



УДК 577.152.315'13 : 577.215

© 1990 г.

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ α -СУБЪЕДИНИЦЫ
 Na^+, K^+ -АТФ-азы В МОЗГЕ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ
АНАЛИЗА κ ДНК-БАНКОВ

Макаревич О. И., Гришин А. В., Юстина М. Б.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

Проведен скрининг библиотек κ ДНК из мозга человека с помощью радиоактивно меченных фрагментов ДНК, представляющих собой участки структурного гена α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы из почек свиньи. Результаты скрининга показали наличие в мозге человека двух высокомолекулярных мРНК, кодирующих α - и α III-изоформы каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы.

Интегральный мембранный фермент Na^+, K^+ -АТФ-аза осуществляет активный транспорт ионов Na^+ и K^+ через клеточные мембраны. Нами были определены полные первичные структуры κ ДНК обеих субъединиц фермента (α и β) из почек свиньи [1, 2]. В ходе исследования структуры локуса, кодирующего фермент в геноме человека, мы обнаружили наличие не менее пяти генов, кодирующих белки, гомологичные его каталитической субъединице [3]. В связи с этим возник вопрос о функциональном значении каждого из этих генов и об их тканеспецифической экспрессии.

Для изучения экспрессии того или иного гена обычно используют два различных подхода: 1) метод гибридизации иммобилизованной РНК, выделенной из различных тканей, с клонированным фрагментом структурного гена. Этот метод является аналитическим и позволяет качественно и количественно оценить уровень экспрессии интересующего нас гена; 2) метод, основанный на получении и анализе банков κ ДНК. Он более трудоемок по сравнению с первым, однако его использование позволяет не только убедиться в факте транскрипции данного гена, но и получить в клонированном виде структурный ген или его фрагменты. В данной работе для решения поставленной задачи был использован второй подход.

Синтез первой цепи κ ДНК проводили на матрице суммарной фракции poly(A)-содержащей мРНК из мозга человека с использованием в качестве затравки $(dT)_{12-18}$ и «рассеянной» затравки [4]. Синтез второй цепи κ ДНК проводили с помощью ДНК-полимеразы I и РНКазы H по методу [5]. Полученную таким образом двухцепочечную ДНК метилировали с помощью *EcoRI*-метилазы, лигировали с *EcoRI*-линкерами и обрабатывали рестриктазой *EcoRI*. Перед клонированием κ ДНК фракционировали по длине гель-фильтрацией на биогеле А50m для обогащения клонируемой ДНК фрагментами большей длины. Далее κ ДНК клонировали в составе вектора λ gt10 по *EcoRI*-сайту. Эффективность клонирования составила 10^7 БОЕ*/мкг κ ДНК. В результате была получена фаговая библиотека, содержащая $2 \cdot 10^7$ клонов.

Независимо часть κ ДНК клонировали в плазмиду pBR322, предварительно расщепленную *PstI*, с использованием коннекторного метода [4]. При трансформации клеток *E. coli* МН1 [6] рекомбинантной ДНК выход трансформантов составил 10^2 — 10^3 клонов на 1 нг вставки, а общий размер библиотеки — $5 \cdot 10^6$ клонов.

Скрининг библиотек κ ДНК проводили гибридизацией с радиоактив-

* БОЕ — бляшкообразующие единицы.

