



УДК 547.963.32.57

## НОВЫЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ ДНК ИЗ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ. СИНТЕЗ ДНК, КОДИРУЮЩИХ ПОВТОРЯЮЩУЮСЯ АНТИГЕННУЮ ДЕТЕРМИНАНТУ ВИРУСА ЯЩУРА

Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Свезерцова И. В.,  
Болдырева Е. Ф., Шилгарова Л. Н., Чувпило С. А.,  
Филиппова Л. Ю., Звонж П. М., Евсильева Т. Е.,

Голосов М. Н.

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

Разработан быстрый метод сборки двухцепочечных ДНК из синтетических олигонуклеотидов, который состоит в раздельном лигировании олигонуклеотидов каждой цепи, достройке 3'-концов синтетического дуплекса ДНК-полимеразой, клонировании образовавшегося фрагмента ДНК с ровными концами в специальном векторе рBBV и регенерации целевой ДНК из рекомбинантной плазмиды при помощи рестрикционной нуклеазы *Bbv* II. Метод позволяет сшивать в один прием большое число олигонуклеотидов, не требует выделения промежуточных продуктов до стадии рекомбинантной плазмиды и не зависит от наличия рестриктивных сайтов на концах синтетического дуплекса, т. е. пригоден для сборки любой нуклеотидной последовательности. Этим методом из 10 химически синтезированных олигонуклеотидов получен 60-членный фрагмент кДНК вируса ящура штамма O<sub>1</sub>K, имеющий комплементарные 5'-выступающие тетра-нуклеотидные концы (ДНК I). Его самолигирование «головой к хвосту» привело к синтетическим ДНК длиной от 120 до 900 п.о., (ДНК II)–(ДНК XV), кодирующим олигомеры антигенной детерминанты (аминокислотной последовательности 141–160 белка VP1) вируса ящура. Осуществлены слияние синтетического гексамера (ДНК VI) с геном *lacZ'* в плазмиде рBBV21 и экспрессия рекомбинантной ДНК в *E. coli*. Установлено, что продукт гибридного гена комплементирует делецию *lacZΔM15*, откуда следует, что он с α-дефектной β-галактозидазой образует тетрамерный ассоциат, несущий на своих N-концах 24 антигенные детерминанты вируса ящура.

Одним из интересных достижений современной иммунологии являются искусственные вакцины на основе синтетических пептидов. Еще в середине 60-х годов было показано, что сравнительно короткие пептиды, иммобилизованные на высокомолекулярном носителе, могут имитировать антигенные детерминанты белков и что антитела к таким пептидам узнают соответствующие аминокислотные последовательности в нативном или денатурированном белке [1]. Успехи генной инженерии позволили распространить этот подход на многие белки, являвшиеся ранее практически недоступными, и в последние годы были иммунологически изучены пептидные фрагменты поверхностных антигенов таких эпидемиологически важных вирусов, как возбудители гриппа и гепатита В [2–8], а также ящура.

Вирус ящура (FMDV) принадлежит к группе пикорнавирусов и отличается значительной антигенной вариабельностью: для него известно 7 серологически различных типов и более 60 подтипов. Доминантные эпитопы вириона (главные сайты связывания антител) обусловлены специфическим белком оболочки, который обычно обозначают VP1, реже VP3, VPT или VPTH. Первичная структура этого белка установлена секвенированием кДНК нескольких штаммов трех серотипов [9–14].

Белок VP1 штамма O<sub>1</sub>K построен из 213 аминокислотных остатков [9] и содержит два иммуногенных участка в С-концевой трети молекулы [15]. Две группы исследователей независимо показали [16, 17], что один иммуногенный участок находится на самом конце полипептидной

цепи, а другой расположен между аминокислотами 140 и 160 и представляет собой главную антигенную детерминанту VP1. Были синтезированы и иммунологически исследованы эйкозапептид P1 [16] и гексадекапептид P2 [17], имеющие соответственно последовательности 141–160 и 144–159 белка VP1. Антисыворотки, полученные при иммунизации этими пептидами, оказались высокоспецифичными к VP1 и вирионам штамма O1K (причем не давали перекрестной реакции с вирионами серотипов A и C) и обладали защитным действием в опытах на животных.

141 VPNLRGDLQVLAQKVARTLP 160 144 LRGDLQVLAQKVARTL 159

Результаты этих исследований имеют важное значение для понимания функциональной топографии вируса ящура и представляют теоретический интерес для молекулярной иммунологии. Что касается практического значения, то в этом отношении синтетические пептиды имеют два серьезных недостатка: во-первых, они дорого стоят, а, во-вторых, обладают низкой иммуногенностью; чтобы вызвать достаточно сильный ответ, их обычно конъюгируют с подходящим белком (в случае P1 и P2 таким белком был гемоглобин улитки [16, 17]) и вводят вместе с адьювантом. Поэтому химический синтез пептидов вряд ли можно считать практическим способом получения вакцинных препаратов для медицины и ветеринарии.

Более перспективными для этой цели представляются подходы, основывающиеся на технологиях рекомбинантных ДНК, т. е. на биосинтезе целевой аминокислотной последовательности путем экспрессии соответствующей матрицы в микробной или животной клетке. Этим путем антигенные детерминанты можно получать не в виде коротких пептидов, а в составе полипептидов, благодаря чему усиливается их иммуногенность и повышается устойчивость к деградации внутриклеточными пептидазами. К числу таких полипептидов принадлежат, естественно, сами капсидные белки вирионов; в качестве примеров следует упомянуть получение природного белка VP1 вируса ящура экспрессией его кДНК в *E. coli* [10], а также микробиологический синтез антигенов HbsAg и HbcAg вируса гепатита В на рекомбинантных плазмидах в дрожжах и бактериях [18, 19]. Особенно привлекательны живые вакцины на основе вируса осповакцины, которые получают при вставке в его геном фрагментов ДНК, кодирующих антигены других вирусов, как описано для гемагглютинина вируса гриппа [20, 21] и HbsAg вируса гепатита В [22].

Очевидно, что для получения генно-инженерным путем вакцин против ящура необходимо располагать по крайней мере фрагментом ДНК, кодирующим упоминавшиеся выше пептиды P1 и P2. Такой фрагмент можно синтезировать химико-ферментативными методами и рекомбинацией с природной ДНК превратить в функционально активный гибридный ген, экспрессия которого *in vivo* будет приводить к искусственному белку с антигенной детерминантой вируса ящура. В статье [23] описаны «первые шаги для реализации этого подхода в применении к вирусу гепатита В человека». В этой работе был синтезирован фрагмент ДНК, кодирующей антигенную детерминанту HbsAg, и осуществлена его экспрессия в бесклеточной системе с образованием химерного полипептида, содержащего 72 аминокислотных остатка (далее — а. к.) хлорамфениколацетилтрансферазы и 17 а. к. белка HbsAg. Авторы статьи не описывают свойств полученного полипептида и не объясняют, почему для слияния с синтетической ДНК выбрали именно ген *cat*.

