

УДК 579.222:577.217

Л.А. Бабенко^{1,2}, О.Ю. Скоробогатов², О.Л. Дубровський¹,
О.І. Корнелюк¹

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

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, Київ, 01601, Україна, e-mail: babenko_lesia@ukr.net

ОПТИМІЗАЦІЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ПРОТИПУХЛИННОГО ЦИТОКІНА ЕМАР II В КЛІТИНАХ *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3)PLYSE

*ЕМАР II (ендотеліальний моноцитаривуючий поліпептид II) – новий прозапальний антиангіогенний цитокін, який має протипухлинну дію. З метою розробки генно-інженерної технології отримання ЕМАР II проведена оптимізація умов бактеріальної експресії клонованого в складі вектора рЕТ30а гена, що кодує ЕМАР II. Досліджено вплив концентрації індуктора синтезу ІПТГ цільового білка на його кінцевий вихід, встановлено оптимальний час культивування бактеріальної культури до та після додавання індуктора. Запропоновано схему культивування *E. coli* BL21(DE3)pLysE для досягнення високого рівня виходу рекомбінантного цитокіна ЕМАР II на рівні 110 мг з 1 л бактеріальної культури.*

Ключові слова: ЕМАР II, бактеріальна система експресії, оптимізація експресії, антипухлинний цитокін.

Сучасні генно-інженерні біотехнології широко використовуються для отримання рекомбінантних білків в препаративних кількостях як нових терапевтичних препаратів для медицини. Для досягнення ефективної експресії рекомбінантних білків в прокаріотних системах необхідна розробка оптимальної системи експресії для кожного білка, оскільки універсальної стратегії оптимізації експресії клонованих генів не існує [1]. Незважаючи на значні успіхи молекулярної біотехнології в отриманні рекомбінантних терапевтичних білків, іде постійний пошук нових білків – кандидатів для застосування в біомедицині. Першочерговою задачею є необхідність

розробки нових антипухлинних препаратів з низькою токсичністю для застосування в клінічній онкології.

EMAP II (endothelial monocyte-activating polypeptide-II) — це мультифункціональний цитокін, який утворюється в злоякісних пухлинах ссавців завдяки посттрансляційному процесингу білка р43. Вперше він був виділений з фібросаркоми мишей, індукованою метилхолантреном [2, 3]. Виявлена здатність EMAP II пригнічувати міграцію ендотеліальних клітин, стимулювати їх апоптоз, впливати на активність моноцитів, нейтрофілів і макрофагів, сприяючи запальним процесам в пухлинах [3, 4]. На експериментальних моделях гліоми, саркоми, раки шлунку і підшлункової залози отримані докази його протипухлинної активності, що автори пояснюють перш за все антиангіогенними властивостями [4–6]. Виявлено також ефект гальмування рекомбінантним EMAP II росту ксенографтів раку простати людини, імплантованих під капсулу нирки мишей [7, 8]. Потенційна здатність EMAP II інгібувати неоангіогенез та стимулювати апоптоз ракових клітин є основою для його дослідження в якості нового протипухлинного лікарського засобу.

Метою даного дослідження було встановити умови високого рівня експресії рекомбінантного цитокіна EMAP II людини в бактеріальній системі шляхом здійснення підбору оптимальних умов культивування *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE та експресії цільового білка.

Матеріали і методи

Для суперпродукції цільового білка в роботі використаний штам-продуцент рекомбінантних білків, отриманий на основі реципієнта *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE. Штам трансформовано за загальноприйнятою методикою [9] сконструйованим нами плазмідним вектором рЕТ30а-EMAP II, у якого під контролем промотора фага T7 міститься ген, що кодує синтез цільового білка EMAP II. Генетичним маркером плазміди рЕТ30а є ген *kan*, що забезпечує стійкість трансформованих клітин до канаміцину.

Одиничну колонію штама-продуцента інокулювали в середовище Luria-Bertani (LB), яке містить 5 г дріжджового екстракту, 10 г триптон, 10 г NaCl в 1 л з додаванням антибіотика канаміцину до кінцевої концентрації в розчині 30 мкг/мл та нарощували протягом ночі. Нарощену культуру інокулювали в свіже середовище LB та культивували при температурі 37 °C та інтенсивній аерації (150 об/хв) до досягнення нею оптичної густини 0,6–1,3 (залежно від часу культивування культури). Оптичну густину (OD_{600}) визначали спектрофотометрично (спектрофотометр Bio-Mate-5, Велика Британія) при довжині хвилі 600 нм.

