

Особенности экспрессии целевого гена в составе вектора на основе бактериофага лямбда и изучение путей ее оптимизации

И. Ю. Славченко^{1, 2}, В. А. Шмидт¹, С. И. Черных^{1, 2}, В. А. Кордюм^{1, 2}

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

² ПНИК «Биотехнолог»

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

*Рекомбинантные молекулы на основе бактериофага лямбда отличаются высокой сегрегационной стабильностью в лизогенном состоянии и высоким уровнем амплификации фаговой ДНК и соответственно встроенного в нее целевого гена при литическом развитии фага, которое заканчивается лизисом бактериальной клетки и высвобождением целевого продукта в культуральную среду. Это делает перспективным использование фага лямбда для получения рекомбинантных белков. В данном сообщении описано конструирование фага λrIF , несущего две копии искусственного гена интерферона (ИФН) человека под контролем тандема триптофановых промоторов. Экспрессию чужеродных генов осуществляли термоиндукцией клеток, несущих фаг с генами ИФН, а также инфекцией этим фагом реципиентных клеток. Показано, что выход рекомбинантного белка зависит от оптической плотности клеток при термоиндукции и последующего температурного режима культивирования продуцента. Увеличение содержания ИФН в лизатах после индукции также наблюдали при использовании Q^+R^- амбер-мутантов фага λrIF . Показано, что инфицирование реципиентных клеток фагом λrIF обеспечивало более высокий выход ИФН (около 40 мг/л), чем термоиндукция клеток *Escherichia coli*, несущих фаг с целевыми генами.*

Введение. Одним из способов повышения выхода целевого продукта является увеличение в клетке количества копий целевого гена. Для амплификации генов в клетках *Escherichia coli* используют векторы на основе мультিকопийных плазмид, нитчатых фагов (например, M13) и бактериофага лямбда. Известны примеры эффективной экспрессии нескольких копий целевого гена в составе вектора, обеспечивающие повышение выхода рекомбинантного белка [1—4]. Так, при клонировании двух, трех и четырех копий гена альфа-8 интерферона в составе рекомбинантной плазмиды имело место пропорциональное увеличение синтеза интерферона по сравнению с плазмидой, несущей одну копию этого гена [1]. В работе [4] достигнут высокий уровень экспрессии глицеролкиназы при клонировании четырех копий целевого гена в составе

вектора на основе бактериофага лямбда. Хотя имеются примеры [5—8] успешного использования для суперсинтеза целевых белков фагов лямбда, полученных как *in vivo*, так и *in vitro*, тем не менее, векторы на основе фага лямбда очень широко применяют для клонирования целевого гена, а для достижения высокоэффективной экспрессии, как правило, гены встраивают в плазмидные векторы под контроль сильных и регулируемых промоторов. Прежде всего это обусловлено тем, что при выполнении генно-инженерных работ манипулировать плазмидной ДНК более удобно, чем фаговой. Однако использование бактериофагов для биосинтеза рекомбинантных белков имеет определенные преимущества. Как известно, выход целевых продуктов во многом зависит от стабильности рекомбинантных молекул в процессе хранения и культивирования клеток продуцента. Но исследователи часто сталкиваются с проблемой сегрегационной нестабильности рекомбинантных плазмид. Она при-

водит к уменьшению числа репликонов, что увеличивает образование в процессе деления бесплазмидных клеток и соответственно уменьшению конечного выхода целевого продукта.

В то же время рекомбинантные молекулы, сконструированные на основе бактериофага лямбда, не утратившего способности к интеграции в бактериальную хромосому и дальнейшему исключению из нее, характеризуются стабильностью в лизогенном состоянии (интегрированном в бактериальную хромосому) [9, 10] и способностью к 100—200-кратной амплификации клонируемых генов при литическом развитии фага.

Еще одним преимуществом использования фаговых векторов в биотехнологическом процессе является то, что литическое развитие фага заканчивается лизисом бактериальной клетки и в результате этого рекомбинантный белок самопроизвольно высвобождается из клеток в культуральную среду. А это позволяет избежать технологических сложностей, связанных с извлечением целевого продукта из бактериальных клеток, особенно в условиях крупномасштабного производства. Амплификация генов в составе фага λ достигается индукцией лизогенных или инфекцией реципиентных клеток. Выражение привнесенных генов может контролироваться как собственным промотором, так и одним из фаговых.

В представленной работе исследовали эффективность экспрессии рекомбинантного альфа-2b интерферона (ИФН) человека, информация о синтезе которого привносилась в клетки *E. coli* бактериофагом лямбда. В исследуемой нами системе биосинтеза рекомбинантного белка увеличение дозы целевого гена достигалось путем амплификации фагового вектора, несущего две копии гена ИФН. Изучение эффективности различных подходов для оптимизации экспрессии рекомбинантного гена в составе лямбда-вектора и явилось основной целью данной работы.

