

УДК 579.22:579.852.11:577.218

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕКРЕСТНЫХ ЗАМЕН В ПРОМОТОРАХ ГЕНОВ РИБОНУКЛЕАЗ *V. PUMILUS* И *V. INTERMEDIUS* НА ИХ ЭКСПРЕССИЮ

О.В. Морозова, М.А. Харитонова, В.И. Вершинина, Л.В. Знаменская

Аннотация

Секретируемые гуанилспецифичные рибонуклеазы *V. pumilus* (РНКаза Вр) и *V. intermedius* (биназа) являются функциональными и структурными гомологами. Биосинтез рибонуклеаз происходит в условиях дефицита неорганического фосфата и активируется в присутствии малых доз специфического ингибитора транскрипции актиномицина Д. Однако специфическая активность РНКазы Вр как исходного бациллярного штамма, так и рекомбинантного штамма в 6–10 раз выше удельной активности биназы. Такой эффект может быть обусловлен различиями в нуклеотидных последовательностях промоторных областей генов РНКаз *V. intermedius* и *V. pumilus*, которые отличаются несколькими нуклеотидами, расположенными диффузно. Каждый из отличающихся нуклеотидов в промоторе биназы был заменен на соответствующий из промотора РНКазы Вр и наоборот. Анализ экспрессии генов РНКаз с мутантными промоторами показал, что обнаруженный эффект связан с заменой лишь одного нуклеотида, находящегося в положении 23 транскрибируемой части промотора.

Введение

Внеклеточные низкомолекулярные гуанилспецифичные рибонуклеазы бацилл образуют многочисленное семейство рибонуклеаз, характеризующееся определенной гомологией аминокислотных последовательностей, близостью ряда физико-химических свойств и субстратной специфичностью. Ферменты идентичны по первичной структуре на 85–100%, стабильны в широком диапазоне рН (3–10) с оптимумом при рН 8.5, не требуют ионов металлов для проявления активности и ингибируются внутриклеточным ингибитором гуанилспецифичной РНКазы *V. amyloliquefaciens* (барназы) – барстаром [1–9]. Рибонуклеазы *V. pumilus* (РНКаза Вр) и *V. intermedius* (биназа) являются функциональными и структурными гомологами [5]. Оба фермента были выделены в гомогенном состоянии и охарактеризованы. Кодирующие их гены были клонированы в клетках *B. subtilis* и *E. coli*, секвенированы [10–12]. Молекулярная масса рибонуклеазы *V. pumilus* совпадает с молекулярной массой РНКазы *V. intermedius*. Структурный ген РНКазы *V. pumilus* на 98% гомологичен гену биназы, а регуляторные области содержат несколько отличающихся нуклеотидов [13]. Механизмы регуляции биосинтеза биназы и РНКазы Вр подробно изучены. Синтез РНКазы Вр и биназы, как и ряда других гуанилспецифичных РНКаз (РНКаза *V. intermedius*, РНКаза *V. pumilus*, РНКаза *V. thuringiensis* и РНКаза *V. circulans*) происходит в условиях дефицита неорганического фосфата и ак-

тивируется в присутствии малых доз специфического ингибитора транскрипции актиномицина Д [14–15]. Установлено, что регуляция экспрессии генов РНКазы Вр и биназы осуществляется посредством белков двухкомпонентной системы сигнальной трансдукции PhoP-PhoR [16].

1. Постановка задачи

Несмотря на значительное сходство биназы и РНКазы Вр, тем не менее, специфическая активность РНКазы Вр, т. е. количество фермента, синтезируемого единицей биомассы в культуральной жидкости, как исходного бациллярного штамма, так и рекомбинантного штамма в 6–10 раз выше удельной активности биназы. Также отмечается большая чувствительность к неорганическому фосфату биназы, чем РНКазы Вр. Кроме того, у *B. pumilus* стимуляция биосинтеза РНКазы актиномицином Д проявляется в несколько меньшей степени [15].

