

Клонирование кДНК, кодирующей С-концевую часть тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих, с использованием ПЦР-амплифицированного радиоактивно меченного гибридизационного зонда

О. В. Леванец, В. Г. Найденов, М. И. Вудмаска, Г. Х. Мацука, А. И. Корнелюк

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Для скрининга кДНК-библиотеки методом полимеразной цепной реакции осуществлен синтез радиоактивно меченного гибридизационного зонда с высокой удельной активностью ($3,5 \cdot 10^9$ имп·мин⁻¹·мкг⁻¹), специфичного к тирозил-тРНК синтетазе млекопитающих. Проведен скрининг кДНК-библиотеки печени быка и получен клон, соответствующий указанному ферменту. Секвенирование кДНК-вставки показало, что данный клон кодирует С-концевую часть тирозил-тРНК синтетазы из печени быка. Обнаружена гомология аминокислотной последовательности С-концевого некаталитического домена тирозил-тРНК синтетазы с новым цитокином — моноцит-активирующим полипептидом II.

Введение. Аминоацил-тРНК синтетазы (АРСазы, КФ б. 1. 1) — ключевые ферменты аппарата биосинтеза белка клетки [1, 2]. АРСазы высших эукариот отличаются более сложной структурой по сравнению с их прокариотическими аналогами и обычно имеют N- или С-концевые удлинения полипептидной цепи, обусловленные необходимостью выполнения ими некоторых дополнительных функций, например, участием в формировании кодосом [3].

Тирозил-тРНК синтетазы (КФ б. 1. 1) из печени быка, выделенная и изученная нами ранее [4—6], представляет собой димер α_2 -типа с молекулярной массой 2×59 кДа. Наряду с основной формой синтетазы также выделена и охарактеризована функционально активная протеолитически модифицированная форма белка, имеющая $M_r 2 \times 39$ кДа [4—6]. Несущественное для каталитической активности фермента С-концевое удлинение полипептидной цепи вносит определяющий вклад в сродство тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих к высокомолекулярным РНК [5].

Для дальнейшего структурно-функционального анализа эукариотической тирозил-тРНК синтетазы необходимо знание ее первичной структуры. Ранее нами определена первичная структура N-концевого полипептидного фрагмента бычьей тирозил-тРНК синтетазы, кодирующего нуклеотидсвязывающий домен фермента (свертку Россмана) с помощью ПЦР-амплификации, клонирования и секвенирования соответствующего кДНК-фрагмента [7]. В данной работе нами впервые проведено клонирование и секвенирование кДНК, кодирующей С-концевую часть тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих.

В настоящее время используются различные методы получения радиоактивно меченных гибридизационных зондов. Чаще всего концевую метку вводят при помощи полинуклеотидкиназы бактериофага T4 и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I [8—10]. ДНК также может быть помечена методом ник-трансляции [8, 11] или с использованием статистических олигонуклеотидных затраток [12]. Метод ник-трансляции наиболее эффективен для фрагментов ДНК длиной более 1 тыс. п. н., активность полученного зонда при этом достигает значений до $0,5 \cdot 10^9$ имп·мин⁻¹·мкг⁻¹. Метод статистиче-

ских затравок используется для мечения фрагментов ДНК размером от 0,5 до 2 тыс. п. н., активность зонда — до $2 \cdot 10^9$ имп·мин⁻¹·мкг⁻¹ [13].

В последнее время применяется метод введения метки в ДНК с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на введении одного из радиоактивно меченных dNTPs в реакционную смесь [13]. Мечение гибридационных зондов с использованием ПЦР имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами: высокая эффективность мечения фрагментов размером меньше 0,5 тыс. п. н.; возможность легкой регуляции значений активности зонда и его количества; эффективное мечение зонда при небольших исходных количествах соответствующей последовательности; прямое мечение геномной ДНК [13].

Материалы и методы. В работе использовали клетки *Escherichia coli* XL1-Blue, плазмидный вектор pBluescript II SK⁽⁺⁾ и фаговый вектор λ ZAPII («Stratagene», США). Для скрининга кДНК-библиотеки печени быка в фаговом векторе λ ZAPII в качестве зонда использовали фрагмент размером 638 п. н., полученный при ПЦР-амплификации кДНК печени быка и кодирующий нуклеотидсвязывающий домен тирозил-тРНК синтетазы [7] — GenBank Acc# X96373.

