

Генетическая конструкция для экспрессии рекомбинантного миостатина в штамме-продуcente E.coli.

*Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»
Боровск, Калужская обл., РФ*

Езерский В.А., Колоскова Е.М.

XVII научно-практическая межрегиональная конференция
«БИОМЕДИЦИНА И БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ»
- 2022 -

**ФГБУН «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»**

Технологии рекомбинантных ДНК позволяют получать и использовать в практической медицине множество белковых и пептидных препаратов, значительно повысив их доступность.

Экспрессия рекомбинантных генов в клетках *E. coli* один из самых распространенных методов для получения рекомбинантных белков.

Рекомбинантный миостатин (pMSTN), обладающий достаточной иммуногенностью в отношении миостатина как антигена, может быть использован для повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот, свиньи, лошади, кролики), птицы за счет индукции синтеза специфических аутоантител к миостатину, блокирования его действия и, как следствие, стимуляции роста мышечной ткани.

Аминокислотная последовательность миостатина идентична у всех сельскохозяйственных животных. **Рекомбинантный миостатин**, как антиген, может стать универсальным средством для повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных, птицы.

Инъекционный препарат **pMSTN** для повышения мышечной массы с/х животных может быть востребован в животноводстве.

Предполагаемый механизм действия **pMSTN** - временное блокирование активности эндогенного миостатина с помощью аутоантител.

Цель:

изучение возможности нейтрализовать действие эндогенного миостатина у овец для повышения мясной продуктивности с использованием иммунологического метода. Иммунизации животных рекомбинантным миостатином с образованием антител к эндогенному белку.

Задачи:

1. Получить **рекомбинантный миостатин**:

- Создать генетическую конструкцию для экспрессии белка рекомбинантного миостатина с иммуногенными свойствами в штамме-продуcente E.coli;
- Получить штамм-продуцент E.coli для экспрессии рекомбинантного миостатина и наработать рекомбинантный белок;
- Иммунизировать овец полученным рекомбинантным миостатином.

2. Разработать **тест-систему** для определения титра антител к миостатину в крови.

- Получить и очистить IgG овцы; получить аффинный сорбент с иммобилизованными овечьими антителами;
- IgG овцы иммунизировать кроликов для получения кроличьих антител против овечьих IgG;
- Получить аффинно очищенные антитела кролик-анти-IgG овцы и их конъюгаты с пероксидазой хрена; оценить качество конъюгата и подобрать рабочее разведение для использования в ИФА;
- Подобрать условия проведения ИФА, оценить иммуногенность рекомбинантного миостатина у иммунизированных овец.

1. **Выбор аминокислотной последовательности рекомбинантного белка .**

База данных GeneBank

Последовательность зрелого белка миостатина овцы (109 ак)

(из NCBI Reference Sequence: NP_001009428.1)

**DFGLDCDEHS TESRCCRYPL TVDFEAFGWD WIIAPKRYKA NYCSGECEFL
FLQKYRHTHL VHQANPKGSA GPCCTPTKMS PINMLYFNGK EQIIYGKIPG
MVVDRCGCS**

Последовательность, кодирующая зрелый белок миостатина овцы

(из NCBI Reference Sequence: NC_056055.1)

**GAT TTT GGG CTT GAT TGT GAT GAG CAC TCC
ACA GAA TCT CGA TGC TGT CGT TAC CCT CTA
ACT GTG GAT TTT GAA GCT TTT GGA TGG GAT
TGG ATT ATT GCA CCT AAA AGA TAT AAG GCC
AAT TAC TGC TCT GGA GAA TGT GAA TTT TTA
TTT TTG CAA AAG TAT CCT CAT ACC CAT CTT
GTG CAC CAA GCA AAC CCC AAA GGT TCA GCC
GGC CCT TGC TGT ACT CCT ACA AAG ATG TCT
CCA ATT AAT ATG CTA TAT TTT AAT GGC AAA
GAA CAA ATA ATA TAT GGG AAG ATT CCA GGC
ATG GTA GTA GAT CGC TGT GGG TGC TCA**

