

УДК:57.578.224

Наханова Гульнур Джолдасбековна, магистр биологии,
Жунушов Асанкадыр Темирбекович, доктор ветеринарных наук,
 профессор, академик НАН КР
Червякова Ольга Викторовна, кандидат биологических наук, профессор
Молдагулова Сабина Улановна, магистр биологии
Исабек Айша Уранкызы, магистр естественных наук
Ұланқызы Акнур, бакалавр
Жақыпбек Айгерим Серікқызы, магистр ветеринарных наук
Шораяева Камшат Абитхановна, PhD

Наханова Гульнур Джолдасбековна, биология илимдеринин магистри,
Жунушов Асанкадыр Темирбекович, ветеринария илимдеринин доктору,
 профессор, КР УИАнын академиги
Червякова Ольга Викторовна, биология илимдеринин кандидаты, профессор
Молдагулова Сабина Улановна, биология илимдеринин магистри,
Исабек Айша Уранкызы, илимдин магистри,
Ұланқызы Акнур, бакалавр
Жақыпбек Айгерим Серікқызы, ветеринария илимдеринин магистри
Шораяева Камшат Абитхановна, PhD

Nakhanova Gulnur Dzholdasbekovna, master of biology,
Zhunushov Asankadyr Temirbekovich, doctor of veterinary sciences,
 professor, academician NAS KR
Chervyakova Olga Viktorovna, candidate of biological sciences, professor
Moldagulova Sabina Ulanovna, master of biology
Isabek Aisha Urankyzy, master of science
Ulankeyzy Aknur, bachelor's degree
Zhakypbek Aigerim Serikkyzy, master of veterinary science
Shorayeva Kamshat Abitkhanovna, PhD

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ХИМЕРНОГО SM БЕЛКА ВИРУСА SARS-COV-2

SARS-COV-2 ВИРУСУНУН ХИМЕРДИК SM БЕЛОГУН КУЛЬТИВАЦИЯЛОО ШАРТТАРЫН ОПТИМАЛДАШТЫРУУ

OPTIMIZATION OF EXPRESSION CONDITIONS FOR CHIMERIC SM PROTEIN OF SARS-COV-2

Аннотация. Экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli* остается одним из наиболее распространенных и экономически эффективных методов получения целевых белковых продуктов для научных и биотехнологических целей. Успешность данного процесса во многом определяется оптимизацией условий культивирования, включая параметры инокуляции, концентрацию индуктора и режим экспрессии.

В данной работе исследовано влияние ключевых факторов на экспрессию химерного белка SM вируса SARS-CoV-2 в *E. coli*. Основное внимание уделено разведению инокулята, наличию ампициллина в питательной среде, концентрации ИПТГ. Результаты показали, что оптимальное разведение инокулята в среде LB в соотношении 1:100 обеспечивает максимальный выход белка при сбалансированном росте культуры при температуре 37 °C и продолжительности инкубирования 4 ч до и 4 ч после индукции экспрессии. Наличие ампициллина способ-

ствуется стабильному сохранению плазмиды в клетках, что положительно сказывается на продуктивности. Использование ИПТГ в концентрации 0,5 мМ позволяет достичь максимального накопления белка в клетках. Выбранные параметры бактериальной экспрессии позволяют получать целевой химерный белок SM в лабораторных условиях и могут быть применены при масштабировании процесса.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, химерный белок SM, бактериальная экспрессия, *E. coli*.

Аннотация. Рекомбинантный белок экспрессиясы *E. coli* бактериясында илимий жана биотехнологиялык максаттар үчүн максаттуу белокторду өндүрүүнүн эң кеңири колдонулган жана экономикалык жактан натыйжалуу ыкмаларынын бири болуп эсептелет. Бул процесстин ийгилиги көбүнчө культивация шарттарын оптималдаштырууга байланыштуу, анын ичинде инокуляция параметрлери, селективдүү агенттердин болушу жана экспрессияны индукциялоо режимин.

