

С. М. Зеленин, И. В. Морозов, Н. Р. Тевс, В. В. Горн,
В. А. Каргинов, Н. П. Мертвцов

ОТБОР ГЕНА ТИРОЗИНАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ ГЕНОМНОЙ БИБЛИОТЕКИ КРЫСЫ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ЗОНДОВ, СКОНСТРУИРОВАННЫХ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГА M13

Описан модифицированный метод выделения эукариотических генов из геномной библиотеки с использованием молекулярных зондов на основе фага M13. Из геномной библиотеки крысы отобран клон, содержащий ген тирозинаминотрансферазы (TAT). Дана частичная структурно-функциональная характеристика изолированного гена TAT крысы.

Введение. Одним из необходимых условий успешного изучения структуры и функции генов является возможность работы с нуклеотидным материалом индивидуального гена. В настоящее время разработаны различные способы отбора генов [1]. Большинство из них предполагает создание геномной библиотеки в составе векторов на основе фага λ и тестирование (скрининг) библиотеки генов с помощью молекулярной гибридизации с тем или иным зондом. Для скрининга с использованием радиоактивных молекулярных зондов в связи с небольшим количеством фаговых частиц в индивидуальной бляшке выбирают, как правило, высоко меченные зонды. Среди известных типов молекулярных зондов достичь наибольшей удельной активности позволяют зонды на основе одноцепочечной ДНК (оцДНК) бактериофага M13 [2].

В силу высокой чувствительности использование таких зондов может быть весьма полезным при выборке клонов из библиотеки генов в составе векторов на основе фага λ . В то же время использование зондов на основе оцДНК фага M13 для отбора клонов из библиотеки генов, сконструированной в векторах типа λ Харон осложняется тем обстоятельством, что в фаге M13 присутствует фрагмент гена *lacZ*, входящего в состав этого вектора [3, 4].

Целью настоящей работы была проверка возможности использования зондов такого типа (на основе оцДНК M13) для отбора клонов из библиотеки генов крысы, представленной в составе фага λ Харон 4А, в частности, для клонов, несущих ген TAT (L-тирозин: 2-оксоглутаратаминотрансфераза, КФ 2.6.1.5) — одного из наиболее исследованных индуцибельных ферментов млекопитающих [5].

Материалы и методы. В работе использованы β -меркаптоэтанол, агароза (тип V), бромистый этидий, дезокси- и дидезоксинуклеозидтрифосфаты («Sigma», США); формамид, протеиназа K («Merck», ФРГ); нитроцеллюлозные фильтры типа BA 85 («Schleicher and Schuell», ФРГ); лизосим, аденозинтрифосфат, 5-бром-4-хлор-3-индокси- β -D-галактозид (X-gal) («Serva», ФРГ); изопропил- β -D-тиогалактозид (IPTG) («Pharmacia», Швеция); пептон, дрожжевой экстракт, акриламид, метиленбисакриламид, полиэтиленгликоль с молекулярной массой 6 000 («Fluka», Швейцария); бромфеноловый синий, агар-агар, персульфат аммония, N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин («Reanal», ВНР). Остальные реактивы имели квалификацию не ниже х. ч.

Библиотека генов крысы в векторе λ Харон 4А получена от Г. Шутца и сотр. (Ин-т биологии клетки и опухолей, Гейдельберг, ФРГ). Клон, содержащий ген TAT в векторе EMBL3 (λ TAT 1), был также любезно предоставлен Г. Шутцем и сотр. [6]. Использовали стандартные среды LB, SM, 20×SSC и буферы — 1×TE, 10×киназный буфер (10×КБ), 10×полимеразный буфер (10×ПБ) [1]. На 1 литр среды 1.ВММ брали: 1 л среды LB, 10 мл 20 %-ной мальтозы и 20 мл 1 М MgSO₄.

