

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-3-17-22>



РЕКОМБИНАНТНЫЙ МИОСТАТИН: ВЫДЕЛЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВАКЦИНАХ

Е.М. Колоскова*, В.А. Езерский

*Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии,
биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский
центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»
249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт*

Белок миостатин является не только потенциальной мишенью для терапевтического воздействия при патологиях мышечной системы, но и инструментом для биотехнологического регулирования мясной продуктивности сельскохозяйственных животных. Блокирование действия миостатина может достигаться индукцией синтеза аутоантител при использовании рекомбинантного миостатина (рМСТ) как антигена. Был получен штамм-продуцент *E. coli* B121/pET28-MSTN с высоким уровнем экспрессии рекомбинантного белка в тельцах включения. Очищенный рМСТ был использован для иммунизации овец и кроликов. С использованием созданной ИФА тест-системы для детекции антител к миостатину в крови овец было показано, что рМСТ иммуногенен (рабочий титр сывороток — 1/400–1/800). В результате вакцинации кроликов за месячный период наблюдалась тенденция к повышению средней массы тела и среднесуточному привесу у животных опытных групп по сравнению с контрольной.

Ключевые слова: рекомбинантный миостатин, *Escherichia coli*, аутоантитела, ПААГ-электрофорез, ИФА, титр антител, кролики, среднесуточный привес

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Колоскова Е.М., Езерский В.А. Рекомбинантный миостатин: выделение и использование в вакцинах. *Биомедицина*. 2023;19(3):17–22. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-3-17-22>

Поступила 22.04.2023

Принята после доработки 16.06.2023

Опубликована 10.09.2023

RECOMBINANT MYOSTATIN: ISOLATION AND USE IN VACCINES

Elena M. Koloskova*, Vadim A. Ezerskiy

*All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Animals —
Branch of the Federal Science Center for Animal Husbandry — All-Russian Institute
of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institute Village*

Protein myostatin is not only a potential target for therapeutic effects in pathologies of the muscular system, but also a tool for biotechnological regulation of the meat productivity of farm animals. The action of myostatin can be blocked by inducing autoantibody synthesis using recombinant myostatin (rMST) as an antigen. *E. coli* producer strain B121/pET28-MSTN was obtained with a high level of recombinant protein expression in inclusion bodies. Purified rMST was used to immunize sheep and rabbits. Using the created ELISA test system for the detection of antibodies to myostatin in the blood of sheep, it was shown that rMST is immunogenic (the working titer of sera is 1/400–1/800). As a result of vaccination of rabbits over a monthly period, the average body weight and average daily weight gain in animals of the experimental groups was observed to increase compared to the control group.

Keywords: recombinant myostatin, *Escherichia coli*, autoantibodies, PAAG electrophoresis, ELISA analysis, antibody titer, rabbits, average daily weight gain

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Koloskova E.M., Ezerskiy V.A. Recombinant Myostatin: Isolation and Use in Vaccines. *Journal Biomed.* 2023;19(3):17–22. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-3-17-22>

Submitted 22.04.2023

Revised 16.06.2023

Published 10.09.2023

Введение

Продукт экспрессии гена *MSTN*, белок миостатин, является одним из отрицательных регуляторов роста скелетных мышц: ингибирует синтез белков в мышцах, дифференцировку и пролиферацию миоцитов [4]. Недостаток миостатина или блокировка его действия приводит не только к увеличению мышечной массы, но и повышению силовых характеристик скелетных мышц. Аминокислотная последовательность миостатина идентична у многих видов животных. Рекombинантный миостатин (pMCT) как иммуноген в составе вакцин может быть использован для повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных (крупный и мелкий рогатый скот, свиньи, лошади, кролики), птицы. В настоящее время активно разрабатываются способы ингибирования активности миостатина на разных уровнях [6], один из которых — системное введение антител против миостатина. С другой стороны, оценивается возможность использования pMCT индуцировать синтез специфических антител (аутоантител) против эндогенного белка [7].

Ранее нами был получен штамм-продуцент *E. coli* Bl21/pET28-MSTN, при индукции которого реагентом ИПТГ наблюдали высокий уровень экспрессии рекombинантного белка [1, 2]. В составе генетической конструкции использовали оптимизированную для синтеза в *E. coli* нуклеотидную последовательность, кодирующую белок зрелого миостатина.

