

Выделение и очистка рекомбинантного миостатина для использования в вакцинах

*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*

Колоскова Е. М., Езерский В.А.

XIX научно-практическая межрегиональная конференция
«БИОМЕДИЦИНА И БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ»
- 2023 -

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

Ген миостатина - **MSTN** (GDF-8) идентифицирован в 1997 году.

У GDF-8 KO мышей было примерно в два раза больше мышц, чем у нормальных.

Миостатин ограничивает гипертрофированный рост мышечной массы. При дегенеративных заболеваниях, травмах и других патологиях мышечной системы, служит потенциальной мишенью для терапевтического воздействия.

Выявлена корреляция между высоким уровнем миостатина и дистрофическими изменениями скелетной мускулатуры.



Миостатин вырабатывается в скелетных мышцах как белок-предшественник (**препропептид**, 375 ак), который расщепляется на N-концевой **пропептид** (243 ак) и C-концевой **зрелый белок** (109 ак). Функциональное состояние: два C-концевых мономеров, связанных двухцепочечной дисульфидной связью между остатками CYS339. Каждый мономер содержит четыре цистиновых узла.

Рекомбинантный миостатин (pMST), обладающий достаточной иммуногенностью в отношении миостатина как антигена, может быть использован для повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы за счет индукции синтеза специфических аутоантител к эндогенному миостатину, блокирования его действия.

Аминокислотная последовательность зрелого миостатина практически идентична у всех сельскохозяйственных животных.

Аминокислотные последовательности зрелого миостатина разных видов ЖИВОТНЫХ И ПТИЦЫ.

	1	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																																																																																																
Human	1	D	F	G	L	D	C	D	E	H	S	T	E	S	R	C	C	R	Y	P	L	T	V	D	F	E	A	F	G	W	D	I	I	A	P	K	R	Y	K	A	N	Y	C	S	G	E	C	E	F	L	F	L	Q	K	Y	P	H	T	H	L	V	H	Q	A	N	P	K	S	A	G	P	C	C	T	P	T	K	M	S	P	I	N	M	L	Y	F	N	G	K	E	Q	I	I	Y	G	K	I	P	A	M	V	V	D	R	C	G	C	S
Mus musculus	1	D	F	G	L	D	C	D	E	H	S	T	E	S	R	C	C	R	Y	P	L	T	V	D	F	E	A	F	G	W	D	I	I	A	P	K	R	Y	K	A	N	Y	C	S	G	E	C	E	F	L	F	L	Q	K	Y	P	H	T	H	L	V	H	Q	A	N	P	K	S	A	G	P	C	C	T	P	T	K	M	S	P	I	N	M	L	Y	F	N	G	K	E	Q	I	I	Y	G	K	I	P	A	M	V	V	D	R	C	G	C	S
Rattus norvegicus	1	D	F	G	L	D	C	D	E	H	S	T	E	S	R	C	C	R	Y	P	L	T	V	D	F	E	A	F	G	W	D	I	I	A	P	K	R	Y	K	A	N	Y	C	S	G	E	C	E	F	L	F	L	Q	K	Y	P	H	T	H	L	V	H	Q	A	N	P	K	S	A	G	P	C	C	T	P	T	K	M	S	P	I	N	M	L	Y	F	N	G	K	E	Q	I	I	Y	G	K	I	P	A	M	V	V	D	R	C	G	C	S
Gallus gallus	1	D	F	G	L	D	C	D	E	H	S	T	E	S	R	C	C	R	Y	P	L	T	V	D	F	E	A	F	G	W	D	I	I	A	P	K	R	Y	K	A	N	Y	C	S	G	E	C	E	F	L	F	L	Q	K	Y	P	H	T	H	L	V	H	Q	A	N	P	K	S	A	G	P	C	C	T	P	T	K	M	S	P	I	N	M	L	Y	F	N	G	K	E	Q	I	I	Y	G	K	I	P	A	M	V	V	D	R	C	G	C	S
Oryctolagus	1	D	F	G	L	D	C	D	E	H	S	T	E	S	R	C	C	R	Y	P	L	T	V	D	F	E	A	F	G	W	D	I	I	A	P	K	R	Y	K	A	N	Y	C	S	G	E	C	E	F	L	F	L	Q	K	Y	P	H	T	H	L	V	H	Q	A	N	P	K	S	A	G	P	C	C	T	P	T	K	M	S	P	I	N	M	L	Y	F	N	G	K	E	Q	I	I	Y	G	K	I	P	A	M	V	V	D	R	C	G	C	S
Bos taurus	1	D	F	G	L	D	C	D	E	H	S	T	E	S	R	C	C	R	Y	P	L	T	V	D	F	E	A	F	G	W	D	I	I	A	P	K	R	Y	K	A	N	Y	C	S	G	E	C	E	F	L	F	L	Q	K	Y	P	H	T	H	L	V	H	Q	A	N	P	K	S	A	G	P	C	C	T	P	T	K	M	S	P	I	N	M	L	Y	F	N	G	E	Q	I	I	Y	G	K	I	P	A	M	V	V	D	R	C	G	C	S	
Sus scrofa	1	D	F	G	L	D	C	D	E	H	S	T	E	S	R	C	C	R	Y	P	L	T	V	D	F	E	A	F	G	W	D	I	I	A	P	K	R	Y	K	A	N	Y	C	S	G	E	C	E	F	L	F	L	Q	K	Y	P	H	T	H	L	V	H	Q	A	N	P	K	S	A	G	P	C	C	T	P	T	K	M	S	P	I	N	M	L	Y	F	N	G	K	E	Q	I	I	Y	G	K	I	P	A	M	V	V	D	R	C	G	C	S
Capra hircus	1	D	F	G	L	D	C	D	E	H	S	T	E	S	R	C	C	R	Y	P	L	T	V	D	F	E	A	F	G	W	D	I	I	A	P	K	R	Y	K	A	N	Y	C	S	G	E	C	E	F	L	F	L	Q	K	Y	P	H	T	H	L	V	H	Q	A	N	P	K	S	A	G	P	C	C	T	P	T	K	M	S	P	I	N	M	L	Y	F	N	G	K	E	Q	I	I	Y	G	K	I	P	A	M	V	V	D	R	C	G	C	S
Ovis aries	1	D	F	G	L	D	C	D	E	H	S	T	E	S	R	C	C	R	Y	P	L	T	V	D	F	E	A	F	G	W	D	I	I	A	P	K	R	Y	K	A	N	Y	C	S	G	E	C	E	F	L	F	L	Q	K	Y	P	H	T	H	L	V	H	Q	A	N	P	K	S	A	G	P	C	C	T	P	T	K	M	S	P	I	N	M	L	Y	F	N	G	K	E	Q	I	I	Y	G	K	I	P	A	M	V	V	D	R	C	G	C	S

