

## Суперсинтез альфа-2b интерферона человека в клетках *Escherichia coli* в растворимой форме с использованием системы экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7

И. Ю. Славченко, Е. В. Борейко, Н. В. Воробей, С. И. Черных, В. А. Кордюм

ПНИК «Биотехнолог»  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина  
biotech@naverex.kiev.ua

Разработана эффективная технология получения растворимого альфа-2b интерферона человека (ИФН) с использованием системы экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7. Синтезированный для этой цели искусственный ген ИФН клонировали в экспрессионный вектор рЕТ-24a, содержащий Т7 промотор и терминатор. Рекombинантную плазмиду, обозначенную как рЕТ-аИФН, трансформировали в клетки *Escherichia coli* BL (DE3) и синтез ИФН индуцировали изопропил-β-D-тиогалактозидом. Изучали влияние температуры (37 и 21 °С) культивирования клеток *E. coli* BL (рЕТ-аИФН) на уровень синтеза и выход растворимого ИФН. Установлено, что уровень синтеза рекombинантного белка в первые часы после индукции при температуре 37 °С выше, чем при 21 °С. Так, через 4 ч после индукции выход ИФН при культивировании продуцента при 37 °С составляет до 20 %, а при 21 °С — только 7 % от суммарных белков клетки. Однако, если ИФН экспрессируется при температуре 37 °С, то он накапливается в клетках в виде нерастворимых телец включений. Показано, что снижение температуры культивирования продуцента после индукции способствует накоплению целевого белка в растворимой форме. Увеличение продолжительности культивирования продуцента при температуре 21 °С до 18 ч позволяет получать растворимый ИФН в большем количестве. Разработанная нами технология получения ИФН предусматривает инфицирование фагом лямбда клеток *E. coli* BL21 (DE3), содержащих плазмиду с целевым геном под контролем промотора фага Т7. В результате лизиса клеток штамма-продуцента синтезированный целевой белок высвобождается в ростовую среду, где и накапливается в растворимой форме. При оптимальных условиях культивирования 1 л фаголизата содержит около 200 мг растворимого ИФН. Полученный выход ИФН более чем в 2,5 раза выше по сравнению с ранее достигнутым нами выходом растворимого ИФН при использовании в качестве продуцента клеток *E. coli* SG30 (рIF-16), несущих плазмиду с двумя копиями искусственного гена ИФН под контролем тандема триптофановых промоторов.

**Введение.** В настоящее время для практической медицины становятся доступными препараты различных белков и пептидов, полученных с использованием генно-инженерной биотехнологии, например, инсулина, гормона роста, интерферонов, интерлейкинов, фактора некроза опухолей человека и т. д. Однако цены на такие препараты остаются высокими, и специалистами в этой области ведутся

разработки более высокопродуктивных систем синтеза рекombинантных белков. Для получения таких продуктов используют клетки животных, дрожжей и различных бактерий. Однако большинство рекombинантных белков для их последующего применения в медицинской практике в настоящее время получают в клетках *Escherichia coli*.

Для достижения эффективной экспрессии целевого гена в бактериальной клетке используют комплексные подходы, обеспечивающие амплификацию целевого гена, эффективную транскрипцию

© И. Ю. СЛАВЧЕНКО, Е. В. БОРЕЙКО, Н. В. ВОРОБЕЙ,  
С. И. ЧЕРНЫХ, В. А. КОРДЮМ, 2003

гена и трансляцию соответствующей мРНК, стабилизацию мРНК и белкового продукта. При разработке высокопродуктивных технологий получения рекомбинантных белков исследователям также приходится решать проблемы, связанные с извлечением целевого продукта из бактериальных клеток, накоплением его в виде неактивных нерастворимых агрегатов (телец включений), наличием дополнительного N-концевого метионина и другими факторами, влияющими как на уровень выхода рекомбинантных белков, так и на их идентичность природным аналогам (см. обзоры [1—4]).