Основной **целью** исследований настоящего этапа являлось изучение иммуноген-

ности полученного рекombинантного белка и подбор условий иммунизации животных.

Материалы и методы

Очистка рекombинантного белка

ИПТГ-индуцированную культуру штамма-продуцента pMCT *E. coli* BL21(DE3) центрифугировали, 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. Суспензию центрифугировали при 10 000 g, 10 °C, 35 мин. Осадок ресуспендировали в денатурирующем буфере с высоким содержанием мочевины (20 mM Трис-HCl, 0,5 M NaCl, 8 M мочевины, 20 mM имидазол, 5 mM 2-меркаптоэтанол; pH=7,9), обрабатывали ультразвуком, центрифугировали. Осветлённый лизат вносили в колонку с Ni-сефарозой, уравновешенную тем же буфером. Носитель со связанным белком промывали до выхода ОП280 на плато. РБ последовательно снимали тем же буфером с возрастающим содержанием имидазола 50, 200 и 500 mM.

Диализ раствора РБ проводили в течение суток при 8 °C против двух буферов: ФБС (20 mM NaH_2PO_4 , 0,15 M NaCl; pH=7,4) и бикарбонатного буфера (0,1 M NaHCO_3 ; pH=9,5) с использованием диализных мембран с размером пор 12–14 кДа. Содержимое диализных мешков центрифугировали, определяли ОП280 в осадке и растворе и методом Брэдфорда. Наличие и чистоту pMCT определяли методом

ПААГ-SDS электрофореза (12,5%), белки окрашивали Coomassie Blue R-250.

Компоненты для определения титра антител к миоастатину

Сорбент Сефароза CL4B с иммобилизованным IgG овцы. Из сыворотки крови овцы с использованием сорбента с иммобилизованным G-белком выделяли IgG овцы (ovIgG). Полученным ovIgG иммунизировали кроликов и готовили сорбент Сефароза CL4B-ovIgG для связывания анти-овечьих антител.

Очистка антител «кролик-анти-овца». Из сыворотки иммунизированных ovIgG кроликов на сорбенте Сефароза CL4B-ovIgG были аффинно очищены антитела кролика против IgG овцы: «кролик-анти-овца». Был получен конъюгат антител «кролик-анти-овца» с пероксидазой хрена (ПХ), оценено качество конъюгата, подобрано его рабочее разведение для ИФА.

Иммунизация животных

В эксперименте использовали овец романовской породы возрастом 1–1,5 года и самцов кроликов калифорнийской породы возрастом 6–7 мес. Все животные содержались в условиях вивария ВНИИФиП на соответствующих стандартных рационах. Очищенный рМСТ, растворенный в буфере с 8 М мочевиной, разводили физ. р-ром до нужной концентрации и смешивали с одним из адъювантов (1:1) — гель гидроксида алюминия (ГА), полный адъювант Фрейнда (ПАФ), неполный адъювант Фрейнда (НАФ). Доза антигена для овец составляла 1 мг/гол., для кроликов — 0,5 мг. Кровь для получения сыворотки брали у овец из яремной вены, у кроликов — из ушной вены в пробирки с активатором свёртывания. В сыворотке крови овец и кроликов определяли титр антител к миоастатину. Животных взвешивали согласно схеме исследования.

Результаты исследований

Наличие в рекомбинантном белке (РБ) полигистидиновой последовательности

(6xHis) позволяет производить его очистку с помощью Ni-сефарозы (агарозы). Образование нерастворимых телец включения является одной из проблем получения РБ в клетках *E. coli* [3]. В денатурирующих условиях 6xHis тэг становится полностью доступен для связывания с Ni-сефарозой, уменьшается вероятность неспецифического взаимодействия сорбента с другими белками. При выделении РБ из телец включения при жёстких денатурирующих условиях они остаются пригодными для иммунизации и получения антител [5].

Очистка и оценка растворимости рМСТН

Нативный лизат бактериальной культуры, полученный после обработки лизоцимом, ультразвуковой гомогенизации и центрифугирования, практически не содержал РБ (рис., А, дорожка 1). РБ в виде телец включения находился в осадке и растворялся только в денатурирующих условиях в буфере с 8 М мочевиной и обработкой ультразвуком (рис., А, дорожка 2). Осветлённый центрифугированием лизат, содержащий большое количество РБ, пропускали через Ni-колонку. Связанный с носителем рМСТ последовательно снимали буфером с возрастающей концентрацией имидазола — от 50 до 500 мМ (дорожки 4–6, 8–10). В проскоке лизата оставалось незначительное количество рМСТ (дорожка 3). Помимо мономеров рМСТ (около 16 кДа), очищенный белок был представлен в димерной (32 кДа) и даже в тримерной форме (около 48 кДа).