Індукцію експресії рекомбінантного білка з промотора lacUV5 здійснювали шляхом додавання в культуральне середовище ізопропіл- β -тіогалактопіранозиду (ІПТГ) в концентраціях 0,5 мМ, 0,75 мМ, 1 мМ,



1,25 мМ та 1,5 мМ. Визначали час культивування бактеріальної культури до індукції (1, 2, 3 год) та після індукції експресії (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5 год). Для підбору оптимального середовища культивування бактеріальної культури тестували такі середовища: середовище Luria-Bertani, м'ясо-пептонний бульйон (пептон, суміш амінокислот, Na_2CO_3 , NaCl) та мінімальне середовище А (глюкоза, тіамін, біотин, MgSO_4 , CaCl_2 , NH_4Cl , NaCl , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , солі заліза, цинку, міді, кобальту, бору, марганцю у якості мікроелементів).

Виділення та очистка рекомбінантного білка з клітин *E. coli*. На ультразвуковому дезінтеграторі проводили руйнування бактеріальних клітин (6 циклів: 20 сек сонікація, 20 сек перерва). Цільовий рекомбінантний білок ЕМАР II отримували із супернатанту лізованих клітин (буфер для лізису: 50 мМ Na-фосфат, 500 мМ NaCl , 10 мМ імідазол, 5 мМ β -меркаптоетанол). Очистку рекомбінантного білка проводили методом металхелатуючої хроматографії на колонці з Ni-NTA-агарозою. Супернатант наносили на колонку з Ni-NTA-агарозою (Qiagen, США), цільовий білок елюювали буфером для елюції (50 мМ Na-фосфатний буфер, 150 мМ NaCl , 200 мМ імідазолу, 5 мМ β -меркаптоетанолу). Для фракцій, що містили цільовий білок, проводили діаліз.

Концентрацію очищеного білка визначали на спектрофотометрі BioMate-5, коефіцієнт оптичного поглинання рекомбінантного ЕМАР II на довжині хвилі 280 нм складає $8730 \text{ см}^{-1}\text{моль}^{-1}$ (0,377 мл/мг). Коефіцієнт оптичного поглинання визначали за даними амінокислотного аналізу за допомогою програми ProtParam (<http://expasy.ch/cgi-bin/protparam>).

Аналіз бактеріальних білків проводили з допомогою SDS-гель-електрофорезу за методом Леммлі в денатуруючих умовах, використовуючи для їх розділення 12%-й поліакриламідний гель із 0,1% додецилсульфату натрію [10], використовуючи суміш маркерних білків фірми Fermentas (Литва). Гелі фарбували барвником Coomassie blue R-250. Вміст білків визначали денситометрично (денситометр LKB UltroScan XL, Швеція). При статистичній обробці результатів дослідження використовували пакет статистичних програм STATISTICA 7.0. Одержані результати представлені у вигляді середніх значень з урахуванням середніх квадратичних відхилень.

Отриманий рекомбінантний білок ЕМАР II (212 амінокислот, молекулярна маса 23 304 Da) розщеплювали специфічно ентерокиназою та очищали ЕМАР II від відщепленого фрагмента додатковим етапом металхелатуючої хроматографії на Ni-NTA-агарозі. В результаті отримували високочищений препарат ЕМАР II (169 а.з., молекулярна маса 18 535 Da) з чистотою біля 98% згідно даним електрофоретичного аналізу. Ізоелектрична точка ЕМАР II складає $pI=6.36$, коефіцієнт оптичного поглинання на довжині хвилі 280 нм складає $8730 \text{ см}^{-1}\text{моль}^{-1}$ (0,471 мл/мг).