В результате ранее проведенных исследований [5—8] нами разработана трехкомпонентная система биосинтеза (клетки *E. coli*—плазмида—фаг лямбда) такого ценного для медицины продукта, как рекомбинантный альфа-2b интерферон человека. В данной системе информация о синтезе целевого белка кодируется тандемом искусственных генов ИФН [9], которые конститутивно экспрессируются в составе плазмиды *pIF-16* под контролем тандема триптофановых промоторов. Инфицирование плазмидосодержащих клеток *E. coli* SG30 (*pIF-16*) бактериофагом  $\lambda$ cI857Q<sup>-</sup>R<sup>-</sup> при оптимальных условиях культивирования штамма-продуцента приводит к их лизису и позволяет получать рекомбинантный ИФН в растворимом виде непосредственно в культуральной среде в количестве около 70 мг в 1 л.

В работе [8] мы предприняли попытку улучшить данный результат, увеличив в клетке дозу целевого гена заражением клеток SG30 (*pIF-16*) фагом  $\lambda$ pIF-8. В такой системе экспрессируются четыре гена ИФН — два в составе плазмиды и два в составе фага. Однако увеличение в клетке штамма-продуцента дозы целевого гена за счет двух дополнительных копий в составе фага не привело к статистически достоверному повышению выхода целевого продукта.

Цель данной работы состояла в разработке более высокопродуктивной трехкомпонентной технологии биосинтеза ИФН (клетки *E. coli*—плазмида—фаг лямбда) за счет использования в ней эффективной системы экспрессии на основе РНК-полимеразы фага T7.

**Материалы и методы.** В работе использованы следующие штаммы *E. coli* и бактериофага лямбда. BL21 (*pET-aИФН*) (*F*<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>*, (*r<sub>B</sub>*<sup>-</sup>*m<sub>B</sub>*<sup>-</sup> *gal dcm*) (DE3), несет плазмиду с искусственным геном, кодирующим альфа-2b интерферон человека, транскрипция которого контролируется промотором гена *10* фага T7. Плазмида сконструирована на основе вектора *pET-24a(+)* («Novagen», США) и трансформирована в штамм *E. coli* BL21 (DE3).

Данная плазмида привносит в клетки маркер устойчивости к канамицину. SG30 (*pIF-16*) (*recA*, *F*<sup>-</sup>, *araD139*,  $\Delta$ (*argF-lac*)*U169*, *flbB5301*, *deoC1*, *rpsL150*, *relA1*,  $\Delta$ *lon-100*, *cps-50::Mu d1*,  $\lambda$ <sup>S</sup>), содержит плазмиду *pIF-16* с двумя искусственными генами альфа-2b интерферона человека под контролем тандема триптофановых промоторов и геном *bla*, обеспечивающим устойчивость несущих ее клеток к ампициллину [5, 8].

Для инфицирования продуцента использовали фаг  $\lambda$ cI857Q<sup>-</sup>R<sup>-</sup> (*cI857Qam117Ram54*), источником которого служил лизогенный штамм *E. coli* K802 (*hsdR*<sup>+</sup>, *hsdM*<sup>+</sup>, *gal*<sup>-</sup>, *met*<sup>-</sup>, *SupE*) ( $\lambda$ cI857Q<sup>-</sup>R<sup>-</sup>). В качестве индикаторной культуры при титровании фага использовали штамм *E. coli* RLM1 (*thr*<sup>-</sup>, *leu*<sup>-</sup>, *lac*<sup>-</sup>, *tonA*, *SupE*). Все штаммы получены из коллекции культур ПНИК «Биотехнолог».

**Среды.** Бактериальные культуры выращивали в жидких питательных средах: Rogcine («Difco», США), приготовленной согласно рекомендации производителя, и в разработанной нами среде PB10 (вода — 1 л, пептон (Винницкий мясокомбинат) — 10 г, NaCl — 10 г, дрожжевой экстракт (USB) — 5 г). На основе среды PB10 готовили 1,5 и 0,5 %-е агаризованные среды. При выращивании плазмидосодержащих клеток BL21 (*pET-aИФН*) и SG30 (*pIF-16*) в среду добавляли соответственно канамицин или ампициллин до конечной концентрации 50 мкг/мл. Для индукции синтеза целевого продукта в клетках BL21 (*pET-aИФН*) в среду вносили раствор изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозида (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ. При использовании в биотехнологическом процессе бактериофага лямбда в жидкую среду добавляли 1 М раствор MgSO<sub>4</sub> из расчета 1 мл на 1 л среды, а также дополнительно вносили источник углерода. В случае выращивания BL21 (*pET-aИФН*) добавляли глицерин (до конечной концентрации 2 %), а SG30 (*pIF-16*) — мальтозу (до конечной концентрации 5 г/л).

