



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-1-67-73>

УДК 619:578.833.31:615.371.001.76



Оптимизация условий транзientной трансфекции производственных линий клеток млекопитающих для экспрессии антигена E2 вируса классической чумы свиней

А. Г. Галеева^{1,2}, Ю. А. Кузнецова¹, А. Р. Ахунова¹, Н. И. Хаммадов^{1,2}, К. С. Хаертынов^{1,3}, Рин. С. Мухаммадиев¹, М. А. Ефимова^{1,2}

¹ ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), Научный городок-2, г. Казань, 420075, Республика Татарстан, Россия

² ФГБОУ ВО «Казанский государственный аграрный университет», Институт «Казанская академия ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана», ул. Сибирский Тракт, 35, г. Казань, 420029, Республика Татарстан, Россия

³ Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации (КГМА – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России), ул. Муштари, 11, г. Казань, 420012, Республика Татарстан, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Несмотря на отсутствие в Российской Федерации с 2021 г. зарегистрированных случаев классической чумы свиней, для получения статуса зоны, свободной от данного заболевания, необходимо внедрение эффективных и безопасных вакцин, соответствующих стратегии DIVA. В качестве потенциальных инструментов для создания рекомбинантной субъединичной вакцины рассматриваются различные системы экспрессии; перспективным представляется синтез антигена E2 в клетках млекопитающих.

Цель исследования. Оптимизация условий транзientной трансфекции производственных линий клеток млекопитающих для экспрессии антигена E2 вируса классической чумы свиней.

Материалы и методы. Нуклеотидная последовательность, кодирующая фрагмент антигена E2 протяженностью 188 а. о., была клонирована в вектор pVAX1. Транзientная трансфекция проводилась двумя общедоступными методами: кальций-фосфатным и катионным (при помощи разветвленного полиэтиленгликоля) – в отношении трех производственных клеточных линий млекопитающих: СНО-К1, РК-15, ВНК-21/13. Контроль эффективности экспрессии осуществлялся методами иммунофлуоресценции, количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, иммуноферментного анализа.

Результаты. Было установлено, что все рассматриваемые клеточные линии подвергались трансфекции с эффективностью от 60 до 90%. Выживаемость клеток через 24 ч после проведения трансфекции составляла не менее 87%, наименьшие показатели регистрировались при проведении кальций-фосфатной трансфекции с первичной инкубацией 12 ч. Проведение трансфекции во всех случаях сопровождалось экспрессией специфических матричных РНК. Наибольший выход рекомбинантного белка E2 молекулярной массой 17,3 кДа был характерен для линии СНО-К1 (до 47,4 мг/л), наименьший – для линии ВНК-21/13 (до 24,1 мг/л). Коэффициент специфичности в антигенном варианте непрямого иммуноферментного анализа со специфическими антителами для всех вариантов экспрессируемого белка варьировал в диапазоне 5,1–6,2 ед.

Заключение. Все представленные в исследовании клеточные линии обладали удовлетворительной трансфицируемостью, что в совокупности с их свойствами (высокой скоростью пролиферации, адаптацией к бессывороточным средам) позволяет использовать их для стабильной экспрессии. И кальций-фосфатный метод, и катионный обеспечивают высокую эффективность трансфекции, относительно низкую цитотоксичность и воспроизводимость. Применение рассматриваемых методов контроля целесообразно в совокупности на этапе конструирования экспрессионных систем, однако в производственных условиях основным критерием их функциональности является тотальный выход специфического рекомбинантного белка, регистрируемый при помощи антигенного иммуноферментного анализа.

Ключевые слова: классическая чума свиней, клетки млекопитающих, транзientная экспрессия генов, рекомбинантный антиген, иммунофлуоресценция, матричные РНК, иммуноферментный анализ

Благодарности: Работа выполнена за счет гранта, предоставленного Академией наук Республики Татарстан образовательным организациям высшего образования, научным и иным организациям на поддержку планов развития кадрового потенциала в части стимулирования их научных и научно-педагогических работников к защите докторских диссертаций и выполнению научно-исследовательских работ (соглашение № 4/2025-ПД-ВНИВИ).

Для цитирования: Галеева А. Г., Кузнецова Ю. А., Ахунова А. Р., Хаммадов Н. И., Хаертынов К. С., Мухаммадиев Рин. С., Ефимова М. А. Оптимизация условий транзientной трансфекции производственных линий клеток млекопитающих для экспрессии антигена E2 вируса классической чумы свиней. *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (1): 67–73. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-1-67-73>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Галеева Антонина Глебовна, канд. вет. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных антропоонозов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Научный городок-2, г. Казань, 420075, Республика Татарстан, Россия, antonina-95@yandex.ru

Optimizing transient transfection conditions in mammalian cell production lines for expression of classical swine fever virus E2 antigen

Antonina G. Galeeva^{1,2}, Yulia A. Kuznetsova¹, Alsu R. Akhunova¹, Nail I. Khammadvov^{1,2}, Kamil S. Khaertynov^{1,3}, Rinat S. Mukhammadiev¹, Marina A. Efimova^{1,2}

¹ Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchnyi gorodok-2, Kazan 420075, Republic of Tatarstan, Russia

² Kazan State Agricultural University, Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N. E. Bauman, ul. Sibirskiy Tract, 35, Kazan 420029, Republic of Tatarstan, Russia

³ Kazan State Medical Academy – Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, ul. Mushtari, 11, Kazan, 420012, Republic of Tatarstan, Russia

© Галеева А. Г., Кузнецова Ю. А., Ахунова А. Р., Хаммадов Н. И., Хаертынов К. С., Мухаммадиев Рин. С., Ефимова М. А., 2026

ABSTRACT

Introduction. Despite no cases of classical swine fever (CSF) have been recorded in the Russian Federation since 2021, gaining official recognition, as a disease-free zone, will require adoption of effective, safe vaccines compatible with the DIVA strategy. A range of expression systems is being evaluated as potential platforms for a recombinant subunit vaccine; synthesizing the E2 antigen in mammalian cells appears to be a particularly promising approach.

Objective. Optimizing transient transfection conditions in mammalian cell production lines for expression of classical swine fever virus (CSFV) E2 antigen.

