

## Изучение влияния различных концентраций индуктора на выход альфа-2b интерферона человека в системе экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7 в клетках *Escherichia coli*

И. Ю. Славченко<sup>1, 2</sup>, Е. В. Борейко<sup>1</sup>, Н. В. Воробей<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ПНИК «Биотехнолог»

Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

E. mail: biotech@naverex.kiev.ua

<sup>2</sup>

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Биосинтез альфа-2b интерферона человека (ИФН) в клетках *E. coli* BL21 (DE3), несущих плазмиду pET-αИФН, индуцировали различными (от 0,01 до 10 мМ) концентрациями изопропил-β-D-тиогалактозида (ИПТГ). Плазида pET-αИФН содержит искусственный ген ИФН под контролем промотора гена 10 фага Т7. Ген РНК-полимеразы фага Т7 находится в хромосоме клеток *E. coli* BL21 (DE3) под контролем *lac-UV5* промотора *E. coli*. Обнаружено, что значение минимальной концентрации ИПТГ, обеспечивающей эффективную экспрессию целевого белка, возрастает с понижением температуры культивирования продуцента после индукции. Так, при 37 °С полная индукция достигается внесением в среду ИПТГ в конечной концентрации 0,06 мМ, а при 21 °С — 0,1 мМ. Показано, что снижение концентрации индуктора до 0,01 мМ не способствует накоплению ИФН в растворимой форме при культивировании продуцента при температуре 37 °С. Также установлено, что ИПТГ в конечной концентрации до 2 мМ не оказывает негативного влияния на литическое развитие бактериофага лямбда и инфицированные им плазмидосодержащие клетки лизируются, в результате чего рекомбинантный белок в растворимой форме накапливается непосредственно в культуральной среде. Минимальная концентрация ИПТГ, обеспечивающая максимальный выход ИФН при данном способе его получения, составляет 0,2 мМ.

**Введение.** Использование регулируемых промоторов для транскрипции клонируемых генов позволяет получать в значительных количествах рекомбинантные белки, оказывающие токсическое воздействие на клетку, в частности, полипептиды гетерологичного происхождения в клетках *E. coli*. Это достигается разобщением во времени процессов наращивания биомассы продуцента и синтеза целевого продукта.

Так, на первом этапе биотехнологического процесса клетки штамма-продуцента культивируют в условиях, оптимальных для их роста. И только после достижения бактериальной культурой заданной плотности индуцируют транскрипцию с

промотора, под контролем которого находится целевой ген, и лишь на втором этапе создают оптимальные условия для эффективного синтеза целевого белка.

Для регулируемой экспрессии клонируемых генов широко используют *lac*-промотор *E. coli* и его мутанты, а также различные гибридные и синтетические промоторы, созданные на его основе, например, *lac*, *lpp-lac*, *P2-lac*, *trc*, *Psyn*, *tac*, *rac* и другие (см. обзоры [1, 2]). Индукторами этих промоторов являются лактоза и ее синтетический аналог изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ). ИПТГ в отличие от лактозы не метаболизируется бактериальной клеткой и чаще применяется для индукции транскрипции целевого гена, контролируемой *lac*-промотором или его производными.

Для эффективного синтеза рекомбинантных белков разработаны и более сложные системы биосинтеза, в которых *lac*-промотор используют для транскрипции не целевого гена, а гена вспомогательного продукта, необходимого для эффективной экспрессии целевого белка. Примером такого каскадного процесса является система экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7, разработанная Стаднером [3]. В такой системе ген РНК-полимеразы фага Т7 под контролем *lacUV5* промотора *E. coli* локализован в хромосоме бактериальной клетки, содержащей плазмиду с целевым геном под контролем промотора, узнаваемого РНК-полимеразой фага Т7. При добавлении в среду индуктора лактозного оперона (лактозы или ИПТГ) синтезируется фаговый фермент, который с высокой эффективностью и специфичностью осуществляет процесс транскрипции целевого гена, находящегося в составе плазмидного вектора под контролем промотора фага Т7.