Результати та їх обговорення

Оптимізація умов культивування штамів-продуцентів рекомбінантних білків є важливою проблемою сучасної молекулярної біотехнології. Однчасне використання традиційних методів оптимізації зі специфічними підходами, які застосовуються для рекомбінантних штамів може суттєво підвищити вихід цільового продукту. Бактеріальні системи експресії найбільш широко використовуються серед інших систем білкової експресії завдяки їх простоті та дешевизні. Серед переваг бактеріальних систем зазначаються проста фізіологія, короткі проміжки між 2 поділами бактеріальних клітин — швидкий ріст та розмноження, високий вихід цільового продукту.

Система експресії на основі РНК-полімерази фага T7 є однією з найбільш ефективних прокариотних систем. На відміну від більшості бактеріальних та еукаріотних РНК-полімераз, T7 РНК полімераза складається з однієї субодиниці, і в той же час здатна здійснювати повний цикл транскрипції при відсутності додаткових білкових факторів. Найчастіше в ролі продуцента в таких системах виступає штам *E. coli* BL21 (DE3) *pLysE* [9].

Ген РНК-полімерази фага T7 під контролем *lac* UV5 промотора локалізується в бактеріальній хромосомі, куди він інтегрований в складі фага λ . Індукція синтезу фагового фрагмента та наступна високоефективна транскрипція цільового гену в складі рекомбінантної плазміди спостерігаються після додавання в середовище культивування індуктора експресії ІПТГ [12, 13].

При проведенні оптимізації умов культивування штаму-продуценту цитокіна ЕМАР II ми враховували такі фактори, як концентрацію індуктора (ІПТГ), фазу росту клітин штаму-продуцента, часу додавання індуктора, склад культурального середовища, час культивування штаму-продуцента після додавання індуктора ІПТГ. Однією з проблем при експресії білків є підбір оптимального часу індукції, оскільки рання індукція призводить до більш низького виходу біомаси та цільового продукту. При пізній індукції спостерігається високий вихід біомаси та низький рівень накопичення рекомбінантного білка.

Не менш важливу роль відіграє і концентрація індуктора, що додається.

Для експресії цитокіна ЕМАР II максимальна кількість білка спостерігалась за умови додавання в середовище культивування індуктора на другу годину росту культури ($OG_{600}=0,7-0,9$), що пояснюється ймовірним досягненням культурою найбільш сприятливої фази росту — логарифмічної фази росту (рис. 1).

Нами проведено дослідження рівня бактеріальної експресії білка ЕМАР II в залежності від концентрації індуктора ІПТГ та часу культивування культури *Escherichia coli* BL21 (DE3) *pLysE* після індукції.



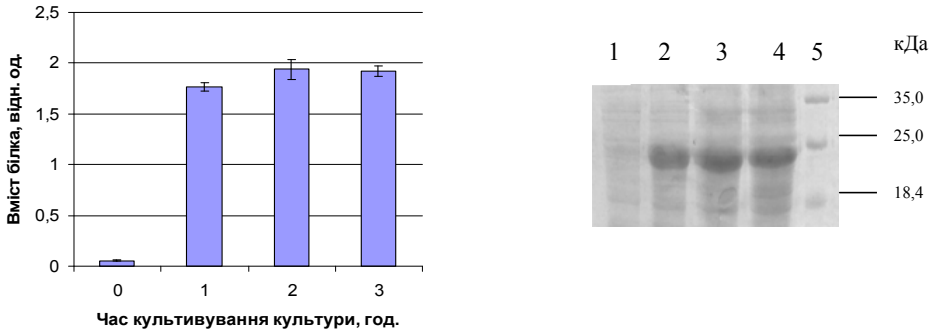


Рис. 1. Рівень експресії білка ЕМАР II залежно від часу культивування бактеріальної культури до індукції: а) залежність виходу білка від часу культивування; б) електрофореграма білків, отриманих при різному часі культивування. 1–4 – лізати до індукції (0, 1, 2, 3 год. культивування до індукції, відповідно); 5 – білковий маркер молекулярної маси («Fermentas», Литва).

Fig. 1. The level of expression of EMAP II protein depending on the time of cultivation of bacterial culture to the induction of: a) the dependence output protein of time of cultivation; b) electrophoretograms of proteins, obtained at different times of cultivation. 1 – without inducer; 2–4 – after induction (1, 2, 3 h of cultivation with inducer, respectively); 5 – protein molecular weight marker (“Fermentas”, Lithuania).

