

Изучение особенностей синтеза альфа-2b интерферона человека в клетках *Escherichia coli* при различных условиях культивирования

И. Ю. Славченко

ПНИК «Биотехнолог»

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

Исследовано влияние на уровень синтеза альфа-2b интерферона (ИФН) человека в клетках E. coli SG30 (pIF-16) наличия в питательной среде глюкозы и мальтозы, а также температуры культивирования продуцента. Продуцент ИФН содержит плазмиду pIF-16, несущую тандем искусственных генов ИФН. Конститутивную экспрессию этих генов обеспечивает тандем триптофановых промоторов. В результате исследований выявлено, что при выращивании клеток E. coli SG30 (pIF-16) при температуре 37 °С в среде, содержащей в качестве источников углерода мальтозу или глюкозу, может существенно снижаться уровень выхода ИФН по сравнению со средой без добавления этих сахаров. Показано, что выход ИФН зависит от температуры культивирования продуцента и концентрации данных сахаров в питательной среде. Глюкоза оказывает негативное влияние на синтез ИФН в более низких концентрациях, чем мальтоза. Установлено, что добавление мальтозы в культуральную среду обеспечивает более высокий выход биомассы, чем добавление глюкозы, при выращивании клеток штамма-продуцента E. coli SG30 (pIF-16) как при температуре 37, так и 28 °С.

Введение. Существующие подходы для достижения высокого уровня экспрессии чужеродных генов в *E. coli* позволяют исследователям целенаправленно конструировать рекомбинантные штаммы бактерий с прогнозируемыми свойствами (см., например, обзоры [1—3]). Уровень синтеза целевого продукта определяется удачным выбором продуцента, типа вектора, дизайна целевого гена, а также регуляторных элементов, способных обеспечить его эффективную транскрипцию и трансляцию соответствующей мРНК. Выход рекомбинантного белка во многом зависит от условий культивирования продуцента — температурного режима ведения процесса, аэрации, рН, состава питательной среды и других факторов, поскольку они оказывают влияние на все ступени реализации генетической информации. Например, и температура, и состав питательной среды могут дифференцированно влиять на инициацию трансляции индивидуальных мРНК *E. coli* [4]. Эти и другие параметры могут обуславливать

и протеолитическую активность в бактериальных клетках [5], что также сказывается на конечном выходе целевого продукта. Существенное влияние на уровень синтеза рекомбинантного белка могут оказывать величина рН [6—8] и количество растворенного кислорода в культуральной среде [6, 9]. В литературе также широко представлены данные, демонстрирующие зависимость биосинтеза белков от скорости роста бактериальных клеток (например, [9—11]). Кроме того, конечный выход целевого продукта определяется общим количеством полученной биомассы из единицы объема [12, 13]. Последние параметры, прежде всего, обеспечиваются составом питательной среды, в частности, используемым в качестве источника углерода и энергии веществом. Как правило, исследователи останавливают свой выбор на глюкозе [12—15], хотя есть примеры успешного применения и других сахаров, таких как мальтоза [16], фруктоза [17], галактоза [16], арабиноза [18].

Манипулируя составом питательной среды, исследователи разрабатывают новые подходы для увеличения вклада растворимой фракции рекомби-

нантного белка. Так, в литературе описано, что выращивание клеток штамма-продуцента в условиях осмотического стресса (например, 4 % NaCl) в присутствии веществ, стабилизирующих белок, в частности, глицерина, сорбита, глицинбетаина и др. может способствовать накоплению целевого продукта в клетках в растворимом виде [19, 20]. Существуют и другие подходы для получения рекомбинантных белков в растворимом состоянии, например, использование в биотехнологических процессах бактериофага лямбда, обеспечивающего лизис бактериальных клеток и накопление целевого продукта в растворимой форме в культуральной среде. Такая система, разработанная нами для получения альфа-2а интерферона человека в клетках *E. coli* [21], является перспективной для получения и других генно-инженерных продуктов эукариотического происхождения, в частности, альфа-2b интерферона человека.

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния на уровень синтеза альфа-2b интерферона (ИФН) человека наличия в составе питательной среды в качестве источников углерода глюкозы и мальтозы, а также температурных условий культивирования продуцента.

