

УДК 57.085.23: 581.16: 581.6: 615.32

ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ТА ІНІЦІАЦІЯ КАЛЮСОГЕНЕЗУ У *SALVIA HISPANICA* L. (ЧІА)

А. З. РЕВУЦЬКА, А. В. ГОЛУБЕНКО, Н. В. НУЖИНА, Г. О. РУДІК, Н. Ю. ТАРАН

Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Україна, 03022, м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2
e-mail: nastartia@i.ua

Мета. Отримання асептичних проростків *Salvia hispanica* L., ініціація калюсогенезу *in vitro* та встановлення первинних експлантів, придатних для отримання калюсу. **Методи.** Насіння пророщували за власною модифікацією загальноприйнятих методик. Базовим середовищем для експериментів було безгормональне агаризоване живильне середовище Мурасіге-Скуга. Як експланти для отримання калюсу використали частини одномісячних проростків (корені, гіпокотиль, сім'ядольні листки). Для ініціації калюсогенезу до живильного середовища додавали регулятори росту (БАП, 2,4-Д) у різних поєднаннях концентрацій. Статистичну обробку виконували у програмі Microsoft Office Excel. **Результати.** Отримано асептичні проростки *Salvia hispanica*. Ініційовано калюсогенез на всіх типах експлантів, встановлено залежність інтенсивності калюсогенезу від типу експланта та вмісту регуляторів росту в живильному середовищі. Отримано морфогенний калюс та корені-регенеранти. **Висновки.** Найбільш придатним первинним експлантом для калюсогенезу виявився гіпокотиль. Сім'ядольні листки та корені показали низьку здатність до калюсогенезу. Найефективнішим для ініціації калюсогенезу та проліферації неморфогенного калюсу було живильне середовище із підвищеним вмістом 2,4-Д (1,5 мг/л). Висока концентрація 2,4-Д у середовищі стимулює проліферацію калюсу *Salvia hispanica*, але пригнічує його здатність до морфогенезу.

Ключові слова. *Salvia hispanica* (Чіа), культура *in vitro*, калюс.

Вступ. Шавлія (*Salvia*) — рід родини Глухокропивові (*Lamiaceae* Mart.), що налічує близько 900 видів зелених рослин — напівчагарників і чагарників. Чіа (*Salvia hispanica* L.) — однорічна неморозостійка рослина, що росте переважно в гірських районах за високої кількості опадів і температури 15-30 °С. Серед великого різноманіття видів роду *Salvia* тільки *S. hispanica* широко вирощується за контрольованих умов. Спочатку чіа культивували у місцевостях з тропічним і субтропічним кліматом. Зараз її вирощують по всьому світу, зокрема в Аргентині, Перу, Парагваї, Еквадорі, Мексиці, Нікарагуа, Болівії, Гватемалі та Австралії, а у Європі її вирощують за умов закритого ґрунту (Ali et. al., 2012; Marcinek et. al., 2017; Kulczyński et. al., 2019).

Насіння *S. hispanica* є цінною лікарською сировиною завдяки його унікальному хімічному складу: 16–26 % білка, 31–34 % жирних кислот, 37–45 % вуглеводів, 23–35 % харчових волокон. Крім цього вони є джерелом мінералів (кальцію, фосфору, калію і магнію), вітамінів (тіаміну, рибофлавіну, ніацину, фолієвої й аскорбінової кислот і вітаміну А). Не менш важливим є вміст антиоксидантних речовин, зокрема фенольних сполук. Встановлено, що насіння чіа містить розмаринову, кавову, саліцилову кислоти, а також флавоноїди (міріцетин і кверцетин) (Marcinek, 2017; Alcântara et. al., 2019).

Нинішній рівень розвитку біотехнології рослин дозволяє використовувати для отримання біоактивних речовин сировину не лише з дикорослих чи вирощених у штучних умовах рослин, але і з отриманих методами культури рослинних тканин і органів *in vitro*, застосування яких відкриває можливості регулювання синтезу біологічно активних вторинних метаболітів і цільового отримання їх у більших кількостях, ніж із традиційного рослинного матеріалу (Кунах, 2005; Wink, 2010; Gonçalves, 2017). Крім того, методи асептичної культури широко застосовують для масового мікроклонального розмноження цінних генотипів рослин, відбору продуктивних ліній, створення генетично модифікованих організмів тощо (Rybczyński et al., 2015; Naik, 2016). Біотехнологічні методи були застосовані і для розмноження та дослідження рослин *S. hispanica*. Так, було виконано порівняльний аналіз морфометричних показників та антиоксидантної активності рослин чаї, розмножених звичайним способом і методами асептичної культури (Zayova et al., 2016), отримано калюс, як потенційне джерело жирних кислот, та регенеранти з нього (Bueno et al., 2010; Marconi et al., 2013). Проте, у літературних джерелах недостатньо повно висвітлені питання подолання явища міксокарпії у насінин *S. hispanica* при введенні в культуру *in vitro*, наведено дані про калюсогенез із листових і стеблових експлантів, але нема інформації щодо використання сім'ядольних листків та коренів як первинних експлантів для калюсогенезу, показано низьку здатність калюсу синтезувати жирні кислоти та деякі флавоноїди, але не досліджено наявність у калюсі інших фенольних сполук з антиоксидантною активністю. Тому метою нашого дослідження стало введення *S. hispanica* в асептичну культуру, ініціація калюсогенезу та отримання калюсу як потенційного джерела фенольних сполук як біологічно активних речовин.

Матеріали і методи

Для отримання первинного культивацийного матеріалу — асептичних проростків — використовували насіння *S. hispanica* репродукції Ботанічного саду ім. акад. О. В. Фоміна урожаю 2017–2018 рр., отримане при двохетапному вирощуванні рослин (1-й етап — за умов оранжереї, 2-й — у відкритому ґрунті до зацвітання та плодоношення) (Рудік та ін., 2017). Морфометричні показники насінин (розміри і маса 1000 шт.) та схожість досліджували за загальноприйнятою методикою (Войтенко и др., 1980). Насінини пророщували *in vitro* за власною модифікацією мето-

дики М. Г. Ніколаєвої та ін. (Николаева и др., 1985) за температури 20–24 °C та освітленні 3000 лк. і 16-годинному фотоперіоді.

