

УДК 577.218

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПРОДУЦЕНТ СОМАТОЛИБЕРИНА КУРИЦЫ НА ОСНОВЕ БАЦИЛЛ

^{1,2,3}Белякова А.В., ³Эпова Е.Ю., ⁴Гра О.А., ^{2,4}Зылькова М.В., ^{2,5}Плаксина А.Г.,
²Смирнова М.С., ⁶Елагина Е.М., ^{2,7}Филимонова Н.А., ⁵Хасанова А.Р.,

⁵Смирнова А.В., ⁵Казеева Т.Н., ^{2,7}Шибеева А.В., ²Шевелев А.Б., ^{3,5}Алешин В.В.
¹ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных»,
Казань, e-mail: mary.zyl@mail.ru;

²ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им М.П. Чумакова» РАМН, РФ,
Московская обл. поселок сельского типа Институт полиомиелита;

³ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии имени К.И. Скрябина», Москва;

⁴ФГБОУ ВПО «Московский педагогический государственный университет», Москва;

⁵ФГБОУ ВПО «Набережночелнинский институт социально-педагогических
технологий и ресурсов», Набережные Челны;

⁶ГОУ ВПО «Смоленский государственный университет», Смоленск;

⁷УРАН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля», Москва

Разработка методов перорального введения пептидных ростовых факторов сельскохозяйственным животным, в частности, в составе рекомбинантных пробиотических препаратов, может рассматриваться в качестве перспективного подхода к снижению себестоимости животноводческой продукции и обеспечения конкурентоспособности ее производства. Одним из наиболее эффективных в этом отношении средств является соматолиберин – релизинг-фактор гормона роста. В связи с этим целью работы было создание новых векторных систем для экспрессии полусинтетических генов соматолиберина курицы, способных стабильно функционировать в составе бациллярных штаммов со свойствами пробиотиков. Получены три конструкции, содержащие промотор гена *wprA*, мини-ген E-пептида и производные гена соматолиберина, кодирующие либо пептид-предшественник (слитые GHRH и PACAP), либо фрагменты, соответствующие изолированным пептидным гормонам GHRH и PACAP. Сконструированы штаммы *B. subtilis*, несущие эти конструкции. Таким образом, созданы перспективные продуценты пептидных гормонов, позволяющие проводить испытания биологической активности живых пробиотических препаратов, содержащих производные соматолиберина птицы во внутриклеточной форме, путём их перорального введения.

Ключевые слова: птицеводство, анаболический эффект, соматолиберин, *B. subtilis*, SLN, GHRH, PACAP

RECOMBINANT PRODUCER OF CHICKEN SOMATOLIBERIN IN BACILLI

^{1,2,3}Belyakova A.V., ³Eпова E.Y., ⁴Gra O.A., ^{2,4}Zylkova M.V., ^{2,5}Plaksina A.G.,
²Smirnova M.S., ⁶Elagina E.M., ^{2,7}Filimonova N.A., ⁵Khasanova E.R., ⁵Smirnova A.V.,
⁵Kazeeva T.N., ^{2,7}Shibaeva A.V., ²Shevelev A.B., ^{3,5}Aleshin V.V.

¹Federal Center for Toxicological and Radiation Safety of Animals, Kazan, e-mail: mary.zyl@mail.ru;

²Federal State Budgetary Institution «Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis»
of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow region, community of Institute of poliomyelitis;

³Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology by K.I. Skryabin, Moscow;

⁴Moscow Pedagogical State University, Moscow;

⁵Naberezhnye Chelny Institute for social and pedagogic technologies and resources, Naberezhnye Chelny;

⁶Smolensk state university, Smolensk;

⁷Emanuel Institute of Biochemical Physics, Moscow

Establishing methods of per ore administration of peptide growth factors to farm animals within recombinant probiotic preparations may be suggested as an approach to reducing production cost of animal breeding and elevating its economic efficiency. Somatoliberin (GHRH, growth hormone releasing hormone) is one of the most promising compounds. In this respect, a new genetically sustainable vector system for semi-synthetic chicken somatoliberin gene expression in probiotic bacillary strains was designed. It includes *wprA* gene promoter, E-peptide min-gene and somatoliberin gene derivatives are engineered. Three expression constructs encoding either GHRH+PACAP common precursor, or fragments corresponding to the mature peptide hormones GHRH and PACAP were assembled. *B. subtilis* strains bearing these constructs in the chromosome were obtained. Therefore prospective peptide hormone producer strains suitable for testing biological activity of probiotics preparations bearing chicken somatoliberin up on per ore administration were obtained.