Materials and methods. The nucleotide sequence encoding a 188-amino acid fragment of the E2 antigen was cloned into the pVAX1 vector. Transient transfection was performed using two common methods – calcium-phosphate and cationic (employing branched polyethylenimine, PEI) – on three established mammalian production cell lines: CHO-K1, PK-15, and BHK-21/13. Expression efficiency was controlled using immunofluorescence, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, and enzyme-linked immunosorbent assay.

Results. It was determined that all the cell lines evaluated underwent transfection with an efficiency ranging from 60 to 90%. Cellular viability 24 hours post-transfection was at least 87%, with the lowest rates observed following calcium-phosphate transfection using an initial 12-hour incubation period. In all cases, transfection was accompanied by expression of specific messenger RNAs. The highest yield of the 17.3 kDa recombinant E2 protein was achieved in the CHO-K1 cell line (up to 47.4 mg/L), while the lowest yield was observed in the BHK-21/13 line (up to 24.1 mg/L). The specificity ratio in the antigen variant of the indirect enzyme-linked immunosorbent assay using specific antisera ranged from 5.1 to 6.2 units for all the expressed protein variants.

Conclusion. All the cell lines presented in the study demonstrated satisfactory transfection efficiency. Combined with their properties – such as high proliferation rates and adaptation to serum-free media – this makes them suitable for stable expression. Both the calcium-phosphate and cationic methods provide high transfection efficiency, relatively low cytotoxicity, and good reproducibility. The combined use of these control methods is advisable during the design phase of expression systems. In a production setting, however, the primary metric of their functionality is the overall yield of the specific recombinant protein, as determined by antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay.

Keywords: classical swine fever, mammalian cells, transient gene expression, recombinant antigen, immunofluorescence, messenger RNAs, enzyme-linked immunosorbent assay

Acknowledgements: The work was carried out using a grant provided by the Academy of Sciences of the Republic of Tatarstan to higher education institutions, scientific and other organizations to support plans for the development of human resources in terms of stimulating their scientific and scientific-pedagogical staff to defend doctoral dissertations and carry out research work (agreement No. 4/2025-PD-VNIVI).

For citation: Galeeva A. G., Kuznetsova Yu. A., Akhunova A. R., Khammatov N. I., Khaertynov K. S., Mukhammadiev Rin. S., Efimova M. A. Optimizing transient transfection conditions in mammalian cell production lines for expression of classical swine fever virus E2 antigen. *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (1): 67–73. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-1-67-73>

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interests.

For correspondence: Antonina G. Galeeva, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for Viral Anthroozoonoses, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchnyi gorodok-2, Kazan 420075, Republic of Tatarstan, Russia, antonina-95@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Классическая чума свиней (КЧС), вызываемая РНК-содержащим *Pestivirus C*, является одним из наиболее опасных вирусных заболеваний представителей семейства *Suidae* и сопровождается геморрагическим синдромом [1, 2]. Вирус КЧС поражает преимущественно эндотелиальные клетки и макрофаги, одновременно стимулируя апоптоз Т-клеток, индуцируя выраженную иммуносупрессию; острая инфекция чаще всего завершается летальным исходом, однако в ряде случаев на фоне выработки вируснейтрализующих антител наблюдается реконвалесценция либо переход заболевания в хроническую форму [3, 4]. В эндемичных по КЧС странах, как правило, применяются живые аттенуированные вакцины, однако способность вакцинных штаммов реплицироваться в организме хозяина затрудняет дифференциацию вакцинированных животных от инфицированных (стратегия DIVA), что обуславливает проведение политики ограничения вакцинации в неэндемичных странах. Таким образом, в Российской Федерации существует потребность в разработке эффективных и безопасных маркированных вакцин для контроля возможных вспышек КЧС и в перспективе для получения статуса зоны, свободной от КЧС, декларируемого Всемирной организацией здравоохранения животных [5, 6].

В контексте разработок экспериментальных субъединичных вакцин имеются сведения об успешном использовании различных систем экспрессии для биосинтеза мажорного гликопротеина E2. Ранее нами был получен прокариотический аналог гликопротеина E2 [7], синтезируемый преимущественно в виде телец включения, что влекло за собой проведение обширных этапов хроматографической очистки и рефолдинга и, как следствие, относительно низкий выход очищенного биоактивного продукта.

В качестве альтернативы коли-экспрессии может рассматриваться экспрессия генов в клетках млекопитающих, основными преимуществами которой считаются посттрансляционные модификации, близкие к нативным, а также растворимость и фолдинг рекомбинантных белков, совместимые со сверхэкспрессией [8]. Для дальнейшего масштабирования экспрессия в клетках млекопитающих должна быть недорогой и высокопроизводительной, в связи с чем возникла необходимость создания оптимизированной генетической конструкции, подбора производственной клеточной линии – потенциального продуцента рекомбинантного вакцинного антигена – и адаптации известных протоколов трансфекции к условиям данной технологической задачи.

Цель настоящей работы – оптимизация условий транзientной трансфекции производственных линий клеток млекопитающих для экспрессии антигена E2 вируса КЧС. Для ее достижения решались следующие задачи:

а) оценка пригодности клеточных линий CHO-K1, PK-15, BHK-21/13 для транзientной экспрессии гена, кодирующего фрагмент гликопротеина E2;

б) сравнение эффективности общедоступных методов невирусной доставки ДНК (кальций-фосфатной и катионной);

в) апробирование разработанных методов контроля эффективности экспрессии: иммунофлуоресценции (РИФ) на культуре клеток, количественной оценки матричных РНК (мРНК) и иммуноферментного анализа (ИФА) в антигенном варианте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение рекомбинантной ДНК. Нуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный белок E2 вируса

КЧС штамма «Ши-Мынь» (GenBank ID AF092448.2), клонировали в вектор pVAX1 (ЗАО «Евроген», Россия) по сайтам рестрикции *BamHI* и *EcoRI*. Идентичность созданной конструкции подтверждена секвенированием по Сэнгеру. Рекомбинантная плазмида была реципирована в клетки *Escherichia coli* штамма DH5a (Novagen, Германия), наработана и выделена при помощи системы Midiprep (ЗАО «Евроген», Россия). Концентрацию плазмиды измеряли на спектрофотометре Nano-500 (Allsheng, Китай); чистоту образца оценивали по соотношению поглощения на длинах волн 260 и 280 нм, которое при отсутствии загрязнения полипептидами либо свободными нуклеотидами составляет 1,8–2,0 ед.

