

## Влияние температуры на выход растворимого альфа-интерферона человека в системе суперсинтеза рекомбинантных белков с использованием бактериофага лямбда

И. Ю. Славченко

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

---

*Получение рекомбинантных белков в штаммах-продуцентах, созданных на основе Escherichia coli, требует извлечения целевого продукта из бактериальных клеток. Использование бактериофага лямбда в таких системах суперсинтеза является одним из путей решения этой задачи. В результате лизиса фагом лямбда клеток E. coli, несущих плазмиду с целевым геном, рекомбинантный белок выходит в культуральную среду. Однако в зараженной клетке фаг может развиваться как по литическому, так и по лизогенному пути. Выбор литического пути развития фага могут обуславливать различные факторы. Нами исследовано влияние температуры культивирования (37, 28 и 21 °С) инфицированных фагом λ клеток E. coli, несущих плазмиду с геном α-интерферона человека (ИФН), на выход растворимого ИФН в культуральной среде. В данной работе показано, что эффективность использования бактериофага лямбда для лизиса клеток продуцента и высвобождения растворимого ИФН в культуральную среду зависит от температуры культивирования инфицированных клеток. Максимальная концентрация растворимого целевого продукта в культуральной среде наблюдалась при температуре культивирования 21 °С, не являющейся оптимальной для литического пути развития фага. Обсуждаются возможные причины полученных результатов.*

---

**Введение.** Одной из проблем, возникающих при разработке генно-инженерных технологий получения рекомбинантных белков в клетках *Escherichia coli*, является извлечение целевого продукта из бактериальной клетки. Для этой цели используют различные методы химического (обработка детергентами, лизоцимом) или физического (обработка ультразвуком, гомогенизация на установках типа пресса Френча) разрушения клеток, а также их комбинирование. При масштабировании процесса в условиях промышленного производства сложность выделения из бактериальных клеток целевого продукта приводит к значительным потерям рекомбинантного белка. В этой связи более перспективными являются биотехнологии, обеспечивающие внеклеточное накопление целевого продукта. К ним относятся системы с использованием так называемых

секреторных векторов, которые в последние годы очень интенсивно разрабатываются, но еще не используются для промышленного получения рекомбинантных белков из продуцентов, созданных на основе *E. coli*. Преимущества и недостатки использования секреторных векторов подробно рассматриваются в обзорах [1—4].

Одной из альтернативных систем синтеза целевых продуктов, способных обеспечить их накопление в культуральной среде, является использование векторов на основе бактериофагов. В литературе описаны примеры успешного применения некоторых бактериофагов для этих целей, например, λ [5—9] и T4 [10—11]. Однако при генно-инженерном конструировании векторов, обеспечивающих эффективную экспрессию целевого гена, манипулировать с плазмидами намного легче, чем с фагами. Поэтому исследователи предпочитают создавать векторы экспрессии целевых белков на основе

мультикопийных плазмид, а литическую способность бактериофагов использовать в системах суперсинтеза рекомбинантных белков лишь для разрушения клеток штамма-продуцента.

Для осуществления данной задачи можно использовать несколько подходов. Например, штамм-продуцент трансформировать двумя плазмидами, одна из которых содержит целевой ген, а другая — ген (гены) фага, продукт которого отвечает за лизис бактериальной клетки. Так, в работе [12] авторы для лизиса и выхода целевого белка ( $\beta$ -глюкуронидаза) в культуральную среду использовали ген *t* фага T4. Другой подход состоит в создании векторов, одновременно содержащих и целевой ген, и ген (гены) лизиса. Такой вектор использован при разработке системы экспрессии проурокиназы человека, обеспечившей накопление целевого продукта в культуральной среде в результате лизиса клеток штамма-продуцента белком E фага  $\phi$ X174 [13]. Экспрессия генов фага лямбда *S*, *R* и *Rz* в составе рекомбинантных плазмид может также с успехом использоваться для программированного лизиса клеток *E. coli* [14—16]. Наряду с регулируемым синтезом белков лизиса фагового происхождения на основе клонируемых генов для этой же цели могут применяться и сами фаги. Так, в литературе описаны примеры использования в качестве продуцента штаммов, лизогенных по фагу  $\lambda$ . Для регулирования лизиса таких клеток и соответственно выхода в культуральную среду целевых белков применяют фаги лямбда с *ts* мутацией в гене репрессора *cI* [17—19]. Кроме того, как показано нами ранее, инфицирование клеток штамма-продуцента, содержащих плазмиду с рекомбинантным геном, также может обеспечивать лизис и накопление целевого продукта непосредственно в культуральной среде (например, [20]).

