



УДК 547.963.32.07

## СИНТЕЗ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ДНК БАКТЕРИОФАГА *fd* \*

I. ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ,  
СООТВЕТСТВУЮЩИХ 5'-КОНЦЕВОМУ УЧАСТКУ «МИНУС»-ЦЕПИ ПРОМОТОРА

*Ефилов В. А., Чахмахчева О. Г.*

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

Осуществлен синтез двух олигодезоксирибонуклеотидов d(A-A-A-T-C-A-G-G-T-C-T-T-T) и d(A-C-C-C-T-G-T-C-T-A), составляющих в совокупности участок (+15) – (-8) «минус»-цепи промоторной области G2 ДНК бактериофага *fd*. Синтез проводили блочным фосфодиэфирным методом. Структура полученных соединений была подтверждена методом нуклеотидных карт.

Одним из наиболее интересных примеров нуклеиново-белкового узнавания является взаимодействие РНК-полимеразы с промоторными областями ДНК при инициации процесса транскрипции генетической информации в клетке. Расшифровка нуклеотидной последовательности промоторов ДНК некоторых бактерий и вирусов [2], а также исследования по установлению первичной структуры РНК-полимеразы *E. coli* [3] делают возможным структурно-функциональное изучение как этого фермента, так и промоторных участков ДНК [2, 4–8].

Успех этой работы в первую очередь определяется доступностью обоих участвующих во взаимодействии компонентов в индивидуальном виде и необходимых количествах. Наибольшие возможности для исследования взаимодействия РНК-полимеразы с промоторами предоставляет химико-ферментативный синтез последних [6]. Применяя синтетический подход, можно систематически модифицировать различные участки ДНК-промотора, например осуществлять делеции в различных его частях или заменять отдельные пары оснований (и даже целые фрагменты), вводить в его состав модифицированные аналоги нуклеотидов и с помощью ковалентного сшивания таких модифицированных фрагментов с белком локализовать точки связывания РНК-полимеразы с нуклеиновой кислотой. Кроме того, возможность изменения длины промоторного участка значительно облегчает определение его размеров.

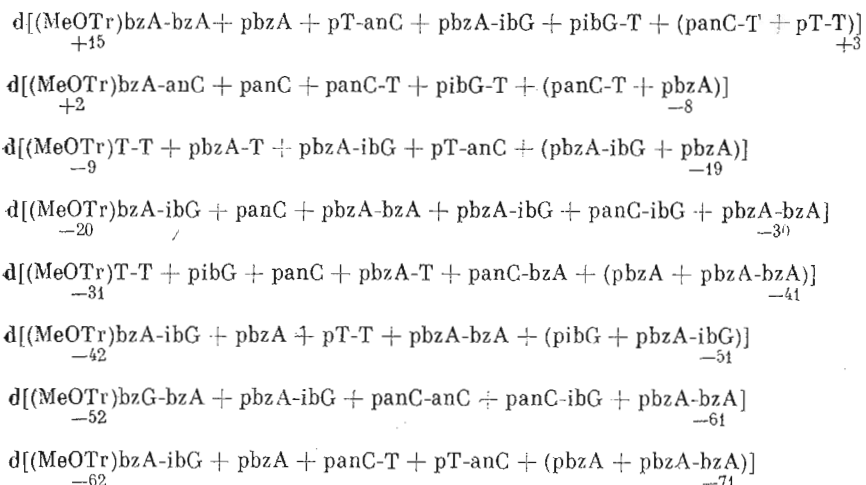
С целью изучения функциональной топографии РНК-полимеразы *E. coli* мы предприняли химико-ферментативный синтез промоторной области G2 ДНК бактериофага *fd* [9]. Синтезируемый 86-звенный двухцепочечный фрагмент ДНК содержит 71 пару оснований в районе, предшествующем точке начала считывания мРНК, и 15 пар в постинициаци-

\* Краткое сообщение см. [1]. В статье использованы следующие нестандартные сокращения: ТЕАВ – бикарбонат триэтиламония, ТРС – 2,4,6-триизопропилбензол-сульфохлорид.

онном районе. Выбор объекта синтеза был связан прежде всего с тем, что этот промотор являлся одним из наиболее сильных промоторов, структура которых была установлена к моменту начала работы независимо двумя группами исследователей [9, 10], что делало ее достаточно достоверной. Кроме того, природная ДНК бактериофага *fd* легкодоступна в индивидуальном виде в больших количествах и имеет однонитчатую кольцевую форму. Последнее обстоятельство послужило фундаментом для разработки двух новых химико-ферментативных подходов к получению двухцепочечных участков ДНК, которые и были реализованы нами на примере синтеза этой промоторной области. Оба эти подхода основаны на способности цепей олиго- и полинуклеотидов образовывать упорядоченные двухспиральные комплексы с комплементарными участками одноцепочечных ДНК и предполагают химико-ферментативный синтез только «минус»-цепи промотора, в качестве же второй цепи мы использовали соответствующий фрагмент природной ДНК фага *fd* [1].

