

СОЗДАНИЕ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ *LACTOCOCCUS LACTIS*,
СИНТЕЗИРУЮЩИХ БЕЛОК S ИЛИ РЕЦЕПТОРСВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН
ВИРУСА SARS-CoV-2

О. В. ЕВДОКИМОВА¹, А. Э. ОХРЕМЧУК¹,
Е. В. ОХРЕМЧУК¹, Д. О. ДОРМЕШКИН², Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ¹

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, ул. Академика Купревича, 2, 220084, г. Минск, Беларусь

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси,
ул. Академика Купревича, 5, корп. 2, 220084, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Получены рекомбинантные штаммы бактерий *Lactococcus lactis*, содержащие экспрессионные плазмиды с фрагментами генома вируса SARS-CoV-2. В составе векторной конструкции pNZ::spike находится полная кодирующая последовательность гена белка S вируса SARS-CoV-2, векторные конструкции pNZ::mini-spike и pNZ::HA-spike содержат различающиеся по кодонному составу и размеру фрагменты гена *s*, транскрибируемые в рецепторсвязывающий домен. Индукция экспрессии фрагмента гена *s* в клетках полученных штаммов низином (1 нг/мл) сопровождается синтезом белков, специфически связывающихся с коммерческими антителами к рецепторсвязывающему домену вируса SARS-CoV-2. Рекомбинантный белок, продуцируемый бактериями *L. lactis* pNZ::spike, на электрофореграмме определяется в виде нескольких фракций, молекулярная масса наиболее представленной из них составляет около 150 кДа, что совпадает с теоретически рассчитанной молекулярной массой полноразмерного белка S. Рекомбинантный белок, синтезируемый бактериями *L. lactis* pNZ::HA-spike, имеет молекулярную массу приблизительно 23 кДа. В клетках бактерий *L. lactis* pNZ::mini-spike целевой белок представлен основной фракцией с молекулярной массой около 35 кДа. Продуцируемые рекомбинантные белки имеют клеточную локализацию.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии; коронавирус; гликопротеин шипа; рецепторсвязывающий домен; экспрессия гетерологичных генов.

Образец цитирования:

Евдокимова ОВ, Охремчук АЭ, Охремчук ЕВ, Дормешкин ДО, Валентович ЛН. Создание штаммов бактерий *Lactococcus lactis*, синтезирующих белок S или рецепторсвязывающий домен вируса SARS-CoV-2. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;3:37–49. EDN: QTYHHG

For citation:

Evdokimova OV, Akhremchuk AE, Akhremchuk KU, Dormeshkin DO, Valentovich LN. Design of *Lactococcus lactis* strains producing S protein or receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 virus. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024; 3:37–49. Russian. EDN: QTYHHG

Авторы:

Олеся Владимировна Евдокимова – научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований».

Артур Эдуардович Охремчук – научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований».

Екатерина Владимировна Охремчук – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований».

Дмитрий Олегович Дормешкин – кандидат химических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии.

Леонид Николаевич Валентович – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией «Центр аналитических и генно-инженерных исследований».

Authors:

Olesia V. Evdokimova, researcher at the laboratory «Centre of analytical and genetic engineering research».

evdokimovalesia@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0003-7071-0841>

Artur E. Akhremchuk, researcher at the laboratory «Centre of analytical and genetic engineering research».

a.akhremchuk@mbio.bas-net.by

<https://orcid.org/0000-0001-8602-4887>

Katsiaryna U. Akhremchuk, PhD (biology); senior researcher at the laboratory «Centre of analytical and genetic engineering research».

katerinaakhremchuk@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-3195-6529>

Dmitri O. Dormeshkin, PhD (chemistry); leading researcher at the laboratory of molecular diagnostics and biotechnology.

dormeshkin@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-2505-3005>

Leonid N. Valentovich, PhD (biology), docent; head of the laboratory «Centre of analytical and genetic engineering research».

valentovich@mbio.bas-net.by

<https://orcid.org/0000-0001-7329-743X>

Благодарность. Авторы выражают признательность сотрудникам Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии доктору медицинских наук, профессору Т. В. Амвросьевой и И. В. Бельской, а также ведущему научному сотруднику Института микробиологии НАН Беларуси кандидату биологических наук, доценту И. С. Казловскому за предоставленные плазмиды.

DESIGN OF *LACTOCOCCUS LACTIS* STRAINS PRODUCING S PROTEIN OR RECEPTOR-BINDING DOMAIN OF THE SARS-CoV-2 VIRUS

O. V. EVDOKIMOVA^a, A. E. AKHREMCHUK^a,
K. U. AKHREMCHUK^a, D. O. DORMESHKIN^b, L. N. VALENTOVICH^a

^aInstitute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus,
2 Akademika Kuprevicha Street, Minsk 220084, Belarus

^bInstitute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
5 Akademika Kuprevicha Street, 2 building, Minsk 220084, Belarus

Corresponding author: O. V. Evdokimova (evdokimovalesia@gmail.com)

Abstract. We obtained recombinant bacterial strains of *Lactococcus lactis* containing expression plasmids with fragments of the SARS-CoV-2 virus genome. The pNZ::spike vector construction contains the complete coding sequence of the S protein gene of the SARS-CoV-2 virus, the vector constructions pNZ::mini-spike and pNZ::HA-spike contain *s* gene fragments with different codon composition and size, which translated into the receptor-binding domain. Induction of *s* gene fragment expression in cells of the obtained strains by nisin (1 ng/ml) is followed by the synthesis of proteins specifically binding to commercial antibodies against the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 virus. Recombinant proteins produced by the bacteria *L. lactis* pNZ::spike are represented by several fractions, a molecular mass of the major fraction is about 150 kDa, which coincides with the theoretically calculated molecular mass of the full-length S protein. The bacteria *L. lactis* pNZ::HA-spike synthesised the recombinant protein with a molecular mass of approximately 23 kDa. In *L. lactis* pNZ::mini-spike cells the target protein is represented by a major fraction with a molecular mass of about 35 kDa. The produced recombinant proteins have cellular localisation.

Keywords: lactic acid bacteria; Coronavirus; spike protein; receptor-binding domain; heterologous gene expression.

Acknowledgements. The authors would like to thank the staff of the Republican Research and Practical Centre for Epidemiology and Microbiology doctor of science (medicine), full professor T. V. Amvrosieva and I. V. Belskaya, as well as the leading researcher at the Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, PhD (biology), docent I. S. Kazlouski for provided plasmids.

Введение

Молочнокислые бактерии (МКБ) – это несистематическая группа грамположительных бактерий, которая объединяет микроорганизмы, продуцирующие молочную кислоту в качестве конечного метаболита при ферментации углеводов. С давних времен МКБ применяются для получения кисломолочных, ферментированных мясных и растительных продуктов, производства кормов, фармакологических и химических субстанций, консервантов [1–5]. С развитием генной инженерии штаммы МКБ, в первую очередь представители родов *Lactococcus* и *Lactobacillus*, стали использоваться в качестве продуцентов гомологичных и гетерологичных белков [6–11]. Безопасность для человека, быстрый, не требующий аэрации рост культуры клеток, небольшое количество синтезируемых протеаз, возможность секреции во внеклеточную среду, отсутствие необходимости очистки продукта от липополисахаридов определяют МКБ как удобную, а в некоторых случаях предпочтительную альтернативу бактериям *Escherichia coli* в качестве хозяев систем гетерологичной экспрессии генов [5; 12; 13]. С начала 2000-х гг. МКБ интенсивно изучаются как вектор доставки терапевтических белков и антигенов к слизистым оболочкам организма [2; 14–17]. Такие свойства МКБ, как устойчивость к низкому pH и солям желчных кислот, слабая иммуногенность, а у некоторых штаммов пробиотические свойства и эффект адьювантности обосновывают применение МКБ в качестве основы для разработки живых мукозальных вакцин [18–21]. Такая доставка антигенов может представлять собой эффективную стратегию профилактики инфекций, основными входными воротами которых являются верхние дыхательные пути и (или) желудочно-кишечный тракт.

