



УДК 576.858.9

Т. В. Сорочинская, С. И. Черных

ИССЛЕДОВАНИЕ СИНТЕЗА β -ЛАКТАМАЗЫ TEM1 В РАЗЛИЧНЫХ ШТАММАХ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ИХ ФАГОМ λ bla С АМБЕР-МУТАЦИЯМИ В РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНАХ *

*Проведен поиск оптимальных условий для функционирования системы фагозависимого синтеза β -лактамазы. Для этого были выделены рекомбинантные фаги λ bla, в которых структурный ген β -лактамазы (bla) ориентирован альтернативно. Установлено, что эффективная экспрессия bla-гена наблюдается в конструкции, где он контролируется сильными lac- и P_L-промоторами фага λ . Получены N- и QR- производные фага λ bla. Осуществлен подбор штамма-продуцента β -лактамазы. Максимальный выход β -лактамазы наблюдается при инфицировании бессупрессорного штамма *E. coli* W3101 фагом λ blaQ-R.*

Введение. В ряде работ [1—3], посвященных вопросам сверхпродукции биологически активных веществ, показано, что инфицирование клеток *E. coli* умеренным бактериофагом λ , содержащим в своем геноме ген целевого продукта, приводит к высокому выходу этого продукта. При попадании ДНК фага в бактериальную клетку начинается синтез генных продуктов, обеспечивающих автономную репликацию фаговой ДНК, ее упаковку в фаговые частицы и последующий лизис клетки с освобождением 100—200 фаговых корпускул. При этом идет и синтез продукта, ген которого встроен в ДНК фага. Для того чтобы замедлить процесс созревания и сборки фага, а также предотвратить лизис клетки-хозяина и тем самым продлить время функционирования нужного гена, вводят амбер-мутации в регуляторные гены фага λ — ранний N и поздний Q, а также в поздние структурные гены R и S. При заражении таким фагом штамма *E. coli*, не имеющего супрессора, который исправляет амбер-мутации, происходит накопление продукта клонированного гена и выход достигает высокого уровня. Для получения фермента β -галактозидазы с одинаковой эффективностью были использованы N- и Q-R-производные фага λ . Выход фермента достигал 1 г из 1 л культуральной жидкости [3]. Известно использование N-, Q-, Q-R-, R-, S-производных фага для максимизации экспрессии генов trp-оперона и polA-гена [4, 5]. При разработке системы синтеза фермента β -лактамазы по фагозависимой технологии мы основывались на вышеизложенных данных. Фермент гидролизует β -лактаманое кольцо антибиотиков пенициллинового ряда. Благодаря своим физико-химическим свойствам (небольшая молекулярная масса (м. м.) — 26 500, одна субъединица, стабильность при хранении, простота детекции) β -лактамаза является перспективным ферментом для твердофазного иммуноферментного анализа с использованием конъюгатов на основе этого фермента.

* Представлена членом редколлегии В. А. Кордюмом.

Материалы и методы. Бактериальные штаммы, использованные в исследованиях: *E. coli* K12 802, содержащий плазмиду *pCV11*, — получен от Т. Н. Копыловой-Свиридовой (Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, Пущино); *E. coli* C600, используемый для трансформации; бессупрессорные штаммы *E. coli* Su^0 : MR31, W3101, 3000×74, AB259, CA77, 10; супрессорные штаммы *E. coli* Su^+ : K12, CA5013, RLMI; штаммы *E. coli* Su^+ , имеющие супрессор, неполностью исправляющий амбер-мутации, — HB101, C600. Бактериофаги: λ *plac5c1857* Δ (*HindIII* λ 2-*sHindIII* λ 3)*sRI* λ 3⁰ *sRI* λ 5₀- Δ (*sRI1acz sHaeIII lacZ*)UV5, содержащий один сайт *EcoRI*, в тексте мы будем называть его λ *c1* (получен от П. Тиолле, Пастеровский ин-т, Франция); λ *plac5c1857Nam53* — в дальнейшем λ *c1N*-*N*⁻. λ *plac5c1857Qam117Ram54* — далее λ *c1Q*-*R*⁻.