Для получения (-)-цепи промоторной области последовательность этого 86-звенного одноцепочечного полинуклеотида была условно разбита на восемь сегментов (A)–(H) (рис. 1), химический синтез которых проводили блочным фосфодиэфирным методом. Схемы синтеза всех олигонуклеотидов составлялись одновременно с учетом общих правил стратегии блочного метода [11], а также возможности многократного использования одних и тех же ди- и тринуклеотидных блоков при получении разных сегментов. Так, динуклеотиды  $d(pbzA-bzA)$  и  $d(pbzA-ibG)$  встречаются по шесть раз, динуклеотид  $d(panC-T)$  — четыре раза, тринуклеотиды  $d(pbzA-bzA-bzA)$  и  $d[(MeOTr)bzA-ibG-bzA]$  — по два раза и т. д. Это позволило сократить общее число межнуклеотидных конденсаций с 78 до 54, т. е. более чем на 30% (см. схему 1).

#### Схема 1



В настоящем сообщении описывается химический синтез двух олигодезоксирибонуклеотидов  $d(A-A-A-T-C-A-G-G-T-C-T-T-T)$  (A) и  $d(A-C-C-C-T-G-T-C-T-A)$  (B), соответствующих в совокупности участку (+15) — (–8) «минус»-цепи промоторной области.

Защищенный тридекануклеотид (VI) был получен из 5'-монометокситритил-N-бензоилдезоксиаденозина последовательным наращиванием двумя моно-, тремя ди- и одним тетра нуклеотидными блоками (схема 2). Промежуточными соединениями при синтезе декануклеотида (XI) были ди- (VII), три- (VIII), пента- (IX) и гептануклеотид (X) (схема 3).

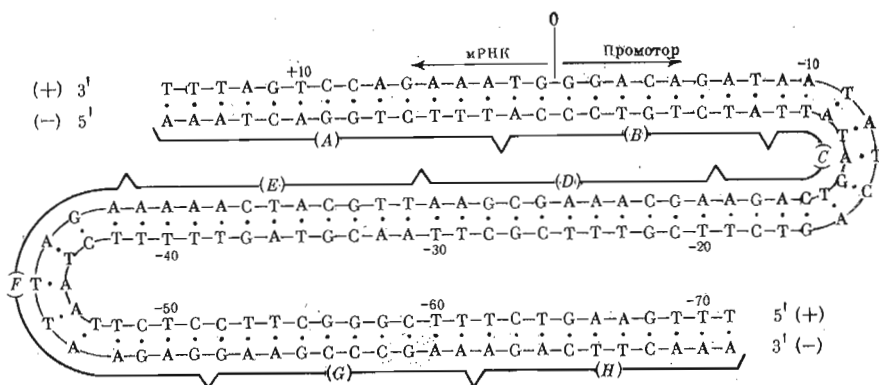


Рис. 1. Нуклеотидная последовательность промотора G2 ДНК бактериофага *fd* и разбивка «минус»-цепи на сегменты

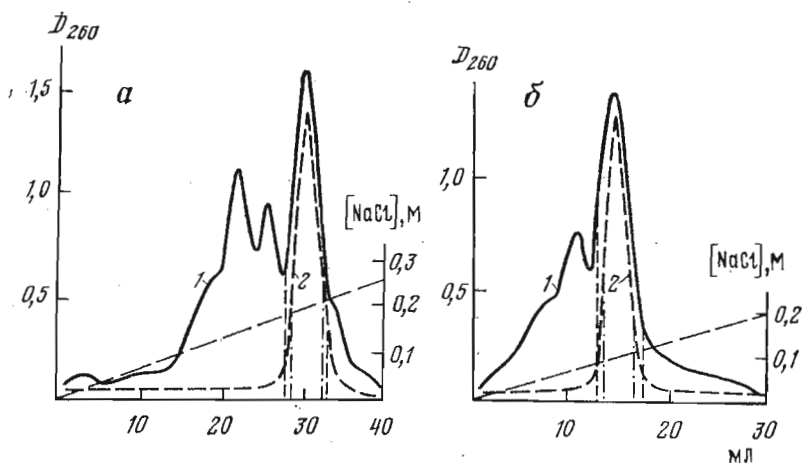


Рис. 2. Выделение и рехроматография незащищенных сегментов (A) и (B) на DEAE-целлюлозе ( $\text{Cl}^-$ ) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины, колонка  $0,2 \times 6$  см. а - выделение (A), 1 - хроматография при pH 4,0, скорость элюции 0,5 мл/мин, выделенная фракция содержит 7  $\text{OE}_{260}$  (A); 2 - рехроматография в тех же условиях, выделено 5  $\text{OE}_{260}$  тридекануклеотида; б - выделение (B), 1 - хроматография при pH 3,5 скорость элюции 0,42 мл/мин, центральная часть основного пика содержит 4,5  $\text{OE}_{260}$  (B), 2 - рехроматография в аналогичных условиях, выделено 3,7  $\text{OE}_{260}$  декануклеотида

В качестве конденсирующего реагента во всех реакциях образования межнуклеотидной связи был использован 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид. Тритилсодержащие ди- и тринуклеотиды выделяли из реакционных смесей избирательной экстракцией органическими растворителями из разбавленных растворов в ТЕАВ [12], в остальных синтезах разделение проводили с использованием ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе. Промежуточные соединения были охарактеризованы хроматографически и УФ-спектрами (табл. 1), а их мономерный состав определен после удаления защитных групп исчерпывающим гидролизом фосфодиэстеразой змеиного яда (табл. 2). Конечные сегменты (A) и (B) выделяли ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе (рис. 2), 5'-фосфорилировали с помощью  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  и Т4-полинуклеотидкиназы [13] и их строение подтверждали частичным гидролизом фосфодиэстеразой змеиного яда с последующим фингерпринтированием [14] (рис. 3).

