



УДК 577.1:547.963.2

ЭКСПРЕССИЯ ДВУХ ВАРИАНТОВ ГЕНА КОР-АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В ЧЕЛОВЕКА В *ESCHERICHIA COLI*

Г. П. Борисова, Я. В. Калис, А. В. Дишлер,
П. П. Пумпен, Э. Я. Грен, В. В. Цибиногин, Р. А. Кукайн

Введение. Клонирование вирионной ДНК в бактериях с расшифровкой ее первичной структуры [1] позволило локализовать в геноме вируса гепатита В (*HBV*) гены двух мажорных вирусных белков — поверхностного антигена (*HBsAg*) и кор-антигена (*HBcAg*), определяющих иммунологические свойства наружной липопротеидной оболочки вирусной частицы и ее внутреннего капсида (кора) соответственно. Кор-частицы *HBV* обнаруживаются в клетках печени больных гепатитом В и несут в себе, помимо *HBcAg* и вирионной ДНК, вирусспецифическую ДНК-зависимую ДНК-полимеразу и «е»-антиген (*HBеAg*) [1]. Последний представляет собой третью из известных антигенных систем *HBV*, присутствует в крови больных и вирусоносителей [2] и, что крайне интересно, закодирован в вирусном геноме тем же геном, что и *HBcAg* [3].

Иммунологическое выявление *HBcAg* и *HBеAg* и антител к ним — анти-*HBе* и анти-*HBс* — имеет первостепенное диагностическое значение, в первую очередь, для прогноза заболевания [4]. Возможная же роль анти-*HBс* в формировании иммунитета к *HBV*-инфекции вызывает особый интерес к *HBcAg*, который в таком случае может быть использован для получения принципиально новой противогепатитной вакцины [5] вместо традиционных вакцин на базе *HBsAg* [1, 4]. Поскольку природных ресурсов *HBcAg* и *HBеAg* практически не существует, на передний план выдвигается проблема экспрессии гена, кодирующего оба антигена, в гомологичных и гетерологичных системах с использованием генноинженерных подходов.

Открытая фаза трансляции *C*, в которой закодированы *HBcAg* и *HBеAg*, имеет в большинстве секвенированных геномов *HBV* одинаковую структуру: считывание фазы с первого иницирующего кодона АТГ предполагает образование полипептида Р24 протяженностью 212 аминокислотных остатков, со второго — полипептида Р21, содержащего 183 аминокислотных остатка (рис. 1). Молекулярная масса мажорной компоненты кор-частиц, или мономерной субъединицы *HBcAg*, оценивается экспериментально в 19000—22000 [1], а прямая попытка определить структуру ее N-концевой последовательности закончилась неудачей [6]. В результате не представляется возможным отождествить *HBcAg* с одним из двух теоретически возможных пептидов: если на раннем этапе в качестве *HBcAg* фигурировал обычно Р21 [1], то в новейших обзорных работах предпочтение отдается Р24 [7]. Полипептид Р15,5, образующийся в результате процессинга первоначального продукта трансляции гена по последовательности Thr-Thr-Val-Val₁₄₉ с удалением 34 концевых аминокислот, по-видимому, обладает *HBеAg*-активностью [8].

Неоспоримый успех в области экспрессии гена *HBcAg* в бактериях [9—12] не привел, как это ни парадоксально, к окончательному реше-

нию проблемы о структуре нативного белка. Материал, обладающий антигенными свойствами *HBcAg* был получен при экспрессии как короткого [9, 11], так и длинного [10] вариантов гена. Замена двух N-концевых аминокислот полипептида P21 на 11 N-концевых аминокислот β -галактозидазы [12] не сказывается на его свойствах и не препятствует, очевидно, бактериальному *HBcAg* образовывать мультимерные структуры, напоминающие нативные кор-частицы [13].

Наша задача состояла в сравнении иммунологических свойств полипептидов P21 и P24. Настоящая работа посвящена конструированию и предварительной оценке эффективности плазмид для синтеза обоих полипептидов под контролем промоторно-операторного участка триптофанового оперона *Escherichia coli*.