Мы предположили, что такой эффект может быть обусловлен различиями в нуклеотидных последовательностях промоторных областей генов РНКаз *B. intermedius* и *B. pumilus*, которые отличаются несколькими нуклеотидами, расположенными диффузно. В связи с этим целью работы было изучение влияния конкретных нуклеотидных замен на экспрессию генов рибонуклеаз.

2. Материалы и методы

Бактериальные штаммы и плазмиды. В работе использовали штамм бактерий *Escherichia coli* XL1 Blue с рекомбинантными плазмидами, несущими нативные и мутантные промоторы биназы (pBI, pMZ15, pMZ18, pMZ19, pMZ20, pMZ21, pMZ22, pMZ23, pMZ24) и РНКазы Вр (pBP, pMZ11, pMZ25, pMZ26, pMZ27, pMZ28, pMZ29). Рекомбинантные плазмиды получали методом рекомбинантной циклической ПЦР [17], матрицами служили плазмиды для экспрессии генов биназы и РНКазы Вр в клетках *E. coli* – pML5, pML163, pML61 и pML53 [12].

Условия проведения ПЦР: 10 мМ ТрисHCl, 1.5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, pH 8.3, 0.2 мМ нуклеозидтрифосфатов, 10 нг плазмидной матрицы, 200 нг каждого из праймеров, 0.5–1 ед. термостабильной ДНК-полимеразы в конечном объеме 25 мкл. Реакция включала 25 циклов, состоящих из следующих этапов: 94°C – 1 мин.; 50–65°C (в зависимости от праймера) – 1 мин.; 72°C – 3 мин. Использовали PCR kit, Lifetechnologies, и Taq DNA Polymerase. Продукты ПЦР подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле, элюировали и очищали с помощью Wizard PCR Preps DNA Purification System, “Promega”, затем подвергали отжигу. Для этого растворяли в 10 мкл 1xSSC буфера, помещали на 1 мин. в кипящую воду, затем выдерживали 1 ч при 60°C и медленно охлаждали до комнатной температуры. Полученные nick-плазмиды переосаждали этанолом и использовали для трансформации.

Для получения плазмиды pBI (полные гены биназы и барстара) использовали две пары олигонуклеотидов

H36-39-1 + H36-37-1 (GGAAGAGAATTCGTTATTTATTTTCATCA +
+ ACGGCAAGGGTATGAACATCT)

и

H36-37-3 + H36-39-4 (TACACCATCAAACGTATTAATG +
+ GAAGGTTATCAGGAAAAAAG)

для амплификации промотора и лидерной последовательности с плазмиды pML5; и две пары олигонуклеотидов

LVZ2 + LVZ1 (TGATGAAATAAATAACGAATTCTCTCCGCTTCCTC+
+ GCAGATTATTTAATTTCGCTACAAACGATTG)

и

H36-37-2 + H36-39-3 (CATTAATACGTTTGATGGTGTA +
+ GCTTCCTCGCTCACTGACT)

для амплификации вектора, содержащего структурный ген биназы и барстар под своим промотором с плазмиды pML163.

Для получения плазмиды pBP (полные гены РНКазы Вр и барстара) использовали две пары олигонуклеотидов

H36-39-1 + H36-37-1 (GGAAGAGAATTCGTTATTTATTTTCATCA+
+ ACGGCAAGGGTATGAACATCT)

и

H36-37-3+H36-45-1 (TACACCATCAAACGTATTAATG +
+ GAAGAATATCAGGAGAAAAG)

для амплификации промотора и лидерной последовательности с плазмиды pML61; и две пары олигонуклеотидов

LVZ2 + LVZ1 (TGATGAAATAAATAACGAATTCTCTCCGCTTCCTC+
+ GCAGATTATTTAATTTCGCTACAAACGATTG)

и

H36-37-2+H36-39-3 (CATTAATACGTTTGATGGTGTA +
+ GCTTCCTCGCTCACTGACT)

для амплификации вектора, содержащего структурный ген РНКазы Вр и барстар под своим промотором с плазмиды pML53.