2. Оптимизация кодонов последовательности рекомбинантного белка для экспрессии

Для экспрессии белка в E. Coli некоторые кодоны являются редкими, что может ограничивать эффективность синтеза рекомбинантного белка

Codon Usage Tables

Codon Usage Table: Escherichia coli

Green = preferred codon

Second Position

		T	C	A	G	
First Position	T	TTT → Phe (F) 0.58	TCT → Ser (S) 0.14	TAT → Tyr (Y) 0.57	TGT → Cys (C) 0.45	T
		TTC → Phe (F) 0.42	TCC → Ser (S) 0.15	TAC → Tyr (Y) 0.43	TGC → Cys (C) 0.55	C
		TTA → Leu (L) 0.13	TCA → Ser (S) 0.14	TAA → * 0.59	TGA → * 0.33	A
		TTG → Leu (L) 0.13	TCG → Ser (S) 0.15	TAG → * 0.08	TGG → Trp (W) 1.00	G
	C	CTT → Leu (L) 0.11	CCT → Pro (P) 0.17	CAT → His (H) 0.58	CGT → Arg (R) 0.36	T
		CTC → Leu (L) 0.10	CCC → Pro (P) 0.13	CAC → His (H) 0.42	CGC → Arg (R) 0.37	C
		CTA → Leu (L) 0.04	CCA → Pro (P) 0.19	CAA → Gln (Q) 0.33	CGA → Arg (R) 0.07	A
		CTG → Leu (L) 0.49	CCG → Pro (P) 0.51	CAG → Gln (Q) 0.67	CGG → Arg (R) 0.11	G
	A	ATT → Ile (I) 0.50	ACT → Thr (T) 0.17	AAT → Asn (N) 0.47	AGT → Ser (S) 0.16	T
		ATC → Ile (I) 0.40	ACC → Thr (T) 0.41	AAC → Asn (N) 0.53	AGC → Ser (S) 0.27	C
		ATA → Ile (I) 0.09	ACA → Thr (T) 0.15	AAA → Lys (K) 0.76	AGA → Arg (R) 0.05	A
		ATG → Met (M) 1.00	ACG → Thr (T) 0.27	AAG → Lys (K) 0.24	AGG → Arg (R) 0.03	G
	G	GTT → Val (V) 0.26	GCT → Ala (A) 0.16	GAT → Asp (D) 0.63	GGT → Gly (G) 0.33	T
		GTC → Val (V) 0.21	GCC → Ala (A) 0.27	GAC → Asp (D) 0.37	GGC → Gly (G) 0.39	C
		GTA → Val (V) 0.16	GCA → Ala (A) 0.22	GAA → Glu (E) 0.68	GGA → Gly (G) 0.12	A
		GTG → Val (V) 0.37	GCG → Ala (A) 0.35	GAG → Glu (E) 0.32	GGG → Gly (G) 0.16	G

Third Position

Print...

Format: DNA GCA → Ala (A)

Поиск редких для E. Coli кодонов на доступном специализированном веб-сервисе <http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html>

GAT TTT GGG CTT GAT TGT GAT GAG CAC TCC ACA GAA TCT CGA TGC TGT CGT TAC CCT CUA ACT GTG
GAT TTT GAA GCT TTT GGA TGG GAT TGG ATT ATT GCA CCT AAA AGA TAT AAG GCC AAT TAC TGC TCT GGA
GAA TGT GAA TTT TTA TTT TTG CAA AAG TAT CCT CAT ACC CAT CTT GTG CAC CAA GCA AAC CCC AAA GGT
TCA GCC GGC CCT TGC TGT ACT CCT ACA AAG ATG TCT CCA ATT AAT ATG CUA TAT TTT AAT GGC AAA GAA
CAA AUA AUA TAT GGG AAG ATT CCA GGC ATG GTA GTA GAT CGC TGT GGG TGC TCA

The Number of Bases in the above Sequence = 327

The Number of Codons in the above Sequence = 109

Amino Acid	Rare Codon	Frequency of Occurrence
Arginine	CGA	1
	GGG	0
	AGG	0
	AGA	1
Glycine	GGA	2
	GGG	3
Isoleucine	AUA	2
Leucine	CUA	2
Proline	CCC	1
Threonine	ACC	0

Вывод: ПЦР-амплификация нуклеотидной последовательности зрелого белка не подходит для получения штамма-продуцента рекомбинантного белка. Необходим синтетический ген с оптимизированной последовательностью.