С х е м а 2

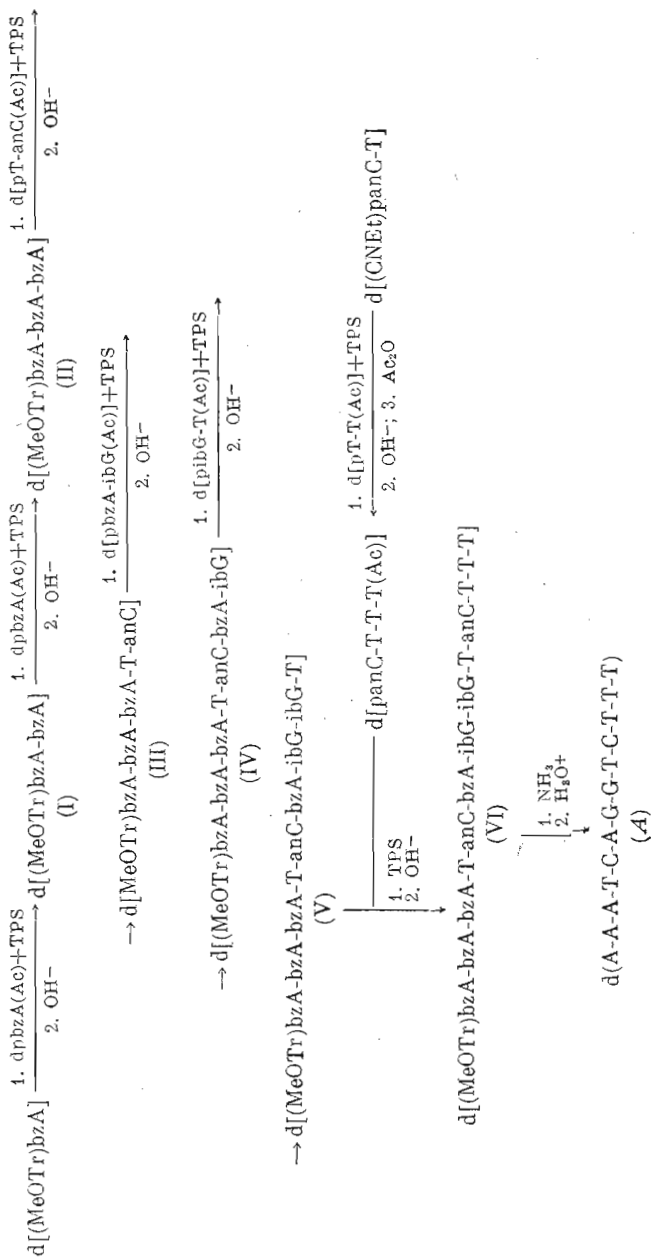


Схема 3

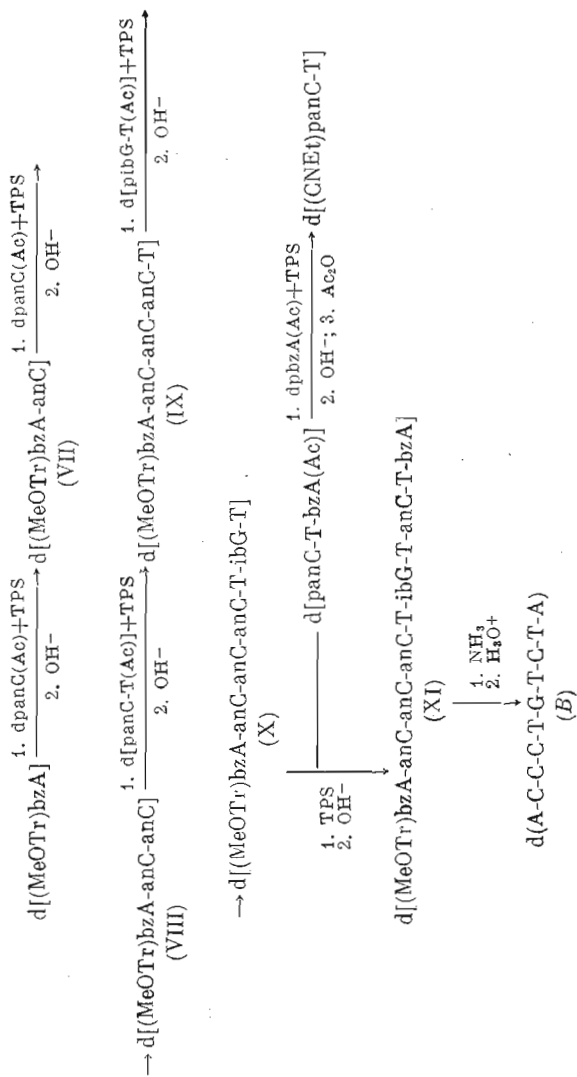


Таблица 1

Олигонуклеотид	ОН-Компонент (ммоль)	Р-компонент (ммоль)	TPS, ммоль	Выход продукта, %	F <sub>дрт</sub> в системе А	УФ-характеристики			
						λ <sub>макс</sub> , нм	λ <sub>мин</sub> , нм	E <sub>260</sub> /E <sub>260</sub>	E <sub>260</sub> /E <sub>260</sub>
d[(MeOTr)bzA-bzA] (I)	d[(MeOTr)bzA] (1,0)	d[pbzA(Ac)] (1,9)	3,8	70	2,15	250	0,99	1,44	
d[(MeOTr)bzA-bzA-bzA] (II)	(I) (0,7)	d[pbzA(Ac)] (1,8)	7,5	43,0	4,95	250	0,96	1,43	
d[(MeOTr)bzA-bzA-bzA-T-anC] (III)	(II) (0,3)	d[pT-anC(Ac)] (1,2)	4,2	27,6	1,68	280	0,90	1,41	
d[(MeOTr)bzA-bzA-bzA-T-anC-bzA-ibG] (IV)	(III) (0,083)	d[pbzA-ibG(Ac)] (0,6)	2,2	54,2	4,10	284, 265н	0,90	1,26	
d[(MeOTr)bzA-bzA-bzA-T-anC-bzA-ibG-ibG-T] (V)	(IV) (0,045)	d[pibG-T(Ac)] (0,4)	1,5	19,0	0,57	282	0,87	1,18	
d[(MeOTr)bzA-bzA-bzA-T-anC-bzA-ibG-ibG-T-anC-T-T] (VI)	(V) (0,005)	d[panC-T-T-T(Ac)] (0,065)	0,4	18,0		280	0,84	1,14	
d[(MeOTr)bzA-bzA-bzA-T-anC-bzA-ibG-ibG-T-anC-T-T-T] (VII)	d[(MeOTr)bzA] (3,4)	d[panC(Ac)] (7,85)	15,7	51,5	4,90	284	0,96	1,43	
d[(MeOTr)bzA-anC] (VIII)	(VII) (0,4)	d[panC(Ac)] (1,65)	4,0	75,0	4,75	290	0,96	1,33	
d[(MeOTr)bzA-anC-anC-anC-T] (IX)	(VIII) (0,246)	d[panC-T(Ac)] (0,60)	2,3	57,0	1,0	289	0,94	1,31	
d[(MeOTr)bzA-anC-anC-anC-T-ibG-T] (X)	(IX) (0,07)	d[pibG-T(Ac)] (0,39)	1,5	71,0	0,85	282	0,88	1,27	
d[(MeOTr)bzA-anC-anC-anC-T-ibG-T-anC-T-bzA] (XI)	(X) (0,01)	d[panC-T-bzA(Ac)] (0,05)	0,3	16,0		284	0,89	1,12	
d(panC-T-bzA)	d[(CNET)panC-T] (0,2)	d[pbzA(Ac)] (0,75)	2,0	24,0	0,80	280	0,86	1,35	
d(panC-T-T-T)	d[(CNET)panC-T] (0,25)	d[pT-T(Ac)] (0,60)	2,5	53,0	0,52	273, 304н	0,71	1,09	

