

ОСОБЕННОСТИ КЛОНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ *rpoBC* - ОПЕРОНА *ESCHERICHIA COLI* В ПЛАЗМИДАХ *pUC*

Е. Б. Патон, И. В. Крупская, А. Н. Живолуп

Введение. ДНК-зависимая РНК-полимераза *E. coli* является основным ферментом транскрипции. Голофермент РНК-полимеразы включает β -, β' -, σ - и две α -субъединицы, кодируемые генами *rpoB*, *rpoC*, *rpoD* и *rpoA* соответственно [1]. Гены, кодирующие β - и β' -субъединицы, являются частью оперона, включающего также гены *rplA*, *rplL*, *rplJ* и *rplK*, кодирующие синтез соответственно рибосомальных белков *L1*, *L7/L12*, *L10* и *L11* [1]. Известно, что в состав этого оперона входят два сильных промотора P_{11} (транскрипция генов *rplK* (*L11*) и *rplA* (*L1*)) и P_{10} (P_J) (транскрипция генов *rplJ* (*L10*) и *rplL* (*L7/L12*)) и два слабых — P_{β} и $P_{\beta'}$, направляющих транскрипцию генов *rpoB* и *rpoC*. Изучение функциональной топографии и генетические исследования РНК-полимеразы *E. coli*, естественно, требуют получения рекомбинантных молекул, включающих гены, определяющие синтез субъединиц этого фермента. С этой целью на основе многокопийной плазмиды *pUC* [2] и космиды *pJC703* [3] нами был сконструирован ряд рекомбинантных плазмид, включающих фрагменты *rpoBC*-оперона *E. coli*, и изучены особенности ориентации этих фрагментов в рекомбинантных плаزمидях.

Материалы и методы. В работе использован штамм *E. coli* К-12 JM101 [4]. Для выращивания клеток *E. coli* пользовались богатой средой LB [5], включающей дрожжевой экстракт и бактотриптон фирмы «Difco» (США), для твердых сред — агаром фирмы «Fluka» (Швейцария) или «Difco» (США). Использовали также рифампицин фирмы «Sigma» (США) и ампициллин отечественного производства.

Для получения рекомбинантных молекул ДНК и их анализа были использованы рестрикционные эндонуклеазы (НПО «Фермент», Вильнюс), ДНК-лигаза фага T4 также НПО «Фермент» (Вильнюс).

Электрофорез плазмидной ДНК и ее фрагментов, образующихся при обработке ферментами рестрикции, проводили в 0,8- и 1%-ном горизонтальных гелях по стандартной методике [6] в трис-ацетатном буфере. Использовали агарозу фирм «Сметарол» (СССР) и «BioRad» (США). Гель окрашивали раствором бромистого этидия («Calbiochem», США).

Плазмидную ДНК из клеток *E. coli* выделяли щелочным методом [7], в случае препаративной наработки ее проводили равновесное центрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия (о. с. ч., СССР), как описано в [8]. Фрагменты ДНК, непригодные для клонирования, выделяли после разделения их из агарозных гелей методом электроэлюции [6].

В работе использовали также РНКазу фирмы «Worthington» (США), лизоцим фирмы «Serva» (ФРГ). Остальные реактивы были отечественного производства, квалификация о. с. ч. и х. ч.

Получение рекомбинантных плазмид проводили следующим образом. Рекомбинантная плаزمида *pUC19/rpoB*, содержащая сильный промотор P_J и без него, была получена, как описано ранее [9]. Получение плазмиды *pUC19/B* с молекулярной массой 13000 описано в [10]. Получение рекомбинантной плазмиды *pUC9/rpoB* и анализ рекомбинантных клонов *E. coli*, содержащих ее, проводили аналогично *pUC19/rpoB* [9]. 0,5 мкг ДНК плазмиды *pUC9*, расщепленной рестриктазой *Bam*III, лигировали с 0,5 мкг *Bgl*II-фрагмента *pJC703*, выделяемого электроэлюцией из агарозного геля. Аликвоты лигазной смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* JM101, которые после инкубации высевали на чашки с LB, содержащей 50 мкг/мл рифампицина (учитывая, что ген *rpoB* клонируемого фрагмента содержит доминантную мутацию устойчивости к рифампицину *rpoB3*) и 50 мкг/мл ампициллина (учитывая наличие в векторной плазмиде гена *bla*). Для получения рекомбинантных плазмид *pUC18* и *pUC19*, включающих центральный фрагмент гена *rpoB*, ДНК векторных молекул расщепляли рестриктазой *Eco*RI и лигировали с *Eco*RI-фрагментом длиной 2870 пар оснований (п. о.), полученным из космиды *pJC703*. Трансформанты, как

