

Биосинтез основного фактора роста фибробластов человека в клетках *Escherichia coli* и его очистка

И. Ю. Славченко, Е. В. Борейко, Т. Г. Гавриш, И. П. Костюченко, В. А. Кордюм

ПНИК «Биотехнолог»
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина
biotech@naverex.kiev.ua

*Основной фактор роста фибробластов (bFGF, известный также как FGF-2) является важным модулятором клеточной дифференциации, пролиферации, миграции, ангиогенеза и других процессов в клетках различного типа. Рекомбинантный bFGF человека рассматривается как потенциальное средство для лечения сосудистых и некоторых других заболеваний. В представленной работе разработана система биосинтеза bFGF человека (146 аминокислотных остатков) в клетках *E. coli* и его очистка. Метод получения рекомбинантного белка предусматривает инфицирование фагом λ клеток BL21 (DE3), несущих плазмиду с целевым геном под контролем промотора фага T7. Данный процесс заканчивается лизисом клеток штамма-производителя и синтезированный bFGF высвобождается в культуральную среду, где накапливается в растворимой форме (около 60 мг/л). Целевой белок очищен с использованием аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе до гомогенного состояния (не менее 98 %). В биологических тестах показано, что полученный bFGF стимулирует ангиогенез в хориоаллантоидной мембране куриных эмбрионов.*

Введение. Основной фактор роста фибробластов (bFGF), известный также как FGF-2, относится к семейству гепаринсвязывающих ростовых факторов. В настоящее время идентифицированы 23 члена этого семейства. FGF-2 продуцируется различными типами клеток, изолирован из разных тканей человека и животных и обладает широким спектром биологических активностей. Он стимулирует рост кровеносных сосудов (ангиогенез), пролиферацию всех клеток мезодермального происхождения, многих клеток нейроэкто-, экто- и энтодермального происхождения. FGF-2 влияет на миграцию, дифференциацию, хемотаксис, синтез ДНК и другие процессы в клетках как в течение эмбрионального развития, так и в зрелом организме, играя тем самым важную роль в различных физиологических и патологических процессах [1, 2]. FGF-2 осуществляет свои функции через взаимодействие с низко- и высокоаффинными рецепторами. Низкоаффинными рецепторами являются гепарансульфатпротеогликаны, высокоаффинными — трансмембранные тирозинкиназные рецепторы [3]. Широкий спектр биологических активностей

FGF-2, возможно, связан со специфическим действием его изоформ, физиологическая роль которых еще мало изучена. Геном человека имеет только одну копию гена *FGF-2*, которая локализована на хромосоме 4q 26—27 [4]. Однако идентифицированы не менее семи изоформ этого белка, пять из которых с молекулярными массами (м. м.) 18; 22; 22,5; 24 и 34 кДа синтезируются в результате альтернативной инициации трансляции. Инициация трансляции на каноническом кодоне AUG обеспечивает синтез изоформы FGF-2 с м. м. 18 кДа (155 аминокислотных остатков, а. о.), в то время как синтез более высокомолекулярных изоформ иницируется на четырех CUG кодонах [5]. Описаны также укороченные варианты FGF-2, состоящие из 146 и 131 а. о., отличающиеся степенью N-концевого протеолиза [6]. Именно изоформа FGF-2, включающая 146 а. о., была описана первой [7, 8], наиболее хорошо изучена и в настоящее время препараты на ее основе проходят клинические испытания за рубежом, в частности, «Fiblast» компании Scios Inc. (США).

Рекомбинантный FGF-2 рассматривается как потенциальное средство для лечения сосудистых заболеваний у пациентов, страдающих ишемией конечностей, сердца, других органов [9]. Он также

вызывает интерес как фактор, стимулирующий заживление ран и регенерацию тканей, в частности, после повреждения головного, спинного мозга и периферической нервной системы [10]. FGF-2 является потенциальным агентом для лечения остеопорозов, поскольку стимулирует пролиферацию остеобластов и может увеличивать массу костей [11].

Однако для проведения крупномасштабных исследований данный белок необходим в значительных количествах, что делает актуальным разработку технологии получения рекомбинантного аналога FGF-2 с использованием микробного синтеза.

