

Влияние состава питательной среды на лизис и внеклеточную локализацию альфа-интерферона человека в системе суперсинтеза рекомбинантных белков с использованием бактериофага лямбда

И. Ю. Славченко

ПНИК «Биотехнолог»
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Исследовано влияние различных источников углерода на выход внеклеточного интерферона в системе биосинтеза рекомбинантных белков с использованием бактериофага лямбда. Установлено, что при содержании в культуральной среде определенных источников углерода увеличивается как уровень синтеза целевого продукта, так и эффективность лизиса инфицированных фагом клеток штамма-продуцента и, следовательно, конечная концентрация рекомбинантного белка в культуральной среде.

Введение. Бактериофаг лямбда является умеренным фагом и при инфицировании бактериальной клетки может развиваться по одному из двух альтернативных путей — лизогенному или литическому (см., например, обзор [1]). При лизогенном пути развития фаговая ДНК интегрирует в бактериальную хромосому, в ее составе реплицируется и передается дочерним клеткам как часть родительского генома. В случае литического развития фага синтезируются фаговые белки, обеспечивающие автономную репликацию фаговой ДНК, ее упаковку в фаговые частицы и последующий лизис клетки. Поэтому при разработке систем суперсинтеза рекомбинантных белков клетками *Escherichia coli* с использованием бактериофага лямбда можно добиться внеклеточной локализации целевого продукта, т. е. непосредственно в культуральной среде, куда он попадает в результате лизиса инфицированных клеток штамма-продуцента. Это позволяет избежать ряда технологических сложностей, связанных с извлечением рекомбинантного белка из бактериальных клеток. В таких системах биосинтеза ген, кодирующий целевой продукт, может быть локализован в составе плазмиды, содержащейся в клетках штамма-продуцента [2], в составе фаговой ДНК [3—5] либо и в составе плазмиды, и

в составе фага [6, 7]. Сложность разработки технологий с использованием бактериофага λ , прежде всего, связана с тем, что высокая концентрация целевого продукта в культуральной среде зависит как от эффективности синтеза целевого белка, так и от продуктивности литического развития фага. Однако рекомбинантный продукт, как правило, оказывает токсическое воздействие не только на рост клеток штамма-продуцента, но и на развитие фага [6]. И если в первом случае решить эту проблему можно за счет использования регулируемых промоторов для транскрипции целевого гена, то разделить во времени литическое развитие фага и процесс синтеза целевого продукта пока не представляется возможным. Поэтому эффективность систем биосинтеза рекомбинантных белков с использованием бактериофага лямбда определяется тем, насколько удачно будут найдены оптимальные условия ведения процесса биосинтеза.

Несмотря на то, что бактериофаг λ является хорошо изученным объектом молекулярной биологии и генетики, не так много известно о влиянии на развитие фага условий выращивания клеток хозяина, в частности, состава питательной среды. В литературе имеются данные, демонстрирующие, что концентрация молекул рецептора фага λ (продукт гена *lamB*) на поверхности бактериальной

клетки может определяться используемым источником углерода в составе питательной среды. Также показано влияние концентрации катионов Mg^{2+} в питательной среде на эффективность процесса адсорбции фага [8]. Кроме того, присутствие в определенных концентрациях данных катионов позволяет сохранить фагу λ , несущему мутацию в одном из генов, ответственных за лизис, — *Rz*, способность лизировать клетку [9].

Установлено, что концентрация $NaCl$ в среде играет важную роль в формировании открытого комплекса между РНК-полимеразой и *pR* промотором фага λ [10] и тем самым оказывает влияние на инициацию транскрипции правого оперона фага, в котором находятся гены, кодирующие существенные для литического развития фага λ белки [1]. Обнаружено ингибирование различными веществами формирования бляшек бактериофагом λ на газоне *E. coli*, выращенной в присутствии или в отсутствие лактозы [11]. Состав питательной среды также может влиять на выбор пути развития фага в инфицированной клетке [12, 13]. Например, показано, что замена глюкозы на глицерин в бедной питательной среде стимулирует лизогенное развитие фага [13].

