

Научная статья/Research article

УДК 579.25:579.258

DOI: 10.36718/1819-4036-2026-4-188-197

Виктор Сергеевич Самойленко^{1✉}, Александр Юрьевич Криворучко²,
Сергей Викторович Пушкин³, Елена Валентиновна Светлакова⁴,
Анастасия Игоревна Живодерова⁵

^{1,2,3}Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

^{4,5}Ставропольский государственный аграрный университет, Ставрополь, Россия

¹viktor_samoilenko_26@mail.ru

²akrivoruchko@ncfu.ru

³sergey-pushkin-st@yandex.ru

⁴alenska6121970@mail.ru

⁵nastya.zhivoderova007@mail.ru

ОБЕСПЕЧЕНИЕ ВЫСОКОТОЧНОГО СИНТЕЗА ГЕНОВ И КОДОН-ОПТИМИЗАЦИЯ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ КОЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНОВ В ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММАХ *LACTOBACILLUS SPP.*

Цель исследования – разработка высокоэффективного метода синтеза и сборки длинных кодон-оптимизированных генетических конструкций для последующей коэкспрессии в пробиотических штаммах бактерий. На базе Геномного центра Северо-Кавказского федерального университета в период с 2024 по 2025 г. были проведены комплексные исследования, направленные на разработку высокоточного метода синтеза генов и кодон-оптимизации для эффективной коэкспрессии цитокинов в пробиотических штаммах *Lactobacillus spp.* Объекты исследования – нуклеотидные последовательности генов цитокинов крупного рогатого скота IL-10 (537 п.н.) и IL-22 (522 п.н.). Биоинформатическая кодон-оптимизация проведена с помощью программы GeneOptimizer с адаптацией к профилю использования кодонов *Lactobacillus spp.*, коррекцией GC-состава (52–55 %) и устранением нестабильных элементов. Сравнивали три метода сборки: классический фосфорамидитный синтез, гибридную сборку (аналог Gibson Assembly) и оптимизированный метод на платформе GeneOptimizer с интегрированной ВЭЖХ-очисткой. Результаты комплексного анализа показали, что все три исследованных методологических подхода принципиально обеспечивали возможность получения целевых полноразмерных генетических конструкций, однако продемонстрировали существенные и статистически значимые различия по ключевым параметрам, определяющим практическую применимость методов. Эти параметры включали точность синтеза (частоту ошибок), скорость выполнения процесса (время сборки) и общий выход полноразмерного продукта, что в совокупности формирует интегральный показатель эффективности каждой из технологий. Оптимизированный метод показал максимальную точность – 1 ошибка на 10 000 нуклеотидов, время сборки 16 ч и выход полноразмерного продукта 95 %. Классический и гибридный методы имели выход 45 и 55 % с частотой ошибок 1/500 и 1/2000 нт соответственно. Интеграция биоинформатического дизайна с автоматизированным синтезом и очисткой создает высокоточную платформу для получения генетических конструкций, обеспечивающих стабильную коэкспрессию иммуномодуляторов в пробиотических штаммах *Lactobacillus spp.* для ветеринарных применений.

Ключевые слова: кодон-оптимизированный синтез генов, коэкспрессия цитокинов, пробиотические штаммы *Lactobacillus spp.*, интерлейкины IL-10 и IL-22, высокоточный синтез, платформа GeneOptimizer, автоматизированная сборка генов

Для цитирования: Самойленко В.С., Криворучко А.Ю., Пушкин С.В., и др. Обеспечение высокоточного синтеза генов и кодон-оптимизация для эффективной коэкспрессии цитокинов в пробиотических штаммах *Lactobacillus spp.* // Вестник КрасГАУ. 2026. № 4. С. 188–197. DOI: 10.36718/1819-4036-2026-4-188-197.

Victor Sergeevich Samoilenko^{1✉}, Alexander Yur'evich Krivoruchko², Sergey Victorovich Pushkin³, Elena Valentinovna Svetlakova⁴, Anastasia Igorevna Zhivoderova⁵

^{1,2,3}North Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

^{4,5}Stavropol State Agrarian University, Stavropol, Russia

¹viktor_samoilenko_26@mail.ru

²akrivoruchko@ncfu.ru

³Sergey-pushkin-st@yandex.ru

⁴alenska6121970@mail.ru

⁵nastya.zhivoderova007@mail.ru

ENSURING HIGH-PRECISION GENE SYNTHESIS AND CODON OPTIMIZATION FOR EFFICIENT CYTOKINE CO-EXPRESSION IN PROBIOTIC STRAINS OF *LACTOBACILLUS SPP.*

