



УДК 577.113.6 : 577.218

**ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ
ЭЛЕМЕНТОВ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ИСКУССТВЕННЫХ ГЕНОВ
В КЛЕТКАХ *BACILLUS SUBTILIS*****Горбунов Ю. А., Данилюк Н. К., Ильичев А. А.,
Красных В. Н., Томакин А. И., Попов С. Г.,
Щелкунов С. Н.***Всесоюзный научно-исследовательский институт
молекулярной биологии, п. Кольцово Новосибирской обл.*

С целью создания штамма-продуцента на основе *Bacillus subtilis* химико-ферментативным методом получена регуляторная область, контролирующая транскрипцию и трансляцию гена α -амилазы *B. amyloliquefaciens*. Олигодезоксирибонуклеотиды, синтезированные модифицированным фосфотриэфирным методом в растворе и на полимерном носителе, были сплиты действием ДНК-лигазы в два фрагмента, которые затем были подвергнуты молекулярному клонированию в составе ДНК фага M13 и плазмиды pBR327. Гибридная плаزمида, содержащая участок, контролирующей транскрипцию гена α -амилазы, может быть использована в качестве вектора для клонирования промоторсодержащих фрагментов в клетках *E. coli*.

Для создания эффективных способов микробиологического синтеза различных белков с помощью гибридных микроорганизмов представляется перспективным использовать клетки *Bacillus subtilis*, которые имеют ряд преимуществ перед клетками *E. coli*, применяемыми в качестве продуцента в настоящее время. В частности, с помощью фрагментов гена α -амилазы может быть обеспечена секреция продуктов биосинтеза в культуральную среду [1].

Целью настоящей работы явился синтез регуляторных элементов транскрипции и трансляции гена α -амилазы *B. amyloliquefaciens* для достижения в клетках *B. subtilis* высокопродуктивной экспрессии искусственного гена лейкоцитарного интерферона α -2 человека, синтезированного ранее [2]. Выбор химико-ферментативного подхода к синтезу был обусловлен необходимостью точной стыковки отдельных генетических элементов без использования сложных генно-инженерных методов и возможностью введения в состав синтетической нуклеотидной последовательности сайтов рестрикции на границах отдельных генетических элементов для упрощения стадий конструирования и использования таких элементов как порознь, так и в различных сочетаниях.

Регуляторная область гена α -амилазы была разделена нами для химико-ферментативного синтеза на промоторный фрагмент и SD-фрагмент, содержащий участок связывания рибосом и кодон инициации трансляции (их первичная структура приведена на рис. 1). Соединение обоих фрагментов было запланировано по *EcoRI**-сайту, возникшему в результате замены двух нуклеотидных пар в природной последовательности (см. рис. 1), так что промоторный фрагмент содержит липкий конец *EcoRI*-сайта, а SD-фрагмент — липкий конец полноценного *EcoRI*-сайта. На 3'-конце SD-фрагмента имеется сайт *HinI*, по которому возможно соединение этого фрагмента с геном сигнального пептида α -амилазы. Непосредственно

Использованы следующие нестандартные сокращения: ClPh — *n*-хлорфенил, ib — изобутирил, TPSNT — 1-(2, 4, 6-триизопробилбензолсульфонил)-3-нитро-1,2,4-триазол, IPTG — изопропилтио- β -D-галактопиранозид, Ygal — 5-бромилдод-3-ил- β -D-галактопиранозид, Ar — ампициллин, Te — тетрациклин; в формулах защитных нуклеотидов «+» под символом межнуклеотидной связи означает *n*-хлорфенильную группу.