Поверхневу стерилізацію насінин виконували за власною модифікацією методики Г. П. Кушнір та В. В. Сарнацької (Кушнір, 2005) з застосуванням попередньої механічної обробки, яка виявилась необхідною через притаманне насінню *S. hispanica*, як представнику родини *Lamiaceae*, явище міксокарпії (мікроспермії) — здатність до ослизнення плодів і насіння рослин при зволоженні (Ryding, 2001; Pajarón et al., 2008). Слиз, який утворюється при змочуванні насінин, містить велику кількість вуглеводів і є живильним субстратом для розвитку бактерій, що ускладнює процедуру поверхневої стерилізації насінин. Крім того, це підвищує ризик контамінації при введенні таких рослин в асептичну культуру. Для забезпечення ефективної стерилізації насінини чаї попередньо замочували у дистильованій воді протягом 20 хв., видаляли з їхньої поверхні утворений слиз, зчищаючи його паперовими серветками, після чого їх поміщали у конверти з фільтрувального паперу. Насінини у конвертах піддавали двохетапній поверхневій стерилізації, послідовно використовуючи 70 % етанол (впродовж 1 хв) і 0,1 % розчин $HgCl_2$ (впродовж 10 хв), після чого їх тричі промивали стерильною дистильованою водою і викладали на поверхню безгормонального агаризованого живильного середовища по 30 насінин у банку (всього було висіяно 180 насінин). Отримані з насіння та вирощені *in vitro* 30-ти денні асептичні проростки використали як джерело первинних експлантів (сім'ядольні листки; частини коренів та гіпокотилів завдовжки 1–1,5 см) для дослідження ініціації калюсогенезу.

Базовим для усіх експериментів було агаризоване живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС) з половинною концентрацією макро- та мікроелементів (МС/2). Для дослідження калюсогенезу використовували живильне середовище, модифіковане додаванням регуляторів росту: 6-бензиламінопурина (БАП) і 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) у різних поєднаннях їхніх концентрацій (Murashige, 1962). Концентрації регуляторів росту в живильному середовищі для ініціації калюсогенезу (мг/л): 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 мг/л 2,4-Д у присутності 0,2 мг/л БАП.

Дослідження проводили у 6 повторностях. Результати оброблені статистично із застосуванням загальноприйнятих методик за допомогою програми Microsoft Office Excel при рівні значущості $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Використані для отримання асептичних проростків, частини яких стали первинними експлантами для ініціації калюсогенезу, насінни *S. Hispanica* овальної форми, різних відтінків коричневого або сірого кольору, поверхня яких вкрита рельєфним малюнком темно-коричневого або чорного кольору (рис. 1).

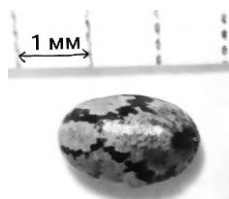


Рис. 1. Насіння *S. hispanica* (Чіа). Морфологічні показники насінин: середні довжина $2,0 \pm 0,1$ мм, ширина $1,2 \pm 0,06$ мм, товщина $1 \pm 0,05$ мм, маса 1000 насінин — 1612,8 мг

За умов пророщування *in vitro* схожість насінин становила $57,5 \pm 2,8$ %. 90 % проростків з'явилися впродовж 4–7-ї діб з часу висівання. Спостерігався швидкий ріст і розвиток проростків — на 30-у добу висота проростків становила 5–7 см, у них утворилася перша пара справжніх листків і спостерігалися ознаки утворення другої. Вузол зі справжніми листками використали для дослідження мікроклонального розмноження, а частини гіпокотилу, коренів та сім'ядольні листки — для ініціації калюсогенезу.

Здатність до калюсогенезу виявили всі типи експлантів (рис. 2), але їхній морфогенетичний потенціал суттєво відрізнявся.

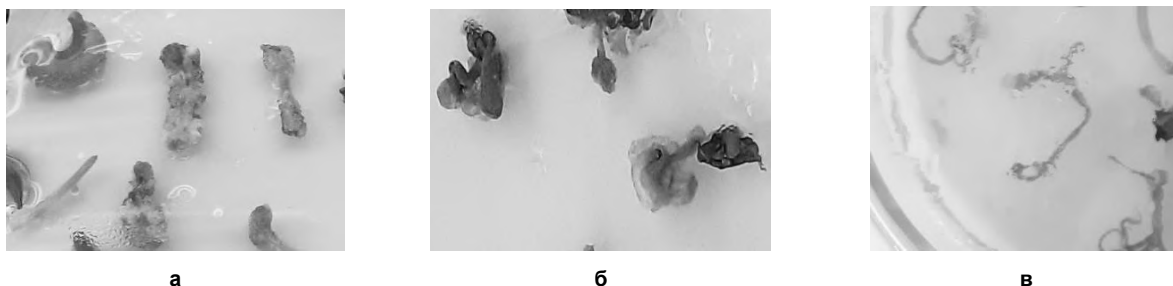


Рис. 2. Калюсогенез на стадії ініціації у різних типів експлантів на живильних середовищах, доповнених 2,4-Д: а — гіпокотилі, б — сім'ядольні листки, в — корені

Найраніше ознаки калюсогенезу були відмічені у гіпокотилів (на 6-ту добу після початку культивування) навіть на середовищі, доповненому 2,4-Д у найнижчій концентрації (0,25 мг/л). Експланти з сім'ядольних листків на тому ж середовищі почали утворювати калюс лише на 10–12 добу, а кореневі експланти — лише на 20-ту. Такі результати дозволя-

ють стверджувати, що найвищий морфогенетичний потенціал мають експланти, виділені з гіпокотилу.

Також нами встановлено, що ініціація калюсогенезу залежить не лише від типу експланта, а й від вмісту 2,4-Д у живильному середовищі (табл. 1).

Таблиця 1. Частота калюсогенезу (%) у різних типів експлантів *S. hispanica* за різної концентрації 2,4-Д у живильному середовищі

Тип експланта	Концентрація 2,4-Д, мг/л			
	0,25	0,5	1	1,5
Гіпокотиль	$72,7 \pm 3,6$ %	$81,8 \pm 4$ %	$90,9 \pm 4,5$ %	$91 \pm 4,5$ %
Сім'ядольні листки	60 ± 3 %	$57,1 \pm 2,8$ %	60 ± 3 %	$75 \pm 3,7$ %
Корені	$50 \pm 2,5$ %	$50 \pm 2,5$ %	$66,7 \pm 3,3$ %	$66 \pm 3,3$ %

Висока концентрація 2,4-Д у живильному середовищі прискорювала не лише початок утворення первинного калюсу, а й швидкість його наростання. Проте, отриманий на середовищах з підвищеним (1–1,5 мг/л) вмістом 2,4-Д калюс не виявляв здатності до морфогенезу. Причиною такого явища, можливо, є пригнічення регенеративної здатності калюсу високими концентраціями 2,4-Д. У калюсі, отриманому на середовищах із 0,25–0,5 мг/л 2,4-Д, спостерігалася спонтанна регенерація коренів — ризогенез, що вказує на менш токсичну дію цього регулятора росту при застосуванні його у нижчих концентраціях.

Отже, на нашу думку, якщо калюсогенез ініціюється з метою отримання великої маси неморфогенного калюсу (наприклад, для використання його як джерела вторинних метаболітів), доцільно використовувати середовища з підвищеним вмістом 2,4-Д. Якщо ж метою ініціації калюсу є, у подальшому, отримання регенерантів з нього, потрібно стимулювати утворення калюсу нижчими концентраціями 2,4-Д.