Синтез зонда, специфичного к тирозил-тРНК синтетазе, и скрининг кДНК-библиотеки печени быка. Проведение полимеразной цепной реакции. Реакционная смесь (20 мкл) содержала следующие компоненты: 10 нг матричной ДНК (фрагмент X96373), по 20 пмоль каждого из праймеров (Z2⁽⁺⁾-праймер 5'-AAGAGAAACTGCACCTTATCACCCG-3' и PM⁽⁻⁾-праймер 5'-GCCTGTAAATCCTGGAACCATAGG-3'), по 4 нмоль dCTP, dGTP, dTTP, 100 мкКи [³²P]dATP с удельной активностью 2000 Ки/ммоль («Радиофармацевт», Ташкент), 1 × реакционный буфер (10 ммоль трис-HCl, pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,001 % (в/о) желатина и 5 ед. ДНК-полимеразы Taq («Stratagene»). Проведено 25 циклов амплификации по программе: денатурация при 94 °C в течение 45 с; отжиг праймеров при 60 °C в течение 60 с; достройка при 72 °C в течение 90 с.

По окончании амплификации синтезированный зонд пересаждали этанолом и растворяли в 50 %-м формамиде.

Выход реакции определяли по включению [³²P]dATP в ТХУ-осаждаемый продукт на стекловолоконистых фильтрах [14].

Исходя из выхода реакции и удельной активности [³²P]dATP определяли удельную активность полученного гибридационного зонда [14].

Первичный скрининг кДНК-библиотеки печени быка с использованием синтезированного радиоактивного зонда. Для выявления клонов кДНК, соответствующих тирозил-тРНК синтетазе млекопитающих, проведен скрининг кДНК-библиотеки печени быка полученным зондом. Для этого библиотеку рассеивали на чашки со средой LB (10 чашек по 50 000 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на каждой). После инкубации при 37 °C в течение 16 ч фаговую ДНК переносили на нейлоновые фильтры (Hybond-N, «Amersham», Англия) по общепринятой методике. В качестве положительного контроля на отдельный фильтр были нанесены аликвоты 2 и 0,2 нг ДНК фрагмента X96373, в качестве отрицательного — 10 и 1 нг суммарной ДНК рекомбинантного фага λ ZAPII библиотеки. Далее ДНК, связавшуюся с фильтром, денатурировали в течение 7 мин в растворе: 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl; затем фильтр нейтрализовали в течение 6 мин в растворе: 1 M трис-HCl, pH 8,0; 1,5 M NaCl. Далее фильтр промывали в 4 × SSC (1 × SSC: 150 mM NaCl; 15 mM Na-цитрат, pH 7,0), ДНК фиксировали на нем УФ-излучением и фильтр использовали для гибридазации.

Предгибридацию проводили в течение 3—5 ч при температуре 37 °C в растворе следующего состава: 5 × SSC; 5 × раствор Денхардта (1 ×: по 0,02 % поливинилпирролидона, фикола, БСА); 50 %-й формамид; 0,1 %-й DS-Na. Объем раствора: по 0,2 мл на 1 см² площади фильтра.

Затем в предгибридационную смесь добавляли полученный меченый зонд, растворенный в 50 %-м формамиде и предварительно денатурированный прогреванием при 65 °C (5 мин), до концентрации $(2—5) \cdot 10^6$ имп·мин⁻¹·мл⁻¹ гибридационной смеси и проводили гибридацию при 37 °C в течение 16—18 ч на качающейся платформе.

По завершении гибридазации каждый фильтр последовательно отмывали: 1) 15 мин при комнатной температуре в 100 мл раствора 2 × SSC, 0,1 %-й DS-Na; 2) 15 мин в растворе того же состава при 65 °C; 3) 15 мин при 65 °C в растворе 0,2 × SSC, 0,1 %-й DS-Na.

После отмывки фильтр помещали на экспозицию с рентгеновской пленкой (PM-1, «Свема», Украина) на 1—2 сут с использованием интенсифицирующего экрана при -70 °C.

Анализ отобранных в результате первого скрининга образцов методами дот-гибридазации и гибридазации по Саузерну. На чашках в местах, соответствующих

положительным сигналам на фильтрах, были вырезаны участки среды примерно 1 см^2 (200—300 фаговых бляшек) и помещены в 1 мл буфера SM для элюции фаговых частиц.

Затем отобранными образцами инфицировали культуру *E. coli* XL1-Blue, размножали бактериофаги и выделяли фаговую ДНК [8].

