



УДК 547.963.32:577.155

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ АДАПТЕРЫ, ОТЩЕПЛЯЕМЫЕ
ЭНДОНУКЛЕАЗОЙ *HgaI*, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В СИНТЕЗЕ ДНК

*Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В.,
Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Колосов М. Н.*

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

Синтезированы олигонуклеотидные адаптеры двух типов (AI и AII) для клонирования фрагментов ДНК с последующей регенерацией из рекомбинантной молекулы. Каждый адаптер имеет выступающий конец для соединения с вектором, сайт узнавания эндонуклеазы *HgaI* для отщепления клонируемого фрагмента и терминирующий триплет для прямого отбора рекомбинантных ДНК при клонировании. Предложен общий метод сборки двухцепочечных полинуклеотидов из синтетических олигонуклеотидов при помощи адаптеров типа AI. Метод позволяет провести всю сборку в три этапа независимо от того, содержит ли полинуклеотидная цепь десятки или сотни и даже тысячи пар оснований, и представляется особенно выгодным для синтеза длинных ДНК. С применением адаптеров AII-*HindIII* осуществлен хемикоферментативный синтез и клонирование с регенерацией искусственного структурного гена пептида свя.

При выделении и очистке ДНК путем молекулярного клонирования необходимо на заключительном этапе регенерировать исходный фрагмент ДНК из рекомбинантной молекулы. Такая регенерация легко выполняется, если концы клонируемого фрагмента структурно соответствуют рестриктивным сайтам клонирующего вектора, но представляет серьезную проблему, когда клонирование проводится при помощи линкеров или методом тейлинга. В этом общем случае после клонирования и отрезания вектора рестрикционной нуклеазой получается фрагмент ДНК, который отличается от исходного лишними нуклеотидами на обоих концах дуплекса. Для удаления этих избыточных нуклеотидов были предложены «возвращающие» адаптеры с сайтами эндонуклеаз *MboII* и *HphI* [1], однако их применение увеличивает в 2 раза число биохимических реакций при клонировании и не позволяет получать фрагменты с выступающими на концах олигонуклеотидными последовательностями, которые необходимы для направленного синтеза длинных двухцепочечных ДНК.

В связи с этим мы предприняли разработку нового метода, основанного на применении специальных адаптеров и использующего уникальное свойство эндонуклеазы *HgaI* расщеплять двухцепочечную ДНК на расстоянии 5 нуклеотидов с 3'-стороны от пентауклеотидной последовательности GACGC и 10 нуклеотидов с 5'-стороны от комплементарной ей последовательности GCGTC [2]. Общая конструкция этих линкеров и принцип их применения изображены на рис. 1. Каждый линкер (AI) является несимметричным 15/11-членным дуплексом, в центре которого расположен пентауклеотидный сайт узнавания *HgaI*, левая часть имеет 5'-выступающий конец и представляет собой половину гексануклеотидного рестриктивного сайта типа *EcoRI*, *HindIII* и т. п., а на правом, тупом конце находится терминирующий триплет.

Для клонирования с последующей регенерацией фрагмент ДНК, имеющий ровные концы (ДНК I), лигируют с адаптером (AI) и продукт лигирования (ДНК II) вставляют в подходящий вектор по рестриктивному сайту, которому соответствует выступающий конец адаптера. Выделенную после клонирования рекомбинантную ДНК гидролизуют нуклеазой *HgaI*, в результате чего образуется новый фрагмент (ДНК III), отличающийся от исходного только отсутствием 5 нуклеотидов на 3'-конце каждой из цепей: если для дальнейшей работы требуется ДНК с ровными концами, то эти

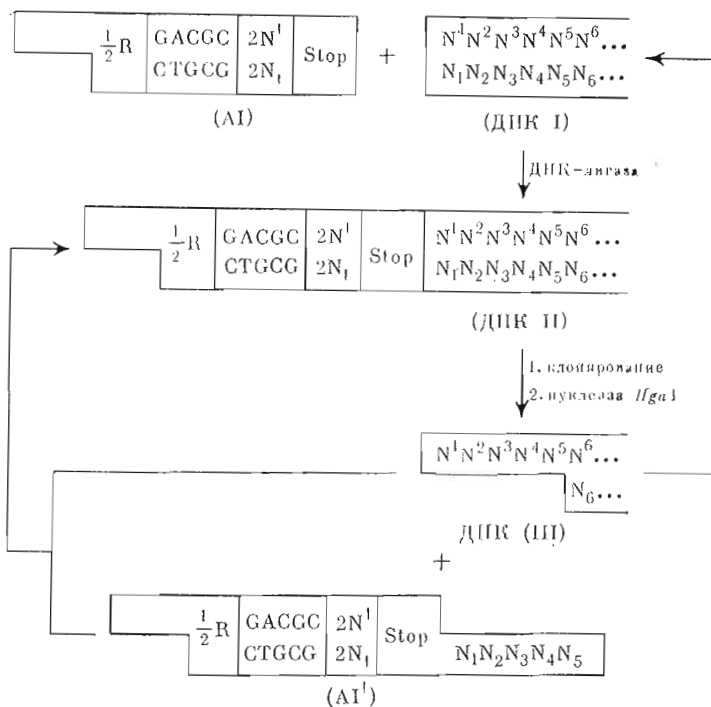
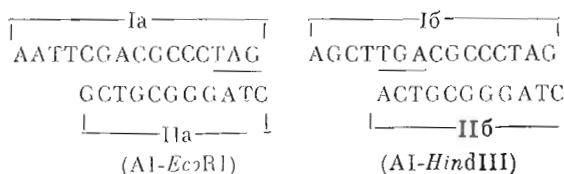