и во всех остальных случаях, высевали на среду, содержащую ИПТГ и Z-gal*. Для получения рекомбинантных плазмид *pUC18* и *19*, содержащих *BglIII-EcoRI*-фрагмент (1545 п. о.), включающий сильный промотор P_J , ДНК векторных плазмид гидролизовали последовательно рестриктазами *BamHI* и *EcoRI* и лигировали с выделенным электроолющей после расщепления *BglIII-B*-фрагмента *pJC703* рестриктазой *EcoRI* фрагментом *BglIII-EcoRI*, содержащим P_J -промотор. Трансформанты анализировали на среде, содержащей ИПТГ и Z-gal, в концентрациях, указанных в [11].

Результаты. Конструирование рекомбинантной плазмиды *pUC19/rpoB*, проведенное ранее [9], показало, что встраивание в нее *BglIII*-фрагмента космиды *pJC703*, включающего полные гены *rplJ*, *rplL*

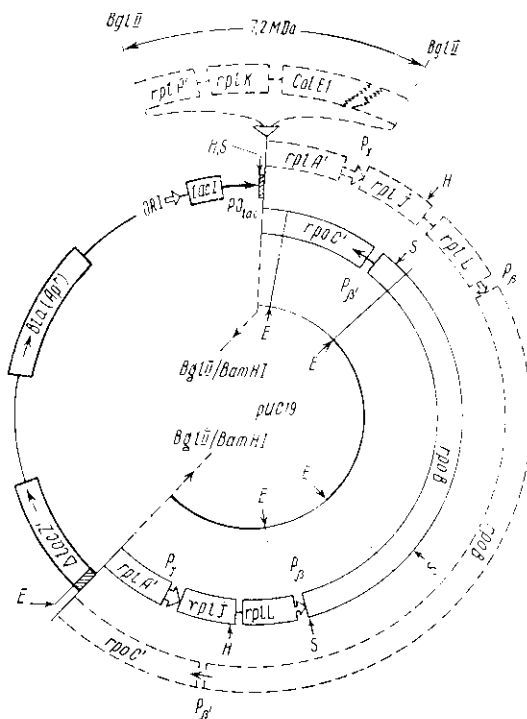


Рис. 1. Рекомбинантные плазмиды *pUC19*, включающие участки *rpoBC*-оперона *E. coli*. Пунктиром обозначена ориентация, возможная только при встраивании *BglIII*-фрагмента с молекулярной массой 7200 и удалении *BglIII-HindIII*-фрагмента, содержащего промотор P_J [9]. Жирной линией выделены *BglIII-EcoRI*-фрагмент (1545 п. о.), содержащий промотор P_J , и *EcoRI*-фрагмент (2870 п. о.) центральной области гена *rpoB*. Буквами обозначены места узнавания рестриктазами *EcoRI* (E), *HindIII* (H) и *SalGI* (S). P_J , P_{β} , $P_{\beta'}$ и *lac* обозначены стрелками

Fig. 1. Recombinant plasmids *pUC19* with inserted *E. coli* *rpoBC*-operon fragments. Dotted line designates the orientation possible only if *BglIII*-fragment with molecular weight of 7200 is inserted or the *BglIII-HindIII* P_J -promoter carrying fragment is eliminated [9]. Bold line designates 1545 bp *BglIII-EcoRI* P_J -promoter carrying fragment and the 2870 bp *rpoB*-gene central region including *EcoRI*-fragment. Letters designate sites of restriction for *EcoRI* (E), *HindIII* (H), *SalGI* (S). Arrows indicate the P_J , P_{β} , $P_{\beta'}$ and *lac* promoters

