

## Экспрессия альфа-2b интерферона человека в различных штаммах *Escherichia coli*

И. Ю. Славченко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

---

*Исследована экспрессия альфа-2b интерферона (ИФН) человека в различных штаммах E. coli, несущих одну и ту же рекомбинантную плазмиду pIF-16. Установлено, что уровень синтеза ИФН в разных штаммах E. coli колеблется от электрофоретически не определяемого уровня до 35 % от суммарных белков клетки в одинаковых условиях культивирования продуцентов. Показано отсутствие связи между уровнем синтеза ИФН и генетической нестабильностью плазмид.*

---

**Введение.** Интенсивное развитие методов генетической инженерии и олигонуклеотидного синтеза позволяет в настоящее время выделять из различных объектов или химически синтезировать структурные гены, кодирующие белки как прокариотического, так и эукариотического происхождения. Высокий уровень синтеза целевого продукта достигается амплификацией кодирующего его гена в составе многокопийных векторов, оптимизацией транскрипции клонируемого гена и трансляции соответствующей мРНК.

Конечный выход целевого продукта во многом определяется и генетическими свойствами штамма продуцента. Известно, что более высокий выход целевого продукта наблюдается в штаммах, в которых стабильнее рекомбинантные молекулы и мРНК чужеродных белков, а также менее активен протеолиз. Так, в клетках *E. coli*, мутантных по гену *rnp*, ответственному за синтез фосфонуклеотидфосфорилазы [1], генам РНКазы III [2, 3] и РНКаз Е и Р [4], а также гену *ams* (alteration of mRNA stability) [5], значительно увеличивается время жизни мРНК, в результате чего может повышаться выход чужеродных продуктов. Например, время полураспада интерфероновой мРНК в мутанте *rnp* возрастает с 25 до 90 с, что приводит к двукратному увеличению выхода интерферона [6]. Чужеродные белки более стабильны в штаммах *E. coli*, дефектных по системе деградации

аномальных белков, в частности, по гену *lon*, поэтому использование в качестве продуцентов таких штаммов также может приводить к увеличению конечного выхода целевого продукта. В частности, в работе [7] показано, что в клетках, дефектных по гену *lon*, выход интерферона в 1,5–10 раз выше по сравнению с *lon*<sup>+</sup> клетками. Перспективными для синтеза чужеродных белков являются штаммы *E. coli*, дефектные по гену *htpR*, продукт которого контролирует синтез протеиназы La — продукта *lon* гена. Так, есть данные, что мутация в гене *htpR* приводит к тому, что в мутантных клетках накапливается примерно в 10 раз больше интерферона, чем в недефектном реципиенте [6]. Кроме того, в качестве продуцентов перспективно использовать штаммы, дефектные по системе рекомбинации, что вызывает стабилизацию многокопийных векторов и тем самым способствует увеличению выхода целевого продукта. Поэтому при разработке геноинженерных биотехнологий суперсинтеза особое место отводится выбору штамма-продуцента, который может нести мутации, повышающие выход целевого продукта.

Однако при получении рекомбинантных белков, предназначенных для применения в медицинской практике, имеет большое значение не только высокий выход целевого продукта, но и идентичность структурно-функциональных и антигенных характеристик полипептидов, выделенных из природных источников и их рекомбинантных аналогов. Одной из проблем, имеющих место при получении

рекомбинантных белков обычными методами, когда целевой продукт накапливается внутри бактериальных клеток, является то, что в случае суперпродукции происходит агрегация целевого продукта и образование так называемых телец включений (inclusion bodies). Это не только сильно усложняет процесс получения биологически активного препарата в ходе его выделения и очистки, при котором необходимо использовать методы, связанные с денатурацией полипептидов и последующей ренатурацией уже очищенных препаратов, но и неблагоприятно сказывается на свойствах геноинженерного продукта, что нежелательно при его дальнейшем использовании в медицинской практике.

Технологических сложностей, связанных с образованием телец включений и извлечением рекомбинантного продукта из клеток продуцента, удается избежать при использовании в биотехнологических процессах бактериофага  $\lambda$ , который обеспечивает лизис бактериальных клеток и накопление целевого продукта в растворимой форме в культуральной среде. Такая система разработана нами для получения альфа-2а интерферона (ИФН) человека в клетках *E. coli* [8] и является перспективной для получения и других геноинженерных продуктов эукариотического происхождения, в частности, альфа-2b ИФН человека.

Целью настоящей работы было исследование экспрессии альфа-2b ИФН человека в различных штаммах *E. coli*, несущих одну и ту же рекомбинантную плазмиду, и отбор наиболее перспективного продуцента для синтеза целевого продукта на основе бактериофага  $\lambda$ .

