







МРНТИ 62.37.41

<https://doi.org/10.26577/bb106120269>

В.Ю. Кислицин , Е.Е. Рыбак\* , А.С. Низкородова ,  
Л.Т. Надирова , А.М. Александрова , К.О. Шарипов 

Институт молекулярной биологии и биохимии имени М.А. Айтхожина, Алматы, Казахстан  
\*e-mail: elizasfishd@gmail.com

## ПОЛУЧЕНИЕ БЫЧЬЕГО РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА В СИСТЕМЕ *ESCHERICHIA COLI* И ЕГО РЕФОЛДИНГ

Интерфероны – сигнальные белки, секретируемые клетками птиц и млекопитающих в ответ на вирусную инфекцию, которые активируют неспецифический противовирусный иммунный ответ. В последние годы препараты интерферонов показали свою эффективность в профилактике и лечении вирусных инфекций у человека и животных. Однако в Казахстане такие препараты не производятся и поставляются из других стран. Поэтому разработка отечественной технологии получения рекомбинантных интерферонов для сельскохозяйственных животных является важной задачей для укрепления ветеринарной безопасности Казахстана. В данной работе был клонирован ген бычьего  $\alpha$ -интерферона (*Bos taurus*) и разработан продуцент рекомбинантного белка на основе бактерии *Escherichia coli* и были подобраны оптимальные условия его культивирования. Однако было установлено, что продуцируемый белок накапливается в тельцах включениях и не может быть выделен в нативных условиях. Соответственно, синтезированный рекомбинантный белок был выделен после растворения в буфере, содержащем 6 М гуанидинхлорид, а затем очищен и подвергнут рефолдингу с помощью металл-аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Выход целевого белка после рефолдинга составил 3,3 мг с литра бактериальной культуры. Таким образом, был разработан лабораторный метод получения рекомбинантного бычьего  $\alpha$ -интерферона. В дальнейшем планируется проведение испытаний противовирусной активности рекомбинантного белка и масштабирование технологии для промышленного производства отечественного препарата.

**Ключевые слова:** интерфероны, коровы, крупный рогатый скот, рекомбинантные белки.

V.Yu. Kislitsin, E.E. Rybak\*, A.S. Nizkorodova,  
L.T. Nadirova. A.M. Alexandrova, K.O. Sharipov  
Aitkhozhin Institute of molecular biology and biochemistry, Almaty, Kazakhstan  
\*e-mail: elizasfishd@gmail.com

### Production of bovine recombinant interferon alpha in the *Escherichia coli* system and its refolding

Interferons are signaling proteins secreted by the cells of birds and mammals in response to viral infection, which activates nonspecific antiviral immune response. In recent years, interferon preparations have shown effective in the prevention and treatment of viral infections in humans and animals. However, such preparations are not produced in Kazakhstan and are supplied from other countries. Therefore, developing a local technology for producing recombinant interferons for farm animals is an important task for strengthening Kazakhstan's veterinary security. In this study, the  $\alpha$ -interferon gene of a cattle (*Bos taurus*) was cloned and a recombinant protein producer based on the bacterium *Escherichia coli* was developed. In addition, optimal cultivation conditions to produce recombinant protein were selected. However, it was determined that the protein produced accumulated in inclusion bodies and was not able to be isolated under native conditions. Accordingly, the synthesized recombinant protein was isolated after dissolution in a buffer containing 6 M guanidine chloride and then purified and refolded using metal affinity chromatography with Ni-NTA agarose. Finally, the yield of the target protein after refolding was 3.3 mg per liter of bacterial culture. Thus, a laboratory method for producing bovine recombinant  $\alpha$ -interferon was developed. In the future, it is planned to conduct tests of the antiviral activity of the recombinant protein and scale up the technology for industrial production of the domestic drug.

**Keywords:** interferons, cows, cattle, recombinant proteins.

В.Ю. Кислицин, Е.Е. Рыбак\*, А.С. Низкородова,  
Л.Т. Надирова, А.М. Александрова, Қ.О. Шарипов  
«М.Ә. Айтхожин атындағы молекулалық биология  
және биохимия институты» ШЖҚ РМК, Алматы, Қазақстан  
\*e-mail: elizasfishd@gmail.com

### ***Escherichia coli* жүйесінде сиырдың рекомбинантты альфа-интерферонды алу және оның рефолдингі**

Интерферондар – құстар мен сүтқоректілердің жасушалары вирустық инфекцияға жауап ретінде бөлетін сигналдық белоктар. Олар спецификалық емес вирусқа қарсы иммундық жауапты белсендіреді. Соңғы жылдары интерферон препараттары адамдар мен жануарлардағы вирустық инфекциялардың алдын алу және емдеуде тиімділігін көрсетті. Дегенмен, мұндай препараттар Қазақстанда өндірілмейді және басқа елдерден жеткізіледі. Сондықтан ауылшаруашылық жануарларына арналған рекомбинантты интерферондарды өндірудің отандық технологиясын әзірлеу Қазақстандағы ветеринариялық қауіпсіздікті нығайту үшін маңызды міндет болып табылады. Бұл зерттеуде ірі қара малдың  $\alpha$ -интерферон гені (*Bos taurus*) клондалды, *Escherichia coli* бактериясына негізделген рекомбинантты белок өндірушісі жасалды және оңтайлы өсіру жағдайлары таңдалды. Дегенмен, өндірілген белок инклюзивті денелерде жиналатыны және жергілікті жағдайларда бөліп алуға болмайтыны анықталды. Тиісінше, синтезделген рекомбинантты белок 6 М гуанидин хлориді бар буферде ерігеннен кейін бөлініп алынды, содан кейін Ni-NTA агарозындағы металл аффинді хроматографияны қолдана отырып тазартылып, қайта бүктелді. Қайта бүктелгеннен кейін мақсатты ақуыздың өнімділігі бактериялық дақылдың бір литріне 3,3 мг құрады. Осылайша, рекомбинантты ірі қара малдың  $\alpha$ -интерферонын алудың зертханалық әдісі жасалды. Болашақ жоспарларға рекомбинантты белоктың вирусқа қарсы белсенділігін тексеру және отандық препаратты өнеркәсіптік өндіру технологиясын кеңейту кіреді.

