



УДК 547.963.32.07

СИНТЕЗ ОЛИГО- И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

XXVIII. ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ И КЛОНИРОВАНИЕ
ИСКУССТВЕННОГО СТРУКТУРНОГО ГЕНА БРАДИКИНИНА ***Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф.,
Северцова И. В., Чернов Б. К., Колосов М. Н.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва***Городецкий С. И., Слюсаренко А. Г., Капелюнская Т. В.,
Лисенков А. Ф., Дубинин Н. П.***Институт общей генетики Академии наук СССР, Москва*

Восемь олигодезоксирибонуклеотидов длиной от 9 до 12 звеньев синтезированы фосфотриэфирным методом и энзиматически сшиты при помощи T4 ДНК-лигазы с образованием искусственного структурного гена пептидного гормона брадикинина. Полученный ген построен аналогично описанному ранее искусственному гену соматостатина и представляет собой короткую двухцепочечную ДНК (37 пар оснований) с выступающими 5'-концами, соответствующими сайтам рестриктаз *EcoRI* и *BamHI*. В качестве вектора для клонирования этого гена из плазмиды pBR 322 рекомбинацией *in vitro* с фагом λ plac5 получена плазида pL1, которая содержит *EcoRI*-фрагмент *lac*-оперона *E. coli* (4,4 Мд), ориентированный в сторону сайта *BamHI* (по направлению транскрипции). В результате расщепления плазмиды pL1 рестриктазами *BamHI* и частично *EcoRI*, а затем лигирования с синтетической ДНК и молекулярного клонирования получена рекомбинантная ДНК (плазида pLB 55), в которой искусственный ген брадикинина присоединен к дистальной части гена *lacZ* и экспрессируется под контролем *lac*-промотора и *lac*-оператора. Структура синтетического гена и полученных рекомбинантных ДНК доказана определенным нуклеотидной последовательности и рестриктным анализом.

Одним из важных направлений генной инженерии является конструирование искусственных генов, способных обеспечить в живой клетке биосинтез желаемых белков и пептидов. Необходимые для этой цели структурные гены обычно получают обратной транскрипцией соответствующих природных мРНК с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы вируса птичьего миеобластоза. В последние годы, однако, благодаря разра-

* Сообщение XXVII см. [1], предварительное сообщение см. [2]. Используются обозначения, рекомендованные номенклатурной комиссией IUPAC – IUB, но символ d для краткости опущен, так как в статье упоминаются только дезоксирибонуклеотиды. Другие сокращения: BAP – бактериальная щелочная фосфатаза, DMTr – *n*, *n*-диметокситрипид, PAG – поллакриламидный гель, SPDE – фосфодиэстераза селезенки, TEAB – бикарбонат триэтиламмония, VPDE – фосфодиэстераза змеиного яда; X-gal – 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозид; символом \mp обозначена *n*-хлорфенилфосфатная группа *n*-ClC₆H₄OP(=O)₂; Мд – мегадальтон.

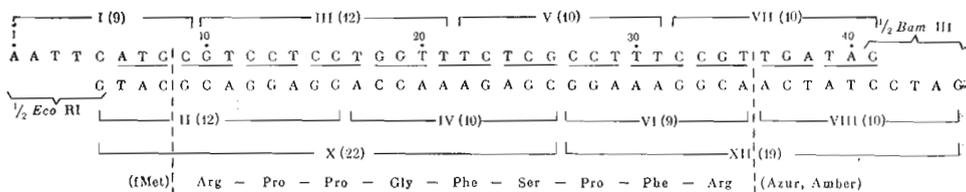


Рис. 1. Искусственный структурный ген брадикинина и кодируемая им аминокислотная последовательность. Подчеркнуты триплеты, соответствующие кодонам мРНК. Римскими цифрами обозначены синтезированные олигонуклеотиды, в скобках указана их величина (число мононуклеотидных звеньев)

ботке эффективных методов химического синтеза олигонуклеотидов появилась реальная возможность получать небольшие гены без использования природных матриц, т. е. полным синтезом. Первый значительный успех на этом новом направлении был достигнут в 1977 г., когда были осуществлены химико-ферментативный синтез искусственного структурного гена тетрадекапептидного гормона соматостатина и его интеграция с геном *lac z E. coli* в плазмиде pBR 322 [3]. При экспрессии в *E. coli* полученного гибридного гена образовался химерный белок (β -галактозидаза — соматостатин), от которого действием бромциана был отщеплен пептид, иммунохимически идентичный природному гормону [3]. В 1978—1979 гг. той же группой исследователей были созданы аналогичным путем экспрессируемые гены цепей А и В инсулина [4, 5] (о химическом синтезе цепи А инсулина см. также [6]), а недавно получен искусственный ген неприродного проинсулина [7] для промышленного производства человеческого инсулина микробиологическим синтезом.

Нами с целью изучения экспрессии простейших генетических структур начаты исследования по синтезу неприродных структурных генов и регуляторных участков ДНК, контролирующих их транскрипцию и трансляцию. В качестве первого объекта был избран ген nonapeптида брадикинина — тканевого гормона из группы каллидинов, стимулирующего гладкую мускулатуру и обладающего сильным гипотензивным действием [8].

Искусственный ген брадикинина (рис. 1) был сконструирован аналогично гену соматостатина [3] с учетом частоты использования вырожденных кодонов в геномах колифагов. Его центральная часть (нуклеотиды 9—35) предназначена кодировать аминокислотную последовательность брадикинина; она ограничена спереди иницирующим триплетом АТГ, а сзади — гандемом терминирующих триплетов ТГА и ТАГ. На концах гена имеются «половинные сайты» рестриктаз *EcoRI* и *BamHI* для соединения с вектором и последующей регенерации из рекомбинантной ДНК.

При планировании схемы синтеза ген был разделен на 8 сегментов таким образом, чтобы их гибридизация приводила к достаточно большому (не менее 4 нуклеотидных пар) перекрыванию комплементарных последовательностей и обеспечивала однозначное протекание реакции лигазного сшивания. Эти 8 сегментов, представляющие собой олигодезокси-нуклеотиды (I)—(VIII) длиной от 9 до 12 звеньев, были синтезированы

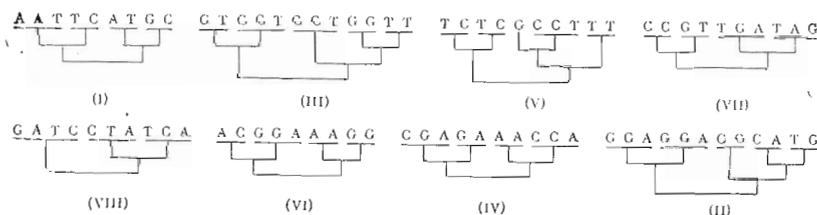


Рис. 2. Принципиальная схема синтеза олигонуклеотидных сегментов верхней цепи (I, III, V, VII) и нижней цепи (VIII, VI, IV, II) гена брадикинина