The aim of the study is to develop a highly efficient method for the synthesis and assembly of long codon-optimized genetic constructs for subsequent co-expression in probiotic bacterial strains. From 2024 to 2025, comprehensive studies were conducted at the Genome Center of the North Caucasus Federal University to develop a highly accurate method for gene synthesis and codon optimization for efficient co-expression of cytokines in probiotic strains of *Lactobacillus spp.* The objects of the study were the nucleotide sequences of the bovine cytokine genes IL-10 (537 bp) and IL-22 (522 bp). Bioinformatics codon optimization was performed using the GeneOptimizer program with adaptation to the codon usage profile of *Lactobacillus spp.*, correction of the GC composition (52–55 %), and elimination of unstable elements. Three assembly methods were compared: classical phosphoramidite synthesis, hybrid assembly (similar to Gibson Assembly), and an optimized method based on the GeneOptimizer platform with integrated HPLC purification. The results of a comprehensive analysis showed that all three methodological approaches were capable of producing full-length target genetic constructs, but demonstrated significant and statistically significant differences in key parameters determining the practical applicability of the methods. These parameters included synthesis accuracy (error rate), process speed (assembly time), and overall full-length product yield, which together form an integrated performance indicator for each technology. The optimized method demonstrated maximum accuracy – 1 error per 10,000 nucleotides – with an assembly time of 16 hours and a full-length product yield of 95 %. The classical and hybrid methods had yields of 45 % and 55 %, with error rates of 1/500 and 1/2000 nt, respectively. The integration of bioinformatic design with automated synthesis and purification creates a high-precision platform for producing genetic constructs that ensure stable coexpression of immunomodulators in probiotic *Lactobacillus spp.* strains for veterinary applications.

Keywords: codon-optimized gene synthesis, cytokine co-expression, probiotic strains of *Lactobacillus spp.*, interleukins IL-10 and IL-22, high-precision synthesis, GeneOptimizer platform, automated gene assembly

For citation: Samoilenko VS, Krivoruchko AY, Pushkin SV, et al. Ensuring high-precision gene synthesis and codon optimization for efficient cytokine co-expression in probiotic strains of *Lactobacillus spp.* *Bulletin of KSAU.* 2026;(4):188-197. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2026-4-188-197.

Введение. Разработка пробиотических штаммов, способных к одновременной экспрессии нескольких иммуномодулирующих белков, может оказать значительное влияние на здоровье и продуктивность сельскохозяйственных животных, что подчеркивает необходимость внедрения передовых, высокоточных методов генетического конструирования. В условиях современного интенсивного животноводства, где стратегические задачи включают повышение эффективности производства, укрепление естественной резистентности поголовья и глобальное сокращение

применения антибиотиков, создание высокоэффективных пробиотиков с заданными, программируемыми свойствами становится критически важным направлением биотехнологии [1–4].

Особый интерес в этом контексте представляют представители рода *Lactobacillus* – грамположительные бактерии, обладающие статусом «общепризнанных безопасных» (GRAS), высокой адаптивностью к желудочно-кишечному тракту и давней историей применения в качестве пробиотиков. Их генетическая модификация для направленной доставки терапевтических

агентов, таких как цитокины, открывает путь к созданию препаратов нового поколения для коррекции иммунного статуса, профилактики инфекционных заболеваний и снижения воспалительных процессов у молодняка и взрослых животных [5, 6].

Ключевой технологической проблемой при конструировании рекомбинантных штаммов для коэкспрессии нескольких гетерологичных белков является обеспечение не только высокого, но и сбалансированного уровня их накопления. Асимметричное накопление целевых цитокинов часто обусловлено фундаментальными различиями в эффективности трансляции их мРНК в чужеродном бактериальном хозяине. Это связано с видоспецифичными различиями в частоте использования синонимичных кодонов. Редкие для эукариот кодоны в генах млекопитающих часто соответствуют низкоэкспрессируемому или отсутствующим тРНК в прокариотических системах, таких как *Lactobacillus spp.* [7, 8]. Это несоответствие приводит к задержкам рибосомального сканирования, повышенной частоте ошибок трансляции, образованию стоп-кодонов и, как следствие, к преждевременной термации синтеза полипептидной цепи. Результатом становится не только низкий общий выход целевого белка, но и нарушение стехиометрического баланса при коэкспрессии, что может нивелировать синергетический терапевтический эффект от применения нескольких иммуномодуляторов.

Современные стратегии кодон-оптимизации эволюционируют от простой адаптации частоты кодонов к более комплексным подходам, учитывающим такие факторы, как скорость трансляции и ко-трансляционный фолдинг белка. Распределение «медленных» и «быстрых» кодонов вдоль открытой рамки считывания может влиять на корректность пространственной упаковки полипептида, особенно для секреторируемых цитокинов, что напрямую определяет их биологическую активность [14, 15]. Кроме того, при коэкспрессии возникает проблема конкуренции за ограниченный пул рибосом, аминоацил-тРНК-синтаз и шаперонов, что требует тонкой настройки не только кодонного состава, но и силы промоторов, стабильности мРНК для достижения желаемого стехиометрического соотношения белков. Выбор конкретных цитокинов, таких как IL-10 (противовоспалительный) и IL-22 (репаративный, индуцирующий продукцию антимикробных пептидов), для экспрессии в лактобактериях продиктован их

комплементарным действием на слизистую кишечника. Такая комбинация потенциально позволяет одновременно гасить патологическое воспаление и усиливать барьерную функцию, что критически важно для профилактики и терапии неонатальных диарей телят, вызванных условно-патогенной микрофлорой.