Висновки

Для успішного введення *S. hispanica* в культуру *in vitro* необхідне застосування механічного видалення слизу з поверхні насінин при їхній поверхневій стерилізації. Насіння чіа має високу схожість як за лабораторних умов, так і за умов *in vitro*, проте процедура поверхневої стерилізації дещо знижує показники схожості. Найвищу здатність до калюсогенезу було відмічено у гіпокотилі, трохи нижчу — у сім'я-дольних листків експлантів, найнижчу — у кореневих експлантів. Найбільш ефективна концентрація 2,4-Д у живильному середовищі для ініціації утворення неморфогенного калюсу та його проліферації становить 1–1,5 мг/л, для морфогенного — до 0,5 мг/л, оскільки висока концентрація 2,4-Д у середовищі стимулює проліферацію калюсу *S. hispanica*, але пригнічує його здатність до морфогенезу.

Перелік літератури

1. *Войтенко В. Ф. и др.* Методические указания по семеноведению интродуцентов / Отв. ред. Н. В. Цицин. Гл. ботан. сад им. Н. В. Цицина. Москва : Наука, 1980. 62 с.
2. *Кунах В. А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіологічно-біохімічні основи: Монографія. К. : Логос, 2005. 730 с.
3. *Кушнір Г. П., Сарнацька В. В.* Мікроклональне розмноження рослин. К. : Наукова думка, 2005. 270 с.
4. *Николаева М. Г., Разумова М. В., Гладкова В. Н.* Справочник по проращиванию покоящихся семян. Ленинград : Наука, 1985. 348 с.

5. *Рудік Г. О., Меншова В. О., Березкіна В. І.* Насіння-ва продуктивність *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae) у Ботанічному саду ім. акад. О. В. Фоміна. «Лікарське рослинництво: від досвіду минулого до новітніх технологій»: матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції (м. Полтава, 26–27 груд. 2017 р.). Полтава. 2017. С. 100–102.
6. *Ali N. M., Yeap S. K. et al.* The Promising Future of Chia, *Salvia hispanica* L. Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012. Volume 2012, Article ID 171956, 9 p. doi: 10.1155/2012/171956.
7. *Alcántara M. A., de Lima Brito Polari I. et al.* Effect of the solvent composition on the profile of phenolic compounds extracted from chia seeds. *Food Chemistry*. 2019. Vol. 275. P. 489–496.
8. *Bueno M. et al.* *In vitro* response of different *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae) explants. *Molecular Medicinal Chemistry*. 2010. Vol. 21. P. 125–126.
9. *Gonçalves S., Romano A.* Production of Plant Secondary Metabolites by Using Biotechnological Tools. *Sec. Metabolites — Sources and Applications*. 2018. Chapter 5. P. 81–99. doi: 10.5772/intechopen.76414.
10. *Kulczyński B., Kobus-Cisowska J. et al.* The Chemical Composition and Nutritional Value of Chia Seeds — Current State of Knowledge — Review. *Nutrients*. 2019. Vol. 11, No 6, 16 p. doi: 10.3390/nu11061242.
11. *Marcinek K., Krejpcio Z.* Chia seeds (*Salvia hispanica*): health promoting properties and therapeutic applications — A Review. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2017. Vol. 68, No 2. P. 123–129.
12. *Marconi P. L.* *In vitro* establishment of *Salvia hispanica* L. plants and callus. *Biotechnologia Vegetal*. 2013. Vol. 13. P. 203–207.
13. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15. P. 473–497.
14. *Naik P. M., Al-Khayri J. M.* Abiotic and biotic Elicitors-Role in secondary metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants — Recent Advances and Future Perspectives*. 2016. Chapter 10. P. 247–277. doi: 10.5772/61442.
15. *Pajarón S., Ron E., Alfayate C. et al.* La mixocarpia de *Salvia aegyptiaca* L. y su aplicación etnobotánica. *Botánica Complutensis*. 2008. Vol. 32. P. 213–216.
16. *Ryding O.* Myxocarpy in *Nepetoideae* (Lamiaceae) with notes of myxodiaspory in general. *Systematics and Geography of Plants*. 2001. Vol. 71, No 2. P. 503–514.
17. *The Gentianaceae — Volume 2: Biotechnology and Applications* / eds.: Rybczyński J. J., Davey M. R., Mikula A. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015. 452 p. doi: 10.1007/978-3-642-54102-5_2.
18. *Wink M.* Biochemistry of Plant Secondary Metabolism (Second Edition). *Annual Plant Reviews*. 2010. Vol. 40. 481 p.
19. *Zayova E., Nikolova M. et al.* Comparative study of *in vitro*, *ex vitro* and *in vivo* propagated *Salvia hispanica* (Chia) plants: morphometric analysis and antioxidant activity. *AgroLife Scientific Journal*. 2016. Vol. 5, No 2. P. 166–173.

References

- Voytenko V. F. et al. Methodical instructions on seed introduction of introducts / otv edit N.V. Tsitsin N.V. Tsitsin M. botanical garden. Moscow: Science, 1980. 62 p.
- Kunakh V. A. Biotechnolody of medicinal plants. genetic and physiological basis.: Monograph. K. : Lohos, 2005. 730 p.
- Kushnir H. P., Samats'ka V. V. Microclonal propagation of plants. K. : Naukova dumka, 2005. 270 p.
- Nikolaeva M. G., Razumova M. V., Gladkova V. N. Handbook on the germination of dormant seeds. Leningrad : Nauka, 1985. 348 p.
- Rudik G. O., Menshova V. O., Berezkina V. I. Seed productivity of *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae) in O. V. Fomin botanical garden. «Medicinal plant growing: from the experience of the past to the latest technologies»: materials of the VI International Scientific and Practical Conference (Poltava, 26–27 Dec. 2017). Poltava. 2017. P. 100–102.
- Ali N. M., Yeap S. K. et al. The Promising Future of Chia, *Salvia hispanica* L. Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012. Vol. 2012, Article ID 171956, 9 p. doi: 10.1155/2012/171956.
- Alcántara M. A., de Lima Brito Polari I. et al. Effect of the solvent composition on the profile of phenolic compounds extracted from chia seeds. *Food Chemistry*. 2019. Vol. 275. P. 489–496.
- Bueno M. et al. *In vitro* response of different *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae) explants. *Molecular Medicinal Chemistry*. 2010. Vol. 21. P. 125–126.
- Gonçalves S., Romano A. Production of Plant Secondary Metabolites by Using Biotechnological Tools. *Sec. Metabolites — Sources and Applications*. 2018. Chapter 5. P. 81–99. doi: 10.5772/intechopen.76414.
- Kulczyński B., Kobus-Cisowska J. et al. The chemical composition and nutritional value of chia seeds — current state of knowledge — review. *Nutrients*. 2019. Vol. 11, No 6, 16 p. doi: org/10.3390/nu11061242.
- Marcinek K., Krejpcio Z. Chia seeds (*Salvia hispanica*): health promoting properties and therapeutic applications — A Review. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2017. Vol. 68, No 2. P. 123–129.
- Marconi P. L. *In vitro* establishment of *Salvia hispanica* L. plants and callus. *Biotechnologia Vegetal*. 2013. Vol. 13. P. 203–207.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15. P. 473–497.
- Naik P.M., Al-Khayri J. M. Abiotic and biotic Elicitors—Role in secondary metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants – Recent Advances and Future Perspectives*, 2016, Chapter 10. P. 247–277. doi: 10.5772/61442.
- Pajarón S., Ron E., Alfayate C. et al. La mixocarpia de *Salvia aegyptiaca* L. y su aplicación etnobotánica. *Botánica Complutensis*. 2008. Vol. 32. P. 213–216.
- Ryding O. Myxocarpy in *Nepetoideae* (Lamiaceae) with notes of myxodiaspory in general. *Systematics and Geography of Plants*. 2001. Vol. 71, No 2. P. 503–514.
- The *Gentianaceae* — Volume 2: Biotechnology and Applications / eds.: Rybczyński J. J., Davey M. R., Mikula A. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015. 452 p. doi:10.1007/978-3-642-54102-5_2.
- Wink M. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism (Second Edition). *Annual Plant Reviews*. 2010. Vol. 40. 481 p.
- Zayova E., Nikolova M. et al. Comparative study of *in vitro*, *ex vitro* and *in vivo* propagated *Salvia hispanica* (Chia) plants: morphometric analysis and antioxidant activity. *AgroLife Scientific Journal*. 2016. Vol. 5, No 2. P. 166–173.

