

ДИСКУССИОННЫЕ СТАТЬИ, ЛЕКЦИИ, НОВЫЕ ТРЕНДЫ МЕДИЦИНСКОЙ НАУКИ DISCUSSION PAPERS, LECTURES, NEW TRENDS IN MEDICAL SCIENCE

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА АНАЛЬГЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА HCRG21

Павленко А.П.^{1,2},
Кветкина А.Н.²,
Балдаев С.Н.²,
Лейченко Е.В.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО «Дальневосточный
федеральный университет», Передовая
инженерная школа (690922,
г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, д. 10,
Россия)

² Тихоокеанский институт
биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
ДВО РАН (690022, г. Владивосток,
проспект 100-летия Владивостоку, 159)

Автор, ответственный за переписку:
Павленко Александра Павловна
e-mail: apavlenko141@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Разработка новых, более эффективных обезболивающих препаратов, обладающих высоким сродством к биологическим мишеням, является актуальной задачей. Кандидатом для разработки нового анальгетического препарата стал пептид HCRG21 морской анемоны *Heteractis magnifica* – блокатор TRPV1-канала.

Цель исследования. Провести исследование генетической и экспрессионной стабильности штамма *Escherichia coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21, продуцирующего гибридный белок SMT3_HCRG21.

Материалы и методы. Жизнеспособность клеток рабочей посевной культуры (РПК) при последовательных пассажах оценивали путем расчета титра клеток в каждом пассаже. Количество генераций РПК определяли на основании значений титра жизнеспособных клеток для каждого пассажа по соответствующей формуле. Уровень экспрессии гибридного белка в последовательных пассажах клеток был рассчитан посредством отношения количества гибридного белка к общему белку клеточного лизата. Содержание белка определяли по методу Лоури и с помощью электрофореза. Методами ПЦР и электрофоретического разделения определяли размер участка ДНК, кодирующего гибридный белок SMT3_HCRG21, а также проводили секвенирование по Сэнгеру для подтверждения подлинности вставки.

Результаты. Показано, что при последовательных пересевах титр клеток варьирует от $8,3 \cdot 10^7$ до $1,7 \cdot 10^9$ клеток/мл, а среднее число генераций составило $10,4 \pm 2,3$. В результате амплификации пДНК клонов 10, 90 и 140 генераций были получены фрагменты длиной около 600 н.п., что соответствует длине нуклеотидной последовательности генетической конструкции pSMT3_HCRG21 (541 н.п.). Нуклеотидные последовательности полученных ПЦР-фрагментов оказались полностью идентичны заявленному в паспорте штамма-продуцента. Продемонстрировано, что среднее содержание гибридного белка между генерациями сохранялось на уровне 16 %, что свидетельствует о высокой стабильности уровня продуктивности штамма.

Заключение. Биосинтетическая активность и количество жизнеспособных клеток штамма *E. coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21 остаются стабильными, таким образом, штамм может быть использован для производства анальгетического пептида HCRG21.

Ключевые слова: анальгетический пептид, штамм-продуцент *Escherichia coli*, стабильность штамма, рабочая посевная культура

Статья поступила: 31.03.2026
Статья принята: 14.08.2026
Статья опубликована: 09.10.2026

Для цитирования: Павленко А.П., Кветкина А.Н., Балдаев С.Н., Лейченко Е.В. Исследование стабильности штамма-продуцента анальгетического пептида HCRG21. *Acta biomedica scientifica*. 2026; 11(4): 12-20. doi: 10.29413/ABS.2026-11.4.2

STABILITY STUDY OF THE PRODUCER STRAIN OF THE ANALGESIC PEPTIDE HCRG21

Pavlenko A.P.^{1,2},
Kvetkina A.N.²,
Baldaev S.N.²,
Leychenko E.V.^{1,2}

¹ Far Eastern Federal University, Advanced Engineering School (10 Ajax Bay, Russky Island, Vladivostok 690922, Russian Federation)

² G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, (100-letiya Vladivostoka Prospekt, 159, Vladivostok 690022, Russian Federation)

Corresponding author:

Aleksandra P. Pavlenko

e-mail: apavlenko141@gmail.com

ABSTRACT

*The development of new, more effective analgesic drugs with high affinity for biological targets is a critical challenge. The peptide HCRG21, a TRPV1 channel blocker derived from the sea anemone *Heteractis magnifica*, is considered as a promising candidate for a new analgesic drug.*

Aim. *To investigate the genetic and expression stability of the *Escherichia coli* strain Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21, which produces the SMT3_HCRG21 fusion protein.*

Materials and methods. *The viability of the working seed lot (WSL) during sequential passaging was assessed by calculating the cell titer in each passage. The number of generations of WSL cells was determined based on the viable cell titer values for each passage using an appropriate equation. The expression level of the fusion protein during continuous cell passaging was calculated as the ratio of the fusion protein amount to the total cellular protein in the cell lysate. Protein content was determined using the Lowry method and electrophoresis. The size of the DNA region encoding the SMT3_HCRG21 fusion protein was determined by PCR and electrophoretic separation, and Sanger sequencing was performed to confirm its genetic identity as specified in the strain passport.*

