

УДК 577.1

## АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА СИБИРСКОЙ КОСУЛИ (*Capreolus pygargus*), ПОЛУЧЕННОГО В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ (СНО-К1)

© 2023 Д.Е. Мурашкин<sup>1</sup>, С.В. Беленькая<sup>1,2\*</sup>, А.А. Бондарь<sup>3</sup>,  
В.В. Ельчанинов<sup>4</sup>, Д.Н. Щербаков<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559 Кольцово, Новосибирская обл., Россия; электронная почта: belenkaya.sveta@gmail.com

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> ЦКП «Геномика», Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия, 656910 Барнаул, Россия

<sup>5</sup> Алтайский государственный университет, 656049 Барнаул, Россия

Поступила в редакцию 16.05.2023

После доработки 13.07.2023

Принята к публикации 15.07.2023

Впервые установлена структура гена химозина (Хн) сибирской косули (*Capreolus pygargus*) и определена его экзон/интронная организация. Методом Golden Gate реконструирована и получена в виде ДНК-клона кодирующая часть гена Хн *C. pygargus*. Сравнительный анализ последовательностей прохимозинов (ПроХн) косули, коровы и одногорбого верблюда выявил ряд аминокислотных замен на участках, формирующих субстрат-связывающую полость фермента и затрагивающих субсайты специфичности S4 и S1' + S3'. С использованием интеграционного вектора рIP1 сконструирована рекомбинантная плазмида рIP1-Сар для экспрессии гена ПроХн косули в клетках СНО-К1. Получен поликлон клеток СНО-К1-СУМ-Сар, обеспечивающий синтез и секрецию рекомбинантного ПроХн в культуральную жидкость. В результате активации зимогена получен препарат рекомбинантного Хн косули с общей молокосвёртывающей активностью  $468,4 \pm 11,1$  ИМСУ/мл (ИМСУ – International Milk Clotting Units, международные единицы молокосвёртывающей активности). Выход рекомбинантного Хн косули составил 500 мг/л или  $\approx 468\,000$  ИМСУ/л, что превышает показатели выхода генно-инженерных Хн в большинстве используемых систем экспрессии. Основные биохимические свойства полученного фермента сравнивали с коммерческими препаратами рекомбинантных Хн одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) и коровы (*Bos taurus*). Удельная молокосвёртывающая активность рекомбинантного Хн *C. pygargus* составила  $938 \pm 22$  ИМСУ/мг белка и была сопоставима с показателями ферментов сравнения. Неспецифическая протеолитическая активность рекомбинантного Хн косули оказалась в 1,4–4,5 раза выше, чем у ферментов коровы и верблюда. По коагуляционной специфичности рекомбинантный Хн *C. pygargus* занимал промежуточное положение между генно-инженерными аналогами Хн *B. taurus* и *C. dromedarius*. Порог термостабильности рекомбинантного Хн косули был равен 55 °С. При 60 °С фермент сохранял < 1% от исходной молокосвёртывающей активности, а его полная термоинактивация наблюдалась при 65 °С.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** система экспрессии млекопитающих, СНО-К1, рекомбинантный химозин, сибирская косуля, молокосвёртывающая активность, протеолитическая активность, термостабильность.

DOI: 10.31857/S0320972523090087, EDN: WWNNWK

### ВВЕДЕНИЕ

Гастральный молокосвёртывающий фермент химозин (КФ 3.4.23.4) относится к се-

мейству аспаргатных протеиназ. Его активный центр несёт два остатка аспарагиновой аминокислоты в положениях 34 и 216 [1]. Аспаргатные протеиназы входят в группу

Принятые сокращения: МА – молокосвёртывающая активность; ПА – протеолитическая активность; ПроХн – прохимозин; рПроХн – рекомбинантный прохимозин; рХн – рекомбинантный химозин; Хн – химозин; СНО – культура клеток яичника китайского хомячка; СН – казеин.

\* Адресат для корреспонденции.

эндопептидаз — ферментов, гидролизующих внутримолекулярные пептидные связи [2, 3]. Химозин (Хн) избирательно и с высокой скоростью гидролизует связь F105-M106 в молекуле κ-казеина (κ-CN), что вызывает свёртывание молока. Натуральный Хн, получаемый из желудков новорожденных сельскохозяйственных животных, а также его генно-инженерные аналоги широко используются при производстве сыров.

Хн является удобной моделью для разработки и анализа эффективности как про-, так и эукариотических систем экспрессии. Его ферментативная (молокосвёртывающая) активность зависит от корректности процессов синтеза и посттрансляционного процессинга. Молокосвёртывающая активность (МА) Хн определяется с использованием простых клоттинговых тестов, не требующих дорогостоящих реагентов и оборудования.

Для получения рекомбинантного прохимозина (рПроХн) использовались различные системы продукции. В прокариотах (речь идёт преимущественно об *Escherichia coli*), несмотря на достаточно высокий уровень синтеза, целевой белок накапливается в нерастворимой форме в тельцах включения, что требует использования процедуры рефолдинга, эффективность которой в случае ПроХн невысока [4–7].

Уровень синтеза ПроХн клетками *Bacillus subtilis* предельно низок [8]. Видимо, поэтому данная система продукции для получения рекомбинантного Хн (рХн) не используется.

Опубликован ряд работ, описывающих получение рПроХн в растительных экспрессионных системах [9–11]. К недостаткам этих систем относится неразрешённая проблема гликозилирования белков по растительному типу [12].

Наиболее существенные результаты достигнуты при экспрессии гена ПроХн в грибных (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*) и дрожжевых (*Komagataella* (ранее — *Pichia*) *pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*) клетках. При использовании этих систем целевой белок секретируется в культуральную жидкость продуцента и, после активации, демонстрирует высокую ферментативную активность [13–17]. В настоящее время грибные системы продукции активно используются при промышленном получении рХн коровы (*Bos taurus*) и одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) [18].

Системы экспрессии на основе клеток млекопитающих наилучшим образом подходят для получения рекомбинантных белков представителей этого класса, особенно в тех случа-

ях, когда принципиально важен определённый характер посттрансляционных модификаций (ПТМ) целевого продукта. Удивительно, но в научной периодике обнаруживается всего два примера описания экспрессии гена ПроХн коровы в клетках млекопитающих [19, 20].

Системы экспрессии на основе клеток теплокровных животных (СНО, NS0, Sp2/0, НЕК 293, ВНК-21, Per.C6) способны обеспечивать высокоэффективный синтез, ПТМ и секрецию рекомбинантных белков. Однако для культивирования клеток млекопитающих необходимы дорогостоящие питательные среды и оборудование, что приводит к увеличению цены конечных продуктов. Принято считать, что использование этих систем оправдано лишь для получения особо значимых белков и ферментов [21]. Поэтому основной сферой применения систем продукции млекопитающих является производство моноклональных антител и других терапевтических белков [22, 23].

С момента первых попыток получения Хн в клетках млекопитающих прошло более 30 лет. За это время достигнут серьёзный прогресс в развитии технологий конструирования продуцентов, накоплен значительный опыт использования высокоэффективных промоторов, разработаны новые питательные среды. Всё это увеличивает доступность систем экспрессии в клетках млекопитающих и позволяет рассматривать их как перспективный инструмент для получения самого широкого спектра рекомбинантных белков научного, технологического и терапевтического назначения [21].

По сравнению с другими системами экспрессии млекопитающих культура клеток яичника китайского хомячка (СНО) обладает рядом преимуществ, к которым следует отнести устойчивую жизнеспособность, возможность достижения высокой плотности клеток при суспензионном выращивании, продолжительную практику использования и высокую степень оптимизации условий культивирования. Наличие широкой линейки специализированных питательных сред позволяет обеспечивать длительное поддержание жизнеспособности клеток СНО [24].

Ранее нами были получены и исследованы Хн представителей семейства Оленевые (*Cervidae*) — рХн марала [25–27] и рХн лося [7], которые продемонстрировали биохимические свойства, перспективные с точки зрения технологического использования этих ферментов. Это позволяет предполагать, что и другие виды, относящиеся к семейству *Cervidae*, могут быть источниками Хн с необычными ферментативными свойствами. Поэтому в качестве

объекта для экспрессии в клетках млекопитающих выбран ген ПроХн сибирской косули (*Capreolus pygargus* Pallas, 1771).