Рис. 1. Общая конструкция адаптерных линкеров с сайтом узнавания *HgaI* и принципиальная схема их применения для клонирования ДНК с регенерацией из рекомбинантной молекулы. R — гексануклеотидный рестриктный сайт типа *EcoRI*, *BamHI*, *SalI*, *HindIII* и т. п. Stop — терминирующий триплет. Верхними и нижними индексами обозначены соответственно комплементарные нуклеотиды верхней (5'—3') и нижней цепи ДНК

нуклеотиды можно легко ввести действием ДНК-полимеразы в присутствии соответствующих трифосфатов.



Мы синтезировали два адаптера типа AI с выступающими концами *EcoRI* и *HindIII*. С помощью этих адаптеров можно проводить клонирование в pBR322 и других плаزمидях того же типа, однако более удобно использовать в качестве векторов фаги M13mp2 — M13mp7 [3] или соответствующие плазмиды серии pUR [4], кодирующие биосинтез α -пептида β -галактозидазы. При вставке любой ДНК с адаптером AI-*EcoRI* в плазмиду pUR2 или в фаг M13mp2 терминирующий триплет адаптера (подчеркнутый в формуле) прерывает трансляцию мРНК, транскрибированной с *lac*-промотора, что позволяет производить прямой отбор рекомбинантов по изменению фенотипа бактерии-хозяина, если в качестве реципиента использовался штамм *E. coli* с делецией в начале гена *lacZ*. Аналогичное нарушение α -комплементации происходит при клонировании с адаптером AI-*HindIII* в плазмиде pUR51 или в фаге M13mp51, но в этом случае трансляцию α -пептида обрывает не концевой триплет адаптера TAG (он не функционирует из-за сдвига рамки считывания), а другой терминирующий триплет, TGA, расположенный на стыке сайтов *HindIII* и *HgaI*.

Важнейшей областью применения сконструированных нами адаптерных линкеров является химико-ферментативный синтез ДНК, причем главное назначение этих адаптеров состоит в усовершенствовании процесса сборки длинных двухцепочечных ДНК. Традиционный метод сборки

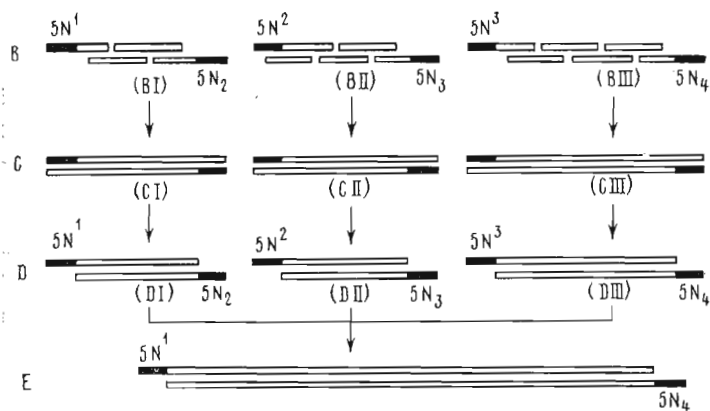


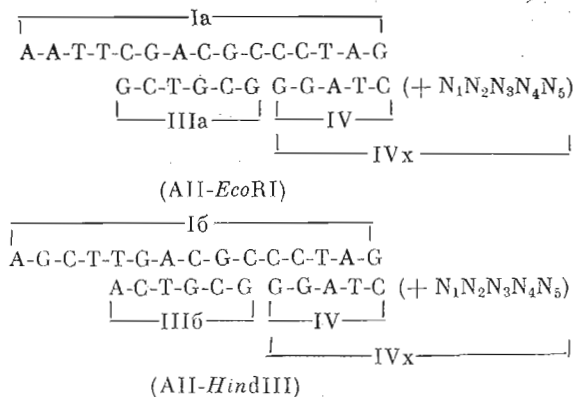
Рис. 2. Сборка двухцепочечной ДНК с применением адаптерных линкеров типа АІ. Зачернены 5'-концевые пентануклеотидные последовательности, которые попарно комплементарны: $5N^2$ с $5N_2$, $5N^3$ с $5N_3$ и т. д.