Субклонирование *Pst*I-*Eco*RI-фрагментов плазмиды pTAT-5-VGZK и *Eco*RI-фрагментов ДНК λ TAT 1 в составе фага M13. ДНК плазмиды pTAT-5-VGZK [7] расщепляли одновременно рестриктазами *Eco*RI и *Pst*I; ДНК λ TAT 1 — рестриктазой *Eco*RI; репликативную форму ДНК (РФ-ДНК) бактериофага M13mp19 — в одном случае рестриктазой *Eco*RI, в другом — одновременно рестриктазами *Eco*RI и *Pst*I. Полноту расщепления препаратов ДНК проверяли электрофорезом

в 0,6 %-ном агарозном геле. Лигирование 1 мкг ДНК-фрагментов и векторной ДНК проводили, как описано Маниатисом и др. [1], с небольшими изменениями. Подготовку компетентных клеток *Escherichia coli* штамма JM103, их трансформацию, отбор и выращивание клонов, выделение оцДНК и РФ-ДНК осуществляли согласно прописи фирмы «BRL» [8] с незначительной модификацией. Клоны РФ-ДНК выделяли методом щелочного лизиса [1].

Подготовка клеток *E. coli* штамма K802 для высева фагов. Индивидуальную колонию бактерий *E. coli* штамма K802 выращивали в течение 6 ч в 100 мл среды LBMM с хорошей аэрацией при 37 °С до плотности 1 о. е. ($\lambda=600$ нм). Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 4 000 *g* (4 °С). Осадок ресуспендировали в 50 мл холодного раствора 0,01 М MgSO₄, хранили в течение 2—4 недель при 0—4 °С. Такие «магниевого» клетки использовали для титрования суспензий фага λ , высева библиотек генов и приготовления препаратов ДНК фага λ и его производных.

Синтез радиоактивно меченных олигонуклеотидов проводили по методу [1]. Радиоактивные зонды на основе оцДНК гибридного фага M13 синтезировали по методике [9].

Отбор клонов из библиотеки генов крысы. Микробиологический титр определяли, высевая суспензию фагов из библиотеки генов крысы на чашки Петри с 1,5 %-ным агаром [1]. Чтобы установить присутствие клонов, несущих полный ген *lacZ*, в верхний (0,7 %) агар перед посевом добавляли индикатор X-gal. Для отбора клона, содержащего ген TAT крысы, аликвоту объемом 2,5 мкл из библиотеки генов крысы (около $5 \cdot 10^9$ клонов) смешивали с 100 мкл «магниевого» клеток, инкубировали 30 мин при 37 °С и высевали на чашки Петри с 1,5 %-ным агаром в 3 мл 0,7 %-ного агара, содержащего 50 мкл 2 %-ного X-gal и среду LBMM.

Чашки инкубировали в течение ночи при 37 °С. Получение нитроцеллюлозных отпечатков (по 2 реплики с каждой чашки) и молекулярную гибридизацию на фильтрах проводили по модифицированному методу [1]. Для гибридизации использовали радиоактивные зонды, синтезированные на основе оцДНК клона M13 TAT EPN39, а в качестве альтернативного зонда — оцДНК фага M13mp9, содержащего 360 нуклеотидов кДНК проопиомеланокортина (ПОМК) быка [10]. Специфическим для TAT является клон M13 TAT EPN39, содержащий фрагмент кДНК-TAT крысы, комплементарный 3'-концевому участку кДНК-TAT [7].

Сравнивая радиоавтографы, полученные с нитроцеллюлозных реплик одной и той же чашки Петри, выявляли клоны с сигналами, соответствующими только одному из указанных зондов, затем сопоставляли эти сигналы с фаговыми бляшками. В случае, когда необходимый искомым сигнал соответствовал бесцветной бляшке, столбик агара с этой бляшкой переносили в 0,5 мл среды SM, добавляли 1 каплю хлороформа и выдерживали при 4 °С минимум 4 ч. Отобранные таким образом клоны рассеивали до образования индивидуальных бляшек штрихом на стандартные чашки Петри с двумя слоями агара. Нижний слой состоял из 1,5 %-ного агара, верхний (0,7 %-ный агар) содержал 100 мкл «магниевого» клеток и 50 мкл 2 %-ного индикатора X-gal.

Приготовление нитроцеллюлозных реплик, иммобилизацию ДНК и отбор индивидуальных клонов с помощью молекулярной гибридизации осуществляли так же, как при первичной селекции клонов из библиотеки генов крысы.