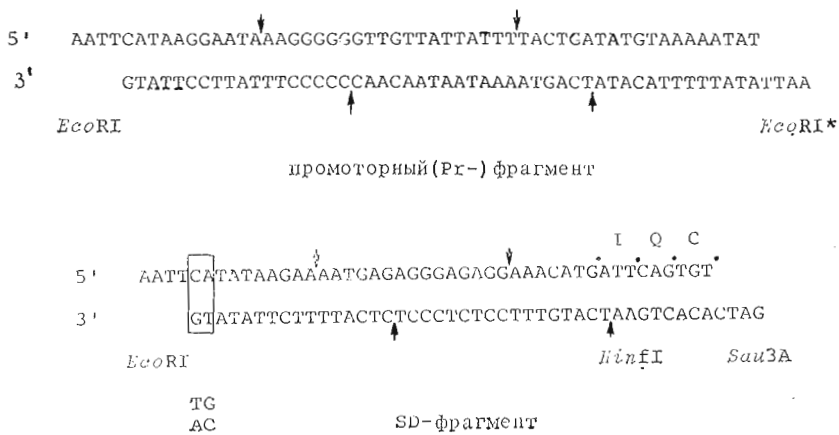


Рис. 1. Первичная структура промоторного и SD-фрагментов. Стрелками указаны места сшивки синтетических олигомеров, точками отмечены триплеты аминокислот сигнального пептида α -амилазы. Рамкой выделена последовательность, отличающаяся от природной; под ней приведена природная последовательность

за сайтом *HinfI* введен триплет, кодирующий первый цистеиновый остаток интерферона, а также липкий конец *Sau3A*-сайта, который можно использовать для стыковки SD-фрагмента с 5'-концом гена интерферона. При этом ожидаемый продукт трансляции будет отличаться от природного интерферона двумя дополнительными аминокислотами на N-конце полипептидной цепи.

Химический синтез олигомеров, составляющих промоторный фрагмент, проводили фосфотриэфирным методом в растворе, а синтез олигодезоксирибонуклеотидов SD-фрагмента — триэфирным твердофазным методом. Подход к синтезу олигодезоксирибонуклеотидов в растворе аналогичен описанному в литературе [3], но модифицирован нами с целью получения полинуклеотидов длиной более 15 звеньев. В качестве исходных компонентов мы использовали моно- и динуклеотидные блоки, в которых 5'-гидроксил защищен монометокситриэтильной группой, удаляемой трихлоруксусной кислотой в смеси хлороформ — этанол, 9 : 1 [4], а фосфатные группы — *n*-хлорфенильным и цианэтильным остатками. Наиболее существенным фактором, ограничивающим возможность фосфотриэфирного метода синтеза в растворе, является необходимость хроматографического выделения целевого продукта реакции из реакционной смеси. Для увеличения хроматографической подвижности при адсорбционной хроматографии на силикагеле и улучшения растворимости в органических растворителях используют защитные группы, обладающие повышенной липофильностью [5]. С этой целью для защиты 3'-гидроксила концевых нуклеозидов мы использовали липофильную *n*-*трет*-бутилбензоильную группу [6], проводя наращивание олигонуклеотидной цепи от 3' к 5'-концу. Чтобы увеличить липофильность 5'-концевых фосфотриэфирных блоков, мы применяли в ряде случаев вместо цианэтильного остатка флуоренилметильную защитную группу [7]. Только благодаря ее использованию удалось получить 5'-концевой блок d [(MeOTr)bzA \mp bzA \mp ibG \mp ibG \mp \mp ibG \mp ibG \mp ibG \mp ibG \mp ibGp(CiPh)] для синтеза олигомера d(A-A-G-G-G-G-G-G-T-T-G-T-T-A-T-T-A-T-T). Флуоренилметильный остаток удаляли в условиях, применяемых для удаления цианэтильной группы (триэтиламин — ацетонитрил, 1 : 1; 4 ч; 20° C) [8]. Во всех случаях конденсации проводили с помощью TPSNT [9]. Выходы продуктов конденсации после колоночной хроматографии на силикагеле, определенные спектрофотометрически (см. «Экспериментальную часть»), составляли более 70%.

Олигодезоксирибонуклеотиды SD-фрагмента синтезировали фосфотриэфирным методом на полимерном носителе по описанному ранее способу [10]. Цианэтильную защитную группу удаляли в условиях, приведенных в работе [11], смесью диизопропиламин — пиридин (2 : 1) за 30—40 мин

при комнатной температуре. Нарастивание олигонуклеотидной цепи проводили в условиях, описанных в работе [12], с помощью смеси мезитилсульфохлорида и *N*-метилимидазола в мольном соотношении 1 : 3 в ацетонитриле. Время конденсации составляло 1 ч при использовании моно- и динуклеотидных блоков и 2 ч для тринуклеотидных блоков. Применение ацетонитрила как растворителя в реакции конденсации не всегда дает удовлетворительные результаты. Так, попытка синтеза пентадекануклеотида d(ATTGAGAGGGAGAGG) в приведенных выше условиях оказалась неудачной, по-видимому, из-за плохой растворимости защищенного тринуклеотида d[ibG \mp ibG \mp \mp ibGp(CiPh)(CNEt)] в ацетонитриле. После замены ацетонитрила на 1,2-дихлорэтан [13] синтез этого пентадекануклеотида протекал без осложнений. Время конденсации в среде 1,2-дихлорэтана составляло 30 мин для мононуклеотидов и 1 ч для тринуклеотидных блоков.

