

Отбор чувствительных к бактериофагу λ клонов из устойчивого к нему штамма *Escherichia coli*

И. Ю. Славченко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

*Теоретически сформулирован и экспериментально апробирован метод селекции чувствительных к фагу λ клонов из популяции клеток, устойчивых к бактериофагу λ с помощью фага λ c1857Ap^RTc^R. Устойчивый к фагу λ штамм *E. coli* инфицировали фагом λ , который привносит в клетку маркеры антибиотикоустойчивости. На селективной среде отобраны клоны, чувствительные к фагу λ *vir* и лизирующие при температуре 43 °С. Частота возникновения таких клеток в популяции составила 10⁻⁶. Наличие *ts*-мутации в *cI*-гене фага позволило при выращивании несущих его клеток в неселективных условиях при повышенной температуре излечить клетки от фага λ c1857Ap^RTc^R и получить чувствительные к фагу λ клоны, производные исходного нечувствительного штамма *E. coli*. Метод также может быть использован для популяционных оценок гетерогенности популяций *E. coli* по данному признаку.*

Введение. Методы генетической инженерии позволяют в настоящее время создавать микробные штаммы, способные продуцировать значительные количества целевого продукта. При создании суперпродуцентов на основе *E. coli* для клонирования целевого гена обычно используют бактериофаг λ , а для его высокоэффективной экспрессии — векторы на основе мульткопийных плазмид. Однако известны примеры успешного применения векторов на основе бактериофага λ и для экспрессии привнесенных генов. Например, выход продуктов триптофанового оперона, экспрессированных в составе трансдуцирующего фага λ , достиг 50 % от растворимых белков клетки [1], а амидазы *Pseudomonas aeruginosa* — 25 % от растворимых белков клетки [2]. Разработанная нами технология получения β -галактозидазы с использованием бактериофага λ позволяет получать до 2 г β -галактозидазы в 1 л культуральной жидкости [3].

При использовании в системах суперсинтеза биологически активных веществ бактериофага λ клетки штамма-продуцента разрушаются в результате литического развития фага, и образующийся целевой продукт накапливается непосредственно в культуральной среде. Это имеет определенные пре-

имущества по сравнению с плазмидным способом получения биологически активных веществ, при котором целевой продукт накапливается внутри бактериальных клеток и для его выделения необходима их дезинтеграция.

Уровень экспрессии целевого гена в бактериальных клетках как в случае применения плазмидных технологий, так и технологий с использованием бактериофага λ во многом определяется генетическими свойствами штамма-продуцента. Известно, что более высокий выход целевого продукта наблюдается в штаммах, в которых рекомбинантные молекулы ДНК и мРНК чужеродных белков стабильнее, а также менее активен протеолиз. При использовании бактериофага λ для получения биологически активных веществ штамм-продуцент должен обладать еще одним свойством — чувствительностью к фагу λ . Однако, как показывает практический опыт, штаммы *E. coli* часто являются нечувствительными к фагу λ и не могут быть использованы в системах синтеза целевых продуктов с использованием фага λ .

В этой связи с целью расширения круга штаммов *E. coli*, пригодных для системы получения биологически активных веществ, основными компонентами которой являются бактериальная клетка и бактериофаг λ , разработан описанный в данной

работе метод селекции чувствительных к фагу λ клонов из устойчивых к нему штаммов *E. coli*.

Материалы и методы. Штаммы *E. coli* и бактериофага λ , используемые в работе, представлены ниже:

Штамм	Генотип
RLM1	Thr ⁻ , leu ⁻ , lac ⁻ , tonA, SupE
SG20050	F ⁻ , araD139, Δ (arg-lac)U169, flbB5301, deoC1, gpsL150, relA1, proC _{YA} 221, Δ lon-100
K802	hsdR ⁺ , hsdM ⁺ , gal ⁻ , met ⁻ , SupE
λ vir	v1, v2, v3, vs
λ clear	cI, cII, cIII
λ cI857Ap ^R Tc ^R	cI857 bla tet Nam7Nam53

Фаги λ clear и λ vir любезно были предоставлены В. Н. Рыбчиным, (Ленинградский политехнический институт им. М. И. Калинина, Россия), а штамм *E. coli* SG20050 — В. Г. Коробко (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина, Россия). Остальные штаммы получены из коллекции культуры отдела регуляторных механизмов клетки Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины.