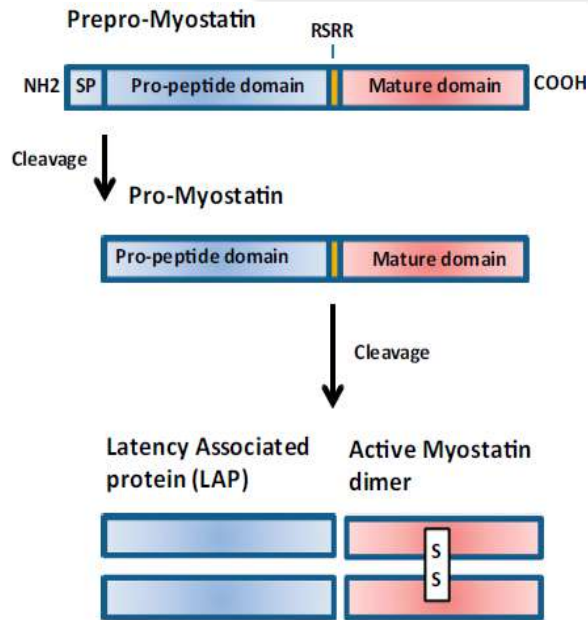
Обозначение	АК	-R (боковой остаток)	Свойства
L	лейцин	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	Нейтральные гидрофобные
V	валин	-CH(CH ₃) ₂	
G	глицин	-H	
A	аланин	-CH ₃	Основные
K	лизин	-(CH ₂) ₄ -NH ₂	
R	аргинин	-(CH ₂) ₃ -NH-C(NH)-NH ₂	

Вид	Ссылка: NCBI, GenPept
Homo sapience	NP_005250.1
Mus musculus	NP_034964
Rattus norvegicus	NP_062024
Gallus gallus	NP_001001461
Oryctolagus cuniculus	NP_001103291
Sus scrofa	NP_999600
Bos taurus	NP_001001525
Capra hircus	NP_001272666
Ovis aries	NP_001009428

Последовательность зрелого миостатина овцы – модель для рМСТ

**DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFLFLQKYPHTHLV
HQA NPKGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPGMVVDRCGCS**

Белок миостатин. Структура, свойства.