2. Заказ «синтетического гена» в специализированной фирме

Предложенный нам сиквенс:

ggatccGACTTTGGCTTGGATTGTGATGAACACAGTACTGAGTCTCGCTGTTGT**AGG**TATCCAC
TGACAGTTGACTTTGAAGCGTTTGGCTGGGATTGGATCATTGCTCCGAAACGCTACAAAGCGAA
CTACTGCAGTGGTGAGTGTGAGTTTCTGTTTCTGCAGAAGTATCCTCACACACATCTTGTCCAT
CAAGCGAATCCGAAAGGCTCAGCTGGTCCGTGCTGCACACCGACCAAGATGAGTCCGATCAACA
TGCTGTA CTTCAACGGCAAAGAACAGATCATCTATGGCAAGATTCCAGGCATGGTTGTGGATCG
TTGTGGCTGCAGC**taactcgag**

Результаты проверки показали присутствие мало используемого для аргинина кодона AGG – 0,03 (скриншот окна программы Caltor)

Amino Acid	Rare Codon	Frequency of Occurrence
Arginine	CGA	0
	CGG	0
	AGG	1
	AGA	0
Glycine	GGA	0
	GGG	0
Isoleucine	AUA	0
Leucine	CUA	0
Proline	CCC	0
Threonine	ACG	0

Оптимизированная последовательность

ggatccGACTTTGGCTTGGATTGTGATGAACACAGTAC
TGAGTCTCGCTGTTGT**CGT**TATCCACTGACAGTTGACT
TTGAAGCGTTTGGCTGGGATTGGATCATTGCTCCGAAA
CGCTACAAAGCGAACTACTGCAGTGGTGAGTGTGAGTT
TCTGTTTCTGCAGAAGTATCCTCACACACATCTTGTCC
ATCAAGCGAATCCGAAAGGCTCAGCTGGTCCGTGCTGC
ACACCGACCAAGATGAGTCCGATCAACATGCTGTA CTT
CAACGGCAAAGAACAGATCATCTATGGCAAGATTCCAG
GCATGGTTGTGGATCGTTGTGGCTGCAGC**taactcgag**

Сайты для клонирования в pET28(+): **ggatcc** –XhoI, **ctcgag** – BamHI

3. Выбор бактериального вектора для клонирования «синтетического гена»

pET-28a(+)

Бактериальный вектор для экспрессии N-терминированных 6xHis- тэгированных белков с тромбиновым сайтом

