



УДК 578.5 : 578.85/86

© 1992 г. Б. К. Чернов\*, А. Меритс, О. А. Мизенина,  
С. Ю. Морозов**ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ И КЛОНИРОВАНИЕ  
ПОЛНОРАЗМЕРНОГО ГЕНОМА ДНК-СОДЕРЖАЩЕГО ВИРУСА  
РАСТЕНИЙ***Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета;**\* Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*

Сконструированы рекомбинантные плазмиды, содержащие полноразмерные ДНК-копии генома мелкого ДНК-содержащего вируса растений – вируса увядания листьев кокосовых пальм. Искусственно синтезированные фрагменты ДНК вируса собраны из частично комплементарных синтетических олигонуклеотидов путем их лигирования *in vitro* и последующей амплификации с помощью полимеразной цепной реакции. Полученные клонированные фрагменты ДНК вируса секвенировали, сшивали и встраивали в плазмиду pRCV002 с целью получения непрерывной копии полноразмерного вирусного генома.

Использование ДНК-содержащих фитовирусов как векторов для переноса чужеродных генов имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами конструирования трансгенных растений. Во-первых, эти вирусы способны системно заражать целые растения, включая листовую, корневую и генеративные ткани, что позволяет в значительной степени снизить большие затраты времени и преодолеть трудности, связанные с регенерацией изолированных клеток и протопластов, что имеет особую важность в случае однодольных растений, в частности злаков. Во-вторых, при автономной репликации в ядрах растительных клеток происходит многократная амплификация переносимого гена, клонированного в составе вирусной ДНК. Важно отметить, что амплифицированный чужеродный ген в одних случаях может постоянно экспрессироваться в составе автономной рекомбинантной вирусной ДНК [1, 2], а в других может с высокой вероятностью интегрировать в хромосомы ядра растительной клетки, что увеличивает стабильность трансформантов [3].

К настоящему моменту выявлены два типа ДНК-содержащих вирусов растений: параретровирусы [4, 5], которые в силу ряда особенностей репликационного цикла представляют незначительный интерес в качестве потенциальных векторов, и вирусы растений, содержащие одноцепочечные ДНК, которые по структуре и способу репликации геномов во многом сходны с мелкими бактериофагами типа M13 или ФХ174 [6]. К ним относятся геминивирусы, уже успешно используемые в качестве векторов [2, 7, 8], а также очень мелкие сферические вирусы однодольных (пальм) [9] и двудольных растений [10]. Полная первичная структура генома одного из этих вирусов – вируса увядания листьев кокосовых пальм (вирус УЛКП) – недавно опубликована [11]. Длина кольцевой одноцепочечной

Принятые сокращения: вирус УЛКП – вирус увядания листьев кокосовых пальм; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

ДНК вируса составляет всего 1291 нуклеотидный остаток. Этот геном, таким образом, наименьший из известных для всех автономных вирусов.

С целью конструирования нового вектора, способного амплифицировать чужеродные гены в трансгенных растениях, нами осуществлены синтез ДНК-копии полноразмерного генома вируса УЛКП и клонирование его в составе плазмид *E. coli*. Известно, что частично или полностью дублированные тандемы геномов геминивирусов при введении в растительные клетки в составе векторных ДНК весьма эффективно выщепляют циркулярные мономерные двуцепочечные ДНК, способные к автономной репликации [12, 13]. Поэтому из полученной нами полноразмерной клонированной ДНК-копии генома вируса УЛКП был сконструирован также тандемный димер генома.

Существующие подходы к синтезу искусственных фрагментов ДНК связаны со сборкой требуемой нуклеотидной последовательности из отдельных олигомерных сегментов [14]. Однако сборка столь крупных ДНК-копий сопряжена со значительными экспериментальными трудностями. При большой длине синтезируемой ДНК-копии требуется значительное число необходимых олигомеров, что связано с резким увеличением материальных и временных затрат и, кроме того, с неизбежностью приводит к сборке фрагмента по сложным многоступенчатым схемам. Учитывая невысокие выходы конечного продукта лигирования и возможность образования непредсказуемых побочных продуктов в многокомпонентных реакционных смесях [15], экспериментатор сталкивается с определенными сложностями при сборке протяженных синтетических ДНК-фрагментов.

