



УДК 547.963.32.057

© 1990 г.

С. А. Филиппов, С. В. Калининко, Д. С. Есипов,
Е. В. Шибанова, Л. Н. Шингарова, В. Г. Коробко,
В. Н. Добрынин

ТВЕРДОФАЗНОЕ ЛИГИРОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФРАГМЕНТОВ ДНК

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Синтетический олигодезоксирибонуклеотид посредством диаминонана был ковалентно связан через один из межнуклеотидных фосфатов с сукцинизированной поверхностью Sepharosyl S-500. Имобилизованный на твердой фазе фрагмент ДНК использован как стартовый компонент для осуществления ряда стадий лигирования с помощью Т4-ДНК-лигазы синтетических олигодезоксирибонуклеотидов в протяженную ДНК с нуклеотидной последовательностью *rec A* промотора *E. coli*. Показано, что как поэтапная сборка двухцепочечной ДНК диадными дуплексами, так и одновременное твердофазное лигирование двух диад (тетрады) дают схожие результаты с небольшим преимуществом в случае тетрады. Достоверность сборки синтетической ДНК с последовательностью промотора транскрипции подтверждена клонированием ДНК в составе специализированного плазмидного вектора в клетках *E. coli*.

Химический синтез белково-пептидных молекул и фрагментов нуклеиновых кислот, биохимические реакции с помощью иммобилизованных ферментов, широкий диапазон использования аффинных носителей для выделения функциональных белков и даже специализированных клеток, гибридационная детекция нуклеотидных последовательностей с помощью зондов, закрепленных на носителе, — вот далеко не полный перечень успешного использования твердофазного подхода в биоорганическом, биохимическом и молекулярно-биологическом направлениях.

Если твердофазному химическому синтезу нуклеиновых кислот уделено максимальное внимание исследователей, то о твердофазных реакциях ферментативного лигирования фрагментов ДНК в литературе встречаются лишь отдельные упоминания [1, 2]. Для изучения особенностей ферментативного лигирования на матрице нами был приготовлен носитель с иммобилизованным на его поверхности олигонуклеотидом, синтезирован ряд фрагментов ДНК, составляющих дуплекс с последовательностью оснований, соответствующей *rec A*-промотору *E. coli* [3], которые были использованы для твердофазной сборки с помощью ДНК-лигазы. То, что в результате такой сборки на носителе была получена ДНК с функцией промотора транскрипции, было подтверждено ее клонированием в специализированном векторе, в котором ген, кодирующий хлорамфенилкоацетилтрансферазу, не способен транскрибироваться из-за отсутствия промотора, но перестает быть молчащим в результате его вставки.

Синтез олигонуклеотида с якорной группой для ковалентного связывания с матрицей

Очень часто для обеспечения ковалентного связывания нуклеиновой кислоты с твердым носителем используются реакции как по отдельным нуклеиновым основаниям, так и по 5'- или 3'-концевым группировкам [4].

Использованные сокращения: DMTr — диметокситритил, FmocCl — 9-флуоренилметилхлорформат, DMAP — 4-N,N-диметиламинопиридин, PMSF — фенолметилсульфонилфторид, Py — пиридин, MES — 2-морфолиноэтансульфонат.

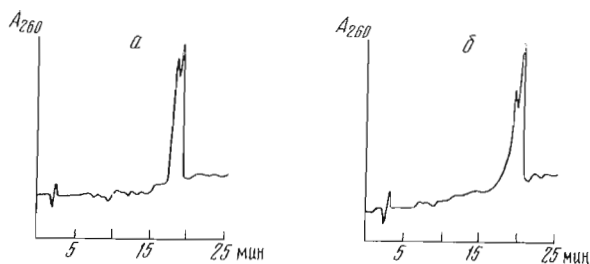
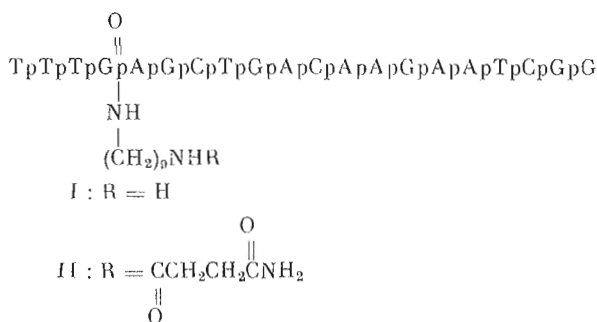