таких ДНК, впервые использованный Кораной с сотрудниками в синтезе генов тРНК (см. обзор [5]), заключается в многоэтапном последовательном лигировании: сначала одноцепочечных комплементарно-перекрывающихся олигонуклеотидов, затем все более длинных дуплексов. В принципе этот метод пригоден для построения двухцепочечных полинуклеотидов любой желаемой длины, однако практически по мере увеличения числа последовательных сшивок делается все труднее очищать продукты реакции и получать их в количестве, достаточном для дальнейшей работы. Клонирование с помощью адаптеров типа АІ полностью решает проблему очистки и наработки продуктов сшивки и позволяет свести к минимуму число последовательных стадий лигирования при синтезе ДНК длиной в сотни и даже тысячи пар оснований.

Сборка двухцепочечных ДНК с применением адаптеров АІ начинается, как обычно, со сшивки одноцепочечных олигонуклеотидов и осуществляется в три этапа (рис. 2). Первый этап состоит из двух стадий — лигирования в комплементарном комплексе (В) и достройки 3'-концов ДНК-полимеразой — и приводит к дуплексам с равными концами (С), причем каждый следующий дуплекс (например, СІІ или СІІІ) начинается с тех же 5 пар нуклеотидов, которыми оканчивается предыдущий (соответственно СІ или СІІ). Для получения этих дуплексов исходные комплексы состоят из четырех (ВІ), пяти (ВІІ) или большего числа компонентов (ВІІІ) таким образом, чтобы 5'-концевые пентануклеотидные последовательности верхней и нижней цепей двух соседних комплексов были взаимно комплементарны. Второй этап сборки включает три стадии — лигирование тупоконечных фрагментов ДНК (С) с адаптерным линкером АІ, клонирование (приводящее к полной очистке продукта сшивки) и вырезание из рекомбинантной ДНК *HgaI*-фрагментов (D). Эти стадии уже рассматривались выше (рис. 1); здесь следует лишь отметить, что каждая 5'-концевая пентануклеотидная последовательность, образующаяся при действии эндонуклеазы *HgaI*, является практически уникальной, так как встречается в среднем один раз в 500 *HgaI*-фрагментах. Очевидно, что эта уникальность должна обеспечивать высокую специфичность реакции лигирования на третьем, заключительном этапе сборки ДНК (E), позволяя сплести в один прием сразу большое число дуплексов (B). Действительно, на примере RFI-формы ДНК бактериофага f1, содержащей более 6000 пар оснований, было установлено [6], что при ее полном гидролизе эндонуклеазой *HgaI* с последующим лигированием восстанавливается инфекционность фаговой ДНК, а при совместном лигировании смеси *HgaI*-рестриктов двух мутантных фагов f1, несущих мутации в разных *HgaI*-фрагментах, происходит генетическая рекомбинация с частотой, близкой к теоретической. Эти результаты наглядно демонстрируют высокую направленность лигиро-

вания *HgaI*-фрагментов и показывают, что она может быть использована для эффективной сборки ДНК длиной в несколько тысяч нуклеотидов.

Адаптеры типа (AI) универсальны в том смысле, что они пригодны для клонирования любых фрагментов ДНК, поскольку неровные концы дуплекса всегда можно достроить ДНК-полимеразой или обрезать однонитчатой экзонуклеазой. При химическом синтезе ДНК, однако, такая универсальность не является необходимой и в ряде случаев выгоднее использовать адаптеры, специально приспособленные для каждого отдельного фрагмента (сделанные «по индивидуальному заказу»), что позволяет избежать выравнивания концов дуплекса и лигирования встык тупыми концами, которое требует относительно высоких концентраций ДНК и фермента. Как видно на рис. 4, подготовленный для клонирования фрагмент (ДНК II) можно удобно получить из (ДНК III) и линкера (AI'), которые имеют взаимно комплементарные 5'-выступающие пентануклеотидные последовательности. Наличие требуемого выступающего конца у синтетической ДНК нетрудно предусмотреть в плане ее синтеза, а адаптер целесообразно делать составным (адаптер типа AII), разделив его нижнюю, 16-членную цепь на постоянную и переменную части.



Нами были синтезированы два адаптера этого типа, AII-*EcoRI* и AII-*HindIII*; оба состоят из трех компонентов (I)·(III)·(IV) и содержат общий пентануклеотидный блок СТАГГ. При получении адаптеров с разной последовательностью переменной части нижней цепи этот блок (в защищенном виде) наращивают с 5'-конца теми же олигонуклеотидами, которые используют для синтеза соседнего фрагмента ДНК. В настоящей работе из пентануклеотида (IV) конденсацией с защищенными «двойками» и «тройками» были получены декануклеотиды ААТТССТАГГ (IVа) и ГАТСССТАГГ (IVб), которые в комплементарном комплексе с пентадекануклеотидом (Iб) и гексануклеотидом (IIIб) были использованы в качестве адаптерных линкеров типа AII-*HindIII* для синтеза и клонирования с регенерацией искусственного структурного гена пептида сна (*dsp*).

