
ГЕНЕТИКА, МИКРОБИОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS, MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 577.27

БИОСИНТЕЗ РЕКОМБИНАНТНОГО ОВЕЧЬЕГО ИНТЕФЕРОНА- α В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

К. В. ОСТРИКОВА¹⁾, М. И. ПОТАПОВИЧ¹⁾, В. А. ПРОКУЛЕВИЧ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Обозначена актуальная для животноводства и, в частности, овцеводства проблема инфекционных заболеваний, приводящих к значительным экономическим потерям. Отмечается отсутствие антивирусных лечебных ветеринарных препаратов, несмотря на выпуск огромного количества антибиотиков для лечения заболеваний бактериальной этиологии. Обращается внимание на перспективность производства препаратов интерферонов. В ходе настоящего эксперимента последовательность гена овечьего интерферона- α оптимизирована для экспрессии в грамотрицательных бактериях и клонирована в клетках *Escherichia coli* в составе вектора pET24b. Получен штамм-продуцент рекомбинантного овечьего интерферона- α с максимальной продуктивностью, составляющей около 40 % общего клеточного белка.

Ключевые слова: клонирование; экспрессия; овечий интерферон- α ; индукция; рекомбинантный белок; масс-спектрометрический анализ.

Образец цитирования:

Острикова К. В., Потапович М. И., Прокулевич В. А. Биосинтез рекомбинантного овечьего интерферона- α в клетках *Escherichia coli* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 43–50.

For citation:

Vostrykava K. U., Patapovich M. I., Prakulevich U. A. Biosynthesis of ovine recombinant interferon- α in *Escherichia coli* cells. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 43–50 (in Russ.).

Авторы:

Кристина Владимировна Острикова – аспирантка кафедры микробиологии биологического факультета. Научный руководитель – В. А. Прокулевич.

Максим Иосифович Потапович – заведующий научно-исследовательской лабораторией биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета.

Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета.

Authors:

Krystina Vostrykava, postgraduate student at the department of microbiology, faculty of biology.

kristiost@mail.ru

Maksim Patapovich, head of the research laboratory of biotechnology at the department of microbiology, faculty of biology.

mipatapovich@gmail.com

Uladzimir Prakulevich, doctor of science (biology), full professor; head of the department of microbiology, faculty of biology.
prakulevich@mail.ru

BIOSYNTHESIS OF OVINE RECOMBINANT INTERFERON- α IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS

K. U. VOSTRYKAVA^a, M. I. PATAPOVICH^a, U. A. PRAKULEVICH^a

^aBelarusian State University, Niezaliežnasci Avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus

Corresponding author: K. U. Vostrykava (kristiost@mail.ru)

Viral infection diseases cause huge losses to livestock. Although bacterial infections can be controlled by antibiotics, there is a lack of effective treatment for viral diseases. Recombinant interferons have broad spectrum of antiviral activity and can be used to solve this problem. As a result of the study the ovine interferon- α gene sequence was optimized for expression in gram-negative bacteria and cloned in *Escherichia coli* cells as a part of the pET24b vector. A strain producing recombinant ovine interferon- α with a target protein yield of about 40 % of the total cellular protein was obtained.

Key words: cloning; expression; ovine interferon- α ; induction; recombinant protein; mass-spectrometric analysis.

Овцеводство – отрасль мирового продуктивного скотоводства, обеспечивающая сырьем легкую промышленность (шерсть, овчина, шмушка, козсырье), а также производящая пищевые продукты (ягнятина, баранина, молоко, сыры). Несмотря на регулярное проведение противоэпизоотических мероприятий, количество инфекционных заболеваний животных в хозяйствах постоянно растет. Экономический ущерб от инфицирования овец складывается из падежа, вынужденного убоя животных, снижения продуктивности вследствие их болезни, недополучения приплода по причине постинфекционного бесплодия, потери племенной ценности, а также затрат на профилактику [1].

