



УДК 577.143.7:577.243.7:577.452.277'445:577.315'445

**КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ ФАГОВОЙ ДНК  
С СИНТЕТИЧЕСКИМИ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДАМИ  
И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСОВ С ДНК-ПОЛИМЕРАЗой  
И ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ РЕСТРИКЦИИ\****Титеева Г. Р., Виноградов С. В., Берлин Ю. А.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Рассмотрено влияние температуры, ионной силы, длины и молярного избытка олигонуклеотида и вторичной структуры ОЦ ДНК на ее гибридизацию с олигонуклеотидами. Обнаружена возможность ДНК-полимеразной достройки составного праймера, образуемого двумя стыкующимися фрагментами, которые по отдельности не достраиваются. Изучено взаимодействие эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Msp*I с комплементарным комплексом ОЦ ДНК – олигонуклеотид и показана возможность избирательного *Bam*HI-расщепления ДНК в составе такого комплекса.

Дуплексы, включающие одноцепочечную нуклеиновую кислоту и комплементарный ей (полностью или частично) олигонуклеотид, находят широкое применение для направленного мутагенеза и коррекций мутаций, выяснения первичной структуры ДНК, получения  $\kappa$ ДНК [1–10]. Нас интересовала возможность использования таких дуплексов для изучения механизма действия эндонуклеаз рестрикции и для направленной фрагментации одноцепочечной ДНК с помощью этих ферментов. Сведения о физико-химических свойствах подобных дуплексов, в частности об их стабильности, довольно скудны, а об использовании эндонуклеаз рестрикции для фрагментации одноцепочечных ДНК в таких комплексах до последнего времени не было сведений (лишь недавно опубликован изыскательский подход к решению этой проблемы [11, 12]); в ряде работ с помощью комплементарных олигонуклеотидов осуществлена направленная химическая фрагментация ДНК [13, 14].

В качестве одноцепочечной ДНК мы использовали ДНК нитчатого фага M13mp2, содержащую проксимальный участок лактозного оперона *E. coli* [15]. Вторым компонентом системы служил один из синтетических олигонуклеотидов (I)–(IX), комплементарных фаговой ДНК в участках А–Г (см. рис. 1) и содержащих *Msp*I-, *Bam*HI- или *Eco*RI-сайт.

Прежде всего мы проанализировали гибридизацию додекануклеотида TTATCCGGTATT (I), комплементарного сегменту 3366–3377 в составе участка А одноцепочечной ДНК. Для этого  $5'$ - $^{32}$ P-фосфорилированный додекануклеотид (I) гибридизовали с одноцепочечной ДНК в условиях различной ионной силы, температуры и соотношения олигонуклеотид – ДНК, комплекс ОЦ ДНК – додекануклеотид (I) вместе со свободной ДНК отделяли от избытка нуклеотида гель-фильтрацией и по радиоактивности высокомолекулярной фракции судили о степени гибридизации. Полученные данные приведены в таблице.

Естественная тенденция к повышению степени связывания при увеличении избытка лиганда и понижении температуры привела к тому, что при  $4^\circ\text{C}$  и 50-кратном избытке додекануклеотида (I) наблюдаемая степень гибридизации превышала 100%. Машинный анализ нуклеотидной последовательности показал, что кроме участка специфического связывания нуклеотида (I) ДНК M13mp2 содержит еще 25 участков частичной

\* Префикс «d» (дезоксн) всюду опущен. ОЦ ДНК – одноцепочечная ДНК; РФ ДНК – репликативная форма ДНК, SSC – 0.15 M NaCl, 0.015 M Na-цитрат.



Гибридизация додекануклеотида (I) с ОЦ ДНК фага M13mp2 в 10 мМ трис-НСI, (рН 7,6), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>

Соотношение (I) : ДНК, моль/моль	t°, С	[NaCl], мМ	Радиоактивность высокомолекулярной фракции. (имп/мин) · 10 <sup>-3</sup>		Степень гибридизации, %
			найдено	вычислено для комплекса 1 : 1	
5	4	—	9	62	15
50	4	—	22 000	860	>100
5	22	—	150	3600	4
10	22	—	330	3600	9
15	22	—	39	316	23
30	22	—	90	288	31
40	22	—	260	500	52
25	23	—	33	204	16
50	23	—	330	700	47
5	4	100	3	62	6
15	22	50	8	288	2,5
15	22	100	9	402	2
25	22	100	31	288	11
15	22	300	11	288	3
15	22	500	8	402	2

гибридизации (см., например, данные о том, что в растворах с высокой концентрацией соли ДНК нитчатых фагов сжимается в короткие палочки [16]).