Плазмиды pMZ11 и pMZ15 содержат перекрестные замены промоторов биназы и РНКазы Вр в полных генах этих ферментов. Плазмиды pMZ18, pMZ19, pMZ20, pMZ21, pMZ22, pMZ23, pMZ24, pMZ25, pMZ26, pMZ27, pMZ28, pMZ29 содержат мутантные промоторы, полученные путем замены отличающихся нуклеотидов в промоторе гена РНКазы Вр на соответствующие из промотора биназы, и наоборот, в промоторе биназы на соответствующие из промотора РНКазы Вр (рис. 1).

В качестве матрицы при получении мутантных промоторов в гене РНКазы Вр служила плазида pBP. В качестве матрицы при получении мутантных промоторов в гене биназы служила плазида pBI. В плазмиде pMZ18 была проведена замена около 100 нуклеотидов из промоторной области РНКазы Вр и примыкающие части сигнальной последовательности на соответствующие из гена биназы. В плазмиде pMZ19 была проведена замена около 100 нуклеотидов промоторной области биназы и примыкающей части сигнальной последовательности на соответствующие из гена РНКазы Вр. Конкретные замены нуклеотидов в изученных плазмидах приведены в табл. 1.

Клоны отбирали гибридизацией ДНК из выросших колоний с соответствующими мечеными олигонуклеотидами, а также по проявлению РНКазной активности [18].

```

1
TGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAA
56                               GT           A
GCGGAAGAGAATTCGTTATTTATTTATTCATCAGAAGAATATCAGGAGAAAAGCCTCA
111          A           -35           G           -10
TTTTAGCAAAGATCCTGTTTCTTTACATTTTCSTTTCATATTCGGGTGCTATAATAT
166                               A           SD
GAGGTAGACAAGCATCAAGAGGACAGCTTCCGATTTCTTAAATAGGAGGATGAAG

```

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность промоторной области РНКазы Вр. Отличающиеся нуклеотиды в промоторе биназы приведены сверху

Выделение плазмид проводили щелочным методом [19].

Питательные среды. Бактерии выращивали в питательной среде, оптимизированной для биосинтеза РНКаз (биназы и РНКазы Вр) рекомбинантными штаммами *E. coli*: пептон – 5.0%; дрожжевой экстракт – 2.5%. При выращивании рекомбинантных штаммов в среду добавляли ампициллин в концентрации 50 мкг/мл.

Табл. 1

Характеристика плазмид, содержащих мутантные промоторы гуанилспецифичных РНКаз *B. intermedius* и *B. pumilus*

Матрица рВІ		Матрица рВР	
Плаزمида	Замены	Плазмида	Замены
рМZ19	Нуклеотиды с 51 по 253	рМZ18	Нуклеотиды с 51 по 253
рМZ20	A53T	рМZ25	T53A
рМZ21	G78A	рМZ26	A78G
рМZ22	A123T	рМZ27	T123A
рМZ23	GT20,21AA	рМZ28	AA20,21GT
рМZ24	A30G	рМZ29	G30A

Культивирование бактерий проводили в пробирках и колбах (при соотношении объема среды к объему колбы 1:7.5) на лабораторных качалках с интенсивностью качания 220 об./мин. при 30°C. Засев опытных колб проводили 1% инокулята.

Накопление биомассы определяли нефелометрически на КФК-2 при длине волны 590 нм. За единицу биомассы принимали поглощение в 1 см кювета, равное 1.

Трансформацию клеток *B. subtilis* проводили по стандартной методике [20].

Определение РНКазной активности проводили по количеству кислоторастворимых продуктов гидролиза РНК [21].

Реактивы. Для приготовления сред и буферов использовали соли квалификации х.ч. и ч.д.а. («Реахим», Россия), обедненный неорганическим фосфатом (P_i) пептон производства Семипалатинского мясокомбината (содержание P_i не превышает 1.5 мг на 1 г сухого вещества); антибиотики: ампициллин (ОАО «Биохимик», г. Саранск). Определение ферментативной активности проводили с использованием дрожжевой высокомолекулярной РНК (НИКТИ БАВ, г. Новосибирск, Россия), дрожжевую РНК (НПО «Биохимреактив») для определения зон гидролиза, уранилацетат, пара-нитрофенилфосфат («Serva», США), агарозу фирмы «BIO-RAD», США. В работе использовали фрагмент Кленова ДНК-полимеразы и ДНТФ фирмы «New England Biolabs» (США).