Наличие разработанного в последние годы метода амплификации сегментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции [16] позволило нам усовершенствовать процедуру синтеза/клонирования синтетических ДНК. В результате полная последовательность вирусного ДНК-генома длиной почти 1300 пар нуклеотидов была сконструирована всего из трех одноэтапно клонированных субфрагментов (рис. 1а). Используемый для синтеза этих субфрагментов метод ПЦР позволил резко увеличить количества продуктов сшивки химически синтезированных олигодезоксирибонуклеотидов даже при весьма неэффективном многоэтапном лигировании. К настоящему времени данная работа представляет собой первый случай конструирования полноразмерного генома автономного вируса полностью на основе химически синтезированных ДНК-сегментов.

Разработанную схему синтеза реализовали для разных субфрагментов с некоторыми модификациями:

а) субфрагмент CFDV-2 — лигировали 8 пар комплементарных и 2 пары частично комплементарных олигодезоксирибонуклеотидов (рис. 1б). Полученные двуспиральные полинуклеотиды, состоящие из ковалентно-непрерывной «+»-цепи и в значительной степени ковалентно-непрерывной «-»-цепи, использовали как матрицы для ПЦР в присутствии в качестве концевых затравок олигонуклеотидов АВ-148 и АВ-163 (табл. 1, рис. 1б). Продукт ПЦР обрабатывали одновременно рестрикционными эндонуклеазами *Apa*I и *Xho*I и клонировали по соответствующим сайтам в плазмиду pGEM-7Z(f+) (Promega).

б) субфрагмент CFDV-3 — лигировали 12 олигодезоксирибонуклеотидов (рис. 1б). Полученные частично биспиральные полинуклеотиды, состоящие из ковалентно-непрерывной «+»-цепи ДНК и частично сшитой «-»-цепи использовали как матрицы для ПЦР в присутствии в качестве затравок олигонуклеотидов АВ-174 и АВ-147 (табл. 1, рис. 1б). Продукт ПЦР клонировали по *Pst*I-сайту плазмиды pTZ18R с помощью G-C-коннекторов (см. «Эксперим. часть»).

в) субфрагмент CFDV-4 — лигировали 12 олигодезоксирибонуклеотидов (рис. 1б). Полученную ковалентно-непрерывную «+»-цепь использова-

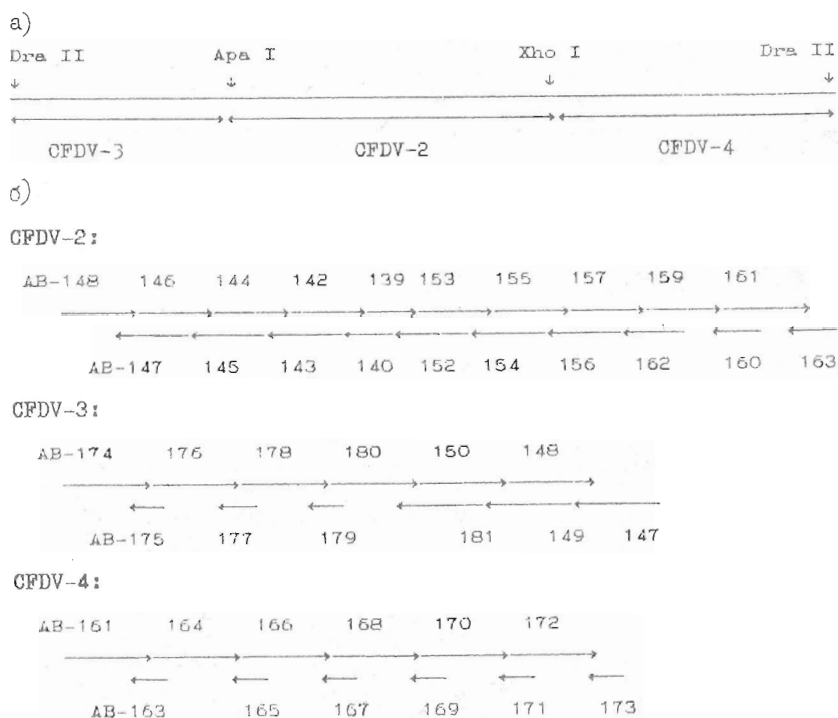


Рис. 1. Рестрикционная карта генома вируса УЛКП (а) и схемы сборки отдельных субфрагментов из химически синтезированных олигодезоксирибонуклеотидов (б). Указаны номера синтетических олигонуклеотидов (см. табл. 1)

ли как матрицу для ПЦР в присутствии в качестве затравок олигонуклеотидов АВ-161 и АВ-173 (табл. 1, рис. 1б). Продукт реакции ПЦР клонировали аналогично субфрагменту CFDV-3 (см. выше).