Цель данной работы – частичная биохимическая характеристика рекомбинантного Хн косули (рХн-Сар), полученного в системе продукции СНО-К1.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Идентификация гена Хн косули.** Нуклеотидная последовательность гена Хн (*СУМ*) косули была получена в виде ДНК нескольких перекрывающихся продуктов ПЦР и секвенирована как напрямую, так и в виде клонов в составе вектора рJET1.2. Для этого использовали суммарную геномную ДНК, выделенную из образцов рогов трёхлетнего самца *C. pygargus* и любезно предоставленную лабораторией сравнительной геномики ИМКБ СО РАН. Полученную геномную ДНК косули дополнительно очистили и сконцентрировали на колонках Amicon 100 kDa («Millipore», ФРГ).

В среднем размер гена *СУМ* у млекопитающих составляет приблизительно 13 000 п.н. Используя полученные нами ранее последовательности гена *СУМ* марала (*Cervus elaphus*) и лося (*Alces alces*), а также последовательности *СУМ* коровы (*B. taurus*), овцы (*Ovis aries*), козы (*Capra hircus*) и одногорбого верблюда (*C. dromedarius*) из базы GenBank, определили наиболее консервативные участки гена и рассчитали специфичные для *СУМ* олигонуклеотидные праймеры. Несколько пар дали в амплификации перекрывающиеся ПЦР-фрагменты гена *СУМ* косули (*СУМ-Сар*) (табл. 1).

Амплификацию проводили с использованием полимеразы Hot Start Q5 («New England Biolabs», США). Полученные ампликоны очищали от компонентов ПЦР с помощью сорбции на магнитных частицах Speed Beads («GE Healthcare», США) и секвенировали напрямую, используя 0,25–0,30 пкмоль ПЦР-фрагмента как матрицу ДНК для реакции Сэнгера. Затем клонировали полученные ампликоны в составе вектора рJET1.2. Плазмидную ДНК селективированных клонов-трансформантов нарабатывали в препаративном количестве и тоже секвенировали по методу Сэнгера на автоматических генных анализаторах ABI3130XL или ABI3500XL («Applied Biosystems», США). Полученные секвенограммы *СУМ-Сар* анализировали и сшивали в контиги с помощью академической версии программы Vector NTI 10 («Invitrogen», Швеция), а затем выравнивали с известными для других китопарнокопыт-

ных структурами генов *СУМ* из базы данных GenBank для подтверждения принадлежности к гену Хн и расчёта праймеров для следующего шага секвенирования. В итоге была получена полноразмерная нуклеотидная последовательность гена *СУМ* *C. pygargus* (регистрационный номер GenBank – OQ427063).

Подтверждение видовой принадлежности проверяли с помощью прямого секвенирования продукта амплификации фрагмента митохондриального гена цитохрома *b* (МТСВ) с использованием той же геномной ДНК, что и для гена *СУМ*.

**Конструирование рекомбинантного интеграционного вектора, обеспечивающего экспрессию гена *СУМ* косули.** Для конструирования плазмидного вектора, обеспечивающего синтез и секрецию ПроХн косули в эукариотической системе экспрессии, использовались следующие подходы и процедуры. На основе сравнительного анализа гена *СУМ* была установлена его интрон/экзонная структура и определена кодирующая последовательность, включающая пре- и про-фрагменты. Для получения одной рамки считывания, содержащей только экзона, были рассчитаны праймеры для амплификации каждого экзона с последующей бесшовной сборкой методом Golden Gate [28] (табл. 2).

Для клонирования полученных фрагментов использовалась экспрессионная плаزمиды рIP1. Вектор рIP1 имеет в своём составе следующие основные генетические элементы: промотор CMV, сигнал полиаденилирования SV40, полилинкер для клонирования по методу Golden Gate, последовательность IRES вируса энцефаломиокардита и ген устойчивости к пуромицину для отбора трансгенных клеток.

Экспрессионная кассета в составе вектора рIP1 фланкирована с двух сторон плечами интеграции транспозона Sleeping Beauty. Амплификация экзонов проводилась с помощью полимеразы Q5 HotStart («NEB», США) согласно рекомендациям производителя. Далее полученные ампликоны очищались из реакционной смеси набором реагентов Cleanup S-Cap («Евроген», Россия). После измерения концентрации ДНК на спектрофотометре NanoDrop 2000C («Thermo Fisher Scientific», США) составлялась реакционная смесь в соответствии с рекомендациями производителя набора NEBridge® Golden Gate Assembly Kit BsaI-HF®v2 («NEB»). Далее реакционная смесь инкубировалась в термоциклере со следующей программой: (37 °C, 5 мин → 16 °C, 5 мин) × 30 циклов → 60 °C, 5 мин. После завершения инкубации проводилась трансформация компетентных клеток NEBStable 10 мкл реакционной смеси.

**Таблица 1.** Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации (PCR-) фрагментов ДНК гена химозина косули *C. pygargus* и их секвенирования (SEQ) напрямую или в виде клонов в составе вектора pJET1.2

| Праймер    | Последовательность (5'–3') | Назначение      |
|------------|----------------------------|-----------------|
| Cap-2614F  | ggcttcttaaccattgcacca      | PCR-2           |
| Cap-3839R  | gctctctggggcagcctaaca      | SEQ             |
| Cap-6633R  | ctgagtcccactaacctgagc      | SEQ             |
| Cap-6830R  | aacacgtattgggcacttactacatg | SEQ             |
| Cap-6932R  | cagaccccaggaagaactcaag     | PCR-3,<br>PCR-9 |
| Cap-7552F  | aaaccacggcacagagctgaa      | SEQ             |
| Cap-7877F  | ctcggtttacatggacaggtagg    | SEQ             |
| Cap-9554F  | gagcttgacgaaggacatgg       | SEQ             |
| Cap-9724F  | agtctccctcacatccatggtc     | PCR-1,<br>PCR-9 |
| Cap-10189F | cctgcatctcttattktttgagc    | SEQ             |
| Cap-11696R | gagaaaacaggaagacaagacgga   | SEQ             |
| Cap-11745R | gttaagtgtctggcatctagtagca  | SEQ             |
| Cap-11862R | tccttgtaggtctccacctatc     | SEQ             |
| Cap-12127R | acccagaccctcagacctt        | PCR-7           |
| Cap-12311R | caggaatgcagccctaaacg       | SEQ             |
| Cap-12624R | tactggggacaagactggctga     | PCR-8           |
| Cap-14050F | ctgaccaactacctggatgtgagt   | PCR-3           |
| Cap-15290F | catgccagtcggttctaagagaat   | PCR-4           |
| Cap-15300R | cctctactttattctcttagaacg   | SEQ             |
| Cap-15475R | gccatctctatggttccagagactag | PCR-1           |
| Cap-16024R | gctggtggtttctggaacac       | PCR-2           |
| Cap-16798F | atcagatgagctgataacttgctt   | PCR-6,<br>PCR-8 |
| Cap-17961R | tgcttagatgctggtgccttg      | SEQ             |
| Cap-19778R | cgctcgtcacatccaagtctg      | SEQ             |
| Cap-20433F | tccttgagatccaagaactcc      | PCR-5,<br>PCR-7 |
| Cap-20856R | ggctcctctctggagatgcatac    | PCR-4,<br>PCR-6 |
| Cap-22011R | cattcttactcaattccacctcaag  | PCR-5           |

Скрининг колоний проводился с помощью пары праймеров, один из которых комплементарен 3'-концу нетранслируемой области экспрессирующего вектора, а другой – СУМ\_REV\_(9).

После скрининга клонов-трансформантов плазмидная ДНК положительных клонов была выделена. Корректность встройки подтверждалась секвенированием по Сэнгеру. В результате был получен интеграционный экспрессирующий вектор pIP1-Cap.

**Получение рПроХн косули в культуре клеток СНО-К1.** Клетки СНО-К1 трансфицировали полученным экспрессирующим вектором pIP1-Cap совместно с плазмидой pCMV(CAT) T7-SB100 в среде HyClone HyCell TransFx-C («Cytiva», Швеция) согласно описанному протоколу [29]. Плазида pCMV(CAT)T7-SB100 содержит последовательность транспозазы SB100, обеспечивающей встройку целевой экспрессионной кассеты, фланкированной плечами интеграции, в геном клеток. Селекцию проводили в присутствии пурамицина в концентрации 50 мкг/мл. После добавления антибиотика к пятому дню селекции жизнеспособность клеток опустилась до 69%. На десятый день жизнеспособность клеток достигала значения 95% и селекция была остановлена. Полученный пул продуцентов дважды промывали фосфатно-солевым буфером, переносили в 600 мл среды HyClone™ HyCell™ СНО («Cytiva») и культивировали при 37 °С, 185 об./мин и 5% CO<sub>2</sub> до достижения концентрации жизнеспособных клеток 4·10<sup>6</sup> клеток/мл. После этого понижали температуру до 31 °С и продолжали культивирование с питательными добавками HyClone™ Cell Boost™ Kit («Cytiva») в течение 14 дней, до снижения доли жизнеспособных клеток < 75%. Клетки продуцента отделяли центрифугированием при 8000 g в течение 10 мин и получали осветлённую культуральную жидкость, которую фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм («Thermo Fisher Scientific»).