При підвищенні концентрації індуктора до 1,25 мМ спостерігалось зростання рівня експресії цільового білка, проте при подальшому збільшенні кількості ІПТГ ця тенденція втрачалась і спостерігався спад рівня експресії (рис. 2).

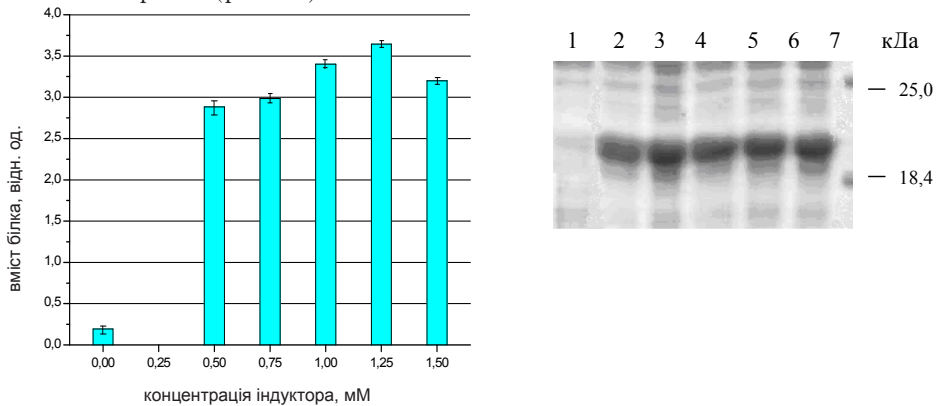


Рис. 2. Рівень експресії білка ЕМАР II залежно від кількості ІПТГ: а) залежність виходу білка від кількості індуктора; б) електрофореграма білків, отриманих при додаванні різної кількості ІПТГ. 1 – лізат до індукції; 2–6 – лізати після індукції (0,5 мМ, 0,75 мМ, 1 мМ, 1,25 мМ, 1,5 мМ ІПТГ, відповідно, 7 – білковий маркер молекулярної маси («Fermentas», Литва).

Fig. 2. The level of expression of EMAP II protein depending on the concentration IPTG: a) the dependence output protein of concentration of inducer; b) electrophoretograms of proteins, obtained by adding different amount of IPTG. 1 – without inducer; 2–6 – induced with 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 1,25 mM, 1,5 mM IPTG respectively; 7-protein molecular weight marker (“Fermentas”, Lithuania).

При дослідженні рівня експресії ЕМАР II в залежності від часу культивування культури після індукції нами встановлено, що найбільший приріст експресії цільового білка спостерігався при культивуванні культури 4,5 год. Подальше культивування бактеріальної культури приводило до незначного зниження біосинтезу цільового білка та суттєвого збільшення синтезу бактеріальних білків (рис. 3).

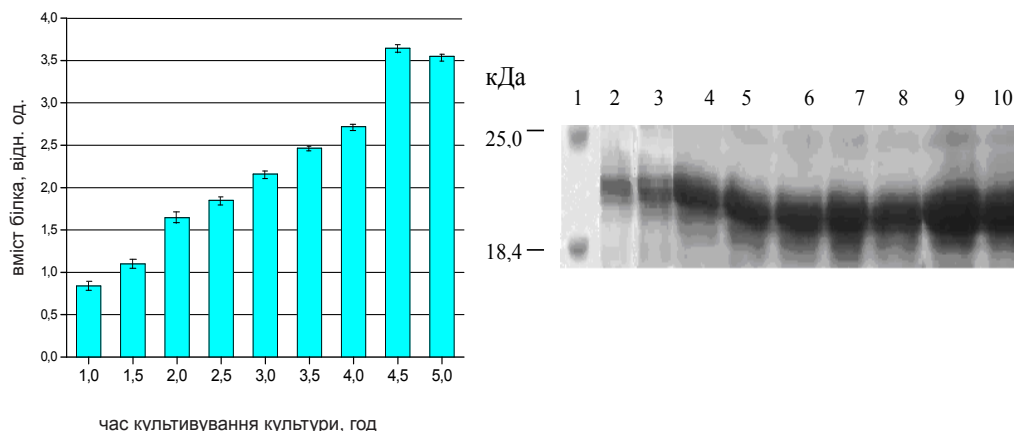


Рис. 3. Рівень експресії білка ЕМАР II залежно від часу культивування культури після індукції: а) залежність виходу білка від часу культивування; б) електрофореграма білків, отриманих при різному часі культивування. 1 — білковий маркер молекулярної маси (“Fermentas”, Литва); 2–10 — лізати після індукції (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5 год. культивування після індукції, відповідно).