Проверка отобранных рекомбинантных клонов методом dot-гибридизации с молекулярными зондами. Препарат ДНК из каждого отобранного клона готовили методом лизата на чашках [1]. Количество ДНК оценивали электрофорезом в агарозном геле. На нитроцеллюлозные фильтры наносили по 1 мкл (0,1—0,001 мкг) каждого препарата ДНК, иммобилизацию проводили так же, как при отборе клонов из библиотеки генов крысы. Нитроцеллюлозные фильтры с иммобилизованной ДНК использовали для молекулярной гибридизации:

а) с зондом, полученным ник-трансляцией ДНК плазмиды pTAT-5-VGZK (ник-трансляцию ДНК и гибридизацию ДНК-ДНК проводили по [1]);

б) с олигонуклеотидными зондами, комплементарными определенным экзонам гена TAT. Гибридизационная смесь содержала $6 \times \text{SSC}$, $1 \times$ раствор Денхардта, 50 мкг/мл ДНК из спермы лосося, денатурированной ультразвуком, и 1 пмоль/мл радиоактивно меченного зонда. Гибридизацию проводили в течение 2 ч при 37 °С, отмывку неприсоединившегося материала осуществляли в 100 мл $5 \times \text{SSC}$ буфера при комнатной температуре, четыре раза меняя буфер с интервалами по 10 мин, и в 200 мл того же буфера при 37 °С в течение 20 мин. Для получения радиоавтографов фильтры после гибри-

дизации экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-В («Свема», СССР) при -70°C в течение 4—24 ч с усиливающими экранами типа ЭУ-1И (СССР). Клоны, ДНК которых давала положительные сигналы на радиоавтографах, использовали для препаративной наработки.

Препараты ДНК рекомбинантных фагов λ готовили по [1].

Результаты и обсуждение. В работе использовали библиотеку генов крысы, сконструированную на основе фага λ серии Харон 4А [3]. В составе данного вектора были клонированы фрагменты геномной ДНК крысы со средним размером около 20 000 н.п. [11]. Нами было установлено, что титр используемой библиотеки генов крысы составляет $\approx 2,2 \cdot 10^6$ фагов в 1 мл, среди них $\sim 0,5\%$ составляют фаги, имеющие оперон *lacZ* (т. е. их ДНК не содержит вставок).

Для скрининга библиотеки генов крысы (и селекции специфического гена) использованы молекулярные зонды, сконструированные на основе оцДНК гибридного фага *M13*. Последние обладают рядом преимуществ по сравнению с двуцепочечными молекулярными зондами, в случае которых при введении метки используют метод ник-транслации:

а) в зонде на основе *M13* после достройки второй цепи фрагмент зонда, непосредственно участвующий в гибридизации, остается одноцепочечным. Этот участок зонда гибридизуется только с комплементарной ДНК, сорбированной на нитроцеллюлозных фильтрах, в отличие от ник-транслированной ДНК (когда в растворе присутствуют комплементарные цепи ДНК);

б) удельная радиоактивность такого зонда, как правило, выше, чем ник-транслированного. Кроме этого, вся радиоактивная метка, включенная в состав зонда, полученного на основе оцДНК, дает сигнал при гибридизации, в то время как в ник-транслированном зонде в большинстве случаев эффективно используется только часть метки. При синтезе зонда на основе оцДНК *M13* процент включения радиоактивного трифосфата достигал 70%, в то время как при ник-трансляции — в оптимальном случае $\sim 30\%$.

Основным недостатком этих зондов при отборе клонов из библиотеки генов, сконструированной в векторе λ Харон 4А, является наличие в последнем гена *lacZ* и фрагмента этого же гена в фагах *M13*. В связи с этим зонд на основе фага *M13* будет гибридизоваться с клонами, содержащими исходный фаг λ Харон 4А. Рекомбинантные же фаги при замещении центральной части вектора на вставку теряют часть гена *lacZ*, содержащую фрагмент, входящий в состав ДНК-зонда. Для исключения ошибок в отборе генов при подобной гибридизации использовали схему, приведенную на рис. 1. Согласно ей, библиотеку генов высевают на чашки Петри, содержащие в верхнем агаре X-gal (исходный вектор λ Харон 4А на таких чашках дает синие бляшки), и проводят гибридизацию фильтров-реплик как минимум с двумя молекулярными зондами на основе оцДНК фага *M13*. Один из зондов должен содержать в своем составе нуклеотидную последовательность, комплементарную искомому гену (в нашем случае в составе зонда *M13* ТАТ ЕРН39 содержался фрагмент кДНК-ТАТ крысы), второй (альтернативный) зонд может не нести дополнительных фрагментов или иметь в своем составе фрагмент другого гена (в нашем случае альтернативный *M13*-зонд содержал фрагмент кДНК ПОМК быка). При первичном скрининге отбирали неокрашенные колонии, гибридизующиеся только с одним из названных зондов. Такого же рода критерии отбора были использованы при расчистке клонов.