Целью данной работы было исследование влияния температурного режима культивирования инфицированных фагом  $\lambda$  клеток штамма-продуцента на эффективность использования бактериофага лямбда для получения альфа-2b интерферона человека (ИФН) в растворимом виде непосредственно в культуральной среде.

**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::Mu d1*) [21, 22]. Рекомбинантная плазида *pIF-16* несет тандем искусственных генов ИФН под контролем тандема триптофановых промоторов. В качестве генетического маркера она содержит ген *bla* ( $\beta$ -лактамазы), обеспечивающий устойчивость несущих ее клеток к

ампициллину. Для инфицирования продуцента использовали фаг  $\lambda$ cI857Q<sup>R</sup>⁻, источником которого служил лизогенный штамм *E. coli* K802 (*hsdR*⁺, *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, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O из расчета 1 мл 1 М раствора на 1 л среды, 10 %-й раствор мальтозы до конечной концентрации 0,5 г/л.

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

**Получение фаголизата.** Фаголизат  $\lambda$ cI857Q<sup>R</sup>⁻ получали термоиндукцией лизогенной культуры K802 ( $\lambda$ cI857Q<sup>R</sup>⁻), как описано в работе [21]. Титр определяли общепринятым двухслойным методом. Как правило, получали (1,5—3,0) · 10<sup>10</sup> 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 (ОП) 3,0. После этого инфицировали фагом  $\lambda$ 1857Q<sup>R</sup>⁻, добавляя заранее полученный фаголизат в количестве 1/5 объема культуральной среды, и продолжали культивирование в течение 18 ч при температурах 37, 28 или 21 °С.

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

Для электрофоретического анализа белков пробы готовили следующим образом. 100 мкл лизата центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в 100 мкл буфера для нанесения (5 %-й глицерин, 3 %-й DS-Na, 2 %-й  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,02 %-й бромфеноловый синий). Пробы выдерживали 5 мин при температуре 100 °С и 10 мкл образца наносили на ПААГ, что соответствует осадку клеток из 40 мкл лизата. К 40 мкл супернатанта добавляли 15 мкл буфера для нанесения и перемешивали. Пробы выдерживали 5 мин при 100 °С и весь образец наносили на ПААГ.

Электрофорез белков осуществляли по методу

Лэмбли [23] в 12,5 %-м ПААГ в присутствии 1 %-го DS-Na с последующим прокрашиванием в растворе кумасси R-250.

**Результаты и обсуждение.** Разрабатываемая технология получения альфа-2b ИФН основана на использовании рекомбинантной плазмиды *pIF-16*, несущей тандем искусственных генов ИФН под контролем тандема триптофановых промоторов. Нуклеотидная последовательность этих генов не идентична природной, поскольку на стадии химического синтеза олигонуклеотидов были предусмотрены нуклеотидные замены в искусственном гене альфа-2b ИФН, сделанные с учетом частоты встречаемости кодонов в генах белков, эффективно синтезирующихся в клетках *E. coli* [24]. При этом аминокислотная последовательность целевого белка, кодируемая синтетическим геном, полностью соответствует природной.