Для последующего анализа отобранные образцы использовали для дот-гибридизации с тем же зондом. На нейлоновый фильтр наносили ДНК выбранных образцов (по 100—200 нг в каждую точку), положительный контроль — 2 нг ДНК фрагмента X96373, отрицательный — 10 нг суммарной ДНК-библиотеки. Подготовку фильтров, предгибридизацию, гибридизацию и отмывку осуществляли так же, как на соответствующих этапах первичного скрининга кДНК-библиотеки. Экспозиция с рентгеновской пленкой (PM-1, «Свема») — 2 сут при -70°C с интенсивизирующим экраном.

После дот-гибридизации отобранные образцы фаговой ДНК рестрицировали по сайту *EcoRI* (в библиотеке по данному сайту клонированы фрагменты кДНК в вектор λ ZAPII) и использовали для гибридизации по Саузерну [15].

Рестрикцию проводили в течение 2 ч при 37°C . Каждая реакционная смесь в объеме 50 мкл содержала по 2 мкг ДНК-образца и по 20 ед. акт. *EcoRI* («BioMaster», Россия) в соответствующем буфере. После завершения реакции образцы пересаждали и наносили на электрофорез: 1,5 %-я агароза в буфере TAE (40 мМ трис-ацетат, pH 8,3; 1 мМ ЭДТА). В качестве положительного контроля на одну из дорожек нанесено 40 нг ДНК, кодирующей N-концевой фрагмент тирозил-тРНК синтетазы (последовательность X96373).

После завершения электрофореза для денатурации ДНК гель в течение 30 мин выдерживали в растворе 0,5 М NaOH, 1,5 М NaCl, а затем 30 мин — в нейтрализующем растворе 1 М трис-HCl, pH 8,0, 1,5 М NaCl. ДНК с геля на нейлоновый фильтр переносили по стандартной схеме [8] в течение 18 ч, после чего ее фиксировали на фильтре УФ-излучением и проводили те же процедуры гибридизации, что и в предыдущих случаях.

Второй скрининг отобранного образца. Для дальнейшей работы был отобран один из проанализированных образцов. Поскольку каждый образец представлял собой смесь примерно 200—300 клонов, существовала необходимость дополнительного скрининга для выделения индивидуального клона, специфичного к тирозил-тРНК синтетазе. Для этого отобранный образец был раститрован до получения отдельных бляшек (1000 БОЕ на чашку).

Далее перенос фаговой ДНК на нейлоновые фильтры, подготовку фильтров и гибридизацию проводили так же, как на соответствующих этапах первого скрининга кДНК-библиотеки.

Третий скрининг образца. В месте, соответствующем положительному сигналу на фильтре, на чашке был вырезан участок среды, содержащий отдельную фаговую бляшку, и помещен в 1 мл среды SM для элюции фаговых частиц. Затем был определен титр полученной суспензии по стандартной методике [8]. Чтобы убедиться в том, что полученный образец содержит индивидуальный клон без посторонних примесей, осуществляли еще один скрининг с использованием радиоактивного зонда, специфичного к тирозил-тРНК синтетазе.

На чашку высевали 100 БОЕ образца после второго скрининга и проводили аналогичные процедуры переноса ДНК на фильтр и гибридизации.

Секвенирование ДНК. Из полученных рекомбинантных клонов выделяли плазмидную ДНК с использованием колонок QIAGEN-100 («Qiagen», США). ДНК секвенировали по методу Сэнгера [16], использовали T7 ДНК-полимеразу («Pharmacia», Швеция), изотоп $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ ($> 1000 \text{ мКи/ммоль}$, «Amersham»). Для секвенирования использовали внешние олигонуклеотидные праймеры M13 и SPT3 («Pharmacia»), а также синтезированные внутренние праймеры SK1-SK9.

Результаты и обсуждение. Результаты скрининга кДНК-библиотеки печени быка зондом, специфичным к тирозил-тРНК синтетазе. При синтезе радиоактивно меченного зонда в ходе ПЦР включение изотопа составляло, как правило, 50 %. Исходя из включения и удельной активности использованного препарата $[\text{}^{32}\text{P}]\text{dATP}$, удельная активность полученного зонда составляла примерно $3,5 \cdot 10^9 \text{ имп} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мкг}^{-1}$, что соответствует литературным данным [13] для данного метода введения метки в гибридационный зонд.

