



ИДК 579.852.11

ВЕКТОРЫ ЭКСПРЕССИИ НА ОСНОВЕ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ *PHO3* И *PHO5* ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: КОНСТРУИРОВАНИЕ, СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ СУПЕРПРОДУКЦИИ ФОСФОРИБОЗИЛАМИНОИМИДАЗОЛ-КАРБОКСИЛАЗЫ

К. В. Останин, Т. М. Смирнова, А. Н. Мясников,
Д. А. Геддилайте, К. В. Саснаускас, М. Н. Смирнов

Введение. Один из определяющих моментов в работе по созданию систем экспрессии чужеродных генов в клетках дрожжей — это выбор дрожжевого промотора, способного обеспечить высокую продуктивность и гибкость всей системы в целом. Использование в такого рода исследованиях промоторов структурных генов репрессибельной и конститутивной кислотных фосфатаз *PHO5* и *PHO3* представляется перспективным по ряду причин. Эти гены клонированы в составе единого фрагмента геномной ДНК [1, 2], определена их полная нуклеотидная последовательность [3, 4]. О силе промоторов *PHO5* и *PHO3* свидетельствуют высокие уровни синтеза кислотных фосфатаз в дрожжевых клетках, составляющие около 1 % общего белка [5]. Активность промотора гена *PHO5* регулируется концентрацией неорганического фосфата в культуральной среде [6]. Регуляторная система, посредством которой активируется промотор *PHO5*, генетически хорошо охарактеризована [7]. Поскольку продуктами *PHO5* и *PHO3* являются секретируемые белки, при создании секреторных векторов возможно использование не только промоторов, но и фрагментов кодирующих областей этих генов, соответствующих сигнальным пептидам.

Конкретным подтверждением перспективности использования промотора *PHO5* для получения штаммов дрожжей, продуцирующих чужеродные белки, являются успешные работы по экспрессии под его контролем генов лейкоцитарного интерферона [8, 9], поверхностного антигена вируса гепатита [10] и ряда других. Промотор гена *PHO3* ранее в аналогичных исследованиях использован не был.

Первой задачей настоящей работы являлось конструирование бактериальных плазмид, называемых нами «векторами экспрессии», которые могут быть использованы для слияния различных генов с делеционными производными промоторов *PHO5* или *PHO3*, а также с фрагментом *PHO5*, содержащим сигналы терминирования транскрипции и полиадезилации, с последующим переносом полученных конструкций в дрожжевые плазмиды. Для сравнительной оценки перспективности использования этих векторов при решении биотехнологических задач была изучена экспрессия гена *ADE2* под контролем промоторов *PHO5* и *PHO3* в дрожжевых клетках.

Ген *ADE2* дрожжей-сахаромицетов кодирует структуру фосфорибозиламиноимидазол-карбоксилазы (АИР-карбоксилазы) — одного из ферментов биосинтеза пуриновых нуклеотидов. Этот ген клонирован [11] и секвенирован [12], разработан простой спектрофотометрический метод определения активности АИР-карбоксилазы в дрожжевых экстрактах [13]. Характерной особенностью штам-

мов, частично или полностью лишенных активности АИР-карбоксилазы, является наличие в клетках красного пигмента [14]. Это дает возможность качественно оценить уровень экспрессии гена *ADE2* по окраске колоний. Перечисленные данные свидетельствуют об удобстве использования уровня экспрессии этого гена в качестве критерия эффективности дрожжевых промоторов.