**Получение фаголизата  $\lambda$ cI857Q<sup>-</sup>R<sup>-</sup>,** культивирование продуцента, электрофоретический анализ растворимой и нерастворимой фракций клеточных белков, суммарных белков плазмидосодержащих клеток и их фаголизатов осуществляли, как описано ранее [10].

Для электрофоретического анализа белков на полиакриламидный гель наносили образцы в количестве, эквивалентном 10 мкл клеточной суспензии или супернатанта фаголизата.

Процентное содержание ИФН в образцах устанавливали денситометрированием соответствующих дорожек геля с помощью прибора Image Master («Pharmacia Biotech», Швеция). Для опреде-

ления молекулярной массы (м. м.) белка применяли программу Image Master ID Prime, а для подсчета количества целевого белка в исследуемом образце — функцию Quantity Calibration программы Image Master ID Prime. В качестве стандарта для электрофореза использовали калибровочный набор белков с низкой м. м. («Amersham Pharmacia Biotech», Швеция). Набор содержит смесь белков с м. м. 94, 67, 43, 30, 20,1 и 14,4 кДа.

Выход биомассы определяли по оптической плотности на фотоколориметре КФК-3 (Россия) при  $\lambda = 540$  нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Концентрацию белка в супернатанте фаголизатов определяли по методу Бредфорда [11], используя в качестве стандартного белка бычий сывороточный альбумин («Sigma», США).

**Результаты и обсуждение.** Для получения рекомбинантного альфа-2b ИФН человека в клетках *E. coli* с использованием системы экспрессии на основе РНК-полимеразы фага T7 осуществлен химико-ферментативный синтез гена, кодирующего целевой белок. На стадии химического синтеза олигонуклеотидов были предусмотрены не приводящие к изменению природной аминокислотной последовательности целевого продукта нуклеотидные замены в искусственном гене ИФН, сделанные с учетом частоты встречаемости кодонов в генах белков, эффективно синтезирующихся в клетках *E. coli*.

Синтетическая последовательность ДНК, кодирующая ИФН, фланкирована сайтами узнавания рестриктазами *NdeI* (перед кодоном ATG) и *BamHI* (после терминатора трансляции TAA). В результате клонирования данной последовательности по *NdeI-BamHI*-сайтам в вектор *pET-24a(+)* («Novagen») получена плаزمид *pET- $\alpha$ ИФН*, в которой транскрипция синтетического гена ИФН находится под контролем промотора гена *10* фага T7, узнаваемого РНК-полимеразой фага T7.

В качестве продуцента использовали штамм *E. coli* BL (DE3), клетки которого содержат в своей хромосоме ген РНК-полимеразы фага T7 под контролем индуцибельного *lacUV5* промотора *E. coli* [12]. Индукция синтеза фагового фермента и, как следствие, высокоэффективная транскрипция целевого гена, находящегося в составе плазмидного вектора под контролем гена *10* фага T7, достигается добавлением в среду культивирования плазмидосодержащих клеток индуктора лактозного оперона ИПТГ.

Для исследования уровня экспрессии ИФН в данной системе клетки *E. coli* BL21 (*pET- $\alpha$ ИФН*) выращивали в среде Rogsine при температуре 37 °С

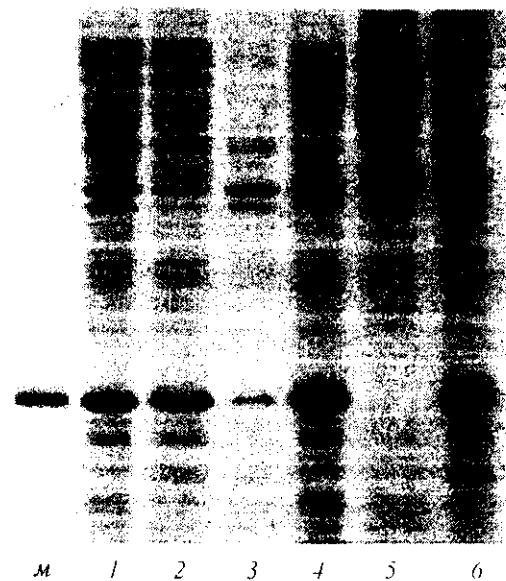


Рис. 1. Электрофореграмма образцов белковых фракций клеток *E. coli* BL (*pET- $\alpha$ ИФН*), культивированных после индукции изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозидом синтеза ИФН при температуре 21 (1—3) и 37 °С (4—6): 1, 4 — суммарные белки клетки; 2, 5 — фракция растворимых белков; 3, 6 — фракция нерастворимых белков; м — маркер интерферона