**Түйін сөздер:** интерферондар, сиырлар, ірі қара мал, рекомбинантты белоктар.

#### **Сокращения и обозначения**

IFN – интерферон, MALDI-TOF MS – матрично-ассоциированная лазерная десорбция/ионизация – времяпролетная масс-спектрометрия, ДЭ ПААГ – денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле, п.о. – пара оснований, ИПТГ – Изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид.

#### **Введение**

Интерфероны – это группа цитокинов, низкомолекулярных белков (около 20 кДа), отвечающих за сигнальную функцию клеток, образуемых в ответ на заражение клеток млекопитающих и птиц вирусами (Mueller & Hartmann, 2021). Они, в свою очередь, подразделяются на интерфероны I, II, III типа. (Klotz et al., 2017). Интерфероны I типа выполняют ряд важнейших функций, предотвращающих распространение вирусного патогена на здоровые клетки. Они отвечают за стимуляцию презентации антигена, одновременно модулируют врожденный иммунный ответ и ингибируют провоспалительные процессы, регулируя выработку других цитокинов. К тому же, они обеспечивают активацию адаптивной иммунной системы. В этом случае интерфероны I типа выступают в качестве стимуляторов раз-

вития антигенспецифичных T- и B-клеточных реакций, которые формируют иммунологическую память (Ivashkiv & Donlin, 2014). Практически любые инфицированные клетки способны продуцировать интерфероны I типа посредством ответа на стимуляцию цитозольных или трансмембранных рецепторов при инфицировании организма вирусом. Наиболее часто индукция интерферона I типа стимулируется активацией цитозольных рецепторов, распознающих либо вирусную, либо иную ксеногенную преимущественно двуцепочечную РНК (Kawai & Akira, 2010).

Цитозольные рецепторы, участвующие в распознавании ксеногенных РНК, представляют собой семейство рецепторов распознавания образов RIG-1 (RLR), связывающиеся с MAVS (митохондриальным адаптером). Это связывание запускает сигнальный каскад, который завершается выделением и дальнейшей секрецией интерферонов альфа и бета. (Kawai & Akira, 2010; Goubau et al., 2013). Механизм действия интерферонов основан на связывании с рецепторами на клеточной мембране, к которым относятся IFNAR1 и IFNAR2 для интерферонов I типа. После связывания, интерфероны передают сигнал через путь JAK-STAT, активируя гетеротримерный комплекс факторов транскрипции

ISGF3. Сам комплекс ISGF3 состоит из фосфорилированных белков STAT1 и/или STAT2 и IRF9 (Schoggins, 2019).

Впервые интерферон был обнаружен Аликом Айзексом и Жаном Линдеманом в 1957 году при изучении интерференции, вызываемой инактивированным вирусом гриппа при росте живого вируса во фрагментах хорион-аллантоисной мембраны эмбриона цыплёнка (Isaacs & Lindenmann, 1957). В дальнейшем было показано, что клетки иммунной системы, такие как лимфоциты, макрофаги и другие при стимуляции вирусами могут выделять большие количества интерферона. Однако долгое время, несмотря на высокий потенциал применения интерферонов в терапии вирусных инфекций, их использование на практике оставалось неэффективным из-за низкой степени очистки получаемых препаратов. В 1979 году Рубинштейн и коллеги, применив метод обратной фазовой хроматографии, одни из первых смогли получить и очистить гомогенный лейкоцитарный человеческий интерферон, используя вирус-индуцированные лейкоциты человека (Rubinstein et al., 1979). Данная технология позволила получить активный интерферон высокой степени очистки, однако она была относительно трудоёмкой и времязатратной.

С развитием технологии рекомбинантной ДНК появилась возможность получать рекомбинантный интерферон используя в качестве продуцента бактерию *Escherichia coli*, что позволило значительно снизить себестоимость производства. Первыми компаниями, освоившими производство человеческого рекомбинантного интерферона альфа стали Biogen в Швейцарии и Genentech в США (White & Fenner, 2016, с. 310).

В настоящее время бактерии *E. coli* остаются одной из самых эффективных систем для получения рекомбинантных интерферонов, и технология получения белков с помощью этого продуцента продолжает совершенствоваться. Расширяется и спектр производимых рекомбинантных интерферонов. Так были получены рекомбинантные интерферон альфа собаки (Taiga et al., 2005), верблюда (Premraj et al., 2020), быка (Yin et al., 2023), кур (Xia et al., 2004) и некоторых других животных.

В свою очередь, получение рекомбинантных белков в *E. coli* имеет также недостатки. Главной проблемой является накопление интерферона в клетках продуцента в виде телец включения,

что требует проведения рефолдинга белка и усложняет процесс очистки. В связи с этим были сделаны попытки наладить получение рекомбинантного интерферона в эукариотических экспрессионных системах. На данный момент одной из наиболее используемых подобных систем являются дрожжи *Pichia pastoris* (He et al., 2019). Технология, основанная на *P. pastoris*, считается более эффективной в отношении сохранения активности и функций белка по сравнению с бактериальной системой *E. coli*, при этом имеет относительно низкую стоимость, большую стабильность, чем системы на основе бакуловирусов и клеток млекопитающих (Macaulay-Patrick et al., 2005; Khan et al., 2014). В исследовании Zhang et al. (2022) продемонстрировали методику получения интерферона альфа норки с использованием дрожжей *P. pastoris*. Таким же образом были получены интерфероны альфа человека (Liu et al., 2001), свиньи (Jin et al., 2010), и быка (Shao et al., 2015). Если сравнивать с бактериальной системой экспрессии *E. coli*, то возникают ограничения, связанные с длительностью культивирования дрожжей *P. pastoris*, а также риском гипер-гликозилирования белка (Asada et al., 2011). Поэтому *E. coli* остаётся наиболее распространённым продуцентом рекомбинантных интерферонов.

Препараты интерферонов нашли своё применение не только при лечении людей, но и в ветеринарии (Mueller & Hartmann, 2021). Важным направлением животноводства Казахстана является разведение крупного рогатого скота (КРС). По официальным данным на 1 января 2023 года поголовье КРС в Казахстане составляло более 8 млн. голов (Бюро национальной статистики Республики Казахстан, 2025). и продолжает увеличиваться. Коровы подвержены таким вирусным заболеваниям как вирусная диарея, коронавирус крупного рогатого скота, инфекционный ринотрахеит и другие (Есимсиитова и др., 2025; Тулепов и др., 2025; Zhigailov et al., 2023). Поэтому разработка отечественной технологии получения рекомбинантного интерферона для КРС важна для улучшения ветеринарной безопасности Казахстана.