К числу наиболее опасных заболеваний овец относят чуму мелкого рогатого скота, анаплазмоз, ящур, блютанг и др. [2]. Причинами их возникновения являются разнообразные стрессы и всегда сопутствующие им иммунодефицитные состояния, на фоне которых развиваются бактериальные, вирусные и смешанные инфекции. Если проблемы, связанные с заболеваниями бактериальной этиологии, современная наука решает достаточно успешно, то бороться с болезнями, вызванными вирусами, оказалось гораздо сложнее. Создание терапевтических препаратов, обладающих противострессовой, иммуномодулирующей и противовирусной активностью, – важное направление прикладных научно-исследовательских работ. Поиски подходящего агента привели к открытию многообещающих по своим свойствам белков – интерферонов (ИФН). Именно они характеризуются комплексным воздействием на организм животного.

Интерфероны – семейство цитокинов, многофункциональных секретируемых сигнальных белков животных [3]. По молекулярно-структурным и функциональным особенностям ИФН подразделяют на три типа. Группа ИФН овцы I типа включает в себя четыре подтипа ИФН- α и по одному подтипу - β , - ξ , - κ , - ϵ , - ω , - σ . К выработке ИФН- α способны все ядерные клетки организма (лейкоциты, фибробласты и др.). Эти цитокины индуцируют внутриклеточные механизмы, ингибирующие вирусную репродукцию. Кроме того, они принимают участие в процессах каскадной регуляции систем иммунной защиты организма – естественных киллеров, макрофагов, Т-лимфоцитов и др. Гены, кодирующие ИФН I типа, сконцентрированы у овцы на 2-й хромосоме [4; 5]. Ко II типу ИФН относится один представитель – ИФН- γ , под действием которого Т-лимфоциты синтезируют необходимые для иммунного ответа интерлейкины (ИЛ) [6]. Наконец, III тип ИФН включает в себя ИФН- λ 1, - λ 2 и - λ 3 (известные как ИЛ-29, ИЛ-28А и ИЛ-28В соответственно) [7] и недавно идентифицированный ИФН- λ 4 [8]. Интерфероны III типа, как и ИФН I типа, участвуют в противовирусной и антибактериальной защите, однако обособлены в отдельный тип, поскольку различаются аминокислотными последовательностями и третичной структурой. Интерфероны III типа синтезируются только клетками эпителиальных тканей [7; 8].

Благодаря высокому терапевтическому потенциалу и очевидному разнообразию специфических функций ИФН представляют большой интерес для ветеринарии в качестве средств профилактики и лечения вирусных, бактериальных и вирусно-бактериальных заболеваний, стрессовых состояний, а также как иммуномодуляторы. Главный способ применения препаратов на основе ИФН заключается во введении экзогенного белка в терапевтической или профилактической концентрации в организм животного. Получить экзогенный ИФН необходимой степени чистоты и в достаточных количествах можно биотехнологическим путем с помощью генно-инженерных методов. В настоящее время ведутся поиски наиболее высокопродуктивных систем синтеза рекомбинантных белков.

Особенностью биопрепаратов на основе ИФН является их строгая видоспецифичность, вследствие чего для каждого вида животных требуется разработка индивидуальных технологий производства субстанций и лекарственных форм. В Республике Беларусь выпускаются препараты на основе видоспецифических рекомбинантных свинных, бычьих, лошадиных и собачьих ИФН- α . Между тем препараты на основе овечьего ИФН- α отсутствуют. Цель настоящей работы – клонировать и получить высокоэффективный штамм-продуцент овечьего ИФН- α .

Материалы и методы исследования

Бактериальные штаммы и плазмиды. В целях клонирования рекомбинантных плазмид использовали клетки штамма *Escherichia coli* XL-1Blue ($F':: Tn 10 proA^+B^+ lacI^q\Delta(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96(Nal^r) thi hsdR17(r_k^- m_k^+) glnV44 relA1 lac$) [9] из коллекции научно-исследовательской лаборатории биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета БГУ.