Сходные результаты были получены при проведении гибридизации на нитроцеллюлозных фильтрах в условиях высокой ионной силы (6×SSC) и 30-кратного избытка меченого додекануклеотида (I). Так, при 4, 12 и 22° С степень гибридизации составляла 10, 5 и 2% (ср. таблицу). Предел термической устойчивости комплекса следует из того, что промывка фильтров при температуре выше 33° С удаляет практически всю радиоактивность.

Для изучения комплексообразования олигонуклеотидов с одноцепочечной ДНК мы использовали также элонгацию праймера в системе праймер — матрица под действием ДНК-полимеразы. Этот метод удобен тем, что он может иллюстрировать не только сам факт комплексообразования, но и его региоспецифичность. В простейшем варианте мы провели частичную достройку додекануклеотида (I) неполными наборами трифосфатов — СТР + ТТР и СТР + ТТР + АТР. Электрофоретическое разделение продуктов достроек показало, что, как и следовало ожидать, в первом случае додекануклеотид удлинится на два звена (СТ), а во втором — на четыре (СТАА).

Для подтверждения специфичности гибридизации и выяснения эффективности праймеров наряду с додекануклеотидом (I) в качестве праймера использовали олигонуклеотиды (II) — (V) длиной 8—14 звеньев, содержащие *Bam*HI-сайт (GGATCC) и комплементарные ДНК M13mp2 в районе этого сайта (Б, рис. 1). Продукты достройки анализировали в условиях секвенирования ДНК по Сенгеру [17]. Оказалось, что в то время как оба октануклеотида (II, III) и декануклеотид (IV) вообще не достраиваются, додекануклеотид (I) и тетрадекануклеотид (V) в таких же условиях образуют четкий набор продуктов элонгации (рис. 2; приведены результаты опытов с олигонуклеотидами (II—V)), т. е., в отличие от более коротких соединений, вещества (I) и (V) способны к образованию специфических и устойчивых комплексов с одноцепочечной ДНК.

Была изучена также элонгация 10- (VI) и 13-членника (VII), комплементарных участку В ДНК M13mp2, за исключением одного звена (рис. 1): соответствующие дуплексы содержат одну неканоническую пару (G·T), что создает возможность сайт-специфического мутагенеза с транзицией T → C и образованием нового *Eco*RI-сайта (GAATTT → GAATTС). Подобно описанному выше, 10-членник (VI) достроить не удалось, в то время как 13-членник (VII) достраивался. Полная элон-

гация этого праймера и последующее лигирование привели к репликативной форме фаговой ДНК, идентичной заведомому препарату по электрофоретическим свойствам и по набору фрагментов рестрикции (например, с эндонуклеазой *MspI*).

Следует особенно отметить результаты, полученные при элонгации декануклеотидов GACGGCCAGT (VIII) и GTTGTA AAAAC (IX), совместно комплементарных 20-членному участку ДНК M13mp2 в районе Г (рис. 1). Оказалось, что хотя ни один из этих декануклеотидов по отдельности не достраивается, оба они после совместного отжига с ДНК претерпевают эффективную региоселективную полимеразную достройку (рис. 3). По-видимому, причиной этого является довольно устойчивая вторичная структура ОЦ ДНК: для ее нарушения одного декануклеотида при отжиге оказывается недостаточно, тогда как при гибридизации обоих декануклеотидов, располагающихся встык вдоль цепи ДНК, пикированный эйкозануклеотид (VIII+IX) благодаря кооперативности взаимодействия преодолевает эффект вторичной структуры и удерживается на полинуклеотидной цепи. При этом, судя по включению радиоактивных предшественников при полимеразной достройке, пикированный эйкозануклеотид (VIII+IX) в качестве праймера в составе тройного комплекса (VIII+IX)+ ДНК близок по эффективности, а следовательно, и по прочности удерживания на односторонней ДНК к продукту его лигирования.