В данной работе нами был клонирован ген бычьего альфа-интерферона и получен штамм-продуцент соответствующего рекомбинантного белка. Также были проведены эксперименты по оптимизации экспрессии, очистки и рефолдинга бычьего рекомбинантного интерферона альфа. В дальнейшем планируется испытание актив-

ности полученного рекомбинантного белка и масштабирование процесса для промышленных условий.

## Материалы и методы исследования

### 2.1 Клонирование гена $\alpha$ -интерферона коровы

Геномная ДНК коровы (*Bos taurus*), использованная для клонирования гена  $\alpha$ -интерферона (*BtInf2 $\alpha$* ), была выделена с помощью набора GenUP™ Plant DNA Kit (Biotechrabbit, ФРГ) из мышечной ткани животного, приобретенной в мясном магазине. Концентрацию ДНК после выделения определяли с помощью микроспектрофотометра Nano-500 (Allsheng, КНР). Кодированная последовательность гена *BtInf2 $\alpha$*  была амплифицирована на ДНК-амплификаторе Mastercycler X50s (Eppendorf, ФРГ) с помощью ДНК-полимеразы Phusion™ High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific, США), по протоколу, рекомендованному производителем (температура отжига праймеров 60 °C), с использованием праймеров BosINFA2\_UpLic (5'-tacttccaatccatgctgggtgttacctgtctgagg-3') и BosINFA2LowLic (5'-tatccaccttactgtcaaatgtagttcagatctccaccatc-3'). Праймеры были подобраны в программе SnapGENE 3.2.1 по последовательности ДНК M60913.1 interferon alpha II [*Bos taurus*] из базы данных NCBI. Амплифицированный фрагмент ДНК был клонирован LIC-методом (Aslanidis & de Jong, 1990) в вектор pNIC-28 (Savitsky et al., 2010). Полученными ДНК конструкциями был трансформирован штамм *E. coli* DH5 $\alpha$ , который использовался для наработки плазмидной ДНК, выделявшейся набором GenUP™ Plasmid Kit (Biotechrabbit). Клонированный таким образом ген *BtInf2 $\alpha$*  был секвенирован по методу Сэнгера на генетическом анализаторе ABI3500 (Applied Biosystems, США) с использованием программного обеспечения 3500 Series Data Collection Software V.3.1 (Applied Biosystems).

### 2.2 Электрофорез белка в денатурирующих условиях.

Электрофорез белка в денатурирующих условиях проводили в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) по методике Лэммли (Laemmli, 1970) на приборе SE250 (Hoefel scientific instruments, США). Для визуализации белка гель окрашивали красителем Кумасси G250 или добавляли в гель 2,2,2-трихлорэтанол (Ladner et al., 2004) и

регистрировали флуоресценцию белка на приборе ChemiDoc™ MP (Bio-Rad, США).

### 2.3 Экспрессия рекомбинантного белка в бактериальной культуре *E. coli*

Для экспрессии рекомбинантного интерферона был использован экспрессионный штамм *E. coli* BL21(DE3). Для этого пробирки с 5 мл среды LB и канамицином в концентрации 50 мкг/мл засеивали единичной колонией и культивировали на термостатируемой качалке ES-20 (Biosan, Латвия) при 180 об/мин и 37 °C в течение ночи, после чего из пробирок отбирали 0,5 мл ночной культуры и снова засеивали пробирки с 5 мл среды LB и культивировали их 1 час при 26 °C после чего индуцировали экспрессию рекомбинантного белка добавлением изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) и культивировали 6-16 часов. Далее по 30 мл клеточной суспензии отбирали для анализа с помощью денатурирующего электрофореза (ДЭ) в ПААГ. Оставшуюся часть бактериальной культуры осаждали центрифугированием на центрифуге 5810R (Eppendorf) (5000 об/мин, 4 °C, 5 минут) для проверки растворимости синтезируемого рекомбинантного белка. Клеточный осадок ресуспендировали в лизирующем буфере (буфер А) (50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол), добавляли лизоцим в концентрации 1 мг/мл и инкубировали во льду 30 минут. Далее осаждали лизат центрифугированием (10000 об/мин при 4 °C в течение 25 минут). Супернатант и осадок, ресуспендированный, в буфере А, анализировали с помощью ДЭ ПААГ.

### 2.4 Вестерн-блоттинг

Белок из ПААГ переносился на PVDF-мембрану (ThermoFischer Scientific) полусухим способом на приборе EBU-4000 (C.B.S. Scientific, США). Для обнаружения рекомбинантных белков использовались антитела His-Tag (H-3) Alexa Fluor sc-8036 (Santa Cruz Biotechnology, США), детекцию флуоресцентного сигнала проводили на приборе ChemiDoc™ MP.

### 2.5 Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

Для идентификации пептидных фрагментов белка, вырезанного из ПААГ была проведена масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетной ионизацией (MALDI-TOF MS) с ис-

пользованием масс-спектрометра UltrafleXtreme II TOF/TOF (BrukerDaltoniks GmbH, Германия). Триптический гидролиз белковых полос в геле (SDS-PAGE) проводился, как описано Смитом (Smith, 1997). Идентификацию пептидов проводили с использованием сервера пептидных масс-отпечатков Mascot (<http://www.matrixscience.com/>).