В связи с пандемией COVID-19 резко возросла востребованность исследований в области конструирования генно-инженерных штаммов МКБ, синтезирующих антигены коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома – 2 (SARS-CoV-2) [22–27]. После завершения пандемии данные исследования остаются актуальными, поскольку вирус SARS-CoV-2 продолжает циркулировать в человеческой популяции, и не исключено появление новых потенциально пандемических вариантов. За годы пандемии были детально изучены структура генома, функциональная нагрузка, участие в патогенезе и вклад в развитие иммунного ответа отдельных структурных единиц вируса SARS-CoV-2 [28], разработаны тест-системы для обнаружения специфических антител к различным доменам вирусных белков [29], поэтому антигены вируса SARS-CoV-2 являются «удобными» для проверки вакцинных платформ. Разработанные и оптимизированные с применением данного материала системы гетерологичной экспрессии генов в МКБ могут служить основой для создания мукозальных вакцин с использованием иных антигенов вирусного или бактериального происхождения.

Как правило, в векторных вакцинах в качестве антигенов применяются структурные белки патогена. В случае с вирусом SARS-CoV-2 таковыми являются гликопротеин шипа (*spike protein*, S), мембранный белок (*membrane protein*, M), белок оболочки (*envelope protein*, E) и нуклеокапсидный белок (*nucleocapsid protein*, N) [30]. Первые зарегистрированные вакцины против COVID-19 – мРНК-вакцины BNT162b2 (Pfizer – BioNTech) и Spikevax (Moderna) и векторные вакцины «Гам-КОВИД-Вак» («Спутник V») (Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи) и ChAdOx1 nCoV-19 (Oxford – AstraZeneca) – вызывали иммунный ответ организма за счет экспрессии гена белка S в клетках хозяина [31]. Действие большинства разрабатываемых мукозальных вакцин также основано на иммуногенности гликопротеина шипа или его фрагмента. Исследования структуры, функции и антигенности белка S вируса SARS-CoV-2 показали, что субъединица S1 содержит рецепторсвязывающий домен (*receptor-binding domain*, RBD) (рис. 1), который имеет высокую аффинность к ангиотензинпревращающему ферменту ACE2 [30; 32; 33]. На основании проведенного филогенетического анализа и структурного моделирования регион RBD (319–541 аминокислотный остаток) рекомендован к использованию в качестве целевого антигена для разработки вакцины [32]. В другом исследовании показано, что для проявления иммуногенности достаточно даже фрагмента белка S с 330-го по 526-й аминокислотный остаток [34]. В экспериментах на лабораторных животных было отмечено, что домен S1 гликопротеина шипа вируса SARS-CoV-2 является более эффективным иммуногеном, чем RBD [35], это объясняется наличием дополнительных эпитопов за пределами фрагмента RBD.

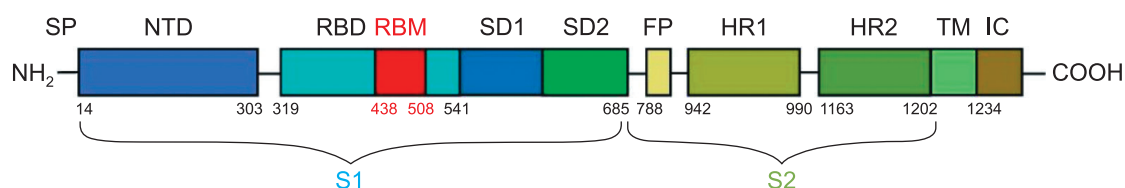


Рис. 1. Структура белка S вируса SARS-CoV-2 (координаты согласно базе данных UniProtKB – P0DTC2).

Используемые обозначения: SP – сигнальный пептид; NTD – N-концевой домен;

RBM – рецепторсвязывающий мотив; SD1 – субдомен-1; SD2 – субдомен-2;

FP – пептид слияния; HR1 – гептадный повтор – 1; HR2 – гептадный повтор – 2;

TM – трансмембранная область; IC – внутриклеточный домен

Fig. 1. Structure of the S protein of the SARS-CoV-2 virus (coordinates according to the UniProtKB database – P0DTC2).

Symbols: SP – signal peptide; NTD – N-terminal domain; RBM – receptor-binding motif;

SD1 – subdomain-1; SD2 – subdomain-2; FP – fusion peptide; HR1 – heptad repeat – 1;

HR2 – heptad repeat – 2; TM – transmembrane region; IC – intracellular domain

Согласно литературным сведениям большинство созданных рекомбинантных штаммов МКБ синтезируют отдельные домены белков вируса SARS-CoV-2 [25; 36–38] и только несколько штаммов продуцируют полноразмерные структурные белки [23; 27], в их числе бактерии *Lactobacillus plantarum* [23] и *Bifidobacterium longum* (URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04334980>), содержащие плазмидную ДНК с полной кодирующей последовательностью гена *s* вируса SARS-CoV-2. Бактерии *Lactococcus lactis* являются одним из наиболее часто используемых хозяев для экспрессии генов в грамположительных бактериях в целях продукции белков вирусного, бактериального или эукариотического происхождения [7; 39–41], однако сообщений о синтезе полноразмерного белка S в клетках бактерий *L. lactis*, как и сравнительного анализа экспрессии целого гена *s* либо его фрагмента, в литературных источниках найти не удалось. Целью данного исследования являлось получение рекомбинантных штаммов бактерий *L. lactis*, экспрессирующих фрагменты гена *s* вируса SARS-CoV-2.

Материалы и методы исследования

Бактерии *E. coli* XL1-Blue [42] и *Bacillus subtilis* 168 [43] выращивали в жидкой или агаризованной среде LB (Conda, Испания; кат. № 1083) при температуре 37 °С. Бактерии *L. lactis* NZ3900 [44] культивировали в бульоне или на поверхности агаризованной среды M17 (HiMedia Laboratories, Индия; кат. № M1029) с добавлением глюкозы до концентрации 0,5 % при температуре 30 °С. Для создания селективных условий в среду культивирования вводили ампициллин (100 мг/л) или хлорамфеникол (10 мг/л). Плазмиды, использованные в работе, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Плазмиды, использованные в исследовании

Table 1

Plasmids used in the study

Плазмида	Характеристика	Источник
pJET1.2/blunt	Ap ^R , oriV _{ColE1} , Eco47I/T7	Сайт производителя (URL: https://www.thermofisher.com)
pUC19	Ap ^R , lacZα, oriV _{ColE1}	[45]
pUC21	Ap ^R , lacZα, oriV _{ColE1} , M13 IR	[46]
pNZ8121	Cm ^R , P _{nisA} , oriV _{pSH71}	[47]
pEX-K	Плазмида со вставкой фрагмента кодирующей последовательности гена <i>s</i> вируса SARS-CoV-2	[48]
pJET::spike	Плазмида pJET1.2/blunt со вставкой кодирующей последовательности гена <i>s</i> вируса SARS-CoV-2	Данная работа
pUC19::HA-spike	Плазмида pUC19 со вставкой фрагмента гена <i>s</i> вируса SARS-CoV-2	
pUC21::HA-spike	Плазмида pUC21 со вставкой фрагмента гена <i>s</i> вируса SARS-CoV-2 с добавленным стоп-кодоном	
pNZ::spike	Плазмида, несущая экспрессионную кассету на основе промотора P _{nisA} и полной кодирующей последовательности гена <i>s</i> вируса SARS-CoV-2	
pNZ::mini-spike	Плазмида, несущая экспрессионную кассету на основе промотора P _{nisA} и фрагмента кодирующей последовательности гена <i>s</i> вируса SARS-CoV-2	
pNZ::HA-spike	Плазмида, несущая экспрессионную кассету на основе промотора P _{nisA} и фрагмента кодирующей последовательности гена <i>s</i> вируса SARS-CoV-2	

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с применением Flash-полимеразы и Flash-буфера (ООО «АртБиоТех», Беларусь), а также олигонуклеотидных праймеров (табл. 2) в концентрации 0,1 мкмоль/л (ОДО «Праймтех», Беларусь). Количество матричной ДНК в реакции составляло 20–50 нг.

Таблица 2

Праймеры, использованные в исследовании

Table 2

Primers used in the study

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'–3')
M13R	GGATAACAATTCACACAGG
T7-Pro-Seq	TAATACGACTCACTATAGGG
pNZ-F	TCGTTCGAAGGAACTAC
pNZ-R	TGCCATTTCAATTGAAC
SpV2-F	AGCTTGGTCATATGTTTGTGTTTCC
SpV2-R	TATTATCCATGGTTATCTAGATCCG

Окончание табл. 2
Ending of the table 2

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'–3')
SpV-F	ATGTTTGTGTTCCCTGTGTTATTG
Gib-ori-F	TCATGACCAAAATCCC
mSpHA-F	ATCATGAACACCCAGATCCTGGTG
mSpHA-R	TTACTTCTTGGGGCCACACACTG

Трансформацию бактерий *E. coli* плазмидной ДНК осуществляли согласно рекомендациям [49], бактерии *B. subtilis* трансформировали по методике, описанной в работе [50], при трансформации бактерий *L. lactis* руководствовались инструкцией [51].

Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора Monarch Plasmid Miniprep Kit (*New England Biolabs*, США; кат. № T1010) или путем щелочного лизиса по методике, изложенной в публикации [52]. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК осуществляли в 0,8 % агарозном геле, экстракцию ДНК из агарозного геля проводили с использованием набора Monarch DNA Gel Extraction Kit (*New England Biolabs*; кат. № T1020). Рестриктию фрагментов ДНК и их лигирование ДНК-лигазой Т4 (*Thermo Scientific*, США; кат. № EL0011) выполняли в стандартных буферных системах при рекомендуемых в инструкции производителя условиях.

Секвенирование осуществляли по методу Сенгера [53] с помощью набора реактивов DNA Cycle Sequencing Kit (*Jena Bioscience*, Германия) и меченных флуоресцентной меткой Cy5.5 праймеров (см. табл. 2). Полногеномное секвенирование проводили на платформе MiSeq (*Illumina*, США) с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v3 (*Illumina*; кат. № MS-102-3003). Библиотеки фрагментов ДНК готовили с применением наборов реактивов NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit for Illumina (*New England Biolabs*; кат. № E7805S) и NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (*New England Biolabs*; кат. № E6609S). Множественное выравнивание нуклеотидных и предсказанных аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью инструмента Clustal Omega ресурса UniProt (URL: <https://www.uniprot.org/>).

Для анализа белкового состава бактериальных суспензий супернатант отделяли от клеточного осадка путем центрифугирования. Белки супернатанта осаждали трихлоруксусной кислотой с последующей промывкой ледяным 80 % ацетоном, центрифугировали 10 мин при скорости 12 000 об/мин и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Для приготовления клеточных лизатов промытые и ресуспендированные в ФСБ суспензии клеток выравнивали по оптической плотности при длине волны 600 нм ($ОП_{600} = 0,3$), аликвоты суспензий обрабатывали лизоцимом (на протяжении 1 ч при температуре 37 °C), дважды отмывали и ресуспендировали в ФСБ. В качестве положительного контроля использовали коммерческий рекомбинантный белок Recombinant 2019-nCoV Spike Protein (RBD, mFc Tag; *Elabscience*, Китай; кат. № PKSR030500) с молекулярной массой 51,5 кДа. Электрофорез белков в денатурирующих условиях проводили в 10 % полиакриламидном разделяющем геле, перенос белков на поливинилидендифторидную мембрану выполняли в аппарате Trans-Blot Turbo Transfer System (*Bio-Rad*, США). После блокировки неспецифических сайтов связывания антител 5 % обезжиренным молоком мембрану инкубировали с первичными антителами SARS-CoV-2 Spike RBD Polyclonal Antibody (2019-nCoV) (*Elabscience*; кат. № E-AB-V1006) в течение 1 ч, затем отмывали и инкубировали 1 ч со вторичными антителами Immun-Star Goat Anti-Rabbit (GAR)-HRP Conjugate (*Bio-Rad*; кат. № 170-5046). Визуализацию целевых белков проводили с помощью оборудования ChemiDoc MP Imaging System (*Bio-Rad*) хемилюминесцентным методом после 5 мин инкубации ECL-смеси (*Bio-Rad*; кат. № 170-5061) на поверхности мембраны.

Получение кодирующих последовательностей. В качестве донора последовательности гена *s* использовали препарат «Гам-КОВИД-Вак» (компонент II), в основе которого находится аденовирус типа 5 с геном полноразмерного белка S вируса SARS-CoV-2 [54]. Предварительно была выделена ДНК данного препарата и установлена его полная нуклеотидная последовательность. На основе секвенированной нуклеотидной последовательности сконструированы праймеры SpV2-F и SpV2-R (см. табл. 2), дающие при амплификации с ДНК-матрицы препарата «Гам-КОВИД-Вак» фрагмент, содержащий последовательность гена *s* и добавленные сайты узнавания рестриктаз на 5'-конце (NdeI) и 3'-конце (NcoI). В результате ПЦР были получены ампликоны длиной 3872 пары нуклеотидов (п. н.), которые клонировали в составе вектора pJET1.2/blunt в клетках *E. coli* XL1-Blue. Из отобранных на ампициллине (100 мкг/мл) колоний выделяли плазмидную ДНК и с помощью рестрикционного анализа определяли направление вставки, а также линейный размер полученной плазмиды и вставки. Среди плазмид, соответствующих расчетному размеру, выбирали варианты с удобным для последующих манипуляций направлением вставки. Для проверки отсутствия нуклеотидных замен и перестроек в кодирующей последовательности гена *s* плазмидную

ДНК pJET::spike подвергали проверочному секвенированию на приборе MiSeq, что позволило выявить полную идентичность референсной последовательности ДНК препарата «Гам-КОВИД-Вак» и наличие внесенных сайтов рестрикции, фланкирующих кодирующую последовательность.

Фрагмент последовательности RBD (Phe318 – Cys590) длиной 820 п. н., обозначаемый далее как mini-spike, был любезно предоставлен сотрудниками лаборатории инфекций с природным резервуаром Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии и отраслевой лаборатории молекулярных био- и нанотехнологий Института микробиологии НАН Беларуси в составе плазмиды pEX-K размером 3338 п. н. [48].

Кодирующая RBD (Arg319 – Lys529) нуклеотидная последовательность фрагмента гена *s* вируса SARS-CoV-2, обозначаемого далее как HA-spike, синтезирована в компании *Synbio Technologies* (США). Оптимизацию состава кодонов проводили для максимального уровня экспрессии в клетках человека с помощью сервиса *GeneArt* (*Thermo Fisher Scientific*, США). К N-концу RBD были добавлены сигнальный пептид гемагглютинаина и четыре дополнительные аминокислоты от фрагмента гемагглютинаина [55]. Фрагмент клонировали в составе вектора pUC19 в клетках *E. coli* XL1-Blue, трансформанты отбирали на среде с ампициллином (100 мкг/мл). К кодирующей последовательности с помощью ПЦР добавляли сайт рестрикции и стоп-кодон путем амплификации фрагмента плазмиды pUC19::HA-spike с использованием праймеров mSpHA-F (содержит на 5'-конце два нуклеотида для восстановления сайта рестрикции EcoRV) и mSpHA-R (содержит на 3'-конце три нуклеотида стоп-кодона). Продукт размером 714 п. н. клонировали в составе вектора pUC21 в клетках *E. coli* XL1-Blue. Полученную плазмиду pUC21::HA-spike проверяли на соответствие нуклеотидной последовательности HA-spike и наличие внесенных изменений методом секвенирования ДНК по Сенгеру с использованием праймеров M13R и T7-Pro-Seq.

Результаты и их обсуждение

Для создания экспрессионных конструкций были клонированы три кандидатные последовательности фрагмента ДНК вируса SARS-CoV-2: вариант spike, содержащий полную кодирующую последовательность гена *s*, вариант HA-spike, представляющий собой нуклеотидную последовательность, транслируемую в RBD, слитый с HA-сигналом секреции, и вариант mini-spike, представляющий собой более протяженную нуклеотидную последовательность гена *s*, транслируемую в RBD (см. подраздел «Получение кодирующих последовательностей»). Секвенированные нуклеотидные и предсказанные аминокислотные последовательности фрагмента гена *s* в составе плазмид pJET::spike, pEX-K и pUC21::HA-spike сравнивали с кодирующей последовательностью гена гликопротеина шипа вируса SARS-CoV-2 изолята Wuhan-Hu-1, депонированной в базе данных GenBank под номером NC_045512. Было установлено, что предсказанные аминокислотные последовательности сравниваемых фрагментов белка S идентичны, в то время как нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов гена *s* отличаются от последовательности изолята Wuhan-Hu-1 и различаются между собой в зависимости от дизайна предварительно проведенной оптимизации кодонного состава (рис. 2).