Действительно, анализ ближайшего окружения соответствующего эйкозануклеотидного сегмента ДНК на наличие элементов вторичной структуры (рис. 1, участок Г) показал, что этот сегмент находится как раз в районе потенциальной шпильки. Из аналогичного рассмотрения районов комплексообразования других праймеров (рис. 1) следует, что шпилька, расположенная вплотную или на расстоянии одного нуклеотидного звена от 3'-конца 10-членного праймера, препятствует его элонгации, тогда как прочность связывания 12-членного праймера уже достаточна, чтобы он мог конкурировать с элементами вторичной структуры ДНК.

Полученные результаты согласуются с данными о возможности использования олигонуклеотидов длиной более 10 звеньев в качестве праймеров в системах на основе ОЦ ДНК-содержащих нитчатых фагов [18] и иллюстрируют рост эффективности включения метки с увеличением длины праймера: так, 14-звенный праймер в 5-6 раз эффективнее 12-звенного, а 20-звенный (даже пикированный) — вдвое эффективнее, чем 14-звенный. Такой составной праймер удобен не только благодаря простоте его синтеза. При электрофорезе продуктов элонгации он автоматически укорачивается, в результате чего соответственно возрастает длина читаемой последовательности. Далее, такой праймер может быть

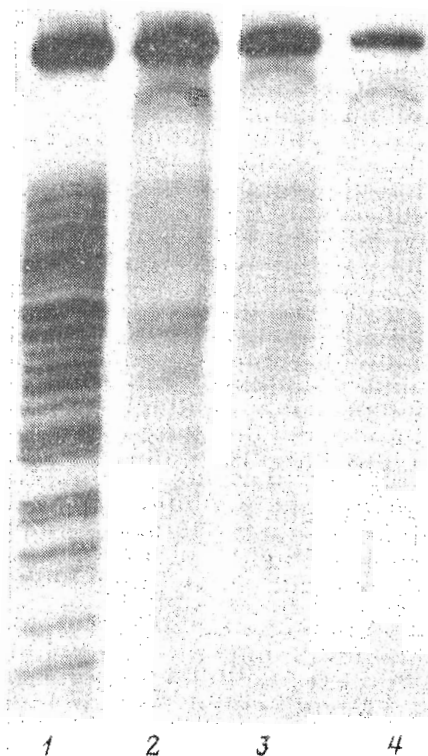


Рис. 2. Электрофорез в 20% ПААГ продуктов ДНК-полимеразной достройки олигонуклеотидов (V) — 1, (IV) — 2, (II) — 3, (III) — 4 на ОЦ ДНК M13mp2 в качестве матрицы (40-кратный избыток праймера) в присутствии 25 мкМ трех dNTP, 0.25 мкМ (2.5 мкКи)  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  и 50 мкМ ddATP, 1 ч, 20° С.