Таким образом, в третьем варианте для упрощения схемы и затрат на синтез относительно небольшие олигодезоксирибонуклеотиды, соответствующие «-»-цепи генома вируса УЛКП, были использованы только как «подложка» для лигирования ковалентно-непрерывного фрагмента «+»-цепи (рис. 1б).

В ходе клонирования субфрагментов CFDV-2 – CFDV-4 трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL-1В. Отбор рекомбинантных клонов проводили с помощью рестрикционного анализа выделенной плазмидной ДНК. Нуклеотидная последовательность искусственных субфрагментов генома вируса в составе рекомбинантных плазмид подтверждена методом Сэнгера [17].

Ранее было показано, что частота точечных мутаций, генерируемых в ходе ПЦР в стандартных смесях с *Taq*-ДНК-полимеразой, составляет 0,25–0,4% [16, 18, 19], причем от 5 до 20% этих мутаций приходится на делеции или вставки. В ходе нашей работы было просеквенировано 16 независимых клонов для трех субфрагментов вирусного генома с общей длиной 5873 п. о. Выявлено, что частота мутации составила 0,7% (табл. 2). Это несколько больше, чем описано в литературе. Однако частота делеций/вставок в наших экспериментах оказалась необычно высокой и составила 88% (табл. 2), что может быть связано, например, с использованием в качестве матрицы для ПЦР химически синтезированных полинуклеотидов.

Для получения полноразмерного клонированного генома вируса УЛКП

## Первичная структура синтетических олигонуклеотидов, использованных для сборки генома вируса УЛКП

&lt;&lt;+&gt;&gt; цепь

CCCCCTGGCTATAAAATGGGTTCCCTCCATTCGCGCTGGTGGCTTCACTCTGAACTACGAGACAG  
 AGGA : 27 - 95 AB-153  
 AGAGGCGGCGAATGTTGTAAGCGGOATOGAGTCCCTTAACTGGTGTATGCTATAGTTGGGGACG  
 AGG : 95 - 163 AB-155  
 TTGCACCTTCAACTGGCCAACGACACCTCCAGGATTCATTCACCTTGAAGACCGGTCCGGCGAC  
 : 164 - 225 AB-157  
 TGCAAGGATTGAAGACTGTTCTTGGGAATGACAGGATTCACCTGGAGCGGACCCCGTGG  
 : 226 - 283 AB-159  
 TTCCGACGGAACAGAAATAGAGACTACTGTTGGAAGGAACGGGTGCTTCTCGAGCACGGAGTCCCGA  
 CTC : 284 - 351 AB-161  
 GTCCTGGAGTCAAAAAGGCCACGATTGGCCCAACGATTTGCTGAGGAACTGTATGAACTCCGCCGTG  
 GAA : 352 - 419 AB-164  
 GACCCAGGCGGATACCGAAGATGCGTTGTACACGGAGCTTCGGTGGAAATGGACAAGATGGGCCGCG  
 TGA : 420 - 487 AB-166  
 AAATCCGTTCCCATTTCCATATCACAAATTTGGCAGCTTGAAGTCTGTCTCGATCGGAGAGCCAG  
 CGG : 488 - 555 AB-168  
 ACGATCGCAAACTCCTCTGGATATGCGGACGAGACGGAGGAGACGGGAAGTCCGTGTTGCCAAA  
 TAT : 556 - 623 AB-170  
 CTCGGACTCAAGCCCGACTGGTTCTACACATGTGGTGGAAACCAGAAAGGACGTATTGTACCAGTA  
 CAT : 624 - 691 AB-172  
 CGAGGACCCAAAACGAAATTTAATCTCGATGTACCCAGCTGTAATTTAGAGTATTTAAATATG  
 CCC : 692 - 759 AB-174  
 TGTTAGAAATGTGTTAAGAACAGGGCATTTCAGTTCGGACAAAATCGAACCCCTTAGTTATCTTGGG  
 TTC : 760 - 827 AB-176  
 GACCATGTGCATGTACTCTATTTGCAATGTCTCTGCTGATTTTGAATAACAGCAGGGACAG  
 AATA : 828 - 895 AB-178  
 AAACCTGTGGAATATTTAAAGTATGTGTATCTAAATTCACCAATACCCGCCCGCCAC  
 : 897 - 955 AB-180  
 GCGCTATCGTTTACATCTTATGAATATCOTGCCACAGGCCAAGGCCTGGGAGCTGCTACCCGGCC  
 GAA : 956 - 1023 AB-150  
 GGCCGGGAACAATATGAATCGAGTTATGGCGGGCCCAATAAAAAGATTCCATTTGGA  
 : 1024 - 1082 AB-145  
 TAAGAACGAATCTGTTACTTTGCTTGCAGTGCACGCAACCACTTTCACCGTCAACCAATCCAGGTG  
 AGT : 1083 - 1150 AB-146  
 AGCTTGTGGAGAAGAAAGCCGCAAGCCTCTATCTACCGTCCATTTGTTTTCGGCGATCGGAACG  
 GCT : 1151 - 1218 AB-144  
 GAGTTGATCTGGCGCCAAAACCTCTGCTGAGTCCCGTGTGAGTATAAGTAGCCGCGGGG  
 : 1219 - 1279 AB-142  
 GCTAGTATTACCCCGCGGCTCCCAACCTCTGCTAA  
 : 1280 - 26 AB-139