**Материалы и методы.** В работе использовали следующие штаммы *E. coli*: K802 (*hsdR<sup>+</sup>, hsdM<sup>+</sup>, gal, met, supE*), RR1 (*F, pro<sup>-</sup>, leu<sup>-</sup>, thi, lacY, supE44*), W3101 (*F, recA13, gal<sup>-</sup>*), CA77 (*HfrC, B<sup>+</sup>, Δlac*). Штаммы получены из коллекции культур отдела регуляторных механизмов клетки ИМБиГ НАН Украины. Устойчивый к фагу  $\lambda$  штамм *E. coli* SG20050 *recA (F, araD139, Δ(argF lac) U169, flbB5301, deoC1, rpsL150, relA1, Δlon-100, cps-50::Mu d1)*, а также штамм *E. coli* SG20050 (*pIF-16*) любезно предоставлены В. Г. Коробко (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина, Россия). Рекомбинантная плазида *pIF-16*, несущая гены ИФН, содержит в качестве генетического маркера ген *bla* ( $\beta$ -лактамазы), который обеспечивает устойчивость трансформированных клеток к ампициллину. Получение чувствительных к фагу  $\lambda$  клонов *E. coli* SG20050 описано в работе [9].

**Среды.** Для выращивания бактериальных культур использовали питательную среду LB [10]. Концентрация агара в агаризованной среде составляла

1,5 %. При необходимости в среду добавляли ампициллин до конечной концентрации 20 мкг/мл.

Приготовление компетентных клеток, трансформацию бактерий, выделение плазмидной ДНК, рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды осуществляли по стандартным методикам [10]. В работе использованы рестриктазы *EcoRI*, *XhoI*, *PstI* («Fermentas», Литва).

Для определения уровня синтеза ИФН плазмидосодержащие клетки *E. coli* выращивали в условиях интенсивной аэрации в 2 мл питательной среды в присутствии ампициллина до плотности  $\sim 10^9$  клеток в 1 мл клеточной суспензии. Для электрофоретического анализа суммарных белков клетки биомассу из 0,2 мл клеточной суспензии собирали центрифугированием (14000 об/мин, 5 мин) и ресуспендировали в 50 мкл буфера (5 %-й глицерин, 3 %-й додецилсульфат натрия (SDS), 2 %-й 2-меркаптоэтанол, 0,02 %-й бромфеноловый синий). Пробу выдерживали в течение 5 мин при температуре 100 °С и по 10 мкл наносили на 12,5 %-й ПААГ.

Для электрофоретического анализа растворимой и нерастворимой фракций клеточных белков клетки собирали центрифугированием, ресуспендировали в буфере, содержащем 100 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 %-ю сахарозу, 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид, 5 мМ ЭДТА, 0,2 М NaCl, 0,005 %-й тиогликоль, разрушали ультразвуковой обработкой на установке фирмы «MSE» (США) и после центрифугирования пробы для электрофореза из надосадочной жидкости и осадка готовили, как описано выше.

Электрофорез белков осуществляли по методу Лэммли [11] в 12,5 %-м ПААГ в присутствии 1 %-го SDS с последующим прокрашиванием в растворе кумасси R-250.

Процентное содержание ИФН в лизатах определяли денситометрированием соответствующих дорожек геля с помощью прибора Ultrosan XL («LKB», Швеция).

**Результаты и обсуждение.** Имеющийся в нашем распоряжении продуцент ИФН *E. coli* SG20050 (*pIF-16*) содержит плазмиду *pIF-16*, несущую тандем искусственных генов альфа-2b ИФН [12]. Конститутивную экспрессию этих генов обеспечивает тандем триптофановых промоторов. Плазида сконструирована таким образом, что трансляция целевых генов происходит по принципу сопряжения в искусственном полицистроне [13]. Как показывает анализ суммарного клеточного белка, эта плазида обеспечивает в клетках *E. coli* SG20050 достаточно высокий уровень конститутивного биосинтеза рекомбинантного белка, однако он

накапливается в клетке в нерастворимом состоянии (рис. 1).