Материалы и методы. В работе использовали стандартные лабораторные штаммы *Escherichia coli* *HB101* и *JM103*. Культивирование бактерий проводили на среде LB (1 % пептона, 0,5 % дрожжевого экстракта, 1 % NaCl) с добавкой бензилпенициллина (500000 ед/л) или тетрациклина (15 мг/л). Для проверки бактериальных штаммов на наличие активности β -галактозидазы использовали среду LB, содержащую 5-бromo-3-хлороиндолил- β -галактозид и β -изопропилтиогалактозид (по 40 мг/л). Трансформацию бактерий, выделение и рестрикционный анализ плазмид проводили по [15]. В работе использовали фрагмент Кленова, ДНК-лигазу и рестриктазы *EcoRV*, *SmaI* и *DraI* («Amersham», Англия), рестриктазы *EcoRI*, *BamHI*, *Sall*, *HindIII*, *PstI* (НПО «Фермент», Вильнюс), а также ряд других рестриктаз, любезно предоставленных нам А. А. Янулайтисом (НПО «Фермент»). Нуклеотидную последовательность определяли методом Сэнджера [16], используя в качестве праймера олигонуклеотид структуры AGTATGGCTTCATCTCTC, комплементарный участку промоторной области гена *PHO5*, предоставленный нам А. Хиннсом («Ciba-Geigi», Швейцария), или стандартный 17-членный олигонуклеотид для системы фагов *M13mp*, синтезированный и любезно предоставленный нам В. А. Вейко (ВНИИгенетика, Москва). Плазида *pUC1(PHO3PHO5)*, содержащая клонированные гены *PHO3* и *PHO5*, также получена от А. Хиннена. В работе использовали стандартный штамм *S. cerevisiae* *DC5* (*a his3 leu2 can1*) и полученный на его основе мутант по гену *ADE2 p29-DC5*, предоставленный нам Д. А. Гордениным (ЛГУ им. А. А. Жданова). Для выращивания дрожжевых штаммов использовали минимальную среду SC (0,67 % препарата Yeast Nitrogen Base без аминокислот («Difco», США), 2 % глюкозы) с добавками аденина (10 мг/л), *L*-гистидина или *L*-лейцина (по 50 мг/л), а также полные среды ПЕП и ПЕПФО [17]. Трансформацию дрожжей осуществляли согласно [18].

Дрожжевые экстракты получали вскрытием клеток культуры, выращенной до окончания логарифмической фазы роста при 30 °С, с помощью пресса Хьюза в 0,2 М трис-фосфатном буфере (рН 8,0), содержащем глицерин (10 %), дитиотреитол (1 мМ), ЭДТА (1 мМ), фенилметилсульфонилфторид (1 мМ). Активность АИР-карбоксилазы в экстрактах определяли с помощью метода, описанного в работе [13]. Субстрат АИР-карбоксилазы карбоксиаминоимдазолриботид (КАИР) синтезирован сотрудниками лаборатории биохим. генетики ЛГУ им. А. А. Жданова В. Д. Домкиным и Т. Р. Костиковой. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда [19].

Результаты и обсуждение. Начальным этапом работы являлось конструирование векторов экспрессии на основе промоторов *P1105* и *PHO3*. При этом использовали делеционные производные промоторной области гена *PHO5*, полученные следующим образом. Фрагмент этого гена, ограниченный сайтами рестрикции *BamHI* и *Sall* и содержащий промотор и начало кодирующей области (рис. 1), клонировали в фаговом векторе *m13mp9*. После гидролиза репликативной формы рекомбинантного фага по уникальному сайту рестрикции *KpnI*, переваривания экзонуклеазой *Bal31*, репарации липких концов ДНК фрагментом Кленова, лигирования в присутствии лишекеров *EcoRI* и трансформации клеток *E. coli* выделяли однострэнговую ДНК из 200 случайно выбранных трансформантов. На основании анализа нуклеотидной последовательности 3'-концевой области промотора *PHO5* в составе полученных рекомбинантных фаговых ДНК было отобрано 12 делеционных производных промотора с положением конечных точек делеции —42, —35, —31, —17, —2, —1, +12, +19, +23, +32, +46, +53 от стартовой точки трансляции. Еще одно делеционное производное было получено в результате рестрикции *BamHI-Sall*-фрагмента гена *P1105* по сайту *DraI*, расположенному в положении +6 от иницилирующего кодона. Конечные точки делеций во всех случаях были фиксированы присоединением линкера *EcoRI*. Были сконструированы векторы экспрессии на основе

шести картированных делеционных вариантов, координаты 3'-концов которых приведены ниже:

Плазмида	Положение конечной точки делеции относительно начала кодирующей области
<i>pAM31</i>	-31
<i>pMS46</i>	-17
<i>pNK45</i>	-2
<i>pYP26</i>	-1
<i>pYK20</i>	+6
<i>pVY18</i>	+53

Схема конструирования представлена на рис. 2.