Бул изилдөөдө SARS-CoV-2 вирусунун рекомбинанттык SM белогунун *E. coli* деги экспрессиясына негизги факторлордун таасири иликтенди. Негизги көңүл инокулятты суюлтууга, азыктык чөйрөдө ампициллиндин болушуна жана инкубация маалында ИПТГ экспрессия индукторлорунун концентрациясына бурулду (37 °C температурада – индукцияга чейин 4 саат жана андан кийинки 4 саат). Натыйжалар көрсөткөндөй, инокуляттын оптималдуу 1:100 суюлтуусу клетка маданиятынын тең салмактуу өсүшү менен максималдуу белок өндүрүмдүүлүгүн камсыз кылат. Ампициллиндин кошулушу плазмиддин туруктуу сакталуусуна жана плазмидди алып жүрүүчү клетка маданиятынын колдоого алынышына өбөлгө түзүп, продуктивдүүлүктү жогорулатат. ИПТГ-нин 0,5 мМ концентрациясын колдонуу өсүштү олуттуу төмөндөтпөстөн жогорку деңгээлдеги экспрессияга жетүүгө мүмкүндүк берди. Тандалган шарттар рекомбинанттык SM белогун өндүрүүнүн натыйжалуулугун жогорулатат жана процессти масштабдоо учурунда колдонууга ылайыктуу.

Ачкыч сөздөр: химердик SM белок, *E. coli*, экспрессия, SARS-CoV-2, оптималдаштыруу, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид.

Abstract. Recombinant protein expression in *E. coli* remains one of the most common and cost-effective methods for producing target proteins for scientific and biotechnological purposes. The success of this process is largely determined by the optimisation of cultivation conditions, including inoculation parameters, the presence of selective agents, and the expression induction regime.

This study investigates the influence of key factors on the expression of the recombinant SM protein of SARS-CoV-2 in *E. coli*. The main focus was on inoculum dilution, the presence of ampicillin in the culture medium, and the concentration of IPTG inducers during incubation at 37 °C 4 hours before induction and 4 hours after. The results showed that an optimal inoculum dilution of 1:100 provides maximum protein yield with balanced culture growth. The presence of ampicillin ensures stable plasmid retention and maintenance of plasmid-carrying cell cultures, which has a positive effect on productivity. The use of IPTG at a concentration of 0.5 mM enables a high level of expression to be achieved without a significant reduction in growth. The selected conditions increase the efficiency of recombinant SM protein production and can be applied in process scale-up.

Keywords: chimeric SM protein, *E. coli*, expression, SARS-CoV-2, optimisation, isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside.

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, привела к беспрецедентному всплеску интереса к изучению вирусных антигенов и разработке тест-систем для их получения. Вирус SARS-CoV-2 кодирует несколько структурных белков, среди которых основными иммуногенными мишенями

являются спайковый (S), нуклеокапсидный (N) и мембранный (M) белки. Наибольшее внимание уделяется S белку, особенно его рецептор-связывающему домену (RBD), поскольку он непосредственно взаимодействует с рецептором ACE2 на поверхности клеток-хозяев и является ключевым антигеном в вакцинных препаратах и диагностических тестах [1-2].

Рекомбинантные формы S белка и его фрагментов активно используются в производстве серологических тестов, разработке вакцины и исследовании взаимодействия антиген-антитело. Однако экспрессия полноразмерного S белка может быть затруднена из-за его большой молекулярной массы, сложной структуры и склонности к агрегации. В связи с этим выбор все чаще отдается химерным конструкциям, в которых сочетаются иммуногенные домены с элементами, повышающими растворимость, стабильность и простоту очистки [3-4]. Химерные белки широко используются в биомедицинских исследованиях и разработке диагностических тест-систем благодаря своей способности совмещать функциональные домены различных белков.

Для экспрессии рекомбинантных белков используют различные системы. Среди них бактериальная система на основе *Escherichia coli*. Для эффективной экспрессии одним из ключевых этапов является оптимизация условий культивирования. Правильный подбор условий культивирования и индукции позволяет существенно повысить выход растворимого и биологически активного белка [5]. Рекомбинантные белки в прокариотических системах, особенно в клетках *E. coli*, остается востребованным методом благодаря простоте, высокой скорости роста культуры и возможности масштабирования [6-7]. Однако экспрессия белков вирусного происхождения в клетках *E. coli* может сопровождаться образованием нерастворимых включенных телец, снижением

биологической активности и метаболической нагрузкой на клетки, особенно при индукции высокими концентрациями изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) [8].

Химерные конструкции, включающие иммунологически значимые участки S белка и стабилизирующие домены, позволяют повысить растворимость и стабильность целевого продукта. Тем не менее, эффективность экспрессии таких белков существенно зависит от ряда факторов: начальная плотность клеток (разведение инокулята), наличие селективного давления (канамицина или ампициллина), концентрация индуктора и температурных условий [9]. Оптимизация этих параметров имеет большое значение для получения высоких выходов растворимого и функционального белка, пригодного для использования в диагностике и вакцинопрофилактике.