Keywords: poultry, anabolic effect, somatoliberin, *B. subtilis*, SLN, GHRH, PACAP

В настоящее время применение стимуляторов роста на птицеводческих предприятиях приобрело массовый характер и является важнейшим фактором снижения

себестоимости продукции и обеспечения ее конкурентоспособности в условиях быстрого роста производства. В то же время получение очищенных субстанций росто-

вых факторов, пригодных для парентерального применения, остается дорогостоящим в применении и требует длительных сроков на разработку. В результате птицеводческим хозяйствам приходится прибегать к массовому применению потенциально опасных для потребителя химических средств стимулирования роста: синтетическим стероидным гормонам [3]. Экономически эффективной и безопасной для человека альтернативой этому укоренившемуся на практике подходу является разработка живых вакцин и продуцентов ростовых факторов на базе полностью безопасных микроорганизмов, обладающих естественной антагонистической активностью к энтеропатогенам, в частности, мезофильных видов бацилл [5]. Этот подход не является полностью новым: в течение многих лет он оправдывает себя в ходе применения пробиотических штаммов, большинство из которых являются природными продуцентами бактерицидных пептидов.

Эти штаммы представляют собой экономически эффективный и полностью безопасный заменитель антибиотиков. Применение таких штаммов в качестве добавки в корм вызывает пролонгированный эффект подавления патогенной микрофлоры, в то же время, улучшая метаболический потенциал среды кишечника за счет синтеза витаминов, полисахаридов и других биологически активных веществ. В совокупности применение пробиотиков в птицеводстве существенно снижает смертность поголовья, приводя к повышению суточных привесов [5]. Введение в геном эффективных пробиотических штаммов бацилл генов ростовых факторов, в частности, гена соматолиберина, может существенно дополнить и расширить лечебно-профилактический эффект от их применения, практически не увеличивая затраты на получение препаратов по сравнению с традиционными штаммами.

Существенным фактором, осложняющим практическое использование потенциала пробиотических препаратов на основе бацилл, является несовершенство экспрессионных систем введения чужеродных генов в эти микроорганизмы. Существующие плазмидные векторы для бацилл не обладают достаточной репликативной и физиологической стабильностью. Кроме того, введение в организм сельскохозяйственных животных внехромосомных генетических элементов нежелательно с точки зрения биобезопасности [6].

Целью настоящей работы явилось создание новых векторных систем для экспрессии полусинтетических генов соматолиберина курицы, способных стабильно

функционировать в составе бациллярных штаммов при получении бактериального препарата пробиотического назначения в промышленных условиях и пригодного для применения на отечественных птицеводческих предприятиях.

Материалы и методы исследования

Для конструирования рекомбинантных пробиотических штаммов бацилл был разработан и синтезирован вариант гена соматолиберина курицы, оптимизированный для экспрессии в бактериях. Для этого с помощью ПЦР из генома курицы были клонированы два экзона гена соматолиберина [4], которые затем были сшиты и введены в состав вектора pQE30 (Qiagen, США). Геномная ДНК курицы была выделена из мышечной ткани методом фенольной экстракции [2, 7]. Полученная базовая конструкция pQE-SLN была использована для амплификации искусственных генов, кодирующих производные предшественника соматолиберина (пептиды GHRH и PACAP) с последующим введением ПЦР-продуктов желаемой последовательности в состав вектора pQE30 и получением конструкций pQE-GHRH и pQE-PACAP. Полученные конструкции использовали для получения интегративных векторов для экспрессии в клетках *B. subtilis*. Для этого в конструкцию pQE-SLN вводили промотор гена *WprA B. subtilis* и мини-ген E-пептида устойчивости к эритромицину. Правильность трансгенной вставки контролировали посредством прямого секвенирования.