Начальной стадией работы было получение молекулярных зондов, содержащих специфические нуклеотидные последовательности в составе оцДНК *M13* (см. «Материалы и методы»). Для этого субклонировали в фаге *M13* фрагменты плазмиды *pTAT-5-VGZK* и фрагменты λ TAT 1. В случае субклонирования *PstI-EcoRI*-фрагмента кДНК-ТАТ (*pTAT-5-VGZK*) РФ-ДНК 48 клонов подвергли гидролизу одновременно рестриктазами *PstI* и *EcoRI*. В результате отобран клон, содержащий

PstI-EcoRI-фрагмент, который, по данным электрофореза в агарозе, имел одинаковые размеры с *PstI-EcoRI*-фрагментом кДНК-ТАТ, полученным при расщеплении ДНК *pTAT-5-VGZK*. Для проверки правильности субклонирования оцДНК отобранного клона секвенировали методом Сэнгера [8], используя универсальный праймер. Прочитанная по-

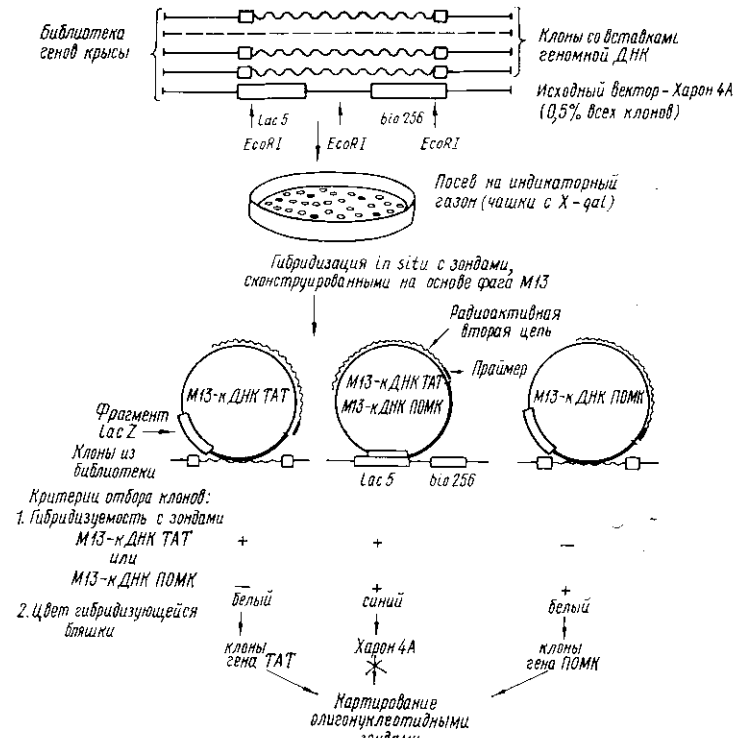


Рис. 1. Схема отбора генов ТАТ и ПОМК из геномной библиотеки крысы

Fig. 1. The scheme for isolation of tyrosine aminotransferase and proopiomelanocortin genes from the rat genome library

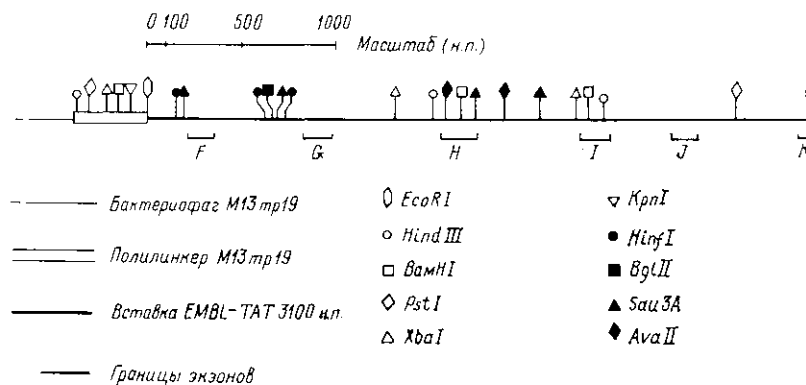


Рис. 1. Рестрикционная карта *EcoRI*-фрагмента № 4, полученного из гена ТАТ печени крысы (клон λ TAT1) и переклонированного по *EcoRI*-сайтам в состав вектора M13mp19