## Экспериментальная часть

В работе использованы мононуклеотиды производства СКТВ БАВ Главмикробиопрома (Новосибирск), а также фирмы Calbiochem (США), тризопропилбензолсульфохлорид (Merck, ФРГ), ацетилцеллюлоза (Schleicher und Schüll, ФРГ), целлюлоза MN-300 и DEAE-целлюлоза MN-300 (Serva, ФРГ), DEAE-целлюлоза DE-23 (для колоночной хроматографии), DE-81 (бумага) и бумага № 1 (Whatman, Англия), сефадексы А-25 и G-50 (Pharmacia, Швеция), [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТР (10 Ки/ммоль, Amersham, Англия), щелочная фосфатаза *E. coli* (КФ 3.1.3.1), фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1) (Worthington, США). Т4-полинуклеотидкиназа была выделена по методу [15]. Гомосмеси и пластинки с DEAE-целлюлозой готовили как описано в работе [16].

Хроматографию на бумаге проводили в системах этанол — 1 М ацетат аммония, 7 : 3 (рН 7,5) (А) и *n*-пропанол — 25% аммиак — вода, 55 : 10 : 35 (Б); ТСХ — на пластинках Silufol UV254 (ЧССР) в водном ацетонитриле. N-Защитные группы удаляли обработкой 25% водным NH<sub>3</sub> (2 мл на 20 ОЕ олигонуклеотида, 5 сут при 20° С) с последующим упариванием и хроматографией в системе Б. Для удаления монометокситрильной группы олигонуклеотида, лишённые N-защитных групп, обрабатывали 80% уксусной кислотой (2 мл на 20 ОЕ олигонуклеотида, 1 ч при 20° С), раствор упаривали и хроматографировали в системе Б. Нуклеотидный состав полученных соединений определяли исчерпывающим гидролизом фосфодиэстеразой змеиного яда по методу [17].

d[(MeOTr)bzA], а также соответствующим образом защищенные мононуклеотиды и динуклеотиды, содержащие 5'-фосфатную группу, получали как описано Кораной и сотр. [18, 19].

1. Конденсации при образовании межнуклеотидных связей проводили согласно следующей общей