Материалы и методы. Бактерии, плазмиды, трансформация и отбор клонов. *E. coli* RR1 получен от Э. М. Ледерберг (Станфорд, США). Плазида *pBR322-trp* [14] любезно предоставлена Е. Д. Свердловым (Москва). Клетки трансформировали по методу Дагерта и Эрлиха [15]. Клоны отбирали по гибридизации колоний с ^{32}P -меченными зондами [16]. Для скрининга плазмид использовали экспресс-метод выделения плазмидных ДНК [17]. В прямом иммуноскрининге клонов — продуцентов *HBcAg* следовали, в основном, методу [18]. Из человеческой сыворотки, обладавшей анти-*HBc*-активностью по данным иммунологического теста CORAB («Abbott», ФРГ), выделяли IgG-фракцию иммуноглобулинов и метили ее ^{125}I хлораминовым методом [19]. Колонии, перенесенные на нитроцеллюлозные фильтры диаметром 12 см, лизировали, инкубируя 30 мин в буферном растворе (50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 5 мМ ЭДТА, 50 мкг/мл PMSF, 100 мкг/мл ϵ -аминокапроновой кислоты, 2 мг/мл лизоцима и 3 % бычьего сывороточного альбумина (БСА)). Далее фильтры обрабатывали буферным раствором (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 10 мМ MgCl_2 , 20 мкг/мл ДНКазы) в течение 15 мин. Обе обработки проводили при 4 °С. Фильтры помещали в 3 %-ный раствор БСА и выдерживали 1 ч при 40 °С. После отмывки каждый фильтр инкубировали в 5 мл 3 %-ного раствора БСА с $1 \cdot 10^7$ имп/мин ^{125}I -анти-*HBc* в течение ночи при комнатной температуре. Далее фильтры отмывали 4—5 раз буферным раствором (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 150 мМ NaCl), высушивали и проводили автордиографирование в течение 48 ч на пленке РМ-1.

Ферменты. Нуклеаза *Bal31* любезно предоставлена Н. В. Томилиным (Ленинград). ДНК-лигаза фага T4, рестриктазы *EcoRI*, *BamHI*, *SalI*, *HindIII* — производства Ин-та прикладной энзимологии (Вильнюс), *AvaI*, *PstI* — «P/L Biochemicals», США, *BglII*, ДНК-полимераза *E. coli* (фрагмент Кленова) — «Boehringer», ФРГ.

Получение и электрофоретический анализ ДНК. Плазмидные ДНК в препаративных количествах получали очисткой на оксипатите [20]. Расщепление и зашивку ДНК проводили в условиях, рекомендованных изготовителями. Для разделения фрагментов ДНК применяли горизонтальный электрофорез в 1 %-ном агарозном геле (100×100×3 мм) или вертикальный — в 10 %-ном полиакриламидном геле (150×300×3 мм).

Конкурентная радиоиммунопреципитация. Клетки выращивали при 37 °С в 5 мл питательного бульона до оптической плотности 0,3 ед. A_{650} , осаждали центрифугированием, отмывали солевой средой M9 и суспендировали в 1,5 мл среды M9 с 0,2 %-ными казаминовыми кислотами («Difco», США), после чего инкубировали в течение 90 мин для полной индукции *Pitp*. Клетки осаждали центрифугированием и лизировали в 80 мкл буферного раствора (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 5 мМ ЭДТА, 50 мкг/мл PMSF, 100 мкг/мл ϵ -аминокапроновой кислоты и 5 мг/мл лизоцима). После 3-кратного замораживания — оттаивания добавляли 10 мкл 5 %-ного DS-Na и 10 %-ного тритона X-100 и центрифугировали 5 мин при 12000 об/мин. Все операции — при 4 °С. Для определения *HBcAg* 10 мкл бактериального лизата вносили в реакционную смесь РИПА (50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 1 %-ный дезоксихолат натрия, 1 %-ный тритон X-100, 0,1 %-ный DS-Na) общим объемом 100 мкл, добавляли 10 мкл анти-*HBc* соответствующего разведения и выдерживали 1 ч при 37 °С. Затем вносили 10 мкл (10000 имп/мин) бактериального *HBcAg* («Biogen», Швейцария), меченного ^{125}I . Пробы инкубировали 60 мин при 37 °С, добавляли 20 мкл 10 %-ной суспензии убитых формалином клеток *St. aureus*, выдерживали 60 мин при 4 °С, отмывали буферным раствором РИПА и просчитывали радиоактивность в γ -кювете на сцинтилляционном счетчике.