На первом этапе этого синтеза (см. рис. 3) было проведено два 7-компонентных лигирования синтетических олигонуклеотидов в комплементарных комплексах: (Iб+V+VII)·(IIIб+IVа+VI+VIII) и (IX+XI+IVб+IIIб)·(X+XII+Iб). Образовавшиеся 36/37-членные дуплексы (XIII)·(XIV) и (XV)·(XVI) были очищены хроматографией на сефадексе G-75, и их структура была доказана определением нуклеотидной последовательности обеих цепей. Затем эти дуплексы были сшиты между собой и электрофорезом в полиакриламидном геле (ПАГ) был выделен 73-членный двухцепочечный полинуклеотид ([*HindIII*-AIIa]*dsp*[AIIб-*HindIII*]), который представляет собой полный ген *dsp*, снабженный на обоих концах однотипными, но неидентичными адаптерными *HindIII*-линкерами. После клонирования эти линкеры вместе с векторной ДНК были отщеплены эндонуклеазой *HgaI*, в результате чего был получен ген *dsp*, не содержащий лишних нуклеотидов на концах дуплекса. Его структура была доказана определением нуклеотидной последовательности обеих цепей модифицированным методом Максама-Гилберта.

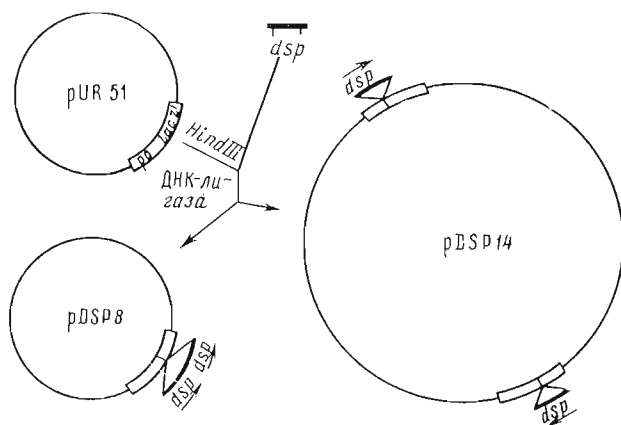


Рис. 4. Схема клонирования синтетического гена пептида сна (*dsp*), снабженного адаптерными линкерами AII-*Hind*III

Клонирование гена *dsp* (рис. 4) мы проводили в клетках *E. coli* (штамм ВМН 71-18), имеющих делецию M15 в гене *lacZ*, а в качестве вектора использовали плазмиду pUR51, которая кодирует N-концевой фрагмент β-галактозидазы и, таким образом, дает α-комплементацию с этим штаммом. При вставке сконструированных нами адаптеров (AI) и (AII) в рестриктный сайт *Eco*RI или *Hind*III этой плазмиды происходит, как указывалось выше, преждевременная терминация синтеза α-пептида. Благодаря этому трансформанты, несущие рекомбинантные плазмиды с геном *dsp*, были легко отобраны на индикаторной среде с X-gal (неокрашенные колонии). Плазмиды из двух клонов, обозначенные pDSP8 и pDSP14, были подвергнуты рестриктному анализу, и у них была определена нуклеотидная последовательность в области синтетической вставки. Установленные структуры (рис. 5) полностью соответствовали ожидаемым, за исключением того, что в обеих плаزمидах на расстоянии 8 пар оснований перед последним сайтом *Eco*RI были обнаружены додекануклеотид GTCACCTGAATGC, о присутствии которого ранее не было известно*.

Таким образом, используя синтезированные нами адаптеры, можно легко проводить клонирование синтетической ДНК с прямым отбором рекомбинантов по изменению фенотипа бактерии-хозяина, а затем при помощи эндонуклеазы *Hga*I регенерировать отклоненную ДНК из рекомбинантной молекулы.

Экспериментальная часть

Общие сведения об эксперименте см. [9, 10]. В работе использовали динуклеотидные блоки, синтезированные ранее [11], дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты фирмы «P-L Biochemicals», [α - 32 P]dGTP (2000–3000 Ки/ммоль) и [γ - 32 P]rATP (2000–3000 Ки/ммоль) фирмы «Amersham», щелочную фосфатазу и рестриктные эндонуклеазы *Eco*RI и *Bam*HI производства СКТБ БАН Главмикробиопроба (Новосибирск). Эндонуклеаза *Hga*I предоставлена проф. Б. Обергом (Стокгольм). Остальные ферменты выделяли как описано в литературе или с небольшими изменениями: эндонуклеазу *Hind*III – модифицированным методом [12], эндонуклеазу *Msp*I – по методу [13], ДНК-лигазу и полинуклеотидкиназу фага T4 – способом [14], ДНК-полимеразу Кленова получали из ДНК-полимеразы I *E. coli* по методу [15].