Рис. 1. Обращенно-фазовая хроматография соединения (I) после полного деблокирования (а) соединения (II), полученного аммонлизом иммобилизованной матрицы (б). Колонка Ultrasphere ODS (Altex), градиент концентрации ацетонитрила 5—30% за 25 мин в 0,1 М триэтиламмоний-ацетатном буфере (рН 7,0), скорость элюции 1 мл/мин

Мы же для иммобилизации олигонуклеотида на поверхности носителя использовали одну из межнуклеотидных фосфатных групп, преобразовав ее из фосфодиэфирной в диэфирофосфамидную со «свисающей» первичной аминогруппой. Об ограничениях, которые накладывает на результаты лигирования наличие фосфамидной модификации межнуклеотидной связи вблизи места шивки, мы уже имели представление из параллельно проводимых нами исследований, результаты которых готовятся к публикации. Поэтому мы запланировали расположение «свисающей» группы для иммобилизации на достаточном расстоянии от 3'-конца, на котором без каких-либо затруднений должен быть осуществлен первый акт лигирования. Чтобы контролировать ход ферментативской сборки на носителе, удобно располагать рестриктивным сайтом, расположенным на существенном расстоянии от места иммобилизации. В связи с этим возник общий план, приведший к соединению (I). Это соединение имеет алифатическую NH_2 -группу для ковалентной связки с матрицей, немодифицированные нуклеиновые основания для образования устойчивого комплекса с комплементарными участками, свободный 5'-гидроксил, позволяющий ввести радиоактивную метку, и 3'-гидроксил для обеспечения ферментативского лигирования:



Синтез соединения (I) осуществлялся твердофазным способом в несколько этапов. Начиная от 3'-конца вплоть до места модификации межнуклеотидного фосфата наращивание проводили амидофосфитным методом [5, 6]. Модифицированный межнуклеотидный участок создавался путем гидрофосфорильной конденсации и последующего превращения Н-фосфатного диэфира в амидофосфат в условиях реакции Аттертона — Тодда [7, 8] с участием 1,9-диаминононана. Аминогруппа модифицированного межнуклеотидного фосфата была блокирована реакцией с FmOSCl , и синтез завершен посредством Н-фосфонатных конденсаций.

Деблокирование и выделение синтезированного вещества осуществлялись в следующем порядке: 1) обработка иодом в смеси уксусная кислота — пиридин для окисления межнуклеотидных Н-фосфонатных групп [9], 2) действие смеси тиофенол — триэтиламин — диоксан для деметилирования межнуклеотидных фосфатов, 3) обработка концентрированным

аммиаком для отщепления от носителя, снятия Fmoc-защиты и удаления N-защитных групп нуклеиновых оснований, 4) выделение целевого соединения в виде 5'-DMTr-производного методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, удаление 5'-концевой защитной группы и очистка олигонуклеотида (I) в условиях такой же хроматографии. Выделенный олигонуклеотид представляет собой смесь диастереомеров из-за наличия асимметрического атома фосфора (рис. 1).

Подготовка носителя и иммобилизация олигонуклеотида (I) на его поверхности

В качестве носителя мы использовали, как и в работе [1], Sephacryl S-500. Доступные гидроксильные группы на поверхности носителя были подвергнуты сукцинированию реакцией с янтарным ангидридом в присутствии DMAP. Ионизированные сукцинатные группировки были активированы переводом их в *n*-нитрофениловые или N-оксисукцинимидные эфиры. Часть этих активированных группировок была вовлечена во взаимодействие с алифатической NH₂-группой соединения (I). Не вступившие в реакцию *n*-нитрофениловые эфиры были погашены с помощью ϵ -аминокапроновой кислоты; возникающая при этом отрицательно заряженная поверхность носителя, по нашему мнению, должна препятствовать неспецифической сорбции нуклеотидного материала.