Питательные среды. Для выращивания культур использовали «Амниопептид» — ферментный гидролизат белков. Твердый (2 %) и мягкий (0,6 %) агары готовили на разведенном 1:1 0,14 М NaCl-амниопептиде.

Плазмидную ДНК выделяли по методу Клевелла и Хелинского [6].

Ферменты, использованные для конструирования рекомбинантной молекулы λ *c1pCV11* (в дальнейшем мы будем называть *c1bla*), — *EcoRI*, T4-ДНК-лигаза, *Sall* — производства НПО «Фермент» (Вильнюс). Получение *EcoRI*-фрагментов ДНК фага и плазмиды *pCV11* и последующее лигирование проводили по общепринятому методу [7].

Трансформацию *E. coli* C600 осуществляли на хлор-кальциевых компетентных клетках, выделенных по методу Дагерта и Эрлиха [8].

Электрофорез фрагментов рекомбинантных ДНК фага λ *c1bla* производили в 0,7 %-ном агарозном геле размером 8,5×12 см, толщиной 3 мм в трис-ацетатном буфере, pH 8,0 (40 мМ трис, 20 мМ ацетат натрия, 2 мМ ЭДТА, 18 мМ NaCl) в течение 17 ч при напряжении 20 В на пластинку при комнатной температуре.

Получение фаголизатов. Лизогенные культуры выращивали на аминокислоте в условиях интенсивной аэрации при 28 °С до плотности 1·10⁸ клеток в 1 мл. Затем в течение 20 мин их термолуцировали при 43 °С. Через 70—80 мин при 37 °С наступает лизис клеток. При таких условиях титр фага составлял (1—2)·10¹⁰ БОЕ/мл [9]. В качестве индикаторной культуры использовали штамм *E. coli* RLMI(Su^+).

Активность β -лактамазы определяли йодометрически по методу Чайковской и Венкиной [10]. За единицу активности принимали наименьшее количество β -лактамазы, способное инактивировать 10⁻⁷ М пенициллина (60 ед.) за 1 ч при 37 °С в фосфатном буфере, pH 6,8—7,0.

Введение мутаций в гены *N*, *Q*, *R*. Мутации в гены *N*, *Q*, *R* рекомбинантного фага λ *c1bla* вводили методом рекомбинации *in vivo*. Для этого лизогенные культуры *E. coli* λ *c1N*-*N*⁻ и λ *c1Q*-*R*⁻ выращивали при 28 °С до плотности 1·10⁸ клеток в 1 мл. Затем вносили лизат фага λ *c1bla* из расчета 5 фаговых корпускул на клетку. После 30 мин адсорбции культуру разводили в 100 раз 0,14 М раствором NaCl. Для повышения частоты рекомбинации фаговых ДНК культуры облучали ультрафиолетом. Разбавив в 50 раз свежей питательной средой (0,2 мл культуры+10 мл среды), культуру термолуцировали 20 мин при 43 °С и помещали на качалку на 2 ч. Не лизировавшие клетки разрушали хлороформом. Полученный лизат титровали на культуре *E. coli* RLMI (Su^+). Фаговые пятна перекальвали последовательно на газоны культур Su^0 и Su^+ . Рекомбинантный фаг образовывал зоны лизиса в местах уколов на газоне с культурой Su^+ и не образовывал их на газоне с культурой Su^0 . Для обнаружения рекомбинанта λ *c1blaN*-*N*⁻ или λ *c1blaQ*-*R*⁻ на пятна лизиса наносили одну каплю раствора *O*-нитрофенил- β -*D*-галактозида (ОНФГ, синтетический суб-

страт для фермента β -галактозидазы). В случае присутствия исходных фагов λclN^-N^- или λclQ^-R^- в пятне появлялась желтая окраска, обусловленная расщеплением ОНФГ и образованием нитрофенола. Пятна, на которых отсутствовала желтая окраска и не проявляющиеся на газоне с Su^0 -культурой, были образованы искомыми рекомбинантными фагами $\lambda clbaN^-N^-$ или $\lambda clblaQ^-R^-$. Отобранные фаговые пятна перекальвали на газон Su^+ культуры *E. coli* RLMI, смешанной с 0,6 %-ным агаром, в подложку вносили антибиотик ампициллин в концентрации 20 мкг/мл. Культура *E. coli* RLMI чувствительна к ампициллину, поэтому в таких условиях она расти не будет. Но если произойдет лизогенизация этой культуры фагом с *bla*-геном, обеспечивающим гидролиз ампициллина, то вокруг укола появится рост лизогенной культуры *E. coli* RLMI с интегрированным фагом $\lambda clbla$. Эти лизогенные культуры являлись источником фага в дальнейших исследованиях.