Таким образом, настоящее исследование направлено на определение оптимальных условий экспрессии химерного SM белка вируса SARS-CoV-2 в системе *E. coli* с акцентом на влияние разведения инокулята, концентрации ИПТГ, температуры инкубации и наличия ампициллина. И в этой связи проводился подбор оптимальных условий культивирования штамма-продуцента *E. coli* ER2566/pET/SM рекомбинантного белка SM вируса SARS-CoV-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм-продуцент. В работе использовался штамм-продуцент рекомбинантного химерного белка *E. coli* ER2566/pET/SM вируса SARS-CoV-2.

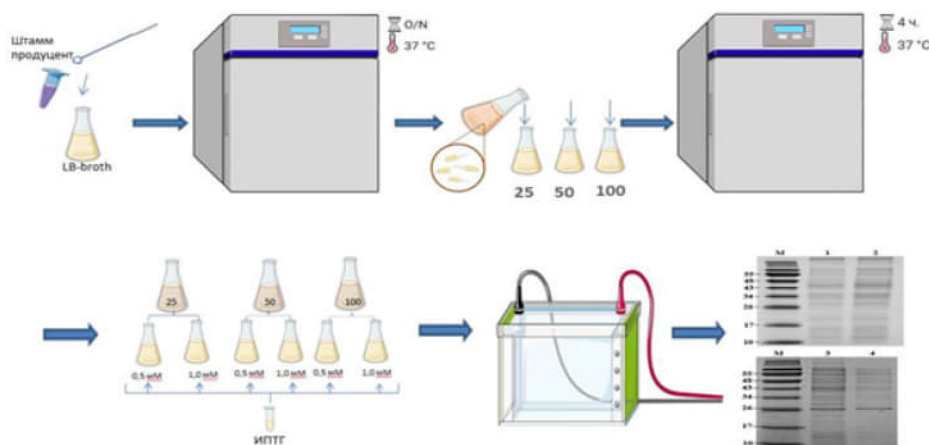


Рисунок 1. Дизайн подбора оптимальных условий культивирования *E. coli* ER2566/pET/SM – продуцента химерного белка SM

Культивирование. Клетки культивировали в 10 мл среды LB-broth (Lennox) [NaCl 5 g/L, Tryptone 10 g/L, Yeast Extract 5 g/L] при температуре 37 °C в течение 18 ч на орбитальном шейкере при 250 об/мин для получения ночной культуры. Затем проводили соответствующее разведение инокулята в 50 мл основной среды с и без добавления ампициллина. Клетки *E. coli* из ночной культуры разводили в свежей среде LB-broth (Lennox) в разведении 1:25 (2 мл культуры +48 мл среды), 1:50 (1 мл культуры +49 мл среды) 1:100 (0,5 мл культуры +49,5 мл среды) в стерильных условиях. Клетки инкубировали при температуре 37 °C на шейкере при 250 об/мин в течение 4 ч ($OD_{600} \sim 0,6$). Далее проводили индукцию экспрессии добавлением ИПТГ в конечных концентрациях 0,5 мМ и 1,0 мМ.

Электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Клеточные лизаты разделяли методом электрофореза в 12% SDS-PAGE по Laemmli [10] и визуализировали путем окрашивания Coomassie G-250.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс экспрессии рекомбинантных белков в системе *E. coli* зависит от множества факторов, включая состав питательной

среды, температуры инкубации, концентрации индуктора, время индукции, а также плотность клеток на момент ее проведения. Оптимизация этих условий позволяет существенно повысить выход целевого белка и улучшить его растворимость, что критически важно при получении биологически активных форм продукта [11-12]. В результате проведенных экспериментов были определены оптимальные условия экспрессии химерного SM белка. Были изучены параметры, влияющие на уровень продукции целевого белка: степень разведения ночной культуры, концентрация индуктора ИПТГ, а также режим инкубации до и после индукции.

Для оптимизации условий экспрессии SM белка в клетках *E. coli* были исследованы три различных соотношения разведения ночной культуры при подготовке инокулята: 1:25, 1:50, 1:100. Результаты показали, что при разведении инокулята 1:100 оптическая плотность культуры достигала $OD_{600} \sim 0,6-0,8$, что способствовало эффективной экспрессии белка (таблица 1). В то время как при разведениях 1:50 и особенно 1:25 наблюдалось более быстрое накопление биомассы, ОП клеточной суспензии превышала значения для индукции, что привело к снижению уровня экспрессии белка.

