



УДК 547.962.32+546.07

СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

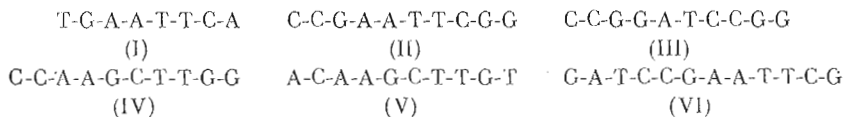
XXII. СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ САЙТЫ РЕСТРИКТАЗ *EcoRI* И *BamI* *

*Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В.,
Быстров Н. С., Волдырева Е. Ф., Чернов Б. К.,
Колосов М. Н.*

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

В качестве линкеров для конструирования рекомбинантных ДНК синтезированы самокомплементарные олигодезоксинуклеотиды С-*G-A-A-T-T-C-G* (XVII), *G-A-T-C-C-G-A-A-T-T-C-G* (VI), *A-T-C-C-G-A-A-T-T-C-G-G-A-T* (XXXVII) и *G-A-T-C-C-G-A-A-T-T-C-G-G-A-T-C* (XXXVIII), которые в двухцепочечной форме содержат сайт рестриктазы *EcoRI* в середине дуплекса и, за исключением (XVII), имеют неполные сайты *BamI* на концах цепей. Окта-, додека- и тетрадекануклеотиды (XVII), (VI) и (XXXVII) синтезированы химически, фосфотриэфирным методом с использованием ТПС-тетразолида в качестве конденсирующего реагента. Гексадекануклеотид (XXXVIII) синтезирован энзиматически, путем достраивания 12-мера (VI) четырьмя дезоксинуклеозидтрифосфатами с помощью Т4 ДНК-полимеразы. Олигомеризация додекануклеотида (VI) под действием Т4 ДНК-лигазы и затем гидролиз эндонуклеазой *EcoRI* привели к изомерному додекануклеотиду *A-A-T-T-C-G-G-A-T-C-C-G* (XI) с обращением последовательности рестриктазных сайтов *EcoRI* и *BamI*.

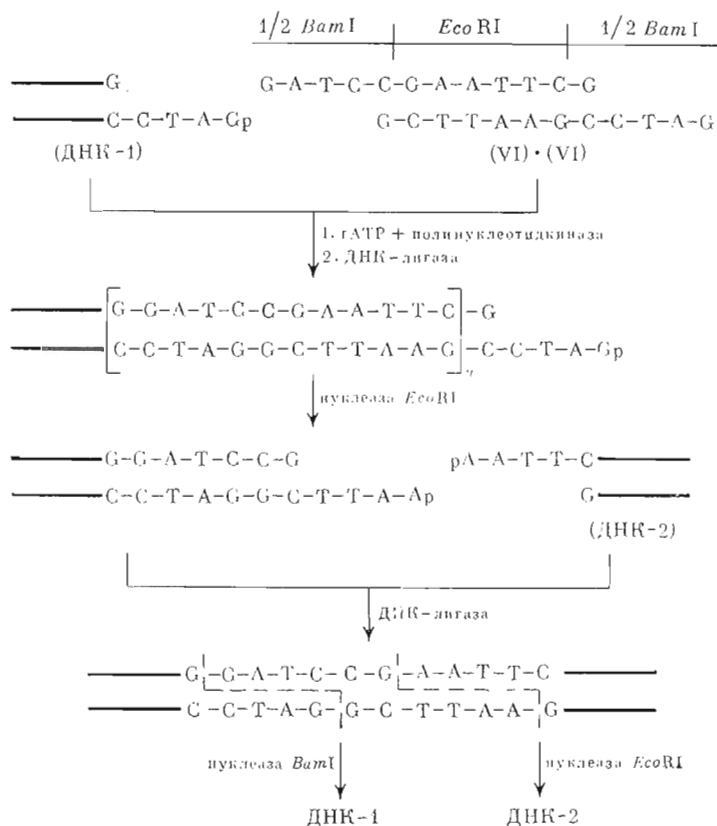
Для конструирования рекомбинантных ДНК значительный интерес представляют самокомплементарные олигодезоксинуклеотиды, которые содержат рестриктазные сайты, т. е. участки, специфически расщепляемые эндонуклеазами рестрикции. Такие олигонуклеотиды, получившие название линкеров, или адапторов, позволяют соединять между собой фрагменты ДНК, имеющие некомплементарные концы, и избирательно разрезать образующуюся рекомбинантную ДНК с выделением исходных фрагментов. В последние годы были синтезированы и использованы в работах по геной инженерии самокомплементарные олигодезоксинуклеотиды (I) [2—4], (II) [5—7], (III) [5], (IV) [4, 5, 8] и (V) [9, 10].



* Сообщение XXI см. [1]. Используются обозначения, рекомендованные номенклатурной комиссией IUPAC — IUB, но символ *d* для краткости опущен, так как в статье упоминаются нуклеотиды только дезоксирибы. Другие сокращения: DMTr — *n*, *n*-диметокситригид, MSTri — мезитилсульфотриазолид, NBSTri — *n*-нитробензолсульфотриазолид, TPSTet — 2,4,6-триизопропилбензолсульфотетразолид, TEAB — триэтиламмония бикарбонат, BAP — бактериальная щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1), VPDE — фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1), \mp — *n*-хлорфенилфосфатная группа $n\text{-ClC}_6\text{H}_4\text{OPO}_3$.

