

АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

На правах рукописи

СМИРНОВ Олег Ювенальевич

УДК 577.21

СОЗДАНИЕ ДОМИНАНТНЫХ МАРКЁРОВ ДЛЯ РАСТЕНИЙ

03.00.03 - Молекулярная биология

А в т о р е ф е р а т  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 1988

Работа выполнена в лаборатории генетической инженерии растений Института молекулярной биологии АН СССР.

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор К.Г.Скрябин, кандидат биологических наук В.М.Захарьев.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук Я.И.Бурьянов, доктор биологических наук В.И.Негрук.

Ведущая организация: Институт молекулярной генетики АН СССР.

Защита диссертации состоится "31" марта 1988 г. в "14" часов на заседании Специализированного Учёного совета Д.002.79.01 по защите диссертаций на соискание учёной степени доктора наук при Институте молекулярной биологии АН СССР по адресу: 117984, Москва, ул.Вавилова, Д.32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИМБ АН СССР.

Автореферат разослан "29" февраля 1988 года.

Учёный секретарь  
Специализированного совета,  
кандидат химических наук

  
А.М.Крицын

Актуальность темы. Молекулярная биология растений открыла новый путь конструирования генов с желаемыми характеристиками и введения их в растения, что может быть эффективнее традиционных методов селекции. Разработанные в последнее время методы переноса генов в высшие растения дали исследователю мощный инструмент для выяснения закономерностей, лежащих в основе таких фундаментальных процессов передачи генетической информации, как транскрипция и трансляция.

В отличие от прокариот, у высших эукариот, особенно у растений, процессы транскрипции и трансляции на молекулярном уровне остаются во многом неисследованными. Несмотря на имеющиеся данные о регуляторных элементах промоторов и важной роли в трансляции нуклеотидов, окружающих стартовый AUG-кодон мРНК, всё ещё нет четкого представления о структурной организации 5'-нетранслируемой последовательности мРНК и ее функции при инициации трансляции.

Изучение механизмов, контролирующих работу генов, позволит создавать эффективные системы экспрессии гетерологичных генов, кодирующих определенные целевые белки.

Цель и задачи работы. Цель работы - конструирование генно-инженерными методами доминантных маркёров растений, содержащих различные нуклеотидные последовательности в области инициации трансляции. В соответствии с этим были поставлены следующие задачи: клонировать регуляторные участки - промотор и терминатор - гена нопалинсинтетазы из Т-ДНК Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, который конститутивно работает в растениях; получить набор делеций в районе АТG-кодона; создать векторные молекулы, позволяющие экспрессировать чужеродные гены в растении-

ях; сконструировать доминантные маркеры для растений (гены устойчивости к канамицину) с разной первичной структурой в районе ATG-кодона.

В качестве компонентов маркерных генов были выбраны промотор хорошо изученного гена нопалинсинтетазы, а также ген неомизинфосфотрансферазы из Tn5, экспрессию которого можно легко определить как *in vivo*, по устойчивости клеток к канамицину, так и *in vitro*, по активности фермента в клеточном экстракте.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые получен набор гибридных маркерных генов *pos-лео* для растений, у которых расстояние от иницирующего AUG-кодона до кэп-сайта мРНК составляет от 17 до 71 нуклеотида. Ряд генов *pos-лео* содержит дополнительный "ложный" (то есть не попадающий в рамку считывания) AUG-триплет в 5'-нетранслируемой последовательности, находящийся на том же расстоянии от 5'-конца мРНК, что и иницирующий AUG-кодон в других конструкциях.

На основании результатов функционального анализа полученных гибридных генов доказано, что в кишечной палочке работает не промотор гена нопалинсинтетазы, как предполагалось ранее (Herrera-Estrella L. et al., 1983), а другой промотор, расположенный в 5'-концевом участке гибридного гена. Уровень экспрессии генов *pos-лео* в агробактерии отличается от уровня их экспрессии в *E.coli*, что подтверждает имеющиеся данные о различии систем транскрипции и трансляции у *E.coli* и агробактерии.