Таблица 2

Олигонуклеотид	R дрт в системе Б	УФ-характеристики					Нуклеотидный состав				
		$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\lambda_{\text{мин}}$ , нм	$\frac{E_{260}}{E_{280}}$	$\frac{E_{270}}{E_{260}}$	$\frac{E_{290}}{E_{280}}$	dA	dрA	dрГ	dрG	dрC
d(A-A)	1,34	260	233	0,80	0,84	0,22	1,0	1,0			1,0
d(A-A-A)	0,95	260	232	0,73	0,80	0,10	1,0	2,0			1,03
d(A-A-T-C)	0,60	263	232	0,80	0,81	0,40	0,89	1,95	1,0	0,98	1,03
d(A-A-T-C-A-G)	0,35	257	230	0,84	0,80	0,39	1,0	2,84	1,0	2,0	2,0
d(A-A-T-C-A-G-C-T)	0,17	259	231	0,86	0,83	0,42	1,0	4,0*	1,9	5,0*	2,0*
d(A-A-T-C-A-G-C-T-T-T) (A)		262	232	0,82	0,87	0,51		0,95	1,0	1,0	1,0
d(pC-T-A)	0,55	262	234	0,75	0,95	0,53		0,24	2,8		0,95
d(pC-T-T-T)	0,70	270	235	0,72	1,15	0,94		0,45			1,0
d(A-C)	1,25	263	228	0,77	0,86	0,48		0,15			2,8
d(A-C-C)	1,0	265	232	0,79	1,02	0,69		0,32	1,0	1,0	0,95
d(A-C-C-C-T)	0,60	265	230	0,80	1,0	0,67	0,89	2,1	1,0	2,1	2,8
d(A-C-C-C-T-G-T)	0,32	263	231	0,84	0,98	0,66	0,95	2,0	1,0	2,0	2,9
d(A-C-C-C-T-G-T-C-T-A) (B)		263	235	0,83	0,96	0,63		2,0*	3,0*	1,0*	4,0*

\* Определено на основании нуклеотидной карты.

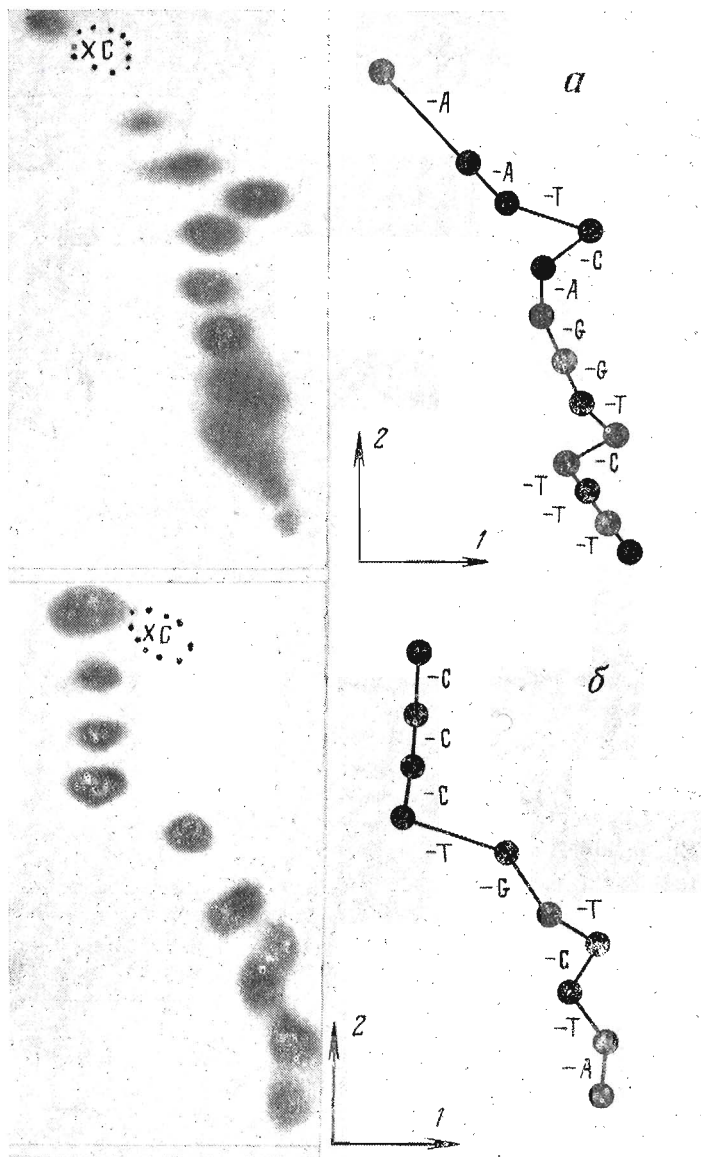


Рис. 3. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза меченых сегментов. Направление 1 — электрофорез на ацетилцеллюлозе при pH 3,5; направление 2 — гомохроматография на пластинках (20×20 см) DEAE-целлюлозы (гомосмесь 6 [16]), XC — пятно красителя ксиленцианола FF. *a* — нуклеотидная карта тридекануклеотида  $d^{(32}\text{P})\text{-A-A-T-C-A-G-G-T-C-T-T}$ , *b* — нуклеотидная карта декануклеотида  $d^{(32}\text{P})\text{-C-C-C-T-G-T-C-T-A}$

процедуре. Оба компонента реакции (Р-компонент обычно брали в избытке относительно ОН-компонента — см. табл. 1) растворяли в сухом пиридине (2 мл на ммоль нуклеотида), прибавляли конденсирующий реагент и выдерживали 4–5 ч при комнатной температуре. Реакцию останавливали прибавлением при  $-20^\circ\text{C}$  1 М раствора диизопропилэтиламина в пиридине (2 ммоль на ммоль сульфохлорида +1 ммоль на мг-экв фосфата) и равного объема воды. Раствор выдерживали при  $4^\circ\text{C}$  12–18 ч, после чего удаляли 3'-О-ацетильную группу (и 5'-цианэтильную группу в случае получения олигонуклеотидов с 5'-концевой фосфатной группой) обработкой 1 н. NaOH при  $0^\circ\text{C}$  15–20 мин. Щелочь нейтрализовали избытком дауэкса