в условиях интенсивной аэрации до оптической плотности (ОП) 3,0, вносили в среду ИПТГ и продолжали культивирование штамма-продуцента при этой же температуре в течение 4 ч. В контрольный вариант индуктор не добавляли. Электрофоретический анализ показал наличие в плазмидосодержащих клетках полипептида с м. м., соответствующей ИФН, содержание которого составляло до 20 % от суммарных белков клетки.

В контрольном варианте рекомбинантный белок электрофоретически не выявлен. При этом анализ зарегистрированных значений ОП показал, что выход биомассы в опытном варианте по сравнению с контролем ниже на ~20 %. Это может свидетельствовать о том, что целевой продукт оказывает негативное воздействие на бактериальную клетку, однако не настолько сильное, как это имело место при синтезе в аналогичной системе экспрессии основного фактора роста фибробластов человека, когда выход биомассы при индукции синтеза данного продукта был более чем на 65 % ниже по сравнению с контролем (клетки штамма-продуцента без индукции) [10].

Электрофоретический анализ растворимой и нерастворимой фракций белков (рис. 1, дорожки 4—6) показал, что при данных условиях культиви-

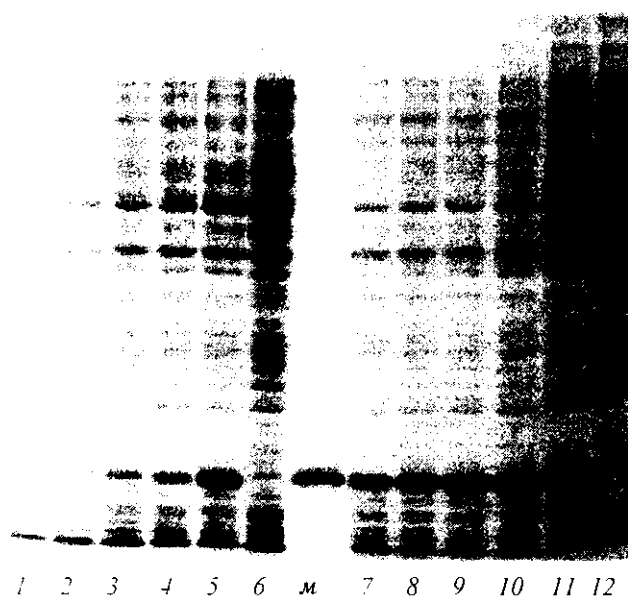


Рис. 2. Электрофореграмма суммарных белков клеток *E. coli* BL (*pET-αИФН*), культивируемых при температуре 21 (1–6) и 37 °С (7–12) после индукции в течение: 1, 7 — 1 ч; 2, 8 — 2 ч; 3, 9 — 3 ч; 4, 10 — 4 ч; 5, 11 — 18 ч; 6, 12 — контрольные образцы клеток без индукции к опытным образцам 5, 11 соответственно; м — маркер интерферона

рования целевой продукт накапливается в клетках в нерастворимом виде, в так называемых тельцах включений, что характерно для многих рекомбинантных белков. В таких тельцах включений, как правило, рекомбинантные белки находятся в неактивном состоянии и получение из них активных белков связано с определенными сложностями (см. обзор [13]). Поэтому задача получения целевого продукта в растворимой форме всегда является актуальной, особенно при разработке технологий биосинтеза белков медицинского назначения для их крупномасштабного производства.

