МРНТИ 62.37.35; 34.15.27 https://doi.org/10.26577/bb108320266

Н.Ж. Тлеумбетова[1, 2], Ж.Ж. Марат[1, 2], Л.А. Ибрагимова[1, 2], Ж.М. Аманбек[1], И.Т. Смекенов[1,2], А.К. Бисенбаев[1, 2*]

[1]Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан
[2]Научно-исследовательский институт «Проблем биологии и биотехнологии», Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан
*e-mail: amangeldy.bisenbaev@kaznu.edu.kz

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРИМОГО РЕКОМБИНАНТНОГО AG85B *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* С ПОМОЩЬЮ ЭНДОГЕННОГО ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО УДАЛЕНИЯ N-КОНЦЕВОГО ТИОРЕДОКСИНА В *E. COLI*

Получение рекомбинантного антигена 85B (Ag85B) *Mycobacterium tuberculosis* в *Escherichia coli* ограничивается низкой растворимостью белка и его преимущественным накоплением в виде телец включения. Использование тиоредоксина (Trx) в качестве N-концевого партнёра позволяет повысить растворимость рекомбинантного белка, однако последующее удаление Trx с помощью коммерческих протеаз требует дополнительной стадии обработки и усложняет процесс получения целевого продукта. В настоящей работе предложен подход, основанный на оптимизации условий культивирования *E. coli*, способствующих как накоплению растворимого Ag85B, так и внутриклеточному удалению N-концевого Trx. Рекомбинантную конструкцию Trx-Ag85B-FLAG-His_6 экспрессировали в клетках *E. coli* SHuffle T7 и оценивали влияние состава среды, концентрации индуктора, плотности культуры при индукции, температуры и продолжительности культивирования. В исходных условиях LB-среды рекомбинантный белок преимущественно накапливался в нерастворимой фракции в виде полноразмерного продукта массой около 51 кДа, что соответствовало сохранению Trx в составе слитного белка. Использование SB-среды, 0,1 мМ ИПТГ, индукции при OD_{600} 0,8–1,0 и культивирования при 16 °C существенно увеличивало долю растворимого продукта. После длительной инкубации формировался FLAG-положительный продукт с молекулярной массой менее 35 кДа, соответствующий Ag85B без N-концевого Trx и с сохранением C-концевой области FLAG-His_6. Добавление β-меркаптоэтанола в культуральную среду не оказывало существенного влияния на накопление растворимого белка. Полученные результаты согласуются с моделью, согласно которой умеренная кинетика экспрессии способствует формированию растворимого Ag85B, после чего происходит его эндогенная внутриклеточная протеолитическая переработка. Предложенный подход может упростить получение рекомбинантного Ag85B белка за счёт снижения необходимости в отдельной стадии удаления Trx экзогенной протеазой.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, Ag85B, растворимый белок, *Escherichia coli* SHuffle T7, тиоредоксин (Trx), внутриклеточный протеолиз, экспрессия белка.

N.Zh. Tleumbetova[1,2], Zh.Zh. Marat[1,2], L.A. Ibragimova[1,2], Zh.M. Amanbek[1], I.T. Smekenov[1,2], A.K. Bissenbaev[1,2*]

[1]Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
[2]Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems, Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
*e-mail: amangeldy.bisenbaev@kaznu.edu.kz

Production of soluble recombinant *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B by endogenous proteolytic removal of N-Terminal thioredoxin in *E. coli*

Recombinant expression of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85B (Ag85B) in *Escherichia coli* is frequently limited by poor solubility and accumulation of the target protein in inclusion bodies. Fusion to thioredoxin (Trx) can improve solubility; however, subsequent removal of the fusion partner using commercial proteases adds an additional purification step and increases process complexity. Here, we developed an alternative approach in which optimization of cultivation conditions promoted both soluble expression and intracellular removal of the N-terminal Trx partner. A recombinant Trx-Ag85B-FLAG-His_6 construct was expressed in *E. coli* SHuffle T7, and the effects of medium composition, inducer concen-

 © 2026 Al-Farabi Kazakh National University

tration, cell density at induction, temperature, and cultivation time were evaluated. Under initial LB-medium conditions, the recombinant protein accumulated predominantly in the insoluble fraction as a full-length product of approximately 51 kDa, consistent with retention of the Trx fusion partner. Optimization using Super Broth-medium, 0.1 mM IPTG, induction at OD_{600} 0.8–1.0, and cultivation at 16 °C substantially increased the soluble fraction. Prolonged incubation under these conditions resulted in a FLAG-positive product with a molecular mass below 35 kDa, consistent with removal of the N-terminal Trx and retention of the C-terminal Ag85B-FLAG-His_6 region. Addition of β-mercaptoethanol to the culture medium did not substantially affect accumulation of soluble protein. These findings support a model in which moderate expression kinetics facilitate soluble Ag85B folding, followed by endogenous intracellular proteolytic processing of the fusion protein. This strategy may simplify recombinant Ag85B production by reducing the need for an external protease-mediated tag-removal step.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Ag85B, soluble protein, *Escherichia coli* Shuffle T7, thioredoxin (Trx), intracellular proteolysis, protein expression.

Н.Ж. Тлеумбетова[1,2], Ж.Ж. Марат[1,2], Л.А. Ибрагимова[1,2],
Ж.М. Аманбек[1], И.Т. Смекенов[1,2], А.К. Бисенбаев[1,2*]

[1]Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан
[2]«Биология және биотехнология мәселелері» ғылыми-зерттеу институты,
әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан
*e-mail: amangeldy.bisenbaev@kaznu.edu.kz

E. coli бактерияларындағы N-терминалды тиоредоксинді эндогендік протеолитикалық жолмен алып тастау арқылы *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B ерігіш рекомбинантты белогін алу

Mycobacterium tuberculosis 85B антигенін (Ag85B) *Escherichia coli* жасушаларында рекомбинантты түрде өндіру ақуыздың төмен ерігіштігімен және оның ерімейтін қосылу денешіктері түрінде жиналуымен үйлесіп отырады. Тиоредоксинді (Trx) N-терминалды ерігіштік серіктесі ретінде пайдалану рекомбинантты ақуыздың ерігіштігін арттыруға мүмкіндік береді, алайда Trx-ті коммерциялық протеазалар көмегімен кейіннен алып тастау қосымша тазарту кезеңін талап етіп, процестің күрделілігін арттырады. Бұл жұмыста *E. coli* өсіру жағдайларын оңтайландыру арқылы Ag85B-ның ерігіш түрде жинақталуын және N-терминалды Trx-тің жасушаішілік жойылуын қамтамасыз етуге бағытталған тәсіл ұсынылды. Trx-Ag85B-FLAG-His_6 рекомбинантты конструкциясы *E. coli* SHuffle T7 жасушаларында экспрессияланып, қоректік ортаның құрамы, индуктор концентрациясы, индукция кезіндегі жасуша тығыздығы, температура және өсіру ұзақтығының әсері зерттелді. Бастапқы LB-орта жағдайларында рекомбинантты ақуыз негізінен ерімейтін фракцияда шамамен 51 кДа молекулалық массасы бар толық ұзындықтағы өнім ретінде жиналды, бұл Trx-тің қосылыс құрамында сақталғанын көрсетті. SB ортасын, 0,1 мМ IPTG қолдану, OD_{600} 0,8–1,0 кезінде индукциялау және 16 °C-та өсіру ерігіш өнімнің мөлшерін айтарлықтай арттырды. Ұзақ инкубациядан кейін молекулалық массасы 35 кДа-дан төмен FLAG-оң өнім түзілді, бұл N-терминалды Trx-тің жойылып, C-терминалды Ag85B-FLAG-His_6 бөлігінің сақталғанымен сәйкес келді. Өсіру ортасына β-меркаптоэтанол қосу ерігіш ақуыздың жиналуына елеулі әсер етпеді. Алынған нәтижелер экспрессия кинетикасын бәсеңдету Ag85B-ның ерігіш түрде қатталуына жағдай жасап, кейін рекомбинантты ақуыздың эндогенді жасушаішілік протеолитикалық өңделуіне мүмкіндік беретінін көрсетеді. Ұсынылған тәсіл экзогенді протеаза көмегімен Trx-ті алып тастаудың жеке кезеңін қысқарту арқылы рекомбинантты Ag85B өндіру процесін жеңілдетуі мүмкін.