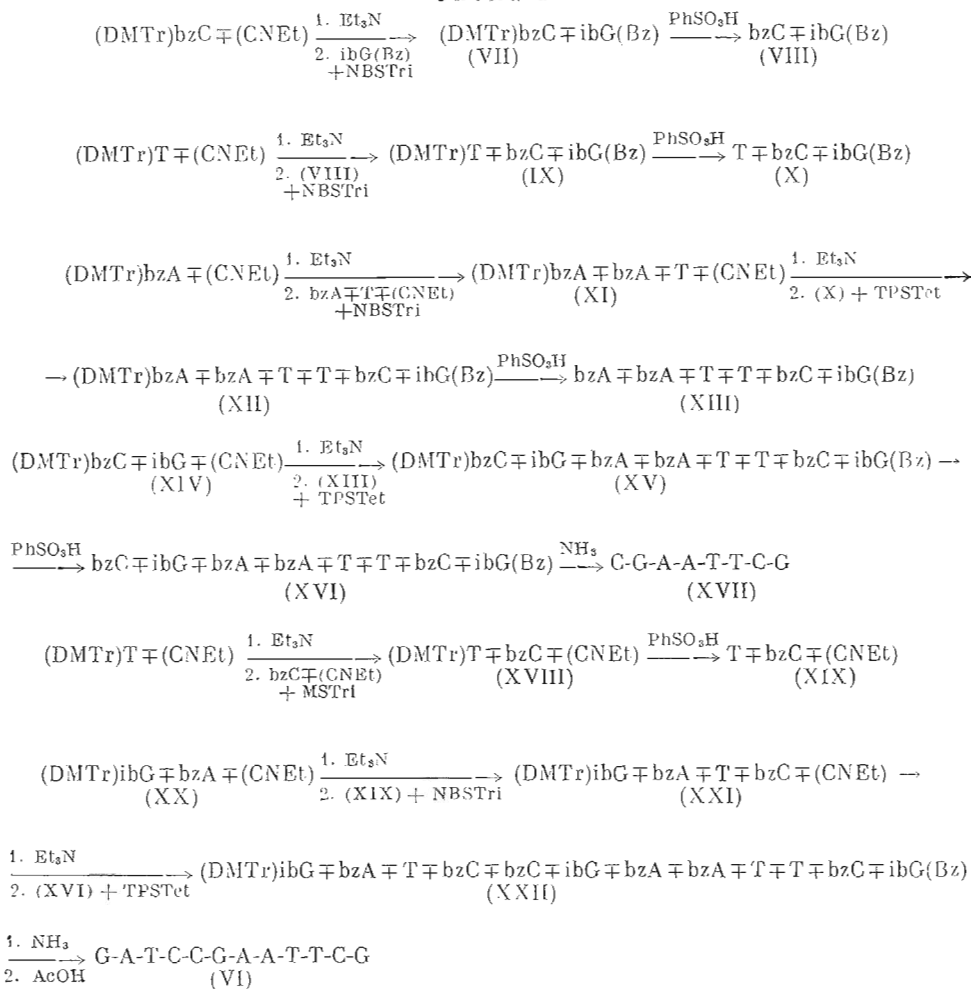
Олигонуклеотиды (I) — (V) в двухцепочечной форме имеют ровные концы и поэтому могут быть соединены (встык) только с такими фрагментами ДНК, которые тоже имеют ровные концы. Между тем для расщепления ДНК на крупные фрагменты очень часто используют эндонуклеазы *Eco*-RI, *Bam*I и другие рестриктазы, которые образуют выступающие концы. Для соединения таких фрагментов мы синтезировали частично самокомплементарный додекадезоксинуклеотид (VI). Его дуплекс (VI)·(VI) имеет в середине сайт *Eco*RI, а по краям — «половинные сайты» *Bam*I и предназначен для соединения выступающих концов с последующей регенерацией исходных ДНК из рекомбинантной молекулы, как показано на схеме 1.

С х е м а 1



Синтез додекануклеотида (VI) был нами осуществлен фосфотриэфирным методом по схеме 2. Исходными веществами служили полностью защищенные 2'-дезокс-3'-нуклеотиды, в которых 5'-гидроксил блокирован диметокситритильной группой, фосфатный остаток — *n*-хлорфенильной и β-цианэтильной группами, а аминогруппа — ацилом (изобутирилом в G и бензоилом в A и C); 3'-гидроксил в конечном нуклеозиде был защищен бензоильным остатком. Принципиальная схема синтеза, т. е. последовательность соединения мононуклеотидов в олигонуклеотидные блоки и затем в единую цепь, являлась следующей: (GA + TC) + {CG + [(A + AT) + (T + CG)]}. В качестве конденсирующего реагента при получении ди-, три- и тетра-нуклеотидов использовали *n*-нитробензолсульфотриазолид (NBSTri), а на дальнейших стадиях полученные блоки конденсировали между собой при помощи тетразолида триизопропилбензолсульфокислоты (TPSTet). Соотношения реагентов и выходы продуктов конденсаций указаны в таблице. Избирательное деблокирование 5'-гидроксила проводили путем кратковременной обработки бензолсульфокислотой в

С х е м а 2



смеси хлороформ — метанол при 0°, Р-защитную цианэтильную группу удаляли путем β-элиминирования с помощью триэтиламина в пиридиновом растворе, а полное деблокирование аминогрупп и фосфатных остатков, т. е. отщепление всех N-ацильных и Р-хлорфенильных групп, осуществляли аммонолизом в тех же условиях, что и ранее [11].

Продукты межнуклеотидных конденсаций выделяли адсорбционной хроматографией на силикагеле, контролируя полную разделение при помощи ТСХ на пластинках с силуфолом. Полностью деблокированные олигонуклеотиды выделяли аниообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе при pH 7,5 и очищали рехроматографией при pH 3,5, элюируя градиентом концентрации NaCl (от 0 до 0,4 M) в 7 M растворе мочевины. Чистота и нуклеотидная последовательность синтезированных веществ были доказаны введением 5'-концевой ³²P-метки с последующим частичным VPDE-гидролизом и двухмерным разделением продуктов реакции путем электрофореза на ацетилцеллюлозе и гомохроматографии. Полученные нуклеотидные карты представлены на рис. 1 а, в.