В настоящее время исследователи используют различные подходы, способствующие накоплению рекомбинантных белков в бактериальной клетке в растворимой форме. Это коэкспрессия бактериальных шаперонов GroES/GroEL, DnaK/DnaJ/GrpE, снижение температуры культивирования продуцента, добавление в питательную среду в условиях осмотического стресса веществ, стабилизирующих белок (например, глицинбетаин, глицерин, сорбит), высоких концентраций неметаболизируемых сахаров, оптимизация концентрации солей, значения pH питательной среды и др. (см. обзор [4]).

В представленной работе для разработки эффективной технологии получения ИФН в раствори-

мой форме исследовали влияние температуры культивирования продуцента на уровень синтеза целевого продукта, выход биомассы, а также, в какой форме — растворимой или нерастворимой, он накапливается в бактериальной клетке. Для этого клетки *E. coli* BL21 (*pET-αИФН*) выращивали в 200 мл среды Rogsine в колбе объемом 2 л при температуре 37 °С в условиях интенсивной аэрации до ОП 3,0. Затем по 50 мл культуры переносили в четыре колбы объемом 0,5 л. В две колбы добавляли раствор ИПТГ для индукции синтеза ИФН (опыт), а в две его не вносили (контроль). Затем в двух колбах (один опытный и один контрольный варианты) продолжали культивировать клетки штамма-продуцента при температуре 37 °С, а в двух (также один опытный и один контрольный варианты) — при 21 °С в течение 18 ч. Для исследований пробы отбирали через 1, 2, 3, 4 и 18 ч после индукции ИПТГ.

Электрофоретический анализ суммарных белков плазмидосодержащих клеток в опытных вариантах показал следующее. При культивировании продуцента ИФН после индукции при 37 °С выход целевого продукта уже через 1 ч составляет около 15 % от суммарных белков клетки, через 2 ч — 18, 3 ч — 19, 4 ч — 20 и 18 ч — 15 % (рис. 2, дорожки 7–12). При этом возрастает и ОП культуры (рис. 3), однако она меньше, чем в контроле, через 1 ч после индукции на — 10 %, 2 и 3 ч — на 25 %, 4 ч — на 20 %. Через 18 ч после индукции ОП культуры в опытном и контрольном вариантах одинаковые. При культивировании продуцента ИФН после индукции при 21 °С уровень синтеза

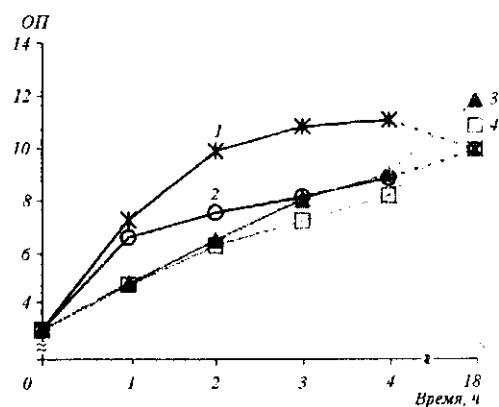


Рис. 3. Кинетика роста штамма *E. coli* BL (*pET-αИФН*) при температуре 37 (1, 2) и 21 °С (3, 4) после индукции синтеза целевого белка (1, 3), а также без индукции в контрольных вариантах (2, 4); нулевая точка по оси *x* — момент добавления изопропил-β-D-тиогаляктозида в пробы 1 и 3

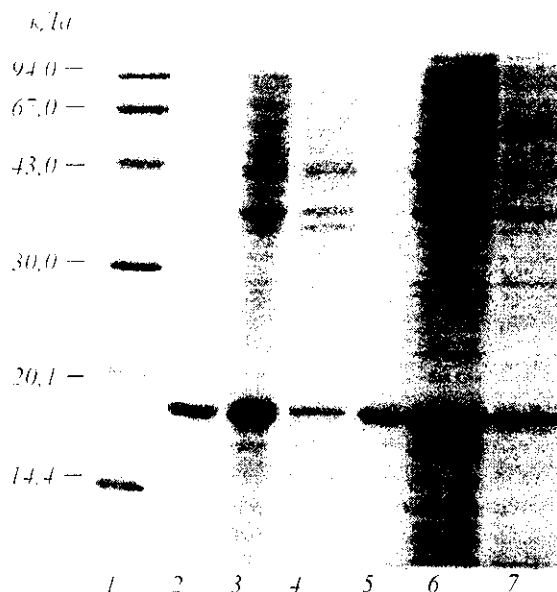


Рис. 4. Электрофореграмма лизатов (3, 4) и супернатантов фаголизатов (6, 7) клеток BL (*pET-αИФН*) (3, 6) и SG30 (*pIF-16*) (4, 7); 1 — стандарты молекулярных масс; 2, 5 — маркер интерферона