Результаты и обсуждение. Для создания системы суперсинтеза β -лактамазы на основе фагозависимой технологии первоочередной задачей являлось конструирование фага, несущего в своем геноме ген β -лактамазы *bla* под контролем эффективного промотора, и введение амбер-мутаций в регуляторные гены фага, а затем подбор штамма-продуцента. Для достижения этих целей в фаговый вектор $\lambda cl1$, имеющий один *EcoRI*-сайт, был встроены ген *bla* в составе целой плазмиды *pCV11*. Ориентацию вставки определяли с помощью рестриктового анализа с последующим электрофорезом. Рестриктаза *Sall* разрезает молекулу ДНК фага на два больших фрагмента с м. м. примерно $10 \cdot 10^6$ и $20 \cdot 10^6$ (рис. 1, б). Плазмида *pCV11* имеет один сайт *Sall* в районе *Tc*-гена. В зависимости от ориентации плазмиды можно рассчитать молекулярную массу ожидаемых *Sall*-фрагментов рекомбинантной молекулы ДНК $\lambda clbla$. В данной молекуле в случае нахождения *bla*-гена под контролем *lac*-промотора должны образоваться после обработки рестриктазой *Sall*-фрагменты с м. м. $10,1 \cdot 10^6$; $9,6 \cdot 10^6$; $12,9 \cdot 10^6$. Но такой картины мы не наблюдали. После электрофореза на геле выявлены фрагменты с м. м. $10,1 \cdot 10^6$; $7,6 \cdot 10^6$; $12,7 \cdot 10^6$ (рис. 1, в). При допол-

Активность β -лактамазы в различных штаммах *E. coli* при заражении фагами $\lambda clblaN^-N^-$ и $\lambda clblaQ^-R^-$ (ед. акт./мл лизата)

β -Lactamase activity in various *E. coli* strains infected by phages $\lambda clblaN^-N^-$ and $\lambda clblaQ^-R^-$ (enzyme activity units per ml of lysate)

Штамм	Активность β -лактамазы при заражении фагом $\lambda clblaN^-N^-$	Активность β -лактамазы при заражении фагом $\lambda clblaQ^-R^-$
3000 \times 74 (Su^0)	$5 \cdot 10^3$	$1,16 \cdot 10^5$
AB259 (Su^0)	$6,7 \cdot 10^3$	$1,16 \cdot 10^5$
CA77 (Su^0)	$1,7 \cdot 10^3$	$1,61 \cdot 10^5$
10 (Su^0)	$0,7 \cdot 10^3$	$1,39 \cdot 10^5$
MR31 (Su^0)	$0,8 \cdot 10^3$	$0,34 \cdot 10^5$
W3101 (Su^0)	$1,3 \cdot 10^3$	$3,11 \cdot 10^5$
HB101 (Su^-)	$13,3 \cdot 10^3$	$1,06 \cdot 10^5$
C600 (Su^-)	$31,1 \cdot 10^3$	$1,42 \cdot 10^5$
K12 (Su^+)	$1,37 \cdot 10^6$	$1,33 \cdot 10^5$
CA5013 (Su^+)	$1,33 \cdot 10^6$	$1,55 \cdot 10^5$

нительном анализе после обработки рестриктазой *EcoRI* рекомбинантной молекулы $\lambda clbla$ вместо фрагмента с м. м. $5 \cdot 10^6$ (м. м. плазмиды *pCV11*) образовался фрагмент размером $3,2 \cdot 10^6$. Следовательно, геном фага $\lambda cl1$ содержит делеционный вариант плазмиды *pCV11* с *bla*-геном, объясняющий различие между рассчитанными размерами фрагментов и полученными практически. При таком расположении вставки ген *bla* контролируется сильными *lac*- и *P_L*-промоторами (рис. 2, а). При обратной ориентации (рис. 2, б) фрагменты ДНК $\lambda clbla$ должны иметь