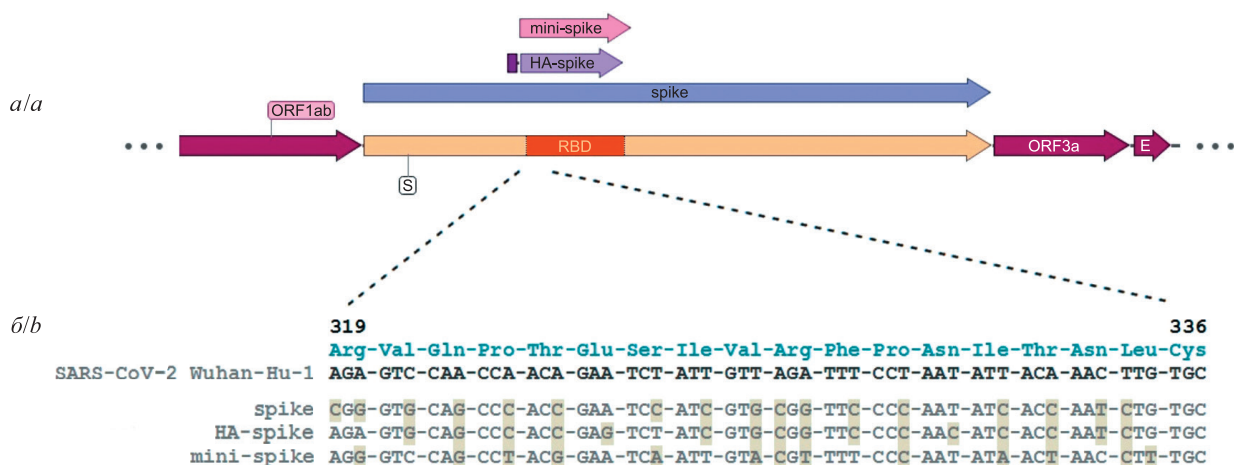


Рис. 2. Выравнивание последовательностей spike, HA-spike, mini-spike и фрагмента генома вируса SARS-CoV-2 изолята Wuhan-Hu-1 (а) и сравнение участка кодирующей последовательности RBD вируса SARS-CoV-2 и трех кандидатных последовательностей (б)

Fig. 2. Alignment of spike, HA-spike, mini-spike sequences against the genome fragment of the SARS-CoV-2 virus Wuhan-Hu-1 isolate (a) and comparison of the RBD coding sequence region of the SARS-CoV-2 virus and three candidate sequences (b)

Основой для создания экспрессионной конструкции с фрагментом гена *s* вируса SARS-CoV-2 выбран плазмидный вектор широкого круга хозяев pNZ8121 – компонент коммерческой системы экспрессии генов под контролем низина NICE® (MoBiTec, Германия). Данный вектор содержит низин-индуцируемый промотор P_{nisA} в сочетании с нативным сайтом связывания рибосом, сигнальную последовательность гена *prtP* и терминатор гена *pepN*, а также ген хлорамфениколацетилтрансферазы в качестве селективного маркера [51]. Штамм *L. lactis* NZ3900, делеционный мутант по гену *lacF*, неспособный расти на лактозе, был использован как реципиент экспрессионной конструкции. Выбор данного штамма обоснован возможностью переноса экспрессионной кассеты, функционирующей в составе вектора pNZ8121, в вектор pNZ8149, содержащий в качестве селективного маркера ген *lacF*, восстанавливающий способность штамма *L. lactis* NZ3900 расти на лактозе [51]. Такая комбинация делает систему гетерологичной экспрессии пригодной для применения в пищевой промышленности.

В инструкции производителя используемой системы экспрессии вставку целевой последовательности в вектор pNZ8121 рекомендовано осуществлять с помощью сайта рестрикции EcoRV для сохранения рамки считывания, начинающейся с сигнальной последовательности гена *prtP*, однако в таком случае вставка фрагмента может происходить в двух направлениях и необходим отбор трансформантов с нужной ориентацией вставки. В данной работе применяли вариант, при котором фрагмент ДНК имеет один «тупой» и один «липкий» конец, что обеспечивает сохранение рамки считывания, начинающейся с кодирующей последовательности сигнального пептида, и позволяет получать трансформанты с нужным направлением вставки. Для субклонирования фрагментов в составе вектора pNZ8121 производитель рекомендует использовать штаммы *E. coli* *recA*⁺, однако согласно описанию рост трансформантов *E. coli* занимает около 48 ч и клонирование векторов pNZ в *E. coli* может приводить к нестабильности и (или) реорганизации плазмиды [51]. Нами было замечено, что в случае использования бактерий *B. subtilis* 168 векторы на основе pNZ8121 стабильно наследуются, трансформанты можно отбирать через 24 ч. Для получения экспрессионной конструкции с полной кодирующей последовательностью гена белка S вируса SARS-CoV-2 амплифицировали фрагмент плазмиды pJET::spike с использованием праймеров SpV-F и Gib-ori-F (рис. 3). Полученный продукт размером 5317 п. н. обрабатывали рестриктазой NcoI, целевой фрагмент размером 3854 п. н. (см. рис. 3, б) лигировали с линейаризованным по сайтам EcoRV и NcoI вектором pNZ8121. Продукты лигирования использовали для трансформации бактерий *B. subtilis* 168, трансформанты отбирали на среде с хлорамфениколом (10 мкг/мл).

Экспрессионные конструкции с кодирующей последовательностью RBD собирали аналогично с использованием рестриктазно-лигазного метода (рис. 4 и 5), при этом фрагмент HA-spike длиной 777 п. н. получали путем обработки плазмиды pUC21::HA-spike рестриктазами EcoRV и NcoI (см. рис. 4, а и б), а фрагмент mini-spike длиной 842 п. н. – путем обработки донорной плазмиды pEX-K рестриктазами PstI и NheI (см. рис. 5, а и б). Очищенные фрагменты лигировали с линейаризованным вектором pNZ8121 по сайтам EcoRV и NcoI для вставки HA-spike или по сайтам PstI и XbaI (изокаудомер NheI) для вставки mini-spike. Продуктами лигирования трансформировали бактерии *B. subtilis* 168, трансформанты отбирали на среде с хлорамфениколом (10 мкг/мл). Полученные генетические конструкции pNZ::spike, pNZ::HA-spike и pNZ::mini-spike проверяли на правильность сборки методом секвенирования ДНК по Сенгеру с использованием праймеров pNZ-F и pNZ-R и вводили в компетентные клетки бактерий *L. lactis* NZ3900. Для оценки индуцируемой экспрессии целевых генов в клетках рекомбинантных штаммов ночные культуры, разведенные в 25 раз, выращивали на протяжении 4 ч, затем вводили индуктор низин (1 нг/мл) и продолжали инкубировать при тех же условиях в течение 3 ч.

Подтверждение синтеза целевого белка полученными рекомбинантными штаммами осуществляли методом электрофореза белков с последующим иммуноблоттингом с антителами к RBD белка S вируса SARS-CoV-2 (см. рис. 3, в, рис. 4, в, и рис. 5, в). Согласно рис. 3, в, в клеточных лизатах бактерий штамма *L. lactis* pNZ::spike регистрируется несколько фракций белка, связывающихся с антителами к RBD. Отсутствие неспецифического связывания с белками клеточного лизата неиндуцированной суспензии бактерий (отрицательный контроль) подтверждает, что все регистрируемые с помощью иммуноблоттинга фракции содержат эпитоп RBD. Молекулярная масса наиболее представленной фракции составляет около 150 кДа, что совпадает с теоретически рассчитанной массой полноразмерного белка S (144,6 кДа с сигнальной последовательностью гена *prtP*). Присутствие фракций меньшего размера может свидетельствовать о частичной деградации белка или неполной трансляции.

В клеточном лизате штамма *L. lactis* pNZ::HA-spike регистрируется целевой белок массой приблизительно 23 кДа (см. рис. 4, в). Теоретически рассчитанная масса рекомбинантного белка HA-spike в рамке считывания с сигнальной последовательностью гена *prtP* составляет 29,9 кДа, а при условии удаления сигнальных пептидов уменьшается до 23,8 кДа. В лизате клеток штамма *L. lactis* pNZ::mini-spike основную часть целевого белка составляет фракция массой около 35 кДа (см. рис. 5, в), что соответствует теоретически рассчитанной массе 35,4 кДа.