Другими двумя компонентами разрабатываемой технологии являются бактериальная клетка и бактериофаг  $\lambda$ . Выбор штамма-продуцента является очень важным этапом работы. В результате ранее проведенных исследований нами установлено, что максимальный уровень синтеза ИФН имеет место в штамме *E. coli* SG20050, несущем плазмиду *pIF-16* [22]. Однако этот штамм оказался нечувствительным к бактериофагу лямбда, что сделало невозможным его использование в системе получения биологически активных веществ с участием данного фага. С помощью разработанного нами метода селекции получены чувствительные к фагу  $\lambda$  изогенные производные данного штамма [21] и показано, что отобранные клоны сохранили способность к высокому уровню продукции интерферона [22]. Таким образом, специально для разработки технологии с использованием фага лямбда был получен штамм — продуцент альфа-2b ИФН человека — SG30 (*pIF-16*).

Для инфицирования штамма-продуцента использовали бактериофаг  $\lambda$ cI857Q<sup>R</sup>-, который в клетке может развиваться либо по литическому, либо по лизогенному пути. В первом случае в результате экспрессии фаговых генов образуется фаговое потомство, после чего клетка лизируется. При лизогенном пути развития фаговая ДНК интегрирует в бактериальную хромосому и передается дочерним клеткам как часть родительского генома. Выбор пути развития определяется конкуренцией белков cI (репрессор) и cro за связывание с двумя операторными участками OL и OR, перекрывающимися с промоторами pL и pR соответственно. Если преобладает белок cI, то фаг интегрирует в хромосому хозяина и клетка становится лизогенной. Если преобладает cro белок, то синтез репрес-

сора подавляется, и фаг развивается по литическому пути (см. обзор [25]). Поэтому важно создать такие условия, при которых фаг будет развиваться именно по литическому пути. Для продуктивной инфекции бактериальную культуру, как правило, культивируют при температуре 37 °С, оптимальной и для роста клеток *E. coli*, и для развития фага лямбда.

На первых этапах отработки технологического процесса получения рекомбинантного белка самое сложное — это подобрать условия, обеспечивающие электрофоретически регистрируемое содержание целевого продукта в культуральной среде. А это зависит от множества параметров, которые в совокупности должны обеспечивать как эффективный уровень экспрессии целевого гена, так и продуктивное развитие бактериофага, заканчивающееся лизисом инфицированной клетки и выходом рекомбинантного белка в культуральную среду. И только после этого можно приступать к изучению влияния на эффективность биотехнологического процесса различных факторов, таких как температурный режим, состав и pH питательной среды, аэрация, множественность инфекции, ОП и физиологическое состояние клеток в момент заражения, скорость роста штамма-продуцента до и после инфекции и т. д.

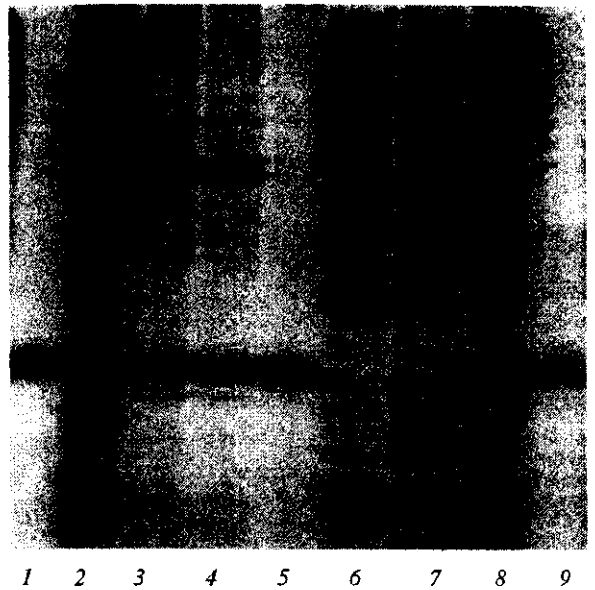
К началу выполнения данных исследований мы уже имели успешный опыт работы над различными модификациями системы суперсинтеза ряда белков с использованием бактериофага лямбда. Это ферменты *E. coli*  $\beta$ -галактозидаза и  $\beta$ -лактамаза, а также белок эукариотического происхождения альфа-2a интерферон человека. Причем разработанная технология получения альфа-2a ИФН с использованием фага лямбда обеспечивает накопление этого белка в культуральной среде в растворимом виде, что очень ценно при получении рекомбинантных белков, предназначенных для приготовления фармацевтических препаратов. Однако разработка аналогичной системы биосинтеза даже для очень близкого по аминокислотной последовательности, биологическим и биохимическим характеристикам продукта требует индивидуальных технологических решений.