Обработка части приготовленного носителя раствором аммиака приводит к расщеплению сложноэфирной связи, при этом иммобилизованный олигонуклеотид освобождается в виде сукцинамидного производного (II). Выделение этого вещества позволило оценить количество олигонуклеотида (I), привязанного к поверхности Sephacryl S-500; оно составляет $\sim 5 \text{ ОЕ}_{260}$ (25 нмоль) на 1 г сухого носителя. Попытка аналогичным образом привязать к активированной поверхности матрицы немодифицированный аналог соединения (I), не имеющий первичной алифатической NH₂-группы, показала отсутствие какой-либо способности образовывать ковалентную связь путем взаимодействия нуклеофильных центров его оснований с *n*-нитрофенилсукцинатами.

Сборка синтетических олигонуклеотидов на носителе с закрепленным на его поверхности олигонуклеотидом (I)

Создание запланированной двухцепочечной ДНК включает в себя первоначальное образование дуплексного участка путем отжига иммобилизованного олигонуклеотида (I) с 5'-фосфорилированным соединением (III) (рис. 2). Наличие радиоактивного атома фосфора на 5'-конце соединения (III) и *EcoRI*-сайта в соединениях (I) и (III) может служить для оценки количества образовавшегося при отжиге дуплекса и свидетельствовать о дальнейших событиях наращивания этого дуплекса диадами (pIV·pV) и (pVI·pVII). Расщепление эндонуклеазой *EcoRI* отожженных компонентов (Sephacryl-I) и (³²pIII) и последующий электрофоретический анализ показали, что в продуктах гидролиза отсутствует соединение (³²pIII) и появится более короткий меченый продукт, свидетельствующий об образовании иммобилизованного дуплекса.

Энзиматическое лигирование проводилось поэтапно: сначала к иммобилизованному дуплексу (Sephacryl-I·³²pIII) пришивали диаду (pIV·³²pV), избыток ДНК-лигазы и не вступивших в сшивку олигонуклеотидов отделяли от твердой фазы последовательными центрифугированием и отмывками. Для анализа сшивки отбирали порцию отмытого носителя и обрабатывали рестриктазой *EcoRI*. Полноту энзиматического расщепления контролировали по исчезновению радиоактивного материала на носителе. Анализ продуктов лигирования и энзиматического отщепления от матрицы выполняли с помощью электрофореза в неденатурирующих условиях. Установлено, что лигирование на протяжении 2 ч дает низкий выход продуктов сшивки, который значительно увеличивается при проведении реакции в течение ночи. На следующем этапе, когда пришивался дуп-

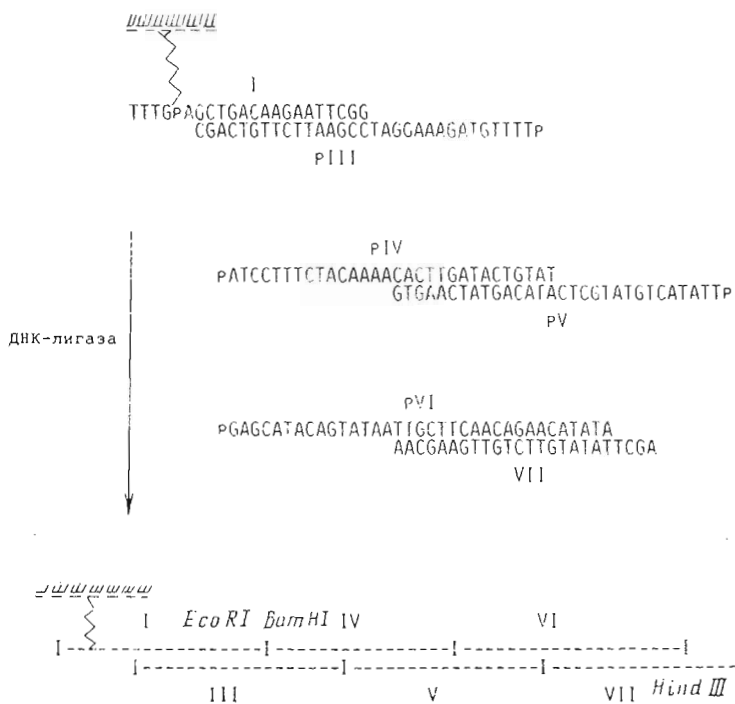


Рис. 2. Схема твердофазной сборки синтетических фрагментов ДНК. Римскими цифрами помечены синтетические олигонуклеотиды

