

## Пошук можливих змін у структурній ділянці гена *Cyp2e1* мишей за дії іонізуючого випромінювання

О. В. Максимчук, І. М. Данко, Л. Г. Глушакова, М. О. Чашин

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

*Представлено результати визначення нуклеотидної послідовності екзонних ділянок гена *Cyp2e1* довжиною 1482 пари нуклеотидів. Виявлені при секвенуванні структурної ділянки гена *Cyp2e1* заміни, випадіння та вставки нуклеотидів недостовірні. Низькі дози іонізуючого випромінювання Чорнобильського спектра не викликають змін у нуклеотидній послідовності структурної ділянки гена цитохрому P450 2E1.*

Вступ. Цитохром P450 2E1 (*Cyp2e1*) — одна з ізоформ надродини цитохрому P450, що здійснює в клітині мікросомне окислення широкого спектра різних за хімічною будовою екзогенних та ендогенних сполук [1]. *Cyp2e1* метаболізує головним чином гідрофобні низькомолекулярні речовини. Серед його субстратів визначено велику кількість цитотоксичних та канцерогенних сполук, що свідчить про значну роль *Cyp2e1* у розвитку деяких захворювань, зокрема, в канцерогенезі [2]. Однією з особливостей функціонування *Cyp2e1* є його здатність у неіндукованому стані генерувати утворення активних киснево-радикальних сполук, які порушують структуру та функції клітинних органел, спричиняють інтенсифікацію перекисного окислення ліпідів і створюють у клітині умови окисного стресу [3, 4].

У попередніх наших роботах досліджено тривалий вплив низьких доз іонізуючого випромінювання на експресію мікросомного цитохрому P450 печінки мишей [5, 6]. Виявлені зміни досліджуваних показників можуть свідчити про певні порушення функціонування монооксигеназної системи клітин. Зміни активності ферментних систем виявлено також за умов одноразової дії високих та низьких доз іонізуючого випромінювання [7].

Порушення експресії та каталітичної активності мікросомного цитохрому P450 печінки ми-

шей, яких піддавали дії низьких доз іонізуючого випромінювання, скоріше за все, асоційовані з нуклеотидними замінами у структурі гена і викликаними ними структурно-функціональними змінами білка. Для перевірки цього припущення нами проведено клонування та аналіз нуклеотидної послідовності структурної ділянки гена *Cyp2e1* печінки мишей.

Матеріали і методи. В роботі використано статевозрілих мишей лінії BALB/c. Дослідну групу складала тварини, що певний час (3—8 місяців) знаходилися в Чорнобильській зоні відчуження під впливом постійного іонізуючого випромінювання низької інтенсивності. Тварини аналогічного віку та лінії розведення віварію Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ) становили контрольну групу. У кожній з груп використано по шість тварин.

Тотальну РНК з печінки мишей виділяли за методом Хомчинські і Сакхі [8]. Кількість РНК вимірювали за допомогою спектрофотометричного методу. Електрофорез РНК (20 мкг) проводили у 0,8 %-му агарозному гелі [9]. РНК-ДНК-нозерн-блот-гібридизацію та автографію проводили згідно з протоколами Маніатіса [9]. Інтенсивність смуг на блотах оцінювали за допомогою програмного забезпечення «Scion image 1.6».

кДНК синтезували з використанням M-MuLV ревертази (20 од/мкл) та оліго(dT)<sub>18</sub> праймера (0,5 мкг/мкл) з набору реагентів «First Strand

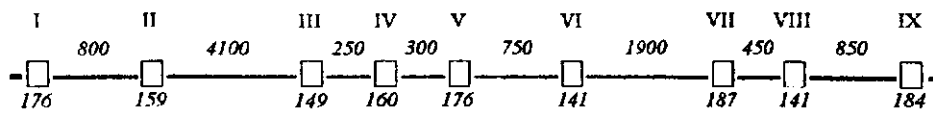


Рис. 1 Структура гена *Cyp2e1* миші [14]; прямокутниками позначено екзони (п. н.); лініями — інтрони (п. н.)

cDNA Synthesis Kit» («Fermentas», Литва). Реакційна суміш (20 мкл) містила тотальну РНК (10 мкг), оліго(dT)<sub>18</sub> праймер (0,025 мкг/мкл), інгібітор РНКаз (1 од/мкл) та M-MuLV ревертазу (2 од/мкл) у 10 × реакційному буфері.