Для анализа цифрового материала экспериментов проводили статистическую обработку результатов [22].

3. Результаты

3.1. Биосинтез биназы и РНКазы V_p рекомбинантными штаммами *E. coli* XL1 Blue с плазмидами pVI и pVP . Мультикопийные плазмиды активно реплицируются в рекомбинантных штаммах по окончании экспоненциальной фазы роста. В то же время наблюдается выход продуктов, гены которых кодируются плазмидой.

Табл. 2
Динамика накопления РНКаз в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов *E. coli* XL1 Blue, несущих плазмиды с полными генами РНКаз *B. intermedius* и *B. pumilus*

Плаزمида	Время культивирования	ОП ₅₉₀	РНКазы опт. ед./мл ч	Специфическая активность
pVI , биназа	16	4.6±0.12	1950±42	423±9
	20	7.0±0.17	3466±65	495±10
	24	7.3±0.16	4750±110	650±16
pVP , РНКазы V_p	16	4.6±0.11	18850±455	4097±90
	20	7.0±0.12	37600±850	4947±110
	24	7.9±0.15	51960±1070	6577±154

Известно, что гуанилспецифичные РНКазы бацилл синтезируются в стадию замедления роста, максимальный уровень активности фермента в культуральной жидкости достигается к началу стационарной фазы роста [12, 15]. Поэтому для установления оптимального времени накопления РНКаз в культуральной жидкости определяли активность фермента на 16, 20 и 24 ч роста, результаты представлены в табл. 2.

Согласно полученным результатам, суммарная и специфическая активность биназы, детерминируемая плазмидой pVI , в 10 раз ниже, чем общая и специфическая активность РНКазы V_p , детерминируемая плазмидой pVP . Наиболее хорошо это выражено на 24 ч культивирования. Поэтому в последующих экспериментах культивирование рекомбинантных продуцентов проводилось в течение 24 ч.

3.2. Влияние перекрестной замены промоторов генов биназы и РНКазы Вр на их экспрессию. С помощью RC PCR были созданы конструкции с перекрестной заменой промоторов биназы и РНКазы Вр (плазмиды pMZ11 и pMZ15) в полных генах этих ферментов. Полученными плазмидами был трансформирован штамм *E. coli* XL1 Blue.

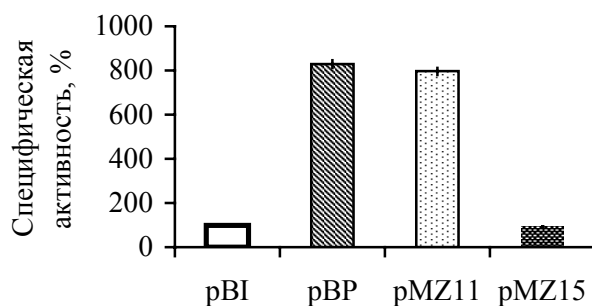


Рис. 2. Экспрессия генов биназы и РНКазы Вр при перекрестной замене промоторов и кодирующих областей в рекомбинантных штаммах *E. coli* XL1 Blue с плазмидами: pBI (полный ген биназы), pBP (полный ген РНКазы Вр), pMZ11 (ген биназы под промотором РНКазы Вр), pMZ15 (ген РНКазы Вр под промотором биназы)

Анализ показал, что разница в биосинтезе РНКаз обусловлена именно промоторами этих генов. Установлено, что замена промотора в полном гене РНКазы Вр в плазмиде pBP на промотор биназы (плазмида pMZ15) вызывает снижение активности РНКазы Вр до уровня активности биназы в штамме с плазмидой pBI, несущей полный ген биназы, и наоборот, замена промотора биназы на промотор гена РНКазы Вр (pMZ11) приводит к увеличению активности биназы на порядок, до уровня, обеспечиваемого плазмидой с полным геном РНКазы Вр (рис. 2).