Материалы и методы. В работе использованы следующие штаммы *E. coli* и бактериофага лямбда: K802 (*hsdR*⁺, *hsdM*⁺, *gal*⁻, *met*⁻, *SupE*), CA77 (*HfrC*, *B₁*⁻, Δ *lac*), RLM1 (*thr*⁻, *leu*⁻, *lac*⁻, *tonA*, *SupE*), SG30 (*recA*, *F*⁻, *araD139*, Δ (*argF lac*)*U169*, *flbB5301*, *deoC1*, *rpsL150*, *relA1*, Δ *lon-100*, *cps-50::Mu d1*, λ^S), SG30 (*pIF-16*), несущий плазмиду с двумя генами ИФН под контролем тандема триптофановых промоторов и геном *bla*. Плазмида *pIF-16* любезно предоставлена В. Г. Коробко (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва). Источниками фагов λ *plac5cI857Q⁻R⁻* (*plac5cI857-Qam117Ram54*), λ *cI857Q⁻R⁻* (*cI857Qam117Ram54*), λ *cI857* (*cI857*) и λ ZUV5 (*plac5cI857* Δ (*sHindIII*

*\lambda*2-*sHindIII*3) *sRI* λ^0 3*sRI* λ^0 4*sRI* λ^0 5 Δ (*sRI lacZ-sHaeIII lacZ*) UV5) служили лизогенные штаммы K802 (λ *plac5cI857Q⁻R⁻*), K802 (λ *cI857Q⁻R⁻*), K802 (λ *cI857*) и штамм 300074 (*Hfr*, *lac*⁻74), лизогенный по фагу λ ZUV5. Штаммы получены из коллекции культур отдела регуляторных механизмов клетки ИМБиГ НАН Украины и ПНИК «Биотехнолог».

Среды. Для выращивания бактериальных клеток использовали жидкую питательную среду Аминопептид производства Ленинградского завода медпрепаратов, представляющую собой ферментативный гидролизат белка. На ее же основе готовили 1,5 %-ю и 0,5 %-ю агаризованные среды. При необходимости в среду добавляли ампициллин до конечной концентрации 20 мкг/мл, а также MgSO₄ из расчета 1 мл 1 М раствора на 1 л среды и 10 %-й раствор мальтозы до конечной концентрации 0,5 г/л.

Получение фаголизатов. Фаголизаты получали термоиндукцией лизогенных культур, как описано в работе [11]. Титр определяли общепринятым двухслойным методом. В качестве индикаторной культуры при титровании фага использовали штамм *E. coli* RLM1. Как правило, получали (1,0—2,5) · 10¹⁰ БОЕ/мл лизата.

Культивирование продуцента. Для получения целевого продукта индукцией лизогенных клеток, несущих в своем геноме рекомбинантные фаги с генами ИФН, питательную среду засеивали инокулятом, предварительно выращенным в термостате при температуре 28 °С в течение ночи. Соотношение объема инокулята к объему среды составляло 1:5. Культуру выращивали на качалке в условиях интенсивной (160 об/мин) аэрации при температуре 28 °С до оптической плотности 1,0. Затем выдерживали при температуре 43 °С в течение 20 мин и помещали в условия интенсивной аэрации при температуре 37 °С до наступления полного лизиса культуры (до 1,5 ч). В отдельных экспериментах изменяли оптическую плотность культуры при термоиндукции и температуру последующего культивирования продуцента, о чем отдельно указано в тексте.

Инфицирование реципиентных клеток. Для получения целевого продукта инфицированием реципиентных клеток в питательную среду вносили растворы мальтозы и MgSO₄, засеивали инокулятом *E. coli* SG30 или SG30 (*pIF-16*), предварительно выращенным в термостате при температуре 37 °С в течение ночи. Соотношение объема инокулята к объему среды составляло 1:10. Культуру выращивали на качалке в условиях интенсивной (160 об/мин) аэрации при температуре 37 °С до оптической плотности 3,0. После этого инфицировали

фагом с множественностью 5—10 корпускул на клетку и продолжали культивирование в течение 18 ч при температуре 21 °С.

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

Все генно-инженерные манипуляции, в том числе приготовление компетентных клеток, трансформацию и трансфекцию бактерий, выделение плазмидной и фаговой ДНК, гидролиз эндонуклеазами рестрикции, лигирование и электрофоретическое разделение фрагментов ДНК, проводили по стандартным методикам [12].

Рекомбинация *in vivo* фагов λ plac5cI857Q⁻R⁻ и λ pIF. Лизогенную культуру K802(λ plac5cI857Q⁻R⁻) выращивали в жидкой питательной среде при 28 °С в условиях интенсивной аэрации до плотности $\sim 1 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл и заражали фагом λ pIF с множественностью 5 корпускул на клетку. Для адсорбции фага на бактериальных клетках инфицированную культуру выдерживали 30 мин при 20 °С, а затем разводили ее в 100 раз 0,14 М раствором NaCl. Для повышения частоты рекомбинации культуру облучали ультрафиолетом, затем в 50 раз разводили питательной средой, 20 мин выдерживали при 42 °С, интенсивно аэрировали в течение 2 ч при 37 °С, после чего клетки разрушали хлороформом. Полученный таким образом лизат титровали на газоне культуры K802(Su^+). Затем каждую из полученных блюшек откалывали на две чашки с 1,5 %-й агаризованной средой, на которую наслаивали 0,5 %-й бактериальный агар, содержащий клетки Su^+ штамма *E. coli* K802 (одна для дифференциации фагов, другая — как источник отобранных фаговых клонов для дальнейшей лизогенизации), и еще на одну чашку с агаром, содержащим клетки Su^0 штамма *E. coli* CA77.