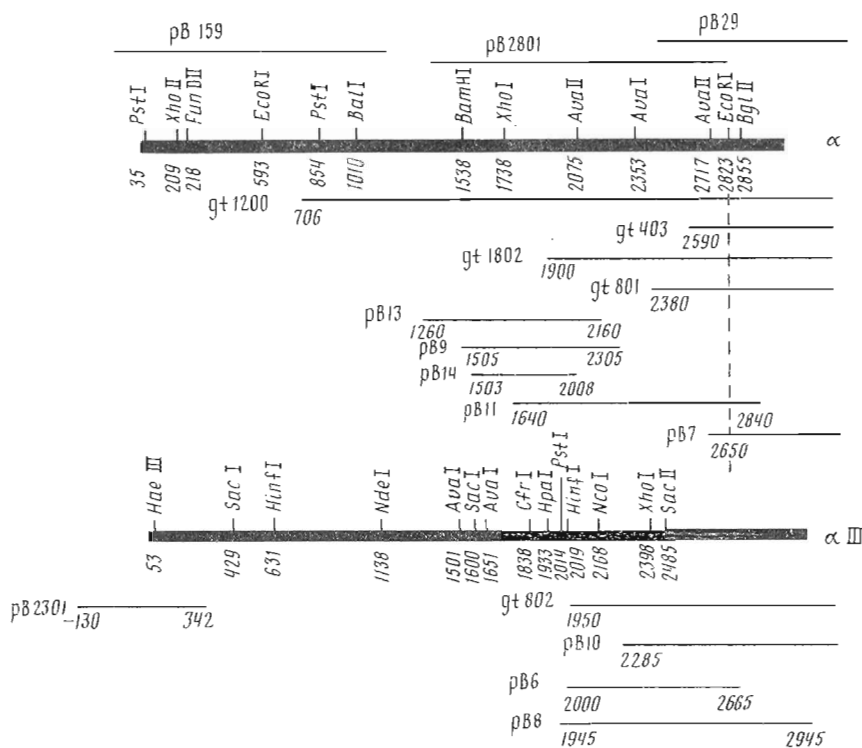


Рис. 1. Схема строения ДНК рекомбинантных клонов, полученных в результате скрининга мозговых человеческих банков на участки структурного гена α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы свиньи. Цифрами показаны положения сайтов рестрикции и нуклеотидные остатки начала и конца клонированных последовательностей; их нумерация — как в работе [7]

но мечеными пробами — плазмидными ДНК, несущими участки структурного гена α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы из почек свиньи, которые кодируют N-концевую (pB159), серединную (pB2801) и C-концевую (pB29) области молекулы белка. В результате скрининга фаговой библиотеки на «С-концевой» и «серединный» зонды было получено 69 положительных сигналов гибридизации. При гибридизации на «N-концевой» зонд не было найдено ни одного положительного клона, что можно объяснить недостаточно большим размером транскриптов, которые получают при синтезе кДНК с помощью обратной транскриптазы. До индивидуального состояния было доведено пять клонов (рис. 1), причем четыре из них (gt403, gt1802, gt801, gt802) гибридизовались только на «С-концевой» зонд, а один (gt1200) — на «серединный» и «С-концевой» зонды.

В результате скрининга плазмидной библиотеки на «серединный» зонд также был идентифицирован ряд положительных клонов: pB13, pB9, pB14, pB7, pB11, pB10, pB6 и pB8.

Рестриктивный анализ положительных клонов, гибридизующихся с С-концевым зондом, показал, что они распадаются на две группы. Первую группу составляют клоны, имеющие *EcoRI*-сайт в 3'-концевой области структурного гена (клоны gt1200, gt403, gt1802, gt801, pB7, pB11). От этой группы отличаются клоны gt802, pB10, pB6 и pB8, не имеющие *EcoRI*-сайта в соответствующей области.

Определение первичной структуры фрагментов кДНК рекомбинантных клонов методом Сэнгера показало, что нуклеотидная последовательность вставок из клонов первой группы gt403, gt801, gt1200, pB7, pB11, а также pB13, pB9 и pB14 полностью совпадает с опубликованной последовательностью структурного гена α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы из клеток человека линии HeLa [7]. Первичная структура вставок из клонов gt802, pB10, pB6 и pB8 была гомологична, но существенно отличалась от структуры предыдущих клонов. К этому моменту в нашей лабо-