Для экспрессии целевого белка были взяты клетки *E. coli* следующих штаммов [10]:

- BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL с генотипом *fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS λ DE3= λ sBamHIo Δ EcoRI-B int::(*lacI::PlacUV5::T7 gene1*) i21 Δ lin5. Клетки данного штамма содержат дополнительные копии генов, редко встречающихся у прокариот тРНК;*

- BL21(DE3) с генотипом $F^- dcm ompT hsdS(r_k^- m_k^-) gal \lambda$ (DE3). Клетки данного штамма лизогенны по бактериофагу λ DE3, который содержит в себе ген T7 РНК-полимеразы под контролем *lacUV5*-промотора;

- BL21(DE3)pLysS с генотипом $F^- ompT hsdS(r_k^- m_k^-) gal dcm \lambda$ (DE3) [*pLysS Cam^R*]. Клетки данного штамма содержат плазмиду pLysS, которая несет в своем составе конститутивно экспрессируемый ген эндוליрина бактериофага T7, являющийся естественным ингибитором T7 РНК-полимеразы. Штамм позволяет более строго следить за экспрессией белков под контролем T7-промотора;

- BL21-Gold с генотипом $F^- ompT hsdS(rB^- mB^-) dcm^+ Tetr gal endA Hte$. В данном штамме отсутствуют протеазы *lon* и *ompT*, которые могут разрушить белки во время очистки. Кроме того, ген *endA*, который кодирует эндонуклеазу I, инактивирован (не происходит деградации плазмидной ДНК).

Плазмиду pET24b(+) (*Novagen*, Великобритания) применяли в качестве вектора для экспрессии.

Генно-инженерные методики и ферменты. В работе использовали ферменты и соответствующие им буферные системы производства компании *Thermo Fisher Scientific* (США).

Синтез гена овечьего ИФН- α (*ovineIFN- α*) проводили таким образом, чтобы на концах последовательности находились сайты рестрикции *NdeI* и *EcoRI*, что позволит встроить полученную нуклеотидную последовательность в полилинкер pET24b.

Гидролиз ДНК рестриктазами *NdeI* и *EcoRI* осуществляли в буферных растворах при условиях, рекомендуемых фирмой-производителем. Результаты рестрикции контролировали при помощи электрофореза в агарозном геле. Реакционную смесь очищали от продуктов реакции с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*, США) согласно инструкции.

Лигирование гена *ovineIFN- α* с векторной ДНК проводили при помощи ДНК-лигазы фага T4. Реакционную смесь инкубировали при температуре 22 °С в течение 2 ч.

Индукция экспрессии рекомбинантного гена. Индукцию экспрессии гена овечьего ИФН- α в клетках штамма-продуцента осуществляли с использованием изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ). Для этого единичную колонию штамма-продуцента инокулировали в 10 мл среды LB, содержащей канамицин (30 мкг/мл) и хлорамфеникол (15 мкг/мл), и культивировали при температуре 37 °С в термостатированном шейкере на протяжении ночи при постоянном перемешивании (180 об/мин). Ночную культуру разводили в 20 раз и выращивали в течение 1–2 ч при температуре 37 °С до $ОП_{600} = 1$. Далее в среду добавляли индуктор ИПТГ до конечной концентрации 0,5 ммоль/л и продолжали культивировать в течение 4–8 ч при температуре 37 °С. Накопление целевого белка определяли с помощью электрофореза в денатурирующем (0,1 % ДСН – додецил сульфат натрия) 16 % полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) по методу Лэммли [11]. Пробы для ДСН-ПААГ-электрофореза получали путем осаждения одинакового количества клеток на основе данных по оптической плотности (ОП) бактериальных культур. Клетки осаждали центрифугированием (13 000 об/мин, 1 мин), ресуспендировали в загрузочном буфере (50 ммоль/л трис-НСl; рН 6,8; 5 % ДСН; 1,4 моль/л 2-меркаптоэтанол; 10 % глицерина; 0,05 % бромфенолового синего) и кипятили на водяной бане в течение 5 мин. Гель окрашивали в растворе кумасси синего R-250.

Масс-спектрометрический анализ. Образцы бактериальных клеток, находящиеся в 1 мл 70 % этанола, тщательно встряхивали и центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 2 мин. Надосадок сливали, образцы оставляли на воздухе до полного испарения следов этанола. Затем к осадку добавляли 30 мкл 70 % муравьиной кислоты и тщательно встряхивали. После этого добавляли 30 мкл 100 % ацетонитрила и снова встряхивали. Смесь центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 2 мин. Надосадок наносили на мишень для матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) масс-спектрометра в смеси (50 : 50) с синаповой кислотой.

Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 (*Thermo Fisher Scientific*) согласно инструкции производителя с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer той же компании.