Отриману кДНК використовували як матрицю для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Ампліфікацію кДНК *Cyp2e1* проводили за допомогою рекомбінантної термостабільної Таq-ДНК-полімерази у суміші загальним об'ємом 50 мкл. Реакційна суміш містила 10 × ПЛР буфер з 15 мМ MgCl<sub>2</sub>, dNTP у концентрації 0,20 мМ кожний, праймери у концентрації 0,25 мкМ кожний і 0,025 од/мкл Таq-полімерази. Оптимальні параметри проведення ПЛР: 30 циклів, температура синтезу становила 72 °С, температура денатурації — 92—94 °С, температура відпалювання для ПЛР гена *Cyp2e1* миші, яку вираховували за формулою:  $t_d = (4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)) - 4$ , складала 66 °С. Як позитивний контроль при проведенні ПЛР використовували *pMP*<sub>202</sub> (кДНК *Cyp2e1* миші, яку клонувано у сайті *NotI* *pBluescript* IISK). Сенсовим праймером для ПЛР була олігонуклеотидна послідовність: 3'-GAATTC ATGGCGGTTCTTGGCATCACCGTTGC-5' і антисенсовим — 5'-GGATCC TCATGAACGAGG-AATGACACAGAG-3'.

Електрофорез продуктів ПЛР проводили у 1 %-му агарозному гелі і необхідний фрагмент ДНК виділяли за допомогою набору реагентів фірми «Geneclean III Kit» Bio 101, Inc. (США).

Отриманий ПЛР продукт гена *Cyp2e1* лігували у *pGEM-T Easy Vector System* («Promega», США) по тупих кінцях за допомогою Т4-ДНК-лігази (0,2 од/мкл). Лігазною сумішшю трансформували компетентні клітини *Escherichia coli* штаму XLI-Blue-F'proABlacI<sup>q</sup>lacZΔM15Tn10(Ter<sup>r</sup>)/recA1endalgugA96(Nal<sup>r</sup>)thi1hsdR17(r<sub>k</sub><sup>+</sup>)supE44relA1lac, отримані згідно з методом Нішімури [10], що дозволяє зберігати їх довгий час при  $t = -80$  °С. Трансформовані колонії клітин *E. coli*, що несли ДНК *pGEM-T/Cyp2e1* миші, відбирали на 2 %-му твердому селективному середовищі з ампіциліном (кінцева концентрація 30—40 мкг/мл), IPTG (0,1 мМ), X-gal (0,004 %). Колонії клітин білого кольору відбирали та вирощували у рідкому поживному середовищі LB (1 %-й бактеропептон, 0,5 %-й дріжджовий екстракт, 0,5 %-й NaCl) упродовж 12 год при 37 °С. Рекомбінантну ДНК з клітин *E. coli* виділяли за методом лужного лізису та кип'ятіння

[9] і аналізували на наявність досліджуваного гена *Cyp2e1* миші за допомогою ПЛР та методу дот-гібридації.

Для проведення дот-гібридації застосовували набір реагентів Nonradioactive Nucleic Acid Detection System «Cool Probe» («Sigma», США) і нітроцелюлозну мембрану Hybond-N («Amersham Pharmacia Biotech», Англія). Як зонд використовували ДНК *pMP*<sub>202</sub>, яку мітили нерадіоактивними біотиновою та DIG мітками. Внесення мітки, передгібридацію, гібридацію та детекцію виконували згідно з рекомендаціями фірми-виробника.

Секвенування ПЛР продуктів гена *Cyp2e1* миші проводили у 20 мкл реакційної суміші, яка містила 0,5 мкг векторної ДНК, 3,2 мкМ праймери T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) і SP6 (TTTAGGTGACACTATAG), 3 мкМ 5 × буфер (400 мМ трис-НСl, рН 9,0, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>), 2 мкл Big Dye termination reaction mix («Perkin Elmer», США) та 1 мкл ДМСО. Оптимальними параметрами реакції були: початкова денатурація при 95 °С протягом 4 хв.; 45 циклів, які включали денатурацію при 95 °С — 15 с, відпалювання при 55 °С — 5 с та наступний синтез при 60 °С — 4 хв. Секвенування та ампліфікацію проводили на приладах ABI 310 Sequencer та Gene Amp PCR System 2400 згідно з протоколом фірми «Perkin Elmer».