Выходы на каждой стадии конденсации в синтезе на полимерном носителе составляли 48—65% в расчете на целевой продукт, выделенный хроматографически. После завершения циклов наращивания цепи синтезированные олигодезоксирибонуклеотиды отщепляли от полимерного носителя и деблокировали с помощью *n*-нитробензальдоксимата лития и затем водного аммиака. Деблокированные олигомеры обессоливали гель-фильтрацией и очищали ионообменной и обращенно-фазовой хроматографией [14]. Аналогичные стадии деблокирования и очистки проводили для олигомеров, синтезированных в растворе. Структура полученных олигодезоксирибонуклеотидов промоторного и SD-фрагментов подтверждена анализом по методу Максама — Гилберта [15].

Лигазная сборка промоторного и SD-фрагментов была осуществлена нами по схеме, позволяющей однозначно получать продукты сшивки в одноцепочечной форме, необходимой для определения первичной структуры. Для этого в реакцию вводили сразу все олигодезоксирибонуклеотиды промоторного или SD-фрагментов, причем предварительно фосфорилировали только внутренние 5'-концы олигомеров одной из цепей. Олигомеры комплементарной цепи служили матрицей, обеспечивающей сшивку фосфорилированных олигомеров. Об образовании полинуклеотидов нужной длины судили по данным электрофореза в ПААГ с 7 М мочевиной после 1,5—2 ч ферментативной реакции. Подобным образом были сшиты обе цепи как промоторного, так и SD-фрагмента. В использованных нами условиях реакция лигирования протекала с хорошим выходом и без побочных продуктов как при 10—12° С, так и при комнатной температуре (рис. 2). Недавно аналогичная схема сборки была опубликована в работе [16].

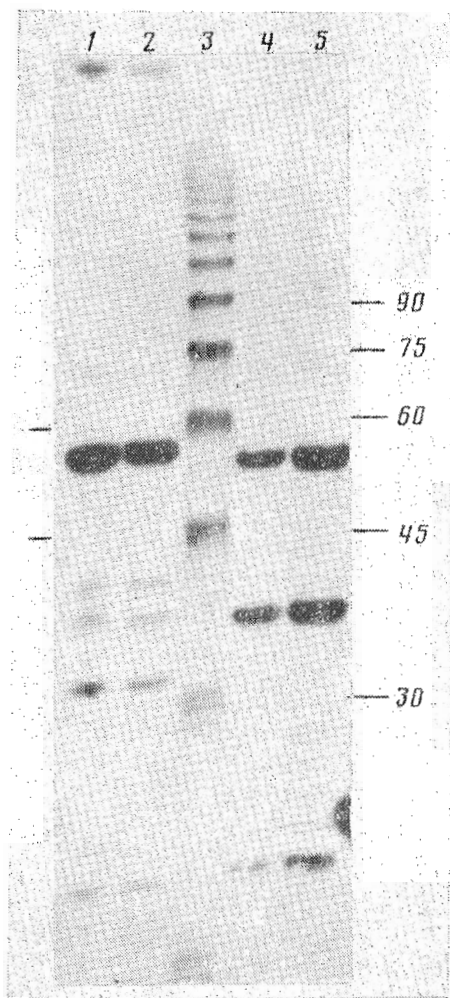


Рис. 2. Радиоавтограмма гель-электрофореза в 15% ПААГ реакционных смесей лигазной сшивки промоторного фрагмента: верхней цепи при 10° (1) и 20° С (2), нижней цепи при 10° (4) и 20° С (5). Дорожка 3 — полимеризованный 15-членный маркерный олигонуклеотид. Цифры справа — число мономерных звеньев в цепи