Fig. 2. Restriction map of *EcoRI*-fragment No. 4 obtained from TAT gene (clone λ TAT 1) and subcloned into M13mp19 vector at *EcoRI*-sites

следовательность нуклеотидов (≈ 90 н. п.) полностью совпадала с соответствующей первичной структурой кДНК-ТАТ. Таким образом был отобран клон M13 ТАТ EPN39, содержащий вставку кДНК-ТАТ размером 332 н. п.

В случае субклонирования в векторе *M13mp19* фрагментов гена ТАТ крысы, извлеченных из клона λ ТАТ 1 [6], первоначально провели отбор клонов, оцДНК которых имела меньшую подвижность при электрофорезе в агарозном геле, чем оцДНК исходного вектора. РФ-ДНК отобранных клонов расщепляли рестриктазой *EcoRI*, полученные фраг-

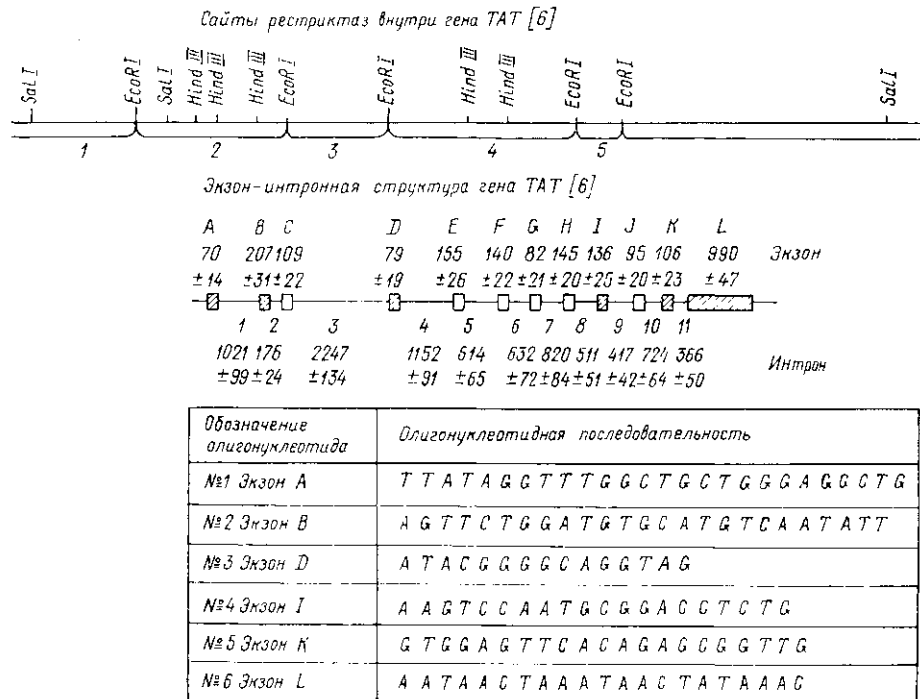


Рис. 3. Схема расположения молекулярных зондов (олигонуклеотидов), использованных для картирования гена ТАТ, и их нуклеотидная последовательность [6, 13]

Fig. 3. The scheme for the positions of molecular probes (synthetic oligonucleotides used for tyrosine aminotransferase gene mapping) on the structure of the rat TAT mRNA

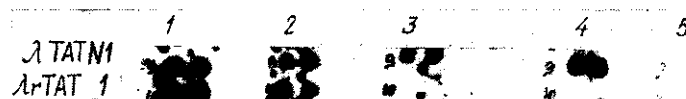


Рис. 4. Анализ ДНК отобранного клона, содержащего ген ТАТ (λ ТАТ N1) при гибридизации с синтетическими олигонуклеотидами, соответствующими определенным экзонам гена ТАТ крысы: L (1); I (2); D (3); A (4); экзону № 1 гена ПОМС крысы (5). В качестве контроля использовали ДНК λ ТАТ 1, в которой отсутствуют *EcoRI*-фрагменты №№ 1—3 гена ТАТ крысы, описанного Шутцем и др. [6]