Клоны фага, образующие зоны лизиса на газоне *E. coli* K802(Su^+), и не образующие зон лизиса на газоне *E. coli* CA77(Su^0), несли амбер-мутации в Q и R генах. Для отбора пятен, образованных фагами λ pIFQ⁻R⁻, на них наносили каплю раствора (4 мг/мл в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0) о-нитрофенил- β -D-галактозид (ОНФГ), являющегося субстратом для β -галактозидазы, информацией о синтезе которой несет фаг λ plac5cI857Q⁻R⁻. Если в месте нанесения появлялась желтая окраска, то данная зона лизиса образована фагом λ plac5cI857Q⁻R⁻, в лизате которого присутствуют β -галактозидаза, расщепляющая ОНФГ с образованием нитрофенола, обуславливающего появление желтой окраски. Искомые фаги не содержат гена β -галактозидазы и при нанесении раствора ОНФГ на зоны лизиса, образованные ими, желтой окраски не

появлялось. Для получения лизогенных культур, несущих такие профаги, соответствующие пятна с параллельной чашки откалывали в бактериальный агар K802(Su^+), содержащий ампициллин, и инкубировали при температуре 28 °С в течение 1 сут. Поскольку полученный фаг λ pIFQ⁻R⁻ привносит в клетку маркер устойчивости к ампициллину, то вокруг места укола лизогенизированные им клетки образовывали зону роста. Выросшие бактерии рассевали на агаризованную среду, содержащую ампициллин, и инкубировали при 28 °С. Затем отдельные колонии откалывали на две чашки, одну из которых выдерживали при 28, а другую при 43 °С. Колонии, выросшие на среде с антибиотиком при 28 °С и не выросшие при 43 °С, отбирали для получения фаголизатов, которые затем титровали на Su^0 и Su^+ индикаторных культурах. Фаги, дающие на CA77(Su^0) титр, на несколько порядков ниже, чем на K802(Su^+), отбирали как несущие фаги λ pIFQ⁻R⁻ и использовали в исследованиях.

Определение количественного содержания ИФН в лизатах осуществляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) согласно [13]. Для анализа использовали мышинные моноклональные и кроличьи поликлональные антитела (АТ) к альфа-ИФН, антикроличьи АТ, конъюгированные с пероксидазой хрена производства ТОО «Протеиновый контур» (Россия). В качестве стандарта использовали препарат α 2-ИФН человека, полученный от В. П. Кузнецова (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Россия). Оптическую плотность в лунках определяли при 492 нм на приборе «Multiskan» («Flow-Lab», Великобритания).

Результаты и обсуждение. Для изучения уровня экспрессии целевых генов в составе вектора на основе бактериофага лямбда и путей ее оптимизации нами сконструированы рекомбинантные фаги, несущие тандем генов ИФН. В качестве лямбда-вектора использовали вектор λ ΔZUV5, содержащий уникальный *EcoRI* сайт рестрикции и позволяющий встраивать в него клонируемые фрагменты ДНК под контроль *lac* промотора, несущего UV5 мутацию [14]. В данном векторе 11,5 % генома deletировано и поэтому его емкость позволяет встраивать в него чужеродный фрагмент ДНК величиной до 6,7 тыс. п. н. Источником информации для синтеза целевого продукта служила имеющаяся в нашем распоряжении плаزمида *pIF-16*, несущая тандем искусственных генов ИФН (рис. 1). Конститутивную экспрессию этих генов обеспечивает тандем триптофановых промоторов. Плазмида сконструирована таким образом, что трансляция целевых генов происходит по принципу сопряже-

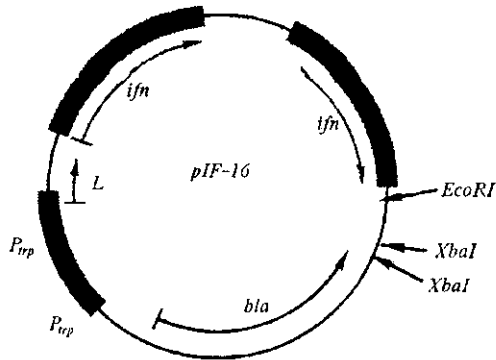


Рис. 1. Схема плазмиды *pIF-16*. Указаны *EcoRI*- и *XbaI*-сайты рестрикции, использованные при клонировании плазмидной ДНК в лямбда-вектор. P_{trp} и L — соответственно промотор и часть гена лидерного пептида триптофанового оперона [15]