Түйін сөздер: *Mycobacterium tuberculosis*, Ag85B, еритін ақуыз, *Escherichia coli* Shuffle T7, тиоредоксин (Trx), жасушаішілік протеолиз, ақуыз экспрессиясы.

Введение

Антиген 85B (Ag85B), кодируемый геном *fbpB*, относится к основным секретируемым белкам *Mycobacterium tuberculosis* (MT) и входит в состав антигенного комплекса Ag85, включающего также Ag85A и Ag85C. Ag85B синтезируется MT и играют важную роль в биосинтезе клеточной стенки. Они являются частью комплекса антигена 85, который отвечает за синтез трегалозодимиколата и миколил-арабиногалактан-пептидогликана, основных компонентов клеточной стенки микобактерий. Ag85B функционирует как миколилтрансфераза, катализируя перенос миколовых кислот в клеточную стенку, что жизненно важно для поддержания структурной целостности и вирулентности бактерий (Babaki и др., 2017). Более того, комплекс Ag85 является одним из наиболее секретируемых белков MT и может сильно индуцировать

пролиферацию Т-клеток и продукцию IFN-γ у вакцинированных БЦЖ мышей и здоровых людей, подвергшихся воздействию МТ (Diacon, 2022). Поэтому комплексы Ag85 были включены в качестве важных антигенов для кандидатов на вакцины против туберкулеза, таких как модифицированный вирус коровьей оспы Анкара, экспрессирующий Ag85A (MVA85A), Ag85A-сверхэкспрессирующие БЦЖ, субъединичные и ДНК-вакцины (Allué-Guardia и др., 2021; Balu и др., 2011; Diacon, 2022; Gordillo Altamirano & Barr, 2019).

Получение рекомбинантного Ag85B в *Escherichia coli* является привлекательным подходом благодаря технологичности и масштабируемости бактериальной системы экспрессии. Однако эффективное получение Ag85B в растворимой форме представляет определённую проблему. Ранее было показано, что при гетерологичной экспрессии Ag85B в *E. coli* значительная часть рекомбинантного белка может накапливаться в нерастворимой фракции и формировать тельца включения, что существенно осложняет последующую очистку (Aghababa и др., 2011; Piubelli и др., 2013). В ряде работ для получения растворимого продукта применялись денатурирующие агенты и последующее рефолдингирование либо проводилась оптимизация условий экспрессии и конструкции рекомбинантного белка. Вместе с тем показано, что рациональный подбор экспрессионной системы, условий культивирования и стратегии очистки способен существенно повысить выход растворимого Ag85B, что подчёркивает важность контроля кинетики синтеза и фолдинга данного белка в клетках *E. coli* (Ban и др., 2020; Francis & Page, 2010; Yang и др., 2011).

Одним из распространённых способов повышения растворимости рекомбинантных белков является использование N-концевых белков-партнёров, способствующих правильному фолдингу и снижению агрегации (Costa и др., 2014; Paraskevopoulou & Falcone, 2018; Raran-Kurussi & Waugh, 2012; Sørensen & Mortensen, 2005; Zou и др., 2008). Среди таких партнёров особое место занимает тиоредоксин (Trx) – небольшой, высокорастворимый и термостабильный белок, который способен выполнять функцию растворяющего партнёра при гетерологичной экспрессии в *E. coli* (Arakawa & Akuta, 2025; Ditgen и др., 2016; LaVallie и др., 1993; LaVallie и др., 2000). Использование Trx в составе слитных конструкций позволяет получать растворимые формы ряда белков, которые при экспрессии без дополнительного партнёра преимущественно накапливаются в виде агрегатов или телец включения. Однако применение растворяющих партнёров создаёт дополнительную технологическую задачу: после получения растворимого слитного белка необходимо удалить Trx, если требуется рекомбинантный продукт без N-концевой метки (Gagliardo et al., 2008; Lantez et al., 2011; Piubelli, 2013). Традиционно для этой цели в конструкцию включают специфический сайт протеолитического расщепления, после чего очищенный слитный белок обрабатывают соответствующей коммерческой протеазой *in vitro* (Charlton & Zachariou, 2011; Sigma-Aldrich, n.d.; Xu и др., 2019; Zheng и др., 2008). Такая схема требует дополнительной стадии обработки, расхода протеолитического реагента и последующего разделения целевого белка, растворяющего партнёра и самой протеазы. Для лабораторного получения небольших количеств белка эти операции могут быть приемлемыми, однако при масштабировании они увеличивают сложность и стоимость процесса. Данная проблема является общей для многих систем, использующих солюбилизирующие слитые белки (fusion tags). Таким образом, для получения рекомбинантного Ag85B белка представляет интерес стратегия, позволяющая одновременно обеспечить растворимость белка на этапе экспрессии и избежать обязательной отдельной стадии удаления растворяющего партнёра после выделения продукта.

В настоящей работе мы исследовали возможность использовать тиоредоксин как N-концевой солюбилизирующий партнёр Ag85B в сочетании с оптимизацией условий культивирования *E. coli*. Особое внимание было уделено влиянию состава среды, концентрации индуктора, плотности культуры, температуры и продолжительности экспрессии на растворимость и молекулярную форму рекомбинантного белка. В результате была выявлена комбинация условий, при которой вместо преимущественного накопления полноразмерного Trx-Ag85B-FLAG-His_6 с молекулярной массой около 51 кДа формировался растворимый С-концевой продукт с молекулярной массой менее 35 кДа, сохраняющий FLAG- и His_6-метки. Полученные данные позволили предложить модель, согласно которой мягкие условия экспрессии способствуют формированию растворимого Ag85B, после чего N-концевой Trx подвергается эндогенной протеолитической переработке непосредственно в

клетках *E. coli*. Такой подход потенциально позволяет интегрировать этап удаления солюбилизирующего партнёра непосредственно в процесс экспрессии и тем самым упростить получение растворимого рекомбинантного Ag85B белка.

Материалы и методы исследования

Плазмиды, бактериальные штаммы и условия культивирования

Плазмида pMG-amp, предоставленная компанией Macrogene (Гымчхон-гу, Сеул), содержит ген устойчивости к ампициллину, lac-промотор и оператор, а также множественный сайт клонирования. Она использовалась в качестве вектора клонирования *E. coli*. Плазмида pET-28c(+)-Trx была любезно предоставлена Gunter Stier (Центр биохимии Гейдельбергского университета (BZH), 69120 Гейдельберг, Германия) и использовалась в качестве вектора экспрессии. Она содержит ген устойчивости к канамицину, промотор T7, lac-оператор, ген Trx, сайт TEV, последовательности His-тегов на N- и C-концах и множественный сайт клонирования.

Штамм *E. coli* DH5α был получен от компании Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, США) и использовался для клонирования генов и размножения плазмид. Штамм *E. coli* SHuffle T7 был получен от компании New England Biolabs (США) (New England Biolabs, n.d.). Он использовался для экспрессии белков, образующих дисульфидные связи в цитоплазме (Lobstein и др., 2012).

Бактериальные штаммы выращивались на твердой или жидкой среде Луриа-Бертани (LB; 10 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl) с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) или канамицина (50 мкг/мл) при 37 °C на шейкере со скоростью 180 об/мин (Sambrook, 1989). Для получения растворимой формы рекомбинантного белка клетки культивировались в среде Super Broth (SB; 32 г/л бактотриптона, 20 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl) и индуцировали в условиях, описанных ниже (Piubelli и др., 2013).

Клонирование гена fbpB и трансформация

Плазмида pMG-amp, содержащая синтетическую последовательность гена *fbpB*, использовалась в качестве источника гена для последующего субклонирования в экспрессионный вектор pET-28c(+)-Trx с использованием сайтов рестрикции *Nco*I и *Xho*I. В качестве источника гена *fbpB*, кодирующего белок Ag85B, использовалась референсная последовательность NCBI NC_000962.3. Оптимизацию гена для прокариотической системы проводили с использованием онлайн-инструмента GenSmart Codon Optimization. Эта стратегия включала слияние клонированного гена с 6×His-тегом.