CGGACGGACGGACGGCCACCTACCGACGGCGGGCTGCAGAGGTC⁶CCAGCCCAAGCCCTGAGCCTGAGCCCCCGAGGTC⁶CCCCCGCCCCGGC

1-51 CCGCCTGGCTCTCGCCGGAGCCGCAAG ATG GGG GAC AAG AAA GAT GAC AAG GAC TCA CCC AAG AAC AAC AAG GGC AAG
Met-Gly-Asp-Lys-Lys-Asp-Asp-Lys-Asp-Lys-Asp-Lys-Asn-Lys-Lys-Gly-Lys-

52-126 GAG CGC CGG GAC CTG GAT GAC CTC AAG AAG GAG GTG GCT ATG ACA GAG CAC AAG ATG TCA GTG GAA GAG GTC TGC
Glu-Arg-Arg-Asp-Leu-Asp-Leu-Lys-Lys-Glu-Val-Ala-Met-Thr-Glu-His-Lys-Met-Ser-Val-Glu-Glu-Val-Cys-

127-201 CGG AAA TAC AAC ACA CAC TGT GTG CAG GGT TTG ACC CAC AGC AAA GCC CAG GAG ATC CTG GCC CGG GAT GGG CCT
Arg-Lys-Tyr-Asn-Thr-Asp-Cys-Val-Gln-Gly-Leu-Thr-His-Ser-Lys-Ala-Gln-Ile-Leu-Ala-Arg-Asp-Gly-Pro-

202-276 AAC GCA CTC ACC CCA CGG CCT ACC ACC CCA GAG TGG GTC AAG TTT TCC CGG CAG CTC TTC CGG GGC TTC TCC ATC
Asn-Ala-Leu-Thr-Pro-Pro-Thr-Thr-Pro-Glu-Trp-Val-Lys-Phe-Cys-Arg-Gln-Leu-Phe-Gly-Gly-Phe-Ser-Ile-

277-342 CTG CTG TGG ATC GGG GCT ATC CTC TGC TCC CTG GCC TAC GGT ATC CAG GCG ACC GAG GAC GAC.....
Leu-Leu-Trp-Ile-Gly-Ala-Ile-Leu-Cys-Phe-Leu-Ala-Tyr-Gly-Ile-Gln-Ala-Gly-Thr-Glu-Asp-Asp-

.....

1945-2019 GAT GCC AAG GCC TGC CTG ATC CAC GGC ACC GAC CTC AAG GAC TTC ACC TCC GAC CAA ATC GAC GAG ATC CTG CAG
Asp-Ala-Lys-Ala-Cys-Val-Ile-His-Gly-Thr-Asp-Leu-Lys-Asp-Phe-Thr-Ser-Glu-Gln-Ile-Asp-Glu-Ile-Leu-Gln-

2020-2094 AAT CAC ACC GAG ATC CTC TTC GCC CGC ACA TCC CCC CAG CAG AAG CTC ATC ATT GTG GAG GGC TST CAG ACA CAG
Asn-His-Thr-Glu-Ile-Val-Phe-Ala-Arg-Thr-Ser-Pro-Gln-Gln-Lys-Leu-Ile-Val-Glu-Gly-Cys-Gln-Arg-Gln-

2095-2169 GGT GCA ATT GTG CCT GTG ACC GGG GAT GGT GTG AAC GAC TCC CCC GCT CTG AAG AAG GCC GAC ATT GGG GTG GCC
Gly-Ala-Ile-Val-Ala-Val-Thr-Gly-Asp-Gly-Val-Asn-Asp-Ser-Pro-Ala-Leu-Lys-Lys-Ala-Asp-Ile-Gly-Val-Ala-

2170-2244 ATG GGC ATC CCT GGC TCT GAC GTC TCC AAG CAG GCA GCT GAC ATG ATC CTG CTG GAC AAC TTT GCC TCC ATC
Met-Gly-Ile-Ala-Gly-Ser-Asp-Val-Ser-Lys-Gln-Ala-Ala-Asp-Met-Ile-Leu-Leu-Asp-Asp-Asn-Phe-Ala-Ser-Ile-