Так, первые эксперименты по получению альфа-2b ИФН проводили в технологическом режиме, разработанном нами для альфа-2a ИФН человека. Однако положительных результатов нам достичь не удалось (данные не представлены), несмотря на то, что оба белка очень близки. Белковые молекулы альфа-2a и альфа-2b ИФН содержат 165 аминокислотных остатков и их последовательности идентичны за исключением аминокислоты в 23-м положе-

нии. Альфа-2b ИФН человека содержит в этом положении аргинин, а альфа-2a ИФН — лизин. Однако синтез альфа-2a ИФН человека в разработанной нами системе синтеза кодируется геном, выделенным с использованием кДНК и, следовательно, имеющим природную нуклеотидную последовательность, существенно отличающуюся от последовательности синтетического гена альфа-2b ИФН. Кроме того, ген альфа-2a ИФН экспрессируется под контролем триптофанового промотора одновременно в составе и плазмиды, и бактериофага лямбда [20]. Разрабатываемая же нами технология синтеза альфа-2b ИФН также предполагает экспрессию двух целевых генов под контролем триптофановых промоторов, однако оба они находятся в составе векторной плазмиды. И, наконец, в качестве продуцентов мы используем различные штаммы *E. coli*.

Первые положительные результаты нам удалось получить при культивировании инфицированного фагом продуцента ИФН *E. coli* SG30 (*pIF-16*) при температуре 28 °С — оптимальной для получения альфа-2a ИФН с использованием бактериофага лямбда (неопубликованные данные). Электрофоретический анализ лизата показал наличие рекомбинантного белка в супернатанте, что позволило нам исследовать влияние температуры культивирования продуцента ИФН *E. coli* SG30 (*pIF-16*) на эффективность лизиса клеток и выход целевого продукта. Результат электрофоретического анализа одного из таких экспериментов представлен на рисунке. В данном исследовании штамм-продуцент вырастили при температуре 37 °С на среде с добавлением мальтозы до ОП 3,0. Затем в культуральную среду добавили предварительно полученный фаголизат  $\lambda$ c1857Q<sup>R</sup>, после чего по 25 мл инфицированной таким образом культуры внесли в три колбы объемом 0,5 л. Дальнейшее культивирование этих образцов продолжили в одинаковых условиях аэрации, но при разных температурах — 37, 28 и 21 °С в течение 18 ч.

Электрофоретический анализ супернатантов, полученных в результате центрифугирования лизатов (рисунок), выявил четкую зависимость содержания ИФН в супернатанте от температуры культивирования инфицированного фагом продуцента. Так, максимальный выход ИФН на единицу объема наблюдался при культивировании продуцента при температуре 21 °С (дорожка 7). При 28 °С (дорожка 6) он в ~3 раза ниже. При 37 °С (дорожка 5) целевой продукт в супернатанте лизата электрофоретически не регистрировался. Это может быть следствием нескольких причин. Наиболее вероятно, что фаг при оптимальной для своего



Электрофореграмма осадков (1—3) и супернатантов (5—7) фаголизатов клеток *E. coli* SG30 (*pIF-16*), полученных при температуре 37 (1, 5), 28 (2, 6) и 21 °С (3, 7); 4 — маркер ИФН

развития температуре лизировал клетки штамма-продуцента еще до того, как в них синтезировалось достаточное количество целевого продукта. Либо целевой продукт при температуре 37 °С накапливался в культуральной среде только в виде нерастворимых телец включений и находился в осадочной фракции лизата. Так, нами показано [22], что при выращивании продуцента ИФН при температуре 37 °С целевой белок регистрируется только во фракции нерастворимых белков. Однако, если при использовании бактериофага лямбда при этой температуре он накапливается в культуральной среде все же в растворимом виде, то при температуре 37 °С он может быстро деградировать и поэтому также отсутствовать в супернатанте лизата.