и *rpoB* и участки генов *rplA* и *rpoC*, а также сильный промотор P_J и слабые — P_{β} и $P_{\beta'}$, происходит однонаправленно. При этом ориентация его такова, что промоторы *lac* (вектора) и P_J (встроенного фрагмента) разделены протяженным участком встроенной ДНК и ориентированы во встречном направлении (рис. 1). Аналогичным образом ориентирован данный *BglIII*-фрагмент и в рекомбинантной плазмиде *pUC9/rpoB*, имеющей более короткую, чем *pUC19*, полилинкерную область. Картина электрофоретического анализа расщепленных *EcoRI* рекомбинантных плазмид *pUC9/rpoB* и *pUC19/rpoB* совпадает, как видно на рис. 2.

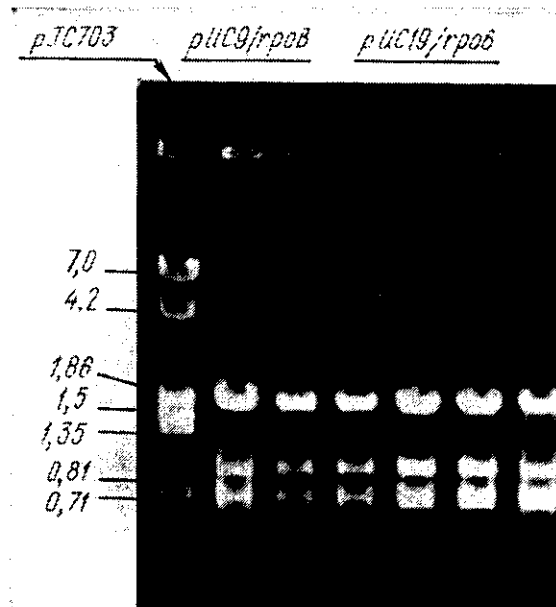
Известно [12], что клонирование сильного промотора сопряжено с рядом трудностей. Для клонирования сильных промоторов, таких, например, как промотор колифага *T5*, были сконструированы специальные плазмиды, содержащие терминатор транскрипции, стоящий вслед за клонируемым промотором. И тем не менее ряд промоторов фага *T5* оказался «не клонируемым», другие терялись с высокой частотой вследствие различных перестроек внутри рекомбинантной плазмиды. В отсутствие селективного давления такие плазмиды элиминировались из клеток с высокой частотой. Присутствие чужеродного сильного промотора в мультিকопийной рекомбинантной плазмиде может приводить к

* Z-gal является аналогом X-gal, синтезированным А. Г. Терентьевым в лаборатории Ин-та молекуляр. биологии и генетики АН УССР.

«вытнровыванию» регуляторных белков, контролирующих ее активность [13]. Показано [12], что в основе нестабильности рекомбинантных плазмид, содержащих *ColEI*-репликон, лежит сквозное считывание, инициируемое в *tet*-районе *pBR322*, приводящее к сверхпродукции пептида, негативно влияющего на копийность рекомбинантной плазмиды, что отрицательно сказывается на репликации такой рекомбинантной плазмиды. Учитывая все перечисленные факты, мы посчитали целесообразным исследовать влияние сильного промотора P_J на содержащие его рекомбинантные плазмиды. Для проверки предположения о том, что ориентация встраиваемого *BglIII*-фрагмента *pJC703* определяется содержащимся в нем сильным промотором P_J , нами были предприняты попытки конструирования рекомбинантных плазмид *pUC18* и *pUC19*, включающих фрагмент ДНК с промотором P_J в последовательном и встречном по отношению к сильному промотору *lac* вектора направлению. Как видно на рис. 1, расщепление векторных плазмид *pUC18* и *pUC19* совместно рестриктазами *BamHI* и *EcoRI* и последующее лигирование с *BglIII-EcoRI*-фрагментом (1545 п.