Для запобігання помилок, які можуть виникати при синтезі ДНК за участю M-MuLV ревертази і Таq-полімерази, синтез кДНК та ПЛР одного й того ж фрагмента кДНК проводили двічі. Оскільки вірогідність появи однакових помилок у нуклеотидній послідовності при такій процедурі незначна, вважається, що виявлені подібним чином мутації, які повторюються в усіх копіях гена *Cyp2e1* кожної тварини, є справжніми, а ті, що не повторюються, — помилковими.

Результати і обговорення. Відомо, що конститутивна та індукована експресія цитохрому P450 2E1 має вікову, тканинну та певну статеву специфічність [11, 12]. Оскільки у дорослих ссавців у клітинах печінки реєструється високий рівень транскрипції гена *Cyp2e1* [13], об'єктом дослідження було обрано цитохром P450 2E1 печінки статевозрілих мишей, які тривалий час перебували під впливом низьких доз іонізуючого випромінювання. Показано, що залежно від часу експозиції радіаційного фактора експресія цитохрому P450 2E1 суттєво змінюється [5]. Однією з можливих

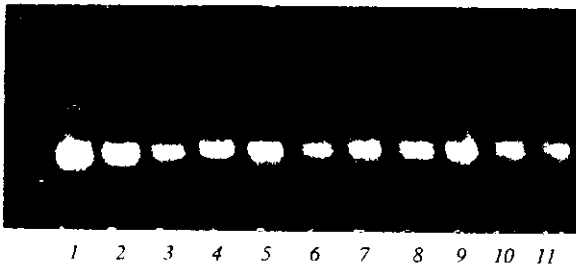


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР гена *Cyp2e1* мишей. Контрольні тварини: 1, 2 — самці; 3, 4 — самки; дослідні тварини: 5, 6, 10 — самці; 7—9, 11 — самки

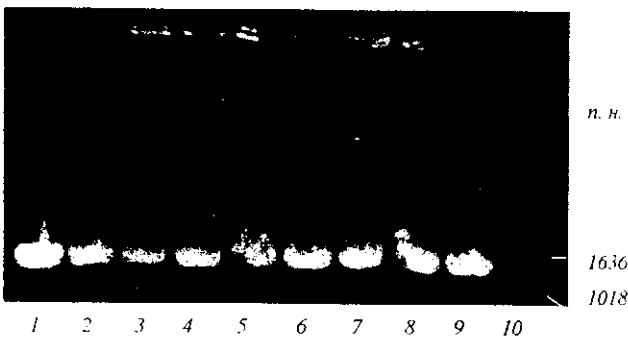


Рис. 3. ПЛР аналіз рекомбінантних ДНК *pGEM-T/Cyp2e1* миші (ПЛР продукт гена *Cyp2e1* миші, клонований у *pGEM-T*). Контрольні тварини: 1, 2 — самці; 3, 4 — самки; дослідні тварини: 5, 6 — самці; 7, 8 — самки; 9 — ПЛР на *pMP202*; 10 — ДНК маркер («Gibco BRL», США)

причин порушення експресії *Cyp2e1* можуть бути зміни у нуклеотидній послідовності кодуючої ділянки гена, яка у миші має довжину 1482 пари нуклеотидів (п. н.) і складається з дев'яти екзонів (рис. 1).

Для пошуку можливих мутацій у структурній ділянці гена *Cyp2e1* нами було її клоновано у системі *E. coli*. Для цього виділяли тотальну РНК з печінки окремих тварин. Результати РНК-ДНК-нозерн-блот-гібридизації показали досить високий рівень експресії *Cyp2e1* у печінці як контрольних, так і дослідних тварин [6]. Для отримання гена *Cyp2e1* на тотальній РНК з печінки окремих тварин синтезували кДНК і проводили ПЛР.

На рис. 2 наведено електрофореграму продуктів ПЛР гена *Cyp2e1* окремих мишей дослідної і контрольної груп. кДНК-фрагмент гена *Cyp2e1* виділяли і очищували з агарозного гелю та клонували його у векторну ДНК *pGEM-T*. Після трансформації клітин *E. coli* векторною ДНК з окремих колоній, які містили *pGEM-T/Cyp2e1*, виділяли рекомбінантну ДНК і аналізували її на наявність досліджуваного гена за допомогою методів ПЛР та дот-гібридизації.

На рис. 3 зображено електрофореграму продуктів ПЛР, проведеної на матриці рекомбінантної ДНК *pGEM-T/Cyp2e1*. Чіткі смуги, які відповідають фрагменту ДНК довжиною приблизно 1,5 тис. п. н., свідчать про наявність гена *Cyp2e1* у складі рекомбінантної ДНК. З відібраних колоній, які несли рекомбінантну ДНК *pGEM-T/Cyp2e1*, отримували векторну ДНК і визначали нуклеотидну послідовність кДНК гена *Cyp2e1*.