3.3. Определение влияния перекрестной замены части промоторной области биназы и РНКазы Вр, несущей по 3 отличающихся нуклеотида на экспрессию этих генов. Для установления приблизительной локализации изменения промоторной активности были сконструированы плазмиды с перекрестной заменой части промоторов биназы и РНКазы Вр. В плазмиде pMZ18 была проведена замена около 100 нуклеотидов промоторной области РНКазы Вр и примыкающей части сигнальной последовательности на соответствующие из гена РНКазы Вр. Заменяемая часть сигнальной последовательности генов биназы и РНКазы Вр не имеет отличий. Результаты приведены в табл. 3.

По данным таблицы можно заключить, что замена части промоторной области РНКазы Вр на соответствующую из гена биназы приводит к уменьшению специфической активности РНКазы (определяемой плазмидой pMZ18) до уровня специфической активности биназы (определяемой плазмидой pBI). Замена в промоторной области биназы на соответствующую из гена РНКазы Вр приводит к увеличению специфической активности РНКазы (определяемой плазмидой pMZ19) и приближению значений специфической активности к уровню активности РНКазы Вр (определяемой плазмидой pBP).

Табл. 3

Влияние переноса части регуляторной области из полного гена рибонуклеазы *B. intermedius* в ген рибонуклеазы *B. pumilus* и наоборот

Плазмида	ОП ₅₉₀	РНКаза, опт. ед./мл ч	Специфическая активность	% от pBP	% от pVI
pVI	4.2±0,09	3350±81	780±16	14	100
pBP	4.3±0,10	23700±550	5524±105	100	708
pMZ18	4.6±0,09	3600±70	779±17	14	100
pMZ19	4.9±0,09	23700±480	4789±105	87	614

Таким образом, нуклеотиды, влияющие на эффективность промотора, расположены ниже 50 нуклеотида секвенированной области, т. е. ближе к сигнальной последовательности (рис. 1).

3.4. Определение влияния отдельных отличающихся нуклеотидов в промоторе гена биназы на экспрессию этого гена. Обнаружено, что замены нуклеотидов A53 на T, G78 на A, AA20,21 на GT и A30 на G в промоторе гена биназы на нуклеотиды из промоторной области гена РНКазы *Vr* не приводят к увеличению активности рибонуклеазы, определяемой плазмидами pMZ20, pMZ21, pMZ23, pMZ24, pMZ25, по сравнению с биназной активностью, определяемой исходной нуклеотидной последовательностью промоторной области плазмиды pVI. Результаты представлены в табл. 4 и на рис. 3.

Табл. 4

Влияние замен отличающихся нуклеотидов в промоторе гена биназы на экспрессию гена

Плазмида	ОП ₅₉₀	РНКаза, опт. ед./мл ч	Специфическая активность
pVI	8.2±0,18	5139±105	623±15
pBP	9.5±0,20	49500±1056	5172±170
pMZ20 (A53T)	8.2±0,19	4500±105	545±15
pMZ21 (G78A)	9.9±0,22	3250±80	328±8
pMZ22 (A123T)	8.2±0,21	41910±1050	5080±115
pMZ23 (GT20,21AA)	9.0±0,19	3900±95	393±9
pMZ24 (A30G)	6.5±0,14	3400±78	490±15

Замена в промоторе гена биназы нуклеотида A123 на T приводит к значительному увеличению РНКазной активности, определяемой плазмидой pMZ22 и приближению значений специфической и общей активности в культуральной жидкости к значениям, получаемым для РНКазы *Vr* (детерминируемой плазмидой pBP).

3.5. Определение влияния отдельных отличающихся нуклеотидов в промоторе гена РНКазы *Vr* на экспрессию этого гена. Для подтверждения закономерностей, обнаруженных при изучении промотора гена биназы, были сделаны перекрестные замены в промоторе гена РНКазы *Vr*.