Полученные векторы экспрессии на основе промотора *PHO5* можно разделить на три типа. Во-первых, это векторы, содержащие фрагменты гена *PHO5* с положением делеции в области, соответствующей лидерному участку мРНК (*pAM31*, *pMS46*, *pNK45*, *pYP26*). Значение этого участка для эффективной экспрессии генов в клетках эукариот

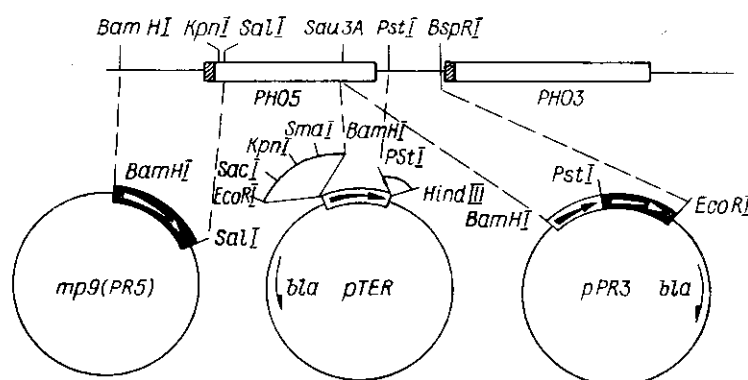


Рис. 1. Частичная рестрикционная карта кластера генов *PHO5* и *PHO3* (вверху) (прямоугольниками выделены кодирующие участки генов, заштрихованные участки соответствуют лидерным областям белков) и клонирование фрагментов кластера генов *PHO3* и *PHO5*, использованных при конструировании векторов экспрессии (внизу). Субклонированные фрагменты генов *PHO3* и *PHO5*, использованные в качестве «переносных промоторов», обозначены темными прямоугольниками со стрелкой. *Sau3A-PstI*-фрагмент гена *PHO5*, использованный в качестве «переносного терминатора транскрипции», обозначен светлым прямоугольником со стрелкой. Стрелки указывают направление транскрипции

Fig. 1. Above: a partial restriction map of the *PHO3* and *PHO5* gene cluster. The coding regions of the two genes are represented by open boxes, the sequences coding for the signal peptides are indicated by striped boxes. Below: cloning of fragments of the *PHO3* and *PHO5* genes for the use in construction of the expression vectors. The fragments of *PHO3* and *PHO5* used as «portable promoters» are represented by black boxes with an arrow. The *Sau3A-PstI* fragment of the *PHO5* gene used as «portable transcription terminator» is shown by an open box with an arrow. The arrows indicate the direction of transcription

до настоящего времени остается не до конца ясным. Поэтому представляло интерес получить ряд делеционных производных этого типа с тем, чтобы впоследствии сравнить их эффективность в одной модельной системе. Во-вторых, это вектор *pYK20*, где сохранен иницирующий кодон *PHO5*, что делает возможным использование его для экспрессии генов, для которых инициация трансляции с собственного ATG-кодона по каким-либо причинам невозможна или неудобна. И наконец, вектор *pVY18*, содержащий делеционное производное промотора *PHO5* с участком гена, кодирующим структуру сигнального пептида, может быть использован для получения секреторных дрожжевых векторов.

При конструировании вектора экспрессии на основе промотора *PHO3* использовали одно делеционное производное этого промотора, полученное следующим образом. Из плазмиды *pYU1(PHO3PHO5)* выделяли фрагмент ДНК, ограниченный сайтами рестрикции *Sau3A* и *BspRI*. После присоединения к его тупому концу линкера *EcoRI* он

был клонирован в составе бактериальной плазмиды *pUC19* (рис. 1). Сконструированный на основе выделенного фрагмента вектор экспрессии *pBG10* (рис. 3) включает промоторную область гена *PHO3* от —17 до —370 нуклеотида, считая от ATG-кодопа. Граница этого фрагмента на 5'-конце выбрана с учетом данных, ранее полученных в нашей лаборатории, согласно которым сохранение 370 пар оснований (п. о.) 5'-некодирующей области гена *PHO3* обеспечивает его полноценную экспрессию в составе мультикопийной плазмиды.