Материалы и методы. В работе использованы следующие бактериальные культуры: устойчивый к фагу лямбда штамм *E. coli* SG20050 (*pIF-16*) *recA* (F^- , *araD139*, Δ (*argF-lac*)*U169*, *flbB5301*, *deoC1*, *rpsL150*, *relA1*, Δ *lon-100*, *cps-50::Mu d1*) получен от В. Г. Коробко (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина, Россия). Штаммы *E. coli* SG30 и SG30 (*pIF-16*) являются его производными, чувствительными к фагу лямбда, и получены в ходе манипуляций, описанных в работах [22, 23].

Рекомбинантная плазида *pIF-16*, несущая гены ИФН, содержит в качестве генетического маркера ген *bla* (β -лактамазы), обеспечивающий устойчивость трансформированных клеток к ампициллину.

Среды. Для выращивания бактериальных культур использовали питательную среду LB [24], содержащую ампициллин в конечной концентрации 20 мкг/мл. В зависимости от условий эксперимента в среду добавляли 20 %-й раствор глюкозы или мальтозы до конечных концентраций 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 % (w/v).

Культуры поддерживали на чашках Петри с агаризованной средой LB с ампициллином без добавления сахаров. Концентрация агара в среде составляла 1,5 %.

Для определения уровня синтеза ИФН плазмидосодержащие клетки *E. coli* выращивали в пробирках с 2 мл питательной среды на качалке в

условиях интенсивной аэрации (160 об/мин) при температуре 37 или 28 °С в течение 18 ч. Среды засеивали предварительно полученным инокулятом. Инокулят выращивали в термостате при температуре 37 °С в течение ночи. Соотношение объема инокулята к объему среды составляло 1:10.

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

Для электрофоретического анализа суммарных белков клетки пробы готовили следующим образом. Предварительно определяли объем клеточной суспензии, из которой следует собирать биомассу центрифугированием в зависимости от ОП культуры (из расчета 200 мкл при ОП 5,0). Затем клетки из этого объема клеточной суспензии осаждали при 14000 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в 50 мкл буфера для нанесения (5 %-й глицерин, 3 %-й додецилсульфат натрия (SDS), 2 %-й 2-меркаптоэтанол, 0,02 %-й бромфеноловый синий). Пробы выдерживали 5 мин при температуре 100 °С и по 10 мкл наносили на полиакриламидный гель (ПААГ).

Электрофорез белков осуществляли по методу Лэммли [25] в 12,5 %-м ПААГ в присутствии 1 %-го SDS с последующим прокрашиванием в растворе кумасси R-250. Процентное содержание ИФН в плазмидосодержащих клетках устанавливали денситометрированием соответствующих дорожек геля с помощью прибора Image Master («Pharmacia Biotech», Швеция). Для определения молекулярной массы (м. м.) белков применяли программу 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.

Результаты и обсуждение. Для разработки технологии получения альфа-2b ИФН человека с использованием бактериофага лямбда нами в качестве продуцента получен чувствительный к этому фагу штамм *E. coli* SG30 (*pIF-16*) [22, 23]. Этот продуцент содержит плазмиду *pIF-16*, несущую тандем искусственных генов ИНФ [26]. Конститутивную экспрессию этих генов обеспечивает тандем триптофановых промоторов. Плазида сконструирована таким образом, что трансляция целевых генов происходит по принципу сопряжения в искусственном полицистроне [27]. Эта плазида обеспечивает в клетках *E. coli* SG20050 высокий уровень конститутивного биосинтеза рекомбинантного белка, однако он накапливается в клетке в нерастворимом состоянии [23, 28] и для выделения

активного ИФН необходимо осуществлять дезинтеграцию клеток с последующим получением из телец включений растворимого целевого продукта. Эти процедуры приводят не только к значительным потерям, но и неблагоприятно сказываются на свойствах генно-инженерного продукта, что нежелательно при его дальнейшем применении в медицинской практике. Таких технологических сложностей можно избежать при использовании в биотехнологических процессах синтеза рекомбинантных белков бактериофага лямбда. Так, наиболее высокий выход альфа-2а ИФН человека достигнут нами в трехкомпонентной системе биосинтеза, основными элементами которой являются бактериальная клетка, плаزمид, несущая целевой ген, и используемый для инфицирования плазмидосодержащих клеток *E. coli* фаг лямбда, геном которого также содержит целевой ген [21].