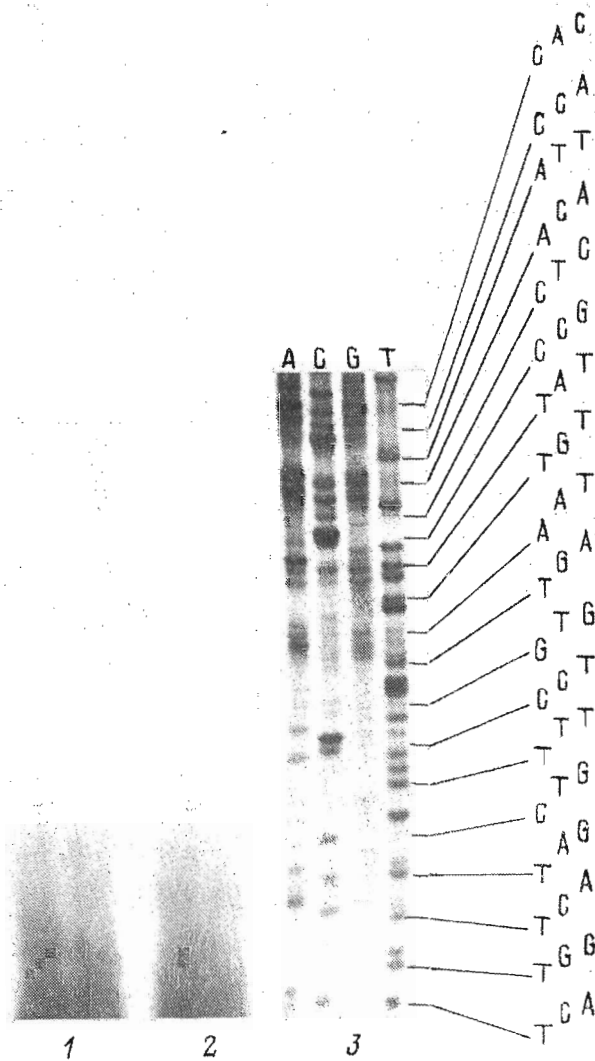


Рис. 3. Электрофорез в 20% ПААГ продуктов ДНК-полимеразной достройки декануклеотидов (VIII) - 1 и (IX) - 2 и составного праймера (VIII+IX) - 3 (см. подпись к рис. 2). В каждом случае использовали следующие ddNTP (слева направо): А, С, G, Т. Последовательность ДНК, изображенная в виде троек, читается справа налево, сверху вниз

использован для получения RF-формы ДНК с брешами контролируемого размера в заданном районе, что важно при исследовании некоторых ферментов нуклеинового обмена (см., например, [19, 20]).

В рамках изучения бактериофагов, содержащих кольцевую одноцепочечную ДНК, значительный интерес представляют данные о физико-химических свойствах и функциональной активности линейной формы этой ДНК и ее фрагментов. Обычный подход к их получению, состоящий в расщеплении двухцепочечной ДНК эндонуклеазами рестрикции и делении цепей путем центрифугирования или электрофореза, не всегда позволяет получить индивидуальные цепи, так как эффективность их разделения зависит от асимметричности распределения оснований между ними. Очевидно, возможен иной путь: получение комплементарных дуплексов с участием одноцепочечной ДНК и олигонуклеотида, включающих один из рестриктных сайтов, и расщепление по этому сайту; комбинируя такие олигонуклеотиды попарно, в общем случае можно вычленивать из одноцепочечной ДНК любой нужный фрагмент. Для проверки подобной возможности мы использовали синтетические олигонуклеотиды (I)

я (V), комплементарные фаговой ДНК и содержащие *MspI*- и *BamHI*-сайты.

Чтобы оценить возможность специфического расщепления ОЦ ДНК по одному рестриктному сайту, мы расщепили комплекс ОЦ ДНК M13mp2 — тетрадекануклеотид (V) по единственному *BamHI*-сайту. Ранее было показано, что хотя сам по себе тетрадекануклеотид (V) расщепляется *BamHI* необычным образом, в составе дуплекса с ОЦ ДНК его расщепление по *BamHI*-сайту протекает нормально [21]. Чтобы убедиться, что при этом расщепляется и ДНК, мы подвергли продукты действия *BamHI* на комплекс ДНК M13mp2 — тетрадекануклеотид (V) дефосфорилированию щелочной фосфатазой, а затем, после депротеинизации, фосфорилировали их действием [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ГАТР и Т4-полинуклеотидкиназы. Полученную смесь разделили электрофорезом в 20% полиакриламидном геле и определили радиоактивность стартовой зоны, содержащей ДНК и свободной от низкомолекулярных веществ; аналогичную последовательность операций провели с одноцепочечной ДНК без добавления 14-членика (V). Оказалось, что радиоактивность полученной ДНК в первом случае в 25 раз выше, чем во втором, что свидетельствует о способности ДНК в составе комплементарного комплекса с олигонуклеотидом специфически расщепляться *BamHI*.