* Нуклеотидные последовательности плазмид pUR2 и pUR51 не опубликованы, но первую из них можно однозначно вывести из литературных данных о способе конструирования этого вектора [4] и о нуклеотидной последовательности его компонентов – плазмиды pBR322 [7] и *lac*-фрагмента, содержащегося также в фаге M13mp7 [8]. Очевидно, что плаزمида pUR51 должна отличаться от pUR2 так же, как фаг M13mp51 от M13mp2 [4], т.е. наличием дополнительной *Hind*III-содержащей вставки по сайту *Eco*RI. Структура этой вставки в M13mp51, полученная нами от д-ра Б. Гроненборна (Кёльн), не содержит вышеупомянутого додекануклеотида.

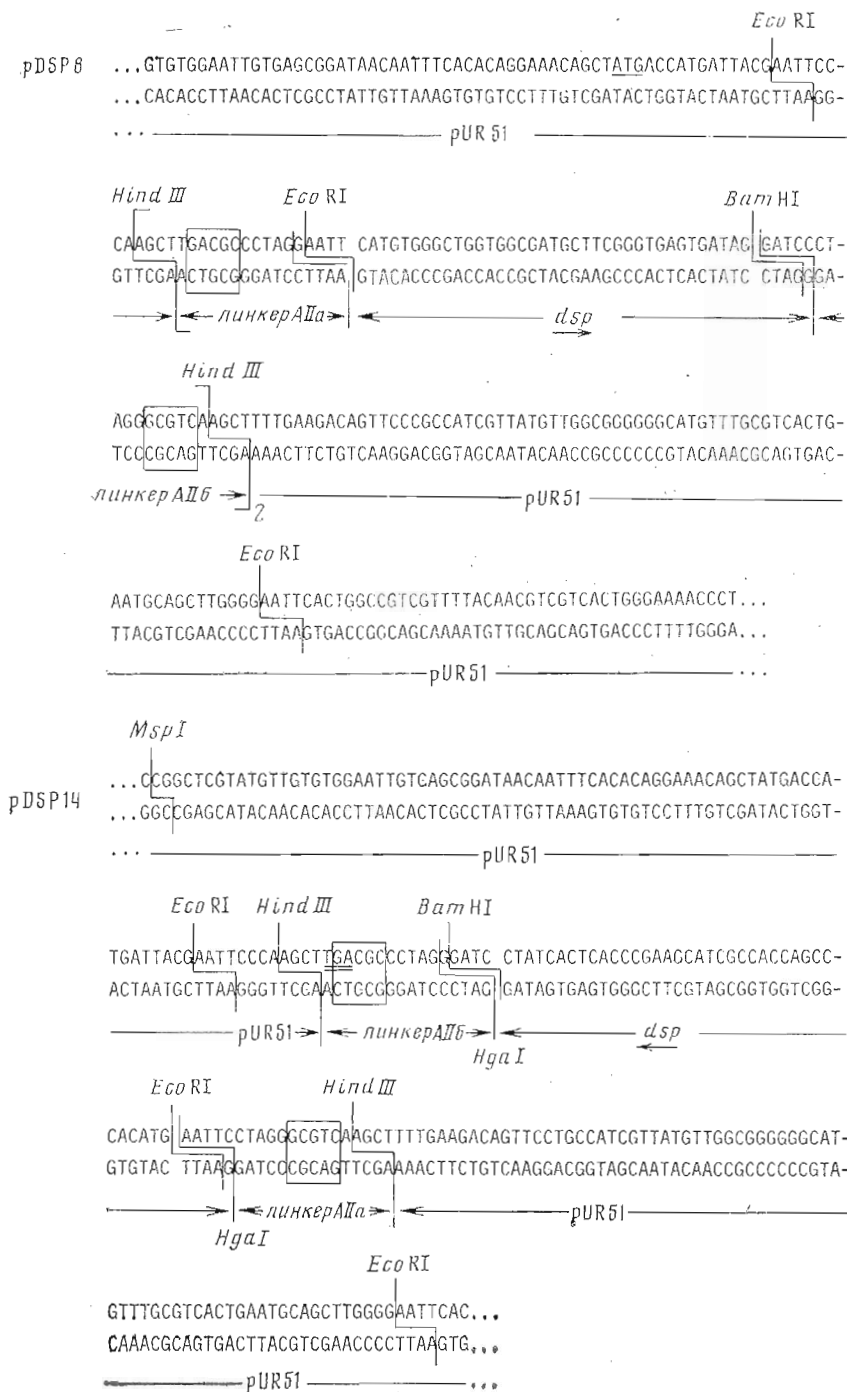


Рис. 5. Нуклеотидная последовательность рекомбинантных плазмид pDSP8 и pDSP14. В рамки заключены сайты узнавания эндонуклеазы *Hga*I, подчеркнут инициирующий триплет гена *lacZ*, дважды подчеркнут терминирующий триплет адаптера.