Рис. 2. Электрофорез в 1%-ном агарозном геле рекомбинантных плазмид *pUC9/rpoB* и *pUC19/rpoB*, расщепленных рестриктазой *EcoRI*

Fig. 2. An 1% agarose gel electrophoresis of *EcoRI* cleaved recombinant plasmids *pUC9/rpoB* and *pUC19/rpoB*



о.), содержащим промотор P_J , делает возможной лишь одну ориентацию клонируемого фрагмента в рекомбинантной плазмиде, таким образом, что в случае встраивания данного фрагмента в плазмиду *pUC19* направление транскрипции с промоторов *lac* и P_J совпадает, а при встраивании в *pUC18* — будет инициироваться во встречном направлении. Из первичной структуры клонируемого P_J -содержащего фрагмента [14] и плазмиды *pUC* [2] известно, что при вышеописанном встраивании рамка считывания генов *rplI* и *rplL* (встраиваемого фрагмента) и *lacI* (вектора) не совпадает. Поэтому при анализе рекомбинантных плазмид брали только те клоны *E. coli*, которые утратили голубую окраску в индикаторной среде с ИПТГ и Z-gal. В случае плазмиды *pUC18* были проанализированы 20 рекомбинантных клонов. Результаты электрофореза в 0,8%-ном агарозном геле свидетельствовали об уменьшении подвижности плазмид из этих клонов по сравнению с подвижностью векторной плазмиды *pUC18*. Учитывая, что сайт лигирования *BamHI/BglII* не узнается более этими рестриктазами, в наличии встроеного P_J -содержащего фрагмента убеждались с помощью расщепления рекомбинантных плазмид рестриктазой *HindIII*. Известно [14], что встроеным фрагмент содержит один асимметрично расположенный сайт узнавания рестриктазой *HindIII* (расщепляющей его на фрагменты 290 и 1255 п. о.) Полилинкерная область векторной плазмиды также имеет один сайт узнавания *HindIII* (рис. 1). Наличие в продуктах расщепления рекомбинантных плазмид *pUC18/P_J* *HindIII*-фрагментов с молекулярными массами 1930 и 840 подтверждало присутствие в них *BglIII-EcoRI*-фрагмента, содержащего промотор P_J (рис. 3).

В случае плазмиды *pUC19* были проведены три независимые реакции лигирования векторной ДНК с *BglIII-EcoRI*-фрагментом, содержащим промотор P_J . Частота появления белых колоний после трансформации клеток *E. coli* лигазной смесью была примерно в 100 раз ниже, чем в случае клонирования данного фрагмента ДНК в плазмиде *pUC18*, анализ же плазмид *pUC19* из клонов, утративших голубую окраску, показал, что ни одна из выделенных плазмид не содержит *BglIII-EcoRI*-фрагмента с промотором P_J , ориентация которого в этом случае совпала бы с ориентацией *lac*-промотора вектора. Таким образом, полученные данные указывают на то, что *BglIII-EcoRI*-фрагмент, содержа-

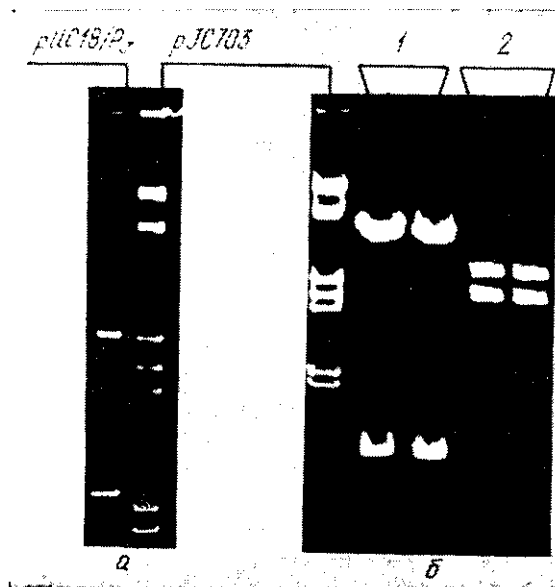


Рис. 3. Электрофорез в 1%-ном агарозном геле рекомбинантной плазмиды *pUC18* со встроеным *BglIII-EcoRI*-фрагментом, содержащим промотор P_J , расщепленный рестриктазой *HindIII* (а), и рекомбинантных плазмид *pUC18* и *pUC19* со встроеным *EcoRI*-фрагментом гена *rpoB* в двух ориентациях (1, 2) после расщепления *SalGI* (б)

