

ПОЛУЧЕНИЕ НОВОЙ АМИНОГИДРОЛАЗЫ PSEUDOMONAS PUTIDA И ХАРАКТЕРИСТИКА ЕЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

¹Просеков А.Ю., ¹Дышлюк Л.С., ¹Носкова С.Ю., ¹Карчин К.В., ¹Каширских Е.В.,
²Do Ngoc Dai

¹ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности» (650056, г. Кемерово, б-р Строителей, 47), e-mail: elen.ulrich@mail.ru;

² Vinh University, Вьетнам

Проведен анализ нуклеотидной последовательности генома бактерии *Pseudomonas putida*. Выделен *hutI*, кодирующий имидазолонпропионат-аминогидролазу, из клеточных экстрактов *Pseudomonas putida* B5437. Клонирован ген *hutI*, кодирующий имидазолонпропионат-аминогидролазу. Создана эффективная система экспрессии гена, кодирующего имидазолонпропионат-аминогидролазу. Оптимизированы параметры культивирования рекомбинантного штамма *E. coli* BL21DE3, продуцирующего имидазолонпропионат-аминогидролазу. Осуществлена экспрессия гена имидазолонпропионат-аминогидролазы в *Escherichia coli* BL21DE3. Выделена и очищена рекомбинантная имидазолонпропионат-аминогидролаза *Pseudomonas putida*. Изучены биохимические свойства рекомбинантной имидазолонпропионат-аминогидролазы *Pseudomonas putida*. Доказано, что температурный оптимум реакции наблюдается при температуре +50 °С. Активность фермента уменьшается более чем в два раза при +60 °С, причем такое снижение активности не может быть вызвано необратимой денатурацией фермента. Так, при данной температуре фермент теряет 50% активности за 15 мин, тогда как время реакции в данной серии экспериментов составляет 4 минуты. Данный факт также подтверждается тем, что во время реакции не наблюдается значительных отклонений от линейности, как должно быть при денатурации белка в кювете.

Ключевые слова: геном, экспрессия, рекомбинантные штаммы.

GETTING A NEW AMINOGIDROLAZY PSEUDOMONAS PUTIDA AND CHARACTERISTICS OF ITS BIOCHEMICAL PROPERTIES

¹Prosekov A.Y., ¹Dyshlyuk L.S., ¹Noskova S.Y., ¹Karchin K.V., ¹Kashirskih E.V.,
²Do Ngoc Dai

¹FGBOU VO "Kemerovo Technological Institute of Food Industry" (650056, Kemerovo, Boulevard Builders, 47), e-mail: elen.ulrich@mail.ru;

² Vinh University, Vietnam

The analysis of the nucleotide sequence of the genome of the bacterium *Pseudomonas putida*. Isolated *hutI*, coding imidazolonpropionat-aminogidrolazu from cell extracts *Pseudomonas putida* B5437. Cloned gene *hutI*, coding imidazolonpropionat-aminogidrolazu. An effective system is the expression of the gene encoding imidazolonpropionat-aminogidrolazu. Optimize the parameters of cultivation of the recombinant strain *E. coli* BL21DE3, producing imidazolonpropionat-aminogidrolazu. Performed gene expression imidazolonpropionat-aminogidrolazu in *Escherichia coli* BL21DE3. Isolated and purified recombinant imidazolonpropionat-aminogidrolaza *Pseudomonas putida*. The biochemical properties of the recombinant-imidazolonpropionat-aminogidrolazy *Pseudomonas putida*. It is proved that the optimum temperature of the reactionis observed at a temperature of 50 ° C. The enzyme activity is reduced by more than two times at 60 ° C, with a reduction in activity may be due to irreversible denaturation of the enzyme. Thus, at a given temperature the enzyme loses 50% of activity over 15 minutes, while the reaction time in this series of experiments is 4 minutes. This fact is also confirmed by the fact that during the reaction, no significant deviations from linearity, as it should be when the denaturation of protein in the cuvette.

Keywords: gene, expression, recombinant strains.

Генетическая инженерия конкретнее и точнее клеточной по характеристике используемых объектов и оперирует в основном с разными по форме и размерам фрагментами клетки [1; 2]. Термины «генетическая инженерия», «генная инженерия» и «рекомбинантная ДНК» - равноценны [3].