2245-2319 GTC ACA GGG GTG GAC GAG GCC CGC CTG ATC TTC GAC AAC CTA AAG AAG TCC ATT GCC TAC ACC CTG ACC AGC AAT
Val-Thr-Gly-Val-Glu-Glu-Gly-Arg-Leu-Ile-Phe-Asp-Asn-Leu-Lys-Lys-Ser-Ile-Ala-Tyr-Thr-Leu-Thr-Ser-Asn-

2320-2394 ATC CGG GAG ATC ACC CCC TTC CTG CTG TTC ATC ATG GCC AAC ATC CCG CTG CCC CTG GGC ACC ATC ACC ATC CTC
Ile-Pro-Glu-Ile-Thr-Pro-Phe-Leu-Leu-Phe-Ile-Met-Ala-Asn-Ile-Pro-Leu-Pro-Leu-Gly-Thr-Ile-Thr-Ile-Leu-

2395-2469 TGC ATC GAT CTG GGC ACT GAC ATG CTC CCT GGC ATC TCA CTG GCG TAC GAG GCT GCC GAA AGC GAC ATC ATG AAG
Cys-Ile-Asp-Leu-Gly-Thr-Asp-Met-Val-Pro-Ala-Ile-Ser-Leu-Ala-Tyr-Glu-Ala-Ala-Glu-Ser-Asp-Ile-Met-Lys-

2470-2544 AGA CAG CCC AGG AAC CCG CGG ACG GAC AAA TTG GTC AAT GAG ACA CTC ATC ACC ATG GCC TAC GGG CAG AAT GGA
Arg-Gln-Pro-Arg-Asn-Pro-Arg-Thr-Asp-Lys-Leu-Val-Asn-Glu-Arg-Leu-Ile-Ser-Met-Ala-Tyr-Gly-Gln-Ile-Gly-

2545-2619 ATG ATC CAG GCT CTC GGT GGC TTC TCT TAC TTT GTG ATC CTG GCA GAA AAT GGC TTC TTG CCC GGC AAC CTG Met-Ile-Gln-Ala-Leu-Gly-Gly-Phe-Phe-Ser-Tyr-Phe-Val-Ile-Leu-Ala-Glu-Asn-Gly-Phe-Leu-Pro-Gly-Asn-Leu-

2620-2694 CTG GGC ATC CGG CTG AAC TGG GAT GAC CGC ACC GTC AAT GAC CTG GAA GAC AGT TAC GGG CAG CAG TGG ACA TAC Val-Gly-Ile-Arg-Leu-Asn-Trp-Asp-Arg-Thr-Val-Asn-Asp-Leu-Glu-Asp-Ser-Tyr-Gly-Gln-Trp-Thr-Tyr-

2695-2769 GAG CAG AGG AAG GTG GAG TTC ACC TGC CAC ACG GCC TTC TTT GTG AGC ATC GTT GTC GTC CAG TGG GCC GAT Glu-Gln-Arg-Lys-Val-Val-Glu-Phe-Thr-Cys-His-Thr-Ala-Phe-Val-Ser-Ile-Val-Val-Gln-Trp-Ala-Asp-

2770-2844 CTG ATC ATC TGC AAG ACC CGG AGG AAC TCG GTC TTC CAG CAG GGC ATG AAG AAC AAG ATC CTG ATC TTC GGG CTG Leu-Ile-Ile-Cys-Lys-Thr-Arg-Arg-Asn-Ser-Val-Phe-Gln-Gln-Gly-Met-Lys-Asn-Lys-Ile-Leu-Ile-Phe-Gly-Leu-

2845-2919 TTT GAG GAG ACG GCC CTG GCT GCC TTC TCC TAC TGC CCC GGA ATG GAC GTG GCC CTG CGC ATG TAC CCT CTG Phe-Glu-Glu-Thr-Ala-Leu-Ala-Ala-Phe-Leu-Ser-Tyr-Cys-Pro-Gly-Met-Asp-Val-Ala-Leu-Arg-Met-Tyr-Pro-Leu-