Анализ литературных данных показал, что наиболее часто для индукции применяют ИПТГ в конечной концентрации 1 мМ. Однако в отдельных работах эффективный синтез целевых продуктов достигнут при использовании ИПТГ в концентрации 0,1 мМ и меньше для индукции транскрипции целевого гена, контролируемой *lac*-промотором [4–7], *lac*-промотором [8], а также в описанной выше системе экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7 [9, 10]. Показано, что высокие концентрации ИПТГ могут стимулировать образование целевого продукта в нерастворимой форме [4, 6, 7, 9], влияя на его локализацию (в цитоплазме и/или периплазме), а также угнетать рост рекомбинантных бактерий [5].

Оптимальная концентрация индуктора для разных систем биосинтеза может колебаться в широких пределах и зависеть от множества факторов, таких как сила используемого промотора, нуклеотидная последовательность клонируемого гена, токсичность целевого продукта, состав питательной среды, физиологическое состояние клеток в момент индукции, использование того или иного штамма продуцента и др. Поэтому поиск оптимальной концентрации индуктора, обеспечивающей продуктивный синтез целевого белка, является актуальной задачей при оптимизации технологий получения рекомбинантных полипептидов с использованием регулируемых промоторов.

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния различных концентраций ИПТГ на выход рекомбинантного альфа-2b интерферона человека (ИФН) в системах экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7 в клетках *E. coli*.

**Материалы и методы.** В работе использован ранее полученный [11] штамм *E. coli* BL21 (*pET-*

*aИФН*) (*F', ompT, hsdS<sub>B</sub>, (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup> gal dcm)* (DE3), несущий плазмиду с искусственным геном, кодирующим альфа-2b интерферон человека, транскрипция которого контролируется промотором гена *10* фага Т7. Плаزمид сконструирована на основе вектора *pET-24a(+)* (Kan<sup>R</sup>) («Novagen», США) и трансформирована в штамм *E. coli* BL21 (DE3).

Для инфицирования продуцента использовали фаг  $\lambda$ cI857Q 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 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*). Как правило, получали (1,5–3,0) · 10<sup>10</sup> БОЕ/мл лизата.

**Среды.** Бактериальные культуры выращивали в жидкой питательной среде Porcine («Difco», США), приготовленной согласно рекомендации производителя. На основе разработанной нами среды ПВ10 (вода — 1 л, пептон (Винницкий мяскокомбинат) — 10 г, NaCl — 10 г, дрожжевой экстракт (USB) — 5 г) готовили 1,5 и 0,5 %-с агаризованные среды.

При выращивании плазмидосодержащих клеток BL21 (*pET-aИФН*) в среду добавляли канамицин до конечной концентрации 50 мкг/мл. Для индукции синтеза целевого продукта в клетках BL21 (*pET-aИФН*) в среду вносили раствор ИПТГ («Inalco», США) до заданной конечной концентрации. 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 глицерин до конечной концентрации 2 %.

**Культивирование продуцента.** Питательную среду засеивали инокулятом *E. coli* BL21 (*pET-aИФН*), предварительно выращенным в термостате при температуре 37 °С в течение ночи. Соотношение объема инокулята к объему среды и объема среды к объему колбы составляло 1:10. Культуру выращивали на качалке в условиях интенсивной (160 об/мин) аэрации при температуре 37 °С до оптической плотности (ОП) 3,0. Затем по 25 мл культуральной среды переносили в колбы объемом 0,25 л и в каждую из них для индукции синтеза целевого продукта добавляли определенное количество раствора ИПТГ. В контрольный вариант ИПТГ не вносили. После этого продолжали культивирование продуцента при температуре 37 или 21 °С в течение ~ 18 ч.

При получении рекомбинантного белка с использованием фага перед индукцией культуру инфицировали фагом  $\lambda$ cI857Q R<sup>-</sup>, добавляя заранее полученный фаголизат в количестве 1/5 объема культуральной среды, и продолжали культивирование в течение 18 ч при температуре 21 °С.

Получение фаголизата  $\lambda$ CI857Q<sup>-</sup>R<sup>-</sup>, электрофоретический анализ растворимой и нерастворимой фракций клеточных белков, суммарных белков плазмидосодержащих клеток и их фаголизатов осуществляли, как описано ранее [12].

