



УДК 547.963.32.07

## СИНТЕЗ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ДНК БАКТЕРИОФАГА *fd*

II. \* ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ НЕМОДИФИЦИРОВАННОГО ПРОМОТОРА С ПОМОЩЬЮ ДНК-ЛИГАЗЫ И НУКЛЕАЗЫ  $S_1$

Общников Ю. А., Ефилов В. А., Чахламчева О. Г.

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

Осуществлен химико-ферментативный синтез серии двухцепочечных полинуклеотидов длиной от 45 до 86 пар оснований, представляющих собой варианты промоторной области G2 ДНК бактериофага *fd*, различающиеся размерами нетранскрибируемого района.

Ранее мы сообщали о синтезе тридекадезоксирибонуклеотида d(A-A-A-T-C-A-G-G-T-C-T-T-T) (A) и декадезоксирибонуклеотида d(A-C-C-C-T-G-T-C-T-A) (B), соответствующих 5'-концевому фрагменту (—) цепи промоторной области G2 ДНК бактериофага *fd*, синтез которой был предпринят с целью изучения функциональной топографии комплекса РНК-полимераза — ДНК [1]. В настоящей работе\*\* описывается получение шести олигонуклеотидов (C) — (H), которые в совокупности с первыми двумя составляют полную последовательность (—) цепи промоторной области, ферментативное соединение этих сегментов на природной ДНК фага *fd* и получение немодифицированного промотора G2.

d(T-T-A-T-A-G-T-C-A-G-A)	(C)	d(A-G-A-T-T-A-A-G-A-G)	(F)
d(A-G-C-A-A-A-G-C-G-A-A)	(D)	d(G-A-A-G-C-C-C-G-A-A)	(G)
d(T-T-G-C-A-T-C-A-A-A-A)	(E)	d(A-G-A-C-T-T-C-A-A-A)	(H)

Химический синтез олигонуклеотидов (C) — (H) проводился фосфодиэфирным методом, нуклеотидную цепь наращивали в направлении от 5'-к 3'-концу. 5'-Концевыми блоками во всех случаях являлись динуклеозидмонофосфаты: в ундекануклеотидах (C) и (E) d[(MeOTr)T-T], в декануклеотиде (G) — d[(MeOTr)bzG-bzA] и в соединениях (D), (F) и (H) — d[(MeOTr)bzA-ibG]. Дальнейшее удлинение цепи осуществлялось за счет присоединения моно- и в основном динуклеотидов. На последней стадии в сегментах (C), (E), (F) и (H) в качестве 3'-концевых блоков использовались тринуклеотиды (см. «Экспериментальную часть»). Выделение промежуточных и конечных соединений проводилось как это описано для сегментов (A) и (B) [1]. Первичную структуру олигодезоксирибонуклеотидов (C) — (H) после введения  $^{32}\text{P}$ -метки на 5'-конец подтверждали нуклеотидными картами по методу Сенгера [2].

\* Сообщение I см. [1].

\*\* В статье использованы следующие нестандартные сокращения: ТЕАВ — бикарбонат триэтиламония, ТРС — 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид.

ДНК фара +20 +10 0 -10 -20 -30 -40 -50 -60 -70  
 fd (+) ... ТТТАГТТТТТАГТССАГАААТGGGACAGATAАТАТСАГТСТТGGTTTCGTTAАCGTAGTTTTTCTAAATTCCTCTCGGGCTTCTGAACTTTATAGGGC...  
 3' 5'

G2-мФНК  
 Промотор

1) сегменты A-H  
 2) T4-ДНК-лигаза

fd (+) ... ТТТАГТТТТТАГТССАГААТGGGACAGATAАТАТСАГТСТТGGTTTCGTTAАCGTAGTTTTTCTAAATTCCTCTCGGGCTTCTGAACTTTATAGGGC...  
 (-) PAAATCAGGTCTTTACCCCTGTCTATTATA GTCAAAA GCAAA GCGAATTCGATCAAAAAGATTAA GAGGAA GCCCGAAA GACTTCAAA  
 5' A B C D E F G H 3'

S<sub>1</sub>- нуклеаза

(+) 3' ТТТАГТССАГААТGGGACAGATAАТАТСАГТСТТGGTTTCGTTAАCGTAGTTTTTCTAAATTCCTCTCGGGCTTCTGAACTTTATAGGGC... 5'  
 (-) 5' PAAATCAGGTCTTTACCCCTGTCTATTATA GTCAAAA GCAAA GCGAATTCGATCAAAAAGATTAA GAGGAA GCCCGAAA GACTTCAAA 3'  
 +15 -30 -41 -51 -61 -71

G2-мФНК  
 Промотор

Для получения промоторной области мы использовали подход, состоящий в ковалентном связывании химически синтезированных сегментов, соответствующих только (-)-цепи промотора, с помощью ДНК-лигазы на (+)-нити ДНК фага *fd* с последующим вырезанием образующегося при этом дуплекса [4, 5]. Принципиальная возможностью лигазного сшивания двух олигонуклеотидов на природных одноцепочечных матрицах была показана ранее [6]. Наш подход основан на этих экспериментах и предполагает одновременное соединение нескольких синтетических сегментов в сочетании с использованием  $S_1$ -нуклеазы *Aspergillus oryzae*, количественно расщепляющей одноцепочечные участки ДНК [7]. По сравнению с традиционной методологией синтеза двухцепочечных полинуклеотидов, которая предусматривает химический синтез и ферментативное соединение олигонуклеотидов, составляющих в совокупности обе цепи целевого фрагмента [8], настоящий подход позволяет вдвое сократить трудоемкие химические стадии, поскольку в качестве одной из цепей дуплекса используется участок природной ДНК. Схема на с. 1783 иллюстрирует принцип данного метода.