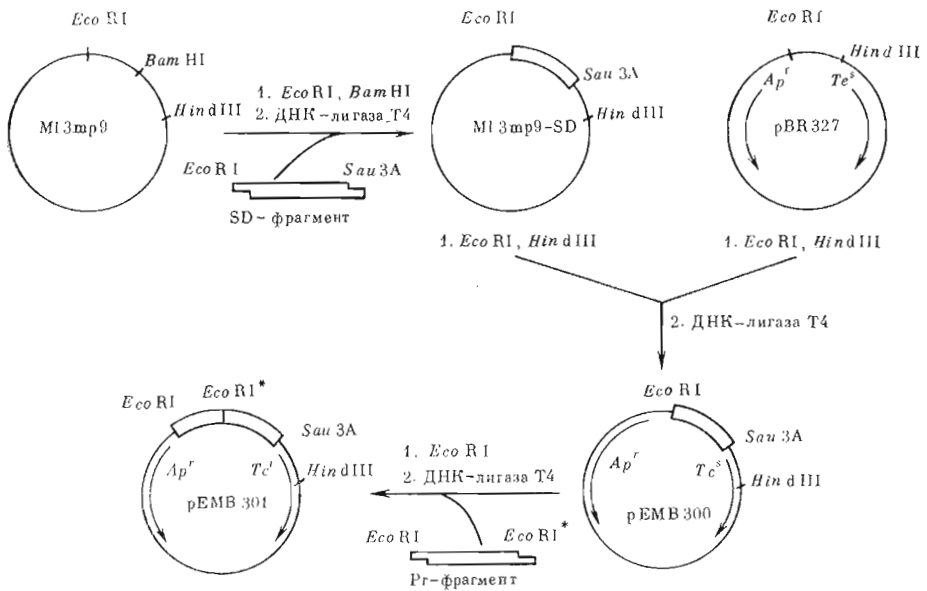


Рис. 3. Общая схема клонирования промоторного и SD-фрагментов

Полученный в результате лигазной шивки фрагмент ДНК, содержащий SD-сайт, клонировался в фаговом векторе M13mp9. SD-Фрагмент отжигали с репликативной формой (РФ) ДНК фага M13mp9, обработанной рестриктазами *EcoRI* и *BamHI*, и затем лигировали. Лигазную смесь использовали для трансфекции компетентных клеток *E. coli* JM103 с последующим высевом на чашки с IPTG и Ygal. После отбора *lacZ*⁻-колоний и выделения фаговой ДНК проводили гибридизацию с 5'-³²P-меченым олигонуклеотидом из состава клонируемого фрагмента. Клоны с положительным гибридизационным ответом использовали для препаративной наработки фаговых частиц.

Рестрикционный анализ показал, что в составе РФ ДНК фага M13mp9 содержится фрагмент ожидаемой длины. Определение первичной структуры этого фрагмента методом Максама — Гилберта подтвердило ее точное соответствие исходной структуре SD-фрагмента. Далее клонированный фрагмент вырезали из РФ ДНК фага M13 гидролизом *EcoRI* и *HindIII* и переносили в плазмиду pBR327 для последующей стыковки с промоторным фрагментом (рис. 3). Полученная плазида pEMB300 не обеспечивает устойчивости к тетрациклину и может служить удобным вектором для клонирования промоторных фрагментов по *EcoRI*-сайту с последующим отбором *Tc*^r-рекомбинантов. Введение в такую плазмиду синтетического промоторного фрагмента в случае его активности в клетках *E. coli* должно восстанавливать транскрипцию гена устойчивости к тетрациклину, которая позволяет на среде с тетрациклином отбирать колонии, содержащие нужную вставку. Для проверки этого предположения промоторный фрагмент встраивали по *EcoRI*-концам в плазмиду pEMB300 и лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* с последующим высевом на агар, содержащий ампициллин и тетрациклин. Отобранные *Ap*^r*Tc*^r-колонии гибридизовали с одной из цепей промоторного фрагмента. Из клонов, давших положительный гибридизационный ответ, выделяли плазмидную ДНК. Гидролиз плазмид рестриктазами *EcoRI* и *HindIII* показал наличие фрагмента длиной 122 п. о., структура которого полностью соответствовала заданной (рис. 4).