В этом синтезе наряду с конечным додекануклеотидом (VI) был промежуточно получен полностью самокомплементарный октануклеотид (XVII). Его дуплекс (XVII)·(XVII) содержит сайт рестриктазы *EcoRI* и может быть использован в качестве линкера для создания гибридных ДНК, по-

Межнуклеотидные конденсации

Р-Компонент		ОН-Компонент		Конденсирующий реагент, ммоль		Продукт конденсации		
Структура		Структура		ммоль	ммоль	Время, ч	Формула	Выход, %
(DMTr)bzC≡(CNEt)	0,67	ibG (Bz)	0,61	2,02	48	VII	65	
(DMTr)bzC≡(CNEt)	1,47	ibC≡(CNEt)	1,39	4,43	48	XIV	43	
(DMTr)T≡(CNEt)	2,45	bzC≡(CNEt)	2,05	6,14 *	48	XVIII	71	
(DMTr)ibG≡(CNEt)	2,44	bzA≡(CNEt)	2,33	7,69	36	XX	54	
(DMTr)ibG≡(CNEt)	0,73	ibG≡(CNEt)	0,57	1,45	1	XXIII	85	
(DMTr)T≡(CNEt)	0,2	bzC≡ibG (Bz)	0,17	0,5	48	IX	72	
(DMTr)bzA≡(CNEt)	0,42	bzA≡T≡(CNEt)	0,38	1,04	48	XI	71	
(DMTr)bzC≡(CNEt)	0,19	bzC≡ibG≡(CNEt)	0,12	0,37	2	XXXII	37	
(DMTr)ibG≡bzA≡(CNEt)	0,63	T≡bzC≡(CNEt)	0,57	1,58	48	XXI	61	
(DMTr)ibG≡ibG≡(CNEt)	0,16	bzA≡T (Ac)	0,12	0,32	1,5	XXV	76	
(DMTr)bzA≡T≡(CNEt)	0,055	bzC≡bzC≡ibC≡(CNEt)	0,027	0,11	2	XXXV	91	
(DMTr)bzA≡bzA≡T≡(CNEt)	0,11	T≡bzC≡ibG (Bz)	0,86	0,23	1,5	XII	90	
(DMTr)T≡bzC≡(CNEt)	0,10	ibG≡ibG≡bzA≡T (Ac)	0,05	0,2	1,5	XXVII	46	
(DMTr)bzC≡ibG≡(CNEt)	0,13	bzA≡bzA≡T≡T≡bzC≡ibG (Bz)	0,61	0,25	3	XV	78	
(DMTr)ibG≡bzA≡T≡bzC (CNEt)	0,52	bzC≡ibG≡bzA≡bzA≡T≡T≡bzC≡ibG (Bz)	0,26	0,11	4	XXII	53	
(DMTr)bzA≡bzA≡T≡(CNEt)	0,043	T≡bzC≡ibG≡ibG≡bzA≡T (Ac)	0,020	0,09	2	XXIX	82	
(DMTr)bzA≡T≡bzC≡ibG≡(CNEt)	0,013	bzA≡bzA≡T≡T≡bzC≡ibG≡bzA≡T (Ac)	0,005	0,04	6	XXXVI	79	

* В качестве конденсирующего реагента использовались метилленсульфотриазиды.

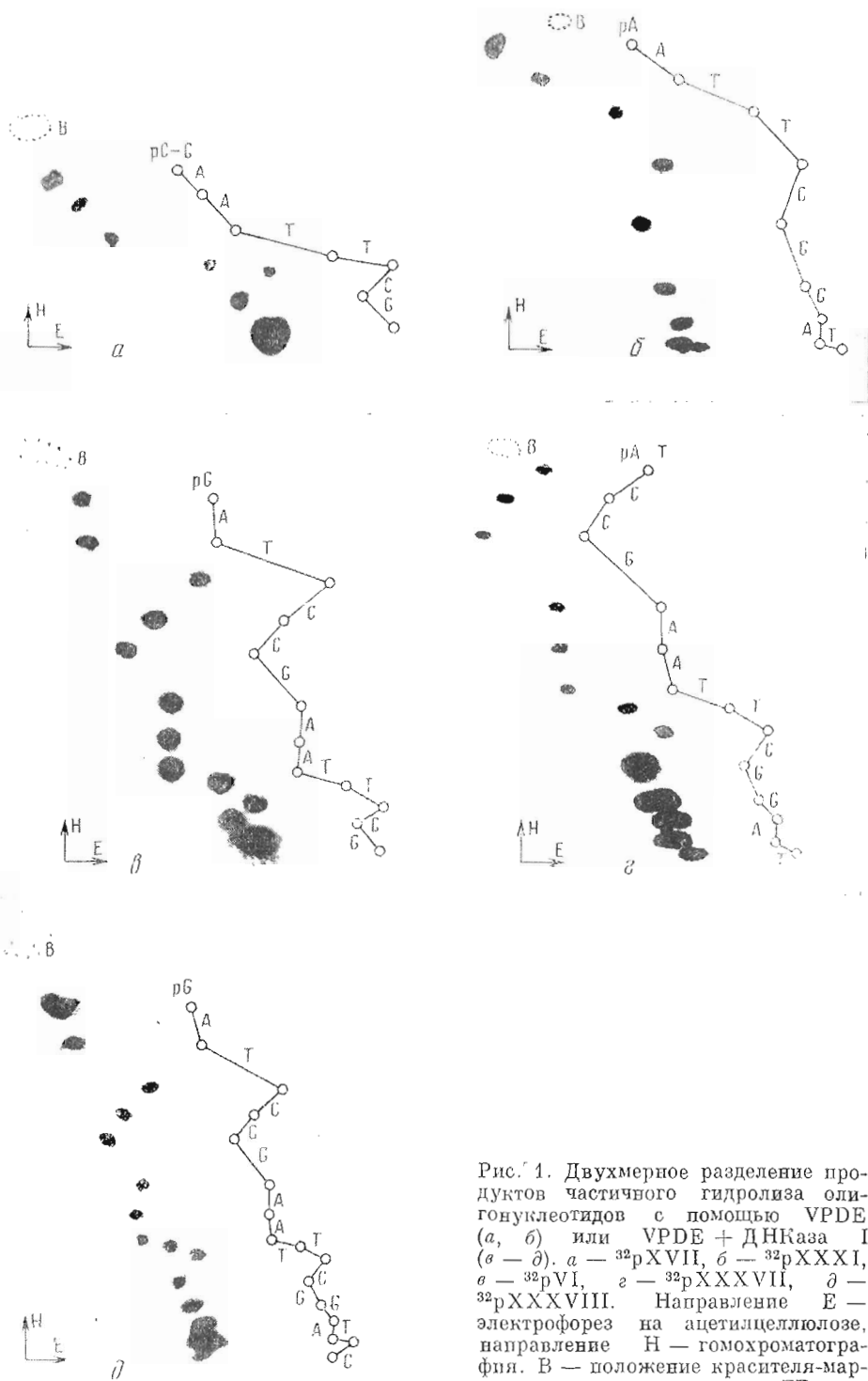
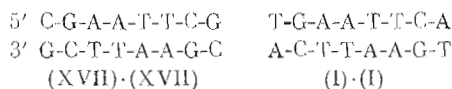