Культивирование клеток. Монослойные клетки яичника китайского хомячка (CHO-K1, ATCC® CCL 61), почки сирийского хомячка (ВНК-21/13, ATCC® CCL 10), почки свиньи (PK-15, ATCC® CCL 33) выращивали в культуральных флаконах объемом 75 см³ и чашках диаметром 100 мм (Biologix Group Ltd., Китай) в среде DMEM-F12 (НПП «ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, Австралия), 100 МЕ/мл пенициллина и стрептомицина (НПП «ПанЭко», Россия), 20 мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich, США) при 37 °С в атмосфере 5%-го CO₂ с исходной концентрацией 10 × 10⁶ кл/мл. В ходе контроля контаминации бактерии, микоплазмы и возбудитель вирусной диареи крупного рогатого скота не обнаруживались.

Проведение трансфекции. Условия кальций-фосфатной (КФТ) и катионной (PEI) трансфекций производственных клеточных линий приведены в таблице.

Жизнеспособность клеток определяли через 24 ч после трансфекции в 96-луночных культуральных планшетах (Corning Incorporated, США) при помощи колориметрического метилтетразолиевого (МТТ) теста. В каждую лунку на 100 мкл свежей питательной среды добавляли по 10 мкл МТТ-реактива (Wuhan Servicebio Technology Co., Ltd., Китай) и инкубировали в течение 3,5 ч в стандартных условиях. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в эквивалентном объеме диметилсульфоксида, после чего измеряли поглощение в каждой лунке при длине волны 570 нм. Долю жизнеспособных клеток рассчитывали по соотношению показателей лунок с трансфицированными и интактными клетками.

Оценка уровней экспрессии матричных РНК. Транскрипционную активность фрагмента гена E2 оценивали путем количественного определения его продукта – специфических мРНК. Нуклеиновые кислоты из трансфицированных клеток выделяли при помощи набора реагентов «РИБО-сорб» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия); выделенные образцы обрабатывали ДНКазой (НПК «Синтол», Россия) из расчета 1 ед. на 10 нг ДНК и инкубировали 1 ч при 37 °С с последующей инактивацией в течение 5 мин при 80 °С. Для проведения амплификации использовали реакционную смесь следующего состава (на одну пробу объемом 20 мкл): 4 мкл готовой ПЦР-смеси 5x qPCRmix-HS SYBR, 5 пМ прямого (5'-CGTCAACCAATGAGATA GGGCTGT-3') и обратного (5'-GCACAGCCCGAATCCGAAGT-3') праймеров, 100 ед. MMLV-ревертазы (ЗАО «Евроген», Россия), 15 нг РНК-матрицы, ddH₂O – до 20 мкл. Для построения калибровочной кривой использовали 10-кратные разведения рекомбинантной плазмиды pVAX1-trE2. Полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) проводили на амплификаторе C1000 с оптическим блоком CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) согласно следующей программе: 1 – обратная транскрипция при 37 °С в течение 5 мин; 2 – денатурация ДНК при 95 °С в течение 5 мин; 3 – 35 циклов, состоящих из 30 с при 94 °С, 30 с при 56 °С, 25 с при 72 °С; 4 – элонгация при 72 °С в течение 10 мин. Графический анализ кривых плавления ампликонов проводили в про-

грамме CFX Manager (Bio-Rad Laboratories, Inc., США); количество копий мРНК в образце представлено из расчета на 1 мкг суммарной РНК.

Реакция иммунофлуоресценции на культуре клеток. Окрашивание трансфицированных клеток проводили ФИТЦ-конъюгатом поликлональных антител свиньи к вирусу КЧС (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ») в рабочем разведении 1:500, как описано в предыдущей работе авторов [9].

Выделение целевого белка. Через 48–72 ч после трансфекции клетки с поверхности культуральных флаконов снимали механически при помощи скребков. Клетки из суспензии осаждали при 3000 g в течение 15 мин, осадок заливали 1 мл охлажденного RIPA-буфера (50 мМ трис-НСI, pH 7,4; 150 мМ NaCl; 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты; 1% Triton X-100; 0,1% дезоксихолата натрия; 0,1% SDS додецилсульфата натрия; 0,1 мМ фенилметилсульфонил фторид) и инкубировали в течение 30 мин во льду, после чего повторно осаждали клетки. Наличие белка в супернатанте подтверждали методом аналитического электрофореза в 15%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях; активность по отношению к специфическим антисывороткам оценивали в ИФА с применением ранее разработанной тест-системы для контроля специфичности рекомбинантного антигена вируса КЧС [10].

Статистический анализ проводили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 10.4 (GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе биоинформационного анализа был идентифицирован фрагмент аминокислотной последовательности, характеризующийся наибольшей плотностью расположения В-клеточных КЧС-специфических эпитопов протяженностью 188 аминокислот (690–878 а. о.). Согласно результатам pBLAST-анализа консервативность данного участка среди представителей 1-го и 2-го генотипов вируса КЧС составляет

Таблица
Условия проведения трансфекции на культуральных чашках (Ø 100 мм)

Table
Transfection conditions on culture plates (Ø 100 mm)

| Показатель | Кальций-фосфатная трансфекция (КФТ) | Катионная трансфекция (PEI) |
|--|---|---|
| Посевная концентрация клеток | (6 – 10) × 10 ⁵ кл/мл | |
| Конфлюэнтность клеток на момент трансфекции, % | 70 | 70–85 |
| Состав смеси: | | |
| Раствор А | 2,5 М CaCl ₂ – 30 мкл Плазмидная ДНК – 10–20 мкг ddH ₂ O – до 300 мкл | Бессывороточная среда – 100 мкл Плазмидная ДНК – 2–4 мкг |
| Раствор Б | НБС-буфер, pH 7,05 – 300 мкл Полная среда – до 5–6 мл | Бессывороточная среда – 100 мкл PEI – 6–16 мкл |
| Образование комплексов | Раствор А приливали по каплям к раствору Б (3–5 мин при комнатной температуре) | Раствор Б приливали по каплям к раствору А (15 мин при комнатной температуре) |
| Продолжительность инкубации | 6–12 ч | 4–12 ч |
| Посттрансфекционное культивирование | 48–72 ч | 48–72 ч |