Межнуклеотидные конденсации

Исходные вещества			Продукт конденсации	
Р-компонент	ОН-компонент	Молярное отношение Р-комп./ОН-комп	Число нукл. звеньев	Выход, %
(DMTr) T \mp	T (Ac)	1,3	2	77
(DMTr) bzA \mp	bzA \mp (CNEt)	1,3	2	63
(DMTr) bzA \mp	bzC \mp (CNEt)	1,5	2	76
(DMTr) bzC \mp	bzA (Bz)	1,5	2	61
(DMTr) bzC \mp	bzA \mp (CNEt)	1,5	2	73
(DMTr) bzC \mp	bzC \mp (CNEt)	1,5	2	78
(DMTr) ibG \mp	T \mp (CNEt)	1,3	2	79
(DMTr) ibG \mp	ibG (Bz)	1,3	2	72
(DMTr) ibG \mp	bzC (Bz)	1,3	2	89
(DMTr) bzC \mp	bzC \mp bzA (Bz)	2	3	76
(DMTr) T \mp	bzC \mp bzA (Bz)	1,3	3	55
(DMTr) ibG \mp	ibG \mp bzA \mp (CNEt)	2	3	80
(DMTr) bzC \mp	bzC \mp T \mp (CNEt)	1,5	3	69
(DMTr) bzC \mp	ibG \mp bzA \mp (CNEt)	2	3	74
(DMTr) T \mp	ibG \mp bzA \mp (CNEt)	1,5	3	63
(DMTr) bzC \mp T \mp	bzA \mp (CNEt)	1,3	3	89
(DMTr) T \mp bzA \mp	ibG (Bz)	1,3	3	67
(DMTr) bzA \mp T \mp	ibG \mp bzC (Bz)	1,3	4	94
(DMTr) ibG \mp ibG \mp	T \mp T (Ac)	1,5	4	95
(DMTr) bzA \mp bzA \mp	ibG \mp ibG (Bz)	1,5	4	68
(DMTr) bzC \mp bzA \mp	T \mp acG (Ac)	1,3	4	86
(DMTr) ibG \mp	bzC \mp bzC \mp T \mp (CNEt)	2	4	79
(DMTr) T \mp bzC \mp	T \mp bzC \mp (CNEt)	1,5	4	90
(DMTr) bzC \mp bzC \mp	ibG \mp T \mp (CNEt)	2	4	58
(DMTr) bzA \mp bzA \mp	bzC \mp bzC \mp bzA (Bz)	2	5	72
(DMTr) ibG \mp T \mp	bzC \mp bzC \mp T \mp (CNEt)	1,3	5	57
(DMTr) bzC \mp ibG \mp bzA \mp	ibG \mp bzA \mp (CNEt)	1,5	5	51
(DMTr) bzA \mp bzC \mp	ibG \mp ibG \mp bzA \mp (CNEt)	2	5	58
(DMTr) bzA \mp bzA \mp T \mp	T \mp bzC \mp (CNEt)	1,3	5	78
(DMTr) ibG \mp bzC \mp bzC \mp T \mp	T \mp T (Ac)	1,5	6	68
(DMTr) T \mp ibG \mp bzA \mp	T \mp bzA \mp ibG (Bz)	1,5	6	46
(DMTr) bzC \mp T \mp bzA \mp	T \mp bzC \mp bzA (Bz)	1,5	6	74
(DMTr) bzC \mp acG \mp	bzC \mp bzA \mp T \mp acG (Ac)	1,5	6	70
(DMTr) ibG \mp ibG \mp bzA \mp	ibG \mp ibG \mp bzA \mp (CNEt)	1,5	6	40
(DMTr) bzC \mp bzC \mp T \mp	ibG \mp ibG \mp T \mp T (Ac)	1,5	7	81
(DMTr) bzA \mp bzA \mp T \mp T \mp -bzC \mp	bzA \mp T \mp ibG \mp bzC (Bz)	1,5	9	65
(DMTr) bzA \mp bzC \mp ibG \mp -ibG \mp bzA \mp	bzA \mp bzA \mp ibG \mp ibG (Bz)	1,5	9	44
(DMTr) T \mp bzC \mp T \mp bzC \mp	ibG \mp bzC \mp bzC \mp T \mp T \mp T \mp - (Ac)	2	10	73
(DMTr) bzC \mp bzC \mp ibG \mp T \mp	T \mp ibG \mp bzA \mp T \mp bzA \mp -ibG (Bz)	2	10	54
(DMTr) ibG \mp bzA \mp T \mp bzC \mp	bzC \mp T \mp bzA \mp T \mp bzC \mp -bzA (Bz)	2	10	60
(DMTr) bzC \mp ibG \mp bzA \mp -ibG \mp bzA \mp	bzA \mp bzA \mp bzC \mp bzC \mp -bzA (Bz)	1,5	10	46
(DMTr) ibG \mp T \mp bzC \mp bzC \mp -T \mp	bzC \mp bzC \mp T \mp ibG \mp ibG \mp -T \mp T (Ac)	2	12	50
(DMTr) ibG \mp ibG \mp bzA \mp -ibG \mp ibG \mp bzA \mp	bzC \mp acG \mp bzC \mp bzA \mp T \mp -acG (Ac)	1,5	12	*

* Продукт конденсации выделен после полного удаления Р, N, O-защитных групп; выход додекануклеотида (II) 18%.

фосфотриэфирным методом [9] исходя из соответствующих нуклеозидов и 3'-мононуклеотидов, в которых 5'-гидроксил защищен диметокситрипильной группой, фосфатный остаток — *n*-хлорфенильной и β -цианэтильной группами, а аминогруппа — ацилом (изобутирилом или ацетилом в гуанине и бензоилом в аденине и цитозине); вторичная спиртовая группа

