

31. *Agabalyan A.S., Zakharyan R.A., Akopyan J.I., et al.* In: International small conference "Brain and immune system", 2, Yerevan, 1997.
32. *Bocci V.* Immunomodulation: New Frontiers and advances Proc. of asymp. On Recent advances on immunomodulators, 131-154, New York, 1984.
33. *Bribanti S., Yarson J., Foli M. Stal.,* Gastroenterology, 1077, 812-817, 1994.
34. *Davtyan O.Y., Bagdassarjan A.A., Agabalyan A.S. et al.* 3-rd Biennial congress to the European council coloproctology, 44-45, Berlin, 1990.
35. *Hubbett H.R., Kvalnes-Krick K., Carter W.* Cancer. Res., 45, 2481-2486, 1985.
36. *Lieberman A.P., Pitha P.M., Shin H.S. et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86, 6348-6352, 1989.
37. *Sedman P.C., Ramsden C.W., Brennan T.G. et al.* Br. Journ. Surg., 75, 976-981, 1988.
38. *Serrou B., Rey A., Cupissol D. et al.* In: New immunomodulating agents and biological modifiers, 5, 62-72, 1982.
39. *Tufano M.A., Cipollero de L' Ero G.* Immunopharmacol. Immunotoxicol, 14, 769-782, 1992.
40. *Zavalyalov V.P., Navolotskaya E.V., Abramov V.M. et al.* FEBS lett., 278, 187-189, 1991.

Поступила 2 IV. 1999

Биолог. журн. Армении, 1-2 (53), 2001

УДК 577.212.175.3

ЭКСПРЕССИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

В.Е. КАРАПЕТЯН

Институт биохимии НАН РА, 375014, Ереван

Использование технологии получения рекомбинантной ДНК сделало возможным получение бактериальных штаммов, продуцирующих различные биологически активные белки и пептиды. Экспрессия эукариотических генов в штаммах *Escherichia coli*, помимо решения некоторых фундаментальных задач молекулярной биологии, позволяет решать и некоторые прикладные задачи медицины и других областей деятельности человека. В клетках микроорганизмов используются два основных пути экспрессии чужеродных генов: прямая экспрессия и экспрессия гибридных генов. Первый способ используется для получения экспрессии белков, которые стабильны в клетках бактерий и менее чувствительны к протеолитической деградации. Второй путь используется для экспрессии пептидов. Ген экспрессируемого эукариотического пептида соединяется с геном бактериального белка и регуляторным элементом бактерии. Бактериальный белок в таком случае называется белком носителем, или буферным белком. Гибридный белок устойчив в клетках микроорганизмов и может нарабатываться в больших количествах.

Ռեկոմբինանտ ԴՆԹ-ի ստացման տեխնոլոգիայի կիրառումը հնարավոր է դարձրել տարբեր կենսաբանական ակտիվ սպիտակուցներ և պեպտիդներ արտադրող բակտերիալ շտամների ստացումը: Էուկարիոտիկ գեների արտահայտումը *Escherichia coli* բջիջներում թույլ է տալիս մոլեկուլային կենսաբանության մի շարք հիմնադրային խնդիրներին զուգահեռ լուծել նաև կիրառական հարցեր կապված բժշկության և ժողովրդական տնտեսության այլ ոլորտների հետ: Մանրէների բջիջներում օգտագործվում են օտարածին գեների արտահայտման 2 հիմնական

ուղիներ ուղղակի արտահայտուն և հիբրիդային գեների արտահայտուն: Առաջին եղանակը կիրառվում է սպիտակուցների արտահայտման համար, որոնք կայուն են բավերիաների բջիջներում և ավելի քիչ զգայուն պրոտեոլիտիկ քայքայման նկատմամբ: Երկրորդ եղանակն օգտագործվում է պեպտիդների լեպտոսիսի համար: Արտահայտվող էուկարոտիկ պեպտիդի գենը միացվում է բակտերիալ սպիտակուցի գենի և բակտերիայի կարգավորիչ էլեմենտի հետ: Այդ դեպքում բակտերիալ սպիտակուցը կոչվում է կրող կամ բուֆերային սպիտակուց: Հիբրիդային սպիտակուցը կայուն է մանրէների բջիջներում և կարող է արտադրվել մեծ քանակությամբ:

The use of recombinant DNA technology makes possible to construct bacterial strains, producing different biologically active proteins and peptides. The expression of eukaryotic genes in *Escherichia coli* strains besides of some fundamental problems of molecular biology permits to solve the applied problems of medicine and other spheres of human activity. There are two main ways of expression of heterologous genes in cells of microorganisms: direct expression and expression of hybrid genes. The first method is used for obtaining of protein expression, which are stable in bacteria and are less sensitive to proteolytic degradation. The second method is used for the expression of peptides. The hybrid gene is expressed under the control of bacterial regulatory elements. Hybrid protein is stable in microbial cells and can worked out in large number.

Экспрессия - гибридный белок - векторы - секреция - бактерии - промотор - эукариотические гены

При экспрессии эукариотических генов в клетках микроорганизмов необходимо получить последовательность, в которой регуляторные элементы прокариот соединены с эукариотическим геном. Для клонирования небольших пептидов ген нужного пептида соединяют с кодирующей последовательностью одного из белков микроорганизма так, чтобы эукариотический ген попал в рамку считывания эндогенного белка. При этом транскрипция регулируется бактериальным промотором и синтезируется гибридный транскрипт, трансляция которого приводит к синтезу гибридного белка: бактериальный белок-эукариотический белок. Кодируемый гибридным геном белок устойчив в клетке хозяина и может нарабатываться в больших количествах.

Исследование экспрессии генов эукариот в клетках микроорганизмов представляет интерес по ряду причин. Они способствуют решению некоторых фундаментальных вопросов молекулярной биологии. Огромный интерес представляет и практическая сторона. Экспрессия гетерологичных генов в бактериальной клетке открывает качественно новые перспективы в производственном получении важных для человека белковых физиологически активных веществ.

Для правильной экспрессии чужеродной ДНК, в особенности эукариотического происхождения, предстоит решить ряд сложных проблем. Необходимыми условиями экспрессии генов является стабильная репликация чужеродной ДНК в клетке, правильный контроль транскрипции гена, трансляция мРНК на рибосомах, процессинг белка в конечную зрелую форму. Экспрессия гена может регулироваться на всех перечисленных уровнях. Экспрессия структурных генов прокариот зависит от регуляторных участков: промоторов, операторов, участков связывания рибосомы. Для достижения эффективной экспрессии эукариотических генов в бактериях необходимо, чтобы конструкция "экспрессируемых плазмид" максимально приближалась к организации участков "промотор-ген" у прокариот. Логическим решением этой проблемы является соединение *in vitro* интересующих исследователя генов с высокоэффективными промоторами бактерий и фагов, таких как промотор *lac* оперона, *trp* оперона, P_L и P_R промоторы фага λ . Поскольку эукариотическим генам не предшествует область, кодирующая подходящие для *E.coli* последовательности Шайна-Далгарно, для экспрессии в клетках кишечной палочки эукариотических генов необходимо конструирование эффективных участков инициации трансляции, что является одним из способов увеличения уровня экспрессии генов.

Принцип слитых (гибридных) белков. Некоторые эукариотические белки, такие как гормон роста [14], β -глобин [15], инсулин и другие удалось получить с высоким выходом подстраиванием исследуемого гена под сильный бактериальный промотор с образованием гибридных участков инициации трансляции. Этот способ экспрессии эукариотических генов называется прямой экспрессией. Такой подход оказывается неприемлемым для синтеза многих пептидов. В частности, короткие чужеродные пептиды, синтезированные в *E.coli*, подвергаются протеолитической деградации [33]. Для повышения стабильности пептидных