Fig. 4. Hybridization of the DNA of λ TAT N1 clone with synthetic oligonucleotides corresponding to the certain exons of the rat TAT gene: — exon L (1), exon I (2), exon D (3), exon A (4) and to exon No. 1 from the rat POMC gene (5). The DNA λ TAT 1 deprived of *EcoRI*-fragments No. 1—3 from the rat TAT gene described by Schutz et al [6] was used as a control

менты анализировали электрофорезом в агарозном геле. Был отобран клон, ДНК которого содержала *EcoRI*-фрагмент, близкий по размерам таковому ДНК гена ТАТ величиной 3200 н. п. Для подтверждения правильности субклонирования *EcoRI*-фрагменты ДНК λ ТАТ 1 разделяли электрофорезом в агарозном геле и переносили на нитроцеллюлозный фильтр [1]. На основе оцДНК отобранного клона синтезировали радиоактивный зонд и провели блот-гибридизацию с разделенными геле-электрофорезом в агарозном геле *EcoRI*-фрагментами ДНК λ ТАТ 1, как описано у Маниатиса и др. [1], с небольшими изменениями. В результате был отобран клон, содержащий *EcoRI*-фрагмент № 4

гена ТАТ крысы в составе фага *M13*, названный *M13* ТАТ Е3, 2 N2. Нами построена подробная рестрикционная карта данного фрагмента гена ТАТ крысы (рис. 2) и определена частичная первичная структура фрагмента методом Максама — Гилберта [12].

Для первичного скрининга высевали $\sim 1,5 \cdot 10^5$ клонов, после чего специфическими зондами для генов ТАТ и ПОМК крысы были отобраны 239 клонов для дальнейшей расчистки до образования индивидуальных колоний. Из них для гена ТАТ отобраны четыре клон, для гена ПОМК крысы — девять.

Клоны, содержащие фрагменты гена ТАТ или его полноразмерный вариант, анализировали гибридизацией фаговых ДНК, приготовлен-

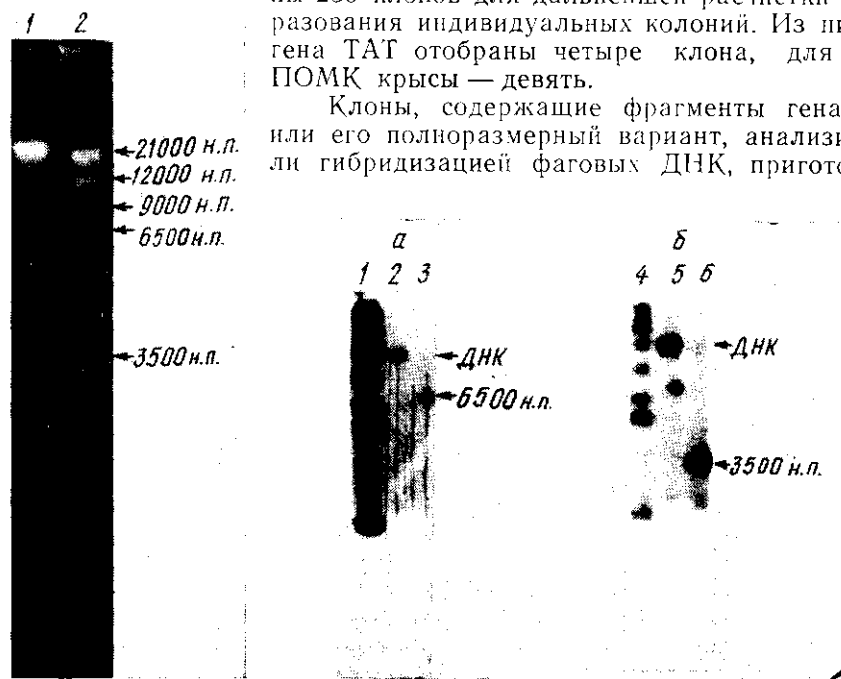


Рис. 5. Рестрикционный анализ ДНК гибридного клона, содержащего ген ТАТ (λ ТАТ N1). Электрофорез вели в 0,6 %-ной агарозе: 1 — исходная ДНК λ ТАТ N1; 2 — ДНК λ ТАТ N1, расщепленная по *EcoRI*-сайтам