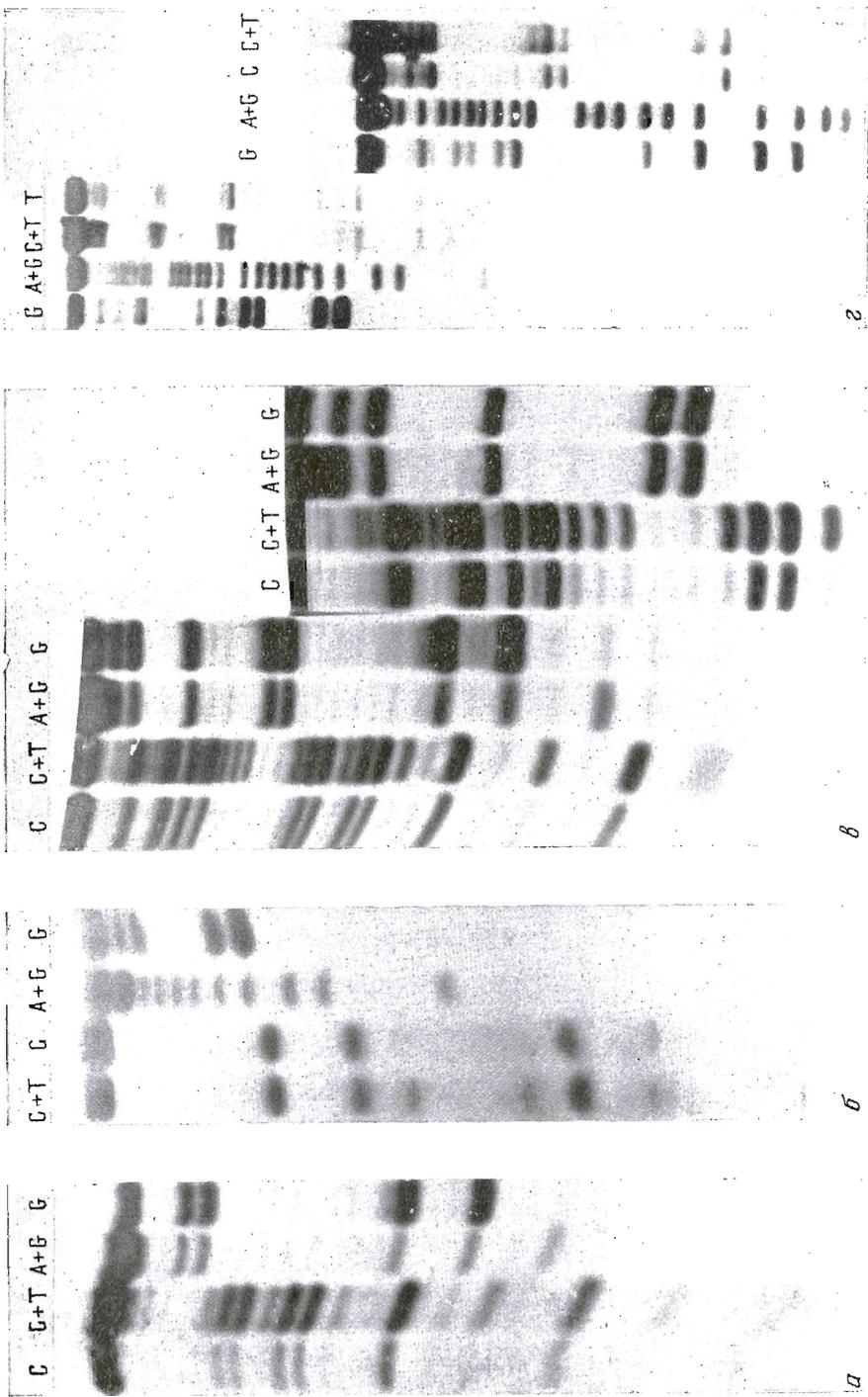


Рис. 6. Анализ нуклеотидной последовательности в продуктах лигазной сшивки модифицированным методом Марксама — Гилберта (автордиография электрофореграмм в 20% РАС). а — верхняя цепь (³²pIX) дуплекса (³²pIX)·(X), б — нижняя цепь (³²pXI) дуплекса (XI)·(³²pXII), в — верхняя цепь (³²pXII) синтетического гена брадикинина (³²pXIII)·(XIV), г — нижняя цепь (³²pXIV) того же гена

Анализ ближайших соседей в продуктах лигазной сшивки сегментов гена брадикинина

Продукт лигазной сшивки	Радиоактивность продуктов гидролиза, имп/мин							
	VPDE (BAP, затем VPDE)				BAP, затем SPDE			
	pA	pG	pC	pT	Ap	Gp	Cp	Tp
(IX)·(X)	*	9120	4700	*	3830	*	3680	*
	(*)	(7930)	(*)	(*)				
(XI)·(XII)	4290	*	4630	4550	4300	*	*	4820
	(4470)	(*)	(4520)	(*)				
(XIII)·(XIV)	3230	6650	6480	3170	5860	3080	2960	6070

* Радиоактивность соответствует фоновой (менее 50 имп/мин).

в 3'-концевом нуклеозиде была блокирована ацетильным или бензонильным остатком. Последовательность соединения ди- и трипуклеотидов в более крупные блоки и далее в сегменты гена изображена на рис. 2.

В качестве конденсирующего реагента на всех стадиях синтеза использовали триизопропилбензолсульфотетразолид в 2–4-кратном избытке по отношению к Р-компоненту. Выходы продуктов конденсации приведены в табл. 1; не упомянутые в этой таблице, но использованные в синтезе защищенные олигонуклеотиды были получены ранее: (DMTr)bzA \mp T \mp (CNEt), (DMTr)bzC \mp T \mp (CNEt), (DMTr)T \mp bzA \mp (CNEt), (DMTr)bzC \mp acG \mp (CNEt) и (DMTr)T \mp acG(Ac) [10], (DMTr)T \mp bzC \mp (CNEt), (DMTr)ibG \mp ibG \mp (CNEt), (DMTr)ibG \mp bzA \mp (CNEt), (DMTr)bzA \mp bzA \mp T \mp (CNEt) и (DMTr)ibG \mp bzA \mp T \mp bzC \mp (CNEt) [11].

Избирательное деблокирование 5'-гидроксила проводили путем кратковременной обработки бензолсульфокислотой при 0° С. Р-Защитную цианэтильную группу удаляли действием триэтиламина в пиридиновом растворе, а полное деблокирование аминогрупп и фосфатных остатков, т. е. отщепление всех N-ацильных и Р-хлорфенильных групп, осуществляли аммонолизом. Продукты межнуклеотидных конденсаций выделяли адсорбционной хроматографией на силикагеле, контролируя полноту разделения с помощью ТСХ на силуфоле. Полностью деблокированные олигонуклеотиды выделяли анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе при pH 7,5 и очищали рехроматографией при pH 3,5, элюируя градиентом концентрации NaCl в 7 М растворе мочевины. Чистота и нуклеотидная последовательность синтезированных веществ были доказаны введением 5'-концевой ³²P-метки с последующим частичным гидролизом VPDE и двухмерным разделением продуктов реакции путем электрофореза на ацетилцеллюлозе и гомохроматографии. Полученные нуклеотидные карты представлены на рис. 3.

Энзиматическое сшивание синтезированных олигонуклеотидов (I)–(VIII) проводили в три стадии: сначала лигировали две пары олигонуклеотидов (I+III) и (II+IV), составляющие левую часть гена, затем две пары (V+VII) и (VI+VIII) правой части гена и, наконец, обе половины гена (IX)·(X) и (XI)·(XII) соединяли между собой (рис. 4).

Для получения левой части гена смесь эквимолекулярных количеств олигонуклеотидов (II)–(IV) фосфорилировали T4-полинуклеотидкиназой в присутствии [γ -³³P]rATP средней удельной активности (около 50 Ки/ммоль; такая ³³P-метка не мешает в дальнейшем определению нуклеотидной последовательности в продуктах лигазной сшивки по методу Максама — Гилберта [12]). Затем прибавляли избыток немеченого нонануклеотида (I), смесь отжигали и образовавшийся четырехкомпонентный комплекс (I)·(³³pII)·(³³pIII)·(³³pIV) сшивали ДНК-лигазой T4 при 10° С, следя за ходом реакции по превращению [³³P]фосфата из концевой

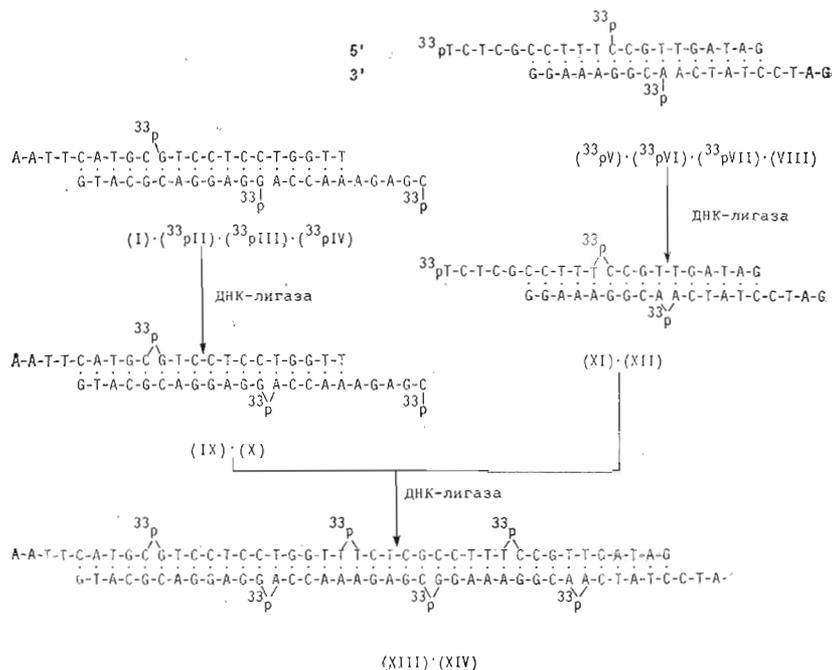


Рис. 4. Схема лигазного сшивания синтетических олигонуклеотидов в ген брадикинина

го в межзуклеотидный, устойчивый к действию ВАР (рис. 5а). Через 3 ч выход продуктов лигирования достиг максимума (75%) и после хроматографии на сефадексе G-50 (рис. 5б) был выделен дуплекс (IX) · (X) с выходом 43%. Структура полученного вещества была подтверждена анализом ближайших соседей (табл. 2). Кроме того, действием Т4-полинуклеотидкиназы и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{rATP}$ (>1000 Ки/ммоль) дуплекс (IX) · (X) был фосфорилирован по единственному свободному 5'-гидроксилу и после очистки электрофорезом в 20% РАГ нуклеотидная последовательность его верхней цепи (^{32}pIX) была доказана модифицированным [13, 14] методом Максама — Гилберта (рис. 6а).