Все полученные нами векторы экспрессии построены по общему плану. Они содержат делеционное производное промотора гена *PHO5*

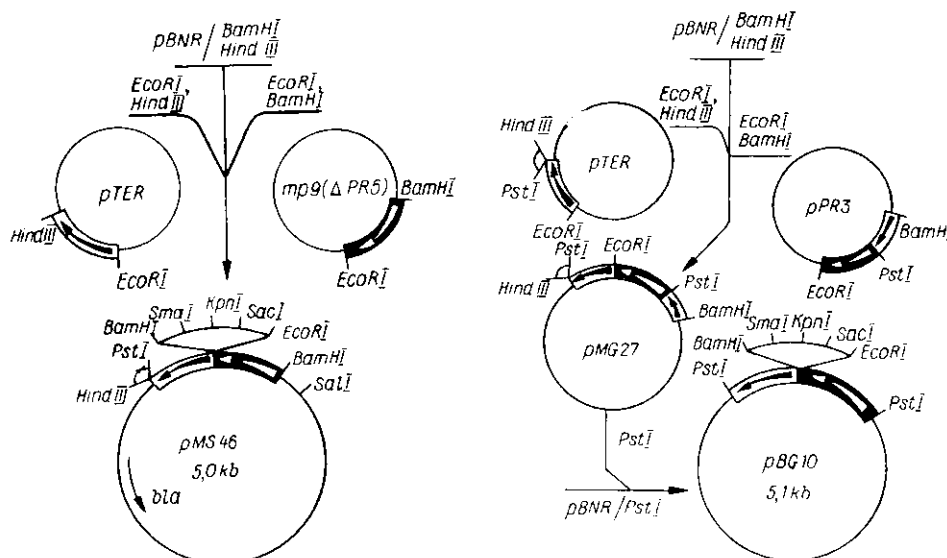


Рис. 2. Получение плазмид экспрессии, содержащих промотор и терминатор гена *PHO5*, разделенные полилинкером, на примере одной из пяти однотипных плазмид — *pMS46*. Обозначения те же, что на рис. 1. Стрелками показано направление транскрипции

Fig. 2. The construction of the expression vectors containing the promoter and transcription terminator of the *PHO5* gene with a polylinker fragment between them. The conventions are the same as in Fig. 1

Рис. 3. Конструирование плазмиды *pBG10*. Обозначения, как на рис. 1

Fig. 3. The construction of the plasmid *pBG10*. The conventions are the same as in Fig. 1

или *PHO3* и терминатор транскрипции *PHO5* (рис. 1), одинаковым образом ориентированы и разделены участком полилинкера плазмиды *pUC19*, включающим пять уникальных сайтов рестрикции. При использовании этих векторов для экспрессии в клетках дрожжей чужеродных генов предусмотрена следующая последовательность операций: встраивание кодирующей части интересующего нас гена в полилинкерный участок и последующий перенос конструкции «промотор — кодирующая часть — терминатор» в один из бифункциональных бактериально-дрожжевых векторов. Альтернативная стратегия, при которой все функциональные элементы окончательной конструкции за исключением экспрессируемого гена собираются в составе дрожжевого челночного вектора, менее удобна, поскольку такие векторы содержат ограниченное число удобных для клонирования уникальных рестрикционных сайтов.

Для сравнительной оценки эффективности использования полученных векторов была проделана работа по изучению экспрессии дрожжевого гена *ADE2* под контролем промоторов *PHO5* и *PHO3*. Для получения фрагмента ДНК, содержащего кодирующую часть гена *ADE2* без промоторной области, использовали сконструированные нами ранее плазмиды *pYE(ADE2)-3* и *pLCA*, рестрикционные карты которых приведены на рис. 4. В состав первой из них входит фрагмент ДНК XV хромосомы дрожжей длиной 3600 п. о., включающий кодирующую часть

гена *ADE2*, фланкированную достаточно протяженными нуклеотидными последовательностями. В плазмиде *pLCA* содержится структурная область гена за исключением 14 п. о. с 3'-конца. К 5'- и 3'-концам этого фрагмента присоединены линкеры *BamHI* и *Sall* соответственно. Промоторный участок гена делегирован в результате обработки экзонуклеазой *Bal31*. В результате анализа нуклеотидной последовательности указанного фрагмента после переноса его в ДНК фага *M13mp9* нами установлено, что он содержит лишь 5 п. о. 5'-некодирующей области гена *ADE2*. На рис. 5 изображена схема конструирования плазмиды *pUC19(ADE2)-2*, в состав которой входит фрагмент