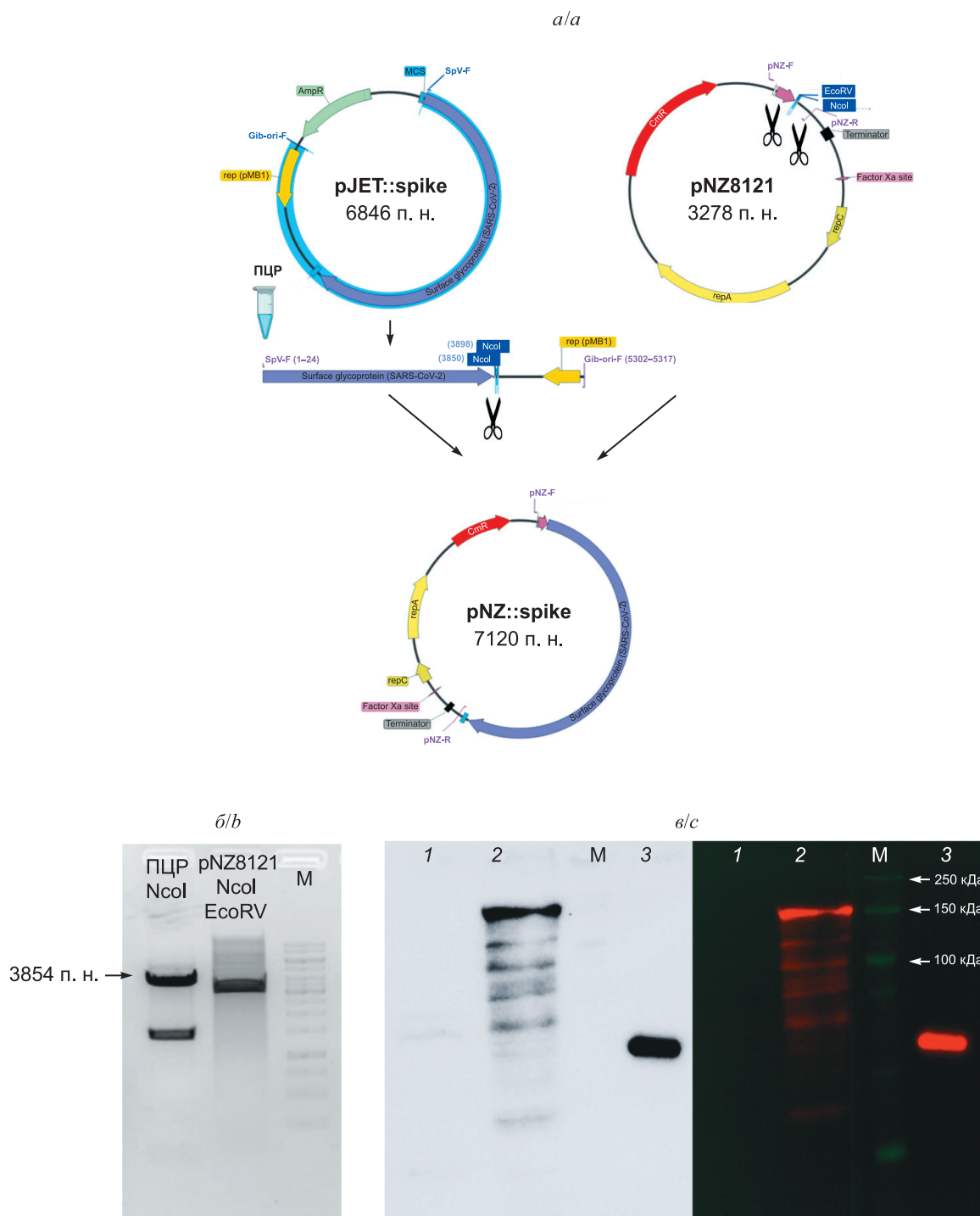


Рис. 3. Схема создания рекомбинантной плазмиды pNZ::spike и проверка экспрессии целевого гена:

- a* – стратегия конструирования экспрессионной плазмиды pNZ::spike;
b – электрофореграмма с фрагментами рестрикции, использованными в приготовлении лигирующей смеси для последующей трансформации бактерий *B. subtilis* 168 (M – маркер молекулярной массы фрагментов ДНК (*Thermo Scientific*; кат. № SM0311));
в – результат идентификации белков с RBD в клетках штамма *L. lactis* pNZ::spike (1 – лизат клеток без индукции, 2 – лизат клеток после индукции низином, 3 – положительный контроль RBD, M – маркер молекулярной массы белка (*Bio-Rad*; кат. № 161-0376))
- Fig. 3. The scheme of recombinant plasmid pNZ::spike construction and verification of target gene expression:
a – the strategy of expression plasmid pNZ::spike engineering;
b – electropherogram of restriction fragments used in the ligation with the following transformation of *B. subtilis* 168 cells (M – DNA fragment molecular weight marker (*Thermo Scientific*; catalog No. SM0311));
c – result of identification of proteins with RBD in *L. lactis* pNZ::spike cells (1 – cell lysate without induction, 2 – nisin-induced cell lysate, 3 – RBD positive control, M – protein molecular weight marker (*Bio-Rad*; catalog No. 161-0376))