Сефарозу TR получали тритилированием сефарозы CL-4B (Pharmacia) как описано в статье [16]; использовали препарат, содержащий 0,14 ммоль/мл тритильных групп. Для получения плазмид pUR51, pDSP8 и pDSP14 бактериальные клетки выращивали на среде L в присутствии 50 мкг/мл ампициллина, проводили амплификацию в течение 18 ч в присутствии 225 мкг/мл хлорамфеникола, плазмидную ДНК выделяли по методу [17], инкубировали 30 мин при 37° С с 20 мкг/мл панкреатической

РНКазы (Boehringer, ФРГ) и очищали хроматографией на биогеле А 15m в буфере, содержащем 0,5 М NaCl, 10 мМ трис-HCl (рН 8,0) и 1 мМ EDTA. 5'-фосфорилирование олигонуклеотидов и их анализ методом нуклеотидных карт, а также определение нуклеотидной последовательности ДНК модифицированным методом Максама — Гилберта проводили как в работе [10].

Синтез олигонуклеотидов. Соединения (VI) — (XI) были синтезированы ранее [11], а (Ia), (Iб), (IIa), (IIб), (IIIa), (IIIб), (IVa), (IVб), (V) и (XII) получены в настоящей работе. Их синтез был выполнен фосфотриэфирным методом аналогично описанному [10], причем нуклеотидная цепь наращивалась (в направлении 5' ← 3') преимущественно динуклеотидными блоками. Конденсирующим реагентом служил 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилтетразолид, продукты межнуклеотидных конденсаций выделяли хроматографией на колонках с силикагелем (40—100 меш, Chemapol), элюируя растворами метанола в хлороформе под давлением 2—4 атм. Р-Цианэтильные защитные группы удаляли по методу [18] смесью триэтиламин — пиридин — вода (1 : 3 : 1) в течение 20 мин при 20° С. N, P-Защищенные олигонуклеотиды детритилировали 2—3 мин 2% раствором бензолсульфокислоты в смеси хлороформ — метанол (7:3) при 0° С, а N, P-незащищенные олигонуклеотиды — 80% уксусной кислотой (20° С, 20 мин). Отщепление N, O-ацильных и P-хлорфенильных защитных групп осуществляли действием конц. аммиака в течение 2 сут при 20° С или 8 ч при 50° С.

Выделение олигонуклеотидов. Полностью защищенные олигонуклеотиды подвергали аммонолизу для удаления N, O-ацильных и P-хлорфенильных групп, аммиачный раствор упаривали, остаток растворяли в 0,1 н. растворе бикарбоната триэтиламония (TEAB), рН 7,5, и экстрагировали этилацетатом. Водный раствор, содержащий 100—200 ОЕ₂₆₀ нуклеотидного материала в 0,1 н. TEAB, пропускали через колонку с сефарозой TR (25×30 мм), которую далее промывали тем же буфером до отсутствия в промывном растворе веществ, поглощающих при 260 нм. Затем 0,05 н. TEAB в 50% этаноле элюировали 5'-диметокситритилированные олигонуклеотиды; анализ этого элюата (например, путем детритилирования и затем ионообменной хроматографии в депатурирующих условиях) показывает, что он содержит только два олигонуклеотида: P-компонент и продукт последней межнуклеотидной конденсации. После отщепления 5'-DMTr-группы целевой незащищенный олигонуклеотид выделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl (от 0 до 0,4 М) в 7 М растворе мочевины при рН 7,5, а затем рН 3,5.

Лигазное сшивание олигонуклеотидов. а. Смесью олигонуклеотидов (IVa), (V), (VI), (VII) (по 3 пмоль каждого) и (Iб), (IIIб), (VIII) (по 3,5 пмоль) в 300 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (рН 7,5) и 10 мМ MgCl₂, нагревали 5 мин при 100° С, охладили за 3 ч до 12° С и оставили при этой температуре на 16 ч. Затем прибавили 6 мкл 5 мМ гАТР, 6 мкл 0,5 М дитиотреита, 300 ед. акт. T4-ДНК-лигазы и инкубировали 18 ч при 12° С. Реакцию останавливали прибавлением 15 мкл 0,5 М EDTA, раствор нагревали 3 мин при 100° С и продукты лигирования выделяли хроматографией на сефадексе G-75 (колонка 0,8×40 см). Получили 55 мкг (65%) дуплекса (XIII) · (XIV).