Среды. Для выращивания бактериальных культур использовали жидкую питательную среду аминокислотного производства Армавирского мясокомбината (Россия), представляющую собой ферментативный гидролизат белка, а также минимальную среду M9 с добавлением мальтозы [4]. Агаризованную среду готовили на основе аминокислотного гидролизата, концентрация агара составляла 1,5 %. При необходимости в среду добавляли антибиотики до конечной концентрации ампициллина 20 мкг/мл, а тетрациклина — 12 мкг/мл. При высевах фага двухслойным методом для верхнего слоя использовали 0,6 %-ю агаризованную среду. Стандартные разведения фаголизатов и бактериальных культур осуществляли в 0,14 М NaCl.

Получение фаголизатов. Фаг λ cI857Ap^RTc^R получали термощинковой лизогенной культуры K802 (λ cI857Ap^RTc^R). Для этого культуру K802 (λ cI857Ap^RTc^R) выращивали в аминокислотной среде при температуре 28 °С в условиях интенсивной аэрации до плотности $\sim 2 \cdot 10^8$ кл/мл. Затем ее выдерживали при температуре 43 °С в течение 20 мин, после чего культуру помещали в условия интенсивной аэрации (37 °С). Через 60—80 мин клетки лизируются и фаг выходит в культуральную среду. Далее фаголизат обрабатывали хлороформом. Титр опре-

деляли общепринятым двухслойным методом. В качестве индикаторной культуры использовали штамм *E. coli* RLM1. Как правило, получали $(1,5—3,0) \cdot 10^{10}$ БОЕ/мл лизата.

Размножение фагов λ vir и λ clear осуществляли путем инфицирования с множественностью 0,1 копускулы на клетку культуры RLM1, выращенной в аминокислотной среде при температуре 37 °С в условиях интенсивной аэрации до плотности $\sim 2 \cdot 10^8$ кл/мл. Через 5 ч инкубирования зараженной культуры в условиях интенсивной аэрации (при 37 °С) клетки лизируются. Полученный фаголизат также обрабатывали хлороформом. Титр определяли общепринятым двухслойным методом. Индикаторной культурой служил штамм *E. coli* RLM1. Как правило, получали $(3,0—5,0) \cdot 10^{10}$ БОЕ/мл лизата. Чувствительность клонов к этим фагам определяли по наличию зоны лизиса в месте нанесения на свежепосеянные штрихом клоны на чашки с твердой питательной средой. Чашки инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 15 ч. В настоящей работе под чувствительными клетками *E. coli* к фагу λ (далее обозначены, как « λ^S ») подразумеваются такие реципиентные клетки, которые фаг способен не только заразить, но и при определенных условиях литически в них развиваться. Под устойчивыми клетками *E. coli* к фагу λ (далее обозначены, как « λ^R ») подразумеваются клетки, в которых нарушен хотя бы один из этапов, приводящих к литическому развитию фага, в том числе этапы адсорбции фага и инъекции фаговой ДНК.

Результаты и обсуждение. Устойчивость клеток к бактериофагу λ может быть обусловлена различными факторами. Клетки могут содержать в своем геноме профаг λ и быть иммунными к повторному заражению аналогичным фагом. Для селекции нелизогенных клеток из лизогенных по фагу λ штаммов *E. coli* нами предложен способ, описанный в работе [5]. Известно, что мутации в гене *Lam B*, продукт которого является рецептором бактериофага λ , приводят к потере клетками чувствительности к этому бактериофагу. Если клетки содержат мутации в гене *Lam B*, то получить чувствительные к фагу λ производные таких штаммов можно путем введения в клетку функционального гена *Lam B* в составе плазмидного вектора. Это может привести к положительному результату не только в случае штаммов *E. coli*, утративших чувствительность к фагу в результате мутаций в гене рецептора, но и в случае бактериальных культур, которые в природе не являются хозяевами для бактериофага λ . Например, *Agrobacterium* и *Rhizobium* [6]. Однако устойчивость клеток *E. coli*

к фагу λ могут обуславливать не только мутации в *Lam B*-гене. И если она появилась в результате единичной мутации в гене бактериальной клетки, продукт которого необходим для литического развития бактериофага λ , то с низкой вероятностью в популяции таких клеток могут возникать особи, восстановившие свою чувствительность к фагу. Из-за очень низкой вероятности такого события случайный поиск соответствующих особей требует проверки огромного количества бактериальных колоний и, как следствие, много времени. Поэтому требуются такие методы выявления, которые позволили бы на фоне основной массы идентифицировать измененную особь, частота возникновения которой, как правило, не превышает 10^{-4} .