лекс (pVI·VII), продолжительность лигирования составляла не менее 6 ч, и увеличение этого времени до 16 ч, как показал электрофоретический анализ, заметно улучшило результат.

Когда был проанализирован каждый этап сборки промоторного фрагмента из синтетических блоков, была осуществлена попытка пришить к иммобилизованному дуплексу (Sephacryl-I·pIII) одновременно две диады: (pIV·pV) и (pVI·VII). В этом случае использовали блоки, содержащие нерадиоактивные фосфаты. Для анализа результата лигирования двух диад метку в продукты сшивки вводили после расщепления их по сайту *Bam*HI, запланированному в синтетической нуклеотидной последовательности, путем заполнения выступающих концов с помощью ДНК-полимеразы и радиоактивных dNTP. По данным электрофоретического анализа продуктов твердофазного лигирования синтетических олигонуклеотидов, построение двуязыковой ДНК с использованием тетрады в нашем случае оказалось несколько эффективнее, чем поэтапное лигирование диад.

Клонирование собранного твердофазным лигированием промоторного фрагмента ДНК

При планировании синтетической последовательности введение сайтов *Bam*HI вблизи 5'-концевого участка и *Hind*III на 3'-конце промоторного дуплекса было вызвано удобством встраивания собранной ДНК в плазмиду pDS1t₀2 + [10]. В этой плазмиде интегрированы гены *dfr* и *cat*, кодирующие дигидрофолатредуктазу и хлорамфенилкоацетилтрансферазу. Оба гена практически не экспрессируются из-за отсутствия промотора, контролирующего их транскрипцию. Ген *dfr* в плазмиде pDS1t₀2+ фланкирован сайтами рестриктаз *Bam*HI и *Hind*III и может быть удален без нарушения участков, контролирующих трансляцию гена *cat*. Из плазмидной ДНК был приготовлен вектор путем расщепления ее по указанным сайтам, а синтетическая ДНК отделена от твердой матрицы с помощью эндонуклеазы *Bam*HI. Векторный и промоторный фрагменты лигированы между собой, и рекомбинантная плазмидная ДНК использована для трансформации клеток *E. coli*. Клетки, экспрессирующие ген *cat*, отбирались

на среде с хлорамфениколом по устойчивости к этому антибиотику. Из отобранных клонов выделенная плазмидная ДНК была подвергнута рестриктному анализу, который показал, что синтетический фрагмент встроился перед геном *cat*. Окончательно структура рекомбинантной плазмиды была подтверждена прямым секвенированием участка вставки по методу [13].

После подтверждения результата клонирования была определена предельная концентрация хлорамфеникола, на которой способны выживать клетки, несущие плазмиду с геном *cat* под контролем промотора *rec A*; она составила около 75 мкг/мл.

В заключение подчеркнем, что результаты наших опытов дают основание для распространения метода твердофазного лигирования синтетических олигонуклеотидов для сборки протяженных фрагментов ДНК.

Экспериментальная часть

В работе использованы рестриктазы *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* (НПО «Фермент», Вильнюс), Т4-полинуклеотидкиназа, ДНК-полимераза I (фрагмент Кленова) (выделены в лаборатории), [γ - ^{32}P]АТФ и [α - ^{32}P]dNTP (Amersham), полиэтиленимин (полимин Р), акриламид, трис (Merck), FmocCl (Fluka), дитиотреит, PMSF (Serva), Sephacryl S-500 (Pharmacia).

Олигонуклеотиды (II)–(VII) были синтезированы П-фосфонатным методом [11, 12] и выделены препаративным электрофорезом в ПААГ. 5'-Фосфатные группы вводились с использованием Т4-полинуклеотидкиназы и АТФ [13] или же по методу [11].