**Активация рПроХн косули.** Активацию рПроХн косули проводили непосредственно в культуральной жидкости путём ступенчатого изменения рН [17]. В культуральную жидкость, содержащую рПроХн, при постоянном перемешивании вносили 2,0 М HCl до рН 3,0. Затем останавливали перемешивание и инкубировали смесь при рН 3,0 в течение 2 ч. По истечении времени инкубации доводили рН образца до 5,8, используя 1,0 М NaOH.

**Белковый состав** культуральных жидкостей и фермент-субстратных смесей анализировали методом электрофореза в присутствии

**Таблица 2.** Олигонуклеотидные праймеры, использованные для бесшовной сборки методом Golden Gate

| Праймер     | Последовательность 5'–3'                 | Назначение |
|-------------|--|------------|
| CYM_FWD_(1) | ttacgtctccccatgaggtgtcttgggtgctac        | экзон 1    |
| CYM_FWD_(2) | ttacgtctcgagatcaccaggatccctctgtacaaaggc  | экзон 2    |
| CYM_FWD_(3) | ttacgtctcggtcagtactttgggaagatctacctcg    | экзон 3    |
| CYM_FWD_(4) | ttacgtctccaaaaccaccagcgcttcg             | экзон 4    |
| CYM_FWD_(5) | ttacgtctccctccgacattgtggatgtcc           | экзон 5    |
| CYM_FWD_(6) | ttacgtctcggaatggccaggggagc               | экзон 6    |
| CYM_FWD_(7) | ttacgtctccagtgcaccatcagcggtatg           | экзон 7    |
| CYM_FWD_(8) | ttacgtctccggatggcgagttgacatcgactgtgacagc | экзон 8    |
| CYM_FWD_(9) | ttacgtctcccaggatgaggcttctgtacc           | экзон 9    |
| CYM_REV_(1) | ttacgtctccatctcggcgccctggg               | экзон 1    |
| CYM_REV_(2) | ttacgtctcgtgactatccaggtagttggtcaggg      | экзон 2    |
| CYM_REV_(3) | ttacgtctcgtttttgcaggcattgctcttgc         | экзон 3    |
| CYM_REV_(4) | ttacgtctcaggagacagtgacagtgctgtagcc       | экзон 4    |
| CYM_REV_(5) | ttacgtctccattcctgtccatgtaaaccgagaacac    | экзон 5    |
| CYM_REV_(6) | ttacgtctcgcactgtccacagtgaactgcca         | экзон 6    |
| CYM_REV_(7) | ttacgtctcctaccggttctgggtggct             | экзон 7    |
| CYM_REV_(8) | ttacgtctcccctggttggtataggcggag           | экзон 8    |
| CYM_REV_(9) | ttacgtctcccttacacggctttggccagc           | экзон 9    |

додецилсульфата натрия (ЭФ-ДСН) по Лэммли [30]. В качестве маркеров молекулярных масс (ММ) использовали набор LMW-SDS Marker Kit («GE Healthcare», США).

**В качестве препаратов сравнения** использовали коммерческие рХн коровы (СНУ-MAX® Powder Extra, сухая форма) и одногорбого верблюда (СНУ-MAX® М 1000, жидкая форма) производства компании «Chr. Hansen» (Дания). Для определения концентрации белка и расчёта удельной МА использовали неразведённый препарат рХн верблюда и 1%-ный раствор рХн коровы в 20 мМ Na-ацетатном буфере (рН 5,8). При исследовании термостабильности (ТС) и протеолитической активности (ПА) ферменты сравнения разводили 20 мМ Na-ацетатным буфером (рН 5,8) до значений МА 8–12 ИМСУ/мл (ИМСУ – International Milk

Clotting Units, международные единицы МА). В ходе определения биохимических свойств препараты рХн козули (рХн-Cap), рХн коровы (рХн-Bos) и рХн одногорбого верблюда (рХн-Sam) нормировали по МА.

**Концентрацию белка в препаратах рХн** определяли по методу Бредфорда [31].

**Определение общей и удельной МА.** В качестве субстрата использовали сборное непастеризованное коровье молоко, в которое внесли  $\text{NaN}_3$  до концентрации 0,02% и доводили рН до 6,5. Субстрат (1,25 мл), прогретый на водяной бане при 35 °С не менее 10 мин, быстро смешивали с 0,1 мл исследуемого рХн и регистрировали время образования первых хлопьев коагулята. В качестве стандарта коагуляционной активности использовали 0,5%-ный водный раствор сухого коммерческого рХн ко-

ровы «Chy-Max» («Chr. Hansen») с заявленной МА 2201 ИМСУ/г. Все измерения повторяли не менее трёх раз ( $n \geq 3$ ). Общую МА выражали в ИМСУ/мл и рассчитывали по формуле (1):

$$MA = MA_{ст} / 200 \cdot T1 / T2, \quad (1)$$

где  $MA_{ст}$  – заявленная МА стандарта в ИМСУ/г; 200 – фактор разведения (мл/г); T1 – время (с) свёртывания субстрата стандартом; T2 – время (с) свёртывания субстрата раствором исследуемого фермента.

Удельную МА рХн рассчитывали после определения общей МА и концентрации белка и выражали в ИМСУ/мг.

#### **Определение общей ПА и специфичности.**

Субстратом служил 1%-ный раствор казеина (CN) по Гаммерстену («MP Biomedicals», Франция) в 20 мМ Na-фосфатном буфере (рН 5,65). Аликвоты субстрата (2,0 мл) помещали в водяную баню (35 °С), прогревали в течение 15 мин и добавляли к ним 0,5 мл раствора исследуемого рХн. Фермент-субстратные смеси тщательно перемешивали и отмечали время начала инкубации. Через 30, 90 и 180 мин инкубации реакцию протеолиза останавливали, добавляя к фермент-субстратным смесям 2,5 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Содержимое каждой пробирки перемешивали, оставляли на 30 мин при комнатной температуре и фильтровали через бумажный фильтр («белая лента»). В прозрачном фильтрате определяли поглощение при длине волны 280 нм (A280). Для подготовки спектрофотометрического контроля компоненты фермент-субстратной смеси вносили непосредственно в 5%-ную ТХУ, выдерживали 30 мин и фильтровали через бумажный фильтр. За общую (неспецифическую) ПА принимали значение A280 через 180 мин инкубации. Строили графики зависимости A280 от продолжительности инкубации. Специфичность определяли как соотношение удельной МА и общей ПА (МА/ПА).

#### **Определение ПА методом электрофореза.**

Для подготовки субстрата использовали цельное непастеризованное молоко коровы, в которое вносили  $NaN_3$  до 0,01%-ной концентрации и разводили в соотношении 1 : 4 (v/v) 20 мМ Na-ацетатным буфером (рН 5,65). Субстрат использовали в день приготовления. В 250 мкл субстрата вносили 5 мкл исследуемого рХн с активностью  $\approx 8$  ИМСУ/мл и тщательно перемешивали. Полученные фермент-субстратные смеси инкубировали при 35 °С в течение 1 ч. После завершения инкубации смешивали фермент-субстратные смеси с буфером для подготовки образцов перед загруз-

кой в ПААГ (Sample buffer for SDS-PAGE, «Serva», ФРГ) в соотношении 1 : 1 (v/v) и прогревали на кипящей водяной бане в течение 90 с. Подготовленные таким способом образцы исследовали методом ЭФ-ДСН по Лэммли [30]. В контрольные образцы вместо раствора рХн вносили 5 мкл 20 мМ Na-ацетатного буфера (рН 5,65).

