

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.112.083
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-1-7-17>

Поступила в редакцию 05.06.2018
Received 05.06.2018

А. В. Жидецкий, М. И. Потапович, И. В. Кудина, В. А. Прокулевич, М. В. Шолух

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

УСЛОВИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО БЫЧЬЕГО АЛЬФА-ИНТЕРФЕРОНА ИЗ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ *E. COLI*

Аннотация. Эффективность рекомбинантного бычьего альфа-интерферона (rbIFN- α), как и других белков данной группы, обусловлена тем, что при проведении противовирусной терапии он стимулирует и модулирует противовирусную активность ряда клеток-мишеней в ответ на вирусную атаку.

Данное исследование посвящено определению оптимальных условий выделения, очистки и рефолдинга методом разведения rbIFN- α из телец включения (ТВ) *E. coli*. Основными методами являлись спектрофотометрические, электрофоретические, хроматографические и рефолдинг методом разведения.

Двухстадийная отмывка ТВ растворами на основе 50 ммоль/л Трис, 50 ммоль/л NaCl и 3,5 моль/л мочевины и их последующая солюбилизация в растворе с 50 ммоль/л Трис-HCl, pH 9,0, 8 моль/л мочевины и 20 ммоль/л β -меркаптоэтанола позволили получить целевой белок в мономерной форме с чистотой $53,18 \pm 9,3$ %. Применение тандемной ионообменной хроматографии на последовательно соединенных колонках с DE 52 целлюлозой и тоуоперл DEAE-650 M дало возможность получить целевой rbIFN- α с чистотой $80,7 \pm 8,6$ %. В результате скрининга основных характеристик определен следующий состав рефолдинга буфера для проведения ренатурации рекомбинантного rbIFN- α : 10 ммоль/л NaPB, pH 7,4, 0,4 моль/л сахараза, 1 ммоль/л ЭДТА, 1 ммоль/л L-Цис, 0,1 ммоль/л L-цистина, 0,05 % Kolliphor EL. На конечном этапе сбора целевого белка с помощью данной системы выход мономерной формы rbIFN- α составил $20,44 \pm 1,1$ %, чистота – 98,43 %, активность – $(5 \pm 3,6) \cdot 10^6$ МЕ/мг.

Ключевые слова: рекомбинантный бычий α -интерферон, рефолдинг белка, тельца включения, агрегация белков

Для цитирования: Условия выделения рекомбинантного бычьего альфа-интерферона из телец включения *E. coli* / А. В. Жидецкий [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 1. – С. 7–17. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-1-7-17>

A. V. Zhydzetski, M. I. Patapovich, I. V. Kudina, U. A. Prakulevich, M. V. Sholukh

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

SELECTION CONDITIONS OF THE RECOMBINANT BOVINE α -INTERFERON FROM *E. COLI* INCLUSION BODIES

Abstract. Like other proteins of the cytokine family, bovine α -interferon activates and modulates antiviral state of the target cells and inhibits division and growth of the infected cells which makes it an excellent candidate as a new antiviral therapeutic agent.

This study is concerned with the determination of the optimal isolation, purification and refolding conditions of the recombinant bovine interferon- α (rbIFN- α) from inclusion bodies (IBs). Main methods used were UV/Visible spectroscopy, electrophoresis, liquid chromatography and refolding by dilution.

It was found that two step IBs washing with solutions containing 50 mmol/l Tris, 50 mmol/l NaCl and 3.5 mol/l urea and their subsequent solubilization in 50 mmol/l Tris-HCl, pH 9.8 mol/l Urea and 20 mmol/l β -mercaptoethanol allow us to receive the target protein in monomeric form and 53.18 ± 9.3 % purity. Further application of the anion-exchange tandem chromatography on DE 52 cellulose and toyopearl DEAE-650 M gives a possibility to remove the major impurities and obtain rbIFN- α with 80.7 ± 8.6 % purity. Refolding by dilution in the buffer containing 20 mmol/l NaPB, pH 7.4, 0.4 mol/l sucrose, 1 mmol/l L-Cys, 0.1 mmol/l L-Cystine, 1 mmol/l EDTA, 0.05 % Kolliphor EL at 10 °C followed by the protein collection allows to get the recombinant rbIFN- α in homogeneous state, with 98.43 % purity and antiviral activity about $(5 \pm 3.6) \cdot 10^6$ U/mg.

Keywords: recombinant bovine interferon- α , protein refolding, inclusion bodies, protein aggregation

For citation: Zhydzetski A. V., Patapovich M. I., Kudina I. V., Prakulevich U. A., Sholukh M. V. Selection conditions of the recombinant bovine α -interferon from *E. coli* inclusion bodies. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 1, pp. 7–17 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-1-7-17>

Введение. Бычий альфа-интерферон (rbIFN- α) принадлежит к группе белков, продуцируемых клетками большинства позвоночных в ответ на воздействие вирусов либо агентов иной этиологии. Интерфероны стимулируют противовирусное состояние ряда клеток-мишеней, в част-

ности регулируют активность Т- и В-лимфоцитов, натуральных киллеров, макрофагов и других клеток, вовлеченных в иммунный ответ, а также рост раковых и других пролиферирующих клеток [1–3].

Противовирусные и иммуномодулирующие свойства $gbIFN-\alpha$, а также тот факт, что данный белок предупреждает развитие ряда болезней при превентивном применении, позволяют рассматривать его в качестве противовирусного профилактического и терапевтического средства [4]. Это в свою очередь требует наличия методики получения необходимого белка в достаточных количествах, что может быть достигнуто генно-инженерным путем с накоплением рекомбинантного белка [5]. Однако зачастую такое накопление целевого продукта в клетках хозяина идет в неактивной форме в виде нерастворимых телец включения (ТВ) [6]. В настоящее время из ТВ выделяют человеческие $IFN-\gamma$, $IFN-\alpha 8$, $IFN-\alpha_{2b}$ и другие интерфероны [7–9].

Однако производство из ТВ нативных препаратов белков, в том числе и интерферонов, обладающих биологической активностью, требует разработки индивидуального подхода к их выделению, очистке и рефолдингу [10]. Несмотря на то что в настоящее время существует целый ряд методических подходов к рефолдингу рекомбинантных белков, до сих пор нет универсального, позволяющего получить любой белок в активной форме. Это связано с индивидуальными характеристиками белковой молекулы, что требует для каждого конкретного белка проведения скрининга основных условий ренатурации (значения pH, температуры, окислительно-восстановительного потенциала, типа стабилизатора) [10, 11]. В связи с этим представляется весьма эффективным и экономически выгодным разработать подход, с помощью которого можно проверить большое количество условий выделения, очистки и рефолдинга различных рекомбинантных белков.

Цель настоящей работы – апробация метода выделения, очистки и рефолдинга методом разведения $gbIFN-\alpha$ из телец включения *E. coli*, который был успешно применен нами ранее при получении рекомбинантного эфрина-A5 [12].