Генетическую инженерию можно представить как соединение фрагментов ДНК природного и синтетического происхождения или их комбинацию *in vitro* с последующим введением полученных рекомбинантных структур в живую клетку для того, чтобы введенный фрагмент ДНК после включения его в хромосому либо реплицировался, либо автономно экспрессировался.

Успехи генетической инженерии привели к тому, что свыше 100 белков человека (биорегуляторов, корректоров гомеостаза, факторов врожденного и приобретенного иммунитета) могут сохранять свою видеоспецифичность. Они нарабатываются как лекарственные средства путем микробиологического синтеза. При этом технология рекомбинантной ДНК позволяет их совершенствовать: повышать физиологическую активность, снижать вероятность побочных реакций после введения и так далее [4].

Основным при получении рекомбинантных белков является решение проблемы дефицита сырья, так как из человеческих тканей в промышленном масштабе получать их невозможно. В качестве продуцентов рекомбинантных белков человека чаще других в настоящее время используются: *E.coli* (кишечная палочка), *Bacillus subtilis* (сенная палочка), *Saccharomyces cerevisiae* (пекарские дрожжи). Эти организмы достаточно безопасны, однако попадание их в окружающую среду по ряду причин нежелательно. В связи с этим существуют принятые и тщательно соблюдаемые правила работы с рекомбинантами [5]. Безопасность должна соблюдаться на генетическом и на физическом уровне, и это относится к производству любых рекомбинантных белков.

Данная работа направлена на разработку генноинженерного инструментария, позволяющего получать рекомбинантный фермент амингидролазу, востребованную в пищевой и биотехнологической промышленности, с использованием штамма - суперпродуцента *Escherichia coli*.

Целью данной работы являлось: получение новой рекомбинантной амингидролазы *Pseudomonas putida* и характеристика ее биохимических свойств.

Объекты и методы исследований

Для исследования использован коллекционный штамм *Pseudomonas putida* B5437, предоставленный ФГУП «ГосНИИгенетика». Для культивирования *Pseudomonas putida* B5437 использовали LB-среду, содержащую 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM MgSO_4 , 1,05% K_2HPO_4 , 0,45% KH_2PO_4 , 0,4% сукцината и 0,2% глюкозы.

Определение нуклеотидной последовательности проводилось методом секвенирования на геномном секвенаторе GS Junior (Roche, Япония).

Клонирование гена *hutI* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Разработку олигонуклеотидных праймеров для амплификации гена проводили с помощью

программы OLIGO (версия 3.3) с учетом данных о первичной структуре гена *hutI*. В качестве матрицы для амплификации, кодирующей область гена *hutI* из *P. Putida*, использовали последовательность данного гена из баз данных GenBank (X12702.1). Для наработки к-ДНК методом полимеразной цепной реакции использовали соответствующие праймеры:

прямой праймер – CTCGAGATGAAACTTGTCTTCCTCG;

обратный праймер – GAATTCAATGGTGATGGTGATGGTG.

Полимеразную цепную реакцию проводили в 20–50 мкл раствора, приготовленного на основе десятикратного буфера для Taq-полимеразы, который содержал 200 мкМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0,5 мкМ праймеров, 2 мМ MgSO₄, 10 нг матрицы, 2 единицы Taq ДНК-полимеразы и 0,1 единицы Pfu ДНК-полимеразы. Температуру отжига олигонуклеотидов рассчитывали по эмпирической формуле $T_m = 67,5 + 34[\%GC] - 395/n$, где %GC = (G+C)/n, n – число нуклеотидов. Анализ продуктов ПЦР проводили электрофорезом в 1%-ном геле агарозы.

Для экспрессии целевого белка в работе использованы клетки штамма *E. coli* BL21[DE3]Star (Invitrogen, США) с генотипом F-ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3), содержащие в геноме λDe3 лизоген и мутацию *rne131*. Мутированный ген *rne* (*rne131*) кодирует усеченную форму РНК-азы E, что уменьшает внутриклеточное разрушение м-РНК, приводя к увеличению ее ферментативной стабильности.