Диализ очищенного рМСТ (рис., В, дорожка 1) проводили с целью перевести РБ в растворенном виде в один из стандартных буферов, используемых в т. ч. для выполнения ИФА. Как оказалось, в PBS и в бикарбонатном буфере рМСТ нерастворим: в надосадочной жидкости содержимого диализного мешка белок не обнаружен (дорожка 2). Весь рМСТ находился в осадке (дорожка 3). Наблюдалась тенденция

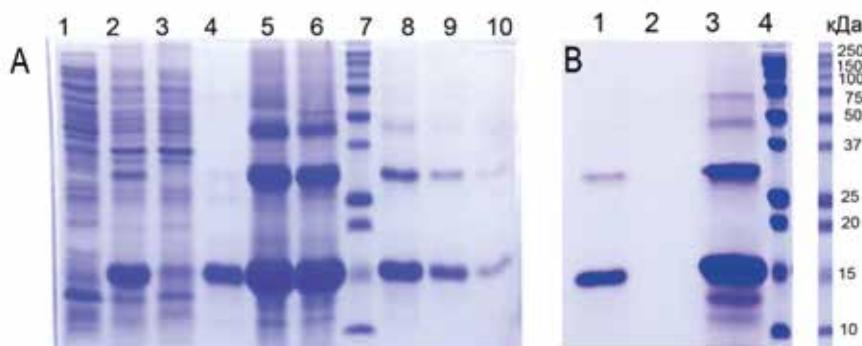


Рис. ПААГ-SDS электрофорез (15%): А — образцы, взятые на разных стадиях очистки рМСТ; В — диализ рМСТ, выделенного при денатурирующей очистке. Дорожки А7, В5 — маркер белковых масс.

Fig. PAAG-SDS electrophoresis (15%): А — samples taken at different stages of purification of rMST; В — dialysis of rMST isolated during denaturing purification. Lines А7, В5 — a marker of protein masses.

к полимеризации рМСТ, проявившаяся в появлении полос, соответствующих ди-, три- и тетрамерам (32 кДа, 48 кДа и 64 кДа), и к частичному гидролизу белка (появление полос с массой ниже, чем у мономера).

ИФА тест-система, иммунизация животных

На основе полученного рМСТ и аффинно очищенных антител «кролик-анти-IgG овцы», конъюгированных с ПХ, была создана ИФА тест-система (непрямой вариант) для оценки антител к миостатину в биологических жидкостях овец, иммунизированных рМСТ. Было определено рабочее разведение конъюгата: 1/25000–1/50000. Кроме того, используя в качестве вторых антител ПХ-конъюгаты других видоспецифичных антител, например, «коза-анти-кролик», можно определять антительный ответ у других животных, иммунизированных рМСТ, например, у кроликов.

Иммунизация овец показала, что рМСТН обладает иммуногенной активностью. Оптимальное разведение сывороток для ИФА было в 400–800 раз. ОП сывороток иммунизированных животных была в 4–15 раз выше, чем у контрольных. Титр существенно зависел от используемого адъ-

юванта и места введения антигена: самый высокий титр был при подкожной иммунизации с ПАФ, самый низкий — при внутримышечном введении рМСТ с гелем гидроксида алюминия.

При иммунизации кроликов достоверных различий в набранной за месяц эксперимента массе между животными контрольной и опытных групп не было обнаружено, однако средняя масса и среднесуточные привесы у животных опытных групп были выше, чем у кроликов контрольной группы (табл.). Максимальный рост кроликов приходится на 1,5–4-месячный возраст, и именно в этом возрасте, по-видимому, иммунизация рМСТ была бы наиболее эффективна.

Закключение

Аминокислотная последовательность миостатина идентична у всех сельскохозяйственных животных. Рекombинантный миостатин (рМСТ) как иммуноген в составе вакцин может быть использован для повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, свиньи, лошади, кролики), птицы.