Объекты и методы исследования. *Отмывка телец включения.* Объектом исследования послужил рекомбинантный бычий интерферон- α из ТВ. Последние выделяли из *E. coli* с помощью описанного нами ранее метода [12]. Для определения наиболее эффективной системы отмывки ТВ от примесей проводили в два этапа. На первом использовали растворы на основе 50 и 500 ммоль/л Трис, 50 и 500 ммоль/л NaCl, 1 % изопропанола и 1 % Tween-20, на втором – растворы на основе 50 ммоль/л Трис в 1–8 моль/л мочеvine. ТВ суспендировали в растворе для отмывки в соотношении 1:20 (вес/объем), перемешивали на магнитной мешалке в течение 1 ч и центрифугировали при 15 000 g в течение 20 мин при 20 °C. Эффективность систем отмывки контролировали методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), проверяя белковый состав в осадке и супернатанте. Потери материала при отмывке регистрировали спектрофотометрически.

Солюбилизация телец включения. Отмытые ТВ растворяли в 50 ммоль/л Трис-HCl буфере (pH 8,0 или pH 9,0) с добавлением или без добавления β -меркаптоэтанола (ВМЕ) и в мочеvine (концентрация 6 и 8 моль/л) в течение 20–24 ч. После растворения ТВ полученный раствор центрифугировали 20 мин при 15 000 g и 20 °C. Оптимальную систему солюбилизации определяли электрофоретически по наличию мономерной формы белка и его максимальному выходу из ТВ.

Очистка $gbIFN-\alpha$ методом ионообменной хроматографии. Очистку интерферона проводили на CM-сефарозе (Amersham, Швеция) и DE 52 целлюлозе (Whatman, Великобритания). Колонки предварительно уравнивали буфером А (50 ммоль/л Трис-HCl, pH 9,0, 8 моль/л мочеvine, 10 ммоль/л ВМЕ), после чего наносили солюбилизат ТВ и промывали тем же буфером до достижения базовой линии при 280 нм. Не связавшуюся с сорбентом фракцию и фракцию, элюированную буфером А с 1 моль/л NaCl, анализировали спектрофотометрически и электрофоретически.

Рефолдинг. Условия ренатурации $gbIFN-\alpha$ методом разведения определяли на очищенном солюбилизате после проведения тандемной хроматографии на DE 52 целлюлозе и toyopearl DEAE-650 M (Tosoh, Япония). Для скрининга систем рефолдинга использовали следующие буферные агенты: MES, Трис-HCl, HEPES, MOPS, NaPB (натрий-фосфатный буфер) при pH 7,4 и антиагрегационные соединения: D-глюкозу, D-фруктозу, D-сахарозу, глицерол, ПЭГ-3000 (полиэти-

ленгликоль с M_r 3000), ПЭГ-6000 (M_r 6000), поливинилпирролидон (ПВП), Kolliphor EL (BASF, Германия), L-глицин и мочевины при температуре 10 °С. Для создания окислительно-восстановительного потенциала ренатурирующего буфера использовали пару цистин/цистеин с различным соотношением ее компонентов. Проанализировано действие 19 составов рефолдинг-буфера и проведено их сравнение по антиагрегационной эффективности, наличию целевого продукта в мономерной форме с максимальной противовирусной активностью.

Определение противовирусной активности. Противовирусную активность рекомбинантного гbIFN- α проверяли на культуре клеток MDBK, подвергнутых воздействию вируса везикулярного стоматита (VSV) согласно [13] с изменениями. В качестве контроля активности препаратов интерферона использовали рекомбинантный свиной α -интерферон со специфической активностью $1 \cdot 10^6$ МЕ/мл (Biomedical Laboratories, США).

SDS-электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Эффективность экстракции гbIFN- α из ТВ, чистоту белковых фракций и содержание мономерной формы целевого белка оценивали методом SDS-электрофореза в 15 %-ном полиакриламидном геле [14]. Окраску гелей проводили красителем Кумасси ярко-синим R-250 [15] либо серебром по методу Damerval с соавт. [16]. В работе использовали маркер молекулярных масс белков BlueElf 5-245 kDa (JenaBioscience). Степень чистоты оценивали с помощью программы TotalLab 2.01.

УФ-видимая спектроскопия. Концентрацию общего белка оценивали по методу Лоури в модификации Петерсона [17], агрегатное состояние белка – по светорассеиванию при 340 нм через 1 и 12 ч после инициации ренатурации [5, 10]. Степень экстракции гbIFN- α и примесных соединений при выборе состава растворов для отмывки и сольюбилизации ТВ определяли спектрофотометрически в диапазоне длин волн от 200 до 600 нм.

Результаты и их обсуждение. Получение рекомбинантного белка в активной форме из ТВ включало следующие этапы: сольюбилизацию ТВ растворами с высокими концентрациями сильных денатурантов (6–8 моль/л мочевины, 6 моль/л гуанидингидрохлорида), очистку целевого белка от примесных соединений и его рефолдинг [18].

Важным этапом в работе с ТВ является их подготовка к экстракции целевого продукта (сольюбилизации). Для этого проводят предварительную отмывку буферами, содержащими хаотропные агенты (0,5–2 моль/л гуанидин гидрохлорид или 1–4 моль/л мочевины) или детергенты (третон X-100, Tween-20, (дезоксид)холат натрия, саркозил, октилглюкозид) в низких концентрациях и солевых растворов [19, 20]. Такой этап необходим для удаления небелковых примесных соединений, в основном нуклеиновых кислот (НК) и липидных компонентов мембраны, а также клеточных белков, попадающих в ТВ, так как показано, что они снижают выход рефолдинга целевого продукта [18, 21]. Вместе с тем при выборе компонентов растворов для отмывки ТВ необходимо учитывать их влияние на сольюбилизацию ТВ, возможность необратимого взаимодействия с целевым белком, а также их стоимость [22].

В связи с этим для выбора условий наиболее эффективного удаления примесей на этапе отмывки ТВ нами проведен скрининг различных композиций растворов. На первом этапе работы были использованы растворы на основе NaCl, Трис, Tween-20, изопропанола в различных концентрациях.

На основании электрофореза в ПААГ (рис. 1) и данных УФ-видимой спектроскопии (результаты не приведены) установлено, что наибольшему и практически равному удалению примесных соединений без потери целевого белка способствуют растворы на основе 50 и 500 ммоль/л Трис и раствор с 500 ммоль/л NaCl, т. е. щелочное значение pH в комбинации с высокой ионной силой. Следует отметить, что балластные соединения переходят в раствор непосредственно после добавления отмывочных систем. Их выход не зависит от продолжительности инкубации ТВ в данных растворах. Это значит, что однократной промывки ТВ достаточно для удаления слабо ассоциированных с ними примесей. На основании данных спектрометрии можно заключить, что они имели нуклеиновую природу, так как максимальное поглощение растворов после отмывки ТВ отмечалось при длине волны 260 нм, свойственной для данных соединений (рис. 2) [23].