Таблица 1. Динамика OD_{600} клеточной суспензии до и после индукции при разных разведениях инокулята

№ п/п	Разведение инокулята	Время инкубаций	OD_{600} перед индукцией
1	1:25	4 ч	1,20
2	1:50		0,95
3	1:100		0,65

Так, при разведении 1:100 выход целевого белка был в 1,3 и 1,8 раз выше по сравнению с разведениями 1:50 и 1:25 соответственно. Это может быть связано с тем, что при меньшей начальной плотности клеток обеспечиваются более благоприятные условия для роста и физиологического состояния клеток на момент индукции, что положительно сказывается на уровне экспрессии рекомбинантного белка. Результаты преды-

дущих исследований свидетельствует о том, что состояние клеток на момент индукции оказывает значительное влияние на уровень белковой продукции [13-14]. В противоположность этому, более концентрированные инокуляты (1:25 и 1:50) могут приводить к преждевременному истощению питательных веществ и накоплению метаболитов, ингибирующих рост клеток и экспрессию целевого белка [15]. Таким образом, исполь-

зование инокулята, приготовленного путем разведения ночной культуры в соотношении 1:100 является оптимальным для получения максимального выхода целевого белка.

Не менее значимым фактором при бактериальной экспрессии целевых белков яв-

ляется поддержание селективного давления в культуре. Для этого в питательную среду вводят соответствующие антибиотики, которые способствуют стабильному сохранению плазмид и предотвращает размножение клеток, утративших плазмиду (табл. 2).

Таблица 2. Динамика OD_{600} клеточной суспензии до и после индукции при наличии ампициллина

№ п/п	Наличие антибиотика	Время инкубации	OD_{600} перед индукцией
1	Ампициллин +	4 ч, 37 °C	0,65
2	Ампициллин –		0,93

Наличие ампициллина в конечной концентрации 50 мкг/мл в среде оказало заметное влияние на рост бактериальной культуры. После добавление ампициллина оптическая плотность культуры $OD_{600} \sim 0,65$, без ампициллина $OD_{600} \sim 0,93$ (Таб.2). Это свидетельствует о селективном давлении на рост бактериальных клеток и сохранении в популяции только клеток с плазмидной ДНК.

Несмотря на незначительное замедление роста в начальные часы инкубации в присутствии ампициллина, общая биомасса к моменту индукции достигала сопоставимых значений по сравнению с контролем без антибиотика, которые согласуются с литературными данными, согласно которым поддержание селекционного давления способствует стабильной экспрессии целевого гена

[16-17].

ИПТГ широко используется как индуктор экспрессии генов под контролем промотора T7. Однако его концентрация может существенно влиять на физиологическое состояние клеток, уровень экспрессии и скорость роста культуры. В данном этапе исследования сравнивается влияния концентрации ИПТГ на рост клеток *E. coli* при экспрессии химерного SM белка. Для оценки влияния концентрации ИПТГ на экспрессию SM белка использовали индуктор в концентрациях 0,5 мМ и 1 мМ. Образцы отбирались до индукции и через 2 и 4 ч после индукции. Анализ экспрессии проводился методом электрофореза в ПААГ с последующим окрашиванием Coomassie G-250 геля.