Целью данной работы было исследование влияния различных дополнительных источников углерода в составе богатой питательной среды для культивирования инфицированных фагом лямбда клеток штамма-продуцента *E. coli* на литическое развитие фага и выход растворимого альфа-2b интерферона человека (ИФН).

Материалы и методы. В работе использовали ранее полученный нами чувствительный к фагу лямбда продуцент ИФН — *SG30 (pIF-16) recA (F, araD139, $\Delta(argF-lac)U169, flbB5301, deoC1, rpsL150, relA1, \Delta lon-100, cps-50::MudI$)* [14, 15]. Рекombинантная плазмида *pIF-16* несет tandem искусственных генов ИФН под контролем tandem триптофановых промоторов. В качестве генетического маркера она содержит ген *bla* (β -лактамазы), обеспечивающий устойчивость несущих ее клеток к ампициллину. Для инфицирования продуцента использовали фаг $\lambda cI857Q^R^-$, источником которого служил лизогенный штамм *E. coli* K802 (*hdsR⁺, hsdM⁺, gal⁺, met⁺, SupE)* ($\lambda cI857Qam117Ram54$). В качестве индикаторной культуры при титровании фага использовали штамм *E. coli* RLM1 (*thr⁻, leu⁻, lac⁻, tonA, SupE*).

Среды. Продуцент культивировали в питательной среде следующего состава: вода — 1 л, $NaCl$ — 10 г, дрожжевой экстракт (USB) — 5 г, пептон (Винницкий мясокомбинат) — 10 г. В среду добавляли ампициллин до конечной концентрации

20 мкг/мл и $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ из расчета 1 мл 1 М раствора на 1 литр среды. В зависимости от условий эксперимента в нее также вносили 10 %-й раствор одного из следующих веществ — глюкозы, ксилозы, рамнозы, мальтозы, фруктозы, глицерина, маннита, сорбита до конечной концентрации 0,5 г/л.

Для получения фаголизата $\lambda cI857Q^R^-$ использовали аналогичную среду, но содержащую 40 г/л пептона без каких-либо добавок.

Получение фаголизата. Фаголизат $\lambda cI857Q^R^-$ получали термоиндукцией лизогенной культуры K802 ($\lambda cI857Q^R^-$) по [14]. Титр определяли общепринятым двухслойным методом и, как правило, он составлял $(1,5-3,0) \cdot 10^{10}$ БОЕ/мл лизата.

Культивирование продуцента. Питательную среду засеивали инокулятом *E. coli* SG30 (*pIF-16*), предварительно выращенным в термостате при температуре 37 °С в течение ночи. Соотношение объема инокулята к объему среды составляло 1:10. Культуру выращивали на качалке в условиях интенсивной (160 об/мин) аэрации при температуре 37 °С до оптической плотности 3,0. После этого инфицировали фагом $\lambda cI857Q^R^-$, добавляя заранее полученный фаголизат в количестве 1/5 объема культуральной среды, и продолжали культивирование в течение 18 ч при температуре 21 °С.

Оптическую плотность (ОП) измеряли на фотокolorиметре КФК-3 (Россия) при $\lambda = 540$ нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Электрофоретическому анализу подвергали супернатант лизата, полученный центрифугированием при 14000 об/мин в течение 5 мин. Для этого к 40 мкл супернатанта добавляли 15 мкл буфера для нанесения (5 %-й глицерин, 3 %-й SDS, 2 %-й β -меркаптоэтанол, 0,02 %-й бромфеноловый синий) и перемешивали. Пробы выдерживали 5 мин при 100 °С и весь образец наносили на полиакриламидном геле (ПААГ).

Электрофорез белков осуществляли по методу Лэммли [16] в 12,5 %-м ПААГ в присутствии 1 %-го SDS с последующим прокрашиванием в растворе кумасси R-250.