Представлено М. О. Твардовською
Надійшла 20.04.2019

INTRODUCTION TO *IN VITRO* CULTURE AND CALLUS INITIATION IN *SALVIA HISPANICA* L. (CHIA)

A. Z. Revutskaya, A. V. Holubenko, N. V. Nuzhyna, H. O. Rudik, N. Yu. Taran

ESC «Institute of Biology and Medicine»,
Kyiv National Taras Shevchenko University
Ukraine, 01601, Kyiv, Glushkov avenue, 2
e-mail: nastartia@i.ua

Aim. Preparation of aseptic seedlings *Salvia hispanica* L., callus initiation *in vitro* and establishment of primary explants suitable for the callus production. **Methods.** Seeds are sprouted on our own modification of conventional methods. The non-hormonal Murashige-Skoog agarized nutrient medium was used as basic medium for the experiments. Parts of one-month seedlings (roots, hypocotyl, cotyledon leaves) were used as explants for the use of the colza. We added growth regulators (BAP, 2,4-D) in different concentration combinations into the nutrient medium for callus initiation. Statistical processing was performed in Microsoft Office Excel. **Results.** Aseptic *S. hispanica* seedlings have been obtained. The callus growth was initiated on all types of explants, the dependence of the callus intensity on the type of explants and the growth regulators content in the nutrient medium was established. Morphogenic callus and root-regenerants have been obtained. **Conclusions.** Hypocotyl was the most suitable primary explant for callus growth. Seedlings, leaves and roots showed low morphogenetic capacity. The nutrient medium with an elevated 2,4-D content was the most effective for initiation of callus genesis and proliferation of non-morphogenous callus. A high concentration of 2,4-D in the medium improves callus growth but suppresses its morphogenic ability.

Keywords: *Salvia hispanica* (Chia), *in vitro* culture, callus.

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ РЕНАТУРАЦІЇ ЗЛИТОГО БІЛКА rhIL7-VAPmut ІЗ ТІЛЕЦЬ ВКЛЮЧЕННЯ *ESCHERICHIA COLI* ТА ЙОГО ПРАКТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

М. О. УСЕНКО^{1,2}, О. В. ОКУНЄВ², К. І. БЕНЦІОНОВА³, О. Б. ГОРБАТЮК^{1,2},
Д. М. ІРОДОВ^{1,2}, М. В. КОВАЛЬЧУК^{1,2}, В. А. КОРДЮМ^{1,2}

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

² Державна установа «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України»
Україна, 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67

³ Державна установа «Інститут охорони ґрунтів України»
Україна, 03190, м. Київ, пров. Бабушкіна, 3

e-mail: usenko.m.alex@gmail.com, (050) 462-37-85

Мета. Метою нашої роботи була оптимізація методу ренатурації злитого білка rhIL7-VAPmut, створеного на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини (rhIL7) та бактерійної лужної фосфатази з підвищеними каталітичними властивостями (VAPmut), для його отримання у функціонально активній формі. **Методи.** Клітини *E. coli* BL21(DE3) трансформували плазмідним вектором pET24-IL7-VAPmut. Синтез білка індукували за протоколом аутоіндукції. Для ренатурації білка з бактерійних тілець включення *in vitro* застосовували іммобілізуючу металоафінну хроматографію (IMAX) та метод плавного розведення. **Результати.** Поєднання методів IMAX та плавного розведення в присутності аргініну, GSH/GSSG та іонів Mg²⁺ забезпечило отримання rhIL7-VAPmut в очищеній функціонально-активній формі. Біфункціональну активність rhIL7-VAPmut після ренатурації підтверджували імунохімічними методами шляхом зв'язування зі специфічними антитілами. **Висновки.** Було показано, що застосування rhIL7-VAPmut дозволяє значно скоротити час скринінгу імунної комбінаторної бібліотеки кДНК варіабельних генів імуноглобулінів і не потребує використання специфічних первинних і вторинних антитіл. Злитий білок rhIL7-VAPmut може також використовуватись для якісного та кількісного аналізу рецепторів IL-7.

Ключові слова: IL-7, VAPmut, бактерійні тільця включення, ренатурація.

Вступ. Антитіла є одним із основних інструментів сучасної медицини та діагностики, а також активно використовуються під час проведення фундаментальних та прикладних досліджень. Одноланцюгові антитіла — scFv (single chain variable fragment), які одержують шляхом об'єднання в один ген ДНК-послідовностей варіабельних доменів важкого (VH) та легкого (VL) ланцюгів імуноглобулінів, стають популярною альтернативою повнорозмірним моноклональним антитілам. Основними перевагами scFv, порівняно з повнорозмірними антитілами, є їхні менші розміри, можливість конструювання генно-інженерних кон'югатів на їх основі, відносно не дорогий та простий спосіб отримання синтезом в гетерологічних системах, а також високі показники афінності, специфічності та стабільності (Weisser et al., 2009).

В даній роботі як цільовий антиген, проти якого отримували специфічні антитіла, було обрано інтерлейкін 7 (IL-7) людини. IL-7 — імунний цитокін, що відіграє центральну роль в дозріванні та гомеостазі Т- і В-лімфоцитів (Corfe et al., 2012).