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

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

Выход целевого продукта устанавливали по процентному содержанию ИФН в образцах денситометрированием соответствующих дорожек геля с помощью прибора Image Master («Pharmacia Biotech», Швеция).

**Результаты и обсуждение.** Влияние различных концентраций ИПТГ на выход рекомбинантного альфа-2b интерферона человека исследовали в двух ранее [11] разработанных нами биотехнологических системах получения данного белка с использованием РНК-полимеразы фага T7 в клетках *E. coli*.

Первая система базируется на стандартном способе получения рекомбинантных белков путем культивирования клеток, несущих плазмиду с целевым геном, в данном случае BL21 (*pET- $\alpha$ ИФН*). После внесения ИПТГ в культуральную среду индуцируется синтез целевого продукта, который накапливается внутри бактериальной клетки. Для извлечения рекомбинантного белка клетки необходимо разрушить, что в условиях промышленного производства не только требует использования дорогостоящего оборудования, но и приводит к значительным потерям целевого продукта.

Вторая система основана на разработанных нами ранее способах получения рекомбинантных белков с использованием бактериофага  $\lambda$  и предусматривает инфицирование фагом на определенном этапе технологического процесса клеток штамма-продуцента, несущих плазмиду с целевым геном. В результате фаговой инфекции бактериальные клетки лизируются и целевой белок высвобождается в культуральную среду. Использование бактериофага лямбда в биотехнологическом процессе обеспечивает накопление рекомбинантного белка непосредственно в культуральной среде и, как показано нами в работе [13], может способствовать накоплению целевого продукта в растворимой форме.

На первом этапе работы исследовали влияние различных концентраций ИПТГ на выход ИФН, культивируя клетки *E. coli* BL21 (*pET- $\alpha$ ИФН*) при температуре 37 °С. Ранее нами установлено [11], что если после индукции ИПТГ (1 мМ) процесс биосинтеза ИФН осуществляется при данной температуре, то выход целевого белка более высокий,

чем при 21 °С. Однако рекомбинантный полипептид при 37 °С накапливается в клетках в нерастворимом виде. В первой серии экспериментов для индукции синтеза целевого продукта использовали ИПТГ с конечной концентрацией в интервале от 0,1 до 10 мМ, а именно: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 2; 4; 6; 8; 10 мМ. В контрольный вариант ИПТГ не вносили. Культивирование продуцента осуществляли, как описано в разделе «Материалы и методы». Образцы отбирали через 4 ч после индукции и по окончании процесса, измеряли их ОП, проводили электрофоретический анализ суммарных белков клетки, а также фракций растворимых и нерастворимых белков.

В результате проведенных исследований установлено следующее. Согласно данным, полученным при электрофоретическом анализе лизатов клеток штамма-продуцента, выход ИФН при индукции его синтеза ИПТГ с конечной концентрацией в интервале от 0,1 до 10 мМ находится примерно на одном уровне как через 4 ч после индукции, так и через 18 ч (данные не представлены) и колеблется в пределах 15–20 % от суммарных белков клетки. В контрольном образце, в котором синтез ИФН не индуцировали, целевой белок электрофоретически не определяется. Анализ значений ОП в образцах через 4 ч после индукции показал, что выход биомассы при концентрации индуктора 0,1 мМ на  $4 \pm 1$  % ниже, чем в контроле. При более высоких концентрациях ИПТГ выход биомассы еще ниже. Однако статистически достоверной зависимости угнетения роста от концентрации индуктора в пределах 0,2–10 мМ не установлено, и уменьшение выхода биомассы при таких концентрациях индуктора в среднем ниже по сравнению с контролем на  $24,9 \pm 4$  %.

Минимальная концентрация ИПТГ, обеспечивающая эффективный синтез ИФН в первой серии экспериментов, не была установлена, поскольку она не находится в пределах 0,1–10 мМ. В связи с этим исследовали влияние на выход ИФН более низких концентраций индуктора — от 0,01 до 0,1 мМ: в культуральную среду добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 и 0,1 мМ. Электрофореграмма образцов, полученных в одном из таких экспериментов, представлена на рис. 1.