Результаты исследования и их обсуждение

На основании известной интрон-экзонной организации гена соматолиберина курицы были сконструированы две пары праймеров SLN1-SLN2 и SLN3-SLN4 (рис. 1). Праймеры позволяли получить ген соматолиберина, кодирующий полноразмерный зрелый гормон без пропептида и секреторного лидера, аминокислотная последовательность которого соответствует сплайсоформе I первичного транскрипта. На 5'-конец праймера SLN3 была введена последовательность из 20 нуклеотидов, комплементарная праймеру SLN2, что позволяло продуктам ПЦР, полученным с использованием праймеров SLN2 и SLN3, взаимно отжигаться друг с другом. С помощью пары праймеров SLN1-SLN2 на матрице геномной ДНК курицы был получен продукт размером 104 п.н., включающий последовательность II экзона гена соматолиберина, а с помощью пары праймеров SLN3-SLN4 – продукт размером 241 п.н., соответствующий III экзону того же гена.

Первичные продукты ПЦР были очищены элюцией из агарозного геля, объединены и использованы в качестве матрицы для проведения ПЦР с праймерами SLN1-SLN4. В результате был получен продукт размером 325 п.н. После элюции из агароз-

ного геля он был обработан рестриктазами *Bam*HI и *Sall*. В итоге была отобрана конструкция рQE-SLN, содержащая ген соматолиберина желаемой последовательности.

