



УДК 547.963.32.07

СИНТЕЗ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ДНК  
БАКТЕРИОФАГА *fd*

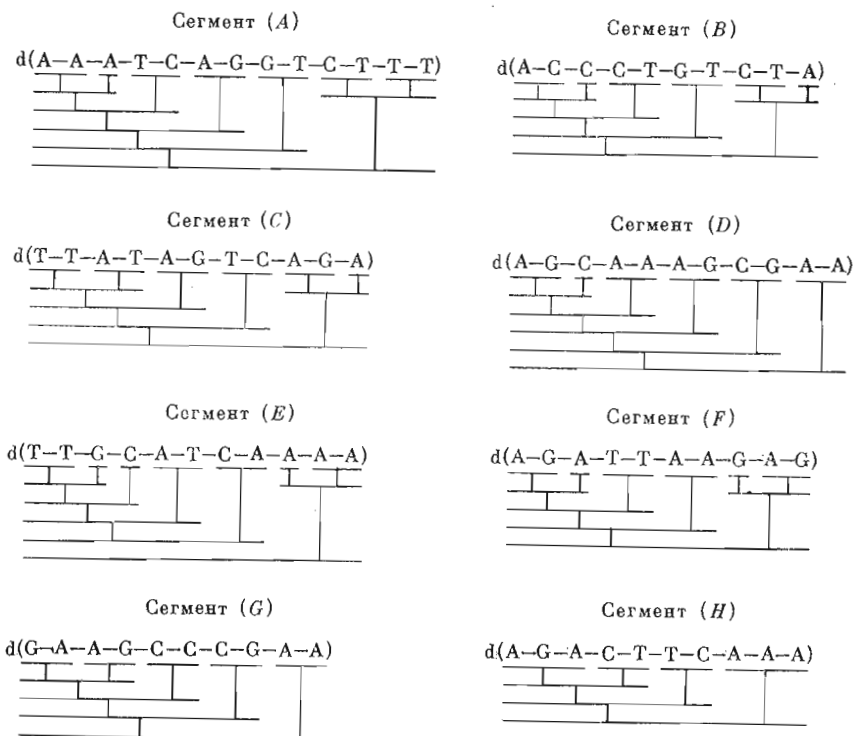
Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г.

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

В развитие работ по структурно-функциональному изучению РНК-полимеразы *E. coli* [1, 2] нами был предпринят синтез 86-звенного двухцепочечного полинуклеотида, представляющего собой промоторную область G2 ДНК бактериофага *fd*. Структура этого сильного промотора была недавно установлена Шаллером с сотр. [3], а затем подтверждена японскими исследователями [4]. Для получения этого фрагмента ДНК, в котором 15 пар оснований относятся к структурному гену G2 мРНК, а 71 пара предшествует точке начала считывания мРНК, нами были использованы два новых химико-ферментативных подхода, в основе которых лежит способность олигодезоксирибонуклеотидов благодаря спариванию оснований образовывать двухспиральные комплексы со строго определенными, комплементарными участками одноцепочечных ДНК. Оба эти способа предполагают синтез только одной цепи промоторной области, в качестве же второй цепи был взят соответствующий участок природной ДНК.

Первый подход заключался в ковалентном соединении с помощью ДНК-лигазы синтетических сегментов, составляющих в совокупности (—)цепь промотора, на одноцепочечной ДНК фага *fd*, как на матрице, с последующим выщелением образующегося при этом дуплекса (см. рис. 1). Химический синтез восьми олигодезоксирибонуклеотидов (А) — (Н) длиной от 10 до 13 мононуклеотидных звеньев каждый проводился фосфодизэфирным методом [5]. Нуклеотидная цепь начиналась с 5'-монометокситриптинуклеозидов и наращивалась блоками в направлении от 5'- к 3'-концу, как показано на схемах.

Все полученные соединения были охарактеризованы спектрально и хроматографически, а их мономерный состав определен ферментативным гидролизом фосфодизэстеразой змеиного яда. Первичная структура конечных сегментов (А) — (Н) подтверждалась нуклеотидными картами [6].