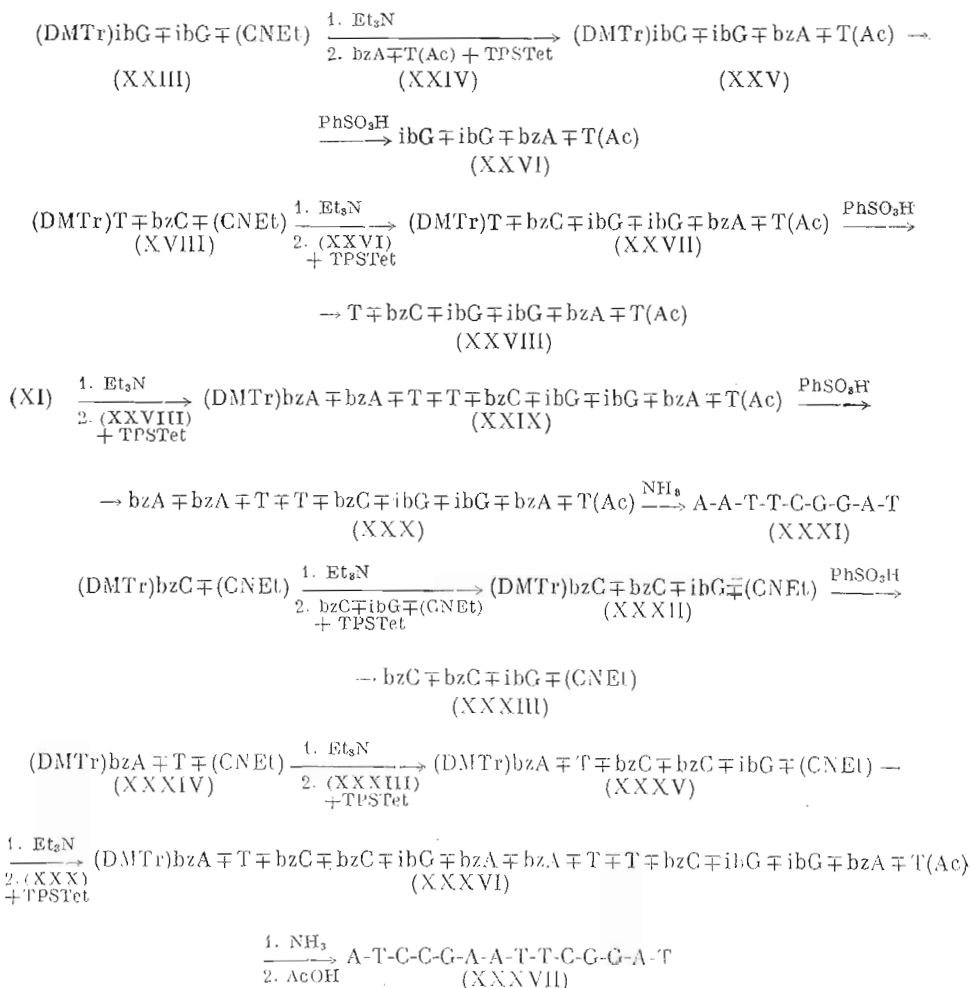
Рис. 1. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза олигонуклеотидов с помощью VPDE (а, б) или VPDE + ДНКазы I (в - г). а - 32 P XVII, б - 32 P XXXI, в - 32 P VI, г - 32 P XXXVII, д - 32 P XXXVIII. Направление E — электрофорез на ацетицеллюлозе, направление H — гомохроматография. В — положение красителя-маркера ксиленцианола FF

добно тому как дуплекс (I)·(I) был использован ранее для встраивания синтетического *lac*-оператора в плазмиду рМВ9 [3].



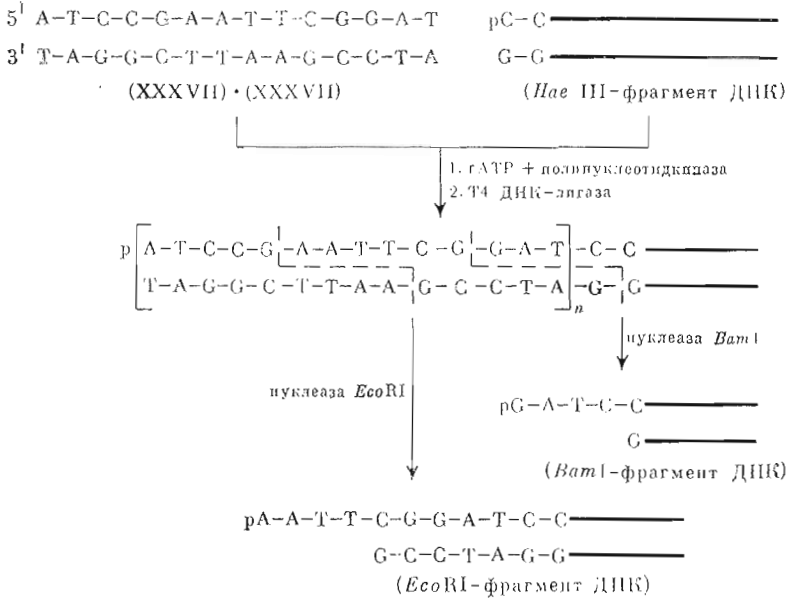
Нами были синтезированы также два других линкера, которые тоже имеют ровные концы и *EcoRI*-сайт в середине цепи, но, кроме того, содержат «неполные сайты» *BamI* и благодаря большей длине цепи образуют более устойчивые дуплексы. Первый из них, тетрадекадезоксинуклеотид (XXXVII), был получен фосфотриэфирным синтезом по схеме 3. В этом

