

Высокоэффективное клонирование бицистронных конструкций для коэкспрессии цитокинов в пробиотических штаммах

В. С. Самойленко

Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

E-mail: viktor_samoylenko_26@mail.ru

Аннотация. Целью исследования являлась разработка эффективного способа конструирования генетически модифицированных пробиотических микроорганизмов с терапевтическим потенциалом для коррекции воспалительных заболеваний кишечника и аутоиммунных расстройств у молодняка крупного рогатого скота. Генетическая модификация штаммов *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. рассматривалась как инструмент получения продуцентов иммунорегуляторных цитокинов IL-10 и IL-22. Традиционные методы клонирования и плазмидные системы отличались нестабильностью конструкций, сниженной экспрессией и ограниченными возможностями координированной работы нескольких генов. **Методы.** Исследования выполнялись в 2024–2025 гг. на базе Геномного центра Северо-Кавказского федерального университета и лаборатории Ставропольского аграрного университета. Целью экспериментального этапа стало создание бицистронных плазмид для одновременной экспрессии IL-10 и IL-22 в штаммах *Lactobacillus* spp. Использовался модифицированный вектор pLacDual. Биоинформационный дизайн последовательностей обеспечивал высокую специфичность гибридизации. Амплификацию проводили высокоточной полимеразой Q5 с добавлением ДМСО. Сборку генетических кассет осуществляли методом HiFi DNA Assembly. Контроль правильности конструкций выполняли с помощью капиллярного электрофореза и диагностической ПЦР; результаты сравнивали с лигированием и Golden Gate Assembly. **Результаты.** Сформированные плазмиды с бицистронной архитектурой подтвердили корректность сборки: фрагмент длиной 6421 п. н. соответствовал расчетным параметрам, а ампликон 723 п. н. свидетельствовал о правильной интеграции генов. Метод HiFi продемонстрировал более высокую точность, воспроизводимость и эффективность по сравнению с альтернативными технологиями. **Научная новизна.** Впервые обоснована и экспериментально подтверждена возможность стабильной коэкспрессии двух терапевтически значимых цитокинов в пробиотических штаммах на основе бицистронной конструкции с использованием HiFi DNA Assembly, что расширяет методологические подходы к созданию мультигенных пробиотических систем. **Выводы.** Достижение поставленной цели подтвердило перспективность предложенной стратегии для разработки биоинженерных пробиотиков, востребованных в медицине, синтетической биологии и пищевой биотехнологии.

Ключевые слова: бицистронные конструкции, рекомбинантные плазмиды, высокоэффективное клонирование, пробиотические штаммы, генные терапевтические подходы, клеточные культуры

Для цитирования: Самойленко В. С. Высокоэффективное клонирование бицистронных конструкций для коэкспрессии цитокинов в пробиотических штаммах // Аграрный вестник Урала. 2026. Т. 26, № 06. С. 1105–1111. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2026-26-06-1105-1111>.

Дата поступления статьи: 25.02.2026, **дата рецензирования:** 25.03.2026, **дата принятия:** 30.04.2026.

Highly efficient cloning of bicistronic constructs for cytokine co-expression in probiotic strains

V. S. Samoylenko

North Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

E-mail: viktor_samoylenko_26@mail.ru

Abstract. The purpose of the study was to develop an effective method for engineering genetically modified probiotic microorganisms with therapeutic potential for the treatment of inflammatory bowel diseases and autoimmune disorders in young cattle. Genetic modification of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. strains was considered a tool for producing immunoregulatory cytokines IL-10 and IL-22. Traditional cloning methods and plasmid systems were characterized by structural instability, reduced expression, and limited capacity for coordinated expression of multiple genes. **Methods.** The study was conducted in 2024–2025 at the Genome Center of the North-Caucasus Federal University and the laboratory of the Stavropol Agrarian University. The experimental phase aimed to construct bicistronic plasmids for the simultaneous expression of IL-10 and IL-22 in *Lactobacillus* spp. A modified pLacDual vector was used. Bioinformatic sequence design ensured high hybridization specificity. Amplification was performed using the high-fidelity Q5 DNA polymerase with DMSO. Assembly of genetic cassettes was carried out using the HiFi DNA Assembly method. Correctness of the constructs was verified by capillary electrophoresis and diagnostic PCR; results were compared with ligation and Golden Gate Assembly. **Results.** The constructed bicistronic plasmids confirmed correct assembly: the 6421 bp fragment matched the expected length, and the 723 bp amplicon indicated proper gene integration. The HiFi method demonstrated higher accuracy, reproducibility, and efficiency compared to alternative techniques. **Scientific novelty.** For the first time, the possibility of stable co-expression of two therapeutically relevant cytokines in probiotic strains using a bicistronic construct with HiFi DNA Assembly was substantiated and experimentally confirmed, expanding methodological approaches for creating multigene probiotic systems. **Conclusion.** Achieving the stated aim confirmed the potential of the proposed strategy for developing bioengineered probiotics, relevant to medicine, synthetic biology, and food biotechnology.