Тем не менее, наличие бактериальных белков в лизатах свидетельствует о достаточно продуктивном литическом развитии фага в инфицированных клетках при всех исследуемых температурах. Полученные результаты очень интересны тем, что максимальное количество ИФН в культуральной среде мы наблюдали при культивировании инфицированных клеток при достаточно низкой температуре — 21 °С. С одной стороны, такая низкая температура могла способствовать образованию ИФН в растворимом виде (см. обзор [26]). Но, с другой, — попасть в культуральную среду он мог только в результате лизиса содержащих его клеток.

А, как известно, при низкой температуре (20—25 °С) литическое развитие фага почти полностью блокируется, поскольку при таких температурных условиях увеличивается стабильность сII белка фага лямбда [27, 28]. А он, в свою очередь, действует как активатор транскрипции с фаговых промоторов pRE, pI и paQ, что приводит к образованию белков, необходимых для лизогенного развития фага лямбда, в частности, белка-репрессора cI (см. обзор [25]). Мы же добились того, что в используемой нами системе фаг литически развивается при низкой температуре — 21 °С, да еще параллельно с процессом суперсинтеза белка гетерологичного происхождения в инфицированной клетке. Это может быть обусловлено тем, что используемый нами в качестве продуцента штамм *E. coli* SG30 несет мутацию в гене *lon*. Как известно, таким мутантам *E. coli* характерна низкая частота лизогенизации бактериофагом лямбда [29]. Показано, что при заражении *lon*-мутантов синтезируется в ~2 раза меньше лямбда репрессора, больше поздних фаговых белков и выше выход фага, чем при заражении недефектных по этому гену клеток [30]. Поэтому использование в качестве продуцентов *lon*-мутантов оправдано, с одной стороны, тем, что они характеризуются низкой протеолитической активностью, так как продуктом этого гена является протеаза La, и в таких мутантах чужеродные белки более стабильны, а, с другой стороны, тем, что в зараженной клетке фаг развивается преимущественно по литическому пути, что очень актуально при использовании бактериофага лямбда для получения рекомбинантных белков с внеклеточной локализацией.

Электрофореграммы осадка лизата также свидетельствуют об эффективности лизиса клеток, культивированных при пониженной температуре (дорожки 2, 3). Однако целевой белок в достаточном количестве присутствует и в осадке. Можно предположить, что в осадке он находится в виде нерастворимых телец включений, что характерно для белков гетерологичного происхождения при их высоком уровне экспрессии в бактериальной клетке. Кроме того, часть его может быть внутри нелизированных фагом клеток, и поэтому ИФН находится в осадке вместе с клетками. Обращает на себя внимание тот факт, что осадок лизата, полученного при температуре 37 °С (дорожка 1), содержит много бактериальных белков, что свидетельствует о большом количестве нелизированных фагом клеток. Это может быть следствием множества различных причин, например, при этой температуре может быть более выраженным токсическое влияние рекомбинантного продукта на литическое

развитие фага. Однако для изучения природы данного явления необходимы дополнительные эксперименты.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что бактериофаг лямбда может с успехом использоваться для получения альфа-2b ИФН. При этом целевой продукт в результате лизиса зараженных клеток штамма-продуцента накапливается в растворимом виде в высокой концентрации непосредственно в культуральной среде. Показано, что эффективность данного процесса существенно зависит от температурного режима культивирования инфицированных клеток штамма-продуцента.

