

ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПРОТЕАЗЫ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ ИЗ КЛЕТОК *Escherichia coli*

Александр Владимирович РЯБЧЕНКО, Мария Владимировна КОТОВА,
Роман Александрович КНЯЗЕВ, Наталия Викторовна ТРИФОНОВА,
Лев Михайлович ПОЛЯКОВ

НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Каталитический домен белка ядерного включения вируса табачной мозаики TEVp используется для расщепления искусственных слитых полипептидов. Однако получение рекомбинантного фермента имеет определенные трудности из-за низкого выхода продукта и его малой растворимости в физиологических растворах. **Цель исследования** – оптимизация способов получения рекомбинантного фермента TEVp из клеток-продуцентов *Escherichia coli*. **Материал и методы.** Исследования выполняли на клетках *E. coli* штамм BL21(DE3), продуцентах рекомбинантной протеазы. Фермент синтезировался клетками в виде слитого полипептида с мальтозосвязывающим белком (MBP) с последующим саморасщеплением. Нарботку биомассы проводили при различных условиях: изменение температурного режима, времени инкубации клеток с индуктором (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид), концентрации индуктора и фазы роста культуры при добавлении индуктора. Фермент выделяли с помощью аффинной хроматографии в нативных условиях и с увеличенной концентрацией хлорида натрия, его активность проверяли на химерном рекомбинантном аполипопротеине А-I человека (~33,4 кДа). **Результаты их обсуждение.** Значительное влияние на конечный выход фермента оказывала фаза роста культуры при добавлении индуктора. Оптимальными условиями получения биомассы были найдены следующие: температура инкубации с индуктором 30 °С; время инкубации 4 ч; концентрация индуктора 200 мкМ; оптическая плотность при добавлении индуктора 2,0–2,5 о.е./мл (конец экспоненциальной фазы роста культуры клеток). Концентрация хлорида натрия в буферном растворе при выделении белка составила 150 мМ. Выход фермента в данных условиях достигал 50 мг/л культуры клеток. Во всех случаях полученный фермент сохранял свою активность. **Заключение.** На выход рекомбинантного фермента из клеток-продуцентов *E. coli* шт. BL21(DE3) в экспрессирующем векторе pD441-MBP под регуляцией гена бактериофагового промотора «T5» наибольшее влияние оказывает фаза роста культуры клеток в момент запуска экспрессии гена.

Ключевые слова: рекомбинантный белок, протеаза вируса табачной мозаики, *Escherichia coli*.

В генной инженерии широко используется прием слияния различных белков в виде химерных полипептидов с последующим их расщеплением. Для расщепления химеров используются специфичные и недорогие ферменты. Одним из таких ферментов является каталитический домен белка ядерного включения вируса табачной мозаики – TEVp (tobacco etch virus protease). Фермент представляет собой белок с молекулярной массой 29 кДа, полученный в рекомбинантной форме с сохранением ферментативной активности в клетках *Escherichia coli* [6]. Следует заметить, что получение рекомбинантного фермента имеет определенные трудности в виде низкого выхода продукта и его малой растворимости в физиологических

растворах. При сверхэкспрессии гена в клетках *E. coli* фермент накапливается в виде телец включения, что затрудняет его последующее извлечение из клеток в нативных условиях с сохранением каталитической активности [4, 5, 8]. В связи с этим исследователи используют различные приемы для увеличения растворимости фермента в цитоплазме клеток-продуцентов. В частности, опубликована работа, в которой авторы внесли мутации в структуру фермента с целью увеличения его накопления в цитоплазме [12]. Другим приемом является получение слитых полипептидов, в частности, известны работы по слиянию фермента с глутатион-S-трансферазой (GST), тиоредоксином [7], мальтозосвязывающим бел-

Рябченко А.В. – к.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail borrelia@mail.ru

Котова М.В. – младший научный сотрудник, e-mail zerokiri@mail.ru

Князев Р.А. – к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail Knjazev_roman@mail.ru

Трифорова Н.В. – младший научный сотрудник, e-mail nataliya-iverdohleb@yandex.ru

Поляков Л.М. – д.м.н., проф., зав. лабораторией медицинской биотехнологии, e-mail plm@niibch.ru

