



УДК 577.113.6.088.3:543.544.42

ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ И КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА
ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА

*Ватчикова Н. В., Скапцова Н. В., Твардовская С. Е.,
Бесидский Е. С., Даныков Ю. В., Степанов А. И.,
Ажаев А. В.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт
биотехнологии, Москва*

Твердофазным фосфотриэфириным методом получены 24 олигодезоксирибонуклеотида, из которых ферментативным путем синтезированы гены эпидермального фактора роста человека и его Leu^{21} -аналога. Нуклеотидные последовательности клонированных генов полностью соответствуют искомым структурам. Показано, что высокая степень чистоты олигонуклеотидов позволяет синтезировать и клонировать гены без выделения промежуточных фрагментов.

Эпидермальный фактор роста человека (hEGF), он же урогастрон, участвует в ряде физиологических процессов, связанных с эмбриональным ростом, регенерацией тканей, регуляцией функционирования эндокринной системы, заживлением ран, секрецией желудочного сока [1]. Очевидно, что этот пептидный гормон представляет интерес для таких областей медицины, как микрохирургия глаза, ожоговая терапия, лечение язв желудка и т. д.

Относительно низкое содержание hEGF в моче человека, откуда этот полипептид обычно выделяют [2], делает его недоступным для широкого применения в медицине. В последние годы был разработан альтернативный способ получения hEGF путем клонирования его гена в различных микроорганизмах [3—9].

Настоящая работа посвящена химическому синтезу и клонированию генов hEGF и его аналога (Leu^{21})hEGF. Целью предполагаемого цикла исследований является создание различных систем экспрессии hEGF в *E. coli*, *S. cerevisiae*, *B. subtilis* и в конечном итоге выбор оптимальной системы для получения этого гормона.

Полипептид hEGF состоит из 53 аминокислотных остатков (молекулярная масса ~6000) и содержит три дисульфидных мостика [10, 11]. Его структура дана на рис. 1а. Мы синтезировали два гена, один из которых кодирует природный hEGF, другой — аналог полипептида (Leu^{21})hEGF, также обладающий биологической активностью [12]. Нуклеотидные последовательности синтетических генов представлены на рис. 1б и различаются одной нуклеотидной парой в кодоне № 21. При выборе последовательности синтезируемого гена применялись кодоны, которые наиболее часто используются в клетках *E. coli* и дрожжей [13], а также кодоны, которые позволили ввести в ген сайты рестриктаз *Hin*II, *Bgl*III и «липкий конец» рестриктазы *Eco*RI на 5'-конце кодирующей последовательности. На 3'-конце синтетического гена расположены два терминирующих кодона и «липкий конец», специфичный для рестриктазы *Bam*HI.

Последовательности генов hEGF и (Leu^{21})hEGF были разбиты на 20 фрагментов длиной 13—19 нуклеотидов таким образом, чтобы их пере-

Использованы обозначения, рекомендованные номенклатурной комиссией IUPAC—IUB. Другие сокращения: MSNT — мезитилсульфонил-3-нитро-1,2,4-триазол; MeIm — 1-метилимидазол; TPS-Cl — 2,4,6-тринизопропилбензолсульфонилхлорид; \pm — *n*-хлорфенилфосфатная группа. Знак d (дезоксип) опущен всюду для краткости.

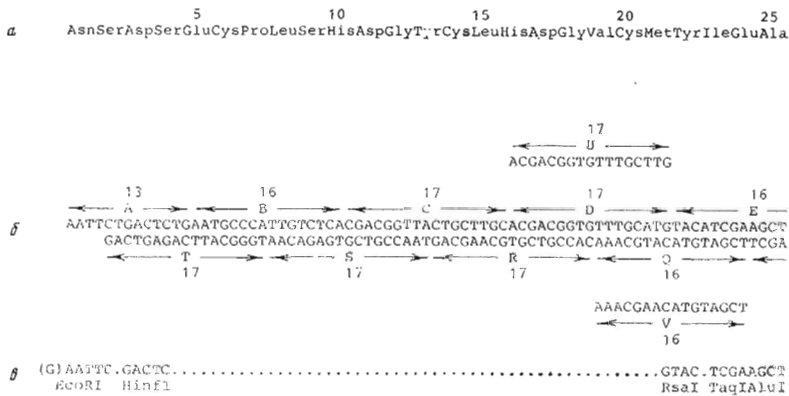


Рис. 1. Аминокислотная последовательность hEGF (а), нуклеотидная последовательность синтетического гена hEGF (б) и расположение в нем сайтов рестриктаз (в). Буквами обозначены синтезированные в настоящей работе олигонуклеотиды. Количество нуклеотидов в каждом показано цифрами. Олигонуклеотиды U и V использованы в синтезе гена (Leu²¹)hEGF

крывание составляло 8—9 пар оснований (рис. 1б). При этом особое внимание обращали на то, чтобы структуры областей перекрытия фрагментов обеспечивали бы однозначное лигирование олигонуклеотидов при сборке генов по схеме, представленной на рис. 2. Ген (Leu²¹)hEGF отличается от гена hEGF заменой олигонуклеотидов D и Q на U и V соответственно, включающих кодоны аминокислотных остатков № 21.