Практическая ценность работы заключается в том, что полученные векторные молекулы ДНК, содержащие различные варианты *pos*-промотора и *pos*-терминатора могут служить основой при

конструировании гибридных генов, конститутивно работающих в растениях. Кроме того, анализ экспрессии в растительных клетках полученных гибридных маркерных генов позволит оценить влияние на экспрессию структуры мРНК а районе AUG-кодона и выбрать конструкцию, обеспечивающую максимальные уровень экспрессии.

Объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов. Материал изложен на 80 страницах машинописного текста, включает 16 рисунков и 2 таблицы. Список использованной литературы содержит 115 наименований.

Апробация. Материалы диссертации докладывались на заседаниях отдела генетической инженерии и на конкурсе научных работ молодых ученых института молекулярной биологии; материалы были представлены на I Международном конгрессе по молекулярной биологии растений, Саванна, США, 1985; на тематической выставке "Биотехнология - народному хозяйству" на ВДНХ СССР, Москва, 1985; на V Всесоюзном биохимическом съезде, Киев, 1986; на международном симпозиуме по генетической инженерии растений, Пушино, 1987.

#### Материалы и методы.

В работе использованы штаммы *Escherichia coli* K802 и F<sup>+</sup>Z<sup>-</sup>ΔM15recA; *Agrobacterium tumefaciens* C58 и GV3850.

Среды. Для *E. coli* применяли среды УТ или ДУТ, для агробактерии - среду РА (4 г/л пептона, 2 мм сульфата магния, рН 7,2); все культуры выращивали на чашках со средой УТ,

содержащей 1,5% агара.

Выделение плазмидных ДНК. Выделение плазмид из *E.coli* проводили щелочным методом. Плазмиды из агробактерии выделяли по методу, разработанному в Гентском университете: после инкубирования в течение 24-48 часов при 28°C клетки лизировали с помощью проназы и гидроксида натрия. Доводили pH до 8,5 раствором трис-HCl pH 7,0, добавляли хлорид натрия до 1М, осаждали. Затем осаждали ДНК с помощью ПЭГ 6000 и проводили ультрацентрифугирование в градиенте хлористого цезия.

Молекулярное клонирование, идентификацию рекомбинантных клонов методом гибридизации *in situ* бактериальных колоний, быстрое разрушение колоний *E.coli* для определения наличия вставок в плаزمидах проводили по Маниатису Т. и др. (1984).

Обработку ДНК нуклеазой Bal31 проводили в буфере, содержащем 6 мМ трис-HCl pH 8,1, 600 мМ NaCl, 12 мМ CaCl<sub>2</sub>, 12 мМ MgCl<sub>2</sub> при 30°C. Реакцию останавливали, добавляя ЭДТА до концентрации 50 мМ, 20 мкг ТРНК и помещая пробирку в лед.

Нуклеотидную последовательность ДНК определяли по методу Максама-Гилберта (1977, 1980).

Конъюгационный перенос плазмид из *E.coli* в агробактерию проводили по методу Van Haute E. et al. (1983).

Активность неомицинофосфотрансферазы в клеточных экстрактах определяли по методу An G. et al. (1985).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Клонирование регуляторных участков гена нопалинсинтетазы.

Поскольку ген нопалинсинтетазы из Т-ДНК Ti-плазмиды агробактерии является конститутивным (он экспрессируется во всех

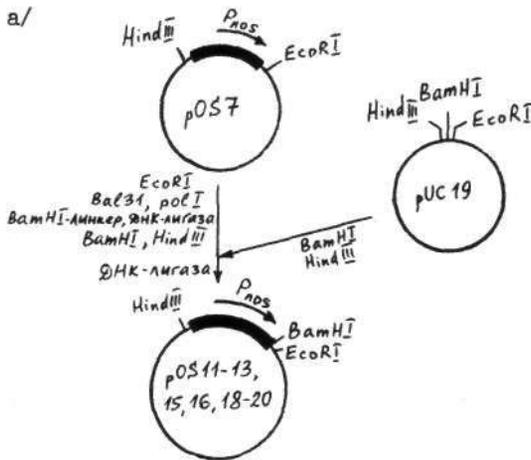
тканях растения), его регуляторные участки - промотор и терминатор - весьма удобны для создания маркерных генов растений.