ком (MBP) [3], SUMO (small ubiquitin-related modifier) [13] и пептидом С9R [9]. Выбор приема получения рекомбинантного фермента обуславливает и оптимизацию способов получения биомассы и методов выделения белка. В связи с этим целью нашего исследования являлась оптимизация способов получения рекомбинантной протеазы вируса табачной мозаики из клеток *E. coli*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали полученные ранее клетки-продуценты слитого полипептида MBP-TEVp *E. coli* штамм BL21 (DE3) [1]. Ген химерного полипептида MBP-TEVp находился под контролем бактериофагового промотора «Т5» в плазмидном векторе pD441-MBP («ATUM», США). Для получения биомассы использовали стандартную культуральную среду LB (1 % триптона, 1 % хлорида натрия, 0,5 % дрожжевого экстракта, pH 7,0–7,4). Ночную культуру выращивали в 5 мл среды при 37 °С, на следующий день переносили в двухлитровую колбу с 500 мл свежей среды LB, содержащей 30 мкг/мл канамицина. Клетки выращивали при активном перемешивании и различных температурных режимах до необходимой оптической плотности D_{600} , добавляли индуктор изопропил-β-D-1-тиогиалактопиранозид (ИПТГ) и инкубировали 4 или 18 ч. По окончании инкубирования отбирали пробу для анализа в полиакриламидном геле (ПААГ). Клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин, замораживали и хранили при –20 °С для последующего выделения фермента.

Клеточные лизаты и рекомбинантные белки анализировали в 12 %-м ПААГ по Леммли. Белки окрашивали красителем «Кумасси бриллиантовый синий R-250». Расчет доли белка в смеси образцов, в том числе клеточных лизатов, производили по электрофореграммам с помощью программы GelAnalyzer версии 2010a (<http://www.gelanalyzer.com>). Для вычитания фона использовали автоматический режим «Rolling ball», нижняя граница электрофореграммы (линия фронта) при расчетах не учитывалась.

Рекомбинантные белки выделяли в нативных условиях согласно протоколу фирмы-производителя аффинного сорбента Ni-NTA-сефароза CL-6B («Quiagen», Германия). Клетки *E. coli* ресуспендировали в лизис-буфере (50 мМ Tris-HCl pH 8,0, 150 мМ NaCl, 20 мМ имидазола) и разрушали обработкой ультразвуком (УЗГ 13-0,1/22, ФГУП «ВНИИТВЧ», Россия). При необходимости в буфер добавляли хлорид натрия до 1 М. Клеточный лизат отделяли от дебриса центрифугированием 20 мин при 20000 г и использовали в

аффинной хроматографии. Дебрис экстрагировали 60 мин 8М мочевиной и осаждали 10 мин при 20000 г. Супернатант анализировали в ПААГ. Фермент из лизата клеток выделяли и очищали с помощью аффинной хроматографии на колонке с объемом смолы 5 мл общепринятыми методами жидкостной хроматографии, профиль элюции регистрировали на проточном УФ-детекторе при длине волны 280 нм. Целевой белок элюировали лизис-буфером, дополнительно содержащим 250 мМ имидазола. От имидазола и других солей фермент очищали с помощью диализа в буфере следующего состава: 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, 150 мМ NaCl. На заключительном этапе к ферменту добавляли равный объем 100%-го глицерина, перемешивали и хранили при –20 °С.

В качестве субстрата для проверки ферментативной активности использовали химерный рекомбинантный полипептид аполипопротеин А-I (апо А-I) человека [2], который получали аналогично ферменту, за исключением того, что разрушение клеток и хроматографию проводили в денатурирующих условиях (с 6М мочевиной). От мочевины фермент очищали с помощью диализа в буфере, аналогичном буферу фермента.