Fig. 3. The level of expression of EMAP II protein depending on the time of cultivation of bacterial culture after induction: a) the dependence output protein of time of cultivation; b) electrophoretograms of proteins, obtained at different times of cultivation. 1 — protein molecular weight marker (“Fermentas”, Lithuania); 2–10 — after induction (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5 h of cultivation with inductor, respectively).

Слід зазначити, що накопичення в біомасі клітин цільового продукту при культивуванні рекомбінантних штамів-продуцентів залежить великою мірою від якості та складу субстратів. Якщо ростове середовище для бактеріальної культури підбрано оптимально, це дозволяє отримати найбільш високий рівень виходу цільового білка.

Нами проведено культивування бактерій на різних поживних середовищах В результаті проведеного дослідження встановлено, що найвищий рівень експресії рекомбінантного білка ЕМАР II спостерігався при вирощуванні на мінімальному середовищі А (рис. 4). Це дуже вигідно при культивуванні штама-продуцента у великих кількостях та промислового культивуванні. Найнижчий рівень експресії цільового продукту спостерігався при культивуванні штаму-продуцента на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) (рис. 4).

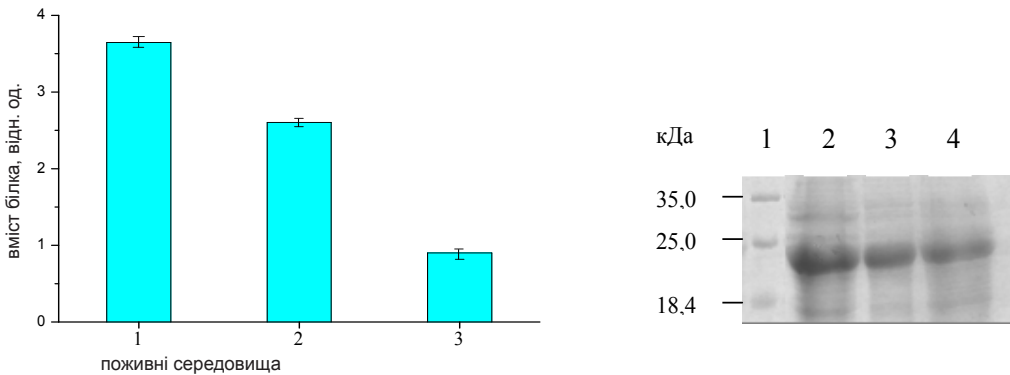


Рис. 4. Рівень експресії білка ЕМАР II залежно від середовища культивування бактеріальної культури: а) залежність виходу білка від середовища культивування: 1 – мінімальне середовище А; 2 – середовище LB; 3 – МПБ; б) електрофореграма білків, отриманих з різних середовищ: 1 – білковий маркер молекулярної маси (“Fermentas”, Литва); 2 – мінімальне середовище А; 3 – середовище LB; 4 – МПБ.

Fig. 4. The level of expression of EMAP II protein depending on cultivation medium: a) dependence of protein yield on cultivation medium: 1 – minimal medium A; 2 – LB; 3 – beef-extract agar; b) protein electroforetograms, obtained from different cultivation mediums: 1 – protein molecular weight marker (“Fermentas”, Lithuania); 2 – minimal medium A, 3 – LB, 4 – beef-extract agar.

Після проведення бактеріальної експресії здійснювали афінну очистку рекомбінантного білка ЕМАР II металхелатуючою хроматографією на Ni-NTA агарозі. Концентрація білка після хроматографічного очищення складала 1,112 мг/мл для білка ЕМАР II із чистотою 95–98%. Вимір проводили у кварцевих кюветах з довжиною оптичного шляху 1 см. Коефіцієнт екстинкції визначали за даними амінокислотного аналізу за допомогою програми ProtParam (<http://expasy.ch/cgi-bin/protparam>).