При первичном скрининге кДНК-библиотеки печени быка с использованием синтезированного зонда получен ряд гибридационных сигналов. Поскольку при первичном скрининге многие сигналы могут являться неспецифическими, требовался дополнительный анализ отобранных образцов. Кроме того, из-за большого количества анализируемых клонов кДНК выделить после первого скрининга индивидуальный клон невозможно — каждый образец представляет собой смесь из 200—300 клонов. Всего в результате первого скрининга было отобрано 28 образцов, соответствующих положительным сигналам.

Эффективность гибридизации была проверена

в контрольных образцах: положительный контроль дал сильные гибридационные сигналы, в отрицательном — сигналов не наблюдалось.

В дальнейшем использовали выделенную ДНК отобранных образцов. При дот-гибридации наиболее сильный сигнал дал образец 22. Сигнал упомянутого образца по интенсивности был сопоставим с таковым положительного контроля. Однако для последующего анализа были отобраны еще 11 образцов, дававших менее интенсивные гибридационные сигналы, поскольку сила сигнала могла быть обусловлена не только специфичностью клона, но и другими причинами: чистотой препарата ДНК, неточным определением количества ДНК в препарате.

Для более точной проверки результатов дот-гибридации была осуществлена гибридация по Саузерну с ДНК отобранных образцов, расщепленной по сайту рестрикции *EcoRI*, поскольку именно по этому сайту была клонирована кДНК печени быка в вектор для данной библиотеки. Кроме того, этот опыт позволял определить, гибридизуется ли зонд со специфическими последовательностями кДНК или же имеет место неспецифическая гибридация с последовательностями векторной ДНК, имеющими случайную гомологию с зондом.

Результаты гибридации по Саузерну (рис. 1)

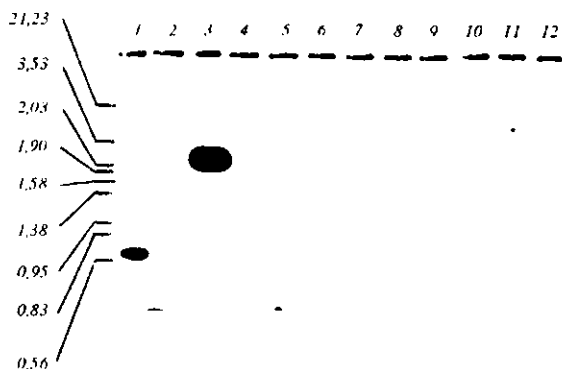


Рис. 1. Результат гибридации по Саузерну ДНК образцов, отобранных после первого скрининга кДНК-библиотеки печени быка, с радиоактивно меченным зондом X96373. Нанесены следующие образцы: 1 — контроль (1 нг ДНК фрагмента X96373); 2 — 23; 3 — 22; 4 — 21; 5 — 20; 6 — 18; 7 — 16; 8 — 14; 9 — 10; 10 — 7; 11 — 3; 12 — 1. Слева указаны положения маркеров в тыс. п. н.



Рис. 2. Результат третьего скрининга кДНК-библиотеки печени быка: гибридация фаговых бляшек клона 22 с радиоактивным зондом X96373, специфичным к тирозил-тРНК синтетазе млекопитающих

показали, что положительный сигнал дает действительно только клон 22. Сигнал давал один из рестриционных фрагментов размером примерно 2200 п. н.

В ходе второго скрининга образца 22 получены отдельные клоны, дающие положительный сигнал. Третий скрининг показал, что клон 22 является гомогенным, не содержит никаких примесей и дает сильный положительный сигнал в гибридации с радиоактивно меченным зондом, специфичным к тирозил-тРНК синтетазе млекопитающих (рис. 2).

Секвенированием по Сэнгеру [16] определена нуклеотидная последовательность кДНК-вставки клона 22. На схеме приведена нуклеотидная последовательность кДНК-фрагмента, соответствующего С-концевой части последовательности бычьей тирозил-тРНК синтетазы. Наблюдается перекрытие нуклеотидной области 1—135 с последовательностью секвенированного нами ранее [7] фрагмента кДНК, кодирующего N-концевой нуклеотидсвязывающий домен синтетазы (свертку Россмана). Отнесение полученной последовательности к С-концевой части полипептидной цепи бычьей тирозил-тРНК синтетазы независимо под-