При разработке способов получения биологически активных веществ необходимо учитывать механизм их биосинтеза и физиологические особенности продуцента. Поскольку на выход целевого продукта существенное влияние могут оказывать такие факторы, как состав питательной среды и температурный режим, представлялось целесообразным изучить влияние на уровень экспрессии альфа-2b ИФН человека в клетках *E. coli* SG30 (*pIF-16*) наличия в питательной среде мальтозы или глюкозы и определить оптимальную температуру культивирования продуцента.

Выбор именно этих источников углерода и энергии сделан по следующим причинам. При использовании в биотехнологических процессах бактериофага λ очень важно создать оптимальные условия для литического развития фага в зараженных клетках. Адсорбция фага на бактериальной клетке является первым этапом инфекционного процесса. Добавление мальтозы в питательную среду индуцирует мальтозный оперон, в состав которого входит ген *lamB*. Продуктом этого гена является рецептор фага лямбда, необходимый для его адсорбции на бактериальной клетке. Поэтому при индукции мальтозного оперона добавлением в питательную среду мальтозы на поверхности клетки резко возрастает количество рецепторов фага λ [29]. Это способствует эффективности фаговой инфекции и может в значительной мере влиять на выход целевого продукта, который накапливается в культуральной среде в результате лизиса инфицированных фагом клеток. Наличие в составе среды такого эффективного источника углерода и энергии, как глюкоза, также может обеспечивать более высокий выход целевого продукта, поскольку клетке нужны энергия и строительный материал для

активного синтеза как целевого продукта, так и фаговых белков.

В ходе экспериментов получены неожиданные результаты. Так, установлено, что при выращивании при температуре 37 °С продуцента SG30 (*pIF-16*) на среде LB10, содержащей 0,4 % мальтозы, имело место резкое угнетение синтеза ИФН по сравнению с контролем (среда без добавления сахаров). Аналогичный результат получен и в случае добавления в среду глюкозы до конечной концентрации 0,4 %.

Такое явление не описано в литературе для продуцентов, созданных на основе штамма *E. coli* SG20050, в которых экспрессия целевого гена находится под контролем триптофановых промоторов. Поскольку это могло быть характерно только для полученного нами λ^S штамма SG30 (*pIF-16*), мы провели эксперимент по аналогичному протоколу и с исходным продуцентом ИФН *E. coli* SG20050 (*pIF-16*). Электрофоретический анализ показал, что добавление в питательную среду как мальтозы, так и глюкозы практически полностью блокирует синтез ИФН и в клетках штамма *E. coli* SG20050 (*pIF-16*) (рис. 1). Этот результат является подтверждением того, что исходный штамм *E. coli* SG20050 (*pIF-16*) и полученный нами штамм SG30 (*pIF-16*) являются изогенными и по этому признаку.

Интересным является тот факт, что в клетках, выращенных при температуре 37 °С на средах как с мальтозой, так и с глюкозой, на фоне блокирования синтеза целевого продукта наблюдается увеличение уровня синтеза полипептида с немного большей молекулярной массой (19 кДа), чем ИФН (18,4 кДа). Это имеет место и в клетках *E. coli* SG30 (*pIF-16*), и в клетках *E. coli* SG20050 (*pIF-16*) (рис. 1).

Чтобы установить, связано ли это с наличием в клетках рекомбинантной плазмиды и чужеродного продукта либо является характерной особенностью реципиента, клетки *E. coli* SG30, не содержащие плазмиду *pIF-16*, выращивали при температуре 37 °С на среде с глюкозой (0,4 %), мальтозой (0,4 %) и без них, как описано в разделе «Материалы и методы» для плазмидосодержащих клеток, и подвергали электрофоретическому анализу (рис. 2). В результате данного эксперимента показано, что увеличение синтеза полипептида с молекулярной массой 19 кДа относительно контроля (среда без сахаров) имеет место и в бесплазмидных клетках *E. coli* SG30 при их выращивании на среде с глюкозой или мальтозой (0,4 %) и не связано с наличием в клетках плазмиды и рекомбинантного белка.