целевого продукта в первые часы значительно ниже, чем при 37 °С (рис. 2, дорожки 1—6). Так, через 1 ч после индукции выход ИФН составляет около 3 % от суммарных белков клетки, к 4-му ч постепенно увеличивается до 7 %, а через 18 ч составляет около 10 %, что ниже, чем при 37 °С. Однако конечный выход биомассы в опытном варианте при 21 °С выше, чем при 37 °С, а электрофоретический анализ растворимой и нерастворимой фракций белков показал, что при культивировании штамма-продуцента при пониженной температуре рекомбинантный белок накапливается в бактериальной клетке преимущественно в растворимом виде.

Таким образом, понизив температуру и увеличив продолжительность культивирования продуцента после индукции ИПТГ синтеза целевого белка, нам удалось получить ИФН в растворимом виде при выходе около 10 % от растворимых белков клетки.

Близкий выход обеспечивает и система экспрессии тандема искусственных генов ИФН под контролем тандема триптофановых промоторов в клетках *E. coli* SG30 (*pIF-16*). Однако система экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7 обеспечивает более высокий выход рекомбинантного белка из единицы объема, что является более важным показателем эффективности биотехнологического процесса.

Так, на рис. 4 представлена электрофореграмма образцов суммарных белков клеток штаммов *E. coli* BL21 (*pET-αИФН*) (дорожка 3) и SG30 (*pIF-16*) (дорожка 4), которые были нанесены на полиакриламидный гель в количестве, эквивалентном 10 мкл клеточной суспензии. Поскольку более оптимальной средой для синтеза ИФН клетками *E. coli* SG30 (*pIF-16*) является ПВ10, чем Porcine (данные не представлены), то для сравнительного анализа уровня синтеза ИФН в двух разных штаммах клетки SG30 (*pIF-16*) культивировали в среде ПВ10.

Таким образом, более высокий уровень синтеза целевого продукта происходит в штамме BL21 (*pET-αИФН*) при экспрессии одного гена ИФН под контролем промотора гена 10 фага Т7 в составе плазмиды *pET-αИФН*, чем в штамме *E. coli* SG30 (*pIF-16*) при экспрессии двух копий гена ИФН под контролем тандема триптофановых промоторов в составе плазмиды *pIF-16*. Однако полученные результаты нельзя рассматривать как прямое свидетельство более эффективной транскрипции целевого гена под контролем промотора фага Т7, поскольку экспрессия генов интерферона осуществлялась не только под контролем различных промоторов, но и в разных штаммах-продуцентах, в составе различных плазмидных векторов и, более того, искусственные гены ИФН в плазмидных векторах *pIF-16* и *pET-αИФН* имеют различную нуклеотидную последовательность.

Более высокий уровень синтеза ИФН в полученном штамме BL21 (*pET-αИФН*) явился предпосылкой для достижения и более высокого выхода ИФН в трехкомпонентной системе его биосинтеза (клетки *E. coli* BL (DE3)—плазмида *pET-αИФН*—бактериофаг λ), чем в ранее разработанной системе (клетки *E. coli* SG30—плазмида *pIF-16*—бактериофаг λ). Данная технология предусматривает инфицирование фагом клеток штамма-продуцента, в результате чего зараженные клетки лизируются и целевой продукт высвобождается в культуральную среду, где и накапливается в процессе культивирования. Поэтому рекомбинантный белок можно очищать непосредственно из культуральной среды, что позволяет избежать этапа разрушения клеток, который (особенно в условиях крупномасштабного производства) требует использования дорогостоящего оборудования и приводит к значительной потере целевого продукта.

Кроме того, как показано нами ранее [14], использование бактериофага лямбда в процессе синтеза рекомбинантных белков способствует их накоплению в растворимом виде.