Линеаризация плазмиды pET-28c(+)-Trx и вырезание последовательности гена *fbpB* проводились с использованием рестрикционных ферментов *Nco*I и *Xho*I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Реакцию проводили в 20 мкл реакционной смеси, используя 2000 нг ДНК, 2 × буфер Tango и 2 единицы каждого фермента в течение 1 часа при 37°C, после чего проводили термическую инактивацию при 80°C в течение 20 мин. Продукты рестрикции анализировали методом электрофореза на 1% агарозном геле в 1 × буфере Tris/борная кислота/ЭДТА. Анализ проводился под УФ-светом с помощью системы визуализации ChemiDoc Go (Bio-Rad Laboratories, n.d.). Наблюдаемые четкие полосы фрагментов ДНК соответствующих размеров (5260 и 1016 п.н.) вырезали из агарозного геля и очищали с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) в соответствии с инструкциями производителя. Очищенную ДНК элюировали в 20 мкл элюирующего буфера и использовали для последующих реакций лигирования.

Лигирование проводили с использованием ДНК-лигазы T4 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) в молярном соотношении вектор:вставка 1:3 в соответствии с рекомендациями производителя. Реакционная смесь содержала 100 нг вектора и 58 нг вставки. Массу вставки рассчитывали с помощью онлайн-калькулятора NEBiocalculator. Продукт лигирования трансформировали в компетентные клетки *E. coli* DH5α путем теплового шока при 42 °C в течение 30 секунд. После 30 минут восстановления, трансформированные клетки высевали на среду LB, содержащую 50 мкг/мл канамицина, и инкубировали при 37 °C в течение 24 часов (Tu, 2008).

Выращенные рекомбинантные клоны тестировали с использованием разработанных специфических праймеров Dir_Ag85B_NcoI (5′-GT CCCCCATGGGCCATATGACAGAC-3′) и Rev_ Ag85B_XhoI (5′-ATTATCTCGAGGCCGGCGCC TAACGAACT-3′) для гена *fbpB* методом ПЦР колоний с использованием термоциклера

Mastercycler (Eppendorf, Гамбург, Германия). ПЦР проводился в общем объеме 25 мкл, содержащем 12,5 мкл ПЦР-мастер-микса (2X) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), 0,4 мкМ каждого из прямого и обратного праймеров, 8 мкл дистиллированной воды и 2 мкл клеточной суспензии. Программа ПЦР включала начальную денатурацию в течение 10 мин при 98 °C, 35 циклов денатурации при 95 °C в течение 30 с, отжига при 60 °C в течение 30 с и элонгации при 72 °C в течение 70 с, за которыми следовала заключительная элонгация при 72 °C в течение 10 мин, после чего реакцию останавливали при 4 °C. Продукт ПЦР анализировали методом электрофореза на 1% агарозном геле.

Положительные колонии использовали для получения и выделения рекомбинантной плазмиды. Плазмиды очищали с помощью коммерческого набора GeneJET Plasmid Midiprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрация и чистота ДНК определялась с помощью УФ-визуального наноспектрофотометра (Nabi, Корея).

Экспрессия и анализ рекомбинантного белка Ag85B

Для экспрессии белка Trx-Ag85B-Flag-His_6 плазмиду трансформировали в штамм *E. coli* SHuffle T7 (Lobstein и др., 2012). Трансформированные бактерии выращивали в 20 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина, и инкубировали при 37°C в шейкере со скоростью 180 об/мин в течение ночи. Затем 10 мл ночной культуры переносились в 500 мл среды LB и инкубировали с перемешиванием при 37°C в течение 3-4 часов до достижения оптической плотности до 0,6 ± 0,05 (OD_{600}) при 600 нм. Эксперименты по синтезу белка проводили в колбах Эрленмейера объемом 100 мл, содержащих 50 мл бактериальной культуры. Экспрессию белка индуцировали с помощью ИПТГ в конечной концентрации 0,1 мМ (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Влияние температуры и продолжительности индукции на экспрессию рекомбинантного белка оценивали при 16, 20 и 30°C в течение 2 и 16 часов. Для индукции при 20 °C в питательную среду дополнительно добавляли 4 мМ β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, n.d.).

Для дальнейшей оптимизации экспрессии растворимого белка Trx-Ag85B-Flag-His_6 был проведен дополнительный эксперимент с использованием среды Super Broth (SB). Индукция экспрессии белка проводилась с помощью 0,1 мМ ИПТГ при 16 и 30 °C в течение 16 часов (ночь). Затем бактериальные клетки собирались центрифугированием при 4000 × g в течение 10 мин при 4 °C, ресуспендировали в лизисном буфере (50 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 7.5), 300 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА (pH 8.0), 1 мМ ДТТ, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 2% Тритон X-100, 5% глицерин, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ)), с коктейлем ингибиторов протеаз (PIC; Roche, Базель, Швейцария), и разрушались ультразвуком на льду с помощью аппарата Omni Ruptor 4000 (Omni International, Кеннесо, Джорджия, США). Полученные лизаты центрифугировали при 12 000 × g в течение 30 мин при 4°C. Собранные супернатанты и их осадки использовали для оценки экспрессии белка методом ДСН-ПААГ электрофореза в 12% геле с последующим окрашиванием с Coomassie Brilliant Blue R-250 (Steinberg, 2009).

Кроме того, рекомбинантный белок анализировался методом вестерн-блоттинга. Для этого белки переносились с полиакриламидного геля на PVDF-мембрану (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) с использованием системы Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, n.d.) в соответствии с инструкциями производителя. Мембрану блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре в 1 × TBS (20 мМ Tris-HCl, pH 7,6; 150 мМ NaCl), содержащем 5% обезжиренного молока и 0,1% Tween-20 (TBST). Затем мембрану инкубировали в течение ночи с первичными антителами: аффинно-очищенными кроличьими антителами против FLAG эпитопа (DDDDK) (кат. № A190-102A; Bethyl Laboratories, Inc., США), разведенными в соотношении 1:10 000. После этого мембрана промывалась пять раз по 5 минут в 1× TBST и инкубировали в течение 1 часа с антителами козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (CUSABIO, Хьюстон, США), разведенные в соотношении 1:20 000 в блокирующем буфере с Tween-20. Затем мембрану снова промывали таким же образом. Детекцию проводили с использованием системы ECL (Bio-Rad Laboratories, n.d.) на системе визуализации ChemiDoc Go (Bio-Rad Laboratories, n.d.) (Reinecke, 2026).

Рекомбинантные белки были очищены металлоаффинной хроматографией с использованием 1 мл HP HisTrap колонки (Cytiva) и Akta start хроматографической системой (Cytiva, США) в соответствии с инструкциями произво-

дителя. На этапе отмывки использовалось 18% Б буфера (50 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 7,5), 500 мМ NaCl, 500 мМ имидазола). Элюцию проводили градиентным методом с использованием 7 мл элюирующего Б буфера. Пиковые фракции использовались для анализа методом ДСН-ПААГ электрофореза в 12% геле. Количество рекомбинантного белка определяли с помощью набора для определения белка по методу Брэдфорда (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкциями производителя (Bio-rad, 2026).

Статистический анализ

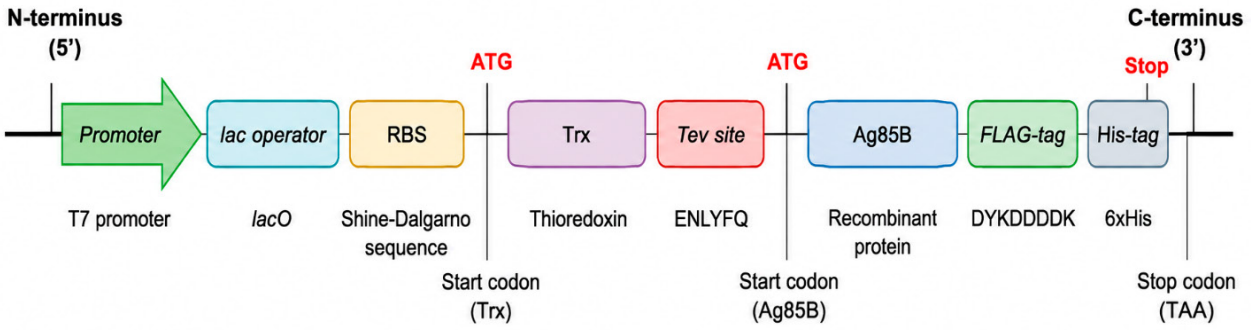
Экспериментальные работы проводились с использованием соответствующих положительных и отрицательных контролей в трех независимых повторностях. Полученные количественные данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (mean ± SD). Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0. Для оценки статистической значимости различий между экспериментальными группами применяли соответствующие статистические критерии в зависимости от характера и распределения полученных данных. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Для получения растворимого рекомбинантного Ag85B *Mycobacterium tuberculosis* была сконструирована экспрессионная система на основе плазмиды pET-28c-Trx, содержащая N-концевой тиоредоксин (Trx) в качестве партнёра по слиянию и С-концевые FLAG- и 6×His-метки для детектирования и последующей аффинной очистки целевого белка. Экспрессионная кассета находилась под контролем промотора T7 и включала *lac*-оператор и сайт связывания рибосомы. Между последовательностями Trx и Ag85B был предусмотрен междоменный участок, содержащий сайт расщепления TEV (ENLYFQ), а на С-конце Ag85B располагались FLAG- и 6×His-метки (Рисунок 1). Такая архитектура конструкции позволяла использовать Trx в качестве N-концевого растворяющего партнёра на этапе экспрессии, сохраняя при этом возможность получения целевого белка без Trx и его последующей аффинной очистки по С-концевой 6×His-метке.