Как известно, температура культивирования

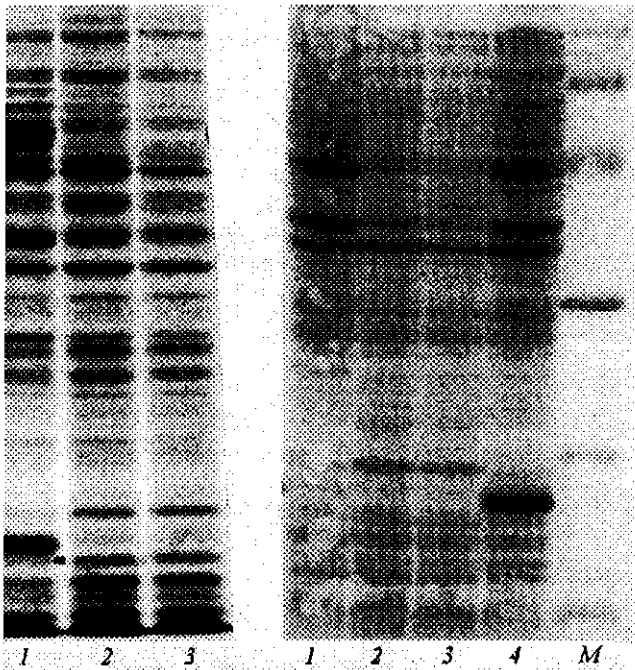


Рис. 1. Электрофореграмма образцов клеток *E. coli* SG20050 (*pIF-16*), выращенных при температуре 37 °С на средах: 1 — LB; 2 — LB с мальтозой (0,4 %); 3 — LB с глюкозой (0,4 %). Положение ИФН указано стрелкой

Рис. 2. Электрофореграмма образцов клеток *E. coli* SG30 (1—3) и SG30 (*pIF-16*) (4), выращенных при температуре 37 °С на средах: 1, 4 — LB; 2 — LB с глюкозой (0,4 %); 3 — LB с мальтозой (0,4 %); 5 — белки-маркеры. Положение ИФН указано стрелкой

ддукта может оказывать существенное влияние как на выход биомассы, так и на уровень синтеза целевого продукта. Поэтому в ходе данной работы исследовали влияние на выход биомассы и ИФН температуры культивирования продуцента SG30 (*pIF-16*) при его выращивании на среде LB с сахаров, а также с глюкозой (0,4 %) и мальтозой (0,4 %). Усредненные результаты, полученные в пяти независимых опытах, представлены на рис. Установлено, что при температуре 37 °С выход биомассы выше, чем при 28 °С, на всех средах, а именно: на среде LB без сахаров — в 1,7 раза, на среде с глюкозой (0,4 %) — в 1,3 раза, мальтозой (0,4 %) — 1,4 раза. При этом самый низкий выход биомассы как при температуре 37, так и 28 °С наблюдается на среде без добавления сахаров, а самый высокий — на среде не с глюкозой, как это следовало ожидать, а на среде с мальтозой. Следующим неожиданным результатом было то, что при температуре 28 °С на среде, содержащей как мальтозу, так и глюкозу, не наблюдается существенного снижения выхода ИФН, которое имеет место при температуре 37 °С. Это свидетельствует о том, что нарушенное нами ингибирование синтеза ИФН в клетках *E. coli* SG30 (*pIF-16*) имеет температурозависимый характер.

В ходе дальнейших экспериментов исследовали влияние на уровень синтеза ИФН концентрации мальтозы в питательной среде при культивирова-

нии клеток *E. coli* SG30 (*pIF-16*) при температурах 37 и 28 °С. Анализ электрофореграммы образцов (рис. 4) показал, что уровень синтеза ИФН в клетках, культивируемых при температурах 37 (дорожка 1) и 28 °С (дорожка 2) на среде без мальтозы, сопоставим. Выход ИФН при выращивании клеток *E. coli* SG30 (*pIF-16*) при температуре