следующие молекулярные массы: $14,9 \cdot 10^6$; $5,4 \cdot 10^6$; $10,1 \cdot 10^6$, что и было выявлено при анализе фрагментов при электрофорезе (рис. 1, з). Активность β -лактамазы в клонах с первой ориентацией вставки (рис. 2, а) составляла $(3-5) \cdot 10^3$ ед/мл лизата, в то время как с обратной ориентацией вставки — $(2-4) \cdot 10^2$ ед/мл лизата. Всю дальнейшую работу проводили с клонами, у которых вставка находилась в первой ориентации.

Для увеличения времени функционирования гена *bla* и накопления его продукта β -лактамазы необходимо замедлить процесс созревания и сборки фага и предотвратить лизис клетки-хозяина. С этой целью в гены *N*, *Q*, *R* фага λ *CIbla* введены амбер-мутации. *N* — ранний ген положительной регуляции фага λ . Он необходим для полноценной экспрессии всех ранних генов, в первую очередь *O* и *P*, продукты которых нужны для репликации фаговой ДНК. Продуктом гена *N* является белок — антитерминатор трансляции, необходимый для транскрипции генов *O* и *P* с максимальной скоростью. В отсутствие продукта гена *N* некоторая транскрипция генов *O* и *P* все же происходит, что, таким образом, объясняет невысокий уровень репликации фаговой ДНК у *N*-мутантов. *N*-белок — мономер с м. м. 14 000, устойчив к нагреванию. Специфическая активность его достигает максимума через 5 мин после индукции профага. Он способен подавлять как ρ -зависимую, так и ρ -независимую терминацию у фага [12]. Однако некоторые терминаторы, по-видимому, даже ρ -зависимые (например, t_j в *j*-B2-области) полностью устойчивы к антитерминирующему действию *N*-белка [11, 12]. Биологический смысл наличия этого терминатора заключается в необходимости предотвращения транскрипции с двух нитей ДНК в этой перекрывающейся области генома. В отсутствие *N*-белка (при введении мутаций в ген *N*) терминация блокируется на сайтах t_{RI} (эффективность терминации 50—70 %) и t_{LI}