Таким образом, с помощью химико-ферментативного синтеза и последующего клонирования создана плазида, имеющая в своем составе блок-промотор α -амилазы — SD-сайт, которая может быть использована для создания генетических систем экспрессии различных генов в клетках *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *E. coli*. Наличие вблизи 3'-конца SD-

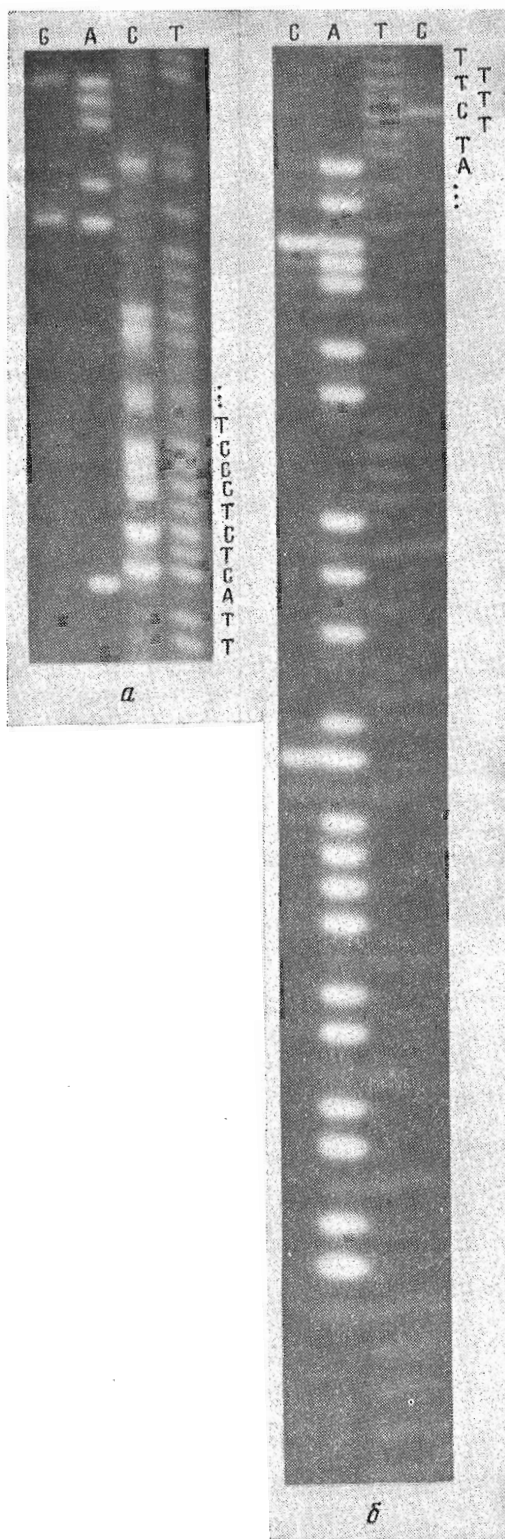


Рис. 4. Радиоавтограмма структурного 5% ПААГ при секвенировании 122-членного клонированного синтетического фрагмента, содержащего промотор α -амилазы и SD-сайт. По горизонтали — специфические реакции расщепления. *a* — 5'-концевой участок нижней цепи фрагмента, *b* — 3'-концевой участок нижней цепи фрагмента

фрагмента полилинкера из ДНК M13mp9 обеспечивает возможность стыковки этого фрагмента с кодирующими последовательностями генов, имеющими различные липкие концы. Плазмида рЕМВ300 может быть применена для клонирования промоторов в клетках *E. coli*.

Экспериментальная часть

В работе использованы моно- и динуклеотидные блоки, полученные по методике [3] из дезоксирибонуклеозидов производства НИКТИ БАВ (Бердск); флуоренилметанол, 1,2,4-триазол, 4-диметиламинопиридин, 4-трет-бутилбензойная кислота, N-метилимидазол и дициклогексилкарбодимид (Fluka, Швейцария); акриламид, метиленбисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (Sigma, США); Kieselgel 60 для колоночной хроматографии и пластинки для ТСХ Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ); [γ -³²P]АТФ (1000 Ки/ммоль). Т4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) и Т4 ДНК-лигаза (КФ 6.5.1.1), рестриктаза *Bam*HI получены из НИКТИ БАВ (Бердск), *Eco*RI, *Hind*III — из НПО «Фермент» (Вильнюс). Использованы также бумага DE-81 (Whatman, Англия) и фильтры HAWP (Millipore, США).