После 5'-фосфорилирования с помощью  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  и T4-полинуклеотидкиназы [9] синтетические олигонуклеотиды (A)-(H) гибридизовали с ДНК бактериофага *fd* дикого типа [(+)-нить] и инкубировали с T4-полинуклеотидлигазой. За ходом ферментативной реакции следили по превращению  $^{32}\text{P}$  фосфата из концевое в межнуклеотидный, устойчивый к действию щелочной фосфатазы *E. coli*, а также с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Для доказательства правильности

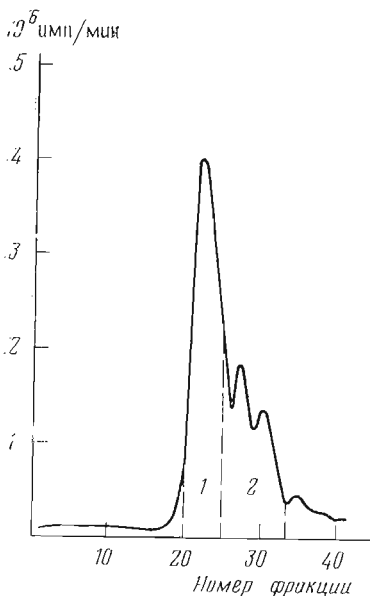


Рис. 1. Выделение дуплекса (A-G) геля-фильтрацией на колонке с биогеом А 1,5m (1×50 см) в 0,05 М ТЕАВ (рН 8,0), фракции по 0,8 мл/6 мин. Пик 1 ( $1,6 \cdot 10^5$  имп/мин) содержит целевой полинуклеотид (A-G), пик 2 ( $0,7 \cdot 10^5$  имп/мин) содержит фрагменты дуплекса (A-G)

сочленения олигонуклеотидов фрагменты (-)-цепи промотора отделяли от кольцевой ДНК электрофорезом в 8% полиакриламидном геле (в условиях, описанных для разделения цепей дуплексов [10]) и после 5'-дефосфорилирования подвергали исчерпывающему гидролизу до 5'- и 3'-нуклеотидов действием соответственно фосфодиэстеразы змеиного яда и фосфодиэстеразы селезенки (анализ ближайших соседей, см. табл. 1).

При использовании 3–6-кратных избытков олигонуклеотидов относительно ДНК реакция заканчивалась через 2–4 ч и полученная при этом полинуклеотидная цепь на 70–80% представляла собой целевой фрагмент (A-H). В контрольных экспериментах по связыванию олигонуклеотидов в отсутствие матрицы продуктов лигазной реакции обнаружено не было. Аналогично были получены одноцепочечные полинуклеотиды, состоящие из четырех (A-D), пяти (A-E), шести (A-F) и семи (A-G) сегментов.

В результате обработки комплексов фрагментов (-)-цепи промотора с (+)-нитью ДНК фага *fd* нуклеазой  $S_1$  были получены пять двухцепочечных полинуклеотидов, представляющих собой варианты промоторной области G2, содержащие по 15 пар оснований в постинициационном районе и 30 [дуплекс (A-D)], 41 [дуплекс (A-E)], 51 [дуплекс (A-F)], 61 [дуплекс (A-G)] и 71 [дуплекс (A-H)] пар оснований в нетранскрибируемом районе. Дуплексы выделяли геля-филь-

Продукты гидролиза фосфодиэстеразами \* змеиного яда (VPDE)  
и селезенки (SPDE)  
Приведена радиоактивность, имп/мин (в скобках молярное отношение)

Полинуклеотид	VPDE				SPDE			
	дpT	дpC	дpA	дpG	дTp	дCp	дAp	дGp
(A-D)	8300 (1,0)	<100	15900 (1,915)	<100	2500 (1,0) <sub>1</sub>	<100	5100 (2,04)	<100
(A-E)	12400 (2,0)	<100	13100 (2,11) <sub>1</sub>	<100	3300 (1,0)	<100	9800 (2,97)	<100
(A-F)	14200 (2,03)	<100	21000 (3,0)	<100	4200 (1,0)	<100	15900 (3,80)	<100
(A-G)	10500 (2,1)	<100	14800 (2,96)	5000 (1,0)	3700 (1,03)	<100	13500 (3,75)	3600 (1,0)
(A-H)	7900 (2,026)	<100	16200 (4,15)	3900 (1,0)	2200 (1,0)	<100	11200 (5,09)	2300 (1,045)

\* После удаления 5'-концевого фосфата действием щелочной фосфатазы *E. coli*.