Таким образом, центральным звеном в решении данной проблемы является получение высококачественных, безошибочных и адаптированных к хозяину генетических конструкций. Современные методы синтетической биологии, в частности автоматизированный химический синтез олигонуклеотидов и мощный биоинформатический анализ, предоставляют исследователям принципиально новые возможности для прецизионного получения длинных фрагментов ДНК [9, 10].

Однако сам по себе синтез является лишь первым этапом. Критически важным становится последующий процесс сборки этих коротких фрагментов в полноразмерные гены, а также эффективная очистка промежуточных продуктов. Здесь на первый план выходят такие методики, как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), которая позволяет не только удалять соли и растворители, но и осуществлять тонкое фракционирование, отделяя полноцепочечные олигонуклеотиды от неполных продуктов синтеза и химических артефактов [11, 12]. Это напрямую влияет на эффективность и точность последующей ферментативной или гибридной сборки, минимизируя риск включения дефектных фрагментов в итоговую конструкцию.

В этом технологическом контуре кодон-оптимизация выступает в качестве незаменимого инструмента, связывающего биоинформатический дизайн с физическим синтезом. Она представляет собой не простую замену кодонов на синонимичные, а комплексный процесс адаптации нуклеотидной последовательности гетерологичного гена к специфическим условиям целевого пробиотического хозяина [13, 14]. Современные алгоритмы, реализованные в специализированном программном обеспечении (GeneOptimizer, OPTIMIZER, GenScript), позволяют проводить многопараметрическую оптимизацию. Это включает адаптацию частоты использования кодонов к профилю тРНК *Lactobacillus spp.*, корректировку общего GC-состава и его распределения по последовательности для обеспечения стабильности ДНК и эффективной транскрипции, устранение криптических

сайтов рестрикции, нестабильных повторов и сайтов сплайсинга, а также минимизацию образования стабильных вторичных структур в мРНК (шпилек, стеблей), которые могут блокировать движение рибосомы. Именно такой комплексный подход позволяет преодолеть барьеры неэффективной трансляции и обеспечить предсказуемо высокий и сбалансированный уровень коэкспрессии [15].

Тем не менее существующие технологические платформы для синтеза генов демонстрируют значительный разброс по ключевым параметрам, таким как точность (частота ошибок на нуклеотид), выход полноразмерного продукта, время выполнения и степень автоматизации. Классический пошаговый фосфорамидитный синтез с последующей ферментативной лигацией олигомеров, несмотря на отработанность, страдает от накопления ошибок и низкой эффективности сборки длинных фрагментов. Более современные методы изотермической сборки (Gibson Assembly) обеспечивают лучшую точность, но требуют сложной подготовки множества перекрывающихся олигонуклеотидов и многоэтапной очистки, что увеличивает время и стоимость процесса, а также снижает воспроизводимость. Таким образом, сохраняется актуальная потребность в разработке и сравнительном анализе высокоинтегрированных методов, которые сочетали бы в едином автоматизированном цикле этапы биоинформатического дизайна, высокоточного синтеза, интегрированной очистки и сборки, специально ориентированных на задачи синтетической биологии пробиотиков.

Цель исследования – разработка высокоэффективного метода синтеза и сборки длинных кодон-оптимизированных генетических конструкций для последующей коэкспрессии в пробиотических штаммах бактерий.

Объекты и методы. На базе Геномного центра Северо-Кавказского федерального университета в период с 2024 по 2025 г. были проведены комплексные исследования, направленные на разработку высокоточного метода синтеза генов и кодон-оптимизации для эффективной коэкспрессии цитокинов в пробиотических штаммах *Lactobacillus spp.*

В качестве объекта исследований были использованы нуклеотидные последовательности генов интерлейкина-10 (IL-10, 537 п.н.) и интерлейкина-22 (IL-22, 522 п.н.) телят.

Кодон-оптимизацию последовательностей проводили с использованием специализирован-

ного программного обеспечения GeneOptimizer (Thermo Fisher Scientific, США) с применением алгоритмов, учитывающих видоспецифичные особенности использования кодонов у представителей рода *Lactobacillus*. В процессе оптимизации проводили замену редких кодонов на частотные, корректировку GC-состава до оптимальных значений (52–55 %), устранение криптических сайтов рестрикции, стабильных вторичных структур мРНК и гомополимерных участков длиной более 4 нуклеотидов. Оптимизированные последовательности были фрагментированы на 24 перекрывающихся олигонуклеотида (по 12 на каждый ген) длиной 60–80 нуклеотидов с перекрытием 15–20 п. н. с использованием алгоритма, минимизирующего самокомплементарность и обеспечивающего температуру отжига 60–65 °С. Все олигонуклеотиды были спроектированы с 5'-фосфорилированием для последующей ферментативной лигации.