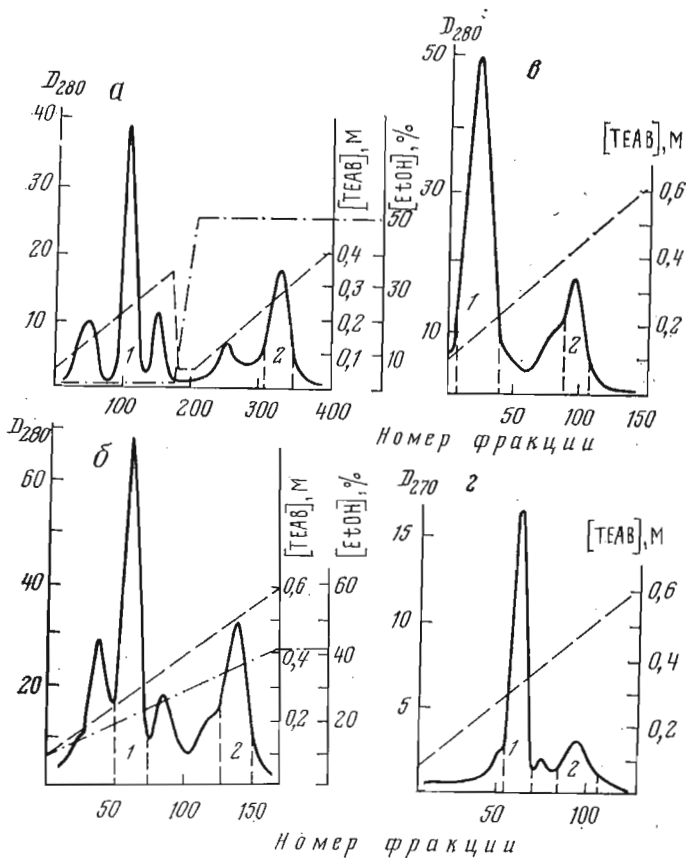


Рис. 4. Выделение защищенных олигонуклеотидов (III), (IV), (V), и (VI) хроматографией на DEAE-целлюлозе ( $\text{HCO}_3^-$ -форма). а - выделение (III), колонка  $3 \times 20$  см, градиент концентрации TEAB и спирта, фракции по 9 мл/4 мин, пик 1 - 17 000  $\text{OE}_{280}$  динуклеотида  $d(\text{pT-anC})$ , пик 2 - 9000  $\text{OE}_{280}$  пентануклеотида (III); б - выделение (IV), колонка  $2,5 \times 20$  см, градиент концентрации TEAB и спирта, фракции по 7 мл/3 мин, пик 1 - 10 000  $\text{OE}_{280}$  динуклеотида  $d(\text{pbzA-ibG})$ , пик 2 - 6800  $\text{OE}_{280}$  гептануклеотида (IV); в - выделение (V), колонка  $2 \times 20$  см, градиент концентрации TEAB в 40% спирте, фракции по 7,5 мл/3 мин, пик 1 - 6800  $\text{OE}_{280}$  динуклеотида  $d(\text{pibG-T})$ , пик 2 - 2400  $\text{OE}_{280}$  нонануклеотида (V); г - выделение (VI), колонка  $2 \times 16$  см, градиент концентрации TEAB в 30% спирте, фракции по 9 мл/5 мин, пик 1 - 1650  $\text{OE}_{270}$  тетра-нуклеотида  $d(\text{panC-T-T-T})$ , пик 2 (700  $\text{OE}_{270}$ ) содержит тридекануклеотид (VI)

50 ( $\text{PuN}^+$ ), смолу отфильтровывали. Дальнейшую обработку в зависимости от характера продуктов реакции проводили одним из следующих способов.

а) При выделении ди- и тринуклеотидов, содержащих 5'-монометокси-тритильную группировку, объединенные фильтраты упаривали досуха, остаток растворяли в 0,1 М TEAB (100 мл на 1 ммоль олигонуклеотида) и последовательно экстрагировали эфиром ( $3 \times 100$  мл), этилацетатом ( $2 \times 100$  мл), смесью этилацетат - *n*-бутанол, 9:1 (100 мл) и 8:2 ( $2 \times 100$  мл) и смесью хлористый метилен - *n*-бутанол, 7:3 ( $2 \times 100$  мл), контролируя ход извлечения с помощью ТСХ на силуфоле в водном ацетонитриле. Экстракты, содержащие продукт реакции, упаривали с пиридином и остаток осаждали из пиридина эфиром.

б) При выделении олигонуклеотидов, содержащих 5'-концевую фосфатную группу, объединенные фильтраты помещали на колонку с DEAE-целлюлозой или DEAE-сефадексом, предварительно уравновешенными при  $4^\circ\text{C}$  0,05 М TEAB в 10% спирте, колонку промывали стартовым бу-

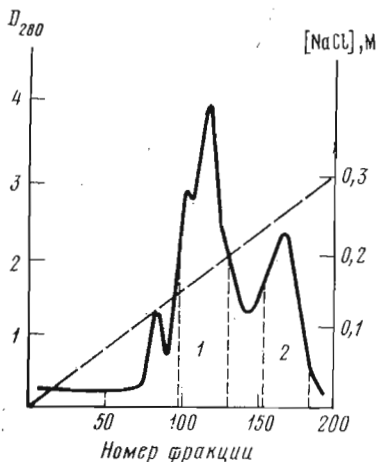


Рис. 5. Рехроматография тридекануклеотида (VI) на колонке с DEAE-целлюлозой (1×30 см, Cl<sup>-</sup>) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины и 0,01 М трис-НСl, рН 7,5, фракции по 4 мл/5 мин, пик 1 (380 ОЕ<sub>280</sub>) содержит смесь новануклеотида (V) и пирофосфата тетра-нуклеотида d(panC-T-T-T), пик 2 — 210 ОЕ<sub>280</sub> тридекануклеотида (VI)