### 2.6 Выделение рекомбинантного белка металл-аффинной хроматографией

Для препаративного выделения рекомбинантного белка колбу со 150 мл среды LB с канамицином засеивали 1 мл ночной культуры, подращивали 2 часа в термостатируемой качалке ES-20 (Biosan, Латвия) при 180 об/мин при 26 °C после чего добавляли 1 мМ ИПТГ и культивировали ещё 16 часов. Затем бактериальные клетки осаждали центрифугированием в 50 мл пробирках на центрифуге 5810R (5000 об/мин, 4 °C, 15 минут). Далее осадок растворяли в лизирующем буфере Б (20 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 мМ NaCl, pH 7,4), и лизировали путем многократного пропускания суспензии через инъекционную иглу. Тельца включения отделяли от растворимой фракции лизата центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 10 мин и ресуспендировали в буфере В для растворения включений (6М гидрохлорид гуанидина, 300 мМ NaCl, 50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>, (pH 8,0)). Растворённые тельца включения инкубировали в течение 2 ч при 4 °C, а клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 12000 об/мин в течение 30 мин при 4 °C. Супернатант переносили в 15 мл пробирку и добавляли к нему 2 мл Ni-NTA агарозы (Qiagen, США), уравновешенной буфером В и инкубировали смесь на качалке во льду 2 часа. Далее суспензию лизата с Ni-NTA агарозой загружали в 10 мл хроматографическую колонку (Pharmacia, Швеция), подключенную к хроматографической системе GP250 (Pharmacia), давая стечь жидкой фазе, после чего колонку сначала промывали промывочным буфером Г (8М мочевины, 10 мМ имидазола, 500 мМ NaCl и 20 мМ Трис-НСl, pH 8,0). Рефолдинг рекомбинантных белков, связанных с колонкой, проводили путем применения медленного линейного градиента от 8М (буфер Г) до 0М мочевины (буфер Д) (10 мМ имидазола, 20 мМ Трис-НСl, 500 мМ NaCl, pH 7,5). После рефолдинга связанный с колонкой белок промывали буфером Е (40 мМ имида-

зола, 20 мМ Трис-НСl, 500 мМ NaCl, pH 7,5) и, наконец, элюировали линейным градиентом от 100 до 500 мМ имидазола, используя буфер Ж (20 мМ Трис-НСl, 500 мМ NaCl, pH 7,5). Фракции, содержащие рекомбинантный белок, анализируют с помощью денатурирующего ПААГ-электрофореза.

Объединенные фракции, содержащие рекомбинантный белок, диализовали против буфера PBS pH 7,4 (Pharmacia) используя диализные пробирки Pur-A-Lyzer™ Maxi 6000 (Sigma-Aldrich, США), после чего добавляли равный объем глицерина и оставляли на хранение при -80 °C.

Концентрацию белка после диализа определяли с помощью микроспектрофотометра Nano-500 (Allsheng).

### Статистический анализ

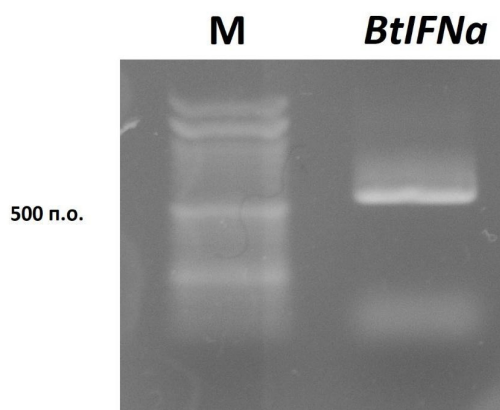
Все измерения проводились в трёх технических повторях, по которым в программе Microsoft Excel вычислялось среднее арифметическое значение и стандартное отклонение.

### Результаты исследования и их обсуждение

Последовательность ДНК M60913.1 interferon alpha II, найденная в базе данных NCBI была проанализирована в программе SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) для определения N-концевого сигнального пептида, отщепляемого при секреции белка из клетки. В результате программой было определено, что место его отщепления находится между 21 и 22 аминокислотными остатками. Также в программе Augustus (<https://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>) был проведён поиск интронов в гене, показавший их отсутствие, что согласуется с данными литературы [11]. Исходя из этого были подобраны ПЦР-праймеры. После выделения геномной ДНК из мышечной ткани животного концентрация ДНК в образце по результатам трёх измерений составила 38.56±1.42 нг/мкл. Выделенная геномная ДНК была успешно использована для амплификации фрагмента гена *BtIfn2a* размером 525 п.о. (Рисунок 1), что подтвердило возможность выделения ДНК из мышечной ткани набором GenUP™ Plant DNA Kit. После клонирования фрагмента в экспрессионный вектор pNIC-28 была получена плаزمида pNIC28IFNaBos (Рисунок 2).

**Рисунок 1**

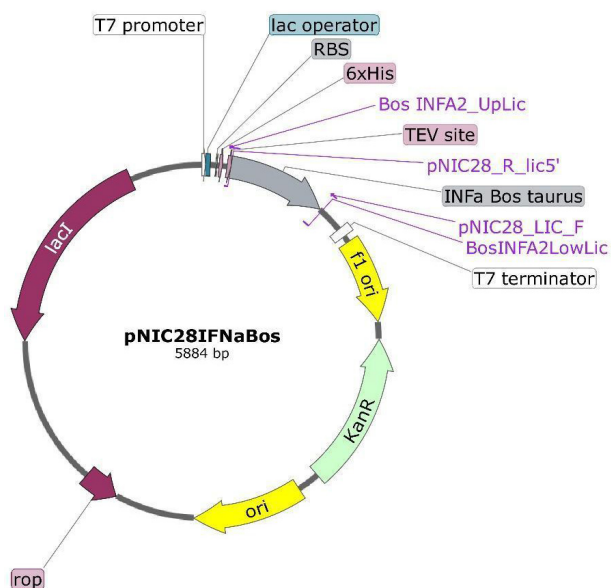
Результаты амплификации гена *BtIfna*



Примечание: M – маркер длин фрагментов ДНК 50 bp DNA ladder RTU (Biotechrabbit).

**Рисунок 2**

Карта плазмиды *pNIC28IFNaBos*

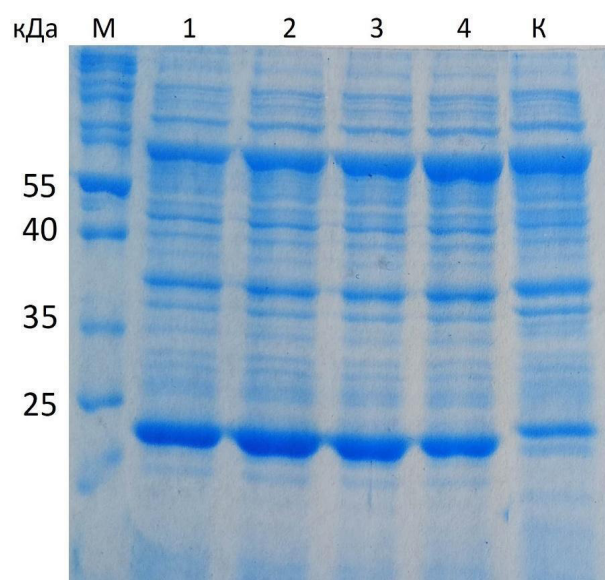


Примечание: Плазмида содержит ген устойчивости к канамицину (*KanR*), *lac* оператор под контролем промотора фага T7 регулирует экспрессию целевого гена *INFa V. taugus*, содержащего на N-конце His-tag (6 остатков гистидина) и сайт протеазы Вируса табачной мозаики для удаления His-tag, белок *Rop* поддерживает низкую копию плазмиды в клетке *E. coli*.