Fig. 3. An 1% agarose gel electrophoresis of the *HindIII*-cleaved plasmid *pUC18* (1) carrying an inserted P_J -promoter including *BglIII-EcoRI* fragment and *SalGI*-cleaved recombinant plasmids *pUC18* and *pUC19* (2) with the *rpoB*-gene *EcoRI*-fragment inserted in both orientations (a, b)

щий промотор P_J , может быть встроен в плазмиду *pUC* только в такой ориентации, когда направление транскрипции с него противоположно направлению транскрипции, инициируемой с *lac*-промотора.

Для выяснения причин наблюдаемого эффекта нами было предпринято клонирование в плаزمиды *pUC18* и *pUC19* *EcoRI*-фрагмента (2870 п. о.) центральной части гена *rpoB*. Лишенный промоторных участков данный фрагмент мог быть использован в качестве контроля. Как и в предыдущем случае, при отборе рекомбинантных клонов анализу подвергли только белые колонии, полученные в результате трансформации компетентных клеток *E. coli* аликвотами лигазной смеси. В этом случае после предварительного электрофоретического отбора рекомбинантных плазмид, подвижность которых была ниже, чем у исходной, в наличии вставки убеждались, расщепляя их рестриктазой *EcoRI*, по присутствию в продуктах расщепления клонированного *EcoRI*-фрагмента. Для определения ориентации его в составе рекомбинантных плазмид использовали данные по первичной структуре гена *rpoB* [15]. Известно, что данный фрагмент гена *rpoB* содержит один асимметрично расположенный сайт узнавания рестриктазой *SalGI*, расщепляющей данный фрагмент на субфрагменты 500 и 2370 п. о. Уникальный сайт расщепления этим ферментом есть и на полилинкерной области векторной плазмиды. Как можно увидеть на рис. 3, рекомбинантные плазмиды *pUC18* и *pUC19* содержат данный фрагмент в обеих ориентациях, поскольку продукты их расщепления *SalGI* включают фрагменты ДНК с молекулярными массами 320, 3300 и 1500, 2100, соответствующие двум ориентациям клонированного *EcoRI*-фрагмента.

Обсуждение результатов. Суммируя вышеизложенные результаты, можно заключить, что клонирование фрагмента ДНК *E. coli*, содержащего гены, кодирующие рибосомные белки *L7/L12* и *L10*, а также ген