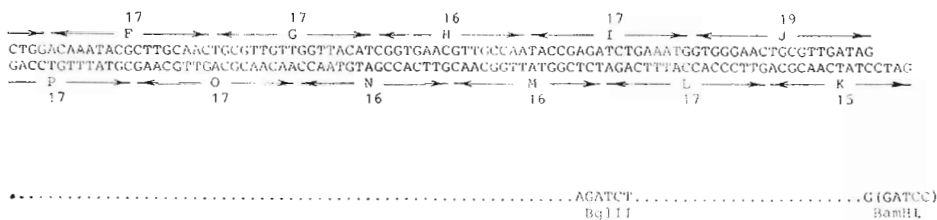
Синтез олигонуклеотидов проводили твердофазным фосфоритриэфирным методом в шприце. В качестве полимерной основы использовали пористое стекло SPG/long chain alkylamino, модифицированное N-оксисукцинимидными эфирами N-защищенных 5'-О-диметокситритилнуклеозид-3'-О-сукцилатов [14]. Емкость полученных носителей была ~20 мкмоль/г. Для наращивания олигонуклеотидных цепей использовали защищенные динуклеотидные блоки (в случае олигонуклеотидов с четным числом оснований один цикл наращивания цепи вели с защищенным мононуклеотидом). Динуклеотидные блоки получали по методу [15]. После реакции конденсации полностью защищенный динуклеотид очищали фильтрацией через слой с обращенной фазой (см. «Экспериментальную часть»). По данным обращенно-фазовой ВЭЖХ чистота 16 полученных динуклеотидных блоков составила 85—95%. Далее все 16 динуклеотидов дециантилировали и выделяли с помощью препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 3).

Для наращивания олигонуклеотидной цепи использовали 0,1 М раствор в пиридине защищенного динуклеотида, активированного смесью MSNT и MeIm [16]. Избыток нуклеотидного компонента составлял 10 экв. в расчете на иммобилизованный нуклеозид. Навеска полимерного носи-

Схема операций одного цикла * наращивания цепи

Операция	Растворители и реагенты	Время, мин (объем растворителя)
Деблокирование	3% CHCl_2COOH в 1,2-дихлорэтано	0,5 — пурины 1,0 — пиримидины
Промывка	1% Триэтиламин в 1,2-дихлорэтано	(0,6 мл)
»	Пиридин	(1×0,6 мл)
Конденсация	Защищенный динуклеотид, MSNT, MeIm в пиридине	(2×0,6 мл) 15,0
Промывка	Пиридин	(1×0,6 мл)
»	1,2-Дихлорэтан	(2×0,6 мл)

* Цикл составлял ~ 20 мин.



теля содержала 0,7 мкмоль 5'-О-диметокситритилнуклеозида. Схема операций для одного цикла наращивания цепи представлена в таблице.

Отщепление синтезированных олигонуклеотидов от носителя и деблокирование осуществляли поэтапно (см. «Экспериментальную часть»). Целевые продукты выделяли сначала анионообменной ВЭЖХ (рис. 4), затем фракции, содержащие искомый олигонуклеотид, рехроматографировали на колонке с обращенной фазой (рис. 5а) и освобождали от посторонних ненуклеотидных примесей элюцией водой с колонки TSK gel G 2000SW. Качество полученных соединений проверяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 5б), а также электрофорезом в 20% денатурирующем ПААГ после введения в 5'-конец олигонуклеотидов радиоактивной метки с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ (рис. 6).

Последовательности синтезированных олигонуклеотидов не определялись, однако испытывалась эффективность их лигирования путем получения отдельно верхней и нижней цепей каждого из трех общих блоков I—III (рис. 2). Для этого олигонуклеотиды В—J и L—Т фосфорилировали препаративно в условиях 50-кратного избытка АТР низкой удельной активности и аликвоты соответствующих инкубационных смесей без какой-либо дополнительной очистки объединяли, отжигали и инкубировали с ДНК-лигазой. Например, смешивание и лигирование нефосфорилированного олигонуклеотида А, фосфорилированных В и С и нефос-

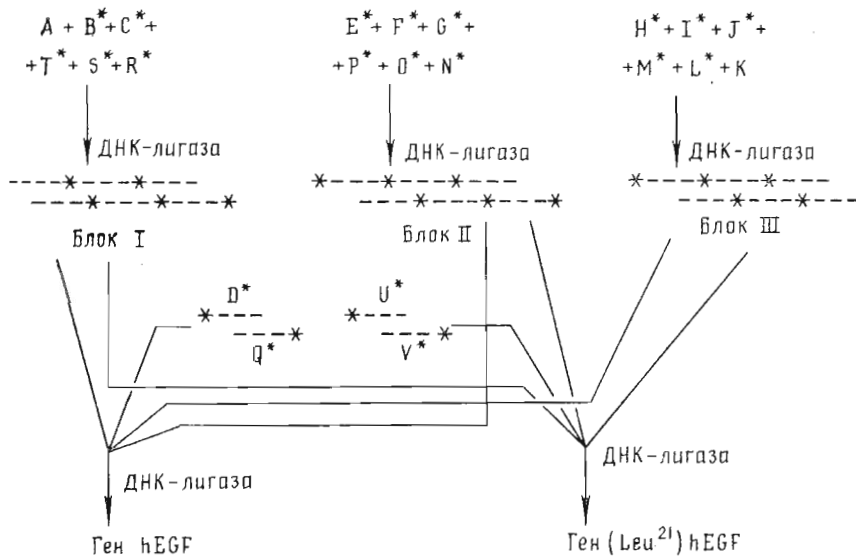


рис. 2. Схема сборки генов hEGF и (Leu²¹)hEGF. Звездочками отмечены олигонуклеотиды, фосфорилированные по 5'-концу