Методы обработки последовательностей. Кодировая последовательность гена овечьего (*Ovis aries*) ИФН- α взята из базы данных GenBank, код доступа AY802984.1.

Эффективность использования кодонов определяли путем расчета индекса адаптации кодонов (Codon adaptation index – CAI) согласно Codon Usage Database при помощи алгоритма, реализованного в программе DAMBE [12].

Денситометрический анализ изображений гелей производили при помощи пакета программ ImageJ 1.47v (*Image Processing and Data Analysis in Java*, Национальный институт здоровья, США) [13].

Результаты исследования и их обсуждение

Зрелый овечий ИФН- α представляет собой белковую молекулу, состоящую из 167 аминокислотных остатков, с молекулярной массой около 19 кДа. Белок имеет две дисульфидные связи: Cys 2 – Cys 30 и Cys 100 – Cys 140, последняя из которых важна для проявления антивирусной активности ИФН [14].

Как известно, частота встречаемости синонимичных кодонов в эукариотических и бактериальных кодирующих последовательностях может значительно отличаться, что отражает различия в относительном количестве молекул тРНК, соответствующих таким кодомам. Недостаток определенных тРНК в клетках прокариот приводит к низкой эффективности гетерологичной экспрессии эукариотических последовательностей. Из-за присутствия тандемов Arg-кодонов AGA или AGG может произойти сдвиг рамки считывания. Эти проблемы способна решить замена в последовательности гена редко встречающихся в *E. coli* кодонов на синонимичные прокариотические, благодаря чему увеличится продукция белка от его суммарного количества (до 20–50 % и более).

Кодирующая последовательность природного гена овечьего ИФН- α из базы данных GenBank содержит редко встречающиеся в *E. coli* кодоны Arg (6 кодонов AGA; 7 – AGG; 1 – CGA), а также относительно редко встречающиеся Leu (9 кодонов CTC; 3 – TTG), Pro (2 кодона – CCC; 3 – CCT), Gly (1 кодон – GGA; 2 – GGG; 2 – GGC) и Lys (6 кодонов – AAG). Кроме того, последовательность содержит в себе три тандема AGG AGG: 34–39 пар оснований (п. о.), 64–69 и 489–492 п. о. (рис. 1, выделены полужирным шрифтом).

[illegible]

Рис. 1. Последовательности ДНК структурной части гена и белка овечьего ИФН- α :

I – природная нуклеотидная последовательность структурной части гена из базы данных GenBank (AY802984.1).

Редко встречающиеся в *E. coli* кодоны подчеркнуты; II – секвенированная последовательность гена, оптимизированного для экспрессии в *E. coli*; III – аминокислотная последовательность белка до и после оптимизации гена

Fig. 1. DNA and protein sequences of ovine IFN- α :

I – native nucleotide sequence from GenBank (AY802984.1). Rare codons for *E. coli* are underlined;

II – gene optimised for expression in *E. coli* after sequencing; III – amino acid sequence before and after optimisation

Рассчитанный индекс адаптации кодонов (CAI) для исходной последовательности овечьего ИФН- α из базы данных равен 0,54, что не позволяет надеяться на эффективную экспрессию интактного гена в клетках *E. coli* даже при достаточно сильном промоторе. Замена соответствующих кодонов при оптимизации последовательности повышает CAI до значения 0,98 (см. рис. 1).

На основании разработанного дизайна (см. рис. 1, II) синтезирована последовательность гена овечьего ИФН- α , адаптированного для экспрессии в клетках бактерий *E. coli*. В результате получен продукт – фрагмент ДНК размером 498 пар нуклеотидов (п. н.), – который содержит в себе следующие структурные элементы: инициаторный (ATG) и терминирующий (TGA) кодоны, сайты рестрикции (*Nde*I и *Eco*RI) и последовательность кодонов структурной части гена овечьего ИФН- α .

Оптимизированная последовательность целевого гена переклонирована в вектор экспрессии pET24b(+) по сайтам рестриктаз *Nde*I и *Eco*RI. Полученная конструкция была названа pMK13113. Рекомбинантная плазмида pMK13113 имеет размер 5810 п. н. и содержит в себе ген овечьего ИФН- α под контролем промотора бактериофага T7. Полученная конструкция кодирует устойчивость к канамицину (30 мкг/мл) [15]. Кроме того, плазмида имеет в своем составе терминатор фага T7 и последовательность, кодирующую ген *lac*I.