фером для удаления пиридина и хроматографировали в градиенте концентрации TEAB в 10% спирте. Фракции, содержащие продукт реакции или возврат исходного материала, объединяли, концентрировали в вакууме в присутствии пиридина, остаток растворяли в небольшом объеме сухого пиридина (5 мл на 1 ммоль олигонуклеотида) и осаждали избытком эфира.

в) При выделении олигонуклеотидов длиной более четырех звеньев, содержащих на 5'-конце монометокситригильную группу, также применяли колоночную хроматографию на DEAE-целлюлозе, как это показано на рис. 4—6.

2. *Выделение незащищенных сегментов (A) и (B)* проводили следующим образом. а) d(A-A-A-T-C-A-G-G-T-C-T-T-T) (A). 40 ОЕ<sub>280</sub> защищенного тридекануклеотида (VI) обработали 4 мл 25% водного NH<sub>3</sub> (5 сут при комнатной температуре), раствор упарили досуха, прилили 3 мл 80% уксусной кислоты, выдержали 1 ч при 20°C и снова упарили. Остаток растворили в 30 мл 7 М мочевины и хроматографировали, как показано на рис. 5а.

б) d(A-C-C-C-T-G-T-C-T-A) (B) получен из 30 ОЕ<sub>280</sub> защищенного декануклеотида (VI) аналогично опыту 2а. Условия хроматографии и рехроматографии приведены на рис. 5б и в.

3. *Анализ сегментов (A) и (B). а) 5'-Фосфорилирование.* 0,05 ОЕ<sub>280</sub> (0,45—0,50 нмоль) олигонуклеотида инкубировали 30 мин при 37°C в 50 мкл раствора, содержащего 1 нмоль [γ-<sup>32</sup>P] АТФ, 0,05 М трис-НСl (рН 7,5), 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ дитиотреит, 2 мМ спермин и 2 ед. акт. Т4-поли-нуклеотидкиназы [15]. Реакционную смесь хроматографировали на колонке с сефадексом G-50 в 0,05 М TEAB, фракцию меченого олигонуклеотида (первый пик, 14—20·10<sup>6</sup> имп/мин) упарили досуха и остаток растворили в 50 мкл воды.

б) *Частичный гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда.* Три порции <sup>32</sup>P-меченого олигонуклеотида (по ~100 000 имп/мин) упарили досуха, к остаткам прибавили по 1 мкл буфера, содержащего 0,05 М трис-НСl (рН 8,9), 0,01 М MgCl<sub>2</sub> и 1 мкл раствора фосфодиэстеразы змеиного яда в том же буфере (соответственно 50, 100 и 200 мкг/мл), и инкубировали 15 мин при 20°C. Все три гидролизата смешали и нанесли на полоску ацетилцеллюлозы (3×55 см), смоченную 7 М мочевиной при рН 3,5 (создается за счет уксусной кислоты); электрофорез проводили при 5000 В в течение 1 ч, используя в качестве электродного пиридин-ацетатный буфер (рН 3,5), а в качестве стандарта — смесь 1% растворов красителей (ксиленцианола FF, оранжевого G и кислого фуксина). Продукты гидролиза переносили на пластинку (20×20 см, толщина слоя 0,20 мм) со смесью целлюлозы MN-300 и DEAE-целлюлозы MN-300 (7,5:1) и хроматографировали в 2%