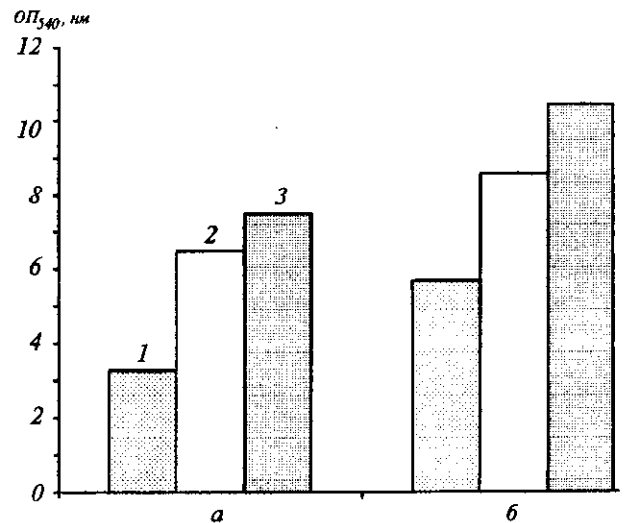


Рис. 3. Выход биомассы при выращивании продуцента при температуре 28 (а) и 37 °С (б) на средах LB без сахаров (1, контроль); с глюкозой (0,4 %) (2); мальтозой (0,4 %) (3)

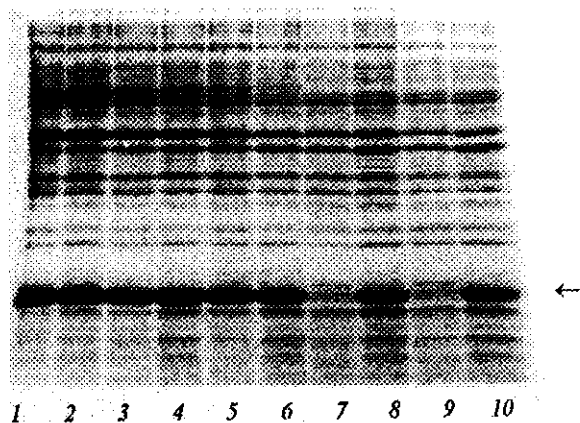


Рис. 4. Электрофореграмма образцов клеток *E. coli* SG30 (*pIF-16*), выращенных при температуре 37 (1, 3, 5, 7, 9) или 28 °С (2, 4, 6, 8, 10) на средах: 1, 2 — LB; 3, 4 — LB с мальтозой (0,1 %); 5, 6 — LB с мальтозой (0,2 %); 7, 8 — LB с мальтозой (0,3 %); 9, 10 — LB с мальтозой (0,4 %). Положение ИФН указано стрелкой

37 °С на среде, содержащей мальтозу в концентрации 0,1 (дорожка 3) и 0,2 % (дорожка 5), значительно ниже, чем в контроле (дорожка 1). При культивировании клеток при температуре 37 °С на среде, содержащей мальтозу в концентрации 0,3 (дорожка 7) и 0,4 % (дорожка 9), синтез рекомбинантного белка резко угнетен. При выращивании же продуцента при 28 °С концентрация мальтозы на синтез целевого продукта существенно не влияет (дорожки 4, 6, 8, 10) и приближается к контролю (дорожка 2).

Близкие результаты получены нами и при исследовании влияния на выход ИФН различных концентраций глюкозы в питательной среде и температуры культивирования клеток *E. coli* SG30 (*pIF-16*). Так, установлено, что при выращивании продуцента при температуре 28 °С выход целевого продукта в вариантах, содержащих глюкозу в питательной среде независимо от ее концентрации, сравним с таковым в контроле (рис. 5, а). При выращивании продуцента при температуре 37 °С в среде с концентрацией глюкозы 0,05 % уровень синтеза ИФН несколько ниже, чем в контроле, а при 0,1; 0,2; 0,3 и 0,4 % — резко угнетен (рис. 5, б). Таким образом, при выращивании продуцента *E. coli* SG30 (*pIF-16*) при температуре 37 °С максимальная концентрация глюкозы в питательной среде, при которой еще существенно не снижается выход ИФН, составляет 0,05 %, а мальтозы — 0,2 %.