трацией на биогеле А 1,5м (рис. 1), их гомогенность проверяли электрофорезом в 8% полиакриламидном геле (рис. 3). Структура 86-звенного полинуклеотида (А-Н) после введения высокой 5'-концевой метки (~500 Ки/ммоль) была подтверждена методом химических модификаций Максама — Гилберта (см. рис. 2 в сообщении [4]).

Полученные в этой работе двухцепочечные фрагменты ДНК были использованы нами в дальнейшем при проведении исследований по определению минимальной длины промоторного района, достаточной для его нормального функционирования, а синтетические олигонуклеотиды (А) — (Н) — для получения модифицированных промоторов, применяемых в настоящее время для структурно-функционального изучения ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*.

### Экспериментальная часть

В работе использованы мононуклеотиды производства СКТБ БАН Главмикробиопроба (Новосибирск), триизопропилбензолсульфохлорид (Merck, ФРГ), ацетилцеллюлоза (Schleicher und Schüll, ФРГ), целлюлоза MN-300 и DEAE-целлюлоза MN-300 (Serva, ФРГ), DEAE-целлюлоза DE-23 (для колоночной хроматографии), DE-81 (бумага) и бумага № 1 (Whatman, Англия), сефадекс G-50 (Pharmacia, Швеция), биогель А 1,5м (Bio-Rad, США), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ ( $\leq 20$  и 3000 Ки/ммоль, Amersham, Англия), щелочная фосфатаза *E. coli* (КФ 3.1.3.1), фосфодиэстераза селезенки (КФ 3.1.4.1), фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1) и ДНКаза I (КФ 3.1.4.5) (Worthington, США), микрококковая пуклеаза (КФ 3.1.4.7) и S<sub>1</sub>-нуклеаза *Aspergillus oryzae* (P-L Biochemicals, США). Т4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) и Т4-полинуклеотидлигаза (КФ 6.5.1.1) были выделены по методу [11]. Гомосмеси и пластинки с DEAE-целлюлозой приготавливали как описано [3].

Хроматографию на бумаге проводили в системах этанол — 1М ацетат аммония (рН 7,5), 7:3 (А) и *n*-пропанол — 25% аммиак — вода, 55:10:35 (В).

Очищенный бактериофаг *fd* и одноцепочечную ДНК выделяли как описано Марвином и Шаллером [12], за исключением того, что фаг очи-

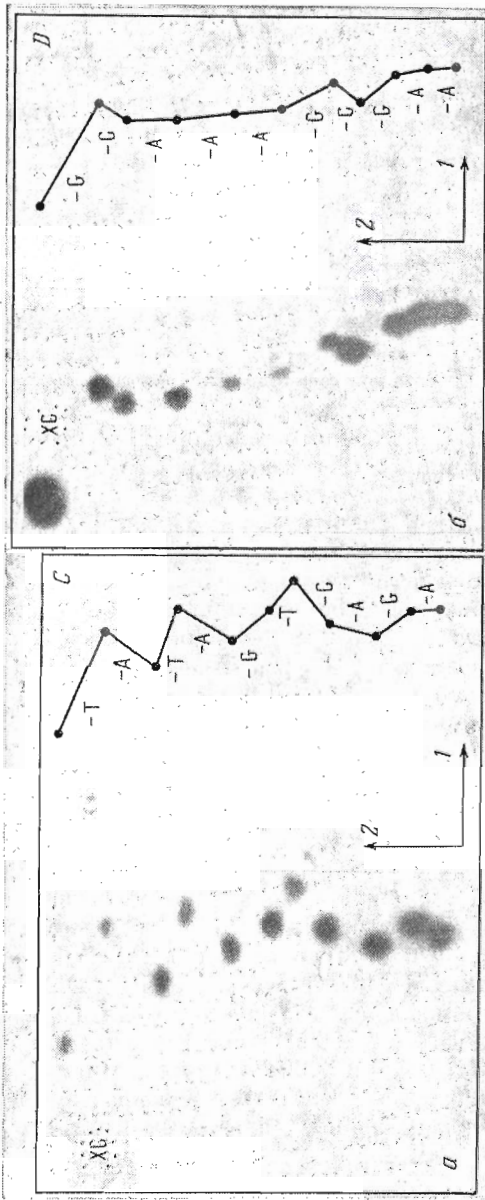


Рис. 2. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда меченых олигонуклеотидов. Направление 1 — электрофорез на ацетилцеллюлозе при pH 3,5, направление 2 — гомохроматография на пластинках DEAE-целлюлозы (20×20 см), гомосмесь 6 [3], ХС — пятно крапиволя ксенцианола FF. Приведены нуклеотидные карты: *a* — ундекануклеотида d(<sup>32</sup>p-T-T-A-T-A-G-T-C-A-G-A) (C), *б* — ундекануклеотида d(<sup>32</sup>p-A-G-C-A-A-A-C-C-G-A-A) (D), *в* — ундекануклеотида d(<sup>32</sup>p-T-T-G-C-A-T-C-A-A-A) (E), *г* — декануклеотида d(<sup>32</sup>p-A-G-A-T-T-A-A-G-A-G) (F), *д* — декануклеотида d(<sup>32</sup>p-G-A-A-G-C-C-G-A-A) (G), *е* — декануклеотида d(<sup>32</sup>p-A-G-A-C-T-T-C-A-A-A) (H)