Схема 3

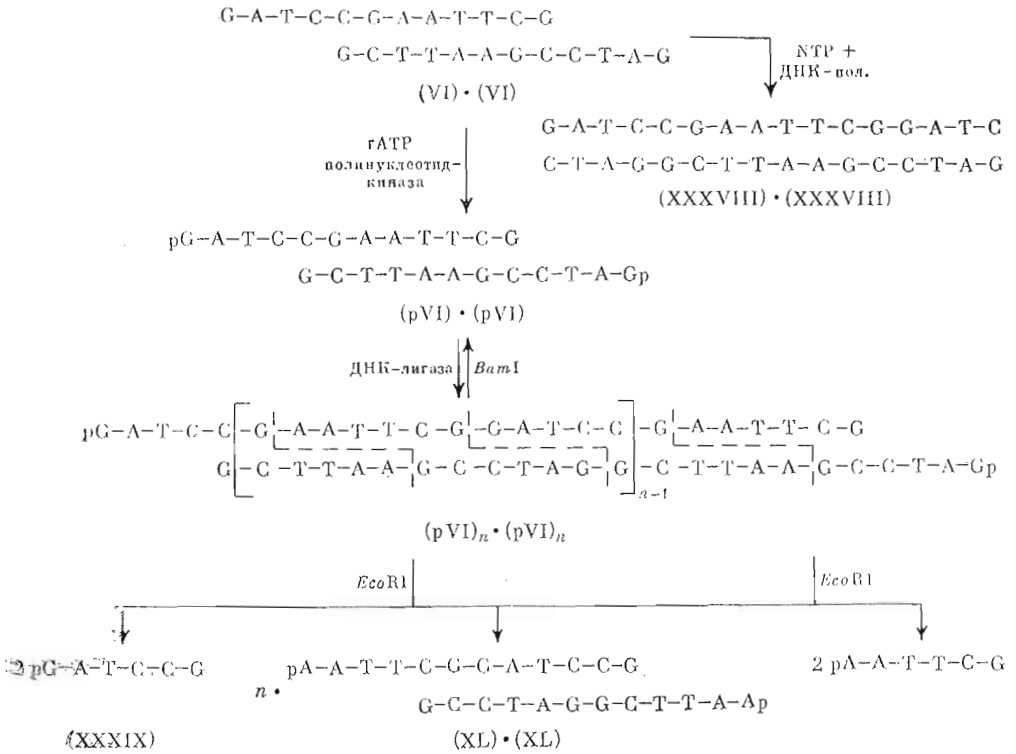


синтезе все межнуклеотидные конденсации проводили с помощью TPSTet, причем олигонуклеотидные блоки соединяли в следующей последовательности: [AT + (C + CG)] + {AAT + [TC + (GG + AT)]}. 5'-Концевой динуклеотид и 3'-концевой динуклеозидмонофосфат (XXIV) были синтезированы нами в одной из предыдущих работ [11] двумя путями, фосфодиэфирным и фосфотриэфирным способом, а остальные блоки получены в процессе синтеза додекануклеотида (VI). Избирательное и полное удаление защитных групп, выделение защищенных и деблокированных олиго-

С х е м а 4



С х е м а 5



нуклеотидов и доказательство их структуры были выполнены так же, как в синтезе по схеме 2. Нуклеотидные карты промежуточного нонануклеотида (XXXI) и конечного тетрадекануклеотида (XXXVII) приведены на рис. 1 б, г.

Дуплекс этого тетрадекануклеотида (XXXVII)·(XXXVII) можно с помощью ДНК-лигазы T4 присоединить к любому фрагменту ДНК, имеющему хотя бы один ровный конец, в частности к фрагментам, которые получены с помощью рестриктаз *HaeI*, *HaeIII* или их изоэнзимов и поэтому оканчиваются динуклеотидными парами 5'-CC и 3'-GG. В этом случае (схема 4) после присоединения линкера (XXXVII)·(XXXVII) на конце полинуклеотидной цепи создается тандем сайтов *EcoRI*—*BamI* и при действии одной из этих рестриктаз генерируется «липкий» конец для встраивания фрагмента ДНК в соответствующий вектор.

Другой линкер с ровными концами был синтезирован нами энзиматически из уже упоминавшегося додекануклеотида (VI). При достраивании его дуплекса (VI)·(VI) четырьмя дезоксирибонуклеозидтрифосфатами с помощью ДНК-полимеразы фага T4 (см. схему 5) был получен двухцепочечный гексадекануклеотид (XXXVIII)·(XXXVIII), строение которого было доказано путем введения 5'-концевой ³²P-метки с последующим гидролизом при совместном действии эндо- и экзонуклеазы — панкреатической ДНКазы и VPDE; полученный фингерпринт и его интерпретация представлены на рис. 1д. Гексадекануклеотид (XXXVIII)·(XXXVIII) позволяет создавать тандем сайтов *EcoRI*—*BamI* на концах не только тех ДНК, для которых пригоден в качестве линкера тетрадекануклеотид (XXXVII)·(XXXVII) (схема 4), но и в случае фрагментов, образующихся, например, при действии рестриктазы *AluI* и имеющих лишь по одной паре (5'-C)·(3'-G) на концах дуплекса.