Препропептид (375 aa) = сигнальный пептид (SP, 18 aa) + пропептид (248 aa) + домен зрелого белка (109 aa)

Промиостатин (гидролиз по RSRR) = пропептид (LAP, 42 кДа) + активный МСТ (12 кДа).

Активный пептид $\times 2$ = Активный димер (24 Кда).

Пропептид нековалентно блокирует MSTN.

BMP-1, металлопротеиназа, расщепляет неактивный комплекс, высвобождая активный MSTN.

Зрелый МСТ секретируется в межклеточную среду, поступает в плазму крови, где его основная часть находится в комплексе с пропептидом, фоллистатином и фоллистатин родственными белками

Последовательность pMCT (Mw 15 923 Да)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQMGSGDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYC
SGECEFLFLQKYRHTHLVHNQANPKGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPGMVVDRCGCS*

Аффинные тэги:

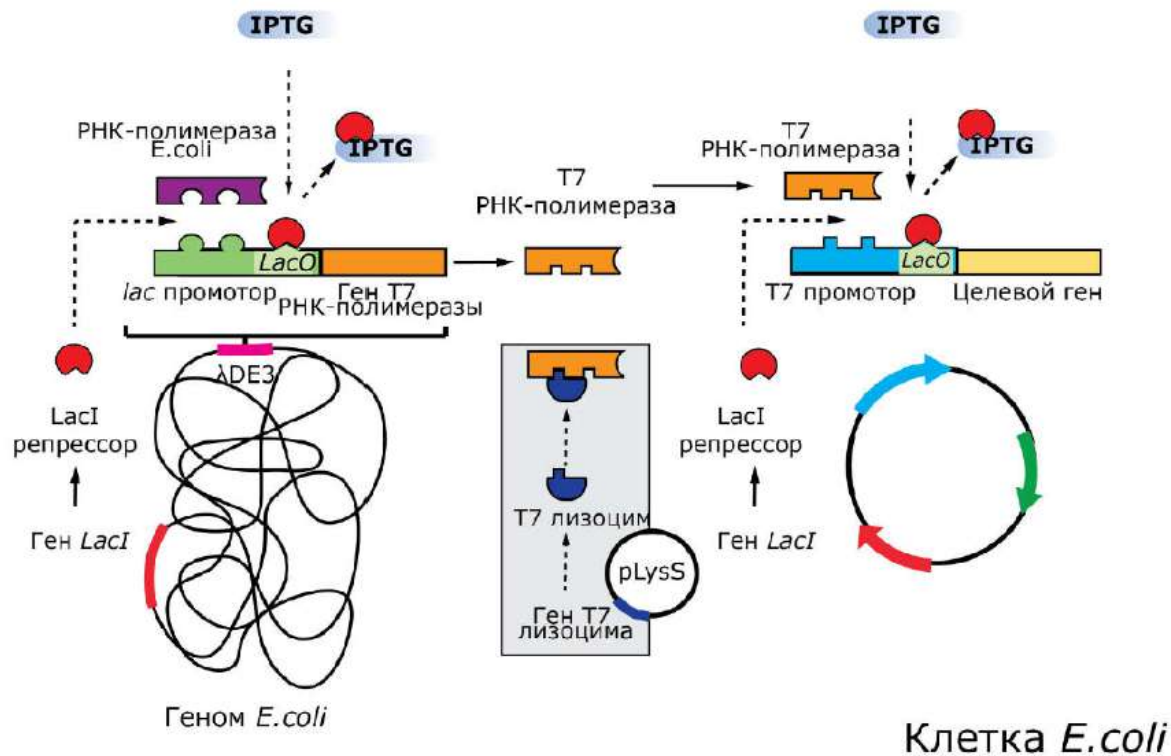
6xHis (лиганд – Ni^{2+} --сефароза, Ni^{2+} -NTA агароза, элюирование 20–250 мМ имидазол, низкий pH), емкость аффинных сорбентов для металлохелатной хроматографии - до 40 мг рекомбинантного белка на 1 мл сорбента.