Results. *During continuous passaging, the cell titer has been shown to vary from $8.3 \cdot 10^7$ to $1.7 \cdot 10^9$ cells/mL, and the average number of generations was 10.4 ± 2.3 . Following pDNA amplification of clones from 10, 90, and 140 generations the PCR fragments of approximately 600 bp in length were obtained, which correspond to the length of the nucleotide sequence of the pSMT3_HCRG21 genetic construct (541 bp). The nucleotide sequences of the obtained PCR fragments were identical to those specified in the strain passport. It was demonstrated that the average content of the fusion protein across generations remained at 16 %, indicating a high stability of the strain productivity level.*

Conclusions. *The biosynthetic activity and viable cell titer of the *E. coli* strain Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21 remained stable; therefore, the strain can be used for industrial production of the analgesic peptide HCRG21.*

Key words: Analgesic peptide; *Escherichia coli* producer strain; genetic stability; working cell culture

Received: 31.03.2026

Accepted: 14.08.2026

Published: 09.10.2026

For citation: Pavlenko A.P., Kvetkina A.N., Baldaev S.N., Leychenko E.V. Stability study of the producer strain of the analgesic peptide HCRG21. *Acta biomedica scientifica*. 2026; 11(4): 12-20. doi: 10.29413/ABS.2026-11.4.2

ВВЕДЕНИЕ

Актуальной проблемой современной медицины является недостаточная эффективность и безопасность используемых анальгетических препаратов. Существующие группы препаратов, такие как нестероидные противовоспалительные средства и опиоидные анальгетики, обладают серьезными побочными эффектами и не подходят для длительного применения вследствие высоких рисков развития зависимости, толерантности и токсичности [1]. Поиск новых соединений, обладающих анальгетическими свойствами, и разработка на их основе обезболивающих лекарственных средств является важной биомедицинской задачей.

В этом контексте перспективным кандидатом для создания анальгетического препарата нового поколения является пептид HCRG21, аминокислотная последовательность которого была выведена на основе последовательности транскрипта, полученного в результате секвенирования библиотеки кДНК морской анемоны *Heteractis magnifica* (ранее ошибочно определенной как *Heteractis crispa*) [2]. Пептид HCRG21 (6228 Да) состоит из 56 а.о. и относится к структурному семейству пептидов Кунитц-типа, которые, как известно, способны ингибировать сериновые протеазы и модулировать различные типы ионных каналов [2–4]. Было показано, что рекомбинантный аналог HCRG21 является ингибитором трипсина и химотрипсина (K_i $2,0 \cdot 10^{-7}$ и $7,0 \cdot 10^{-7}$ М соответственно) и отрицательным аллостерическим модулятором канала TRPV1 (IC_{50} 6,9 мкМ) [2]. Известно, что канал TRPV1 отвечает за передачу болевых сигналов, а антагонисты TRPV1 предотвращают боль, блокируя рецепторы на чувствительных нейронах и вызывая тем самым длительную анальгезию, что делает их реальной альтернативой традиционным анальгетикам [5, 6]. Исследования *in vivo* на различных моделях боли и воспаления продемонстрировали выраженное пролонгированное анальгетическое действие HCRG21 [7–9].

Пептидная природа HCRG21 обуславливает перспективы производства лекарственных препаратов на его основе биосинтетическим способом. Ключевое преимущество биосинтеза заключается в контролируемом получении безопасных целевых соединений в промышленном масштабе с возможностью оптимизировать и удешевить процесс очистки готового препарата.

Основными биосинтетическими этапами получения пептидного препарата являются создание штамма-продуцента, изучение его стабильности в лабораторных и промышленных условиях, наработка и выделение пептида, и изучение стабильности препарата пептида при использовании и хранении.

Целью данной работы являлось изучение стабильности штамма-продуцента *Escherichia coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21, который планируется использовать в дальнейшем производстве пептида HCRG21 в промышленных масштабах для создания на его основе лекарственного препарата.

Изучение стабильности включало определение биосинтетической активности и количества жизнеспособных клеток и числа генераций рабочей посевной культуры штамма-продуцента, определение подлинности и уровня продуктивности главной посевной культуры штамма-продуцента и определение размера и подлинности гена, кодирующего гибридный белок SMT3_HCRG21, при последовательных пересевах культуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение количества жизнеспособных клеток и биосинтетической активности культуры

Для определения количества жизнеспособных клеток в культуре штамма-продуцента *E. coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21 была приготовлена рабочая посевная культура (РПК) в 15%-ном стерильном растворе глицерина в конечном объеме 100 мл и проведена серия последовательных пассажей (12 пассажей). В качестве посевного материала для первого пассажа использовали РПК, для каждого последующего пассажа – культуральную жидкость (КЖ) предыдущего посева. Используя технику последовательных десятикратных разведений, РПК и КЖ каждого пассажа разводили в стерильном физиологическом растворе и высевали на чашки Петри в трех повторах. Титр клеток в 1 мл культуры рассчитывали по формуле:

$$T = d \times n \times 10,$$

где d – разведение, n – среднее количество выросших колоний.