С вашей точки зрения, продукт гена *cat*, к тому же укороченный, не является оптимальным носителем для антигенных групп, и маловероятно, что его химера с 17-членным фрагментом HbsAg обладает какими-либо достоинствами по сравнению с природным антигеном. Более высокой активности можно ожидать от высокомолекулярного белка, несущего большое число одинаковых или разных антигенных детерминант, расположенных на поверхности белковой глобулы и доступных для взаимодействия с другими макромолекулами. Таким высокомолекулярным носителем может

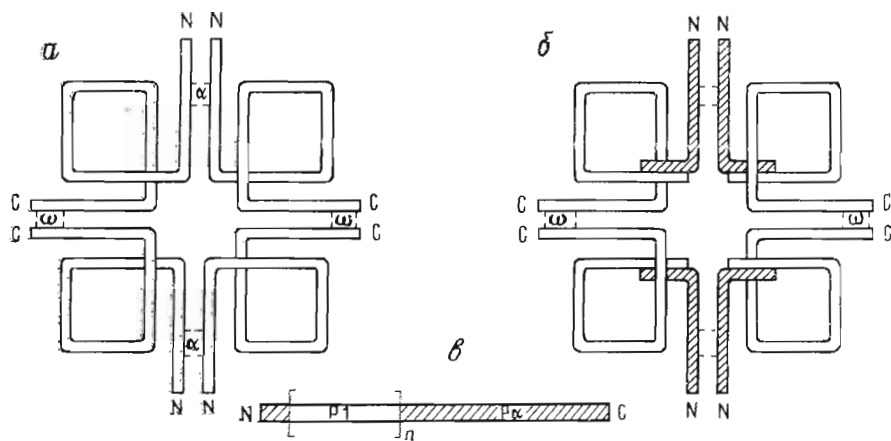


Рис. 1. Схема ассоциации  $\beta$ -галактозидазы с образованием тетрамера. *a* — белок димерного типа, *б* — делеция M15, комплементарная  $\alpha$ -пептидом (заштрихован), *в* — гибрид  $\alpha$ -пептида (P $\alpha$ ) с олигомерной антигенной детерминантой (P1) вируса ящура. Указаны N- и C-концы

служить  $\beta$ -галактозидаза — один из наиболее крупных и хорошо изученных белков *E. coli*, биохимии и генетике которого посвящен ряд специальных обзоров (см., например, [24–27]). Этот фермент имеет молекулярную массу около 500 кДа и состоит из четырех идентичных полипептидных цепей (по 1023 а.к. каждая [28]), ассоциация которых зависит от N-проксимального ( $\alpha$ ) и дистального ( $\omega$ ) участков, как схематически показано на рис. 1*a*. Удаление участка 11–41 (делеция M15) приводит к инактивации фермента вследствие потери способности к самосборке, но в присутствии  $\alpha$ -концевого пептида ( $\alpha$ -донора) энзиматическая активность восстанавливается в результате образования  $\alpha$ -комплементарированного тетрамера (рис. 1*б*). Структура N- и C-кошцов фермента, напротив, не имеет критического значения, и присоединение к ним «чужеродного» полипептида (даже длиной несколько сотен аминокислотных остатков) не вызывает инактивации, т. е. не нарушает ассоциацию субъединиц. Образующиеся химерные  $\beta$ -галактозидазы реагируют с антителами против присоединенного полипептида [29], откуда следует, что его антигенные детерминанты экспонированы на поверхности белка-тетрамера.

В связи с этим мы решили синтезировать двухцепочечную ДНК, кодирующую пептид P1, осуществить ее олигомеризацию и слияние с геном *lacZ'* (кодирующим  $\alpha$ -пептид  $\beta$ -галактозидазы) и таким образом получить гибридный ген, продукт которого представлял бы собой полипептид (P1)<sub>n</sub>—P $\alpha$  (рис. 1*в*) и комплементаровал делецию M15 с образовавшимся высокомолекулярным субъединичным белком, несущим на своих N-концах антигенные детерминанты вируса ящура. При планировании этой работы мы учитывали, что ящурная РНК эволюционно приспособлена к трансляции в животной клетке, а соответствующая кДНК способна программировать в *E. coli* интенсивный биосинтез белка VP1 (до 17% суммарного белка [10]). Принимая во внимание эти обстоятельства и имея в виду применение синтетической ДНК не только для экспрессии в микробной клетке, но и для получения живой вакцины на основе поксвирусов, мы предпочли не составлять искусственную цуклеотидную последовательность из предположительно оптимальных кодонов, а синтезировать природную последовательность кДНК 3397–3456 (рис. 2), которая кодирует антигенный участок 141–160 белка VP1 [9]. Чтобы обеспечить возможность направленной олигомеризации по типу «голова к хвосту» без нарушения рамки считывания и без введения дополнительных кодонов, было решено снабдить эту последовательность взаимно комплементарными выступающими концами, т. е. сконструировать ДНК I.

С этой целью были синтезированы фосфотриэфирным путем 10 олигонуклеотидов (I)–(X); кроме того, были получены два 5'-удлиненных олигонуклеотида — (Ia) и (Xa), которые служили зондами при

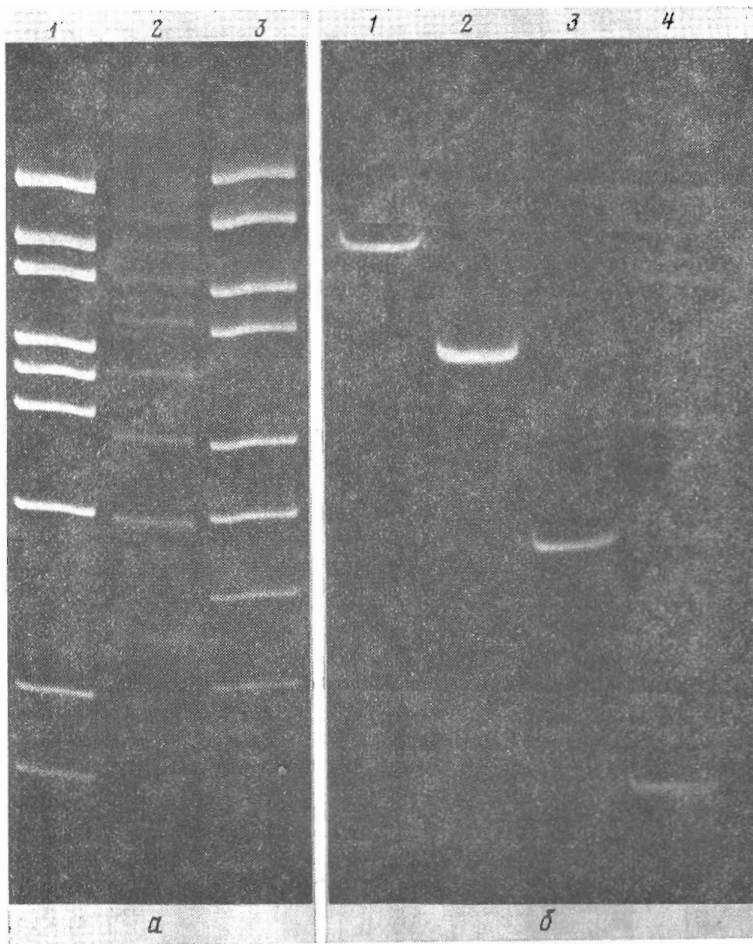


Рис. 5. Электрофорез в 6% ПААГ продуктов олигомеризации ДНК I (колонок 2—*a* и колонок 4—*b*); колонки 1 и 3 (*a*) — *Hae*III- и *Msp*I-гидролизаты ДНК плазмиды рFMD5; колонки 1—3 (*b*) — *Bbv*I-гидролизат ДНК плазмид рFMD60, рFMD40 и рFMD20 соответственно