Keywords: bicistronic constructs, recombinant plasmids, high-efficiency cloning, probiotic strains, gene therapeutic approaches, cell cultures

For citation: Samoylenko V. S. Highly efficient cloning of bicistronic constructs for cytokine co-expression in probiotic strains. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2026; 26 (06): 1105–1111. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2026-26-06-1105-1111>. (In Russ.)

Date of paper submission: 25.02.2026, **date of review:** 25.03.2026, **date of acceptance:** 30.04.2026.

Постановка проблемы (Introduction)

Биоинженерия пробиотических микроорганизмов в последние десятилетия сформировалась как самостоятельное направление молекулярной биотехнологии, объединяющее достижения микробной генетики, иммунологии и медицинской микробиологии [1; 2]. Особый интерес в данном контексте представляет использование представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* в качестве биологических платформ для доставки терапевтических молекул непосредственно в желудочно-кишечный тракт. Эти микроорганизмы обладают высоким уровнем биологической безопасности, выраженной адгезионной способностью к эпителию кишечника и устойчивостью к физиологическим условиям пищеварительного тракта, что делает их перспективными кандидатами для создания живых рекомбинантных препаратов. Генетическая модификация таких бактерий позволяет превратить их в свое-

образные «микробные биореакторы», способные синтезировать и высвобождать биологически активные белки непосредственно в зоне воспалительного процесса [3–5].

Особое значение в разработке подобных систем придается экспрессии иммунорегуляторных цитокинов, играющих ключевую роль в поддержании иммунного гомеостаза слизистой оболочки кишечника. Среди них интерлейкины IL-10 и IL-22 занимают центральное место благодаря их способности модулировать воспалительные реакции, усиливать барьерные функции эпителия и регулировать взаимодействие между врожденным и адаптивным звеньями иммунитета [4; 6]. IL-10 является одним из основных противовоспалительных цитокинов, ингибирующих продукцию провоспалительных медиаторов макрофагами и дендритными клетками, тогда как IL-22 преимущественно воздействует на эпителиальные клетки, стимулируя регенера-

цию слизистой оболочки, синтез антимикробных пептидов и восстановление целостности эпителиального барьера. Сочетанная экспрессия этих молекул в составе одной пробиотической системы потенциально позволяет обеспечить комплексное иммуномодулирующее действие, направленное как на подавление воспаления, так и на ускорение репаративных процессов.

Несмотря на значительный прогресс в области конструирования рекомбинантных пробиотиков, применение традиционных плазмидных систем экспрессии сопряжено с рядом фундаментальных ограничений [2; 7; 8]. Одной из ключевых проблем является генетическая нестабильность плазмидных векторов при культивировании бактерий в условиях отсутствия селективного давления. В таких ситуациях происходит постепенная утрата плазмид популяцией клеток, что приводит к снижению доли рекомбинантных бактерий и, соответственно, к уменьшению продукции целевого белка. Кроме того, длительное поддержание высококопийных плазмид сопровождается значительными метаболическими затратами, что может негативно отражаться на жизнеспособности и физиологическом состоянии бактериальных клеток [2; 9]. Дополнительную сложность представляет также регуляция экспрессии нескольких генов, поскольку использование отдельных промоторов и регуляторных элементов для каждого гена может приводить к дисбалансу в уровне синтеза белков и снижению общей эффективности системы.