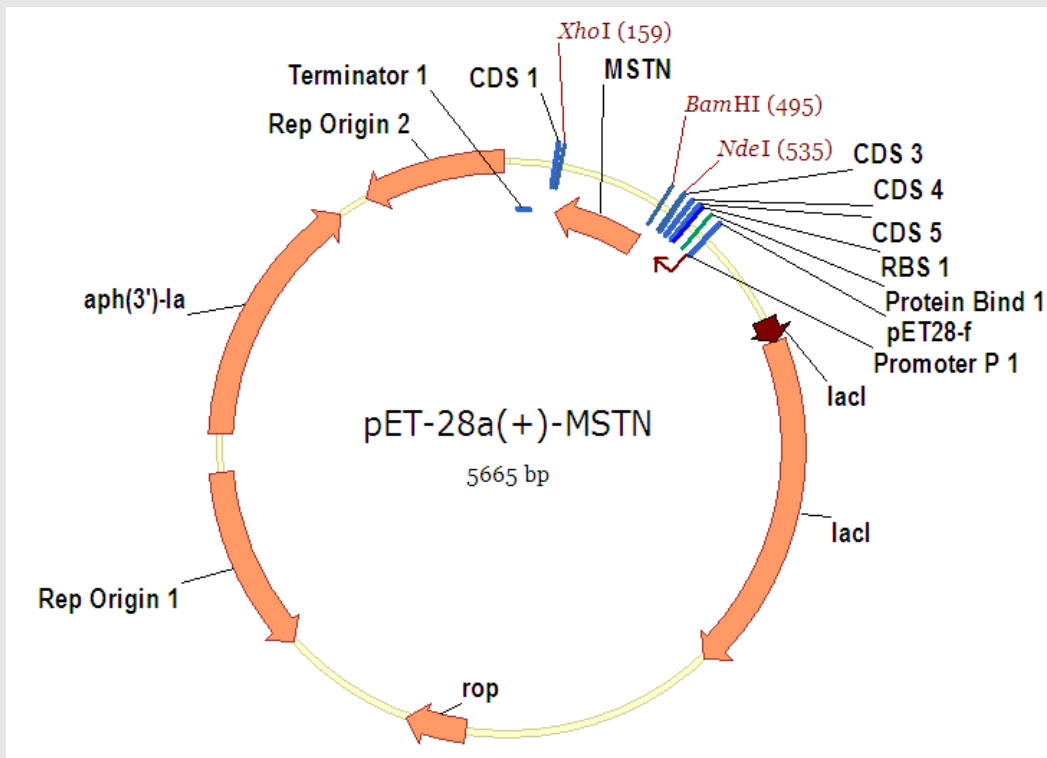


Реконструированная в Vector NTI плазида

Желтым выделена
последовательность MSTN, в
красной рамке 6xHis,
подчеркнуто – T7 tag

Размер рекомбинантного белка
 $429:3=143$ ак $\times 110=15\,730$ Да

Плазида,
трансформированная в штамм-
продуцент E.coli, даст нужный
белок для очистки на Ni-
сефарозе.



--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Последовательность рекомбинантного белка

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSDFGLDCDEHSTESRCCRY
PLTVDFEAFGWDWIIPKRYKANYCSGECFLFLQKYPHTHLVHQANPKGSA
GPCSTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPGMVVDRCGCS*

Аффинные тэги (пептидные последовательности, усиливающих растворимость экспрессируемого белка): **6xHis** (лиганд – Ni²⁺---сефароза, Ni²⁺-NTA агароза, элюирование 20–250 мМ имидазол, низкий pH), емкость аффинных сорбентов для металлохелатной хроматографии (например, Ni-NTA агароза, Ni-IDA-сефароза) составляет до 40 мг рекомбинантного белка на 1 мл сорбента.

Тег T7 - первые 11 ак белка 10 гена фага T7: эпитоп, который может быть обнаружен иммунологически, очистка на иммуноаффинной колонке.

Тромбиновый сайт - узнавание протеиназой и гидролиз

Миостатин – зрелый белок

Эффективность трансляции может зависеть от доступности тРНК, узнающих редкие для *E. coli* кодоны. Для трансляции белков с редко встречающимися кодонами (эукариотические белки) разработаны экспрессионные штаммы, несущие гены, кодирующие дополнительные тРНК.

Пример: *E. coli* BL21-CodonPlus (вариант RIL), содержит дополнительные копии генов, редких для *E. coli* тРНК, узнающих кодоны AGG и AGA (Arg), CUA (Leu), AUA (Ile). *E. coli* BL21-Rosetta с дополнительными тРНК для кодонов AGG, AGA, CGG (Arg), CUA (Leu), AUA (Ile), CCC (Pro) и GGA (Gly).

4. Выбор бактериального штамма для трансформации и экспрессии рекомбинантного белка

Escherichia coli **BL21 (DE3)** и экспрессирующий вектор **pET** - наиболее репрезентативная система производства рекомбинантного белка.