На основе известной рестрикционной карты плазмиды pTic58 и локализации гена нопалинсинтетазы (Depicker A. et al., 1980, 1982) нами был получен клон, содержащий полный структурный ген в *HindIII*-фрагменте размером 3,3 тысячи пар нуклеотидов.

По данным нуклеотидной последовательности гена нопалинсинтетазы (Depicker A. et al., 1982), его промотор находится в *Sau3AI*-фрагменте размером 345 пар нуклеотидов, а терминатор (участки полиаденилирования и терминации транскрипции) - во фрагменте размером 249 пар нуклеотидов.

*Sau3AI*-фрагмент ДНК, содержащий *pos*-промотор, клонировали в *BamHI*-сайт вектора pUC19, а его ориентацию определяли путем секвенирования ДНК. Полученная плазида была обозначена pOS7 (рис.1). Поскольку клонированный фрагмент содержал, кроме промотора, первые 16 кодонов гена нопалинсинтетазы, чтобы удалить структурную часть гена и получить набор делеций в нетранслируемой 5'-последовательности, плазмиду pOS7 расщепляли рестриктазой *EcoRI*, обрабатывали нуклеазой *Bal31*, репарировали концы с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I и лигировали с *BamHI*-линкером. После расщепления рестриктазами *BamHI* и *HindIII* фрагменты ДНК соответствующего размера элюировали из 5% ПААГ и лигировали с вектором pUC19, расщепленным этими рестриктазами. Затем определяли нуклеотидную последовательность полученных делеционных вариантов *pos*-промотора со стороны *EcoRI*-сайта (рис.1).

В работе использовали два терминатор-содержащих фрагмента. Первый - *BamHI-HindIII*-фрагмент размером 1,1 тысячи пар нуклеотидов, содержащий 3'-конец гена нопалинсинтетазы (плазида



б/

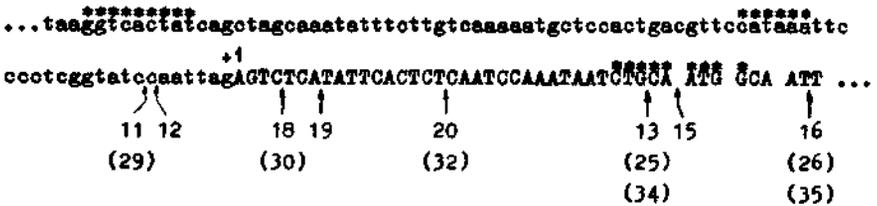


Рис.1 Конструирование плазмид, содержащих делеции в 5'-концевой части гена нопалинсинтетазы. а - схема получения делеций в плазмиде pOS7, содержащей промотор и первые 16 кодонов гена *pos*. P<sub>nos</sub> - промотор гена *pos*, стрелкой указана его ориентация; б - делеции в 5'-районе гена *pos*. Транскрибируемая последовательность изображена заглавными буквами, транслируемые кодоны - вразрядку. Стрелками обозначены левые границы делеций, цифрами - номера плазмид pOS, содержащих такой "укороченный" промотор. Ниже в скобках даны номера плазмид, содержащих соответствующий промотор и терминатор гена *pos*. Звездочками выделены нуклеотиды, необходимые для инициации транскрипции и трансляции.

pOS6); второй - *Sau3AI*-фрагмент размером 249 п.н., клонированный в векторе pUR222, а затем в pUC19 с целью создания *BamHI*-сайта перед участком терминации транскрипции (плазмида pOS28).