Использование фага  $\lambda$  в биотехнологической системе синтеза белков в клетках *E. coli* позволяет получать целевой продукт в растворимом виде непосредственно в культуральной среде. При разработке таких технологий мы сталкивались с тем, что выбор штамма-продуцента является очень важным элементом работы и выход целевого продукта во многом определяется именно этим. Так, более высокий выход  $\beta$ -галактозидазы наблюдался при использовании в качестве продуцента штамма *E. coli* CA77 [14],  $\beta$ -лактамазы — штамма *E. coli* W3101 [15], а альфа-2а ИФН человека — штамма *E. coli* K802 [8]. Имеющаяся в нашем распоряжении плаزمиды с генами ИФН обеспечивала высокий выход целевого продукта в штамме *E. coli* SG20050, однако проверка показала, что этот штамм нечувствителен к бактериофагу  $\lambda$  и его нельзя использовать в системе получения биологически активных веществ с применением данного фага. Поэтому нам было необходимо исследовать экспрессию альфа-2b ИФН человека в других, чувствительных к фагу  $\lambda$  штаммах *E. coli*. В качестве реципиентов были отобраны четыре штамма *E. coli*. Три из них — CA77, W3101 и K802, как упоминалось выше, были успешно использованы нами в качестве продуцентов других белков. Четвертый штамм — RR1 выбран на основании имеющихся у нас данных, согласно которым в нем, как и в случае использования штамма *E. coli* K802, не угнеталось развитие фага, несущего ген альфа-2а ИФН человека [8].

Реципиентные штаммы *E. coli* CA77, W3101, K802 и RR1 трансформировали плазмидной ДНК, предварительно выделенной из штамма *E. coli* SG20050 (*pIF-16*), и полученные трансформанты отбирали на селективной среде, содержащей ампициллин. Для определения уровня синтеза ИФН штаммы *E. coli* CA77 (*pIF-16*), W3101 (*pIF-16*), K802 (*pIF-16*) и RR1 (*pIF-16*) культивировали, как описано в «Материалах и методах». По окончании процесса выращивания клетки подвергали электрофоретическому анализу. Сравнительный анализ электрофореграмм бесплазмидных и плазмидосодержащих клеток штаммов *E. coli* CA77, W3101 и K802 не выявил в плазмидосодержащих клетках ожидаемого полипептида с молекулярной массой 18 кДа. Только в клетках *E. coli* RR1 (*pIF-16*) по сравнению с бесплазмидными клетками отмечен синтез полипептида такой молекулярной массы, однако уровень этого синтеза был несравнимо ниже относительно уровня, имеющего место в клетках *E. coli* SG20050 (*pIF-16*) (рис. 2, дорожки 1—4).

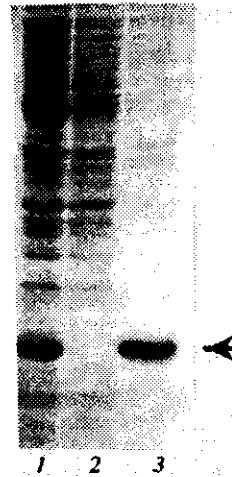


Рис. 1. Электрофореграмма образцов белковых фракций клеток *E. coli* SG20050(*pIF-16*): 1 — суммарные белки клетки; 2 — фракция растворимых белков; 3 — фракция нерастворимых белков. Положение альфа-2b-интерферона указано стрелкой

Для исключения структурной нестабильности плазмиды *pIF-16* в штаммах *E. coli* CA77 (*pIF-16*), W3101 (*pIF-16*), K802 (*pIF-16*) и RR1 (*pIF-16*) из них (а также в качестве контроля — из штамма *E. coli* SG20050 (*pIF-16*)) выделены плазмидные ДНК и подвергнуты рестриктному анализу на наличие вставки генов ИФН с помощью эндонуклеаз *EcoRI*, *XhoI*, *PstI*. Анализ показал, что плазмиды, выделенные из всех штаммов, в которых мы не регистрировали синтеза ИФН с помощью электрофоретического анализа, содержат тандем искусственного гена ИФН. Однако изменения могли иметь место на уровне точечных мутаций, микроделеций и т. д. и могли затронуть не только структурные части генов, но и регуляторные элементы. Поэтому для проверки уровня синтеза ИФН, обусловленного плазмидами, выделенными из штаммов *E. coli* CA77 (*pIF-16*), W3101 (*pIF-16*), K802 (*pIF-16*) и RR1 (*pIF-16*), их трансформировали в клетки *E. coli* SG20050. В ходе дальнейших исследований установлено, что полученные трансформанты обеспечивали синтез ИФН в количествах, сравнимых с уровнем синтеза ИФН в исходном штамме *E. coli* SG20050 (*pIF-16*).