Обнаруженная нами способность глюкозы и мальтозы негативно влиять на выход целевого про-

дукта проявляется подобно катаболитной репрессии, имеющей место при регуляции лактозного и более чем 100 других оперонов [30]. Однако в нашем случае наблюдается аналогичный феномен при экспрессии генов ИФН, находящихся под контролем искусственно сконструированного тандема триптофановых промоторов. Регуляция транскрипции триптофанового оперона достаточно хорошо изучена и, как известно, триптофановый промотор нечувствителен к катаболитной репрессии. Установленная в ходе данных исследований зависимость угнетения синтеза целевого продукта от концентрации глюкозы и мальтозы в культуральной среде, проявляющаяся только при повышенной температуре, является очень интересным и неожиданным результатом сама по себе, а также в связи с тем, что экспрессия генов ИФН контролируется триптофановыми промоторами. В литературе нам не удалось найти подобных данных в случае биосинтеза каких-либо белков в клетках *E. coli*.

Можно сделать предположение, что при добавлении в питательную среду глюкозы изменяется уровень синтеза бактериальных белков, которые тем или иным способом оказывают положительное или отрицательное влияние на какой-либо из этапов экспрессии чужеродного продукта. Хотя угнетение синтеза ИФН наблюдается при добавлении в питательную среду двух разных сахаров, возможно, в случае использования как глюкозы, так и мальтозы имеет место один механизм репрессии, поскольку мальтоза является дисахаридом, расщепляющимся в результате ферментативного гидролиза с образованием двух молекул глюкозы. Изучение природы описанного в данной работе феномена может послужить предметом специальных исследований, однако обнаруженные нами свойства культуры *E. coli* SG30 (*pIF-16*) позволят более целенаправленно манипулировать данными параметрами при отработке технологического процесса получения ИФН с использованием фага лямбда.

Таким образом, в результате исследований установлено, что при выращивании клеток *E. coli* SG30 (*pIF-16*) при температуре 37 °С в среде, содержащей в качестве источников углерода мальтозу или глюкозу, может существенно снижаться уровень синтеза ИФН по сравнению со средой без добавления этих сахаров. Показано, что выход ИФН зависит от температуры культивирования продуцента и концентрации данных сахаров в питательной среде. Глюкоза отрицательно влияет на синтез ИФН в более низких концентрациях, чем мальтоза. Установлено, что добавление мальтозы в культуральную среду обеспечивает более высокий выход биомассы, чем добавление глюкозы, при

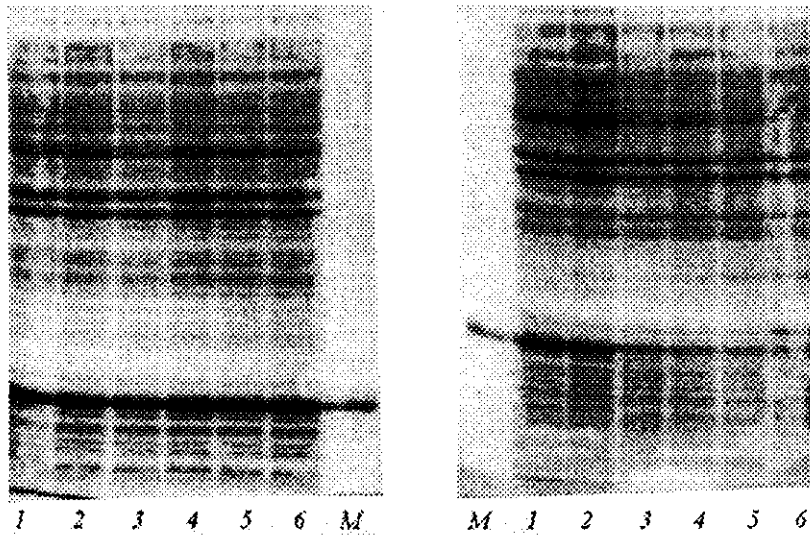


Рис. 5. Электрофореграмма образцов клеток *E. coli* SG30 (*pIF-16*), выращенных при температурах 28 (а) и 37 °С (б) на средах: 1 — LB; 2 — LB с глюкозой (0,05 %); 3 — LB с глюкозой (0,1 %); 4 — LB с глюкозой (0,2 %); 5 — LB с глюкозой (0,3 %); 6 — LB с глюкозой (0,4 %). Положение ИФН указано стрелкой

выращивании клеток штамма-продуцента *E. coli* SG30 (*pIF-16*) при температуре как 37, так и 28 °С.