ных опытах плазмиду рFMD5 сначала подвергали полному гидролизу пуклеазой *Msp*I, больший фрагмент (около 650 п.о.) выделяли электрофорезом в 6% ПААГ и затем уже гидролизовали нуклеазой *Bbv*II. Образовавшуюся ДНК I выделяли электрофорезом в 7,5% ПААГ и лигировали «головой к хвосту» действием T4-ДНК-лигазы в таких условиях, чтобы преобладали продукты реакции со степенью олигомеризации  $n$  от 2 до 15 (рис. 5). Полученные таким образом олигомеры разделяли электрофорезом в 6% ПААГ, используя в качестве маркеров продукты *Bsp*I- и *Msp*I-гидролиза плазмиды рBVV21 (рис. 5а). Выделенные из геля димер (ДНК II), тетрамер (ДНК IV) и гексамер (ДНК VI) клонировали в векторе, полученном гидролизом плазмиды рFMD5 рестриктазой *Bbv*II, в результате чего получили соответственно плазмиды рFMD20, рFMD40 и рFMD60 (рис. 4).

Работа по синтезу ДНК I и ее олигомеров преследовала несколько целей препаративного и методического характера. Во-первых, мы стремились получить такую ДНК, которая кодировала бы многократно повторяющийся антигенный участок 141—160 белка VP1 вируса ящура, чтобы в дальнейшем провести ее рекомбинацию с подходящим прокариотическим или эукариотическим вектором и осуществить экспрессию в микробной или животной клетке; для этого мы синтезировали ДНК VI и сконструировали плазмиду рFMD60. Во-вторых, как уже указывалось выше, представляло интерес получение гибридного гена, продукт которого являлся бы полипептидом  $(P1)_n - P2$  и образовывал тетрамер с  $\alpha$ -дефектной  $\beta$ -галактозидазой

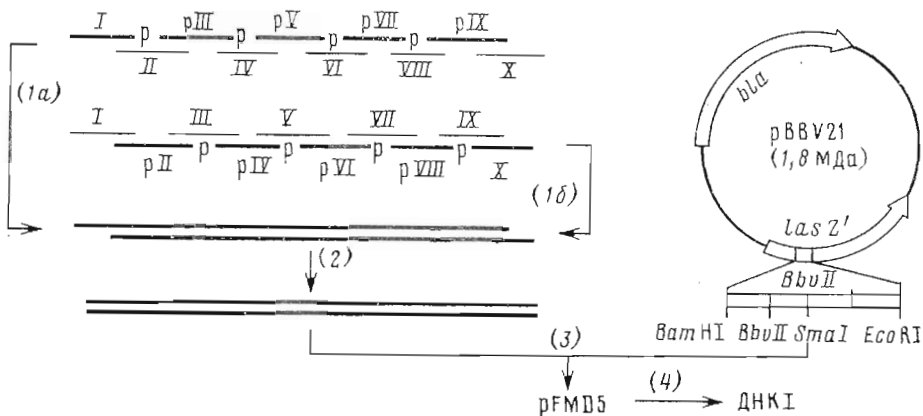


Рис. 3. Схема сборки двухцепочечной ДНК из синтетических олигодезоксинуклеотидов с клономированием и регенерацией из вектора pBBV

скрининге рекомбинантных плазмид гибридизацией колоний (см. ниже). Сборка двухцепочечной ДНК из олигонуклеотидов проводилась новым методом, дающим большую экономию труда и времени по сравнению с обычной техникой параллельно-последовательного лигирования.

Этот метод состоит в том (рис. 3), что олигонуклеотиды верхней и нижней цепей ДНК сшиваются отдельно (стадии 1а и 1б), образовавшийся дуплекс достраируют по 3'-концам (стадия 2) и клонируют в специальном векторе (стадия 3), из которого затем регенерируют целевую ДНК (стадия 4).

Раздельная сшивка обеих цепей ДНК является простым и эффективным средством против ошибочного лигирования, происходящего из-за образования неправильных или не полностью комплементарных комплексов вследствие структурного сходства нескольких олигонуклеотидов разных цепей, в особенности когда ДНК обладает элементами симметрии, а используемые препараты ферментов содержат примеси экзонуклеаз. Благодаря подавлению побочных реакций таким образом можно успешно лигировать сразу 10 и более олигонуклеотидов; правда, половина из них служит при этом только «подкладкой» и, следовательно, расходуется непроизводительно, но обычно эти потери не имеют значения, так как ферментативная сшивка проводится в гораздо меньшем масштабе, чем химический синтез. Начиная с 1981 г., мы систематически использовали этот прием (в частности, при синтезе *lac*-операторной ДНК [30], гена человеческого лейкоцитарного интерферона  $\alpha_2$  [31], концевого фрагмента гена *lacZ* *E. coli* [32], промотора P25 бактериофага T5 [33]), и во всех случаях сшивка по отдельности верхней и нижней цепей ДНК существенно облегчала гель-электрофоретическое разделение продуктов лигирования.

Важнейшей стадией разработанного нами метода является клономирование в специализированных векторах pBBV [34]. Мы сконструировали три серии таких векторов с разной рамкой считывания гена *lacZ'* и различными рестриктивными сайтами в полилинкерной части; изображенная на рис. 3 плаزمида pBBV21 является одним из представителей серии  $3n+2$ , т. е. плазмид со сдвигом рамки +2. Применение этих векторов представляет собой дальнейшее усовершенствование предложенной ранее методологии клономирования с регенерацией [35] и позволяет осуществить сборку двухцепочечной ДНК вообще без выделения веществ на промежуточных этапах.

Для этого продукты раздельной сшивки обеих цепей объединяют, достраируют четырьмя дезоксирибонуклеозидтрифосфатами с помощью ДНК-полимеразы и образовавшуюся смесь фрагментов ДНК с тупыми концами лигируют с *Sma*I-расщепленным вектором. После трансформации *E. coli* (*lacZ*ΔM15) проводят селекцию рекомбинантов по фенотипическому изменению  $Lac^+ \rightarrow Lac^-$  или, лучше,  $Lac^- \rightarrow Lac^+$  и гибридизацию колоний с  $^{32}P$ -мечеными 5'-концевыми олигонуклеотидами. Оптимальную темпера-

туру гибридизации с нуклеотидами длиной  $15 \pm 2$  звеньев можно приблизительно определить по формуле  $T_m = 2(A+T) + 3(G+C)$ . Если такой ориентировочный расчет дает величину  $T_m < 40^\circ \text{C}$ , то в качестве зондов предпочтительно использовать олигонуклеотиды, удлинённые с 5'-стороны на несколько звеньев, соответствующих прилегающей последовательности вектора.

Применение таких элонгированных зондов повышает специфичность гибридизации и облегчает идентификацию клонов с искомой плазмидой, а для их получения достаточно провести лишь несколько дополнительных стадий при синтезе 5'-концевых олигонуклеотидов по стандартной схеме с наращиванием полинуклеотидной цепи в направлении  $5' \leftarrow 3'$ .