Дослідження IL-7 показали, що його рівень варіює у випадку різних захворювань, таких, як вірусні інфекції (ВІЛ, цитомегаловірусна інфекція, вірусний гепатит С), розсіяний склероз (РС), ревматоїдний артрит, діабет 1 типу, синдром важкого комбінованого імунодефіциту та інших (Lundström et al., 2012). Моніторинг концентрації IL-7 має прогностичне значення для детального вивчення механізмів його впливу на ефективність терапії вірусних та аутоімунних захворювань. ScFv(IL-7) можуть бути перспективним високоефективним інструментом моніторингу концентрації IL-7 в біологічних рідинах. Для отримання scFv проводять конструювання комбінаторних бібліотек кДНК V-генів імуноглобулінів, важливим етапом роботи з якими є селективний скринінг. Від ефективності скринінгу залежить специфічність та афінність отриманих рекомбінантних антитіл (Ahmad et al., 2012). Зазвичай, скринювання таких бібліотек проводять із застосуванням специфічних первинних і вторинних антитіл, що є затратним як за використанням реагентів, так і за тривалістю проведення самого процесу. Застосування генно-інженерних кон'югатів на основі антигену, проти якого проводиться селекція, та маркерної молекули для детекції дозволяє скоротити час проведення скринінгу. На попередніх етапах роботи синтезом в клітинах *E. coli* нами було отримано злитий білок rhIL7-VAPmut, який накопичувався у формі бактерійних тілець включення. Для подальшого використання необхідною умовою було повернення його функціональної активності *in vitro*. Тому метою даної роботи було оптимізувати метод ренатурації rhIL7-VAPmut із тілець включення *E. coli* та показати можливість його застосування для виявлення клонів-продуцентів специфічних scFv(IL-7).

Матеріали і методи

Конструювання і синтез rhIL7-VAPmut проводили як описано у роботі (Usenko et al., 2019). Для забезпечення синтезу rhIL7-VAPmut плазмідною *pET24-IL7-VAPmut* трансформували клітини *E. coli* BL21(DE3). Синтез білка індукували за протоколом аутоіндукції (Studier, 2005).

Очищення і ренатурація rhIL7-VAPmut методом розведення. Виділення бактерійних тілець включення проводили згідно оптимізованої нами раніше методики (Gorbatuk et al., 2008). Очищення білка проводили методом металоафінної хроматографії. Колонку HiTrap об'ємом 1 мл урівноважували іонами Ni^{2+} та приєднували до

автоматизованої хроматографічної системи FPLS («Pharmacia», Швеція). Сорбент урівноважували денатуруючим буфером, який містив 6 М гуанідин гідрохлориду, 100 мМ трис-НСІ (рН 8,0), 200 мМ NaCl, 10 мМ імідазолу при швидкості потоку буфера 0,5 мл/хв. Фракцію бактерійних тілець включення солюбілізували протягом 1 години за кімнатної температури в денатуруючому буфері, який містив 10 мМ 2-меркаптоетанолу, центрифугували, фільтрували через 0,45 мкм мембранний фільтр PVDF («Millipore», США). 1 мл солюбілізованих тілець включення (2 мг/мл) наносили на колонку зі швидкістю 0,2 мл/хв. Сорбент відмивали від неспецифічно зв'язаних білків денатуруючим буфером. IL7-VAPmut елюювали денатуруючим буфером, який містив 500 мМ імідазолу. Далі проводили заміну буфера для елюції на такий, що не містив імідазол, методом гель-фільтрації на сорбенті сефадекс G-25. Очищений білок ренатували плавним розведенням протягом 12 годин при +4 °С та постійному перемішуванні. Для ренатурації було обрано буферні розчини такого складу: 1) 100 мМ Tris-HCl рН 8,0, 150 мМ NaCl, 500 мМ аргініну, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ MgSO_4 ; 2) 100 мМ Tris-HCl рН 8,0, 150 мМ NaCl, 5 мМ β -циклодекстрин, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ MgSO_4 ; 3) 100 мМ Tris-HCl рН 8,0, 150 мМ NaCl, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 0,1 % Triton X-100.

Очищення та ренатурація rhIL7-VAPmut на металоафінному сорбенті. Очищення rhIL7-VAPmut проводили за методикою як описано вище. Ренатурація білка відбувалася в результаті встановлення лінійного градієнта ГГХ в 15 об'ємах колонки при змішуванні буферів з насосу А, який містив 6 М ГГХ та ренатуруючого буфера з насосу В (100 мМ Tris-HCl рН 8,0, 150 мМ NaCl, 100 мМ аргінін, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ MgSO_4) за швидкості потоку через колонку 0,2 мл/хв. Ренатурований білок елюювали з буфером 100 мМ Tris-HCl рН 8,0, 150 мМ NaCl, який містив 300 мМ імідазолу. Далі проводили заміну буфера для елюції на такий, що не містив імідазол, методом гель-фільтрації на сорбенті сефадекс G-25.

Визначення оптимальних умов роботи VAPmut у складі злитого білка rhIL7-VAPmut в ELISA. Для визначення оптимальних умов, що забезпечують високу каталітичну активності VAPmut було протестовано буферні розчини такого складу: 1) 100 мМ Tris-HCl, 140 мМ NaCl, 15 мМ MgSO_4 (рН=9,5); 2) 50 мМ CAPS, 400 мМ NaCl, 10 мМ MgSO_4 (рН = 10,0); 3) 100 мМ Tris-HCl, 15 мМ MgSO_4 (рН = 9,0); 4) 50 мМ гліцин, 15 мМ MgSO_4 (рН = 9,2). Як

хромогенний субстрат для бактерійної лужної фосфатази використовували р-нітрофеніл-фосфат (Sigma, США).

Скринування бібліотеки кДНК методом реплік колоній. Клітини *E. coli* штаму TG1, інфіковані фагами після афінної селекції висівали на агаризоване середовище 2YT, що містило ампіцилін та глюкозу, інкубували протягом ночі при +30 °С. Після цього, для отримання реплік колоній *E. coli*, на чашку наносили нітроцелюлозну мембрану («Millipore», США) та інкубували 10–12 годин. Мембрану з репліками колоній відмивали 6–8 разів фосфатним буфером (PBS). Після блокування місць неспецифічного зв'язування буфером PBS, що містив 3 % молока (PBSM), наносили rhIL7-BAPmut у концентрації 10 мкг/мл та інкубували протягом 1 год. Мембрану промивали 3–4 рази PBS та буферним розчином, що містив 140 мМ NaCl, 100 мМ Tris/HCl, 15 мМ MgSO₄ (pH = 9,5). Для візуалізації імунних комплексів застосовували субстрат для лужної фосфатази NBT/BCIP-T (Sigma, США).

Результати та обговорення

Штам-реципієнт *E. coli* BL21(DE3) було трансформовано плазмідним вектором *pET-rhIL7-BAPmut*. Індукування синтезу злитого білка проводили протягом 20 годин за протоколом аутоіндукції при +37°C. Електрофоретичний аналіз лізатів бактерійних клітин показав наявність у них продукту очікуваної молекулярної маси (66,2 кДа). Вихід цільового білка досягав 0,4 мг/мл вихідної культури *E. coli*.