ния в искусственном полицистроне [15]. Размер плазмиды *pIF-16* (~ 4,8 тыс. п. н.) и наличие в ней уникального *EcoRI*-сайта рестрикции, который не затрагивает ни генов интерферона, ни тандема триптофановых промоторов, делают возможным встраивание в фаговый вектор всей плазмидной ДНК, включая тандем генов ИФН, тандем триптофановых промоторов и ген *bla*, детерминирующий устойчивость клеток к ампициллину. Для конструирования рекомбинантного фага, несущего плазмиду с двумя генами ИФН, можно также использовать и *XbaI*-сайт рестрикции, который в фаге находится на расстоянии ~2,2 тыс. п. н. от *EcoRI*-сайта (рис. 2). ДНК плазмиды *pIF-16* имеет два *XbaI*-сайта рестрикции на расстоянии всего 102 п. н. друг от друга и 496 п. н. от *EcoRI*-сайта (рис. 1). В данной работе конструирование рекомбинантного фага с генами ИФН проводили в двух вариантах.

В первом варианте предварительно выделенную фаговую и плазмидную ДНК подвергали гидролизу *EcoRI*-рестриктазой и полученные *EcoRI*-

фрагменты обрабатывали ДНК-лигазой. В этом случае фаговый вектор использовали как вектор внедрения. В сконструированных таким образом рекомбинантных фагах гены интерферона могут быть в двух различных ориентациях и в зависимости от этого на их транскрипцию могут влиять либо P_L и P_{lac} промоторы (рис. 3, а), либо P_R промотор фага (рис. 3, б).

Во втором варианте ДНК фага и плазмиды подвергали совместному гидролизу *EcoRI*- и *XbaI*-рестриктазами и полученные *EcoRI-XbaI*-фрагменты обрабатывали ДНК-лигазой. В этом случае фаговый вектор использовали как вектор замещения, меняя *EcoRI-XbaI*-фрагмент ДНК фага на *EcoRI-XbaI*-фрагмент ДНК плазмиды. При этом фаг должен содержать вставку с заведомо известной ориентацией. В таких рекомбинантных фагах отсутствует P_{lac} промотор, поскольку он входит в состав замещенного *EcoRI-XbaI*-фрагмента фага и поэтому на транскрипцию генов ИФН в фагах такой конструкции может оказывать влияние только P_L промотор (рис. 3, в).

Полученные, как описано выше, рекомбинантные фаговые ДНК трансфицировали в реципиентные клетки, размножали на бактериальном газоне и использовали для лизогенизации клеток штамма *E. coli* K802. Лизогены, дающие рост при температуре 28 °С на среде с ампициллином, отбирали как содержащие рекомбинантные фаги. Поскольку используемый нами в качестве вектора фаг $\lambda\Delta ZUV5$ несет *ts*-мутацию в *cl*-гене, кодирующем репрессор, то термоиндукция этих лизогенов приводит к литическому развитию фага, в ходе которого происходит выщеление профага из бактериальной хромосомы, амплификация фагового генома и вновь синтезированные копии фаговой ДНК упаковываются в белковую оболочку. Из полученных фаговых корпускул выделяли ДНК рекомбинантных фагов и анализировали ее с помощью эндонуклеаз *XbaI*, *XhoI*, *EcoRI*, *KpnI*. В результате отобра-

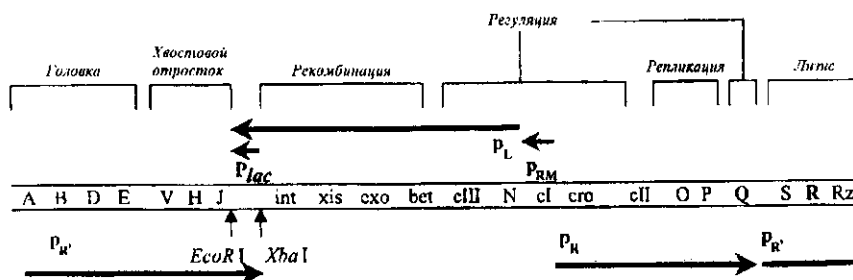


Рис. 2. Карта генома бактериофага лямбда. Указаны наиболее важные гены и их роль в развитии фага. Направление транскрипции, инициируемой с P_L , P_R , P_R' , P_{DM} промоторов, а также с P_{lac} промотора в векторе $\lambda\Delta ZUV5$ указано толстыми стрелками. Тонкими стрелками показано расположение уникальных *EcoRI*- и *XbaI*-сайтов рестрикции в ДНК фага $\lambda\Delta ZUV5$, использованных для клонирования плазмидной ДНК, несущей гены интерферона в данный вектор. Масштаб не соблюден