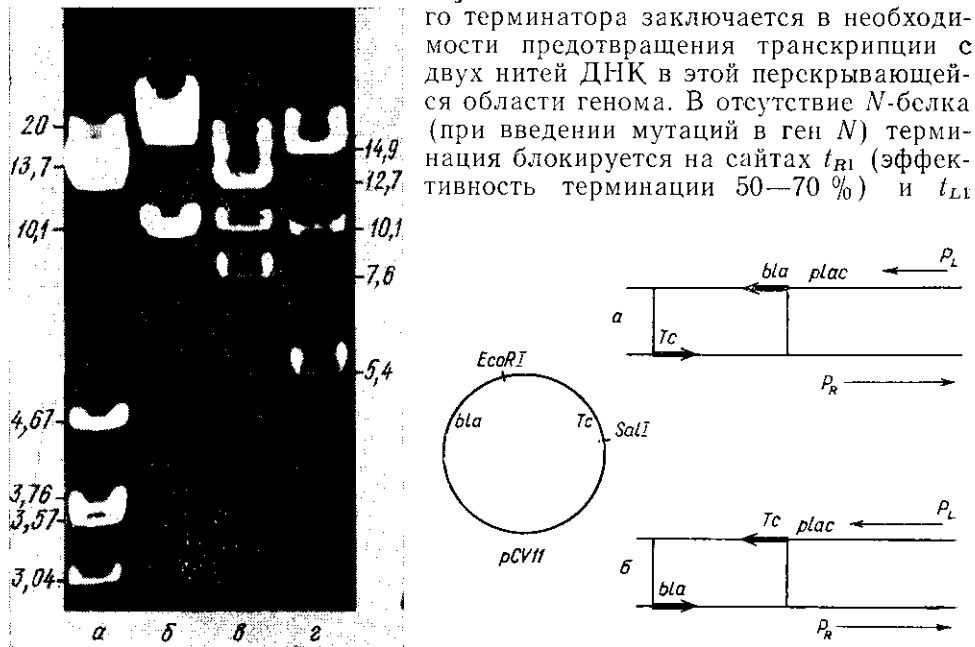


Рис. 1. Электрофорез в 0,7 %-ном агарозном геле фрагментов рекомбинантных ДНК λ *CIbla*: а — ДНК фага λ дикого типа, обработанная рестриктазой *EcoRI* (как маркер); б — то же, но *SalI* (как маркер); в — ДНК фага λ *CIbla*, обработанная рестриктазой *SalI* (делеционный вариант встройки плазмиды *pCVII*); з — то же, но обратная ориентация вставки. Размеры фрагментов указаны $\cdot 10^6$.

Fig. 1. Electrophoresis in 0.7 % agarose gel of recombinant DNA fragments. а — *EcoRI* lysate of wild-type λ phage DNA (as marker); б — *SalI* lysate of wild-type λ phage DNA (as marker); в — phage DNA treated by restrictase *SalI* (deletion variant of *pCVII* plasmid incorporation); з — λ -phage DNA treated by restrictase *SalI* (reverse orientation of *pCVII* plasmid incorporation)

Рис. 2. Схематическая карта рекомбинантной молекулы λ *CIbla*: а, б — 1-я и 2-я ориентации рекомбинантной молекулы соответственно

Fig. 2. Scheme of recombinant molecule of the phage λ *CIbla*. а — first orientation of the recombinant molecule; б — second orientation of the recombinant molecule.

(80 %) [13—15]. Из-за неэффективности t_{R1} -терминатора наблюдается некоторый уровень правосторонней транскрипции в области СП-О-Р. Правосторонняя транскрипция терминируется на ρ -зависимом сайте t_{R2} , локализованном между генами P и Q . N^- -производные фага λ дефектны по поздним Q -зависимым функциям, т. е. они не лизируют клетку-хозяина и не образуют структурных компонентов фаговых частиц [16]. Для достижения более полного блока терминации транскрипции ДНК фага нами был использован фаг с двойной мутацией в гене N — $\lambda c1857blaNam7Nam53$. В клетках *E. coli* Su^0 N^- -мутанты существуют в плазмидном состоянии, образуя от 10 до 20 копий ДНК на клетку [17].

Ген Q осуществляет положительную регуляцию экспрессии поздних генов фага $\lambda(S, R, A-j)$ [18] с помощью своего продукта Q -белка. Это полипептид с м. м. 23 000 [19]. Он активизирует синтез РНК и белков с поздних генов ДНК фага. Гены R , R_2 и S необходимы для лизиса бактериальной стенки. Все эти гены составляют единый оперон и выражаются как одна транскрипционная единица, начиная с промотора $P_{R'}$, который расположен справа от гена Q . Транскрипция осуществляется конститутивно, но в отсутствие белка Q терминируется в $t_{R'}$ -сайте, расположенном рядом с промотором $P_{R'}$. В присутствии белка Q удлиняется 6S РНК, и экспрессия поздних генов резко усиливается. Однако потребность в Q -белке не является абсолютной. У Q^- -мутантов образование РНК с поздних генов сильно подавлено, хотя транскрипция ранних генов протекает нормально. В фаге с делецией по гену Q уровень экспрессии поздних функций составляет 10 % и поздние белки продуцируются в количестве, достаточном для развития небольшого числа потомков [20].

Ген R контролирует растворение клеточной стенки бактерии. Продукт гена R — муреинтрансгликозилаза, обладающая ферментативной активностью [21], м. м. 17 500. Введение мутаций в этот ген приводит к изменению лизиса бактериальной клетки. Однако применение R^- -производных фага λ для максимизации экспрессии бактериальных генов менее эффективно, чем Q^- , $Q-R^-$, N^- [22].