Клонированный в плазмиду фрагмент ДНК был секвенирован и полученный сиквенс подтвердил высокую гомологию с последовательностью ДНК M60913.1 из базы данных NCBI. Для экспрессии рекомбинантного белка плазмидой *pNIC28IFNaBos* был трансформирован штамм *E. coli* BL21(DE3). Для проверки наличия экспрессии было посеяно 4 клона в жидкую среду LB с канамицином и после подращивания добавлен 1 mM ИПТГ для индукции. После ночного культивирования был проведён ДЭ ПЛАГ (Рисунок 3).

**Рисунок 3**

Электрофореграмма общего клеточного белка разных клонов *E. coli* после трансформации плазмидой *pNIC28IFNaBos* после индукции ИПТГ



Примечание: M – маркер молекулярных масс белка, 1-4 – номера клонов, K – клетки без индукции

Мажорный белок с молекулярной массой около 20 кДа из дорожки №2 (Рисунок 3) был вырезан и проанализирован с помощью MALDI-TOF MS. Результаты анализа подтвердили соответствие белка бычьему  $\alpha$ -интерферону (Таблица 1, Рисунок 4).

**Таблица 1**

Пептиды с массами, совпадающими с расчётными массами пептидов, получаемых в результате трипсинолиза бычьего  $\alpha$ -интерферона по специфическим сайтам

Ожидаемая масса	Полученная масса	$\Delta$ массы (ppm)	Пептид	Позиция	Модификации	Пропуски сайтов пептидазы
531.324	531.289	-66.700	(R)/ENLR/(L)	15-18		0
681.336	681.306	-44.200	(R)/VEMMR/(A)	148-152	MSO	0
697.329	697.301	-40.500	(R)/VEMMR/(A)	148-152	MSO MSO	0
1165.602	1165.578	-20.300	(R)/LSPHPCLQDR/(K)	26-35		0
1384.675	1384.620	-39.600	(K)/EYSDCAWEIIR/(V)	137-147		0
1641.810	1641.758	-31.800	(K)/EKEYSDCAWEIIR/(V)	135-147		1

**Рисунок 4**

Покрывание аминокислотной последовательности бычьего  $\alpha$ -интерферона пептидами, полученными после MALDI-TOF MS

#### INFa2 *Bos taurus*

LGCYLSEdHMLGARENLRLLRMNRLSPHPCLQDR  
 KDFGLPQEMVEGNQLQKDQAISVLHEMLQQCFNLF  
 YTEHSSAAWNTTLLLEQLCTGLQQLEDLDACLGPV  
 MGEKSDMGRMGPIILTVKKYFQGIHVYLK**EKEYSD**  
**CAWEIIRVEMMR**ALSSSTTLQKRLRKMGGDLNLSL

Примечание: Красным цветом выделено расположение пептидов с массами, совпадающими с расчётными массами пептидов, получаемыми при трипсинолизе бычьего  $\alpha$ -интерферона по специфическим сайтам

На следующем этапе работы был проведён подбор оптимальной концентрации ИПТГ и времени культивирования, для чего ночной культурой были засеяны пробирки с 5 мл среды LB, в которые добавлялся ИПТГ в концентрации 0,1 0,5 и 1 мМ, затем пробирку культивировали 6 или 16 часов, после чего отбирались пробы для ДЭ ПААГ, а также был сделан вестерн-блоттинг для подтверждения экспрессии рекомбинантного белка (Рисунок 5). Результаты показали, что при культивировании в течение ночи (16 ч) образуется больше рекомбинантного белка, а также, что снижение концентрации ИПТГ негативно влияет на уровень экспрессии.

Для препаративного выделения рекомбинантного интерферона был использован осадок клеток полученный после культивирования штамма-продуцента в колбе со 150 мл среды LB с добавлением индуктора и антибиотика в течение 16 часов. Выделение белка проводилось с использованием металл-аффинной хроматогра-

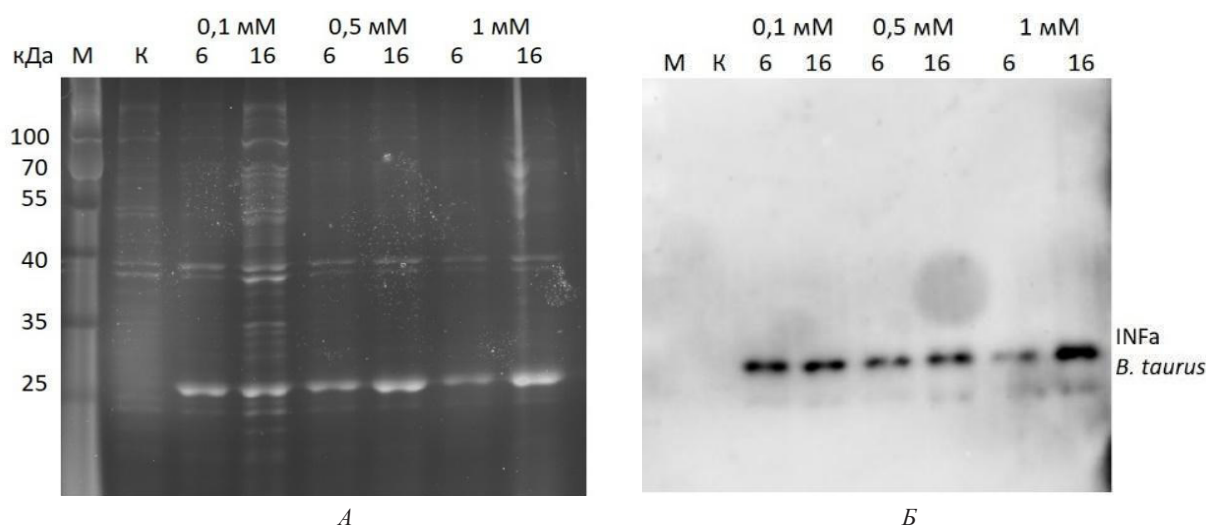
фии с Ni-NTA агарозой по методике, описанной для верблюжьего рекомбинантного интерферона альфа (Premraj et al., 2020). При этом связанный со смолой белок вначале промывался буфером с 8 М мочевины для отмывки от гуанидинхлорида, а затем буфером без мочевины и таким образом происходил рефолдинг белка. Ранее, в работах по получению рекомбинантного бычьего  $\alpha$ -интерферона, белок выделяли в денатурирующих условиях после чего проводили диализ в диализных мешках. Например, в работе (Yin et al., 2023) диализ проводился в течение 24 часов, с двумя сменами рефолдирующего буфера через 10 часов. Рефолдинг белка диализом в диализных мешках требует значительный объём буфера и сопровождается риском преципитации белка, для предотвращения которого в буфер добавляют глицерин и прочие добавки. Например, Mussakhmetov et al. (2016) для рефолдинга рекомбинантного человеческого  $\gamma$ -интерферона добавляли в диализный буфер L-аргинин,