секвенированные и не содержащие мутации вставки из клонов CFDV-2 — CFDV-4 сшивали в два этапа (рис. 2). Плазмиду CFDV-2 расщепили по *ApaI*-сайту внутри вирусспецифической вставки и одновременно по *HindIII*-сайту внутри последовательности полилинкера. Полученный фрагмент выделили и лигировали с плазмидой CFDV-3, расщепленной эндонуклеазами *HindIII* и *ApaI*. В результате был получен клон CFDV-2-3 (рис. 2a). Для конструирования полноразмерной ДНК-копии вирусного генома плазмиду CFVF-2-3 разрезали одновременно рестрикционными эндонуклеазами *HindIII* и *XhoI*, а затем лигировали с *HindIII-XhoI*-фрагментом плазмиды CFDV-4 (рис. 2б). В результате была получена плазида CFDV-1.0, содержащая полноразмерный вирусный геном, ограниченный *DraII*-сайтами, и короткие дубликации *PstI-DraII* на концах вирусспецифической вставки (рис. 2б).

Для конструирования tandemного димера, необходимого для получения трансгенных растений, рестрикционный фрагмент *DraII-XbaI*, содержа-

&lt;&lt;-&gt;&gt; ЦЕПЬ

GTAATACTAGCCCCGGGGCTACTTATACTCAGCAAG  
 : 1291 - 1254 AB-140  
 TCGACCCCCGGGGCTACTTATACTCAGCAAG  
 : 1280 - 1254 AB-141  
 GGACTCAGGAGAGGTTTTTGGGGCCAGATCAACTCAGCCGTCGGATCGCGCAAAAAACAATGGAC  
 GGTAG : 1253 - 1184 AB-143  
 ATAGAGGCTTGGGGCTTTTCTCTCCAGCAAGCTACTCACCTGGATTGGTGAACGTGAAAAGTGGTT  
 GCG : 1183 - 1116 AB-145  
 TGCACCTGCAAGCAAAAGTAAACAGATTGCTTCTTATCCAAATGGAATCTTTTATTGTGGGCCCGCCC  
 ATA : 1115 - 1048 AB-147  
 ACTCGATTCCATATTGTTCCCGGCTTCCGGCCGGGTAGCACCTCCAGGCTTCCGGCTGGGCAGG  