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

Результаты и обсуждение. Ранее нами показано, что экспрессия генов альфа-2 ИФН человека в составе плазмиды *pIF-16* обеспечивает накопление целевого продукта внутри клетки-продуцента в нерастворимом виде [15]. Установлено, что содержание в культуральной среде того или иного источника углерода может приводить как к увеличению,

так и уменьшению выхода рекомбинантного белка. Например, при культивировании клеток *E. coli* SG30 (*pIF-16*) при температуре 37 °С в среде, содержащей глюкозу, ксилозу, мальтозу или маннит, выход целевого продукта значительно ниже по сравнению с контролем (среда без внесения дополнительного источника углерода) [17]. Нами также показано, что использование в биотехнологическом процессе бактериофага лямбда позволяет получать альфа-2b ИФН в высокой концентрации непосредственно в культуральной среде, куда он попадает в результате лизиса инфицированных фагом λ клеток *E. coli* SG30 (*pIF-16*). При этом эффективность данного процесса существенно зависит от температурного режима культивирования продуцента [2].

Поскольку состав питательной среды может влиять не только на уровень синтеза целевого продукта, но и на эффективность лизиса инфицированных фагом клеток штамма-продуцента и, следовательно, на конечную концентрацию рекомбинантного белка в культуральной среде, исследование действия на этот процесс источника углерода является одним из важных элементов оптимизации биотехнологического процесса.

Первым этапом инфекционного процесса является адсорбция фага на бактериальной клетке. Рецептор фага лямбда кодируется геном *lamB*, входящим в состав мальтозного оперона. Добавление мальтозы в питательную среду индуцирует мальтозный оперон и на поверхности клетки резко возрастает количество рецепторов фага λ [8]. При использовании фага для получения рекомбинантных белков с внеклеточной локализацией очень важно, чтобы как можно большая часть клеток штамма-продуцента была заражена фагом. Обычно принято считать, что этому способствует индукция синтеза молекул рецептора фага λ . Поэтому во многих руководствах рекомендуют для этих целей использовать среды, содержащие мальтозу (например, [18]). Однако мальтоза оказалась в числе четырех углеводов, добавление которых в питательную среду приводило к угнетению синтеза рекомбинантного интерферона в клетках *E. coli* SG30 (*pIF-16*) [17]. Но в этой же работе нами установлено, что негативное влияние мальтозы, глюкозы, ксилозы или маннита на синтез ИФН носит температурозависимый характер, и имеет место при 37 °С. А поскольку при использовании фага в процессе биосинтеза ИФН, как показано нами ранее [2], предпочтительна пониженная температура для культивирования инфицированных клеток штамма-продуцента, то целесообразно исследовать влияние и этих углеводов на эффективность процесса получения целевого продукта в

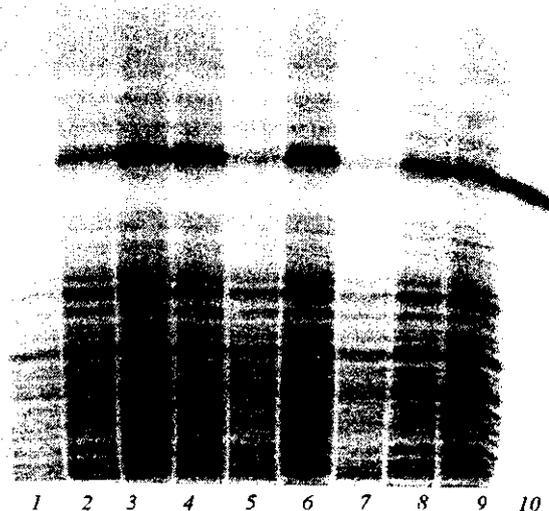


Рис. 1. Электрофореграмма супернатантов фаголизатов клеток *E. coli* SG30 (*pIF-16*), полученных при культивировании на среде с: 2 — глюкозой; 3 — ксилозой; 4 — рамнозой; 5 — мальтозой; 6 — фруктозой; 7 — глицерином; 8 — маннитом; 9 — сорбитом; 10 — контроль; 1 — маркер ИФН

разрабатываемой системе биосинтеза с использованием бактериофага лямбда.

В представленной работе изучали влияние на литическое развитие фага и выход растворимого альфа-2b интерферона человека наличия в составе богатой питательной среды для культивирования инфицированных фагом лямбда клеток штамма-продуцента *E. coli* одного из следующих источников углерода — глюкозы, ксилозы, рамнозы, мальтозы, фруктозы, глицерина, маннита, сорбита.