Для порівняльного аналізу нуклеотидних послідовностей гена *Cyp2e1* відбирали по декілька колоній клітин *E. coli*, що містили досліджувану кДНК. Таким чином, ми вивчали і порівнювали результати секвенування декількох копій гена однієї тварини. Нами виявлено певні зміни у структурних ділянках гена *Cyp2e1* тварин, які зазнали впливу низьких доз іонізуючого випромінювання (рис. 4).

У досліджених екзонних ділянках гена окремих дослідних мишей знайдено такі зміни: у позиціях 376 і 1029 — вставки С; у 377, 387, 392 і 1210 — випадіння G, C, G і C відповідно; 815 A → G, 1089 C → G, 1164 T → G, 1165 G → T, 1218 A → G, 1372 T → C. У нуклеотидних послідовностях гена *Cyp2e1* контрольних мишей також знайдено певні точкові заміни: 20 C → T, 67 T → C, 476 A → G, 874 A → C, 1110 C → G, 1384 T → C і випадіння А у положенні 19. Такі нуклеотидні заміни могли б спричинити зміни в амінокислотному складі, а випадіння та вставки нуклеотидів — зсув рамки зчитування, які призвели б до значних порушень у структурі та експресії білка *Cyp2e1*.

Отримані нами послідовності екзонних ділянок гена на 99—100 % збігаються з нуклеотидною послідовністю гена *Cyp2e1*, описаною іншими авторами [14—16]. При порівняльному аналізі результатів секвенування структурних ділянок гена *Cyp2e1* змін, що повторюються у різних копіях гена однієї тварини як дослідної так і контрольної груп, визначено не було. Таким чином, справжніх мутацій у досліджуваних зразках нами не знайдено. Виявлені зміни у структурі гена *Cyp2e1*, скоріше за все, є наслідком неточності у роботі Таq-ДНК-полімерази, для якої показано вірогідність помилок  $2 \cdot 10^{-5}$  нуклеотидів при синтезі ДНК [17], що при перерахунку кількості синтезованих нуклеотидів за 60 циклів відповідає одержаним нами даним.

Отримані результати дозволяють зробити висновки стосовно того, що в нуклеотидній послідовності структурної ділянки гена *Cyp2e1* печінки тварин, які перебували тривалий час у Чорнобильській зоні відчуження, достовірних змін не виявлено. Порушення в експресії та функціонуванні цитохрому P450, можливо, пов'язані з інтен-