Тег T7 - первые 11 ак белка 10 гена фага T7: возможна очистка на иммуноаффинной колонке.

Тромбиновый сайт - узнавание протеиназой и гидролиз

Миостатин – зрелый белок

Бактериальный штамм-продуцент



Основа:

E. coli BL21 (DE3),

вектор pET*

***pET-система** (plasmid for expression by T7 RNA polymerase  экспрессионная плазмида на основе бактериофага T7 РНК-полимеразы).

Промотор T7 не распознается бактериальной полимеразой.

Ген T7 РНК-полимеразы (**T7 RNAP**), распознающей T7 промотор, внедрен в геном *E. coli* в виде профага λ DE3 под контролем *lacUV5* промотора (штаммы с обозначением «DE3»). Ген T7 RNAP индуцируется продуктом метаболизма **лактозы** или не метаболизируемым изопропил β -D-1-тиогалактопиранозидом (**IPTG**).

T7 РНК-полимераза способна транскрибировать со скоростью в 5 раз быстрее, чем РНК полимеразы *E. coli*

Получение и очистка pMCT

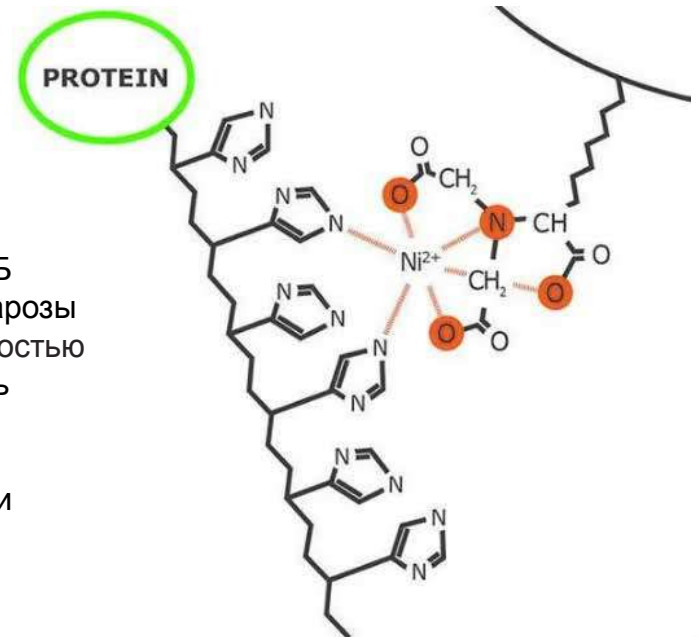
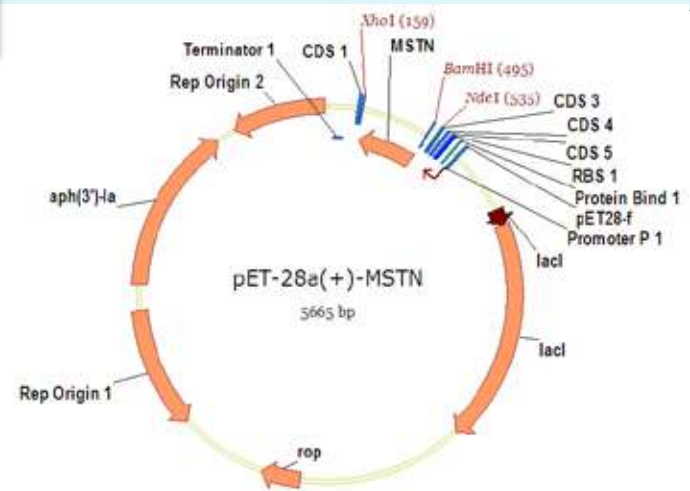
Основные этапы:

1. Получена плазмида **pET28-MSTN**.
2. Плазмидой **pET28-MSTN** трансформировали штамм **E.coli. BL21 (DE3)**.
3. Штамм-продуцент **E.coli BL21/pET28-MSTN** при культивировании в ЛБ-среде с канамицином индуцируется ИПТГ и синтезирует РБ с высокой эффективностью – до 80 мг/л культуры.
3. **pMCT** очищали в денатурирующих условиях на Ni-сефарозе.