Далее синтетические олигонуклеотиды (А) — (Н) 5'-фосфорилировали действием  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$  и Т4-полинуклеотидкиназы [7], гибридизовали с предварительно выделенной в индивидуальном виде ДНК бактериофага *fd* дикого типа [(+) - нить] и сшивали их с помощью Т4-полинуклеотидлигазы [8]. Реакцию проводили в условиях, описанных в работе [9]. Ход сшивки контролировали по повышению доли  $^{32}\text{P}$ -фосфата, устойчивого к действию щелочной фосфатазы *E. coli*, а также с помощью электрофореза в 10% полиакриламидном геле. Таким образом получили (—)-цепь промотора. В качестве второй нити искомого дуплекса использовали участок природной ДНК фага *fd*, соответствующий (+)-нити промоторной области. Для этого комплекс синтетической (—)-цепи с кольцевой ДНК обработали  $S_1$ -нуклеазой *Aspergillus oryzae*, специфичной к одноцепочечным областям [10]. Полученный в результате этого 86-звенный дуплекс (А — Н) выделяли хроматографией на биогеле А 1,5m.

Аналогично были синтезированы четыре фрагмента ДНК, представляющие собой укороченные варианты той же промоторной области длиной 45 [дуплекс (А — D)], 56 [дуплекс (А — E)], 66 [дуплекс (А — F)] и 76 [дуплекс (А — G)] нуклеотидных звеньев, содержащие по 15 пар оснований в транскрибируемом районе и соответственно 30, 41, 51 и 61 пару — в промоторной области. Строение всех дуплексов было доказано анализом ближайших соседей, а их гомогенность — электрофорезом в 8% неденатурирующем полиакриламидном геле. Структура 86-звенного полинуклеотида (А — Н) была подтверждена модифицированным методом Максама — Гилберта [11—13] (рис. 2).

Помимо изложенного выше, для синтеза участков ДНК со специфической нуклеотидной последовательностью нами также предлагается подход, состоящий в контролируемом удлинении синтетического олигонуклеотида-«праймера» на одноцепочечной матрице с помощью Т4-ДНК-полимеразы в присутствии олигонуклеотида-«стоппера», терминирующего рост вновь образующейся цепи. На рис. 3 показаны способы синтеза