Учитывая значительное преимущество использования штамма *E. coli* SG20050 (*pIF-16*) в качестве продуцента ИФН, мы предприняли попытку отбора чувствительных к бактериофагу  $\lambda$  клонов из устойчивого к нему штамма *E. coli* SG20050. Процедура селекции, в результате которой получены интересные нас  $\lambda^s$  клоны штамма *E. coli* SG20050, подробно описана в работе [9]. И хотя нам удалось отобрать такие клоны без применения каких-либо мутагенных факторов, не было гаран-

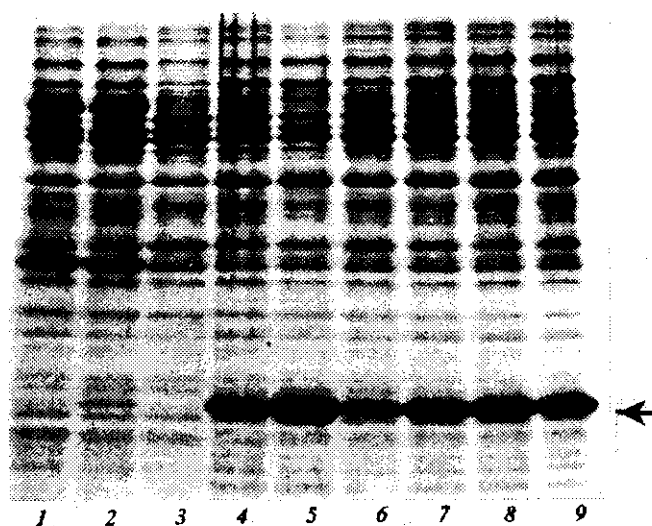


Рис. 2. Электрофореграмма образцов клеток *E. coli*: 1 — RR1; 2 — RR1(pIF-16); 3 — SG20050; 4 — SG20050(pIF-16); 5 — SG30(pIF-16); 6, 7 — SG74(pIF-16); 8, 9 — SG98(pIF-16). Положение альфа-2b интерферона указано стрелкой

тии того, что в изолированных  $\lambda^S$  клетках сохраняется способность синтеза ИФН на том же уровне, что и в исходном  $\lambda^R$  штамме *E. coli*. Три  $\lambda^S$  клона *E. coli* SG20050, обозначенных как SG30, SG74 и SG98, были трансформированы плазмидой pIF-16 и в отдельных трансформантах исследован уровень синтеза ИФН. Так, в результате эксперимента установлено, что при одинаковых условиях культивирования уровень синтеза ИФН в  $\lambda^S$  производных  $\lambda^R$  штамма *E. coli* SG20050 сравним с таковым в исходном штамме. Результаты электрофоретического анализа клонов представлены на рис. 2 (дорожки 4—9). Содержание ИФН в исходном штамме составило 10,7 % от содержания суммарных белков клетки (дорожка 4), а в  $\lambda^S$  клонах (дорожки 5—9) соответственно SG30 — 35,2 %; SG74 — 7,9 и 12,7 %; SG98 — 16,2 и 14,3 %. Наблюдаемое колебание уровня синтеза ИФН в различных  $\lambda^S$  клонах SG20050 характерно и для исходного штамма *E. coli* SG20050.

Штамм *E. coli* SG20050 является перспективным реципиентом для конструирования продуцентов методами генетической инженерии, поскольку он дефектный по системе рекомбинации, так как несет мутацию в *recA* гене, что может обеспечить генетическую стабильность векторной молекулы. Этот штамм также характеризуется низкой проте-

олитической активностью благодаря делеции в *lon* гене, кодирующем протеазу La. Поэтому на его основе получены продуценты некоторых рекомбинантных цитокинов, которые, как показано в ряде работ (например [16]), отличаются нестабильностью продукции целевого белка не только при культивировании в селективных условиях, но даже на первой стадии получения продуцента — трансформации *E. coli* SG20050 рекомбинантными плазмидами. Для решения этой проблемы можно использовать различные подходы, однако их разработка не является целью настоящего сообщения.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что уровень синтеза ИФН в разных штаммах *E. coli* колеблется от электрофоретически не определяемого уровня до 35 % от суммарных белков клетки. При этом клетки несут одну и ту же рекомбинантную плазмиду и выращиваются в одинаковых условиях. Показано, что это не связано с генетической нестабильностью плазмид. В качестве продуцента для разработки технологии биосинтеза альфа-2b ИФН человека с использованием фага  $\lambda$  отобран штамм *E. coli* SG30 (pIF-16).

Автор выражает искреннюю признательность В. А. Кордюму за ценные замечания, сделанные им при чтении рукописи, а также В. Г. Коробко — за предоставление штаммов *E. coli* SG20050 и SG20050(pIF-16).

Работа выполнена при поддержке ПНИК «Биотехнолог» (Украина).