1 Atg gcg gtt ctt ggc atc a\*c\*c gtt gcc ttg ctt gtc tgg atc gcc acc ctc ctc ctc gta  
 M A V L G I T V A L L V W I A T L L L V  
 61 tcc atc t\*gg aaa cag atc tat aga agt tgg aac ctg ccc cca gga cct ttc cca att cct  
 S I W K Q I Y R S W N L P P G P F P I P  
 121 Ttc ttt gga aac att ttt cag ctg gat ttg aag gat att ccc aag tct tta acc aag ttg  
 F F G N I F Q L D L K D I P K S L T K L  
 181 Gca aag cgc ttc ggg cca gtg ttc aca ctg cac ctg ggt cag agg cgc atc gtg gtc ctg  
 A K R F G P V F T L H L G Q R R I V V L  
 241 Cat ggc tac aag gct gtc aag gag gtg cta ctg aac cac aag aat gag ttc tct ggc cga  
 H G Y K A V K E V L L N H K N E F S G R  
 301 Ggg gac att cct gtg ttc cag gag tac aag aac aag ggg att att ttc aat aat gga ccc  
 G D I P V F Q E Y K N K G I I F N N G P  
 361 Aca tgg aag gac gtg c\*g\*g agg ttt tcc\* cta ag\*t atc ctc cgt gac tgg gga atg ggg aaa  
 T W K D V R R F S L S I L R D W G M G K  
 421 Cag ggt aat gag gcc cgc atc caa aga gag gca cac ttc ctg gtg gag gag ctc aa\*a aag  
 Q G N E A R I Q R E A H F L V E E L K K  
 481 Acc aaa ggc cag cct ttt gac cct acc ttt ctg att ggc tgt gca ccc tgc aat gtc att  
 T K G Q P F D P T F L I G C A P C N V I  
 541 Gcg gat att ctc ttc aac aaa cgc ttc gat tac gat gac aag aag tgt ctg gag ctc atg  
 A D I L F N K R F D Y D D K K C L E L M  
 601 Agt ttg ttc aat gaa aac ttc tac ctg ctg agt act ccc tgg atc cag gct tac aat tac  
 S L F N E N F Y L L S T P W I Q A Y N Y  
 661 Ttt tcg gat tat cta caa tat cta cct gga agc cac aga aaa gtc atg aaa aat gtg tct  
 F S D Y L Q Y L P G S H R K V M K N V S  
 721 Gaa ata aga cag tac aca ctt gga aaa gcc aag gaa cac ctt aag tca ctg gac atc aac  
 E I R Q Y T L G K A K E H L K S L D I N  
 781 Tgc ccc cgg gat gtg act gac tgt ctc ctc ata ga\*g atg gag aag gaa aaa cac agc caa  
 C P R D V T D C L L I E M E K E K H S Q  
 841 Gaa ccc atg tac aca atg gaa aat att tct gtg a\*ct ttg gcc gac ctg ttc ttt gca gga  
 E P M Y T M E N I S V T L A D L F F A G  
 901 Aca gag acc acc agc aca act ctg aga tat ggg ctc ctg att ctc atg aaa tac cca gaa  
 T E T T S T T L R Y G L L I L M K Y P E  
 961 Att gaa gag aaa ctt cat gaa gaa att gac agg gtt att ggg cca agc cgt gcc cct gca  
 I E E K L H E E I D R V I G P S R A P A  
 1021Gtc cga gac\* agg atg aat atg ccc tac atg gac gct gta gtg cat gag att cag aga ttc  
 V R D R M N M P Y M D A V V H E I Q R F  
 1081Atc aac ctc\* gtc cct tcc aac ctg ccc cac\* gaa gca acc cga gac acc gtg ttc cga gga  
 I N L V P S N L P H E A T R D T V F R G  
 1141Tat gtc atc ccc aag ggt aca gtt\* g\*ta att cca act ctg gac tcc ctt tta ttt gac aac  
 Y V I P K G T V V I P T L D S L L F D N  
 1201Tat gag ttt c\*ca gat cca\* gag aca ttt aaa cct gag cat ttt ctg aat gaa aat ggg aag  
 Y E F P D P E T F K P E H F L N E N G K  
 1261Ttc aag tac agt gac tat ttc aag gcg ttt tct gca gga aag cgc gtg tgt gtt gga gaa  
 F K Y S D Y F K A F S A G K R V C V G E  
 1321Ggc ctg gcc cgc atg gaa ctg ttt ctg ctt ttg tct gct att ctg cag cat t\*tt aat ctg  
 G L A R M E L F L L L S A I L Q H F N L  
 1381Aag t\*ct ctg gtt gac cct aag gat atc gac ctc agc cct gtt aca att ggc ttt ggc agt  
 K S L V D P K D I D L S P V T I G F G S  
 1441Atc cca cgc gaa ttt aaa ctc tgt gtc att cct cgt tca tga  
 I P R E F K L C V I P R S (stop)

Рис. 4. Нуклеотидна та виведена амінокислотна послідовності *Сур2e1* миші. Зірочками позначено позиції усіх виявлених змін нуклеотидів у структурній ділянці гена *Сур2e1*

сифікацією процесів перекисного окислення ліпідів та накопиченням вільних радикалів кисню і радіотоксинів, які пошкоджують клітинні мембрани і викликають структурні та функціональні зміни мембранозв'язаного цитохрому P450.

O. V. Maksymchuk, I. M. Danko, L. G. Glushakova, M. O. Chaschyn

Search for possible changes in murine gene *Cyp2e1* structural region under exposure to ionizing radiation

Summary

The structural region of murine *Cyp2e1* gene was cloned in *Escherichia coli* system. We identified a nucleotide sequence of gene exon regions of 1482 base pairs. Substitutions, inserts and deletions in the gene structural region revealed by sequencing appeared to be invalid. Thus, low doses of Chernobyl specter radiation do not cause changes in the nucleotide sequence of structural region of murine cytochrome P450 2E1 gene.