Особую проблему при разработке терапевтических пробиотиков представляет невозможность применения классических селекционных маркеров на основе устойчивости к антибиотикам. В клинических условиях использование таких систем недопустимо по соображениям биобезопасности, поскольку существует риск горизонтального переноса генов антибиотикорезистентности к представителям нормальной микрофлоры или условно-патогенным микроорганизмам. В результате стабильность рекомбинантных конструкций должна обеспечиваться исключительно за счет особенностей их молекулярной архитектуры, что требует разработки новых подходов к проектированию генетических векторов [2; 10].

Альтернативная стратегия, основанная на интеграции экспрессионных кассет непосредственно в хромосому бактерии-хозяина, действительно обеспечивает высокую стабильность наследования генетической информации, поскольку исключает потерю конструкций в процессе клеточного деления [11]. Однако подобный подход также имеет ряд существенных ограничений. Хромосомная локализация гена обычно предполагает наличие лишь одной копии экспрессионной кассеты, что значительно снижает уровень транскрипции и, соответственно,

продукцию рекомбинантного белка. Дополнительное влияние оказывают так называемые позиционные эффекты, обусловленные особенностями локального хроматиноподобного окружения и соседних регуляторных последовательностей, которые могут существенно модифицировать активность даже сильных промоторов. В результате уровень синтеза терапевтических молекул нередко оказывается недостаточным для достижения выраженного биологического эффекта [7; 11].

Перспективным решением этих проблем является создание бицистронных генетических конструкций, обеспечивающих экспрессию двух генов из единой транскрипционной единицы [6; 9; 12]. Такой подход позволяет достичь сбалансированного синтеза целевых белков и значительно снизить метаболическую нагрузку на клетку-хозяина [9; 13]. Однако традиционные методы молекулярного клонирования, используемые для создания таких конструкций, остаются чрезвычайно трудоемкими, недостаточно точными и часто не обеспечивают необходимой эффективности [14; 15].

В связи с этим разработка высокоточных и технологически эффективных методов конструирования многокомпонентных генетических систем приобретает особую актуальность. Современные технологии сборки ДНК, основанные на принципах модульного дизайна и направленной рекомбинации, позволяют значительно ускорить процесс создания рекомбинантных конструкций и повысить точность их формирования. Применение таких подходов открывает широкие перспективы для разработки новых поколений пробиотических штаммов-продуцентов биологически активных молекул, способных выполнять функцию целевой доставки терапевтических факторов непосредственно в очаг воспаления [14; 16; 17; 18].

Методология и методы исследования (Methods)

Исследования проводили в 2024–2026 годах на базе Геномного центра Северо-Кавказского федерального университета и бактериологической лаборатории базовой кафедры эпизоотологии и микробиологии Ставропольского государственного аграрного университета.

В качестве клеток-хозяев для последующей трансформации использовали штаммы *Lactobacillus* spp. Для конструирования экспрессионной системы применяли плазмидный вектор pLacDual, модифицированный для бицистронной экспрессии генов иммуномодулирующих цитокинов. В качестве целевых генетических последовательностей использовали синтетические гены интерлейкинов IL-10 (537 п. н.) и IL-22 (522 п. н.), оптимизированные по кодонному составу для экспрессии в лактобациллах.

Проектирование генетической конструкции выполняли с использованием биоинформационного анализа перекрывающихся последовательностей.

Для сборки конструкции формировали фрагменты с комплементарными участками длиной 25 нуклеотидов. Температура плавления перекрывающихся последовательностей составляла 62 ± 2 °C при содержании GC-пар 45–55 %. При проектировании исключали участки, способные формировать стабильные вторичные структуры, а также последовательности, гомологичные геномным участкам бактерии-хозяина.

Аmplификацию целевых фрагментов проводили методом полимеразной цепной реакции с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Q5, обладающей 3'→5' экзонуклеазной активностью. Реакционная смесь дополнительно содержала 3 % диметилсульфоксида для повышения специфичности амплификации GC-обогащенных фрагментов. Термоциклический режим включал начальную денатурацию при 98 °C в течение 30 с, затем 28 циклов: денатурация при 98 °C – 10 с, элонгация при 72 °C со скоростью 15 с на килобазу. Заключительное удлинение проводили при 72 °C в течение 5 минут.