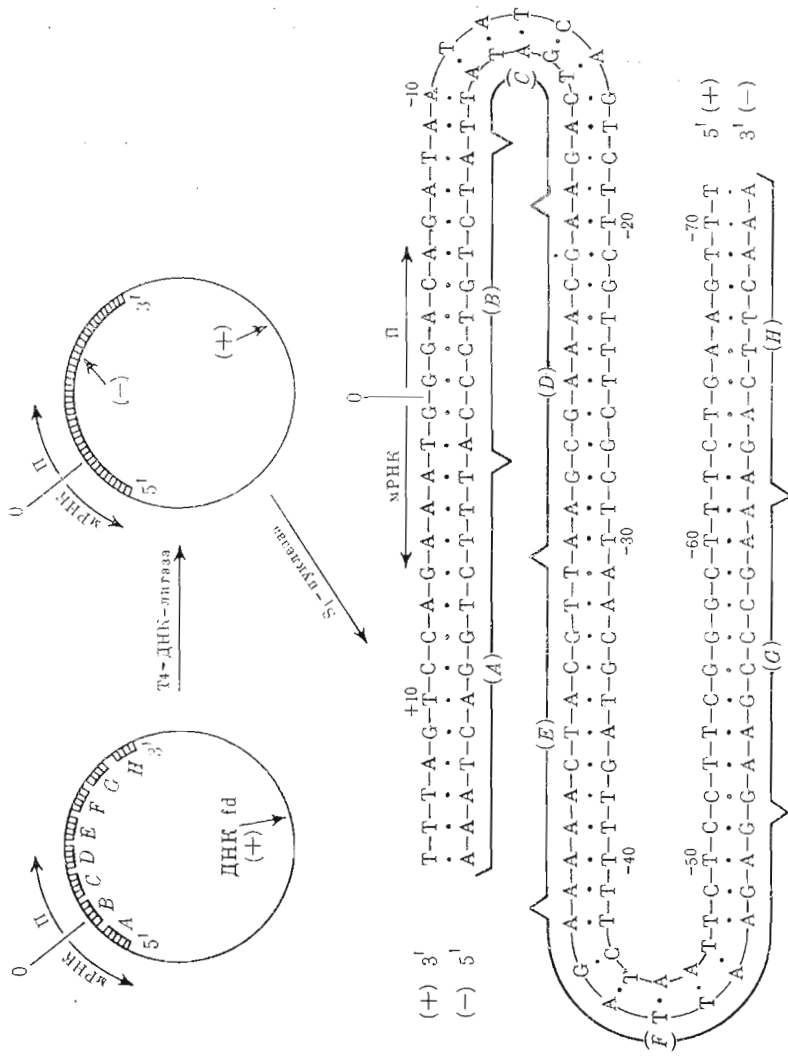


Рис. 1. Схематическое изображение шпана синтеза промоторного участка С2 ДНК бактериофага fd с помощью первого подхода и нуклеотидная последовательность этого промотора (A, B, C, D, E, F, G, H — сегменты, П — промотор)