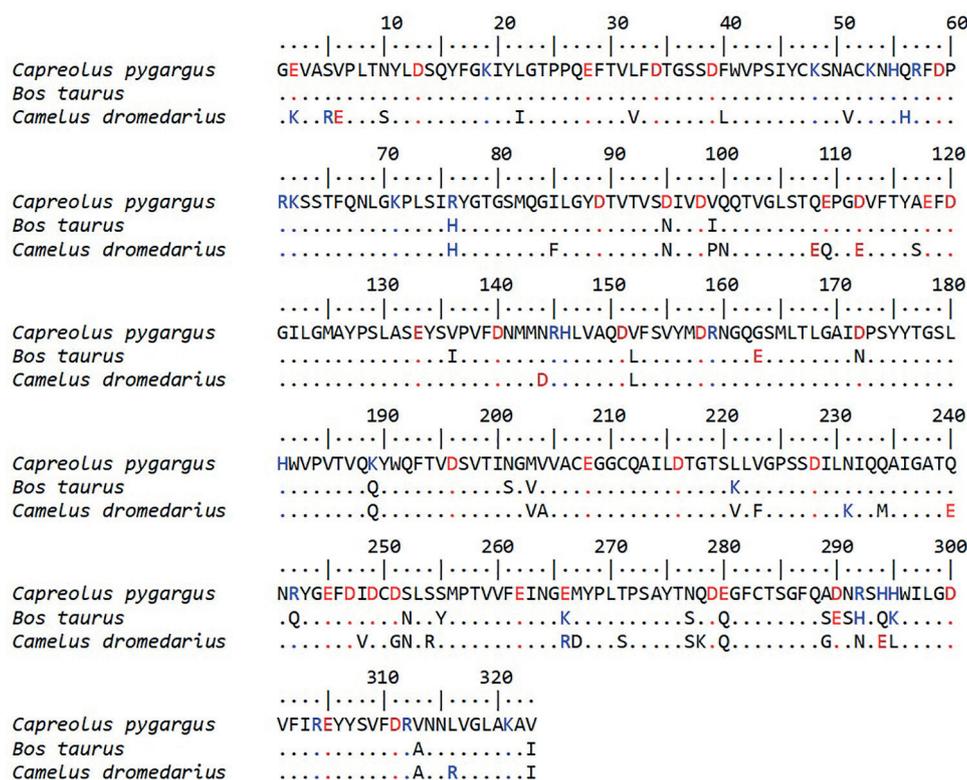
**Определение ТС.** Растворы рХн прогревали на водяной бане в диапазоне температур 30–70 °С в течение 30 мин, быстро охлаждали до комнатной температуры и определяли в них остаточную МА. За 100% принимали исходные значения МА, полученные в образцах, прогретых при 30 °С. Строили графики зависимости остаточной МА от температуры прогревания. Порогом ТС считали температуру прогревания, при которой исследуемый рХн сохранял не менее 80% от исходной МА.

**Статистическую обработку** полученных данных проводили в вычислительной среде табличного процессора Excel («Microsoft Corporation», США). Результаты определения количественных переменных представляли в виде среднего арифметического (M) с указанием среднеквадратического отклонения ( $\pm SD$ ).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**Идентификация гена СУМ косули.** На основании анализа нуклеотидных последовательностей генов СУМ, представленных в базе данных GenBank, было сделано предположение о том, что длина целевого гена составляет около 13 000 п.н. Было определено, что область границы гена *СУМ-Cap* демонстрирует высокую гомологию с аналогичными участками генов известных Хн. Поэтому на основе консенсусной последовательности были рассчитаны две пары олигонуклеотидных праймеров, необходимые для получения левого и правого перекрывающихся фрагментов.

ДНК полученных фрагментов гена после препаративной наработки и очистки использовалась для прямого секвенирования с обеих сторон, по методу Сэнгера. Множество перекрывающихся секвенограмм было собрано в контиг, включающий оба фрагмента гена. Для контроля правильности сборки была амплифицирована и секвенирована напрямую центральная область гена. Анализ структуры *СУМ-Cap* позволил выявить его высокую степень гомологии с ранее исследованными генами СУМ представителей семейства Оленевые: марала (*C. elaphus*), лося (*A. alces*) и северного оленя (*Rangifer tarandus*).



**Рис. 1.** Выравнивание аминокислотных последовательностей Хн козули, коровы и верблюда. Положительно заряженные аминокислотные остатки выделены синим, отрицательно заряженные – красным. Одинаковые аминокислотные остатки обозначены точками

**Определение нуклеотидной и аминокислотной последовательности гена *СУМ* козули.** Сравнение полученной последовательности гена *СУМ* *C. pygargus* с известными мРНК, кодирующими Хн у млекопитающих, позволило локализовать границы экзонов/интронов исследуемого гена и вывести структуру мРНК *СУМ-Cap*.

После установления интрон/экзонной структуры *СУМ-Cap* была определена его кодирующая последовательность, включающая пре- и про-фрагменты. Также был проведён сравнительный анализ полученной аминокислотной последовательности ПроХн козули с последовательностями ПроХн коровы и одногорбого верблюда.

В результате в выведенной аминокислотной последовательности Хн *C. pygargus* был обнаружен ряд примечательных замен, отличающих этот фермент от референсных Хн *B. taurus* и *C. dromedarius*. Эти замены расположены на участках, формирующих субстрат-связывающую полость, и теоретически могут влиять на свойства фермента. Так, у Хн козули остатком в положении 221, который формирует субсайт S4, является L, тогда как у коровы мы наблюдаем K, а у верблюда – V. В позиции 294, относящейся к субсайтам S1'+ S3', у козули находится H, в то время как у коровы это Q,

а у верблюда – E. Позицию 295 у Хн козули занимает H, в противоположность K у коровы и L у верблюда (рис. 1).

**Конструирование рекомбинантного вектора, обеспечивающего экспрессию гена *СУМ-Cap* в клетках СНО-К1.** Для бесшовной сборки экспрессионной кассеты, содержащей только кодирующие области гена *СУМ-Cap*, использовали сборку методом Golden Gate. Праймеры были рассчитаны таким образом, чтобы на 5'-конце каждого из них находился сайт Ps эндонуклеазы рестрикции Esp3I, который узнаёт последовательность CGTCTC и катализирует гидролиз ДНК через один нуклеотид после сайта узнавания с образованием четырёхнуклеотидных «липких» концов. «Липкие» концы подбирали так, чтобы они были непалиндромными, и каждый из них был комплементарен только одному другому «липкому» концу. В результате амплификации на матрице гена *СУМ-Cap* с использованием рассчитанных олигонуклеотидных праймеров было получено 9 фрагментов, кодирующих экзоны гена ПроХн *C. pygargus* (рис. 2).

Экспрессионная кассета была клонирована в составе вектора pIP1, разработанного в лаборатории иммунохимии ГНЦ «Вектор». Полученный вектор имел в своём составе плечи интеграции транспозона Sleeping

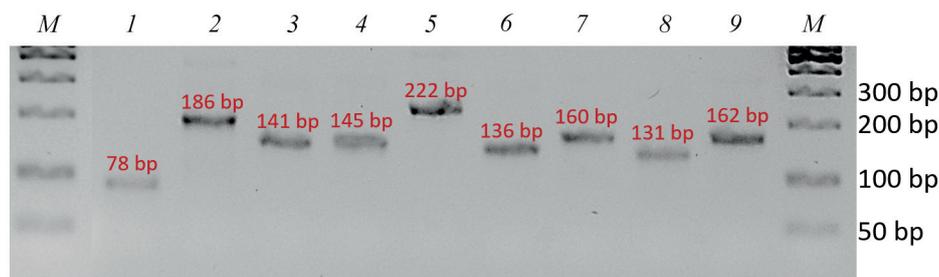


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР последовательностей экзонов гена ПроХн косули: 1–9 – экзоны 1–9; М – маркеры молекулярных масс 100 bp + 50 bp (SE-M33, «СибЭнзайм», Россия)

Beauty, которые фланкируют экспрессионную кассету и ген устойчивости к пуромицину для интеграции в геном клетки СНО и дальнейшего отбора трансфицированных клеток.

**Получение препарата рПроХн косули.** Выбор клеточной линии обусловлен следующими характеристиками СНО-К1: хорошо проработанные методы культивирования, устойчивость к изменению концентрации кислорода, рН, температуры, а также лёгкость адаптации к составу среды. Кроме того, метаболизм клеток СНО-К1 по сравнению с другими часто используемыми линиями (СНО-S и СНО-DG44) в большей степени направлен на экспрессию белка, чем на образование биомассы [32].