Для получения эффективной системы экспрессии гена *hutI* вектор pET28a+ модифицировали последовательностью гена *hutI*. Гидролиз фрагментов ДНК рестриктазами XhoI и HindIII проводили в объеме 100 мкл в специальных буферных растворах при оптимальной для каждого фермента температуре 37 °С. Полноту гидролиза контролировали с помощью гель-электрофореза в 1%-ном агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия.

Предварительно подготавливали компетентные клетки *E. coli* BL21DE3 к трансформации. Для этого брали отдельную колонию клеток, выращенную на LB-агаре, и помещали в 5 мл LB-среды. Клетки культивировали в течение ночи при 37 °С и постоянном перемешивании (250 об/мин); 2 мл полученной ночной культуры помещали в 200 мл LB-среды. Клетки растили при 37 °С при постоянном перемешивании (250 об/мин) до ОП₆₀₀ = 0,6, после чего осаждали центрифугированием в течение 10 мин на 4000 g при +4 °С. Клетки отмывали в деионизованной воде в исходном объеме с последующим центрифугированием. Процедура отмывки повторялась трижды. После отмывки осадок клеток ресуспендировали в малом объеме деионизованной воды и центрифугировали 30 с при 5000 об/мин на микроцентрифуге. К осадку клеток добавляли 3 объема (от объема клеточного осадка)

15%-ного раствора глицерина, осадок ресуспендировали и быстро замораживали в жидком азоте. Готовые к трансформации клетки хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* BL21DE3 осуществляли методом электропорации. Для этого 2 мкл плазмидной ДНК с концентрацией 0,3–1 нг/мкл добавляли к 12 мкл компетентных клеток, перемешивали и проводили электропорацию на генераторе высоковольтных импульсов ГВИ-1 в стерильных ячейках при электрическом импульсе напряженностью 10 кВ/см длительностью 4 мсек. После трансформации клетки помещали в 1 мл SOC-среды (2% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄, 20 мМ глюкозы) и инкубировали в течение 40 мин при 37 °С. После инкубации 10–250 мкл клеточной суспензии высевали на селективную LB-среду, содержащую канамицин (25 мкг/мл), для отбора рекомбинантных клонов.

Для автоиндукции экспрессии по методу Штудииера использовалась модифицированная среда RYP-5052, состоящая из 1% пептона, 0,5% дрожжевого экстракта, 50 мМ Na₂HPO₄, 50 мМ K₂HPO₄, 25 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgSO₄, 0,5% глицерина, 0,05% глюкозы и 0,2% лактозы. В среду RYP-5052, содержащую канамицин в концентрации 25 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-продуцента. После этого ферментировали при 25 или 37 °С в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об/мин в течение 32 или 18 ч или до отсутствия существенного изменения ОП₆₀₀ за 1 ч. Далее отбирали аликвоту клеток на анализ. Аликвоты хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Экспрессию рекомбинантного фермента контролировали с использованием электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли. Ферментацию проводили в 2-литровых колбах в 250 мл среды, содержащей канамицин в концентрации 25 мкг/мл, в термостатированной качалке роторного типа при 37 °С и 250 об/мин.

Определение содержания белка имидазолонпропионат-аминогидролазы в клетках *E. coli* методом денситометрического анализа полученной электрофореграммы с использованием компьютерной программы TotalLab.

Для определения стабильности очищенного препарата рекомбинантной имидазолонпропионат-аминогидролазы его разбавляли в 50 раз в таких же буферах с pH от 3 до 12 и концентрацией 0,1 М. Концентрация белка в пробах составляла 0,2 мг/мл. Образцы инкубировали при +30 °С в течение 10 мин. Затем отбирали аликвоты и вносили их в инкубационную смесь для определения активности в стандартных оптимальных условиях при pH 8,5.

Результаты и их обсуждение

С помощью программы SignalP 3.0 и базы данных NCBI [6] идентифицирован ген *hutI*, кодирующий имидазолонпропионат-аминогидролазу.

Праймеры содержали на 5'-концах дополнительные последовательности, включающие сайты рестрикции NcoI для прямого праймера и HindIII для обратного, и были предназначены для амплификации и последующей встройки структурной области гена в полилинкер экспрессирующего вектора рЕТ28а по соответствующим сайтам. Обратный праймер был сконструирован таким образом, чтобы полученный ампликон не содержал стоп-кодона и обеспечивалась состыковка рамок считывания гена и последовательности *His6*.