В описываемом синтезе ДНК I образующийся на стадии 2 дуплекс с ровными концами содержит 64 п. о. и, следовательно, должен компенсировать сдвиг рамки гена *lacZ'* при вставке в векторы pBBV с полилинкерами  $3n+2$  п. о. Поэтому с целью селекции рекомбинантов во восстановление фенотипа *Lac*<sup>+</sup> клонирование синтетической ДНК проводили в плазмиде pBBV21. Реципиентом служил штамм *E. coli* F<sup>-</sup> *lacZ*Δ*M15* *recA*, трансформанты высевали на индикаторную среду с X-gal и окрашенные в синий цвет колонии анализировали гибридизацией по методу [36]. В качестве радиоактивных зондов использовали 5'-<sup>32</sup>P-меченые олигонуклеотиды (Ia) и (Xa), поскольку 5'-концевые сегменты (I) и (X) не отвечали предъявляемым требованиям (расчетные величины  $T_m$  соответственно 44, 41, 35 и 30° C). Для структурного анализа рекомбинантные плазмиды расщепляли нуклеазой *EcoRI*, вводили 3'-концевую метку и секвенировали как описано в работе [35].

Среди *Lac*<sup>+</sup>-трансформантов приблизительно 10% гибридизовались с обоими зондами; выделенные из них плазмиды pFMD5 и pFMD9 оказались идентичными и содержали полную синтетическую вставку длиной 64 п. о. (рис. 4). Для выяснения характера побочных реакций мы проанализировали также плазмиды из нескольких *Lac*<sup>+</sup>-клонов, гибридизующихся только с одним зондом; две такие плазмиды приведены в качестве иллюстрации на рис. 4. Плаزمида pFMD12 имеет 61-членную вставку, у которой отсутствует последний из 20 триплетов, вероятно, вследствие частичного гидролиза 5'-выступающих нуклеотидов нижней цепи при достройке 3'-конца верхней цепи. 70-членная вставка в плазмиде pFMD8, (рис. 4в), по-видимому, образовалась в результате лигирования равными концами двух 3'-достроенных продуктов частичной сшивки в процессе их лигирования с вектором. Последняя плазмиды содержит в интактном виде все исходные олигонуклеотиды, в том числе 5'-концевые; тем не менее перекрестная гибридизация с элонгированными зондами (Ia) и (Xa) позволяет легко дифференцировать клетки с искомой плазмидой pFMD5 (Ia<sup>+</sup>, Xa<sup>+</sup>) от клеток с неправильно спитой ДНК (Ia<sup>+</sup>, Xa<sup>-</sup>).

Заключительный этап — регенерация синтетической ДНК после ее клонирования в векторе pBBV (стадия 4 на рис. 3) осуществляется при помощи рестрикционной эндонуклеазы *BbvII*, которая гидролизует полинуклеотидную цепь сбоку от сайта узнавания GTCTTC [37]. Проведенный нами анализ концевой структуры *BbvII*-фрагментов плазмиды pBK322 показал, что расщепление этой нуклеазой происходит на расстоянии 6 нуклеотидов перед 5'-концом указанного сайта и 2 нуклеотидов за 3'-концом комплементарной последовательности GAAGAC. В плазмиде pBBV21 (и других векторах pBBV подгруппы I) имеются сайты *SmaI* и два *BbvI* противоположной полярности, которые расположены таким образом, что участки расщепления ДНК обеими нуклеазами частично совпадают, благодаря чему фрагмент ДНК, клонированный в сайте *SmaI*, может быть точно вырезан по 5'-концам нуклеазой *BbvII*.

При расщеплении рекомбинантной плазмиды pFMD5 этой нуклеазой сразу получается синтетическая ДНК I, выделение которой не представляет трудности, так как второй продукт расщепления является линеаризованным вектором pBBV21. Известно, однако, что небольшие плазмиды гидролизуются некоторыми рестриктазами значительно труднее, чем линейные ДНК. Поэтому с целью экономии нуклеазы *BbvII* в препаратив-

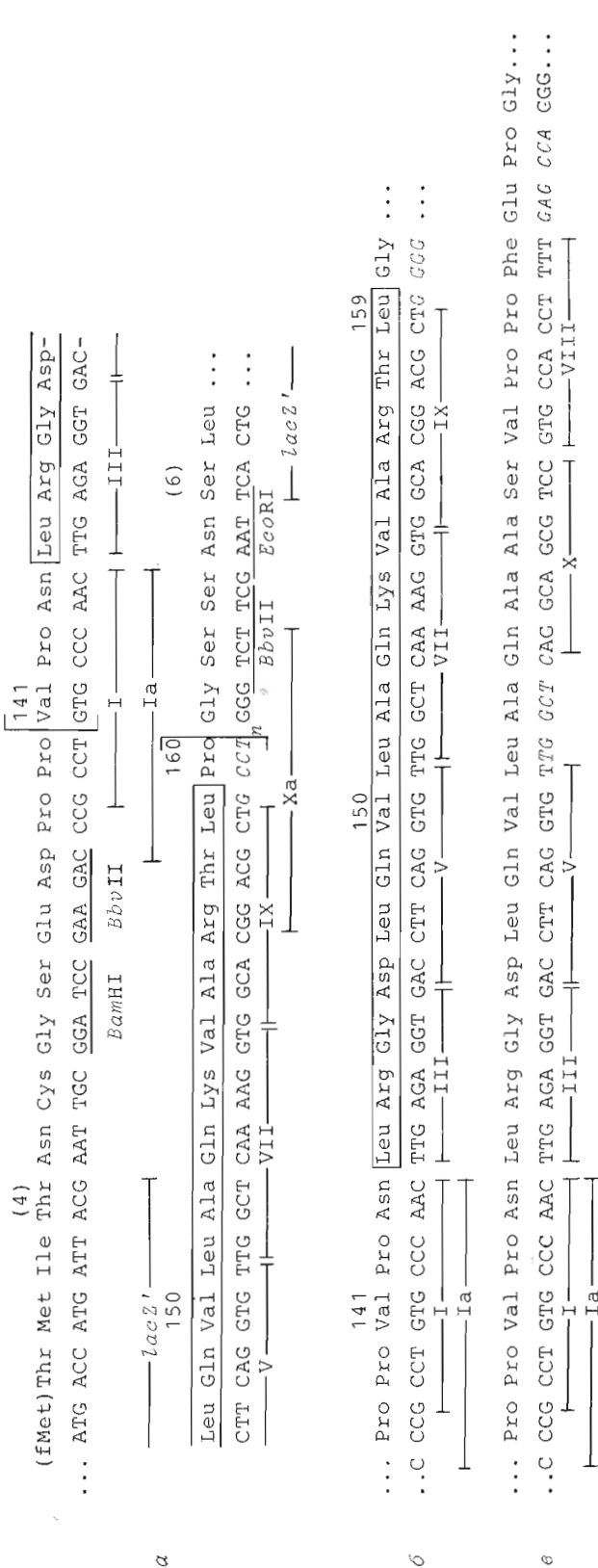


Рис. 4. Нуклеотидная последовательность рекомбинантных плазмид и кодируемая ею аминокислотная последовательность гибридного белка. В рамку заключена антигенная детерминанта 144-159 белка VP1 вируса ящура. Нумерация в скобках относится к  $\alpha$ -пептиду  $\beta$ -галактозидазы. Отмечены границы синтетических олионуклеотидов и сайты использованных нуклеаз: курсивом обозначены участки, синтезированные ДНК-полимеразой. *a* - pFMD5 ( $n=1$ ), pFMD20 ( $n=2$ ), pFMD40 ( $n=4$ ), pFMD60 ( $n=6$ ); *b* - pFMD12; *в* - pFMD8