Очистку продуктов ПЦР выполняли ферментативным методом с использованием экзонуклеазы I и щелочной фосфатазы для удаления остаточных праймеров и нуклеотидов. Дополнительную очистку осуществляли методом сорбции на магнитных частицах. Концентрацию двуцепочечной ДНК определяли на флуориметре Qubit 4.0 с использованием набора реагентов HS DNA kit. Очищенные образцы хранили в буфере TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM ЭДТА, pH 8,0).

Сборку бицистронной генетической кассеты проводили методом HiFi DNA Assembly. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 10 мкл 2 × HiFi Master Mix, линейный плазмидный вектор и амплифицированные фрагменты в молярном соотношении 1 : 2. Объем доводили стерильной деионизированной водой. Инкубацию проводили при 50 °C в течение 45 минут. В процессе реакции формировались одноцепочечные 3'-выступы длиной 12 ± 2 нуклеотида, обеспечивающие гибридизацию перекрывающихся последовательностей и последующее лигирование фрагментов.

Контроль корректности сборки осуществляли методом капиллярного электрофореза на системе Fragment Analyzer. Детектировали плазмидную молекулу длиной 6421 п. н., соответствующую расчетному размеру конструкции. Дополнительно проводили диагностическую ПЦР с использованием специфических праймеров: F (5'-CGCGTACGCGTTAG-3') и R (5'-ATCGATGCGATCTA-3').

Для сравнительной оценки эффективности метода HiFi DNA Assembly дополнительно применяли два альтернативных подхода клонирования. При классическом рестрикционно-лигазирующем кло-

нировании использовали ферменты EcoRI и HindIII. Проводили двойную рестрикцию плазмидного вектора и вставки, после чего продукты очищали и соединяли с использованием T4 ДНК-лигазы при молярном соотношении вектора и инсерта 1 : 3.

Вторым альтернативным методом являлась технология Golden Gate Assembly. Реакцию проводили с использованием рестриктазы типа IIS BsaI и T4 ДНК-лигазы в одностадийной системе, позволяющей одновременно осуществлять рестрикцию и лигирование фрагментов ДНК. Такой подход обеспечивал направленную сборку мультифрагментных конструкций в пределах одной реакционной смеси.

Результаты (Results)

В ходе проведенных экспериментов выполнена сравнительная оценка эффективности различных методов сборки рекомбинантных плазмидных конструкций с бицистронной организацией, предназначенных для коэкспрессии генов IL-10 и IL-22 в пробиотических штаммах рода *Lactobacillus*.

Контроль качества полученных рекомбинантных молекул проводили методом капиллярного электрофореза с использованием системы Fragment Analyzer. В электрофоретических профилях регистрировался основной пик, соответствующий фрагменту длиной 6421 п. н., что совпадало с расчетным размером плазмидной конструкции pLacDualIL10/IL22. Побочные фрагменты и продукты деградации ДНК практически отсутствовали, что свидетельствовало о корректной сборке плазмиды и высокой специфичности используемой технологии.

Дополнительную верификацию выполняли методом диагностической ПЦР. При использовании праймеров F (5'-CGCGTACGCGTTAG-3') и R (5'-ATCGATGCGATCTA-3') наблюдалось образование ампликона длиной 723 п. н., соответствующего участку интеграции экспрессионной кассеты. Получение фрагмента заданного размера подтверждало присутствие обоих целевых генов и их корректную локализацию в структуре вектора.

Для количественной оценки эффективности сборки проводили параллельные эксперименты с использованием трех методов клонирования: классического рестрикционно-лигазного клонирования с применением T4 ДНК-лигазы, технологии Golden Gate Assembly и метода HiFi DNA Assembly (таблица 1). Сравнительный анализ показал существенные различия между исследуемыми подходами по эффективности получения корректных клонов, продолжительности процедуры и возможностям работы с мультифрагментными конструкциями.

Сравнительный анализ трех методов клонирования, представленных в таблице 1, показал значительные различия в их эффективности, временных затратах и потенциальных возможностях при работе с мультифрагментными конструкциями.