O. V. Максимчук, И. М. Данко, Л. Г. Глушакова, Н. А. Чащин

Поиск возможных изменений в структурном участке гена *Cyp2e1* мыши при действии ионизирующего излучения

Резюме

Проведено клонирование структурного участка гена цитохрома P450 2E1 мыши в системе *Escherichia coli*. Определена нуклеотидная последовательность экзонных участков гена *Cyp2e1* длиной 1482 пары нуклеотидов. Выявленные при секвенировании структурного участка гена *Cyp2e1* замены, вставки и выпадения нуклеотидов недостоверны. Низкие дозы ионизирующего излучения Чернобыльского спектра не вызывают изменений в нуклеотидной последовательности структурного участка гена *Cyp2e1*.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Parke D. V., Joannides C., Lewis F. V. The role of cytochromes P450 in the detoxication and activation of drugs and other chemicals // *Canad. J. Physiol. and Pharmacol.*—1991.—69.—P. 537—549.
2. Lieber C. S. Cytochrome P450 2E1: its physiological and pathological role // *Physiol. Rev.*—1997.—77.—P. 517—544.
3. Gergel D., Misik V., Riesz P., Cederbaum A. I. Inhibition of rat and human cytochrome P450 2E1 catalytic activity and reactive oxygen radical formation by nitric oxide // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1997.—337.—P. 239—250.
4. Morel Y., de Waziers J., Barouki R. A repressive cross-regulation between catalytic and promoter activities of the *Cyp1A1* and *Cyp2E1* genes: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> // *Mol. Pharmacol.*—2000.—57.—P. 1158—1164.
5. Максимчук О. В., Данко І. М., Росохацька І. В., Чащин М. О. Експресія гена *Cyp2e1* у клітинах печінки мишей під

впливом низьких доз радіації // *Біополімери і клітина.*—2002.—18, № 6.— С. 518—521.

6. Максимчук О. В., Данко І. М., Чащин М. О. Коливання рівнів експресії та вмісту цитохрому P450 2E1 (*Cyp2e1*) при дії іонізуючої радіації // *Доп. НАН України.*—2003.— № 11.— С. 162—166.
7. Chung H. Ch., Kim S. H., Lee M. G., Cho C. K., Kim T. H., Lee D. H., Kim S. G. Mitochondrial dysfunction by gamma-irradiation accompanies the induction of cytochrome P4502E1 (CYP2E1) in rat liver // *Toxicology.*—2001.—161.—P. 79—91.
8. Chomczynski P., Sacchi N. A simple and fast method to extract RNA from tissues, culture cells // *Biochemistry.*—1990.—9, N 6.—P. 5091—5094.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—425 с.
10. Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., Sugino Y. Rapid and highly efficient method for preparation of competent *E. coli* cells // *Nucl. Acids Res.*—1990.—N 18.—P. 6169.
11. Novak R. F., Woodcroft K. J. The alcohol-inducible form of cytochrome P450 (Cyp2E1): role in toxicology and regulation of expression // *Arch. Pharm. Res.*—2000.—23, N 4.—P. 267—282.
12. Emoto C., Yamazaki H., Yamazaki S., Shimada N., Nakajima M., Yokoi T. Characterization of cytochrome P450 enzymes involved in drug oxidation in mouse intestinal microsomes // *Xenobiotica.*—2000.—30, N 10.—P. 943—953.
13. Ingelman-Sundberg M., Johansson I., Yin H., Terelius Y., Eliasson E., Clot P., Albano E. Ethanol-inducible cytochrome P4502E1: genetic polymorphism, regulation, and possible role in the etiology of alcohol-induced liver disease // *Alcohol.*—1993.—10, N 6.—P. 447—452.
14. Freeman J. E., Stirling D., Russell A. L., Wolf R. cDNA deduced amino acid sequence, predicted gene structure and chemical regulation of mouse CYP2E1 // *Biochem. J.*—1992.—281.—P. 689—695.
15. Song B. J., Gelboin H. V., Park S. S., Yang C. S., Gonzalez F. J. Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P450s // *J. Biol. Chem.*—1986.—261, N 35.—P. 16689—16697.
16. Umeno M. O., MacBride W., Yang C. S., Gelboin H. V., Gonzalez F. J. Human ethanol inducible P4502E1: Complete gene sequences promoter characterization, chromosome mapping and cDNA-directed expression // *Biochemistry.*—1988.—27.—P. 9006—9013.
17. Lundberg K. S., Shoemaker D. D., Adams M. W., Short J. M., Sorge J. A., Mathur E. J. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus* // *Gene.*—1991.—108, N 1.—P. 1—6.

УДК 577.2

Надійшла до редакції 05.12.03