rpoB и участок гена *rpoC* (β - и β' -субъединицы РНК-полимеразы) в плаزمидах *pUC19* и *pUC9*, приводит к образованию рекомбинантных плазмид, где данный фрагмент ориентирован одинаково, таким образом, что транскрипция с сильных промоторов P_J этого фрагмента и *lac*-промотора *pUC* инициируется во встречном направлении. Удаление промотора P_J , содержащегося в *BglIII-HindIII*-фрагменте (1255 п. о.), делает возможной противоположную ориентацию оставшейся части *BglIII*-фрагмента *pJC703* в плазмиде *pUC19* [9]. Интересно отметить, что совпадение рамки считывания генов *rpoC'* и *lacZ'* в данном случае приводит к образованию химерного гена *rpoC'-lacZ'*, сохраняющего активную β -галактозидазу в клетках *E. coli*, содержащих такую рекомбинантную плазмиду. Та же картина наблюдается в плазмиде *pUC19/B*, описанной в [10]. В этой плазмиде совпадение ориентации промоторов P_J и *lac* становится возможным, по всей вероятности, благодаря встраиванию между ними протяженного (7200) *BglIII-A*-фрагмента *pJC703*. Структура описанных выше рекомбинантных плазмид позволяет заключить, что ориентация встраиваемого *BglIII*-фрагмента не определяется его дистальной, т. е. содержащей ген *rpoC*, частью, поскольку слияние генов *rpoC'* и *lacZ'* оказывается возможным в случае *pUC19/rpoB* с удаленным промотором P_J и в случае *pUC19/B*, где промоторы *lac* и P_J однонаправлены, но разделены фрагментом ДНК с молекулярной массой 7200. Свидетельством в пользу того, что именно присутствие сильного промотора P_J определяет ориентацию *BglIII*-фрагмента в рекомбинантной плазмиде *pUC*, служит и тот факт, что не содержащий промоторов центральный фрагмент гена *rpoB* (2870 п. о.) может быть ориентирован двояко в рекомбинантных плаزمидах *pUC18* и *pUC19*. Подтверждением того, что наличие сильного промотора влияет на содержащую его рекомбинантную плазмиду *pUC*, служит результат клонирования в плазмиде *pUC18* и *pUC19* *BglIII-EcoRI*-фрагмента (1545 п. о.), включающего сильный промотор P_J . Как уже отмечалось, расщепление полилинкерной области плазмид *pUC18* и *pUC19* совместно рестриктазами *BamHI* и *EcoRI* задает ориентацию в них промотора P_J (рис. 1). В плазмиде *pUC18* направление его может быть только противоположным, а в *pUC19* — совпадать с направлением транскрипции, инициируемой с *lac*-промотора вектора. Как выяснилось, промотор P_J , находящийся в данном фрагменте ДНК, мог быть клонирован только в плазмиде *pUC18*, т. е. когда направление транскрипции, инициируемой с него, противоположно направлению транскрипции, инициируемой с промотора *lac*. Следует отметить, что присутствие промотора, по нашим наблюдениям, оказало влияние на копийность содержащей его рекомбинантной плазмиды *pUC18/P_J*, понижая ее. Это было заметно по количеству рекомбинантных плазмид, выделенных из клеток *E. coli* после нескольких пассажей их на богатой среде LB. По данным литературы [16], однонаправленная ориентация чужеродного фрагмента ДНК при его клонировании может быть связана с образованием в результате этого «летального» гена [16]. И в этом случае становится возможной лишь «молчащая», т. е. не приводящая к транскрипции «летального» гена, ориентация. Машинный анализ первичной структуры клонированного *BglIII-EcoRI*-фрагмента плазмид *pUC9* и *pUC19*, содержащего P_J -промотор, показал, что в случае однонаправленной ориентации промоторов *lac* и P_J в рекомбинантных плазмиде *pUC9* и *pUC19* становится возможным считывание новых полипептидов, кодируемых соответственно 69 и 456 п. о. «Летальность» этих пептидов для клеток *E. coli*, однако, кажется нам маловероятной, поскольку при клонировании данного *BglIII*-фрагмента ДНК в нитевидных фагах *M13* [17] ориентация его всегда одинакова, но противоположна *pUC*, т. е. такова, что промоторы *lac* и P_J всегда ориентированы однонаправленно. Учитывая это последнее обстоятельство, причины однонаправленной, но противоположной ориентации *BglIII*-фрагмента *pJC703* при клонировании его в плазмиде *pUC* и фагах *M13* следует, очевидно, искать во влиянии, оказываемом чужеродным фрагментом на репликацию реком-

биантной ДНК (механизмы которой отличны у плазмид *pUC* и фага *M13*). Возможность отрицательного влияния сильного чужеродного промотора на репликацию содержащей его рекомбинантной плазмиды показана в [12]. Тем не менее на практике часто приходится сталкиваться с необходимостью клонирования фрагментов ДНК, содержащих сильные промоторы. Поэтому дальнейшее детальное изучение причин, определяющих ориентацию *BglIII*-фрагмента *pJC703*, содержащего участок *rpoBC*-оперона *E. coli*, в содержащих его рекомбинантных плаزمиде и фагах, представляется нам целесообразным.