Fig. 5. The restriction analysis of DNA of hybrid clone containing TAT gene (λ TAT N1). Electrophoresis was performed in 0.6 % agarose gel. 1 — native DNA λ TAT N1; 2 — λ TAT N1 restricted at *EcoRI*-sites

Рис. 6. Анализ методом блот-гибридизации ДНК клона λ ТАТ N1 с зондами, изготовленными на основе фага *M13*: *M13* ТАТ ЕРН39 (а) и *M13* ТАТ Е3,2 N2 (б). При разделении ДНК в агарозном геле на дорожки наносили *pTAT-VGZK* [7] (1, 4); исходную ДНК λ ТАТ N1 (2, 5); *EcoRI*-фрагменты ДНК λ ТАТ N1 (3, 6)

Fig. 6. Blot-hybridization of the DNA λ TAT N1 with the probes prepared on the basis of phage *M13*: *M13* TAT EPN39 (a) and *M13* TAT E3 2 N2 (b). To separate DNA by agarose gel electrophoresis it is necessary to use: *pTAT-VGZK* [7] (1, 4); native DNA λ TAT N1 (2, 5); *EcoRI*-fragments DNA λ TAT N1 (3, 6)

ных по методу лизатов на чашках Петри [1], с зондами, полученными на основе ДНК *pTAT-VGZK* [7] и *pBR-ПОМК-Вов-N8* [10]. Таким образом были исследованы все индивидуальные клоны, отобранные после расчистки. Все четыре клон гена ТАТ дали положительные сигналы после повторной гибридизации; среди клонов, потенциально соответствующих гену ПОМК, лишь один (№ 14) положительно ответил при повторной гибридизации.

Структурный анализ отобранных клонов, содержащих фрагменты гена ТАТ или его полноразмерный вариант, проводили гибридизацией с мечеными синтетическими олигонуклеотидами, комплементарными участками отдельных экзонов гена ТАТ. Структура этих нуклеотидов была рассчитана на основе изучения первичной структуры мРНК-ТАТ из печени крысы (рис. 3). Примечательно, что анализируемые с помощью олигонуклеотидов экзоны гена ТАТ локализованы в индивидуальных *EcoRI*-фрагментах (с № 1 по № 6) ДНК, образующихся при рестрик-

тазном гидролизе рекомбинантной ДНК (рис. 3). Оказалось, что ДНК одного из гибридных клонов (ДНК λ TAT N1) гибридизуется со всеми используемыми синтетическими олигонуклеотидами, соответствующими экзонам *A*, *D*, *I*, *L* гена TAT крысы и не гибридизуется с олигонуклеотидным зондом, соответствующим экзону № 1 гена ПОМК крысы. Используемая в качестве контроля ДНК λ TAT 1, в которой отсутствуют *EcoRI*-фрагменты №№ 1—3 стандартного гена TAT крысы (рис. 3), описанного Шутцем и др. [6], гибридизовалась только с олигонуклеотидными зондами, соответствующими экзонам *I* и *L* гена TAT, в то время как ДНК отобранного клона λ TAT N1 дала положительные сигналы со всеми олигонуклеотидными зондами, за исключением зонда, соответствующего экзону № 1 гена ПОМК крысы (рис. 4). Размеры *EcoRI*-фрагментов ДНК λ TAT N1 определяли электрофорезом в агарозном геле. Как следует из данных рис. 5, при расщеплении ДНК λ TAT N1 образуются как минимум 5 фрагментов. По приблизительным оценкам, они имеют следующие размеры: $\sim 21\ 000$, $\sim 12\ 000$, $\sim 9\ 500$, $\sim 6\ 500$ и $\sim 3\ 500$ п. н. Из этих фрагментов первые два по размеру соответствуют левому и правому плечам вектора λ Харон 4A [3].