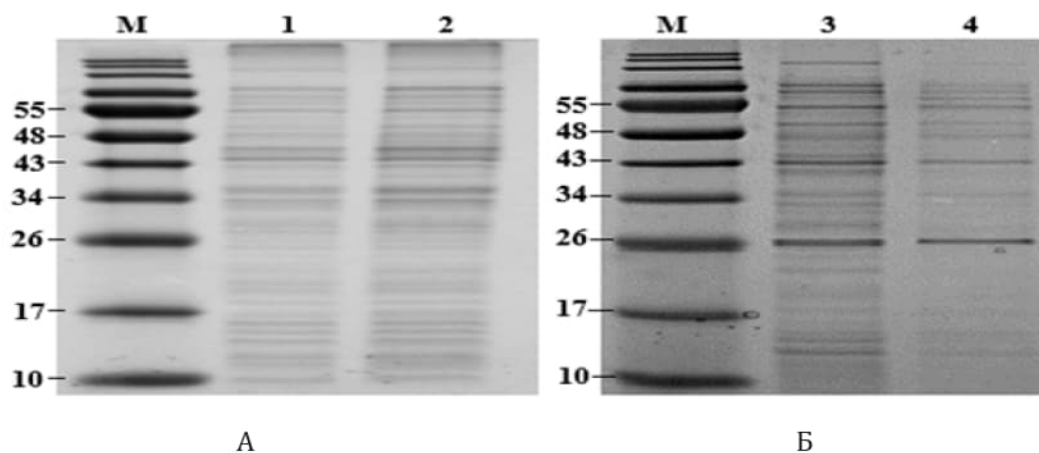


Рисунок 1 – Определение оптимальной концентрации ИПТГ. М – маркер; 1 – лизат клеток через 2 ч культивирования; 2 – лизат клеток через 4 ч культивирования; 3 – лизат клеток, индуцированных 0,5 мМ ИПТГ; 4 – лизат клеток, индуцированных 1 мМ ИПТГ.

На рисунке 1Б (линия 3 и 4) видно, что добавление ИПТГ индуцирует экспрессию белка, соответствующего расчетным значениям молекулярной массе SM белка, составляющей 28 кДа. После индукции 0,5 мМ ИПТГ (Рис 1Б, линия 3) наблюдается выраженная экспрессия целевого белка без заметного снижения общего белкового профиля. При 1 мМ ИПТГ (Рис 1Б, линия 4) экспрессия проявляет целевой белок, однако уменьшается интенсивность других белковых полос, что может свидетельствовать о замедлении роста клеток и метаболической нагрузке.

ИПТГ оказывает значительное влияние как на уровень экспрессии рекомбинантного белка, так и на рост клеточной культуры [13]. При высоких концентрациях 1 мМ ИПТГ может вызывать сильную метаболическую нагрузку на клетки *E. coli*, что приводит к замедлению роста, накоплению неправильно свернутых белков и даже к формированию телец включений [14]. В то же время, использование более низких концентраций индуктора (0,1-0,5 мМ) часто позволяет достичь баланса между уровнем экспрессии и устойчивым ростом культуры.

В наших исследованиях наблюдалось снижение скорости роста культуры при увеличении концентрации ИПТГ, что согласуется с литературными данными о токсичности чрезмерной экспрессии для метаболических активных клеток [16]. Таким образом, оптимальный подбор концентрации ИПТГ является критически важным для эффективной экспрессии без существенного угнетения роста.

Помимо состава среды и индуктора, важным фактором, определяющим успешность экспрессии рекомбинантных белков, является температурный режим. Температура инкубации оказывает существенное влияние на экспрессию рекомбинантных белков в *E. coli*, влияя как на скорость роста клеток, так и на правильность сворачивания белковых молекул. В ходе эксперимента индукцию проводили при температуре 37 °С. Такой режим обеспечил накопление биомассы и высокий уровень экспрессии, однако при более продолжительной инкубации или повышении температуры может возрасти риск образования нерастворимых включенных телец [16]. Выбранные условия позволяют достичь баланса между скоростью синтеза и

сохранением растворимой формы белка.

Анализ полученных нами данных показал, что наибольший выход химерного SM белка наблюдался при использовании инокулята, подготовленного путем разведения ночной культуры в соотношении 1:100, с последующей индукцией экспрессии путем добавления 0,5 мМ ИПТГ. Оптимальными условиями инкубации стали: начальный рост клеток при 37 °С в течение 4 ч до индукции, с последующим инкубированием в течение 4 ч после индукции при той же температуре.

Данные электрофореза в ПААГ подтвердили наличие белковой полосы размером 28 кДа, соответствовавшей расчетному размеру молекулярной массы SM белка, что указывает на эффективную экспрессию при выбранных условиях. Полученные результаты позволяют утверждать, что данный режим является оптимальным для получения максимального выхода химерного SM белка и может быть использован для масштабирования процесса при дальнейших исследованиях и при масштабировании процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования были изучены основные факторы, влияющие на эффективность экспрессии целевого белка штаммом-продуцентом *E. coli* ER2566/pET/SM. На основании экспериментальных данных были определены оптимальные условия, позволяющие выход рекомбинантного белка.