Для отбора чувствительных к фагу λ ревертантов из популяции устойчивых к нему клеток нами разработан метод селекции при помощи бактериофага λ , несущего гены, определяющие устойчивость к антибиотикам. Принцип предлагаемого способа заключается в следующем. В популяции устойчивых к фагу λ клеток в результате спонтанной мутации с очень низкой частотой может возникнуть ревертант, чувствительный к фагу λ . При инфицировании такой культуры фагом λ , в отличие от основной массы нечувствительных клеток, фаг может лизогенизировать только особи, чувствительные к фагу λ . Если фаг привносит в клетку селективный маркер, то лизогенизированные им клетки легко отбираются на селективной среде. При этом необходимо использовать такой маркированный фаг, от которого можно легко излечить клетки. Этим требованиям отвечает фаг λ cI857Ap^RTc^R ранее сконструированный в нашей лаборатории [7], несущий гены *bla* и *tet*, детерминирующие устойчивость к ампициллину и тетрациклину, а также *ts*-мутацию в *cI*-гене, что позволяет при выращивании лизогенов при повышенной температуре в неселективных условиях излечить клетки от этого профага. Это не составляет трудности, так как при выращивании клеток, лизогенных по фагу λ cI857Ap^RTc^R при температуре 37 °C, большинство из них в результате abortивной индукции освобождается от фага с термолабильным репрессором, и становятся нелизогенными.

Перед нами стояла задача получить из штамма *E. coli* SG20050 изогенные производные, чувствительные к фагу λ . Этот штамм являлся перспективным продуцентом в системах биосинтеза биологически активных веществ с использованием бактериофага λ , поскольку он с успехом был применен для плазмидных технологий. На основе штамма *E. coli* SG20050 созданы продуценты интерферона человека [8] и гранулоцит-колониестимулирующего

фактора человека [9]. Однако устойчивость этого штамма к фагу λ делала его непригодным для фагозависимых технологий получения биологически активных веществ.

Было установлено, что штамм *E. coli* SG20050 является устойчивым как к фагу λ cleag, так и к вирулентному фагу λ vir, который, как известно, нечувствителен к репрессору и способен размножаться в клетках, лизогенных по фагу λ . Это свидетельствует о том, что устойчивость к фагу λ штамма *E. coli* SG20050 не обусловлена специфическим иммунитетом к повторному инфицированию фагом и не связана с наличием в клетке аналогичного профага. Исходя из описанных выше теоретических предпосылок можно было рассчитывать на то, что, используя предлагаемый метод, удастся отобрать чувствительные к фагу λ клоны из устойчивого к нему штамма *E. coli* SG20050. При этом мы не располагали информацией о том, мутация в каком именно гене делает этот штамм устойчивым к вирусной инфекции.

Поскольку фаг λ cI857Ap^RTc^R привносит в клетку маркеры антибиотикоустойчивости к ампициллину и тетрациклину, было необходимо предварительно проверить, не обладает ли штамм *E. coli* SG20050, из которого необходимо отобрать восприимчивые к фагу λ клоны, устойчивостью к данным антибиотикам. В результате проверки выяснилось, что штамм *E. coli* SG20050 не способен расти на среде с ампициллином, но является устойчивым к тетрациклину. Поэтому, к сожалению, для отбора искомым особей для данного штамма *E. coli* проводить селекцию можно только на среде с ампициллином, что имеет определенные недостатки, которые будут обсуждены ниже. Однако это не делает невозможным использование фага λ cI857Ap^RTc^R для отбора чувствительных к фагу λ клонов из устойчивого к нему штамма *E. coli* SG20050.

Анализ клонов на наличие или отсутствие в них фагов λ , а также чувствительности к фагу λ в ходе работы проводили по нескольким параметрам, представленным в табл. 1.