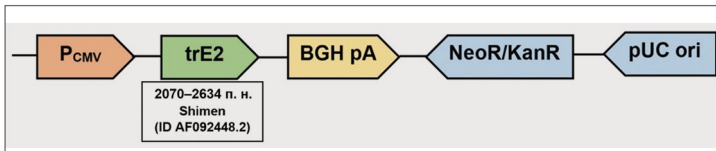


Рис. 1. Структура генетической конструкции на основе вектора pVAX1: P_{CMV} – цитомегаловирусный промотор; trE2 – последовательность, кодирующая усеченный белок E2 вируса КЧС (участок 2070–2634 п. н. по штамму «Ши-Мынь»); BGH pA – сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста; NeoR/KanR – гены устойчивости к селективным антибиотикам (неомицину и канамицину); pUC ori – инициатор репликации

Fig. 1. Structure of the genetic construct based on the pVAX1 vector: P_{CMV} – cytomegalovirus promoter; trE2 – sequence encoding the truncated E2 protein of CSFV (nucleotides 2,070–2,634 of the Shimen strain); BGH pA – bovine growth hormone polyadenylation signal; NeoR/KanR – genes conferring resistance to selective antibiotics (neomycin and kanamycin); pUC ori – origin of replication

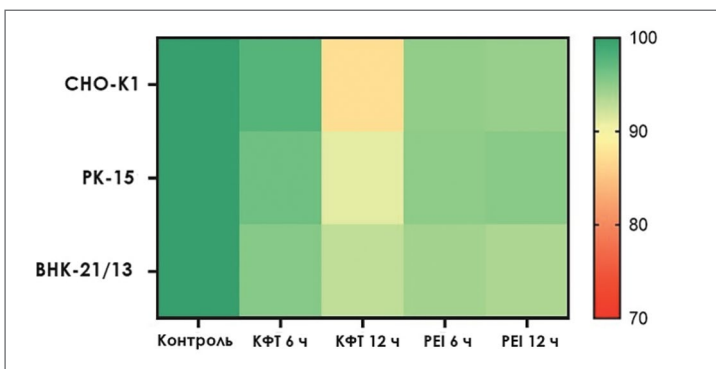


Рис. 2. Результаты анализа жизнеспособности производственных клеточных линий через 24 ч после КФТ и PEI методом MTT-теста

Fig. 2. Cell viability results for production cell lines 24 hours after calcium phosphate transfection and PEI using MTT assay

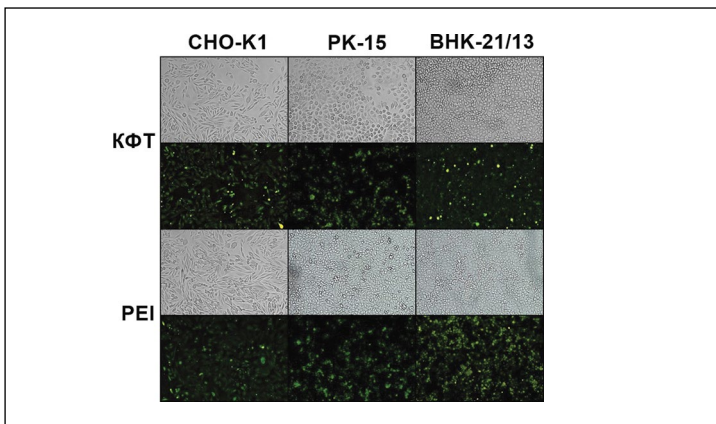


Рис. 3. Флуоресцентный контроль трансфекции (48 ч) производственных клеточных линий

Fig. 3. Fluorescence-based monitoring of transfection (48 hours) in production cell lines

от 91,19 до 98,74%. Также он не обладает гомологией в отношении аналогичного участка протеома вируса вирусной диареи КРС, что является критическим фактором в выборе последовательности диагностического антигена. Для конечной аминокислотной последовательности, фланкированной гексагистидиновым тегом, была выполнена обратная трансляция; синтезированная нуклеотидная последовательность с консенсусной последовательностью Козак перед старт-

кодом была клонирована в целевой вектор pVAX1. Схема конструкции представлена на рисунке 1.

Через 24 ч после проведения трансфекции клеточных линий CHO-K1, PK-15 и BHK-21/13 была оценена их жизнеспособность (рис. 2).

Диаграмма показывает, что доля жизнеспособных клеток при применении обоих методов трансфекции с соблюдением указанных периодов инкубации с трансфицирующими агентами составляет не менее 87%. При этом при катионной трансфекции в течение 6–12 ч, а также при КФТ с продолжительностью первичной инкубации не более 6 ч выживаемость клеток превышает 93,6%. Более низкие показатели жизнеспособности (87,2–92,8%) регистрировались при КФТ с условием первичной инкубации до 12 ч. Вероятно, это связано с тем, что преципитаты кальция при продолжительной инкубации оказывают цитотоксический эффект.

На следующем этапе исследования решалась задача сравнительной оценки различных методов контроля эффективности трансфекции, а именно прямой РИФ на трансфицированных клетках, количественного анализа мРНК в ОТ-ПЦР-РВ и антигенного ИФА.

Согласно данным РИФ на культуре клеток, через 48 ч эффективность трансфекции варьировала от 60 до 90%. Наибольший показатель регистрировался при анализе монослоев линии CHO-K1: 87% для КФТ и 90% для PEI. Несколько ниже оценивалась доля флуоресцирующих клеток линии PK-15: 82% для КФТ и 85% для PEI. Наименьшая эффективность наблюдалась при трансфекции линии BHK-21/13: 80 и 65% соответственно (рис. 3).