Возможность избирательного расщепления одного из нескольких одинаковых рестриктных сайтов мы оценивали на примере комплекса ОЦ ДНК M13mp2 — додекануклеотид (I) и эндонуклеазы *MspI* (фаговая ДНК содержит 15 *MspI*-сайтов). К сожалению, одноцепочечная ДНК M13mp2 уже сама по себе способна разрезаться *MspI* (по-видимому, вследствие внутримолекулярного спаривания соответствующих тетра-нуклеотидных участков; см. [21]), хотя предпочтение денатурированной ДНК перед нативной, отмечавшееся ранее [22], в наших опытах не подтвердилось. Все же комплекс ОЦ ДНК — додекануклеотид (I) начинает разрезаться несколько раньше, чем сама ОЦ ДНК. Так, при параллельной инкубации с *MspI* ОЦ ДНК и ее комплекса с соединением (I) электрофорез в агарозном геле показал, что в случае комплекса линейная ДНК появляется уже через 40 мин инкубации при 4°С (две полосы в геле); дальнейшая инкубация приводила к появлению серии полос, т. е. расщеплению ДНК по другим *MspI*-сайтам. С другой стороны, в отсутствие олигонуклеотида ОЦ ДНК начинала разрезаться несколько позже, после 1 ч инкубации при 4°С, причем сразу появлялось несколько полос. В этих же условиях продукты эндонуклеазного расщепления меченого додекануклеотида (I) в комплексе с ОЦ ДНК также появлялись гораздо раньше (через 50 мин), чем при действии *MspI* на сам олигонуклеотид (после 2 ч инкубации). Полученные данные свидетельствуют о том, что рестриктаза *MspI* разрезает двухцепочечные структуры, хотя, по-видимому, узнает и одноцепочечные участки и способствует образованию дуплексов с их участием. То, что в комплексе с додекануклеотидом (I) ОЦ ДНК M13mp2 разрезается быстрее, чем вне его, может быть связано с нарушением вторичной структуры ДНК при ее гибридизации с олигонуклеотидом: при этом разрушаются внутримолекулярные дуплексные участки узнавания ферментом и наиболее доступным для действия рестриктазы оказывается участок гибридизации.

Наблюдавшаяся предпочтительность расщепления ОЦ ДНК в составе комплекса с олигонуклеотидом оказалась недостаточной для ее избирательного расщепления по одному из нескольких рестриктных сайтов. Очевидно, для направленной фрагментации ОЦ ДНК с помощью олигонуклеотидных подложек более реально использование редко щепящих рестриктаз.

### Экспериментальная часть

В работе использовали сверхтонкие сефадексы G-50 и G-75 (Pharmacia); [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ГАТР, [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]дНТР (400–3000 Кп/ммоль) (Amersham); акриламид, метиленисакриламид, тетраметилэтилендиамин и персульфат аммония (Reanal); иттроцеллюлозные фильтры (Schleicher und Schüll); DEAE-целлюлозу MN300 и целлюлозу MN300 (Serva), агарозу (Bio-Rad); триптон, дрожжевой экстракт, агар (Difco). Куль-

тура фага и хозяина фага M13mp2 были получены от Дж. Мессинга (Дэвис, Калифорния), эндонуклеазы рестрикции *VamHI* и *MspI* — из НПО «Фермент» (Вильнюс), 2',3'-дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты ddNTP — из НИОХ СО АН СССР (Новосибирск), ДНК-полимераза I *E. coli* (большой фрагмент) предоставлена А. И. Гуревичем (ИВХ, Москва). Синтетические олигонуклеотиды получены и проанализированы, как описано ранее [21].

ОЦ и РФ ДНК фага M13mp2 получали, как описано в работе [23]. Олигонуклеотиды метили по 5'-концу в объеме 25–30 мкл в буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl (pH 9,0), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ дитиотреит, двухкратный молярный избыток [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]rATP и 1 ед. акт. T4-полинуклеотидкиназы, 1 ч при 37°С и выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50.