В плазмиды, несущие различные варианты 5'-концевой области гена нопалинсинтетазы, клонировали по *BamHI*-*EcoRI*-сайтам фрагменты ДНК, содержащие терминатор этого гена (рис.2). Плазмиды pOS25 и pOS26 имеют в своем составе "большой" терминатор-содержащий фрагмент, а остальные - "малый".

Полученные векторы экспрессии в растениях (pOS25, pOS26, pOS29, pOS30, pOS32, pOS34 и pOS35) имеют структуру "промотор-*BamHI*-терминатор", что позволяет путем клонирования в *BamHI*-сайт помещать под контроль этих регуляторных участков различные структурные гены.

Ген, клонированный в плаزمидах pOS26 и pOS35, будет находиться под полным контролем *nos*-промотора, а его трансляция будет начинаться с AUG-кодона гена *nos*; остальные плазмиды обеспечивают лишь транскрипционный контроль экспрессии клонированных генов, что позволяет проверять эффективность различных участков инициации трансляции структурных генов.

## 2. Получение гибридных генов *nos-leo*.

В качестве маркерного гена был использован ген неомицин-фосфотрансферазы *leo* из Tn5 с известной нуклеотидной последовательностью; ген был клонирован в pBR322 в лаборатории генетической инженерии растений А.Ш.Ташпулатовым, - плазмида pAT1. Структурная часть гена *leo* (около 800 п.н.) находится в *BglII*-*SmaI*-фрагменте, причем *BglII*-сайт расположен в 5'-нетранслируемой последовательности. А.Ш.Ташпулатовым был

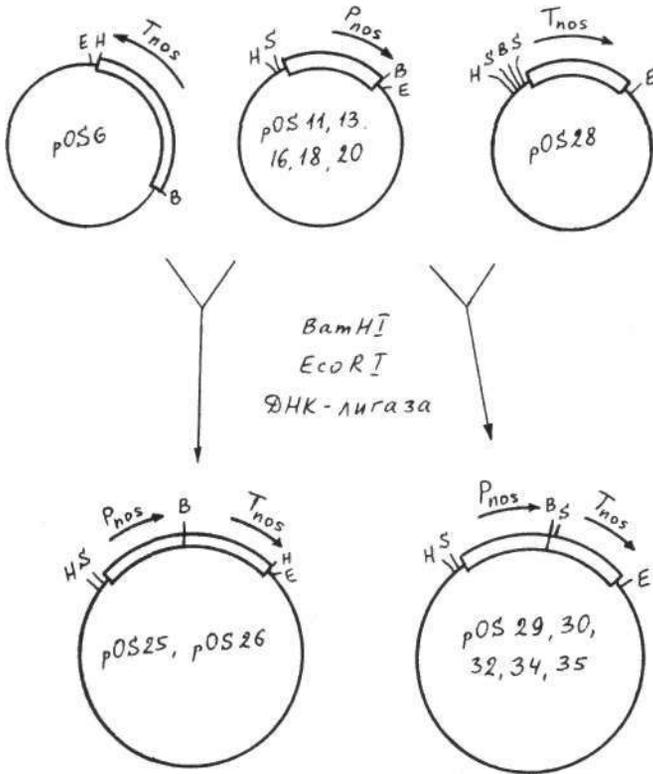


Рис.2 Схема получения векторов экспрессии, содержащих промотор и терминатор гена нопалинсинтетазы. Сайты рестриктаз обозначены следующим образом: В, *Bam*HI; Е, *Eco*RI; Н, *Hind*III; S, *Sal*I.  $P_{nos}$ ,  $T_{nos}$  - промотор и терминатор гена *nos*, стрелкой указана их ориентация.

удален промотор гена *leo* вместе с участком Шайна-Дальгарно (плазмида рАТ4), либо вместе с первыми пятью кодонами (плазмида рАТ2), вместо которых был присоединен *Bam*HI-линкер.