Правильность полученной синтетической последовательности овечьего ИФН- α в составе рекомбинантной молекулы подтверждена секвенированием (см. рис. 1, II). Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) трансформировали рекомбинантной плазмидной ДНК. В результате получен штамм *E. coli* BL21(DE3)-pMK13113, наследующий рекомбинантную плазмиду с геном овечьего ИФН- α , адаптированным к экспрессии в бактериях *E. coli*.

Для установления факта экспрессии целевого белка проводили индукцию гена путем добавления в культуру растущих бактерий индуктора ИПТГ в конечной концентрации 0,5 ммоль/л. В качестве отрицательного контроля выступали клетки того же штамма, выращиваемые без добавления индуктора.

В результате проведенного электрофореза суммарных клеточных белков *E. coli* зафиксировали белковый продукт с молекулярной массой около 19 кДа, что соответствует размеру белка овечьего ИФН- α (рис. 2). В контроле данный белок обнаруживается в следовых количествах.

Белок овечьего ИФН- α идентифицировали с помощью времяпролетного масс-спектрометра с источником ионизации МАЛДИ, позволяющим определять молекулярные массы белков, природных соединений и физиологически активных веществ (рис. 3).

Путем масс-спектрометрического анализа (см. рис. 3) удалось определить молекулярную массу накапливающегося в ходе индукции белка, которая оказалась равна 19 085 Да, при этом теоретическая расчетная масса овечьего ИФН- α составляла примерно 19 067 Да. Из этого можно сделать вывод о том, что белок, который накапливается в клетках *E. coli*, является овечьим ИФН- α .

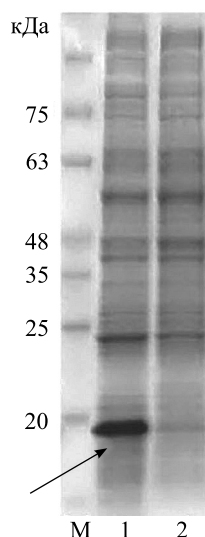


Рис. 2. ДСН-ПААГ-электрофореграмма клеточных белков *E. coli* BL21-(DE3)-pMK13113:
М – маркер молекулярной массы Blue Wide Range Prestained Protein Ladder (Cleaver Scientific Ltd, Великобритания) (кат. № CSL-BBL); 1 – образец спустя 4 ч после индукции ИПТГ (0,5 ммоль/л); 2 – образец без индукции ИПТГ.
Стрелкой обозначен белок, соответствующий по размеру овечьему ИФН- α (около 19 кДа)

Fig. 2. SDS-PAGE of *E. coli* BL21-(DE3)-pMK13113 cellular proteins:
M – molecular weight marker Blue Wide Range Prestained Protein Ladder (Cleaver Scientific Ltd, United Kingdom) (Cat. No. CSL-BBL); 1 – sample after 4 h induction with IPTG (0.5 mmol/l); 2 – sample without IPTG.
Molecular weight of ovine IFN- α is indicated by arrow (about 19 kDa)