*I. Yu. Slavchenko*

The influence of temperature on the yield soluble human alpha interferon in the system of recombinant proteins overproduction using bacteriophage lambda

Summary

*The recombinant proteins synthesized in E. coli cells are in need of their extraction from the host cells. Using bacteriophage lambda for infection of E. coli cells harbouring plasmid with target gene is one of the way of solving of this problem. As a result of lysis of E. coli cells by phage intracellular target protein release to the growth medium. However, phage is able to enter either of two alternative modes of development upon infection of E. coli — lytic and lysogenic pathways. The different conditions affect on choose the lytic pathway. The influence of cultivation temperature (37, 28 and 21 °C) of E. coli cells harbouring plasmid with human alpha interferon gene infected by phage λ on yield soluble interferon (IFN) in growth medium have been investigated. In this study it was shown that efficiency of bacteriophage lambda using for lysis producer and release to the growth medium soluble IFN depends on temperature of cultivation of infected cells. The maximum concentration of soluble target protein in cultural medium was observed at cultivation temperature 21 °C which is not optimal for lytic pathway of phage lambda development. The possible reasons of this result have been discussed.*

*I. Ю. Славченко*

Вплив температури на вихід розчинного альфа-інтерферону людини в системі суперсинтезу рекомбінантних білків з використанням бактеріофага лямбда

Резюме

*Отримання рекомбінантних білків у штаммах-продуцентах, створених на базі Escherichia coli, потребує виділення цільового продукту з бактеріальних клітин. Використання бактеріофага лямбда в таких системах суперсинтезу є одним з шляхів розв'язання цієї задачі. В результаті лізису фагом клітин E. coli, що несуть плазмиду з цільовим геном, рекомбінантний білок виходить у культуральне середовище. Однак в інфікованій клітині фаг може розвиватися як за літичним, так і лізогенним шляхом. Вибір літичного шляху розвитку фага можуть обумовлювати різні фактори. Нами досліджено вплив температури культивування (37, 28 і 21 °С) інфікованих фагом λ клітин E. coli, що несуть плазмиду з геном альфа-інтерферону людини (ІФН), на вихід розчинного*