2920-2994 AAG CCC AGC TGG TGG TTC TGT GCC TTC CCC TAC AGT TTC CTC ATC TTC GAC GAA ATC CGC AAA CTC ATC Lys-Pro-Ser-Trp-Trp-Phe-Phe-Cys-Ala-Phe-Pro-Tyr-Ser-Phe-Leu-Ile-Phe-Val-Tyr-Asp-Glu-Ile-Arg-Lys-Leu-Ile-

2995-3039 CTG CGC AGG AAC CCA GGG GGT TGG GTG GAG AAG GAA ACC TAC TAC TGA CCTCAGCCCCACACATCGGCCATCTTCCCCGTC Leu-Arg-Arg-Asn-Pro-Gly-Gly-Trp-Val-Glu-Lys-Glu-Thr-Tyr-Tyr TER

CGCAGGCCAGGACCGCCCTGTCACTCCCCCAATTGTATCTGGGGGAGAGACCCCTCTCTCTCTGGCCSACCTTGGCCCCACCCCTCCACT

ATCTCCTGCCCCGCCSACCTGTGGTGGCTTCTCTCCCTGCCCCAAACCTCTCTCTCTTTTCTGTGTGCTCTCTCCCTCTCTCACCCTCT

ATCCATTCCTCCCGCCCCAGCCSACCTCCCTGGGCTCTTTTTTAACTCCSCTTCAUGCCCCGGTGTGATGCCATCTCTGGTCTGGACAATATCAAAATAT

CACTGG

Рис. 2. 3'- и 5'-Концевые нуклеотидные последовательности кДНК и соответствующая аминокислотная последовательность α III-изоформы катали-
ческой субъединицы Na⁺, K⁺-АТР-азы. Слева --- нумерация нуклеотидов согласно [10].

ратории было обнаружено существование семейства генов α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы в геноме человека и была определена часть структуры одного из них [8]. Сравнение первичной структуры вставок из клонов gt802, pB10, pB6 и pB8 показало, что она полностью совпадает со структурой экзонов из клонированного нами геномного гена и на 90% гомологична последовательности α -субъединицы из клеток HeLa (рис. 2).

Одновременно с нашей работой были опубликованы результаты, демонстрирующие наличие трех различных типов мРНК, кодирующих изоформы α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы из мозга крысы [9]. Согласно номенклатуре, предложенной в этой работе, и на основании высокой гомологии нуклеотидных последовательностей мРНК крысы и человека можно заключить, что в кДНК-банках из мозга человека обнаружены кДНК, соответствующие α -форме (клоны gt1802, gt403, gt801, gt1210, pB13, pB9, pB14, pB11 и pB7) и α III-форме (клоны gt802, pB10, pB6 и pB8) каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы. (На основании данных о нуклеотидной последовательности экзонной части гена α III [10] был синтезирован олигонуклеотидный зонд с координатами 7—31, который использовали для скрининга плазмидной библиотеки с целью поиска клонов из 5'-концевой области соответствующей кДНК. В результате был идентифицирован клон pB2301.)

Полученные данные свидетельствуют о том, что гены, кодирующие α - и α III-изоформы каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы, транскрибируются в мозге человека. К сожалению, нам пока не удалось обнаружить клоны, соответствующие α^+ -изоформе, хотя экспрессия аналогичного гена была обнаружена в мозге крысы [9]. Следует особо подчеркнуть, что библиотека кДНК была получена нами из мозга больного пожилого возраста, скончавшегося после продолжительного лечения. Эксперименты, как наши [11], так и других лабораторий [12], свидетельствуют о том, что экспрессия различных изоформ каталитической субъединицы меняется в ходе индивидуального развития. Кажется вероятным, что в препаратах мозга, имевшихся в нашем распоряжении, в большом количестве экспрессировались α - и α III-изоформы, а α^+ -изоформа экспрессировалась либо в меньших количествах, либо не экспрессировалась совсем. Нельзя исключить также и возможность того, что структурный ген α^+ -изоформы клопируется хуже остальных генов. Эта возможность, однако, кажется нам менее вероятной.