Первый этап работы заключался в лизогенизации фагом λ cI857Ap^RTc^R тех единичных ревертантов в популяции λ^R клеток, у которых восстановилась чувствительность к фагу λ . Источником фага служил лизоген K802 (λ cI857Ap^RTc^R). Фаг получали предварительно, как описано в «Материалах и методах». После обработки фаголизата хлороформом его проверяли на наличие жизнеспособных клеток, высевая шпателью 0,1 мл фаголизата на чашки со средой без антибиотиков с последующей инкубацией чашек при температуре 28 °C в течение 15—24 ч. Фаг использовали только в том

Таблица 1

Анализ клонов *E. coli* SG20050 на наличие или отсутствие в них фагов λ , а также чувствительности клонов к фагу лямбда

Показатель	Рост клонов*		Наличие чувствительности к фагам**	
	при $t = 43$ °C	на среде с ампициллином	λ clear	λ vir
Наличие дикого профага λ	+	-	-	+
Наличие фага λ cI857Ar ^R Tc ^R в Su ⁺ клетках	-	+	-	+
Наличие фага λ cI857Ar ^R Tc ^R в Su ⁰ клетках	+	+	-	+
Отсутствие фага, λ^S	+	-	+	+
λ^K	+	-	-	-

*Плюс — культура растет в этих условиях, минус — не растет; **плюс — культура чувствительна к фагу, минус — нечувствительна.

случае, если на чашках не выросло ни одной колонии.

Поскольку вероятность появления λ^S ревертантов может быть очень низкой, лизогенизацию необходимо проводить в условиях, при которых эффективность заражения близка к 100 %. Этого можно достичь путем индукции мальтозного оперона, в состав которого входит ген *Lam B*. Для этого культуру *E. coli* SG20050 выращивали на среде M9 с мальтозой при 37 °C в условиях интенсивной аэрации и инфицировали фагом λ cI857Ar^RTc^R. В табл. 2 представлены протоколы двух экспериментов, отличающихся плотностью культуры в момент заражения и множественностью инфекции.

Инфицированную культуру в течение 20 мин инкубировали при температуре 20 °C, а затем по 0,1 мл из разведений 10^{-1} и 10^{-2} высевали шпателью на чашки с агаризованной средой, содержащей ампициллин. Одновременно из разведений 10^{-4} и 10^{-5} по 0,1 мл культуры высевали на чашки с агаризованной средой без антибиотиков для определения общего количества клеток. Чашки инкубировали в термостате при температуре 28 °C.

На следующий день на среде с антибиотиком наблюдался рост отдельных колоний. Частота появления Ar^R клонов после инфицирования штамма *E. coli* SG20050 фагом λ cI857Ar^RTc^R была близкой в обоих экспериментах и составила $2,47 \cdot 10^{-4}$ и $2,96 \cdot 10^{-4}$ (см. табл. 2).

Колонии, выросшие на среде с ампициллином, были отколоты на четыре чашки с агаризованной средой, а именно: первая чашка со средой без антибиотиков, инкубация при 28 °C; вторая — без антибиотиков, 42 °C; третья — со средой с ампи-

циллином, 28 °C; четвертая — с ампициллином, 42 °C. Параллельно все эти клоны были проверены на чувствительность к фагу λ vir.

Необходимо отметить, что все Ar^R клоны проверяли на чувствительность к фагу λ vir, поскольку для селекции был использован фаг λ cI857Ar^RTc^R с амбер-мутациями в *N*-гене. Такой фаг в Su⁰ клетках не может литически развиваться даже при 42 °C и находится в клетке в виде плазмиды. Было неизвестно, содержит ли штамм *E. coli* SG20050 супрессор, исправляющий амбер-мутации. И если все выросшие на ампициллине клоны будут чувствительными к фагу λ vir, то это будет показателем того, что штамм *E. coli* SG20050 является Su⁰.

Анализ переколов и теста на чувствительность к фагу λ vir показал следующее. Часть клонов вообще не выросла на среде с ампициллином при температуре как 42 °C, так и 28 °C. Это оказалось неожиданным, поскольку мы вынуждены были использовать для селекции только ампициллин. А во время роста Ar^R клонов они продуцируют и секретируют β -лактамазу, которая разрушает ампициллин, давая возможность расти не только Ar^R, но и Ar^S клеткам. Подавляющее большинство клонов дало рост на ампициллине при температурах 28 °C и 42 °C. И все они оказались устойчивыми к фагу λ vir. Это могут быть различные мутанты, несущие мутации в бактериальном геноме, блокирующие литическое развитие фага в клетке-хозяине. Ожидать же, что все выросшие на среде с ампициллином клоны будут иметь только интересующие нас свойства, нет оснований даже теоретически.