Наконец, додекануклеотид (VI)·(VI) был нами превращен в еще один линкер — изомерный додекануклеотид (XL)·(XL) (схема 5). Формально это превращение представляет собой перестановку гексануклеотидных блоков G-A-T-C-C-G и A-A-T-T-C-G и приводит к обращению последовательности рестриктазных сайтов: $1/2$ *BamI*—*EcoRI*— $1/2$ *BamI* → $1/2$ *EcoRI*—*BamI*— $1/2$ *EcoRI*. Для его осуществления додекануклеотид (VI)·(VI) был сначала 5'-фосфорилирован с помощью 74-полинуклеотидкиназы, а затем подвергнут олигомеризации (pVI)·(pVI) → (pVI)_n·(pVI)_n под действием T4 ДНК-лигазы. Чтобы упростить анализ продуктов лигазной реакции, на стадии фосфорилирования использовали [γ -³³P]rATP низкой активности и после лигирования концевой ³³P-фосфат удаляли действием ВАР, а затем при помощи [γ -³²P]rATP высокой активности (до 1000 Ки/ммоль) вводили 5'-терминальную ³²P-метку. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20% полиакриламидном геле и их структуру определяли путем химической деградации по методу Максама — Гилберта [12] с изменениями, описанными в работе [13].

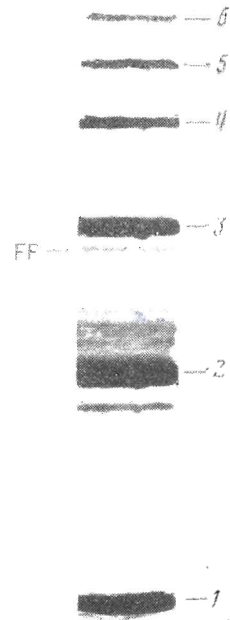


Рис. 2. Электрофорез в 20% полиакриламидном геле 5'-³²P-меченых продуктов олигомеризации додекануклеотида (pVI)·(pVI) под действием T4 ДНК-лигазы. 1 — исходный олигонуклеотид, 2 и 3 — его димеры, 4 и 5 — тримеры, 6 — тетрамер. Стрелкой указано положение красителя-маркера ксиленианола FF

При электрофорезе было обнаружено (рис. 2) шесть полос олигомеров $(pVI)_n$, начиная с исходного додекануклеотида (pVI) (полоса 1) и кончая тетрамером $(pVI)_4$ (полоса 6). Неожиданно оказалось, что олигонуклеотиды из полос 2 и 3 оба имеют 24-членную последовательность димера $(pVI)_2$, а из полос 4 и 5 — 36-членную последовательность тримера $(pVI)_3$. Возможно, это объясняется тем, что в условиях гель-электрофореза они денатурируют неполностью и существуют каждый в виде двух конформеров, подобно тому как описано для продуктов лигирования додекануклеотида (IV) [14]. При действии на эти олигомеры эндонуклеазой *BamI* был получен ^{32}P -меченый исходный додекануклеотид (pVI) , а при гидролизе эндонуклеазой *EcoRI* обнаружен радиоактивный гексануклеотид (XXXIX), что является косвенным доказательством образования нового додекануклеотида (XL), имеющего обратную (по сравнению с первоначальной) последовательность сайтов *EcoRI*--*BamI*.

Авторы выражают благодарность С. И. Городецкому (Институт общей генетики АН СССР) за препарат T4 ДНК-полимеразы.

Экспериментальная часть

Общие сведения об эксперименте см. [11]. Исходные вещества — полностью защищенные дезоксирибонуклеозиды и дезокси-3'-нуклеотиды были тинтированы, как описано ранее [11], но дезоксигуанозин был *N*-изобутирилирован, а не ацетилирован. Для межнуклеотидных конденсаций применялся TPSTet, свежеполученный по методу [15]; т. пл. 105—106° (лит. данные [15]: т. пл. 95—97°). В работе использовали ДНКазу I (КФ 3.1.4.5), щелочную фосфатазу *E. coli* (КФ 3.1.3.1) и фосфодиэстеразу змеиного яда (КФ 3.1.4.1) фирмы Worthington (США); T4 ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1), эндонуклеазы *EcoRI* и *BamI* и тРНК производства СКТБ БАН Главмикробиопрома (Новосибирск); $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ (3000 Ки/ммоль) фирмы Amersham. $[\gamma\text{-}^{33}P]ATP$ (20—50 Ки/ммоль) был получен по модифицированному методу [12]. T4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) выделена по методу [17] и очищена от нуклеаз гель-хроматографией на сефадексе G-100. T4 ДНК-полимераза (КФ 2.7.7.7) предоставлена С. И. Городецким (Москва).

Удаление *O*-защитной диметокситритильной группы проводили по методу [15] 2% раствором бензолсульфокислоты в смеси хлороформ — метанол (7 : 3) в течение 3 мин при температуре от —5 до 0°. После нейтрализации 5% раствором $NaHCO_3$ и промывки насыщенным раствором $NaCl$ детритилированное соединение выделяли хроматографией на колонке с силикагелем и использовали в качестве ОН-компонента для межнуклеотидной конденсации.

Удаление *P*-защитной цианэтильной группы осуществляли по методу [16] действием триэтиламина в пиридине (1 : 3) в течение 15 ч при 0°. Раствор упаривали и сиропообразный остаток использовали в качестве Р-компонента для межнуклеотидной конденсации.

Фосфотриэфирные межнуклеотидные конденсации проводили как описано ранее [11], но в качестве конденсирующего реагента наряду с NBSTri и MSTri использовали TPSTet. Условия реакции и выход продуктов конденсации приведены в таблице.