Концентрацию белков измеряли спектрофотометрически в ЦКП «Спектротометрические измерения» на базе НИИ биохимии, г. Новосибирск (спектрофотометр Evolution 300, «Thermo Scientific», США) по методике Варбурга и Кристиана. Активность фермента проверяли в буфере следующего состава: 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, 150 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитола. Температура реакции 22–24 °С, время инкубации 18 ч. Продукты гидролиза анализировали в 15%-м ПААГ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в нашей лаборатории получен продукт химерного полипептида MBP, слитого с TEVp [1]. Ген TEVp был оптимизирован для экспрессии в *E. coli*, в него внесено 37 синонимических замен кодонов и сделаны четыре замены аминокислот: S219V, T17S, N68D и I77V. По литературным данным, замена S219V уменьшает неспецифическую автокаталитическую активность фермента примерно в 100 раз по сравнению с диким типом, что делает его более стабильным [6], а замены T17S, N68D и I77V приводят к большей цитоплазматической растворимости фермента при сохранении его каталитической активности [12]. Экспрессируемый полипептид MBP-TEVp содержал в своей структуре сайт расщепления для TEVp и схематически представлял следующий вид: MBP-ENLYFQ/G-NNNNNN-TEVp,

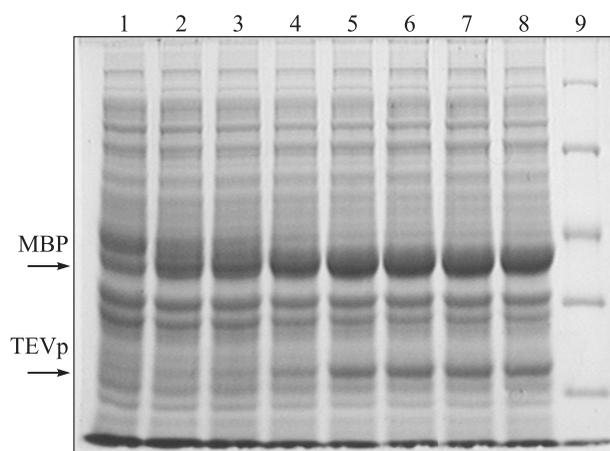


Рис. 1. Электрофорезграмма клеточных лизатов в 12 % ПААГ. Влияние концентрации ИПТГ на уровень синтеза фермента TEVr в клетках продуцента. Дорожки: 1 – лизат клеток, инкубированных без добавления индуктора (контроль); 2–8 – лизаты клеток, инкубированных с индуктором (1,2, 25, 50, 100, 200, 500 и 1000 мкМ); 9 – маркерные белки: бета-галактозидаза 116 кДа, бычий сывороточный альбумин 66,2 кДа, овалбумин 45,0 кДа, лактатдегидрогеназа 35 кДа, эндонуклеаза рестрикции Bsp98I 25 кДа (ThermoFisher Scientific, США)

где ENLYFQ/G – сайт расщепления полипептида ферментом TEVr, ННННН – 6 аминокислотных остатков гистидина. Благодаря специфическому сайту TEVr полипептид в клетке расщеплялся с образованием свободного фермента, а наличие у фермента на N-конце 6 остатков гистидина позволяло выделять его из клеточного лизата с помощью металлохелатной аффинной хроматографии.

На первом этапе исследовалось влияние концентрации индуктора (ИПТГ) на уровень синтеза белка в клетках с целью выбора оптимальной концентрации и отсутствия свехрэкспрессии гена при избытке ИПТГ. Производитель плазмиды рекомендует использовать 1 мМ ИПТГ при оптической плотности культуры клеток D_{600} 0,6–0,8 оптических единиц (о.е.) в 1 мл и последующей инкубации клеток в течение 4–8 ч. Мы приняли эти условия за исходные, время инкубации культуры с индуктором составило 4 ч, температура инкубации – 37 °С. Результаты анализа клеточных лизатов представлены на рис. 1.

Результаты анализов показали, что визуально банд, соответствующий по подвижности TEVr (29,0 кДа), проявляется при концентрации ИПТГ 50 мкМ (см. рис. 1, дорожка 4, доля белка в клетке оценена как ~8,7 %). При концентрации индуктора 100 мкМ банд становится отчетливо виден (см. рис. 1, дорожка 5, доля белка в клетке оценена как ~14,5 %). При повышении concentra-

ции до уровня, рекомендуемого производителем плазмиды рD441-MBP, существенного увеличения мажорного банд не обнаружено (см. рис. 1, дорожки 6, 7 и 8, доля белка в клетке оценена как ~15,4, 15,8 и 16,3 % соответственно). Поэтому в дальнейших экспериментах мы использовали концентрацию индуктора 200 мкМ.