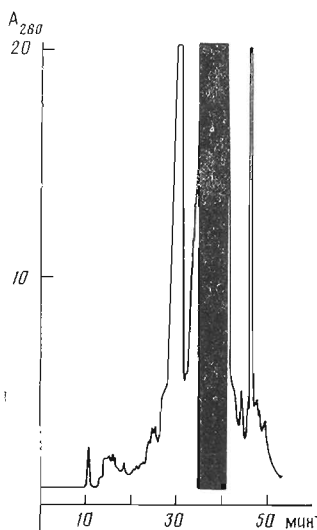


Рис. 3

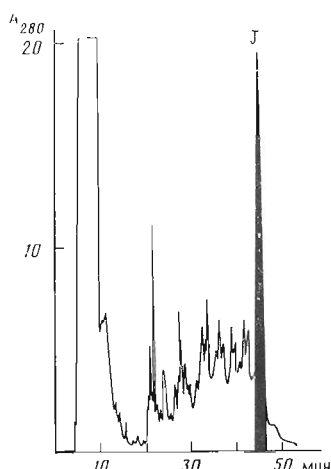


Рис. 4

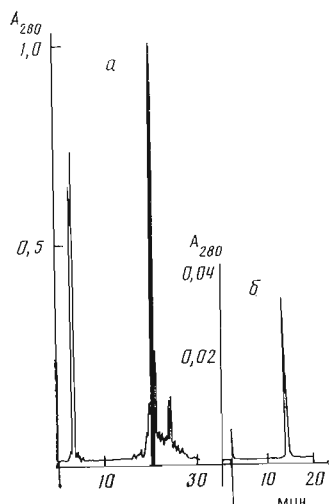


Рис. 5

Рис. 3. Препаративная обращенно-фазовая ВЭЖХ динуклеотида $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{ibG} \mp \text{bzA} \mp$ на колонке Zorbax ODS, 10 мкм ($21,2 \times 250$ мм). Элюция в линейном градиенте от 0,5% пиридина в воде до 0,5% пиридина в ацетонитриле (50 мин). Скорость потока 12 мл/мин

Рис. 4. Препаративная ионообменная ВЭЖХ смеси, содержащей олигонуклеотид J на колонке Zorbax NH₂, 7 мкм ($4,6 \times 250$ мм). Элюция в линейном градиенте от 0,05 М фосфата калия в 60% формамиде (pH 4,15) до 0,6 М сульфата аммония и 0,05 М фосфата калия в 60% формамиде, pH 5,5 (46,7 мин) и далее 0,6 М сульфатом аммония и 0,05 М фосфатом калия в 60% формамиде, pH 5,5 (7,7 мин). Скорость потока 0,6 мл/мин

Рис. 5. Обращенно-фазовая ВЭЖХ олигонуклеотида J: а — очистка J на колонке Nucleosil 7C18, 7 мкм (10×250 мм). Элюция в градиенте от 2,5 до 15% ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония (30 мин), скорость потока 4,75 мл/мин; б — анализ J на колонке Zorbax ODS Golden, 3 мкм ($6,2 \times 80$ мм). Элюция в градиенте от 5 до 10% ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония (15 мин) и далее 10% ацетонитрилом в 0,1 М ацетате аммония (5 мин), скорость потока 1,82 мл/мин

форилированных T и S позволило получить верхнюю цепь блока I; фосфорилированных R, S, T и нефосфорилированных B и C — нижнюю цепь блока I. Аналогично были получены отдельные цепи блоков II и III. Продукты реакций анализировали с помощью 15% денатурирующего ПААГ. При стехиометрическом соотношении синтетические олигонуклеотиды лигируются с очень высокой эффективностью (рис. 7). Этот факт, по нашему мнению, объясняется не только отсутствием нуклеотидных, но и других примесей, ингибирующих лигазную реакцию. В связи с этим мы считаем гель-фильтрацию в воде на колонке с TSK gel весьма важной стадией очистки олигонуклеотидов.

Основной эксперимент сборки генов проводили по схеме, представленной на рис. 2. Шесть олигонуклеотидов, составляющих блок, смешивали, отжигали и инкубировали с ДНК-лигазой. Эффективность лигирования, проверенная электрофорезом в денатурирующем и неденатурирующем ПААГ, оказалась столь же высокой, как и при лигировании «по цепям» (электрофореграммы не представлены). В связи с этим мы сочли целесообразным не выделять промежуточные продукты из геля (блоки I—III), а проводить реакцию далее до получения полного гена. Инкубационные смеси, содержащие блоки I—III, соединяли и делили пополам. К одной порции добавляли фосфорилированные олигонуклеотиды D и Q (ген hEGF), к другой — U и V (ген (Leu²¹)hEGF) и дополнительно инкубировали с ДНК-лигазой.