Целью настоящей работы является разработка технологии биосинтеза и очистки FGF-2, содержащего 146 а. о. (bFGF-146).

Материалы и методы. В работе использованы следующие штаммы *Escherichia coli* и бактериофага лямбда: BL21(DE3) (*F', ompT, hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal, dcm* (DE3), BL21(pbFGF-146) несет плазмиду, в которую по *NdeI-BamHI*-сайтам встроена последовательность ДНК, кодирующая bFGF-146. Плазида сконструирована на основе вектора *pET-24a(+)* («Novagen», США) и трансформирована в штамм *E. coli* BL21(DE3). В качестве генетического маркера плазида содержит ген *nek*, обеспечивающий устойчивость несущих ее клеток к канамицину.

Для инфицирования продуцента использовали фаг λ ci857Q⁻R⁻ (*ci857Qam117Ram54*), источником которого служил лизогенный штамм *E. coli* K802 (*hsdR⁺, hsdM⁺, gal⁻, met⁻, SupE*) (λ ci857Q⁻R⁻). В качестве индикаторной культуры при титровании фага использовали штамм *E. coli* RLM1 (*thr⁻, leu⁻, lac⁻, tonA, SupE*). Штаммы получены из коллекции культур ПНИК «Биотехнолог».

Среды. Бактериальные культуры выращивали в питательной среде, содержащей: воду — 1 л, NaCl — 10 г, дрожжевой экстракт (USB) — 5 г, пептон (Винницкий мясокомбинат) — 10 г. На ее же основе готовили 1,5 и 0,5 %-е агаризованные среды. При выращивании плазмидосодержащих клеток в среду добавляли канамицин до конечной концентрации 25 мг/мл. При использовании в биотехнологическом процессе бактериофага λ в жидкую среду дополнительно вносили 1 М раствор MgSO₄ из расчета 1 мл/1 л среды и 10 %-й раствор мальтозы до конечной концентрации 0,5 г/л.

Для получения фаголизата λ ci857Q⁻R⁻ использовали аналогичную среду, но содержащую 40 г/л пептона, без каких-либо добавок.

Получение фаголизата. Фаголизат λ ci857Q⁻R⁻ получали термоиндукцией лизогенной культуры K802 (λ ci857Q⁻R⁻), как описано [12]. Титр определяли общепринятым двухслойным методом. Как правило, получали (1,0—2,5) · 10¹⁰ БОЕ/мл лизата.

Культивирование продуцента. Питательную среду засеивали инокулятом *E. coli* BL21(pbFGF-146), 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 нужной оптической плотности (ОП). Затем для индукции синтеза целевого продукта добавляли раствор изопропил-β-D-тиоигалактозида (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ и продолжали культивирование (37 или 21 °С, 18 ч). При получении рекомбинантного белка с использованием фага лямбда перед индукцией культуру инфицировали фагом с множественностью 5—10 корпускул на клетку и продолжали культивирование в течение 18 ч при температуре 21 °С.

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

Для электрофоретического анализа растворимой и нерастворимой фракции клеточных белков 0,4 мл культуры центрифугировали 3 мин при 13 тыс. об/мин, а затем ресуспендировали осадок в 50 мкл раствора (50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 5 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид, 1 мг/мл лизоцима). Пробирку на 30 мин помещали в лед, добавляли 350 мкл буфера для лизиса (20 мМ трис-НСl, рН 7,0, 1 мМ ЭДТА, 0,1 % тритона X-100) и инкубировали еще 8 или 18 ч. Затем центрифугировали 10 мин при 13 тыс. об/мин, переносили 30 мкл верхней фазы в другую пробирку и добавляли 15 мкл буфера для нанесения на гель. Пробы выдерживали 5 мин при 100 °С и весь образец наносили на полиакриламидный гель (ПААГ). Оставшуюся часть супернатанта сливали, к осадку добавляли 400 мкл буфера для нанесения, тщательно перемешивали, выдерживали 5 мин при 100 °С и 30 мкл наносили на ПААГ.

Препарат суммарных белков клетки анализировали электрофоретически, для чего биомассу из 0,2 мл клеточной суспензии собирали центрифугированием (13000 об/мин, 5 мин), подсушивали и ресуспендировали в 100 мкл буфера для нанесения. Пробы выдерживали 5 мин при 100 °С и по 15 мкл наносили на ПААГ.