 ATAT : 1047 - 979 AB-149  
 TCATAAGATGTA AACGATAGCGGCTGGGGGGGGGGTATTGGTGTAAATTTAGATGACACATACTT  
 T : 978 - 915 AB-181  
 AAATATTCACAGTTTTATTCTGTCCCTGGCTG  
 : 914 - 883 AB-179  
 AGTACATGCACATGGTCGAAACCAAGATAACT  
 : 846 - 815 AB-177  
 CTTAACACATCTCAACAGGGGATAATTAAAT  
 : 778 - 747 AB-175  
 TTTCGTTTTGGGGTCTCGATGTAAGTGGTACAAT  
 : 711 - 679 AB-173  
 GTGGGGCTTGAGTCCGAGATATTGGCCAAACAC  
 : 643 - 611 AB-171  
 GAGGATTTGGGATCGTCCGGCTGGCTCTCAG  
 : 574 - 544 AB-169  
 AAATGGGAACGGGATTTTCAGCGGCCCATCTT  
 : 506 - 475 AB-167  
 CGGTATCCGGCTGGCTCTTCCAGGGGGAGTTC  
 : 439 - 407 AB-165  
 CCTTTGACCTCCAGGACGAGTCCGGGACTCCGT  
 : 371 - 339 AB-163  
 CTATTCTGTCTCGTCCGGAACCAACGGGTCCGGCTCCAG  
 : 301 - 269 AB-160  
 GTGAATCCTGTCAATCCCAAGAACAGCTCTTCAATCCTTGCAGTCCGCCGACCGGTCTTCAAGTGAA  
 TGA : 268 - 201 AB-162  
 ATCCTTGGAGGTGTCTTGGCCAGTTGAAGGTGCAACCTCGTCCCAACTATAGCATAGACCAAG  
 TTA : 200 - 133 AB-156  
 AGGGACTCGATGGCCCTTACAAATTCGCGGCTCTTCCCTGTCTCGTAGTTCAGAGTGAAGCA  
 CCAGC : 132 - 63 AB-154  
 GCGCAATGGAGGAACCCATTTATAGCCCAAGCGGGTTAGCAGAGGTTGGGGAGCCGCGGGG  
 : 62 - 1 AB-152

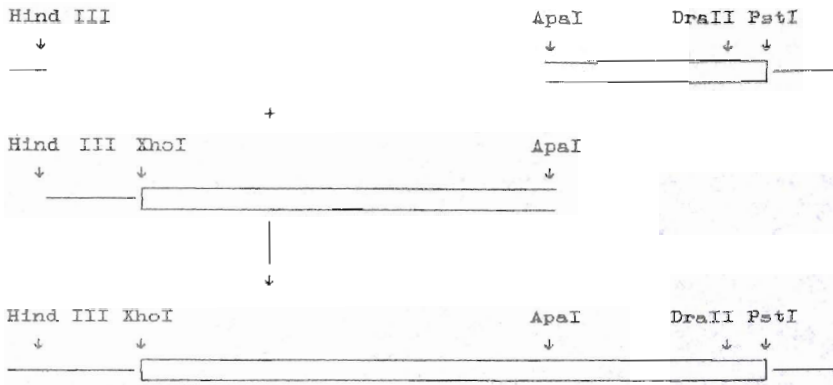
щий полноразмерную копию ДНК генома вируса УЛКП, клонировали в векторе, полученном из плазмиды CFDV-1.0 после разрезания вектора рестриктазой *XbaI* и частичного разрезания *DraII* (рис. 2с). В результате была получена плазида CFDV-2.0, содержащая tandemный димер вирусного генома. На следующем этапе полученный tandemный димер был перенесен в вектор для трансформации растений рPCV002.