С целью уменьшения размера маркерного гена из незначительной 3'-концевой области был удален фрагмент величиной около 550 пар нуклеотидов. Полученная плазмида рАТ4d и плазмиды рАТ1 и рАТ2 были использованы для получения гибридных генов *pos-leo*.

В *Bam*HI-сайт плазмиды рOS26 клонировали *Bam*HI-фрагмент плазмиды рАТ2, в *Bam*HI-сайты плазмид рOS25, 29, 30, 32, 34 - *Bgl*III-*Bam*HI-фрагмент плазмиды рАТ1, а в *Bam*HI-сайты плазмид рOS25, 30 и 32 - *Bam*HI-фрагмент плазмиды рАТ4d, так чтобы трансляция гена неоминифосфотрансферазы начиналась с AUG-кодона гена *pos* (в случае плазмиды рOS26) или с его собственного AUG-кодона (рис.3). Плазмиды, в которые был клонирован *Bgl*III-*Bam*HI-фрагмент рАТ1, обозначили рOS...Neo; плазмиду рOS26, содержащую ген *leo*, также обозначили рOS26Neo; а плазмиды, в которые был клонирован *Bam*HI-фрагмент рАТ4d, обозначили рOS...Neo d. Ориентацию клонированных *Bam*HI-фрагментов определяли с помощью рестрикционного анализа.

Первичную структуру промоторных районов полученных девяти плазмид, несущих гибридные гены *pos-leo*, определяли по методу Максама-Гилберта от сайта рестриктазы *Dde*I, расположенного перед СААТ-блоком гена *pos* на расстоянии 80 нуклеотидов от стартовой точки транскрипции.

На рис.4 приведены нуклеотидные последовательности мест соединения промоторов гена *pos* и структурных областей гена *leo* в полученных гибридных генах *pos-leo*. Три из девяти полученных нами конструкций по структуре 5'-района гена анало-

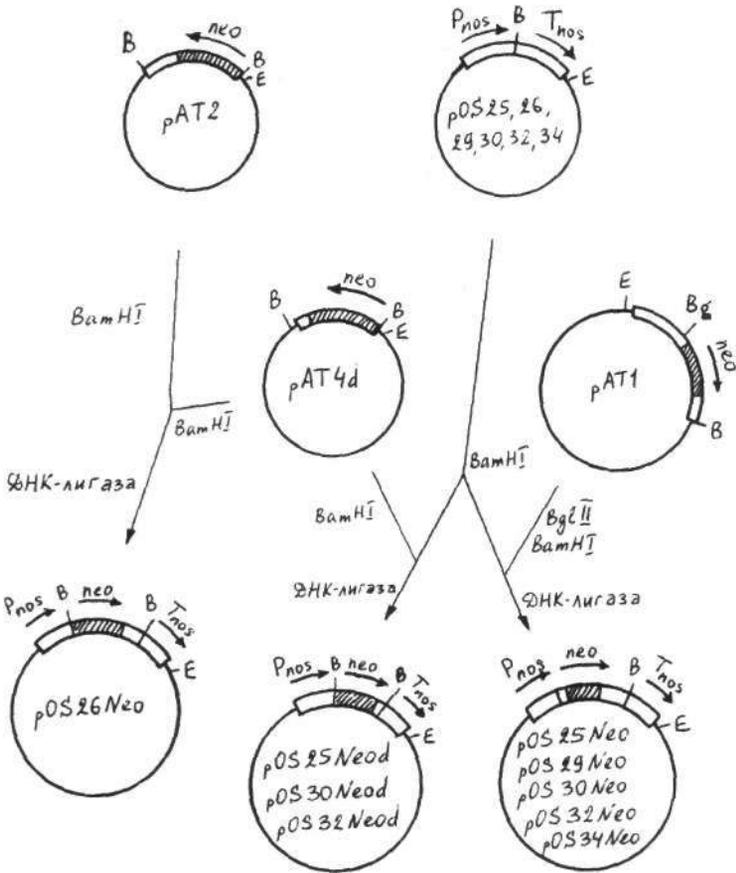


Рис.3 Схема получения гибридных генов *pos*-*neo*.