В ходе работы при сравнительном анализе

эффективности систем биосинтеза ИФН с использованием бактериофага лямбда для инфицирования продуцентов *E. coli* BL21 (pET-aIFN) и SG30 (pIF-16) установлено, что выход ИФН в системе экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7 при оптимальных условиях ведения процесса более чем в 2,5 раза выше (см. рис. 4, дорожки 6 и 7).

Таким образом, используя в трехкомпонентной технологии получения ИФН систему экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7, нами достигнут высокий выход альфа-2b интерферона человека (около 200 мг в 1 л). Разрабатываемая технология позволяет получать целевой продукт не только в значительном количестве, но и в растворимом виде. При этом рекомбинантный ИФН накапливается непосредственно в культуральной среде, что обеспечивается использованием в биотехнологическом процессе бактериофага лямбда.

I. Yu. Slavchenko, E. V. Boreyko, N. V. Vorobey, S. I. Chernykh, V. A. Kordyum

Overproduction of human alpha-2b interferon in a soluble form in *Escherichia coli* cells using the bacteriophage T7 RNA polymerase-base expression system

#### Summary

An effective technology of soluble human alpha-2b interferon (IFN) production using the bacteriophage T7 polymerase-base expression system have been developed. For this purpose an artificial gene for human alpha-2b interferon (IFN) has been chemically synthesized and cloned into the expression vector pET-24a containing T7 promoter and terminator. A recombinant plasmid named pET-aIFN was transformed into *E. coli* BL (DE3) cells and synthesis of the IFN was induced with IPTG. The influence of temperature (37 and 21 °C) of *E. coli* BL (pET-aIFN) cells cultivation on the level of synthesis and the yield of soluble IFN have been investigated. We found that level of recombinant protein synthesis at 37 °C is higher than at 21 °C in the first hours after induction. Thus, the IFN yield after 4 hour postinduction amounts about 20 % at 37 °C and only 7 % of the total cellular proteins at 21 °C. However, it has been determined that the expression of IFN at 37 °C results in accumulation of recombinant protein in cells as the insoluble inclusion bodies. It was shown that the lower temperature promotes accumulation of target protein in a soluble form and that soluble IFN can be produced in *E. coli* BL (pET-aIFN) cells in higher amounts by postinduction cultivation at 21 °C during 18 h. The technology of IFN production developed by us includes the phage lambda infection of *E. coli* BL21 (DE3) cells, containing a plasmid with a target gene under the T7 phage promoter. The process results in lysis of the producer strain cells and releasing newly synthesized target protein into the growth medium, where it accumulates in a soluble form. Under the optimal cultivation conditions 1 liter of phage lysate contains about 200 mg of a soluble IFN. The obtained yield of soluble IFN is more than 2,5 times higher compared to the previously achieved yield of a soluble IFN using as a producer *E. coli* SG30 (pIF-16) carrying the plasmid with the two copies of an artificial gene for IFN under the control of the P<sub>trp</sub> tandem promoter.

I. Ю. Славченко, О. В. Борейко, Н. В. Воробей, С. І. Черних, В. А. Кордюм

Суперсинтез альфа-2b интерферону людини у клітинах *Escherichia coli* в розчинній формі з використанням системи експресії на основі РНК-полімерази фага Т7