Справка:

Полигистидиновая метка (тэг 6xHis) позволяет проводить очистку РБ методом **металл-аффинной хроматографии** – с помощью Ni-агарозы (сефарозы). В денатурирующих условиях 6xHis тэг становится полностью доступен для связывания с Ni-сефарозой, уменьшается вероятность неспецифического взаимодействия сорбента с другими белками.

Емкость аффинных сорбентов для металлохелатной хроматографии составляет до 40 мг РБ на 1 мл сорбента



Подбор условий культивирования. Проверка индукции синтеза РБ.

При использовании индуцируемого промотора подбирают параметры индукции: оптимальную плотность жидкой культуры, при которой следует добавлять индуктор, концентрацию индуктора и время инкубации с индуктором.

Эти параметры индивидуальны для каждой экспрессионной системы.

Учитывали следующие факторы:

- 1) доля рМСТН в суммарном бактериальном белке,
- 2) содержание РБ в общем объеме клеточной культуры.

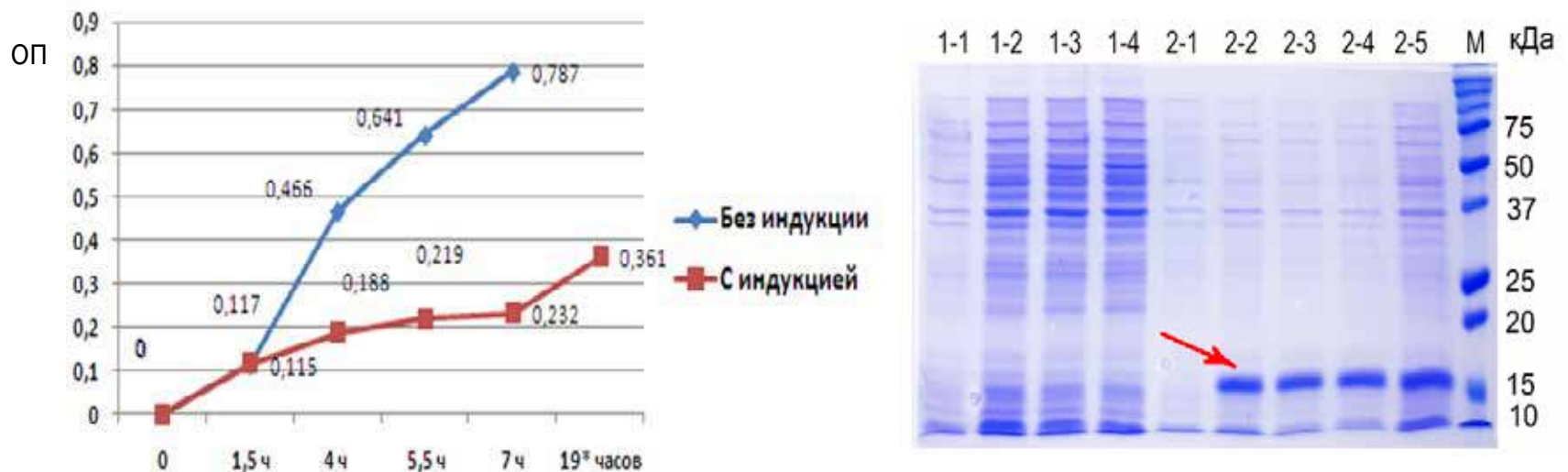


Рис.1. **Динамика роста культуры-продуцента в зависимости от внесения ИПТГ (слева). Определение экспрессии рМСТ методом ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях (1% SDS) (справа).**

Пробы 1-1, 1-2, 1-3 и 1-4 – без индукции, пробы 2-1, 2-2, 2-3, 2-4 и 2-5 -ИПТГ-индукция.

Образцы 1-1 и 2-1 взяты в момент введения ИПТГ (1,5 часа), при одинаковой плотности культуры.

Красной стрелкой обозначена полоса рМСТ.