Для определения биосинтетической активности штамма-продуцента *E. coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21 КЖ пассажей I, III, VI, IX и XII инкубировали при 37°C и интенсивной аэрации (220 об/мин) до достижения оптической плотности 1–1,2 при длине волны 600 нм. Продукцию гибридного белка в клетках индуцировали изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ), после чего клетки инкубировали при 37°C при постоянном перемешивании (220 об/мин) в течение 5 часов. После разрушения бактериальных клеток с помощью ультразвука клеточный лизат был подвергнут центрифугированию (10000 об/мин, 10 мин, 4°C). Гибридный белок выделяли методом аффинной хроматографии на колонке с Ni-NTA-агарозой (Machery-Nagel Protino®, Германия) по инструкции производителя. Концентрацию суммарного и гибридного белка определяли с помощью колориметрического метода Лоури [10]. Биосинтетическую активность культуры штамма-продуцента оценивали как отношение содержания гибридного белка SMT3_HCRG21 к суммарному белку в супернатанте, значение выражали в %.

Определение числа генераций культуры в рабочем банке

Количество генераций РПК штамма-продуцента *E. coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21 определяли

на основании значений, полученных при определении титра жизнеспособных клеток для каждого пассажа. Число генераций в пассажах рассчитывали по формуле:

$$k = \frac{\lg n_k - \lg n_0}{\lg 2},$$

где n_0 – число клеток в дозе посевного материала (объем 0,1 мл), равное титру клеток в соответствующем пассаже, n_k – число клеток в культуральной жидкости, объем которой равен 100 мл, по окончании инкубации.

Обработка полученных данных была проведена с помощью программного обеспечения Microsoft Excel (Microsoft Office, США).

Определение подлинности и уровня продуктивности штамма

Суспензию клеток главной посевной культуры (ГПК) штамма-продуцента *E. coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21 высевали на чашки Петри и инкубировали в термостате при 37°C в течение 16 часов до появления единичных колоний. Выросшие колонии ресуспендировали в 50 мл жидкой питательной среды и инкубировали при 37°C и 220 об/мин в течение 8–9 часов до ОП₆₀₀ = 1–1,2 (пассаж 1). Полученную клеточную культуру объемом 0,08 мл переносили в свежую стерильную питательную среду объемом 50 мл и инкубировали при 37°C и 220 об/мин в течение 8–9 часов до ОП₆₀₀ = 1–1,2. Процедуру повторяли до XIV пассажа.

Для оценки подлинности и уровня экспрессии гибридного белка клетками штамма-продуцента клетки 6 колоний из пассажей I, IX и XIV переносили в стерильные колбы с 50 мл жидкой питательной среды и инкубировали при тех же условиях. Полученную суспензию делили на два равных объема, один из которых использовали для выделения плазмидной ДНК (пДНК). К оставшейся части КЖ добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ и инкубировали КЖ при 37°C, 220 об/мин в течение 5 часов. Полученную биомассу гомогенизировали с помощью ультразвука, клеточный лизат осветляли центрифугированием (10000 об/мин, 10 мин, 4°C).

Оценку уровня экспрессии гибридного белка SMT3_HCRG21 в супернатанте и молекулярную массу гибридного белка определяли с помощью электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле по методу Лэммли [11]. Анализ белков клеточного лизата на электрофореграммах и определение содержания гибридного белка SMT3_HCRG21 осуществляли с помощью системы визуализации iBrightFL1500 (Invitrogen, Thermo Scientific, США) и соответствующего ПО. Расчет суммарной интенсивности всех полос и процентного содержания гибридного белка SMT3_HCRG21 осуществляли с помощью программного обеспечения Microsoft Excel (Microsoft Office, США).

Одобрение проведения исследования Локальным этическим комитетом не требуется.

Установление размера гена, кодирующего гибридный белок SMT3_HCRG21

Выделение пДНК из КЖ проводили с помощью коммерческого набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия)

по инструкции производителя. Фрагмент гена, кодирующего гибридный белок SMT3_HCRG21, получали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием универсальных Т7-праймеров на амплификаторе DNA Engine Thermal Cycler (Bio-Rad, США) с применением коммерческого набора Encyclo plus (Евроген, РФ). Амплификацию ДНК проводили при следующих условиях: 95°C, 60 сек; 95°C, 10 сек; 30 циклов 55°C, 30 сек, 72°C, 60 сек; 72°C, 5 мин. Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов выполняли в 1%-ном агарозном геле с использованием маркера длин ДНК (100+ bp, Евроген, РФ). Нуклеотидную последовательность подтверждали секвенированием с использованием стандартных Т7-праймеров и коммерческого набора реактивов BigDyeTM Terminator v.3.1 (Thermo Scientific, США) на генетическом ДНК-анализаторе SeqStudio (Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями производителей.