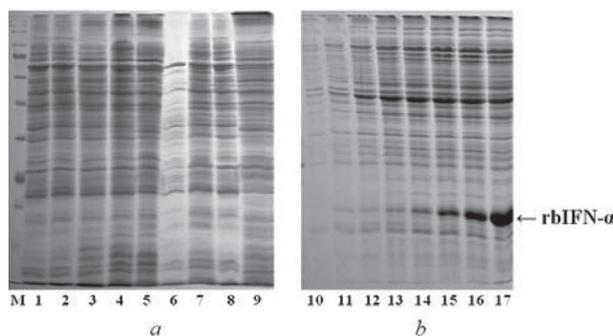


Рис. 1. Влияние состава среды на удаление белковой фракции на первом (а) и втором (б) этапе отмытки ТВ рекомбинантного *rbIFN-α*: 1 – H₂O; 2 – 0,5 моль/л NaCl; 3 – 0,5 моль/л NaCl; 4 – 0,05 моль/л Трис; 5 – 0,5 моль/л Трис; 6 – 1 % Tween-20; 7 – 1 % Triton X-100; 8 – 1 % изопропанол; 9 – 0,5 моль/л NaCl + 0,5 моль/л Трис + 1 % Tween-20 + 1 % изопропанол + 1 % Triton X-100; 10 – 0,05 моль/л Трис; 11 – 1 моль/л мочевины; 12 – 2 моль/л мочевины; 13 – 3 моль/л мочевины; 14 – 4 моль/л мочевины; 15 – 5 моль/л мочевины; 16 – 6 моль/л мочевины; 17 – 8 моль/л мочевины; М – маркер молекулярных масс белков BlueElf 5-245 kDa (JenaBioscience). 15 % SDS-ЭФ в редуцирующих условиях, окраска СВВ R-250

Fig. 1. Influence of the solution composition on protein fraction removal at the first (a) and second (b) stage of the recombinant *rbIFN-α* IBs washing: 1 – H₂O; 2 – 0.05 mol/l NaCl; 3 – 0.5 mol/l NaCl; 4 – 0.05 mol/l Tris; 5 – 0.5 mol/l Tris; 6 – 1 % Tween-20; 7 – 1 % Triton X-100; 8 – 1 % isopropanol; 9 – 0.5 mol/l NaCl + 0.5 mol/l Tris + 1 % Tween-20 + 1 % isopropanol + 1 % Triton X-100; 10 – 0.05 mol/l Tris; 11 – 1 mol/l urea; 12 – 2 mol/l urea; 13 – 3 mol/l urea; 14 – 4 mol/l urea; 15 – 5 mol/l urea; 16 – 6 mol/l urea; 17 – 8 mol/l urea; M – protein molecular weight marker BlueElf 5-245 kDa (JenaBioscience). 15 % SDS-PAGE in reducing conditions, CBB R-250 staining

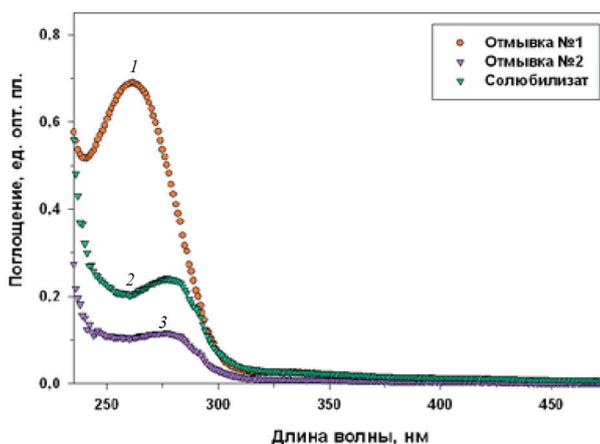


Рис. 2. Спектры поглощения образцов после отмытки и солюбилизации ТВ: 1 – супернатант после отмытки ТВ на первом этапе ($\lambda_{\max} = 260$ нм); 2 – солюбилизат ТВ ($\lambda_{\max} = 278$ нм); 3 – супернатант после отмытки ТВ на втором этапе ($\lambda_{\max} = 277$ нм)

Fig. 2. Absorbance spectra of the samples after IBs washing and solubilization: 1 – supernatant after IBs washing at the first stage ($\lambda_{\max} = 260$ nm); 2 – solubilizate of IBs ($\lambda_{\max} = 278$ nm); 3 – supernatant after IBs washing at the second stage ($\lambda_{\max} = 277$ nm)

Для удаления соединений, которые располагаются глубже в ТВ и сильнее связаны с целевым белком, применяют растворы на основе денатурантов [19, 20]. В связи с этим на втором этапе отмытки ТВ нами использованы растворы на основе мочевины.

Установлено, что с увеличением концентрации мочевины до 8 моль/л нарастает потеря массы ТВ. Причем соединения, переходящие в раствор, имеют в основном белковую природу. Заметный выход *rbIFN-α* из ТВ начинается лишь при концентрации мочевины 4 моль/л и достигает максимума при 8 моль/л (рис. 1, б).

В результате для наиболее эффективной отмытки ТВ от примесных соединений с наименьшими потерями целевого белка были выбраны следующие системы: на первой стадии – 50 ммоль/л Трис, 50 ммоль/л NaCl, на второй стадии – 50 ммоль/л Трис, 50 ммоль/л NaCl и 3,5 моль/л мочевины. Чистота *rbIFN-α* в солюбилизате отмытых ТВ составила $53,18 \pm 9,3$ %,

в то время как при растворении не отмытых ТВ целевого белка – лишь $33,29 \pm 2,08$ %. Выход отмытых ТВ *rbIFN- α* составил 40 ± 10 % от массы исходных телец.

На следующем этапе работы для оптимизации условий солюбилизации ТВ использовали системы на основе 50 ммоль/л Трис-НСl с 6 и 8 моль/л мочевины, при рН 8,0 и рН 9,0 с и без добавления ВМЕ. Установлено, что все системы на основе 6 и 8 моль/л мочевины не приводят к полному растворению ТВ, а соответственно, и к извлечению целевого продукта. Наибольшее количество и выход мономерной формы целевого белка на основании данных электрофореза в ПААГ и спектрофотометрии обнаружено в растворе с 8 моль/л мочевины (рН 9,0) с добавлением 20 ммоль/л ВМЕ. Данный агент необходим для восстановления меж- и внутримолекулярных дисульфидных связей [20]. В результате анализа 8 систем солюбилизации ТВ с бычьим α -ИФН был выбран раствор, включающий 50 ммоль/л Трис-НСl, рН 9, 8 моль/л мочевины, 20 ммоль/л ВМЕ.

Следующий этап заключался в очистке целевого продукта из солюбилизата ТВ с применением ионообменной хроматографии. Данный этап необходим для избавления от примесей, не удаленных на стадии отмытки, которые, как уже отмечалось, существенно снижают эффективность дальнейшего процесса рефолдинга [22, 24].