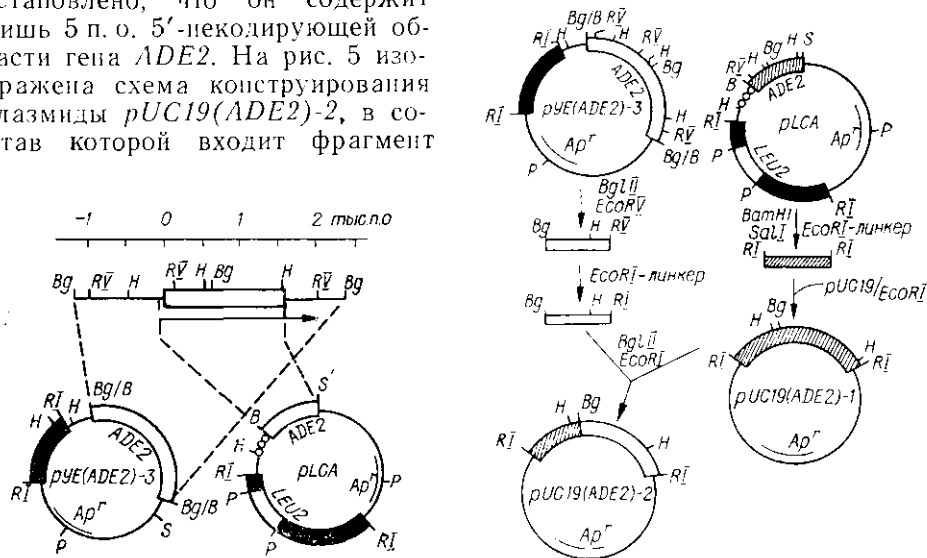


Рис. 4. Структура плазмид *pYE(ADE2)-3*, *pLCA* и входящего в их состав гена *ADE2* дрожжей-сахаромисцетов. На схеме *ADE2* белым прямоугольником выделена кодирующая часть гена, стрелкой обозначен фрагмент, использованный для встраивания в векторы экспрессии. Черными прямоугольниками обозначены фрагменты 2 мкм ДНК дрожжей-сахаромисцетов, тонкой линией — ДНК *pBR322*, кружками — ДНК центромержной области III хромосомы дрожжей. Сокращенные обозначения сайтов рестрикции: *Ri* — *EcoRI*, *RV* — *EcoRV*, *P* — *PstI*, *B* — *BamHI*, *H* — *HindIII*, *S* — *Sall*, *Bg* — *BglII*

Fig. 4. The structure of the plasmids *pYE(ADE2)-3* and *pLCA* containing the yeast *ADE2* gene. The open box represents coding region of *ADE2*. The arrow shows the part of *ADE2* present in the final constructions used for expression studies. The black boxes stand for fragments of 2 μ m DNA, thin line for *pBR322* DNA, the circles for the portion of yeast CEN3 DNA. The abbreviations of the restriction sites are *EcoRI* — *Ri*, *EcoRV* — *RV*, *PstI* — *P*, *BamHI* — *B*, *HindIII* — *H*, *Sall* — *S*, *BglII* — *Bg*

Рис. 5. Схема конструирования плазмид *pUC19(ADE2)-1* и *pUC19(ADE2)-2*. Белыми прямоугольниками изображены фрагменты *ADE2*, полученные из плазмиды *pYE(ADE2)-3*, заштрихованными — фрагменты плазмиды *pLCA*. Остальные обозначения те же, что на рис. 1

Fig. 5. Construction of plasmids *pUC19(ADE2)-1* and *pUC19(ADE2)-2*. The fragments of *ADE2* gene originating from *pYE(ADE2)-3* are represented by those from plasmid *pLCA* by striped boxes. The other designations are the same as in Fig. 1

ДНК, включающий кодирующую часть гена *ADE2*, а также 5 п. о. его 5'-некодирующей и приблизительно 350 п. о. 3'-некодирующей областей.