Для этого культуру *E. coli* SG30 (*pIF-16*) выращивали при 37 °С до оптической плотности 3,0 на среде, содержащей тот или иной источник углерода. В контрольный вариант дополнительно источника углерода не вносили. Затем культуру инфицировали фагом λ с1857Q^R-, как описано в разделе «Материалы и методы», и дальнейшее культивирование продолжали при температуре 21 °С. Через 18 ч фаголизаты центрифугировали и супернатант анализировали электрофоретически.

Анализ полученных данных показал (рис. 1), что наиболее высокое внеклеточное содержание ИФН наблюдается на среде с мальтозой (дорожка 5), глицерином (дорожка 7) и глюкозой (дорожка 2). Интересным является то, что аналогичная зависимость установлена для обоих исследуемых в работе [8] штаммов *E. coli* Hfr G6 и 3000 при определении количества рецепторов на поверхности клеток, выращенных на среде М63 с мальтозой, глицерином и глюкозой. Так, для штамма *E. coli* Hfr G6 этот показатель на среде с мальтозой

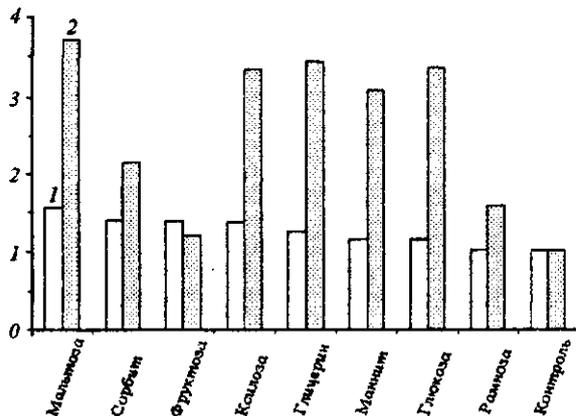


Рис 2. Влияние различных источников углерода в составе питательной среды на выход ИФН в плазмидосодержащих клетках (1) и при его получении в системе биосинтеза с использованием фага λ (2). Выход, имеющий место в контроле, (без добавления углевода), принят за 1. В первом случае ИФН имеет внутриклеточную локализацию и выход определяли как процент от суммарных белков клетки, температура культивирования продуцента 28 °С, данные взяты из работы [16]. Во втором случае ИФН имеет внеклеточную локализацию и выход определяли как процент от растворимых белков клетки

составил 6300, глицерином — 2700, глюкозой — 35. Для штамма *E. coli* 3000 — соответственно 9500, 360 и 30. Тем не менее, несмотря на то, что при биосинтезе ИФН в системе с использованием фага λ уровень выхода целевого белка с внеклеточной локализацией носит подобную зависимость, нет весоных оснований считать, что это связано с количеством молекул рецептора бактериофага λ на поверхности клетки.

В данном исследовании клетки штамма-продуцента, выращенные на среде с добавлением различных источников углерода, инфицировали с одинаковой множественностью, которая в несколько раз меньше, чем количество образующихся рецепторов в условиях катаболитной репрессии их синтеза (как известно, мальтозный оперон, содержащий кодирующий рецептор фага лямбда ген *lamB*, чувствителен к катаболитной репрессии). Кроме того, выход ИФН на среде с глюкозой, репрессирующей синтез рецептора, выше, чем в ее отсутствие (контроль). Это свидетельствует о том, что при данных условиях ведения процесса тот или иной дополнительный источник углерода, прежде всего, влияет на уровень синтеза целевого продукта и эффективность лизиса клеток бактериофагом.