Половину каждой из лигазных смесей наносили на 10% ПААГ, чтобы, во-первых, проверить эффективность сборки блоков в целый ген и, во-вторых, элюировать продукты из геля. Из радиоавтограммы геля (рис. 8)

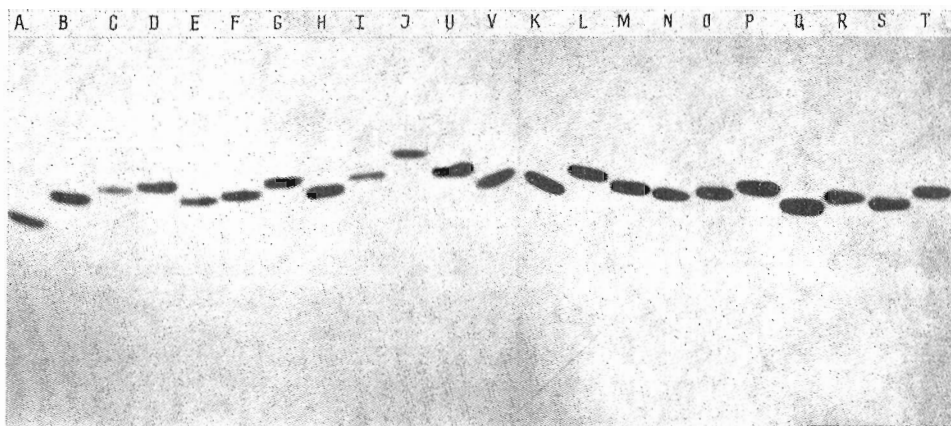


Рис. 6. Радиоавтограмма ^{32}P -меченых олигонуклеотидов А — V после электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ

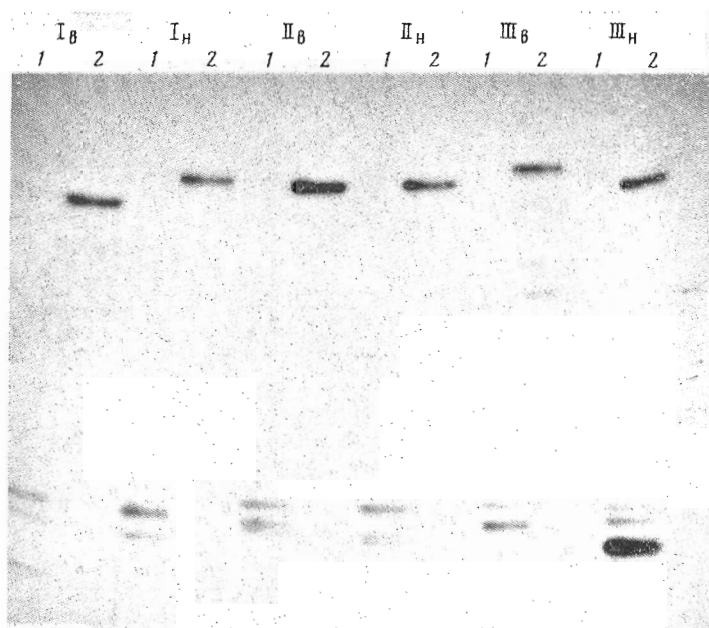


Рис. 7. Проверка эффективности лигирования синтезированных олигонуклеотидов (радиоавтограмма 15% денатурирующего ПААГ). Указаны номера блоков по схеме на рис. 2; «в» и «н» — верхняя и нижняя цепи соответствующего блока. 1 — исходные олигонуклеотиды, 2 — продукты лигационных реакций

видно, что блоки эффективно лигируются с образованием фрагментов, имеющих длину ~ 160 нуклеотидных пар (на рис. 8 указаны стрелками). В качестве маркеров использовали фрагменты ДНК, полученные при гидролизе плазмиды pBR322 рестриктазой *Msp*I, положение которых выявляли с помощью этидийбромида и УФ-облучения. Эти фрагменты элюировали из ПААГ по методу [17] и использовали далее для лигирования с вектором. Поскольку указанные фрагменты являются основными продуктами лигационных реакций, оставшиеся половины инкубационных смесей, содержащих гены hEGF и (Leu²¹)hEGF, использовали для прямого лигирования с вектором.

Клонирование генов hEGF и (Leu²¹)hEGF проводили с помощью векторной ДНК pUC18, гидролизованной рестриктазами *Eco*RI и *Bam*HI. В целях уменьшения числа «фоновых» колоний, не содержащих hEGF, ДНК pUC18/*Eco*RI/*Bam*HI выделяли из агарозного геля по методу [18].