В связи с тем, что в условиях солюбилизации (рН 9,0) целевой белок должен нести хоть и незначительный, но отрицательный заряд (рI 8,4), было решено использовать катионообменную хроматографию на CM- и SP-сефарозе для связывания целевого белка и последующую градиентную элюцию для возможности его очистки. Однако данный подход не дал результатов. Во-первых, большая часть целевого белка оказалась во фракции, не связавшейся с сорбентом. Во-вторых, не удалось добиться очистки связавшегося белка, что видно из результатов ЭФ (рис. 3). Это может быть обусловлено незначительной разницей между рН раствора и рI, а также изменением изоэлектрической точки белка вследствие разворачивания молекулы в растворе мочевины [25, 26].

В связи с этим было решено проверить эффективность анионообменной хроматографии на DE-целлюлозе и *toyopearl* DEAE-650 M. В условиях солюбилизации при рН 9,0 весь белковый пул, который помимо целевого белка содержит и множество клеточных белков, должен нести отрицательный заряд. На DE-целлюлозе происходит очистка целевого продукта от хромофорных соединений, НК, липополисахаридов и части примесных белков. На колонке с DEAE-650 M происходит доочистка целевого продукта от остатков НК, значительной части примесных белков и агрегатов целевого продукта (подтверждено спектрофотометрически и ЭФ, результаты не приведены). Целевой же белок не связывается с сорбентом и остается в не связавшейся фракции. Поэтому для более эффективной очистки целевого белка было решено провести тандемную хроматографию на двух DE ионообменниках (DE 52 целлюлоза → *toyopearl* DEAE-650 M), результаты которой представлены на рис. 4. Различное поведение анионообменных сорбентов при одинаковых условиях может быть связано с отличием химической структуры их матрицы, а следовательно, и физико-химических свойств.

Полученные данные, как и результаты катионообменной хроматографии на CM-сефарозе, можно объяснить изменением рI молекулы в растворе мочевины из-за экспонирования скрытых в нативной структуре функциональных групп. Таким образом, скорее всего, изоэлектрическая точка смещается в сторону более щелочного значения, что придает молекулам интерферона положительный заряд при рН 9,0. Это в свою очередь объясняет взаимодействие с отрицательно заряженными функциональными группами CM-сефарозы и отталкивание от групп DE-сорбентов, несущих положительный заряд. Повышение рН солюби-

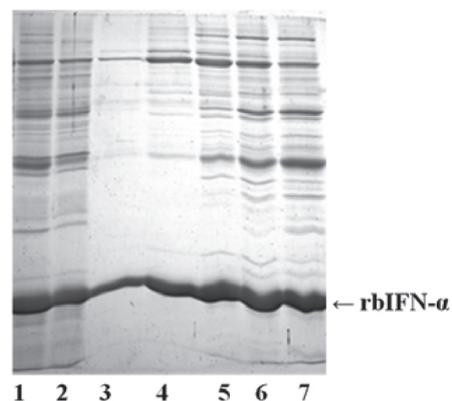


Рис. 3. Анализ очистки *rbIFN- α* на CM-сефарозе: 1 – солюбилизат ТВ; 2 – не связавшаяся с CM-сефарозой фракция; 3–7 – фракции элюции с CM сефарозы. 15 % SDS-ЭФ в редуцирующих условиях, окраска CBB R-250

Fig. 3. Purification analysis of the *rbIFN- α* on CM-sepharose: 1 – solubilize of IBs; 2 – CM sepharose flow-through fraction; 3–7 – CM sepharose elution fractions. 15 % SDS-PAGE in reducing conditions, CBB R-250 staining

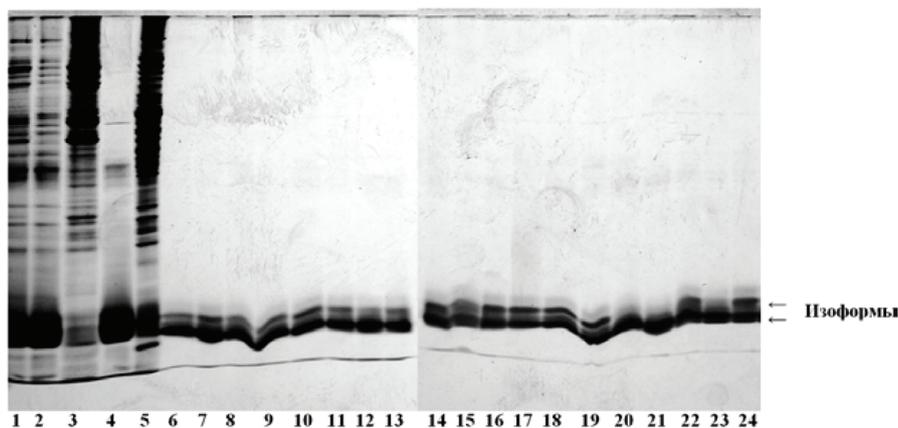


Рис. 4. Скрининг компонентного состава рефолдинг-буфера для рекомбинантного rIFN- α : 1 – солюбилизиат ТВ; 2 – фракция, не связавшаяся с DE 52 целлюлозой; 3 – фракция элюции с DE 52 целлюлозы; 4 – фракция, не связавшаяся с DEAE-650 M; 5 – фракция элюции с DEAE-650 M; 6 – 10 ммоль/л NaPB; 7 – 10 ммоль/л HEPES; 8 – 10 ммоль/л MES; 9 – 10 ммоль/л MOPS; 10 – 10 ммоль/л Tris; 11 – 0,4 моль/л D-глюкоза; 12 – 0,1 моль/л D-фруктозы; 13 – 0,4 ммоль/л глицерола; 14 – 0,1 % ПЭГ-3000; 15 – 0,1 % ПЭГ-6000; 16 – 0,1 % ПВП; 17 – 0,1 % Kolliphor EL; 18 – 0,5 моль/л L-Гли; 19 – 0,5 моль/л мочевины; 20 – 0,1 ммоль/л L-Цис, 0,1 ммоль/л L-цистина; 21 – 0,5 ммоль/л L-Цис, 0,5 ммоль/л L-цистина; 22 – 1 ммоль/л L-Цис, 1 ммоль/л L-цистина; 23 – 1 ммоль/л L-Цис, 0,1 ммоль/л L-цистина; 24 – 5 ммоль/л L-Цис, 0,5 ммоль/л L-цистина. 15 % SDS-ЭФ в редуцирующих условиях, окраска серебром. Рефолдинг системы (номера соответствуют номерам дорожки на геле): 6–10 – pH 7,4, 0,4 моль/л сахарозы, 1 ммоль/л ЭДТА, 4 ммоль/л L-Цис/0,4 ммоль/л L-цистина; 11–19 – 10 ммоль/л NaPB, pH 7,4, 1 ммоль/л ЭДТА, 4 ммоль/л L-Цис, 0,4 ммоль/л L-цистина; 20–24 – 10 ммоль/л NaPB, pH 7,4, 1 ммоль/л ЭДТА, 0,4 моль/л сахарозы