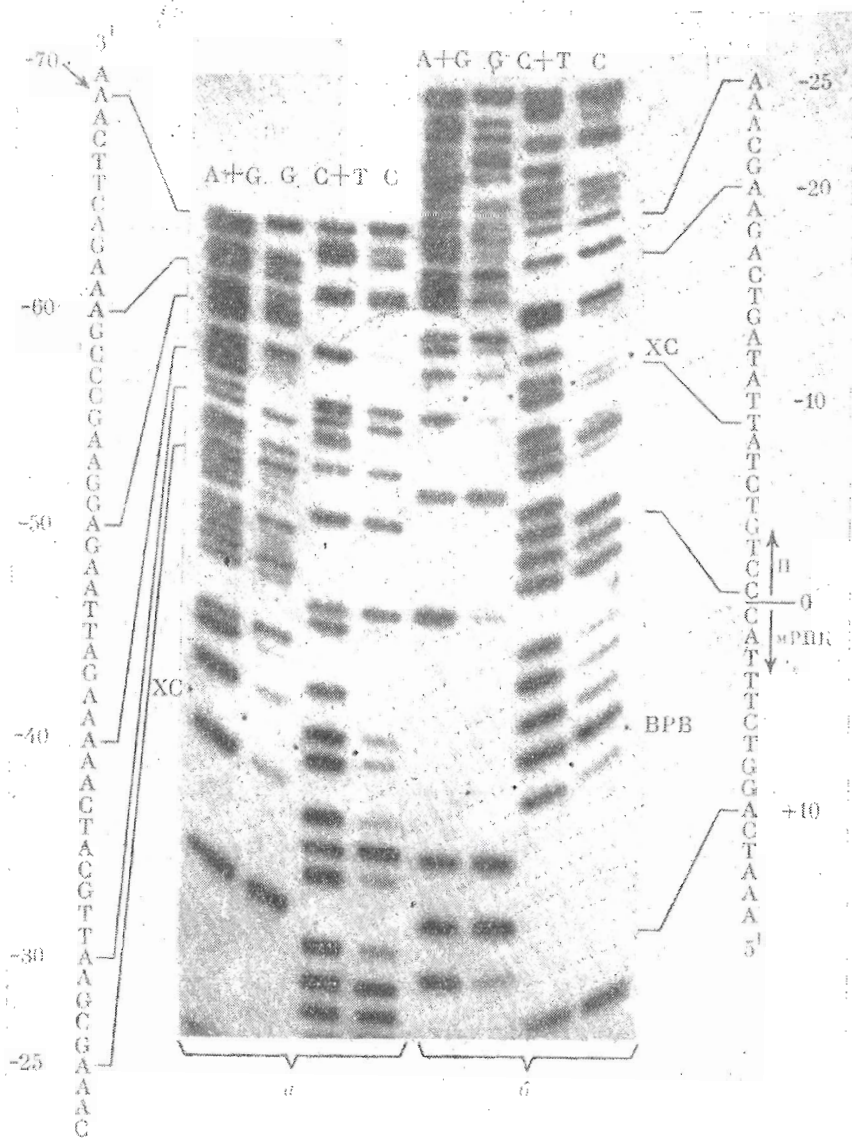


Рис. 2. Радиоавтография геля, полученного при анализе 86-членного полинуклеотида (А—Н) методом Максама — Гилберта. Использованы следующие реакции: А + G — 60% муравьиная кислота, G — 50 мМ диметилсульфат, С + Т — 18 М гидразин и С — 18 М гидразин в 2М NaCl. Электрофорез проводили в 20% денатурирующем полиакриламидном геле (пластина 20 × 40 × 0,10 см) при 1000 В и 20 МА (а — 16 ч, б — 8 ч). XC — краситель ксиленцианол FF, BPB — бромфеноловый голубой

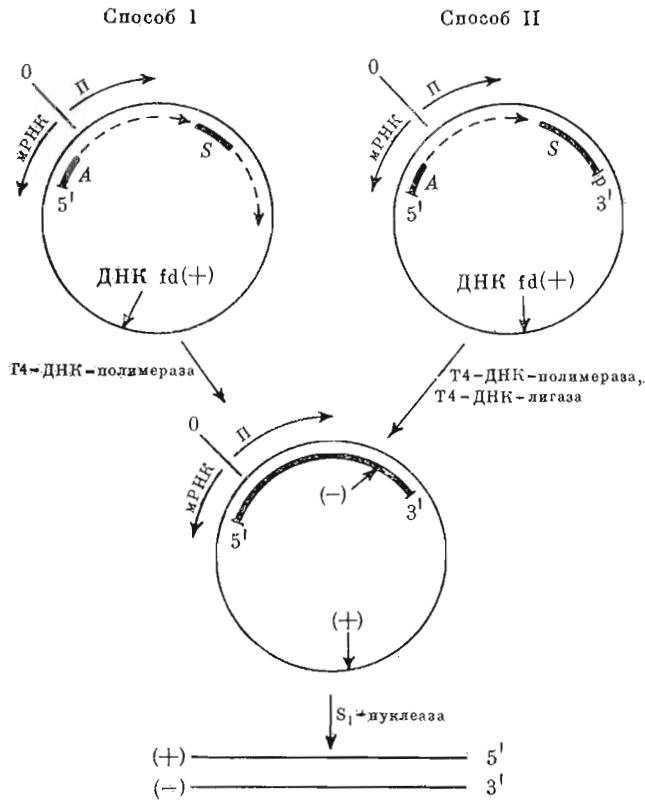


Рис. 3. Схематическое изображение плана синтеза промотора G2 с применением метода ограниченного матричного копирования. A — сегмент «праймер», S — «стоппер»: для способа I — (F), для способа II — (F — H)

промоторной области с применением этого подхода, которому можно дать название метода ограниченного матричного копирования. Так, для получения дуплекса (A — E) (способ I) <sup>32</sup>P-меченый 5'-концевой сегмент (A) и немеченый сегмент (F) [4-кратный избыток относительно (A)] комплексовали с одноцепочечной ДНК бактериофага fd и затем проводили ферментативный синтез комплементарной (—) цепи в присутствии ДНК-полимеразы фага T4 и полного набора дезоксирибонуклеозидтрифосфатов при + 10° [14]. При этом происходила элонгация обеих затравок, причем достройка олигонуклеотида (A) останавливалась, доходя до 5'-конца сегмента (F), который играл роль «стоппера». Полученный таким образом 56-членный одноцепочечный полинуклеотид выделяли гель-электрофорезом в денатурирующих условиях, отжигали с новой порцией (+)-нити ДНК и после обработки эндонуклеазой S<sub>1</sub> получили дуплекс (A — E), который был выделен гель-фильтрацией на биогеле A 1,5m.