Рисунок 1

Линейная карта экспрессионной кассеты pET-28c/Trx-Ag85B-FLAG

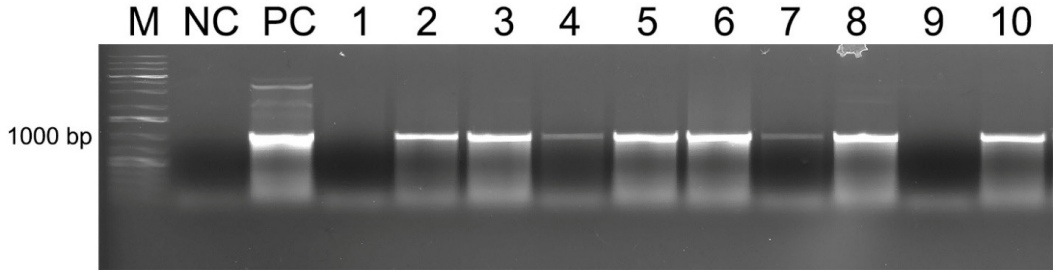


Экспрессионная кассета находится под контролем промотора T7 и организована от N-конца (5') до С-конца (3') следующим образом: промотор, lac-оператор, сайт связывания рибосомы (RBS), стартовый кодон (ATG), партнер по слиянию тиоредоксина (Trx), сайт расщепления TEV (ENLYFQ), стартовый кодон (ATG), рекомбинантный белок Ag85B, FLAG-метка (DYKDDDDK), 6× His-метка и стоп-кодон (TAA).

Для создания экспрессионной плазмиды, кодирующей Ag85B белок, была использована последовательность гена *fbpB (*Diacylglycerol acyltransferase/mycolyltransferase; NCBI Reference Sequence: NC_000962.3) из штамма *M. tuberculosis* H37Ra. Клонирование гена проводилось с использованием рестрикционных эндонуклеаз *Nco*I и *Xho*I. Клонируемый ген размером 1016 пн. и вектор размером 5630 пн. вырезались из агарозного геля и подвергались очистке, после чего осуществлялась реакция лигирования и трансформация

компетентных клеток DH5α реакционной лигазной смесью. Получение рекомбинантной конструкции и её наличие в трансформированных клетках *E. coli* DH5α были подтверждены несколькими независимыми подходами. ПЦР-анализ трансформированных колоний с использованием праймеров Dir_Ag85B_NcoI (5'- GTCCCCCATGGGCCATATGACAGAC-3') и Rev_Ag85B_XhoI – (5'-ATTATCTCGAGGCC GGCGCCTAACGAACT-3') выявил наличие фрагмента, соответствующего гену *fbpB*, в исследованных клонах, тогда как в отрицательном контроле соответствующий продукт отсутствовал (Рисунок 2). В качестве позитивного контроля использовался синтетический pMG-amp-Ag85B-FLAG вектор, несущий ген *fbpB*. Положительные клоны, у которых наблюдалась амплификация фрагмента ожидаемого размера (1028 пн.), использовались для наработки и выделения плазмид.

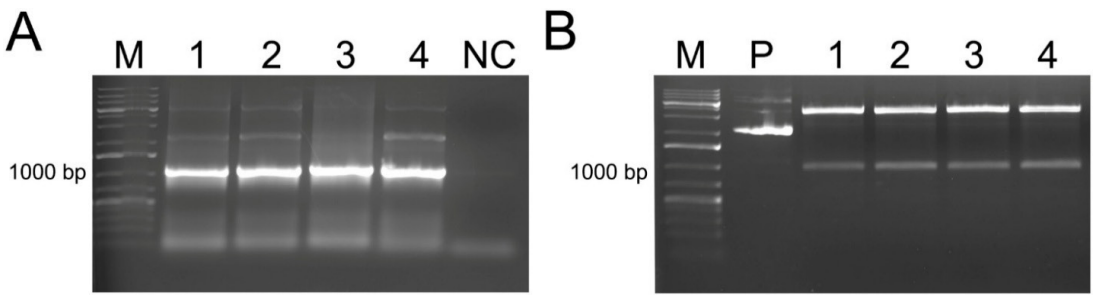
Рисунок 2
Агарозный гель-электрофорез продуктов ПЦР на колониях



M – ДНК маркер GeneRuler 1 kb; NC – негативный контроль; PC – позитивный контроль; 1-10 – клоны трансформированных клеток E. coli DH5α.

Дополнительный рестрикционный и ПЦР анализ выделенных рекомбинантных плазмид также подтвердил наличие правильной целевой конструкции в исследованных клонах (Рисунок 3). Наличие ПЦР продуктов и фрагментов, соответствующих размерам вектора (5630 пн.) и вставки (1016 пн.) на электрофоретическом анализе, подтвердили успешную интеграцию целевого гена в экспрессионный вектор, что говорит об успешном клонировании и трансформации клеток. Таким образом, полученные рекомбинантные конструкции использовались для создания экспрессионного штамма *E. coli* Shuffle T7, которые были использованы для последующей оптимизации условий экспрессии рекомбинантного Trx-Ag85B-FLAG-His_6.

Рисунок 3
Агарозный гель-электрофорез продуктов ПЦР анализа и рестрикции pET-28c/Trx-Ag85B-FLAG вектора



А) ПЦР анализ трансформированных колоний на наличие fbpB гена. 1-4 – клоны; NC – негативный контроль. Б) Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды. P – необработанная плазмида; 1-4 – клоны. M – ДНК маркер GeneRuler 1 kb.

Первоначально экспрессию проводили в LB-среде при различных температурах и продолжительности индукции с использованием 0,1 мМ ИПТГ. Анализ белковых фракций методом ДСН-ПААГ показал, что температура и продолжительность индукции существенно влияли как на количество рекомбинантного продукта, так и на его распределение между растворимой и нерастворимой фракциями (Рисунок 4A). При более высокой температуре и продолжительной индукции значительная часть рекомбинантного белка обнаруживалась в нерастворимой фракции. При снижении температуры до 16 °C наблюдалось незначительное увеличение доли продукта в растворимой фракции, особенно после длительной индукции (Рисунок 4C).

При оптимизации состава культуральной среды дополнительно оценивали влияние β-меркаптоэтанола на накопление рекомбинантного белка в растворимой фракции. Добавление β-меркаптоэтанола в культуральную среду не приводило к заметному увеличению количества растворимого рекомбинантного продукта (Рисунок 4A, линия 6). Таким образом, само по себе создание более восстановительных условий не являлось определяющим фактором повышения растворимости Ag85B в исследуемой системе.

Отсутствие выраженного эффекта β-меркаптоэтанола позволяет предположить, что наблюдаемое повышение растворимости рекомбинантного Ag85B не связано преимущественно с изменением восстановительно-окислительного состояния цитоплазмы. Вероятно, решающую роль в данном случае играет изменение кинетики экспрессии и условий фолдинга, достигаемое за счёт снижения температуры, умеренной индукции и изменения состава среды.

Особое значение при интерпретации этих результатов имеет молекулярная масса выявляемого продукта. При экспрессии в LB-среде рекомбинантный белок имел молекулярную массу приблизительно 51 кДа. Это значение соответствует ожидаемой молекулярной массе полноразмерной конструкции Trx-Ag85B-FLAG-His_6 и, следовательно, указывает на сохранение N-концевого тиоредоксина в составе рекомбинантного продукта. Наличие соответствующего FLAG-содержащего белка было подтверждено вестерн-блоттингом с использованием антител anti-FLAG (Рисунок 4B).