IL-7 містить шість залишків цистеїну, що формують три дисульфідні зв'язки (Cys34-Cys129, Cys47-Cys141 і Cys2-Cys92) (Slyvka et al., 2014). Бактерійна лужна фосфатаза (BAP) - периплазматичний металопротеїн, гомодимер, в кожному мономері якого міститься два дисульфідні зв'язки, формування яких необхідне для правильного фолдингу і активації фермента (Ghosh et al., 1998). BAPmut, застосована для проведення дослідження, володіє підвищеною ферментативною активністю порівняно з бактерійною лужною фосфатазою *E. coli* (Gorbatiuk et al., 2013). В роботі (Muller et al., 2001) було показано, що за рахунок двох амінокислотних замін D153G і D330N (заміна аспарагінової кислоти на аспарагін і гліцин у 153 та 330 положеннях, відповідно) досягається збільшення каталітичної активності у 17–40 разів без втрати термостабільності ферменту. У випадку суперпродукції дисульфідвмісних рекомбінантних білків в *E. coli*, їх накопичення відбувається у цитоплаз-

мі клітини, відновлювальне середовище якої не дозволяє сформуватися дисульфідним зв'язкам, що призводить до формування нерозчинних агрегатів — тілець включення, котрі потребують ренатурації для відновлення активної форми (Tsumoto et al., 2004; Singh A. et al., 2015).

Оскільки цільовий білок накопичувався у формі тілець включення, подальша робота була сконцентрована на очищенні та ренатурації rhIL7-BAPmut *in vitro*. Солюбілізацію тілець включення проводили в буферному розчині, що містив 6 М ГТХ та 10 мМ 2-меркаптоетанол, центрифугували і відбирали супернатант для подальшої очистки і ренатурації. RhIL7-BAPmut містить С-кінцевий залишок His-tag, тому очищення білка проводили методом металоафінної хроматографії. Оскільки імідазол, який було застосовано для елюції білка з металоафінного сорбенту, може впливати на активність лужної фосфатази, проводили заміну буфера для елюції на буфер, що не містить імідазол, методом гель-фільтрації на сорбенті сефадекс G-25 («GE Healthcare», США). Для проведення ренатурації rhIL7-BAPmut застосовано метод плавного розведення. Додаткові речовини, які забезпечують інгібування агрегації, а також співвідношення окисно-відновних реагентів для коректного формування дисульфідних зв'язків підбирали відповідно до даних літератури (Yamaguchi et al., 2014; Xu et al., 2003). Додавання аргініну у концентрації 0,1–1 М дозволяє знизити агрегацію білка та підвищити його розчинність. Припускають, що гуанідинова група має слабкі взаємодії з ароматичними групами амінокислот, котрі в денатурованому білку знаходяться на поверхні і сприяють його агрегації (Tsumoto et al., 2004). Показано, що додавання аргініну і глутатіону забезпечує ренатурацію білків, що містять дисульфідні зв'язки при ступінчастому діалізі. Дослідження концентрації та співвідношення відновленого і окисненого глутатіонів (GSH/GSSG) показали, що для лужної фосфатази присутність GSH/GSSG у співвідношенні 10:1 – 5:1 забезпечувала максимальний вихід функціонально-активного білка (Khodagholi et al., 2007a). При співвідношенні 1:1 вихід ренатурованого білка суттєво зменшувався.

Ще одним реагентом, який досить часто використовують для запобігання агрегації білка є циклодекстрин. Зокрема, β-циклодекстрин — циклічний олігосахарид, що складається з семи α-(1,4) зв'язаних α-D-глюкопіранозних залишків (Aachmann et al., 2003). ЯМР дослідження показали, що порожнина кільця молекули циклодекстрина може утворювати комплекси із залишками амінокислот, особливо ароматичних, на по-

верхні білка. Окрім запобігання агрегації цільового білка, циклодекстрин може мати шапероноподібну дію (Yazdanparast et al., 2006). Молекули детергентів (наприклад, неіонний детергент Tween 20) екранують гідрофобні ділянки денатурованих білків. Циклодекстрин забезпечує вилучення молекули детергента із комплексу білок-детергент, чим запускає процес ренатурації білка *in vitro*. Лімітуючим фактором є розміри детергента, що впливають на можливість його взаємодії з молекулою циклодекстрину.

До складу буферів для ренатурації білків також додають іони металів. Зокрема, в нашому випадку компонентом злитого білка є металопротеїн — лужна фосфатаза, що містить в складі активного центру два іони Zn^{2+} , необхідні для реалізації каталітичної функції і термодинамічної стабільності (у так званих каталітичному M1 і структурному M2 сайтах), а також іон Mg^{2+} (у регуляторному сайті M3) необхідний для структурної стабілізації ферменту (Dirnbach et al., 2001). За даними (Khodagholi, 2007b) іони Mg^{2+} запобігають агрегації і збільшують активність ренатурації фосфатази на 50 % вже за присутності в концентрації 5 мМ. Таке підвищення ефективності ренатурації не досягалося при додаванні інших іонів металів, наприклад, Zn^{2+} чи Ca^{2+} , навіть за більших концентрацій (20 мМ). Відтак, ренатурація лужної фосфатази

менше залежить від іонної сили буфера, ніж від специфічних взаємодій між білком і іонами Mg^{2+} . При використанні різних солей Mg^{2+} досягали схожого рівня ренатурації, тобто, аніонна частина не відігравала специфічної ролі в цьому випадку. Mg^{2+} стабілізує інтермедіати на ранній стадії ренатурації BAP, зменшуючи агрегацію денатурованих молекул. Тому в роботі було застосовано лише іони Mg^{2+} .

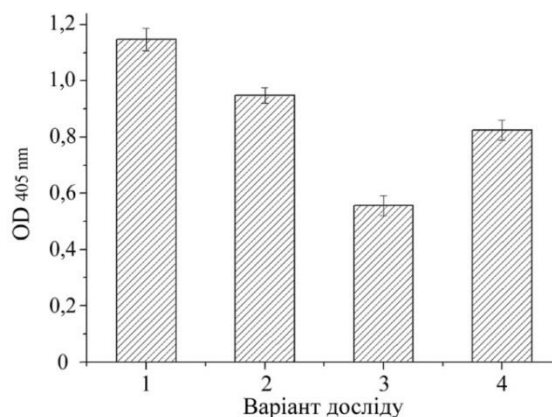


Рис. 1. Аналіз зв'язування rhlL7-BAPmut, ренатурованого за присутності різних реагентів і їх співвідношень, з антитілами до IL-7 в ELISA (n = 3, p < 0,05). Умови ренатурації наведено у таблиці 1. Зв'язувальну активність порівнювали при концентрації rhlL7-BAPmut 1 мкг/мл.

Таблиця 1. Варіанти ренатурації rhlL7-BAPmut

№ дослідження	Метод ренатурації	Склад буфера для ренатурації
1	плавне розведення	100 мМ Tris-HCl pH 8,0, 150 мМ NaCl, 500 мМ аргінін, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ $MgSO_4$
2	плавне розведення	100 мМ Tris-HCl pH 8,0, 150 мМ NaCl, 5 мМ β -циклодекстрин, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ $MgSO_4$
3	плавне розведення	100 мМ Tris-HCl pH 8,0, 150 мМ NaCl, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 0,1% Triton X-100
4	ренатурація на металоафінному сорбенті	100 мМ Tris-HCl pH 8,0, 150 мМ NaCl, 100 мМ аргінін, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ $MgSO_4$

Допоміжні речовини, які додавали під час ренатурації плавним розведенням (табл. 1), забезпечили підвищення виходу функціонально-активного rhlL7-BAPmut за рахунок перешкоджання його агрегації, а також сприяли коректному формуванню дисульфідних зв'язків. В результаті проведеного експерименту було показано, що найвища ефективність ренатурації rhlL7-BAPmut була у випадку застосування аргініну, β -цикло-

декстрину і глутатіонів для формування дисульфідних зв'язків (рис. 1).