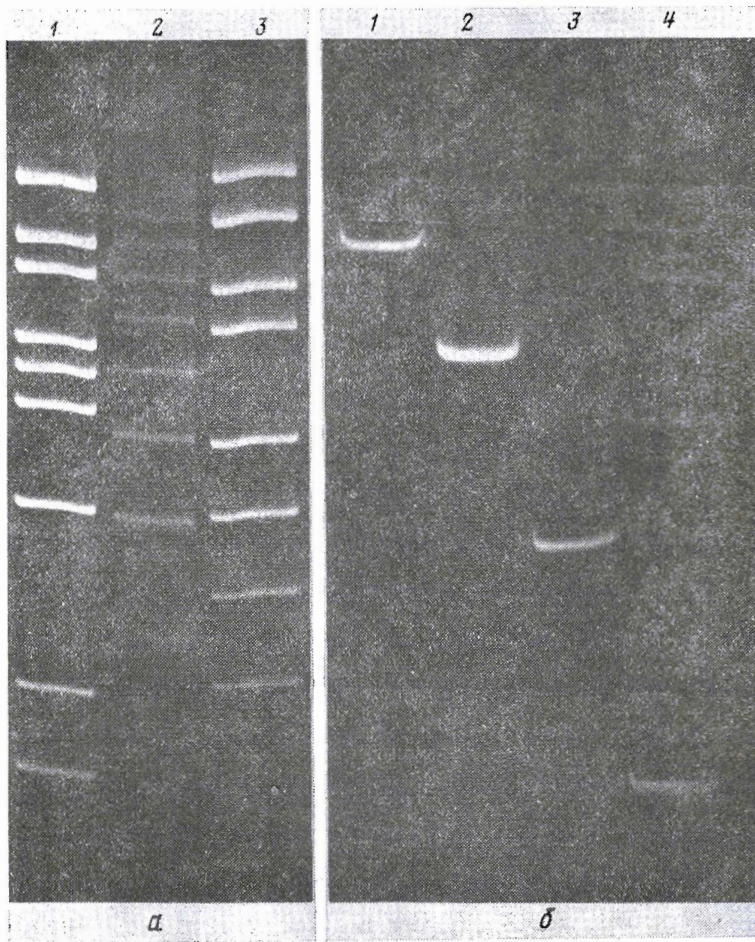


Рис. 5. Электрофорез в 6% ПААГ продуктов олигомеризации ДНК I (колошка 2 — а и колошка 4 — б); колонки 1 и 3 (а) — *HaeIII*- и *MspI*-гидролизаты ДНК плазмиды рFMD5; колонки 1—3 (б) — *BbvII*-гидролизат ДНК плазмид рFMD60, рFMD40 и рFMD20 соответственно

ных опытах плазмиду рFMD5 сначала подвергали полному гидролизу нуклеазой *MspI*, больший фрагмент (около 650 п.о.) выделяли электрофорезом в 6% ПААГ и затем уже гидролизовали нуклеазой *BbvII*. Образовавшуюся ДНК I выделяли электрофорезом в 7,5% ПААГ и лигировали «головой к хвосту» действием Т4-ДНК-лигазы в таких условиях, чтобы преобладали продукты реакции со степенью олигомеризации  $n$  от 2 до 15 (рис. 5). Полученные таким образом олигомеры разделяли электрофорезом в 6% ПААГ, используя в качестве маркеров продукты *BspI*- и *MspI*-гидролиза плазмиды рBVV21 (рис. 5а). Выделенные из геля димер (ДНК II), тетрамер (ДНК IV) и гексамер (ДНК VI) клонировали в векторе, полученном гидролизом плазмиды рFMD5 рестриктазой *BbvII*, в результате чего получили соответственно плазмиды рFMD20, рFMD40 и рFMD60 (рис. 4).

Работа по синтезу ДНК I и ее олигомеров преследовала несколько целей препаративного и методического характера. Во-первых, мы стремились получить такую ДНК, которая кодировала бы многократно повторяющийся антигенный участок 141—160 белка VP1 вируса ящура, чтобы в дальнейшем провести ее рекомбинацию с подходящим прокариотическим или эукариотическим вектором и осуществить экспрессию в микробной или животной клетке; для этого мы синтезировали ДНК VI и сконструировали плазмиду рFMD60. Во-вторых, как уже указывалось выше, представляло интерес получение гибридного гена, продукт которого являлся бы полипептидом (Р1)<sub>n</sub> — Р<sub>α</sub> и образовывал тетрамер с α-дефектной β-галактозидазой



(рис. 1, б и в). В литературе отсутствовали сведения о том, при какой максимальной «нагрузке» на N-конце  $\alpha$ -пептид еще сохраняет способность комплекментировать делецию *lacZ*Δ*M15*. Поэтому мы использовали рекомбинантные плазмиды со вставкой синтетической ДНК I и ее олигомеров, чтобы сравнить эффект последовательного увеличения этой «нагрузки» при присоединении к N-концу  $\alpha$ -пептида 20 а.к. (плазида рFMD5), 40 а.к. (рFMD20), 60 а.к. (рFMD40) и 120 а.к. (рFMD60).

Оказалось, что все полученные нами гибридные белки, биосинтез которых контролируется перечисленными выше плазидами, способны к комплексации и, таким образом, обеспечивают фенотип Lac<sup>+</sup> клеткам, несущим эти плазмиды.

Вектор рBVV21 [34] был сконструирован нами на основе плазмиды рUR222 [38], при получении которой из рBR322 проводился общий химический мутагенез, вследствие чего структура векторной ДНК в области гена *lacZ'* достоверно не известна. Если считать, что она не изменилась, и основываться на опубликованной нуклеотидной последовательности рBR322 [39] и *lacZ* *E. coli* [28], то  $\alpha$ -пептид, кодируемый плазмидой рUR222, должен содержать 110 а.к., а продукт гибридного гена ДНК VI — *lacZ'* в рFMD60 является таким же по величине белком (230 а.к.), как белок VP1 вируса ящура (от 208 до 214 а.к. у разных штаммов). Согласно данным работы [17], главная антигенная детерминанта VP1 представляет собой гексадекапептид P2, свернутый в  $\alpha$ -спираль, одна сторона которой гидрофобна, а другая гидрофильна, причем для поддержания этой конформации на белке-носителе желательнo, чтобы на N-конце пептида P2 находился остаток пролина, поскольку он является эффективным стартером спирализации. Как видно на рис. 4а, сконструированные нами рекомбинантные ДНК соответствуют этой рекомендации: в кодируемых ими белках регулярно повторяются 16-членная антигенная детерминанта (заклученная в рамку аминокислотная последовательность 144—159) и 4-членный снейсер, содержащий два Pro, а всему кластеру антигенов предшествуют еще два пролиновых остатка. Поэтому можно надеяться, что в ассоциатах этих белков с  $\beta$ -галактозидазой Δ*M15* экспонированные на поверхности тетрамера антигенные детерминанты вируса ящура сохраняют конформацию, близкую к нативной, и обладают ожидаемой активностью. Насколько эти предположения соответствуют действительности, покажет изучение антигенных и иммуногенных свойств этих белков, которое не входило в задачу данной работы и будет предметом специального иммунологического исследования.