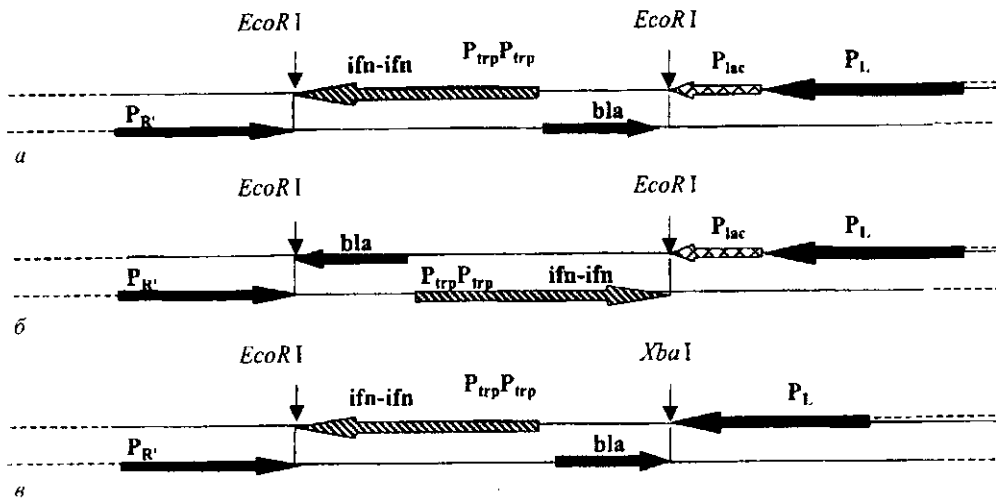


Рис. 3. Схематическая карта рекомбинантных молекул фага λrIF , полученных встраиванием ДНК плазмиды $pIF-16$ в лямбда-вектор $\lambda\Delta ZUV5$: а, б — плазмиды $pIF-16$ встроены по $EcoRI$ -сайту; направление транскрипции генов интерферона (ifn) в варианте а совпадает с направлением транскрипции с промоторов P_L и P_{lac} , в варианте б — с промотора $P_{R'}$; в — $EcoRI$ - $XbaI$ -фрагмент ДНК плазмиды заменен на $EcoRI$ - $XbaI$ -фрагмент ДНК фага $\lambda\Delta ZUV5$; направление транскрипции генов интерферона совпадает с направлением транскрипции с промотора P_L .

ны все три ожидаемых варианта рекомбинантных фагов, несущих вставку с двумя генами ИФН.

В ходе дальнейших исследований установлено, что наличие в клетке профага с двумя генами интерферона не оказывает на нее неблагоприятного воздействия, в частности, не вызывает снижения скорости роста культуры и накопления биомассы при 28 °С. В случае выращивания лизогенной культуры при такой температуре рекомбинантный фаг интегрирован в бактериальную хромосому, реплицируется вместе с ней и передается дочерним клеткам как часть родительского генома. При этом P_L и P_R промоторы фага репрессированы и, следовательно, репрессировано выражение всех фаговых генов, за исключением гена-репрессора cI (рис. 2). Однако в сконструированных в данной работе фагах гены ИФН и bla находятся под контролем собственных промоторов и поэтому конститутивный синтез продуктов этих генов может иметь место как при лизогенном, так и при литическом развитии фага. Если рекомбинантный фаг содержит lac -промотор, то транскрипция, инициируемая с этого промотора, также не подвержена фаговой регуляции.

Хотя экспрессия целевого продукта возможна и при лизогенном пути развития фагов с генами ИФН, ожидать высокого выхода рекомбинантного белка при культивировании лизогенных клеток нет оснований, поскольку в лизогенной клетке присутствуют только две копии гена ИФН. Увеличения выхода целевого продукта, синтезируемого на основе генетической информации, привнесенной в клетку бактериофагом, можно добиться индукцией лизогенных или инфицированных реципиентных клеток, т. е. в таких условиях, при которых обес-

печивается литическое развитие фага, заканчивающееся лизисом клетки. В ходе литического развития происходит амплификация фагового генома, образуются 100—200 копий фаговой ДНК и, следовательно, встроенных в нее целевых генов. С увеличением количества копий целевого гена должно соответственно увеличиться и количество синтезируемого целевого продукта.

Эффективность экспрессии генов интерферона в составе полученных нами рекомбинантных фагов регистрировали по количеству интерферона в лизатах термоиндуцированных лизогенных культур, в которых в результате повышения температуры инактивировался термолabileльный фаговый репрессор и начиналось продуктивное развитие фага, заканчивающееся лизисом бактериальной клетки. Процесс проводили в стандартных условиях, описанных в разделе «Материалы и методы». Установлено, что выход ИФН при термоиндукции лизогенной культуры, содержащей фаг с двумя генами интерферона, не зависит от их ориентации. Количество ИФН в лизатах колебалось в пределах от 0,6 до 1,8 мг/л. Однако статистически достоверной разницы в выходе ИФН, обеспечиваемом фагами трех разных конструкций, не наблюдалось. На основании полученных данных можно предположить, что P_L , $P_{R'}$ и P_{lac} промоторы не влияют положительно на синтез интерферона из-за конвергентной транскрипции, при которой синтез РНК взаимно подавляется за счет столкновения молекул РНК-полимераз, движущихся в противоположных направлениях [16].