Підвищено рівень експресії рекомбінантного цитокіна ЕМАР II шляхом здійснення підбору оптимальних умов культивування бактеріальної культури. Отримано рекомбінантний цитокін ЕМАР II високого рівня чистоти (рис. 5).

Отриманий рекомбінантний білок ЕМАР II специфічно розщеплювали ентерокиназою та додатково очищали ЕМАР II від відщепленого фрагмента металхелатуючою хроматографією на Ni-NTA-агарозі. В результаті отримували високоочищений препарат ЕМАР II, який використовували в біомедичних дослідженнях, в тому числі для інгібування росту ксенорафтів раку простати людини, імплантованих під капсулу нирки мишей [7, 8].

Таким чином, в результаті проведених досліджень досягнуто оптимізації бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР II. Встановлено, що оптимальна кількість індуктора ІПТГ для експресії ЕМАР II становить 1,25 мМ, час культивування бактеріальної культури до та після індукції

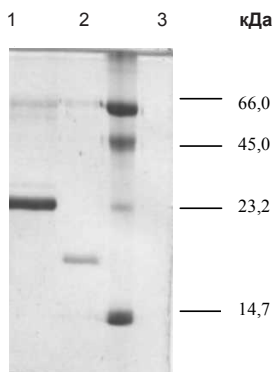


Рис. 5. Електрофоретичний контроль чистоти білка ЕМАР ІІ (12%-ий розділяючий гель)

1 – рекомбінантний білок ЕМАР ІІ; 2 – ЕМАР ІІ після розщеплення ентерокиназою; 3 – білковий маркер (лізоцим, ЕМАР ІІ, овальбумін, бичачий сивороточний альбумін).

Fig. 5. Electrophoretic control of protein EMAP II purity (SDS-12% PAGE):

1 – protein EMAP II; 2 – EMAP II after enterokinase cleavage; 3 – protein molecular weight marker (Lysozyme, EMAP II, ovalbuminum, Bovine Serum Albumin).

синтезу цільового білка становить 2 та 4,5 години, відповідно. Найбільш оптимальним середовищем для культивування є мінімальне середовище А. Вихід цільового білка – рекомбінантного ЕМАР ІІ при бактеріальній експресії в культурі клітин *E. coli BL21(DE3)pLysE* складає близько 110 мг з 1 л культуральної рідини. Після розщеплення рекомбінантного ЕМАР ІІ ентерокиназою та додаткового етапу хроматографічної очистки отримали 73,42 мг кінцевого продукту.

Отже, в роботі нами розроблена вітчизняна генно-інженерна технологія отримання протипухлинного цитокіна ЕМАР ІІ в препаративних кількостях. Слід зазначити, що цитокін ЕМАР ІІ є перспективним генно-інженерним біотехнологічним продуктом. Біотехнологічне виробництво цього цитокіну є необхідним для проведення експериментальних досліджень впливу цитокіна на клітинні процеси (індукція апоптозу, вплив на ангиогенез і т.д.), а в перспективі після його впровадження як нового лікарського препарату для інгібування пухлинного росту. Технологія виробництва нового цитокіна ЕМАР ІІ з широким спектром застосування в біології і медицині може в перспективі дати значний економічний ефект після впровадження розробки у біотехнологічне виробництво.

ЛІТЕРАТУРА

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир. – 2002, – 589 с.

2. Kao J., Ryan J., Brett G., Chen J., Shen H., Fan Y.G., Godman G., Familletti P.C., Wang F., Pan Y.C. Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumour-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. // *J. Biol. Chem.* — 1992. — 267, N 28. — P. 20239–20247.

3. Ivakhno S.S., Kornelyuk A.I. Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis // *Experim. Oncol.* — 2004. — 26, N 4. — P. 250–255.

4. Schwarz M.A., Kandel J., Brett J., Li J., Hayward J., Schwarz R.E., Chappey O., Wautier J.L., Chabot J., Gerfo P.L., Stern D. Endothelial-monocyte activating polypeptide II. A novel antitumour cytokine that suppresses primary and metastatic tumour growth and induces apoptosis in growing endothelial cells // *J. Exp. Med.* — 1999. — 190, N 3. — P. 341–354.

5. Schwarz R.E., Schwarz M.A. In vivo therapy of local tumour progression by targeting vascular endothelium with EMAP II // *J. Surg. Res.* — 2004. — 120. — P. 64–72.