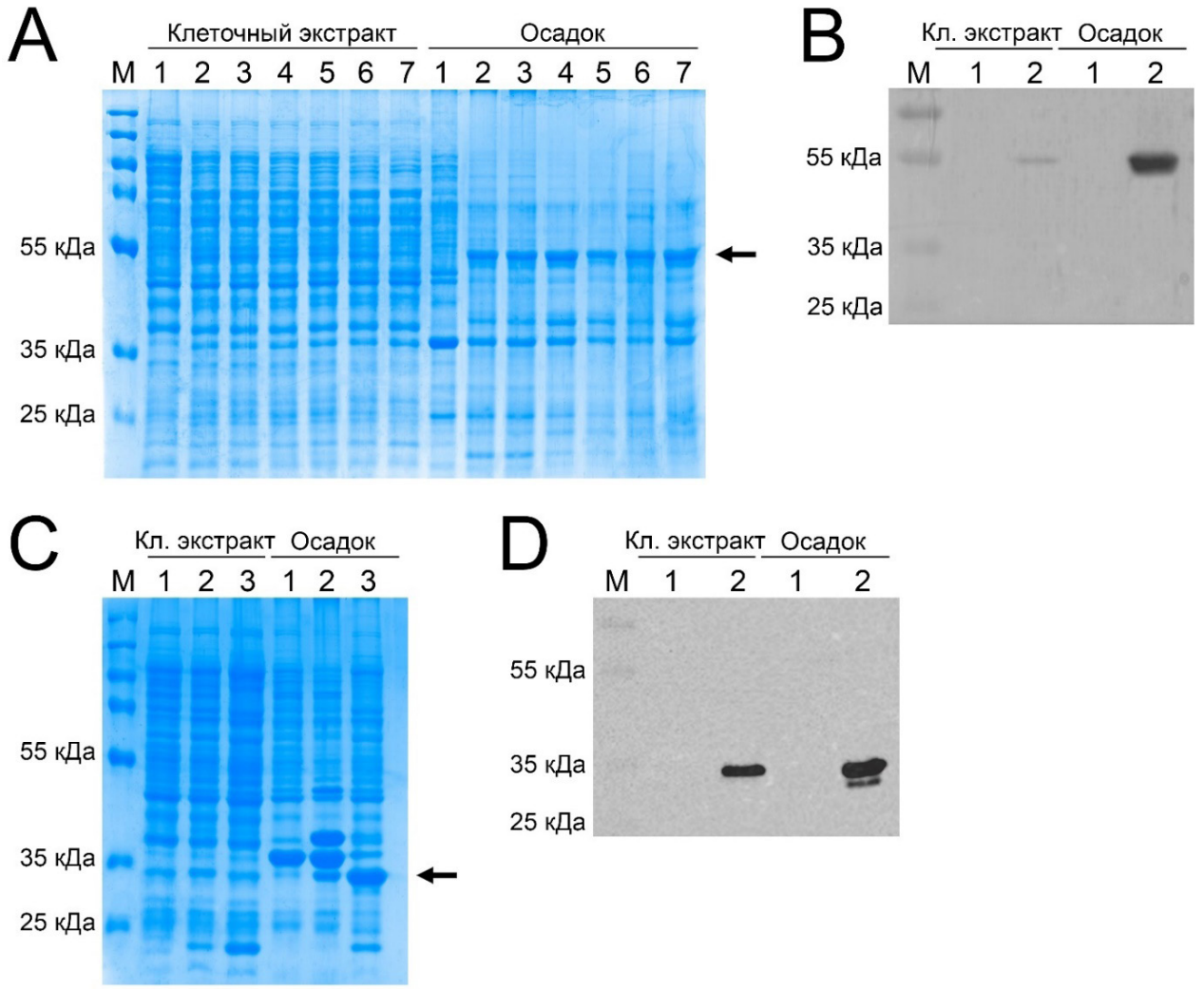
Таким образом, в условиях LB-среды основным обнаруживаемым продуктом являлся полноразмерный слитный белок, содержащий как Trx, так и Ag85B-FLAG-His_6. Сочетание высокой молекулярной массы полноразмерного продукта с его преимущественным присутствием в нерастворимой фракции свидетельствует о том, что исходные условия экспрессии не обеспечивали эффективного получения растворимой формы целевого белка. Вероятной причиной такого поведения является высокая интенсивность экспрессии, при которой скорость синтеза рекомбинантного полипептида может превышать способность клеточной системы к его эффективному фолдингу. В результате увеличивается вероятность накопления неправильно свернутых или агрегированных форм белка. В этих условиях наличие Trx само по себе не обеспечивало получения достаточного количества растворимого целевого продукта. Одним из способов снижения вероятности агрегации является уменьшение скорости синтеза рекомбинантного белка за счёт снижения температуры и интенсивности индукции. Более низкая температура может замедлять синтез и последующее накопление полипептида, создавая более благоприятные условия для формирования стабильной конформации (Francis & Page, 2010; San-Miguel и др., 2013). Кроме того, использование более поздней индукции и более низкой концентрации ИПТГ позволяет уменьшить интенсивность экспрессии и потенциально снизить нагрузку на систему фолдинга клетки-хозяина (Francis & Page, 2010; Larentis и др., 2014; Piubelli и др., 2013). В случае исследуемой конструкции это особенно важно, поскольку Trx должен выполнять свою функцию растворяющего партнёра именно в процессе формирования рекомбинантного полипептида.

Для дальнейшей оптимизации условий экспрессии была использована SB-среда, а концентрация ИПТГ была установлена на уровне 0,1 мМ. Индукцию проводили при OD_{600} = 0,8 с последующим культивированием в течение 16 ч при 30 или 16 °C. В отличие от LB-среды, в SB-среде при 16 °C наблюдалось выраженное увеличение доли рекомбинантного продукта в растворимой фракции, тогда как при 30 °C значительная часть белка по-прежнему оставалась в нерастворимой фракции (Рисунок 4C). Вестерн-блоттинг подтвердил наличие FLAG-положительного продукта при выбранных условиях (Рисунок 4D). Можно предположить, что переход от LB к SB-среде в сочетании с понижением температуры до 16 °C и использованием 0,1 мМ ИПТГ позволил существенно изменить характер накопления рекомбинантного белка: вместо преимущественно нерастворимого полноразмерного Trx-содержащего продукта

была получена значительно более выраженная растворимая фракция. Это позволяет предположить, что выбранные условия создают более благоприятный баланс между синтезом рекомбинантного полипептида, его фолдингом и внутриклеточной переработкой.

Рисунок 4

Анализ экспрессии рекомбинантного белка Trx-Ag85B-FLAG при различных условиях индукции



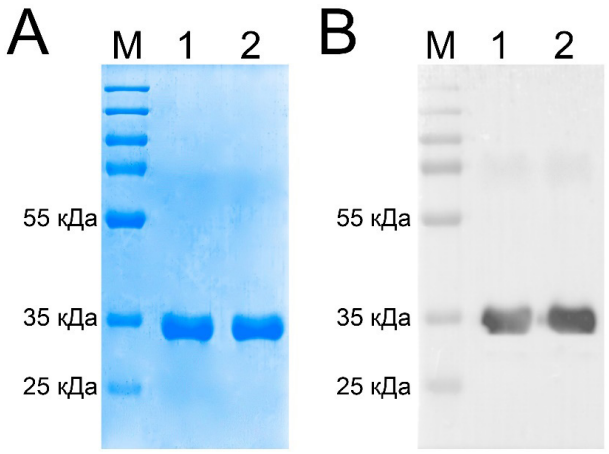
A) ДСН-ПААГ-электрофорез белков клеточных экстрактов и нерастворимых фракций E. coli SHuffle T7, индуцированных в LB-среде с 0,1 мМ ИПТГ при OD_{600} = 0,8, с последующим окрашиванием 12%-ного полиакриламидного геля красителем Coomassie Brilliant Blue R-250. 1 – нетрансформированные клетки E. coli SHuffle T7; 2 – клетки, индуцированные в течение 2 ч при 16 °C; 3 – клетки, индуцированные в течение 2 ч при 20 °C в присутствии 4 мМ β-меркаптоэтанола; 4 – клетки, индуцированные в течение 2 ч при 30 °C; 5 – клетки, индуцированные в течение 16 ч при 16 °C; 6 – клетки, индуцированные в течение 16 ч при 20 °C в присутствии 4 мМ β-меркаптоэтанола; 7 – клетки, индуцированные в течение 16 ч при 30 °C. B) Вестерн-блоттинг образцов E. coli SHuffle T7, индуцированных при 30 °C в течение 16 ч, с использованием антител anti-FLAG (1:10 000). 1 – нетрансформированные клетки E. coli SHuffle T7; 2 – клетки, индуцированные с 0,1 мМ ИПТГ при OD_{600} = 0,8; M – предварительно окрашенные белковые стандарты PageRuler Plus (10–250 кДа). C) ДСН-ПААГ-электрофорез белков клеточных экстрактов и нерастворимых фракций E. coli SHuffle T7, индуцированных в SB-среде с 0,1 мМ ИПТГ при OD_{600} = 0,8, с последующим окрашиванием 12%-ного полиакриламидного геля красителем Coomassie Brilliant Blue R-250. 1 – нетрансформированные клетки E. coli SHuffle T7; 2 – клетки, индуцированные в течение 16 ч при 30 °C; 3 – клетки, индуцированные в течение 16 ч при 16 °C.