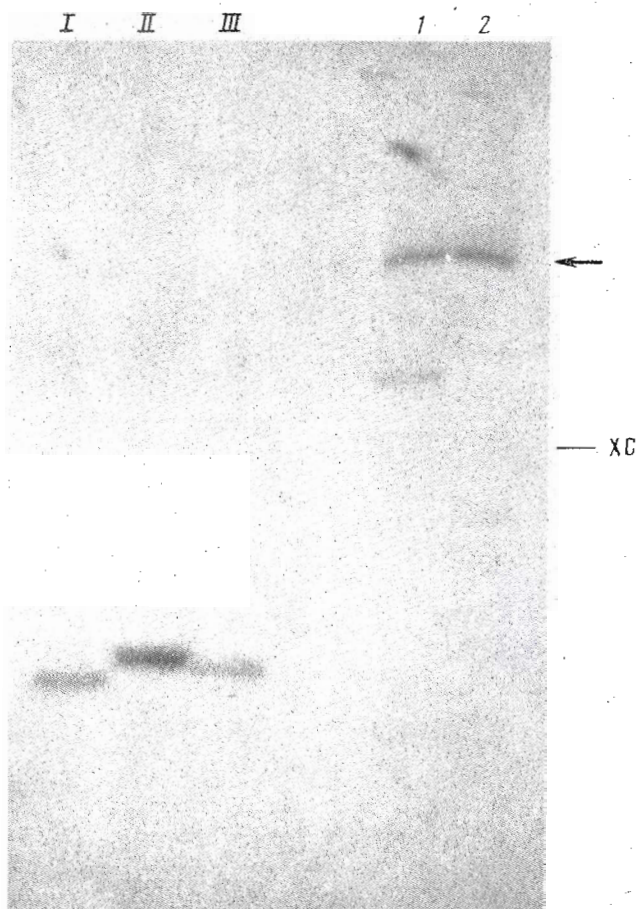


Рис. 8. Сборка генов hEGF и (Leu²¹)hEGF (радиоавтограмма 10% ПААГ). I—III — исходные блоки олигонуклеотидов, 1 и 2 — продукты их лигирования (с добавлением олигонуклеотидов D, Q или U, V соответственно). Стрелкой указаны гены hEGF и (Leu²¹)hEGF. ХС — краситель ксиленадианоловый голубой

Векторную ДНК лигировали, во-первых, с фрагментами, кодирующими hEGF и (Leu²¹)hEGF, элюированными из геля, во-вторых, с полными смесями лигированных олигонуклеотидов и проводили трансформацию реципиентных клеток *E. coli* HB101 по методу [19].

В обоих вариантах лигирования, как со смесью олигонуклеотидов, так и с фрагментами, выделенными из геля, было получено большое число клонов, в то время как при лигировании вектора «самого на себя» (контрольный опыт) не выросло ни одной колонии. В связи с этим мы не стали проводить гибридизацию клонов с мечеными олигонуклеотидами и анализировали далее произвольно взятые клоны. Рестрикционный анализ с помощью рестриктаз *Bgl*II, *Eco*RI и *Bam*HI показал, что плазмидные ДНК практически всех клонов содержат вставки синтетических генов. Структура генов hEGF и (Leu²¹)hEGF в составе рекомбинантных плазмид pUC18/hEGF и pUC18/(Leu²¹)hEGF подтверждена секвенированием методом Максама — Гилберта [20]. На рис. 9 в качестве примера представлена одна из полученных радиоавтограмм.

Необходимость очистки промежуточных продуктов лигазных реакций с помощью электрофореза в ПААГ является одним из основных ограничений в классическом синтезе генов. При низком выходе на этих стадиях бывает крайне сложно (если вообще возможно) выделить целевой дуплекс после его окончательной сборки. Наш эксперимент показывает, что правильная «разбивка» гена и высокая степень чистоты олигонук-