Таблица 1

Сравнительная характеристика методов клонирования генетических кассет

Метод	Эффективность правильных клонов, %	Время выполнения, ч	Мультифрагментная сборка
Лигирование (T4)	30–50	3–4	Нет
Golden Gate Assembly	70–80	2–3	До 10 фрагментов
HiFi DNA Assembly	> 95	~1	До 20 фрагментов

Table 1

Comparative characteristics of gene cassette cloning methods

Method	The effectiveness of correct clones, %	Lead time, hours	Multi-fragment assembly
Ligation (T4)	30–50	3–4	No
Golden Gate Assembly	70–80	2–3	Up to 10 fragments
HiFi DNA Assembly	> 95	~1	Up to 20 fragments

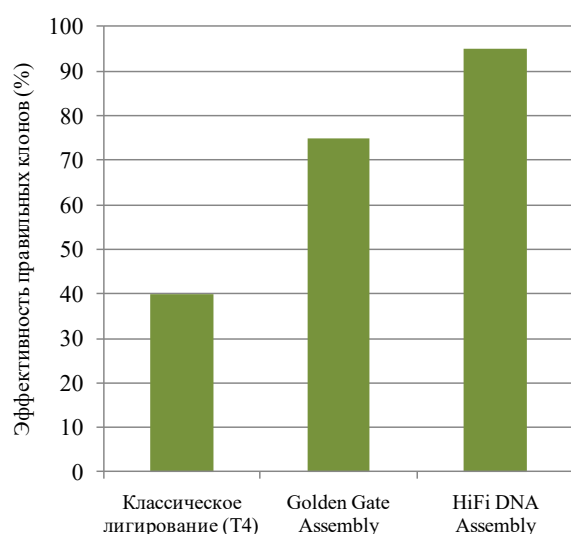


Рис. 1. Сравнение эффективности различных методов клонирования. По оси Y показана доля корректных клонов (%). По оси X указаны методы клонирования (классическое лигирование (T4), Golden Gate Assembly и HiFi DNA Assembly)

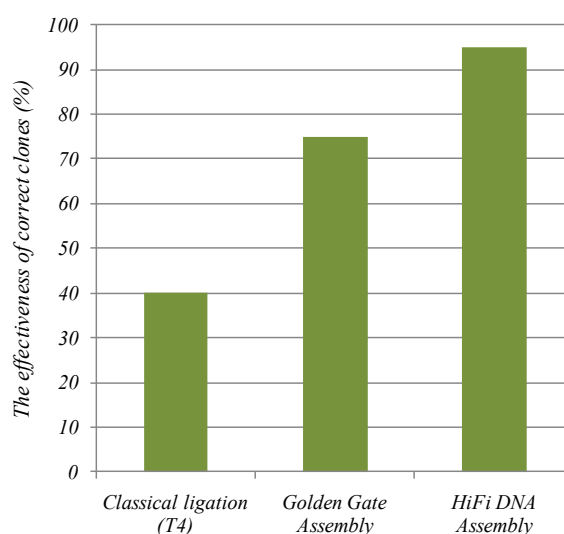


Fig. 1. Comparison of the efficiency of different cloning methods. The y-axis shows the efficiency of correct clones (%). The x-axis shows the cloning methods (classical ligation (T4), Golden Gate Assembly, and HiFi DNA Assembly)

При использовании классического рестрикционно-лигазного клонирования доля корректно собранных плазмид составляла 30–50 %. Основными факторами, снижающими эффективность метода, являлись религирование линейного вектора без вставки, формирование конструкций с неправильной ориентацией фрагментов, а также необходимость подбора уникальных сайтов рестрикции. Продолжительность процедуры составляла 3–4 часа и включала отдельные стадии рестрикции, очистки фрагментов и реакции лигирования. Технологические ограничения метода также не позволяли эффективно осуществлять одновременную сборку нескольких фрагментов ДНК.

Применение технологии Golden Gate Assembly позволило повысить эффективность клонирования до 70–80 % корректных клонов. Сокращение продолжительности процедуры до 2–3 часов было обусловлено тем, что процессы рестрикции и лигирования протекают в одной реакционной смеси. Метод обеспечивал возможность направленной сборки не-

скольких фрагментов ДНК (до 10 элементов) благодаря использованию рестриктаз типа IIS, формирующих комплементарные выступающие концы. Однако эффективность данного подхода существенно зависела от чистоты исходных ДНК-фрагментов и точности проектирования сайтов рестрикции, поскольку ошибки в их расположении приводили к образованию некорректных конструкций.