Табл. 5

Влияние замен отличающихся нуклеотидов в промоторе гена РНКазы Вр на экспрессию гена

Плаزمида	ОП ₅₉₀	РНКазы, опт. ед./мл ч	Специфическая активность
pBI	8.2±0,21	5139±105	623±15
pBP	9.5±0,21	49500±1010	5172±114
pMZ25 (T53A)	9.2±0,19	46500±1050	5032±105
pMZ26 (A78G)	9.6±0,20	45000±850	5012±125
pMZ27 (T123A)	7.9±0,15	2350±61	296±7
pMZ28 (AA20,21GT)	8.5±0,20	42800±950	5035±175
pMZ29 (G30A)	8.9±0,25	43400±1015	4876±121

В промоторе гена РНКазы Вр нуклеотид T123 был заменен на А. Результаты представлены в табл. 5 и на рис. 3. Очевидно, что данная замена приводит к значительному уменьшению РНКазной активности (определяемой плазмидой pMZ27) по сравнению с РНКазной активностью, определяемой нативной нуклеотидной последовательностью промоторной области плазмиды Ври и уравниванию ее с активностью биназы (детерминированной плазмидой pBI).

Замены оставшихся отличающихся нуклеотидов в промоторе гена РНКазы Вр не приводят к уменьшению активности рибонуклеазы, определяемой плазмидой pBP, т. е. не оказывают влияния на экспрессию гена РНКазы Вр.

4. Обсуждение результатов

Наряду с полной аналогией в структуре белка, высокой гомологией структурных генов (10 нуклеотидных замен, не меняющих аминокислотного состава) и однотипной метаболической регуляцией синтеза ферментов известно, что удельная активность рибонуклеазы Вр в культуральной жидкости как рекомбинантного штамма *E. coli*, так и исходного бациллярного штамма превышает в 6–10 раз удельную активность биназы. Кроме того, степень ингибирования синтеза РНКазы *B. pumilus* неорганическим фосфатом заметно ниже. При этом 5'-участки генов биназы и РНКазы Вр, содержащие промоторы, отличаются лишь шестью нуклеотидами, расположенными диффузно.

Обнаруженный эффект связан с заменой лишь одного нуклеотида, находящегося в положении 23 транскрибируемой части промотора. Замена аденина 23 в промоторе биназы на тимин 23 из промотора РНКазы Вр увеличивает активность биназы до уровня, кодируемого плазмидой с геном РНКазы Вр, и, наоборот, замена тимина 23 в промоторе РНКазы Вр на аденин 23 из промотора биназы понижает активность РНКазы Вр до уровня, кодируемого плазмидой с промотором биназы (рис. 3).

На основании полученных данных можно заключить, что последовательность, включающая СТ₁₂₃Т в промоторе гена РНКазы Вр, обеспечивает более высокую эффективность (или силу) промотора по сравнению с биназой. Данная последовательность возможно обеспечивает стабилизацию транскрипционного комплекса либо активирует присоединение рибосом к рибосомсвязывающему сайту при последующей трансляции мРНК рибонуклеазы Вр.

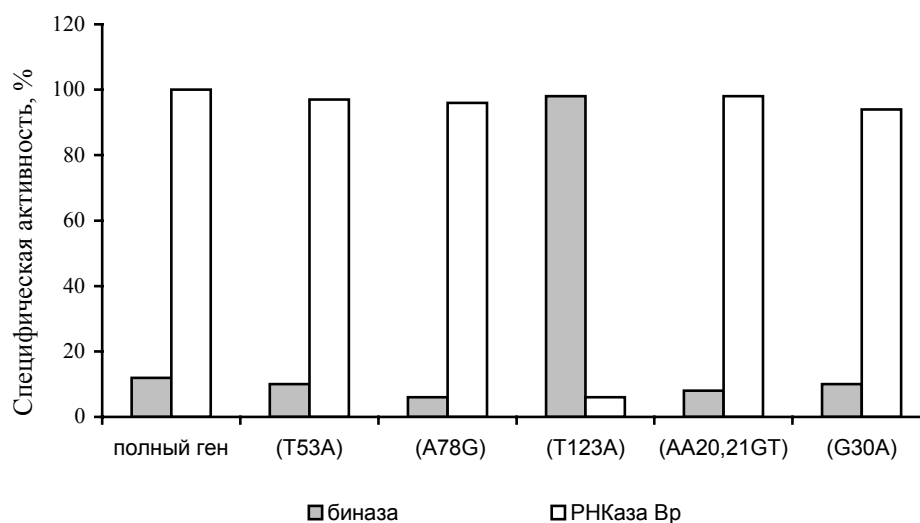


Рис. 3. Влияние перекрестных замен отличающихся нуклеотидов в промоторах генов РНКаз *B. intermedius* и *B. pumilus* на экспрессию генов. За 100% принята специфическая активность РНКазы Bp