Статистический анализ

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программного обеспечения OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, США). Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Тьюки, различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из важных этапов валидации технологического процесса и обязательным условием для промышленного производства рекомбинантных пептидов является изучение стабильности их штаммов-продуцентов. Это позволяет гарантировать производство безопасного и эффективного целевого пептида с минимальными экономическими потерями для производителя. Основными критериями по изучению стабильности штамма-продуцента являются подтверждение подлинности и чистоты культуры, ее генетической и экспрессионной стабильности.

В данной работе была изучена стабильность штамма-продуцента *E. coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21, который продуцирует гибридный белок SMT3_HCRG21, содержащий анальгетический пептид HCRG21 [12, 13]. *E. coli* представляет собой наиболее широко и успешно используемую систему для синтеза гетерологичных белков и пептидов. Экспрессионная конструкция на основе плазмидного вектора pSMT3 включает в себя последовательность, кодирующую гибридный белок, состоящий из пептида HCRG21, гексагистидиновой метки, сайта для гидролиза протеазой Ulp-1 и белка-партнера SMT3. Гексагистидиновая метка необходима для выделения гибридного белка из клеточного лизата с помощью металл-аффинной хроматографии. Белок партнер SMT3 распознается и выселяется специфической протеазой Ulp-1 [12, 13]. В отличие от используемого в лабораторной практике бромциана, применение ферментативного гидролиза

позволяет использовать целевой пептид в качестве медицинского препарата.

Для определения жизнеспособности клеток культуры штамма-продуцента *E. coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21 было проведено 12 последовательных пассажей рабочей посевной культуры. Количество пассажей было выбрано на основе принципа разумной достаточности. В результате было показано, что среднее количество выросших колоний в 12 последовательных пассажах варьирует от 8 до 34 при разведении КЖ в 10^6 раз и от 3 до 16 – при разведении в 10^7 раз (табл. 1). Минимальное значение титра жизнеспособных клеток составило $8,3 \cdot 10^7$ клеток/мл в пассаже VI и максимальное – $1,7 \cdot 10^9$ клеток/мл в пассаже X. Основываясь на полученных значениях титра жизнеспособных клеток в каждом пассаже было рассчитано количество генераций клеток культуры. Установлено, что количество генераций между пассажами варьирует от 7,1 до 14,2, тогда как общее количество генераций в 12 последовательных пассажах культуры оказалось равным 124,4. Следовательно, расчетное среднее количество генераций в одном пассаже составляет $10,4 \pm 2,3$.

Для оценки биосинтетической активности культуры штамма-продуцента был определен уровень экспрессии гибридного белка SMT3_HCRG21 клетками РПК из КЖ пассажей I, III, VI, IX и XII. Для этого КЖ инкубировали с индуктором экспрессии ИПТГ, после чего клетки были гомогенизированы и гибридный белок был выделен с помощью Ni-NTA-аффинной хроматографии. Концентрация суммарного белка и гибридного

белка в клеточных лизатах была определена по методу Лоури. Показано, что содержание гибридного белка SMT3_HCRG21 в КЖ пассажей I, III, VI, IX и XII варьирует от 8 до 18 % от суммарного белка (табл. 1), тогда как среднее значение количества гибридного белка составляет $12,8 \pm 4,5$ %. Хотя было обнаружено незначительное различие в количестве гибридного белка в пассажах VI и IX по сравнению с пассажем I; между I и XII пассажами достоверного различия не наблюдалось, что свидетельствует об экспрессионной стабильности культуры штамма-продуцента в условиях проведенных испытаний.

Для проверки подлинности и уровня продуктивности штамма-продуцента было проведено 14 последовательных пассажей ГПК. Перед производством в лабораторном и промышленном масштабах лекарственного препарата стабильность высокопродуктивных бактериальных штаммов должна быть продемонстрирована как минимум в течение 10 пассажей вследствие потенциальной возможности мутации или потери бактериальными клетками плазмиды. С учетом того, что за один пассаж в культуре штамма-продуцента *E. coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21 происходит около 10 генераций, для оценки генетической и экспрессионной стабильности были выбраны пассажи I, IX и XIV (10, 90 и 140 генераций соответственно). Для этого было отобрано по шесть колоний пассажей I, IX и XIV, которые инкубировали в жидкой питательной среде до достижения необходимой оптической плотности. Из половины объема каждого образца была выделена

ТАБЛИЦА 1

РЕЗУЛЬТАТЫ ПОДСЧЕТА ТИТРА ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА, ЧИСЛА ГЕНЕРАЦИЙ И ОЦЕНКИ БИОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

TABLE 1

RESULTS OF VIABLE CELL TITER, NUMBER OF GENERATIONS, AND BIOSYNTHETIC ACTIVITY OF THE PRODUCING STRAIN CULTURE ASSESSMENT