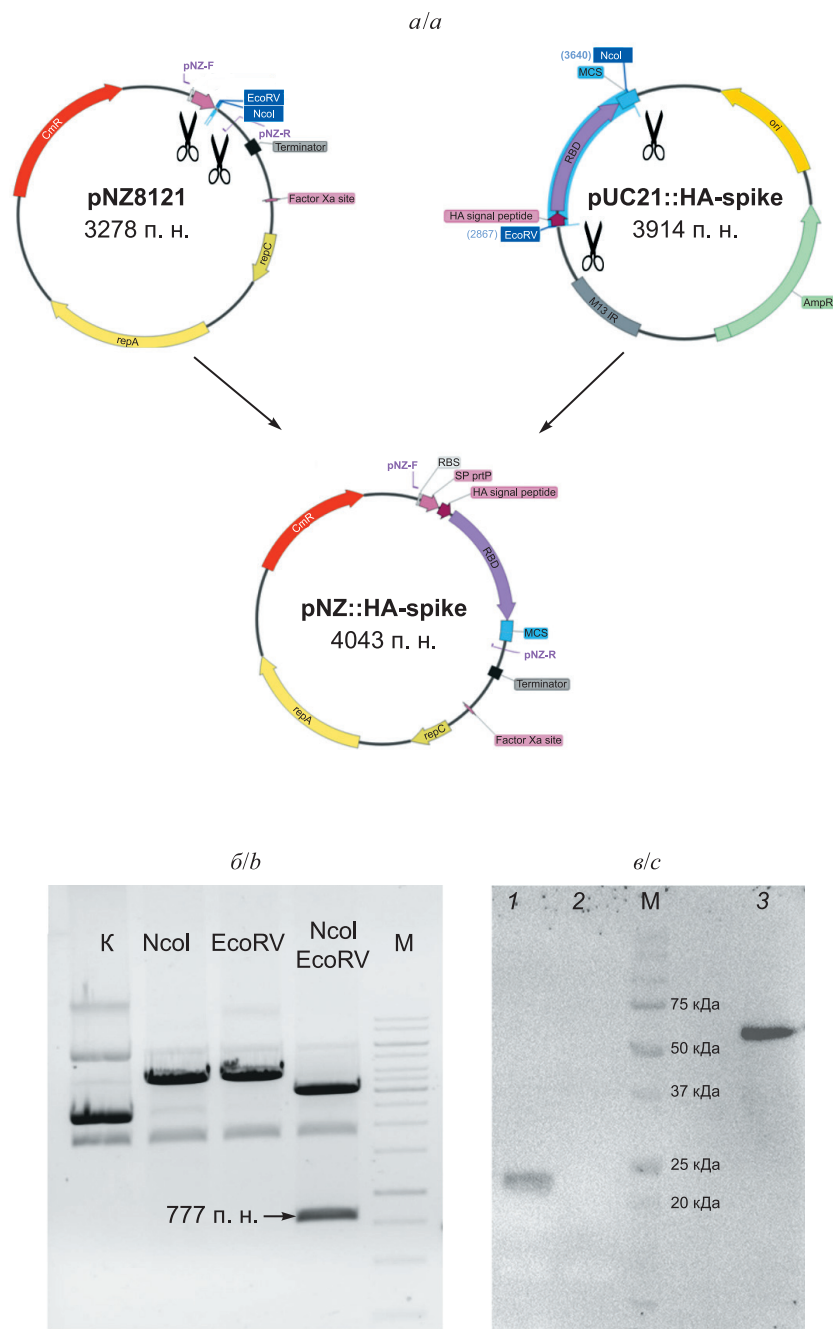


Рис. 4. Схема создания рекомбинантной плазмиды pNZ::HA-spike и проверка экспрессии целевого гена:
 а – стратегия конструирования экспрессионной плазмиды pNZ::HA-spike;
 б – электрофореграмма с фрагментами рестрикции, использованными в приготовлении лигирующей смеси для последующей трансформации бактерий *B. subtilis* 168 (К – необработанная плазмидная ДНК, М – маркер молекулярной массы фрагментов ДНК (Thermo Scientific; кат. № SM0311));
 в – результат идентификации белков с RBD в клетках штамма *L. lactis* pNZ::HA-spike (1 – лизат клеток после индукции низином, 2 – лизат клеток без индукции, 3 – положительный контроль RBD, М – маркер молекулярной массы белка (Bio-Rad; кат. № 161-0376))

Fig. 4. The scheme of recombinant plasmid pNZ::HA-spike construction and verification of target gene expression:
 а – the strategy of expression plasmid pNZ::HA-spike engineering;
 б – electropherogram of restriction fragments used in the ligation with the following transformation of *B. subtilis* 168 cells (K – plasmid without treatment, M – DNA fragment molecular weight marker (Thermo Scientific; catalog No. SM0311));
 в – result of identification of proteins with RBD in *L. lactis* pNZ::HA-spike cells (1 – nisin-induced cell lysate, 2 – cell lysate without induction, 3 – RBD positive control, M – protein molecular weight marker (Bio-Rad; catalog No. 161-0376))

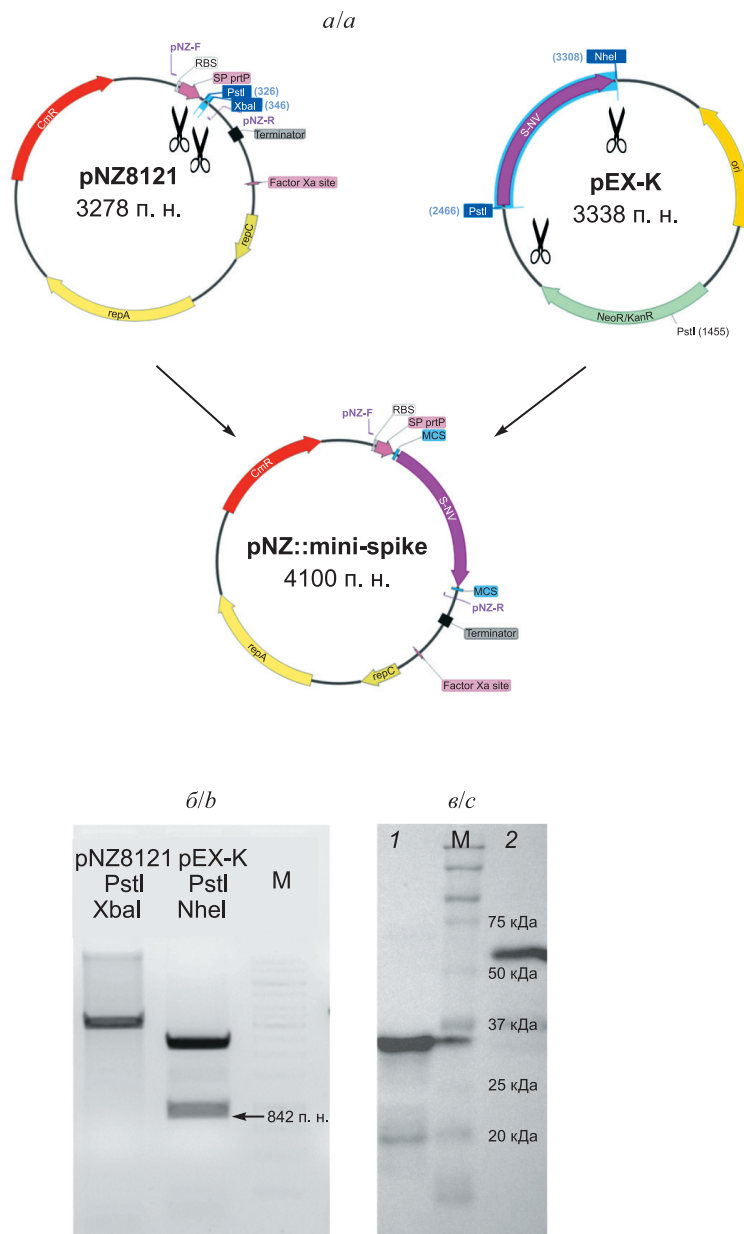


Рис. 5. Схема создания рекомбинантной плазмиды pNZ::mini-spike и проверка экспрессии целевого гена:

- a* – стратегия конструирования экспрессионной плазмиды pNZ::mini-spike;
b – электрофореграмма с фрагментами рестрикции, использованными в приготовлении лигирующей смеси для последующей трансформации бактерий *B. subtilis* 168 (M – маркер молекулярной массы фрагментов ДНК (*Thermo Scientific*; кат. № SM0311));
в – результат идентификации белков с RBD в клетках штамма *L. lactis* pNZ::mini-spike (1 – лизат клеток после индукции низином, 2 – положительный контроль RBD, M – маркер молекулярной массы белка (*Bio-Rad*; кат. № 161-0376))

Fig. 5. The scheme of recombinant plasmid pNZ::mini-spike construction and verification of target gene expression:

- a* – the strategy of expression plasmid pNZ::mini-spike engineering;
b – electropherogram of restriction fragments used in the ligation with the following transformation of *B. subtilis* 168 cells (M – DNA fragment molecular weight marker (*Thermo Scientific*; catalog No. SM0311));
c – result of identification of proteins with RBD in *L. lactis* pNZ::mini-spike cells (1 – nisin-induced cell lysate, 2 – RBD positive control, M – protein molecular weight marker (*Bio-Rad*; catalog No. 161-0376))

Суспензии клеток выравнивали по оптической плотности перед приготовлением проб для электрофореза белков, однако заметно, что в клеточном лизате штамма *L. lactis* pNZ::HA-spike целевого белка меньше, чем в клеточном лизате штамма *L. lactis* pNZ::mini-spike (в сравнении с положительным контролем RBD на рис. 4, в, и рис. 5, в), а молекулярная масса белка соответствует теоретически рассчитанной молекулярной массе без сигнальных пептидов. Предположительно, это может быть связано с секрецией белка во внеклеточное пространство, сопровождающейся удалением сигнальных пептидов, поэтому нами исследовалась способность штаммов секретируемый белок (рис. 6).

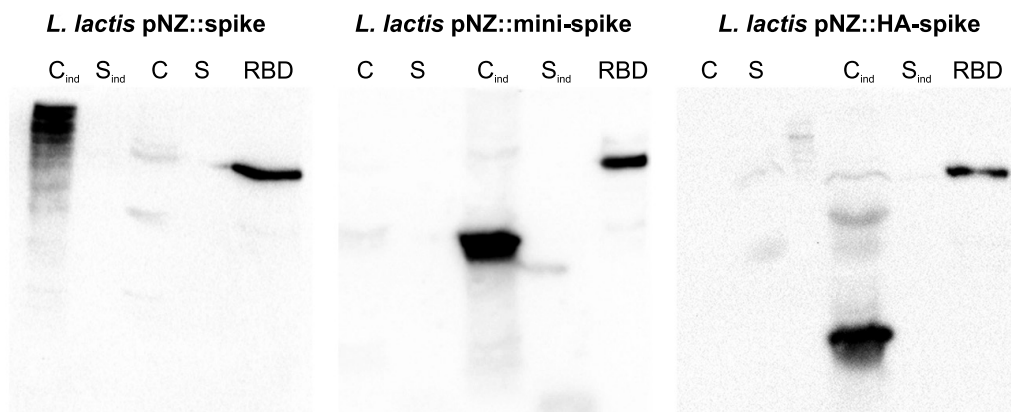


Рис. 6. Результат идентификации белков с RBD в клеточных лизатах и супернатантах рекомбинантных штаммов методом иммуноблоттинга. Используемые обозначения: C – клеточный лизат; S – супернатант; C_{ind} и S_{ind} – образцы из индуцированной низином суспензии; RBD – положительный контроль RBD. Для лучшей визуализации в образце C_{ind} штамма *L. lactis* pNZ::HA-spike загружено в 3 раза больше белкового лизата