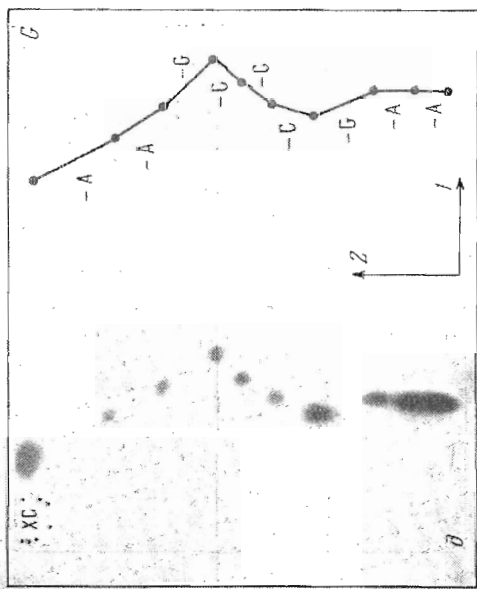
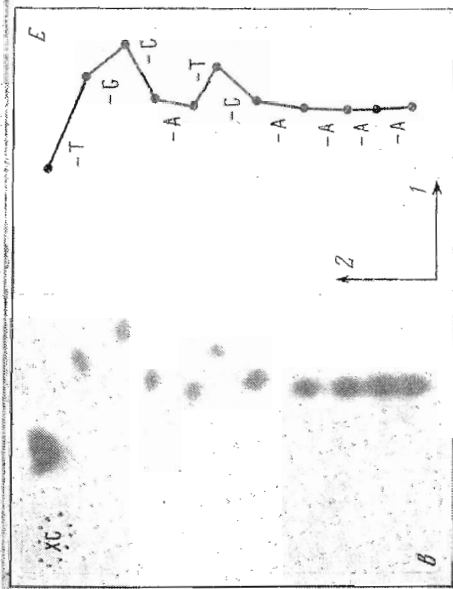
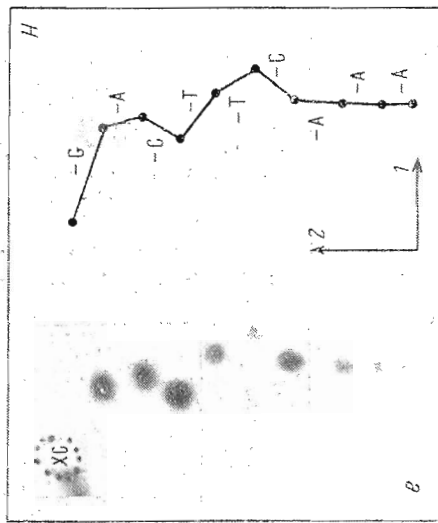
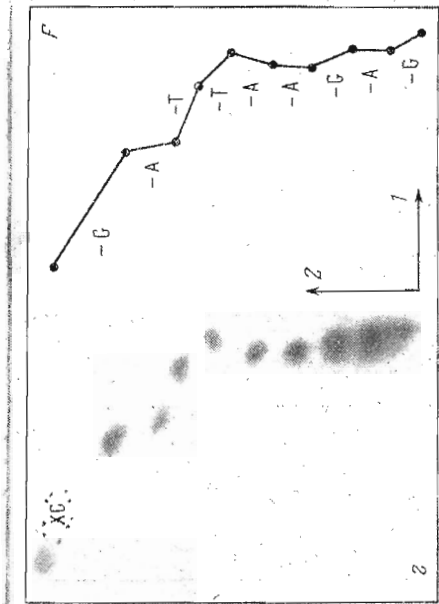