I. Yu. Slavchenko

The expression of human alpha-2b interferon in different strains of *Escherichia coli*

Summary

The expression of human alpha-2b-interferon (IFN) in various strains of *E. coli* carrying the same recombinant plasmid pIF-16 has been investigated. The level of IFN synthesis in different *E. coli* strains is shown to vary from electrophoretically undetectable amount to 35 % of the total cell proteins under the identical conditions of producer cultivation. The difference in the levels of interferon synthesis is not related to genetic instability of the plasmids.

I. Ю. Славченко

Експресія альфа-2b інтерферону людини в різних штаммах *Escherichia coli*

Резюме

Досліджено експресію альфа-2b інтерферону (ІФН) людини в різних штаммах *E. coli*, що несуть одну й ту саму рекомбінантну плазмиду pIF-16. Виявлено, що рівень синтезу ІФН в різних штаммах *E. coli* коливається від рівня, який не визначається електрофоретично, до 35 % від сумарних білків

клітини за однакових умов культивування продуцентів. Показано відсутність зв'язку між рівнем синтезу ІФН та генетичною нестабільністю плазмід.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hautala J. A., Bassett C. L., Giles N. H., Kushner S. R. Increased expression of a eukaryotic gene in *Escherichia coli* through stabilization on its messenger RNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76.—P. 5774—5778.
2. Higgins C. P., Smith N. H. Messenger RNA processing, degradation and the control of gene expression // Regulation of gene expression — 25 Years on — 39 Symp. of Soc. for Gen. Microbiol. (April, 1986).—Cambridge, 1986.—P. 179—198.
3. Pedersen S., Reeh S., Friesen J. D. Functional mRNA half lives in *E. coli* // Mol. and Gen. Genet.—1978.—166.—P. 329—336.
4. Plautz A., Apirion D. Processing of RNA in *Escherichia coli* is limited in the absence of ribonuclease III, ribonuclease E, and ribonuclease P // J. Mol. Biol.—1981.—149.—P. 813—819.
5. Chanda P., Ono M., Kuwano M., Kung H. Cloning, sequence analysis and expression of alteration of the mRNA stability gene (*ams<sup>+</sup>*) of *E. coli* // J. Bacteriol.—1985.—161.—P. 446—449.
6. Клячко Е. В., Лысенко Е. С., Еремашвили М. Р., Козлов Ю. И., Стронгин А. Я., Шакулов Р. С. Мутации в генах *rnp* и *htpR* *Escherichia coli* стабилизируют продукты экспрессии чужеродных генов // Молекуляр. биология.—1988.—22, № 3.—С. 760—765.
7. Рыжавская А. С., Кайдалова Н. В., Анухин Ю. М., Клячко Е. В., Лившиц В. А., Стронгин А. Я. Изучение стабильности нормальных, аномальных и генноинженерных белков в штаммах *Escherichia coli*, дефицитных по внутриклеточной протеиназе La — продукте гена *lon* // Молекуляр. биология.—1988.—22, № 1.—С. 201—207.
8. Славченко И. Ю. Исследование эффективности использования бактериофага  $\lambda$  для получения  $\alpha_2$ -интерферона человека в клетках *Escherichia coli*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—Киев, 1990.—19 с.
9. Славченко И. Ю. Отбор чувствительных к бактериофагу  $\lambda$  клонов из устойчивого к нему штамма *Escherichia coli* // Биополимеры и клетка.—2001.—17, № 2.—С. 160—165.
10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—479 с.
11. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—P. 680—685.
12. 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 // Оpubл. в БИ № 18, 1984.
13. Кравченко В. В., Гилева И. П., Шамин В. В., Куличков В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Чувпило 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.
14. Пат. Украины № 2463. Способ получения  $\beta$ -галактозидазы / В. А. Кордюм, С. И. Черных, И. Ю. Славченко, В. Г. Коробко // Оpubл. в БИ № 5-1, 1994.
15. Славченко И. Ю., Черных С. И., Кордюм В. А. Исследование фагозависимого синтеза  $\beta$ -лактамазы в изогенных  $Su^+$  и  $Su^0$  штаммах *E. coli* при заражении их фагами *lbla* и *lblaQ<sup>-</sup>R<sup>-</sup>* // Ферменты микроорганизмов.—М.: ВНИИСЭНТИ, 1989.—С. 31—36.
16. Литовченко Л. Л., Кривопалова Г. Н., Каньшина А. В., Лебедев Р. Л., Пустошилова Н. М. Исследование популяции рекомбинантных штаммов *E. coli*, синтезирующих ФНО-альфа, ФНО-бета и Г-КСФ, в процессе получения биомассы // Биотехнология.—2001.—№ 3.—С. 11—17.

УДК 579.258 + 579.69  
Надійшла до редакції 23.01.2001