Иммунопреципитация ^{35}S -меченного белка. Клетки выращивали, как описано выше. Через 90 мин после индукции промотора *P_{trp}* осаждали центрифугированием и ресуспендировали в среде M9 со 100 мкКи/мл ^{35}S -метионина (200 Ки/ммоль, «Изотоп», СССР), инкубировали 15 мин, осаждали и лизировали трехкратным замораживанием — оттаиванием в присутствии лизоцима. К 180 мкл лизата ($2-3 \cdot 10^7$ имп/мин) добавляли 60 мкл 5-кратного буфера РИПА, 60 мкл воды и 5 мкл анти-*HVc*, инкубировали 2 ч при 37 °С, затем 12 ч при 4 °С, вносили 25 мкл *St. aureus*; после отмывки осадки суспендировали в 40 мкл раствора для нанесения образцов, прогревали 2 мин при 100 °С и подвергали вертикальному электрофрезу в 14 %-ном полиакриламидном геле ($150 \times 164 \times 1,5$ мм) при 20 мА в течение 12 ч [21]. После высушивания гелей проводили их автордиографирование в течение 48—96 ч.

Бесклеточный синтез белка. S30-экстракт *E. coli* готовили, в основном, согласно [22]. Реакционная смесь (25 мкл) содержала 75 мМ трис-НСl, рН 7,5, 14 мМ ацетат магния, 30 мМ NH_4Cl , 54,5 мМ ацетат калия, 220 мкМ 19 аминокислот, 2,2 мМ АТФ, 1,4 мМ ДТТ, 27 мкг/мл лейковарина, 100 мкг/мл тРНК, 35 мМ РЕР, 20 мкг/мл РЕР-киназы, 50 мкг/мл PMSF, 40 мкг/мл ϵ -аминокапроновой кислоты, 10 мкМ ^{35}S -метионин (10 мкКи) и 5 мкг плазмидной ДНК. Пробы инкубировали 45 мин при 37 °С, добавляли ДНКазу, выдерживали 5 мин при 37 °С, переосаждали ацетоном и подвергали электрофрезу, как описано выше.

Обсуждение результатов. Для осуществления экспрессии обоих вариантов гена *HVcAg* предполагалось использовать регуляторные элементы триптофанового оперона *E. coli*: промотор *P_{trp}* и последовательность Шайно-Далгарно (SD) гена лидерного пептида *trpL*. Наша задача состояла в создании плазмид с оптимальным для инициации трансляции расстоянием между упомянутой SD-последовательностью и соответствующим АТГ, принадлежащим либо короткому, либо длинному варианту гена. Эти АТГ в открытой фазе трансляции *C* удалены на 10 и 100 нуклеотидных пар, соответственно, от сайта рестрикции *HhaI*, предшествующего гену *HVcAg* в клонированном нами геноме *HV* [23]. Поскольку ген не содержит внутренних *HhaI*-сайтов, представлялось удобным использовать его для дальнейшего клонирования в виде *HhaI*-фрагмента. Вычленение гена *HVcAg* рестриктазой *HhaI* в работах по его экспрессии применялось и ранее [10].