продуктов в клетках микроорганизмов используют метод экспрессии пептидов в составе гибридных белков или мультимерных комплексов. Принцип метода состоит в том, что ген нужного пептида соединяют с кодирующей последовательностью одного из белков микроорганизма так, чтобы эукариотический ген попал в рамку считывания эндогенного белка. При этом транскрипция регулируется бактериальным промотором и синтезируется гибридный транскрипт, трансляция которого приводит к синтезу гибридного белка: бактериальный белок-эукариотический белок. Кодируемый гибридным геном белок устойчив в клетке хозяина и может нарабатываться в больших количествах. Из этих двух подходов экспрессии эукариотических генов в клетках бактерий мы остановимся на рассмотрении второго - образования слитых (гибридных) белков. Необходимо отметить, что первые работы по экспрессии эукариотических генов с получением гибридных белков имели своей целью показать принципиальную возможность экспрессии генов в бактериальной клетке, а не получение конечного биологически активного продукта. Так, впервые метод применен для экспрессии синтетического гена соматостатина в клетках *E.coli* [18]. Ген соматостатина клонировался в плазмиде pBR322, содержащей регуляторную область лактозного оперона и кодоны для первых 7 аминокислот β -галактозидазы. Однако гибридный белок все еще подвергался протеолитической деградации из-за небольшого размера. Для получения большого гибридного белка авторы переклонировали ген в плазмиду, содержащую регуляторные области оперона со значительной частью гена β -галактозидазы, что действительно привело к предохранению соматостатина от деградации. Расщепляли гибридный белок BrCN по остатку Met, предшествовавшему последовательности соматостатина. Выход соматостатина из гибридного белка составлял 0,001-0,03% от суммарного клеточного белка. Таким образом, размер гибридного белка оказывает влияние на степень деградации гетерологичного продукта в клетках микроорганизмов.

Выбор вектора для клонирования. В качестве векторов при клонировании гибридных генов в микроорганизмах обычно используют плазмиды небольшого размера, репликация которых находится под ослабленным контролем. Для селекции трансформантов и поддержки плазмиды в бактериальной популяции она должна нести один или несколько маркеров, по которым можно вести отбор, наконец, такая плаزمиды должна содержать единичные уникальные сайты для ферментов рестрикции. Примером такой плазмиды является pBR322. Сайты рестрикции находятся в генах устойчивости к двум антибиотикам - ампицилину и тетрациклину. Когда в один из таких генов встраивается фрагмент чужеродной ДНК, ген инактивируется. Таким образом, успешное встраивание фрагмента чужеродной ДНК в один из этих генов легко детектировать по исчезновению у бактерий устойчивости к данному антибиотику. С другой стороны, когда такая плазмиды попадает в бактериальную клетку, последняя становится устойчивой к тому антибиотику, который обезвреживается продуктом второго, интактного гена.

В настоящее время широко используются векторные плазмиды серии pUC [24]. В их состав входят синтетические полилинкерные участки с множеством уникальных сайтов рестрикции. Плазмиды pUC18 и pUC19 имеют большее число копий на клетку при 37°, чем родительская плазмиды pBR322, что вызвано одиночной точечной мутацией в праймерной РНК II [23]. Описано два типа векторных систем, в которых трансляция клонированных генов регулируется поздним промотором фага T4. Первый тип характеризуется одновременным присутствием в бактериальной клетке как целевого гена, встроенного в многокопийную плазмиду, так и гена T7 РНК-полимеразы, находящегося в той же плазмиде или хромосоме хозяина. Однако имеющая место неполная репрессия гена полимеразы T7, контролируемая индуцибельным промотором *lac UV5*, приводит к синтезу фермента в количествах, достаточных для эффективной транскрипции целевого гена [18], что может препятствовать созданию плазмид с генами, продукты которых токсичны для клетки, или приводить к плазмидной нестабильности. Описано новое семейство экспрессионных плазмид такого типа. Плазмиды имеют область начала репликации *ori p15* и совместимы с плазмидами - производными *ColE1*. Это позволяет осуществить в одной клетке синтез белков с новых векторов и старых, основанных на *ColE1* T7-экспрессионных векторов. Векторы являются среднекопийными и содержат область *ori* фага M13, что позволяет получить одно- и двунитевую ДНК. Плазмиды несут детерминант *Km^r* устойчивости к канамицину, что позволяет избежать их утраты, часто наблюдаемые в случае векторов с детерминантом *Ap^r*. Одна

из плазмид несет ген *lacI* для более строгой регуляции продукции токсичных белков [26].