Fig. 4. Screening of the refolding buffer composition for the recombinant rIFN- α : 1 – solubilizate of IBs; 2 – DE 52 cellulose flow-through fraction; 3 – DE 52 cellulose elution fractions; 4 – DEAE-650 M flow-through fraction; 5 – DEAE-650 M elution fractions; 6 – 10 mmol/l NaPB; 7 – 10 mmol/l HEPES; 8 – 10 mmol/l MES; 9 – 10 mmol/l MOPS; 10 – 10 mmol/l Tris; 11 – 0.4 mol/l D-glucose; 12 – 0.1 mol/l D-fructose; 13 – 0.4 mol/l glycerol; 14 – 0.1 % PEG-3000; 15 – 0.1 % PEG-6000; 16 – 0.1 % PVP; 17 – 0.1 % Kolliphor EL; 18 – 0.5 mol/l L-Gly; 19 – 0.5 mol/l urea; 20 – 0.1 mmol/l L-Cys, 0.1 mmol/l L-cystine; 21 – 0.5 mmol/l L-Cys, 0.5 mmol/l L-cystine; 22 – 1 mmol/l L-Cys, 1 mmol/l L-cystine; 23 – 1 mmol/l L-Cys, 0.1 mmol/l L-cystine; 24 – 5 mmol/l L-Cys, 0.5 mmol/l L-cystine. 15 % SDS-PAGE in reducing conditions, Ag staining. Refolding systems (number corresponds to the gel line number (N)) included: 6–10 – pH 7.4, 0.4 mol/l sukrose, 1 mmol/l EDTA, 4 mmol/l L-Cys, 0.4 mmol/l L-cystine; 11–19 – 10 mmol/l NaPB, pH 7.4, 1 mmol/l EDTA, 4 mmol/l L-Cys, 0.4 mmol/l L-cystine; 20–24 – 10 mmol/l NaPB, pH 7.4, 1 mmol/l EDTA, 0.4 mol/l sukrose

лизирующего буфера до 10,0 приводит к полному связыванию молекул rIFN- α и примесных белков с матрицей DE-сорбентов, т. е. молекулы белка приобретают отрицательный заряд.

Чистота бычьего IFN- α в солюбилизиате отмытых ТВ составляет $53,18 \pm 9,3$ %, а после проведения ИОХ на DE-целлюлозе и toyopearl DEAE-650 M – $64,08 \pm 13,64$ и $80,7 \pm 8,6$ % соответственно. Данные об увеличении степени очистки приведены на рис. 4. Достигнутой чистоты целевого продукта достаточно для подбора условий его ренатурации [18].

На заключительном этапе проводили скрининг условий рефолдинга рекомбинантного rIFN- α методом разведения. Для этого был использован образец после тандемной очистки с концентрацией белка 1,1 мг/мл. Лучшей системой рефолдинга являлась система с наименьшей мутностью (степенью агрегации), в которой белок присутствовал в мономерной форме и обладал противовирусной активностью.

Как уже отмечалось, каждый рекомбинантный белок, будучи накоплен в неактивном виде, требует определенных условий для рефолдинга [27]. Нами был выбран рефолдинг методом разведения в силу ряда его преимуществ по сравнению с другими методами. Во-первых, можно объективно установить оптимальные параметры рефолдинг буфера, во-вторых, это самый быстрый и простой в технологическом плане подход [28].

Разведение при рефолдинге проводили в 10 раз с конечной концентрацией белка 110 мкг/мл. Нами исследовано 19 ренатурирующих систем. На рис. 4 показаны результаты ЭФ-изучения влияния типа буферного агента, стабилизатора и соотношения элементов редокс-системы на выход rIFN- α в гомогенном состоянии.

Исходя из результатов электрофореза, тип буфера и исследованные соединения, такие как полиолы (глицерол, глюкоза, фруктоза), полимеры (ПЭГ, ПВП), Kolliphor EL и Гли в одинаковой степени проявляют антиагрегационное действие – во всех системах целевой белок присутствует в мономерной форме. Однако ренатурация интерферона проходит с образованием нескольких изоформ, видимых на геле. Образование двойных бэндов на геле определяется только соотношением окислитель-восстановительной пары цистеин/цистин. В мономерной форме белок присутствует в трех системах рефолдинга: № 20 – 0,1 ммоль/л L-Цис, 0,1 ммоль/л L-цистин; № 21 – 0,5 ммоль/л L-Цис, 0,5 ммоль/л L-цистин и № 23 – 1 ммоль/л L-Цис, 0,1 ммоль/л L-цистин, т. е. с низкой концентрацией окисленного партнера пары.

Для дальнейшего изучения влияния конечной концентрации белка и мочевины на процесс ренатурации использована система № 23 с 10 ммоль/л NaPB, pH 7,4, 0,4 моль/л сахарозой, 1 ммоль/л ЭДТА, 1 ммоль/л L-Цис, 0,1 ммоль/л L-цистина. Исходный образец разводили в 2, 3, 5 и 10 раз. Конечная концентрация белка составила 550; 367; 220 и 110 мкг/мл, мочевины – 2; 2,67; 1,6 и 0,8 моль/л. Сильное помутнение раствора и образование крупных агрегатов с дальнейшим выпадением в осадок наблюдалось в первых трех случаях. При разведении в 10 раз образец слегка мутнел. Хлопьеобразование (конечная стадия агрегации) начиналась и при разведении в 15 и 20 раз, что указывало на влияние концентрации мочевины на процесс ренатурации (антиагрегационный эффект при 0,8–1 моль/л). Это подтверждено с помощью флуоресцентной спектроскопии с зондом ANS (рис. 5). Суть метода основана на том, что при интеркаляции данного зонда в гидрофобные области молекулы белка происходит изменение флуоресцентных свойств ANS. Это значит, что при разворачивании молекулы белка под действием хаотропных агентов, таких как мочевина, число гидрофобных зон уменьшается, а следовательно, снижается интенсивность флуоресценции. Показано, что при добавлении мочевины в диапазоне концентраций от 0,5 до 1 моль/л к нативному белку не приводит к существенным изменениям в структуре, в то время как при концентрации мочевины свыше 1 моль/л происходит разворачивание молекулы. Наибольшая потеря конформации наблюдается при 8 моль/л мочевины (рис. 5). Причем разворачивание молекулы происходит постепенно при промежуточных концентрациях мочевины (2–5 моль/л), в то время как в растворе 6–8 моль/л мочевины молекула белка теряет третичную структуру практически полностью.