Полученные результаты являются также интересными с точки зрения анализа положительного влияния на эффективность процесса используемых углеводов по их принадлежности к одной из двух групп, сформированных в работе [17]. Первую

группу составляют углеводы, добавление которых в среду для культивирования продуцента ИФН SG30 (*pIF-16*) при температуре 37 °С приводит к увеличению выхода целевого продукта (глицерин, рамноза, фруктоза, сорбит), а вторую — к уменьшению (глюкоза, мальтоза, маннит, ксилоза). При инфицировании этого же продуцента фагом лямбда и его последующем культивировании при температуре 21 °С эффективный лизис и соответственно высокая концентрация ИФН и других растворимых белков клетки обеспечиваются только одним источником углерода, относящимся к первой группе (глицерин), и всеми четырьмя углеводами (в большей или меньшей степени), составляющими вторую группу.

На рис. 2 представлены сравнительные данные по влиянию различных источников углерода в составе питательной среды на выход ИФН в плазмидосодержащих клетках и при его получении в системе биосинтеза с использованием фага λ . Выход, имеющий место в контролях, принят за 1.

Так, согласно полученным данным, самый высокий выход растворимого ИФН с внеклеточной локализацией достигнут на среде с мальтозой (в 3,7 раза выше, чем в контроле). Более чем в три раза он выше на среде с глицерином, глюкозой, ксилозой и маннитом. При этом строгой корреляции положительного влияния используемых источников углерода на выход ИФН при его получении плазмидным способом и с использования фага λ не выявлено. Так, при плазмидном способе получения ИФН наиболее оптимальными оказались среды с добавлением мальтозы, сорбита и фруктозы (рис. 2). В то же время среды с сорбитом и фруктозой не являются оптимальными для культивирования инфицированных фагом λ клеток штамма-продуцента ИФН *E. coli* SG30 (*pIF-16*) (рис. 2).

Сравнительный анализ показал, что при положительной динамике воздействия дополнительных источников углерода на выход ИФН при его получении в системах биосинтеза как с использованием фага λ , так и без него выбор того или иного источника углерода имеет более существенное влияние на выход рекомбинантного белка в системе с использованием фага лямбда. При этом следует учитывать тот факт, что выход ИФН в контрольном варианте с внеклеточной локализацией (продуцент инфицировали фагом) значительно ниже, чем в контрольном варианте с внутриклеточной локализацией продукта (продуцент не инфицировали фагом). Однако использование дополнительного источника углерода в составе питательной среды позволяет оптимизировать технологический процесс и добиться в конечном счете сравнимого уров-

ня выхода целевого белка. А поскольку технология с использованием фага λ позволяет получать рекомбинантный продукт в растворимом виде, она имеет большое преимущество по сравнению с технологией, обеспечивающей накопление целевого белка внутри клеток в виде нерастворимых телец включений.

Таким образом, в результате исследований установлено, что введение того или иного дополнительного источника углерода в состав богатой питательной среды может существенно повысить выход рекомбинантного белка в системе биосинтеза ИФН с использованием штамма-продуцента *E. coli* SG30 (*pIF-16*) и бактериофага λ . При этом внеклеточное содержание ИФН определяется как уровнем синтеза ИФН в инфицированной клетке, так и эффективностью лизиса клеток штамма-продуцента бактериофагом лямбда. Негативного влияния какого-либо из используемых источников углерода в данных условиях ведения процесса не зарегистрировано. Для дальнейшей оптимизации биотехнологического процесса целесообразно использовать среды, содержащие мальтозу, глицерин, глюкозу, маннит, ксилозу.

Автор выражает признательность И. П. Костюченко и Е. В. Борейко за постановку отдельных экспериментов, Е. Н. Пехоте — за денситометрирование гелей.

I. Yu. Slavchenko

The influence of nutrients in growth media on the lysis and extracellular localization of human alpha interferon in the system of recombinant proteins overproduction using bacteriophage lambda

Summary

The influence of different carbon sources on the yield of extracellular human alpha interferon in the system of recombinant proteins biosynthesis using bacteriophage lambda was investigated. Both the level of target protein synthesis and productivity of infected cells lysis are shown to increase in the presence of certain carbon sources in the growth media. This results in rising the extracellular concentration of recombinant protein.