Аналогичным образом была проведена лигазная сшивка правой части гена из олигонуклеотидов (^{33}pV), (^{33}pVI), ($^{33}\text{pVII}$) и (VIII); выход продуктов лигирования составлял 80% (рис. 5б). Хроматографией на сефадексе G-50 (рис. 5б) был выделен с выходом 50% дуплекс (XI) · (XII), структура которого была подтверждена анализом ближайших соседей (табл. 2) и, после 5'- ^{32}P -фосфорилирования, доказана прямым секвенированием нижней цепи ($^{32}\text{pXII}$) (рис. 6б).

На заключительной стадии синтеза обе половины гена, (IX) · (X) и (XI) · (XII), были соединены между собой. Как и в предыдущих случаях, сшивку проводили с помощью ДНК-лигазы Т4 при 10° С; доля ВАР-устойчивого $[\text{}^{33}\text{P}]$ фосфата возросла за 4 ч с 67 до 91% (рис. 5в), т. е. выход продуктов лигирования составлял 86%. Образовавшийся ген брадикинина (XIII) · (XIV) был выделен хроматографией на биогеле А 0,5m (рис. 5в) с выходом 56%, и его структура была подтверждена анализом ближайших соседей (табл. 2). Для окончательного доказательства нуклеотидной последовательности полученный дуплекс (XIII) · (XIV) был 5'- ^{32}P -фосфорилирован Т4-полинуклеотидкиназой и подвергнут двухмерному разделению электрофорезом на ацетилцеллюлозе в 7 М растворе мочевины при рН 3,5 и гомохроматографией с 7% раствором негидролизованной низкомолекулярной РНК. Из двух комплементарных цепей верхняя ($^{32}\text{pXIII}$), в которой содержится меньше А+С и меньше пуриновых ос-

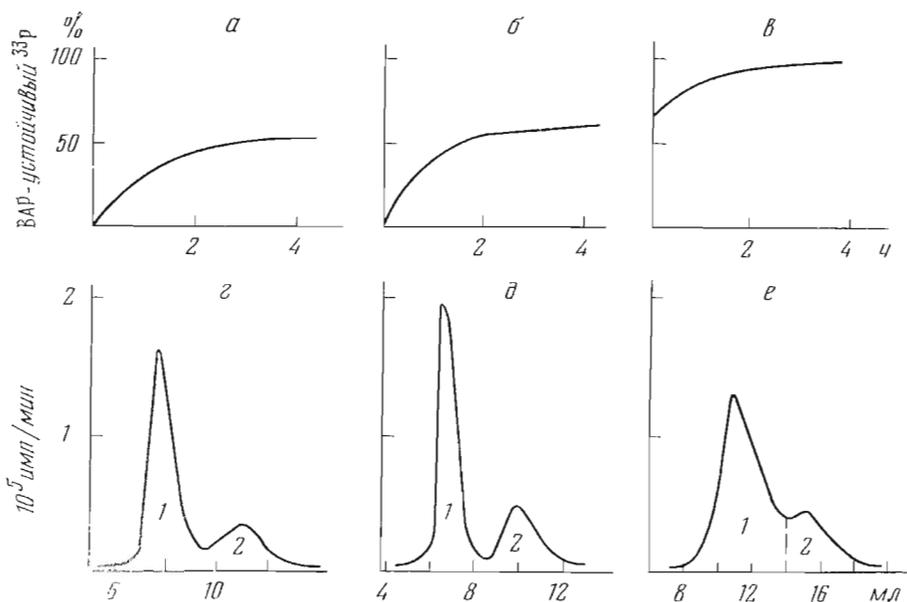


Рис. 5. Кинетика (а-в) и гель-хроматографическое разделение продуктов (z-е) лигазных реакций. 1- продукт лигирования, 2- исходные олигонуклеотиды. а, z - сшивка $(I) \cdot ({}^{33}pII) \cdot ({}^{33}pIII) \cdot ({}^{33}pIV) \rightarrow (IX) \cdot (X)$, опыт 7а; б, d - сшивка $({}^{33}pV) \cdot ({}^{33}pVI) \cdot ({}^{33}pVII) \cdot (VIII) \rightarrow (XI) \cdot (XII)$, опыт 7б; в, e - сшивка $(IX) \cdot (X) \cdot (XI) \cdot (XII) \rightarrow (XIII) \cdot (XIV)$, опыт 7в

пований, чем в нижней цепи (${}^{32}pXIV$), обладала большей подвижностью в обоих направлениях. Обе цепи были дополнительно очищены электрофорезом в 15% PAG (следует отметить, что после выделения в индивидуальном виде они обладали разной подвижностью в PAG, но все попытки разделить дуплекс $({}^{32}pXIII) \cdot ({}^{32}pXIV)$ на комплементарные цепи электрофорезом по методу [12] или [15] не привели к желаемым результатам), и их нуклеотидная последовательность была определена модифицированным методом Максама - Гилберта (рис. 6в, z).

Вектором для синтетического гена служила гибридная плазмида pL 1 (рис. 7), полученная путем рекомбинации *in vitro* плазмиды pBR 322 с фагом $\lambda plac5$. При расщеплении ДНК этого фага рестриктазой *EcoRI* образуется 6 фрагментов, один из которых (величиной 4,4 Мд) содержит промоторно-операторный участок лактозного оперона *E. coli* и большую часть структурного гена *lac z*, кодирующую 1005 (из 1021) аминокислотных остатков β -галактозидазы [16, 17]. Для получения плазмиды pL1 смесь ДНК $\lambda plac5$ и pBR 322 гидролизовали рестриктазой *EcoRI*, а затем сшивали ДНК-лигазой T4 и использовали для трансформации клеток *E. coli* ED 8800, обработанных Ca^{2+} . Клоны отбирали по устойчивости к ампициллину и тетрациклину и по β -галактозидазной активности, проводя селекцию на чашках с L-агаром, содержащим указанные антибиотики, хромогенный субстрат X-gal и индуктор изопропилтио- β -D-галактозид. Было получено 86 колоний $Ap^r Tc^r Lac^+$, у семи из которых плазмидная ДНК была подвергнута рестриктному анализу. Оказалось, что во всех случаях при расщеплении рестриктазой *EcoRI* образуется два фрагмента величиной 2,6 и 4,4 Мд, а при расщеплении рестриктазой *HindIII* - два фрагмента величиной 3,2 и 3,8 Мд. Следовательно, эта плазмида, обозначенная нами pL 1, содержит *EcoRI*-фрагмент *lac*-оперона (4,4 Мд), ориентированный таким образом, что транскрипция гена *z* направлена в сторону локуса *Tc^r*.

Для конструирования рекомбинантной ДНК с искусственным геном брадикинина (рис. 7) плазмиду pL 1 гидролизовали рестриктазой *BamHI*,