б. Реакционная смесь содержала по 3 пмоль олигонуклеотидов (IVб), (X), (XI), (XII) и по 3,5 пмоль олигонуклеотидов (Iб), (IIIб) и (IX). Отжиг и лигирование проводили как в предыдущем опыте. После хроматографии на сефадексе G-75 получили 50 мкг (60%) дуплекса (XV) · (XVI).

в. В условиях опыта а отжигали 10 мкг дуплекса (XIII) · (XIV) с 10 мкг дуплекса (XV) · (XVI), а затем инкубировали при 12° С с 500 ед. акт. T4 ДНК-лигазы в 300 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреит и 0,1 мМ гАТР (лигазный буфер). Реакцию останавливали прибавлением EDTA, продукты лигирования хроматографировали на сефадексе G-75, половину выделенного вещества 5'-фосфорилировали при помощи T4-полинуклеотидкиназы с [γ -³²P]гАТР и подвергали электрофорезу в 15% ПАГ. После электроэлюции из геля и

дополнительной очистки хроматографией на сефадексе G-50 (колонка 0,7×15 см) получено 3 мкг (30%) 5'-³²P-меченного полинуклеотида (*Hind*III-AIIa)*dsp* (AIIb-*Hind*III).

Конструирование рекомбинантных плазмид серии pDSP. 1,5 мкг ДНК pUR51 гидролизovali 1 ч при 37° С действием 2 ед. акт. эндонуклеазы *Hind*III в 50 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂ и 10 мМ меркаптоэтанол. Смесь нагревали 10 мин при 70° С, экстрагировали хлороформом (2×50 мкл) и ДНК осадили 70% этанолом. Осадок промыли 96% этанолом, растворили в 150 мкл лигазного буфера, содержащего 5 ед. акт. T4-ДНК-лигазы и 0,5 мкг синтетического полинуклеотида [5'-³²P] (*Hind*III-AIIa)*dsp* (AIIb-*Hind*III), и инкубировали 16 ч при 12° С. Одну пятую часть реакционной смеси использовали для трансформации клеток *E. coli* ВМН71-18, обработанных СаCl₂, как описано в работе [10]. Трансформанты отбирали на чашках с 1,7% L-агаром, содержащим 50 мкг/мл ампициллина и 40 мкг/мл X-gal. Было получено 18 неокрашенных и 173 голубых колоний. Из двух неокрашенных колоний, которые быстрее других размножались при пробном выращивании, были выделены плазмиды, обозначенные pDSP8 и pDSP14.

Структурный анализ плазмид pDSP8 и pDSP14. 20 мкг ДНК pDSP8 или pDSP14 гидролизovali 1 ч при 37° С действием 30 ед. акт. эндонуклеазы *Bam*HI в 200 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂ и 10 мМ меркаптоэтанол (буфер В). Белок удаляли экстракцией хлороформом (2×150 мкл), ДНК осаждали этанолом и осадок растворили в 150 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ меркаптоэтанол, 50 мкМ dATP, 50 мкМ dCTP, 50 мкМ dTTP и 25 мкКи [α-³²P]dGTP. Прибавили 5 ед. акт. ДНК-полимеразы Кленова и смесь инкубировали 40 мин при 10° С. Радиоактивную ДНК отделили от избытка трифосфатов хроматографией на сефадексе G-50 и гидролизovali 2 ч при 37° С действием 50 ед. акт. эндонуклеазы *Msp*I в 150 мкл буфера В. Гидролизат разделяли электрофорезом в 7,5% ПАГ, радиоактивные фрагменты локализовали автордиографией, извлекали из геля, как описано в статье [19], и их нуклеотидную последовательность определяли модифицированным методом Максама — Гилберта. Результаты анализа представлены на рис. 4 и 5.

Регенерация гена *dsp* из рекомбинантных плазмид pDSP8 и pDSP14. 50 мкг ДНК плазмиды pDSP8 или pDSP14 гидролизovali 4 ч при 37° С при помощи 25 ед. акт. эндонуклеазы *Hga*I в 250 мкл буфера В, содержащего 20 мМ трис-HCl. Смесь нагревали 10 мин при 70° С, прибавили 0,15 ед. акт. щелочной фосфатазы и инкубировали 1 ч при 65° С. Белки экстрагировали смесью фенол — хлороформ (1 : 3, 3×100 мкл) и ДНК осаждали 70% этанолом. Осадок дважды переосаждали из того же растворителя и дважды промывали 96% этанолом, затем растворили в 200 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 9,5), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреит, 1 мМ спермидин, 20 мкКи [γ-³²P]rATP, 20 ед. акт. T4-полинуклеотидкиназы, и инкубировали 1 ч при 37° С. Реакционную смесь хроматографировали на колонке с сефадексом G-50, ³²P-меченные фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 7,5% ПАГ и их положение на электрофореграмме определяли автордиографией. Вещество с подвижностью, приблизительно соответствующей 40-членному дуплексу, извлекали из геля и разделяли на комплементарные цепи путем электрофореза на ацетилцеллюлозе при pH 3,5 и затем гомохроматографии с гомосмесью II [20], как описано в работе [11]. Индивидуальные 5'-³²P-меченные цепи анализировали методом Максама — Гилберта.