Таблица 2

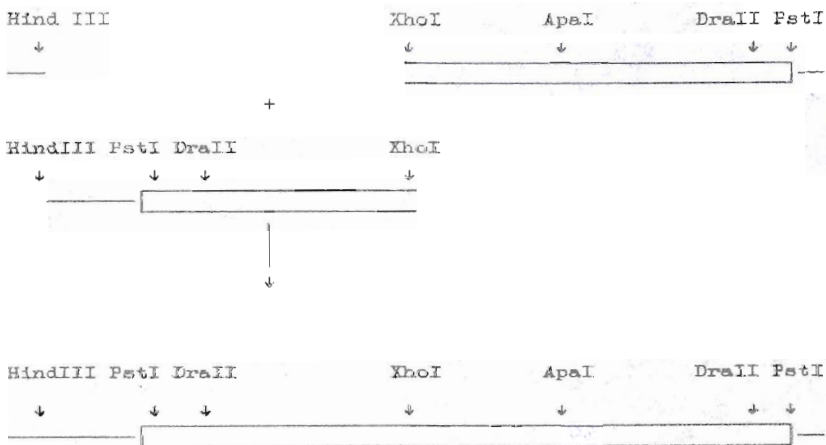
Частота мутаций в клонированных субфрагментах ДНК вируса УЛКП

Фрагмент	Общая длина секвенированных последовательностей, п. о.	Замены	Вставки	Делеции
CFDV-2	996	—	2	4
CFDV-3	1712	3	1	7
CFDV-4	3165	2	5	18
Всего	5873	5	8	29

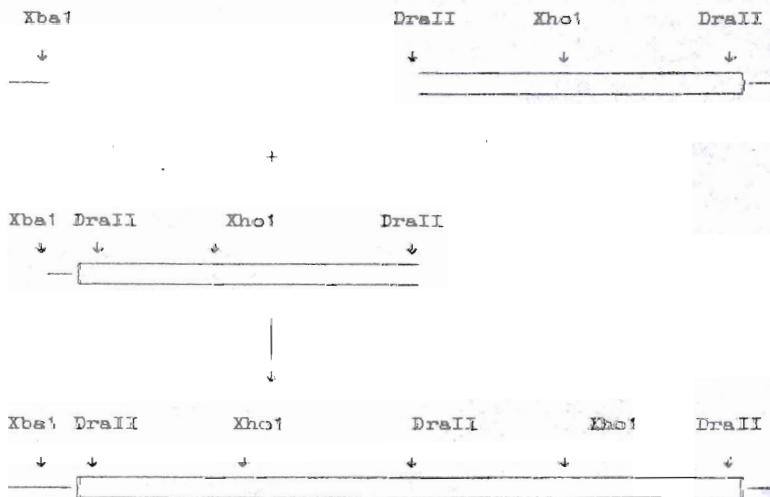
a)



b)



B)



## Экспериментальная часть

Олигодезоксирибонуклеотиды для клонирования генома вируса УЛКП получали твердофазным методом на автоматическом синтезаторе фирмы Applied Biosystems-380В с использованием цианоэтилфосфоамидитов 5'-диметокситритил-2'-дезоксинуклеотидов, содержащих N-феноксиацетильную защитную группу (для dA, dC и dG) в масштабе 0,2 мкмоль. При концентрации фосфоамидитов 0,06 М и активатора (тетразола) 0,35 М продолжительность нестандартного реакционного цикла составила 5 мин 20 с в режиме работы прибора на трех колонках. По завершении синтеза защитные группы удаляли 25% водным аммиаком в течение 4 ч при 70° С. Выделение и очистку синтезированных продуктов осуществляли с помощью ВЭЖХ в две стадии. Сначала выделяли диметокситритил-замещенные олигонуклеотиды на колонке Nucleosil C-18 с размером пор 300 Å (Macherey-Nagel, ФРГ) в градиенте концентрации ацетонитрила, содержащего 0,05 М триэтиламмонияацетат, pH 7,0, и далее после обработки уксусной кислотой рехроматографировали аналогичным образом. Выход очищенных олигонуклеотидов составил 2,5–5 ОЕ<sub>260</sub>.

В работе использовали рестрикционные эндонуклеазы *ApaI*, *HindIII*, *PstI* и *XhoI*, *XbaII*, *DraII*, *Taq*, Т4-полинуклеотидкиназу, терминальную нуклеотидтрансферазу, набор «Сиквенс 2» с Т7-ДНК-полимеразой, термофильную ДНК-полимеразу («Ферментас», Литва) и [α-<sup>32</sup>P]dNTP отечественного производства. Приготовление сред, ферментативные реакции, электрофорез в ПААГ и трансформацию клеток *E. coli* проводили согласно методикам [20], ПЦР — согласно работе [15]. Нуклеотидные последовательности ДНК определяли по методу Сэнгера [17].