Для электрофоретического анализа белков фаголизата его центрифугировали при 13000 об/мин (5 мин). К 30 мкл супернатанта добавляли 15 мкл буфера для нанесения и перемешивали. Перед нанесением на гель пробы выдерживали 5 мин при 100 °С и весь образец наносили на ПААГ.

Электрофорез белков осуществляли по методу Лэммли [13] в 12,5 %-м ПААГ в присутствии

1 %-го SDS с последующим прокрашиванием в растворе кумасси R-250.

Процентное содержание bFGF-146 в плазмидо-содержащих клетках устанавливали денситометрированием соответствующих дорожек геля с помощью прибора Image Master («Pharmacia Biotech», Швеция). Для определения молекулярной массы белков применяли программу Image Master ID Prime. В качестве стандарта для электрофореза использовали калибровочный набор белков («Fluka», Швейцария). Набор содержит смесь белков с м. м. 67, 45, 36, 24, 18,4 и 14 кДа.

Результаты и обсуждение. Системы экспрессии на основе РНК-полимеразы фага T7 широко используются в различных модификациях для синтеза рекомбинантных белков как в лабораторных условиях, так и в условиях крупномасштабного производства. РНК-полимераза фага T7, кодируемая одним из ранних фаговых генов, с высокой эффективностью и специфичностью осуществляет процесс транскрипции, инициируемый со специализированных фаговых промоторов, который в 5—8 раз быстрее, чем скорость элонгации транскрипции, обеспечиваемая РНК-полимеразой *E. coli*. [14]. В качестве продуцента в таких системах наиболее широко используется штамм *E. coli* BL21 (DE3). В клетках *E. coli* BL21 (DE3) ген РНК-полимеразы фага T7 под контролем лактозного оперона *E. coli* локализуется в бактериальной хромосоме, куда он интегрирован в составе фага лямбда D69 [15]. Индукция синтеза фагового фермента и, как следствие, высокоэффективная транскрипция целевого гена, находящегося под контролем одного из узнаваемых этой РНК-полимеразой промоторов в составе плазмидного вектора, наблюдается после добавления в среду культивирования индуктора лактозного оперона ИПТГ.

В данном исследовании в качестве продуцента использовали штамм *E. coli* BL21 (DE3), содержащий плазмиду *pbFGF-146* с целевым геном под контролем промотора гена *10* фага T7. В ходе работы установлено, что индукция синтеза целевого продукта приводит к существенному уменьшению выхода биомассы клеток *E. coli* BL21(*pbFGF-146*) по сравнению с контролем (клетки BL21(*pbFGF-146*) без индукции). Значения ОП, зарегистрированные в одном из экспериментов, представлены на рис. 1.

Так, ОП клеток в опытном варианте на 5-й ч после индукции составляла всего 2,8, в то время как в контрольном — 7,5. И если в опытном варианте она возросла с 0,7 (ОП при индукции в данном эксперименте) до 2,8, то анализ жизнеспособных клеток, сделанный на основе высева куль-

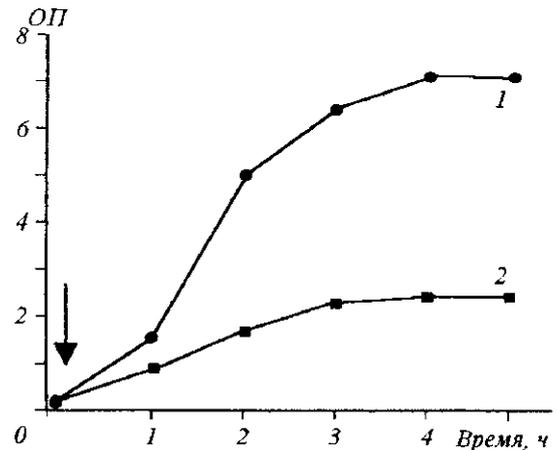


Рис. 1. Кинетика роста штамма *E. coli* BL21(*pbFGF-146*) при температуре 37 °C без индукции (1) и после индукции синтеза целевого белка (2). Вертикальной стрелкой показан момент добавления ИПТГ в пробу 2 (ОП — оптическая плотность)