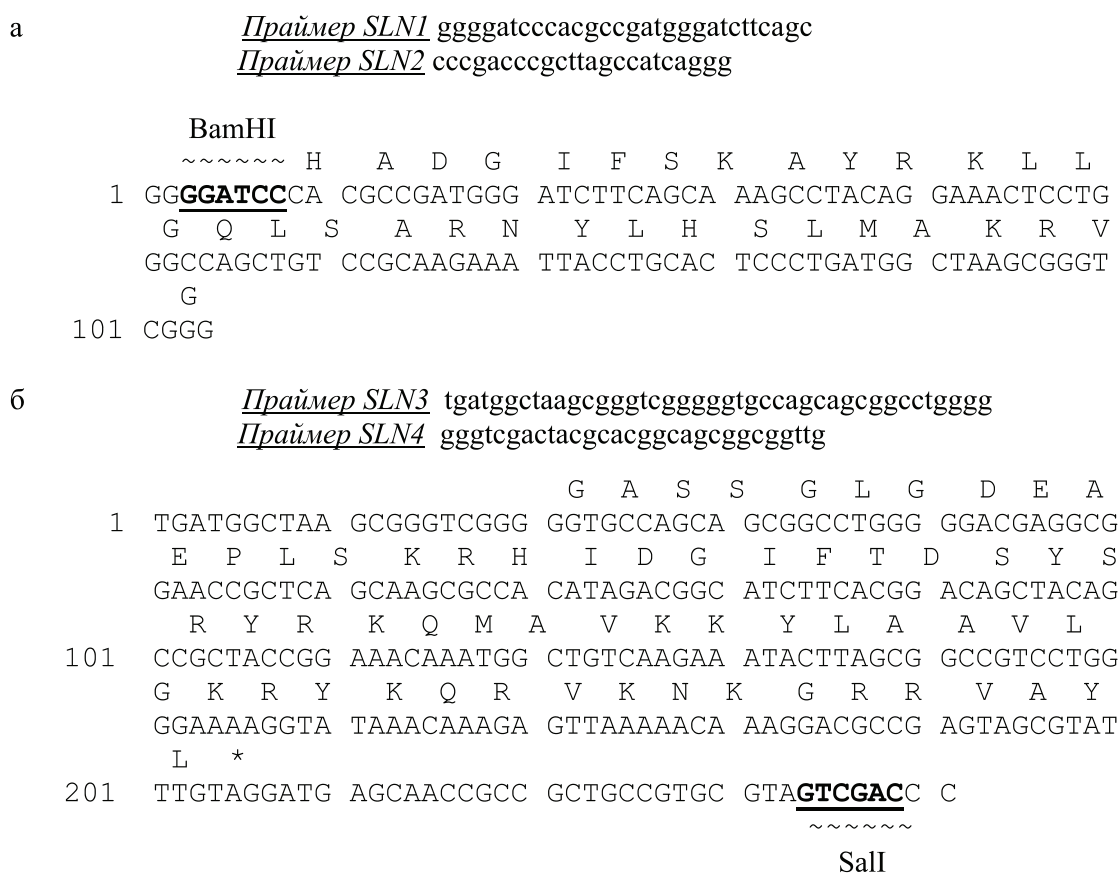


Рис. 1. Последовательности праймеров для амплификации II (а) и III (б) экзонов гена соматолиберина курицы, кодирующих полноразмерный зрелый гормон, с указанием полученных ПЦР-продуктов. Здесь и далее последовательности экзонов выделены серым цветом, сайты рестрикции выделены жирным шрифтом и подчеркнуты

Полученная конструкция рQE-SLN дала высокую продукцию рекомбинантного белка, который был очищен до гомогенного состояния. Поскольку максимальная эффективность действия соматолиберина достигается только в присутствии агониста – аденилатциклаза-активирующего пептида (PACAP), а в геноме млекопитающих ген PACAP существует независимо от гена соматолиберина (GHRH), разработанную конструкцию рQE-SLN использовали в качестве исходной для получения искусственных генов, кодирующих производные предшественника соматолиберина – пептиды GHRH (рис. 2а) и PACAP (рис. 2б).

На матрице рQE-SLN был проведен ПЦР с праймерами SLN1-SLN102 (размер продукта 156 п. н.) и праймерами SLN101-SLN4 (размер продукта 181 п. н.). После элюции из агарозного геля эти продукты были обработаны рестриктазами *Bam*HI и *Sall* и клонированы в вектор рQE30,

предварительно расщепленный по сайтам *Bam*HI и *Sall*. В итоге были отобраны конструкции рQE-GHRH и рQE-PACAP, содержащие последовательности генов пептидов GHRH и PACAP, соответственно.

Полученные базовые конструкции рQE-SLN, рQE-GHRH и рQE-PACAP были использованы для получения интегративных векторов для экспрессии в клетках *B. subtilis*. Для этого в конструкции вводили промотор гена *WprA B. subtilis*, служивший одновременно плечом для гомологичной рекомбинации при интеграции в геном бактерии, и мини-ген E-пептида, придающий бациллам устойчивость к эритромицину.

ДНК-дуплекс искусственного мини-гена E-пептида был получен с использованием праймеров Em1 и Em2 (рис. 3а) в эквимольном соотношении с последующей достройкой полимеразой *Pfu* или обратной транскриптазой *Mu-MLV* (Promega, США). Далее проводилась обработка

ДНК-дуплекса эндонуклеазой рестрикции *NdeI* с последующим клонированием в вектор рЕТ23, обработанный эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *Ecl136II*. Параллельно

на матрице геномной ДНК *B. subtilis* AJ73 была проведена ПЦР-амплификация фрагмента, содержащего промотор гена *wprA* с праймерами Wpr1 и Wpr2 (рис. 3б).

а

Праймер SLN1 ggggatcccacgccgatgggatcttcagc

Праймер SLN102 gggtcgactagctgagcgggtccgcctcg

BamHI

~~~~~ H A D G I F S K A Y R K L L  
 1 GGGGATCCCA CGCCGATGGG ATCTTCAGCA AAGCCTACAG GAAACTCCTG  
 G Q L S A R N Y L H S L M A K R V  
 GGCCAGCTGT CCGCAAGAAA TTACCTGCAC TCCCTGATGG СТАAGCGGGT  
 G G A S S G L G D E A E P L S

101 CGGGGGTGCC AGCAGCGGCC TGGGGGACGA GGCGGAACCG CTCAGCTAGT

CGACCC