В результате клонирования гена *hutI* всего получено шесть клонов, содержащих 5,0-kb фрагменты.

Для создания системы экспрессии гена, кодирующего имидазолонпропионат-аминогидролазу, использован коммерческий вектор рЕТ28а+, содержащий в своем составе ключевые позиции, которые отражены в таблице 1.

Таблица 1

Описание участков рЕТ28а+

Участок	Позиция
T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (BamH I - Xho I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

Физическая карта экспрессионного вектора представлена на рисунке 1.

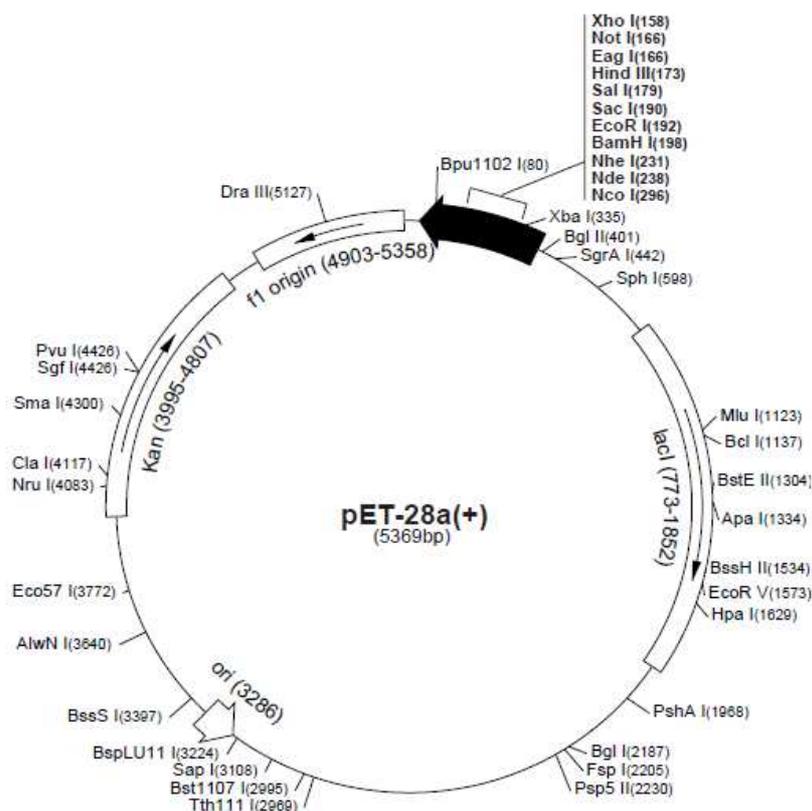


Рис. 1. Коммерческий экспрессионный вектор pET28a+

Экспрессию рекомбинантного фермента контролировали с использованием электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли. На рисунке 2 представлены результаты электрофореза.

Был оптимизирован уровень экспрессии имидазолонпропионат-аминогидролазы по времени и температуре индукции. В качестве индуктора использовали ИПТГ в концентрации 1 мМ. Индукцию экспрессии проводили, когда ОП₆₀₀ культуры клеток достигла 0,6–0,8 оптических единиц. После этого через определенное время (от 15 мин до 1 ч) из культур клеток после индукции отбирали аликвоты для анализа. В качестве контроля использовали культуры клеток без индукции. Без индукции клетки растут по логарифмическому закону: до 0,6–0,8 оп.ед. наблюдается рост по линейной зависимости, далее до 3,8–4,2 оп.ед. происходит экспоненциальный рост, после чего наблюдается выход кривой роста на плато в стационарную фазу роста. После добавления к культуре клеток индуктора 1 мМ ИПТГ наблюдается замедление роста клеток, изменение количества клеток с 0,6 до 1,5 оп.ед. происходит за 4 ч, однако далее наблюдается начало экспоненциального роста культуры клеток с более поздним выходом на плато в стационарную фазу роста.

При изучении динамики биосинтеза рекомбинантного белка имидазолонпропионат-аминогидролазы клетками *E. coli* после индукции экспрессии 1 мМ ИПТГ было показано, что максимальный уровень экспрессии гена *hutI* в клетках *E. coli* при индукции 1 мМ ИПТГ наблюдается после 3-часовой ферментации. При этом, по данным денситометрического

анализа, выход белка составляет 32% от общего клеточного белка (рис. 2). При проведении индукции экспрессии при температуре 25 °С наблюдался более длительный выход культур клеток в экспоненциальный рост, составивший при температуре индукции 25 °С 9 часов.