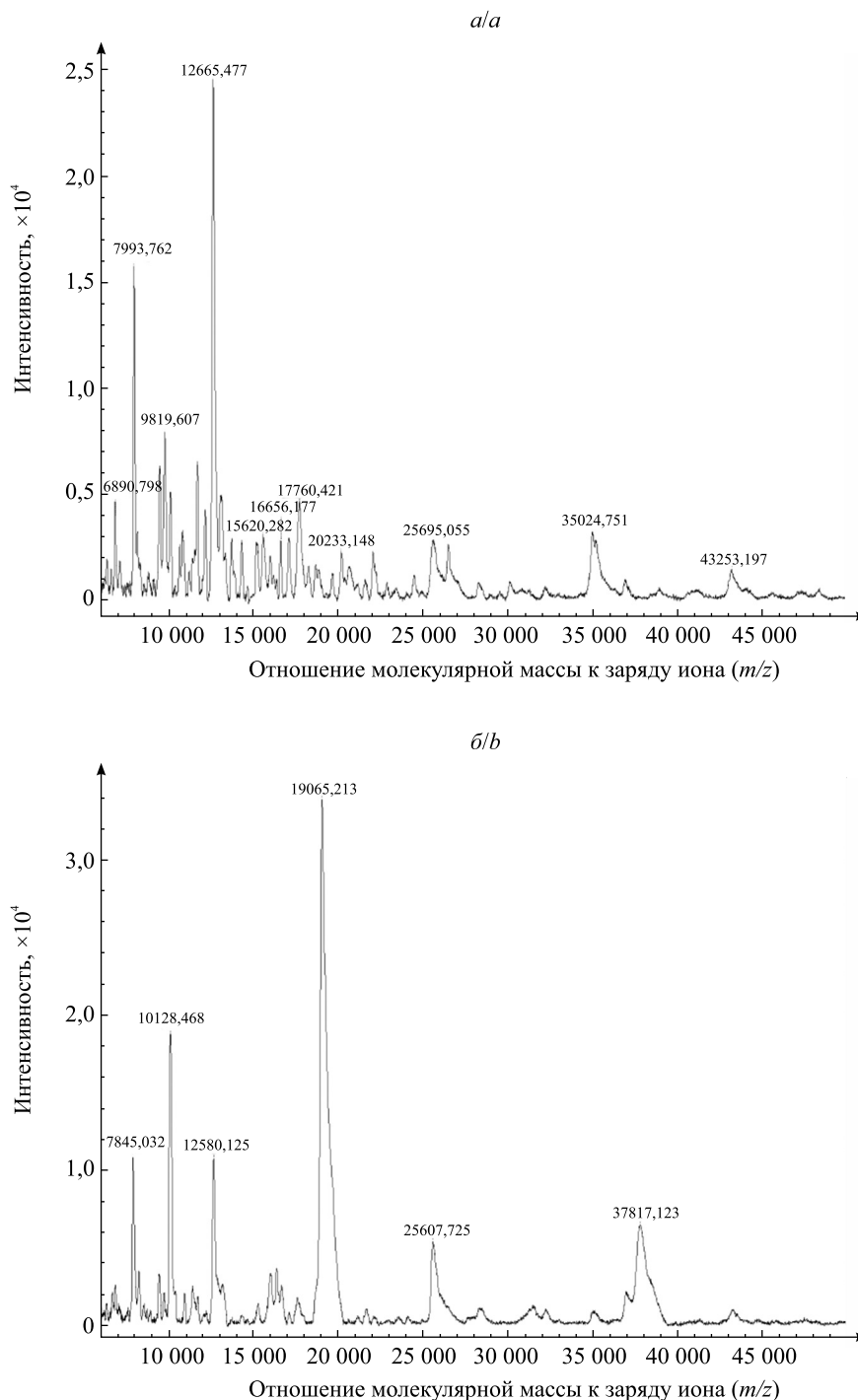


Рис. 3. МАЛДИ масс-спектры клеточных белков *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL-pMK1311:
а – образец без индукции ИПТГ; б – образец спустя 4 ч после индукции ИПТГ (0,5 ммоль/л). Значение m/z , равное 19 085,213, для однозарядного иона соответствует молекулярной массе 19 085,213 Да

Fig. 3. MALDI mass-spectra of *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL-pMK1311 cellular proteins:
а – sample without IPTG; б – sample after 4 h induction with IPTG (0.5 mmol/l). 19 085.213 m/z value for monovalent ion corresponds to 19 085.213 Da molecular mass

В целях выбора наиболее эффективного бактериального продуцента овечьего ИФН- α исследовали уровни накопления целевого белка в клетках различных, генетически отличающихся штаммов *E. coli*, а именно: BL21(DE3); BL21(DE3)pLysS; BL21-Gold и BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Для этого бактерии *E. coli* указанных штаммов трансформировали рекомбинантной плазмидой рМК13113. В трансформированных клетках изучали уровни экспрессии целевого белка после индукции гена овечьего ИФН- α . В качестве отрицательного контроля использовали клетки тех же штаммов, не подвергавшиеся воздействию индуктора (рис. 4).