Примечание: ось абсцисс – время культивирования. 19* часов – из них 12 часов при 22°C. ПААГ электрофорез - 12,5%.

Влияние времени введения ИПТГ на эффективность экспрессии рМСТ

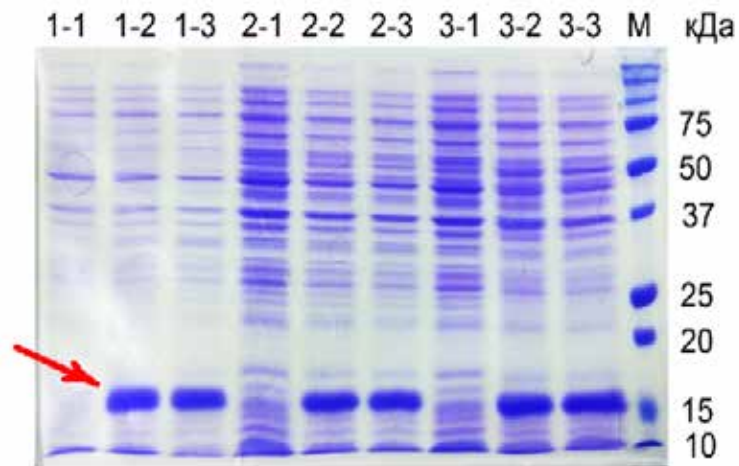
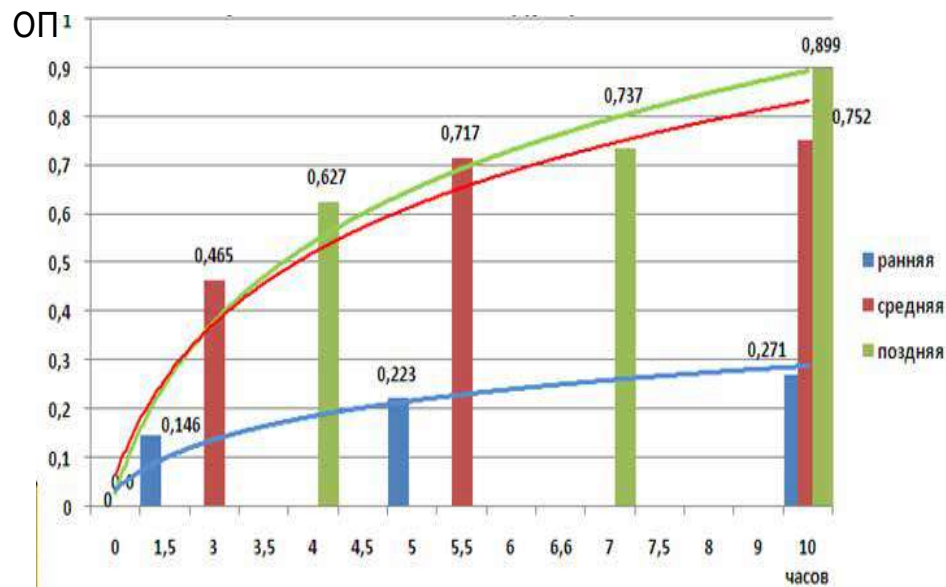


Рис.2. - Динамика роста культуры-продуцента в зависимости от времени внесения ИПТГ (слева). Эффективность экспрессии рМСТ: SDS-ПААГ электрофорез (12,5%) образцов клеточных суспензий (справа)

Ранняя индукция – внесение ИПТГ при 0,146 о.е. / пробы 1-1, 1-2 и 1-3 – 1,5 ч., 5 и 10 часов культивирования соответственно;

средняя индукция – 0,465 о.е. / пробы 2-1, 2-2 и 2-3 – 3, 5,5 и 10 часов культивирования;

поздняя индукция - 0,627 о.е. / пробы 3-1, 3-2 и 3-3 - 4, 7 и 10 часов культивирования;

Очистка pMST.