Таблица. Изменение массы тела и среднесуточных привесов кроликов после иммунизации рМСТ
Table. Changes in body weight and average daily weight gain of rabbits after immunization of rMST

Параметр	Группы кроликов			
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
	Контроль	ГА п/к	ГА в/м	Масло (монтанид) п/к
Кол-во животных	6	6	6	6
Масса тела в 1-е сут. (иммунизация), кг	4,04±0,38	4,04±0,17	4,05±0,3	4,03±0,13
Масса тела через 14 сут. после иммунизации, кг	4,17±0,43	4,28±0,22	4,24±0,28	4,23±0,15
Среднесуточный привес за 14 сут., г	10	17	14	14
Масса тела через 28 сут. после иммунизации, кг	4,20±0,52	4,43±0,19	4,33±0,24	4,34±0,13
Среднесуточный привес за 28 сут., г	6	14	10	11

С использованием технологии рекомбинантных ДНК нами был создан штамм-продуцент *E. coli* BL21/pET28-MSTN с высоким уровнем экспрессии рМСТ.

В экспериментах на овцах было показано, что рМСТ обладает достаточной иммуногенностью и индуцирует синтез специфических аутоантител к миостатину. При иммунизации кроликов калифорнийской породы

рМСТ у животных всех опытных групп наблюдали прирост массы тела и среднесуточный прирост выше, чем у контрольных кроликов. Показано, что вакцины с рМСТ потенциально могут быть использованы для индукции синтеза специфических аутоантител к эндогенному миостатину с целью блокирования его действия и стимуляции роста мышечной ткани у разных видов животных

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Колоскова Е.М., Езерский В.А., Жукова О.Б. Получение бактериального рекомбинантного миостатина для индуцирования синтеза специфических к миостатину аутоантител. *Биомедицина*. 2022;18(3):22–26. [Koloskova E.M., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B. Poluchenie bakterial'nogo rekombinantnogo miostatina dlya indutsirovaniya sinteza spetsificheskikh k miostatinu autoantitel [Preparation of bacterial recombinant myostatin to induce the synthesis of myostatin-specific autoantibodies]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2022;18(3):22–26. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-3-22-26.

2. Колоскова Е.М., Езерский В.А., Жукова О.Б. На пути к разработке биоинженерных методов повышения мясной продуктивности животных: получение бактериального штамма-продуцента рекомбинантного миостатина. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2022;4:49–60. [Koloskova E.M., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B. Na puti k razrabotke bioinzenemykh metodov povysheniya myasnoy produktivnosti zhivotnykh: poluchenie bakterial'nogo shtamma-produtsenta rekombinantnogo miostatina [Towards the development of bioengineering methods to enhance meat productivity of animals: Constructing a bacterial strain producing recombinant myostatin]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh [Problems of Productive Animal Biology]*. 2022;4:49–60. (In Russian)].

3. Baneyx F., Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 2004;22(11):1399–1408. DOI: 10.1038/nbt1029.

4. Chen M.M., Zhao Y.P., Zhao Y., Deng S.L., Yu K. Regulation of myostatin on the growth and development of skeletal muscle. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021;9:785712. DOI: 10.3389/fcell.2021.785712.

5. Makrides S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 1996;60(3):512–538. DOI: 10.1128/mr.60.3.512-538.1996.

6. Nielsen T.L., Vissing J., Krag T.O. Antimyoostatin treatment in health and disease: The story of great expectations and limited success. *Cells*. 2021;10(3):533. DOI: 10.3390/cells10030533.

7. Xu Y., Mao L., Zheng Y. Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of yak recombinant myostatin. *Anim. Biotechnol.* 2012;23(4):253–260. DOI: 10.1080/10495398.2012.722157.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Колоскова Елена Михайловна*, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»;
[e-mail: heleko3@yandex.ru](mailto:heleko3@yandex.ru)

Езерский Вадим Аркадьевич, Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»;
[e-mail: ez.vadim@yandex.ru](mailto:ez.vadim@yandex.ru)

Elena M. Koloskova*, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Animals — Branch of the Federal Science Center for Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst;
[e-mail: heleko3@yandex.ru](mailto:heleko3@yandex.ru)

Vadim A. Ezerskiy, All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Animals — Branch of the Federal Science Center for Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst;
[e-mail: ez.vadim@yandex.ru](mailto:ez.vadim@yandex.ru)

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author