L-пролин, полиэтиленгликоль сахарозу и ПЭГ 3500. Применение промывки иммобилизованного на Ni-NTA агарозе бычьего рекомбинантного  $\alpha$ -интерферона в данной работе сократило время рефолдинга с 24 часов до 10 минут и значительно снизило расход буферов, позволив избежать использования множества добавок и таким об-

разом упростило получение рекомбинантного бычьего  $\alpha$ -интерферона. На Рисунке 6 представлены фракции, собранные с колонки в процессе рефолдинга и элюции рекомбинантного белка. Результаты вестерн-блоттинга показали (Рисунок 6Б), что рекомбинантный белок присутствует во фракции E4, объем которой составлял 2 мл.

### Рисунок 5

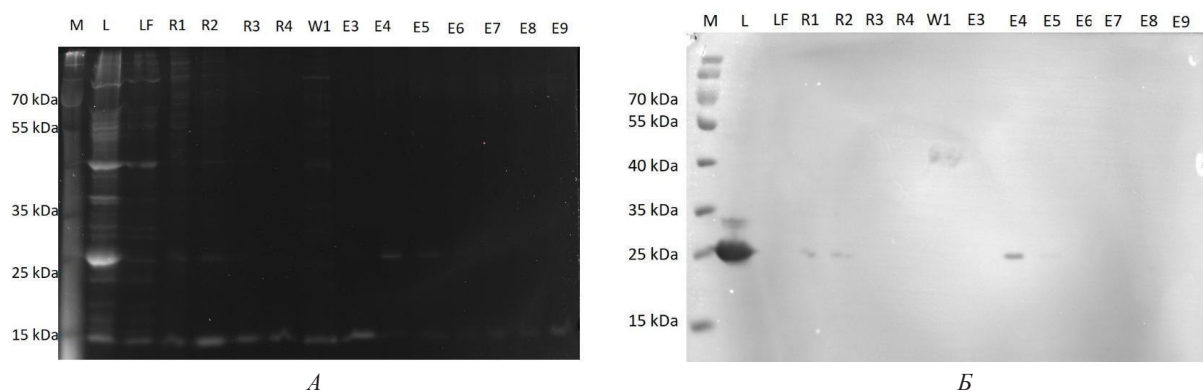
Электрофореграмма (А) и вестерн-блоттинг (Б) общего белка в клетках *E. coli* трансформированных плазмидой *pNIC28IFNaVos* после индукции разными концентрациями ИПТГ



Примечание: М – маркер молекулярных масс белка, К – клетки без индукции, 6, 16 – время культивирования в часах, 0,1 мМ – 1 мМ – концентрация ИПТГ

### Рисунок 6

Электрофореграмма (А) и вестерн-блоттинг (Б) фракций, собранных при очистке рекомбинантного белка *BtINFα* металл-аффинной хроматографии



Примечание: М – белковый маркер, L – общий клеточный лизат в буфере для ДЭ, LF – лизат после связывания с Ni-NTA агарозой, R1 – R4 – фракции, собранные при рефолдинге связанного с Ni-NTA агарозой белка в градиенте мочевины 8 – 0 М, E4 – E9 – фракции, собранные при элюции белка градиентом имидазола 20 – 500 мМ.

Во фракции E4 использованный для элюции буфер с имидазолом был заменён на PBS с помощью диализных пробирок, после чего на микроспектрофотометр была определена концентрация белка, которая по результатам трёх измерений составила  $250.49 \pm 3.23$  мкг/мл. Таким образом нами было получено около 500 мкг рефолдированного рекомбинантного бычьего интерферона альфа из 150 мл бактериальной культуры, что в пересчёте на литр составляет около 3,3 мг. Полученный выход рекомбинантного интерферона согласуется с результатами, полученными для других интерферонов (Mussakhmetov et al., 2016).

### Заключение

Была получена рекомбинантная плаزمидная рN1C28IFNaBos, содержащая клонированную последовательность бычьего интерферона альфа без N-концевого сигнального пептида. Рекомбинантный белок BtIFNa был экспрессирован в клетках экспрессионного штамма *E. coli* BL21(DE3). Соответствие полученного белка бычьему интерферону альфа было подтверждено с помощью MALDI-TOF MS. После оптими-

зации условий культивирования, включавшей подбор концентрации индуктора и времени культивирования рекомбинантный белок, соответствующий по пептидному составу бычьему интерферону альфа, был успешно очищен и рефолдирован с помощью метода металл-аффинной хроматографии. Выход целевого белка после рефолдинга составил 3,3 мг на 1 литр бактериальной культуры.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность Павлу Волкову и сотрудникам ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН (Москва) за помощь в проведении MALDI-TOF масс-спектрометрии.

### Источник финансирования

Работа выполнена за счет средств ГФ ИРН AP27510269 «Разработка технологии получения рекомбинантных интерферонов для двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*), овцы (*Ovis aries*) и коровы (*Bos taurus*)», финансируемой Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

### Вклад авторов

В.Ю. Кислицин: Концептуализация, Методология, Администрирование проекта, Привлечение финансирования, Проведение исследования, Визуализация, Написание – проверка и редактирование; Е.Е. Рыбак: Проведение исследования, Формальный анализ, Визуализация, Написание – первоначальный вариант; А.С. Низкородова: Научное руководство, Написание – рецензирование и редактирование; Л.Т. Надирова: Валидация, Проведение исследования; А.М. Александрова: Формальный анализ, Проведение исследования; К.О. Шарипов: Ресурсы, Написание – проверка и редактирование.