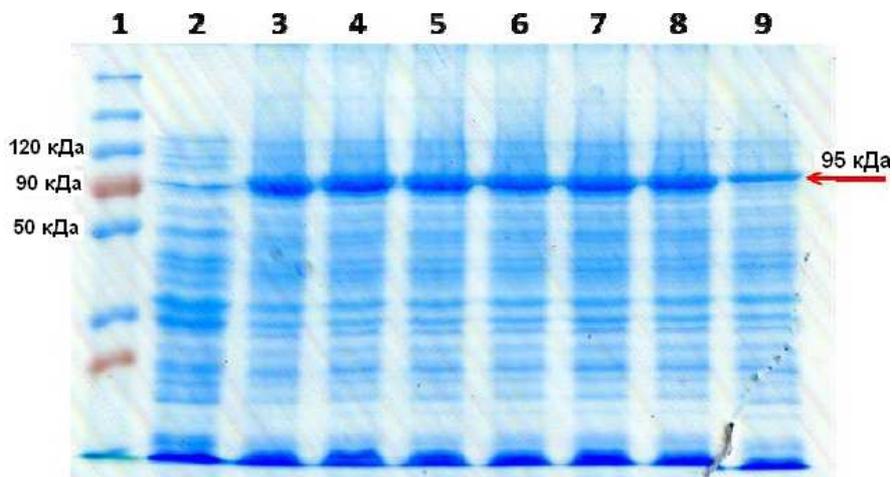


Рис. 2. Анализ лизатов трансформированных клеток *E. coli* BL21DE3 после индукции экспрессии в различных условиях:

1 – маркер молекулярного веса PageRuler™ Prestained Pro-tein Ladder (Fermentas); 2 – отрицательный контроль (лизат клеток штамма-продуцента без добавления индуктора проведения индукции); 3 – лизат трансформированных клеток *E. coli* BL21DE3 после индукции экспрессии 0,2%-ной лактозой по методу Штудиера при температуре 25 °С в течение 32 ч; 4 – лизат трансформированных клеток *E. coli* BL21DE3 после индукции экспрессии 0,2%-ной лактозой по методу Штудиера при температуре 37 °С в течение 18 ч; 5 – лизат трансформированных клеток *E. coli* BL21DE3 после индукции экспрессии 1 мМ ИПТГ при температуре 37 °С в течение 3 ч; 6 – лизат трансформированных клеток *E. coli* BL21DE3 после индукции экспрессии 1 мМ ИПТГ при температуре 37 °С в течение 5 ч; 7 – лизат трансформированных клеток *E. coli* BL21DE3 после индукции экспрессии 1 мМ ИПТГ при температуре 25 °С в течение 5 ч; 8 – лизат трансформированных клеток *E. coli* BL21DE3 после индукции экспрессии 1 мМ ИПТГ при температуре 25 °С в течение 8 ч; 9 – лизат трансформированных клеток *E. coli* BL21DE3 после индукции экспрессии 1 мМ ИПТГ при температуре 25 °С в течение 3 ч.

При этом максимальный уровень экспрессии (32%) для всех температур индукции оставался неизменным.

Результаты изучения индукции экспрессии 0,2%-ной лактозой по методу Штудиера представлены на рисунках 3, 4.

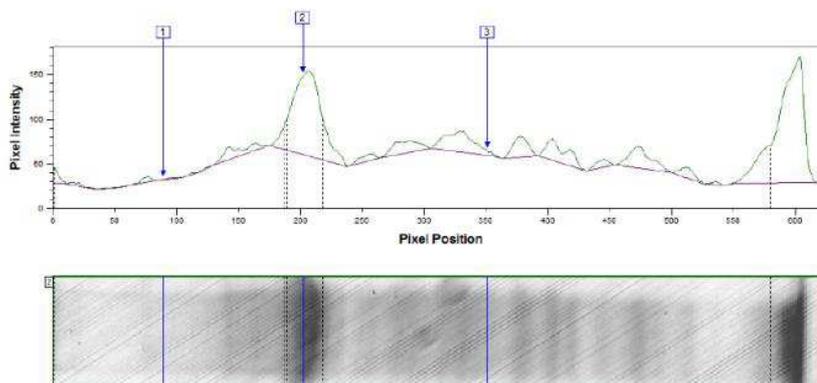


Рис. 3. Денситограмма лизата трансформированных клеток *E. coli* BL21DE3 после индукции экспрессии 0,2%-ной лактозой по методу Штудиера при температуре 25 °С в течение 32 ч.