В результате проведенных исследований установлено, что при использовании индуктора в минимальной концентрации (0,01 мМ) выход ИФН составляет около 5 % (дорожка 2) и постепенно увеличивается до 16 % при повышении концентрации ИПТГ до 0,06 мМ (дорожки 3–5). При концентрации 0,06; 0,08 и 0,1 мМ выход целевого белка находится на одном уровне (дорожки 5–7). Анализ значений ОП в образцах через 4 ч после индукции показал, что незначительное снижение



Рис. 1. Электрофореграмма суммарных белков клеток *E. coli* BL (*pET-aIFN*), культивированных при температуре 37 °С в течение 4 ч после индукции различными конечными концентрациями изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозида: 1 — 0 (контроль); 2 — 0,01; 3 — 0,02; 4 — 0,04; 5 — 0,06; 6 — 0,08; 7 — 0,1 мМ; м — маркер интерферона

выхода биомассы наблюдается при концентрации ИПТГ 0,1 мМ, а при концентрациях от 0,01 до 0,08 ОП образцов такая же, как в контроле. Из данных, полученных в первой и второй серии экспериментов, следует, что выход целевого белка при концентрациях ИПТГ от 0,06 до 10 мМ имеет близкие значения. Поэтому наблюдающееся уменьшение выхода биомассы при 0,1 мМ на  $4 \pm 1$  %, а при концентрации ИПТГ от 0,2 до 10 мМ — на  $24,9 \pm 4$  %, вероятнее всего, в конкретных условиях данного эксперимента имеет место не за счет токсического действия рекомбинантного белка, а обусловлено присутствием ИПТГ в культуральной среде. Однако для подтверждения этого предположения необходимо провести специальные исследования, которые не были выполнены, поскольку не являлись задачей данной работы.

Электрофоретический анализ растворимой и нерастворимой фракций белков показал, что снижение концентрации индуктора не способствовало накоплению ИФН в растворимой форме (данные не представлены). В настоящее время снижение концентрации индуктора рассматривается как один из подходов, предотвращающих образование рекомбинантного белка в неактивной нерастворимой форме, о чем свидетельствуют успехи, достигнутые в некоторых работах [4, 6, 7, 9]. Но не всегда данный прием, как и в представленной работе, приводит к желаемому результату.

Хотя в данной системе биосинтеза уменьшение концентрации индуктора не способствовало накоплению ИФН в растворимой форме, однако другой подход, применение которого способствует повышению растворимости рекомбинантных белков, а именно — снижение температуры культивирования продуцента, как показано нами ранее [11], обеспечивает накопление в клетках ИФН преимущественно в растворимом виде. Считается, что как в случае уменьшения концентрации индуктора, так и температуры культивирования продуцента после индукции снижается скорость синтеза целевого белка и это способствует правильной сборке рекомбинантного полипептида.

На следующем этапе работы исследовали влияние различных концентраций ИПТГ (от 0,01 до 10 мМ) на выход интерферона при культивировании клеток *E. coli* BL21 (*pET-aIFN*) после индукции при температуре 21 °С.

Ранее нами установлено [11], что скорость накопления целевого белка при 21 °С значительно ниже, чем при 37 °С. Поэтому для достижения максимального выхода ИФН клетки после индукции необходимо культивировать при 21 °С более продолжительное время, чем при 37 °С. Однако при пониженной температуре даже в случае увеличения времени культивирования продуцента наблюдается более низкий выход ИФН (10–11 % от суммарных белков клетки), чем при 37 °С, однако он накапливается в клетках преимущественно в растворимой форме. Поэтому в данной серии экспериментов образцы отбирали по окончании биотехнологического процесса (через 18 ч после индукции), измеряли их ОП и проводили электрофоретический анализ только суммарных белков клетки.

В результате обнаружено, что ИФН в контрольном варианте (без добавления ИПТГ) (рис. 2, дорожка 1) и в вариантах, в которых для индукции синтеза интерферона использовали ИПТГ в концентрации 0,01 (дорожка 2) и 0,02 мМ (дорожка 3) электрофоретически не выявляется. При конечной концентрации ИПТГ в культуральной среде 0,04 мМ целевой белок составляет около 7 % от суммарных белков клетки (дорожка 4) и его выход повышается с увеличением концентрации ИПТГ до 0,1 мМ (дорожки 5–7). Дальнейшее повышение концентрации индуктора не привело к статистически достоверному увеличению выхода целевого белка (данные не представлены). Полученные результаты свидетельствуют о том, что температура культивирования продуцента может влиять на значение минимальной концентрации индуктора, обеспечивающей эффективную экспрессию целевого продукта. В этом случае при снижении температуры культивирования продуцента требуются более высокие концентрации ИПТГ.