Для слияния структурной части гена *ADE2* с регуляторными областями *PHO5* и *PHO3* использовали сконструированные нами векторы экспрессии *pMS46* и *pBG10*. Плазмиды *pMS46* содержит промотор *PHO5* (размер фрагмента 560 п. о., положение делеции — 17 п. о. от иницирующего кодона), плазмиды *pBG10* — промотор *PHO3* (размер фрагмента 350 п. о., положение делеции — 17 п. о.). Ген *ADE2* выделяли из плазмиды *pUC19(ADE2)-2* рестрикцией по сайтам *EcoRI* и встраивали в одноименный сайт векторов экспрессии *pMS46* и *pBG10* в той же ориентации, что и промоторная и терминаторная области. Полученные конструкции «промотор *PHO5* (или *PHO3*) — *ADE2* — область терминирования транскрипции *PHO5*» выделяли с помощью ограниченного ферментативного гидролиза по сайтам *HindIII* и *Sall* в случае *pMS46* или полного гидролиза по сайтам *PstI* в случае *pBG10*. Выделенные

фрагменты клонировали в составе дрожжевого челночного вектора *pJDB207*. Выбор данного вектора для изучения экспрессии гена *ADE2* в клетках дрожжей обусловлен его высокой стабильностью и копийностью.

Полученными плазмидами *pTC8* и *pTL1* (рис. 6) трансформировали штамм дрожжей-сахаромицетов *p29-DC5* (*a ade2 his3 leu2*), полностью лишенный активности АИР-карбоксилазы и вследствие этого характеризующийся красной пигментацией колоний и полным отсут-

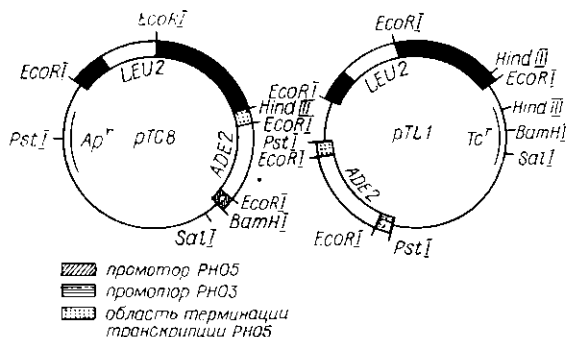


Рис. 6. Строение дрожжевых векторов *pTC8* и *pTL1*. Обозначения, кроме указанных, такие же, как на рис. 1

Fig. 6. The structure of the *pTC8* and *pTL1* expression plasmids. Designations, except for the mentioned, are the same as in Fig. 1

ствием способности расти на минимальной среде, не содержащей аденина. В результате каждой трансформации было отобрано по 20 клонов, утративших ауксотрофность по лейцину. Все они в отличие от штамма-реципиента имели белую окраску, характерную для штамма дикого типа, и не имели ауксотрофности по аденину. Этот результат свидетельствует о функционировании гена *ADE2* в клетках трансформантов под контролем промоторов структурных генов кислых фосфатаз. Для количественной оценки уровней экспрессии гена были измерены величины удельной активности АИР-карбоксилазы в клеточных экстрактах полученных трансформантов (таблица).

Удельные активности АИР-карбоксилазы в клеточных экстрактах штамма дикого типа и штаммов, трансформированных плазмидами *pTC8* и *pTL1*

AIR-carboxylase specific activities in the cell extracts of the wild type strain and pTC8 and pTL1 transformants

Штамм	Среда	Удельная активность АИР-карбоксилазы (мкмоль КАИР·мин ⁻¹ ·мг белка ⁻¹)·10 ³
<i>DC5</i>	ПЕП	1,6
	ПЕПФО	1,6
<i>p29-DC5(pTC8)</i>	ПЕП	3200
	ПЕПФО	8,7
<i>p29-DC5(pTL1)</i>	ПЕП	1600
	ПЕПФО	1800
<i>p29-DC5</i>	ПЕП	0,0
	ПЕПФО	0,0

Выращивание трансформированных штаммов для определения активности проводили параллельно в жидких средах ПЕП, не содержащей специальных добавок неорганического фосфата, и ПЕПФО, содержащей однозамещенный фосфат калия в концентрации 1 г/л, т. е. в условиях derepression и repression репрессибельной кислотой фосфатазы. При этом 99—100 % клеток культуры в стационарной стадии роста сохраняли плазмиды. В качестве контрольного использовали штамм *DC5* с нормальной активностью АИР-карбоксилазы. Показано, что у трансформантов обоих типов на среде ПЕП удельная активность АИР-карбоксилазы приблизительно на три порядка превышает таковую у штамма дикого типа. В то же время присутствие в культуральной среде из-