### Литература

- Asada, H., Uemura, T., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Shimamura, T., Tsujimoto, H., Ito, K., Sugawara, T., Nakane, T., Nomura, N., Murata, T., Haga, T., Iwata, S., & Kobayashi, T. (2011). Evaluation of the *Pichia pastoris* expression system for the production of GPCRs for structural analysis. *Microbial Cell Factories*, 10, 24. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-24>
- Aslanidis, C., & de Jong, P. J. (1990). Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Research*, 18(20), 6069–6074. <https://doi.org/10.1093/nar/18.20.6069>
- Goubau, D., Deddouche, S., & Reis e Sousa, C. (2013). Cytosolic sensing of viruses. *Immunity*, 38(5), 855–869. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.007>
- He, H., Zhai, C., Mei, M., Rao, Y., Liu, Y., Wang, F., Ma, L., Jiang, Z., Zhang, G., & Yi, L. (2019). Functional expression of porcine interferon- $\alpha$  using a combinational strategy in *Pichia pastoris* GS115. *Enzyme and Microbial Technology*, 122, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.12.005>
- Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 147(927), 258–267. <https://doi.org/10.1098/rspb.1957.0048>
- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 14(1), 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Jin, H., Liu, G., Ye, X., Duan, Z., Li, Z., & Shi, Z. (2010). Enhanced porcine interferon- $\alpha$  production by recombinant *Pichia pastoris* with a combinational control strategy of low induction temperature and high dissolved oxygen concentration. *Biochemical Engineering Journal*, 52(3), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.07.009>
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>

- Khan, M. A., Hassan, N., Ahmad, N., Khan, M. I., Zafar, A. U., Khan, F., & Husnain, T. (2014). Studies to analyse the relationship between IFN $\alpha$ 2b gene dosage and its expression, using a *Pichia pastoris*-based expression system. *Yeast*, 31(1), 13–28. <https://doi.org/10.1002/yea.2990>
- Klotz, D., Baumgärtner, W., & Gerhauser, I. (2017). Type I interferons in the pathogenesis and treatment of canine diseases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 191, 80–93. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.08.006>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Ladner, C. L., Yang, J., Turner, R. J., & Edwards, R. A. (2004). Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Analytical Biochemistry*, 326(1), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.047>
- Liu, P. T., Ta, T. V., & Villarete, L. H. (2001). High-yield expression and purification of human interferon alpha-1 in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 22(3), 381–387. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1460>
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249–270. <https://doi.org/10.1002/yea.1208>
- Mueller, R. S., & Hartmann, K. (2021). Interferon therapies in small animals. *Veterinary Journal*, 271, 105648. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105648>
- Mussakhmetov, A., Turgimbayeva, A., & Khassenov, B. (2016). Production of recombinant human interferon-gamma in *Escherichia coli*. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, (2). <https://www.biotechlink.org/index.php/journal/article/view/172>
- Premraj, A., Aleyas, A. G., Nautiyal, B., & Rasool, T. J. (2020). Camelid type I interferons: Identification and functional characterization of interferon alpha from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Molecular Immunology*, 119, 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.01.020>
- Rubinstein, M., Rubinstein, S., Familletti, P. C., Miller, R. S., Waldman, A. A., & Pestka, S. (1979). Human leukocyte interferon: Production, purification to homogeneity, and initial characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(2), 640–644. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.640>
- Savitsky, P., Bray, J., Cooper, C. D., Marsden, B. D., Mahajan, P., Burgess-Brown, N. A., & Gileadi, O. (2010). High-throughput production of human proteins for crystallization: The SGC experience. *Journal of Structural Biology*, 172(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.06.008>
- Shao, J., Cao, C., Bao, J., Liu, H., Peng, T., Gao, M., & Wang, J. (2015). Characterization of bovine interferon  $\alpha$ 1: Expression in yeast *Pichia pastoris*, biological activities, and physicochemical characteristics. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 35(3), 168–175. <https://doi.org/10.1089/jir.2013.0139>
- Schoggins, J. W. (2019). Interferon-stimulated genes: What do they all do? *Annual Review of Virology*, 6(1), 567–584. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756>
- Smith, B. E. (1997). *Protein sequencing protocols*. Humana Press.
- Taira, O., Watanugi, I., Hagiwara, Y., Takahashi, M., Arai, S., Sato, H., & Maehara, N. (2005). Cloning and expression of canine interferon-alpha genes in *Escherichia coli*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(10), 1059–1062. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.1059>
- White, D. O., & Fenner, F. J. (2016). *Medical virology* (3rd ed.). Elsevier.
- Xia, C., Liu, J., Wu, Z. G., Lin, C. Y., & Wang, M. (2004). The interferon-alpha genes from three chicken lines and its effects on H9N2 influenza viruses. *Animal Biotechnology*, 15(1), 77–88.
- Yin, H., Li, S., Chai, C., Zhang, F., Ma, Y., Wu, Y., Fu, C., Diao, Y., Zhou, Y., Zhang, J., Niu, R., & Wang, W. (2023). Biological activity of recombinant bovine IFN- $\alpha$  and inhibitory effect on BVDV in vitro. *Microbial Pathogenesis*, 181, 106155. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106155>
- Zhang, H., Zhang, D., Lu, H., Zou, D., Hu, B., Lian, S., & Lu, S. (2022). Antiviral activity of mink interferon alpha expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 976347. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.976347>
- Zhigailov, A. V., Perfilyeva, Y. V., Ostapchuk, Y. O., Kan, S. A., Lushova, A. V., Kuligin, A. V., Ivanova, K. R., Kumatbekova, S. A., Abdolla, N., Naizabayeva, D. A., Maltseva, E. R., Berdygulova, Z. A., Mashzhan, A. S., Zima, Y. A., Nizkorodova, A. S., Skiba, Y. A., & Mamadaliyev, S. M. (2023). Molecular and serological survey of bovine viral diarrhoea virus infection in cattle in Kazakhstan. *Research in Veterinary Science*, 162, 104965. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.104965>
- Бюро национальной статистики Республики Казахстан. (2025, 11, 18). Основные показатели развития животноводства в 2022 году. [https://stat.gov.kz/ru/news/osnovnye-pokazateli-razvitiya-zhivotnovodstva-v-2022-godu-/?sphrase\\_id=1268960](https://stat.gov.kz/ru/news/osnovnye-pokazateli-razvitiya-zhivotnovodstva-v-2022-godu-/?sphrase_id=1268960)
- Есимсиитова, З., Хусаинов, Д., Тиссен, И., Сансызбай, А., Лесова, Ж., Рысбаева, Е., Кайя, А., & Бердикулов, М. (2025). Роль вирусных патогенов и эпизоотология респираторных заболеваний у крупного рогатого скота. *Микробиология және вирусология*, 3(50), 264–280. <https://doi.org/10.53729/MV-AS.2025.03.14>
- Тулупов, Б., Нисанова, Р., Акшалава, П., Башенова, Э., Маманова, С., Карабасова, А., Жапбар, А., Акылбай, А., Туркеев, М., & Икрамкулова, Ф. (2025). Вирусная диарея крупного рогатого скота в Казахстане: эпизоотическая ситуация и методы контроля 2024 год. *Наука и образование*, 1(2(79)). <https://doi.org/10.52578/2305-9397-2025-2-1-34-44>