В *E.coli* BL21 (DE3) экспрессия гена, кодирующего целевой белок (ген находится на плазмиде pET), управляется кодируемой хромосомой РНК-полимеразой бактериофага Т7 (**T7 RNAP**). Т7 RNAP специфически распознает промотор Т7 плазмиды и транскрибируется в восемь раз быстрее, чем RNA-полимераза *E. coli*.

Ген, кодирующий Т7 RNAP, регулируется изопропил β -D-1-тиогалактопиранозид (**IPTG**) - индуцибельным промотором lacUV5 (P_{lacUV5}). Клетки не способны гидролизовать IPTG, для эффективной индукции требуется низкая концентрация 0,1–2,0 мМ

Таким образом создается система сверхэкспрессии рекомбинантного белка: чем больше синтезируется мРНК, тем больше белка может быть произведено. Однако эта система не подходит для токсичных рекомбинантных белков.

Две стадии производства рекомбинантных белков *E. Coli* BL21 (DE3):

1. Нарботка биомассы в стадии роста
2. Стадия производства белка под действием индуктора (IPTG).

Что дальше?

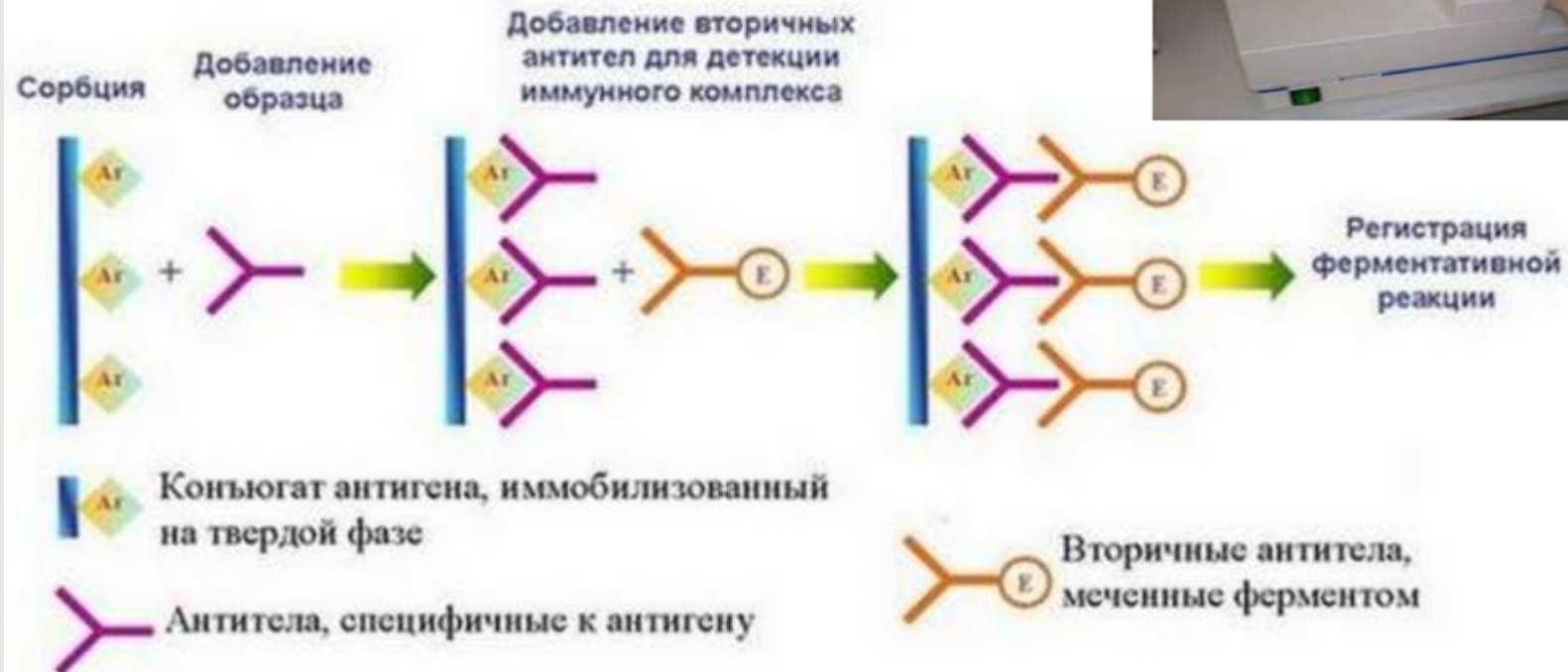
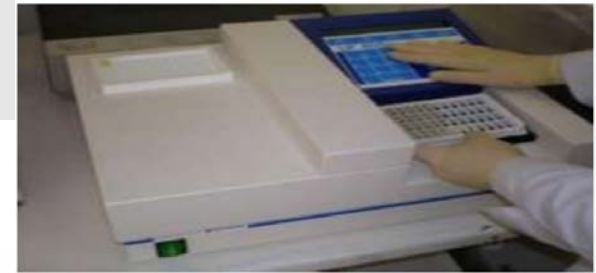
Полученным **рекомбинантный миостатином** будут иммунизированы овцы, у которых будет оценена иммуногенность полученного белка.