После трансфекции клеток плазмидой рIP1-Сар и проведения селекции в присутствии пуромицина в течение 10 дней была получена поликлональная культура клеток (СНО-К1-СУМ-Сар). Дальнейшее полупрепаративное культивирование проводили согласно вышеописанной методике в течение 14 дней до снижения доли жизнеспособных клеток < 75%. Полученная поликлональная культура клеток СНО-К1-СУМ-Сар обеспечивала синтез и секрецию целевого белка в культуральную жидкость. Электрофоретический анализ культуральной среды в процессе культивирования свидетельствовал о высоком (порядка 0,4–0,6 мкг/мкл) содержании в ней полипептидного компонента с ММ около 45 кДа, соответствующей с расчётной для рПроХн косули.

**Активация зимогена.** До активации коагуляционная активность культуральной жидкости, содержащей рПроХн *S. pygargus*, была < 0,1 ИМСУ/мл. После процедуры ступенчатого понижения и повышения рН общая МА препарата составила около 468 ИМСУ/мл. В результате активации МА культуральной жидкости увеличивалась более чем в 4600 раз, что свидетельствовало об эффективности превращения рПроХн в активный рХн косули.

**Концентрация рХн косули в культуральной жидкости.** После активации зимогена концен-

трация рХн-Сар в культуральной жидкости СНО-К1 равнялась  $0,50 \pm 0,03$  мг/мл.

**Выход рХн косули.** Впервые возможность экспрессии гена ПроХн коровы в клетках млекопитающих были показана 1986 г. в работе Gottlieb et al. [19]. Авторы использовали трансгенные по ПроХн клетки почек собак линии MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) и регистрировали секрецию целевого белка в культуральную среду. Активацию зимогена не производили, поэтому оценить выход Хн в системе экспрессии MDCK невозможно.

В работе Kolmer et al. [20] сообщалось о получении рХн коровы в системе продукции клеток HeLa. Отобранные клоны-продуценты секретировали ПроХн в культуральную среду. Выход целевого белка достигал 10–20 мг/л.

В данной работе выход рХн косули в системе продукции СНО-К1 составил 500 мг/л или  $\approx 468\ 000$  ИМСУ/л, что превышает показатели выхода генно-инженерных Хн даже в случае использования наиболее эффективных продуцентов этих ферментов на основе метилотрофных дрожжей (*Komagataella (Pichia) pastoris*) более чем в 2 раза [33–35]. Полученный нами поликлон СНО-К1-СУМ-Сар примерно в 2,6 раза уступал по продуктивности (в мг/л) хлорат-устойчивому мутанту *Aspergillus niger* var. *Awamori* (штамм GC1HF1-3; dgr246 Ch<sup>R</sup> 25), который создавался для получения рХн коровы [36]. При этом необходимо отметить, что выход по МА рХн коровы, полученного с использованием штамма GC1HF1-3; dgr246 Ch<sup>R</sup> 25, составлял  $\approx 90\ 000$  ИМСУ/л [37], что в 5,2 раза меньше, чем в случае рХн косули, полученного нами в СНО-К1.

**Анализ белкового состава культуральной жидкости.** Согласно электрофоретическим данным, рХн-Сар являлся доминирующим полипептидным компонентом культуральной жидкости СНО-К1 (рис. 3). При ЭФ-ДСН полоса рХн косули мигрировала как полипептид с ММ  $\approx 39$  кДа. Таким образом, условия экспрессии гена Хн *S. pygargus* в клетках СНО-К1 обеспечивали высокоэффективный синтез

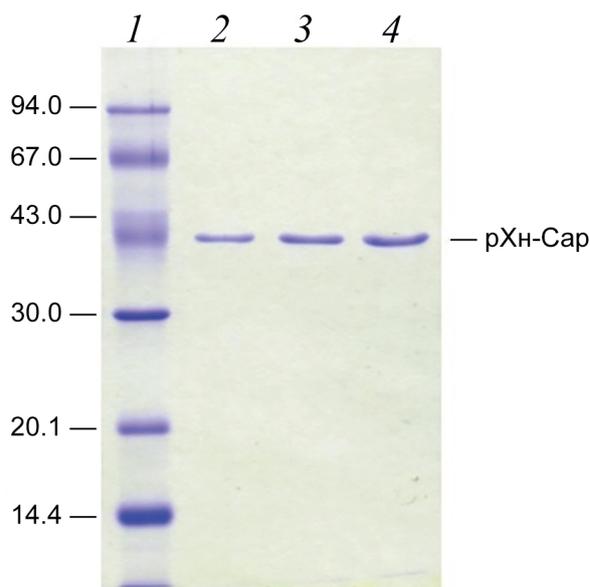
и секрецию целевого белка. После активации зимогена электрофоретическая чистота рХн косули в культуральной среде СНО-К1 была  $\geq 95\%$ .

**Удельная МА.** При определении параметров коагуляционной активности рХн косули и ферментов сравнения показатели рХн коровы принимали за 100% (табл. 3). По удельной МА рХн косули занял промежуточное положение в ряду исследованных ферментов: в  $\sim 1,4$  раза превзошёл рХн коровы, но в  $\sim 1,2$  раза уступил рХн одногорбого верблюда. Наибольшую коагуляционную эффективность продемонстрировал рХн верблюда, чья удельная МА была выше, чем у рХн коровы и косули, в  $\sim 1,7$  и  $\sim 1,2$  раза соответственно. Это согласуется с данными работы Carreler et al. [13], в которой было показано, что соотношение удельной МА рХн *B. taurus* и рХн *C. dromedarius* составляет 1 : 1,7.

Таким образом, рХн *C. pygargus*, полученный в системе экспрессии СНО-К1, является высокоэффективным коагулянтном коровьего молока, а по удельной МА сопоставим с высококачественными коммерческими препаратами рХн.

**ПА и коагуляционная специфичность.** Основными белками молока являются  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеины ( $\alpha$ -CN,  $\beta$ -CN и  $\kappa$ -CN). В нативном молоке взаимодействие всех групп CN и коллоидного фосфата кальция приводит к формированию стабильных белковых агрегатов, которые называются казеиновыми мицеллами [38, 39]. Одной из первостепенных физиологических функций Хн является его способность свёртывать молоко в желудке новорожденного. В результате белки и другие молочные нутриенты дольше задерживаются в желудочно-кишечном тракте, что обеспечивает их полноценное усвоение [40]. Поскольку в основе МА аспаргатных протеиназ лежит способность гидролизовать определённые пептидные связи, биохимическая характеристика любого нового молокозвёртывающего фермента (МФ) включает в себя оценку его ПА.

ПА коагулянтов молока условно подразделяют на специфическую и неспецифическую. Специфическая или МА направлена на гидро-



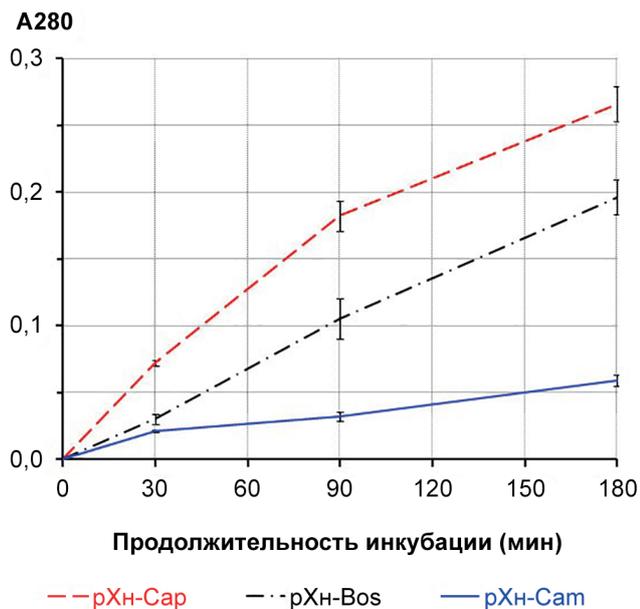
**Рис. 3.** Электрофорез препаратов культуральной жидкости СНО-К1 после активации зимогена рХн косули. Условные обозначения: 1 – маркеры молекулярных масс; 2 – 0,5 мкл препарата культуральной жидкости СНО-К1; 3 – 0,75 мкл препарата культуральной жидкости СНО-К1; 4 – 1,0 мкл препарата культуральной жидкости СНО-К1. Справа обозначено положение рХн-Сар. Слева указаны значения молекулярных масс маркеров в кДа

лиз только одной (ключевой) связи в молекуле  $\kappa$ -CN. Протеолиз этой единственной связи дестабилизирует казеиновые мицеллы, что позволяет им сблизиться и образовать трёхмерную сетчатую структуру – молочный сгусток. В случае  $\kappa$ -CN коровы ключевой является связь F105-M106. Неспецифическая или общая ПА характеризует способность МФ гидролизовать широкий спектр пептидных связей, за исключением связи F105-M106 или её аналога. Соотношение МА и общей ПА (МА/ПА) называется специфичностью и используется для сравнения коагуляционной эффективности молокозвёртывающих протеиназ [41].