бытка неорганического фосфата снижает почти в 400 раз уровень активности у штаммов, содержащих плазмиду *pTC8*, но практически не оказывает влияния на его величину у трансформантов, содержащих плазмиду *pTL1*, и штамма дикого типа. Этот факт является хорошим подтверждением того, что у полученных трансформантов экспрессия гена *ADE2* находится под контролем промоторов структурных генов репрессибельной кислотной фосфатазы в одном случае и конститутивной — в другом. Кроме того, результаты измерения активности впервые позволили достаточно точно определить степень репрессии промотора *PHO5* избытком неорганического фосфата. Определение этой величины на основании активностей репрессибельной кислотной фосфатазы, измеренных в условиях репрессии и дерепрессии, с той же степенью точности невозможно из-за достаточно высокого фонового уровня активности конститутивной кислотной фосфатазы.

Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной возможности использования полученных нами векторов экспрессии *pMS46* и *pBG10* для создания штаммов дрожжей — продуцентов чужеродных белков. Это особенно важно в связи с тем, что промотор *PHO3* не нашел пока еще применения в биотехнологических исследованиях. Определяющим в выборе промотора для решения конкретной экспериментальной задачи может оказаться то обстоятельство, что промоторы *PHO5* и *PHO3* обеспечивают уровни экспрессии одного порядка, но различаются по характеру регуляции. Изложенный в данной работе метод с использованием гена *ADE2*, по нашему мнению, может быть с успехом применен для сравнительной оценки эффективности различных дрожжевых промоторов.

Другим, на наш взгляд не менее важным результатом проделанной работы, являются полученные штаммы — суперпродуценты АИР-карбоксилазы. Структурный ген этого фермента *ADE2* служит объектом различного рода генетических исследований. К настоящему времени получена большая коллекция штаммов дрожжей с мутациями в данном гене, исследуются явления межallelельной комплементации, рекомбинации и супрессии мутаций [20, 21]. Ряд исследований посвящен изучению структуры и свойств АИР-карбоксилазы дрожжей [22]. Использование полученных суперпродуцентов в качестве источника фермента несомненно позволит упростить схему его очистки и выделять АИР-карбоксилазу в гораздо больших количествах. Это должно способствовать успешному продолжению исследований, направленных на изучение структурных и функциональных особенностей АИР-карбоксилазы, а также влияния на эти особенности различных изменений в клеточном геноме.

Авторы выражают благодарность за любезное предоставление использованных в настоящей работе уникальных препаратов В. Д. Домкину, Т. Р. Костиковой, В. А. Вейко и А. Хиннену, а также Д. А. Горденину, предоставившему полученные им штаммы дрожжей. Большую помощь в проведении экспериментов оказали нам В. С. Яковлева, Ю. И. Ковалева и Ю. А. Плавинк.

YEAST EXPRESSION VECTORS BASED ON *PHO3* AND *PHO5* PROMOTERS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: CONSTRUCTION, RELATIVE EFFICIENCY, USE FOR OVERPRODUCTION OF AMINOIMIDAZOLE CARBOXYLASE

*K. V. Ostanin, T. M. Smirnova, A. N. Myasnikov,
D. A. Gedvilaite, K. V. Sasnauskas, M. N. Smirnov*

Zhdanov State University, Leningrad

Summary

A series of yeast expression vectors based on promoters of *PHO3* and *PHO5* genes and transcription terminator region of the *PHO5* gene have been constructed. One of the vectors incorporates the site of *PHO5* coding for the structure of the leader peptide.

The promoter region of these expression vectors is flanked by a fragment of the *pUC19* polylinker containing unique restriction sites for *EcoRI*, *SacI*, *KpnI* and *SmaI*. The efficiency of these vectors was tested in a model study in which they have been used to overproduce the product of yeast *ADE2* gene — aminoimidazole carboxylase. The specific activity of this enzyme in yeast transformants was about 1000 times higher than in wild type yeast strains.