Помимо РИФ, являющейся базовым методом оценки эффективности трансфекции, был проведен анализ экспрессии мРНК. Считается, что измерения, проводимые по уровням белка и мРНК, являются взаимодополняющими и необходимы для комплексной оценки экспрессии генов. Протокол ОТ-ПЦР-РВ предварительно апробировали на 10-кратных разведениях контрольной плазмиды pVAX1-trE2 (исходная концентрация 50 нг/мкл). Было установлено, что показатель линейности реакции (R^2) составил 0,994, наклон линии (пороговое значение Ct между двумя разведениями ДНК) – минус 3,748, теоретический предел обнаружения реакции ($y-int$) – 29,288, эффективность реакции (E) – 94,8%. Результаты оценки уровней специфических мРНК, рассчитанных при помощи ОТ-ПЦР-РВ, представлены на рисунке 4.

Известно, что в клетке соотношение белка и мРНК определяется процессами трансляции и деградации белка – процессами, которые регулируются на геноспецифическом уровне [11]. Общая корреляция между концентрациями мРНК и белка у многоклеточных эукариот считается значимой, но умеренной по сравнению с бактериями и дрожжами: количество молекул белка на транскрипт может сильно варьироваться [12, 13]. Поэтому более объективной оценкой функциональности экспрессионной системы, особенно в условиях производства, будет являться количественный выход белка в совокупности с определением его специфичности доступным серологическим методом (рис. 5).

Согласно расчетным данным белок гE2 с прогнозируемой молекулярной массой 17,3 кДа является стабильным и растворимым. Указанные показатели не отличались среди вариантов белка, экспрессируемых всеми тремя продуцентами, что может свидетельствовать о схожести паттернов посттрансляционных модификаций. Это подтверждается сопоставимой активностью всех вариантов белка в ИФА: коэффициент позитивности варьировал в диапазоне 5,1–6,2. Наибольший выход рекомбинантного белка обеспечивала линия CHO-K1 (35,6–47,4 мг/л), наименьший – BHK-21/13 (19,3–24,1 мг/л), что согласуется с утверждением о влиянии происхождения клеток на эффективность трансфекции в схожих условиях [14]. Несмотря на то что большую эффективность

трансфекции по уровням транскриптов обеспечивал катионный метод, КФТ позволяла достичь в среднем на $(8,7 \pm 1,4)\%$ большего выхода функционального продукта.

В литературе описан опыт наработки рекомбинантного гликопротеина E2 вируса КЧС в клетках млекопитающих. Так, в работе R.-H. Hua et al. [15] сообщается о получении стабильно экспрессирующей линии ВНК-21 при помощи вектора рСAG с продуктивностью до 45 мг/л; рекомбинантный белок обеспечивал 100%-ю защиту свиней при летальном заражении. Tian H. et al. [16] удалось создать усеченный белок E2, содержащий КЧС-специфические домены и вызывавший сероконверсию у кроликов, в клетках PK-15, трансфицированных ретровирусным вектором рVABE риго. Использование клеточной линии CHO также обеспечивало значительный вход рекомбинантного E2: L. Feng et al. [17] получены стабильные трансгенные клетки rCHO с динамическим промотором Txp1r, что легло в основу стратегии индуцируемой экспрессии. Таким образом, экспрессия в клетках млекопитающих является эффективным инструментом масштабного биосинтеза сложных гликопротеинов, применимым в разработке кандидатных субъединичных вакцин [18, 19, 20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании рассмотрено применение стандартных методов трансфекции в отношении нескольких производственных клеточных линий млекопитающих для получения рекомбинантного антигена E2 вируса КЧС, а также методы контроля эффективности экспрессии. Было установлено, что клеточные линии CHO-K1, PK-15, ВНК-21/13 успешно подвергаются трансфекции в стандартных условиях с эффективностью до 90%, при этом наибольшая трансфицируемость, как и наибольший тотальный выход целевого белка, были характерны для линии CHO-K1. Ввиду того, что всем рассматриваемым клеточным линиям присущи высокая скорость пролиферации, простота культивирования, в том числе суспензионного, адаптация к бессывороточным средам, они имеют высокий потенциал использова-

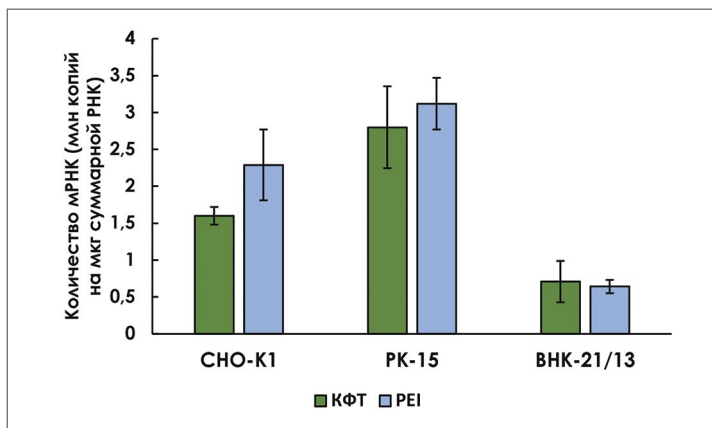


Рис. 4. Количественная оценка экспрессии специфических мРНК

Fig. 4. Quantitative assessment of specific mRNA expression

ния для получения клональных линий-продуцентов в зависимости от конкретных технологических задач. Также установлено, что оба рассматриваемых метода – КФТ и PEI – обеспечивали достаточно высокую эффективность трансфекции и сопоставимые уровни выхода целевого белка; их достоинствами являются экономичность и воспроизводимость.

Сравнительная оценка методов контроля эффективности трансфекции – РИФ, количественной ПЦР и непрямого ИФА – показала, что на этапе конструирования экспрессионных систем их целесообразно применять комплексно. Проведение РИФ с использованием ФИТЦ-меченых поликлональных антител хотя и является информативной на начальных этапах синтеза белка, требует постоянного контроля контаминации клеточных линий и фетальных сывороток крови крупного рогатого скота вирусом вирусной диареи, которая приводит к ложноположительным результатам. Количественная детекция мРНК не всегда