Так, конструкция донорной плазмидной ДНК, содержащей два гена ИФН, такова, что РНК-полимераза, осуществляющая транскрипцию с фагового

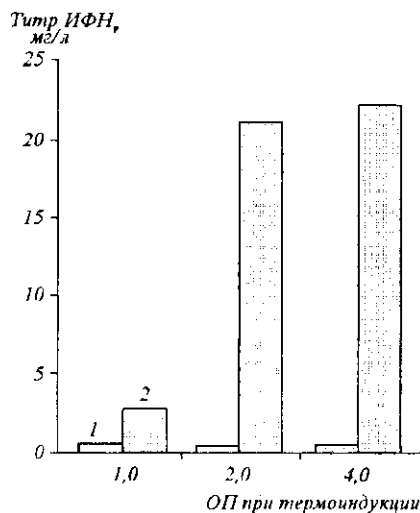


Рис. 4. Влияние на выход ИФН оптической плотности лизогенной культуры K802(λ pIF-8) при термоиндукции и последующего температурного режима культивирования клеток (1 — 37; 2 — 28 °C)

промотора, направление которой совпадает с направлением транскрипции генов интерферонов, во всех трех конструкциях рекомбинантных фагов сталкивается с РНК-полимеразой, осуществляющей транскрипцию *bla* гена (рис. 3).

При получении рекомбинантного белка в системе биосинтеза с использованием бактериофага лямбда синтез целевого продукта прекращается в результате лизиса бактериальной клетки. Однако этот процесс можно отодвинуть во времени, тем самым увеличив время экспрессии целевого гена, биосинтеза целевого белка и соответственно его выхода. Одним из таких подходов является использование фагов с мутациями в некоторых регуляторных генах, а также в генах, ответственных за лизис бактериальной клетки. Так, ранее нами показано, что введение амбер-мутаций в *Q* и *R* гены фага лямбда приводит к увеличению выхода целевого продукта [17—19]. Очень важным моментом является то, что фаги, несущие амбер-мутации в этих генах, сохраняют способность лизировать клетку, что обеспечивает накопление целевого продукта непосредственно в культуральной среде.

Для изучения эффективности использования в биотехнологическом процессе фага лямбда с двумя генами ИФН и амбер-мутациями в *Q* и *R* генах нами получен фаг λ pIFQ⁻R⁻ методом рекомбинации *in vivo* фагов λ pIscI857Q⁻R⁻ и фага λ pIF-8, конструкция которого соответствует указанной на рис. 2, а. Уровень биосинтеза целевого продукта анализировали в лизатах, полученных термоиндукцией

лизогенных культур. Согласно ИФА, количество ИФН в фаголизате клеток *E. coli* K802(λ pIFQ⁻R⁻) было более чем в три раза выше по сравнению с лизатом культуры K802(λ pIF-8). При этом титр фага в лизатах всех проанализированных клонов фага λ pIFQ⁻R⁻ был на порядок ниже относительно исходного фага λ pIF-8 без мутаций в *Q* и *R* генах.

Нам также удалось достигнуть увеличения выхода ИФН при изменении температурного режима культивирования лизогенной культуры K802(λ pIF-8) после термоиндукции. Как правило, для продуктивного развития фага после термоиндукции бактериальные клетки выдерживают при 37 °C, мы же в своих экспериментах снизили температуру до 28 °C. Такой подход для оптимизации экспрессии рекомбинантного гена в составе лямбда-вектора при термоиндукции лизогенной культуры использован впервые и, в отличие от введения амбер-мутаций в *Q* и *R* гены рекомбинантного фага, положительный результат не был столь очевиден. С одной стороны, снижение температуры культивирования клеток, в которых началось литическое развитие фага, тоже должно замедлить лизис клеток. Так, если культуру культивировали при температуре 37 °C, то полный лизис наблюдали через 60—80 мин, а при 28 °C — не менее чем через 120—180 мин. С другой стороны, хотя время работы целевого гена при этом продлевается, его экспрессия проходит не при оптимальном температурном режиме. Тем не менее, такой подход также позволил увеличить выход целевого белка приблизительно в 2,7 раза.