*Гибридизацию ОЦ ДНК* (1 имоль) с избытком меченого додекануклеотида (I) проводили в 25 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 7,6), 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и требуемое количество NaCl (таблица). Смесь инкубировали 20 мин при 60°С, затем 30 мин при 37°С и охлаждали до температуры комплексообразования (4, 22 или 28°С). От избытка олигонуклеотида комплекс отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-75 в гибридизационном буфере. Элюат фракционировали по поглощению при 254 нм (УФ-анализатор UVD 254 VD CSAV) и по радиоактивности (по Черенкову, эффективность счета 56%, или в 1 мкл аликвоте из каждой фракции на DEAE-бумаге (1×1 см) в толуольном сцинтиляторе, эффективность счета 97%; счетчик Mark 2, Nuclear Chicago). Степень гибридизации определяли как отношение радиоактивности во фракции ДНК к радиоактивности, ожидаемой при количественной гибридизации.

*Полимеразную достройку комплекса* проводили в 15 мкл буфера, содержащего 30 мМ трис-HCl (pH 7,6), 5 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ дитиотреит и 2–33-кратный молярный избыток предшественников. Смесь инкубировали с большим фрагментом ДНК-полимеразы I *E. coli* (0,5 ед. акт.) 15–60 мин при 20°С, разделяли в 20% полиакриламидном геле и радиоавтографировали. Для получения структурно-аналитических гелей в инкубационные смеси добавляли необходимые количества ddNTP в качестве терминаторов элонгации (см. [17]). В случае полимеразной достройки спитого на ДНК эйкозануклеотида (VIII:IX) оба 5'-фосфорилированных додекануклеотида (VIII) и (IX) предварительно подвергали отжигу с ОЦ ДНК и действию лигазы при 4°С в течение 16 ч.

Гибридизацию ОЦ ДНК M13mp2 с меченым додекануклеотидом (I) на нитроцеллюлозных фильтрах проводили, как описано в работе [24].

*Гибридизацию и разрезание* эндонуклеазой *MspI* ОЦ ДНК M13mp2 (2,5 мкг) и ее комплекса с немеченым додекануклеотидом (I) (30–50-кратный молярный избыток) проводили в 25 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 7,4), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 6 мМ KCl и 1 мМ дитиотреит. После отжига охлаждали до 4°С, добавляли 2 ед. акт. фермента и продолжали инкубацию при той же температуре. Продукты рестрикции разделяли электрофорезом в 1% геле агарозы и обнаруживали в УФ-свете после окрашивания бромистым этидием. Гибридизацию ОЦ ДНК с меченым додекануклеотидом (I) и расщепление полученного комплекса проводили так же, но в меньшем объеме (10 мкл). Продукты разделяли гомохроматографией в тонком слое DEAE-целлюлозы в гомосмеси VI [25] или электрофорезом в полиакриламидном геле (20 и 30%).

*Расщепление эндонуклеазой VamHI ОЦ ДНК M13mp2 и комплекса ОЦ ДНК — тетрадекануклеотид (V)*. ДНК и комплекс (2,5 мкг) обрабатывали по отдельности 2 ед. акт. рестриктазы *VamHI* в 15 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 7,4), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 6 мМ β-меркаптоэтанол, 50 мМ NaCl, 3 ч при 20°С. Реакционную смесь обрабатывали щелочной фосфатазой, депротенизировали фенолом, дважды пересаждали из спирта. 5'-<sup>32</sup>P-фосфорилировали, очищали от низкомолекулярных продуктов электрофорезом в 20% ПААГ и радиоактивность стартовой зоны, содержащей ДНК, определяли в толуольном сцинтиляторе. В случае комплекса и самой ДНК найденные значения радиоактивности соответствовали 85 000 и 3500 имп/мин.