Таким образом, более высокая эффективность промотора РНКазы Bp по сравнению с промотором биназы связана с заменой пуринового основания аденина в 123 положении промотора биназы на пиримидин тимин.

Работа поддержана РФФИ (проект № 03-04-96274) и ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» (ЖС-12.2/002).

Summary

O.V. Morozova, M.A. Kharitonova, V.I. Vershinina, L.V. Znamenskaya. The influence of cross replacements in promoters of genes of ribonucleases from *B. pumilus* and *B. intermedius* on the efficiency of gene expression.

Biosynthesis of guanylspecific ribonucleases from *B. intermedius* (binase) and *B. pumilus* (RNase Bp) is repressed by exogenous inorganic phosphate (Pi) in native bacilli strains and in recombinant strains of *E. coli* carrying plasmids with genes for these enzymes being expressed from their own regulatory regions. The primary structure of RNase Bp and binase are identical, structural gene for RNase Bp shares 98% identity with that of binase. 150 bp region of RNase Bp gene upstream coding sequence, containing promoter and SD, differs from binase one only by six nucleotides that are situated in different parts of the region. In spite of the so slight differences in regulatory regions there are essential difference in the efficiency of the expression of binase and RNase Bp genes. It was estimated that total RNase activity and specific activity in the medium of RNase Bp several times higher than that of binase as in native bacilli strains, as in recombinant strains of *E. coli*, carrying plasmids with full genes for those ribonucleases. Exchange of the regulatory part in binase gene for that of RNase Bp caused the increase of the total yield and specific activity of binase. As the sequences of promoters of RNase Bp and binase are very similar and differ by only 6 nucleotides in fragment upstream the RBS, we decided to perform site directed mutagenesis in binase and Rnase Bp promoters, changing each nucleotide in binase promoter for corresponding one from RNase

Bp and vice versa. It was found, that the difference in RNase Bp and binase expression is due to 123T in RNase Bp promoter. Replacement of this T123 in RNase Bp promoter with A (as in binase promoter) reduced the RNase Bp activity to the level of pBI. Replacement of A123 in binase promoter with T increased the binase activity several times up to the level of RNase Bp in pBP.