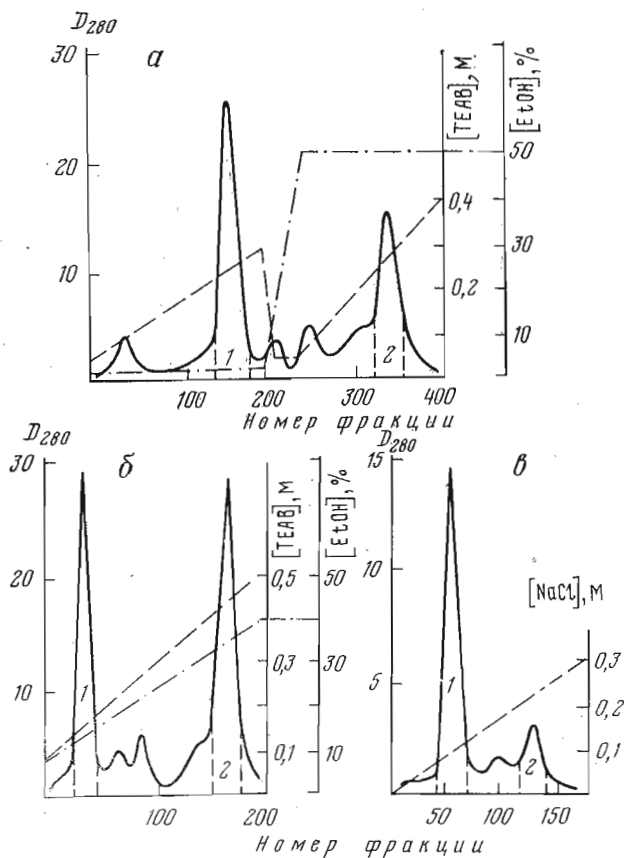


Рис. 6. Выделение защищенных олигонуклеотидов (IX), (X) и (XI) хроматографией на DEAE-целлюлозе. а - выделение (IX), колонка 3×25 см ( $\text{HCO}_3^-$ ), градиент концентрации TEAB и спирта, фракции по 15 мл/3 мин, пик 1-8300  $\text{OE}_{280}$  динуклеотида d(papC-T), пик 2-7500  $\text{OE}_{280}$  пентануклеотида (IX); б - выделение (X), колонка 2×25 см ( $\text{HCO}_3^-$ ), градиент концентрации TEAB и спирта, фракции по 10 мл/3 мин, пик 1-4700  $\text{OE}_{280}$  динуклеотида d(ribG-T), пик 2-5000  $\text{OE}_{280}$  гептануклеотида (X); в - выделение (XI), колонка 2×20 см ( $\text{Cl}^-$ ), градиент концентрации NaCl в 7 М мочевины и 0,01 М трис-HCl (pH 7,5), фракции по 7,5 мл/5 мин, пик 1-900  $\text{OE}_{280}$  три-нуклеотида d(papC-T-bzA), пик 2-300  $\text{OE}_{280}$  декануклеотида (XI)

гомосмеси [16] при 60° С. Радиоавтограммы нуклеотидных карт сегментов (А) и (В) (пленка  $^3\text{P}$ -1, экспозиция 5 ч) приведены на рис. 6. Отнесение сдвигов мононуклеотидов было сделано на основании работ [16, 20].

Авторы глубоко признательны акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание и помощь при выполнении этой работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. (1979) Биоорган. химия, 5, 138-144.
2. Gilbert W. (1976) in: RNA polymerase (Losick R., Chamberlin M., eds), pp. 193-205, Cold Spring Harbor Lab.
3. Ovchinnikov Yu. A., Lipkin V. M., Modyanov N. N., Chertov O. Yu., Smirnov Yu. V., Khokhryakov V. S., Shuvaeva T. M. (1977) FEBS Letters, 76, 108-111.
4. Johnsrud L. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 5314-5318.
5. Okamoto T., Sugimoto K., Sugisaki H., Takanami M. (1977) Nucl. Acids Res., 4, 2213-2222.
6. Brown E. L., Belagaja R., Fritz H.-J., Fritz R. H., Norris K. (1977) Fed. Proc., 36, 732.
7. Frischauf A. M., Scheit K. H. (1973) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 53, 1227-1233.

8. Свердлов Е. Д., Царев С. А., Модянов Н. Н., Липкин В. М., Грачев М. А., Зайчков Е. Ф., Плетнев А. Г. (1978) *Биоорганическая химия*, 4, 1278—1281.
9. Sugimoto K., Sugisaki H., Okamoto T., Takanami M. (1975) *Nucl. Acids Res.*, 2, 2091—2100.
10. Schaller H., Gray C., Herrmann K. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 737—741.
11. Khorana H. G., Agarwal K. L., Besmer P., Buchi H., Caruthers M. H., Cashion P. J., Fridkin M., Lay E., Kleppe K., Kleppe R., Kumar A., Loewen P., Miller R. C., Minamoto K., Panet A., RajBhandary U. L., Ramamoorthy B., Sekiya T., Takeya T., van de Sande J. H. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 565—570.
12. Minamoto K., Caruthers M. H., Ramamoorthy B., van de Sande J. H., Sidorova N., Khorana H. G. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 587—598.
13. Richardson C. (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 54, 158—165.
14. Sanger F. (1973) in: *Virus Research* (Fox C. F., Robinson W. S. eds), pp. 573—599, Academic Press, New York — London.
15. Panet A., van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Raac A. J., Lillehaug J. R., Kleppe K. (1973) *Biochem.*, 12, 5045—5050.
16. Jay E., Vambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) *Nucleic Acids Res.*, 1, 331—353.
17. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) *Биохимия*, 39, 747—751.
18. Weber H., Khorana H. G. (1972) *J. Mol. Biol.*, 72, 219—249.
19. Caruthers M. H., van de Sande J. H., Khorana H. G. (1972) *J. Mol. Biol.*, 72, 375—405.
20. Tu C.-P. D., Jay E., Bahl C. P., Wu R. (1976) *Anal. Biochem.*, 74, 73—93.

Поступила в редакцию  
26.III.1979

**THE SYNTHESIS OF A PROMOTER REGION OF BACTERIOPHAGE *fd* DNA.  
I. THE CHEMICAL SYNTHESIS OF THE OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES  
CORRESPONDING TO THE 5'-TERMINAL FRAGMENT OF THE MINUS  
STRAND OF THE PROMOTER**

EFIMOV V. A., CHAKHMAKHCHEVA O. G.

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

The chemical synthesis of the deoxyribonucleotides d(A-A-A-T-C-A-G-G-T-C-T-T-T) and d(A-C-C-C-T-G-T-C-T-A) corresponding to the (+15) - (-8) fragment of the minus strand of the G2 promoter region of phage *fd* DNA has been carried out by the phosphodiester approach according to the 1+1+1+2+2+2+4 and 1+1+1+2+2+3 schemes. The compounds obtained were 5'-phosphorylated by [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP and T4 polynucleotide kinase and their structure was confirmed by fingerprinting technique.