#### Резюме

Розроблено ефективну технологію одержання розчинного альфа-2b інтерферону людини (ІФН) з використанням системи експресії на основі РНК-полімерази фага Т7. Синтезований для цього штучний ген ІФН клонували в експресійний вектор pET-24a, який містить Т7 промотор і термінатор. Рекомбінантну плазмиду, позначену як pET-aIFN, трансформували в клітини *E. coli* BL (DE3) і синтез ІФН індукували ізопропіл-β-D-тіогалактозидом. Вивчали вплив температури (37 і 21 °C) культивування клітин *E. coli* BL (pET-aIFN) на рівень синтезу і вихід розчинного ІФН. Встановлено, що рівень синтезу рекомбінантного білка у перші години після індукції при температурі 37 °C вищий, ніж при 21 °C. Так, через 4 год після індукції вихід ІФН при культивуванні продуцента при 37 °C складає до 20 %, а при 21 °C — лише 7 % від сумарних білків клітини. Однак якщо ІФН експресується при температурі 37 °C, то він накопичується в клітинах у вигляді нерозчинних тілець включень. Показано, що зниження температури культивування продуцента після індукції сприяє накопиченню цільового білка в розчинній формі. Збільшення тривалості культивування продуцента при температурі 21 °C до 18 год дозволяє одержувати розчинний ІФН у більшій кількості. Розроблена нами технологія отримання ІФН передбачає інфікування фагом лямбда клітин *E. coli* BL21 (DE3), які містять плазмиду з цільовим геном під контролем промотора фага Т7. В результаті лізису клітин штамма-продуцента синтезований цільовий білок вивільняється у середовище для росту, де й накопичується у розчинній формі. За оптимальних умов культивування 1 л фаголізату містить біля 200 мг розчинного ІФН. Отриманий вихід ІФН більш ніж у 2,5 рази вищий порівняно з раніше досягнутим нами виходом розчинного ІФН при використанні як продуцента клітин *E. coli* SG30 (pIF-16), що несуть плазмиду з двома копіями штучного гена ІФН під контролем тандема триптофанових промоторів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Машко С. В. Оптимизация экспрессии чужеродных генов в клетках *E. coli* // Биотехнология.—1998.—№ 6.—С. 3—23.
2. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* // Curr. Opin. Biotechnol.—1999.—10, N 5.—P. 411—421.
3. Balbas P. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli* // Mol. Biotechnol.—2001.—19, N 3.—P. 251—267.
4. Jonasson P., Liljeqvist S., Nygren P. A., Stahl S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli* // Biotechnol. and Appl. Biochem.—2002.—35, N 2.—P. 91—105.
5. Славченко И. Ю. Экспрессия альфа-2b интерферона человека в различных штаммах *Escherichia coli* // Биополимери і клітина.—2001.—17, № 6.—С. 546—550.
6. Славченко И. Ю. Влияние температуры на выход растворимого альфа интерферона человека в системе суперсинтеза рекомбинантных белков с использованием бактериофага лямбда // Биополимери і клітина.—2002.—18, № 5.—С. 436—441.
7. Славченко И. Ю. Влияние состава питательной среды на лизис и внклеточную локализацию альфа-интерферона

- человека в системе суперсинтеза рекомбинантных белков с использованием бактериофага лямбда // Биополимеры і клітина.—2002.—18, № 6.—С. 529—533.
8. Славченко И. Ю., Шмидт В. А., Черных С. И., Кордюм В. А. Особенности экспрессии целевого гена в составе вектора на основе бактериофага лямбда и изучение путей ее оптимизации // Биополимеры і клітина.—2003.—19, № 1.—С. 81—88.
  9. А. с. СССР № 1092176. Способ получения искусственного гена интерферона  $\alpha 2$  человека и способ получения полипептида с активностью интерферона микробиологическим синтезом / М. Н. Колосов, В. Г. Коробко, В. Н. Добрынин, И. В. Северцова, С. А. Чувпило, Н. С. Быстров, Ю. А. Берлин, А. Л. Каюшин, В. В. Буткус, И. А. Полякова, Е. Ф. Болдырева, Л. С. Сандахчиев, С. Г. Попов, Т. Н. Шубина, В. В. Кравченко, О. И. Серпинский, В. Ф. Ямщиков, С. И. Беликов, А. Н. Синяков, Г. Ф. Сиволобова // Опубл. в БИ № 18, 1984.
  10. Славченко И. Ю., Борейко Е. В., Гавриш Т. Г., Костюченко И. П., Кордюм В. А. Биосинтез основного фактора роста фибробластов человека в клетках *Escherichia coli* и его очистка // Биополимеры і клітина.—2003.—19, № 2.—С. 179—184.
  11. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem.—1976.—72.—P. 248—254.
  12. Studier F. W., Moffatt B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // J. Mol. Biol.—1986.—189, N 1.—P. 113—130.
  13. Carrio M. M., Villaverde A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies // J. Biotechnol.—2002.—96, N 1.—P. 3—12.
  14. Славченко И. Ю., Борейко Е. В., Воробей Н. В., Гавриш Т. Г., Пехота Е. Н., Кордюм В. А. Суперсинтез и очистка метионинаминопептидазы *Escherichia coli* // Биополимеры і клітина.—2003.—19, № 3.—С. 274—280

УДК 579.258 + 577.124  
Надійшла до редакції 12.05.03