Выделение и анализ олигонуклеотидов проводили с помощью жидкостного хроматографа Altex, модель 322 (США), прочая аппаратура, использованная в работе, аналогична приведенной в работе [10]. Гидролиз ДНК рестриктазами осуществляли согласно [17]. 5'-Фосфорилирование синтетических полинуклеотидов с помощью [γ -³²P]АТФ и Т4-полинуклеотидкиназы проводили по [18]. Фрагменты ДНК сшивали с помощью ДНК-лигазы фага Т4 в условиях, обеспечивающих максимальный выход рекомбинантных молекул [19]. За единицу активности лигазы принимали такое количество фермента, которое связывает 1 пмоль [γ -³²P]АТФ за 10 мин при 20° С в буфере, содержащем 66 мМ трис-НСl (рН 7,6), 6,6 мМ MgCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол. Компетентные клетки *E. coli* готовили по методике [20]. Плазмидную ДНК выделяли методом [21]. Выходы продуктов при межнуклеотидных конденсациях в растворе определяли спектрофотометрически по поглощению элюата при 280 нм. Коэффициент молярного поглощения олигонуклеотида при 280 нм принимали равным сумме соответствующих коэффициентов *n*-хлорфениловых эфиров мононуклеотидов с N-защитными группами: ε₂₈₀ 7360 для dTr(C1Ph), 8420 для dbzCp(C1Ph), 20 000 для dbzAp(C1Ph) и 12 800 для dibGp(C1Ph). Молярные коэффициенты экстинкции N-ацил-2'-дезоксинуклеозид-3'-(*n*-хлорфенил, β-цианэтил)-фосфатов в метаноле определялись спектрофотометрически стандартным методом.

1. *Введение флуоренилметильной защитной группы.* Мононуклеотид d(MeOTr)ibGp(C1Ph) (0,05 ммоль) и 0,0118 г (0,06 ммоль) флуоренилметанола упаривали трижды с 10 мл абс. пиридина. Остаток растворяли в 5 мл абс. пиридина и к нему добавляли 0,057 г (0,15 ммоль) TPSNT. Смесь выдерживали 1 ч при 20° С, затем реакцию останавливали добавлением 100 мкл воды. Реакционную смесь упаривали в вакууме и остаток распределяли между СНCl₃ и 0,1 М ТЕАВ (20 мл). После промывки и высушивания безводным Na₂SO₄ органическую фазу упаривали и продукт выделяли хроматографией на короткой колонке в градиенте 1—6% этанола в хлороформе. Чистый продукт (*R*_f 0,6 в системе хлороформ — этанол, 9 : 1) был выделен с выходом 82% при осаждении из хлороформа пентаном. Таким же образом флуоренилметильную группу вводили в тринуклеотид d[(MeOTr)ibG ∓ ibG ∓ ibGp(C1Ph)] с выходом 68%.

2. *Межнуклеотидные конденсации.* К смеси фосфатного (1,5—1,2 экв.) и гидроксильного компонентов (1 экв.) в пиридине добавляли 3—4 экв. TPSNT. Реакционную смесь выдерживали при 20° С 1 ч, а в случае конденсации блоков длиной более шести звеньев — 2 ч. После прохождения реакции смесь разлагали льдом, упаривали и остаток распределяли между хлороформом и 0,1 М раствором ТЕАВ. Хлороформный слой упаривали и хроматографировали на силикагеле с градиентной элюцией этанолом в хлороформе. Выходы, определяемые спектрофотометрически по поглоще-

нию элюата при 280 нм, составляли 70—90% в расчете на нуклеозидный компонент.

3. *Полное удаление защитных групп.* После проведения последней конденсации реакционную смесь, содержащую 5—10 мкмоль олигонуклеотидов, обрабатывали трихлоруксусной кислотой для удаления монометокситритильной группы и после нейтрализации насыщенным раствором KHSO_3 органическую фазу упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 0,5 мл пиридина и добавляли 5 мл 0,5 М раствора *n*-нитробензальдоксима лития, полученного смешиванием 25 мл 2 М водного раствора LiOH с 8,26 г (0,05 моль) *син*-4-нитробензальдоксима, растворенного в 75 мл пиридина. Гомогенную смесь выдерживали 12 ч при 20° С, затем нейтрализовали 50% CH_3COOH и экстрагировали этилацетатом. Водный слой упаривали и остаток обессоливали на колонке с биогелем P-2 (1 × 20 см). Деблокированные обессоленные олигомеры очищали ионообменной ВЭЖХ на Partisil SAX-10. Анализ гомогенности и дополнительную очистку проводили обращенно-фазовой хроматографией на Lichrosorb RP-18 с элюцией градиентом ацетонитрила (5—20%) в 0,05 М триэтиламмонийацетате.