Неспецифическая ПА рХн косули оказалась в 1,4–4,5 раза выше, чем у рХн сравнения (рис. 4). По динамике накопления продуктов протеолиза CN рХн косули напоминает рХн коровы и заметно отличается от рХн верблюда. В особенности эти различия проявляются

**Таблица 3.** Общая и удельная МА препаратов рХн

| Препарат | Общая МА (ИМСУ/мл) | Концентрация белка (мг/мл) | Удельная МА (ИМСУ/мг) | Удельная МА (%) |
|----------|--------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------|
| рХн-Сар  | 468,4 ± 11,1       | 0,500 ± 0,030              | 938 ± 22              | 141             |
| рХн-Вос  | 22,0 ± 0,7         | 0,033 ± 0,005              | 667 ± 21              | 100             |
| рХн-Сам  | 1037,3 ± 13,0      | 0,936 ± 0,023              | 1108 ± 14             | 166             |



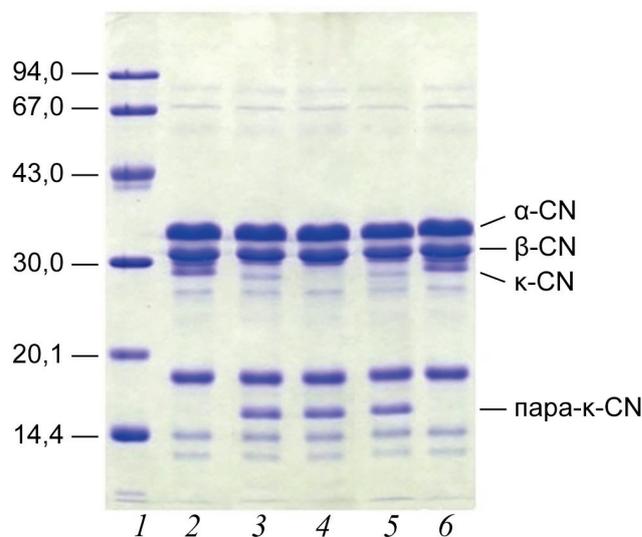
**Рис. 4.** Общая протеолитическая активность (A280) рекомбинантных химозинов. Условные обозначения: рХн-Сар – рХн косули; рХн-Вос – рХн коровы; рХн-Сам – рХн одногорбого верблюда

через 60 мин инкубации. Полученные нами низкие значения ПА характерны для рХн одногорбого верблюда и подтверждаются данными работы Karpele et al. [13], в которой было показано, что рХн верблюда обладает вчетверо меньшей неспецифической ПА, чем рХн коровы. В работе Velenka et al. [6] приводятся данные о том, что при одинаковой МА общая ПА рХн ближайшего филогенетического родственника одногорбого верблюда – альпака (*Vicugna pacos*) – примерно в 3 раза ниже, чем у рХн коровы. По-видимому, низкая общая ПА и высокая специфичность характерны для Хн представителей семейства Верблюдовые (*Camelidae*).

Для сравнения специфичности рХн косули и коммерческих генно-инженерных Хн использовали данные об их удельной МА (%) и общей ПА (%), при этом за 100% принимали показатели рХн коровы (табл. 4). По соотношению МА/ПА ферменты косули и коровы почти не различались и примерно в 5,5 раз уступали рХн одногорбого верблюда.

**Таблица 4.** Удельная МА, общая ПА и специфичность рекомбинантных химозинов

| Препарат | Удельная МА (%) | Общая ПА (A280) | Общая ПА (%) | Специфичность (МА/ПА) |
|----------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------------|
| рХн-Сар  | 141             | 0,266 ± 0,013   | 136          | 1,04                  |
| рХн-Вос  | 100             | 0,196 ± 0,013   | 100          | 1,00                  |
| рХн-Сам  | 166             | 0,059 ± 0,004   | 30           | 5,53                  |



**Рис. 5.** Протеолитическая активность рекомбинантных химозинов по отношению к белкам цельного молока коровы при pH 5,65. Условные обозначения: 1 – маркеры молекулярных масс; 2 – молоко + 20 мМ Na-ацетатный буфер, pH 5,65, непрогретое (контроль 1); 3 – молоко + рХн-Вос; 4 – молоко + рХн-Сам; 5 – молоко + рХн-Сар; 6 – молоко + 20 мМ Na-ацетатный буфер, pH 5,65, прогретое, как и опытные образцы – 60 мин, 35 °С (контроль 2). Слева указаны значения молекулярных масс маркеров в кДа. Справа обозначены полосы  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -CN и пара- $\kappa$ -CN (ММ  $\approx$  16 кДа, на треках 3–5).

Высокая коагуляционная специфичность (МА/ПА) служит одним из главных критериев эффективности и отбора МФ для сыроделия [41, 42]. Большинство известных молочкосвёртывающих аспарагиновых протеиназ различного генеза, за исключением Хн одногорбого верблюда, альпака и свиньи [6, 13], не могут сравниться по этому показателю с Хн коровы [18]. Поэтому значение МА/ПА = 1,04, полученное для рХн-Сар, синтезированного в системе экспрессии СНО-К1, представляет интерес с точки зрения перспектив практического применения этого фермента.

Протеолитическую специфичность рХн по отношению к белкам цельного коровьего молока исследовали методом ЭФ-ДСН (рис. 5). В результате инкубации молока с исследуемыми рХн в фермент-субстратных смесях накапливается пара- $\kappa$ -CN (ММ  $\approx$  16 кДа), что является результатом специфической ПА, направленной

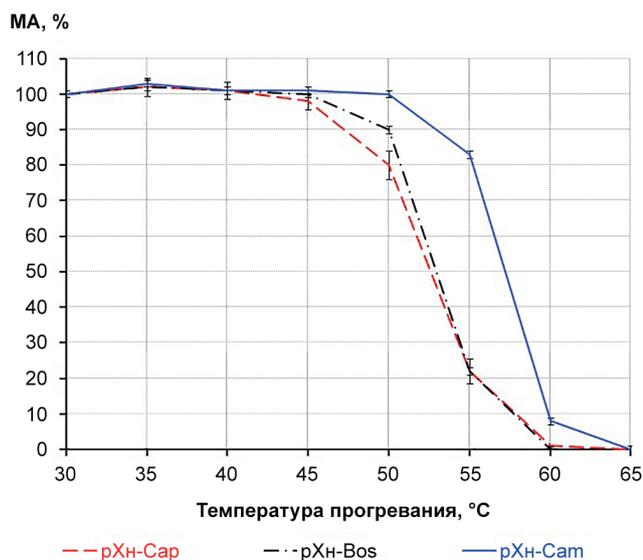


Рис. 6. Зависимость остаточной МА рекомбинантных химозинов от температуры прогревания (ТС). Условные обозначения: рХн-Сар – рХн косули; рХн-Вос – рХн коровы; рХн-Сам – рХн одногорбого верблюда

на гидролиз связи F105-M106 в молекуле к-CN (рис. 5, треки 3–5). Рекомбинантные Хн косули и коровы обладают похожей протеолитической специфичностью, и за время проведения анализа успевают гидролизовать не только к-CN, но также  $\alpha$ - и  $\beta$ -CN. В результате на электрофореграммах, полученных с использованием этих ферментов, появляются слабые белковые полосы с ММ 28–29 кДа и низкомолекулярные полипептидные компоненты с ММ  $\ll$  14 кДа, которые мигрируют в зоне лидирующего красителя (рис. 5, треки 3, 5). В случае рХн верблюда из полипептидного профиля белков молока исчезает только полоса к-CN (рис. 5, трек 4), что является отражением низкой неспецифической ПА этого фермента.

**Термостабильность.** ТС определяется как способность белка противостоять денатурации при повышении температуры и является важной биохимической характеристикой любого фермента. Результаты исследования ТС рХн косули, коровы и одногорбого верблюда представлены на рис. 6.