После обрезки «липких» концов нуклеазой *S1 HhaI*-фрагмент протяженностью 1000 нуклеотидных пар, несущий ген *HVcAg*, клонировали в *BamHI-SalI*-промежутке плазмиды *pBR322-trp* с заполненными ДНК-полимеразой *E. coli* (фрагментом Кленова) «липкими» концами. Предполагалось, что по краям клонированного фрагмента восстановятся сайты *BamHI* и *SalI*, и ген будет предваряться уникальным сайтом *BamHI* в плазмиде с правильной ориентацией вставки относительно промотора *P_{trp}*. Однако все полученные рекомбинантные плазмиды содержали вставку в противоположной ориентации, и перед началом гена образовался не *BamHI*, а другой уникальный сайт — *SalI*. Для того, чтобы «развернуть» вставку, *BamHI-SalI*-фрагмент с геном *HVcAg* переклонировали в *SalI-AvaI*-промежутке вектора *pBR322-trp*. Зашивка в этом случае была направленной и осуществлялась, с одной стороны, по «липким» концам *SalI*, с другой — по «тупым» концам, образовавшимся в результате заполнения «липких» концов *BamHI* и *AvaI* фрагментом Кленова.

Отобранные по соответствию предусмотренной структуре плазмиды, например *pGC2*, содержат ген *HVcAg*, правильно ориентированный относительно промотора *P_{trp}* и предваряемый уникальным сайтом *SalI* (рис. 1). Для сближения SD-последовательности гена *trpL* с геном *HVcAg* ДНК плазмиды *pGC2* после расщепления *SalI* обрабатывали экзонуклеазой *Bal31*, удаляя в среднем в одном варианте синтеза 10 (серия *pHVc-I*), в другом — 100 нуклеотидных пар (серия *pHVc-II*). Продолжительность реакции при постоянной концентрации фермента и температуре 30 °С подбирали на основании анализа кинетики, где количество отщепленных нуклеотидов контролировалось электрофрезом в агарозном геле с помощью модельных фрагментов

различной длины. После обработки *Bal31* участок между SD-последовательностью, расположенной на 12 нуклеотидных пар выше сайта *EcoRI*, и геном *HBcAg* удалялся *EcoRI*-расщеплением, и после заполнения «липких» концов *EcoRI* плазмида зашивалась в кольцо.