А для этого требуется разработать **тест-систему** для определения титра антител к миостатину в крови.

Предстоит:

- Получить и очистить IgG овцы; получить аффинный сорбент с иммобилизованными овечьими антителами;
- IgG овцы иммунизировать кроликов для получения кроличьих антител против овечьих IgG;
- Получить аффинно очищенные антитела кролик-анти-IgG овцы и их конъюгаты с пероксидазой хрена; оценить качество конъюгата и подобрать рабочее разведение для использования в ИФА;
- Подобрать условия проведения ИФА, оценить иммуногенность рекомбинантного миостатина у иммунизированных овец.

Схема ИФА (тест-система)



Пояснения:

Ag, антиген – рекомбинантный миостатин;

Первые антитела, специфичные к рекомбинантному миостатину – образец, сыворотка иммунизированных рекомбинантным миостатином овец;

Вторичные антитела - аффинно очищенные антитела кролик-анти-IgG овцы, конъюгированные с пероксидазой хрена. Субстрат для пероксидазы хрена, например, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; субстратный буфер (содержит перекись водорода).

P.S. Фэйк, курьез или ноу-хау?

В работе «Prokaryotic Expression and Immunogenicity Analysis of Yak Recombinant Myostatin» (2012) китайские исследователи сообщали о получении и очистке рекомбинантного миостатина яка из кишечной палочки.

1. Из скелетных мышц яка выделяли общую РНК и получали кДНК MSTN. Гомология последовательности кДНК MSTN между яком и овцой – 97,3%. **Частота кодонов в кДНК характерна для млекопитающих**
2. Праймеры для кодирующей последовательности зрелого пептида были разработаны на основе кДНК **yak MSTN** (Gene-Банк , регистрационный номер **EU926669.1**). ПЦР-амплификат клонировали в **pMD18-T** . **Частота кодонов в ПЦР-ампликоне характерна для млекопитающих**
3. Плазмиду **MSTN-pMD18-T** и вектор **pET28a(+)** расщепляли двумя рестриктазами, лигировали и трансформировали в *E. coli* JM109 (наработка плазмиды).
4. Вектор экспрессии **MSTN-pET28a(+)** трансформировали в *E. coli* BL21(DE3) и инкубировали с целью наработки **yak MSTN**. **Частота кодонов в в кодирующей последовательности MSTN характерна для млекопитающих**
Т.е., кодирующая последовательность MSTN в векторе экспрессии MSTN-pET28a(+) **не была оптимизирована для эффективной экспрессии в *E. coli* BL21(DE3).**
5. **После выделения** Содержание отличительного белка (с молекулярной массой 16,5 кДа) в общем белке составляло 21% Было установлено, что отличительным белком был белок MSTN яка. Титр антител к MSTN яка в сыворотке кролика составлял 1×32 000.

P.S. Продолжения этой работы не найдено

Спасибо за внимание!