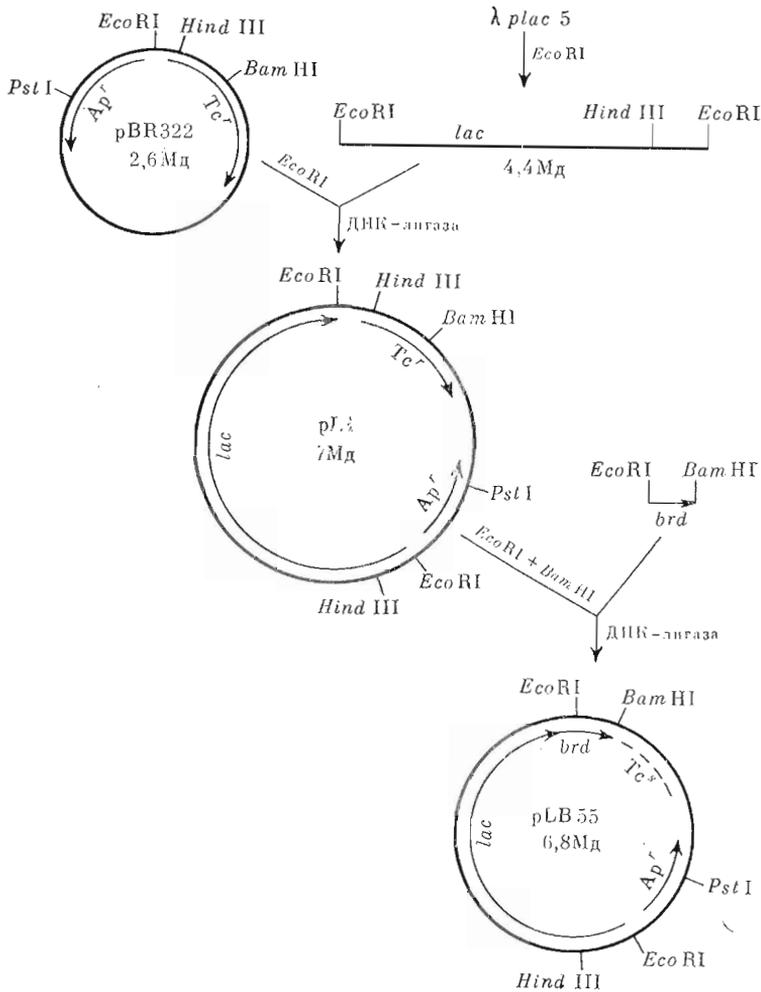


Рис. 7. Схема конструирования гибридной плазмиды pLB 55, содержащей синтетический ген брадикинина (*brd*) и фрагмент лактозного оперона (*lac*) *E. coli*. Указано положение сайтов рестриктаз *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* и *PstI*. *Ap* и *Tc* – гены, определяющие устойчивость к антибиотикам ампициллину и тетрациклину

а затем частично *EcoRI*. Продукты гидролиза лигировали с синтетическим дуплексом (XIII) · (XIV) и полученным веществом трансформировали *E. coli* НВ 101. Трансформанты отбирали на X-gal-ампициллиновой среде и все голубые колонии проверяли на чувствительность к тетрациклину. Из четырех полученных *Ap^rTc^rLac⁺*-клонов была выделена плазмидная ДНК и проанализирована путем последовательного расщепления рестриктазами *HindIII* и *PstI*. Было найдено, что в одной из плазмид (обозначенной pLB 55) *lac*-фрагмент имеет ту же ориентацию, что и в исходной плазмиде pL 1, а в трех других – противоположное направление. Чтобы подтвердить этот вывод и доказать присутствие в рекомбинантной ДНК гена брадикинина, плазмиды из клеток *E. coli* НВ 101 (pLB 55) была выделена в препаративном количестве и подвергнута структурному анализу.

С этой целью ДНК pLB 55 гидролизовали рестриктазой *EcoRI*, а затем *HaeIII* и образовавшуюся смесь фрагментов обрабатывали ДНК-полимеразой Кленова в присутствии [α -³²P]dATP и меченого dTTP по методу [18], чтобы избирательно пометить *EcoRI*-концы путем дестройки комплементарной цепи. При электрофорезе в 7,5% РАГ был выделен фрагмент ДНК длиной 63 н.п. (*EcoRI/HaeIII*-63), который был дополни-

биорекс 70 и дауэкс 50W×8 (Bio-Rad, США), эндонуклеаза *Hind*III (Miles, США). Эндонуклеаза *Hae*III предоставлена П. М. Чумаковым, эндонуклеаза *Eco*RI выделена по методу [27], а эндонуклеаза *Bam*HI — по методу [28] с некоторыми модификациями (хроматография на смоле биорекс 70 вместо фосфоцеллюлозы). Полинуклеотидкиназу и ДНК-лигазу фага T4 выделяли по модифицированным методам [21] и [22]. ДНК-полимеразу Кленова получали из ДНК-полимеразы *I. E. coli* по методу [23].

ДНК плазмид pBR 322, pL 1 и pLB 55 выделяли из клеток, выращенных на минимальной среде M 9 [29] с казаминовыми кислотами (Difco, США). Амплификацию плазмидной ДНК проводили с хлорамфениколом по методу [30], а выделение — по модифицированному методу [31] (препарат ДНК после центрифугирования в градиенте плотности CsCl с бромистым этидием хроматографировали на колонке с сефадексом G-50 (1××15 см), в основании которого находится 1 мг дауэкса 50W×8 (100–200 меш), элюируя буфером, содержащим 10 мМ трис·HCl (pH 8,0), 0,8 М NaCl, 10 мМ EDTA). ДНК фага λ plac 5 выделяли по методу [29].

Использовали [γ -³²P]rATP (3000 Ки/ммоль), [α -³²P]dATP и [α -³²P]dGTP (400 Ки/ммоль) фирмы Amersham (Великобритания), [γ -³³P]rATP (50 Ки/ммоль) получали из H₃³³PO₄ («Изотоп») по модифицированному методу [12]. Бактериальные штаммы *E. coli* K 12 HB 101 [F⁻*pro-leu⁻thi-gal-lacY⁻str^r-m⁻EndoI-recA⁻*] и *E. coli* HB 101 (pBR 322) получены от Г. У. Бойера (США), *E. coli* ED 8800 [*met-supEsupFhsd_s-lac⁻* (ZM15)] — от У. Дж. Браммара (Великобритания).

1. Удаление О-защитной диметокситригильной группы проводили по методу [9] 2% раствором бензолсульфокислоты при –5–0°С в течение 3 мин. Продукт детритилирования хроматографировали на силикагеле и использовали в качестве ОН-компонента для межнуклеотидной конденсации.

2. Удаление Р-защитной цианэтильной группы осуществляли по методу [24] действием триэтиламина в пиридине (1:3) в течение 15 ч при 20°С. Раствор упаривали и сиропообразный остаток без дальнейшей очистки использовали в качестве Р-компонента для межнуклеотидной конденсации.

3. Фосфотриэфирные конденсации проводили как описано ранее [10], но в качестве конденсирующего реагента использовали свежеполученный триизопротилбензолсульфотетразолид. Соотношение Р- и ОН-компонентов и выход продуктов конденсации приведены в табл. 1.

4. Полное удаление защитных групп осуществляли при 20°С действием 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 мочеvine, pH 7,5, и рехроматографировали при pH 3,5.

5. Нуклеотидные карты. 5'-Фосфорилирование олигонуклеотидов проводили с помощью T4-полинуклеотидкиназы и [γ -³²P]rATP. Меченые олигонуклеотиды подвергали частичному гидролизу с помощью VPDE и продукты реакции разделяли электрофорезом на ацетилцеллюлозе и гомохроматографией, как описано в работе [11]. Полученные нуклеотидные карты представлены на рис. 3.

6. 5'-Фосфорилирование олигонуклеотидов. Раствор олигонуклеотидов (II), (III) и (IV) (по 2 нмоль каждого) в 150 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис·HCl (pH 9,0), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, 1 мМ спермидин и 0,1 мМ [γ -³³P]rATP (50 Ки/ммоль), нагревали 2 мин при 90°С, быстро охладили до 0°С, прибавили 15 ед. T4-полинуклеотидкиназы и инкубировали 60 мин при 37°С. Реакцию останавливали прибавлением 0,5 М EDTA до концентрации 20 мМ и продукт фосфорилирования выделяли хроматографией на колонке (0,8×38 см) с сефадексом G-50. Выход

смеси ^{33}P -меченых олигонуклеотидов (^{33}pII), ($^{33}\text{pIII}$) и (^{33}pIV) составлял $4,1 \cdot 10^8$ имп/мин (95%).