Главной целью нашей работы являлось усовершенствование сборки ДНК из олигонуклеотидов и практическая проверка новой методологии на примере синтеза двухцепочечных ДНК, кодирующих многократно повторяющуюся антигенную детерминанту вируса ящура. За последние годы были достигнуты большие успехи в усовершенствовании химического синтеза олигонуклеотидов (см. обзор [40], [41]), благодаря чему стало возможным исходя из мономеров быстро синтезировать на полимерном носителе 15—20-членные олигонуклеотиды и выделять их в чистом виде без применения высокоэффективной хроматографии и гель-электрофореза [42]. Однако техника сборки ДНК из олигонуклеотидов мало изменилась со времени пионерских работ Кораны и по-прежнему оставалась многостадийной и трудоемкой. Так, в опубликованной недавно статье по синтезу гена человеческого интерферона  $\alpha_2$  [43] сшивка 68 синтетических 15-членных нуклеотидов (по 400 пмоль каждого) была выполнена в 17 стадий, причем было получено 0,01 пмоль ДНК «длиной около 500 п.о.», из которой молекулярным клонированием был выделен синтетический ген. В отличие от этого многостадийного синтеза в настоящей работе были сшиты сразу все олигонуклеотиды (десять 10—13-меров) и в два этапа с промежуточным клонированием получен набор индивидуальных ДНК длиной от 60 до 900 п.о. Поскольку эффективность лигирования находится в прямой зависимости от длины сшиваемых олигонуклеотидов (точнее, от протяженности перекрываемых участков в комплекментарном комплексе), очевидно, что описываемым методом можно из 15—20-членных олигонуклеотидов в один прием собирать ДНК длиной свыше 100 п.о.

Таким образом, разработанный нами метод позволяет быстро получать двухцепочечные ДНК из синтетических олигонуклеотидов обычной величины. Достоинствами этого метода являются экономия труда и времени, которые ранее расходовались на выделение промежуточных продуктов лигирования, и полная гомогенность конечной ДНК, не достижимая никакими средствами, кроме молекулярного клонирования. Существенно также, что получающиеся при клонировании в векторах рВВV рекомбинантные плазмиды являются перманентным источником биологически очищенной ДНК.

Авторы выражают благодарность Н. И. Матвиенко (Институт белка АН СССР, Пущино) за препарат эндонуклеазы *BbvII*.

### Экспериментальная часть

Общие сведения об эксперименте см. [35]. Рестрикционная нуклеаза *BbvII* получена от Н. И. Матвиенко (Институт белка АН СССР, Пущино). В работе использовали dNTP фирмы P-L Biochemicals, [ $\gamma$ - $^{32}$ P]rATP (3000 Ки/ммоль) фирмы Amersham; рестрикционные эндонуклеазы *EcoRI*, *BamHI*; эндонуклеазу *SmaI* производства НПО «Фермент» (Вильнюс). Остальные ферменты выделяли как описано в литературе с небольшими изменениями: *HaeIII* и *AspI* — по методу [44], ДНК-лигазу и Т4-полинуклеотидкиназу модифицированным способом [45], ДНК-полимеразу (фрагмент Кленова) получали из штамма суперпродукента модифицированным способом [46].

*Синтез олигонуклеотидов (II)–(IX)* был выполнен фосфотриэфирным методом в растворе аналогично описанному [35]. Нуклеотидная цепь наращивалась в направлении 5' ← 3' преимущественно ди-, три- и тетра-нуклеотидными блоками; в качестве конденсирующих агентов были использованы мезитиленсульфо-3-нитро-1,2,4-триазолид или 2,4,6-триизопропилсульфохлорид в смеси с тетразолом в соотношении 1 : 3. Р-Цианэтильные группы перед конденсацией удаляли согласно [47] обработкой 10% раствором *трет*-бутиламина в пиридине в течение 15 мин при 20° С. N, P-Защищенные олигонуклеотиды детритилировали 2–3 мин 2% раствором бензолсульфокислоты в смеси хлороформ – метанол (7 : 3), а N, P-незащищенные олигонуклеотиды — 80% уксусной кислотой (20 мин при 20° С). N-Ацильные и P-хлорфенильные защитные группы удаляли действием конц. аммиака в течение 12 ч при 50° С.

*Выделение олигонуклеотидов (II)–(IX)*. Полностью деблокированные олигонуклеотиды выделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl (от 0 до 0,4 М) в 7 М мочевины при pH 7,5, а затем при pH 3,5.

*Синтез олигонуклеотидов (I), (Ia), (X) и (Xa)* был выполнен твердофазным триэфирным методом аналогично описанному ранее [39] с тем отличием, что межнауклеотидные конденсации проводили в присутствии 0,3 М мезитиленсульфо-3-нитро-1,2,4-триазолида и 0,6 М метилимидазола в абсолютном ацетонитриле. N, P-Деблокирование и отщепление олигонуклеотидов от полимерного носителя проводили 30% аммиаком при 55° С в течение 24 ч. Олигонуклеотиды выделяли хроматографией на колонке с тритил-сефарозой с градиенте концентрации этанола от 0 до 50%. Фракции, элюированные 25–30% этанолом, концентрировали, обрабатывали 80% уксусной кислотой и очищали ионообменной хроматографией, как описано выше.

*Раздельное легирование цепей*. Смесь олигонуклеотидов (III), (V), (VII) и (IX) (по 1 нмоль каждого) инкубировали в присутствии 10 нмоль АТФ с добавкой 10 мкКи [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТФ и 20 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы в 100 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl (pH 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 5 мМ дитиотреит, в течение 40 мин при 37° С. Затем смесь прогрели 10 мин при 65° С, охладили, прибавили по 1,5 нмоль олигонуклеотидов (I) и (X) и по 1 нмоль олигонуклеотидов (II), (IV), (VI) и (VIII), нагрели до 100° С и медленно охладили до 12° С за 3 ч. К полученной смеси прибавили 2 мкл 0,5 М дитиотреита, 8 мкл 5 мМ АТФ, 10 мкл 100 мМ трис-НСl, 10 мкл 100 мМ MgCl<sub>2</sub>, 70 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы, объем довели во-

дой до 200 мкл и инкубировали при 12° С 4 ч. Реакцию останавливали прогреванием при 65° С в течение 15 мин, смесь охладили и экстрагировали хлороформом (3×200 мкл). Продукты лигирования отделили от не вступивших в реакцию олигонуклеотидов и АТР хроматографией на сефадексе G-50. Аналогичным образом проводили лигазную сшивку олигонуклеотидов нижней цепи — (II), (IV), (VI), (VIII) и (X).