1. Нарботанную ИПТГ-индуцированную культуру *E. coli* BL21/pET28-MSTN центрифугировали.
2. Осадок ресуспендировали в лизирующем буфере (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM имидазол, pH 8,0), охлаждали на льду, вносили **лизоцим** до 1 мг/мл. Смесь инкубировали на льду 30 мин, обрабатывали ультразвуком.
3. Суспензию центрифугировали при 10000g, 10°C, 35 мин. Осадок ресуспендировали в **денатурирующем буфере** с высоким содержанием мочевины (20 mM Трис-HCl, 0,5 M NaCl, 8 M мочевина, 20 mM имидазол, 5 mM 2-меркаптоэтанол, pH 7,9).
4. Суспензию брабатывали **ультразвуком**, центрифугировали.
5. Осветленный лизат вносили в колонку с **Ni-сефарозой**, уравновешенную тем же буфером. Носитель со связанным белком промывали до выхода ОП₂₈₀ на плато. РБ последовательно снимали буфером с возрастающим содержанием имидазола 50, 200 и 500 mM.

Очистка рМСТ.

1. Нативный лизат почти не содержит РБ (фото 1, дор.1).
2. Осадок содержит РБ в виде **тельца включения**: растворяются только в денатурирующих условиях в буфере с 8 М мочевиной и обработкой ультразвуком (дор.2).
3. Хроматография. Осветленный центрифугированием р-р (тельца включения в денатурирующем буфере) пропускали через Ni-колонку. Связанный с носителем рМСТ последовательно снимали буфером с возрастающей концентрацией имидазола - от 50 до 500 мМ (дор. 4-6, 8-10).
4. В проскоке - незначительное количество рМСТ(дор.3).

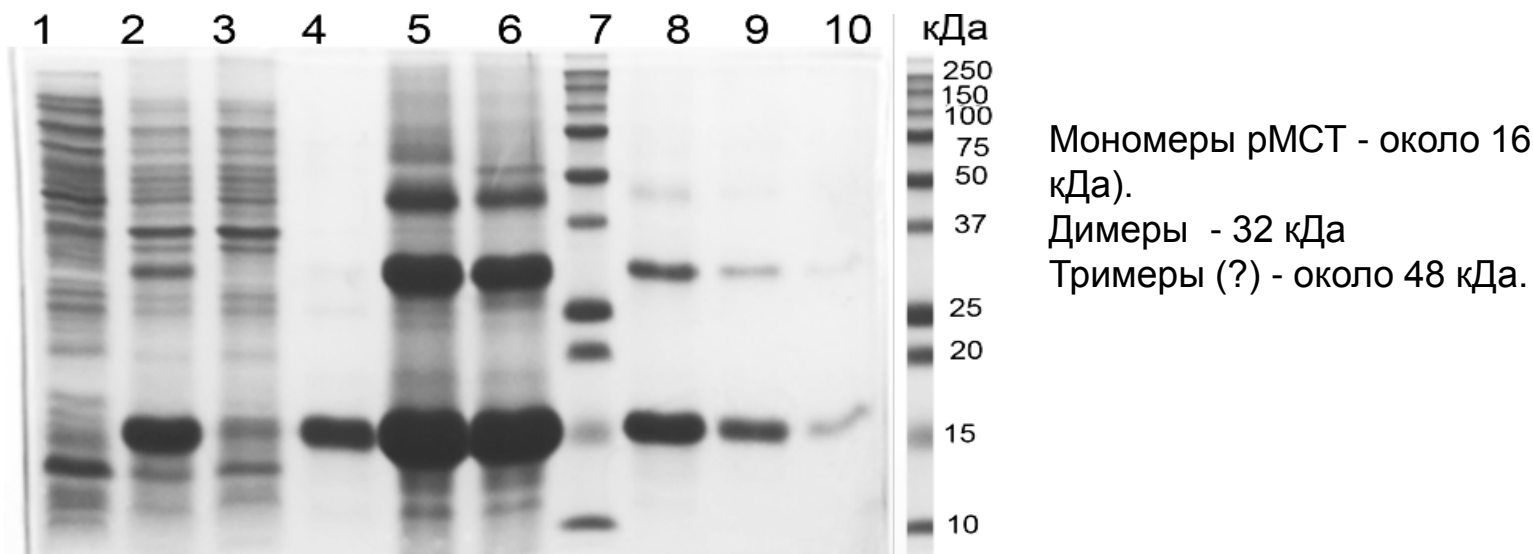


Рис.3. **SDS-ПААГ электрофорез (15%) образцов, взятых на разных стадиях очистки рМСТ.** Дор.7 и справа – маркер белковых масс.