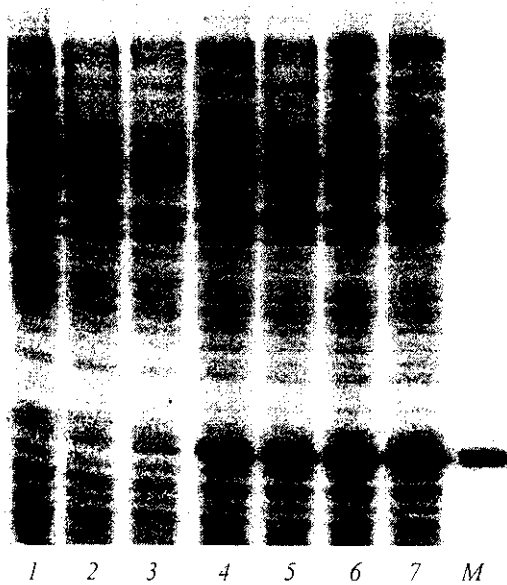


Рис. 2. Электрофореграмма суммарных белков клеток *E. coli* BL (*pET- $\alpha$ ИФН*), культивированных при температуре 21 °С в течение 18 ч после индукции различными конечными концентрациями изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозида: 1 — 0 (контроль); 2 — 0,01; 3 — 0,02; 4 — 0,04; 5 — 0,06; 6 — 0,08; 7 — 0,1 мМ; м — маркер интерферона

Так, при культивировании продуцента после индукции при температуре 37 °С целевой белок электрофоретически определяется при конечной концентрации ИПТГ 0,01 мМ, а при температуре 21 °С — только при концентрации ИПТГ в 4 раза выше (0,04 мМ). Полную индукцию при 37 °С обеспечивает ИПТГ в конечной концентрации 0,06 мМ, а при 21 °С — 0,1 мМ.

На следующем этапе работы изучали влияние конечной концентрации индуктора от 0,01 до 2 мМ на выход ИФН в системе его биосинтеза с использованием бактериофага лямбда. Процесс биосинтеза осуществляли, как описано в разделе «Материалы и методы». Образцы для анализа отбирали по окончании биотехнологического процесса, измеряли их ОП и проводили электрофоретический анализ супернатантов.

В ходе исследований установлено, что ИПТГ в конечной концентрации от 0,01 до 2 мМ не оказывает негативного влияния на литическое развитие бактериофага и ОП образцов, инфицированных фагом  $\lambda$ с1857Q<sup>R</sup>, независимо от концентрации индуктора колебалась в пределах 1,7—2,0. При этом ОП контрольного образца, в который не вносили ИПТГ, составляла также около 2,0, а в контроле с добавлением 1 мМ ИПТГ, но не инфицированном фагом, — 8,5.

Электрофоретический анализ супернатантов

фаголизатов показал, что в данной системе биосинтеза ИФН требуется несколько большая концентрация индуктора, чем в системе без использования бактериофага лямбда. На рис. 3 представлена электрофореграмма образцов, полученных в одном из таких экспериментов. Так, согласно данным электрофоретического анализа, ИФН визуально регистрируется в образце, в котором для индукции синтеза ИФН использовали ИПТГ в концентрации 0,08 мМ (дорожка 5) и его выход составляет около 6 % от растворимых белков клетки. С увеличением концентрации ИПТГ до 0,2 мМ (дорожка 7) выход ИФН повышается с 6 до 10 % и колеблется в пределах 10—11 % при концентрации ИПТГ 0,4; 0,6; 0,8 и 1 мМ (дорожки 8—11).