**Клонирование.** 0,5 мкг каждого из продуктов сшивки верхней и нижней цепей ДНК I нагрели 10 мин при 80° С в 20 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, и 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, затем медленно (за 3 ч) охладили до 18° С и прибавили меркаптоэтанол до концентрации 10 мМ, четыре дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфата до концентрации 50 мМ и 10 ед. акт. ДНК-полимеразы *E. coli* (фрагмент Кленова). Смесь инкубировали 20 мин при той же температуре, реакцию останавливали прогреванием на кипящей водяной бане, смесь экстрагировали хлороформом и продукт реакции после отделения от избытка трифосфатов на колонке с сефадексом G-50 осадил спиртом. 1 мкг гидролизованной рестриктазой *Sma*I ДНК рВВ21 сшили с 0,5 мкг синтетической ДНК в 50 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ дитиотреит, 0,2 мМ АТР и 100 ед. акт. T4-ДНК-лигазы, в течение 3 ч при 20° С. Смесь прогрели 10 мин при 65° С и 5 мкл использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* F<sup>-</sup>Δ *ZM15 recA*. Трансформанты высевали на чашки с LB-агаром, содержащие 100 мкг/мл ампициллина и 40 мкг/мл X-gal. После посева 1/10 части трансформационной смеси было получено 80 белых и 140 синих колоний; 72 синие колонии гибридизовались с 5'-<sup>32</sup>P-фосфорилированным продуктом лигирования. 12 клонов были проверены по гибридизации с удлинёнными олигонуклеотидами (Ia) и (Xa). Два клона показали положительную гибридизацию с обоими зондами. Плазмидная ДНК из этих клонов (рFMD5 и рFMD9) была выделена и анализирована рестриктивным анализом при помощи нуклеаз *Hae*III и *Bbv*II. Анализ нуклеотидной последовательности, выполненный как описано в работе [35], после введения 3'-концевой метки в *Eco*RI-сайт при помощи ДНК полимеразы *E. coli* (фрагмент Кленова) показал, что в плазидах рFMD5 и рFMD9 последовательность ДНК, кодирующая главную антигенную детерминанту белка VP1 вируса ящура, находится в рамке считывания α-пептида β-галактозидазы. Аналогичным образом были проанализированы нуклеотидные последовательности вставок в плазидах рFMD8 и рFMD12 (бактерии, несущие эти плазмиды, гибридизовались только с одним из зондов) (см. рис. 4).

**Гибридизация с олигонуклеотидными зондами.** Нитроцеллюлозные фильтры для гибридизации колоний готовили по методу [36], за исключением того, что фильтры высушивали на воздухе 1 ч при 65° С. Предгибридизацию проводили 1,5–2 ч при 60° С в растворе, содержащем 2× SSC, 0,2% SDS, 5× раствор Денхардта, 100 мкг/мл ДНК молок лосося. Гибридизацию с <sup>32</sup>P-мечеными олигонуклеотидами (Ia) и (Xa) проводили 1 ч при 40–42° С в растворе, содержащем 6× SSC, 0,2% SDS, 2× раствор Денхардта, 100 мкг/мл ДНК молок лосося и 5·10<sup>5</sup> имп·мин<sup>-1</sup>·мл<sup>-1</sup> меченого зонда. Фильтр отмывали 2 раза по 20 мин при 20° С в 2× SSC, 0,2% SDS а затем 2 раза по 2 мин при 38° С в 4× SSC, 0,2% SDS, высушивали и проводили автордиографию в течение 1 ч с усиливающим экраном ЭУВЗ.

**Получение и олигомеризация ДНК I.** 400 мкг ДНК плазмиды рFMD5 обработали 2 ч при 37° С 400 ед. акт. рестриктазы *Msp*I в 1 мл раствора, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ NaCl и 5 мМ дитиотреит. Получившуюся смесь фрагментов разделяли препаративным электрофорезом в пластине 6% полиакриламидного геля, содержащего 0,05 М трис-борат. После прокрашивания геля раствором бромистого этидия вырезали полосу, содержащую фрагмент ДНК величиной около 580 н.п., который извлекали электрофорезом на мембрану в аппарате фирмы Isco (США) и очищали хроматографией на колонке с сефадексом G-50. Затем 60 мкг этого фрагмента обработали 3 ч при 37° С 60 ед. акт. рестриктазы *Bbv*II в 100 мкл буфера, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ NaCl и 10 мМ меркаптоэтанол. Образовавшуюся при

этом ДНК I выделили и очистили как описано выше. 3 мкг ДНК I лигировали 2 ч при 15° С при помощи 120 ед. акт. T4-ДНК-лигазы в 120 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ дитиотреит и 0,1 мМ АТР. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 6% ПААГ, как показано на рис. 5а. 1 мкг смеси олигомеризованной ДНК I лигировали с 1 мкг плазмиды рFMD5, предварительно обработанной рестриктазой *Bbv*II в условиях исчерпывающего гидролиза. Полученной смесью трансформировали CaCl<sub>2</sub>-обработанные клетки *E. coli* F-ΔZM15. Плазмидную ДНК полученных таким образом клонов анализировали при помощи рестриктазы *Bbv*II (рис. 5б). Были получены плазмиды, содержащие вставки ДНК II (рFMD20), ДНК IV (рFMD40) и ДНК VI (рFMD60). Строение полученных плазмид было подтверждено анализом нуклеотидной последовательности вставки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Sela M., Schechter B., Schechter L., Borek A. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1967, v. 32, p. 537-545.
2. Lerner R. A., Green N., Alexander H., Liu F.-T., Sutcliffe J. G., Shinnick T. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 6, p. 3403-3407.
3. Green N., Alexander H., Olson A., Alexander S., Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A. Cell, 1982, v. 28, № 3, p. 477-487.
4. Hopp T. P., Woods K. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 6, p. 3824-3828.
5. Prince A. M., Ikram Hajeer, Hopp T. P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 2, p. 579-582.
6. Dreesmann G. R., Sanchez Y., Ioneseu-Matiu I., Sparrow J. T., Six H. R., Peterson D. L., Hollinger F. B., Melnik J. L. Nature, 1982, v. 295, № 5845, p. 158-160.
7. Müller G. M., Shapira M., Arnon R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 2, p. 569-573.
8. Lamb J. R., Eckels D. D., Lake P., Woody J. N., Green N. Nature, 1982, v. 300, № 5887, p. 66-69.
9. Kurz C., Forss S., Kupper H., Strohmaier K., Schaller H. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 8, p. 1919-1931.
10. Kleid D. G., Yansura D., Small B., Dowbenko D., Moore D. M., Grubman M. L., McKercher P. D., Morgan D. O., Robertson B. H., Bachrach H. L. Science, 1981, v. 214, № 4525, p. 1125-1129.
11. Boothroyd J. C., Harris T. J. R., Rowlands D. J., Löwe P. A. Gene, 1982, v. 17, № 2, p. 153-161.
12. Makoff A. J., Paynter C. A., Rowlands D. J., Boothroyd J. C. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 24, p. 8285-8295.
13. Villanueva N., Davila M., Ortin J., Domingo E. Gene, 1983, v. 23, № 2, p. 185-194.
14. Rowlands D. J., Clarke B. E., Carroll A. R., Brown F., Nicholson B. H., Bittle J. L., Houghten P. A., Lerner R. A. Nature, 1983, v. 306, № 5944, p. 694-697.
15. Strohmaier K., Franze R., Adam K. H. J. Gen. Virol., 1982, v. 59, part 2, p. 295-306.
16. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A. Nature, 1982, v. 298, № 5869, p. 30-33.
17. Pfaff E., Mussgay M., Bohm H. O., Schulz G. E., Schaller H. EMBO J., 1982, v. 1, № 7, p. 869-874.
18. Murray K., Bruce S. A., Hinnen A., Wingfield P., van Erd P. M. C. A., de Reus A., Schelckens H. EMBO J., 1984, v. 3, № 3, p. 645-650.
19. McAleer W. J., Buynak E. B., Maigetter R. Z., Wampler D. E., Miller W. J., Hilleman M. R. Nature, 1984, v. 307, № 5947, p. 178-180.
20. Panicali D., Davis S. W., Weinberg R. L., Paoletti E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 80, № 17, p. 5364-5368.
21. Smith G. L., Murphy B. R., Moss B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 23, p. 7155-7159.
22. Smith G. L., Mackett M., Moss B. Nature, 1983, v. 302, № 5908, p. 490-495.
23. Смирнов В. Д., Сергиенко О. В., Скрипкин Е. А., Дубичев А. Г., Лукин В. Г., Григорьев В. Г., Тихоненко Т. И., Карелин В. П. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 10, с. 1388-1394.
24. Zabin I., Fowler A. In: The Operon/Eds Miller J. H., Reznikoff W. S. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1978, p. 89-121.
25. Bassford P. J., Beckwith J., Berman M., Brickman E., Casadaban M., Guarente L., Saint-Girons I., Schwartz M., Shuman H., Silhavy T. In: The Operon/Eds Miller J. H., Reznikoff W. S. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1978, p. 245-261.
26. Weinstock G. M., Berman M. L., Silhavy T. Y. In: Gene amplification and analysis. V. 3. Expression of cloned genes in prokaryotic and eukaryotic cells/Eds Papes T. S., Rosenberg M. N. Y.: Elsevier, 1983, p. 26-61.
27. Casadaban M. J., Martinier-Arias A., Shapira S. K., Chon J. Meth. Enzymol., 1983, v. 100, p. 293-308.
28. Kalnins A., Otto K., Ruther U., Müller-Hill B. EMBO J., 1983, v. 2, № 4, p. 593-597.
29. Koenen M., Ruther U., Müller-Hill B. EMBO J., 1982, v. 1, № 4, p. 509-512.

30. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Власов В. В., Колосов М. Н. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 6, с. 1740–1744.
31. А. с. № 1092176. Способ получения искусственного гена интерферона  $\alpha 2$  человека и способ получения полипептида с активностью интерферона микробиологическим синтезом. Колосов М. Н., Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Чувапило С. А., Быстров Н. С., Берлин Ю. А., Каюшин А. Л., Буткус В. В., Полякова И. А., Болдырева Е. Ф., Сандажчиев Л. С., Попов С. Г., Шубина Т. И., Кравченко В. В., Серпинский О. И., Ямщиков В. С., Великов С. И., Синяков А. Н., Сиволобова Г. Ф. Опубл. в В. И., 1984, № 18.
32. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Винь Нгуен Куанг, Подладчикова О. Н., Северцова И. В., Быстров Н. С., Болдырева Е. Ф., Чувапило С. А., Колосов М. Н. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 9, с. 1285–1289.
33. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Филиппов С. А., Чувапило С. А., Болдырева Е. Ф., Колосов М. Н. Докл. АН СССР, 1984, т. 274, № 1, с. 213–216.
34. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Шингарова Л. Н., Быстров Н. С., Филиппов С. А., Болдырева Е. Ф., Колосов М. Н., Матвиенко Н. М., Крамаров В. М. Докл. АН СССР, 1984, т. 278, № 4, с. 1002–1005.
35. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Колосов М. Н. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 830–839.
36. Grunstein M., Hogness D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, № 10, p. 3691–3695.
37. Бунина З. Ф., Крамаров В. М., Мазанов А. Л., Пачкунов Д. М., Смолянинов В. В., Матвиенко Н. И. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 11, с. 1578–1580.
38. Rutherford U., Koenen M., Otto K., Müller-Hill B. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 16, p. 4087–4098.
39. Sutcliffe J. G. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1978, v. 43, p. 77–90.
40. Ohtsuka E., Ikehara M., Soll D. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 11, p. 6553–6570.
41. Oligonucleotide synthesis: a practical approach/Ed. Gait M. J. Oxford: IRL Press, 1984.
42. Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Быстров Н. С., Северцова И. В., Колосов М. Н. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 5, с. 706–710.
43. Edge M. D., Greene A. R., Heatcliffe G. R., Moore V. E., Faulkner N. J., Camble R., Petter N. N., Trueman P., Schuch W., Hennam J., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 18, p. 6419–6435.
44. Green P. J., Heyneker H. L., Belivar F., Rodrigues R. L., Bettlach M. C., Covarrubias A. A., Backman K., Russel D. J., Tait R., Royer H. W. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 7, p. 2373–2380.
45. Dolganov G. M., Chestukhin A. V., Shemyakin M. F. Eur. J. Biochem., 1981, v. 114, № 2, p. 247–254.
46. Klenow H., Henningsen L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 65, № 1, p. 168–175.
47. Hsiung N. M. Tetrahedron Lett., 1982, v. 23, № 49, p. 5119–5122.

Поступила в редакцию  
15.IV.1986

#### A NEW APPROACH TO CONSTRUCTION OF DNA FROM SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES. SYNTHESIS OF DNAs CODING FOR REPEATS OF THE ANTIGENIC DETERMINANT OF MOUTH AND FOOT DISEASE VIRUS

KOROBKO V. G., DOBRYNIN V. N., SEVERTSOVA I. V., BOLDYREVA E. F., SHINGAROVA L. N., CHUVAPILO S. A., FILIPPOVA L. Yu., ZVONOK N. M.,

VASIL'EVA T. E., KOLOSOV M. N.

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

A rapid method for assembly of DNA from synthetic oligodeoxynucleotides has been developed which involves separate ligation of top- and bottom-strand oligonucleotides followed by filling in 3'-ends of the duplex formed, blunt end cloning into a specialized vector pBBV, and recovery of the synthetic DNA from the recombinant plasmid by means of restriction nuclease BbvII. The method allows for many oligonucleotides to be ligated at once, with no intermediates being isolated, and any DNA to be recovered on cloning, no matter what the sequences of its termini are. Ten oligodeoxynucleotides (I)–(X) have been chemically synthesised and used to prepare, by this method, a 60-membered duplex with complementary tetranucleotide 5'-protrusions (DNA I) which comprises the cDNA sequence 3397–3456 of foot and mouth disease virus (FMDV) strain O<sub>1</sub>K. Self-ligation of the duplex in the head-to-tail manner yielded 120 to 900 bp long synthetic DNAs (DNA II – DNA XV) coding for oligomers of the major antigenic determinant (the amino acid sequence 144–160 of protein VP1) of FMDV. The synthetic hexamer (DNA VI) was fused to gene lacZ' on plasmid pBBV21 and expressed in *E. coli*. The fusion was found to complement the lacZ deletion M15, from which it follows that the fused protein associated with the  $\alpha$ -deficient  $\beta$ -galactosidase to yield a tetramer carrying, on its N-termini, 24 antigenic determinants of FMDV.