Наиболее высокие показатели были получены при использовании метода HiFi DNA Assembly. Доля правильно собранных плазмид превышала 95 %, что на 45–65 % выше по сравнению с классическим рестрикционно-лигазным клонированием и на 15–25 % выше по сравнению с Golden Gate Assembly. Продолжительность реакции сборки составляла около 60 минут. Метод обеспечивал точное соединение фрагментов на основе комплементарных перекрывающихся последовательностей и позволял осуществлять мультифрагментную сборку, включающую до 20 элементов в одной реакции.

Полученные результаты имеют особое значение при создании бицистронных экспрессионных систем, требующих высокой точности интеграции нескольких генетических элементов. В условиях настоящего исследования применение HiFi DNA Assembly обеспечило корректную сборку плазмидной конструкции pLacDualIL10/IL22, предназначенной для коэкспрессии генов IL-10 и IL-22, при минимальных временных затратах и высокой воспроизводимости результатов.

Графическое сопоставление эффективности трех методов клонирования (рис. 1) подтверждает количественное преимущество HiFi DNA Assembly при конструировании бицистронных плазмидных систем.

Полученные данные свидетельствуют о том, что данный метод является наиболее рациональным для создания рекомбинантных конструкций с мультигенной архитектурой, используемых в биоинженерии пробиотических микроорганизмов.

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Проведенные исследования продемонстрировали, что выбор метода сборки рекомбинантных плазмидных конструкций оказывает значительное влияние как на точность получаемого продукта, так и на время, затраченное на его создание. Сравнительный анализ трех подходов (классического лигирования с T4 ДНК-лигазой, технологии Golden Gate Assembly и метода HiFi DNA Assembly) выявил ключевые различия и позволил определить наиболее эффективное решение для создания бицистронных векторов.

Наилучшие результаты были получены с использованием метода HiFi DNA Assembly. Эффективность сборки составила более 95 %, что на 45–65 % выше по сравнению с классическим лигированием и на 15–25 % выше, чем при применении Golden Gate Assembly. Время выполнения полного цикла сборки не превышало 1 часа, что существенно сокращает трудозатраты по сравнению с классическим методом (1 час против 3–4 часов). Одним из значительных преимуществ HiFi DNA Assembly является возможность мультифрагментной сборки до 20 фрагментов, что значительно расширяет его применимость для создания сложных конструкций, требующих точной коэкспрессии нескольких генов.

Результаты работы подтверждают, что HiFi DNA Assembly является наиболее предпочтительным методом для конструирования рекомбинантных плазмид с бицистронной архитектурой. Его применение не только повышает точность сборки, но и значительно сокращает время процесса. Эти преимущества делают данный метод важным инструментом в синтетической биологии и геномной инженерии, особенно при создании рекомбинантных пробиотических штаммов для производства терапевтических препаратов. HiFi DNA Assembly открывает новые возможности для разработки более эффективных и быстрых методов создания биоинженерных препаратов с потенциальным терапевтическим эффектом, таких как пробиотики, содержащие иммуномодулирующие цитокины IL-10 и IL-22.

Библиографический список (References)