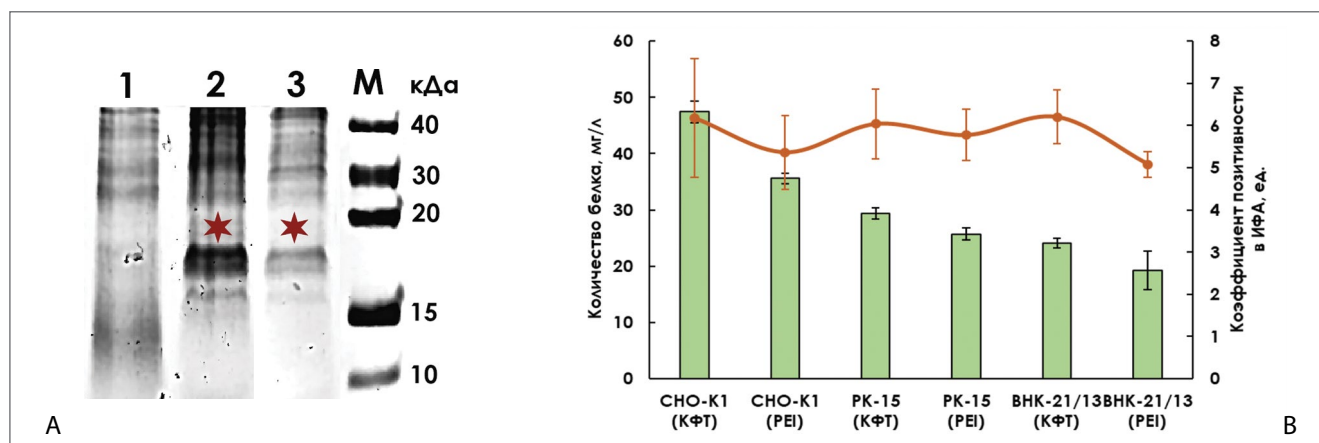


Рис. 5. Анализ функциональности экспрессионных систем на основе вектора pVAX1 и клеточных линий CHO-K1, PK-15, ВНК-21/13: А – электрофорезграмма лизатов трансфицированных клеток приоритетного продуцента (CHO-K1), где трек 1 – отрицательный контроль (лизат клеток, трансфицированных исходной плазмидой pVAX1 без вставки), треки 2 и 3 – лизаты клеток, трансфицированных плазмидой pVAX1-E2 (целевая полипептидная фракция отмечена знаком *), М – маркер молекулярных масс Prestained Protein Marker IV (Wuhan Servicebio Technology Co., Ltd., Kumaй); В – оценка количественного выхода и специфичности рекомбинантного усеченного белка E2 (данные ИФА представлены для растворов с концентрацией антигена 1 мкг/мл)

Fig. 5. Functional analysis of the expression systems based on the pVAX1 vector and cell lines CHO-K1, PK-15, and ВНК-21/13. А – electrophoretogram of cell lysates from the primary producer (CHO-K1): lane 1 – negative control (lysate of cells transfected with the original pVAX1 plasmid without insert); lanes 2 and 3 – lysates of cells transfected with the pVAX1-E2 plasmid (target polypeptide fraction marked with *); М – molecular weight marker Prestained Protein Marker IV (Wuhan Servicebio Technology Co., Ltd., China); В – assessment of the quantitative yield and specificity of the recombinant truncated E2 protein (ELISA data presented for antigen solutions at 1 μg/mL concentration)

коррелирует с выходом целевого продукта, поэтому применение этого метода оправданно лишь при необходимости первичной оценки транскрипционной активности гена. В условиях производства наиболее точным ориентиром является тотальный выход целевого белка, что удобно контролировать в количественном или полуквантитативном варианте ИФА, особенно при работе со стабильно экспрессирующими клеточными линиями.

Несмотря на то что в данной работе для тестовой экспрессии использовали нуклеотидную последовательность, кодирующую усеченный антиген диагностического назначения – фрагмент гликопротеина E2 с наибольшей плотностью расположения КЧС-специфических доменов, описанные подходы при условии грамотного дизайна конструкции, кодирующей полноразмерный гликопротеин, актуальны для разработки рекомбинантной субъединичной вакцины против КЧС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mahadevaswamy R., Muruganatham V., Ramesh V., Mambully S., Suresh K. P., Hiremath J., et al. Global population dynamics and evolutionary selection in classical swine fever virus complete genomes: insights from Bayesian coalescent analysis. *Virus Genes*. 2025; 61 (4): 464–473. <https://doi.org/10.1007/s11262-025-02154-2>
- Huang Y.-C., Deng M.-C., Huang Y.-L., Tsai K.-J., Liu H.-M., Liu I.-L., et al. Classical swine fever virus genotype 2.1 triggers stronger inflammatory and immune responses in porcine alveolar macrophages than genotype 3.4. *Developmental and Comparative Immunology*. 2025; 172:105496. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2025.105496>
- Blome S., Staubach C., Henke J., Carlson J., Beer M. Classical swine fever – an updated review. *Viruses*. 2017; 9 (4):86. <https://doi.org/10.3390/v9040086>
- Yamashita M., Iwamoto S., Ochiai M., Yamamoto A., Sudo K., Narushima R., et al. Pathogenicity of genotype 2.1 classical swine fever virus isolated from Japan in 2019 in pigs. *Microbiology and Immunology*. 2024; 68 (8): 267–280. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.13160>
- Ganges L., Núñez J. I., Sobrino F., Borrego B., Fernández-Borges N., Frías-Lepoureau M. T., Rodríguez F. Recent advances in the development of recombinant vaccines against classical swine fever virus: cellular responses also play a role in protection. *The Veterinary Journal*. 2008; 177 (2): 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.01.030>
- Алексеев К. П., Забережный А. Д., Верховский О. А., Муслиенко М. И., Шемельков Е. В., Южаков А. Г., Алипер Т. И. Вакцина субъединичная маркированная против классической чумы свиней, способ ее получения и применения. Патент № 2808703 Российская Федерация, МПК А61К 39/187, С12Н 7/00. ООО «Ветбиохим». № 2023105741. Заявл. 13.03.2023. Опубл. 01.12.2023. Бюл. № 34.
- Галеева А. Г., Ахунова А. Р., Хаммадов Н. И., Яруллина Г. М., Ефимова М. А. Гетерологичная экспрессия рекомбинантных антигенов вируса классической чумы свиней и цирковируса свиней 2-го типа. *Ветеринария*. 2024; (10): 25–31. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2024.27.10.25-31>
- Hopkins R. F., Wall V. E., Esposito D. Optimizing transient recombinant protein expression in mammalian cells. In: *Protein Expression in Mammalian Cells. Methods in Molecular Biology. Ed. by J. L. Hartley. Vol. 801. Frederick: Humana Press; 2012; Chapter 16: 251–268. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-352-3_16*
- Ахунова А. Р., Насыров Ш. М., Галеева А. Г., Арутюнян Г. С., Ефимова М. А., Гулюкин М. И. Применение прямой реакции иммунофлуоресценции в технологическом контроле матричных раскладок вируса классической чумы свиней. *Ветеринарный врач*. 2024; (3): 27–33. <https://elibrary.ru/mnswgwm>
- Насыров Ш. М., Ахунова А. Р., Галеева А. Г., Яруллина Г. М., Самерханов И. И., Андреева А. В. Твердофазная иммуноферментная тест-система для производственного контроля специфичности рекомбинантного антигена вируса КЧС. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2024; (3): 228–335. <https://doi.org/10.37670/2073-0853-2024-107-3-228-235>
- Gebauer F., Hentze M. W. Molecular mechanisms of translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004; 5 (10): 827–835. <https://doi.org/10.1038/nrm1488>
- De Sousa Abreu R., Penalva L. O., Marcotte E. M., Vogel C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Molecular BioSystems*. 2009; 5 (12): 1512–1526. <https://doi.org/10.1039/b908315d>
- Greenbaum D., Colangelo C., Williams K., Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology*. 2003; 4 (9):117. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-9-117>