Оскільки, ренатурація розведенням не завжди є технологічною, а rhlL7-BAPmut містить генетично введену послідовність His-tag, привабливим було використання останньої для проведення його одностадійного очищення та ренатурації на металоафінному сорбенті. Для оптимізації процесу очищення і ренатурації цільового білка використовували колонку, яка містила 1мл Ni-NTA —

Superflow сефарози. Однак, нами було встановлено, що у випадку rhIL7-BAPmut, який складається з двох функціональних частин, цей метод виявився менш ефективним у порівнянні з плавним розведенням (рис. 1).

Також проводилося визначення оптимальних умов функціонування BAPmut. За даними літератури (Muller et al., 2001) було проаналізовано декілька варіантів буферних розчинів. В результаті імуноферментного аналізу було встановлено, що при використанні буферних систем на основі Трис або CAPS при значенні рН 9,5–10,0 спостерігалась найвища активність ферменту (рис. 2).

Отриманий злитий білок rhIL7-BAPmut було застосовано для скринінгу імунної комбінаторної бібліотеки кДНК варіабельних генів імуноглобулінів миші шляхом аналізу реплік бактерійних колоній (клонів-продуцентів одноланцюгових антитіл, специфічних до IL7). В результаті було виділено клони, що продукують специфічні одноланцюгові антитіла (рис. 3).

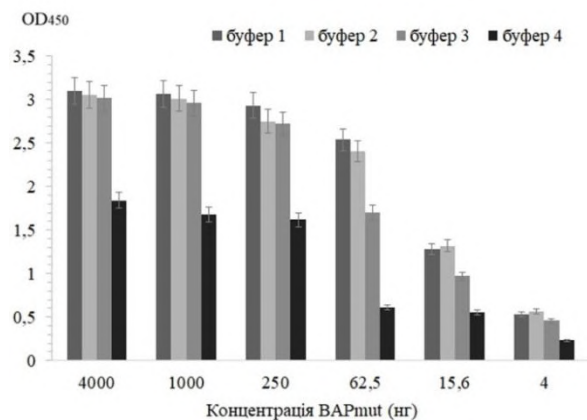


Рис. 2. Визначення оптимальних умов для функціонування BAPmut в ELISA.

Буфер 1: 100 мМ Tris-HCl, 140 мМ NaCl, 15 мМ MgSO₄ (рН=9,5);
 буфер 2: 50 мМ CAPS, 400 мМ NaCl, 10 мМ MgSO₄ (рН=10,0);
 буфер 3: 100 мМ Tris-HCl, 15 мМ MgSO₄ (рН=9,0);
 буфер 4: 50 мМ гліцин, 15 мМ MgSO₄, (рН=9,2).

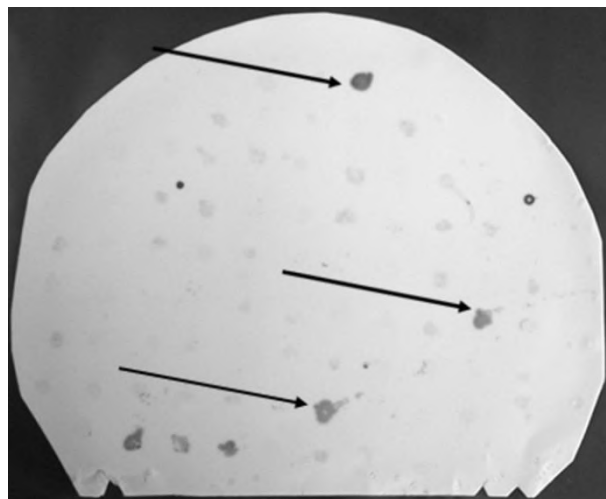


Рис. 3. Імуноблот реплік бактерійних колоній, одержаних в результаті скринінгу клонів, отриманих після декількох циклів афінної селекції фагової бібліотеки проти rhIL7. Візуалізацію клонів-продуцентів проводили із застосуванням rhIL7-BAPmut. Стрілками вказано клони, що продукують специфічні антитіла.

Отриманий злитий білок rhIL7-BAPmut також може бути використаний для одностадійного виявлення специфічних до IL7 антитіл. Схема проведення класичного імуноферментного аналізу із застосуванням кон'югату антигену з маркерною молекулою наведено на рис. 4.

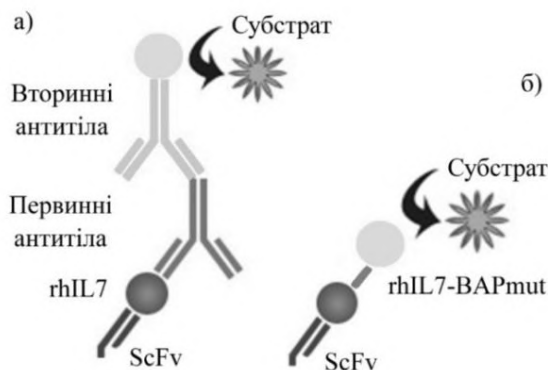


Рис. 4. Схематичне зображення проведення ELISA для детекції scFv(IL7): а) виявлення імунних комплексів scFv-rhIL7 відбувається в результаті послідовного додавання специфічних первинних і вторинних антитіл; б) виявлення scFv(IL7) проводиться в результаті взаємодії злитого білка rhIL7-BAPmut.

Застосування rhIL7-BAPmut дозволяє суттєво скоротити час проведення імуноферментного аналізу та зменшити витрати на імунореагенти.

Висновки

Отже, в результаті виконання роботи було сконструйовано злитий білок на основі інтерлейкіну 7 людини та бактерійної лужної фосфатази з підвищеною каталітичною активністю (rhIL7-BAPmut) і забезпечено його синтез в *E. coli* у формі тілець включення. Встановлено, що плавне розведення очищеного білка буферним розчином, який містив аргінін, глутатіон окиснений/відновлений та іони Mg^{2+} , є оптимальним методом відновлення функціональної активності обох компонентів злитого білка rhIL7-BAPmut *in vitro*. Показано, що застосування rhIL7-BAPmut, після його ренатурації з тілець включення, дозволяє щонайменше втричі скоротити час проведення скринінгу імунної комбінаторної бібліотеки кДНК V-генів імунoglobulinів та не потребує застосування специфічних первинних і вторинних антитіл. Злитий білок rhIL7-BAPmut також може бути використаний у подальших дослідженнях для якісного та кількісного аналізу рецепторів до IL-7. Це дозволить проводити моніторинг функціонального стану клітин імунної системи організму.