Оценка растворимости рМСТ

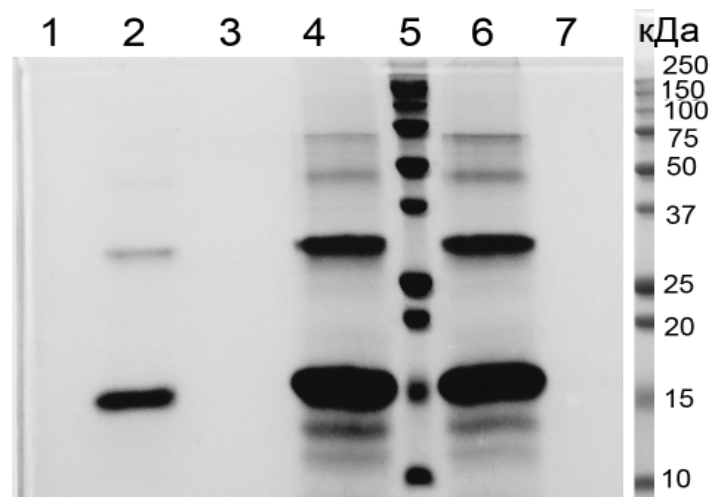
Диализ очищенного рМСТ, растворенного в 8 м мочеvine (рис.4, дор. 2), проводили с целью избавиться от мочевины и имидазола, перевести РБ в растворенном виде в один из стандартных буферов, используемых в том числе для выполнения ИФА.

Диализ проводили в течение суток при 8°C против двух буферов:

- ФБС (20 mM NaH_2PO_4 , 0,15 M NaCl; pH 7,4)
- бикарбонатного буфера (0,1 M NaHCO_3 , pH 9,5)

Использовали диализные мембраны с размером пор 12-14 кДа.

Содержимое диализных мешков центрифугировали, определяли ОП_{280} в осадке и растворе методом Брэдфорд.



Результат:

1. В проверенных буферах рМСТ не растворяется: в надосадочной жидкости содержимого диализных мешков белок не обнаружен (дор. 3 и 7 соответственно).
2. Весь рМСТ находился в осадке (дор. 4 и 6).
3. Была обнаружена тенденция к полимеризации рМСТН: появление полос, соответствующих ди-, три- и тетрамерам (32, 48 и 64 кДа), и к частичному гидролизу белка, выразившемуся в появлении полос с массой, меньшей, чем у мономера.

Рис.5. SDS-ПААГ электрофорез (15%) образцов, взятых при проведении диализа рМСТ, выделенного при денатурирующей очистке. Дор. 5 – маркер белковых масс.

Выводы:

- Экспрессия рМСТ индуцированной культурой *E. coli* BL21/pET28-MSTN приводит к синтезу большого количества РБ (до 80 мг из 1 л).
- Синтезированный рМСТ нарабатывается в виде нерастворимых в стандартных буферах телец включения, что требует очистки в денатурирующих условиях с использованием гуанидина или мочевины в составе буферов.
- Полученный в составе телец включения из культуры-продуцента, индуцированной на ранних стадиях роста, рМСТ даже без выделения на аффинном сорбенте обладает чистотой, достаточной для использования при иммунизации животных.
- Очищенный на Ni-сефарозе рМСТ представлен преимущественно в мономерной форме, ди- и небольшими количествами три- и тетрамеров. Средняя молекулярная масса рекомбинантного белка, определенная ПААГ электрофорезом в денатурирующих условиях, соответствовала рассчитанной 15,9 кДа.
- Высокое содержание цистеина в молекуле рМСТ (9 из 109 аминокислот зрелого миостатина или 143-х – рекомбинантного белка) способствует образованию не только внутри-, но и межмолекулярных дисульфидных связей: на ПААГ электрофореграмме присутствуют полосы, соответствующие 32, 48 и 64 кДа.
- Высокая концентрация рМСТ в денатурирующем буфере с 8М мочевиной позволяет при формировании вакцин для иммунизации животных уменьшить содержание в ней мочевины разбавлением концентрата рМСТ до нужной концентрации.



Спасибо
за
внимание!