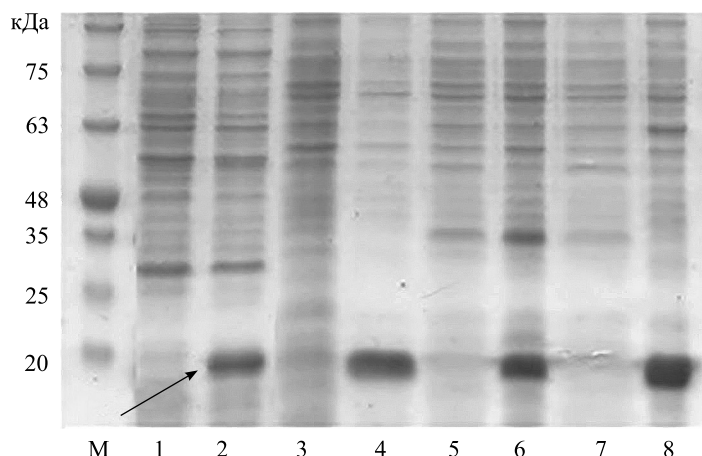


Рис. 4. ДСН-ПААГ-электрофореграмма клеточных белков в клетках различных штаммов *E. coli*, наследующих плазмиду pMK13113:
М – маркер молекулярной массы Blue Wide Range Prestained Protein Ladder (Cleaver Scientific Ltd, Великобритания) (кат. № CSL-BBL);

1 – штамм BL21(DE3)pLysS без добавления индуктора; 2 – тот же штамм после индукции;
3 – штамм BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL без добавления индуктора; 4 – тот же штамм после индукции;
5 – BL21-Gold без добавления индуктора; 6 – тот же штамм после индукции;
7 – BL21(DE3) без добавления индуктора; 8 – тот же штамм после индукции.
Стрелкой обозначен белок, соответствующий по размеру овечьему ИФН-α (около 19 кДа)

Fig. 4. SDS-PAGE of cellular proteins from different *E. coli* strains with plasmid pMK13113:
M – molecular weight marker Blue Wide Range Prestained Protein Ladder (Cleaver Scientific Ltd, United Kingdom) (cat. No. CSL-BBL); 1 – strain BL21(DE3)pLysS without IPTG; 2 – the same strain after induction;
3 – strain BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL without IPTG; 4 – the same strain after induction;
5 – strain BL21-Gold without IPTG; 6 – the same strain after induction;
7 – strain BL21(DE3) without IPTG; 8 – the same strain after induction.
Molecular weight of ovine IFN-α is indicated by arrow (about 19 kDa)

В результате проведенного электрофореза суммарных клеточных белков *E. coli* в индуцированных клетках различных штаммов зафиксирован белковый продукт с молекулярной массой около 19 кДа, что соответствует размеру белка овечьего ИФН-α. В контрольных образцах исследуемый белок отсутствовал (см. рис. 4). Пробы для ДСН-ПААГ-электрофореза получали путем осаждения одинакового количества клеток на основе данных по оптической плотности бактериальных культур спустя 4 ч после индукции экспрессии при температуре 37 °С. Эксперимент проводили три раза. С помощью денситометрического анализа цифровых фотографий окрашенных гелей выявляли средний выход целевого белка по отношению к общему белку клетки, выраженный в процентах (см. таблицу).

Накопление овечьего ИФН-α в клетках различных штаммов *E. coli*

Accumulation of ovine IFN-α in different *E. coli* strains

Штамм	Относительный выход целевого белка, %
BL21(DE3)pLysS	19,8 ± 0,81
BL21-Gold	20,2 ± 0,6
BL21(DE3)	38,0 ± 0,74
BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL	42,0 ± 0,62

Как следует из данных денситометрического анализа, в качестве штамма-хозяина для получения овечьего ИФН-α предпочтительно использовать бактерии *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, поскольку выход целевого белка по отношению к общему белку клетки составляет в среднем 42 %, что является наибольшим показателем для всех исследованных нами штаммов.

Таким образом, сконструирована рекомбинантная плаزمид с адаптированным к экспрессии в бактериях *E. coli* геном овечьего ИФН-α. Создан высокоэффективный штамм-продуцент, обозначенный как *E. coli* PPV MK13, накапливающий более 40 % целевого белка внутриклеточно.