Второй тип основан на раздельном введении генов в бактерию предварительно путем трансформации клеток *E.coli* с плазмидой с экспрессируемым геном и последующим инфицированием их бактериофагами T7 или λ , несущими ген РНК-полимеразы. Однако при использовании этих фагов как носителей гена РНК-полимеразы возникает ряд трудностей, связанных с быстрым лизисом бактериальных культур и сложностью подбора оптимальных условий инфицирования клеток. Указанные ограничения могут быть преодолены при использовании нитчатых бактериофагов, которые в процессе инфекции клеток *E.coli* не приводят к их лизису, а лишь несколько замедляют скорость роста инфицированных культур [19].

Выбор промоторов. Для эффективной экспрессии чужеродных генов используются сильные P_L и P_R промоторы фага λ . Была сконструирована серия плазмид рНУВ, содержащих P_L промотор фага λ [5, 7]. Плазмида содержит 4 одиночных сайта для рестриктаз, стабильна в лизогенных штаммах, но не трансформируется нелизогенно. Транскрипция с нерепрессивного P_L промотора влияет на какие-то свойства плазмиды, возможно на репликацию. Поэтому в нее встроены фрагмент, содержащий термочувствительный мутант гена *cI* репрессора. При 30° синтезируется нормальный *cI* репрессор и транскрипция с P_L промотора не происходит, а при 42° репрессор инактивируется и начинается интенсивная транскрипция. Для экспрессии фибробластного интерферона использовали промотор, контролируемый термочувствительным *cI* геном. В одном случае синтезировался гибридный белок из 82 аминокислот β -лактамазы-фибробластного интерферона, а в другом - 98 аминокислот MS2-полимеразы-интерферона. После индукции при 42° уровень экспрессии составил 100 000 ед/литр бактериальной культуры [12].

Для экспрессии в *E.coli* наиболее часто используются гены β -галактозидазы (*lac Z*), β -лактамазы (*bla*), антранилатсинтазы (*trp*), щелочной фосфатазы, ген белка *A.S.aureus* и белка внешней мембраны *Omp F*.

Выбор *lac Z* и *trpE* обуславливается в частности тем, что промоторы этих генов P_{lac} и P_{trp} хорошо изучены, это сильные бактериальные промоторы, обладающие оперативными участками, позволяющими контролировать уровень экспрессии гибридного белка [31]. Осуществлена экспрессия в виде гибридных белков с использованием *lac* для некоторых эукариотических белков. При использовании химически синтезированного гена инсулина отдельно были получены гибридные белки для А и В цепей инсулина [11]. В виде гибридного белка с β -галактозидазой был получен β -эндорфин [30], урогастрон [32], синтетический ген ангиогенина человека [2]. Сконструированы новые векторы, содержащие гибридный T7 *lac*-промотор, обеспечивающие экспрессию белков типичных для *E.coli*. В этих векторах *lac*-оператор расположен на расстоянии 14 п.н. после участка инициации транскрипции РНК-полимеразы фага T7. Векторы отличаются более высокой копийностью. Используя их, получили продукцию различных белков с молекулярной массой от 10 до 150 кДа, в том числе несколько белков, токсичных для *E.coli*. Уровень экспрессии белков в растворимой форме повышается при культивировании клеток в течение ночи при 15° [28].

Сконструирован вектор рЕН1 для клонирования токсичных белков в клетках *E. coli*. Для строгой регуляции экспрессии авторы использовали векторы с промотором *lac*, а не *ara*. С 3'-стороны от промотора *Lac UV5* расположен сайт связывания рибосом и модифицированным геном *lac Z'* с уникальным сайтом для рестрикции *Nco I*. Вектор использовался для клонирования маннитпермеазы *E. coli* и адренергического рецептора β человека. Экспрессия индуцируется изопропил β -D-тио-галактозидазой [17].