Литература

1. Hartley R.W., Rogerson D.L. Production and purification of the extracellular ribonuclease of *Bacillus amyloquelaciens* (barnase) and its inhibitor (barstar) // *Preparative Biochem.* – 1972. – V. 2. – P. 229–242.
2. Лецинская И.Б. Нуклеодеполимеразы сапрофитных бактерий. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1975. – 180 с.
3. Афанасенко Г.А., Дудкин С.М., Каминин Л.Б. Первичная структура рибонуклеазы *Bacillus intermedius* // *Биоорганическая химия.* – 1979. – Т. 5, № 2. – С. 187–202.
4. Нуркиянова К.М., Шульга А.А., Захарьев В.М., Кирпичников М.П., Скрябин К.Г., Баев А.А. Клонирование и определение нуклеотидной последовательности гена РНКазы *Bacillus intermedius* // *Докл. АН СССР.* – 1989. – Т. 309, № 6. – С. 1476–1479.
5. Струминская Н.К., Ивайловский В.Л., Дементьев А.А., Моисеев Г.П., Федосов Ю.А., Яковлев Г.И. Внеклеточная рибонуклеаза из *Bacillus pumilus* // *Биол. науки.* – 1992. – Т. 61, № 2. – С. 41–44.
6. Hartley R.W. Barnase and Barstar // *The Ribonucleases: structures and functions* / Eds. G. D'Alessio, J.F. Riordan. – N. Y.: Academic Press, 1997. – P. 51–100.
7. Дементьев А.А., Гольшин П.Н., Рябченко Н.Ф. Две формы внеклеточной низкомолекулярной рибонуклеазы *Bacillus sp.* BCF 247. Выделение и характеристика белка // *Биохимия.* – 1993а. – Т. 58, № 8. – С. 1258–1265.
8. Дементьев А.А., Орлов В.М., Шляпников С.В. Полная первичная структура рибонуклеазы бактерии *Bacillus thuringiensis* // *Биоорганическая химия.* – 1993б. – Т. 19, № 9. – С. 853–861.
9. Дементьев А.А., Моисеев Г.П., Шляпников С.В. Первичная структура и каталитические свойства внеклеточной рибонуклеазы *Bacillus circulans* // *Биоорганическая химия.* – 1993в. – Т. 19, № 11. – С. 1065–1072.
10. Нуркиянова К.М., Шульга А.А., Захарьев В.М., Кирпичников М.П., Скрябин К.Г., Баев А.А. Клонирование и определение нуклеотидной последовательности гена РНКазы *Bacillus intermedius* // *Докл. АН СССР.* – 1989. – Т. 309, № 6. – С. 1476–1479.
11. Чернокальская Е.Б., Ромахина Е.Р., Балабан Н.П. Клонирование и экспрессия структурного гена РНКазы *B. intermedius* 7P // *Биол. науки.* – 1992. – Т. 2, № 4. – С. 45–49.
12. Знаменская Л.В., Габдрахманова Л.А., Чернокальская Е.Б., Лецинская И.Б. Регуляция биосинтеза внеклеточных рибонуклеаз в исходных бациллярных и рекомбинантных штаммах *Escherichia coli* // *Микробиология.* – 1995. – Т. 64, № 5. – С. 616–623.
13. Znamenskaya L.V., Gabdrachmanova L.A., Chernokalskaya E.B., Leshchinskaya I.B., Hartley R.W. Phosphate regulation of biosynthesis of extracellular RNases of endospore-forming bacteria // *FEBS Letters.* – 1995. – V. 357. – P. 16–18.
14. Знаменская Л.В., Ромахина Е.Р., Клейнер Г.И. Влияние хлорамофеникола и актиномицина D на биосинтез щелочной внеклеточной РНКазы *Bacillus intermedius* // *Микробиология.* – 1984. – Т. 53, № 5. – С. 796–801.

15. Знаменская Л.В., Ивайловская В.Л., Иванов Е.И. Биосинтез внеклеточной рибонуклеазы *Bacillus pumilus* // Микробиология. – 1994. – Т. 63, № 6. – С. 986–992.
16. Вершинина О.А., Знаменская Л.В. Pho регулоны бактерий // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 5. – С. 581–595.
17. Jones D.H., Howard B.H. A rapid method for site-specific mutagenesis and directional subcloning by using the polymerase chain reaction to generate recombinant circles // Biotechniques. – 1990. – V. 8. – P. 178–183.
18. Jeffris G.D., Holtman W.F., Guse D. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids // J. Bacteriol. – 1957. – V. 73. – P. 61–79.
19. Birnboim H.C., Doly J.A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids. Res. – 1979. – V. 7. – P. 1513–1523.
20. Манниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 394 с.
21. Anfinsen C.B., Redfield R.R., Choate W.I., Page J., Carrol W.R. Studies of cross structure, cross-linkage and terminal sequences in ribonuclease // J. Biol. Chem. – 1954. – V. 207. – P. 201–210.
22. Плохинский Н.А. Математическое моделирование в биологии. – М.: Изд-во МГУ, 1978. – 263 с.

Поступила в редакцию
15.07.05

Морозова Ольга Владимировна – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: Olga.Morozova@ksu.ru

Харитоновна Майя Александровна – кандидат биологических наук, научный сотрудник НИЛ ББФ Казанского государственного университета.

E-mail: Maya.Skvortsova@ksu.ru

Вершинина Валентина Ивановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: Valentina.Vershinina@ksu.ru