УФ-спектры фрагментов ДНК записывали на спектрофотометре Spexord UV VIS (Carl Zeiss, Иена). Обращенно-фазовую хроматографию проводили на хроматографе Du Pont 8800.

Синтез соединения (I) осуществляли твердофазным методом в автоматическом режиме на синтезаторе фирмы Beckman, используя комбинацию фосфитамидного и фосфонатного подходов. До места межнуклеотидной модификации элонгацию вели с использованием защищенных 5'-DMTr-нуклеозид-3'-О-метил-N,N-диизопропилфосфитамидов. Далее выполняли одну гидрофосфорильную конденсацию и межнуклеотидную П-фосфонатную группу окисляли в присутствии 1,9-диаминононана (0,2 М раствор) в смеси CCl_4 — Py — Et_3N (8 : 2 : 1) в течение 10 мин. Затем киперовали 10 мин с помощью FmocCl (0,1 М раствор) в смеси пиридин — метилимидазол (10 : 1) и заканчивали синтез проведением трех гидрофосфорильных конденсаций. Окисление и деблокирование проводили как описано [6, 9]. Р-Модифицированный олигонуклеотид (I), содержащий 5'-DMTr-группу, выделяли обращенно-фазовой хроматографией в градиенте ацетонитрила (15 - - 35%) в 0,1 М триэтиламмоний-ацетатном буфере, рН 7 (20 мин). Колонка Ultrasphere ODS (4,5 × 250 мм), скорость элюции 1 мл/мин. Фракцию, содержащую 5'-DMTr-производное соединения (I), упаривали, обрабатывали 80% уксусной кислотой и выделяли олигонуклеотид (I) в условиях той же хроматографии (рис. 1).

Подготовка матрицы и иммобилизация олигонуклеотида (I). Sephacryl S-500 (0,5 г сухого веса, предварительно промыт водой, ацетоном, абс. нитрилом и высушен в вакууме) обрабатывали 16 ч янтарным ангидридом (100 мг, 1 ммоль) в 10 мл абс. пиридина в присутствии DMAP (50 мг, 0,4 ммоль). Отмывали последовательно ацетоном, водой, 5% лимонной кислотой, водой, ацетоном, и абс. ацетонитрилом. Затем добавляли 80 мг (0,5 ммоль) *n*-нитрофенола, 257 мг (1,25 ммоль) DCC и встряхивали 20 ч в 10 мл абс. пиридина. Отмывали абс. пиридином, хлористым метиленом, абс. ацетонитрилом и сушили в вакууме. К 500 мг функционализованной таким образом матрицы добавляли 12 OE_{260} олигонуклеотида (I) в 0,5 М $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ -буфере, рН 8,9, и встряхивали 48 ч. После этого отфильтровывали, промывали исходным буфером и обрабатывали 20 ч ϵ -аминокапроновой кислотой (0,5 М раствор). Отмывали последовательно исходным буфером, водой, водным ацетонитрилом (1 : 1), водой, быстро холодным раствором NaOH (рН 12) и водой, оставляли в 0,05% растворе NaN_3 при 5° С.

Выделение Т4-ДНК-лигазы [41]. В шесть колб со средой LB (300 мл, 50 мг/мл ампициллина) добавляли по 3 мл ночной культуры штамма-супер-продуцента по Т4-ДНК-лигазе *E. coli*, выращенной при 30 °С. Выращивание проводили в течение 20 ч при 37° С и аэрации, клетки осаждали центрифугированием (10 мин при 4000 об/мин). Все последующие операции проводили при 4° С.