Таблица 2

Олигонуклеотид	ОН-компонент, ммоль	Р-компонент, ммоль	TPS ммоль	Выход, %	НдрТ в системе А	УФ-характеристики			
						λ <sub>макс.</sub> нм	λ <sub>мин.</sub> нм	ε <sub>260</sub> /ε <sub>266</sub>	ε <sub>260</sub> /ε <sub>268</sub>
d(MeOTr)T-T (I)	d(MeOTr)T (3,9)	dpT (Ac) (8,0)	20,0	74,5	2,0	268	247	0,76	0,82
d(MeOTr)T-T-bzA-T (II)	(I) (0,5)	dpbzA-T (Ac) (1,3)	4,85	54,0	1,45	274	246	0,76	1,12
d(MeOTr)T-T-bzA-T-bzA-ibG (III)	(II) (0,16)	dpbzA-ibG (Ac) (0,8)	3,0	69,0	1,25	277, 264π	243	0,82	1,07
d(MeOTr)T-T-bzA-T-bzA-ibG-T-anC (IV)	(III) (0,08)	dpT-anC (Ac) (0,68)	2,5	45,0	0,80	278	245	0,83	1,08
d(MeOTr)T-T-bzA-T-bzA-ibG-T-anC-bzA-ibG-bzA (V)	(IV) (0,015)	dpbzA-ibG-bzA (Ac) (0,15)	0,7	33,8	—	279	240	0,90	1,08
d(MeOTr)bzA-ibG (VI)	d(MeOTr)bzA (4,6)	dpbzA (Ac) (9,0)	18,0	70,0	1,95	263, 278	248	0,91	1,09
d(MeOTr)bzA-ibG-anC (VII)	(VI) (1,0)	dpanC (Ac) (4,0)	10,0	63,5	1,80	283, 260π	247	0,93	1,19
d(MeOTr)bzA-ibG-anC-bzA-bzA (VIII)	(VII) (0,31)	dpbzA-bzA (Ac) (1,25)	4,8	53,0	1,40	282	247	0,93	1,35
d(MeOTr)bzA-ibG-anC-bzA-bzA-ibG (IX)	(VIII) (0,12)	dpbzA-ibG (Ac) (0,73)	3,04	58,5	1,05	281, 261π	242	0,90	1,26
d(MeOTr)bzA-ibG-anC-bzA-bzA-ibG-anC-ibG (X)	(IX) (0,047)	dpanC-ibG (Ac) (0,48)	1,89	37,6	0,65	281, 261π	240	0,88	1,19
d(MeOTr)bzA-ibG-anC-bzA-bzA-ibG-anC-ibG-bzA-bzA (XI)	(X) (0,0063)	dpbzA-bzA (Ac) (0,126)	0,47	49,0	—	282, 262π	240	0,92	1,21
d(MeOTr)T-T-ibG (XII)	(I) (0,84)	dpibG (ib) (3,5)	8,5	59,5	1,90	265	247	0,85	0,82
d(MeOTr)T-T-ibG-anC (XIII)	(XII) (0,42)	dpanC (Ac) (1,8)	4,5	14,5	1,65	265, 302π	243	0,83	0,94
d(MeOTr)T-T-ibG-anC-bzA-T (XIV)	(XIII) (0,061)	dpbzA-T (Ac) (0,59)	2,2	63,0	1,20	275	243	0,84	1,03
d(MeOTr)T-T-ibG-anC-bzA-T-anC-bzA (XV)	(XIV) (0,035)	dpanC-bzA (Ac) (0,42)	1,5	43,0	0,85	280, 262π	243	0,85	1,18
d(MeOTr)T-T-ibG-anC-bzA-T-anC-bzA-bzA-bzA (XVI)	(XV) (0,0114)	dpbzA-bzA-bzA (Ac) (0,102)	0,54	35,0	—	280, 262π	240	0,88	1,18

Таблица 2 (продолжение)

Олигонуклеотид	ОН-компонент, ммоль	Р-компонент, ммоль	TPS, ммоль	P <sub>выход</sub>	R <sub>дпт в</sub> системе	УФ-характеристики			
						λ <sub>макс</sub> , нм	λ <sub>мин</sub> , нм	ε <sub>300</sub> / ε <sub>260</sub>	ε <sub>300</sub> / ε <sub>260</sub>
d(MeOTr)bzA-ibG-bzA (XVII)	(VI) (1,0)	dpbzA (Ac) (2,1)	6,0	60,0	2,10	263, 284	249, 271	0,96	1,12
d(MeOTr)bzA-ibG-bzA-T-T (XVIII)	(XVII) (0,3)	dpT-T (Ac) (0,76)	3,0	40,0	1,36	279, 263π	246	0,88	1,17
d(MeOTr)bzA-ibG-bzA-T-T-bzA-bzA (XIX)	(XVIII) (0,08)	dpbzA-bzA (Ac) (0,5)	1,85	40,0	0,78	280, 261π	245	0,90	1,24
d(MeOTr)bzA-ibG-bzA-T-T-bzA-bzA-ibG-bzA-ibG (XX)	(XIX) (0,01)	dpibG-bzA-ibG (Ac) (0,13)	0,6	28,0	—	280, 261π	244	0,87	1,13
d(MeOTr)bzG-bzA (XXI)	d(MeOTr)bzG (1,4)	dpbzA (Ac) (2,2)	4,5	71,0	1,85	265, 283	250	0,95	1,10
d(MeOTr)bzG-bzA-bzA-ibG (XXII)	(XXI) (0,5)	dpbzA-ibG (Ac) (1,0)	3,75	20,0	1,70	267, 285	249, 271	0,93	1,07
d(MeOTr)bzG-bzA-bzA-ibG-anC-anC (XXIII)	(XXII) (0,1)	dpanC-anC (Ac) (0,61)	2,11	36,0	1,20	283	247	0,93	1,21
d(MeOTr)bzG-bzA-bzA-ibG-anC-anC-ibG (XXIV)	(XXIII) (0,032)	dpanC-ibG (Ac) (0,32)	1,2	28,0	0,90	285, 262π	242	0,90	1,19
d(MeOTr)bzG-bzA-bzA-ibG-anC-anC-ibG-bzA-bzA (XXV)	(XXIV) (0,0063)	dpbzA-bzA (Ac) (0,126)	0,42	54,0	—	283, 261π	245	0,90	1,25
d(MeOTr)bzA-ibG-bzA-anC-T (XXVI)	(XVII) (0,25)	dpanC-T (Ac) (1,0)	3,5	33,0	1,65	283, 263π	245	0,91	1,14
d(MeOTr)bzA-ibG-bzA-anC-T-T-anC (XXVII)	(XXVI) (0,083)	dpT-anC (Ac) (0,55)	2,0	65,0	1,0	283	245	0,85	1,22
d(MeOTr)bzA-ibG-bzA-anC-T-T-anC-bzA-bzA (XXVIII)	(XXVII) (0,0242)	dpbzA-bzA-bzA (Ac) (0,192)	1,06	33,0	—	280	242	0,87	1,32
d(pbzA-bzA-bzA)	d(CNEt)pbzA (1,3)	dpbzA-bzA (Ac) (0,45)	2,8	37,0	1,0	280	245	0,95	1,42
d(pbzA-ibG-bzA)	d(CNEt)pbzA-ibG (0,4)	dpbzA (Ac) (2,0)	5,0	33,0	1,1	282, 262π	232	0,90	1,28
d(pibG-bzA-ibG)	d(CNEt)pibG (1,2)	dpbzA-ibG (Ac) (0,29)	2,2	64,0	1,2	260, 278π	230	0,87	0,83