Среди выросших на среде с ампициллином клонов были отобраны и интересующие нас особи.

Таблица 2

Сравнительная характеристика различных показателей в процессе отбора λ^S клонов из λ^R штамма *E. coli* SG20050

Показатель	Протокол № 1	Протокол № 2
Общее количество клеток в 1 мл при инфицировании	$4,05 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^7$
Титр фага λ сI857Ar ^R Tc ^R в 1 мл фаголизата	$2,0 \cdot 10^{10}$	$2,4 \cdot 10^{10}$
Объем инфицированной культуры, мл	5,0	2,0
Объем фаголизата, мл	1,0	0,2
Множественность инфекции, количество корпускул на клетку	10	133
Количество Ar ^R клеток в 1 мл	$1,0 \cdot 10^5$	$5,32 \cdot 10^3$
Частота появления Ar ^R клонов	$2,47 \cdot 10^{-4}$	$2,96 \cdot 10^{-4}$
Количество λ^S клеток в 1 мл	$2,0 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^2$
Частота появления λ^S клонов среди Ar ^R клонов	$2,0 \cdot 10^{-2}$	$2,26 \cdot 10^{-2}$
Частота появления λ^S клонов в исходной популяции	$4,93 \cdot 10^{-6}$	$6,67 \cdot 10^{-6}$

Они были чувствительными к фагу λ vir, устойчивыми к фагу λ clear, росли на среде с антибиотиками при температуре 28 °С и показали полное отсутствие роста на среде без антибиотиков при 42 °С (см. табл. 1). Частота их появления в популяции клеток составила величину порядка 10^{-6} . Результаты эксперимента представлены в табл. 2. Поскольку все чувствительные клоны к фагу λ vir не росли при температуре 42 °С мы пришли к выводу, что штамм *E. coli* SG20050 содержит супрессор, исправляющий амбер-мутации в *N*-гене фага λ сI857Ar^RTc^R.

На следующем этапе работы было необходимо излечить от фага λ сI857Ar^RTc^R отобранные лизогены SG20050. Для этого клоны SG20050, несущие маркированный фаг с *ts*-мутацией в гене-репрессоре *cI*, были посеяны петлей по секторам на чашки с агаризованной средой без антибиотиков и инкубированы при температуре 37 °С в течение 15 ч. Затем выросшую культуру вновь посеяли на чашки с агаризованной средой без антибиотиков для получения отдельных колоний, которые также инкубировали в аналогичных условиях. Количество клонов, утративших фаг λ сI857Ar^RTc^R при втором посеве на неселективную среду при повышенной температуре, составило более 90 %. Отбор таких клонов проводили по потере маркера устойчивости к ампициллину, способности расти при температуре 43 °С и наличию чувствительности к фагу λ clear (см. табл. 1).

Чувствительные к фагу λ клоны, отобранные

из популяции λ^R клеток SG20050, сохранили устойчивость к тетрациклину и имели генотип *lac*⁻, как и исходный штамм *E. coli*, что дает основание предположить, что нами получены изогенные λ^S производные штамма *E. coli* SG20050. На отобранных клонах фаг λ образует более мелкие бляшки, а также дает титр в несколько раз ниже, чем на индикаторной культуре RLM1, что характерно и для многих других штаммов *E. coli*. Однако это не является препятствием для использования отобранных λ^S производных штамма *E. coli* SG20050 в системах суперсинтеза биологически активных веществ с использованием бактериофага λ .

Таким образом, в результате описанного эксперимента нами показана возможность отбора чувствительных к фагу λ клонов из устойчивого к нему штамма *E. coli* с помощью фага λ сI857Ar^RTc^R. Кроме того, при соответствующих условиях метод позволяет определять и количество таких особей в популяции, оценивать равновесность популяции по данному признаку, ее изменения и т. д. Так, было установлено, что частота появления λ^S клеток в устойчивой к фагу λ популяции клеток штамма *E. coli* SG20050 составляет величину порядка 10^{-6} . Поэтому данный метод может быть использован для решения задач как прикладного, так и научного характера.