В настоящий момент для поиска структурного гена α^+ -изоформы каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы человека анализируется банк из эмбрионального мозга.

Экспериментальная часть

В работе использовались: трис-гидроксиметиламинометан и ацетат натрия (Merck, ФРГ); сахароза, EDTA, MgCl_2 , β -меркаптоэтанол (Sigma, США); додецилсульфат натрия, Bio-Gel A50 (Bio Rad, США); ванадилрибонуклеозидные комплексы (BRL, США); oligo(dT)-целлюлоза, тип 7, (dT)₁₂₋₁₈ и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (P-L, США); тРНК (Boehringer, ФРГ); LiCl, NaCl, KCl и цитрат натрия квалификации ос. ч. (Солюз-реактив); pBR322, расщепленная *Pst*I, с oligo(dG)-концами (NEN, США); ДНК векторов λ gt10 (Amersham, Англия), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (уд. акт. 5000 Ки/ммоль), $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$ (Amersham, Англия).

Обратная транскриптаза (КФ 2.7.7.7) с активностью 15 ед. акт./мкл в 50% глицирине была выделена А. В. Честухиным по методу [13]; РНКазы H (КФ 3.1.26.4) любезно предоставлена Н. В. Чичиковой (межфакультетская лаборатория МГУ); ДНК-полимераза I (КФ 2.7.7.7), терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза — препараты фирмы Amersham (США).

Суммарную РНК из мозга человека выделяли по методу [14], выход составлял 0,5—1 мг на 1 г ткани. Poly(A⁺)-фракцию мРНК получали в результате двух циклов хроматографии на oligo(dT)-целлюлозе [15] с выходом 1—2%.

Синтез и клонирование кДНК. Одноцепочечную кДНК синтезировали по методу [4]. Синтез второй цепи кДНК с помощью ДНК-полимеразы I и РНКазы H проводили по методу [5].

Клонирование двухцепочечной кДНК в составе вектора λ gt10 осуществляли как описано в работе [16]. Первичный высев банка проводили на чашки диаметром 100 мм с плотностью 50 000 БОЕ.

Синтез oligo(dC)-последовательностей на 3'-концах кДНК, отжиг с расщепленной *Pst*I ДНК плазмиды pBR322 с oligo(dG)-концами и клонирование в *E. coli* МН I [6] осуществляли по стандартным методикам [4, 5].

Предгибридизацию на фильтрах выполняли в течение 1,5–2 ч в буфере, содержащем 5-кратный SSPE (0,9 М NaCl, 50 мМ NaH₂PO₄ (рН 7,4), 5 мМ EDTA, рН 7,4) [4], 5-кратный раствор Денхардта [4], 0,5% додецилсульфат натрия, 250 мкг/мл дрожжевой РНК, 0,1% пирофосфат натрия. Гибридизацию проводили в том же буфере, содержащем радиоактивную пробу (0,4 мкКи/мл; 0,2–0,8 мкКи на фильтр). Радиоактивное мечение фрагментов ДНК осуществляли методом ник-трансляции [4] с использованием $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$ (3000 Ки/ммоль, Amersham), удельная активность пробы составляла 40–80 мкКи/мкг ДНК.

Выделение фаговой и плазмидной ДНК, а также ее анализ методом блот-гибридизации проводили в соответствии с [4].

Нуклеотидную последовательность определяли по модифицированному методу Сэнгера [17], в векторе M13mp18.