Синтез олигонуклеотидов осуществляли на автоматическом ДНК-синтезаторе ABI 3948 (Applied Biosystems, США) стандартным фосфорамидитным методом с активацией 0,25 М тетразолом в течение 30 с, временем окисления 0,02 М йодом 15 с и детилированием 3 %-й трихлоруксусной кислотой в течение 45 с. Очистку синтезированных олигонуклеотидов проводили методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на системе Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, США) с использованием колонки C18 (4,6×150 мм, 5 мкм) в градиентном режиме элюирования (5–50 % ацетонитрил в 0,1 М триэтиламонийацетатном буфере, pH 7,0) при скорости потока 1 мл/мин.

Концентрацию и чистоту олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, США). Измерения проводили при длине волны 260 нм с коррекцией по коэффициенту экстинкции. Чистота оценивалась по соотношению A260/A280, значения выше 1,8 рассматривались как показатель отсутствия белковых и фенольных примесей. Все образцы, удовлетворяющие критериям качества, нормализовали до концентрации 100 мкМ в TE-буфере (10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0) и хранили при температуре –20 °С в пробирках LowBind.

Для оценки эффективности сборки полноразмерных генов был проведён сравнительный анализ трёх стратегий. Классический метод основывался на пошаговом синтезе, очистке и

ферментативной сборке с использованием T4 ДНК-лигазы. Несмотря на простоту реализации, данный подход характеризовался высоким уровнем ошибок и низким выходом продукта. Гибридная стратегия, по принципу аналогичная Gibson Assembly, предусматривала использование 48 укороченных олигонуклеотидов длиной 40–60 нуклеотидов с перекрытием 20–25 п.н., синтезированных на платформе MerMade 192X. Очистка проводилась в два этапа: сначала аффинной хроматографией на картриджах Oligo Clean, затем ОФ-ВЭЖХ. Этот метод обеспечивал более высокую точность сборки и возможность синтеза длинных последовательностей, однако требовал сложной оптимизации перекрытий и характеризовался ограниченным выходом полноразмерного продукта. Оптимизированный метод с использованием платформы GeneOptimizer включал ускоренный фосфорамидитный цикл синтеза с активацией бензоилтетразолом в течение 20 с, встроенную ВЭЖХ-очистку в режиме реального времени и автоматическую нормализацию концентрации олигонуклеотидов. Для всех методов проводили

оценку выхода полноразмерного продукта, частоты ошибок и времени сборки.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований была получена комплексная серия экспериментальных данных, позволяющих провести объективную и детальную оценку эффективности различных стратегий синтеза и сборки генов IL-10 и IL-22, оптимизированных для последующей экспрессии в пробиотических штаммах *Lactobacillus spp.* Результаты комплексного анализа показали, что все три исследованных методологических подхода принципиально обеспечивали возможность получения целевых полноразмерных генетических конструкций, однако продемонстрировали существенные и статистически значимые различия по ключевым параметрам, определяющим практическую применимость методов. Эти параметры включали точность синтеза (частоту ошибок), скорость выполнения процесса (время сборки) и общий выход полноразмерного продукта, что в совокупности формирует интегральный показатель эффективности каждой из технологий. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Сравнительная эффективность трех стратегий синтеза и сборки цитокинов
Comparative effectiveness of three cytokine synthesis and assembly strategies

Параметр	Классический метод	Гибридная сборка (Gibson Assembly)	Оптимизированный метод (GeneOptimizer)
Время выполнения	72 ч	48 ч	16 ч
Частота ошибок	1/500 нт	1/2000 нт	1/10000 нт
Выход полноразмерного продукта	45 ± 7 %	55 ± 3 %	95 ± 2 %
Уровень оптимизации	Отсутствует	Частичная	Полная

Согласно данным, представленным в таблице 1, можно сделать вывод, что классический фосфорамидитный метод с последующей ферментативной сборкой продемонстрировал наименьшую производительность среди всех исследуемых подходов. Средний выход целевого полноразмерного продукта составил лишь (45 ± 7) %, что является явно недостаточным показателем для масштабирования технологии. Основными причинами столь низкой эффективности стали кумулятивное накопление стохастических ошибок на каждом этапе твердофазного синтеза и принципиально низкая эффективность последующей ферментативной лигации коротких олигонуклеотидов. Критическим фактором, ограничивающим применение данного метода, стала высокая частота ошибок, достигав-

шая 1 на 500 нуклеотидов (или 0,2 %). Такая ошибкопроницаемость делает значительную долю полученных конструкций непригодной для последующего клонирования и функциональной экспрессии, требуя трудоемкого скрининга и селекции. Кроме того, метод оказался наиболее времязатратным, требуя (72 ± 4) ч для завершения полного цикла синтеза и сборки, что делает его малоприменимым для решения задач, требующих оперативности.

Гибридная стратегия, основанная на принципах изотермической сборки типа Gibson Assembly, показала статистически значимо улучшенные метрики точности. Частота ошибок была успешно снижена до 1 на 2000 нуклеотидов (0,05 %), а выход полноразмерных последовательностей возрос до (55 ± 3) %. Ключевым преимуществом

данного подхода стала его фундаментальная способность к эффективной сборке протяженных фрагментов ДНК за счет использования перекрывающихся участков. Однако метод имел существенные операционные недостатки, такие как необходимость синтеза и последующей сложной очистки 48 укороченных перекрывающихся олигонуклеотидов, каждый длиной 40–60 нуклеотидов. Это требовало тщательной и не всегда предсказуемой оптимизации условий отжига и лигации, что, в свою очередь, увеличивало общие временные затраты до (48 ± 3) ч и снижало общую воспроизводимость процесса.