Активность β -лактамазы в лизатах *E. coli* RLMI $\lambda c1bla$ составила $(3-5) \cdot 10^3$ ед/мл. После введения амбер-мутаций в гены фага $\lambda c1bla$ N , Q и R в клонах с первой ориентацией (рис. 2, а) β -лактамазная активность в лизатах увеличилась на порядок и составила $(2-4) \times 10^4$ ед/мл. Таким образом, использование N^- и $Q-R^-$ -мутантов позволило замедлить образование структурных белков и белков, необходимых для лизиса клетки-хозяина, блокировать их образование у N^- -мутантов, в то время как репликация фаговой ДНК, содержащей bla -ген, идет нормально, что приводит к амплификации bla -гена и к накоплению его продукта β -лактамазы.

Экспрессию bla -гена при заражении фагом $\lambda c1bla$ с амбер-мутациями в генах N , Q и R исследовали в 10 штаммах *E. coli*, отличающихся по наличию или отсутствию амбер-супрессора, исправляющего мутации. Результаты представлены в таблице. При заражении фагом $\lambda c1bla$ $Q-R^-$ штамма *E. coli* W3101 (Su^0) β -лактамазы продуцируется примерно в два раза больше, чем при заражении этим фагом всех исследованных перmissive штаммов Su^+ . Ее количество составило $3 \cdot 10^5$ ед/мл культуральной жидкости. В других исследованных Su^0 -штаммах *E. coli* β -лактамазы накапливалось меньше по сравнению со штаммом *E. coli* W3101. При заражении фагом $\lambda c1blaN^-N^-$ всех Su^0 -штаммов *E. coli* ее синтезируется приблизительно в 20 раз меньше, чем при заражении этим фагом Su^+ -штаммов *E. coli* (таблица). Экспрессия bla -гена в Su^+ -штаммах при заражении как фагом $\lambda c1blaN^-N^-$, так и фагом $\lambda c1blaQ-R^-$ шла примерно на одном уровне, так как мутации в этих фагах исправляет один и тот же амбер-супрессор E , узнающий амбер-кодон и вставляющий в этом месте аминокислоту глутамин. Как уже отмечалось, для системы суперсинтеза β -галактозидазы с одинаковой эффективностью использовали N^- - и $Q-R^-$ -производные фага λ [1]. Однако в системе по синтезу β -лактамазы фаг $\lambda c1blaN^-N^-$ оказал-

ся неэффективным. Это можно объяснить следующим образом. Ген *bla* встроен в фаг λ CI в составе целой плазмиды. Известно, что *N*-мутанты в бессупрессорных клетках существуют как плазмиды [23]. Поэтому фаг λ CI*blaN*⁻ в *Su*⁰-штаммах функционирует как плазида, состоящая из фагового и плазмидного репликонов. Вероятно, они каким-то образом взаимодействуют, в результате чего или снижается количество копий *N*-плазмиды, или увеличивается ее нестабильность.

В результате проведенных исследований установлено, что для фагозависимой системы синтеза β -лактамазы в качестве штамма продуцента следует использовать бессупрессорный штамм *E. coli* W3101 и фаг λ CI*blaQ*⁻*R*⁻.

STUDY OF β -LACTAMASE TEM₁ SYNTHESIS IN VARIOUS *ESCHERICHIA COLI* STRAINS INFECTED BY THE PHAGE λ BLA WITH AMBER-MUTATIONS IN DIFFERENT REGULATORY GENES