№ пассажа	Разведение (d)	Среднее количество колоний (n)	Титр клеток в 1 мл культуральной жидкости (n_k)	Расчетное количество генераций	Количество гибридного белка SMT3_HCRG21, % от суммарного белка клеток
Рабочая посевная культура	10^5	13,3	$1,3 \cdot 10^7$	-	-
I	10^6	15,7	$1,6 \cdot 10^8$	13,5	$17,5 \pm 0,9$
II	10^6	12,0	$1,2 \cdot 10^8$	9,6	-
III	10^6	12,7	$1,3 \cdot 10^8$	10,0	$18,0 \pm 1,4$
IV	10^7	11,0	$1,1 \cdot 10^9$	13,1	-
V	10^7	6,0	$6,0 \cdot 10^8$	9,1	-
VI	10^6	8,3	$8,3 \cdot 10^7$	7,1	$9,4 \pm 1,6^*$
VII	10^7	16,0	$1,6 \cdot 10^9$	14,2	-
VIII	10^6	34,0	$3,4 \cdot 10^8$	7,7	-
IX	10^6	34,3	$3,4 \cdot 10^8$	10,0	$8,4 \pm 2,1^{**}$
X	10^7	16,7	$1,7 \cdot 10^9$	12,3	-
XI	10^7	6,7	$6,7 \cdot 10^8$	8,6	-
XII	10^7	3,7	$3,7 \cdot 10^8$	9,1	$12,1 \pm 0,8$

Примечания: достоверные отличия представлены как $^*(p \leq 0,05)$ и $^{**}(p \leq 0,01)$ относительно количества гибридного белка в пассаже I. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$).

ДНК; оставшаяся клеточная суспензия была индуцирована ИПТГ для количественной оценки содержания гибридного белка.

Для подтверждения генетической стабильности штамма-продуцента был установлен размер гена, кодирующего гибридный белок SMT3_HCRG21. Для этого из КЖ шести колоний 10, 90 и 140 генераций была выделена пДНК и проведена ПЦР с использованием универсальных Т7 праймеров, комплементарных участкам Т7 промотора и терминатора. Выбор олигонуклеотидных праймеров связан с тем, что в плазмидном векторе экспрессия целевых генов находится под регуляцией Т7 промотора. В результате ПЦР-амплификации пДНК клонов 10, 90 и 140 генераций были получены фрагменты ДНК длиной около 600 н.п. (рис. 1), что соответствует

длине нуклеотидной последовательности (541 н.п.) генетической конструкции rSMT3_HCRG21 с учетом T7-праймеров (20 н.п. для каждого праймера).

Для подтверждения подлинности гена, кодирующего гибридный белок SMT3_HCRG21, было проведено секвенирование полученных ПЦР-фрагментов. В результате было установлено, что полученные нуклеотидные последовательности полностью идентичны заявленной в паспорте штамма-продуцента *E. coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21, и включают участки, кодирующие гексагистидиновую метку, белок-партнер SMT3, сайт для расщепления протеазой Ulp-1, пептид HCRG21 и стоп-кодон, что соответствует аминокислотной последовательности гибридного белка (рис. 2). Это свидетельствует о подлинности штамма-продуцента

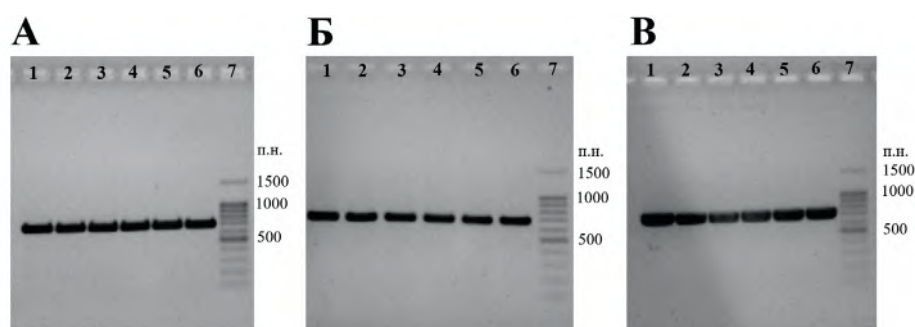


Рис. 1.
Электрофореграммы продуктов амплификации пДНК клонов (1–6) 10 (А), 90 (Б) и 140 (В) генераций продуцента гибридного белка SMT3_HCRG21. 1–6 – фрагменты пДНК клонов 1–6, 7 – маркер длин ДНК (100+ bp, Евроген). п.н. – пар нуклеотидов

FIG. 1. Electropherograms of pDNA amplification products of clones (1–6) of 10 (A), 90 (B) and 140 (B) generations of the producer of the hybrid protein SMT3_HCRG21. Lanes 1–6: PCR fragments amplified from DNAs of clones 1–6; lane 7: DNA Ladder 100+ bp. bp – base pairs