7. *Лигазное сшивание олигонуклеотидов. а.* Смесь ^{33}P -меченых олигонуклеотидов (^{33}pII), ($^{33}\text{pIII}$) и (^{33}pIV) (всего $4,1 \cdot 10^8$ имп/мин) и 2,5 нмоль нонауклеотида (I) в 300 мкл буфера, содержащего 67 мМ трис·HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl_2 , нагревали 10 мин при 80°C , затем в течение 4 ч охладили до 10°C и оставили при этой температуре на 16 ч. К реакционной смеси прибавили 6 мкл 5 мМ гАТР, 6 мкл 0,5 М дитиотреита, 490 ед. ДНК-лигазы Т4 и инкубировали при 10°C , периодически определяя по методу [25] долю радиоактивного фосфора, устойчивого к ВАР (см. рис. 5а). Через 4 ч, когда 51% [^{33}P]фосфата приобрел устойчивость к ВАР, реакцию останавливали прибавлением 30 мкл 0,5 М EDTA и продукты сшивки выделяли хроматографией на колонке с сефадексом G-50 (0,8×38 см) в 0,05 М TEAB, pH 7,5 (рис. 5г). Из фракции 1 ($1,75 \cdot 10^8$ имп/мин, 66% [^{33}P]фосфата устойчиво к ВАР) выделили дуплекс (IX)·(X) с выходом 43%. Его анализировали гидролизом при помощи VPDE, ВАР и затем VPDE или SPDE, как описано ниже; полученные результаты приведены в табл. 2. Фракция 2 ($5,8 \cdot 10^7$ имп/мин, 2% [^{33}P]фосфата устойчиво к ВАР) представляла собой смесь не вступивших в лигазную реакцию олигонуклеотидов (I), (^{33}pII), ($^{33}\text{pIII}$) и (^{33}pIV).

б. Смесь олигонуклеотидов (^{33}pV), (^{33}pVI) и ($^{33}\text{pVII}$) ($4,6 \cdot 10^8$ имп/мин) лигировали с 2,5 нмоль декануклеотида (VIII) по методике опыта 7а. Через 4 ч 54% [^{33}P]фосфата приобрело устойчивость к ВАР (рис. 5б). Реакционную смесь разделяли как в опыте 7а (рис. 5д). Из фракции 1 ($2,3 \cdot 10^8$ имп/мин, 66% [^{33}P]фосфата устойчиво к ВАР) выделили с выходом 50% дуплекс (XI)·(XII), который анализировали методом ближайших соседей (табл. 2). Фракция 2 ($5,8 \cdot 10^7$ имп/мин) содержала 1% [^{33}P]фосфата, устойчивого к действию ВАР.

в. $1,7 \cdot 10^8$ имп/мин (0,7 нмоль) дуплекса (IX)·(X) отжигали в условиях опыта 7а с $1,7 \cdot 10^8$ имп/мин (0,7 нмоль) дуплекса (XI)·(XII) и затем инкубировали при 10°C с 500 ед. Т4 ДНК-лигазы в 400 мкл буфера, содержащего 67 мМ трис·HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl_2 , 0,1 мМ гАТР и 10 мМ дитиотреит. За 4 ч доля ВАР-устойчивого [^{33}P]фосфата выросла с 67 до 91% (рис. 5в). После прибавления EDTA до концентрации 50 мМ реакционную смесь нагревали 3 мин при 90°C , быстро охлаждали и хроматографировали на колонке (1×62 см) с биогелем А 0,5м, элюируя 0,05 М TEAB (см. рис. 5е). Фракция 1 ($1,9 \cdot 10^8$ имп/мин, 99% [^{33}P]фосфата устойчиво к ВАР) представляла собой синтетический ген брадикипина (XIII)·(XIV), полученный с выходом 56%. Он был проанализирован методом ближайших соседей, как описано ниже в опытах 8а–в; результаты анализа приведены в табл. 2.

8. *Анализ продуктов лигазного сшивания. а. Дефосфорилирование ВАР.* Исследуемый олигонуклеотид (обычно $5 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^5$ имп/мин) в 100 мкл буфера, содержащего 100 мМ трис·HCl (pH 9,0) и 10 мМ MgCl_2 , дефосфорилировали при помощи 0,05–0,1 ед. ВАР в течение 45–60 мин при 60°C . Фермент удаляли экстракцией 100 мкл смеси фенол–хлороформ, 3:1. Водный раствор хроматографировали на колонке с сефадексом G-50 (0,8×15 см) в 0,05 М TEAB, pH 7,5. Первый радиоактивный пик содержал продукт дефосфорилирования.

б. *Гидролиз VPDE.* Гидролиз до 5'-моонуклеотидов проводили, инкубируя анализируемый олигонуклеотид ($1 \cdot 10^4$ – $5 \cdot 10^4$ имп/мин) с VPDE (500 мкг/мл) и ДНКазой I (2 мкг/мл) в 20 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис·HCl (pH 7,5) и 10 мМ MgCl_2 . Реакционную смесь разделяли электрофорезом на бумаге Ватман №1 в пиридин-ацетатном буфере (pH 3,5) в течение 45 мин при 100 В/см. Пятна 5'-моонуклеотидов локализовали автордиографией, вырезали и радиоактивность измеряли в толуольном сцинтилляторе.

в. *Гидролиз SPDE.* Для гидролиза до 3'-моонуклеотидов исследуемый

олигонуклеотид ($1 \cdot 10^4$ – $5 \cdot 10^4$ имп/мин) инкубировали 2 ч при 37°C с 2 ед. микрококковой нуклеазы в 10 мкл буфера, содержащего 50 мМ глицин (рН 9,2) и 10 мМ CaCl_2 . Затем нейтрализовали 0,2 М уксусной кислотой, прибавляли 0,01 ед. SPDE в 10 мкл буфера, содержащего 100 мМ NH_4OAc (рН 6,5) и 0,2% твин-80, и инкубировали еще 2 ч при той же температуре. Электрофорез и определение радиоактивности проводили так же, как в предыдущем опыте.

г. *5'-Фосфорилирование*. Исследуемый олигонуклеотид (5–10 пмоль) фосфорилировали при 37°C с помощью 10–15 ед. T4-полинуклеотидкиназы и 100 мкКи $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{rATP}$ в 50 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис·HCl (рН 9,0), 10 мМ MgCl_2 и 5 мМ дитиотреит. Через 30 мин вещество выделяли хроматографией на колонке ($0,8 \times 15$ см) с сефадексом G-50 в буфере, содержащем 1 мМ трис·HCl (рН 8,0), 1 мМ NaCl и 0,1 мМ EDTA. К первому радиоактивному пику прибавляли 20–30 мкг тРНК в качестве носителя и продукт фосфорилирования высаживали 70% этанолом.

д. *Разделение комплементарных цепей*. $5'\text{-}^{32}\text{P}$ -Меченый по обеим цепям ген брадикинина ($5 \cdot 10^6$ имп/мин) подвергали двумерному разделению электрофорезом на ацетилцеллюлозе при рН 3,5 и гомохроматографией на пластинках с DEAE-целлюлозой как описано в работе [25] для получения нуклеотидных карт. В качестве гомосмеси использовали 7% раствор негидролизованной дрожжевой РНК в буфере, содержащем 10 мМ трис·HCl (рН 7,5) и 7 М мочевины. После локализации пятен радиоавтографией целлюлозу соскребали с пластинки, промывали спиртом (2×200 мкл) и вещество элюировали 300–400 мкл 2 М ТЕАВ (рН 9,0). Элюаты разбавляли водой и лиофильно высушивали до полного удаления летучих солей.

е. *Структурный анализ методом химической модификации*. $5'\text{-}^{32}\text{P}$ -Фосфорилированные олигонуклеотиды очищали электрофорезом в 20% РАГ (фрагменты гена) или 15% РАГ (цепи целого гена) в трис-боратном буфере (рН 8,3), содержащем 7 М мочевины. Радиоактивные вещества элюировали из геля буфером, содержащим 0,5 М NH_4OAc (рН 6,0), 10 мМ $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 0,1% додецилсульфат натрия и 1 мМ EDTA (16 ч при 37°C), и выделяли как в работе [11]. Химическую модификацию, расщепление цепи и электрофорез продуктов деградации проводили как описано ранее [13, 14]. Продолжительность модификации для половин гена: G – 30 мин; A+G – 40 мин, C и C+T – 65 мин; для целого гена: G – 20 мин, A+G – 35 мин, C и C+T – 50 мин.