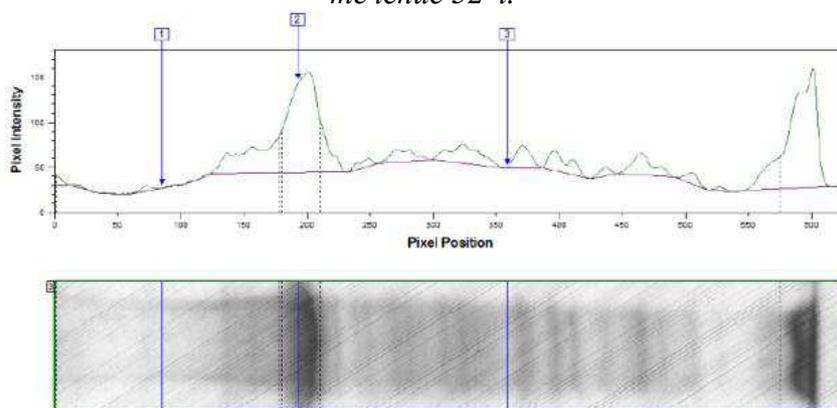


Рис. 4. Денситограмма лизата трансформированных клеток *E. coli* BL21DE3 после индукции экспрессии 0,2%-ной лактозой по методу Штудиера при температуре 37 °С в течение 18 ч.

Средняя оптическая плотность (ОП₆₀₀) культуры трансформированных клеток *E. coli* BL21DE3 была одинаковой при разных температурах культивирования и составила 7 оп.ед. В результате денситометрического анализа было показано, что в трансформированных клетках *E. coli* BL21DE3 изучаемый белок накапливается в количестве 35% от общего клеточного белка при температуре ферментации 37 °С и 33% при температуре 25 °С.

Данный метод индукции экспрессии был выбран как более простая, эффективная и недорогая альтернатива классической индукции с использованием ИПТГ в системах экспрессии, основанных на лактозном опероне. При использовании автоиндукции не требуется ни следить за оптической плотностью культуры клеток, ни добавлять индуктор.

Разработанная схема очистки рекомбинантного фермента включает дробное осаждение сульфатом аммония и две хроматографические стадии: металлохелатную и гидрофобную.

Для анализа чистоты фермента использовали диск-электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия. Результаты очистки представлены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты очистки рекомбинантной имидазолонпропионат-аминогидролазы *Pseudomonas putida* по оптимизированной схеме

Стадия очистки	Экстракт	Осаждение сульфатаммония (25-50%)	Ni-NTA-сефароза	Гидрофобная хроматография	Гидрофобная хроматография, «хвост»
Удельная активность,	0,276	0,822	2,217	3,316	2,228

Е/мг					
Активность, Е/мл	2,57	16,60	11,64	12,80	4,10
Белок, мг/мл	9,30	20,20	5,25	3,90	1,80
Объем, мл	110,0	16,5	20,0	13,7	10,5
Суммарная активность, Е	282,7	273,9	232,8	175,4	43,1
Суммарный белок, мг	1023,0	333,0	105,0	52,9	19,3
Выход, %	100	97	85	58	14

Данные, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что при гидрофобной хроматографии фермент элюируется двумя пиками. При этом 80% фермента элюируется в первой фракции с удельной активностью 3,3 Е/мг, а около 20% фермента с удельной активностью 2,2 Е/мг элюируется во второй фракции. Выход фермента в результате очистки составляет около 60%.

Определяли стабильность очищенного препарата рекомбинантной имидазолонпропионат-аминогидролазы.

Полученные результаты представлены на рисунке 5.