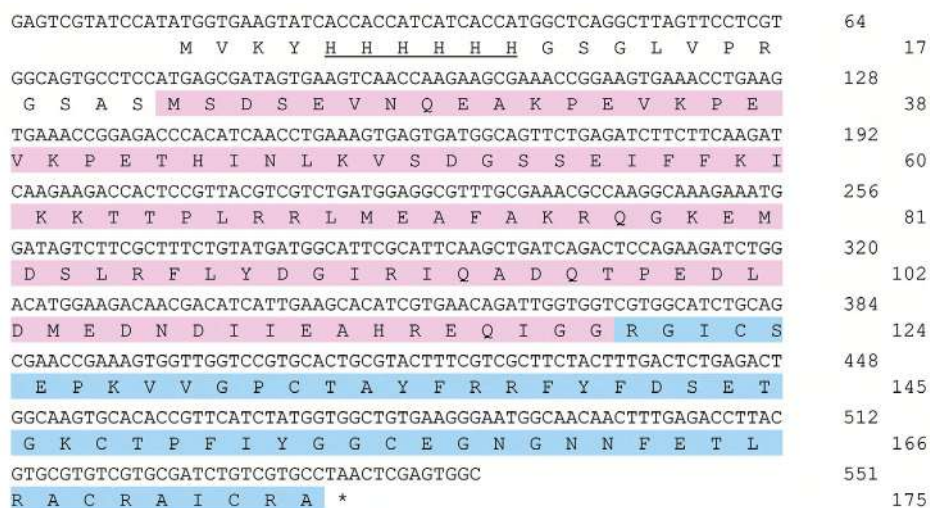


Рис. 2. Нуклеотидная последовательность, полученная в результате секвенирования ПЦР-фрагментов клеток клона 1 10-й генерации штамма-продуцента *E. coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21, и выведенная аминокислотная последовательность гибридного белка SMT3_HCRG21. Розовым цветом показана последовательность белка-партнера SMT3 и сайт расщепления протеазой Ulp-1, голубым – последовательность HCRG21, гексагистидиновая метка (6xHis-tag) подчеркнута, * – стоп-кодон.

FIG. 2. Nucleotide sequence, determined by sequencing of PCR fragments from clone 1 of 10 generation of strain *E. coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21, and deduced amino acid sequence of hybrid protein SMT3_HCRG21. SMT3 and Ulp-1 site sequence is colored pink, HCRG21 sequence is shown in blue. 6xHis-tag is underlined; * – stop codon.

и его способности в течение длительного культивирования сохранять плазмиду и производить целевой гибридный белок.

Уровень продуктивности штамма оценивали по относительному количеству гибридного белка, который был получен после индукции экспрессии ИПТГ в клеточной суспензии клонов 10, 90 и 140 генераций. Согласно электрофоретическому анализу клеточных лизатов, полученных в результате экспрессии с последующей гомогенизацией ультразвуком (рис. 3), полоса гибридного белка была выявлена во всех образцах. Молекулярная масса SMT3_HCRG21 составила около 20 кДа, что соответствует расчетной массе гибридного белка (19,785 кДа). Следует отметить, что полосы гибридного белка на электрофореграммах имели практически одинаковую интенсивность как при 10, так и при 90 и 140 генерациях клеток. Используя систему визуализации и анализа белковых полос в полиакриламидном геле, было определено количественное содержание гибридного белка SMT3_HCRG21 в каждой генерации по отношению к суммарному содержанию белка. Установлено,

что среднее содержание гибридного белка в клонах 10 генераций клеток штамма-продуцента составило $16,2 \pm 1,6 \%$, тогда как в клонах 90 и 140 генераций – $16,5 \pm 1,9 \%$ и $16,0 \pm 1,3 \%$ соответственно (табл. 2). При этом среднее содержание гибридного белка между генерациями сохранялось на уровне 16 %, что свидетельствует о высокой стабильности уровня продуктивности штамма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании показано, что рабочая посевная культура клеток штамма-продуцента *E. coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21, который планируется использовать в производстве анальгетического пептида HCRG21 в промышленных масштабах, сохраняет жизнеспособность и экспрессионную стабильность на протяжении как минимум 12 последовательных пассажей, при этом число генераций культуры в пределах одного пассажа сохраняется на уровне 10.

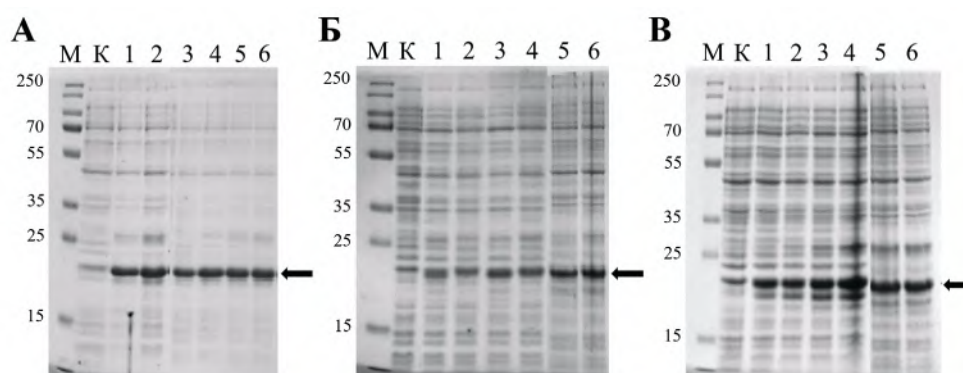


РИС. 3.