Перелік літератури

1. Aachmann F. L., Otzen D. E., Larsen K. L., Wimmer R. Structural background of cyclodextrin-protein interactions. *Protein Engineering Design and Selection*. 2003. Vol. 16. P. 905–912. doi: 10.1093/protein/gzg137.
2. Ahmad Z. A., Yeap S. K., Ali A. M., Ho W. Y., Alitheen N. B. M., Hamid M. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. *Clin. Dev. Immunol.* 2012. P. 1–15. doi: 10.1155/2012/980250.
3. Corfe S. A., Paige C. J. The many roles of IL-7 in B cell development; Mediator of survival, proliferation and differentiation. *Seminars in Immunology*. 2012. Vol. 24. P. 198–208. doi: 10.1016/j.smim.2012.02.001.
4. Dirnbach E., Steel D. G., Gafni A. Mg²⁺ Binding to Alkaline Phosphatase Correlates with Slow Changes in Protein Lability. *Biochemistry*. 2001. Vol. 40. P. 11219–11226. doi: 10.1021/bi011399m.
5. Ghosh N., Sarkar S. N., Roy K. B. Excess Nucleoside Triphosphates (or Zinc) Allow Recovery of Alkaline Phosphatase Activity Following Refolding under Reducing Conditions. *Biochemistry*. 1998. Vol. 37. P. 15542–15547. doi: 10.1021/bi972833g.
6. Gorbatiuk O. B., Okunev O. V., Nikolaev Yu. S., Svyatenko O. V., Kordium V. A. Construction, expression, functional characterization and practical application of fusion protein SPA-BAPmut. *Biopolym. Cell*. 2013. Vol. 29. P. 49–54. doi: 10.7124/bc.000805.
7. Gorbatiuk O. B., Nikolayev U. S., Irodov D. M., Dubey I. Ya., Gilchuk P. V. Refolding of ScFv-CBD fusion protein from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Biopolymers and Cell*. 2008. Vol. 24. P. 51–59. doi: 10.7124/bc.000790.
8. Khodaghali F., Yazdanparast R. Cooperative effects of artificial chaperone and Mg²⁺ ions on alkaline phosphatase refolding. *Biochemical Engineering Journal*. 2007. Vol. 36. P. 123–130. doi: 10.1016/j.bej.2007.02.008.
9. Khodaghali F., Yazdanparast R. Designing a Highly Efficient Refolding System for Alkaline Phosphatase using Combination of Cyclodextrin and Mg²⁺ Ion. *Protein J.* 2007. Vol. 27. P. 1–6. doi: 10.1007/s10930-006-9021-8.
10. Lundström W., Fewke N. M., Mackall C. L. IL-7 in human health and disease. *Seminars in Immunology*. 2012. Vol. 24. P. 218–224. doi: 10.1016/j.smim.2012.02.005.
11. Muller B. H., Lamoure C., Le Du M. H., Cattolico L., Lajeunesse E., Lemaitre F., Pearson A., Ducancel F., Menez A., Boulain J. C. Improving *Escherichia coli* alkaline phosphatase efficacy by additional mutations inside and outside the catalytic pocket. *Chembiochem*. 2001. Vol. 2. P. 517–523. doi: 10.1002/1439-7633(20010803)2:7/8<517::aid-cbic517>3.0.co;2-h.
12. Singh A., Upadhyay V., Upadhyay A. K., Singh S. M., Singh A. K. P. et al. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*. 2015. Vol. 14. P. 1–10. doi: 10.1186/s12934-015-0222-8.
13. Slyvka A. V., Okunev O. V. Molecular mechanisms of versatile biological activity of interleukin-7. *Biopolym. Cell*. 2014. Vol. 30. P. 349–357. doi: 10.7124/bc.0008B1.
14. Studier F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 2005. Vol. 41. P. 207–234. doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
15. Tsumoto K., Umetsu M., Kumagai I., Ejima D., Philo J. S., Arakawa T. Role of Arginine in Protein Refolding, Solubilization, and Purification. *Biotechnology Progress*. 2004. Vol. 20. P. 1301–1308. doi: 10.1021/bp0498793.
16. Usenko M. O., Okunev O. V., Bentsionova K. I., Gorbatiuk O. B., Irodov D. M., Kordium V. A. Obtaining of the recombinant rhIL7-BAPmut fusion protein and its functional characterization. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2019. In press.
17. Weisser N. E., Hall J. C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology Advances*. 2009. Vol. 27. P. 502–520. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.004.
18. Xu H., Zhang X., Zhang Z., Zhang Y., Cass A. E. G. Directed Evolution of *E. coli* Alkaline Phosphatase Towards Higher Catalytic Activity. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2003. Vol. 21. P. 41–47. doi: 10.1080/1024242031000087493.
19. Yamaguchi H., Miyazaki M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules*. 2014. Vol. 4. P. 235–251. doi:10.3390/biom4010235.

20. Yazdanparast R, Khodaghali F. Kinetic aspects of alkaline phosphatase refolding in the presence of alpha-cyclodextrin. *Arch. Biochem. Biophys.* 2006. Vol. 446. P. 11–19. doi: 10.1016/j.abb.2005.11.018.

Представлено Д. В. Колибо
Надійшла 1.06.2019

OPTIMIZATION OF RENATURATION PROCESS OF THE rhIL7-BAPmut FUSION PROTEIN

М. О. Usenko¹, О. В. Okunev², К. І. Bentsionova³,
О. Б. Gorbatyuk¹, Д. М. Irodov¹, М. В. Koval'chuk^{1,2},
V. A. Kordium¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine
Ukraine, 03143, Kyiv, Zabolotnogo str., 150

² State Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS of Ukraine
Ukraine, 04114, Kyiv, Vyshgorodska str., 67

³ State Institution «Soils Protection Institute of Ukraine»
Ukraine, 03190, Kyiv, Babushkina str., 3

e-mail: usenko.m.alex@gmail.com

Aim. The aim of our work was to optimize the renaturation method of the rhIL7-BAPmut fusion protein based on recombinant human interleukin-7 (rhIL7) and bacterial alkaline phosphatase with enhanced catalytic properties (BAPmut) for its obtaining in functionally active form. **Methods.** The cells of *E. coli* strain B-L21(DE3) were transformed with pET24-IL7-BAPmut plasmid vector. Protein synthesis was induced by autoinduction protocol. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC) and slow dilution methods were applied for rhIL7-BAPmut fusion protein renaturation from bacterial inclusion bodies in vitro. **Results.** Combination of IMAC method and slow dilution at the presence of arginine, GSH/ GSSG and Mg²⁺ ions provided obtaining of rhIL7-BAPmut in pure and active form. Bifunctional activity of rhIL7-BAPmut after refolding is confirmed immunochemically by binding with specific antibodies. **Conclusions.** It was shown that application of rhIL7-BAPmut allows to reduce the time of the screening of immune combinatory libraries of variable genes of IgG and does not require specific primary and secondary antibodies. The rhIL7-BAPmut fusion protein also can be used for qualitative and quantitative analysis of IL-7 receptors.

Keywords: IL-7, BAPmut, inclusion bodies, renaturation.