Полное удаление защитных групп осуществляли действием при комнатной температуре сначала 30% аммиака (2 сут), а затем 80% уксусной кислоты (30 мин). Деблокированные олигонуклеотиды выделяли хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой в градиенте концентрации $NaCl$ (от 0 до 0,4 М) в 7 М мочевины, pH 7,5, и рехроматографировали при pH 3,5.

5'-Фосфорилирование олигонуклеотидов. Раствор 2 нмоль $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ или $[\gamma\text{-}^{33}P]ATP$ упаривали досуха и к остатку прибавляли 1 нмоль оли-

гонуклеотида в 100 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис·НСl (рН 9,0), 10 мМ MgCl₂, 1 мМ спермин и 10 мМ дитиотреит. Смесь нагревали 15 с при 90°, быстро охлаждали до 0°, прибавляли 2 ед. Т4-полинуклеотидкиназы и инкубировали 45—60 мин при 37°. Реакцию останавливали прибавлением 0,5 М раствора EDTA до концентрации 20 мМ и продукт фосфорилирования выделяли хроматографией на колонке (0,6×16 см) с сефадексом G-50. Выход 5'-меченого олигонуклеотида составлял 80—95% (по включенно ³²P или ³³P).

Получение нуклеотидных карт. а. Частичный гидролиз VPDE проводили как описано в работе [19].

б. Частичный гидролиз VPDE в присутствии ДНКазы I. Четыре порции 5'-меченого олигонуклеотида (по $1 \cdot 10^4$ — $2 \cdot 10^4$ имп/мин) упарили досуха, к каждой из них прибавили 1 мкл раствора ДНКазы I (1 мкг/мл) в буфере, содержащем 50 мМ трис·НСl (рН 8,5), 10 мМ MgCl₂, и 1 мкл раствора VPDE в том же буфере, содержащий соответственно 0,025; 0,05; 0,1 и 0,2 мкг фермента, и инкубировали 15—30 мин при 25°. Все четыре порции смешали с 50 мкг тРНК и нанесли на полоску ацетилцеллюлозы (3×55 см), смоченную 5% раствором уксусной кислоты в 7 М мочеvine, рН 3,5, содержащим 1 мМ EDTA. Электрофорез проводили в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5) в течение 40—60 мин при 5000 В, используя в качестве стандарта смесь красителей (0,1% растворы ксиленианола FF, оранжевого G и кислотного фуксина). Продукты гидролиза переносили на пластинку (20×20 см) со смесью целлюлоз MN 300 и DEAE MN 300 (3,5 : 1; толщина слоя 200 мкм), разделяли гомохроматографией при 65° в 2% гомосмеси V или VI [18] и радиоавтографировали на пленке РТ-1, РМ-1 или Kodak XR-5. Полученные нуклеотидные карты представлены на рис. 1.

Олигомеризация двуцепочечного додекануклеотида (pVI)·(pVI). 5 нмоль меченого додекануклеотида (³³pVI) ($7,5 \cdot 10^6$ имп/мин) нагревали 20 мин при 85° в 300 мкл буфера, содержащего 67 мМ трис·НСl, 10 мМ MgCl₂ и 10 мМ дитиотреит, после чего медленно, за 4 ч, охладили до 10° и выдержали при этой температуре 20 ч. Затем к смеси прибавили 4 мкл 5 мМ гАТР и 100 ед. Т4 ДНК-лигазы и инкубировали 24 ч при 10°, отбирая пробы для определения радиоактивного фосфата, устойчивого к действию ВАР (за 24 ч 60% ³³P приобрело устойчивость к ВАР). Реакцию останавливали прибавлением 50 мкл 0,5 М EDTA и продукты реакции выделяли хроматографией на колонке с сефадексом G-50 (0,6×16 см), элюируя буфером, содержащим 10 мМ трис·НСl (рН 7,5), 1 мМ NaCl и 0,1 мМ EDTA, и контролируя оптическую плотность элюата при помощи МСФН-1. Первый пик ($2,4 \cdot 10^6$ имп/мин; 75% ³³P устойчиво к ВАР) упарили досуха, растворили в 200 мкл буфера, содержащего 0,1 М трис·НСl (рН 9,0), 10 мМ MgCl₂, прибавили 0,2 ед. ВАР и инкубировали 1 ч при 55°. Фермент удаляли экстракцией (2×100 мкл) смесью фенол — хлороформ, 3 : 1. Водный раствор хроматографировали на колонке с сефадексом G-50 (0,6×16 см) в 0,05 М ТЕАВ, рН 8,0, собирая фракции по 0,3 мл/3 мин. Первый радиоактивный пик, содержащий фосфорилированные олигомеры исходного додекануклеотида, 5'-фосфорилировали при помощи [γ -³²P]гАТР (75 Ки/ммоль) и Т4-полинуклеотидкиназы, как описано выше. Продукты реакции ($4 \cdot 10^7$ имп/мин) разделяли электрофорезом в пластинах (20×20×0,14 см) 20% полиакриламидного геля, содержащего 7 М мочеvinu, и обнаруживали радиоавтографией (рис. 2). Отдельные полосы геля, содержащие индивидуальные олигонуклеотиды, измельчали растиранием и вещества элюировали при 37° буфером, содержащим 0,5 М NH₄OAc (рН 6,0), 10 мМ Mg(OAc)₂, 0,1% додецилсульфат натрия и 1 мМ EDTA. Кусочки геля отделяли центрифугированием, затем к элюату прибавляли 50—60 мкг тРНК в качестве носителя и олигонуклеотиды осаждали прибавлением спирта.