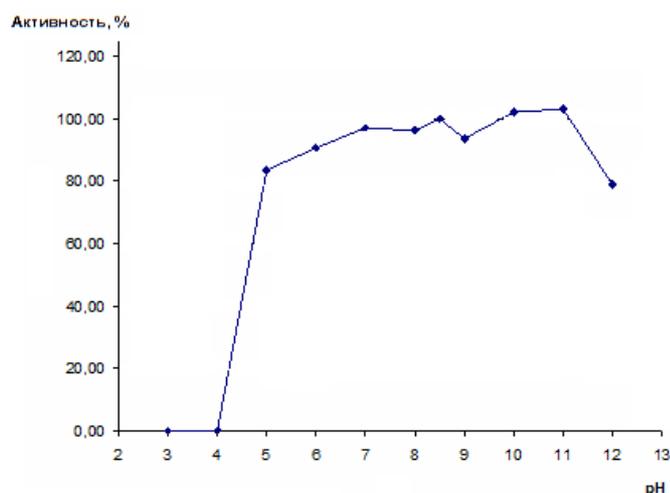


Рис. 5. Стабильность препарата рекомбинантной имидазолонпропионат-аминогидролазы при различных значениях pH

Из рисунка 5 следует, что рекомбинантная имидазолонпропионат-аминогидролаза наиболее стабильна при pH 7,0 и более щелочных значениях вплоть до pH 11,0. При pH 11,0 даже происходит некоторое увеличение активности. По-видимому, это объясняется тем, что ингибирование фермента ДТТ является обратимым и происходит быстрее при pH 11,0. Кроме того, в кислой среде (pH ниже 7,0) белок быстро и необратимо инактивируется. Например, при pH 5,0 сохраняется 83% активности, а при pH 4,0 фермент уже полностью инактивируется после 10-минутной инкубации при +30 °С.

Зависимость активности рекомбинантной имидазолонпропионат-аминогидролазы от температуры определяли в стандартной реакционной смеси, которую предварительно выдерживали 10 мин при температуре реакции. Измерения проводили на спектрофотометре с термостатом, поддерживающим нужную температуру с точностью $\pm 0,1$ °С. Реакцию инициировали ферментом (10,1 мг/мл), предварительно разбавленным в 50 раз 0,1 М Трис-НСI буфером с рН 8,5. Для расчета удельной активности фермента использовали линейный участок кинетической кривой. При построении графика (рис. 6) использовали средние арифметические значения полученных удельных активностей.

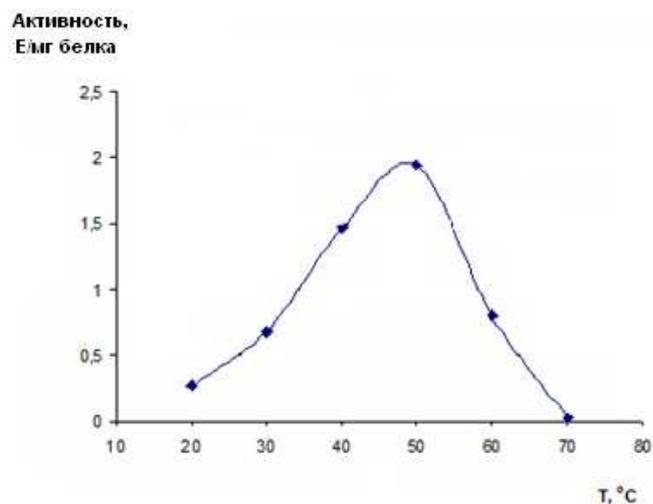


Рис. 6. Зависимость активности рекомбинантной имидазолонпропионат-аминогидролазы от температуры

Как следует из рисунка 6, температурный оптимум реакции наблюдается при температуре +50 °С. Активность фермента уменьшается более чем в два раза при +60 °С, причем такое снижение активности не может быть вызвано необратимой денатурацией фермента. Так, было показано, что при данной температуре фермент теряет 50% активности за 15 мин, тогда как время реакции в данной серии экспериментов составляет 4 минуты. Данный факт также подтверждается тем, что во время реакции не наблюдается значительных отклонений от линейности, как, очевидно, должно быть при денатурации белка в кювете.

Кинетические параметры рекомбинантного фермента, очищенного по разработанной схеме, рассчитанные на основании метода начальных скоростей, представлены в таблице 3 и на рисунке 7.