ІФН у культуральному середовищі. В цій роботі показано, що ефективність використання бактеріофага лямбда для лізису клітин продуцента і виходу розчинного ІФН у культуральне середовище залежить від температури культивування інфікованих клітин. Максимальна концентрація розчинного цільового продукту в середовищі спостерігалася при температурі 21 °С, яка не є оптимальною для літичного розвитку фага. Обговорюються можливі причини отриманих результатів.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Pines O., Inouye M. Expression and secretion of proteins in *E. coli* // Mol. Biotechnol.—1999.—12, N 1.—P. 25—34.
2. Blight M. A., Holland I. B. Heterologous protein secretion and the versatile *Escherichia coli* haemolysin translocator // Trends Biotechnol.—1994.—12, N 11.—P. 450—455.
3. Sandkvist M., Bagdasarian M. Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria // Curr. Opin. Biotechnol.—1996.—7, N 5.—P. 505—511.
4. Дебабов Д. В. Гетерологічна секреція в системі *Escherichia coli* // Молекуляр. біологія.—1994.—28, № 3.—С. 496—505.
5. Moir A., Brammar W. J. The use of specialised transducing phages in the amplification of enzyme production // Mol. and Gen. Genet.—1976.—149.—P. 87—99.
6. Drew R. E., Clarke P. H., Brammar W. J. The construction in vitro of derivatives of bacteriophage lambda carrying the amidase genes of *Pseudomonas aeruginosa* // Mol. and Gen. Genet.—1980.—177, N 2.—P. 311—320.
7. А. с. СССР № 600175. Способ биосинтеза биологически активного вещества / В. А. Кордюм, С. И. Черных // Оpubл. в БИ. № 12, 1978.
8. 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 *lambda* и *lambda*Q<sup>R</sup> // Ферменты микроорганизмов.—М.: ВНИИ-СЭНТИ, 1989.—С. 31—36.
9. Steffen D., Schleif R. Overproducing araC protein with lambda-arabinose transducing phage // Mol. and Gen. Genet.—1977.—157, N 3.—P. 333—339.
10. Weiss B., Jacquemin-Sablon A., Live T. R., Fareed G. C., Richardson C. C. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4 // J. Biol. Chem.—1968.—243, N 17.—P. 4543—4555.
11. Shub D. A., Casna N. J. Bacteriophage T4, a new vector for the expression of cloned genes // Gene.—1985.—37, N 1—3.—P. 31—36.
12. Morita M., Asami K., Tanji Y., Unno H. Programmed *Escherichia coli* cell lysis by expression of cloned T4 phage lysis genes // Biotechnol. Progr.—2001.—17, N 3.—P. 573—576.
13. Blasi U., Kalousek S., Lubitz W. A bifunctional vector system for controlled expression and subsequent release of the cloned gene product by phi X174 lysis protein-E // Appl. Microbiol. Biotechnol.—1990.—33, N 5.—P. 564—568.
14. Garrett J., Fusselman R., Hise J., Chiou L., Smith-Grillo D., Schulz J., Young R. Cell lysis by induction of cloned lambda lysis genes // Mol. and Gen. Genet.—1981.—182, N 2.—P. 326—331.
15. Kloos D. U., Stratz M., Guttler A., Steffan R. J., Timmis K. N. Inducible cell lysis system for the study of natural transfor-
16. Kalousek S., Schrot G., Lubitz W., Blasi U. Expression of the *Alcaligenes eutrophus phbA* gene in *Escherichia coli* using a positive selection vector based on phage Lambda lysis genes // J. Biotechnol.—1994.—33, N 1.—P. 15—19.
17. Srivastava R., Ali S. S., Srivastava B. S. Cloning of xylanase gene of *Streptomyces flavogriseus* in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda-induced lysis for the release of cloned enzyme // FEMS Microbiol. Lett.—1991.—62, N 2—3.—P. 201—205.
18. Pat. GB 2143238A. A method for enzyme liberation from bacterial cells / A. S. Breeze // Publ. date 06.02.1985.
19. Pat. USA 4,637,980. Externalization of product of bacteria / J. I. Auerbach, M. Rosenberg // Publ. date 20.01.1987.
20. Славченко И. Ю. Исследование эффективности использования бактеріофага  $\lambda$  для получения  $\alpha 2$  інтерферона человека в клетках *Escherichia coli*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—Киев, 1990.—19 с.
21. Славченко И. Ю. Отбор чувствительных к бактеріофагу  $\lambda$  клонов из устойчивого к нему штамма *Escherichia coli* // Биополімери і клітина.—2001.—17, № 2.—С. 160—165.
22. Славченко И. Ю. Экспрессия альфа-2b интерферона человека в различных штаммах *Escherichia coli* // Биополімери і клітина.—2001.—17, № 6.—С. 546—550.
23. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—P. 680—685.
24. 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.
25. Пташине М. Переключение генов. Регуляция генной активности и фаг  $\lambda$ .—М.: Мир, 1989.—160 с.
26. Schein C. H. Production of soluble recombinant proteins in bacteria // BioTechnology.—1989.—7, N 11.—P. 1141—1149.
27. Obuchowski M., Shotland Y., Koby S., Giladi H., Gabig M., Wegrzyn G., Oppenheim A. B. Stability of CII is a key element in the cold stress response of bacteriophage lambda infection // J. Bacteriol.—1997.—179, N 19.—P. 5987—5991.
28. Giladi H., Goldenberg D., Koby S., Oppenheim A. B. Enhanced activity of the bacteriophage lambda PL promoter at low temperature // FEMS Microbiol. Rev.—1995.—17, N 1—2.—P. 135—140.
29. Walker J. R., Ussery C. L., Allen J. S. Bacterial cell division regulation: lysogenization of conditional cell division mutants of *Escherichia coli* by bacteriophage // J. Bacteriol.—1973.—113, N 3.—P. 1326—1332.
30. Truitt C. L., Haldenwang W. G., Walker J. R. Interaction of host and viral regulatory mechanisms: effect of the *lon* cell division defect on regulation of repression by bacteriophage lambda // J. Mol. Biol.—1976.—105, N 2.—P. 231—244.