**Получение субфрагмента CFDV-2.** Реакционную смесь, содержащую по 80 пмоль фосфорилированных олигонуклеотидов АВ-146, 144, 142, 139, 153, 155, 157, 159, 161, 160, 147, 145, 143, 140, 152, 154, 156 и 162 и нефосфорилированные АВ-148 и -163 в 450 мкл киназного буфера для линкеров (0,07 М трис-НСl, pH 7,6, 0,01 М MgCl<sub>2</sub> и 5 мМ дитиотреит), содержащего 150 мМ NaCl, нагревали 5 мин при 90° С, а затем отжидали 1,5 ч до 30° С. Смесь обрабатывали фенолом, переосаждали этанолом, осадок растворяли в 25 мкл 10-кратного лигазного буфера (0,66 мМ трис-НСl, pH 7,6, 50 мМ СаCl<sub>2</sub>, 50 мМ дитиотреит) и отжидали 30 мин при 65° С. После отжига добавляли 200 мкл воды, АТФ до концентрации 1 мМ и Т4-ДНК-лигазу (100 ед. акт.). Смесь инкубировали 60 мин при 37° С. Полученные полинуклеотиды переосаждали этанолом и использовали как матрицу в реакции ПЦР.

Реакцию проводили на приборе Perkin — Elmer Cetus (США) следующим образом: в объеме 25 мкл использовали 1 мкл раствора ДНК-матрицы, 2,5 мкл буфера 670 мМ трис-НСl, pH 8,8, содержащего 166 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ β-меркаптоэтанол, 2,5 мкл раствора дезоксинуклеозидтрифосфатов (12,5 мМ каждый), 2,5 мкл раствора желатина (1 мг/мл), 1 мкл затравки 1 (АВ-148, 8 пмоль), 1 мкл затравки 2 (АВ-163, 8 пмоль) и 1 мкл *Taq*-полимеразы (1 ед. акт.). Сверху наслаивали 20 мкл вазелинового стерильного масла и проводили 30 циклов реакции в следующем режиме: 1-й цикл — 5 мин 94° С, 4 мин 58° С и 5 мин 72° С, 2–29-й циклы — 1 мин 94° С, 1 мин 58° С и 3 мин 72° С, последний цикл — 2 мин 94° С, 4 мин 58° С, 10 мин 72° С и 5 мин 58° С. Реакционную смесь фракционировали в агарозном геле, ДНК-дуплексе выделяли, рас-

Рис. 2. Схема сборки субфрагмента CFDV-2-3 (а), полноразмерной копии вирусного генома CFDV-1.0 (б) и tandemного димера CFDV-2.0 (в). Указаны сайты рестрикции, использованные в ходе конструирования полноразмерного генома. Прямоугольными рамками отмечены фрагменты ДНК, соответствующие вирусным последовательностям. Линиями указаны последовательности полилинкера

щепляли рестриктазами *Xho*I и *Apa*I и лигировали с 10 нг плазмиды pGEM-7Z (*f+*) (Promega), разрезанной *Xho*I и *Apa*I, в течение 16 ч при 14° С в присутствии 8 ед. акт. ДНК-лигазы фага T4. Реакционную смесь использовали для трансформации клеток *E. coli* XL-1B (Stratagen) [20].

**Получение субфрагмента CFDV-3.** Реакционную смесь, содержащую по 80 пмоль фосфорилированных олигонуклеотидов АВ-174, 176, 178, 180, 150, 148, 175, 177, 179, 181, 149, 147 в 450 мкл киназного буфера для линкеров, обрабатывали как описано выше. Дальнейшие процедуры и реакцию на циклере проводили как описано для субфрагмента CFDV-2. Реакционную смесь фракционировали в агарозном геле, ДНК-дуплекс выделяли и проводили достройку олиго-С-коннекторными последовательностями с помощью терминальной нуклеотидтрансферазы [20]. 10 нг полученного вирусспецифического фрагмента отжигали с 10 нг вектора pTZ18R (Promega) с достроенными по *Pst*I-сайту олиго-dG-коннекторами 30 мин при 65° С и 2 ч при 56° С. Реакционную смесь использовали для трансформации клеток *E. coli* XL-1B (Stratagen) [20].