Порогом термоинактивации исследуемых рХн считали температуру (°C), при которой МФ сохранял  $\geq 80\%$  от исходной коагуляционной активности, измеренной при 30 °C. Согласно этому критерию, пороги ТС рХн коровы и косули были одинаковыми и составили 55 °C. Несмотря на то, что профили ТС этих ферментов похожи, полная термоинактивация рХн коровы происходила при 60 °C, тогда как рХн косули при этой температуре ещё сохранял 0,8% от исходной МА.

Порог термоинактивации рХн одногорбого верблюда был выше и равнялся 60 °C.

Полученные нами профили термоинактивации рХн коровы и верблюда подтверждаются результатами калориметрических исследований, согласно которым ТС рХн *C. dromedarius* выше, чем у рХн *B. taurus*: точки плавления ( $T_m$ ) этих ферментов различаются на 3 °C и равны 57,7 и 60,7 °C соответственно [41]. О том, насколько значимы такие различия, говорят результаты применения этих ферментов в сыроделии. Показано, что повышение температуры обработки молочного сгустка с 50 до 56 °C приводит к снижению интенсивности неспецифического протеолиза в сырах, произведённых с применением рХн коровы и верблюда. Тем не менее в сырах, выработанных с температурой нагревания сгустка 56 °C, в случае применения рХн верблюда обнаруживалась более высокая концентрация продуктов протеолитической деградации  $\alpha$ -CN, чем при использовании рХн коровы. На основании этих данных был сделан вывод о том, что рХн верблюда, чья общая ПА на 75% ниже, чем у рХн коровы, а  $T_m$  на 3 °C выше, вызывает более интенсивный протеолиз  $\alpha$ -CN в созревающих и хранящихся сырах [43].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённого исследования впервые установлена структура гена Хн сибирской косули и определена его экзон/интронная организация. Проведён сравнительный анализ последовательностей ПроХн косули, коровы и одногорбого верблюда, который выявил ряд аминокислотных замен на участках, формирующих субстрат-связывающую полость фермента и затрагивающих субсайты S4 и S1'+ S3'.

С использованием интеграционного вектора рР1 сконструирована рекомбинантная плаزمид рР1-Сар для экспрессии гена СУМ косули в клетках СНО-К1. Получена поликлональная культура клеток СНО-К1-СУМ-Сар, обеспечивающая синтез и секрецию в культуральную жидкость рПроХн косули.

После активации зимогена получен препарат рХн косули с общей МА  $468,4 \pm \pm 11,1$  ИМСУ/мл. Выход рХн косули в системе продукции СНО-К1 составил 500 мг/л или  $\approx 468\ 000$  ИМСУ/л, что в 2–5 раз превышает показатели выхода генно-инженерных Хн в системах экспрессии дрожжей и плесневых грибов.

Определены основные биохимические свойства полученного фермента. Удельная МА рХн *C. pygargus* составила  $938 \pm 22$  ИМСУ/мг

белка и была сопоставима с показателями коммерческих рХн коровы и верблюда. Неспецифическая ПА рХн косули оказалась в 1,4–4,5 раза выше, чем у рХн сравнения. Тем не менее за счёт высокой удельной МА рХн-Сар занимал промежуточное положение по коагуляционной специфичности (отношению МА/ПА) между генно-инженерными Хн коровы и одnogорбого верблюда. Порог ТС рХн косули был равен 55 °С. При 60 °С фермент сохранял < 1% МА от исходной, а его полная термоин- активация наблюдалась при 65 °С.

Исключительно высокая продуктивность культуры СНО-К1 по рХн косули является основным результатом данной работы и свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения возможностей использования систем экспрессии млекопитающих для получения рекомбинантных молокосвёртывающих протеиназ.

**Вклад авторов.** Д.Е. Мурашкин и С.В. Беленская написали рукопись; А.А. Бондарь подготовил иллюстрации; В.В. Ельчанинов и Д.Н. Щербаков отредактировали текст статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355) в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 гг.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gilliland, G. L., Winborne, E. L., Nachman, J., and Wlodawer, A. (1990) The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution, *Proteins*, **8**, 82–101, doi: 10.1002/prot.340080110.
- Khan, A. R., Khazanovich-Bernstein, N., Bergmann, E. M., and James, M. N. (1999) Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral 3C protease precursors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10968–10975, doi: 10.1073/pnas.96.20.10968.
- Richter, C., Tanaka, T., and Yada, R. Y. (1998) Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin, *Biochem. J.*, **335**, 481–490, doi: 10.1042/bj3350481.
- Chen, H., Zhang, G., Zhang, Y., Dong, Y., and Yang, K. (2000) Functional implications of disulfide bond, Cys206–Cys210, in recombinant prochymosin (chymosin), *Biochemistry*, **39**, 12140–12148, doi: 10.1021/bi000976o.
- Eskandari, M. H., Hosseini, A., Alasvand Zarasvand, S., and Aminlari, M. (2012) Cloning, expression, purification and refolding of caprine prochymosin, *Food Biotechnol.*, **26**, 143–153, doi: 10.1080/08905436.2012.670829.
- Belenkaya, S. V., Rudometov, A. P., Shcherbakov, D. N., Balabova, D. V., Kriger, A. V., et al. (2018) Biochemical properties of recombinant chymosin in alpaca (*Vicugna pacos* L.), *Appl. Biochem. Microbiol.*, **54**, 569–576, doi: 10.1134/S0003683818060054.
- Balabova, D. V., Rudometov, A. P., Belenkaya, S. V., Belov, A. N., Koval, A. D., et al. (2022) Biochemical and technological properties of moose (*Alces alces*) recombinant chymosin, *Vavilov J. Genet. Breeding*, **26**, 240–247, doi: 10.18699/VJGB-22-31.
- Parente, D., de Ferra, F., Galli, G., and Grandi, G. (1991) Prochymosin expression in *Bacillus subtilis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **77**, 243–249, doi: 10.1111/j.1574-6968.1991.tb04356.x.
- Liu, W. G., Wang, Y. P., Zhang, Z. J., Wang, M., Lv, Q. X., et al. (2017) Generation and characterization of caprine chymosin in corn seed, *Protein Express. Purif.*, **135**, 78–82, doi: 10.1016/j.pep.2017.05.004.
- Wei, Z. Y., Zhang, Y. Y., Wang, Y. P., Fan, M. X., Zhong, X. F., et al. (2016) Production of bioactive recombinant bovine chymosin in tobacco plants, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 624, doi: 10.3390/ijms17050624.
- Azizi-Dargahlou, S., Ahmadabadi, M., and Valizadeh Kamran, R. (2022) Biolistic transformation and expression of functional chymosin from a codon-optimized synthetic bovine gene in tobacco plants, *J. Med. Plants By-Product*, doi: 10.22092/jmpb.2022.356717.1425.
- Rozov, S. M., Permyakova, N. V., and Deineko, E. V. (2018) Main strategies of plant expression system glycoengineering for producing humanized recombinant pharmaceutical proteins, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 215–232, doi: 10.1134/S0006297918030033.
- Kappeler, S. R., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhhan, Z., Hansen, E. B., and Johansen, E. (2006) Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 647–654, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.014.
- Vallejo, J. A., Ageitos, J. M., Poza, M., and Villa, T. G. (2008) Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris*, *J. Agricult. Food Chem.*, **56**, 10606–10610, doi: 10.1021/jf802339e.