Электрофореграммы клеточных лизатов 10 (А), 90 (Б) и 140 (В) генераций главного банка штамма-продуцента гибридного белка SMT3_HCRG21. 1–6 – клеточные лизаты колоний 1–6; М – маркер молекулярных масс, К – лизат клеток, не подвергавшихся индукции экспрессии (контроль). Стрелками указан гибридный белок

FIG. 3.

Electrophoregrams of cell lysates obtained from 10 (A), 90 (B) u 140 (B) generations of primary strain bank. 1–6 – cell lysates of clones 1–6; M – protein ladder; K – lysate from cells incubated without IPTG (negative control). The arrows indicate the fusion protein

ТАБЛИЦА 2

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ГИБРИДНОГО БЕЛКА SMT3_HCRG21 В ПРОЦЕССЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ ПЕРЕСЕВОВ (ДЛЯ ШЕСТИ КОЛОНИЙ)

TABLE 2

DYNAMICS OF SMT3-HCRG21 FUSION PROTEIN EXPRESSION DURING SUCCESSIVE PASSAGES FOR SIX COLONIES

№ колонии	Количество гибридного белка SMT3_HCRG21, % от суммарного белка клеток		
	10 генераций	90 генераций	140 генераций
1	15	19	17
2	16	17	14
3	17	15	15
4	15	18	16
5	19	14	17
6	15	16	17

Анализ плазмидной ДНК и уровень продукции гибридного белка в клонах 10, 90 и 140 генераций позволил установить, что данный штамм-продуцент обладает генетической и экспрессионной стабильностью на протяжении 14 последовательных пассажей. Размер и последовательность гена, кодирующего гибридный белок, соответствует заявленному в паспорте штамма-продуцента. Таким образом, штамм-продуцент *E. coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21 является стабильным и может быть использован в производстве анальгетического пептида HCRG21.

Финансирование

Исследование выполнено в рамках стратегического технологического проекта «Биоэкономика и здоровьесбережение» Программы развития Дальневосточного федерального университета в рамках участия университета в программе стратегического академического лидерства «Приоритет-2030». Программа «Приоритет-2030» реализуется Минобрнауки России в рамках национального проекта «Молодежь и дети».

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Cazacu I, Mogosan C, Loghin F. Safety issues of current analgesics: an update. *Clujul Med.* 2015; 88: 128–36. doi: 10.15386/cjmed-413
2. Monastyrnaya M, Peigneur S, Zelepuga E, Sintsova O, Gladkikh I, Leychenko E, et al. Kunitz-Type Peptide HCRG21 from the Sea Anemone *Heteractis crispa* Is a Full Antagonist of the TRPV1 Receptor. *Mar Drugs.* 2016; 14(12): 229. doi: 10.3390/md14120229
3. Kvetkina AN, Leychenko EV, Yurchenko EA, Pisyagin EA, Peigneur S, Tytgat Y, et al. A New Iq-Peptide of the Kunitz Type from the *Heteractis magnifica* Sea Anemone Exhibits Neuroprotective Activity in a Model of Alzheimer's Disease. *Russ J Bioorg Chem.* 2018; 44: 416–23. doi: 10.1134/S106816201804012X
4. Mishra M. Evolutionary Aspects of the Structural Convergence and Functional Diversification of Kunitz-Domain Inhibitors. *Journal of Molecular Evolution.* 2020; 88: 537–548. doi: 10.1007/s00239-020-09959-9
5. Carnevale V, Rohacs T. TRPV1: A Target for Rational Drug Design. *Pharmaceuticals (Basel).* 2016; 9(3): 52. doi: 10.3390/ph9030052
6. Maximiano TKE, Carneiro JA, Fattori V, Verri WA. TRPV1: Receptor structure, activation, modulation and role in neuro-immune interactions and pain. *Cell Calcium.* 2024; 119: 102870. doi: 10.1016/j.cerca.2024.102870
7. Синцова О.В., Паликов В.А., Паликова Ю.А., Климович А.А., Гладких И.Н., Андреев Я.А., и др. Пептидный блокатор ионного канала TRPV1 проявляет длительный анальгетический эффект в модели тепловой стимуляции. *Доклады Российской Академии Наук, Науки о Жизни.* 2020; 493: 423–426. [Sintsova OV, Palikov VA, Palikova YuA, Klimovich AA, Gladkikh IN, Andreev YaA, et al. Peptide blocker of ion channel TRPV1 exhibits a long analgesic effect in the heat stimulation model. *Doklady Biological Sciences.* 2020; 493: 423–426. (In Russ.)). doi: 10.31857/s268673892003018x
8. Патент РФ № 2755206 C1, 2020 Средство пролонгированного анальгетического действия и лекарственный препарат на его основе / Лейченко Е.В., Синцова О.В., Гладких И.Н., Климович А.А., Монастырская М.М., Дьяченко И.А., и др. Заявитель и патентообладатель Федеральное гос. бюджетное учреждение науки Тихоокеан. институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН–№ 2020117918/04; заявл. 20.05.2020; опубл. 14.09.2021, Бюл. № 26 – 24с. 2021. [RU 2755206 C1, 2020 Agent with prolonged analgesic action and medicinal product based thereon / Leychenko EV, Sintsova OV, Gladkikh IN, Klimovich AA, Monastyrnaya MM, Diachenko IA, et al. Proprietor: G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences (PIBOC FEB RAS)–Application: 2020117918, 20.05.2020; Date of publication: 14.09.2021 Bull. № 26 – 24p. 2021. (In Russ.)].
9. Sintsova O, Gladkikh I, Klimovich A, Palikova Y, Palikov V, Styshova O, et al. TRPV1 Blocker HCRG21 Suppresses TNF- α Production and Prevents the Development of Edema and Hypersensitivity in Carrageenan-Induced Acute Local Inflammation. *Biomedicines.* 2021; 9(7): 716. doi: 10.3390/biomedicines9070716
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265–275.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680–685. doi: 10.1038/227680a0
12. Патент РФ № 2798545 C1, 2022 Рекомбинантная плазмидная ДНК pSMT3_HCRG21, кодирующая гибридный белок SMT3-HCRG21, штамм бактерий *Escherichia coli* BL21(DE3)/pSMT3_HCRG21 – продуцент анальгетического пептида HCRG21 и способ получения рекомбинантного анальгетического пептида HCRG21 / Терешин М.Н., Степаненко В.Н., Лейченко Е.В., Козловская Э.П., Подволоцкая А.Б., Текутьева Л.А., и др. Заявитель и патентообладатель Федеральное гос. бюджетное учреждение науки Тихоокеан. институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, ООО «АРНИКА»–№ 2022125725; заявл. 03.10.2022; опубл. 23.06.2023 Бюл. № 18 – 13с. 2023. [RU 2798545 C1, 2022 Recombinant plasmid DNA pSMT3_HCRG21 encoding a hybrid protein SMT3-HCRG21, bacterial strain *Escherichia coli* BL21(DE3)/pSMT3_HCRG21 – producer of HCRG21 analgesic peptide and method of producing recombinant HCRG21 analgesic peptide / Tereshin MN, Stepanenko VN, Leychenko EV, Kozlovskaya EP, Podvolotskaya AB, Tekuteva LA, et al. Proprietor(s): G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences (PIBOC FEB RAS), Limited Liability Company "ARNIKA" (LLC "ARNIKA") – Application: 2022125725, 03.10.2022; Date of publication: 23.06.2023 Bull. № 18 – 13p. 2023. (In Russ.)].