1. León-Buitimea A., Balderas-Cisneros F. d. J., Garza-Cárdenas C. R., Garza-Cervantes J. A., Morones-Ramírez J. R. Synthetic biology tools for engineering microbial cells to fight superbugs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022; 10: 869206. DOI: 10.3389/fbioe.2022.869206.
2. Wu J., Xin Y., Kong J., Guo T. Genetic tools for the development of recombinant lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*. 2021; 20 (1): 118. DOI: 10.1186/s12934-021-01607-1.
3. New England Biolabs. NEBuilder HiFi DNA Assembly Reaction (E2621) v2. *protocols.io*. 2020. DOI: 10.17504/protocols.io.bfhrjj56.
4. Guo S., Peng J., Xiao Y., Chen J., Gao R. Synergistic effects of oral inoculation with a recombinant *Lactobacillus plantarum* NC8 strain co-expressing interleukin-2 and interleukin-17B on the efficacy of the infectious bronchitis vaccine in chickens. *Poultry Science*. 2024; 103 (9): 103908. DOI: 10.1016/j.psj.2024.103908.
5. Rahman T., Das A., Abir M. H., Nafiz I. H., Mahmud A. R., Sarker M. R., Emran T. B., Hassan M. M. Cytokines and their role as immunotherapeutics and vaccine adjuvants: the emerging concepts. *Cytokine*. 2023; 169: 156268. DOI: 10.1016/j.cyto.2023.156268.
6. Krause C. D., Izotova L. S., Ren G., Yuan Z. R., Shi Y., Chen C. C., Ron Y., Pestka S. Efficient co-expression of bicistronic proteins in mesenchymal stem cells by development and optimization of a multifunctional plasmid. *Stem Cell Research & Therapy*. 2011; 2 (2): 15. DOI: 10.1186/scrt56.
7. Li X., Ye C., Liu T., Li S., Zhang M., Zhao Y., Jin Y., Cheng J., Yang G., Li P. Engineering genetic elements for microbial protein expression systems: Advances, challenges, applications, and prospects. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2026; 11: 370–384. DOI: 10.1016/j.synbio.2025.10.008.
8. Marillonnet S., Grutzner R. Synthetic DNA assembly using golden gate cloning and the hierarchical modular cloning pipeline. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2020; 130: e115. DOI: 10.1002/cpm.115.
9. Moradian H., Gossen M., Lendlein A. Co-delivery of genes can be confounded by bicistronic vector design. *MRS Communications*. 2022; 12 (2): 145–153. DOI: 10.1557/s43579-021-00128-7.

10. Guo Q., Jin Y., Chen X., Ye X., Shen X., Lin M., Zeng C., Zhou T., Zhang J. NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2024; 9 (1): 53. DOI: 10.1038/s41392-024-01757-9.
11. Vit C., Richard E., Fournes F., Whiteway C., Eyer X., Lapailierie D., Parissi V., Mazel D., Loot C. Cassette recruitment in the chromosomal integron of *Vibrio cholerae*. *Nucleic Acids Research*. 2021; 49: 5654–5670. DOI: 10.1093/nar/gkab412.
12. Tan F., Zhang L., Yin L., Wang L., Zhang H., Zheng L., Cui X., Lv X., Bai R., Zheng M. Immune synergistic mechanism of recombinant plasmid adjuvant containing chicken IL-4 and IL-2 fusion genes on chicken coccidia live vaccine. *Poultry Science*. 2024; 103 (1): 103204. DOI: 10.1016/j.psj.2023.103204.
13. Bird J. E., Marles-Wright J., Giachino A. A user's guide to golden gate cloning methods and standards. *ACS Synthetic Biology*. 2022; 11: 3551–3563. DOI: 10.1021/acssynbio.2c00355.
14. Marillonnet S., Grütznert R. Synthetic DNA assembly using Golden Gate cloning and the hierarchical modular cloning pipeline. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2020; 130: e115. DOI: 10.1002/cpmb.115.
15. Zhao Y., Zhang G. Key aspects of coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Pathogens*. 2023; 12 (5): 698. DOI: 10.3390/pathogens12050698.
16. Strzelecki P., Joly N., Hébraud P., et al. Enhanced Golden Gate Assembly: evaluating overhang strength for improved ligation efficiency. *Nucleic Acids Research*. 2024; 52(19): e95. DOI: 10.1093/nar/gkae809.
17. Toleco M. R., van der Giezen M. A simple and universal quasi-modular cloning system using NEBuilder® HiFi DNA assembly kit. *Biotechniques*. 2025; 77(5–6): 257–262. DOI: 10.1080/07366205.2025.2542012.
18. New England Biolabs. NEBuilder HiFi DNA Assembly Reaction (E2621) V.2. *protocols.io*. 2022. DOI: 10.17504/protocols.io.bfhrjj56.

Об авторе:

Виктор Сергеевич Самойленко, кандидат ветеринарных наук, заведующий кафедрой зоологии и паразитологии, Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия; ORCID 0009-0005-3291-1241, AuthorID 1082458. E-mail: viktor_samoylenko_26@mail.ru

Author's information:

Viktor S. Samoylenko, candidate of veterinary sciences, head of the department of zoology and parasitology, North Caucasus Federal University, Stavropol, Russia; ORCID 0009-0005-3291-1241, AuthorID 1082458. E-mail: viktor_samoylenko_26@mail.ru