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что минимальная концентрация индуктора, обеспечивающая эффективный синтез рекомбинантного альфа-2b интерферона человека, различна для анализируемых в данной работе систем экспрессии на основе РНК-полимеразы фага T7 и может зависеть от температурного режима культивирования клеток штамма-продуцента *E. coli* BL21 (*pET- $\alpha$ ИФН*).

Показано, что при температуре 37 °С полная индукция достигается при конечной концентрации ИПТГ 0,06 мМ, при 21 °С — 0,1 мМ, а в системе с использованием бактериофага лямбда — 0,2 мМ. Это значительно меньше рекомендуемой концентрации 1 мМ. Поэтому поиск оптимальной концентрации индуктора может рассматриваться как один из этапов оптимизации технологии получения рекомбинантных полипептидов с использованием регулируемых промоторов.

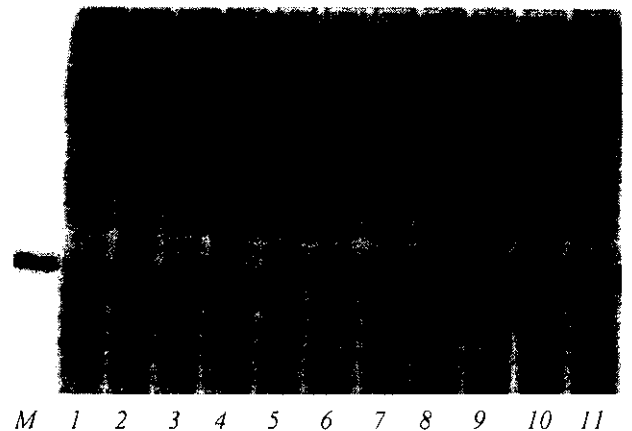


Рис. 3. Электрофореграмма супернатантов фаголизатов клеток *E. coli* BL (*pET- $\alpha$ ИФН*), культивированных при температуре 21 °С в течение 18 ч после индукции различными конечными концентрациями изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозида: 1 — 0 (контроль); 2 — 0,02; 3 — 0,04; 4 — 0,06; 5 — 0,08; 6 — 0,1; 7 — 0,2; 8 — 0,4; 9 — 0,6; 10 — 0,8; 11 — 1,0 мМ; м — маркер интерферона

Кроме того, при крупномасштабном производстве рекомбинантного интерферона, учитывая достаточно высокую стоимость ИПТГ, использование его минимальной концентрации для индукции может привести к значительному экономическому эффекту и к снижению себестоимости конечного продукта.

I. Yu. Slavchenko, E. V. Boreyko, N. V. Vorobey

Influence of various inductor concentrations on the human alpha-2b interferon production in the bacteriophage T7 RNA polymerase-base expression system in *Escherichia coli* cells

#### Summary

Various concentrations (from 0.01 up to 10 mM) of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) were used to induce the human alpha-2b interferon (IFN) biosynthesis by recombinant *E. coli* BL21 (DE3) cells, harboring plasmid pET-aIFN. The plasmid pET-aIFN carries an artificial gene for IFN, which is under the control of the gene 10 phage T7 promoter. The gene for phage T7 RNA polymerase is situated in the chromosome of *E. coli* BL21 (DE3) cells under the control of the lac-UV5 *E. coli* promoter. We have found, that a minimum concentration of IPTG, ensuring effective expression of the target protein, increases with the lowering of the producer cultivation temperature after induction. Thus, the full induction is achieved by adding IPTG to the medium in final concentration 0.06 mM at 37 °C, and 0,1 mM at 21 °C. It was shown, that the decrease of inductor concentration up to 0.01 mM did not promote accumulation of IFN in a soluble form when producer was cultivated at the temperature of 37 °C. It was also determined that IPTG in final concentration up to 2 mM did not have negative effect on the lytic development of bacteriophage lambda. As a result of the lysis of *E. coli* BL (pET-aIFN) cells, infected by phage, the recombinant protein in a soluble form accumulates immediately in a growth medium. The minimum concentration of IPTG, ensuring the maximum yield of IFN obtained by this method is 0.2 mM.