Затем мы исследовали влияние температурного режима и времени инкубации клеток с индуктором. Известно, что снижение температуры культуры клеток до 30 °С способствует увеличению цитоплазматической растворимости гетерологичных белков в *E. coli* [10]. Результаты исследования показали, что температурный режим (30 и 37 °С) и время инкубации (4 и 18 ч) существенно не изменяли конечный выход фермента. Более того, длительная инкубация при 37 °С приводила к снижению его содержания в клетках (по анализу клеточных лизатов), что существенно снижало конечный выход рекомбинантного белка (до 20 мг/л). Поэтому для дальнейших экспериментов мы использовали температуру инкубации клеток с индуктором 30 °С и время инкубации 4 ч, при этом конечная оптическая плотность культур в колбах достигала 4–5 о.е./мл.

Далее мы проанализировали влияние фазы роста клеток, описываемой оптической плотностью культуры, в момент индукции экспрессии гена полипептида MBP-TEVr на растворимость конечного фермента. За растворимость принимали содержание фермента в супернатанте после разрушения клеток ультразвуком и осаждения дебриса. Дебрис ресуспендировали в буфере с 6М мочевиной, суспензию дебриса и супернатант использовали для анализа в ПААГ. Анализ проводили на трех состояниях культуры клеток: при $D_{600} \sim 0,6$ о.е./мл (как рекомендует производитель плазмиды), при $D_{600} \sim 1,2$ о.е./мл и при $D_{600} \sim 2,4$ о.е./мл. Результаты анализа фракций дебриса и супернатанта после разрушения клеток ультразвуком представлены на рис. 2.

Оказалось, что в эксперименте с клетками, индуцированными при $D_{600} \sim 0,6$ о.е./мл, фермент практически отсутствовал во фракции супернатанта (3,3 % от суммарного белка), в то время как во фракции дебриса выявлялся мажорный банд, соответствующий по подвижности ферменту (см. рис. 2, а, дорожки 2 и 3). В клетках, индуцированных при $D_{600} \sim 1,2$ о.е./мл, фермент уже появлялся во фракции супернатанта (8,4 % от суммарного белка (см. рис. 2, б, дорожка 3). В клетках, индуцированных при $D_{600} \sim 2,4$ о.е./мл, фермент визуально отсутствовал во фракции дебриса и практически весь содержался во фракции супернатанта (14,1 % от суммарного белка; см. рис. 2, в, дорожки 2 и 3). Выход рекомби-