9. *Конструирование плазмиды pL 1*. Смесь 2 мкг ДНК pBR 322 и 2 мкг ДНК фага λplac5 в 100 мкл буфера, содержащего 100 мМ трис·HCl (рН 7,5), 10 мМ MgCl_2 и 50 мМ NaCl, гидролизовали при 37°C рестриктазой EcoRI (20 ед.). Через 1 ч прибавили EDTA до концентрации 10 мМ, белок инактивировали нагреванием (10 мин при 70°C) и экстрагировали 100 мкл фенола, насыщенного водой. Фрагменты ДНК осадили 70% этанолом, промыли 95% спиртом, высушили, растворили в 30 мкл буфера, содержащего 20 мМ трис·HCl (рН 7,6), 10 мМ MgCl_2 , 10 мМ дитиотреит и 0,2 мМ rATP, и лигировали при помощи 4 ед. T4 ДНК-лигазы в течение 3 ч при 15°C . После инактивации фермента нагреванием (10 мин при 70°C) смесь продуктов лигирования использовали для трансформации *E. coli* по методу [32]. Для этого выращивали *E. coli* ED 8800 в 100 мл L-бульона [29] до мутности A_{590} 0,4, бактериальные клетки отделяли центрифугированием (5 мин при 4000 об/мин) и при 0°C промывали 100 мл 10 мМ раствора NaCl, а затем снова осаждали центрифугированием и суспендировали в 50 мл 50 мМ CaCl_2 .

После 30 мин выдержки при 0°C клетки отделяли центрифугированием (10 мин при 4000 об/мин) и вновь суспендировали в 50 мМ CaCl_2 (5 мл). К 200 мкл этой суспензии прибавили 10 нг смеси продуктов лигирования (см. выше) в 100 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис·HCl (рН 7,5), 1 мМ EDTA, и инкубировали 1 ч при 0°C , 5 мин при 38°C и

15 мин при 20° С. Затем прибавили 1 мл L-бульона и после 30 мин инкубации при 37° С аликвоты (по 150 мкл) высевали на чашки с L-агаром, содержащим тетрациклин и ампициллин (по 20 мг/л), X-gal (40 мг/л) и 1 мМ изопропилтио-β-D-галактозид. Получено 86 голубых колоний, у семи из которых плазмидная ДНК проанализирована, как описано в опыте 12а.

10. *Конструирование плазмид рLB.* 2 мкг ДНК рL1 в 50 мкл буфера, содержащего 100 мМ трис·НСl (рН 7,5) и 5 мМ MgCl₂, гидролизовали 20 ед. эндонуклеазы *Bam*HI в течение 1 ч при 37° С. Раствор нагревали 10 мин при 70° С, после чего прибавили 5 ед. эндонуклеазы *Eco*RI и инкубировали еще 1 ч при 37° С. Белки удаляли экстракцией 50 мкл фенола, 50 мкл смеси фенол — хлороформ (1:3) и 50 мкл хлороформа и ДНК осаждали 70% спиртом. Осадок растворили в 15 мкл буфера, содержащего 20 мМ трис·НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреит и 0,2 мМ гАТР, прибавили 60 нг синтетической ДНК (XIII)·(XIV) и 10 ед. T4 ДНК-лигазы и инкубировали 16 ч при 12° С. К раствору прибавили EDTA до концентрации 10 мМ и нагревали 10 мин при 70° С. Половину реакционной смеси использовали для трансформации клеток *E.coli* HB 101, обработанных CaCl₂, как описано в предыдущем опыте. Трансформанты отбирали на чашках с L-агаром, содержащим ампициллин (20 мг/л) и X-gal (40 мг/л), и голубые колонии тестировали на L-агаре, содержащем 20 мг/л тетрациклина. Было получено 4 клона, которые устойчивы к ампициллину, чувствительны к тетрациклину и способны к конститутивному синтезу β-галактозидазы. Рестриктивный анализ выделенных из них плазмид рLB 29, рLB 55, рLB 112 и рLB 133 описан в опыте 12б.

11. *Выделение плазмидных ДНК.* Трансформанты *E.coli* ED 8800 или *E.coli* HB 101 выращивали 16 ч при 37° С в 5 мл L-бульона, содержащего 20 мг/л ампициллина (а в случае ED 8800 еще и 20 мг/л тетрациклина). Клетки осаждали при 0° С центрифугированием (5 мин при 4000 об/мин), замораживали при -70° С и оттаивали. Все последующие операции проводили при 0° С. Клетки суспендировали в 1 мл 25% раствора сахарозы в 50 мМ трис·НСl (рН 8,0). Через 5 мин прилили 50 мкл 0,25 М EDTA (рН 8,0), а еще через 5 мин прибавили при перемешивании 1 мл буфера, содержащего 50 мМ трис·НСl (рН 8,0), 62,5 мМ EDTA и 2% тритон X-100. После 10 мин выдержки центрифугировали 1 ч при 16 000 об/мин. Надосадочную жидкость встряхивали 5 мин с 2,5 мг фенола, насыщенного 50 мМ трис·НСl (рН 8,0) и 0,1 М NaCl, и слои разделили центрифугированием (10 мин при 6000 об/мин). Экстракцию фенолом повторили еще 2 раза, затем к водному слою прибавили 0,2 мл 5 М NaOAc и 5 мл 95% спирта. Осадок ДНК растворили в 100 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис·НСl (рН 7,5), 1 мМ EDTA. Выход плазмидной ДНК, пригодной для дальнейшего анализа, составлял 25—50 мкг.

12. *Рестриктивный анализ плазмидных ДНК.* а. 0,5—1 мкг ДНК плазмиды рL 1 в 20 мкл буфера, содержащего 6 мМ трис·НСl (рН 7,5), 6 мМ MgCl₂ и 6 мМ меркаптоэтанол, нагревали 30 мин при 37° С с 1 ед. эндонуклеазы *Hind*III. Реакционную смесь наносили на пластину 1% агарозного геля и подвергали электрофорезу в буфере, содержащем 40 мМ трис·НСl (рН 8,0), 20 мМ NaOAc и 2,5 мМ EDTA (5 ч при 50 В). После окрашивания геля 0,05% водным раствором бромистого этидия обнаружены две полосы ДНК, положение которых соответствует 3,2 и 3,8 Мр (в качестве стандарта использовали *Eco*RI-фрагменты ДНК фага λ).

б. По 0,5—1 мкг ДНК плазмид рLB гидролизовали эндонуклеазой *Hind*III в условиях опыта 12а. Затем к каждому образцу прибавляли 2 мкл буфера, содержащего 0,9 М трис·НСl (рН 7,5) и 100 мМ MgSO₄, и 1 ед. эндонуклеазы *Pst*I. Смесь инкубировали 1 ч при 37° С и фрагменты ДНК разделяли электрофорезом, как описано в предыдущем опыте. В случае плазмиды рLB 55 при окрашивании геля обнаружено два фрагмента ДНК, положение которых соответствует 1 и 6 Мд; в случае плазмид рLB 29, рLB 112 и рLB 133 обнаружено два фрагмента ДНК величиной 2,6 и 4,4 Мд.