Автор выражает благодарность В. А. Кордюму за ценные советы и замечания, сделанные им при чтении рукописи, а также В. Г. Коробко — за предоставление штамма *E. coli* SG20050.

I. Yu. Slavchenko

Isolation of clones sensitive to bacteriophage λ from the phage resistant *Escherichia coli* strain

Summary

A method of selection of the phage λ sensitive clones from the population of the bacteriophage λ resistant cells using the phage λ cI857Ar^RTc^R has been theoretically formulated and experimentally approved. The isolation was realized as follows. The phage λ resistant *E. coli* strain was infected by phage λ , which introduces antibiotic-resistance markers into the cell. The sensitive to phage λ vir and lysing at 43 °C clones were isolated on the selective medium. The frequency of occurrence of such cells in the population was 10^{-6} . The presence of ts-mutation in the phage cI gene has allowed to cure the cells from phage λ cI857Ar^RTc^R during cultivation of these cells under non-selective conditions at increased temperature and to obtain the phage λ sensitive clones originated from resistant *E. coli* strain. The method can also be used for the estimation of the *E. coli* populations heterogeneity by a given feature.

I. Ю. Славченко

Відбір чутливих до бактеріофага λ клонів із стійкого до нього штаму *Escherichia coli*

Резюме

Теоретично сформульовано та експериментально апробовано метод селекції чутливих до фага λ клонів із популяції клітин, стійких до бактеріофага λ , за допомогою фага λ cI857Ar^RTc^R. Стійкий до фага λ штам *E. coli* інфікували фагом λ , який привносить у клітину маркери антибіотикостійкості. На селективному середовищі було відібрано клони, чутливі до фага λ vir, які лізують при температурі 43 °C. Частота виникнення таких клітин у популяції складає 10^{-6} . Наявність ts-мутації в cI-гені фага дозволила при вирощуванні у неселективних умовах і при підвищеній температурі клітин, які несуть цей фаг, вилікувати клітини від фага λ cI857Ar^RTc^R та одержати чутливі до фага λ клони, що походять від вихідного нечутливого штаму *E. coli*. Метод також може бути використаний для популяційних оцінок гетерогенності популяції *E. coli* за даною ознакою.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moir A., Brammar W. J. The use of specialized transducing phages in the amplification of enzyme production // Mol. and Gen. Genet.—1976.—149.—P. 87—99.
2. Drew R. E., Clarke P. H., Brammar W. J. The construction *in vitro* of derivatives of bacteriophage lambda carrying the amidase genes of *Pseudomonas aeruginosa* // Mol. and Gen. Genet.—1980.—177, N 2.—P. 311—320.
3. А. с. СССР № 1593232. Способ получения β -галактозидазы / Кордюм В. А., Черных С. И., Славченко И. Ю., Коробко В. Г.—Опубл. 15.05.1990.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—479 с.
5. Славченко И. Ю., Черных С. И., Кордюм В. А. Использование мутантного фага λ cI857Ar^RTc^RN⁻ для получения клеток, лишенных профага λ // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.—1985.—№ 11.—С. 42—44.
6. Pat. USA 4,784,952. Conferred susceptibility to lambda phage in non-coliform prokaryotic hosts / Robert A. Ludwig, Gert E. de Vries.—Publ. 15.11.88.
7. Черных С. И., Стельмашенко Л. Н., Кордюм В. А. Особенности экспрессии Ar- и Tc-генов плазмидного происхождения в лямбдовекторах // Генетика.—1984.—20, № 3.—С. 382—388.
8. Кравченко В. В., Гилева Н. П., Шамин В. В., Куличков В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Чувпило С. А., Каробко В. Г. Дупликация синтетического гена лейкоцитарного интерферона человека и его экспрессия в составе полицистронных мРНК с сопряженной системой трансляции // Биоорг. химия.—1987.—13, № 9.—С. 1186—1193.
9. Кашияп С. К., Быстров Н. С., Болдырева Е. Ф., Полякова И. А., Северцова И. В., Коробко В. Г. Химико-ферментативный синтез и клонирование в *Escherichia coli* гена, кодирующего гранулоцит-колониестимулирующий фактор человека // Биоорг. химия.—1992.—18, № 1.—С. 71—77.

УДК 579.842.11:578.81].083.12
Надійшла до редакції 29.01.2001