

Выводы. Наши предшествующие исследования показали, что выявленные антигенные маркеры могут служить основой для прогнозирования племенной ценности молодняка при отборе в раннем возрасте. В связи с этим, при оценке племенной ценности, отборе и подборе животных необходимо учитывать частоту встречаемости антигенных маркеров удоя, долголетия, воспроизводительной способности у коров конкретной породы, так как, исходя из последних приведенных данных, у отдельных пород степень встречаемости антигенов, ассоциированных нами с хозяйственно-полезными признаками, различна.

Литература. 1. Бака, А. В. *Генетика.* / А. В. Бакай, И. И. Кочиш, Г. Г. Скрипченко. М. Колос С. 2007. С. 328-377. 2. Боев, М. М. *Селекционное значение эритроцитарных антигенов.* / Зоотехния. 1990. №7. С. 27-30. 3. Патент № 2316957. *Способ определения хозяйственного долголетия крупного рогатого скота.* М. М. Боев, А. О. Савин. 2008 С. 5. 4. Патент №2372776. *Способ отбора крупного рогатого скота по воспроизводительной способности.* М.М. Боев, М.М. Боев. 2009. С. 5. 5. Меркурьева, Е. К. *Генетика.* / Е. К. Меркурьева, З. В. Абрамова, А. В. Бакай, И. И. Кочиш. М. Агрпромпиздат. 1991. С. 308-318.

УДК 753.26.15

ПЛАЗМИДНЫЕ ВЕКТОРЫ ДЛЯ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ФОЛЛИКУЛО-СТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА В *E.coli*

Бурсаков С.А., Ковальчук С.Н., Попов Д.В., Косовский Г.Ю.

*Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий,
г. Москва, Россия*

Введение. Важным звеном технологии трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота является гормональная стимуляция суперовуляции у коров-доноров, которая базируется на применении фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) для обеспечения роста и синхронного созревания множественных фолликул. ФСГ не имеет половой специфичности и влияет на все репродуктивные процессы, отвечая за формирование, развитие и правильное функционирование половых органов. У женских особей он стимулирует созревание и рост фолликул, образование фолликулярной жидкости, способствует повышению концентрации эстрогенов в организме животных, регулирует созревание яйцеклеток.

К настоящему времени еще не сформирована унифицированная форма производства и применения ФСГ, приводящая к стабильному получению биологически полноценных эмбрионов от коров-доноров. Поскольку расходы на приобретение гонадотропинов являются самой затратной частью при выполнении эмбриотрансплантаций, первостепенное значение имеет производство рекомбинантного ФСГ (рФСГ), гомогенного по составу и близкого к своему натуральному аналогу, но обладающего новыми характеристиками для увеличения биологической эффективности и экономической рентабельности. Использование рФСГ может повысить экономическую эффективность эмбриотрансплантаций и прогнозируемость получения ооцитов, пригодных для оплодотворения. Кроме того, использование препарата нового поколения позволит уменьшить побочные эффекты при его интенсивном применении для отобранных высокопродуктивных коров-доноров [1].

Поэтому **целью** настоящей работы было создание необходимых для биосинтеза белка векторов и введение их в клетки продуцента.

Материалы и методы исследований. Все манипуляции с РНК и ДНК осуществлялись на базе стандартных техник [2] и методических указаний коммерче-

ских наборов, используемых в работе. РНК была экстрагирована из свежзамороженного в азоте образца передней части гипофиза коровы согласно инструкции (Евроген ВС032). Синтез первой цепи кДНК на РНК матрице было осуществлено с использованием коммерческого набора, включающего MMLV ревертазу (Евроген SK021). Праймеры для амплификации альфа и бета субъединиц ФСГ были разработаны на основе кодирующих последовательностей соответствующих генов (Genbank: NCBI Reference Sequences: NM_173901.3; NM_174060.1 соответственно).

Результаты и обсуждение. Выбор экспрессионной системы зависит от таких факторов, как уровень экспрессии, посттрансляционные модификации, стоимость производства, доступность генетических систем и других. Несмотря на способность ряда бактерий осуществлять как N-, так и O-гликозилирование [3], лимитирующим фактором бактериального производства рФСГ является неспособность многих бактерий осуществлять посттрансляционные модификации, свойственные системам млекопитающих, необходимые для правильной конформации белковой молекулы. Ранее попытки добиться экспрессии рФСГ предпринимались в разных организмах, включая бактерии *E. coli* [4, 5], способные к производству гетерологических белков. Поскольку взаимодействие ФСГ со своим рецептором происходит благодаря взаимодействию белковой части молекул, получение гормона без дополнительных модификаций служит для целого ряда целей. Например, использование полученных конструкций для последующих молекулярно-биологических манипуляций, получение антител и др. Поэтому нашей задачей на данном этапе исследований было получение бактериальных векторов, удобных для последующих генно-инженерных и химических методов модификаций, направленных на специфическое изменение гормона с целью улучшения требуемых свойств и, в конечном итоге, для получения гомогенного белкового препарата ФСГ.

Для создания конструкции зрелая кодирующая часть альфа и бета субъединиц была амплифицирована с использованием праймеров, включающих рестрикционный сайт, удлиненный тремя нуклеотидами, для надежного функционирования рестриктаз. Кроме того, были созданы также две пары праймеров, состоящих из зрелой кодирующей части ФСГ обеих субъединиц и сайта для энтерокиназы, предшествующего 6-членному гистидиновому пептиду (His-tag), с целью дальнейшей очистки получаемого белка, с использованием аффинной хроматографии на колонке с Ni-содержащим сорбентом. С помощью рестриктаз EcoRI и NotI кодирующие части субъединиц были встроены по отдельности в бактериальный вектор рЕТ-28a (+) для экспрессии белка.

Выводы. Таким образом, нами разработаны и получены плазмидные векторы для гетерологической экспрессии альфа и бета субъединиц ФСГ в клетках *E. coli* BL21(DE3).

Литература. 1. Бурсаков, С. А. Рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон для индукции суперовуляции у крупного рогатого скота: состояние и перспективы (обзор). *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2016, Vol., 3, P. 5-24. 2. Green, M. R., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 4th ed 2012, 2028 pp. 3. Nothaft, H., Szymanski C. M. *Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever*. *Nature Rev. Microb.* 2010, Vol. 8, No. 11, P. 765-778. 4. Samaddar M., Babu P. S., Catterall J. F., Dighe R. R. *Identification of an attenuating region in the bovine follicle-stimulating hormone beta subunit mRNA that decreases its expression in E. coli*. *Gene*. 1999, Vol. 228, No. 1-2, P. 253-260. 5. Wilson M. E., Morris J. C., Gibbons J. R. *Bioactive, bacterial-derived recombinant bovine follicle-stimulating hormone*. *Reproduction, Fertility and Development*. 2008, Vol. 21, No. 1, P. 246-247.