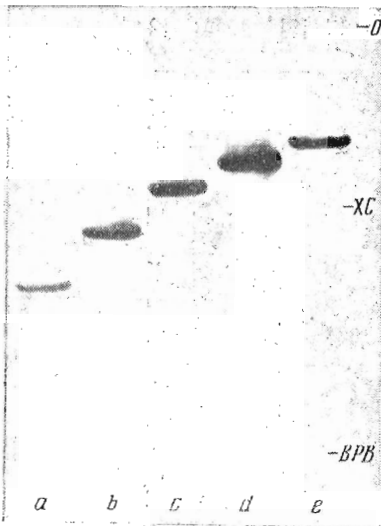


Рис. 3. Электрофорез синтетических дуплексов в 8% полиакриламидном геле (пластина  $20 \times 20 \times 0,15$  см) в 0,05 М трис-боратном буфере (рН 8,3), содержащем 1 мМ EDTA. *a* — дуплекс (A-D), *b* — дуплекс (A-E), *c* — дуплекс (A-F), *d* — дуплекс (A-G), *e* — дуплекс (A-H), O — страт, ХС — ксиленианол RF, ВРВ — бромфеноловый голубой

тверждалась нуклеотидными картами [2] (см. также [1]). Полученные при этом картины приведены на рис. 2.

*Соединение химически синтезированных [5'- $^{32}$ P] олигонуклеотидов на ДНК фага fd с помощью T4-полинуклеотидлигазы* проводили в инкубационной смеси, содержащей 50 мМ трис-HCl (рН 7,5), 40 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ дитиотреит, 0,5 мМ АТР, 1,3 мкМ ДНК фага fd [(+)-нить], 4–8 мкМ каждого олигонуклеотида и по 48 ед. акт. фермента на 100 мкл. До прибавления АТР, дитиотреита и лигазы смесь ДНК и меченых сегментов в буфере прогревали 3 мин при 90°С и медленно охлаждали до комнатной температуры. Реакцию проводили при 20°С в течение 2–4 ч и терминировали прибавлением EDTA до концентрации 0,05 М. Нуклеотидный материал осаждали после прибавления ацетата натрия до концентрации 0,1 М двукратным объемом спирта, центрифугировали при 6000 об/мин, осадок промывали спиртом и высушивали.

*Удаление одноцепочечных фрагментов ДНК S<sub>1</sub>-нуклеазой.* Осадок, полученный в предыдущем опыте, растворяли в буфере, содержащем 0,03 М ацетат натрия (рН 5,0), 0,3 М NaCl, 1 мМ ZnCl<sub>2</sub>. На 0,05 нмоль продуктов лигазной сшивки прибавляли 100 мкл буфера и 8 ед. акт. S<sub>1</sub>-нуклеазы. Инкубировали 1 ч при 20°С, прибавляли EDTA до концентрации 0,05 М и реакционную смесь наносили на колонку с биогелем А 1,5m (1×50 см). Элюцию проводили 0,05 М ТЕАВ при 4°С. Типичная картина разделения приведена на рис. 1. Гомогенность выделенных дуплексов подтверждали электрофорезом в 8% полиакриламидном геле, как показано на рис. 3.

*Анализ продуктов лигазного сшивания (метод ближайших соседей).* Исследуемый полинуклеотид после отделения от ДНК фага fd электрофорезом в полиакриламидном геле [10] и дефосфорилирования щелочной фосфатазой [16] растворяли в 100 мкл воды и делили на две порции,

щали осаждением полиэтиленгликолем (6000) [13].

Электрофорез в полиакриламидном геле проводили в вертикальных слабах с использованием в качестве электродного буфера 0,05 М трис-бората (рН 8,3) — 1 мМ EDTA.