Наибольшая эффективность по всем ключевым параметрам была однозначно достигнута при использовании оптимизированного метода с применением интегрированной платформы GeneOptimizer. Данный подход продемонстрировал беспрецедентно высокий выход полноразмерного продукта – (95 ± 2) %, что более чем вдвое превышает показатели классического метода (рост на 111 %) и на 72,7 % выше результатов гибридной сборки. Столь высокий выход стал возможен благодаря радикальному снижению частоты ошибок до 1 на 10 000 нуклеотидов (0,01 %). Этот показатель на целый порядок (в 5 раз) превосходит точность гибридного метода и на два порядка (в 20 раз) – классического подхода. Скорость работы также была кардинально повышена, что выразилось в сокращении

временных затрат до (16 ± 2) ч, т. е. в 4,5 раза быстрее, чем у классического, и в 3 раза быстрее, чем у гибридного метода.

Ключевым технологическим преимуществом оптимизированного метода стала его сквозная полная автоматизация, охватывающая не только синтез по усовершенствованному фосфорамидитному протоколу, но и встроенную ВЭЖХ-очистку в реальном времени с автоматической нормализацией концентрации олигонуклеотидов. Такая интеграция устранила основные источники варибельности и контаминации. Это обеспечило не только выдающуюся воспроизводимость результатов от эксперимента к эксперименту, но и свело к минимуму риски человеческих ошибок. Фундаментальную роль сыграла глубокая интеграция этапа биоинформатического дизайна, учитывающего особенности кодон-оптимизации для *Lactobacillus spp.*, с самой химией синтеза. Это позволило на этапе проектирования заранее минимизировать риск образования стабильных вторичных структур и других последовательностных артефактов, которые негативно сказываются на эффективности и точности сборки длинных фрагментов ДНК.

Визуализация данных, представленных в виде диаграмм на рисунках 1–3, позволяет показать различия между методами и демонстрирует значительное преимущество оптимизированного метода.

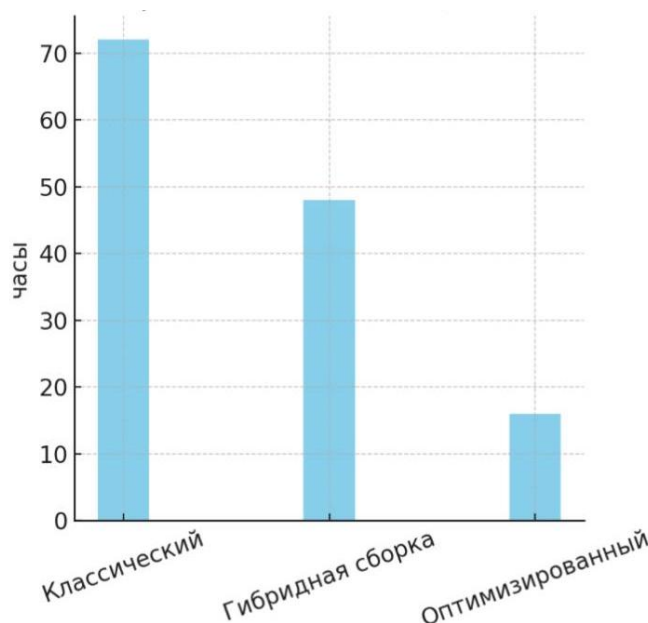


Рис. 1. Сравнение методологических стратегий синтеза и сборки генов по длительности процесса

Comparison of methodological strategies for gene synthesis and assembly by process duration

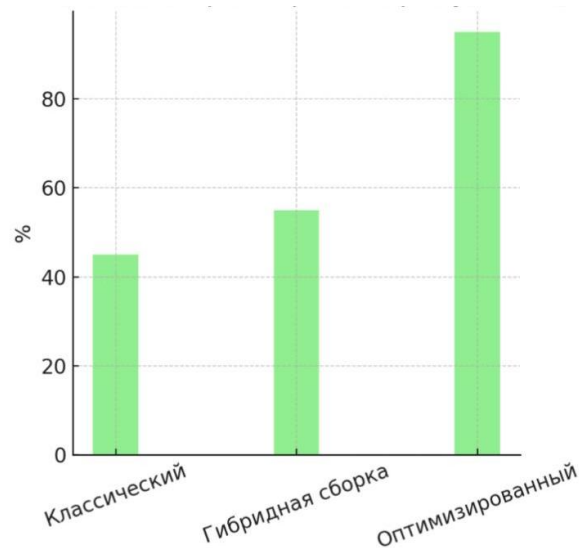


Рис. 2. Сравнение методологических стратегий синтеза и сборки генов по выходу полноразмерного продукта, %
 Comparison of methodological strategies for gene synthesis and assembly based on full-length product yield, %