Продукты гидролиза ДНК λ TAT N1 рестриктазой *EcoRI* разделяли электрофорезом в 0,6 %-ном агарозном геле, переносили на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовали с молекулярными зондами на основе оцДНК: *M13* TAT EPN39 и *M13* E3, 2 N2. Оказалось, что с молекулярным зондом *M13* TAT EPN39, содержащим фрагмент кДНК-TAT, комплементарный 3'-концевой области мРНК-TAT, гибридизуется *EcoRI*-фрагмент ДНК λ TAT N1 размером $\sim 6\ 500$ п. н., а с молекулярным зондом *M13* TAT E3, 2 N2, содержащим экзоны *F*, *G*, *H*, *I*, *J* и *K* гена TAT крысы, гибридизуется другой фрагмент ДНК λ TAT N1 размером $\sim 3\ 500$ п. н. (рис. 6).

Совокупность данных по рестрикции и дот- и блот-гибридизации ДНК отобранного из геномной библиотеки клона ДНК λ TAT N1 позволяет высказать предположение, что данный молекулярный гибрид содержит полноразмерный ген TAT, потенциально несколько отличающийся по своей структурной организации от ранее описанного [6]. Окончательное заключение можно будет сделать после полного структурного анализа отобранного гена. Полученный материал служит основой для последующего субклонирования фрагментов и анализа полной нуклеотидной последовательности выделенного гена TAT.

ISOLATION OF TYROSINEAMINOTRANSFERASE GENE FROM THE RAT GENOME LIBRARY USING MOLECULAR PROBES CONSTRUCTED ON THE BASE OF BACTERIOPHAGE M13

S. M. Zelenin, I. V. Morozov, N. R. Tevs, V. V. Gorn, V. A. Karginov, N. P. Mervetsov
Institute of Bioorganic Chemistry,
Siberian Division of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

Summary

A method for clone isolation from eukaryotic gene library in Charon 4A vector was modified. A clone containing tyrosine aminotransferase TAT gene was selected from gene library. A partial structural-functional characterization of the rat TAT gene was carried out.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маннати Г., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.—490 с.
2. Hu N., Messing J. The making of strand-specific *M13* probes // Gene.—1982.—17, N 1.—P. 271—277.
3. Charon phages: safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning / F. R. Blattner, B. G. Williams, A. E. Blechl et al. // Science.—1977.—196, N 1.—P. 161—169.

4. *Messing J.* New *M13* vectors for cloning // *Meth. Enzymol.*—1983.—**101**, pt C.—P. 20—78.
5. *Мертвцов Н. П.* Гормональная регуляция экспрессии генов.—М.: Наука, 1986.—208 с.
6. *Isolation and characterization of the rat tyrosine aminotransferase gene* / T. Shinomiya, G. Scherer, W. Schmid et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—**81**, N 4.—P. 1346—1350.
7. *Синтез и клонирование ДНК, комплементарной 3'-концевому участку матричной РНК тирозинаминотрансферазы печени крысы* / С. Н. Вишневецкий, С. Я. Головин, С. М. Зеленин и др. // *Изв. Сиб. отд-ния АН СССР.*—1987.—№ 2.—С. 122—125.
8. *M13 cloning, «dideoxy» sequencing manual.*—Bethesda: BRL press, 1982.—49 p.
9. *Mernkoth J., Wahl G.* Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports // *Anal. Biochem.*—1984.—**138**, N 2.—P. 267—284.
10. *Клонирование ДНК, комплементарной мРНК проопиомеланокортина гипофиза быка, крысы и человека. Гормональная регуляция содержания мРНК проопиомеланокортина в гипофизе крысы* / Н. П. Мертвцов, С. Я. Головин, А. Б. Беклемишев и др. // *Биохимия.*—1987.—**52**, № 5.—С. 707—714.
11. *Isolation and characterization of the rat tryptophan oxygenase gene* / W. Schmid, G. Scherer, U. Danesch et al. // *EMBO J.*—1982.—**1**, N 10.—P. 1287—1293.
12. *Maxam A. M., Gilbert W.* Sequencing end-labelled DNA with base specific chemical cleavages // *Meth. Enzymol.*—1980.—**65**.—P. 499—560.
13. *Complete complementary DNA of rat tyrosine aminotransferase messenger RNA. Deduction of the primary structure of the enzyme* / T. Grange, Ch. Guenet, J. B. Dietrich et al. // *J. Mol. Biol.*—1985.—**184**, N 2.—P. 347—350.

Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР,
Новосибирск

Получено 14.02.89