Авторы искренне признательны Е. Д. Свердлову, Н. Н. Модянову, Г. С. Монастырской, Н. Е. Броуде за постоянное внимание и ценные советы, Н. С. Акопьянц за предоставление препаратов очищенной мРНК и Р. Л. Алликметсу за помощь при клонировании в вектор λ gt10.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Овчинников Ю. А., Арсенин С. Г., Броуде Н. Е., Петрухин К. Е., Алданова Н. А., Арзамасова Н. М., Аристархова Е. А., Мелков А. М., Гришин А. В., Смирнов Ю. В., Гурьев С. О., Монастырская Г. С., Модянов Н. Н. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. № 6. С. 1490–1495.
2. Овчинников Ю. А., Броуде Н. Е., Петрухин К. Е., Гришин А. В., Кияткин Н. И., Арзамасова Н. М., Гевондян Н. М., Чертова Е. Н., Мелков А. М., Смирнов Ю. В., Малышев И. В., Монастырская Г. С., Модянов Н. Н. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 287. № 6. С. 1491–1496.
3. Sverdlov E. D., Monastyrskaya G. S., Broude N. E., Ushkaryov Yu. A., Allikmets R. L., Melkov A. M., Grishin A. V., Smirnov Yu. V., Malyshev I. V., Dulubova I. E., Petrukhin K. E., Kiyatkin N. I., Kostina M. B., Sverdlov V. E., Modyanov N. N., Ovchinnikov Yu. A. // FEBS Lett. 1987. V. 217. № 2. P. 275–278.
4. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
5. Gubler U., Hoffman B. J. // Gene. 1983. V. 25. № 2/3. P. 263–269.
6. Casaban M. J., Cohen S. N. // J. Mol. Biol. 1980. V. 138. № 2. P. 179–207.
7. Kawakami K., Nojima H., Ohta T., Nagano K. // J. Biochem. 1986. V. 100. № 2. С. 389–397.
8. Свердлов Е. Д., Монастырская Г. С., Броуде Н. Е., Ушкарев Ю. А., Мелков А. М., Смирнов Ю. В., Малышев И. В., Алликметс Р. Л., Костина М. Б., Дулубова И. Е., Кияткин Н. И., Гришин А. В., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 297. № 6. С. 1488–1494.
9. Shull G. E., Greeb J., Lingrel J. B. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 25. P. 8125–8132.
10. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Broude N. E., Ushkaryov Yu. A., Melkov A. M., Smirnov Yu. V., Malyshev I. V., Allikmets R. L., Kostina M. B., Dulubova I. E., Kiyatkin N. I., Grishin A. V., Modyanov N. N., Sverdlov E. D. // FEBS Lett. 1988. V. 233. № 1. P. 87–94.
11. Свердлов Е. Д., Петрухин К. Е., Акопьянц Н. С., Броуде Н. Е., Монастырская Г. С., Гришин А. В., Свердлов В. Е., Модянов Н. Н. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 298. № 1. С. 236–239.
12. Herrera V. L. M., Chobanian A. V., Ruiz Orazó N. // Science. 1988. V. 4862. P. 221–223.
13. Meyers Y. C., Kamizer F., Kacian O. L., Flood M., Spiegelman S. // Anal. Biochem. 1981. V. 101. № 1. P. 88–96.
14. Feramisco J. R., Heljaman D. M., Smart J. E., Burr ridge K., Thomas G. P. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 18. P. 11024–11031.

15. Aviv H., Leder P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 6. P. 1408—1411.
16. DNA Cloning / Ed. Glover D. M. Oxford: IRL Press, 1984. V. 1. P. 49—78.
17. McGraw R. A. // Anal. Biochem. 1984. V. 143. № 2. P. 298—303.

Поступила в редакцию
18.IV.1989

После доработки
3.VII.1989

**STUDY OF EXPRESSION OF Na⁺,K⁺-ATPase α -SUBUNIT GENES
IN HUMAN BRAIN BY THE ANALYSIS OF cDNA LIBRARIES**

МАКАРЕВИЧ О. И., ГРИШИН А. В., КОСТИНА М. В.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Human brain cDNA libraries were screened with cDNA inserts corresponding to the mRNA for the Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit from pig kidney. The results obtained demonstrate the existence of two highly homologous mRNAs encoding the α - and α III-isoforms of the Na⁺,K⁺-ATPase catalytic subunit.