6. Schwarz R.E., Awasthi N., Konduri S., Cafasso D., Schwarz M.A. EMAP II-based antiangiogenic-antiendothelial in vivo combination therapy of pancreatic cancer. // *Am. Surg. Oncol.* — 2010. — 17.— P. 1442–1452.

7. Reznikov A.G., Chaykovskaya L.V., Polyakova L.I., Kornelyuk A.I. Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model // *Exper. Oncol.* — 2007. — 29, N 4. — P. 267–271.

8. Возианов А.Ф., Резников А.Г., Корнелюк А.И., Романенко А.М., Чайковская Л.В., Полякова Л.И., Григоренко В.Н. Влияние препаратов рекомбинантного белка ЕМАР II на рост, гистологические и гистохимические характеристики гетеротрансплантантов рака простаты человека // *Короткі повідомлення.* — 2008. — Т. 14, № 4. — С. 719–729.

9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984, — 479 с.

10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* — 1970. — 277. — № 259. — P. 680–685.

11. Kornelyuk A.I., Tas M.P., Dubrovsky A.L., Murray J.C. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // *Биополимери і клітка.* — 1999. — 15, № 2. — P. 168–172.

12. Славченко И.В., Борейко Е.В. Фенотипическое проявление особенностей метаболизма клеток *Escherichia coli* BL 21(DE3) при выращивании на средах, содержащих разные источники углерода // *Биополимери і клітина.* — 2002. — Т. 18. — № 3. — С. 232–236.

13. Studier F.W., Moffatt B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // *J. Mol. Biol.* — 1986. — 189D, № 1. — P. 113–130.

Л.А. Бабенко^{1,2}, А.Ю. Скоробогатов², А.Л. Дубровский¹, А.И. Корнелюк¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

² Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64, Киев, 01601, Украина, e-mail: babenko_lesia@ukr.net

ОПТИМИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЦИТОКИНА ЕМАР II В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI BL21 (DE3) PLYSE*

Реферат

ЕМАР II (эндотелиальный и моноцитактивирующий полипептид II) — новый провоспалительный антиангиогенный цитокин, проявляющий противоопухолевое действие. С целью разработки генно-инженерной технологии получения ЕМАР II проведена оптимизация условий бактериальной экспрессии клонированного в составе вектора рЕТ30а гена, кодирующего ЕМАР II. Исследовано влияние концентрации индуктора синтеза ИПТГ целевого белка на его конечный выход, установлено оптимальное время культивирования бактериальной культуры до и после добавления индуктора. Предложено схему культивирования культуры *E. coli BL21 (DE3) pLysE* для достижения высокого уровня выхода рекомбинантного цитокина ЕМАР II на уровне 110 мг с 1 л бактериальной культуры.

К л ю ч е в ы е с л о в а : ЕМАР II, бактериальная система экспрессии, оптимизация экспрессии, противоопухолевый цитокин.

L.A. Babenko^{1,2}, A.Iu. Skorobogatov², A.L. Dubrovsky¹, O.I. Kornelyuk¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics, NASU, 150, Zabolotny str.,
Kyiv, 03143, Ukraine

²National Taras Shevchenko University of Kyiv, Ukraine,
e-mail: babenko_lesia@ukr.net

BACTERIAL EXPRESSION OPTIMISATION OF ANTITUMOR CYTOKINE EMAR II IN *ESCHERICHIA COLI* *BL21 (DE3) PLYSE* CELLS

Summary

EMAR II (Endothelial Monocyte-Activating Polypeptide) — a new anti-angiogenic proinflammatory cytokine that exhibits antitumor activity. In order to develop genetically engineered technology for EMAR II optimization



of bacterial expression conditions within pET30a vector encoded EMAP II was carried out. Both the influence of target protein synthesis inductor IPTG concentration on its overall yield and optimal bacterial cultivation time before and after inductor addition were estimated. There was a proposed scheme for the cultivation of culture *E. coli* BL21(DE3)pLysE to achieve high yield of recombinant cytokine EMAP II at the level of 110 mg from 1 liter of bacterial culture.

Key words: EMAP II, bacterial expression system, expression optimization, antitumor cytokine.