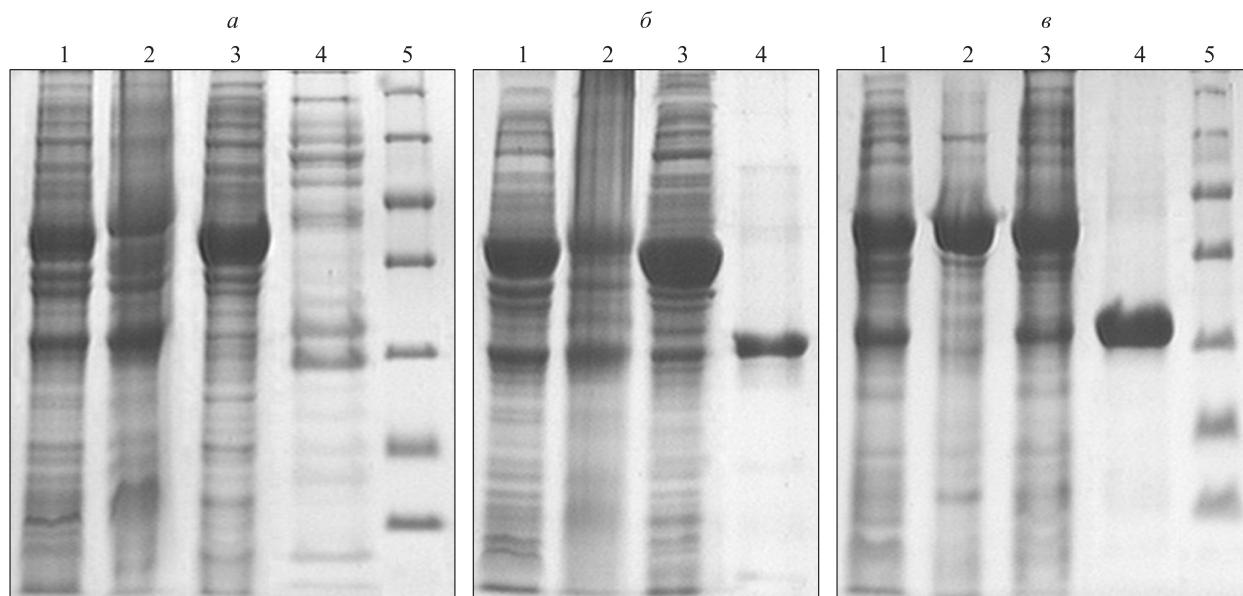


Рис. 2. Фрагменты электрофореграмм белковых фракций выделения TEVr из клеток, индуцированных при различной оптической плотности (а – D_{600} 0,6 о.е./мл; б – D_{600} 1,2 о.е./мл; в – D_{600} 2,4 о.е./мл). Дорожки: 1 – лизат клеток, инкубированных с добавлением индуктора (биомасса для выделения фермента); 2 – клеточный дебрис; 3 – супернатант (клеточный лизат); 4 – фракция, элюированная 250мМ имидазолом (целевой рекомбинантный белок TEVr); 5 – маркерные белки: бета-галактозидаза 116 кДа, бычий сывороточный альбумин 66,2 кДа, овальбумин 45,0 кДа, лактатдегидрогеназа 35 кДа, эндонуклеаза рестрикции Bsp98I 25 кДа, бета-лактоглобулин 18,4 кДа, лизоцим 14,4 кДа (ThermoFisher Scientific, США)

нантного фермента в последнем случае достигал 50 мг/л культуры клеток продуцента.

Известно, что присутствие детергентов или высоких концентраций солей увеличивает растворимость рекомбинантных белков, однако при этом их ферментативная активность может быть снижена или вовсе потеряна. В случае TEVr в литературе опубликована работа, которая показывает, что фермент сохраняет активность в присутствии невысоких концентраций додецилсульфата натрия, мочевины и гуанидина гидрохлорида [11]. Поэтому в своих экспериментах мы попробовали повысить выход фермента при его выделении из клеток путем увеличения концентрации хлорида натрия в лизирующем буфере. Оказалось, что изменение содержания NaCl в буфере от 0,15 до 1,0 М не влияло существенно на конечный выход фермента, однако при этом он сохранял свою ферментативную активность (рис. 3).

Для проверки ферментативной активности в качестве субстрата использовали полученный нами рекомбинантный химерный полипептид – аполипептопротеин А-I человека, состоящий собственно из белка и слитой с ним лидерной последовательности [2]. Схематичная структура полипептида имела вид: лидер–сайт TEVr–апо А-I. Размер исходного полипептида составлял ~33,4 кДа, при его расщеплении образовывалось два фрагмента размером 27,8 и 5,6 кДа. Белки разме-

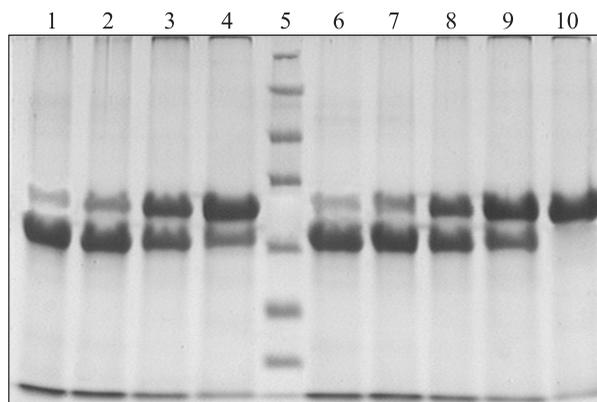


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов гидролиза химерного полипептида апо А-I в 15 %-м ПААГ. Дорожки: 1–4 – продукты гидролиза ферментом, выделенным в буфере с 1,0 М хлоридом натрия, соотношение фермента к субстрату по массе 1 : 12, 1 : 24, 1 : 48 и 1 : 96 соответственно; 5 – маркерные белки: бета-галактозидаза 116 кДа, бычий сывороточный альбумин 66,2 кДа, овальбумин 45,0 кДа, лактатдегидрогеназа 35 кДа, эндонуклеаза рестрикции Bsp98I 25 кДа, бета-лактоглобулин 18,4 кДа, лизоцим 14,4 кДа (ThermoFisher Scientific, США); 6–9 – продукты гидролиза ферментом, выделенным в буфере с 0,15М хлоридом натрия, соотношение фермента к субстрату по массе 1 : 12, 1 : 24, 1 : 48 и 1 : 96 соответственно; 10 – реакционная смесь без фермента