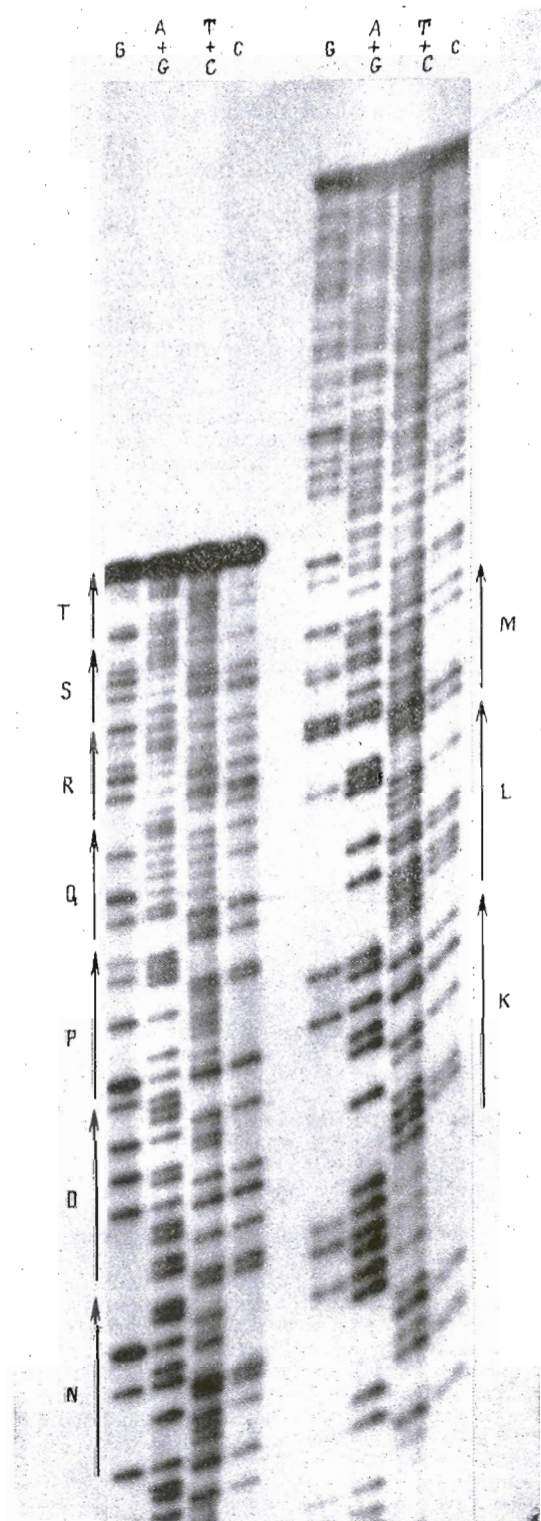


Рис. 9. Радиоавтограмма 8% денатурирующего ПААГ, полученного при определении нуклеотидной последовательности *Hind*III — *Eco*RI-фрагмента плазмиды pUC18/hEGF методом Максама — Гилберта [20]. Стрелками отмечены последовательности, соответствующие олигонуклеотидам шпикней цепи гена hEGF (см. рис. 16)

леотидов позволяет синтезировать и клонировать гены без выделения промежуточных фрагментов.

Авторы выражают благодарность К. А. Бендукидзе за полезные советы при выборе объекта исследования.

Экспериментальная часть

В работе использовали TPS-Cl, MS-Cl, 3-нитро-1Н-1,2,4-триазол, тетразол, 4-нитробензальдоксим, N,N,N',N'-тетраметилгуанидин, MeIm (Fluka, Швейцария), T4-полинуклеотидкиназу, ДНК-лигазу фага T4 (НПО «Фермент», Вильнюс), рестрикционные эндонуклеазы *EcoRI*, *BamHI*, *BglII* и *HinfI* (PL Biochemicals, Англия), а также $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (5000 Ки/ммоль) отечественного производства.

Пиридин марки х. ч. (Fluka, Швейцария), и 1,2-дихлорэтан марки ч. (Союзреактив) очищали как описано в работе [16]. MSNT синтезировали по методу [16] из MS-Cl и 3-нитро-1Н-1,2,4-триазола.

Для ВЭЖХ применяли ацетат аммония марки ос. ч. (Союзреактив), калий фосфорнокислый монозамещенный (Sigma, США), сульфат аммония «sequenal grade» (Pierce, США), ацетонитрил «HPLC grade» и формамид г. г. а. (Fluka, Швейцария), воду, очищенную в системе Milli Ro/Milli Q (Millipore, Франция), а также колонки: Zorbax NH₂, 7 мкм, 4,6 × 250 мм; Zorbax ODS, 5 мкм, 4,6 × 250 мм; Zorbax ODS, 10 мкм, 21,2 × 250 мм; Zorbax ODS Golden, 3 мкм, 6,2 × 80 мм (Du Pont, США); Nucleosil 7C18, 7 мкм, 10 × 250 мм (Macherey-Nagel, ФРГ); TSK gel G 2000SW, 7,5 × 300 мм (Toyo Soda, Япония).

ВЭЖХ проводили на приборе «Gilson» (Франция) при комнатной температуре. Для очистки динуклеотидных блоков использовали головки насоса 25 SC с производительностью до 25 мл/мин, препаративный смеситель 811P, манометрический модуль 803C, петлю для ввода пробы объемом 2 мл, препаративную кювету детектора. Для очистки и анализа олигонуклеотидов использовали головки насоса 10SC с производительностью до 10 мл/мин, аналитический смеситель 811A, манометрический модуль 802C. Алюминиевую хроматографию проводили с петлей для ввода пробы объемом 2 мл и препаративной кюветой детектора, а обращенно-фазовую ВЭЖХ — с аналитической кюветой детектора и петлей для ввода пробы объемом 2 мл в случае препаративной очистки олигонуклеотидов и объемом 20 мкл для их анализа.

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре UV-240 (Shimadzu, Япония).

Защищенные децилантилированные динуклеотиды синтезировали по методу [15]. После разложения водой реакционную смесь наносили на колонку (4 × 3 см) с сорбентом Silasorb C18, 15 мкм (Chemarol, СССР), подключенную к вакууму. Носитель промывали 50% водным ацетоном (200 мл) и защищенные динуклеотиды элюировали ацетоном. Элюаты упаривали досуха и к остатку прибавляли 50 мл смеси пиридин — триэтиламин — вода (3 : 1 : 1). Через 1 ч растворители отгоняли в вакууме, остаток растворяли в 1,5 мл пиридина и очищали с помощью препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 3). Элюаты, содержащие искомые продукты, упаривали досуха, перепаривали с пиридином (3 × 5 мл) и высушивали в вакууме над P₂O₅ и КОН.