GGGCTGCAGG	CCTTGGATGA	AGAATACTTG	AAAGTGGATG	CCCAGTTTGG	AGGTGTTGAT	60
G L Q	A L D E	E Y L	K V D	A Q F G	G V D	20
CAGAGAAAGA	TTTTCACCTT	TGCAGAGAAG	TACCTCCCTG	CACTTGGTTA	CTCAAAACGA	120
Q R K	I F T F	A E K	Y L P	A L G Y	S K R	40
ATCCATCTGA	TGAATCCTAT	GGTTCCAGGA	TAACTGGCA	GCAAAATGAG	CTCTTCAGAA	180
I H L	M N P M	V P G	L T G	S K M S	S S E	60
GAGGAGTCCA	AGATTGATCT	GCTTGATCGG	AAAGAGGATG	TAAAGAAAAA	ACTGAAGAAG	240
E E S	K I D L	L D R	K E D	V K K K	L K K	80
GCCTTCTGTG	AGCCAGGGAA	TGTGGAGAAC	AACGGCGTTC	TGGCCTTCAT	CAGACATGTC	300
A F C	E P G N	V E N	N G V	L A F I	R H V	100
CTCTTTCCTC	TCAAGTCTGA	GTTTGTGATC	CTTCGAGATG	AAAAATGGGG	TGGAAACAAA	360
L F P	L K S E	F V I	L R D	E K W G	G N K	120
ACCTACACAG	CTTACTTGGA	CCTGGAAAAG	GACTTTGCTG	ATGAGGTTGT	CCACCCTGGA	420
T Y T	A Y L D	L E K	D F A	D E V V	H P G	140
GACCTCAAGA	ATTCTGTTGA	AGTTGCCCTG	AACAAGTTGC	TGGATCCCAT	CCGGGAGAAG	480
D L K	N S V E	V A L	N K L	L D P I	R E K	160
TTTAATACTC	CTGCTCTGAA	GAAACTGTCC	AGCGCTGCCT	ACCCAGATCC	CTCAAAGCAG	540
F N T	P A L K	K L S	S A A	Y P D P	S K Q	180
AAGCCAGCTG	TCAAAGGCC	TGCCAAGAAT	TCGGAGCCAG	AGGAGGTCAT	CCCATCCCGG	600
K P A	V K G P	A K N	S E P	E E V I	P S R	200
CTGGATATCC	GTGTGGGGAA	AGTCATTAGT	GTGGACAAGC	ACCCAGATGC	AGACAGCCTG	660
L D I	R V G K	V I S	V D K	H P D A	D S L	220
TATGTGGAGA	AGATTGATGT	GGGGGAAGCT	GAGCCACGGA	CTGTGGTGAG	TGGCCTGGTG	720
Y V E	K I D V	G E A	E P R	T V V S	G L V	240
CAGTTTGTGC	CCAAGGAGGA	ACTGCAGGAC	AGGCTGGTGG	TGGTGCTGTG	CAATCTGAAA	780
Q F V	P K E E	L Q D	R L V	V V L C	N L K	260
CCCCAGAAGA	TGAGAGGAGT	CAAGTCCCAA	GGCATGCTCC	TGTGTGCTTC	TGTAGAAGGG	840
P Q K	M R G V	K S Q	G M L	L C A S	V E G	280
GTAACCGCA	AGGTTGAGCC	TCTAGACCCT	CCTGCAGGCT	CTGCTCCTGG	TGAGCGAGTG	900
V N R	K V E P	L D P	P A G	S A P G	E R V	300
TTTGTGAAGG	GCTATGAGAA	GGGCCAACCA	GACGAAGAGC	TGAAGCCCAA	GAAGAAAGTC	960
F V K	G Y E K	G Q P	D E E	L K P K	K K V	320
TTTGAGAAAT	TGCAGGCTGA	CTTTAAAATT	TCTGACGAGT	ACATTGCACA	GTGGAAGCAA	1020
F E K	L Q A D	F K I	S D E	Y I A Q	W K Q	340
ACCAACTTCA	TG					1032
T N F M						344

тверждается соответствием внутреннего фрагмента MLL...PAG последовательности пептида BrCN-расщепления B13/91, секвенированного нами ранее (А. И. Корнелюк, неопубликованные данные). Данный пептид был выделен из BrCN-расщепления основной формы бычьей тирозил-тРНК синтетазы (2 × 59 кДа), но отсутствовал у протеолитически модифицированной формы фермента (2 × 39 кДа), т. е. относится к некаталитическому С-концевому фрагменту синтетазы.

Анализ гомологии аминокислотной последовательности бычьей тирозил-тРНК синтетазы с другими белками по программе BLASTP обнаружил высокую гомологию С-концевого некаталитического домена с С-доменом метионил-тРНК синтетазы бактерий, а также с новым цитокином — моноцит-активирующим полипептидом II [17].