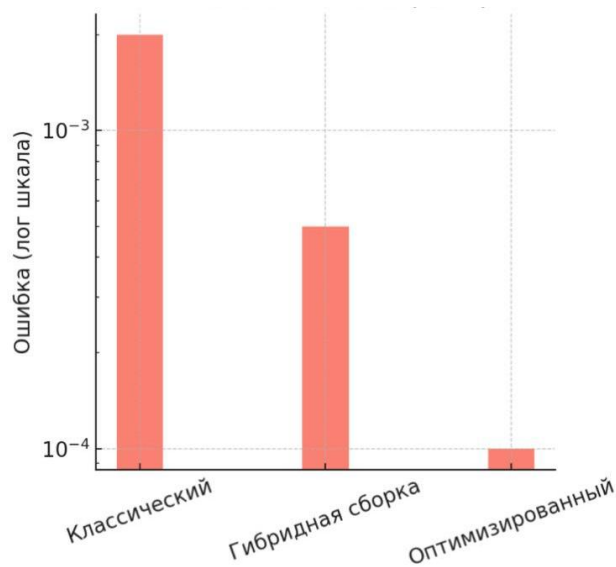


Рис. 3. Сравнение методологических стратегий синтеза и сборки генов по частоте ошибок (1/нт)
 Comparison of methodological strategies for gene synthesis and assembly based on error rates (1/nt)

Полученные результаты демонстрируют, что интеграция современных биоинформатических подходов с автоматизированными платформами синтеза создает эффективную основу для производства высококачественных генетических конструкций. Оптимизированный метод обеспечивает беспрецедентное сочетание скорости, точности и выхода продукта, что делает его особенно ценным для задач синтетической биологии, требующих получения безошибочных последовательностей для коэкспрессии генов в пробиотических системах.

Заключение. В результате проведенного исследования сравнительный анализ трех стратегий сборки генов IL-10 и IL-22 выявил различающиеся показатели эффективности, при этом оптимизированный метод на основе платформы GeneOptimizer показал полное превосходство по всем ключевым параметрам. По выходу полноразмерного продукта данный метод превзошел классический подход в 2,1 раза ((95 ± 2) против (45 ± 7) %), а гибридную сборку – в 1,7 раза ((95 ± 2) против (55 ± 3) %), что обусловлено комплексным подходом, сочетаю-

щим ускоренный фосфорамидитный синтез с активацией бензоилтетразолом в течение 20 с, интегрированную ВЭЖХ-очистку в реальном времени и автоматическую нормализацию концентраций.

Наиболее впечатляющие результаты получены в отношении частоты ошибок: оптимизированный метод обеспечил точность синтеза в 20 раз выше классического подхода (1/10000 против 1/500 нуклеотидов) и в 5 раз выше гибридной сборки (1/10000 против 1/2000 нуклеотидов), что особенно важно для конструкций, предназначенных для коэкспрессии нескольких цитокинов, где даже единичные ошибки могут нарушать стехиометрию и функциональность конечного продукта.

Автоматизация процесса позволила сократить время сборки до (16 ± 2) ч, что в 4,5 раза быстрее классического метода ((72 ± 4) ч) и в 3 раза быстрее гибридного подхода ((48 ± 3) ч). Полная автоматизация (100 % против 20 и 60 % соответственно) не только повысила воспроизводимость, но и значительно снизила операционные затраты, делая метод экономически целесообразным для масштабирования и промышленного применения.

Разработанная методика обеспечивает получение генетических конструкций, пригодных для высокоуровневой коэкспрессии IL-10 и IL-22

в пробиотических штаммах *Lactobacillus spp.*, где кодон-оптимизация до GC-состава 53,4 % для IL-10 и 54,1 % для IL-22, устранение криптических сайтов рестрикции и гомополимерных участков обеспечило 3,2-кратное увеличение экспрессии по сравнению с нативными последовательностями.

Комплексный подход, сочетающий биоинформатический дизайн, автоматизированный синтез и интегрированную очистку, создает надежную платформу для разработки пробиотиков следующего поколения с программируемыми иммуномодулирующими свойствами, при этом достигнутые показатели точности (99,99 %) и выхода продукта ((95 ± 2) %) соответствуют требованиям надлежащей производственной практики (GMP – Good Manufacturing Practice) и открывают возможности для промышленного производства рекомбинантных пробиотических штаммов.

Таким образом, проведенное исследование устанавливает новый технологический стандарт в синтезе генетических конструкций для пробиотических применений, демонстрируя, что интеграция современных методов кодон-оптимизации и высокоточного автоматизированного синтеза позволяет преодолеть традиционные ограничения и создавать высокоэффективные системы для коэкспрессии терапевтических белков.