Сайты рестриктаз обозначены следующим образом: *B*, *Bam*HI; *Bg*, *Bgl*II; *E*, *Eco*RI. *P<sub>nos</sub>*, *T<sub>nos</sub>* - промотор и терминатор гена *pos*. Стрелками указаны ориентации структурных элементов гибридных генов. Расположение гена *neo* обозначено штриховкой.



гичны маркерным генам, описанным в литературе. Имеются также некоторые отличия в терминатор-содержащем фрагменте и в размере фрагмента, содержащего структурную часть гена *leo*, что обусловлено различными схемами клонирования.

В плазмиде *pOS26Neo*, как и в *pGA471*, единственным иницирующим кодоном является ATG гена *pos*, однако *pOS26Neo* содержит не 14, а 3 кодона гена *pos*, после которых через *ValNI*-линкер следует не 9-й, а 6-й кодон гена *leo*. В остальных конструкциях иницирующим кодоном является ATG гена *leo*. В ряде конструкций, как и в исходном бактериальном гене *leo*, перед иницирующим кодоном имеется дополнительный ATG-триплет, не попадающий в рамку считывания. Этот "ложный" триплет может индуцировать синтез пептида из семи аминокислот, затрудняя тем самым правильную инициацию трансляции. В плаزمидях *pOS25Neod*, *pOS30Neod* и *pOS32Neod* этот ATG-триплет удален. Судя по литературным данным, удаление этого триплета ведет к увеличению экспрессии гена (Rogers S.G. et al., 1985).

Интересно отметить, что "ложный" AUG-триплет мРНК должен быть в силу фланкирующих нуклеотидов (ACAGGAUGA) более предпочтителен, чем иницирующий кодон (UUCGGAUGA), при сравнении с предложенной консенсусной последовательностью  $CC^A/CGAUGG$  (Kozak M., 1984). И действительно, как показано в ряде работ, вектор *Bin19* (Bevan M., 1984), по сравнению с *pLGV23Neo* (Deshayes A. et al., 1985), повышает устойчивость клеток табака к канамицину лишь в 2,5 раза, в то время как вектор *pGA471* (An G. et al., 1985), где трансляция начинается с более "удобного" AUG-кодона гена *pos* (CUGGAUGG), - еще в 1,5 раза (к сожалению, в этом случае максимальная критическая концентрация антибиотика не определялась). Однако ген *pos-leo* плазмиды

pMON177, аналогичный Bin19, экспрессируется в клетках петунии в 5-6 раз сильнее, чем ген pMON129, аналогичный pLGV23Neo (Rogers S.G. et al., 1985). Такое различие в результатах трудно объяснить; по-видимому, оно всё же не связано с тем, что использован другой растительный объект. Следует указать, что в описанных векторах разница в расстоянии от AUG-кодона до 5'-конца мРНК составляла от 12 до 35 нуклеотидов (рис.4,6), что может, если исходить из модифицированной "сканирующей модели" инициации трансляции (Kozak M., 1981), влиять на эффективность трансляции.

Полученные в настоящей работе плазмиды дадут возможность оценить *in vivo* эффект как расстояния от AUG-кодона до 5'-конца мРНК (pOS29Neo-pOS30Neo-pOS32Neo-pOS25Neo; pOS30Neod-pOS32Neod-pOS25Neod), так и нуклеотидного окружения AUG-кодона (pOS26Neo-pOS32Neod), а также влияние дополнительного ложного AUG-триплета (pOS26Neo-pOS30Neo-pOS32Neod-pOS29Neo) при условии равноудаленности AUG-кодона от 5'-конца мРНК. Интересными в этом отношении могут быть опыты по электропорации протопластов препаратами плазмидных ДНК с измерением транзитной экспрессии.