Автор выражает признательность И. П. Костюченко и Е. В. Борейко за постановку отдельных экспериментов, Е. Н. Пехоте — за денситометрирование гелей и определение молекулярной массы белков, В. Г. Коробко — за предоставление штамма *E. coli* SG20050 (*pIF-16*).

I. Yu. Slavchenko

Investigation the influence of cultivation conditions on production of human alpha-2b interferon in *Escherichia coli*

Summary

The influence of glucose and maltose presence in a growth medium, as well as the temperature of producer cultivation on the production level of the human alpha-2b interferon (IFN) in *E. coli* have been studied. *E. coli* SG30 (*pIF-16*) harbouring plasmid *pIF-16* bearing tandem of the artificial IFNs genes under the control of the *trp* promoters' tandem has been used as strain-producer of IFN. Results indicate that during *E. coli* SG30 (*pIF-16*) cells cultivation at 37 degrees C in the presence of maltose or glucose as carbone source in growth medium the yield of IFN was appreciably decreased in comparison with carbons — free medium. We have also demonstrated that the level of IFN production depends on the concentration of these carbons in a medium and the cultivation temperature of producer. Glucose exerts negative influence on synthesis IFN in lower concentration, than maltose. It was shown this study, that the addition of maltose to the medium resulted higher yield of cells biomass, than the addition of glucose during growth *E. coli* SG30 (*pIF-16*) both 37, and 28 degrees C.

I. Ю. Славченко

Вивчення особливостей синтезу альфа-2b інтерферону людини в клітинах *Escherichia coli* при різних умовах культивування

Резюме

Досліджено вплив на рівень синтезу альфа-2b інтерферону

(ІФН) людини в клітинах *E. coli* SG30 (*pIF-16*) наявності у поживному середовищі глюкози і мальтози, а також температури культивування продуцента. Продуцент ІФН містить плазмиду *pIF-16*, яка несе тандем штучних генів ІФН. Конститутивну експресію цих генів забезпечує тандем триптофанових промоторів. У результаті досліджень виявлено, що при вирощуванні клітин *E. coli* SG30 (*pIF-16*) при температурі 37 °С у середовищі, що містить як джерела вуглецю мальтозу або глюкозу, може суттєво знижуватися рівень виходу ІФН порівняно з середовищем без додавання цих цукрів. Показано, що вихід ІФН залежить від температури культивування продуцента та концентрації даних цукрів у поживному середовищі. Глюкоза виявляє негативний вплив на синтез ІФН у нижчих концентраціях, ніж мальтоза. Встановлено, що додавання мальтози до культурального середовища забезпечує більш високий вихід біомаси, ніж додавання глюкози, при вирощуванні клітин штама-продуцента *E. coli* SG30 (*pIF-16*) як при температурі 37, так і 28 °С.

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. Weickert M. J., Doherty D. H., Best E. A., Olins P. O. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli* // Curr. Opin. Biotechnol.—1996.—7, N 5.—P. 494—499.
4. Jacques N., Guillerez J., Dreyfus M. Culture conditions differentially affect the translation of individual *Escherichia coli* mRNAs // J. Mol. Biol.—1992.—226, N 3.—P. 597—608.
5. Murby M., Uhlen M., Stahl S. Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli* // Protein. Exp. Purif.—1996.—7, N 2.—P. 129—136.
6. Winther-Larsen H. C., Josefsen K. D., Brautaset T., Valla S. Parameters affecting gene expression from the Pm promoter in gram-negative bacteria // Metab. Eng.—2000.—2, N 20.—P. 79—91.
7. Heyde M., Laloi P., Portalier R. Involvement of carbon source and acetyl phosphate in the external-pH-dependent expression