D) Вестерн-блоттинг образцов E. coli SHuffle T7, индуцированных при 16 °C в течение 16 ч, с использованием антител anti-FLAG (1:10 000). 1 – нетрансформированные клетки E. coli SHuffle T7; 2 – клетки, индуцированные в течение 16 ч при 16 °C. M – предварительно окрашенные белковые стандарты PageRuler Plus (10–250 кДа); Стрелкой указано положение рекомбинантного белка Trx-Ag85B-FLAG-His с ожидаемой молекулярной массой.

Необходимо особо отметить, что наиболее интересные изменения были выявлены при дальнейшем увеличении продолжительности культивирования. После ночной инкубации клеток *E. coli* SHuffle в SB-среде при 16 °C в очищенной фракции методом ДСН-ПААГ выявлялся белковый продукт с молекулярной массой менее 35 кДа (Рисунок 5A). Вестерн-блоттинг с антителами anti-FLAG подтвердил наличие FLAG-положительного продукта в этой фракции (Рисунок 5B). Полученный результат существенно отличался от наблюдаемого при экспрессии в LB-среде, где молекулярная масса рекомбинантного продукта составляла приблизительно 51 кДа. Разница между этими двумя формами рекомбинантного белка имеет принципиальное значение. Полноразмерная конструкция Trx-Ag85B-FLAG-His_6 имеет ожидаемую молекулярную массу около 50–51 кДа, тогда как продукт менее 35 кДа соответствует существенно меньшей полипептидной цепи. При этом сохранение FLAG-иммунореактивности у низкомолекулярного продукта указывает на присутствие его С-концевой части. Поскольку FLAG- и 6×His-метки расположены на С-конце Ag85B, полученные данные согласуются с удалением N-концевого фрагмента конструкции при сохранении С-концевой части Ag85B.

Рисунок 5

Очистка растворимой формы рекомбинантного белка Trx-Ag85B-FLAG-His_6 из клеточного экстракта E. coli Shuffle T7, культивируемых в SB-среде при 16 °C в течение ночи



А) ДСН-ПААГ-электрофорез очищенного белка с последующим окрашиванием 12%-ного полиакриламидного геля красителем Coomassie Brilliant Blue R-250. В) Вестерн-блоттинг очищенного белка с использованием антител anti-FLAG (1:10 000). М – предварительно окрашенные белковые стандарты PageRuler Plus (10–250 кДа); 1–2 – очищенные фракции белка. Для электрофореза использовали по 4 мкг белка на лунку, для вестерн-блоттинга – по 2 мкг белка на лунку.

Таким образом, наблюдаемое изменение молекулярной массы можно интерпретировать как переход от полноразмерного Trx-Ag85B-FLAG-His_6 к форме Ag85B-FLAG-His_6, в которой N-концевой тиоредоксин отсутствует или существенно укорочен. Молекулярная масса полученного продукта, составляющая менее 35 кДа, находится в диапазоне, ожидаемом для Ag85B без N-концевого Trx. Совокупность данных указывает на то, что длительная экспрессия в SB-среде при 16 °C могла обеспечить не только повышение растворимости рекомбинантного белка, но и его внутриклеточную переработку. Одним из возможных объяснений является эндогенное протеолитическое удаление N-концевого Trx после формирования растворимого состояния Ag85B. В соответствии с такой моделью на раннем этапе экспрессии Trx способствует накоплению рекомбинантного полипептида в растворимой форме. Более низкая температура и умеренная индукция замедляют накопление белка и создают более благоприятные условия для формирования стабильной структуры Ag85B. После этого междоменный участок между Trx и Ag85B может становиться доступным для внутриклеточного протеолиза, в результате чего N-концевой Trx удаляется, а Ag85B сохраняется в растворимой форме. Предлагаемая последовательность событий хорошо согласуется с различиями, наблюдаемыми при сравнении LB- и SB-условий. В LB-среде после индукции преимущественно сохраняется полноразмерный Trx-Ag85B-FLAG-His_6 с молекулярной массой около 51 кДа, значительная часть которого локализуется в нерастворимой фракции. В SB-среде при 16 °C и длительной инкубации, напротив, формируется растворимый FLAG-положительный продукт с молекулярной массой менее 35 кДа. Следовательно, изменение условий культивирования, по-видимому, влияет сразу на два взаимосвязанных процесса – накопление растворимого белка и последующее удаление N-концевого тиоредоксина. При этом полученные результаты не позволяют однозначно установить конкретную протеазу, ответственную за образование низкомолекулярного продукта. Несмотря на наличие в конструкции участка с сайтом расщепления TEV, представленные данные не позволяют утверждать, что именно этот сайт является непосредственным местом эндогенного расщепления. Аналогично, на основании только ДСН-ПААГ и вестерн-блоттинга невоз-

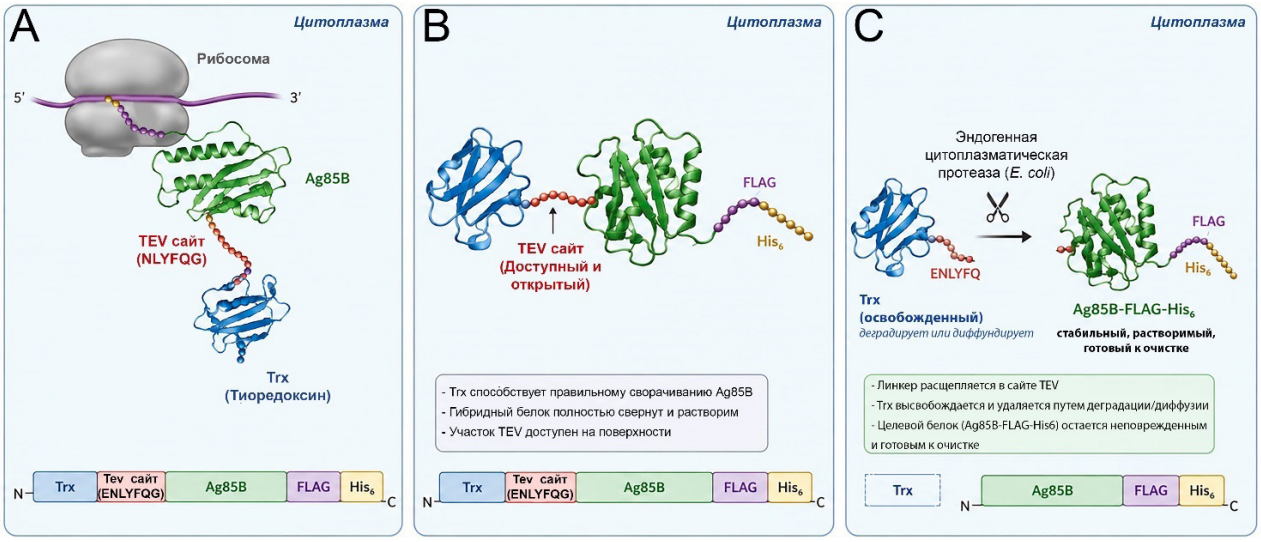
можно идентифицировать конкретную протеазу *E. coli*, участвующую в данном процессе. С технологической точки зрения обнаруженный процесс представляет интерес, поскольку позволяет потенциально объединить функцию растворяющего партнёра и его последующее удаление в рамках одного цикла экспрессии (Changbin и др., 2026; Li, 2011). В традиционном подходе после получения растворимого слитного белка N-концевой партнёр удаляется с помощью экзогенной протеазы, после чего требуется дополнительная стадия отделения протеазы и продуктов расщепления (Harper & Speicher, 2011; Costa и др., 2014). В исследуемой системе изменение условий культивирования, по-видимому, позволяет клетке-хозяину самостоятельно осуществлять переработку слитного белка. Это потенциально упрощает схему получения целевого продукта и снижает необходимость использования коммерческой протеазы.