13. Структурный анализ ДНК рLV 55. а. 20 мкг ДНК рLV 55 гидролизвали 2 ч при 37° С действием 20 ед. эндонуклеазы *EcoRI* в 150 мкл буфера, содержащего 90 мМ трис·НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂ и 10 мМ меркаптоэтанол. Белок удаляли экстракцией (2×100 мкл) смесью фенол — хлороформ, 1:3. ДНК высаживали 70% спиртом, пересаждали, промывали спиртом и высушивали. Остаток растворили в 100 мкл буфера, содержащего 20 мМ трис·НСl (рН 7,5), 0,15 М NaCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ меркаптоэтанол, 0,05 мМ dTTP и 100 мкКи [α -³²P]dATP, прибавили 2 ед. ДНК-полимеразы Кленова и смесь инкубировали 30 мин при 40° С. Затем прибавили 10 мкл 0,5 М EDTA и меченую ДНК отделяли от избытка трифосфатов хроматографией на колонке с сефадексом G-50 (0,4×30 см), элюируя буфером, содержащим 1 мМ трис·НСl (рН 8,0), 1 мМ NaCl и 0,1 мМ EDTA, и измеряя поглощение элюата с помощью МСФП-3. Радиоактивную ДНК высадили 70% спиртом, растворили в 100 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис·НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂ и 10 мМ меркаптоэтанол, и прибавили 50 ед. эндонуклеазы *HaeIII*. Смесью инкубировали 3 ч при 37° С, после чего разделяли электрофорезом в трис-боратном буфере на пластине 7,5% PAG (20×20×0,15 см). Радиоактивные олиго- и полинуклеотиды обнаруживали автордиографией и извлекали из геля экстракцией буфером, содержащим 0,5 М NH₄OAc, 10 мМ Mg(OAc)₂ и 0,1% додецилсульфат натрия, как описано в работе [11]. Полученные таким образом вещества подвергали дополнительной очистке электрофорезом в трис-боратном буфере в 10% PAG, содержащем 7 М мочевины, и после элюции из геля анализировали по методике опыта 8e. Результаты анализа представлены на рис. 8.

б. 20 мкг ДНК рLV 55 гидролизвали 2 ч при 37° С с помощью 15 ед. эндонуклеазы *BamHI* в 100 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис·НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂ и 10 мМ меркаптоэтанол. Последующую обработку проводили так же, как в предыдущем опыте, но вместо 0,05 мМ dTTP и 100 мкКи [α -³²P]dATP для достройки выступающих концов использовали 0,05 мМ dCTP+0,05 мМ dTTP и по 100 мкКи [α -³²P]dATP и [α -³²P]dGTP. Установленная нуклеотидная последовательность изображена на рис. 8.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин Ю. А., Каюшин А. Л., Звонков П. М., Якимов С. А., Колосов М. Н. (1979) Биоорган. химия, 5, 1793—1801.
2. Добрылин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Чернов Б. К., Колосов М. Н. (1979) Биоорган. химия, 5, 776—778.
3. Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. (1977) Science, 198, 1056—1063.
4. Crea R., Kraszewski A., Hirose T., Itakura K. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 5765—5769.
5. Goeddel D. V., Kleid D., Bolivar F., Heyneker H. L., Yansura D. G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., Riggs A. D. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 106—110.
6. Hsiung H. M., Brousseau R., Michniewicz J., Narang S. A. (1979) Nucl. Acids Res., 6, 1371—1385.
7. Riggs A. D. (1979) XIth Intern. Congress of Biochemistry, Toronto, Symposium lecture 02-9-Smp8.
8. Schröder E., Hempel R. (1964) Experientia, 20, 529—544.
9. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. (1977) Nucl. Acids Res., 4, 353—371.
10. Добрылин В. Н., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Северцова И. В., Чернов Б. К., Колосов М. Н. (1978) Биоорган. химия, 4, 523—534.
11. Добрылин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В., Быстров Н. С., Болдырева Е. Ф., Чернов Б. К., Колосов М. Н. (1978) Биоорган. химия, 4, 1600—1611.
12. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 560—564.
13. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) Биоорган. химия, 3, 1420—1422.
14. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. (1978) Биоорган. химия, 4, 1281—1283.
15. Szalay A. A., Crohmann K., Sinsheimer R. L. (1977) Nucl. Acids Res., 4, 1569—1578.
16. Polisky B., Bishop R. J., Gelfand D. H. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 3900—3904.

17. O'Farrel P. H., Polisky B., Gelfand D. H. (1978) *J. Bacteriol.*, **134**, 645-654.
18. Гуревич А. И., Аваков А. Э., Киселева О. А., Колосов М. Н. (1978) *Биоорганическая химия*, **4**, 628-638.
19. Fowler A. V., Zabin I. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 5521-5525.
20. Sutcliffe J. G., Ausubel F. M. (1978) in: *Genetic Engineering* (Chakrabarty A. M., ed.) pp. 83-111, CRC Press, Florida, USA.
21. Nichols B. P., Lindell T. D., Stellwagen E., Donelson J. E. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **526**, 410-417.
22. Panet A., Van de Sande I. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Raas A. I., Lillehang I. R., Kleppe K. (1973) *Biochemistry*, **12**, 5045-5050.
23. Klenow H., Henningsen I. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **65**, 168-175.
24. Sood A. K., Narang S. A. (1977) *Nucl. Acids Res.*, **4**, 2757-2765.
25. Беряин Ю. А., Каран М. З., Колосов М. Н., Коробко В. Г. (1976) *Биоорганическая химия*, **2**, 1063-1072.
26. Greep P. J., Bellach M., Bolivar F., Heyneker H. L., Tait R., Boyer H. W. (1978). *Nucl. Acids Res.*, **5**, 2373-2380.
27. Smith D. J., Blattner F. R., Davies J. (1976) *Nucl. Acids Res.*, **3**, 343-353.
28. Wilson G. A., Young F. E. (1975) *J. Mol. Biol.*, **97**, 123-125.
29. Миллер Дж. (1976) *Эксперименты в молекулярной генетике*, с. 307-310, 393, 395, «Мир», М.
30. Clewell D. B. (1972) *J. Bacteriol.*, **110**, 667-676.
31. Guerry P., Le Blanc D. J., Falkow S. (1973) *J. Bacteriol.*, **116**, 1064-1066.
32. Hershey V., Boyer H. W., Yanofsky C., Lovett N. A., Helinski D. R. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3455-3459.

Поступила в редакцию
6.VIII.1979

**SYNTHESIS OF OLIGO- AND POLYNUCLEOTIDES.
XXVIII. THE CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS AND CLONING OF
AN ARTIFICIAL STRUCTURAL GENE FOR BRADYKININ**

KOROBKO V. G., DOBRYNIN V. N., BOLDYREVA E. F.,
SEVERTSOVA I. V., CHERNOV B. K., KOLOSOV M. N.,
GORODETSKII S. I., SLYUSARENKO A. G., KAPELINSKAYA T. V.,
LISENKOV A. F., DUBININ N. P.

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

Eight deoxyoligonucleotides ranging from 9-mer to 12-mer have been chemically synthesized by the phosphotriester approach and enzymatically joined by T4 DNA ligase into an artificial structural gene for the peptide hormone bradykinin. The gene, like that for somatostatin, is a short double stranded DNA (37 b.p.) with protruding 5'-ends which structurally correspond to the recognition sites of restriction nucleases *EcoRI* and *BamHI*. For cloning the gene, a hybrid plasmid (pL 1) was prepared by insertion of a 4.4 Md fragment of phage λ plac5 DNA into the *EcoRI* site of plasmid pBR 322; the fragment contained lac promoter, operator, and almost the whole gene z, its transcription being in the direction of the *BamHI* site of the plasmid. On sequential digestion of pL 1 with endonucleases *BamHI* and (partially) *EcoRI* followed by ligation with the synthetic DNA and molecular cloning, a recombinant plasmid (pLB 55) has been obtained, in which the synthetic gene is fused to the distal part of lac z in the correct reading frame and thus expresses under the control of lac promoter and operator. The structure of the synthetic gene and of the recombinant DNAs obtained was proved by nucleotide-sequence determinations and by restriction analyses.