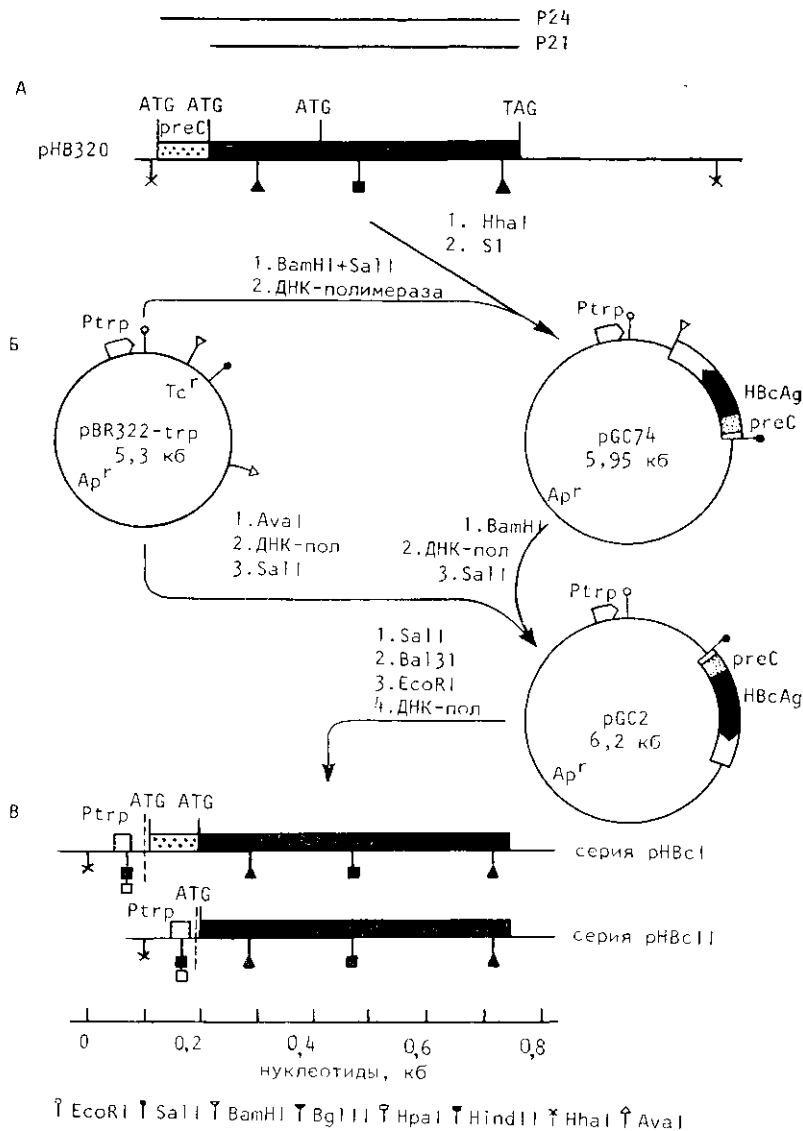


Рис. 1. Структура гена *HBcAg* и схема конструирования плазмид для прямой экспрессии двух его вариантов в *E. coli*. А — структура участка вирусной ДНК, кодирующего полипептиды P21 и P24; Б — схема конструирования плазмид; В — два варианта экспрессии *HBcAg*.

Fig. 1. The structure of *HBcAg* gene and plasmid construction scheme for direct expression of both *HBcAg* and pre-*HBcAg* gene variants in *E. coli*

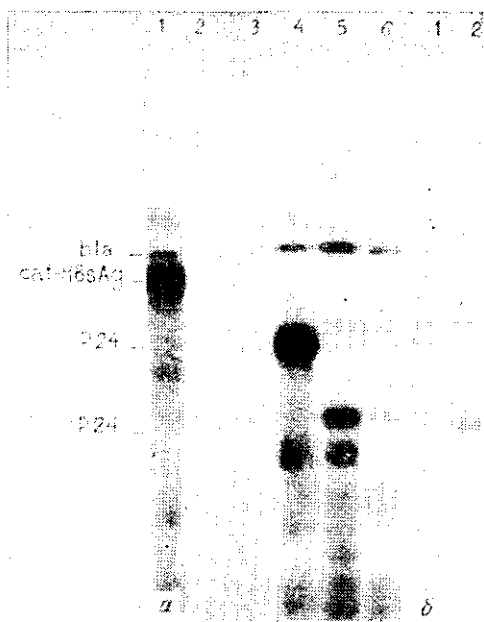
Прямой иммуноскрининг колоний, полученных непосредственно в результате трансформации клеток продуктом синтеза, позволил провести анализ большого числа клонов (порядка 10000) и отобрать наиболее перспективные из них в обоих вариантах конструирования. Плазмидные ДНК из отобранных клонов в большинстве случаев по своим физическим картам соответствовали ожидаемым ДНК. Двойное расщепление таких плазмид рестриктазами *Bgl*II и *Hind*II приводит к образованию фрагмента, содержащего SD-участок и начало гена *HBcAg* (рис. 1). Определение длины такого фрагмента позволяет ориентировочно оценить степень сближения SD и ATG — первого или вто-

рого в фазе С — в составе полученных конструкций. Результаты электрофоретического анализа в полиакриламидном геле показали, что это расстояние в отобранных плазмидах, принадлежащих обоим вариантам синтеза, не превышает 20 нуклеотидных пар. Более подробные сведения о структуре участка инициации трансляции гена *HBcAg* предполагается получить в результате секвенирования, которое проводится в настоящее время.