туральной среды на чашки с агаризованной средой без добавления канамицина, показал, что их количество уменьшилось с $5,9 \cdot 10^7$ до $2,8 \cdot 10^7$. В контрольном варианте оно увеличилось с $5,9 \cdot 10^7$ до $8,0 \cdot 10^9$. Это свидетельствует о сильном токсическом эффекте данного чужеродного белка на бактериальную клетку. Показательным является тот факт, что через 18 ч после индукции количество жизнеспособных клеток в опытном варианте возросло до $1,8 \cdot 10^9$, что, вероятно, связано с ростом клеток, у которых нарушен синтез рекомбинантного белка. Причинами этого могут быть как нестабильность плазмиды *pbFGF-146*, так и появление клеток, утративших ген РНК-полимеразы фага T7.

Электрофоретический анализ клеток *E. coli* BL21(*pbFGF-146*), в которых индуцировали синтез рекомбинантного белка внесением в среду раствора ИПТГ, показал наличие в них белка ожидаемой молекулярной массы ~17,2 кДа, выход которого составил более 10 % от суммарных белков клетки.

Одной из проблем, имеющих место при получении в клетках *E. coli* рекомбинантных белков чужеродного происхождения, является то, что они часто накапливаются в клетках в виде нерастворимых телец включений. Получение биологически активного белка из таких телец связано с денатурацией полипептидов и последующей ренатурацией уже очищенных препаратов. Такие манипуляции могут неблагоприятно сказаться на структурно-функциональных и антигенных свойствах генно-инженерного продукта, что нежелательно при его дальнейшем использовании в медицинской практике. Поэтому эффективность технологии по-



Рис. 2. Электрофореграмма образцов белковых фракций клеток *E. coli* BL21 (*pbFGF-146*): 1 — суммарные белки и клетки; 2 — фракция растворимых белков; 3 — фракция нерастворимых белков. Положение bFGF-146 указано стрелкой

лучения того или иного белка определяется не только уровнем синтеза целевого продукта, но и тем, в каком виде — растворимом или нет он накапливается в клетке.

В ходе работы нами установлено, что целевой белок в клетках накапливается преимущественно в нерастворимом виде (рис. 2). С этой проблемой при экспрессии данной формы фактора роста фибробластов человека (146 а. о.) в клетках *E. coli* сталкивались и другие исследователи [16—20]. Наиболее высокий выход растворимого bFGF-146, описанный в литературе, составляет 10 % от суммарных белков клетки и 40 мг в 1 л [18]. Авторы осуществили в клетках *E. coli* BL21(DE3) экспрессию кДНК, кодирующей bFGF-146 под контролем промотора фага T7 в составе плазмиды, сконструированной на основе вектора *pET-3b*. При культивировании продуцента при температуре 37 °С целевой белок накапливался в нерастворимом виде, а при 30 °С — преимущественно в растворимом.

Поскольку нашей задачей являлось получение рекомбинантного фактора в растворимой форме, мы исследовали влияние температуры культивирования продуцента после индукции на уровень синтеза целевого продукта, а также то, в какой форме — растворимой или нерастворимой он накапливается в бактериальной клетке. Для электрофоретического анализа пробы отбирали через 1, 2, 3, 4 и 18 ч после индукции ИПТГ. В результате установлено, что при культивировании продуцента при 37 °С уже через 1 ч после индукции выход bFGF-146 сравним с таковым через 2, 3, 4 и 18 ч (рис. 3). Однако рекомбинантный белок обнаружи-

вался только во фракции нерастворимых белков. Уровень синтеза целевого продукта при 21 °С значительно растянут во времени и на 4-й ч после индукции он значительно ниже, чем через 1 ч при культивировании продуцента при 37 °С. Кроме того, выход биомассы при температуре 21 °С также значительно ниже, чем при 37 °С. Однако при более длительном культивировании продуцента (18 ч) в клетках накапливается рекомбинантный белок в количестве, сравнимом с выходом при культивировании продуцента при 37 °С. При этом электрофоретический анализ клеток, выращенных при низкой температуре, показал, что целевой продукт в них накапливается в растворимой форме. Таким образом, снизив температуру и увеличив время культивирования продуцента, нам удалось получить bFGF-146 в растворимом виде при выходе 10—12 % от суммарных белков клетки.