Экспрессию эукариотических генов получают также под контролем триптофанового промотора, который сильнее *lac* промотора. Изучена экспрессия эпидермального фактора роста крысы в виде гибридного белка, который состоит из 320 аминокислотных остатков *TrpE*, лизинового линкера и полипептида эпидермального фактора роста [13]. Полученный гибридный белок, образующийся в клетке, формирует нерастворимые тельца включения.

Получена рекомбинантная плазмида, обеспечивающая синтез в *E.coli* под контролем промотора P_{trp} химерного белка, состоящего из иммунного интерферона человека и С-концевой части α -фетопротенина человека. Показано, что продукция химерного белка существенно ниже продукции γ -интерферона при использовании тех же самых регуляторных элементов и условий

культивирования. Гибридный белок содержится преимущественно в тельцах включения [6].

Сконструированы векторы, в которых последовательности, кодирующие сигнальные пептиды трех секретируемых белков - щелочной фосфатазы (Pho A), белка внешней мембраны OmpA *E.coli* и белка A *S.aureus*, были помещены под контроль trp и tac - промоторов. Векторы использовались для получения экспрессии и секреции гормона роста человека. В периплазматической фракции штаммов, трансформированных различными плазмидами, кодирующими гибридные последовательности, определялся уровень накопления зрелого гормона роста методом иммуоферментного анализа. Наиболее высокий уровень был выявлен в периплазматической фракции штамма, содержащего гибридные последовательности Omp A - hGH - 3-5 мкг/мл бактериальной культуры [3].

Под контролем tac-промотора получена экспрессия заякоренной гидролазы фосфорорганических соединений на поверхности клеток *E. coli*. Наибольшее разложение паратиона наблюдалось у штамма *E. coli* Im105. Для образования активной гидролазы фосфорорганических соединений в среду для выращивания клеток добавлялся хлорид кобальта в поздней стационарной фазе роста [21].

Описаны рекомбинантные плазмиды, направляющие в *E. coli* синтез гибридных белков, содержащих часть щелочной фосфатазы *E.coli* и адренкортикотропный гормон 1-24 и 1-39 человека [10]. Но в этом случае гибридный белок остается в цитоплазме, формируя "тельца включения".

Выбор белка-носителя. Клетки *E.coli* содержат ферменты, отщепляющие N-концевой метионин, однако эти ферменты действуют не на все полипептиды в равной степени. Таким образом, белки полученные в результате прямой экспрессии эукариотических генов, могут содержать N-концевой метионин. Например, такая проблема возникла в случае экспрессии гормона роста человека [14]. Кроме того, чужеродные белки, особенно полипептиды небольшого размера, не обладающие компактной пространственной структурой, расщепляются протеазами *E.coli*. В случае высокого синтеза рекомбинантного продукта он может образовывать малорастворимые агрегаты, или тельца включения, и тогда требуются специальные методы для его перевода в растворимое состояние [20]. Наконец, экспрессии некоторых белков не удается достичь из-за их токсичности для клеток *E.coli* [29]. Многие из этих проблем позволяет решить секреция белков через цитоплазматическую мембрану *E.coli* в периплазматическое пространство или во внешнюю среду. При секреции в периплазматическое пространство происходит процессинг сигнального пептида и рекомбинантный продукт накапливается в периплазме. В периплазме накапливается не только полный продукт, но и продукты его протеолитической деградации [4, 8]. Преимуществом секреции является упрощенное получение продукта, в частности, когда белок выделяется в культуральную жидкость. Секреторные белки более легко очищаются в одноступенчатой процедуре, но не все гетерогенные продукты эффективно секретируют, так что общий выход чужеродных белков в секретируемых системах может быть меньше, чем получаемый в интрацеллюлярном пространстве [27]. Получена секреция эпидермального фактора роста человека под промотором и лидером щелочной фосфатазы (AP) *E.coli* [27]. Секреция эпидермального фактора роста в периплазму составляла 95% и достигала 2 мг олигопептида на 1л бактериальной культуры. Следует отметить, что при "прямой" экспрессии эпидермального фактора роста под промотором щелочной фосфатазы без лидерной области AP продукт обнаруживается в меньших количествах (21 мкг/л) и полностью отсутствует в периплазме.