Fig. 6. The result of Western blot identification of proteins with RBD in cell lysates and supernatants of recombinant strains. Symbols: C – cell lysate; S – supernatant; C_{ind} and S_{ind} – samples were prepared from nisin induced suspension; RBD – positive control of RBD. For better visualisation, 3 times more protein lysate was loaded in sample C_{ind} of strain *L. lactis* pNZ::HA-spike

Как видно из рис. 6, весь пул рекомбинантных белков, синтезируемый штаммами *L. lactis* pNZ::spike, *L. lactis* pNZ::mini-spike и *L. lactis* pNZ::HA-spike, находится в клеточном осадке. Относительно отсутствия секреции синтезируемых белков следует отметить, что согласно имеющимся сведениям в бактериях *L. lactis* не всегда удавалось получить секретируемый рекомбинантный белок даже при использовании сигнального пептида Usp45, позиционируемого производителем как более предпочтительного [7; 21]. Эффективность секреции зависит от сочетания сигнального пептида с целевым белком, и оптимальное сочетание трудно предсказать, при этом предполагается, что конформация продуцируемого белка влияет на секрецию в большей степени, чем его размер [12]. При использовании бактерий в качестве живой пероральной вакцины внутриклеточная или мембранная локализация антигенов может быть более предпочтительной, так как секретируемые белки в большей мере подвержены разрушению ферментами желудочно-кишечного тракта хозяина. Возможной причиной разного уровня синтеза RBD штаммами *L. lactis* pNZ::HA-spike и *L. lactis* pNZ::mini-spike являются различия кодонного состава кодирующих последовательностей HA-spike и mini-spike. Также не исключено действие внутриклеточных протеаз, в том числе идентифицированной в бактериях *L. lactis* цитоплазматической протеазы ClpP, которая играет важную роль в деградации неправильно свернутых белков [56].

Согласно результатам, полученным в настоящей работе, бактерии *L. lactis* способны синтезировать как небольшой фрагмент RBD, так и полноразмерный белок S вируса SARS-CoV-2.

Заключение

Созданы экспрессионные конструкции, в составе которых под контролем индуцибельного промотора P_{nisA} находятся ген *s* вируса SARS-CoV-2 (pNZ::spike) и различающиеся по кодонному составу и размеру фрагменты гена *s*, транскрибируемые в RBD (pNZ::mini-spike и pNZ::HA-spike). Получены штаммы бактерий *L. lactis*, продуцирующие рекомбинантные вирусные белки, специфически связывающиеся с антителами к RBD вируса SARS-CoV-2: штамм *L. lactis* pNZ::spike (синтезирует белок S вируса SARS-CoV-2 с молекулярной массой около 150 кДа), а также штаммы *L. lactis* pNZ::mini-spike и *L. lactis* pNZ::HA-spike (синтезируют RBD белка S с молекулярной массой около 35 и 23 кДа соответственно).

Представленные в работе результаты свидетельствуют о принципиальной возможности использования бактерий *L. lactis* в качестве продуцентов отдельных доменов и полноразмерных мультидоменных рекомбинантных белков вируса SARS-CoV-2. Полученные рекомбинантные штаммы *L. lactis* pNZ::spike, *L. lactis* pNZ::mini-spike и *L. lactis* pNZ::HA-spike будут подвергаться дальнейшим исследованиям в целях оценки их способности вызывать специфический иммунный ответ у лабораторных животных.

Библиографические ссылки

1. Ayivi RD, Gyawali R, Krastanov A, Aljaloud SO, Worku M, Tahergorabi R, et al. Lactic acid bacteria: food safety and human health applications. *Dairy*. 2020;1(3):202–232. DOI: 10.3390/dairy1030015.
2. del Rio B, Redruello B, Fernandez M, Martin MC, Ladero V, Alvarez MA. Lactic acid bacteria as a live delivery system for the *in situ* production of nanobodies in the human gastrointestinal tract. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:3179. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03179.
3. Hatti-Kaul R, Chen L, Dishisha T, El Enshasy H. Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiology Letters*. 2018;365(20):fny213. DOI: 10.1093/femsle/fny213.
4. Kaur M, Singh H, Jangra M, Kaur L, Jaswal P, Dureja C, et al. Lactic acid bacteria isolated from yak milk show probiotic potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017;101(20):7635–7652. DOI: 10.1007/s00253-017-8473-4.
5. Thakur K, Tomar SK, De S. Lactic acid bacteria as a cell factory for riboflavin production. *Microbial Biotechnology*. 2016;9(4):441–451. DOI: 10.1111/1751-7915.12335.
6. Ryan MP, Rea MC, Hill C, Ross RP. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62(2):612–619. DOI: 10.1128/aem.62.2.612-619.1996.
7. Enouf V, Langella P, Commissaire J, Cohen J, Corthier G. Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(4):1423–1428. DOI: 10.1128/AEM.67.4.1423-1428.2001.
8. Ogaugwu CE, Cheng Q, Fieck A, Hurwitz I, Durvasula R. Characterization of a *Lactococcus lactis* promoter for heterologous protein production. *Biotechnology Reports*. 2018;17:86–92. DOI: 10.1016/j.btre.2017.11.010.
9. Singh SK, Naghizadeh M, Plieskatt J, Singh S, Theisen M. Cloning and recombinant protein expression in *Lactococcus lactis*. In: Sousa A, Passarinha L, editors. *Advanced methods in structural biology*. New York: Humana Press; 2023. p. 3–20 (Walker JM, editor. *Methods in molecular biology*; volume 2652). DOI: 10.1007/978-1-0716-3147-8_1.
10. Guan C, Yuan Y, Ma Y, Wang X, Zhang C, Lu M, et al. Development of a novel expression system in lactic acid bacteria controlled by a broad-host-range promoter P_{srfa}. *Microbial Cell Factories*. 2022;21:23. DOI: 10.1186/s12934-022-01754-z.
11. Cho SW, Yim J, Seo SW. Engineering tools for the development of recombinant lactic acid bacteria. *Biotechnology Journal*. 2020;15(6):1900344. DOI: 10.1002/biot.201900344.
12. Le Loir Y, Azevedo V, Oliveira SC, Freitas DA, Miyoshi A, Bermúdez-Humarán LG, et al. Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microbial Cell Factories*. 2005;4:2. DOI: 10.1186/1475-2859-4-2.
13. Landete JM. A review of food-grade vectors in lactic acid bacteria: from the laboratory to their application. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017;37(3):296–308. DOI: 10.3109/07388551.2016.1144044.
14. Takahashi K, Orito N, Tokunoh N, Inoue N. Current issues regarding the application of recombinant lactic acid bacteria to mucosal vaccine carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019;103(15):5947–5955. DOI: 10.1007/s00253-019-09912-x.
15. Benbouziane B, Ribelles P, Aubry C, Martin R, Kharrat P, Riazi A, et al. Development of a stress-inducible controlled expression (SICE) system in *Lactococcus lactis* for the production and delivery of therapeutic molecules at mucosal surfaces. *Journal of Biotechnology*. 2013;168(2):120–129. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.04.019.
16. Ma S, Li K, Li X-S, Guo X-Q, Fu P-F, Yang M-F, et al. Expression of bioactive porcine interferon-alpha in *Lactobacillus casei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014;30(9):2379–2386. DOI: 10.1007/s11274-014-1663-7.
17. Chatel J-M, Langella P, Adel-Patient K, Commissaire J, Wal J-M, Corthier G. Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. 2001;8(3):545–551. DOI: 10.1128/CDLI.8.3.545-551.2001.
18. Wells JM, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 2008;6(5):349–362. DOI: 10.1038/nrmicro1840.
19. Qiao N, Du G, Zhong X, Sun X. Recombinant lactic acid bacteria as promising vectors for mucosal vaccination. *Exploration*. 2021;1(2):20210026. DOI: 10.1002/EXP.20210026.
20. Tavares LM, de Jesus LCL, da Silva TF, Barroso FAL, Batista VL, Coelho-Rocha ND, et al. Novel strategies for efficient production and delivery of live biotherapeutics and biotechnological uses of *Lactococcus lactis*: the lactic acid bacterium model. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:517166. DOI: 10.3389/fbioe.2020.517166.
21. Bermúdez-Humarán LG, Kharrat P, Chatel J-M, Langella P. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microbial Cell Factories*. 2011;10(supplement 1):S4. DOI: 10.1186/1475-2859-10-S1-S4.
22. Chau ECT, Kwong TC, Pang CK, Chan LT, Chan AML, Yao X, et al. A novel probiotic-based oral vaccine against SARS-CoV-2 Omicron variant B.1.1.529. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(18):13931. DOI: 10.3390/ijms241813931.
23. Wang M, Fu T, Hao J, Li L, Tian M, Jin N, et al. A recombinant *Lactobacillus plantarum* strain expressing the spike protein of SARS-CoV-2. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;160:736–740. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.239.
24. Zhao Y, Zhang H, Zhao Z, Liu F, Dong M, Chen L, et al. Efficacy and safety of oral LL-37 against the Omicron BA.5.1.3 variant of SARS-CoV-2: a randomized trial. *Journal of Medical Virology*. 2023;95(8):e29035. DOI: 10.1002/jmv.29035.
25. Yurina V, Adianingsih OR, Widodo N. Oral and intranasal immunization with food-grade recombinant *Lactococcus lactis* expressing high conserved region of SARS-CoV-2 spike protein triggers mice's immunity responses. *Vaccine: X*. 2023;13:100265. DOI: 10.1016/j.jvacx.2023.100265.
26. Xuan B, Park J, Yoo JH, Kim EB. Oral immunization of mice with cell extracts from recombinant *Lactococcus lactis* expressing SARS-CoV-2 spike protein. *Current Microbiology*. 2022;79(6):167. DOI: 10.1007/s00284-022-02866-w.