Авторы выражают благодарность д-ру У. Рютеру (Кёльн) за плазмиду pUR51, проф. Б. Мюллеру-Хиллу (Кёльн) за *E. coli* ВМН71-18 и проф. Б. Обергу (Стокгольм) за рестрикционную эндонуклеазу *Hga*I.

ЛИТЕРАТУРА

1. Narang S. A., Brousseau R., Hsiung H. M., Sung W., Scarpulla R., Ghangas G., Lau L., Hess B., Wu R. Nucl. Acids Res. Symp. Ser., 1980. № 7. p. 377-385.
2. Brown N. L., Smith M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977. v. 74. № 8. p. 3213-3216.

3. Messing J., Crea R., Seeburg P. H. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 2, p. 309-321.
4. Rütther U. Mol. and Gen. Genet., 1980, v. 178, № 2, p. 475-477.
5. Khorana H. G. In: Frontiers in Bioorganic Chemistry and Molecular Biology / Eds Ovchinnikov Yu. A., Kolosov M. N. Amsterdam: Elsevier, 1979, p. 191-224.
6. Moses P. B., Horiuchi K. J. Mol. Biol., 1979, v. 135, № 2, p. 517-524.
7. Sutcliffe J. G. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1978, v. 43, p. 77-90.
8. Messing J. In: M13mp7 Cloning / «Dideoxy» Sequencing Manual, Gaithersburg: BRL Inc., 1980.
9. Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Северцова И. В., Чернов Б. К., Колосов М. Н. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 4, с. 523-534.
10. Коробко В. Г., Добрынин В. П., Болдырева Е. Ф., Северцова И. В., Чернов Б. К., Колосов М. Н., Городецкий С. И., Слюсаренко А. Г., Капелюнская Т. В., Лусенков А. Ф., Дубинин П. П. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1802-1815.
11. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В., Власов В. П., Быстров Н. С., Колосов М. Н. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1745-1749.
12. Smith H. O., Wilcox K. W. J. Mol. Biol., 1970, v. 51, № 2, p. 379-391.
13. Greene P. J., Heyneker H. L., Bolivar F., Rodrigues R. L., Betlach M. C., Covarrubias A. A., Backman K., Russel D. J., Tait R., Boyer H. W. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 7, p. 2373-2380.
14. Dolganov G. M., Chestukhin A. V., Shemyakin M. F. Eur. J. Biochem., 1981, v. 114, № 2, p. 247-254.
15. Klenow H., Henningsen L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 65, № 1, p. 168-175.
16. Cashion P., Sathe G., Javed A., Kuster J. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 5, p. 1167-1185.
17. Birnboim H. C., Doly J. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 6, p. 1513-1523.
18. Crea R., Kraszewski A., Hirose T., Itakura K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 12, p. 5765-5769.
19. Maxam A. M., Gilbert W. In: Methods in Enzymology, v. 65, Nucleic Acids, Part I / Eds Grossman L., Moldave K. New York: Acad. Press, 1980, p. 499-560.
20. Jay E., Bambara R. A., Padmanabhan R., Wu R. Nucl. Acids Res., 1974, v. 1, № 3, p. 331-353.

Поступила в редакцию
6.I.1982

OLIGONUCLEOTIDE ADAPTORS CLEAVABLE BY RESTRICTION NUCLEASE *HgaI* AND THEIR APPLICATION FOR DNA SYNTHESIS

KOROBKO V. G., DOBRYNIN V. N., SEVERTSOVA I. V.,
BOLDYREVA E. F., BYSTROV N. S., KOLOSOV M. N.

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

Two types of oligonucleotide adaptors (AI and AII) have been synthesized, which are useful for cloning and subsequent recovery of DNA fragments. The both type adaptors contain each a protruding end, the recognition sequence for restriction nuclease *HgaI*, and a termination triplet to allow for joining with the appropriate vector, for cutting off the cloned DNA, and for the direct screening of recombinants, respectively. A general method is proposed for the assembly of synthetic oligonucleotides into double-stranded DNA fragments with the use of the type AI adaptors. It enables the assembly to be accomplished in three stages whether the fragment should contain tens, hundreds or thousands of base pairs, the method thus appearing most advantageous for the synthesis of long DNAs. The application of the type AII adaptors is exemplified by the use of the AII-*HindIII* ones for the cloning and recovery of the chemically synthesized structural gene for delta sleep inducing peptide.