13. Tereshin MN, Komyakova AM, Stepanenko VN, Myagkikh IV, Shoshina NS, Korolkova YV, et al. Optimized method for the recombinant production of a sea anemone's peptide. *Mendeleev Communications*. 2022; 32: 745–746. doi: 10.1016/j.mencom.2022.11.012

Сведения об авторах

Павленко Александра Павловна – младший научный сотрудник департамента комплексных проектов, Передовая инженерная школа «Институт биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем», ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»; младший научный сотрудник лаборатории молекулярной фармакологии и биомедицины, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН; e-mail: apavlenko141@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0006-0861-3997>

Кветкина Александра Николаевна – кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной фармакологии и биомедицины, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН; e-mail: kvetkinaa@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0937-002X>

Балдаев Сергей Николаевич – младший научный сотрудник лаборатории морской биохимии, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН; e-mail: baldaevsergey@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2605-6681>

Лейченко Елена Владимировна – кандидат химических наук, доцент, старший научный сотрудник Департамента комплексных проектов, Передовая инженерная школа «Институт биотехнологий, биоинженерии и пищевых систем», ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»; заведующий лабораторией молекулярной фармакологии и биомедицины, Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН; e-mail: leychenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2360-1365>

Information about the authors

Aleksandra P. Pavlenko – junior researcher at the Department of Complex Projects, Advanced Engineering School «Institute of Biotechnology, Bioengineering and Food Systems», Far Eastern Federal University; junior researcher at the Laboratory of Molecular Pharmacology and Biomedicine, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences; e-mail: apavlenko141@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0006-0861-3997>

Aleksandra N. Kvetkina – Cand. Sc. (Chem.), researcher at the Laboratory of Molecular Pharmacology and Biomedicine, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences; e-mail: kvetkinaa@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0937-002X>

Sergey N. Baldaev – junior researcher at the Laboratory of Marine Biochemistry, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences; e-mail: baldaevsergey@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2605-6681>

Elena V. Leychenko – Cand. Sc. (Chem.), Associate Professor, senior researcher at the Department of Complex Projects, Advanced Engineering School «Institute of Biotechnology, Bioengineering and Food Systems», Far Eastern Federal University; The Head of the Laboratory of Molecular Pharmacology and Biomedicine, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences; e-mail: leychenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2360-1365>

Статья опубликована в рамках VII Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных с международным участием «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ», 22–24 июня 2026 г.