Наиболее объективные данные о потенциальной эффективности сконструированных плазмид получены в бесклеточной системе биосинтеза белка (рис. 2). Плазмиды для экспрессии короткого и длинного вариантов гена действительно кодируют синтез мажорных полипептидов, которые по своей молекулярной массе могут рассматриваться как P21 и P24 соответственно. Как и векторная плазида *pBR-trp*, промежуточ-

Рис. 2. Синтез *HBcAg* в сопряженной бесклеточной системе биосинтеза белка в бактериальных клетках. А. Бесклеточная система S30 запрограммирована плазмидами: 1 — *pTS310*; 2 — *pHBc11-26*; 3 — *pHBc11-20*; 4 — *pHBc1-8*; 5 — *pHBc11-10*; 6 — *pHBc11-L4*. Б. Иммунопреципитация ³⁵S-меченого белка клеток *E. coli*, несущих рекомбинантные плазмиды: 1 — *pBR322-trp*; 2 — *pHBc11-26*.

Fig. 2. Synthesis of *HBcAg* in the cell-free coupled transcription-translation S30 system and in bacterial cells transformed with appropriate plasmids.



ная в конструировании плазида *pGC2*, ген *HBcAg* в которой удален от бактериальных регуляторных элементов, не приводит к синтезу P21 или P24. В количественном отношении синтез P21 и P24 для наиболее удачных конструкций не уступает синтезу β -лактамазы или химерного белка *cat-HBsAg*, направляемому плазмидами *pBR322* и *pTS310* соответственно [24], хотя их синтез протекает с максимальной возможной эффективностью в нашей бесклеточной системе. Отсутствие синтеза β -лактамазы в рекомбинантных плазмидах может быть объяснено, скорее всего, тем, что в производных *pBR322-trp* ген β -лактамазы находится под контролем наведенного промотора *Pbla* [25]. Впрочем, не исключена возможность конкуренции за РНК-полимеразу со стороны мощного промотора *Ptrp*. Синтезированные *in vitro* полипептиды практически не способны к образованию комплекса с анти-*HBc*-антителами, что, очевидно, объясняется невозможностью образования характерной для нативного *HBcAg* мультимерной структуры в условиях бесклеточного синтеза.

В бактериальных клетках *in vivo* сборка *HBcAg* происходит, о чем свидетельствуют результаты электрофореза в полиакриламидном геле иммунопреципитатов ³⁵S-меченого белка, синтезированного в клетках с рекомбинантными плазмидами (рис. 2). Иммунореактивные ³⁵S-полипептиды, кодируемые плазмидами для экспрессии короткого варианта гена, совпадают по подвижности с синтезированным *in vitro* полипептидом P21 и с *HBcAg*, выделенным из человеческой печени. Полученный нами P21, как и следовало ожидать, немного превосходит по подвижности химерный белок β -*gal-HBsAg* [12], производимый фирмой «Biogen» в качестве бактериального *HBcAg*, который длиннее P21 на несколько (9) аминокислотных остатков.

Надежную иммунопреципитацию ^{35}S -меченного полипептида P24 в клетках, несущих плазмиды для экспрессии длинного варианта гена, получить пока не удалось. Основная причина этого, по-видимому, в чрезвычайно низких ростовых потенциях клеток, несущих такие плазмиды. Следует отметить, что присутствие высокоэффективных плазмид для экспрессии короткого варианта гена, например *pHBcII-10*, аналогичным образом снижает скорость роста клеток, а также приводит к резким изменениям морфологии колоний. Не исключено, что отрицательным моментом, сказывающимся на копияности плазмид и, вследствие этого на устойчивости к ампициллину, является конкуренция на уровне транскрипции и репликации плазмиды [26], тем более, что ген *HBcAg* с промотором *P_{trp}* приближен к точке начала репликации и не отделен от последней участком терминации транскрипции. В настоящее время проводится конструирование вариантов плазмид, обеспечивающих более выгодные ростовые характеристики клеток.