Авторы благодарны И. В. Артемьеву за предоставление программ анализа вторичной структуры ДНК и помощь при работе на ЭВМ и Л. Л. Каюшину за олигонуклеотиды (VIII) и (IX).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Gillam Sh., Smith M. *Gene*, 1979, v. 8, № 1, p. 81–106.
2. Gillam Sh., Jahnke P., Astell C., Phillips S., Hutchison C. A. III, Smith M. *Nucl. Acids Res.*, 1979, v. 6, № 9, p. 2973–2985.
3. Wallace R. B., Jonsson M. J., Suggs S. V., Miyoshi K., Bhatt R., Itakura R. *Gene*, 1981, v. 16, № 1–3, p. 21–26.
4. Wallace R. B., Schold M., Johnson M. J., Dembek P., Itakura K. *Nucl. Acids Res.*, 1981, v. 9, № 15, p. 3647–3656.
5. Baas P. D., Teertstra W. R., van Mansfeld A. D. M., Jansz H. S., van der Marel G. A., Veeneman G. H., van Boom J. H. *J. Mol. Biol.*, 1981, v. 152, № 4, p. 615–639.
6. Simons G. F. M., Veeneman G. H., Konings R. N. H., van Boom J. H., Schoenmakers J. G. G. *Nucl. Acids Res.*, 1982, v. 10, № 3, p. 821–832.
7. Miyada C. G., Soberon X., Itakura K., Wilcox G. *Gene*, 1982, v. 17, № 2, p. 167–177.
8. Lau P. C. K., Spencer J. H. *Bioscience Reports*, 1982, v. 2, № 8, p. 687–696.
9. Kieny M. P., Lathe R., Lecocq J. P. *Gene*, 1983, v. 26, № 1, p. 91–99.
10. Wang A., Lu S.-D., Mark D. F. *Science*, 1984, v. 224, № 4656, p. 1431–1433.
11. Szybalski W. *Gene*, 1985, v. 40, № 2/3, p. 164–173.
12. Podhajski A. J., Szybalski W. *Gene*, 1985, v. 40, № 2/3, p. 175–182.
13. Chu B. C. F., Orgel D. E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1985, v. 82, № 4, p. 963–967.
14. Бросалова Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Плернев А. Г., Подыминский М. А. Докл. АН СССР, 1985, т. 285, № 6, с. 1475–1478.
15. Gronenborn B., Messing J. *Nature*, 1978, v. 272, № 5632, p. 375–377.
16. Griffith J. D., Hester S., el Saidi S. *J. Mol. Biol.*, 1982, v. 157, № 2, p. 321–330.
17. M13 Cloning 'dideoxy' sequencing. Manual, 1980, BRL Inc., p. 1–49.
18. Zoller M. J., Smith M. *Meth. Enzymol.*, 1983, v. 100, p. 468–500.
19. Courage-Tebbe U., Kemper B. *Biochim. et biophys. acta*, 1982, v. 697, № 1, p. 1–5.
20. Cassuto E., Howard-Flanders P. *Nucl. Acids Res.*, 1986, v. 14, № 3, p. 1149–1157.
21. Тюрева Г. Р., Виноградов С. В., Берлин Ю. А. *Биоорган. химия*, 1986, т. 12, № 5, с. 640–646.
22. Yoo O. J., Agarwal K. L. *J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 22, p. 10559–10562.
23. Messing J. In: Protocol for the application of the single-stranded DNA phage M13mp2 as a cloning vehicle, 1979, University of California at Davis, p. 1–21.
24. Wallace R. B., Shaffer J., Murphy R. F., Bonner J., Hirose T., Itakura K. *Nucl. Acids Res.*, 1979, v. 6, № 15, p. 3543–3552.
25. Jay E., Bambara R., Padmanabhan K., Wu R. *Nucl. Acids Res.*, 1974, v. 1, № 3, p. 331–340.

Поступила в редакцию  
2.VI.1986

#### COMPLEXES OF THE PHAGE SINGLE-STRANDED DNA WITH SYNTHETIC OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AND THEIR INTERACTION WITH DNA POLYMERASE AND RESTRICTION ENDONUCLEASES

TITEVA G. R., VINOGRADOV S. V., BERLIN Yu. A.

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

Hybridization of synthetic oligodeoxynucleotides with single-stranded phage M13mp2 DNA has been studied in terms of temperature, ionic strength, oligonucleotide molar excess and chain length, and DNA secondary structure. Combination of two decadeoxynucleotides corresponding to a nicked eicosamer (composite primer) was found to be efficient in the template-directed DNA polymerase-catalyzed chain elongation, where both decamers separately failed. Circular SS DNA was specifically linearized by BamHI cleavage of a SS DNA – tetradecadeoxynucleotide duplex.