14. Kim T. K., Eberwine J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010; 397 (8): 3173–3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>

15. Hua R.-H., Huo H., Li Y.-N., Xue Y., Wang X.-L., Guo L.-P., et al. Generation and efficacy evaluation of recombinant classical swine fever virus E2 glycoprotein expressed in stable transgenic mammalian cell line. *PLoS ONE*. 2014; 9 (9):e106891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106891>

16. Tian H., Liu X., Wu J., Shang Y., Jiang T., Zheng H., Xie Q. Expression of major antigen domains of E2 gene of CSFV and analysis of its immunological activity. *Virologica Sinica*. 2008; 23 (4): 247–254. <https://doi.org/10.1007/s12250-008-2956-5>

17. Feng L., Chen L., Yun J., Cao X. Expression of recombinant classical swine fever virus E2 glycoprotein by endogenous Txnip promoter in stable transgenic CHO cells. *Engineering in Life Sciences*. 2020; 20 (8): 320–330. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900147>

18. Reinhard D., Damjanovic L., Kaiseremayer C., Sommeregger W., Gili A., Gasselhuber B., et al. Bioprocessing of recombinant CHO-K1, CHO-DG44, and CHO-S: CHO expression hosts favor either mAb production or biomass synthesis. *Biotechnology Journal*. 2019; 14 (3):e1700686. <https://doi.org/10.1002/biot.201700686>

19. Opefi C. A., Tranter D., Smith S. O., Reeves P. J. Construction of stable mammalian cell lines for inducible expression of G protein-coupled receptors. *Methods in Enzymology*. 2015; 556: 283–305. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.12.020>

20. Tossolini I., López-Díaz F. J., Kratje R., Prieto C. C. Characterization of cellular states of CHO-K1 suspension cell culture through cell cycle and RNA-sequencing profiling. *Journal of Biotechnology*. 2018; 286: 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.09.007>

REFERENCES

- Mahadevaswamy R., Muruganatham V., Ramesh V., Mambully S., Suresh K. P., Hiremath J., et al. Global population dynamics and evolutionary selection in classical swine fever virus complete genomes: insights from Bayesian coalescent analysis. *Virus Genes*. 2025; 61 (4): 464–473. <https://doi.org/10.1007/s11262-025-02154-2>
- Huang Y.-C., Deng M.-C., Huang Y.-L., Tsai K.-J., Liu H.-M., Liu I.-L., et al. Classical swine fever virus genotype 2.1 triggers stronger inflammatory and immune responses in porcine alveolar macrophages than genotype 3.4. *Developmental and Comparative Immunology*. 2025; 172:105496. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2025.105496>
- Blome S., Staubach C., Henke J., Carlson J., Beer M. Classical swine fever – an updated review. *Viruses*. 2017; 9 (4):86. <https://doi.org/10.3390/v9040086>
- Yamashita M., Iwamoto S., Ochiai M., Yamamoto A., Sudo K., Narushima R., et al. Pathogenicity of genotype 2.1 classical swine fever virus isolated from Japan in 2019 in pigs. *Microbiology and Immunology*. 2024; 68 (8): 267–280. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.13160>
- Ganges L., Núñez J. I., Sobrino F., Borrego B., Fernández-Borges N., Frías-Lepoureau M. T., Rodríguez F. Recent advances in the development of recombinant vaccines against classical swine fever virus: cellular responses also play a role in protection. *The Veterinary Journal*. 2008; 177 (2): 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.01.030>
- Alekseev K. P., Zaberezhnyj A. D., Verkhovskij O. A., Musienko M. I., Shemelkov E. V., Yuzhakov A. G., Aliper T. I. Labeled subunit vaccine against classical swine fever, method of its preparation and use. Patent No. 2808703 Russian Federation. Int. Cl. A61K 39/187, C12N 7/00. ООО “Vetbiokhim”. No. 2023105741. Date of filing: 13.03.2023. Date of publication: 01.12.2023. Bull. No. 34. (in Russ.)
- Galeeva A. G., Akhunova A. R., Khammadow N. I., Yarullina G. M., Efimova M. A. Heterologous expression of recombinant classical swine fever virus and porcine circovirus type 2 antigens. *Veterinariya*. 2024; (10): 25–31. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2024.27.10.25-31> (in Russ.)
- Hopkins R. F., Wall V. E., Esposito D. Optimizing transient recombinant protein expression in mammalian cells. In: *Protein Expression in Mammalian Cells. Methods in Molecular Biology. Ed. by J. L. Hartley. Vol. 801. Frederick: Humana Press; 2012; Chapter 16: 251–268. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-352-3_16*
- Ahunova A. A., Nasyrov Sh. M., Galeeva A. G., Arutyunyan G. S., Efimova M. A., Gulyukin M. I. Application of direct fluorescent antibodies test in process control of classical swine fever virus master seeds. *Veterinariya*. 2024; (3): 27–33. <https://elibrary.ru/mnswgwm> (in Russ.)
- Nasyrov Sh. M., Akhunova A. R., Galeeva A. G., Yarullina G. M., Samerkhanov I. I., Andreeva A. V. Enzyme-linked immunosorbent assay for in-process control of the specificity of the CSF virus recombinant antigen. *Izvestia Orenburg State Agrarian University*. 2024; (3): 228–335. <https://doi.org/10.37670/2073-0853-2024-107-3-228-235> (in Russ.)
- Gebauer F., Hentze M. W. Molecular mechanisms of translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004; 5 (10): 827–835. <https://doi.org/10.1038/nrm1488>