15. Espinoza-Molina, J. A., Acosta-Muñiz, C. H., Sepulveda, D. R., Zamudio-Flores, P. B., and Rios-Velasco, C. (2016) Codon optimization of the “Bos Taurus Chymosin” gene for the production of recombinant chymosin in *Pichia pastoris*, *Mol. Biotechnol.*, **58**, 657-664, doi: 10.1007/s12033-016-9965-7.
16. Kappeler, S., Farah, Z., van den Brink, J. M., Rahbek-Nielsen, H., and Budtz, P. (2016) U.S. Patent No. 9,307,775, Washington, DC, U.S. Patent and Trademark Office.
17. Бельнская С. В., Ельчанинов В. В., Щербаков Д. Н. (2021) Разработка продуцента рекомбинантного химозина марала на основе дрожжей *Kluyveromyces lactis*, *Биотехнология*, **37**, 20-27, doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-5-20-27.
18. Uniacke-Lowe, T., and Fox, P. F. (2017) Chymosin, pepsins and other aspartyl proteinases: Structures, functions, catalytic mechanism and milk-clotting properties, in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Elsevier, Academic Press, pp. 69-113, doi: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00004-1.
19. Gottlieb, T. A., Beaudry, G., Rizzolo, L., Colman, A., Rindler, M., et al. (1986) Secretion of endogenous and exogenous proteins from polarized MDCK cell monolayers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2100-2104, doi: 10.1073/pnas.83.7.2100
20. Kolmer, M., Örd, T., and Ulmanen, I. (1991) Expression of recombinant calf prochymosin in mammalian cell culture, *J. Biotechnol.*, **20**, 131-139, doi: 10.1016/0168-1656(91)90222-H.
21. McKenzie, E. A., and Abbott, W. M. (2018) Expression of recombinant proteins in insect and mammalian cells, *Methods*, **147**, 40-49, doi: 10.1016/j.ymeth.2018.05.013.
22. Zhu, J. (2012) Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production, *Biotechnol. Adv.*, **30**, 1158-1170, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.022.
23. Kunert, R., and Reinhart, D. (2016) Advances in recombinant antibody manufacturing, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 3451-3461, doi:10.1007/s00253-016-7388-9.
24. Tihanyi, B., and Nyitray, L. (2020) Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production, *Drug Discov. Today Technol.*, **38**, 25-34, doi: 10.1016/j.ddtec.2021.02.003.
25. Belenkaya, S. V., Shcherbakov, D. N., Balabova, D. V., Belov, A. N., Koval, A. D., and Elchaninov, V. V. (2020) Production of maral (*Cervus elaphus sibiricus Severtzov*) recombinant chymosin in the prokaryotic expression system and the study of the aggregate of its biochemical properties relevant for the cheese-making industry, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **56**, 647-656, doi: 10.1134/S0003683820060034.
26. Belenkaya, S. V., Bondar, A. A., Kurgina, T. A., Elchaninov, V. V., Bakulina, A. Y., Rukhlova, E. A., Lavrik, O. I., Ilyichev, A. A., and Shcherbakov, D. N. (2020) Characterization of the Altai maral chymosin gene, production of a chymosin recombinant analog in the prokaryotic expression system, and analysis of its several biochemical properties, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 781-791, doi: 10.1134/S0006297920070068.
27. Белов А. Н., Коваль А. Д., Пушкарев В. А., Миронова А. В., Щербаков Д. Н., и др. (2022) Первый опыт применения отечественного рекомбинантного химозина при выработке сыра с низкой температурой второго нагревания, *Сыроделие и маслоделие*, **3**, 28-32, doi: 10.31515/2073-4018-2022-3-28-32.
28. Engler, C., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability, *PLoS One*, **3**, e3647, doi: 10.1371/journal.pone.0003647.
29. Derouazi, M., Girard, P., Van Tilborgh, F., Iglesias, K., Muller, N., et al. (2004) Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells, *Biotechnol. Bioeng.*, **87**, 537-545, doi: 10.1002/bit.20161.
30. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
31. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
32. Reinhart, D., Damjanovic, L., Kaisermayer, C., Sommeregger, W., Gili, A., et al. (2019) Bioprocessing of recombinant CHO-K1, CHO-DG44, and CHO-S: CHO expression hosts favor either mAb production or biomass synthesis, *Biotechnol. J.*, **14**, 1700686, doi: 10.1002/biot.201700686.
33. Akishev, Z., Abdullayeva, A., Mussakhmetov, A., Bekbayeva, A., Tursunbekova, A., et al. (2023) The obtaining of the recombinant camel chymosin by submerge fermentation in the pilot bioreactor, *Eur. J. Appl. Biotechnol.*, **1**, 45-55, doi: 10.11134/btp.1.2023.4.
34. Ersöz, F., and İnan, M. (2019) Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris*, *Protein Express. Purif.*, **154**, 126-133, doi: 10.1016/j.pep.2018.10.007.
35. Wang, N., Wang, K. Y., Li, G., Guo, W., and Liu, D. (2015) Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*, *Protein Express. Purif.*, **111**, 75-81, doi: 10.1016/j.pep.2015.03.012.
36. Bodie, E. A., Armstrong, G. L., Dunn-Coleman, N. S. (1994) Strain improvement of chymosin-producing strains of *Aspergillus niger* var. *awamori* using parasexual recombination, *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 376-382, doi:10.1016/0141-0229(94)90151-1.
37. Van den Brink, H. J. M., Petersen, S. G., Rahbek-Nielsen, H., Hellmuth, K., and Harboe, M. (2006) Increased production of chymosin by glycosylation, *J. Biotechnol.*, **125**, 304-310, doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.02.024.

38. Horne, D. S. (2002) Casein structure, self-assembly and gelation, *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.*, **7**, 456-461, doi: 10.1016/S1359-0294(02)00082-1.
39. Holt, C. (1992) Structure and stability of bovine casein micelles, *Adv. Protein Chem.*, **43**, 63-151, doi: 10.1016/S0065-3233(08)60554-9.
40. Foltmann, B. (1992) Chymosin: a short review on foetal and neonatal gastric proteases, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **52**, 65-79, doi: 10.1080/00365519209104656.
41. Jensen, J. L., Mølgaard, A., Navarro Poulsen, J. C., Harboe, M. K., Simonsen, J. B., et al. (2013) Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties, *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.*, **69**, 901-913, doi: 10.1107/S0907444913003260.
42. Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., and McSweeney, P. L. H. (2016) Enzymatic coagulation of milk, in *Fundamentals of Cheese Science*, pp. 185-229, doi: 10.1007/978-1-4899-7681-9\_7.
43. Costabel, L. M., Bergamini, C. V., Pozza, L., Cuffia, F., Candioti, M. C., and Hynes, E. (2015) Influence of chymosin type and curd scalding temperature on proteolysis of hard cooked cheeses, *J. Dairy Res.*, **82**, 375-384, doi: 10.1017/S0022029915000175.

## ANALYSIS OF SOME BIOCHEMICAL PROPERTIES OF RECOMBINANT SIBERIAN ROE DEER (*Capreolus pygargus*) CHYMOSIN OBTAINED IN THE MAMMALIAN CELL CULTURE (CHO-K1)

D. E. Murashkin<sup>1</sup>, S. V. Belenkaya<sup>1,2\*</sup>, A. A. Bondar<sup>3</sup>,  
V. V. Elchaninov<sup>4</sup>, and D. N. Shcherbakov<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", 630559 Koltsovo, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Genomics Core Facility, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> Federal Altai Scientific Center of Agrobiotechnologies, Siberian Research Institute of cheese making, 656910 Barnaul, Russia

<sup>5</sup> Altai State University, 656049 Barnaul, Russia

The structure of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) chymosin gene has been established for the first time and its exon/intron organization has been determined. The coding part of the *C. pygargus* chymosin gene was reconstructed and obtained as a DNA clone using the Golden Gate method. Comparative analysis of the sequences of prochymosins of roe deer, cow and single-humped camel revealed a number of amino acid substitutions in the sites forming the substrate-binding cavity of the enzyme and affecting the specificity subsites S4 and S1' + S3'. The recombinant plasmid pIP1-Cap was constructed using the integration vector pIP1 for the expression of the roe deer prochymosin gene in CHO-K1 cells. A polyclone of CHO-K1-CYM-Cap cells was obtained, providing synthesis and secretion of recombinant prochymosin into the culture fluid of the producer. As a result of zymogen activation, a recombinant roe deer chymosin preparation with a total milk-clotting activity of  $468.4 \pm 11.1$  IMCU/ml was obtained. The yield of recombinant roe deer chymosin was 500 mg/liter or  $\approx 468,000$  IMCU/liter, which exceeds the yield of genetically engineered chymosins in most of the expression systems used. The main biochemical properties of the obtained enzyme were compared with commercial preparations of recombinant chymosins of single-humped camel (*Camelus dromedarius*) and cow (*Bos taurus*). The specific milk-clotting activity of recombinant *C. pygargus* chymosin was  $938 \pm 22$  IMCU/mg of protein and was comparable with the indicators of comparison enzymes. The non-specific proteolytic activity of recombinant roe deer chymosin was 1.4-4.5 times higher than that of cow and camel enzymes. In terms of coagulation specificity, the recombinant *C. pygargus* chymosin occupied an intermediate position between the genetically engineered analogues of *B. taurus* and *C. dromedarius* chymosins. The threshold of thermal stability of recombinant roe deer chymosin was equal to 55°C. At 60°C, the enzyme retained <1% of the initial milk-clotting activity, and its complete thermal inactivation was observed at 65°C.

**Keywords:** mammalian expression system, CHO-K1, recombinant chymosin, Siberian roe deer, milk-clotting activity, proteolytic activity, thermal stability