~~~~~

SaII

б

Праймер SLN101 ggggatcccacatagacggcatcttcagc

Праймер SLN4 gggtcgactacgcacggcagcggcggttg

BamHI

~~~~~ H I D G I F T D S Y S R Y R  
 1 GGGGATCCCA CATAGACGGC ATCTTCACGG ACAGCTACAG CCGCTACCGG  
 K Q M A V K K Y L A A V L G K R Y  
 AAACAAATGG CTGTCAAGAA АТАСТТАGCG GCCGTCCTGG GGAAAAGGTA  
 K Q R V K N K G R R V A Y L \*

101 TAAACAAAGA GTTAAAAACA AAGGACGCCG AGTAGCGTAT TTGTAGGATG

AGCAACCGCC GCTGCCGTGC GTAGTCGACC C

SaII

Рис. 2. Последовательности праймеров для амплификации генов пептидных гормонов GHRH (а) и PACAP (б) соматолиберина курицы с указанием полученных ПЦР-продуктов

Далее проводилась обработка продукта ПЦР эндонуклеазами рестрикции *BglII* и *XbaI* и лигирование с плазмидной ДНК конструкции на базе вектора рЕТ23, несущей мини-ген Е-пептида устойчивости к эритромицину (рис. 3в).

После этого осуществлялся перенос фрагмента ДНК, содержащего промотор гена *wprA* и мини-ген Е-пептида, в базовые конструкции рQE-SLN, рQE-GHRH и рQE-PACAP. Для этого проводилась обработка ДНК конструкций эндонуклеазами рестрикции *XhoI* и *EcoRI*, препаративная очистка фрагмента конструкции рЕТ23-*wprA*-mE длиной 999 п.н. элюцией из агарозного геля и последующее лигирование очищенного фрагмента с расщепленной и очищенной фенольной экстракцией плазмидной ДНК конструкций рQE-SLN,

рQE-GHRH или рQE-PACAP. Полученные конструкции рQE-*wprA*-mE-SLN (рис. 4), рQE-*wprA*-mE-GHRH (рис. 5а) и рQE-*wprA*-mE-PACAP (рис. 5б) вводили в клетки штамма *B. subtilis* AJ73 (ВКПМ В-5036) методом химической трансформации [1].

Для детекции трансгенов была выделена геномная ДНК из культур клеток *B. subtilis* AJ73 и проведена ПЦР с использованием разработанных праймеров для получения продуктов амплификации, включающих последовательности фрагментов генов полноразмерного соматолиберина и его предшественников. Аутентичность продуктов ПЦР в виде фрагментов генов полноразмерного зрелого гормона соматолиберина SLN и производных предшественника соматолиберина – пептидов GHRH и PACAP, была проконтролирована прямым секвенированием.



а Праймер Em1 ctcatatggttttgtttgttta  
Праймер Em2 gaattcagctagttaaacaacaacccatagagacc

б Праймер Wpr1 ggagatctcgagcttgatacagacatgtcc  
Праймер Wpr2 ggctagaaggtatcataatttcata

в

XhoI  