12 г биомассы суспендировали в 30 мл буфера А (20 мМ MES, рН 7,0, 0,2 мМ EDTA, 20 мМ дитиотреит, 5% глицерин, 50 мкг/мл PMSF). Суспензию озвучивали импульсами по 30 с в течение 5 мин при 20 кГц (температура не превышала 8° С), центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин и супернатант разбавляли буфером А до оптической плотности 150 OE_{260} . К супернатанту в течение 5 мин добавляли 10% полимин Р (рН 7,0) до конечной концентрации 0,8%, перемешивали 10 мин и центрифугировали 20 мин при 1500 об/мин. Осадок суспендировали в 25 мл буфера, содержащего 20 мМ трис (рН 7,6), 2 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA, 50 мкг/мл PMSF (буфер В) и 0,15 М NaCl. Суспензию перемешивали 15 мин и центрифугировали 20 мин при 1500 об/мин. К супернатанту добавляли сульфат аммония до 60% насыщения, перемешивали 30 мин, центрифугировали 40 мин и осадок растворяли в 20 мл буфера, содержащего 10 мМ К-фосфат (рН 7,6), 0,1 мМ EDTA, 2 мМ дитиотреит, 5% глицерин (буфер В) и 0,1 М KCl. Диализовали ночь против 2 л этого буфера. Раствор белка после диализа наносили на колонку с фосфоцеллюлозой P-11, уравновешенной в буфере В, содержащем 0,1 М KCl, промывали 100 мл этого буфера, затем 100 мл буфера В с 0,27 М KCl и элюировали белок 60 мл буфера В с 0,27 М KCl и 1 мМ АТР. Контроль элюции осуществляли с помощью электрофореза в 13% ПААГ. Фракции, содержащие ДНК-лигазу, собирали и диализовали против буфера В с 0,05 М KCl и 50% глицерином. Хранили при -20° С. Гомогенность белка после хроматографии на фосфоцеллюлозе превышала 90%. Количество выделенного белка составило 15 мг.

Отжиг олигонуклеотида ($^{32}pIII$) на носителе. 200 мкл носителя, несущего 0,4 нмоль олигонуклеотида (I), промыли 3 раза по 500 мкл буфера Г (0,05 М трис-HCl, рН 7,5, 0,01 М $MgCl_2$, 5 мМ дитиотреит), к носителю после центрифугирования добавляли 0,2 OE_{260} олигонуклеотида ($^{32}pIII$), 200 мкл 10-кратного буфера Г, воду до объема 300 мкл, прогревали 2 мин при 90° С и охлаждали до 20° С в течение 3 ч. К 20 мл носителя, промытого 3 раза по 500 мкл буфера Г, содержащего 150 мМ NaCl (солевой буфер), после центрифугирования добавляли 100 ед. акт. рестриктазы *EcoRI*, воду до объема 80 мкл и встряхивали 16 ч при 37° С. Супернатант после центрифугирования отделяли и подвергали электрофорезу в 15% ПААГ в денатурирующих условиях. На радиоавтографе геля обнаружены полосы, укороченные по сравнению с нуклеотидом ($^{32}pIII$).

Последовательное лигирование отожженных диад. К 180 мкл носителя с иммобилизованным дуплексом (I· $^{32}pIII$), промытого трижды 500 мкл буфера Г, добавляли 100 мкл (0,4 OE_{260}) диады (pIV · ^{32}pV) в том же буфере, 20 мкл 5 мМ АТР, 300 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы, воду до объема 200 мкл и встряхивали 6 ч при 20° С. Результат лигирования выявляли с помощью *EcoRI*-гидролиза, аналогичным образом лигировали диаду (pVI ·VII).

*Отделение фрагмента *BamHI-HindIII* от носителя*. К 20 мкл суспензии носителя, промытого трижды 100 мкл буфера Д (0,02 М трис-HCl, рН 7,6, 0,01 М $MgCl_2$, 0,05 М NaCl, 0,01 М дитиотреит), добавляли 8 мкл 10-кратного буфера Д, 70 ед. акт. *BamHI* рестриктазы, воду до объема 80 мкл и встряхивали 6 ч при 37° С. Носитель отделяли, супернатант разделяли с помощью электрофореза в 10% ПААГ в неденатурирующих условиях в буфере, содержащем 0,04 М трис-ацетат, 2 мМ EDTA, рН 8,0.