Применение Kolliphor EL при масштабировании процесса рефолдинга оказало положительный эффект, который проявил антиагрегационный эффект по сравнению с буфером без данного соединения. В итоге скрининга была выбрана система, содержащая 10 ммоль/л NaPB, pH 7,4, 0,4 моль/л сахарозу, 1 ммоль/л ЭДТА, 1 ммоль/л L-Цис, 0,1 ммоль/л L-цистина с добавлением 0,05 % Kolliphor EL и разведением в 10 раз при 10 °С. Выход рефолдинга составил $20,44 \pm 1,1$ % с активностью интерферона $(5 \pm 3,6) \cdot 10^6$ МЕ/мг. Однако с процессом масштабирования усилился и процесс агрегации (о чем можно судить по увеличению степени помутнения и выпадения белкового осадка, чего не наблюдалось на небольших, до 5 мл, объемах). В связи с этим было решено проверить увеличение степени разведения до 20 раз с целью предупреждения инициации образования агрегатов со снижением концентрации белка. Однако помутнение раствора и образование осадка остались без изменения, а выход целевого белка уменьшился до $8,56 \pm 2,9$ %, активность составила $2,25 \cdot 10^7$ МЕ/мг. Это еще раз подтверждает вывод о том, что в процессе рефолдинга значительную роль играет конечная остаточная концентрация мочевины, которая в концентрации 0,8–1 моль/л оказывает антиагрегационный эффект.

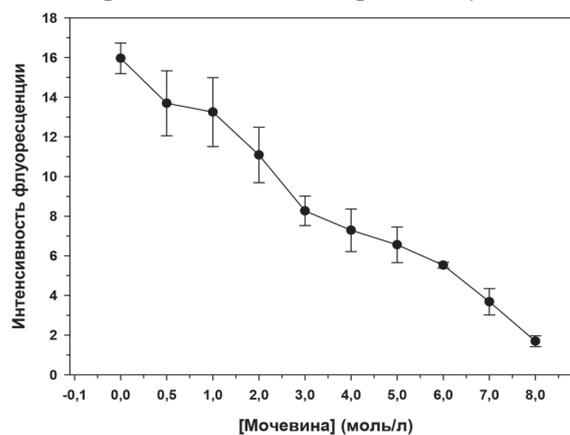


Рис. 5. Зависимость интенсивности флуоресценции rIFN-α от концентрации мочевины

Fig. 5. Dependence of the fluorescence intensity on urea concentration

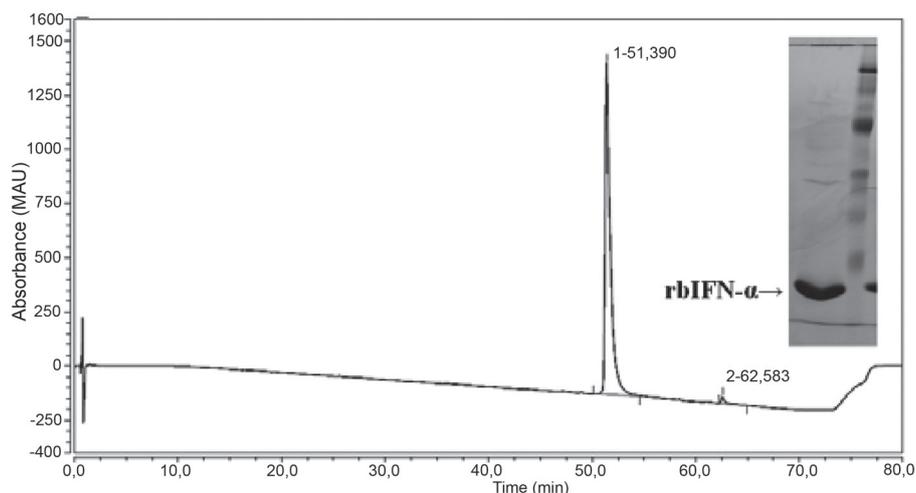


Рис. 6. Анализ чистоты конечного препарата ренатурированного rbIFN- α методом RP-HPLC на колонке Диасфер-110-С4. Во врезке представлен образец, использованный для анализа (окрашивание серебром)

Fig. 6. Purity analysis of the renatured rbIFN- α sample at the terminal stage with the help of RP-HPLC method on Diacpher-110-C4 column. Inset represents the protein sample used in analysis (Ag staining)

Проведя масштабирование выбранного метода рефолдинга и сбор целевого продукта, полученный препарат белка был подвергнут анализу для определения его гомогенности (рис. 6). Чистота конечного препарата рекомбинантного бычьего IFN- α , определенная методом RP-HPLC, составила 98,43 %.

Полученный препарат rbIFN- α обладает сопоставимой с аналогичными белками противовирусной активностью, достаточной чистотой и может быть использован для приготовления на его основе терапевтических средств.

Заключение. Данная работа посвящена определению оптимальных условий выделения, очистки и рефолдинга рекомбинантного rbIFN- α из ТВ. Установлено, что двухстадийная отмывка растворами на основе 50 ммоль/л Трис, 50 ммоль/л NaCl на первой стадии, 50 ммоль/л Трис, 50 ммоль/л NaCl и 3,5 моль/л мочевины на второй стадии позволяет избавиться от части балластных белков и НК с наименьшими потерями целевого продукта. Солюбилизация в растворе с 50 ммоль/л Трис-HCl, pH 9,0, 8 моль/л мочевиной, 20 ммоль/л ВМЕ позволяет наиболее полно экстрагировать целевой белок в мономерной форме из ТВ. Чистота бычьего IFN- α в солюбилизате отмытых ТВ составляет $53,18 \pm 9,3$ %. Тандемная хроматография на последовательно соединенных колонках с DE 52 целлюлозой и toyopearl DEAE-650 M дала возможность удалить остатки белков и НК и получить rbIFN- α с чистотой $80,7 \pm 8,6$ %, достаточной для рефолдинга. При скрининге условий ренатурации система, содержащая 10 ммоль/л NaPB, pH 7,4, 0,4 моль/л сахарозу, 1 ммоль/л ЭДТА, 1 ммоль/л L-Цис, 0,1 ммоль/л L-цистин с добавлением 0,05 % Kolliphor EL и разведением в 10 раз при 10 °C выбрана как наиболее эффективная. Выход мономерной формы rbIFN- α после рефолдинга составил $20,44 \pm 1,1$ %, активность – $(5 \pm 3,6) \cdot 10^6$ ME/мг, чистота – 98,43 %.

Благодарности. Данная работа выполнена в рамках договора № 289/57-М «Разработка технологии и организация производства субстанции и готовой формы адьюванта для конструирования вакцин крупного рогатого скота», подпрограмма «Малотоннажная биотехнология» ГП «Инновационные биотехнологии».