Наиболее высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка достигался при разведении инокулята 1:100, добавлении ампициллина в среду для сохранения плазмиды, инкубации в течение 4 ч при температуре 37 °С до активного роста клеток и индукции 0,5 мМ ИПТГ, что обеспечило эффективную экспрессию рекомбинантного белка. Полученные данные будут использованы для масштабирования процесса и дальнейшей очистки целевого белка с целью его применения в создании диагностических и вакцинных препаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках НТП «Разработка новых диагностических тест-систем для особо опасных вирусных инфекций» (ИРН: BR24992948) на 2024-2026 годы при поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

Литература:

1. Noorabad Gh.M., Ghasemi Y., Mahdavi M., Aghasadeghi M.R., Zarei S. Recombinant subunits of SARS-CoV-2 spike protein as vaccine candidates to elicit neutralizing antibodies // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 2022. – Vol. 36, No. 6. – P. e24328. – DOI: 10.1002/jcla.24328.
2. Karimi S., Nazarian S., Sotoodehnejadnematalahi F., Dorostkar R., Amani J. Designing and expression of recombinant chimeric spike protein from SARS-CoV-2 in *Escherichia coli* and its immunogenicity assessment // *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. – 2023. – Vol. 22, No. 1. – P. e137751. – DOI: 10.5812/ijpr-137751.
3. McGuire B. E., Mela J. E., Thompson V. C., Cucksey L.R., Stevens C.E., McWhinnie R.L., Nano F.E. *Escherichia coli* recombinant expression of SARS-CoV-2 protein fragments // *Microbial Cell Factories*. – 2022. – Vol. 21. – P. 21. – DOI: 10.1186/s12934-022-01753-0.
4. Yoshizue T., Brindha S., Wongnak R., Takemae H., Both M., Mizutani, T., Kuroda, Y. Antisera Produced Using an *E.Coli*-Expressed SARS-CoV-2 RBD and Complemented with a Minimal Dose of Mammalian-Cell-Expressed S1 Subunit of the Spike Protein Exhibits Improved Neutralization // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, No. 13, Article 10583. – DOI: 10.3390/ijms241310583.
5. Expression and purification of recombinant proteins [Экспрессия и очистка рекомбинантных белков] // *Current Protocols in Protein Science*. – 2015. – Том 80, дополнительный выпуск 6. – Статья 6.1. – DOI: 10.1002/0471140864.ps0601s80.
6. Atroshenko, D. L., Sergeev, E. P., Golovina, D. I., Pometun, A. A. (2024). Additivities for soluble recombinant protein expression in cytoplasm of *Escherichia coli*. *Fermentation*, 10(3), 120. <https://doi.org/10.3390/fermentation10030120>.
7. Zweng S., Mendoza-Rojas G., Altegoer, F. (2023). Simplifying recombinant protein production: Combining Golden Gate cloning with a standardized protein purification scheme. *arXiv*. <https://arxiv.org/abs/2310.06456>.
8. Kim W. S., Kim J. H., Lee J., Ka S. Y., Chae H. D., Jung I., Jung, S. T., Na, J. H. (2022). Functional expression of the recombinant spike receptor binding domain of SARS-CoV-2 Omicron in the periplasm of *Escherichia coli*. *Bioengineering*, 9(11), 670. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9110670>.
9. McGuire B. E., Mela J. E., Thompson V. C., Cucksey L. R., Stevens C. E., McWhinnie R. L., Winkler D. F. H., Pelech S., Nano F. E. (2022). *Escherichia coli* recombinant expression of SARS-CoV-2 protein fragments. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01753-0>.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
11. Росано, Г. Л., Чеккарелли, Э. А. Экспрессия рекомбинантных белков в *Escherichia coli*: достижения и проблемы // *Микробиология*. – 2014. – Т. 5. – С. 172. – DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.
12. Сёренсен, Х. П., Мортенсен, К. К. Современные генетические стратегии экспрессии рекомбинантных белков в *Escherichia coli* // *Журнал биотехнологии*. – 2005. – Т. 115, № 2. – С. 113–128. – DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.004.
13. Sivashanmugam, A., Murray, V., Cui, C., Zhang, Y., Wang, J., & Li, Q. (2009). Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Science*, 18(5), 936–948. <https://doi.org/10.1002/pro.102>.
14. Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>.
15. Choi et al., 2006, Choi, J. H., Keum, K. C., & Lee, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 876–885. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.03.031>.
16. Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 411–421. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00003-8).

17. Balbás, P. (2001). Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*, 19(3), 251–267. <https://doi.org/10.1385/MB:19:3:251>.
18. Restrepo-Pineda S., Rosiles-Becerril D., Vargas-Castillo A.B., Ávila-Barrientos L.P., Luviano A., Sánchez-Puig N., García-Hernández E., Pérez N.O., Trujillo-Roldán M.A., Valdez-Cruz N.A. Температура индукции влияет на структуру рекомбинантных тел включения HuGM-CSF в термоиндуцируемой *Escherichia coli* // *Electronic Journal of Biotechnology*. -2022.-Т.59.