**CTCGAG**CTTG GATACGACAT GTCCGATGGG GCCCGTGCTT GTACATAAAT CATCTATTCA  
GGAGCCAGAG CGCCTCAAGG TTGAAACAAG AGTCAACGGC GAGCTGCGCC AATCCGGTTC  
GGCAAGCGAT ATGATCTTTT CCATTCGGGA ATTAATTGAA ACCCTCTCAA AGGGGATGAC  
GCTTGAAGCG GGCGACATTA TTGCCACCGG TACGCCGTCT GGTGTGCGCA AGGGGTTTAC  
GCCTCCAAAA TTCTTGCGGT CAGGTGACAA AATTGATATT ACAATTGATC CGATCGGAAC  
301 GCTGTCAAAC CAAATTGGCT GAATAAAACT GGAGGGCGGA CCCGGACCCG CCCGTTTTTTT  
CTGATAATCA TCTTTGTGAC AGAGGACAAG TTCATGGTAC TATAAGTGGG GTAATTTATC  
TGATAGGGGG AACATATATG ACACACCTAC ATATTACGAC ATGGGTGGTA GCGCTGATTC  
TGCTTTTCGT CAGCTACTCG CTGTATTCGT CAGGAAGTGC AAAGGGCGCA AAAATCACTC  
ATATGATTC TCGGTTATTC TATATCCTTA TTATTTTGAC AGGAGCTGAG CTGTTTGTCC  
601 GTTTCGCCAA CTGGAACGGA GAATACGCC GCAAAATGAT TCTGGGCATT ATCACCATCG  
GCCTGATGGA AATGCTCCTC ATCCGCAAGA AAAAAGAAAA ATCAACAGGA GGCCTGTGGG  
TCGGCTTCGT CATTGTCTTT TTGCTGACAG TGCTGCTCGG TCTGCATTTG CCAATTGGTT  
TTCAATTGTT TTAATAGAAA AACCTATGAA CCCGGCTCTT TGATAGAGCT GGTTTTTTTT  
ATATTTATCC CCTCATATTC CAAATCATTT AAAATAACCT TAAAATTTCC TGTAAGCGGT  
901 ATCTCGTCCT ATGAAATTAT GATACCTTCT AGAAATAATT TTGTTTAACT TTAAGAAGGA  
H M V L F V \*  
GATATACATA TGGTTTTGTT TGTTTAACTA GCT**GAATTC**  
NdeI EcoRI

Рис. 3. Последовательности праймеров для амплификации мини-гена *E*-пептида устойчивости к эритромицину (а) и промотора гена *wprA* (б) на матрице геномной ДНК *B. subtilis* с указанием последовательности, полученной после проведения ПЦР и лигирования плазмидной ДНК конструкции на базе вектора *pET23*, несущей промотор гена *wprA* и мини-ген *E*-пептида устойчивости к эритромицину (в)

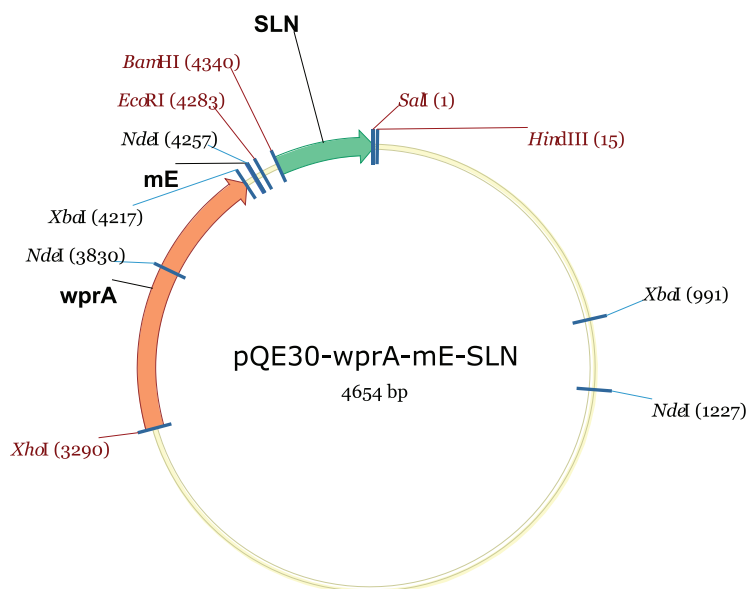


Рис. 4. Принципиальная схема плазмидной конструкции на базе вектора *pQE30*, содержащая промотор гена *wprA*, мини-ген *E*-пептида и ген полноразмерного зрелого гормона соматолиберина *SLN* (конструкция *pQE-wprA-mE-SLN*)

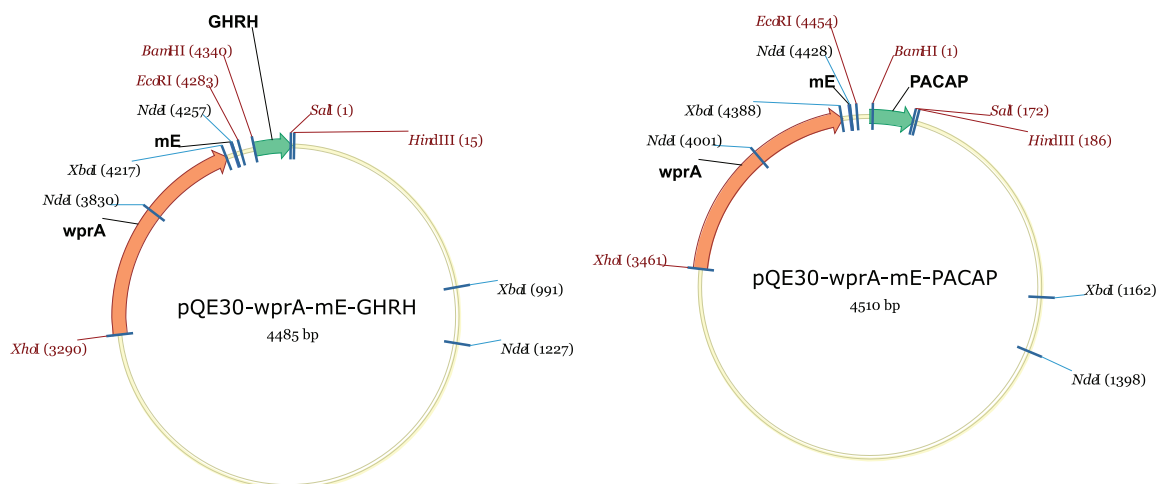


Рис. 5. Схемы плазмидных конструкций на базе вектора pQE30, содержащие промотор гена wprA, мини-ген E-пептида и ген релизинг-фактора гормона роста GHRH (конструкция (а) pQE-wprA-mE-GHRH) или ген аденилатциклаза-активирующего пептида PACAP (конструкция (б) pQE-wprA-mE-PACAP)