О. В. Леванец, В. Г. Найденов, М. I. Вудмаска, Г. Х. Мацука, А. I. Корнелюк

Клонування кДНК, що кодує С-кінцеву частину тирозил-тРНК синтетазу свавців, з використання ПЛР-ампліфікованого радіоактивно міченого гібридаційного зонда

Резюме

Для аналізу кДНК-бібліотеки методом полімеразної ланцюгової реакції проведено синтез радіоактивно міченого гібридаційного зонда з високою питомою активністю ($3,5 \cdot 10^9$ імп·хв⁻¹·мкг⁻¹), специфічного до тирозил-тРНК синтетазу свавців. Проведено скринінг кДНК-бібліотеки печінки бика та одержано клон, що відповідає вказаному ферменту. Секвенування кДНК показало, що отриманий клон кодує С-кінцеву частину тирозил-тРНК синтетазу печінки бика. Виявлена гомологія аминокислотної послідовності С-кінцевого некаталітичного домена тирозил-тРНК синтетазу з новим цитокином — моноцит-активуючим поліпептидом II.

О. V. Levanets, V. G. Naidenov, M. I. Woodmaska, G. H. Matsuka, A. I. Kornelyuk

Cloning of cDNA encoding C-terminal part of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase using of PCR-amplified radioactive probe

Summary

Radioactive probe of high activity ($3.5 \cdot 10^9$ cpm/μg) specific to mammalian tyrosyl-tRNA synthetase has been synthesized by polymerase chain reaction. Bovine liver cDNA-library has been screened and specific clone has been detected. Sequencing of cDNA insert shows that the clone encodes C-terminal part of bovine tyrosyl-tRNA synthetase. C-terminal non-catalytic domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase shares homology of amino acid sequence with a novel cytokine — endothelial-monocyte activating polypeptide II.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоксил-тРНК.—М.: Наука, 1984.—405 с.
2. Schimmel P. Classes of ARSases and the establishment of the genetic code // TIBS.—1991.—16.—N 1.—P.1—3.
3. Mirande M. Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes. Structural domains and their implications // Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.—1991.—40.—P. 95—142.
4. Корнелюк А. И., Курочкин И. В., Мацука Г. Х. Тирозил-тРНК-синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства // Молекуляр. биология.—1988.—22, № 1.—С. 176—186.
5. Курочкин И. В., Корнелюк А. И., Мацука Г. Х. Взаимодействие эукариотической тирозил-тРНК синтетазы с высокомолекулярными РНК // Молекуляр. биология.—1991.—25, № 3.—С. 779—786.
6. Рибкинска Т. А., Корнелюк А. И., Берестень С. Ф. и др. Иммунохимический подход к изучению структуры тирозил-тРНК-синтетазы из печени быка // Там же.—1991.—7, № 6.—С. 33—36.
7. Леванец О. В., Найденов В. Г., Вудмаска М. И. и др. ПЦР-амплификация, клонирование и секвенирование фрагмента кДНК, кодирующего нуклеотидсвязывающий домен тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // Там же.—1996.—12, № 5.—С. 66—70.
8. Маншатиус Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1988.—538 с.
9. Richardson C. C. Bacteriophage T4 polynucleotide kinase // The Enzymes. Nucleic Acids. Pt A / Ed. P. D. Boyer.—New York; London: Acad. press, 1981.—Vol. XIV.—P. 299—314.
10. Klenow H., Henningsen I. Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* by limited proteolysis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1970.—65, N 2.—P. 168—175.
11. Rigby D. W. J., Dieermann M., Rhodes C., Berg P. Labeling DNA high specific activity *in vitro* by nick-translation with DNA-polymerase I // J. Mol. Biol.—1977.—113.—P. 237—251.
12. Feinberg A. P., Vogelstein B. A. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity // Anal. Biochem.—1983.—132.—P. 6—13.
13. Schowalter D. B., Sommer S. S. The generation of radio-labeled DNA and RNA probes with polymerase chain reaction // Ibid.—1989.—177.—P. 90—94.
14. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами.—М.: Наука, 1983.—356 с.
15. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // J. Mol. Biol.—1975.—98.—P. 503—517.
16. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74.—P. 5463—5467.
17. Kao J., Houck K., Fan Y. et al. Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial-monocyte activating polypeptide II // J. Biol. Chem.—1994.—269, N 40.—P. 25106—25119.

УДК 577.217.32

Поступила в редакцию 11.11.96