Неожиданный и интересный результат получен нами при изучении влияния на выход ИФН оптической плотности лизогенной культуры K802(λ pIF-8) при термоиндукции. В стандартных условиях термоиндукцию начинали, когда ОП культуры достигала ~1,0. Как известно, термоиндукция лизогенной культуры при высокой плотности клеток часто является причиной низкого титра фага. Поэтому исследователи отдают предпочтение именно такой плотности клеток для получения фаголизата с высоким титром фага. Однако, поскольку в данной работе перед нами стояла задача изучения условий, положительно влияющих на выход рекомбинантного белка, а не на титр фага, мы провели серию экспериментов, в которых термоиндукцию лизогенной культуры K802(λ pIF-8) осуществляли при ОП 1,0; 2,0 и 4,0, с последующим культивированием клеток как при температуре 37, так и 28 °C. Для количественного определения ИФН в полученных лизатах их подвергали ИФА. Как показывают результаты ИФА, представленные на рис. 4, увеличение ОП клеток при термоиндукции

с 1,0 до 2,0 и 4,0 не привело к повышению титра ИФН в лизатах, полученных при 37 °С. Однако в лизатах, полученных при температуре 28 °С, выход ИФН повысился на порядок, хотя ОП клеток K802(λ pIF-8) при термоиндукции увеличили только в два раза. Таким образом, манипулируя такими параметрами, как оптическая плотность культуры при термоиндукции рекомбинантного фага и температурный режим культивирования, нам удалось повысить выход целевого продукта до 20 мг/л лизата.

В следующей серии экспериментов изучали уровень синтеза целевого белка при инфицировании реципиентных клеток рекомбинантным фагом с генами ИФН. Для этого клетки штамма *E. coli* SG30 инфицировали фагом λ pIF-8 с множественностью 5—10 корпускул на клетку. Использование для этой цели фага λ pIFQ⁻R⁻, у которого титр был на порядок ниже, было нецелесообразным, поскольку не обеспечивалась высокая множественность инфекции, необходимая для эффективного процесса синтеза целевого белка. В результате проведенных исследований установлено, что инфицирование реципиентных клеток фагом λ pIF-8 обеспечивало выход ИФН до 40 мг/л лизата, что выше по сравнению с выходом целевого белка при термоиндукции. Однако инфицирование клеток штамма *E. coli* SG30(pIF-16), несущего плазмиду с двумя генами ИФН, фагом λ cI857Q⁻R⁻ без генов ИФН обеспечивало более высокий выход целевого продукта — до 70 мг/л.

Мы предприняли попытку улучшить данный результат, увеличив в клетке дозу целевого гена путем заражения клеток SG30(pIF-16) фагом λ pIF-8. В такой системе экспрессируются четыре гена ИФН — два в составе плазмиды и два в составе фага. Однако в ходе исследований нами было установлено, что увеличение в клетке штамма-продукта дозы целевого гена за счет двух дополнительных копий в составе фага не привело к статистически достоверному повышению выхода целевого продукта. При анализе этих данных, следовало учесть то, что фаг λ cI857Q⁻R⁻ в отличие от фага λ pIF-8 несет мутации в Q и R генах, а это может обеспечивать положительный эффект, равноценный увеличению дозы гена. Поэтому мы провели исследования, в которых сравнили выход ИФН при инфицировании клеток штамма *E. coli* SG30(pIF-16) фагами λ cI857Q⁻R⁻, λ cI857 и λ pIF-8. Полученные результаты показали, что выход рекомбинантного белка сопоставим при использовании в биотехнологическом процессе каждого из этих фагов, что свидетельствует об отсутствии положительного эффекта при увеличении дозы гена и амбер-мута-

ций в Q и R генах фага в условиях данного эксперимента.

Таким образом, в ходе работы сконструированы фаги лямбда, несущие плазмиду с двумя генами альфа-2b ИФН человека. Экспрессия целевых генов в рекомбинантных молекулах находится под контролем регуляторных элементов, локализованных на плазмиде, а именно — тандема триптофановых промоторов. Показано, что экспрессия генов ИФН не зависит от ориентации встроенной плазмиды, а наличие Q и R мутаций в фаге с генами ИФН существенно увеличивает выход ИФН при термоиндукции лизогенов. Манипулирование такими параметрами, как оптическая плотность лизогенной культуры при термоиндукции рекомбинантного фага и последующий температурный режим культивирования клеток, позволяет более чем на порядок повысить выход целевого белка. Получение альфа-2b ИФН человека путем инфицирования реципиентных клеток также является одним из эффективных подходов для оптимизации экспрессии целевых генов в составе фаговой ДНК и технологически приемлемым способом получения рекомбинантных белков.

I. Yu. Slavchenko, V. A. Shmidt, S. I. Chernykh, V. A. Kordyum

Peculiarities of a target gene expression in the structure of the phage lambda-base vector and investigation of ways of its optimization

Summary

High stability of the cloned gene in the lysogenic state and high copy number in the lytic state suggest a potential use of phage λ as an expression vector for overproduction of the extracellular recombinant proteins which release to the growth medium as a result of lysis of *E. coli* cells by phage. This paper describes the construction and characterization of phage λ pIF carrying the two copy of an artificial gene for human $\alpha 2$ interferon (IFN) under control of the *P*trp tandem promoter. The expression of the foreign genes realized by thermal induction cells carrying the phage λ pIF as well as by infection of recipient cells with this phage. In this study it was shown that the recombinant protein yield is dependent on a cell density at the time of thermal induction and the following temperature of producer cultivation. The increase of soluble target protein concentration in lysates after induction of recombinant phage was also observed using the phage λ pIF contains amber-mutations in genes Q and R. The infection of recipient cells by phage λ pIF resulted in higher IFN yield (about 40 mg per l) than thermal induction of the cells carrying the phage λ with target genes.