#### Сведения об авторах:

Кислицин Валерий Юрьевич – PhD, старший научный сотрудник лаборатории исследований белков и нуклеиновых кислот Института молекулярной биологии и биохимии им. Айтхожина (Алматы, Казахстан, e-mail: [kislitsinval\\_bio@mail.ru](mailto:kislitsinval_bio@mail.ru)).

Рыбак Елизавета Евгеньевна (корреспондентный автор) – лаборант по исследованиям белков и нуклеиновых кислот Института молекулярной биологии и биохимии им. Айтхожина (Алматы, Казахстан, e-mail: [elizafishd@gmail.com](mailto:elizafishd@gmail.com)).

Низкородова Анна Сергеевна – к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории исследований белков и нуклеиновых кислот Института молекулярной биологии и биохимии им. Айтхожина (Алматы, Казахстан, e-mail: anna\_niz@mail.ru)

Надирова Лейла Тимуровна – научный сотрудник лаборатории исследований белков и нуклеиновых кислот Института молекулярной биологии и биохимии им. Айтхожина (Алматы, Казахстан, e-mail: leila.nadirova@gmail.com)

Александрова Алена Михайловна – PhD, старший научный сотрудник лаборатории исследований белков и нуклеиновых кислот Института молекулярной биологии и биохимии им. Айтхожина (Алматы, Казахстан, e-mail: alyona.alexandrova1987@gmail.com)

Шарипов Камалидин Орынбаевич – д. б. н., профессор, генеральный директор Института молекулярной биологии и биохимии им. Айтхожина (Алматы, Казахстан, e-mail: skamalidin@mail.ru).

**Information about authors:**

Kislitsin Valeriy Yurievitch – PhD, senior researcher of the laboratory of protein and nucleic acids research, of Aitkhozhin Institute of molecular biology and biochemistry (Almaty, Kazakhstan, e-mail: kislitsinval\_bio@mail.ru).

Rybak Elizaveta Evgenievna (corresponding author) – laboratory assistant protein and nucleic acids research of Aitkhozhin Institute of molecular biology and biochemistry (Almaty, Kazakhstan, e-mail: elizasfishd@gmail.com).

Nizkorodova Anna Sergeevna – leader researcher of the laboratory of protein and nucleic acids research, of Aitkhozhin Institute of molecular biology and biochemistry (Almaty, Kazakhstan, e-mail: anna\_niz@mail.ru).

Nadirova Leila Timurovna – researcher of the laboratory of protein and nucleic acids research, of Aitkhozhin Institute of molecular biology and biochemistry (Almaty, Kazakhstan, e-mail: leila.nadirova@gmail.com).

Alexandrova Alena Mikhailovna – senior researcher of the laboratory of protein and nucleic acids research, of Aitkhozhin Institute of molecular biology and biochemistry (Almaty, Kazakhstan, e-mail: alyona.alexandrova1987@gmail.com).

Sharipov Kamalidin Orynbaevich – Doctor of Biological Sciences, Professor, general director of Aitkhozhin Institute of molecular biology and biochemistry (Almaty, Kazakhstan, e-mail: skamalidin@mail.ru).

**Авторлар туралы мәлімет:**

Кислицин Валерий Юрьевич – PhD, Айтхожин атындағы Молекулярлық биология және биохимия институтының белок және нуклеин қышқылдарын зерттеу зертханасының аға ғылыми қызметкері (Алматы, Қазақстан, e-mail: kislitsinval\_bio@mail.ru).

Рыбак Елизавета Евгеньевна (корреспондент-автор) – Айтхожин атындағы Молекулярлық биология және биохимия институтының ақуыз және нуклеин қышқылдарын зерттеу зертханасының ассистенті (Алматы, Қазақстан, e-mail: elizasfishd@gmail.com).

Низкородова Анна Сергеевна – б.ғ.к., Айтхожин атындағы Молекулярлық биология және биохимия институтының белок және нуклеин қышқылдарын зерттеу зертханасының жетекші ғылыми қызметкері (Алматы, Қазақстан, e-mail: anna\_niz@mail.ru).

Надирова Лейла Тимурқызы – Айтхожин атындағы Молекулярлық биология және биохимия институтының белок және нуклеин қышқылдарын зерттеу зертханасының ғылыми қызметкері (Алматы, Қазақстан, e-mail: leila.nadirova@gmail.com).

Александрова Алена Михайловна – PhD, Айтхожин атындағы Молекулярлық биология және биохимия институтының белок және нуклеин қышқылдарын зерттеу зертханасының ғылыми қызметкері (Алматы, Қазақстан, e-mail: alyona.alexandrova1987@gmail.com).

Шарипов Қамалидин Орынбаевич – б.ғ.д., профессор, Айтхожин атындағы Молекулярлық биология және биохимия институтының бас директоры (Алматы, Қазақстан, e-mail: skamalidin@mail.ru).

Поступило 25 ноября 2025 года

Принято 20 февраля 2026 года