При определении последовательности синтетических полинуклеотидов методом химических модификаций введение 5'- $^{32}$ P-концевой метки, разделение цепей, а также определение положения пиримидинов и гуанина проводили как описано в работе Максама и Гилберта [10], а определение положения пуринов (A+G) — кислотной апуринизацией [14, 15].

*Химический синтез, выделение и очистку олигодезоксирибонуклеотидов* проводили как описано ранее [1]. В табл. 2 и 3 приведены условия постановки межнуклеотидных конденсаций, выходы всех полученных соединений и их спектральные и хроматографические характеристики. Мономерный состав промежуточных олигонуклеотидов определяли ферментативным гидролизом фосфодиэстеразой змеиного яда по методу [16]. Первичная структура сегментов (C) — (H) после введения  $^{32}$ P-метки на 5'-конец [8] под-

Таблица 3

Олигонуклеотид	R <sub>d</sub> pT в си- стеме B	УФ-характеристики						Нуклеотидный состав								
		λ, нм						dA	dT	dG	dPA	dPT	dPG	dPC		
		λ <sub>max</sub> , нм	λ <sub>мин</sub> , нм	E <sub>252</sub> /E <sub>260</sub>	E <sub>270</sub> /E <sub>280</sub>	E <sub>280</sub> /E <sub>290</sub>	E <sub>300</sub> /E <sub>310</sub>									
d(T-T)	1,4	267	252					1,0				0,99				
d(T-T-A-T)	0,75	263	230	0,71	0,93	0,54	0,28	1,0			0,95	0,95	1,9			
d(T-T-A-T-A-G)	0,40	261	229	0,80	0,86	0,47	0,30	1,0			1,0	1,97	2,0	1,08		
d(T-T-A-T-A-G-T-C)	0,22	264	232	0,79	0,90	0,54	0,22					1,85	2,85	0,95	1,0	
d(T-T-A-T-A-G-T-C-A-G-A) (C)	—	260	238	0,85	0,88	0,59	0,25					4,0*	4,0*	2,0*	1,0*	
d(A-G)	1,15	255	230	0,99	0,75	0,40	0,16	0,97						1,0		
d(A-G-C)	0,75	257	232	0,93	0,89	0,58	0,22	0,96						1,0	1,05	
d(A-G-C-A-A)	0,45	258	234	0,88	0,77	0,34	0,17	1,0				2,05	1,0	0,99		
d(A-G-C-A-A-A-G)	0,33	257	233	0,83	0,76	0,35	0,20	0,95				2,95	2,05	1,0		
d(A-G-C-A-A-A-G-C-G)	0,15	257	230	0,86	0,80	0,42	0,22	1,0				2,80	2,90	1,98		
d(A-G-C-A-A-A-G-C-G-A-A) (D)	—	257	235	0,95	0,77	0,48	0,27					6,0*	3,0*	2,0*	2,0*	
d(T-T-G)	1,08	262	232	0,90	0,93	0,70	0,33		1,0				0,96	1,05		
d(T-T-G-C)	0,90	262	230	0,87	0,98	0,73	0,30		0,9				1,0	0,95	0,88	
d(T-T-G-C-A-T)	0,27	262	235	0,85	0,93	0,60	0,23		1,0			0,95	2,0	1,06	1,10	
d(T-T-G-C-A-T-C-A)	0,15	261	232	0,81	0,91	0,59	0,21		0,97			2,0	1,98	1,0	2,0	
d(T-T-G-C-A-T-C-A-A-A) (E)	—	260	233	0,83	0,86	0,53	0,22					5,0*	3,0*	1,0*	2,0*	
d(A-G-A)	0,90	258	230	0,86	0,78	0,39	0,17	1,0				0,93		0,58		
d(A-G-A-T-T)	0,47	260	232	0,83	0,82	0,45	0,22	1,0				0,88	2,0	0,95		
d(A-G-A-T-T-A-A)	0,25	258	230	0,82	0,78	0,38	0,23	0,96				3,0	1,95	1,0		
d(A-G-A-T-T-A-A-G-A-G) (F)	—	257	232	0,92	0,76	0,44	0,20					5,0*	2,0*	3,0*		
p(G-A)	1,05	258	230	0,89	0,82	0,48	0,23			0,97		1,0		1,0		
d(G-A-A-G)	0,65	256	233	0,96	0,74	0,37	0,24			0,89		1,9		1,0		
d(G-A-A-G-C-C)	0,40	256	228	0,94	0,84	0,50	0,20			1,0		2,0		0,90		
d(G-A-A-G-C-C-C-G)	0,20	260	234	0,93	0,92	0,62	0,21			1,0		1,85		2,10	3,05	
d(G-A-A-G-C-C-C-G-A-A) (G)	—	260	235	0,74	0,71	0,42	0,25					4,0*		3,0*	2,0*	
d(A-G-A-C-T)	0,42	259	230	0,90	0,82	0,56	0,29	1,0				0,89	1,0	0,98	0,97	
d(A-G-A-C-T-T-C)	0,18	262	233	0,83	0,91	0,55	0,25	0,95				1,0	1,85	1,0	2,10	
d(A-G-A-C-T-T-C-A-A-A) (H)	—	260	235	0,85	0,87	0,54	0,24					5,0*	2,0*	1,0*	2,0*	
d(pA-A-A)	0,70	259	228	0,78	0,60	0,32	0,12	1,0				2,65				
d(pA-G-A)	0,30	257	225	0,90	0,74	0,29	0,11					2,0		1,0		
d(pG-A-G)	0,40	255	223	1,0	0,76	0,47	0,18					1,0		1,97		

\* Определено на основании нуклеотидной карты.