Грам-отрицательные бактерии секретируют непосредственно в культуральную среду только несколько белков, и в каждом случае задействованы различные, еще до конца не изученные механизмы [25]. В некоторых случаях секретируемые белки грам-положительных бактерий и их фрагменты секретируются в грам-отрицательных бактериях. Например, гибридные плазмиды, несущие промотор, сигнальную последовательность и tandem IgG-связывающих доменов белка A *S. aureus* и слитую с ним последовательность гена инсулин подобного фактора роста, способны обеспечить секрецию до 85% гибридного белка в культуральную среду [22]. Аналогичные результаты были получены и в случае гибридных белков, содержащих белок A и адренкортикотропный гормон человека [1]. Белок A - это мономерный белок, ковалентно связывающийся с пептидогликанами клеточной стенки у большинства штаммов *S. aureus*. Белку предшествует

сигнальный пептид, который отщепляется во время секреции. В N-конце белка находится участок, специфически связывающийся с константной частью иммуноглобулинов (фракция Fc) многих эукариот. Uhlen с сотрудниками [34] сконструировали две векторные плазмиды, содержащие ген, кодирующий белок А с целью получения гибридных белков, которые можно очистить с помощью аффинной хроматографии. Ген белка А был соединен с геном *lac Z E. coli*. Штаммы *E. coli*, содержащие такие плазмиды, продуцируют гибридный белок, обладающий способностью с IgG и β -галактозидазной активностью. Плазмиды, в которых отсутствовал C-конец белка А, продуцировали в 3-4 раза больше гибридного белка, чем плазмиды, содержащие C-конец (X-домен) [34]. Сконструированы векторы для экспрессии гетерологичных белков, содержащие гексагистидиновую метку на N-конце. В большинстве изученных случаев экспрессированные белки были растворимыми. Метка His₆ позволяет очистить изучаемые белки в одностадийной процедуре методом Ni-аффинной хроматографии [9, 28]. Аффинной хроматографией на целлюлозе очищались гибридные белки, полученные при использовании новых высококопийных плазмид pTUGa и pTUGAS, обладающих высоким уровнем индуцибельной трансформации [16]. Во всех перечисленных выше случаях конечный продукт получается с помощью специфического гидролиза гибридного белка, отщепляясь от белка носителя.