Список источников

1. Achard D., Francoz D., Grimes C., et al. Cerebrospinal Fluid Analysis in Recumbent Adult Dairy Cows With or Without Spinal Cord Lesions J // Vet Intern Med. 2017. Vol. 31, N 3. P. 940–945. DOI: 10.1111/jvim.14672.
2. Bahrami-Yekdangi M., Ghorbani G.R., Sadeghi-Sefidmazgi A., et al. Identification of cow-level risk factors and associations of selected blood macro-minerals at parturition with dystocia and stillbirth in Holstein dairy cows // Sci Rep. 2022. Vol. 12, N 1. P. 5929. DOI: 10.1038/s41598-022-09821-6. EDN: NOWXEL.
3. Bianco A.W., Moore G.E., Taylor S.D. Neonatal Encephalopathy in Calves Presented to a University Hospital // J Vet Intern Med. 2017. Vol. 31, N 6. P. 1892–1899. DOI: 10.1111/jvim.14842.
4. Bienboire-Frosini C., Muns R., Marcet-Rius M., et al. Vitality in Newborn Farm Animals: Adverse Factors, Physiological Responses, Pharmacological Therapies, and Physical Methods to Increase Neonate Vigor // Animals (Basel). 2023. Vol. 13, N 9. P. 1542. DOI: 10.3390/ani13091542. EDN: CQKAAK.
5. Block L.N., Bowman B.D., Schmidt J.K., et al. The promise of placental extracellular vesicles: models and challenges for diagnosing placental dysfunction in utero // Biol Reprod. 2021. Vol. 104, N 1. P. 27–57. DOI: 10.1093/biolre/iaaa186. EDN: ZXICMX.
6. Boyle L.A., Mee J.F. Factors Affecting the Welfare of Unweaned Dairy Calves Destined for Early Slaughter and Abattoir Animal-Based Indicators Reflecting Their Welfare On-Farm // Front Vet Sci. 2021. N 8. P. 645537. DOI: 10.3389/fvets.2021.645537. EDN: AFNZOK.
7. Buczinski S., Fecteau G., Lefebvre R.C., et al. Assessment of fetal well-being in cattle by ultrasonography in normal, high-risk, and cloned pregnancies // Can Vet J. 2011. Vol. 52, N 2. P. 136–141.

8. Cavallini D., Raspa F., Marliani G., et al. Growth Performance and Feed Intake Assessment of Italian Holstein Calves Fed a Hay-Based Total Mixed Ration: Preliminary Steps towards a Prediction Model // *Vet Sci*. 2023. Vol. 10, N 9. P. 554. DOI: 10.3390/vetsci10090554. EDN: NPZFRD.
9. Crociati M., Sylla L., De Vincenzi A., et al. How to Predict Parturition in Cattle? A Literature Review of Automatic Devices and Technologies for Remote Monitoring and Calving Prediction // *Animals (Basel)*. 2022. Vol. 12, N 3. P. 405. DOI: 10.3390/ani12030405. EDN: IMIWRE.
10. Crouse M.S., McLean K.J., Dwamena J., et al. The effects of maternal nutrition during the first 50 d of gestation on the location and abundance of hexose and cationic amino acid transporters in beef heifer uteroplacental tissues // *J Anim Sci*. 2021. Vol. 99, N 1. Art. skaa386. DOI: 10.1093/jas/skaa386. EDN: HDPTUD.
11. Crute C.E., Hall S.M., Landon C.D., et al. Evaluating maternal exposure to an environmental per and polyfluoroalkyl substances (PFAS) mixture during pregnancy: Adverse maternal and fetoplacental effects in a New Zealand White (NZW) rabbit model // *Sci Total Environ*. 2022. Vol. 838, N Pt 4. Art. 156499. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.156499. EDN: WXAOSZ.
12. Davis A.J., Myburgh J.G. Investigation of stillbirths, perinatal mortality and weakness in beef calves with low-selenium whole blood concentrations // *J S Afr Vet Assoc*. 2016. Vol. 87, N 1. P. e1-6. DOI: 10.4102/jsava.v87i1.1346.
13. Hord T.K., Tanner A.R., Kennedy V.C., et al. Impact of Chorionic Somatomammotropin In Vivo RNA Interference Phenotype on Uteroplacental Expression of the IGF // *Axis. Life (Basel)*. 2023. Vol. 13, N 6. P. 1261. DOI: 10.3390/life13061261. EDN: ROXXQA.
14. Mota-Rojas D., Bragaglio A., Braghieri A., et al. Dairy Buffalo Behavior: Calving, Imprinting and Allosuckling // *Animals (Basel)*. 2022. Vol. 12, N 21. P. 2899. DOI: 10.3390/ani12212899. EDN: DCGUAC.
15. Thornburg K.L., Louey S. Uteroplacental circulation and fetal vascular function and development // *Curr Vasc Pharmacol*. 2013. Vol. 11, N 5. P. 748–757.