**Получение субфрагмента CFDV-4.** Реакционную смесь, содержащую по 80 пмоль фосфорилированных олигонуклеотидов АВ-161, 164, 166, 168, 170, 172, 163, 165, 167, 169, 171, 173 в 450 мкл, отжигали, лигировали, амплифицировали и клонировали как описано для субфрагмента CFDV-3.

**Получение tandemного димера генома.** Для конструирования tandemного димера, необходимого для получения трансгенных растений, рестрикционный фрагмент *Dra*II-*Xba*I, содержащий полноразмерную копию ДНК генома вируса УЛКП, вставляли в вектор, полученный из CFDV-1.0 при разрезании *Xba*I-*Dra*II (неполная рестрикция *Dra*II) (рис. 2в). В результате была получена плазида CFDV-2,0, содержащая tandemный димер вирусного генома. На следующем этапе полученный tandemный димер был перенесен в вектор для трансформации растений pPCV002. [21].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hayes R. J., Petty I. T. O., Coutts R. H. A., Buck K. W. // Nature. 1988. V. 334. № 6980. P. 179-182.
2. Davies J. W., Stanley J. // Trends Genet. 1989. V. 5. № 3. P. 77-81.
3. Laufs J., Wirtz U., Kammann M., Matzeit V., Schaefer S., Schell J., Czernilofsky A. P., Barker B., Gronenborn B. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 19. P. 7752-7756.
4. Hull R., Covey S. N. // J. Gen. Virol. 1986. V. 67. № 9. P. 1754-1758.
5. Medberry S. L., Lockhart B. E. L., Olszewski N. E. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 18. P. 5505-5513.
6. Saunders K., Lucy A., Stanley J. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 9. P. 2325-2330.
7. Matzeit V., Schaefer S., Schalk B., Kammann M., Schell J., Gronenborn B. // Plant Cell. 1991. V. 3. № 2. P. 247-258.
8. Meyer P., Heidmann I., Niedenhof I. // Gene. 1992. V. 110. № 2. P. 213-217.
9. Harding R. M., Burns T. M., Dale J. L. // J. Gen. Virol. 1991. V. 72. № 1. P. 225-230.
10. Chu P. W. G., Helms K. // Virology. 1988. V. 167. № 1. P. 38-49.
11. Rohde W., Randles J. W., Langridge P., Hanold D. // Virology. 1990. V. 176. № 2. P. 648-651.
12. Grimsley N., Hohn T., Davies J., Hohn B. // Nature. 1987. V. 325. № 6845. P. 177-179.
13. Hayes R. J., Brough C. L., Prince V. E., Coutts R. H. A., Buck K. W. // J. Gen. Virol. 1988. V. 69. № 1. P. 209-218.
14. Khorana H. G., Terrefy L., Karni K. S. S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 3. P. 599-603.
15. Theriault N., Tomich C., Wicrenda W. // Nucleosides and Nucleotides. 1986. V. 6. № 1. P. 15-32.
16. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. // Science. 1988. V. 239. № 7022. P. 487-491.
17. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 14. P. 5463-5467.
18. Leung D. W., Chen E., Goeddel D. V. // Technique. 1989. V. 1. № 1. P. 11-15.



19. Tindall E., Kunkel F. M. // *Biochemistry*. 1988. V. 27. № 22. P. 6008–6013.  
20. Мануарис Т., Фриш Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.  
21. Koncz C. S., Schell J. // *Mol. Gen. Genet.* 1986. V. 204. № 1. P. 383–395.

Поступила в редакцию  
29.IV.1992

[B. K. CHERNOV\*, A. MERITS, O. A. MIZENINA, S. Yu. MOROZOV

**CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS AND CLONING OF THE  
FULL-LENGTH GENOME OF A DNA-CONTAINING PLANT VIRUS**

*A. N. Belozersky Institute of Physico-chemical Biology,  
Moscow State University, Moscow;*

*\* V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences*

The full-length genomic DNA of a small plant virus – coconut foliar decay virus (CFDV) – has been synthesized by a combination of chemical synthesis, ligation and polymerase chain reaction. Three separately cloned DNA fragments of the genomic DNA were sequenced and assembled in the pPCV002 plasmid vector.