После окончания процесса биосинтеза рекомбинантный белок необходимо извлекать из клетки для его последующей очистки. Для этой цели используют различные методы химического или физического разрушения клеток, а также их комбинирование. При масштабировании процесса в условиях промышленного производства сложность выделения из бактериальных клеток целевого продукта приводит к значительным потерям рекомби-

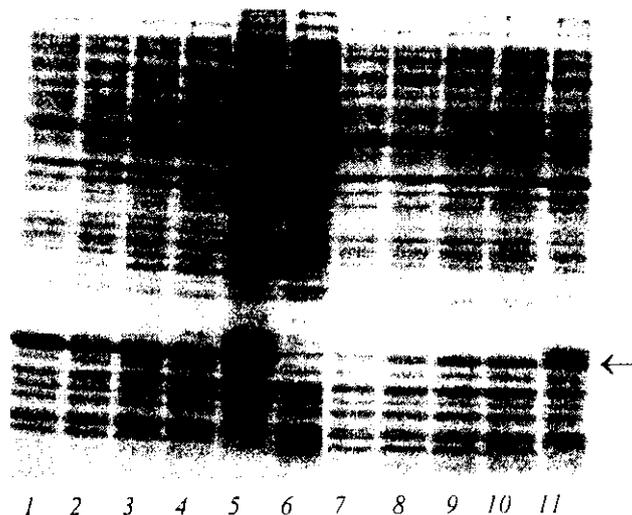


Рис. 3. Электрофореграмма образцов клеток *E. coli* BL21 (*pbFGF-146*), культивированных после индукции при температуре 37 °С (1—5) и 21 °С (7—11) в течение: 1, 7 — 1 ч; 2, 8 — 2 ч; 3, 9 — 3 ч; 4, 10 — 4 ч; 5, 11 — 18 ч; 6 — клетки без индукции (контроль к образцу 4). Положение bFGF-146 указано стрелкой

нантного белка. Использование в биотехнологическом процессе бактериофага λ позволяет получать целевой продукт непосредственно в культуральной среде, куда он высвобождается в результате лизиса инфицированной клетки. Нами разработаны различные модификации такой технологии, одна из которых предусматривает инфицирование клеток штамма-продуцента, содержащих плазмиду с рекомбинантным геном [21].

Мы предприняли попытку применения этого подхода и для получения FGF-2 в системе экспрессии целевого продукта с использованием РНК-полимеразы фага T7. Для чего протестировали культуру *E. coli* BL21 (DE3) на чувствительность к фагу λ c1857Q^R. Установлено, что, несмотря на наличие в геноме профага λ DE3 с геном РНК-полимеразы фага T7, клетки сохранили чувствительность к используемому фагу лямбда. Хотя титр фага на этой культуре составлял $(5-7) \cdot 10^8$ (на стандартной индикаторной культуре RLM1 — $(1,5-2) \cdot 10^{10}$), нам удалось для получения bFGF-146 в клетках *E. coli* разработать трехкомпонентную систему биосинтеза, основными элементами которой являются бактериальные клетки BL21 (DE3), плазида *pbFGF-146*, несущая целевой ген под контролем промотора гена *10* фага T7, и используемый для инфицирования плазмидосодержащих клеток фаг λ c1857Q^R. Исследование таких параметров, как состав питательной среды, температурный режим культивирования продуцента, ОП культуры при индукции ИПТГ и фаговой инфекции, множественность инфекции, аэрация, продолжительность ферментации и т. д., позволило оптимизировать условия ведения процесса. Так, выращивание продуцента на среде, содержащей повышенное количество пептона (40 г/л), индукция клеток ИПТГ и их инфекция при ОП 1,0, дальнейшее культивирование клеток при температуре 21 °С позволяет получать более 60 мг целевого продукта в 1 л культуральной среды. Разработанная нами технология синтеза bFGF-146 человека обеспечивает его накопление в растворимом виде непосредственно в культуральной среде, что имеет ряд преимуществ при выделении и очистке рекомбинантного белка по сравнению с технологиями, при которых целевой продукт накапливается внутри бактериальных клеток в неактивной форме в виде нерастворимых телец включений.