На основании полученных результатов можно предложить рабочую модель, представленную на Рисунке 6.

На первом этапе экспрессии N-концевой Trx способствует получению растворимой формы рекомбинантного Trx-Ag85B-FLAG-His_6. Снижение температуры до 16 °C, использование 0,1 мМ ИПТГ и более длительной инкубации изменяют кинетику накопления белка и создают условия, благоприятные для формирования растворимого продукта. После этого, вероятно, происходит эндогенная протеолитическая переработка междоменного участка с удалением N-концевого Trx. Сохранившаяся С-концевая часть Ag85B содержит FLAG- и 6×His-метки, что позволяет её детектировать и очищать методом аффинной хроматографии.

Рисунок 6

Предлагаемая модель ко-трансляционного фолдинга и эндогенной протеолитической переработки рекомбинантного белка Trx–Ag85B–FLAG–His_6 в клетках E. coli



A) Ко-трансляционный фолдинг. В процессе синтеза рекомбинантной полипептидной цепи N-концевой тиоредоксин способствует формированию растворимой формы Ag85B. B) Формирование растворимого слитного белка. При оптимизированных условиях экспрессии Trx–Ag85B приобретает стабильную растворимую конформацию, при этом междоменный линкер, содержащий последовательность TEV (ENLYFQ), остаётся потенциально доступным для эндогенной протеолитической обработки. C) Эндогенная протеолитическая переработка. При длительной инкубации происходит эндогенное протеолитическое удаление N-концевого Trx, предположительно в области доступного междоменного линкера. С-концевая часть Ag85B сохраняет FLAG- и His_6-метки и остаётся в растворимой форме, пригодной для последующей аффинной очистки.

Таким образом, проведённая оптимизация условий экспрессии позволила перейти от преимущественного накопления полноразмерного Trx-Ag85B-FLAG-His_6 с молекулярной массой около 51 кДа и высокой долей нерастворимого продукта в LB-среде к получению преимущественно растворимой низкомолекулярной формы в SB-среде при 16 °C. Появление после длительной инкубации FLAG-положительного продукта с молекулярной массой менее 35 кДа согласуется с удалением N-концевого тиоредоксина и сохранением C-концевой части Ag85B. Полученные результаты позволяют рассматривать эндогенное протеолитическое удаление Trx как перспективный подход к получению растворимого рекомбинантного Ag85B без отдельной стадии обработки коммерческой протеазой. При этом окончательное подтверждение предложенного механизма требует определения точного места протеолитического расщепления и идентификации фермента, участвующего в образовании низкомолекулярного продукта.

Заключение

Оптимизация условий экспрессии позволила существенно повысить растворимость рекомбинантного Ag85B и изменить молекулярную форму получаемого продукта. В LB-среде преимущественно накапливался полноразмерный Trx–Ag85B–FLAG–His_6 массой около 51 кДа, тогда как использование SB-среды, 0,1 мМ IPTG и культивирование при 16 °C с последующей длительной инкубацией способствовали образованию растворимого FLAG-положительного продукта массой менее 35 кДа. Полученные данные согласуются с удалением N-концевого Trx посредством эндогенной протеолитической переработки при сохранении C-концевой части Ag85B–FLAG–His_6. Добавление β-меркаптоэтанола не оказывало существенного влияния на накопление растворимого белка. Таким образом, предложенный подход потенциально позволяет упростить получение растворимого рекомбинантного Ag85B за счёт интеграции удаления солюбилизирующего партнёра непосредственно в процесс экспрессии, без обязательного использования экзогенной протеазы.

Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Исследование выполнено в рамках грантового финансирования Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (ИРН проекта: AP26102743 «Нанотела (однодоменные антитела) как инструменты нового поколения для терапии туберкулеза»).

Вклад авторов

Н.Ж. Тлеумбетова: Концептуализация, Методология, Исследование; Ж.Ж. Марат: Концептуализация, Методология, Исследование; Л.А. Ибрагимова: Концептуализация, Методология, Исследование; Ж.М. Аманбек: Концептуализация, Методология, Исследование; И.Т. Смекенов: Методология, Исследование, Формальный анализ, Привлечение финансирования, Визуализация; А.К. Бисенбаев: Концептуализация, Методология, Администрирование проекта, Научное руководство, Валидация, Написание – первоначальный вариант, Написание – проверка и редактирование.

Литература

Aghababa, H., Mobarez, A. M., Behmanesh, M., Khoramabadi, N., & Mobarhan, M. (2011). Production and purification of mycolyl transferase B of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tanaffos, 10*(4), 23–30. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4153168/

Allué-Guardia, A., Saranathan, R., Chan, J., & Torrelles, J. B. (2021). Mycobacteriophages as potential therapeutic agents against drug-resistant tuberculosis. *International Journal of Molecular Sciences, 22*(2), Article 735. https://doi.org/10.3390/ijms22020735

Arakawa, T., & Akuta, T. (2025). Beyond purification: Evolving roles of fusion tags in biotechnology. *Current Issues in Molecular Biology, 47*(9), Article 768. https://doi.org/10.3390/cimb47090768

Babaki, M. K. Z., Soleimanpour, S., & Rezaee, S. A. (2017). Antigen 85 complex as a powerful *Mycobacterium tuberculosis* immunogene: Biology, immune-pathogenicity, applications in diagnosis, and vaccine design. *Microbial Pathogenesis, 112*, 20–29. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.040

Balu, S., Reljic, R., Lewis, M. J., Pleass, R. J., McIntosh, R., van Kooten, C., van Egmond, M., Challacombe, S., Woof, J. M., & Ivanyi, J. (2011). A novel human IgA monoclonal antibody protects against tuberculosis. *The Journal of Immunology, 186*(5), 3113–3119. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003189

Ban, B., Sharma, M., & Shetty, J. (2020). Optimization of methods for the production and refolding of biologically active disulfide bond-rich antibody fragments in microbial hosts. *Antibodies, 9*(3), Article 39. https://doi.org/10.3390/antib9030039

Bio-Rad Laboratories. (n.d.). *Bradford protein assay*. https://www.bio-rad.com/en-kz/feature/bradford-protein-assay.html

Changbin, J., Xiaohu, Z., Zhibo, Y., Wei, Y., Hao, S., Jingru, Z., & Yueping, Z. (2026). A self-cleavable ULP1-SUMO fusion strategy for enhanced soluble protein expression and one-step purification in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification, 240*, Article 106892. https://doi.org/10.1016/j.pep.2026.106892

Charlton, A., & Zachariou, M. (2011). Tag removal by site-specific cleavage of recombinant fusion proteins. In D. Walls & S. Loughran (Eds.), *Protein chromatography: Methods and protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 681). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_19

Costa, S., Almeida, A., Castro, A., & Domingues, L. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: The novel Fh8 system. *Frontiers in Microbiology, 5*, Article 63. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00063

Diacon, A. H., Guerrero-Bustamante, C. A., Rosenkranz, B., Rubio Pomar, F. J., Vanker, N., & Hatfull, G. F. (2022). Mycobacteriophages to treat tuberculosis: Dream or delusion? *Respiration, 101*(1), 1–15. https://doi.org/10.1159/000519870

Ditgen, D., Anandarajah, E. M., Hansmann, J., Winter, D., Schramm, G., Erttmann, K. D., Liebau, E., & Brattig, N. W. (2016). Multifunctional thioredoxin-like protein from the gastrointestinal parasitic nematodes *Strongyloides ratti* and *Trichuris suis* affects mucosal homeostasis. *Journal of Parasitology Research, 2016*, Article 8421597. https://doi.org/10.1155/2016/8421597

Francis, D. M., & Page, R. (2010). Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current Protocols in Protein Science, 61*, 5.24.1–5.24.29. https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0524s61

Gagliardo, B., Faye, A., Jaouen, M., Deschemin, J.-C., Canonne-Hergaux, F., Vaulont, S., & Sari, M.-A. (2008). Production of biologically active forms of recombinant hepcidin, the iron-regulatory hormone. *The FEBS Journal, 275*, 3793–3803. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06525.x

Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2019). Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical Microbiology Reviews, 32*(2), e00066-18. https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18