27. Jia Q, Bielefeldt-Ohmann H, Maison RM, Masleša-Galić S, Cooper SK, Bowen RA, et al. Replicating bacterium-vectored vaccine expressing SARS-CoV-2 membrane and nucleocapsid proteins protects against severe COVID-19-like disease in hamsters. *NPJ Vaccines*. 2021;6:47. DOI: 10.1038/s41541-021-00321-8.
28. Kurpas MK, Jaksik R, Kuś P, Kimmel M. Genomic analysis of SARS-CoV-2 Alpha, Beta and Delta variants of concern uncovers signatures of neutral and non-neutral evolution. *Viruses*. 2022;14(11):2375. DOI: 10.3390/v14112375.
29. Jiang H-W, Li Y, Tao S-C. SARS-CoV-2 peptides/epitopes for specific and sensitive diagnosis. *Cellular & Molecular Immunology*. 2023;20(5):540–542. DOI: 10.1038/s41423-023-01001-4.
30. Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2):281–292. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
31. Patel R, Kaki M, Potluri VS, Kahar P, Khanna D. A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2022;18(1):2002083. DOI: 10.1080/21645515.2021.2002083.
32. Nagesha SN, Ramesh BN, Pradeep C, Shashidhara KS, Ramakrishnappa T, Krishnaprasad BT, et al. SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit as an ideal target for stable vaccines: a bioinformatic study. *Materials Today: Proceedings*. 2022;49(part 3):904–912. DOI: 10.1016/j.matpr.2021.07.163.
33. Tai W, He L, Zhang X, Pu J, Voronin D, Jiang S, et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cellular & Molecular Immunology*. 2020;17(6):613–620. DOI: 10.1038/s41423-020-0400-4.
34. Shrivastava T, Singh B, Rizvi ZA, Verma R, Goswami S, Vishwakarma P, et al. Comparative immunomodulatory evaluation of the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein; a potential vaccine candidate which imparts potent humoral and Th1 type immune response in a mouse model. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:641447. DOI: 10.3389/fimmu.2021.641447.
35. Wang Y, Wang L, Cao H, Liu C. SARS-CoV-2 S1 is superior to the RBD as a COVID-19 subunit vaccine antigen. *Journal of Medical Virology*. 2021;93(2):892–898. DOI: 10.1002/jmv.26320.
36. Yang J, Wang W, Chen Z, Lu S, Yang F, Bi Z, et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity. *Nature*. 2020;586(7830):572–577. DOI: 10.1038/s41586-020-2599-8.
37. Montgomerie I, Bird TW, Palmer OR, Mason NC, Pankhurst TE, Lawley B, et al. Incorporation of SARS-CoV-2 spike NTD to RBD protein vaccine improves immunity against viral variants. *iScience*. 2023;26(4):106256. DOI: 10.1016/j.isci.2023.106256.
38. Law JLM, Logan M, Joyce MA, Landi A, Hockman D, Crawford K, et al. SARS-CoV-2 recombinant receptor-binding domain (RBD) induces neutralizing antibodies against variant strains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV-1. *Vaccine*. 2021;39(40):5769–5779. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.08.081.
39. Gaeng S, Scherer S, Neve H, Loessner MJ. Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(7):2951–2958. DOI: 10.1128/AEM.66.7.2951-2958.2000.
40. Zhang H, Dong M, Xu H, Li H, Zheng A, Sun G, et al. Recombinant *Lactococcus lactis* expressing human LL-37 prevents deaths from viral infections in piglets and chicken. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* [Internet]. 2023 September 25 [cited 2024 January 12]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-023-10155-6>. Epub ahead of print. DOI: 10.1007/s12602-023-10155-6.
41. Arnau J, Hjerl-Hansen E, Israelsen H. Heterologous gene expression of bovine plasmin in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997;48(3):331–338. DOI: 10.1007/s002530051058.
42. Achatz S, Skerra A. Comparative genome analysis of three classical *E. coli* cloning strains designed for blue/white selection: JM83, JM109 and XL1-Blue. *FEBS Open Bio*. 2024;14(6):888–905. DOI: 10.1002/2211-5463.13812.
43. Itaya M. *Bacillus subtilis* 168 as a unique platform enabling synthesis and dissemination of genomes. *Journal of General and Applied Microbiology*. 2022;68(2):45–53. DOI: 10.2323/jgam.2021.12.001.
44. de Ruyter PG, Kuipers OP, Beerthuyzen MM, van Alen-Boerrigter I, de Vos WM. Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 1996;178(12):3434–3439. DOI: 10.1128/jb.178.12.3434-3439.1996.
45. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 1985;33(1):103–119. DOI: 10.1016/0378-1119(85)90120-9.
46. Vieira J, Messing J. New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene*. 1991;100:189–194. DOI: 10.1016/0378-1119(91)90365-i.
47. *MoBiTec Molecular Biotechnology* [Internet]. Goettingen: MoBiTec; 2024 [cited 2024 January 12]. Available from: <https://www.mobitec.com/>.
48. Бельская ИВ. Создание векторной конструкции для экспрессии RBD SARS-CoV-2. В: Абиев Е, редактор. *Лучший молодой ученый – 2022. V Международное книжное издание стран Содружества Независимых Государств. Том 18*. Нур-Султан: [б. и.]; 2022. с. 39–42.
49. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 3 volumes.
50. Anagnostopoulos C, Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 1961;81(5):741–746. DOI: 10.1128/jb.81.5.741-746.1961.
51. *NICE® expression system for Lactococcus lactis. The effective & easy-to-operate nisin controlled gene expression system* [Internet]. Goettingen: MoBiTec; 2015 [cited 2024 January 12]. 34 p. Available from: https://www.mobitec.com/media/datasheets/mobitec_gmbh/NICE_Expression_System-Handbook.pdf.
52. Voskuil MI, Chambliss GH. Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993;59(4):1138–1142. DOI: 10.1128/aem.59.4.1138-1142.1993.
53. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS*. 1977;74(12):5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
54. Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet*. 2021;397(10275):671–681. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00234-8.
55. Dormeshkin D, Katsin M, Stegantseva M, Golenchenko S, Shapira M, Dubovik S, et al. Design and immunogenicity of SARS-CoV-2 DNA vaccine encoding RBD-PVXCP fusion protein. *Vaccines*. 2023;11(6):1014. DOI: 10.3390/vaccines11061014.
56. Frees D, Ingmer H. ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*. 1999;31(1):79–87. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01149.x.