### 3. Перенос гибридных генов в агробактериальный вектор pGV3850.

Полученные маркерные гены были перенесены в рекомбинантный вектор pGV3850 (Zambryski P. et al., 1983), способный осуществлять перенос Т-ДНК в растительный геном, методом конъюгации с использованием плазмид-помощников. Так как плазмиды на основе ColE1-репликона не способны реплицироваться в агробактерии, то при соответствующей селекции будут отбираться только те клетки, в которых произошла интеграция перенесенной плазми-

ды в pGV3850.

Частота переноса маркерных генов составляла около  $10^{-9}$ , или почти в 50 раз ниже, чем частота переноса контрольной плазмиды pAT1. Это объясняется тем, что pAT1 получена на основе pBR322 и имеет *boи*-участок, играющий важную роль в конъюгационном переносе, а маркерные гены были клонированы в векторе pUC19, в котором *boи*-участок инактивирован. Однако это не представляет трудностей при отборе клеток агробактерий, содержащих коинтеграта pGV3850 и полученных нами плазмид.

Отбор коинтегратов проводили на среде, содержащей рифампицин, к которому устойчива агробактерия, и 20 мг/л канамицина. Клетки агробактерии, несущие различные маркерные гены или контрольную плазмиду pAT1 в составе pGV3850, были одинаково устойчивы к 200 мг/л канамицина, но на концентрации 500 мг/л их рост немного снижался. Это согласуется с данными о том, что в агробактерии в малом количестве обнаруживается транскрипт гена *nos* (Janssens A. et al., 1984).

Полученные штаммы агробактерии могут быть использованы для заражения листовых пластинок (дисков) или протопластов растений с целью получения трансформированных растений.

#### 4. Экспрессия генов *nos-neo* в *E.coli*.

Эукариотический промотор в принципе не должен работать в бактериях. Однако в связи с высказанным предположением, что *nos*-промотор работает в *E.coli* (Herrera-Estrella L. et al., 1983), нами была проверена экспрессия полученных конструкций в клетках *E.coli*. При этом мы считали, что уровень устойчивости клеток к канамицину в определенном диапазоне концентраций антибиотика пропорционален активности фермента в клеточном экстракте, что было подтверждено экспериментально. Сравнивая

уровни устойчивости к канамицину клеток, трансформированных разными конструкциями генов, можно сделать вывод и об уровнях транскрипции и трансляции генов (конечно, это будут качественные оценки).

Устойчивость клеток к канамицину определяли путем посева ночных культур в разведении 1:100, по одной капле (около  $10^4$  клеток) на чашки с разными концентрациями антибиотика и отмечая наличие или отсутствие роста.

Как оказалось, клетки *E.coli*, несущие маркерные гены, проявляли разную степень устойчивости к канамицину (табл.1).

Таблица 1  
Устойчивость к канамицину клеток *E.coli*,  
несущих маркерные гены *pos-neo*

Плазмиды	Структура гена в районе ATG-кодона		концентрация канамицина, мг/л	
	количество делетированных нуклеотидов в <i>pos</i> -промоторе, по сравнению с плазмидой pOS26	последовательность Шайна-Дальгарно	позволяющая клеткам расти	подавляющая рост клеток
-	-	-	-	2
pOS26Neo	0	нет	-	2
pOS25Neod	10	нет	2	5
pOS32Neod	26	нет	2	5
pOS30Neod	39	нет	5	10
pOS25Neo	10	есть	10	25
pOS34Neo	10	есть	10	25
pLGV23Neo	10	есть	75	100
pOS32Neo	26	есть	100-150	200
pOS30Neo	39	есть	50	75
pOS29Neo	50	есть		
pAT1	-	есть	500	

Если ген содержал последовательность Шайна-Дальгарно, то устойчивость клеток в целой была выше; для обоих типов плазмид (Neo и Neo<sup>d</sup>) при увеличении размера делеции в *pos*-промоторе, то есть при "перемещении" ATG-кодона к точке инициации транскрипции, устойчивость клеток к канамицину возрастала, за исключением плазмиды pOS29Neo. Устойчивость *E.coli*, несущей pLGV23Neo, соответствовала литературным данным (Herrera-Estrella L. et al., 1983). Плазмида pOS26Neo не придавала клеткам *E.coli* устойчивости, что противоречит данным (An G. et al., 1985), согласно которым вектор pGA471 (рис.4,6) придает *E.coli* устойчивость к 10 мг/л канамицина.