I. Ю. Славченко, О. В. Борейко, Н. В. Воробей

Вивчення впливу різних концентрацій індуктора на вихід альфа-2b інтерферону людини в системі експресії на основі РНК-полімерази фага T7 у клітинах *Escherichia coli*

#### Резюме

Біосинтез альфа-2b інтерферону людини (ІФН) у клітинах *E. coli* BL21 (DE3), які несуть плазмиду pET-aIFN, індукували різними (від 0,01 до 10 мМ) концентраціями ізопропіл- $\beta$ -D-тіогалактозиду (ІПТГ). Плазміда pET-aIFN містить штучний ген ІФН під контролем промотора гена 10 фага T7. Ген РНК-полімерази фага T7 знаходиться в хромосомі клітин *E. coli* BL21 (DE3) під контролем lac-UV5 промотора *E. coli*. Виявлено, що значення мінімальної концентрації ІПТГ, яка забезпечує ефективну експресію цільового білка, зростають із зниженням температури культивування продуцента після індукції. Так, при 37 °C повна індукція досягається внесенням до середовища ІПТГ у кінцевій концентрації 0,06 мМ, а при 21 °C—0,1 мМ. Показано, що зниження концентрації індуктора до 0,01 мМ не сприяє накопиченню ІФН у розчинній формі при культивуванні продуцента при температурі 37 °C. Також визначено, що ІПТГ у кінцевій концентрації до 2 мМ не чинить негативного впливу на літичний розвиток бактеріо-

фага лямбда і інфіковані їм клітини, що містять плазмиду, лізуються, в результаті чого рекомбінантний білок у розчинній формі накопичується безпосередньо в культуральному середовищі. Мінімальна концентрація ІПТГ, яка забезпечує максимальний вихід ІФН при цьому способі його отримання, складає 0,2 мМ.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРЫ

- Balbas P. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli* // Mol. Biotechnol.—2001.—19, N 3.—P. 251—267.
- Friebs K., Reardon K. F. Parameters influencing the productivity of recombinant *E. coli* cultivations // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.—1993.—48.—P. 53—77.
- 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.
- Sawyer J. R., Schlom J., Kashmiri S. V. The effects of induction conditions on production of a soluble anti-tumor sFv in *Escherichia coli* // Protein Eng.—1994.—7, N 11.—P. 1401—1406.
- Sriubolmas N., Panbangred W., Sriwairatana S., Meevoitison V. Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase // Appl. Microbiol. Biotechnol.—1997.—47, N 4.—P. 373—378.
- Waters S., Neujahr H. Y. A fermentor culture for production of recombinant phenol hydroxylase // Protein Exp. Purif.—1994.—5, N 6.—P. 534—540.
- Bowden G. A., Georgiou G. Folding and aggregation of beta-lactamase in the periplasmic space of *Escherichia coli* // J. Biol. Chem.—1990.—265, N 28.—P. 16760—16766.
- Donovan R. S., Robinson C. W., Glick B. R. Optimizing the expression of a monoclonal antibody fragment under the transcriptional control of the *Escherichia coli* lac promoter // Can. J. Microbiol.—2000.—46, N 6.—P. 532—541.
- Yang Q. H., Wu C. L., Lin K., Li L. Low concentration of inducer favors production of active form of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in *Escherichia coli* // Protein Exp. Purif.—1997.—10, N 3.—P. 320—324.
- Galloway C. A., Sowden M. P., Smith H. C. Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase // Biotechniques.—2003.—34, N 3.—P. 524—530.
- Славченко И. Ю., Борейко Е. В., Воробей Н. В., Черных С. И., Кордюм В. А. Суперсинтез альфа-2b интерферона человека в клетках *Escherichia coli* в растворимой форме с использованием системы экспрессии на основе РНК-полимераза фага T7 // Биополимери і клітина.—2003.—19, № 4.—С. 367-373.
- 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 // Биополимери і клітина.—2003.—19, № 2.—С. 179—184.
- Славченко И. Ю., Борейко Е. В., Воробей Н. В., Гавриш Т. Г., Пехота Е. Н., Кордюм В. А. Суперсинтез и очистка метионинаминопептидазы *Escherichia coli* // Биополимери і клітина.—2003.—19, № 3.—С.—274—280.

УДК 579.258 + 577.124  
Надійшла до редакції 30.05.03