12. De Sousa Abreu R., Penalva L. O., Marcotte E. M., Vogel C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Molecular BioSystems*. 2009; 5 (12): 1512–1526. <https://doi.org/10.1039/b908315d>

13. Greenbaum D., Colangelo C., Williams K., Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology*. 2003; 4 (9):117. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-9-117>

14. Kim T. K., Eberwine J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010; 397 (8): 3173–3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>

15. Hua R.-H., Huo H., Li Y.-N., Xue Y., Wang X.-L., Guo L.-P., et al. Generation and efficacy evaluation of recombinant classical swine fever virus E2 glycoprotein expressed in stable transgenic mammalian cell line. *PLoS ONE*. 2014; 9 (9):e106891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106891>

16. Tian H., Liu X., Wu J., Shang Y., Jiang T., Zheng H., Xie Q. Expression of major antigen domains of E2 gene of CSFV and analysis of its immunological activity. *Virologica Sinica*. 2008; 23 (4): 247–254. <https://doi.org/10.1007/s12250-008-2956-5>

17. Feng L., Chen L., Yun J., Cao X. Expression of recombinant classical swine fever virus E2 glycoprotein by endogenous Tnnp1 promoter in stable transgenic CHO cells. *Engineering in Life Sciences*. 2020; 20 (8): 320–330. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900147>

18. Reinhart D., Damjanovic L., Kaisermayer C., Sommeregger W., Gili A., Gasselhuber B., et al. Bioprocessing of recombinant CHO-K1, CHO-DG44, and CHO-S: CHO expression hosts favor either mAb production or biomass synthesis. *Biotechnology Journal*. 2019; 14 (3):e1700686. <https://doi.org/10.1002/biot.201700686>

19. Opefi C. A., Tranter D., Smith S. O., Reeves P. J. Construction of stable mammalian cell lines for inducible expression of G protein-coupled receptors. *Methods in Enzymology*. 2015; 556: 283–305. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.12.020>

20. Tossolini I., López-Díaz F. J., Kratje R., Prieto C. C. Characterization of cellular states of CHO-K1 suspension cell culture through cell cycle and RNA-sequencing profiling. *Journal of Biotechnology*. 2018; 286: 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.09.007>

Поступила в редакцию / Received 23.09.2025

Поступила после рецензирования / Revised 28.10.2025

Принята к публикации / Accepted 22.12.2025

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Галеева Антонина Глебовна, канд. вет. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных антропоознозов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-2650-6459>, antonina-95@yandex.ru

Кузнецова Юлия Александровна, младший научный сотрудник лаборатории вирусных антропоознозов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0009-0007-0105-7171>, yulia.nikolaeva111@mail.ru

Ахунова Алсу Рузалевна, младший научный сотрудник лаборатории вирусных антропоознозов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0009-0006-0211-3334>, aahunova@inbox.ru

Хаммадов Наиль Ильдарович, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярно-генетического анализа ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-5669-1486>, [nikhammadov@mail.ru](mailto:nikhhammadov@mail.ru)

Хаертынов Камил Саубанович, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетического анализа ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-4764-560X>, khaertkamil@mail.ru

Мухаммадиев Ринат Салаватович, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отделения вирусологических и ультраструктурных исследований ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2524-9609>, tanirtashir@mail.ru

Ефимова Марина Анатольевна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных антропоознозов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-8786-1310>, marina-2004r@mail.ru

Antonina G. Galeeva, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for Viral Anthroozoonoses, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-2650-6459>, antonina-95@yandex.ru

Yulia A. Kuznetsova, Junior Researcher, Laboratory for Viral Anthroozoonoses, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0009-0007-0105-7171>, yulia.nikolaeva111@mail.ru

Alsu R. Akhunova, Junior Researcher, Laboratory for Viral Anthroozoonoses, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0009-0006-0211-3334>, aahunova@inbox.ru

Nail I. Khammatov, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Head of Laboratory for Molecular and Genetic Analysis, Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5669-1486>, [nikhammadov@mail.ru](mailto:nikhhammadov@mail.ru)

Kamil S. Khaertynov, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Laboratory for Molecular and Genetic Analysis, Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4764-560X>, khaertkamil@mail.ru

Rinat S. Mukhammadiev, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Department for Virological and Ultrastructural Research, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2524-9609>, tanirtashir@mail.ru

Marina A. Efimova, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, Laboratory for Viral Anthroozoonoses, Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-8786-1310>, marina-2004r@mail.ru

Вклад авторов: Галеева А. Г. – концепция исследования, работа с литературой, проведение экспериментов, подготовка текста; Кузнецова Ю. А. – проведение экспериментов, сбор материала; Ахунова А. Р. – проведение экспериментов, подготовка текста; Хаммадов Н. И. – биоинформатический анализ, работа с литературой; Хаертынов К. С. – проведение экспериментов, интерпретация данных; Мухаммадиев Рин. С. – проведение экспериментов, интерпретация данных; Ефимова М. А. – администрирование, анализ и обобщение результатов исследования.

Contribution of the authors: Galeeva A. G. – development of the study design, literature analysis, conducting experiments, preparation of the paper text; Kuznetsova Yu. A. – conducting experiments, data collection; Akhunova A. R. – conducting experiments, preparation of the paper text; Khammatov N. I. – bioinformatics analysis, literature analysis; Khaertynov K. S. – conducting experiments, data interpretation; Mukhammadiev Rin. S. – conducting experiments, data interpretation; Efimova M. A. – administering, study result analysis and generalization.