Синтез олигонуклеотидов вели в пириде со смесной иглой объемом 1 мл (Hamilton, Швейцария). Фильтр из пористого титана диаметром 2,1 мм помещали в адаптер иглы и последний плотно привинчивали к шприцу. В шприц помещали 35—40 мг носителя (CPG/long chain alkylamino, 125—177 мкм, 500 Å (Pierce, США), модифицированного по методу [14]) емкостью ~20 мкмоль/г по нуклеозидному компоненту. В реакцию конденсации вводили 10—12 мг защищенного динуклеотида или 6—8 мг защищенного мононуклеотида и 20 мг MSNT в 100 мкл смеси пиридин — MeIm (9 : 1). Синтез выполнен согласно схеме, представленной в таблице.

Снятие синтезированных олигонуклеотидов с носителя и деблокирование осуществляли обработкой раствором 70 мг 4-нитробензальдоксима и 55 мкл N,N,N',N'-тетраметилгуанидина в 1 мл смеси диоксан — вода, 1 : 1 (12 ч, 60° С). К раствору добавляли дополнительно 3 мл концентрированного аммиака и выдерживали еще 6 ч при 60° С. Носитель отфильтровывали, промывали горячим 1 М триэтиламонийбикарбонатом. Фильтрат и промывки упаривали досуха, 2 раза перепаривали с водой. К остатку добавляли 5 мл 80% уксусной кислоты. Через 30 мин при 20° С смесь упаривали досуха, перепаривали с водой, растворяли в 5 мл воды, экстрагировали 5 мл этилацетата. Водную фазу отделяли, фильтровали через тонкий фильтр, упаривали до объема 1 мл. Олигонуклеотиды очищали с помощью анионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ и далее элюцией водой с колонки TSK gel G 2000SW. Выход олигонуклеотидов А — В был 2—20 ОЕ₂₅₀.

Фосфорилирование олигонуклеотидов. Аналитическое фосфорилирование олигонуклеотидов для проверки их гомогенности проводили 1 ч при 37° С в 10 мкл раствора, содержащего 0,1 мкг олигонуклеотида, 66 мМ трис-НСl (рН 9,5), 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дигнитротрит, 1 мкКи $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 1 мкМ АТР, 1 мкл (4 ед. акт.) T4-полинуклеотидкиназы. К 1 мкл смеси добавляли 10 мкл 80% формамида, содержащего 0,01% бромфенолового синего и 0,01% ксиленцианолового голубого, нагревали 2 мин при 100° С. Препараты наносили на 20% денатурирующей ПААГ. Препаративное фосфорилирование олигонуклеотидов проводили в течение 2 ч при 37° С в 50 мкл раствора, содержащего 0,5 мкг олигонуклеотида, 66 мМ трис-НСl (рН 9,5), 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дигнитротрит, 10 мкКи $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 200 мкМ АТР и 2,5 мкл (10 ед. акт.) T4-полинуклеотидкиназы.

Лигирование олигонуклеотидов. Соответствующие олигонуклеотиды, концентрации которых составляла 0,01 мкг/мкл воды или фосфорилирующей смеси, смешивали по

10 мкл каждого, нагревали 2 мин при 100° С, переносили в термостат с температурой 70° С и отжигали до 25° С в течение 5—6 ч. В смесь добавляли 1/10 объема лигазного буфера, содержащего 0,66 М трис-НСl (рН 7,5), 50 мМ MgCl₂, 50 мМ дитиотреит, 5 мМ АТФ и 2 мкл (4 ед. акт.) ДНК-лигазы. Конечный объем составлял 80—100 мкл в зависимости от количества лигуемых олигонуклеотидов. Инкубацию вели 18 ч при 4° С. Из 100 мкл инкубационных смесей, содержащих блоки I—III, отбирали по 40 мкл, соединяли и делили на две порции (по 60 мкл). К одной добавляли по 0,04 мкг фосфорилированных олигонуклеотидов D и Q (ген hEGF), к другой — фосфорилированных олигонуклеотидов U и V (ген (Leu²¹)hEGF). В обе пробирки вносили 2 мкл лигазного буфера, воду до конечного объема 80 мкл и 2 мкл (4 ед. акт.) ДНК-лигазы. Инкубацию вели 18 ч при 4° С. По 40 мкл смесей наносили на 8% ПААГ для последующей элюции *EcoRI* — *Bam*III-фрагментов (165 нуклеотидных пар) из геля.