I. Ю. Славченко

Вплив складу поживного середовища на лізис і позаклітинну локалізацію альфа-інтерферону людини в системі суперсинтезу рекомбінантних білків з використанням бактериофага лямбда

Резюме

Досліджено вплив різних джерел вуглецю на вихід позаклітинного інтерферону в системі біосинтезу рекомбінантних білків з використанням бактериофага лямбда. За присутності в культуральному середовищі певних джерел вуглецю збільшується як рівень синтезу цільового продукту, так і ефективність лізису інфікованих фагом клітин штамма-продуцента і, як наслідок, кінцева концентрація рекомбінантного білка в культуральному середовищі.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пташине М. Переключение генов. Регуляция генной активности и фаг λ .—М.: Мир, 1989.—160 с.
2. Славченко И. Ю. Влияние температуры на выход растворимого альфа интерферона человека в системе суперсинтеза рекомбинантных белков с использованием бактериофага лямбда // Биополимеры и клетина.—2002.—18, № 5.—С. 436—441.
3. Moir A., Brammar W. J. The use of specialised transducing phages in the amplification of enzyme production // Mol. and Gen. Genet.—1976.—149.—Р. 87—99.
4. А. с. СССР № 600175. Способ биосинтеза биологически активного вещества / Кордюм В. А., Черных С. И. // Опул. в БИ. № 12, 1978.
5. Славченко И. Ю., Черных С. И., Кордюм В. А. Исследование фазозависимого синтеза β -лактамазы в изогенных Su^+ и Su^0 штаммах *E. coli* при заражении их фагами *lba* и *lbaQR* // Ферменты микроорганизмов.—М.: ВНИИСЭТИ, 1989.—С. 31—36.
6. Славченко И. Ю. Исследование эффективности использования бактериофага λ для получения $\alpha 2$ интерферона человека в клетках *Escherichia coli*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—Киев, 1990.—19 с.
7. Пат. Украины № 2463. Способ получения β -галактозидазы / В. А. Кордюм, С. И. Черных, И. Ю. Славченко, В. Г. Коробко // Опул. в БИ № 5-1, 1994.
8. Schwartz M. The adsorption of coliphage lambda to its host: effect of variations in the surface density of receptor and in phage-receptor affinity // J. Mol. Biol.—1976.—103, N 3.—Р. 521—536.
9. Garrett J. M., Young R. Lethal action of bacteriophage lambda S gene // J. Virol.—1982.—44, N 3.—Р. 886—892.
10. Roe J. H., Record M. T. Jr. Regulation of the kinetics of the interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with the lambda pR promoter by salt concentration // Biochemistry.—1985.—24, N 18.—Р. 4721—4726.
11. Gabig M., Herman-Antosiewicz A., Kwiatkowska M., Los M., Thomas M. S., Wegrzyn G. The cell surface protein Ag43 facilitates phage infection of *Escherichia coli* in the presence of bile salts and carbohydrates // Microbiology.—2002.—148.—Р. 1533—1542.
12. Gabig M., Obuchowski M., Wegrzyn A., Szalewska-Palasz A., Thomas M. S., Wegrzyn G. Excess production of phage lambda delayed early proteins under conditions supporting high *Escherichia coli* growth rates // Microbiology.—1998.—144.—Р. 2217—2224.
13. Czyz A., Los M., Wrobel B., Wegrzyn G. Inhibition of spontaneous induction of lambda-doid prophages in *Escherichia coli* cultures: simple procedures with possible biotechnological application // BMC Biotechnol.—2001.—1, N 1.
14. Славченко И. Ю. Отбор чувствительных к бактериофагу λ клонов из устойчивого к нему штамма *Escherichia coli* // Биополимеры и клетина.—2001.—17, № 2.—С. 160—165.
15. Славченко И. Ю. Экспрессия альфа-2b интерферона человека в различных штаммах *Escherichia coli* // Биополимеры и клетина.—2001.—17, № 6.—С. 546—550.
16. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—Р. 680—685.
17. Славченко И. Ю. Влияние различных источников углерода на синтез рекомбинантного белка в клетках *Escherichia coli* // Биополимеры и клетина.—2002.—18, № 4.—С. 334—339.
18. Гловер Д. Клонирование ДНК. Методы.—М.: Мир, 1988..

УДК 579.258+577.124

Надійшла до редакції 30.01.02