ром 33,4 и 27,8 кДа разделялись в 15%-м ПААГ и могли быть легко идентифицированы. Активность фермента, выделенного в присутствии 1М и 0,15М хлорида натрия, была одинаковой (см. рис. 3, дорожки 1–4 и 6–9 соответственно).

Таким образом, из всех проанализированных условий получения биомассы клеток продуцента и условий выделения фермента наибольшее влияние на выход белка оказывала фаза роста культуры клеток в момент запуска экспрессии гена, оптимальной был конец экспоненциальной фазы роста (оптическая плотность D_{600} 2,0–2,5 о.е./мл). Выход рекомбинантного фермента в нашем случае достигал 50 мг/л культуры клеток. Полученный результат согласуется с данными работы [12], в которой авторы использовали мутантный ген протеазы A26 (выход 54 мг/л), содержащий четыре аминокислотные замены (T17S, N68D, I77V и S219N). Сравнение различий результатов выхода фермента может быть не совсем корректным, поскольку в работе [12] использовали вектор с промотором T7 (в нашей работе – T5), а в качестве хозяйского штамма авторы использовали клетки Rosseta(DE3)pLysS, которые синтезируют сравнительно редкие для *E. coli* транспортные РНК.

В продолжение развития работы можно предложить стратегию увеличения уровня синтеза фермента клетками-продуцентами путем отказа от слияния гена протеазы с геном мальтозосвязывающего белка. Полученные нами результаты указывают на высокий уровень содержания МВР в клетках-продуцентах в противоположность целевой TEVp (см. рис. 1, дорожки 4–8, до 26 % от общего уровня белка). Для отказа от мальтозосвязывающего белка, на наш взгляд, привлекательнее выглядит стратегия слияния протеазы с короткими пептидами, описанная в работе [9], где добавление к С-концу 9 аминокислотных остатков аргинина не уменьшало ферментативную активность протеазы, но увеличивало ее растворимость.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показано, что на выход рекомбинантного фермента из клеток-продуцентов *E. coli* штамм BL21(DE3) в экспрессирующем векторе pD441-МВР под регуляцией гена бактериофагового промотора «Т5» наибольшее влияние оказывает состояние культуры в момент запуска экспрессии гена. Оптимальным состоянием культуры является конец экспоненциальной фазы роста (оптическая плотность D_{600} 2,0–2,5 о.е./мл), выход рекомбинантного фермента в этих условиях достигает 50 мг/л культуры клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рябченко А.В., Котова М.В., Поляков Л.М. Получение продуцента протеазы вируса табачной мозаики // Междунар. журн. прикл. и фундам. исслед. 2015. (12-5). 859–862.
2. Рябченко А.В., Котова М.В., Твердохлеб Н.В., Князев Р.А., Поляков Л.М. Получение рекомбинантного аполипопротеина А-I человека и исследование его биологических свойств // Клеточ. технологии в биологии и медицине. 2015. (3). 155–159
3. Blommel P.G., Fox B.G. A combined approach to improving large-scale production of tobacco etch virus protease // Protein Expr. Purif. 2007. 55. (1). 53–68.
4. Cabrita L.D., Gilis D., Robertson A.L., Dehouck Y., Rooman M., Bottomley S.P. Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design // Protein Sci. 2007. 16. (11). 2360–2367.
5. Fang L., Jia K.Z., Tang Y.L., Ma D.Y., Yu M., Hua Z.C. An improved strategy for high-level production of TEV protease in *Escherichia coli* and its purification and characterization // Protein Expr. Purif. 2007. 51. (1). 102–109.
6. Kapust R.B., Tozser J., Fox J.D., Anderson D.E., Cherry S., Copeland T.D., Waugh D.S. Tobacco etch virus protease: Mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency // Protein Eng. 2001. 14. (12). 993–1000.
7. Kapust R.B., Waugh D.S. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused // Protein Sci. 1999. 8. (8). 1668–1674.
8. Lucast L.J., Batey R.T., Doudna J.A. Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease // Biotechniques. 2001. 30. (3). 544–546.
9. Nautiyal K., Kuroda Y. A SEP tag enhances the expression, solubility and yield of recombinant TEV protease without altering its activity // N. Biotechnol. 2018. 42. 77–84.
10. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // Protein Expr. Purif. 2005. 41. (1). 207–234.
11. Sun C., Liang J., Shi R., Gao X., Zhang R., Hong F., Yuan Q., Wang S. Tobacco etch virus protease retains its activity in various buffers and in the presence of diverse additives // Protein Expr. Purif. 2012. 82. (1). 226–231.
12. Van den Berg S., Lofdahl P., Hard T., Berglund H. Improved solubility of TEV protease by directed evolution // J. Biotechnol. 2006. 121. (3). 291–298.
13. Zou Z., Cao L., Zhou P., Su Y., Sun Y., Li W. Hyper-acidic protein fusion partners improve solubility and assist correct folding of recombinant proteins expressed in *Escherichia coli* // J. Biotechnol. 2008. 135. (4). 333–339.