Библиографические ссылки

1. Данкверт С. А., Холманов А. М., Осадчая О. Ю. Овцеводство стран мира. М., 2011.
2. Дорош М. Болезни овец и коз [Электронный ресурс]. URL: <http://www.e-reading.club/book.php?book=84004> (дата обращения: 21.03.2016).
3. The Interferons: Characterization and application / ed. by A. Meager. Weinheim, 2006.
4. Kalliolias G. D., Ivashkiv L. B. Overview of the biology of type I interferons // *Arthr. Res. Ther.* 2010. Vol. 12, suppl. 1. P. 1–9.
5. Woelk C. H., Frost S. D., Richman D. D., et al. Evolution of the interferon alpha gene family in eutherian mammals // *Gene*. 2007. Vol. 397. P. 38–50.
6. Sen G. C. Viruses and interferons // *Annu. Rev. Microbiol.* 2001. Vol. 55. P. 255–281.
7. Donnelly R. P., Kotenko S. V. Interferon-lambda: a new addition to an old family // *J. Interferon Cytokine Res.* 2010. Vol. 30, issue 8. P. 555–564.
8. Hong M., Schwert J., Lim C., et al. Interferon lambda 4 expression is suppressed by the host during viral infection // *J. Exp. Med.* 2016. Vol. 213, issue 12. P. 2539–2552.
9. XL-1 Blue Competent Cells. Manual [Electronic resource]. URL: <http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/200249.pdf> (date of access: 18.12.2016).
10. BL21-CodonPlus Competent Cells. Instruction Manual [Electronic resource]. URL: <http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/230240.pdf> (date of access: 20.01.2017).
11. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
12. Codon Usage Database [Electronic resource]. URL: <http://www.kazusa.or.jp/codon/> (date of access: 01.04.2015).
13. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nat. Methods*. 2012. Vol. 9, № 7. P. 671–675.
14. Fish E. N. Definition of receptor binding domains in interferon- α // *J. Interferon Res.* 1992. Vol. 12, issue 4. P. 257–266.
15. pET Manual system [Electronic resource]. URL: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf (date of access: 02.06.2016).

References

1. Dankvert S. A., Kholmanov A. M., Osadchaya O. Y. [Sheep breeding of the countries of the world]. Moscow, 2010 (in Russ.).
2. Dorosh M. [Diseases of sheep and goats]. URL: <http://www.e-reading.club/book.php?book=84004> (date of access: 11.03.2016) (in Russ.).
3. A. Meager (ed.). The Interferons: Characterization and application. Weinheim, 2006.
4. Kalliolias G. D., Ivashkiv L. B. Overview of the biology of type I interferons. *Arthr. Res. Ther.* 2010. Vol. 12, suppl. 1. P. 1–9. DOI: 10.1186/ar2881.
5. Woelk C. H., Frost S. D., Richman D. D., et al. Evolution of the interferon alpha gene family in eutherian mammals. *Gene*. 2007. Vol. 397. P. 38–50. DOI: 10.1016/j.gene.2007.03.018.
6. Sen G. C. Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001. Vol. 55. P. 255–281. DOI: 10.1146/annurev.micro.55.1.255.
7. Donnelly R. P., Kotenko S. V. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J. Interferon Cytokine Res.* 2010. Vol. 30, issue 8. P. 555–564. DOI: 10.1089/jir.2010.0078.
8. Hong M., Schwert J., Lim C. Interferon lambda 4 expression is suppressed by the host during viral infection. *J. Exp. Med.* 2016. Vol. 213, issue 12. P. 2539–2552. DOI: 10.1084/jem.20160437.
9. XL-1 Blue Competent Cells. Manual. URL: <http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/200249.pdf> (date of access: 18.12.2016).
10. BL21-CodonPlus Competent Cells. Instruction Manual. URL: <http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/230240.pdf> (date of access: 20.01.2017).
11. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
12. Codon Usage Database. URL: <http://www.kazusa.or.jp/codon/> (date of access: 01.04.2015).
13. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*. 2012. Vol. 9, No. 7. P. 671–675.
14. Fish E. N. Definition of Receptor Binding Domains in Interferon- α . *J. Interferon Res.* 1992. Vol. 12, issue 4. P. 257–266.
15. pET Manual system. URL: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf (date of access: 02.06.2016).

Статья поступила в редколлегию 30.03.2017.
Received by editorial board 30.03.2017.