### Заключение

Таким образом, в настоящей работе предложен способ получения интегративных генетических конструкций для экспрессии гена полноразмерного зрелого гормона соматолиберина SLN и его предшественников – пептидов GHRH и PACAP, в бактериях для дальнейшего перорального введения птицам в составе пробиотического препарата на основе *B. subtilis* с целью получения анаболического эффекта.

Настоящая работа поддержана грантами в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» № 16.740.11.0196, № 14.740.11.1033, 14.740.11.0631, 16.512.11.2138.

### Список литературы /References

1. Anagnostopoulos C. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* / Anagnostopoulos C., Spizizen J. // *J. Bacteriol.* – 1961. – Vol. 81. – P. 741–746.
2. Iwasaki Y. Characterization of the putative alpha subunit of a heterotrimeric G protein in rice / Iwasaki Y., Kato T., Kaidoh T., Ishikawa A., Asahi T. // *Plant Mol. Biol.* – 1997. – № 4. – P. 563–572.

3. Kahn C.M. The Merck Veterinary Manual, 10th Edition / Kahn C.M., Line S. – Merck & Co., Inc. – New York, 2010.

4. McRory G.E. Expression and Alternative Processing of a Chicken Gene Encoding Both Growth Hormone-Releasing Hormone and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide / G.E. McRory, R.L. Parker, N.M. Sherwood // *DNA and Cell Biology.* – 1997. – Vol. 16, №1. – P. 95–102.

5. Peric L. Application of alternative growth promoters in broiler production / Peric L., Zikic D., Lukic M. // *Biotechnology in Animal Husbandry.* – 2009. – Vol. 25, № 5-6. – P. 387–397.

6. Rojas Contreras J.A. Replicative and integrative plasmids for production of human interferon gamma in *Bacillus subtilis* / Rojas Contreras J.A., Pedraza-Reyes M., Ordoñez L.G., Estrada N.U., Barba de la Rosa A.P., De León-Rodríguez A. // *Plasmid.* – 2010. – Vol. 64, № 3. – P. 170–176.

7. Sambrook J. Molecular cloning / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis – Cold Spring Harbor Laboratory press. – New York, 1989.

### Рецензенты:

Кузьмин В.А., д.х.н., зав. лабораторией ИБХФ РАН, ГУ Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, г. Москва; Варгин В.В., д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник, ГУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН РФ, Московская обл.

Работа поступила в редакцию 13.03.2012