- of porin genes in *Escherichia coli* // J. Bacteriol.—2000.—182, N 1.—P. 198—202.
8. Chagneau C., Heyde M., Alonso S., Portalier R., Laloi P. External-pH-dependent expression of the maltose regulon and *ompF* gene in *Escherichia coli* is affected by the level of glycerol kinase, encoded by *glpK* // J. Bacteriol.—2001.—183, N 19.—P. 5675—5683.
 9. Tseng C. P., Yu C. C., Lin H. H., Chang C. Y., Kuo J. T. Oxygen- and growth rate-dependent regulation of *Escherichia coli* fumarase (FumA, FumB, and FumC) activity // J. Bacteriol.—2001.—183, N 2.—P. 461—467.
 10. Tao H., Bausch C., Richmond C., Blattner F. R., Conway T. Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media // J. Bacteriol.—1999.—181, N 20.—P. 6425—6440.
 11. Ertl P., Unterladstätter B., Bayer K., Mikkelsen S. R. Ferricyanide reduction by *Escherichia coli*: kinetics, mechanism, and application to the optimization of recombinant fermentations // Anal. Chem.—2000.—72, N 20.—P. 4949—4956.
 12. Jeong K. J., Lee S. Y. High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* and its purification // Appl. Environ. Microbiol.—1999.—65, N 7.—P. 3027—3032.
 13. Schmidt M., Babu K. R., Khanna N., Marten S., Rinas U. Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* // J. Biotechnol.—1999.—68, N 1.—P. 71—83.
 14. Charpentier B., Bardey V., Robas N., Branlant C. The EII^{Glc} protein is involved in glucose-mediated activation of *Escherichia coli* *gapA* and *gapB-pgk* transcription // J. Bacteriol.—1998.—180, N 24.—P. 6476—6483.
 15. Li X., Taylor K. B. Effect of glucose on the expression parameters of recombinant protein in *Escherichia coli* during batch growth in complex medium // Biotechnol. Progr.—1994.—10, N 2.—P. 160—164.
 16. Brautaset T., Petersen S., Valla S. An experimental study on carbon flow in *Escherichia coli* as a function of kinetic properties and expression levels of the enzyme phosphoglucosyltransferase // Biotechnol. Bioeng.—1998.—58, N 2—3.—P. 299—302.
 17. Aristidou A. A., San K. Y., Bennett G. N. Improvement of biomass yield and recombinant gene expression in *Escherichia coli* by using fructose as the primary carbon source // Biotechnol. Progr.—1999.—15, N 1.—P. 140—145.
 18. Kagawa N., Cao Q. Osmotic stress induced by carbohydrates enhances expression of foreign proteins in *Escherichia coli* // Arch. Biochem. and Biophys.—2001.—393, N 2.—P. 290—296.
 19. Barth S., Huhn M., Matthey B., Klimka A., Galinski E. A., Engert A. Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions // Appl. Environ. Microbiol.—2000.—66, N 4.—P. 1572—1579.
 20. Blackwell J. R., Horgan R. A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form // FEBS Lett.—1991.—295, N 1—3.—P. 10—12.
 21. 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.
 22. Славченко И. Ю. Отбор чувствительных к бактериофагу λ клонов из устойчивого к нему штамма *Escherichia coli* // Біополімери і клітина.—2001.—17, № 2.—С. 160—165.
 23. Славченко И. Ю. Экспрессия альфа-2b интерферона человека в различных штаммах *Escherichia coli* // Біополімери і клітина.—2001.—17, № 6.—С. 546—550.
 24. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—479 с.
 25. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—P. 680—685.
 26. 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. Великов, А. Н. Синяков, Г. Ф. Сиволобова // Опубл. в БИ № 18, 1984.
 27. Кравченко В. В., Гилева И. П., Шамин В. В., Куличков В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Чувапило С. А., Коробко В. Г. Дупликация синтетического гена лейкоцитарного интерферона человека и его экспрессия в составе полицистронных мРНК с сопряженной системой трансляции // Биоорг. химия.—1987.—13, № 9.—С. 1186—1193.
 28. Акименко Э. А., Зыков С. А., Шапров В. В., Офицеров В. И., Гилева И. П., Кравченко В. В., Сандахчиев Л. С. Химически синтезированный ген обеспечивает в клетках *Escherichia coli* биосинтез полипептида, структура которого соответствует лейкоцитарному интерферону $\alpha 2$ человека // Докл. АН СССР.—1991.—319, № 5.—С. 1248—1251.
 29. 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.—С. 521—536.
 30. Kolb A., Busby S., Buc H., Garges S., Adhya S. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein // Annu. Rev. Biochem.—1993.—62.—P. 749—795.

УДК 579.258 + 579.69

Надійшла до редакції 07.08.01