С количественной точки зрения синтез *HBcAg* в бактериях наиболее достоверно может быть оценен с помощью конкурентного радиоиммунопреципитационного теста (таблица). Как показывают полученные данные, оба варианта плазмид для экспрессии гена обеспечивают образование в клетках белка, обладающего антигенными свойствами *HBcAg*.

Эффективность бактериального синтеза HBcAg по данным конкурентной радиоиммунопреципитации
The Efficiency of Bacterial HBcAg Synthesis Determined by Competition Radioimmuno-precipitation

Плаزمида	Штамм <i>E. coli</i>	Выход <i>HBcAg</i>		Плазмида	Штамм <i>E. coli</i>	Выход <i>HBcAg</i>	
		мкг/мл	% клеточного белка			мкг/мл	% клеточного белка
pHBcI-8	K802	0,15	0,001	pHBcII-51	K802	1,0	0,007
pHBcI-8	FC5183	0,15	0,001	pHBcII-53	K802	1,0	0,007
pHBcII-10	DH1	1,5	0,01	pHBcII-53	DH1	0,7	0,005
pHBcII-10	K802	0,7	0,005	pHBcII-53	FC5183	0,5	0,003

В одной из новейших работ [27] впервые осуществлен крупномасштабный синтез *HBcAg* в гомологичной системе. В результате использования для экспрессии короткого варианта гена сделано заключение о том, что именно P21 является структурной основой нативного *HBcAg*. Однако право на окончательные выводы о роли *preC*-последовательности в жизненном цикле *HBV* может быть приобретено лишь в результате подробных исследований *HBcAg* естественного происхождения, а также сравнительного изучения иммунологических характеристик полипептидов P21 и P24, наиболее доступным источником которых могут стать бактерии *E. coli*, несущие соответствующие рекомбинантные плазмиды.

EXPRESSION OF TWO VARIANTS OF HUMAN HEPATITIS B-VIRUS CORE ANTIGEN GENE IN *ESCHERICHIA COLI*

G. P. Borisova, Ya. V. Kalis, A. V. Dishler, I. P. Pumpen, E. Ya. Gren
 Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR

V. V. Tsibinogin, P. A. Kukain
 Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Latvian SSR

Summary

The plasmids for direct expression of human hepatitis B core antigen (*HBcAg*) gene in *E. coli* cells controlled by *trp* promoter are constructed. They differ in the 5'-terminal part of *HBcAg* gene. First or second initiated ATG-codons located in the open reading frame

C are close to the Shine-Dalgarno sequence of *trpL* gene. An effective synthesis of polypeptides with molecular weights 24 and 21 kD evoked by the expression of long and short variants of *HBcAg* gene, respectively, are shown in vitro, using the *E. coli* coupled transcription-translation cell-free system. The synthesis of immunologically active *HBcAg* occurs in bacterial cells in vivo. The approximate yields of both *HBcAg* variants are estimated by the competitive radioimmunoprecipitation assay.