Лигирование тетрады (pIV · pV)·(pVI ·VII) на носителе. К 100 мг носителя с иммобилизованным дуплексом (I· $^{32}pIII$) добавляли отожженные олигонуклеотиды (pIV), (pV), (pVI), (VII) (по 0,1 OE_{260}) в 60 мл буфера Г, 10 мкл 5 мМ АТР, 300 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы, воду до объема 100 мкл и встряхивали 3 ч при 20° С. *BamHI/HindIII*-фрагменты выделяли как описано выше.

*Клонирование *BamHI/HindIII*-фрагмента*. 1 мкг ДНК плазмиды

PDS1t₀2+ обрабатывали рестриктазами *Bam*HI и *Hind*III, продукты эндонуклеазного гидролиза разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле и выделяли большой фрагмент. Фрагмент объединяли с отделенным от носителя *Bam*HI/*Hind*III-фрагментом (см. выше) в лигазной смеси, содержащей 3 мкл буфера Г (10-кратного), 3 мкл 5 мМ АТР, 30 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы и воду до объема 30 мкл, инкубировали 6 ч при 14° С. Лигазную смесь трансформировали клетки HB101. Селекцию трансформантов проводили на среде, содержащей 25 мкг хлорамфеникола на 1 мл агара.

Из отобранных колоний выделяли ДНК, обрабатывали рестриктазой *Xho*I и ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) в присутствии dCTP и [α -³²P]TTP как описано [13]. Достроенную ДНК гидролизovali рестриктазой *Bsp*I и меченый фрагмент длиной 239 п. о. подвергали химическим модификациям по методу [15].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hostomsky Z., Smrt J., Arnold L., Točik Z., Paces V. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 12. P. 4849—4856.
2. Goldkorn T., Prockop D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 15. № 22. P. 9171—9191.
3. Sancar A., Stachelek C., Konigsberg W., Rupp W. D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 5. P. 2611—2615.
4. Ghosh S. S., Musso G. F. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 13. P. 5353—5372.
5. Atkinson T., Smith M. // Oligonucleotide synthesis: a practical approach / Ed. Gait M. J. Oxford: IRL Press, 1984. P. 35—81.
6. Добрынин В. Н., Калинин С. В., Фархутдинов М. Р., Филиппов С. А., Коробко В. Г. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1232—1238.
7. Atherton T. R., Openshaw H. T., Todd A. R. // J. Chem. Soc. 1945. V. 5. P. 660.
8. Froehler B. C. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 46. P. 5575—5578.
9. Кумарев В. П., Баранова Л. В., Кобзев В. Ф., Кузнецлова К. Д., Средин Ю. Г. // Биоорганич. химия. 1988. Т. 14. № 2. P. 276—278.
10. Stuber D., Vujard H. // EMBO J. 1982. V. 1. № 11. P. 1399—1404.
11. Филиппов С. А., Есинов Д. С., Калинин С. В., Добрынин В. Н. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 4. P. 527—529.
12. Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5389—5407.
13. Манниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 134.
14. Dolganov C., Chestukhin A., Shemyakin M. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 114. P. 247—254.
15. Chuvpilo S. A., Kravchenko V. V. // FEBS. Lett. 1985. V. 179. № 1. P. 34—36.

Поступила в редакцию
21.IX.1989

S. A. FILIPPOV, S. V. KALINICHENKO, D. S. CSIPOV, E. V. SHIBANOVA,
L. N. SHINGAROVA, V. G. KOROBKO, V. N. DOBRYNIN

SOLID-PHASE LIGATION OF SYNTHETIC DNA FRAGMENTS

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

A synthetic oligodeoxyribonucleotide (oligo) covalently bound by an internucleotide linkage to the succinylated Sephacryl S-500 support through 1,9-diaminononane spacer was used as starting compound to assemble the *E. coli* rec A promoter DNA fragment from synthetic oligos by means of T4 DNA ligase. The solid-phase assembly of the designed DNA was performed by two ways: stepwise ligation of two pairs of oligos (2 diads) or simultaneous ligation of four oligos (tetrad). Both ways gave equal results with some preference in the tetrad case. The reliability of *E. coli* promoter DNA fragment assembly was demonstrated by cloning it in a plasmid vector and sequencing the cloned DNA by the solid-phase Maxam — Gilbert technique.