Причина разной степени устойчивости клеток *E.coli*, несущих маркерные гены, к канамицину, возможно, заключается в том, что при создании генов *pos-leo* в месте соединения промотора *pos* и гена *leo* возникает бактериальный промотор, у которого роль блока Прибнова может играть последовательность TCTGAT, находящаяся в 5'-нетранслируемой области гена *leo*, и если в подсоединяемом *pos*-промоторе будет содержаться более-менее функциональный -35-й район гомологии, то образуется "искусственный" промотор.

Полученные данные по устойчивости к канамицину клеток *E.coli*, несущих плазмиды pOS26Neo, pOS25Neo, pOS32Neo и pOS30Neo, доказывают, что в кишечной палочке функционирует не *pos*-промотор, как предполагалось ранее, а другой бактериальный промотор, возникший при конструировании гибридных генов. Как отмечалось, клетки агробактерии, несущие маркерные гены, устойчивы к высоким концентрациям канамицина в одинаковой степени. Это указывает на то, что сигналы регуляции экспрессии генов у *E.coli* и агробактерии, как отмечалось в обзо-

ре Пирузян Э.С. и Андрианова В.М. (1985), различаются.

#### ВЫВОДЫ

1. Клонированы регуляторные участки (промотор, терминатор) гена нопалинсинтетазы, работающего в растениях; получен набор делеций в районе ATG-кодона гена.

2. Созданы векторные молекулы, содержащие "кассеты экспрессии", обеспечивающие работу в растениях генов, клонированных в Val<sup>NI</sup>-сайт.

3. Сконструированы гибридные маркерные гены *pos-leo* для растений, содержащие различные нуклеотидные последовательности в области инициации трансляции. Анализ работы этих конструкций в растительных клетках даст возможность оценить влияние структуры мРНК в районе AUG-кодона на экспрессию гена.

4. Полученные маркерные гены с разной эффективностью экспрессируются в *E.coli*; разница в их экспрессии в агробактерии не обнаружена. Сделан вывод о различии системы регуляции экспрессии у *E.coli* и агробактерии.

5. Маркерные гены перенесены в агробактерию и включены в состав рекомбинантного вектора pGV3850. Они могут быть использованы для заражения листовых пластинок (дисков) или протопластов.

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Zakharyev V.M., Muradov A.Z., Smirnov O.Yu., Tashpulatov A.S., Skryabin K.G., Bayev A.A. Construction of the intermediate vectors for expression in higher plants. - Abstracts of the first international congress of plant molecular biology, The University of Georgia, USA, 1985, p.114.

2. Захарьев В.М., Мурадов А.З., Смирнов О.Ю., Ташпулатов А.Ш., Федорова О.Е., Скрыбин К.Г., Баев А.А. Создание промежуточных векторов экспрессии для растений. У Всесоюзный биохимический съезд. Тезисы стендовых сообщений, М.: Наука, 1986, Т.2, с.430.
3. Смирнов О.Ю., Ташпулатов А.Ш., Захарьев В.М., Скрыбин К.Г. Конструирование гибридов NOS-NPT - маркерных генов растений. - Биоорганическая химия, 1987, 13, №8, с.1142-1145.

---

В печать 9.02.88 г.

Формат 60x84/16

Печ. л. 1,25. Усл.-печ. л. 1,16. Уч.-изд. л. 0,7. Тир. 100.

Изд. № 106

---

Заказ № 76-487  
отпечатано в ПОРМ  
на 20 листах в 100 экземплярах