1. Tiollais P., Charnay P., Vyas G. N. Biology of hepatitis B virus.— Science, 1981, 213, N 4506, p. 406—411.
2. Demonstration of hepatitis B e antigen in the core of Dane particles / K. Takahashi, Y. Akahane, T. Gotanda et al.— J. Immunol., 1979, 122, N 1, p. 275—279.
3. MacKay P., Lees J., Murray K. The conversion of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli* into e antigen.— J. Med. Virol., 1981, 8, N 2, p. 237—243.
4. Блюгер А. Ф., Новицкий И. Н. Практическая гепатология.— Рига: Звайгзне, 1984.— 405 с.
5. Hepatitis B virus antigens made in microbial cells immunise against viral infection / K. Murray, S. A. Bruce, A. Hinnen et al.— EMBO J., 1984, 3, N 3, p. 645—650.
6. Circular dichroism and biochemical properties of the hepatitis B virus core antigen / M. Yamaki, H. Ohori, S. Onodera et al.— Biochim. et biophys. acta, 1982, 706, N 2, p. 165—173.
7. Tiollais P., Wain-Hobson S. Molecular genetics of the hepatitis B virus.— In: Advances in Hepatitis Research / Ed. F. V. Chisari. Massau, 1984, p. 9—20.
8. Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum / K. Takahashi, A. Machida, G. Funatsu et al.— J. Immunol., 1983, 130, N 6, p. 2903—2907.
9. Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli* / M. Pasek, T. Goto, W. Gilbert et al.— Nature, 1979, 282, N 5739, p. 575—579.
10. Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E. coli* / J. C. Edman, R. A. Halliwell, P. Valenzuela et al.— Nature, 1981, 291, N 5815, p. 503—506.
11. Hardy K., Stahl S., Küpper H. Production in *B. subtilis* of hepatitis B core antigen and of major antigen of foot and mouth disease virus.— Nature, 1981, 293, N 5832, p. 481—483.
12. Hepatitis B virus core antigen: synthesis in *Escherichia coli* and application in diagnosis / S. Stahl, P. MacKay, M. Magasin et al.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, 79, N 5, p. 1606—1610.
13. Cohen B. J., Richmond J. E. Electron microscopy of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli*.— Nature, 1982, 296, N 5858, p. 677—678.
14. Прямая экспрессия гена человеческого лейкоцитарного интерферона F в клетках *E. coli* / Ю. А. Овчинников, Е. Д. Свердлов, С. А. Царев и др.— Докл. АН СССР, 1982, 265, № 1, с. 238—242.
15. Dagert M., Ehrlich S. D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *E. coli* cells.— Gene, 1979, 6, N 1, p. 23—28.
16. Gergen J. P., Stern R. H., Wensink P. C. Filler replicas and permanent collections of recombinant DNA plasmids.— Nucl. Acids Res., 1979, 7, N 8, p. 2115—2176.
17. 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.
18. Identification of clones that encode chicken tropomyosin by direct immunological screening of cDNA expression library / D. M. Hellman, J. R. Feramisco, J. G. Fiddes et al.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, 80, N 1, p. 31—35.
19. Chard T. An introduction to radioimmunoassay and related techniques.— Amsterdam; New York; Oxford: North-Holland publ., 1978.— 241 p.
20. Rapid purification of plasmid DNAs by hydroxyapatite chromatography / A. Colman, M. J. Byers, S. B. Primrose, A. Lyons.— Eur. J. Biochem., 1978, 91, N 1, p. 303—310.
21. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.— Nature, 1970, 227, N 5259, p. 680—685.
22. The effect of rifampicin upon the transcription of RNA polymerase β -gene in *E. coli* / I. A. Bass, O. N. Danilevskaya, S. L. Mekhedov et al.— Mol. Gen. Genet., 1979, 173, N 1, p. 101—107.
23. Клонирование ДНК вируса гепатита B в *Escherichia coli* / П. П. Пумпен, А. В. Динлер, Т. М. Козловская и др.— Докл. АН СССР, 1981, 260, № 4, с. 1022—1024.
24. Синтез поверхностного антигена вируса гепатита B в *Escherichia coli* / П. П. Пумпен, Т. М. Козловская, Г. П. Борисова и др.— Докл. АН СССР, 1983, 271, № 1, с. 230—234.
25. Первичная структура участка ДНК *E. coli*, предшествующего генам триптофанового оперона / В. В. Губанов, Ю. Б. Лебедев, Г. С. Монастырская и др.— Биоорг. химия, 1984, 10, № 3, с. 415—417.
26. Zabeau M., Stanley K. Enhanced expression of cro- β -galactosidase fusion proteins under the control of the P_R promoter of bacteriophage λ .— EMBO J., 1982, 1, N 11, p. 1217—1224.
27. Expression of hepatitis B antigens with a simian virus 40 vector / H. Will, R. Cattaneo, E. Praff et al.— J. Virol., 1984, 50, N 2, p. 335—342.

Ин-т органич. синтеза АН ЛатвССР, Рига
Ин-т микробиологии АН ЛатвССР, Рига

Получено 1.10.84