Таким образом, при экспрессии эукариотических генов в клетках микроорганизмов необходимо получить последовательность, в которой регуляторные элементы прокариот соединены с эукариотическим геном. Для получения экспрессии относительно небольших генов продукт клонированного гена получают в составе гибридного белка. Важным этапом экспрессии эукариотических генов является подбор оптимальных условий, обеспечивающий высокий уровень и полноценность получаемого в бактериях продукта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карапетян В.Е., Парсаданян А.Ш., Галоян А.А. Молекулярная биология, 28, 3, 595-601, 1994.
2. Коваленко С.П., Лисняк И.А., Мертвецов Н.Н. Биоорганическая химия, 15, 4, 492-498, 1989.
3. Нурмухамбетова С.Т., Морозов И.А., Чернов Б.К., Рубцов П.М. Молекулярная биология, 30, 1, 111-120, 1996.
4. Парсаданян А.Ш., Карапетян В.Е., Рубцов П.М., Скрыбин К.Г., Галоян А.А. Молекулярная биология, 24, 1, 220-230, 1990.
5. Солонин А.С., Трояновский Б.М., Тяньшин В.И., Баев А.А. ДАН СССР, 265, 6, 1504-1507, 1982.
6. Татьков С.И., Сиволюбова Г.Ф., Кочнева Г.В., Реметников С.С., Цивковский Р.Ю., Серпинский О.И. Молекулярная биология, 30, 6, 1299-1306, 1996.
7. Bernard H.U., Helinski D.R. Methods Enzymol., 68, 482-492, 1979.
8. Chang J.J.M., Chang P.R., Bannet W.F., Vochnner B.R. Biochem. Soc. Trans. 17, 2, 335-337, 1989.
9. Cheing Ch.-Z., Huang H., Cong J., Xia Qi-Ch., Li B.-L., Wang Y.-L. Acta Biochim. et Biophys. Sin., 28, 5, 523-530, 1996.
10. Daum J., Donner P., Geilen W., Hubner-Kosnay G., Isernhagen M., Scheidecker H., Seliger H., Boidol W., Siewert G. Eur. J. Biochem., 185, 2, 347-354, 1989.
11. Denhardt D.T., Dressler D., Ray D.S. In: The singlestranded DNA phages, Cold Spring Harbor, 4, 1978.
12. Derynck R., Remaut E., Samen E., Stanssens P., De Cierq E., Content J., Fiers W. Nature, 287, 5779, 193-197, 1980.
13. Geoffrey A., Cora A.F., Winther M.D. J. Cell Sci., 3, 29-38, 1985.
14. Goeddel D.V., Heyneker H.L. Hozuma T., Arentzen R., Itakura K., Yansura D.G., Ross M.I., Miozzare G., Grea R., Seeburg P.H. Nature, 281, 5732, 544-548, 1979.
15. Guarente L., Lauer G., Roberts T.M., Ptashne M. Cell, 20, 2, 543-553, 1980.
16. Graham R.W., Greenwood J.M., Warren R.A.J., Kilburn D.G., Trimbur D.E. Gene,

- 158, 1, 51-546, 1995.
17. Hashemzadeh-Bonehi L., Mehraei-Gohom F. Mol. Microbiol., 30, 3, 676-678, 1998.
 18. Itacura I., Hirose T., Grea R., Riggs A.D., Heyneker H.L., Bolivar F., Boyer H.W. Science, 198, 4321, 1056-1063, 1977.
 19. Ivanov I., Jay E. Biotechnol. and Bioindustry, 2, 6-13, 1986.
 20. Kane J.F., Hartley D.L. Trends Biol. Tech., 6, 95-101, 1988.
 21. Kaneva J., Mulchandani A., Chen W. Biotechnol. Progr., 14, 2, 275-278, 1998.
 22. Kareem B.N., Rokkones E., Hogset A., Holmgren E., Gantvic K.M. Anal. Biochem., 204, 26-33, 1992.
 23. Lin-Chao She, Chen Wen-Tsuan, Wong Ten-Tsao Mol. Microbiol., 6, 22, 3285-3293, 1992.
 24. Messing J., Vieira J. Gene, 19, 269-276, 1982.
 25. Model P. Cell, 61, 739-741, 1990.
 26. Munson M., Predki P.F., Regan L. Gene, 144, 1, 59-62, 1994.
 27. Oka T., Sakamoto S., Miyoshi K.-i., Fuwa T., Yoda K., Yamasaki M., Tamura G., Miyake T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 21, 7212-7216, 1985.
 28. Peranen J.R.M., Hyvonen M., Ka aribinen L. Anal. Biochem., 236, 2, 371-373, 1996.
 29. Quaas R., McCeown J., Stanssens P., Frank R., Blocker H., Hahn U. Eur. J. Biochem. 173, 617-622, 1988.
 30. Shine J., Fetters I., Lan N.C.J., Roberts J.L., Baxter J.D. Nature, 285, 5765, 456-461, 1980.
 31. Studier F.W., Moffatt B.A. J. Mol. Biol., 189, 113-130, 1986.
 32. Sumi S.-I., Hasegawa A., Yagi S., Miyoshi K.-i., Kanezawa A., Nakagawa S., Suzuki M. J. Biotechnol., 2, 1, 59-74, 1985.
 33. Talmadge K., Gilbert W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6, 1830-1833, 1982.
 34. Uhlen M., Nilsson B., Guss B., Lindberg M., Gatenbeek S., Philipson L. Gen, 23, 269-378, 1983.

Поступила 11.XII.1998