Acknowledgements. This research was funded by the State Program “Innovative biotechnologies” within the framework of the treaty no. 289/57-M “Development of the technology and production arrangement of the substance and adjuvant ready form for designing of cattle vaccines”, sub-program “Small capacity Biotechnology” State Enterprise “Innovative Biotechnologies”.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Capon, D. J. Two distinct families of human and bovine interferon-alpha genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides / D. J. Capon, H. M. Shepard, D. V. Goeddel // *Mol. Cell. Biol.* – 1985. – Vol. 5, N 4. – P. 768–779. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.4.768>
2. Stability of recombinant bovine interferon- γ antiviral activity in the absence of stabilizing additives / Q. Xu [et al.] // *Microbiol. Immunol.* – 2011. – Vol. 55, N 8. – P. 595–598. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00349.x>
3. Arora, D. Method for increasing the yield of properly folded recombinant human gamma interferon from inclusion bodies / D. Arora, N. Khanna // *J. Biotechnol.* – 1996. – Vol. 52, N 2. – P. 127–133. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(96\)01636-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(96)01636-7)
4. A slow release formulation for recombinant bovine interferon α I-1 / H. Hughes [et al.] // *Antiviral Res.* – 1994. – Vol. 23, N 1. – P. 33–44. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(94\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0166-3542(94)90031-0)
5. Rudolph, R. *In vitro* folding of inclusion body proteins / R. Rudolph, H. Lilie // *FASEB J.* – 1996. – Vol. 10. – N 1. – P. 49–56. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.1.8566547>
6. Guise, A. D. Protein folding in vivo and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies / A. D. Guise, S. M. West, J. B. Chaudhuri // *Mol. Biotechnol.* – 1996. – Vol. 6, N 1. – P. 53–64. <https://doi.org/10.1007/BF02762323>
7. Refolding, isolation and characterization of crystallizable human interferon- α 8 expressed in *Saccharomyces cerevisiae* / S. Di Marco [et al.] // *J. Biotechnol.* – 1996. – Vol. 50, N 1. – P. 63–73. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(96\)01550-7](https://doi.org/10.1016/0168-1656(96)01550-7)
8. Molecular characterization of recombinant human interferon alpha-2b produced in Cuba / H. Santana [et al.] // *Biotechnol. Appl.* – 1999. – Vol. 16, N 3. – P. 154–159.
9. Refolding and purification of interferon-gamma in industry by hydrophobic interaction chromatography / X. Geng [et al.] // *J. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 113, N 1–3. – P. 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.06.006>
10. Shin, H.-C. Protein folding, misfolding, and refolding of therapeutic proteins / H.-C. Shin // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* – 2001. – Vol. 6, N 4. – P. 237–243. <https://doi.org/10.1007/BF02931984>
11. Lilie, H. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli* / H. Lilie, E. Schwarz, R. Rudolph // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 9, N 5. – P. 497–501. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80035-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80035-9)
12. Оптимизация условий очистки и рефолдинга рекомбинантного эфрина-A5 из телец включения *Escherichia coli* / А. В. Жидецкий [и др.] // *Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология.* – 2017. – № 2. – С. 58–65.
13. Rubinstein, S. Convenient assay for interferons / S. Rubinstein, P. C. Familletti, S. Pestka // *J. Virol.* – 1981. – Vol. 37, N 2. – P. 755–758.
14. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, N 5259. – P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
15. Fairbanks, G. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane / G. Fairbanks, T. L. Steck, D. F. H. Wallach // *Biochemistry.* – 1971. – Vol. 10, N 13. – P. 2606–2617. <https://doi.org/10.1021/bi00789a030>
16. A simplification of Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins / C. Damerval [et al.] // *Electrophoresis.* – 1987. – Vol. 8, N 3. – P. 158–159. <https://doi.org/10.1002/elps.1150080308>
17. Peterson, G. L. Determination of total protein / G. L. Peterson // *Meth. Enzymol.* – 1983. – Vol. 91. – P. 95–119. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(83\)91014-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(83)91014-5)
18. Georgiou, G. Isolating inclusion bodies from bacteria / G. Georgiou, P. Valax // *Meth. Enzymol.* – 1999. – Vol. 309. – P. 48–58. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)09005-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)09005-9)
19. Clark, E. D. B. Refolding of recombinant proteins / E. D. B. Clark // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 9, N 2. – P. 157–163. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80109-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80109-2)
20. Misawa, S. Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies / S. Misawa, I. Kumagai // *Biopolymers (Peptide Sci.)*. – 1999. – Vol. 51, N 4. – P. 297–307. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0282\(1999\)51:4<297::aid-bip5>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0282(1999)51:4<297::aid-bip5>3.0.co;2-i)
21. Vallejo, L. F. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins / L. F. Vallejo, U. Rinas // *Microb. Cell Fact.* – 2004. – Vol. 3. – Art. 11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-11>
22. Middelberg, A. P. Preparative protein refolding / A. P. Middelberg // *Trends Biotechnol.* – 2002. – Vol. 20, N 10. – P. 437–443. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02047-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02047-4)
23. Porterfield, J. Z. A simple and general method for determining the protein and nucleic acid content of viruses by UV absorbance / J. Z. Porterfield, A. Zlotnick // *Virology.* – 2010. – Vol. 407, N 2. – P. 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.015>
24. Tran-Moseman, A. D. Renaturation of *Escherichia coli*-derived recombinant human macrophage colony-stimulating factor / A. D. Tran-Moseman, N. Schauer, E. de Bernardez Clark // *Protein Expression and Purification.* – 1999. – Vol. 16, N 1. – P. 181–189. <https://doi.org/10.1006/prep.1999.1074>
25. Salaman, M. R. Isoelectric focusing of proteins in the native and denatured states. Anomalous behaviour of plasma albumin / M. R. Salaman, A. R. Williamson // *Biochem. J.* – 1971. – Vol. 122, N 1. – P. 93–99. <https://doi.org/10.1042/bj1220093>
26. Carbamylation of proteins in 2-D electrophoresis myth or reality? / J. McCarthy [et al.] // *J. Proteome Res.* – 2003. – Vol. 2, N 3. – P. 239–242. <https://doi.org/10.1021/pr025564b>
27. Armstrong, N. A new protein folding screen: application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase / N. Armstrong, A. de Lencastre, E. Gouaux // *Protein Sci.* – 1999. – Vol. 8, N 7. – P. 1475–1483. <https://doi.org/10.1110/ps.8.7.1475>
28. Eiberle, M. K. Technical refolding of proteins: do we have freedom to operate? / M. K. Eiberle, A. Jungbauer // *Biotechnol. J.* – 2010. – Vol. 5, N 6. – P. 547–559. <https://doi.org/10.1002/biot.201000001>