При использовании в качестве «стоппера» олиго- или полинуклеотида с блокированным (например, фосфорилированным) 3'-концом, не являющегося субстратом для ДНК-полимеразы, его можно включать в состав синтезируемого дуплекса (способ II, рис. 3). Это легло в основу еще одного варианта синтеза 86-звенного полинуклеотида (A — H). Образовавшийся в результате ковалентного сшивания ДНК-лигазой в описан-

ных выше условиях сегментов (F), (G) и (H) 30-звенный одноцепочечный полинуклеотид (F — H), содержащий 3'-фосфатную группировку (введенную с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы и НТР [15]) и 5'-<sup>32</sup>P-меченый сегмент (A), гибридизовали с одноцепочечной ДНК бактериофага fd и инкубировали с Т4-ДНК-полимеразой и Т4-ДНК-лигазой в присутствии четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и АТР. Поскольку достраивания «стоппера» (F — H) при этом не происходило, после обработки S<sub>1</sub>-нуклеазой был получен двухцепочечный фрагмент (A — H). Длина дуплексов, синтезированных с помощью метода ограниченного матричного копирования, подтверждалась сравнением их подвижности при электрофорезе в полиакриламидном геле с подвижностью фрагментов, полученных в результате лигазного сшивания, а их структура — методом Максама — Гилберта.

Развивая методы синтеза двухспиральных ДНК со специфической последовательностью оснований, мы стремились максимально сократить трудоемкие химические стадии синтеза. В приложении к изучению нуклеиново-белкового взаимодействия изложенная здесь методология, с одной стороны, значительно облегчит определение размеров промоторного участка, а с другой — предоставит широкие возможности для модификации промотора, в частности для введения в его состав фоточувствительных аналогов нуклеотидов, что предполагается использовать далее при проведении структурно-функциональных исследований РНК-полимеразы *E. coli*.

Авторы выражают благодарность Г. М. Долганову и М. Ф. Шемякину за помощь при выделении ряда ферментов, а также Н. Н. Модянову, В. М. Липкину и Е. Д. Свердлову за полезное обсуждение результатов работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю. А., Липкин В. М., Модянов Н. Н., Чертов О. Ю., Смирнов Ю. В., Хохлаков В. С., Шуваева Т. М. (1977) Биоорг. химия, 3, 283—286.
2. Свердлов Е. Д., Царев С. А., Модянов Н. Н., Липкин В. М., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г. (1978) Биоорг. химия, 4, 1278—1280.
3. Schaller H., Gray C., Herrmann K. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 737—741.
4. Sugimoto K., Sugisaki H., Okamoto T., Takanami M. (1975) Nucl. Acids Res., 2, 2091—2100.
5. Van de Sande J. H., Caruthers M. H., Kumar A., Khorana H. G. (1976) J. Biol. Chem., 251, 571—586.
6. Sanger F. (1973) in: Virus Reserch (Fox C. F., Robinson W. S., eds.), pp. 573—599, Acad. Press, New York—London.
7. Richardson C. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54, 158—165.
8. Besmer P., Miller R. C., Caruthers M. H., Kumar A., Minamoto K., van de Sande J. H., Sidorova N., Khorana H. G. (1972) J. Mol. Biol., 72, 503—522.
9. Raae A. J., Lillehaug J. R., Kleppe R. K., Kleppe K. (1975) Nucl. Acids Res., 2, 423—429.
10. Sekiya T., Takeya T., Contreras R., Küpper H., Khorana H. G., Landy A. (1976) in: RNA Polymerase (Losik R., Chamberlin M., eds.), pp. 455—472, Cold Spring Harbor Lab.
11. Gilbert W., Maxam A. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 560—564.
12. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) Биоорг. химия, 3, 1420—1422.
13. Слыбын К. Р., Захарьев В. М., Баев А. А. (1978) Докл. АН СССР, 241, 488—490.
14. Panet A., van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Raae A. J., Lillehaug J. R., Kleppe K. (1973) Biochemistry, 12, 5045—5050.
15. Roychoudhury R., Jay E., Wu R. (1976) Nucl. Acids Res., 3, 863—878.

Поступило в редакцию  
5.X.1978

# THE SYNTHESIS OF A PROMOTOR REGION OF BACTERIOPHAGE *fd* DNA

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

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

The double-stranded 86-nucleotide-long polynucleotide, corresponding to the G2 promoter region of bacteriophage *fd* DNA, has been synthesized by the two new chemical-enzymatic methods.

---