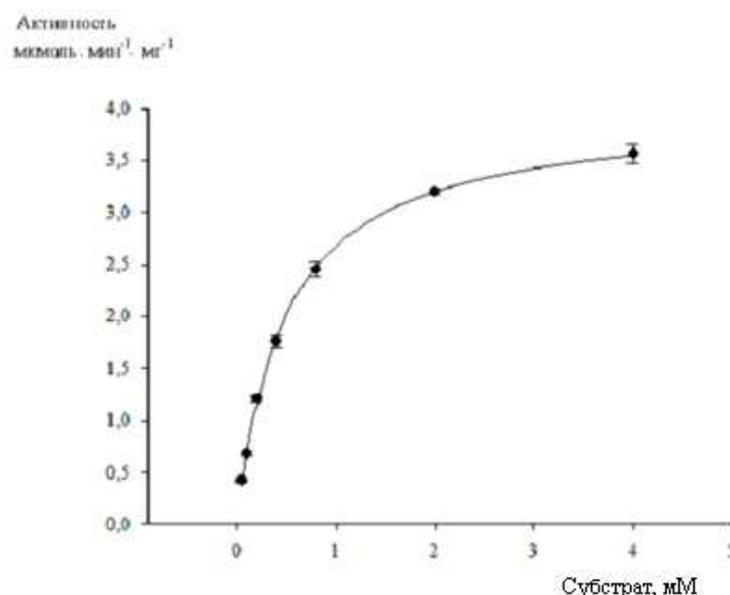


Рис. 7. Кривая насыщения субстратом имидазолонпропионат-аминогидролазы

Таблица 3

Зависимость активности имидазолонпропионат-аминогидролазы от концентрации субстрата в реакционной смеси

Концентрация субстрата, мМ	Специфическая активность имидазолонпропионат-аминогидролазы, мкмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка		
0,05	0,3961	0,4304	0,4266
0,10	0,6361	0,7161	0,6894
0,20	1,1732	1,2532	1,1922
0,40	1,7141	1,8664	1,6950
0,80	2,3312	2,5826	2,4416
2,00	3,1730	3,1692	3,2491
4,00	3,5896	3,7033	3,3911

Концентрация белка в реакционной смеси составляла 1,33 мкг/мл. Кинетические параметры имеют следующие значения:

V_{\max} (мкмоль мин⁻¹ мг⁻¹) = 3,9740 ± 0,056; K_m (мМ) = 0,4847 ± 0,021; k_{cat} (с⁻¹) = 5,193; k_{cat}/K_m (М⁻¹ с⁻¹) = 10713.

Заключение

1. Выделен hutI, кодирующий имидазолонпропионат-аминогидролазу, из клеточных экстрактов *Pseudomonas putida* B5437.
2. Клонирован ген hutI, кодирующий имидазолонпропионат-аминогидролазу.
3. Осуществлена экспрессия гена имидазолонпропионат-аминогидролазы в *Escherichia coli* BL21DE3.
4. Выделена и очищена рекомбинантная имидазолонпропионат-аминогидролаза *Pseudomonas putida*.
5. Изучены биохимические свойства рекомбинантной имидазолонпропионат-аминогидролазы *Pseudomonas putida*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № Ор 15-38-50107/15 от 05.02.2015.

Список литературы

1. Атанасов А. Биотехнология в растениеводстве. – Новосибирск : ИЦиГСО РАН, 1993. – 241 с.
2. Барановов В.С. Генная терапия – медицина XXI века // Соросовский образовательный журнал. - 1999. - № 3. - С. 3–68.
3. Бекер М.Е., Лиепиньш Г.К., Райпулис Е.П. Биотехнология. - М. : Агропромиздат, 1990. - 334 с.
4. Глебов О.К. Генетическая трансформация соматических клеток // Методы культивирования клеток. - Л. : Наука, 1988.
5. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. - М. : Мир, 2002.
6. National Center for Biotechnology Information. База данных NCBI http://molbiol.edu.ru/review/01_02.html.

Рецензенты:

Короткий И.А., д.т.н., профессор, декан заочного факультета ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет)», г. Кемерово;

Бабич О.О., д.т.н., профессор кафедры «Бионанотехнология» ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет)», г. Кемерово.