одну из которых подвергали гидролизу до 5'-нуклеотидов, а другую — до 3'-нуклеотидов.

а) Гидролиз до 5'-мононуклеотидов проводили, инкубируя полинуклеотид [(1-5) · 10<sup>4</sup> имп/мин] с 50 мкг/мл ДНКазы I в течение 0,5 ч при 37°С в 75 мкл буфера, содержащего 0,02 М трис-HCl (pH 7,6) и 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, затем прибавляли 10 мкл 0,5 М натрий-глицинатного буфера (pH 9,2) и 5 мкг фосфодиэстеразы змеиного яда и инкубацию продолжали еще 0,5 ч. Полученную смесь подвергали электрофорезу на бумаге в пиридин-ацетатном буфере (pH 3,5) в течение 1 ч при 50 В/см, пятна мононуклеотидов локализовали радиоавтографией, вырезали и радиоактивность измеряли в толуальном сцинтиллаторе.

б) Гидролиз до 3'-мононуклеотидов осуществляли, инкубируя исследуемое вещество в 100 мкл 0,05 М натрий-глицинатного буфера (pH 9,2), содержащего 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, с 3 мкг микрококковой нуклеазы в течение 2 ч при 37°С, затем прибавляли 10 мкл 1 М ацетата аммония (pH 6,0), 2 мкл 1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 0,2 ед. акт. фосфодиэстеразы селезенки и инкубировали еще 2 ч при 37°С. Электрофорез и определение радиоактивности в мононуклеотидах проводили как в опыте «а».

Полученные результаты приведены в табл. 1.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. (1979) Биоорг. химия, **5**, 1329-1340.
2. Sanger F. (1973) in: *Virus Research* (Fox C. F., Robinson W. S., eds), pp. 573-599, Acad. Press, New York - London.
3. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) *Nucl. Acids Res.*, **1**, 331-353.
4. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. (1979) Биоорг. химия, **5**, 138-144.
5. Ovchinnikov Yu. A., Efimov V. A., Chakhmakhcheva O. G. (1979) *FEBS Lett.*, **100**, 341-346.
6. Besmer P., Miller R. C., Caruthers M. H., Kumar A., Minamoto K., van de Sande J. H., Sidorova N., Khorana H. G. (1972) *J. Mol. Biol.*, **72**, 503-522.
7. Changas G. S., Wu R. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4601-4606.
8. Khorana H. G., Agarwal K. L., Besmer P., Buchi H., Caruthers M. H., Cashion P. J., Fridkin M., Jay E., Kleppe K., Kleppe R., Kumar A., Loewen P., Miller R. C., Minamoto K., Panet A., RajBhandary U. L., Ramamoorthy B., Sekiya T., Takeya T., van de Sande J. H. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 565-570.
9. Richardson C. (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **54**, 158-165.
10. Gilbert W., Maxam A. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 560-564.
11. Panet A., van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Raac A. J., Lillehaug J. R., Kleppe K. (1973) *Biochemistry*, **12**, 5045-5050.
12. Marvin D. A., Schaller H. (1966) *J. Mol. Biol.*, **15**, 1-7.
13. Seeburg P. H., Schaller H. (1975) *J. Mol. Biol.*, **92**, 261-277.
14. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) Биоорг. химия, **3**, 1420-1422.
15. Скрыбин К. Г., Захарьев В. М., Баев А. А. (1978) Докл. АН СССР, **241**, 488-490.
16. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) Биохимия, **39**, 747-751.
17. Sgaramella V., Khorana H. G. (1972) *J. Mol. Biol.*, **72**, 427-444.

Поступила в редакцию  
18.VI.1979

### THE SYNTHESIS OF A PROMOTER REGION OF BACTERIOPHAGE *fd* DNA. II. THE CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS OF THE UNMODIFIED PROMOTER WITH DNA LIGASE AND NUCLEASE $S_1$

OVCHINNIKOV Yu. A., EFIMOV V. A., CHAKHMAKHCHEVA O. G.

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

The synthesis of several double-stranded polynucleotides containing from 45 to 86 base-pairs, which represent the variants of the G2 promoter region of phage *fd* DNA differing in the size of non-transcribed region, has been carried out. In this synthesis use was made of a new chemical-enzymatic method which involves covalent binding of the synthetic oligonucleotide segments (in their sum total comprising one strand of the final fragment) on the single-stranded native *fd* DNA[(+)-strand] as on a template in the presence of  $T_4$  DNA ligase followed by cleavage of the resultant duplex by the action of  $S_1$  nuclease.