1. Two yeast acid phosphatase structural genes are the result of a tandem duplication and show different degrees of homology in their promoter and coding sequences / B. Meyhack, W. Bajwa, H. Rudolph, A. Hinnen // *EMBO J.*—1982.—1, N 6.— P. 675—680.
2. Kramer R. D., Andersen N. Isolation of yeast genes with mRNA levels controlled by phosphate concentration // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1980.—77, N 11.— P. 6541—6545.
3. The nucleotide sequence of the yeast *PHO5* gene: a putative precursor of repressible acid phosphatase contains a signal peptide / K. Arima, T. Oshima, I. Kubota et al. // *Nucl. Acids Res.*—1983.—11, N 6.— P. 1657—1672.
4. Structural analysis of the two tandemly repeated acid phosphatase genes in yeast / W. Bajwa, V. Meyhack, H. Rudolph et al. // *Ibid.*—1984.—12, N 20.— P. 7721—7739.
5. Boyer P., Steyn-Parve E. P. Isolation and purification of acid phosphatase from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochim. et biophys. acta.*—1966.—128, N 2.— P. 400—402.
6. *In vitro* synthesis of repressible acid phosphatase. Identification of multiple mRNAs and products / K. A. Bostian, J. M. Lemire, L. E. Cannon, H. O. Halvorson // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1980.—77, N 7.— P. 4504—4508.
7. Oshima Y. Regulatory circuits for gene expression. The metabolism of galactose and phosphate // *The molecular biology of yeast Saccharomyces* / Eds J. N. Strathern et al.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1982.—Vol. 2.— P. 487—528.
8. Regulated expression of a human interferon gene in yeast: control by phosphate concentration or temperature / R. A. Kramer, T. M. DeChiara, M. D. Schaber, S. Hilliker // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—81, N 1.— P. 367—370.
9. Hinnen A., Meyhack B., Tsapis R. High expression and secretion of foreign protein in yeast // *Proc. of the Alko yeast sympos.* / Ed. M. Korhola.—Helsinki, 1983.— P. 24.
10. Expression of hepatitis B surface antigen in yeast / A. Miyanojara, A. Toj-e, N. Chikateru et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1983.—80, N 1.— P. 1—5.
11. Клонирование *ADE2* гена дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / К. В. Саснаускас, Г. К. Гедминене, В. И. Нактинис и др. // *Докл. АН СССР.*—1982.—263, № 2.— С. 224—227.
12. Ген *ADE2* дрожжей: первичная структура и рекомбинационное картирование / А. С. Краев, М. В. Миронова, К. В. Саснаускас и др. // 16-я конф. ФЕБО: Тез. докл.—М., 1984.—С. 382.
13. Использование карбоксиаминоимидазолриботида для характеристики фосфорибозил-аминоимидазолкарбоксылазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / З. К. Николаева, В. В. Аленин, В. Д. Домкин, М. Н. Смирнов // *Биохимия.*—1975.—40, № 4.— С. 751—754.
14. Fisher C. R. Enzymology of the pigmented adenine-requiring mutants of *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1969.—34, N 1.— P. 306—310.
15. Манитис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—479 с.
16. Cloning in single stranded bacteriophages as an aid to rapid DNA sequencing / F. Sanger, A. R. Coulson, G. Barrell et al. // *J. Mol. Biol.*—1981.—143, N 1.— P. 161—178.
17. Изучение мутантов по экзогенной кислой фосфатазе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / М. Н. Смирнов, Н. Г. Краснопевцева, С. Г. Инге-Вечтомов, А. А. Янулайтис // *Исследования по генетике.*—Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1974.—Вып. 5.— С. 59—62.
18. Hinnen A., Hicks J. B., Fink G. R. Transformation of yeast // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1978.—75, N 2.— P. 1929—1933.
19. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*—1976.—72, N 3.— P. 248—254.
20. Анализ рекомбинационной и комплементарной карт гена *ADE2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / В. В. Кваша, Т. Р. Сойдла, Д. А. Горденин и др. // *Генетика.*—1982.—18, № 5.— С. 565—574.
21. Шилова Б. В., Сойдла Т. Р. Двенадцативерсионная карта межallelльной комплементарии локуса *ADE2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Исследования по генетике.*—Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982.—Вып. 8.— С. 119—131.
22. Очистка и некоторые свойства фосфорибозил-аминоимидазолкарбоксылазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / З. К. Николаева, Е. А. Пушнова, А. А. Аропштам и др. // *Вестн. Ленингр. ун-та.*—1982.—№ 3.— С. 92—98.

Ленингр. гос. ун-т им. А. А. Жданова

Получено 29.12.86