Расщепление олигомеров (pVI)_n·(pVI)_n эндонуклеазами рестрикции. а. $1 \cdot 10^5$ — $2 \cdot 10^5$ имп/мин олигонуклеотида (³²pVI)_n·(³²pVI)_n (n = 2 или 3)

гидролизовали 20 ч при 27° с помощью 10 ед. нуклеазы *EndoR· BamHI* в 15 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис·HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂ и 6 мМ 2-меркаптоэтанол. Затем прибавили 3 мкл 50% глицерина, содержащего 0,1% растворы ксиленианола FF и бромфенолового синего, и полученную смесь подвергли электрофорезу в пластине (20×40×0,15 см) 20% полиакриламидного геля. При последующей автордиографии было найдено, что единственным меченым продуктом реакции является олигонуклеотид, имеющий подвижность исходного (pVI).

б. К раствору $1 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^5$ имп/мин олигонуклеотида $(^{32}\text{pVI})_n \cdot (^{32}\text{pVI})_n$ ($n = 2$ или 3) в 15 мкл буфера, содержащего 0,1 М трис·HCl (pH 7,5), 0,1 М NaCl, 5 мМ MgCl₂, 0,1% Тритон X-100 и 10 мМ 2-меркаптоэтанол, прибавили 10 ед. нуклеазы *EndoR· EcoRI*. Смесь инкубировали 20 ч при 27° и обрабатывали, как в предыдущем опыте. Автордиограмма геля показала, что единственным ³²P-содержащим продуктом реакции является олигонуклеотид, подвижность которого соответствует ³²P-гексануклеотиду (XXXIX).

Достройка концов в двуцепочечном додекануклеотиде (VI)·(VI). К раствору 200 ммоль (5·10⁶ имп/мин) додекануклеотида (³²pVI) в 200 мкл буфера, содержащего 67 мМ трис·HCl (pH 8,0), 6 мМ MgCl₂, 36 мМ NaCl, 6 мМ 2-меркаптоэтанол и 0,1 мМ каждого из трифосфатов АТР, ГТР, СТР и ТТР, прибавили 5 ед. Т4 ДНК-полимеразы и смесь инкубировали 30 мин при 37°. Реакцию останавливали прибавлением 20 мкл 0,5 М EDTA и образовавшийся гексадекануклеотид (XXXVII)·(XXXVIII) выделяли хроматографией на сефадексе G-50 в 0,05 М ТЕАВ, pH 8,0. Выход $3,8 \cdot 10^6$ имп/мин (76%), нуклеотидная карта приведена на рис. 1d.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин Ю. А., Виноградов С. В., Колосов М. Н. (1978) Биоорг. химия, 4, 1181—1190.
2. Green P. J., Nussbaum A. E., Tobias L., Garfin D. E., Boyer H. W., Goodman H. M. (1975) J. Mol. Biol., 99, 237—261.
3. Heyneker H. L., Shine J., Goodman H. M., Boyer H., Rosenberg J., Dickerson R. E., Narang S. A., Itakura K., Lin S., Riggs A. D. (1976) Nature, 263, 748—752.
4. Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pietet R., Tiseher E., Rutter W. J., Goodman H. M. (1977) Science, 196, 1313—1319.
5. Scheller R. H., Dickerson R. E., Boyer H. W., Riggs A. D., Itakura K. (1977) Science, 196, 177—180.
6. Scheller R., Tomas T., Lee A., Niles W., Klein W., Britten R., Davidson E. (1977) Science, 196, 197—200.
7. Shine J., Seelburg P. H., Martial J. A., Baxter J. D., Goodman H. M. (1977) Nature, 270, 494—499.
8. Seelburg P. H., Shine J., Martial J. A., Baxter J. D., Goodman H. M. (1977) Nature, 270, 486—494.
9. Bahl C. P., Mariani K. J., Wu R., Stawinski J., Narang S. A. (1976) Gene, 1, 81—92.
10. Bahl C. P., Wu R., Stawinski J., Narang S. A. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 966—970.
11. Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Северцова И. В., Чернов Б. К., Колосов М. Н. (1978) Биоорг. химия, 4, 523—534.
12. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 560—564.
13. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) Биоорг. химия, 3, 1420—1422.
14. Nan M. B., Smith U. O. (1977) Nucleic Acids Res., 4, 4211—4221.
15. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. (1977) Nucleic Acids Res., 4, 353—371.
16. Sood A. K., Narang S. A. (1977) Nucleic Acids Res., 4, 2757—2765.
17. Panet A., van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Raas A. J., Lillchange J. R., Kleppe K. (1973) Biochemistry, 12, 5045—5050.
18. Jay E., Vambara R., Radmanabhan R., Wu R. (1974) Nucleic Acids Res., 1, 331—353.
19. Берлин Ю. А., Каган М. З., Колосов, М. Н., Коробко В. Г. (1976) Биоорг. химия, 2, 1063—1072.

Поступила в редакцию
7.VII.1978

SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES. XXII. THE
SYNTHESIS OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDES CONTAINING SITES FOR
RESTRICTION ENDONUCLEASES *EcoRI* AND *BamI*

DOBRYNIN V. N., KOROBKO V. G., SEVERTSOVA I. V.,
BYSTROV N. S., BOLDYREVA E. F., CHERNOV B. K.,
KOLOSOV M. N.

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

As potential linkers for recombinant DNAs, self-complementary oligodeoxynucleotides CGAATTCG (XVII), GATCCGAATTCG (VI), ATCCGAATTCGGAT (XXXVII), and GATCCGAATTCGGATC (XXXVIII) containing each an *EcoRI* site at the centre and (except for XVII) two partial *BamI* sites at the termini of the duplex have been prepared. The octa- (XVII), dodeca- (VI), and tetradecanucleotide (XXXVII) were chemically synthesized by phosphotriester approach with triisopropylbenzenesulphonyl tetrazolide (TPSTet) as a coupling reagent. The hexadecanucleotide (XXXVIII) was enzymatically synthesized by extension of the dodecamer (VI) with the four deoxynucleoside triphosphates in the presence of T4 DNA polymerase. T4 DNA ligase catalyzed self-joining of the dodecanucleotide (VI) followed by digestion with endonuclease *EcoRI* yielded the isomeric dodecanucleotide AATTCGGATCCG, thus resulting in inversion of the restriction sites order.