T. V. Sorochnynskaja, S. I. Chernykh

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The search of optimal conditions for phage-dependent supersynthesis of β -lactamase was undertaken. For this purpose the recombinant phage with alternatively orientated β -lactamase (*bla*) structure gene were obtained. It was stated, that phage λ blaN⁻*N*⁻, λ blaQ⁻*R*⁻ derivatives are obtained. The β -lactamase producing strain was selected. The maximal recovery of β -lactamase was obtained while *Su*⁰ *E. coli* W3101 strain was infected by λ -phage *bla Q*⁻*R*⁻.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Суперсинтез β -галактозидазы в клетках *E. coli*, индуцируемый некоторыми амбер-мутациями фага λ CI₈₅₇ / Л. Г. Глушакова, С. И. Черных, Л. Н. Стельмащенко, В. А. Кордюм // Молекуляр. биология.— 1982.— Вып. 30.— С. 37—41.
2. Глушакова Л. Г., Черных С. И., Кордюм В. А. Функционирование *N*-производных фага λ CI₈₅₇ в клетках *E. coli Su*⁰ // Докл. АН УССР.— 1982.— 267, № 12.— С. 56—59.
3. Кордюм В. А., Глушакова Л. Г., Черных С. И. Использование *N*-производных фага λ CI₈₅₇ CI для целей суперсинтеза β -галактозидазы // Там же.— 1980.— 255, № 3.— С. 760.
4. Davidson J., Brammer W. J., Brunel F. Quantitative aspects of gene expression in *trp* fusion operon // Mol. and Gen. Genet.— 1974.— 130, N 1.— P. 9—20.
5. Murray N. E., Kelley W. S. Characterization of *polA* transducing phages; effective expression of *E. coli polA* gene // Ibid.— 1979.— 179, N 1.— P. 77—87.
6. Clewell D. B., Helinski D. R. Supercoiled circular DNA-protein complexes in *E. coli*; purification and induced conversion to an circular DNA form // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1969.— 62, N 3.— P. 1159—1169.
7. Мануатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 479 с.
8. Dagert M., Ehrlich S. D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells // Gene.— 1979.— 6, N 1.— P. 23—28.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.— М.: Мир, 1976.— 436 с.
10. Чайковская С. М., Венкина Т. Г. Модифицированный йодометрический метод определения активности пенициллиназы // Антибиотики.— 1962.— 7, № 5.— С. 453—456.
11. Gottesman M. E., Adhya S., Das A. Transcription antitermination by bacteriophage lambda N gene product // J. Mol. Biol.— 1980.— 140, N 1.— P. 57—75.
12. Honingman A. Cloning and characterization of a transcription signal in bacteriophage unresponsive to the *N* gene product // Gene.— 1981.— 13, N 3.— P. 299—309.
13. Regulations of the *pR* operon of bacteriophage lambda / K. Dambly, M. Gottesman, Ch. Debouck, S. Adhya // J. Mol. and Appl. Genet.— 1983.— 2, N 1.— P. 45—56.
14. Drakas D., Szybalski W. Antitermination and termination functions of the cloned *nutL*, *N* and *tL1* modules of coliphage lambda // Gene.— 1981.— 16, N 2.— P. 261—274.
15. Salstrom J. S., Szybalski W. Coliphage *nutL*⁻: a unique class of mutants defective in the site of gene *N* product utilization for antitermination of leftward transcription // J. Mol. Biol.— 1978.— 124, N 1.— P. 135—221.
16. Эхолс Х. Фаг лямбда.— М.: Мир, 1975.— 422 с.

17. Klechner N., Signer E. R. Genetic characterization of plasmid formation by N^{-} mutants of bacteriophage λ // *Virology*.— 1977.— 79, N 1.— P. 160—173.
18. Herskowitz I., Signer E. R. A site essential for expression of all late genes in bacteriophage λ // *J. Mol. Biol.*— 1970.— 47, N 3.— P. 545—556.
19. Grayhack E. J., Roberts J. W. The phage λ Q gene product: activity of a transcription antiterminator in vitro // *Cell*.— 1982.— 30, N 2.— P. 637—641.
20. Dambly C., Delstanche M., Gythoye D. *Gin 101*: promotes mutation which allows the constitutive expression of the late genes // *J. Virol.*— 1979.— 30, N 1.— P. 14—20.
21. Bienkowska-Szewczyk K., Lipinska B., Taylor A. The R gene product of bacteriophage λ is the murcin transglycosylase // *Mol. and Gen. Genet.*— 1981.— 184, N 1.— P. 111—114.
22. Moir A., Brammer W. J. The use of specialized transducing phages in amplification
23. Lieb M. λ mutants which persist as plasmids // *J. Virol.*— 1970.— 6, N 2.— P. 218—255.
of enzyme products // *Ibid.*— 1976.— 149, N 1.— P. 87—99. и