4. *Лигазная шивка фрагментов.* 5'- ^{32}P -Фосфорилированные олигонуклеотиды одной из цепей (кроме 5'-концевого олигонуклеотида, введившегося в реакцию нефосфорилированным) в количестве 400—500 пмоль каждого смешивали с комплементарными олигонуклеотидами второй цепи в стехиометрическом соотношении. Полученную смесь (100 мкл) нагревали до 70° С и в течение 2,5 ч охлаждали до 20° С. Затем добавляли $1/_{10}$ общего объема реакционной смеси 10-кратного лигазного буфера (результатирующие концентрации: 66 мМ трис- HCl (рН 7,8), 6,6 мМ MgCl_2 , 10 мМ β -меркаптоэтанол, 100 мкМ АТФ) и 30 ед. ДНК-лигазы. Смесь выдерживали 20 ч при 20° С и 2 мин при 70° С. Фрагменты осаждали, добавив к смеси $1/_{10}$ объема 3 М AcONa (рН 7,5) и 3 объема этанола. Промытый 70% этанолом и высушенный осадок растворяли в формамиде и подвергали электрофорезу в 15% ПААГ с 7 М мочевиной. С помощью электроэлюции выделяли фрагмент нужной длины, сорбируя его на ионообменной бумаге DE-81. Фрагмент десорбировали 1,5 М раствором NaCl , рН 8,5 (3 × 20 мкл), при 50° С. Полученный раствор обессоливали на колонке (0,5 мл) с биогелем P-4 в 1 мМ трис- HCl (рН 8), 0,1 мМ EDTA. Выходы сшитых фрагментов составляли 50—70%.

5. *Клонирование промоторного и SD-фрагментов.* Фрагмент, содержащий SD-сайт в количестве 1—2 пмоль, отжигали с 0,2 мкг *EcoRI*-*Bam*HI-гидролизованной РФ ДНК фага M13mp9 [22] в лигазном буфере в течение 1 ч, затем добавляли 30—50 ед. акт. ДНК-лигазы и инкубировали 12 ч при 0° С. Полученную лигазную смесь использовали для трансфекции компетентных клеток *E. coli* JM103 [23], которые затем высевали на селективные чашки, содержащие 50 мкг/мл Ygal и 10^{-3} М IPTG, для отбора гибридных фагов. Негативные колонки переносили в питательный бульон УТ × 2. После инкубации при 37° С в течение 16 ч клетки осаждали из культуральной среды полиэтиленгликолем 6000 и выделяли фаговые частицы. ДНК из фагов получали обработкой фенолом с последующим осаждением этанолом.

Гибридизацию с олигонуклеотидами проводили по методу, описанному в работе [24]. Колонии, давшие положительный ответ, использовали для получения РФ ДНК. SD-Фрагмент резали из РФ ДНК фага рестриктазами *EcoRI* и *HindIII* и шивали с *EcoRI*-*HindIII* гидролизованной плазмидой pBR327 [25], как описано выше. После трансформации компетентных клеток *E. coli* JM103 клоны с гибридными плазмидами отбирали по фенотипу $\text{Ap}^r \text{Tc}^s$. Полученные из отобранных клонов плазмиды pEMB300 обрабатывали рестриктазой *EcoRI* и отжигали с фрагментом, содержащим промотор гена α -амилазы. После лигазной шивки и трансформации клеток *E. coli* JM103, проведенных в стандартных условиях, отбирали клоны с фенотипом $\text{Ap}^r \text{Tc}^r$.