Клонирование генов hEGF и (Leu²¹)hEGF. Для лигирования генов с вектором смешивали по 0,05 пмоль векторной ДНК pUC18/*EcoRI*/*Bam*HI с: а) 0,2 пмоль *EcoRI* — *Bam*III-фрагментов, выделенных из геля; б) 0,2 пмоль полных смесей лигированных олигонуклеотидов. К полученным смесям добавляли по 2 мкл лигазного буфера, воду до 20 мкл и 2 мкл (4 ед. акт.) ДНК-лигазы. Контрольное лигирование вектора «самого на себя» («в») проводили в тех же условиях без добавления экзогенной ДНК. Инкубацию вели 18 ч при 4° С. Смеси разбавляли водой до 100 мкл и далее добавляли по 50 мкл раствора ДНК к 100 мкл реципиентных клеток (Ca²⁺) штамма *E. coli* HB101. Трансформацию проводили по стандартной методике [19]. По 1/10 клеточных суспензий высевали на чашки с YT-агаром, содержащим ампициллин (50 мг/л). После трансформации число ампициллинустойчивых клонов (на 1 чашку) для обоих клонированных генов составило: а) 100—150, б) 150—300, в) 0. Из нескольких произвольно взятых клонов (6 из серии pUC18/hEGF и 6 из серии pUC18/(Leu²¹)hEGF) выделяли плазмидную ДНК методом «быстрого лизиса» [21] и обрабатывали ее рестриктазами *Bgl*III, *EcoRI* и *Bam*III в стандартных условиях. Нуклеотидные последовательности *EcoRI* — *Bam*III-фрагментов плазмид двух клонов из каждой серии определяли по методу Максама — Гилберта [20], после введения 5'-концевой метки в *Hind*III-сайт при помощи [γ -³²P]АТФ и Т4-полинуклеотидкиназы. Они полностью совпали с последовательностями hEGF и (Leu)hEGF, представленными на рис. 16.

ЛИТЕРАТУРА

1. Medical World News. 1986. V. 13. № 10. P. 17.
2. Gregory H., Preston B. M. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1977. V. 9. № 2. P. 107—112.
3. Smith J., Cook E., Fotheringham I., Pheby S., Derbyshire R., Eaton M. A. W., Doel M., Lilley J., Pardon J. F., Patel T., Lewis H., Bell L. D. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 15. P. 4467—4482.
4. Urdea M. S., Merryweather J. P., Mullenbach G. T., Coit D., Heberlein U., Valenzuela P., Barr P. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 24. P. 7461—7465.
5. Brake A. J., Merryweather J. P., Coit D. G., Heberlein U. A., Masiarz F. R., Mullenbach G. T., Urdea M. S., Valenzuela P., Barr P. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 15. P. 4642—4646.
6. Flock J. I., Fotheringham I., Light J., Bell L., Derbyshire R. // Mol. Genet. 1984. V. 195. № 1—2. P. 246—251.
7. Oka T., Sakamoto S., Miyoshi K.-I., Fuwa T., Yoda K., Yamasaki M., Tamura G., Miyake T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 21. P. 7212—7216.
8. Kishimoto F., Gomi H., Kanaoka M., Nakatani T., Ito A., Katoh T., Agui H., Sumida S., Ogino S. // Gene. 1986. V. 45. № 3. P. 311—316.
9. Brewer S. J., Dickerson C. H., Ewbank J., Fallon A. // J. Chromatography. 1986. V. 362. № 3. P. 443—449.
10. Gregory H. // Nature. 1975. V. 257. № 5524. P. 325—327.
11. Gregory H., Preston B. M. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1975. B. 356. № 11. S. 1765—1774.
12. Sumi S.-I., Hasegawa A., Yagi S., Miyoshi K.-i., Kanazawa A., Nakagawa S., Suzuki M. // J. Biotechnol. 1985. V. 2. № 1. P. 59—74.
13. Ikemura T. // J. Mol. Biol. 1982. V. 158. № 4. P. 573—597.
14. Чернов Б. К., Голова Ю. Б., Поздогова Г. Е., Баев А. А. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 291. № 5. С. 1131—1134.
15. Seth A. K., Jay E. // Nucl. Acids. Res. 1980. V. 8. № 22. P. 5445—5459.
16. Spat B. S., Gait M. J. // Oligonucleotide Synthesis. A practical approach/Ed. Gait M. J.: IRL Press, Oxford U. K., 1984. P. 84—116.
17. Young Y. P. L., Young R. J. // Anal. Biochem. 1974. V. 58. № 1. P. 286—293.
18. Weislander L. // Anal. Biochem. 1979. V. 98. № 2. P. 305—309.
19. Cohen C. N., Chang A. C. Y., Hsu L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 8. P. 2110—2114.
20. Mazam A. M., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560—564.
21. Birnboim H. C., Doly J. // Nucl. Acids. Res. 1979. V. 7. № 6. P. 1513—1522.

Поступила в редакцию
16.IX.1987
После доработки
3.XI.1987

CHEMICAL SYNTHESIS AND CLONING
OF THE HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR GENE

BATCHIKOVA N. V., SCAPTSOVA N. V., TVARDOVSKAYA S. E.,
BESIDSKY E. S., DANKOV Yu. V., STEPANOV A. I., AZHAYEV A. V.

All-Union Research Institute of Biotechnology, Moscow

The solid-phase phosphotriester method was used to synthesise 24 oligodeoxyribonucleotides, which were enzymatically joined together to give the human epidermal growth factor gene and its analogue containing Leu codon in position 21. The primary structure of the cloned genes were confirmed by the Maxam — Gilbert technique. It is demonstrated that the high purity degree of oligonucleotides allows to synthesise and clone genes without purification of intermediate fragments.