I. Ю. Славченко, В. А. Шмідт, С. І. Черних, В. А. Кордюм

Особливості експресії цільового гена у складі вектора на основі бактеріофага лямбда та вивчення шляхів її оптимізації

Резюме

Рекомбінантні молекули на основі бактеріофага лямбда відрізняються високою сегрегаційною стабільністю у лізогенному стані і високим рівнем ампліфікації фагової ДНК та відповідно вбудованого в неї цільового гена за літичного розвитку

фага, який закінчується лізисом бактеріальної клітини і вивільненням цільового продукту в культуральне середовище. Це робить перспективним використання фага лямбда для отримання рекомбінантних білків. У даному повідомленні описано конструювання фага λ rIF, який несе дві копії штучного гена інтерферону (ІФН) людини під контролем тандему триптофанових промоторів. Експресію чужорідних генів здійснювали термоіндукцією клітин, які несуть фаг з генами ІФН, а також інфекцією цим фагом реципієнтних клітин. Показано, що вихід рекомбінантного білка залежить від оптичної густини клітин при термоіндукції і наступного температурного режиму культивування продуцента. Збільшення вмісту ІФН у лізатах після індукції також спостерігали при використанні Q^R амбер-мутантів фага λ rIF. Показано, що інфікування реципієнтних клітин фагом λ rIF забезпечує вищий вихід ІФН (біля 40 мг/л), ніж термоіндукція клітин *Escherichia coli*, які несуть фаг з цільовими генами.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРЫ

1. Lee N., Cozzitorto J., Wainwright N., Testa D. Cloning with tandem gene systems for high level gene expression // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 17.—P. 6797—6812.
2. Sun H. Y., Liu X. H., Liang S. W. Gene construction, expression, and characterization of double-copy truncated form of human insulin-like growth factor I // Acta pharmacol. sin.—2001.—22, N 7.—P. 624—628.
3. Lennick M., Haynes J. R., Shen S. H. High-level expression of alpha-human atrial natriuretic peptide from multiple joined genes in *Escherichia coli* // Gene.—1987.—61, N 1.—P. 103—112.
4. Koyama Y., Nakano E. Cloning of the *glpK* gene of *Escherichia coli* K-12 and its overexpression using a «sleeper» bacteriophage vector // Agr. Biol. Chem.—1990.—54, N 5.—P. 1315—1316.
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 // Опубл. в БИ № 12, 1978.
8. Steffen D., Schleif R. Overproducing *araC* protein with lambda-arabinose transducing phage // Mol. and Gen. Genet.—1977.—157, N 3.—P. 333—339.
9. Park T. H., Seo J.-H., Lim H. C. Two-stage fermentations with bacteriophage λ as an expression vector in *Escherichia coli* // Biotechnol. and Bioeng.—1991.—37.—P. 297—302.
10. Padukone N., Peretti S. W., Olis D. F. λ vectors for stable cloned gene expression // Biotechnol. Progr.—1990.—6.—P. 277—282.
11. Славченко И. Ю. Отбор чувствительных к бактериофагу λ клонов из устойчивого к нему штамма *Escherichia coli* // Биополимеры и клетка.—2001.—17, № 2.—С. 160—165.
12. Маннатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—479 с.
13. Иовлев В. И., Соловьева И. Е., Степанов А. Н. Количественное определение интерферона методом иммуноферментного анализа // Тр. Ленингр. НИИ эпидемиологии и микробиологии.—1988.—64.—С. 108—113.
14. Charney P., Louise A., Fritsch A., Perrin D., Tiollais P. Bacteriophage lambda—*E. coli* K12 vector-host system for gene cloning and expression under lactose promoter control. II. DNA fragment insertion at the vicinity of the *lac UV5* promoter // Mol. and Gen. Genet.—1979.—170, N 2.—P. 171—178.
15. 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.
16. Ward D. F., Murray N. E. Convergent transcription in bacteriophage: interference with gene expression // J. Mol. Biol.—1979.—133, N 2.—P. 249—266.
17. Глушакова Л. Г., Черных С. И., Стельмашенко Л. Н., Кордюм В. А. Суперсинтез β -галактозидазы в клетках *Escherichia coli*, индуцируемый некоторыми амбер-мутантами фага λ rlac5cl857 // Молекуляр. биология.—1982.—30.—С. 37—47.
18. Славченко И. Ю., Черных С. И., Кордюм В. А. Исследование фагозависимого синтеза β -лактамазы в изогенных Su^+ и Su^0 штаммах *E. coli* при заражении их фагами λ bla и λ bla Q^R // Ферменты микроорганизмов.—М.: ВНИИ-СЭНТИ, 1989.—С. 31—36.
19. 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.

УДК 579.258+577.124

Надійшла до редакції 21.08.02