OPTIMIZATION OF METHODS FOR PREPARATION OF RECOMBINANT TOBACCO ETCH VIRUS PROTEASE FROM *Escherichia coli* CELLS

Aleksandr Vladimirovich RYABCHENKO, Mariya Vladimirovna KOTOVA,
Roman Aleksandrovich KNYAZEV, Nataliya Viktorovna TRIFONOVA,
Lev Mikhaylovich POLYAKOV

*Research Institute of Biochemistry, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

The catalytic domain of the nuclear inclusion protein of the tobacco etch virus protease, TEVp, is used for the cleavage of artificial fusion polypeptides. However, the production of a recombinant enzyme has certain difficulties, such as a low yield of the product and its low solubility in physiological solutions. The aim of the study was to optimize the methods of producing a recombinant enzyme TEVp from *E. coli* producing cells. **Material and methods.** The studies were carried out on *E. coli* cells st. BL21 (DE3). The enzyme was synthesized by cells in the form of a fusion polypeptide with maltose-binding protein (MBP), followed by self-cleavage. Biomass production was carried out under various conditions: a change in the temperature regime, the time of incubation of cells with an inducer, the concentration of the inducer and the growth phase of the culture with the addition of an inducer. The enzyme was isolated under native conditions and with an increased concentration of sodium chloride by affinity chromatography. The enzyme activity was tested on chimeric recombinant human apolipoprotein A-I (~33.4 kDa). **Results and discussion.** The results of the study showed that a significant influence on the final yield of the enzyme was provided by the growth phase of the culture when the inducer was added. Optimal conditions for obtaining biomass were found as follows: incubation temperature with an inducer 30 °C; incubation time 4 hours; inducer concentration 200 μM; optical density with inducer addition 2.0–2.5 optical units per ml. Sodium chloride concentration in the buffer solution during isolation of the protein was 150 mM. The yield of the enzyme under these conditions reached 50 mg from a liter of cell culture. A similar yield of the enzyme was obtained using the method of auto-induction of cell culture. In all cases, enzymes retained their activity. **Conclusion.** It was shown that the greatest influence on the yield of the recombinant enzyme from *E. coli* producing cells strain BL21 (DE3) in the expression vector pD441-MBP under the regulation of the bacteriophage promoter gene «T5» was exerted by the growth phase of the cell culture at the time of gene expression launch.

Key words: recombinant protein, tobacco etch virus protease, *Escherichia coli*.

Ryabchenko A.V. – candidate of biological sciences, senior researcher, e-mail borrelia@mail.ru

Kotova M.V. – junior researcher, e-mail zerokiri@mail.ru

Knyazev R.A. – candidate of biological sciences, senior researcher, e-mail Knjazev_roman@mail.ru

Trifonova N.V. – junior researcher, e-mail nataliya-tverdohleb@yandex.ru

Polyakov L.M. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory, e-mail plm@niibch.ru