

СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЦИТОКИНОВ: ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ-А И ИНТЕРЛЕЙКИНА-4

Д.В. Копылева, М.И. Потапович, В.А. Прокулевич

Белорусский государственный университет, Республика Беларусь, 220030, г. Минск, проспект Независимости, 4

e-mail: kopyleva.d@gmail.com

Человеческие цитокины, в частности, фактор некроза опухоли- α (ФНО- α) и интерлейкин-4 (ИЛ-4), представляют собой низкомолекулярные регуляторные молекулы плейотропного спектра действия. Учитывая комплексный характер оказываемых белками биологических эффектов, достаточно сложно представить препараты медицинского профиля на их основе. Однако промышленное получение субстанций представляет значимость в виду их активного применения в целях диагностики заболеваний, получения биомедицинских клеточных продуктов и других медицинских технологиях, научных исследованиях в модельных экспериментах *in vivo* на лабораторных животных и клетках *in vitro*.

Существенно удешевить процесс промышленного получения ИЛ-4 и ФНО- α позволит использование в качестве системы экспрессии грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, которые хорошо себя зарекомендовали в качестве эффективных продуцентов низкомолекулярных гетерологичных белков.

Целью настоящего исследования явилось клонирование и экспрессия рекомбинантных человеческих интерлейкина-4 и фактора некроза опухоли- α в клетках бактерий *Escherichia coli*.

Синтетические гены рассчитывали путем обратной трансляции аминокислотных последовательностей ИЛ-4 и ФНО- α (сигнальные пептиды внеклеточной локализации не учитывали), при этом заменяли редко встречающиеся в *E. coli* кодоны, сохранив порядка 40% нативных последовательностей. Вводили тандем стоп кодонов ТАА, сайт рестрикции для *Nde* I (содержит старт-кодон) и *Eco* RI и подбирали селективные праймеры. Амплификацию синтетических

генов осуществляли с помощью ПЦР, очищенные ампликоны и вектор pET24b(+) подвергали рестрикции и лигированию. Полученными лигазными смесями трансформировали клетки штамма *E. coli* XL-1 Blue, которые высевали на селективную среду, содержащую канамицин. Дополнительно наличие вставок целевых генов в полученных трансформантах проверяли ПЦР и рестрикционным анализом. Бактерии культивировали в условиях качалочной аэрации (160 об/мин) при 37 °C в среде LB, выделяли рекомбинантные плазмиды и трансформировали ими клетки штамма *E. coli* BL21-Gold(DE3) с последующей проверкой наличия сконструированных плазмид методом ПЦР. Клетки положительных клонов использовали для получения ночных культур, которые далее разводили в 20 раз и культивировали с аэрацией до $ОП_{600} \approx 0,8$. Вводили индуктор изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в конечной концентрации 0,5 mM и продолжали культивировать в течение 4 ч. Клеточные пробы отбирали и оценивали эффективность биосинтеза целевых белков электрофоретически в 16%-ном полиакриламидном геле. По данным денситометрического анализа процент накопления ИЛ-4 и ФНО- α превысил 30% от общего белка клетки, что характеризует полученные штаммы-продуценты как эффективные. Далее клетки разрушали под действием гомогенизатора высокого давления. Полученные фракции разделяли центрифугированием. Установили, что ИЛ-4 преимущественно накапливается в тельцах включения *E. coli*, в то время как ФНО- α в приведенных условиях эффективно фолдируется бактериальными клетками и полностью растворим.