References

1. Capon D. J., Shepard H. M., Goeddel D. V. Two distinct families of human and bovine interferon-alpha genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides. *Molecular and Cellular Biology*, 1985, vol. 5, no. 4, pp. 768–779. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.4.768>
2. Xu Q., Nomura T., Ikeda M., Ohta M., Kameyama K.-I., Konishi M., Wu D., Inumaru Sh., Murakami K. Stability of recombinant bovine interferon- γ antiviral activity in the absence of stabilizing additives. *Microbiology and Immunology*, 2011, vol. 55, no. 8, pp. 595–598. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00349.x>
3. Arora D., Khanna N. Method for increasing the yield of properly folded recombinant human gamma interferon from inclusion bodies. *Journal of Biotechnology*, 1996, vol. 52, no. 2, pp. 127–133. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(96\)01636-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(96)01636-7)
4. Hughes H. P. A., Rossow S., Campos M., Rossi-Campos A., Janssen S., Godson D. L., Daflon B., Voirol M. J., Gerber C., Babiuk L. A. A slow release formulation for recombinant bovine interferon α I-1. *Antiviral Research*, 1994, vol. 23, no. 1, pp. 33–44. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(94\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0166-3542(94)90031-0)
5. Rudolph R., Lilie, H. *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB Journal*, 1996, vol. 10, no. 1, pp. 49–56. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.1.8566547>
6. Guise A. D., West S. M., Chaudhuri J. B. Protein folding in vivo and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies. *Molecular Biotechnology*, 1996, vol. 6, no. 1, pp. 53–64. <https://doi.org/10.1007/BF02762323>
7. Di Marco S., Fendrich G., Meyhack B., Grütter M. G. Refolding, isolation and characterization of crystallizable human interferon- α 8 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 1996, vol. 50, no. 1, pp. 63–73. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(96\)01550-7](https://doi.org/10.1016/0168-1656(96)01550-7)
8. Santana H., Martínez E., Sánchez J. C., Moya G., Sosa R., Hardy E. [et al.] Molecular characterization of recombinant human interferon alpha-2b produced in Cuba. *Biotechnologia Aplicada*, 1999, vol. 16, no. 3, pp. 154–159.
9. Geng X., Bai Q., Zhang Y., Li X., Wu D. Refolding and purification of interferon-gamma in industry by hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Biotechnology*, 2004, vol. 113, no. 1–3, pp. 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.06.006>
10. Shin H.-C. Protein folding, misfolding, and refolding of therapeutic proteins. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2001, vol. 6, no. 4, pp. 237–243. <https://doi.org/10.1007/BF02931984>
11. Lilie H., Schwarz E., Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, vol. 9, no. 5, pp. 497–501. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80035-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80035-9)
12. Zhidetskii A. V., Sholukh M. V., Khanneman Yu. R., Khandrik R., Motylevich Zh. V., Khimanen Yu.-P. Optimizing purification and refolding conditions of the recombinant ephrin-A5 from inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Journal of Belarusian State University. Biology*. 2017, no. 2, pp. 58–65 (in Russian).
13. Rubinstein S., Familletti P. C., Pestka S. Convenient assay for interferons. *Journal of Virology*, 1981, vol. 37, no. 2, pp. 755–758.
14. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
15. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 1971, vol. 10, pp. 2606–2617. <https://doi.org/10.1021/bi00789a030>
16. Damerval C., le Guilloux M., Blaisonneau J., de Vienne D. A simplification of Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins. *Electrophoresis*, 1987, vol. 8, no. 3, pp. 158–159. <https://doi.org/10.1002/elps.1150080308>
17. Peterson G. L. Determination of total protein. *Methods in Enzymology*, 1983, vol. 91, pp. 95–119. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(83\)91014-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(83)91014-5)
18. Georgiou G., Valax P. Isolating inclusion bodies from bacteria. *Methods in Enzymology*, 1999, vol. 309, pp. 48–58. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)09005-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)09005-9)
19. Clark E. D. B. Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, vol. 9, no. 2, pp. 157–163. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80109-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80109-2)
20. Misawa S., & Kumagai I. Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers (Peptide Science)*, 1999, vol. 51, pp. 297–307. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0282\(1999\)51:4<297::aid-bip5>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0282(1999)51:4<297::aid-bip5>3.0.co;2-i)
21. Vallejo L. F., Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, 2004, vol. 3, art. 11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-11>
22. Middelberg A. P. Preparative protein refolding. *Trends in Biotechnology*, 2002, vol. 20, no. 10, pp. 437–443. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02047-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02047-4)
23. Porterfield J. Z., Zlotnick A. A simple and general method for determining the protein and nucleic acid content of viruses by UV absorbance. *Virology*, 2010, vol. 407, no. 2, pp. 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.015>
24. Tran-Moseman A. D., Schauer N., de Bernardez Clark E. Renaturation of *Escherichia coli*-derived recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Protein Expression and Purification*, 1999, vol. 16, no. 1, pp. 181–189. <https://doi.org/10.1006/prep.1999.1074>
25. Salaman M. R., Williamson A. R. Isoelectric focusing of proteins in the native and denatured states. Anomalous behaviour of plasma albumin. *Biochemical Journal*, 1971, vol. 122, no. 1, pp. 93–99. <https://doi.org/10.1042/bj1220093>
26. McCarthy J., Hopwood F., Oxley D., Laver M., Castagna A., Righetti P. G., Williams K., Herbert B. Carbamylation of proteins in 2-D electrophoresis myth or reality? *Journal of Proteome Research*, 2003, vol. 2, no. 3, pp. 239–242. <https://doi.org/10.1021/pr025564b>

27. Armstrong N., de Lencastre A., Gouaux E. A new protein folding screen: application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase. *Protein Science*, 1999, vol. 8, no. 7, pp. 1475–1483. <https://doi.org/10.1110/ps.8.7.1475>

28. Eiberle M. K., Jungbauer A. Technical refolding of proteins: do we have freedom to operate? *Biotechnology Journal*, 2010, vol. 5, no. 6, pp. 547–559. <https://doi.org/10.1002/biot.201000001>

Информация об авторах

Жидецкий Александр Вячеславович – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (ул. Курчатова, 10, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Zhydzetski@gmail.com

Потапович Максим Иосифович – заведующий лабораторией. Белорусский государственный университет (ул. Курчатова, 10, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mipatapovich@gmail.com

Кудина Ирина Владимировна – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (ул. Курчатова, 10, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Kuddya@gmail.com

Прокулевич Владимир Антонович – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный университет (ул. Курчатова, 10, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: prokulevich@mail.ru

Шолух Михаил Васильевич – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Белорусский государственный университет (ул. Курчатова, 10, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: msholukh@mail.ru

Information about the authors

Alexander V. Zhydzetski – Junior researcher. Belarusian State University (10, Kurchatov Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Zhydzetski@gmail.com

Maksim I. Patapovich – Head of the Laboratory. Belarusian State University (10, Kurchatov Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mipatapovich@gmail.com

Irina V. Kudina – Junior researcher. Belarusian State University (10, Kurchatov Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Kuddya@gmail.com

Uladzimir A. Prakulevich – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Belarusian State University (10, Kurchatov Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mipatapovich@gmail.com

Mikhail M. Sholukh – Ph. D. (Biol.), Assistant professor, Head of the Laboratory. Belarusian State University (10, Kurchatov Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: msholukh@mail.ru