Поэтому, минуя стадии дезинтеграции клеток и солюбилизации телец включений, мы смогли приступить к хроматографической очистке bFGF-146 непосредственно из культуральной среды. Благодаря высокому сродству bFGF к гепарину, а также оптимизации условий нанесения и элюиро-



Рис. 4. Электрофореграмма супернатанта фаголизата клеток *E. coli* BL21 (*pbFGF-146*) (2) и bFGF-146 после хроматографической очистки (3); 1 — белки-маркеры

вания белка нам удалось осуществить одностадийную очистку bFGF-146 аффинной хроматографией на колонке с гепарин-сефарозой. Для этого фаголизат, содержащий bFGF-146, центрифугировали при 8 тыс. об/мин в течение 20 мин. Осадок удаляли, а супернатант наносили на колонку с гепарин-сефарозой («Pharmacia Biotech»), уравновешенной 10 мМ Na-фосфатным буфером (pH 7,5), содержащим 0,15 М NaCl. Промывали этим же буфером, но содержащим 0,6 М NaCl. Рекомбинантный белок элюировали 10 мМ Na-фосфатным буфером (pH 7,5), содержащим 1,5 М NaCl. Гомогенность очищенного препарата определяли с помощью электрофоретического анализа при нанесении на дорожку 40 мкг очищенного белка. По данным SDS-электрофореза, чистота bFGF-146 составляет не менее 98 % (рис. 4).

В биологических тестах показано, что полученный рекомбинантный bFGF-146 активирует ангиогенез в хориоаллантаоидной мембране эмбриона цыпленка (данные не представлены).

Таким образом, разработанная технология синтеза и очистки bFGF-146 позволяет получать данный рекомбинантный белок в достаточных количествах в высокоочищенном виде для проведения работ как научного, так и прикладного характера.

I. Yu Slavchenko, E. V. Boreyko, T. G. Gavrysh, I. P. Kostyuchenko, V. A. Kordyum

Biosynthesis of human basic fibroblast growth factor in soluble form in *Escherichia coli* and its purification

Summary

Basic fibroblast growth factor (bFGF, also known as FGF-2) is an important modulator of cell differentiation, proliferation, migration,

migration, angiogenesis and other activities in a variety of cell types. The recombinant human bFGF is considered as a potential medicine for the treatment of vascular and some other diseases. In this work the production of human bFGF of 146 a. a. length in *E. coli* cells, using the phage lambda, and its purification have been elaborated. The method of recombinant protein production includes the phage lambda infection of the BL21 (DE3) cells, containing a plasmid with a target gene under the T7 phage promoter. The process results in lysis of the producer strain cells and releasing newly synthesized bFGF into the cell medium, where it accumulates in a soluble form (approximately 60 mg/l). The target protein has been purified to homogeneity not less than 98 % by a one-step procedure using heparin-Sepharose affinity chromatography. According to the biological tests bFGF obtained promotes angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane.

І. Ю. Славченко, О. В. Борейко, Т. Г. Гавриш,
І. П. Костюченко, В. А. Кордюм

Біосинтез основного фактора росту фібробластів людини
в клітинах *Escherichia coli* та його очищення