PARTICULARITIES OF CLONING OF ESCHERICHIA COLI
rpoBC-OPERON FRAGMENTS IN THE *pUC* PLASMIDS

E. B. Paton, I. V. Kroupskaya, A. N. Zhyvoloup

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

Summary

Recombinant plasmids with inserted *BglIII* *E. coli* *rpoBC*-operon fragment, including the whole *rplI*, *rplJ* and *rpoB*-genes and parts of *rplA* and *rpoC*-genes are constructed, plasmid *pUC19* and cosmid *pJC703* being the origin of them. The recombinant plasmid *pUC18* with an inserted strong promoter of the *rpoBC*-operon — P_J as well as recombinant plasmids *pUC18* and *pUC19* carrying the 2870 bp central fragment of the *rpoB*-gene are also constructed. Orientations of the cloned fragments are determined for all the recombinant plasmids. It is supposed that strong P_J -promoter including part of the *BglIII* *pJC703* fragment determines its orientation when it is inserted into the *pUC* plasmid.

1. Meek D. N., Hayward R. S. Direct evidence for autogenous regulation of the *Escherichia coli* genes *rpoBC* in vivo // Mol. and Gen. Genet.— 1986.— 202, N 3.— P. 500.
2. Yanish-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved *M13* phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the *M13 mp18* and *pUC19* vectors // Gene.— 1985.— 33, N 1.— P. 103—119.
3. Collins J. Deletions, insertions and rearrangements affecting *rpoB* gene expression // Mol. and Gen. Genet.— 1979.— 173, N 1.— P. 217—220.
4. Zinder N. D., Boeke J. D. The filamentous phage (*Ff*) as vectors for recombinant DNA — a review // Gene.— 1982.— 19, N 1.— P. 1—10.
5. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.— М.: Мир, 1976.— 395 с.
6. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning — a laboratory manual.— New York: Cold Spring Harbor. Lab.— 1982.— 545 p.
7. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res.— 1979.— 7, N 6.— P. 1513—1523.
8. Clewell D. B., Helinski D. R. Supercoiled circular DNA protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1969.— 62, N 3.— P. 1159—1166.
9. Патон Е. Б., Живолуп А. Н., Вараница Л. А. Присутствие двух сильных промоторов определяет ориентацию фрагмента ДНК при встраивании в плазмиду *pUC19* // Биополимеры и клетка.— 1986.— 2, № 4.— С. 217—219.
10. Патон Е. Б., Живолуп А. Н. Химерный ген $\text{proC}'\text{-lacZ}'$ рекомбинантной плазмиды *pUC19*, сохраняющей β -галактозидазную активность в клетках *Escherichia coli* // Там же.— 1987.— 3, № 5.— С. 276—279.
11. Messing J. New *M13* vectors for cloning // Meth. Enzymol.— 1983.— 101.— P. 20— 78.
12. Stueber D., Bujard H. Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes // EMBO J.— 1982.— 1, N 11.— P. 1399—1404.
13. Vidal-Ingigliardi D., Raibaud O. A. A conventional technique to compare the efficiency of promoters in *Escherichia coli* // Nucl. Acids Res.— 1985.— 13, N 16.— P. 5919.
14. Nucleotide sequence of the ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for RNA polymerase subunit in *Escherichia coli* / L. F. Post, G. D. Strycharz, M. Nomura, H. Lewis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1979.— 76, N 4.— P. 1697—1701.
15. The primary structure of *E. coli* RNA polymerase. Nucleotide sequence of the β -subunit / Yu. A. Ovchinnikov, G. S. Monastyrskaya, V. V. Gubanov et al. // Nucl. Acids Res.— 1982.— 10, N 13.— P. 4035—4044.
16. Cloning and expression of the gene for bacteriophage *T7* RNA polymerase / P. Davanloo, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, F. W. Studier // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1984.— 81, N 7.— P. 2035—2039.
17. Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д. Однонаправленная ориентация гена *rpoB* *E. coli* при клонировании в нитевидные фаги *M13mp8* и *mWB2348* // Биоорг. химия.— 1984.— 10, № 11.— С. 1544—1547.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 25.02.87