Авторы выражают благодарность В. А. Петренко за предоставление препаратов IPTG и Ygal.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ohmura K., Shiroza T., Nakamura K., Nakayama A., Yamane K., Yoda K., Yamasaki M., Tamura G. J. *Biochem.*, 1984, v. 95, № 1, p. 87—93.
2. А. с. 1092176 (СССР). Способ получения искусственного гена интерферона α -2 человека и способ получения полипептида с активностью интерферона микробиологическим синтезом/Колосов М. Н., Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова Н. В., Чувпило С. А. и др. Заявл. 29.09.82, № 3493457/28-13(149574). Опубл. в Б. И., 1984, № 18.
3. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. *Nucl. Acids Res.*, 1977, v. 4, № 2, p. 353—371.
4. А. с. 828671 (СССР). Способ удаления тритильных защитных групп с производных нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов/Беликов С. И., Горбунов Ю. А., Попов С. Г. Заявл. 14.05.79, № 2768602/23-04. Опубл. в Б. И., 1982, № 12.
5. Arentzen R., van Boeckel C. A. A., van der Marel G., van Boom J. H. *Synthesis*, 1979, № 2, p. 137—139.
6. Köster H., Hoppe N., Kohli V., Kröpelin M., Kaut H., Kulikowski K. *Nucl. Acids Res.*, Symposium Ser., 1980, № 7, p. 39—60.
7. Kwiatkowski M., Heikkilä J., Björkman S., Chattopadhyaya J. B., Seliger H. *Chem. Scripta*, 1983, v. 22, № 1, p. 30—40.
8. А. с. 809866 (СССР). Способ удаления цианэтильной защитной группы с производных моно- и олигонуклеотидов/Беликов С. И., Горбунов Ю. А., Попов С. Г. Заявл. 14.05.79, № 2793503/23-04. Опубл. в Б. И., 1982, № 12.
9. Jones S. S., Rayner B., Reese C. B., Ubasawa A., Ubasawa M. *Tetrahedron*, 1980, v. 36, № 21, p. 3075—3085.
10. Силъяков А. Н., Ломакин А. И., Ямщиков В. Ф., Попов С. Г. *Биоорганич. химия*, 1982, т. 8, № 4, с. 490—498.
11. Belagaje R., Brush C. K. *Nucl. Acids Res.*, 1982, v. 10, № 20, p. 6295—6303.
12. Ejimov V. A., Reverdatto S. V., Chakhmahcheva O. G. *Nucl. Acids Res.*, 1982, v. 10, № 21, p. 6675—6694.
13. Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Быстров Н. С., Северцова И. В., Колосов М. Н. *Биоорганич. химия*, 1983, т. 9, № 5, с. 706—710.
14. Калашикова В. В., Самуков В. В., Шубина Т. Н., Ямщиков В. Ф. *Биоорганич. химия*, 1983, т. 9, № 5, с. 666—672.
15. Maxam A. M., Gilbert W. *Methods Enzymol.*, 1980, v. 65, p. 498—560.
16. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Северцова И. В., Колосов М. Н. *Докл. АН СССР*, 1984, т. 278, № 5, с. 1250—1253.
17. Tanaka T., Weisblum B. J. *Bacteriol.*, 1975, v. 121, № 1, p. 354—362.
18. Richardson C. C. In: *Procedures in Nucleic Acids Research*. V. 2/Eds Cantoni G. L., Davies D. R. N. Y.: Harper and Row, 1971, p. 815—828.
19. Graf H. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 564, № 1, p. 225—234.
20. Cohen S. N., Chang A. C. Y., Hsu L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, v. 69, № 8, p. 2110—2114.
21. Birnboim H. C., Doly J. *Nucl. Acids Res.*, 1979, v. 7, № 6, p. 1513—1523.
22. Messing J., Vieira J. *Gene*, 1982, v. 19, № 3, p. 269—276.
23. Messing J., Crea R., Seeburg P. H. *Nucl. Acids Res.*, 1981, v. 9, № 2, p. 309—321.
24. Grunstein M., Hogness D. S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, v. 72, № 10, p. 3961—3965.
25. Covarrubias L., Cervantes L., Covarrubias A., Soberon M., Vichido I., Blanco A., Kupersztoch-Portnoy Y. M., Bolivar F. *Gene*, 1981, v. 13, № 1, p. 25—35.

Поступила в редакцию
11.VII.1985

После доработки
2.X.1985

CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS OF THE GENETIC ELEMENTS
FOR EXPRESSION OF SYNTHETIC GENES IN *BACILLUS SUBTILIS* CELLS

GORBUNOV Yu. A., DANILYUK N. K., ILJICHEV A. A.,
KRASNYYKH V. N., LOMAKIN A. I., POPOV S. G.,
SHCHELKUNOV S. N.

All-Union Research Institute of Molecular Biology,
Kol'tsovo, Novosibirsk Region

In order to obtain the recombinant *Bacillus subtilis* strain, a transcriptional-translational control unit of the α -amylase gene \bar{c} of *B. amyloliquefaciens* was synthesized. The oligodeoxyribonucleotides were prepared by the modified triester method in solution and by the solid-phase approach. Then these oligonucleotides were joined by DNA ligase into two fragments which were cloned in the phage M13mp9 DNA and the plasmid pBR327. A plasmid harboring the site regulating the transcription of the α -amylase gene may be employed as vector for cloning the promoter-containing fragments in *E. coli* cells.