Резюме

Основний фактор росту фібробластів (bFGF, відомий також як FGF-2) є важливим модулятором клітинної диференціації, проліферації, міграції, ангиогенезу та ін. у клітинах різного типу. Рекombінантний bFGF людини розглядається як потенційний засіб для лікування судинних і деяких інших захворювань. У представленій роботі розроблено систему біосинтезу bFGF людини (146 амінокислотних залишків) у клітинах *E. coli* і його очищення. Метод отримання рекombінантного білка передбачає інфікування фагом лямбда клітин BL21 (DE3), які несуть плазмиду з цільовим геном під контролем промотору фага T7. Цей процес закінчується лізисом клітин штаму-продуцента і синтезований bFGF вивільняється в культуральне середовище, де накопичується в розчинній формі (біля 60 мг/л). Цільовий білок очищували, використовуючи афінну хроматографію на гепарин-сефарозі, до гомогенності не менше 98 %. У біологічних тестах показано, що отриманий bFGF стимулює ангиогенез у хоріоалантоїдній мембрані курячих ембріонів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Nugent M. A., Iozzo R. V. Fibroblast growth factor-2 // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*—2000.—32, N 2.—P. 115—120.
- Dow J. K., deVere White R. W. Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions // *Urology*.—2000.—55, N 6.—P. 800—806.
- Powers C. J., McLeskey S. W., Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling // *Endocrinol. Relat. Cancer*.—2000.—7, N 3.—P. 165—197.
- Mergia A., Eddy R., Abraham J. A., Fiddes J. C., Shows T. B. The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1986.—138, N 2.—P. 644—651.
- Touriol C., Morillon A., Gensac M. C., Prats A. C. Expression of human fibroblast growth factor 2 mRNA is post-transcriptionally controlled by a unique destabilizing element present in the 3'-untranslated region between alternative polyadenylation sites // *J. Biol. Chem.*—1999.—274, N 30.—P. 21402—21408.
- Gospodarowicz D., Neufeld G., Schweigerer L. Fibroblast growth factor: structural and biological properties // *J. Cell. Physiol.*—1987.—5, Suppl.—P. 15—26.
- Bohlen P., Baird A., Esch F., Ling N., Gospodarowicz D. Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1984.—81, N 17.—P. 5364—5368.
- Abraham J. A., Whang J. L., Tumolo A., Mergia A., Friedman J., Gospodarowicz D., Fiddes J. C. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization // *EMBO J.*—1986.—5, N 10.—P. 2523—2528.
- Laham R. J., Garcia L., Baim D. S., Post M., Simons M. Therapeutic angiogenesis using basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor using various delivery strategies // *Curr. Interv. Cardiol. Rep.*—1999.—1, N 3.—P. 228—233.
- Ford-Perriss M., Abud H., Murphy M. Fibroblast growth factors in the developing central nervous system // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*—2001.—28, N 7.—P. 493—503.
- Nakamura K., Kurokawa T., Aoyama I., Hanada K., Tamura M., Kawaguchi H. Stimulation of bone formation by intraosseous injection of basic fibroblast growth factor in ovariectomized rats // *Int. Orthop.*—1998.—22, N 1.—P. 49—54.
- Славченко І. Ю. Отбор чувствительных к бактериофагу λ клонов из устойчивого к нему штамма *Escherichia coli* // *Биополімери і клітина*.—2001.—17, № 2.—С. 160—165.
- Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*.—1970.—227.—P. 680—685.
- Studier F. W., Moffatt B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // *J. Mol. Biol.*—1986.—189, N 1.—P. 113—130.
- Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Dubendorff J. W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes // *Meth. Enzymol.*—1990.—185.—P. 60—89.
- Iwane M., Kurokawa T., Sasada R., Seno M., Nakagawa S., Igarashi K. Expression of cDNA encoding human basic fibroblast growth factor in *E. coli* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1987.—146, N 2.—P. 470—477.
- Fox G. M., Schiffer S. G., Rohde M. F., Tsai L. B., Banks A. R., Arakawa T. Production, biological activity, and structure of recombinant basic fibroblast growth factor and an analog with cysteine replaced by serine // *J. Biol. Chem.*—1988.—263.—P. 18452—18458.
- Squires C. H., Childs J., Eisenberg S. P., Polverini P. J., Sommer A. Production and characterization of human basic fibroblast growth factor from *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.*—1988.—263, N 31.—P. 16297—16302.
- Knoerzer W., Binder H. P., Schneider K., Gruss P., McCarthy J. E., Risau W. Expression of synthetic genes encoding bovine and human basic fibroblast growth factors (bFGFs) in *Escherichia coli* // *Gene*.—1989.—75, N 1.—P. 21—30.
- Ke Y., Wilkinson M. C., Fernig D. G., Smith J. A., Rudland P. S., Barraclough R. A rapid procedure for production of human basic fibroblast growth factor in *Escherichia coli* cells // *Biochim. et biophys. acta*.—1992.—1131, N 3.—P. 307—310.
- Славченко І. Ю. Влияние температуры на выход растворимого альфа интерферона человека в системе суперсинтеза рекombінантных белков с использованием бактериофага лямбда // *Биополімери і клітина*.—2002.—18, № 5.—С. 436—441.

УДК 579.258+577.124
Надійшло до редакції 17.09.02