References

1. Achard D, Francoz D, Grimes C, et al. Cerebrospinal Fluid Analysis in Recumbent Adult Dairy Cows With or Without Spinal Cord Lesions. *J Vet Intern Med*. 2017;31(3):940-945. DOI: 10.1111/jvim.14672.
2. Bahrami-Yekdangi M, Ghorbani GR, Sadeghi-Sefidmazgi A, et al. Identification of cow-level risk factors and associations of selected blood macro-minerals at parturition with dystocia and stillbirth in Holstein dairy cows. *Sci Rep*. 2022;12(1):5929. DOI: 10.1038/s41598-022-09821-6. EDN: NOWXEL.
3. Bianco AW, Moore GE, Taylor SD. Neonatal Encephalopathy in Calves Presented to a University Hospital. *J Vet Intern Med*. 2017;31(6):1892-1899. DOI: 10.1111/jvim.14842.
4. Bienboire-Frosini C, Muns R, Marcet-Rius M, et al. Vitality in Newborn Farm Animals: Adverse Factors, Physiological Responses, Pharmacological Therapies, and Physical Methods to Increase Neonate Vigor. *Animals (Basel)*. 2023;13(9):1542. DOI: 10.3390/ani13091542. EDN: CQKAAK.
5. Block LN, Bowman BD, Schmidt JK, et al. The promise of placental extracellular vesicles: models and challenges for diagnosing placental dysfunction in utero. *Biol Reprod*. 2021;104(1):27-57. DOI: 10.1093/biolre/ioaa186. EDN: ZXICMX.
6. Boyle LA, Mee JF. Factors Affecting the Welfare of Unweaned Dairy Calves Destined for Early Slaughter and Abattoir Animal-Based Indicators Reflecting Their Welfare On-Farm. *Front Vet Sci*. 2021;8:645537. DOI: 10.3389/fvets.2021.645537. EDN: AFNZOK.
7. Buczinski S, Fecteau G, Lefebvre RC, et al. Assessment of fetal well-being in cattle by ultrasonography in normal, high-risk, and cloned pregnancies. *Can Vet J*. 2011;52(2):136-141.
8. Cavallini D, Raspa F, Marliani G, et al. Growth Performance and Feed Intake Assessment of Italian Holstein Calves Fed a Hay-Based Total Mixed Ration: Preliminary Steps towards a Prediction Model. *Vet Sci*. 2023;10(9):554. DOI: 10.3390/vetsci10090554. EDN: NPZFRD.
9. Crociati M, Sylla L, De Vincenzi A, et al. How to Predict Parturition in Cattle? A Literature Review of Automatic Devices and Technologies for Remote Monitoring and Calving Prediction. *Animals (Basel)*. 2022;12(3):405. DOI: 10.3390/ani12030405. EDN: IMIWRE.

10. Crouse MS, McLean KJ, Dwamena J, et al. The effects of maternal nutrition during the first 50 d of gestation on the location and abundance of hexose and cationic amino acid transporters in beef heifer uteroplacental tissues. *J Anim Sci.* 2021;99(1):skaa386. DOI: 10.1093/jas/skaa386. EDN: HDPTUD.
11. Crute CE, Hall SM, Landon CD, et al. Evaluating maternal exposure to an environmental per and polyfluoroalkyl substances (PFAS) mixture during pregnancy: Adverse maternal and fetoplacental effects in a New Zealand White (NZW) rabbit model. *Sci Total Environ.* 2022;838(Pt 4):156499. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.156499. EDN: WXAOSZ.
12. Davis AJ, Myburgh JG. Investigation of stillbirths, perinatal mortality and weakness in beef calves with low-selenium whole blood concentrations. *J S Afr Vet Assoc.* 2016;87(1):e1-6. DOI: 10.4102/jstva.v87i1.1346.
13. Hord TK, Tanner AR, Kennedy VC, et al. Impact of Chorionic Somatomammotropin In Vivo RNA Interference Phenotype on Uteroplacental Expression of the IGF Axis. *Life (Basel).* 2023;13(6):1261. DOI: 10.3390/life13061261. EDN: ROXXQA.
14. Mota-Rojas D, Bragaglio A, Braghieri A, et al. Dairy Buffalo Behavior: Calving, Imprinting and Allosuckling. *Animals (Basel).* 2022;12(21):2899. DOI: 10.3390/ani12212899. EDN: DCGUAC.
15. Thornburg KL, Louey S. Uteroplacental circulation and fetal vascular function and development. *Curr Vasc Pharmacol.* 2013;11(5):748-757.

Статья принята к публикации 05.03.2026 / The article accepted for publication 05.03.2026

Информация об авторах:

Виктор Сергеевич Самойленко, доцент кафедры зоологии и паразитологии, кандидат ветеринарных наук, доцент

Александр Юрьевич Криворучко, профессор базовой кафедры генетики и селекции, доктор биологических наук, профессор

Сергей Викторович Пушкин, доцент кафедры зоологии и паразитологии, кандидат биологических наук, доцент

Елена Валентиновна Светлакова, доцент базовой кафедры эпизоотологии и микробиологии

Анастасия Игоревна Живодерова, ассистент базовой кафедры эпизоотологии и микробиологии

Information about the authors:

Victor Sergeevich Samoilenko, Associate Professor of the department of zoology and parasitology, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor

Alexander Yurievich Krivoruchko, Professor of the basic department of genetics and selection, Doctor of Biological Sciences, Professor

Sergey Victorovich Pushkin, Associate Professor of the department of zoology and parasitology, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor

Elena Valentinovna Svetlakova, Associate Professor, Department of Epizootology and Microbiology

Anastasia Igorevna Zhivoderova, Assistant Professor, Department of Epizootology and Microbiology