Harper, S., & Speicher, D. W. (2011). Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. In D. Walls & S. Loughran (Eds.), *Protein chromatography: Methods and protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 681). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_14

Lantez, V., Dalle, K., Charrel, R., Baronti, C., Canard, B., & Coutard, B. (2011). Comparative production analysis of three phlebovirus nucleoproteins under denaturing or non-denaturing conditions for crystallographic studies. *PLOS Neglected Tropical Diseases, 5*(1), e936. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000936

Larentis, A. L., Nicolau, J. F. M. Q., Esteves, G. d. S., Vareschini, D. T., Ribeiro de Almeida, F. V., dos Reis, M. G., Galler, R., & Medeiros, M. A. (2014). Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. *BMC Research Notes, 7*, Article 671. https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-671

LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F., & McCoy, J. M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio/Technology, 11*, 187–193. https://doi.org/10.1038/nbt0293-187

LaVallie, E. R., Lu, Z., Diblasio-Smith, E. A., Collins-Racie, L. A., & McCoy, J. M. (2000). Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology, 326*, 322–340. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26063-1

Li, Y. (2011). Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production. *Biotechnology Letters, 33*(5), 869–881. https://doi.org/10.1007/s10529-011-0533-8

Lobstein, J., Emrich, C. A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., & Berkmen, M. (2012). SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial Cell Factories, 11*, Article 56. https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-56

New England Biolabs. (n.d.). *SHuffle T7 competent E. coli*. https://www.neb.com/en/products/c3026-shuffle-t7-competent-e-coli

Paraskevopoulou, V., & Falcone, F. H. (2018). Polyionic tags as enhancers of protein solubility in recombinant protein expression. *Microorganisms, 6*(2), Article 47. https://doi.org/10.3390/microorganisms6020047

Piubelli, L., Campa, M., Temporini, C., Binda, E., Mangione, F., Amicosante, M., Terreni, M., Marinelli, F., & Pollegioni, L. (2013). Optimizing *Escherichia coli* as a protein expression platform to produce *Mycobacterium tuberculosis* immunogenic proteins. *Microbial Cell Factories, 12*, Article 115. https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-115

Raran-Kurussi, S., & Waugh, D. S. (2012). The ability to enhance the solubility of its fusion partners is an intrinsic property of maltose-binding protein but their folding is either spontaneous or chaperone-mediated. *PLOS ONE, 7*(11), e49589. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049589

Reinecke, A., Göbel, J., & Genersch, E. (2026). Immunoassays for the detection and differentiation of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood (AFB) in honey bees. *Scientific Reports, 16*, Article 2635. https://doi.org/10.1038/s41598-026-35590-7

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

San-Miguel, T., Pérez-Bermúdez, P., & Gavidia, I. (2013). Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *SpringerPlus, 2*, Article 89. https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-89

Sigma-Aldrich. (n.d.). *Tag removal proteases for recombinant protein purification*. https://www.sigmaaldrich.com/KZ/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-purification/biotin-tag-protein-purification-proteases

Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories, 4*, Article 1. https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-1

Steinberg, T. H. (2009). Protein gel staining methods: An introduction and overview. *Methods in Enzymology, 463*, 541–563. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63031-7

Tu, A.-H. T. (2008). Transformation of *Escherichia coli* made competent by calcium chloride protocol. *American Society for Microbiology*, 1–10.

Xu, H., Wang, Q., Zhang, Z., Yi, L., Ma, L., & Zhai, C. (2019). A simplified method to remove fusion tags from a xylanase of *Bacillus* sp. HBP8 with HRV 3C protease. *Enzyme and Microbial Technology, 123*, 15–20. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.01.004

Yang, Z., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, T., Feng, Y., Lu, X., Lan, W., Wang, J., Wu, H., Cao, C., & Wang, X. (2011). Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. *PLOS ONE, 6*(7), e22981. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022981

Zheng, N., Pérez, J. de J., Zhang, Z., Domínguez, E., Garcia, J. A., & Xie, Q. (2008). Specific and efficient cleavage of fusion proteins by recombinant plum pox virus NIa protease. *Protein Expression and Purification, 57*(2), 153–162. https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.10.008

Zou, Z., Cao, L., Zhou, P., Su, Y., Sun, Y., & Li, W. (2008). Hyper-acidic protein fusion partners improve solubility and assist correct folding of recombinant proteins expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology, 135*(4), 333–339. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.05.007

Сведения об авторах:

Назым З. Тлеумбетова – магистр наук, докторант, Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии, Казахский национальный университет им. аль-Фараби (Алматы, Казахстан, e-mail: nazymtleumbetova@gmail.com).

Жанар Ж. Марат – бакалавр наук, магистрантка, Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии, Казахский национальный университет им. аль-Фараби (Алматы, Казахстан, e-mail: zhanar.marat09@gmail.com).

Лейла А. Ибрагимова – бакалавр наук, магистрантка, Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии, Казахский национальный университет им. аль-Фараби (Алматы, Казахстан, e-mail: leila.ibragimova_03@mail.ru).

Жансая М. Аманбек – бакалавр наук, магистрантка кафедры молекулярной биологии и генетики факультета биологии и биотехнологии Казахского национального университета им. аль-Фараби (Алматы, Казахстан, e-mail: jansaia.amanbek@mail.ru).

Изат Т. Смекенов – PhD, старший научный сотрудник Научно-исследовательского института проблем биологии и биотехнологии Казахского национального университета им. аль-Фараби (Алматы, Казахстан, e-mail: smekenovizat@gmail.com).

Амангельды А. Бисенбаев – доктор биологических наук, профессор Научно-исследовательского института проблем биологии и биотехнологии Казахского национального университета им. аль-Фараби (Алматы, Казахстан, e-mail: amangeldy.bisenbaev@kaznu.kz).

Information about the authors:

Nazym .Z. Tleumbetova – M.Sc., PhD Student, Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems, Al-Farabi Kazakh National University (Almaty, Kazakhstan, e-mail: nazymtleumbetova@gmail.com).

Zhanar .Zh. Marat – B.Sc., Master Student, Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems, Al-Farabi Kazakh National University (Almaty, Kazakhstan, e-mail: zhanar.marat09@gmail.com).

Leila A. Ibragimova – B.Sc., Master Student, Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems, Al-Farabi Kazakh National University (Almaty, Kazakhstan, e-mail: leila.ibragimova_03@mail.ru).

Zhansaya M. Amanbek – B.Sc., Master Student, Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Biology and Biotechnology, Al-Farabi Kazakh National University (Almaty, Kazakhstan, e-mail: jansaia.amanbek@mail.ru).

Izat T. Smekenov – PhD, Senior Researcher, Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems, Al-Farabi Kazakh National University (Almaty, Kazakhstan, e-mail: smekenovizat@gmail.com).

Amangeldy A. Bissenbaev – Doctor of Biological Sciences, Professor, Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems, Al-Farabi Kazakh National University (Almaty, Kazakhstan, e-mail: amangeldy.bisenbaev@kaznu.kz).

Авторлар туралы мәлімет:

Назым .З. Тлеумбетова – биология ғылымдарының магистрі, PhD докторанты, Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті (Алматы, Қазақстан, e-mail: nazymtleumbetova@gmail.com).

Жанар .Ж. Марат – биология ғылымдарының бакалавры, магистрант, Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті (Алматы, Қазақстан, e-mail: zhanar.marat09@gmail.com).

Лейла А. Ибрагимова – биология ғылымдарының бакалавры, магистрант, Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті (Алматы, Қазақстан, e-mail: leila.ibragimova_03@mail.ru).

Жансая М. Аманбек – биология ғылымдарының бакалавры, магистрант, молекулалық биология және генетика кафедрасы, биология және биотехнология факультеті, Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті (Алматы, Қазақстан, e-mail: jansaia.amanbek@mail.ru).

Изат Т. Смекенов – PhD докторы, аға ғылыми қызметкер, Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің Биология және биотехнология мәселелері ғылыми-зерттеу институты (Алматы, Қазақстан, e-mail: smekenovizat@gmail.com).

Амангелді А. Бисенбаев – биология ғылымдарының докторы, профессор, Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің Биология және биотехнология мәселелері ғылыми-зерттеу институты (Алматы, Қазақстан, e-mail: amangeldy.bisenbaev@kaznu.kz).

Поступило 14 января 2026 года
Повторно загружено 13 августа 2025 года
Принято 15 сентября 2026 года