



УДК 547.963.32.07:577.217.3

**СИНТЕЗ И ЭКСПРЕССИЯ ФРАГМЕНТА ДНК,
КОДИРУЮЩЕГО АНТИГЕННУЮ ДЕТЕРМИНАНТУ БЕЛКА
ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В****Смирнов В. Д., Сергиенко О. В., Скрипкин Е. А.,
Дубичев А. Г., Лукин В. Г., Григорьев В. Г.,
Тихоненко Т. И.***Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского
Академии медицинских наук СССР, Москва***Карелин В. П.***Московская ветеринарная академия им. К. И. Скрябина Миссельхоза СССР*

Химико-ферментативным синтезом получен полинуклеотид (I), кодирующий аминокислотную последовательность 93–109 белка поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg). Полинуклеотид (I) встроен в плазмиду pBR325 между сайтами *EcoRI* и *BamHI*. Полученная гибридная плазида pH5 12 использована для трансформации клеток *E. coli* HB101. Экспрессией плазмиды pH5 12 в бесклеточной системе получен белок, который по молекулярной массе соответствует химерному полипептиду, содержащему гептадекапептид из состава белка HBsAg. Обсуждается подход к созданию вакцинных препаратов на основе гибридных белков, содержащих антигенные детерминанты вирусных белков.

Два фактора — исследование на молекулярном уровне механизма иммунной защиты организма от вирусной инфекции и стремление к минимизации структур, обеспечивающих эту защиту, — предопределили развитие нового подхода к созданию вакцинных препаратов. Основу его составляет химический синтез пептидов, содержащих непрерывные (последовательные) протективные антигенные детерминанты белковых оболочек вирусов. В последние годы синтезированы пептиды (от 6 до 30 аминокислотных остатков) из состава гемагглютинина вируса гриппа [1], белков полиовируса [2], VPT вируса ящура [3] и белка поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) [4–8].

Некоторые из этих пептидов, будучи связаны с носителем (например, с эритроцитами, гемоцианином), проявляют высокую антигенную и иммуногенную активность [4–8]. Особенно привлекательной кажется возможность создания таким путем полиантигенных вакцин, содержащих несколько пептидных группировок, каждая из которых обладает свойствами протективной антигенной детерминанты соответствующего возбудителя или агрессивного продуцента.

С нашей точки зрения, существенным ограничением в развитии этого подхода является невозможность однозначно задавать определенные точки связывания пептида с носителем, регулируя «окружение» антигенной детерминанты, и обеспечивать высокую «насыщенность» носителя гаптенными группировками. Эти недостатки могут быть устранены включением пептидных антигенных детерминант в состав гибридного белка путем введения в его ген полинуклеотида, кодирующего эти детерминанты. При таком подходе может быть обеспечена насыщенность химерного белка различными антигенными детерминантами, многократная их повторяемость в структуре, возможность встраивать синтезируемый пептид в заранее определенные участки различных белков, регулируя таким образом стерическую доступность и конформацию этого пептида, т. е. те факторы, которые, безусловно, влияют на его антигенные свойства. Этот вариант

применим и для синтеза так называемых непоследовательных антигенных детерминант, которые образованы аминокислотными остатками, отстоящими друг от друга в первичной структуре белка или принадлежащими разным молекулам (например, у белков, образующих четвертичную структуру). В этом случае представляется возможной имитация непоследовательных детерминант либо созданием последовательных структур, содержащих все элементы детерминанты, либо заранее рассчитанным (при наличии информации о третичной структуре белка) включением элементов детерминанты в определенные области химерного белка.

Для получения кодирующих полинуклеотидов могут быть использованы как выделение выбранных участков из нативной ДНК генноинженерными методами, так и химико-ферментативный синтез; последний предпочтительнее, если задачей является не просто синтез элементов нативной структуры, а получение ее аналогов, имитация или направленная модификация этой структуры.

Мы предприняли первые шаги для реализации этого подхода в применении к вирусу гепатита В человека. Основным структурным белком оболочки этого вируса является полипептид, состоящий из 226 аминокислот (HBsAg). С этим белком ассоциированы поверхностные антигенные детерминанты вирионов и субвирусных структур. Антитела против белка HBsAg защищают от заражения интактным вирусом. В настоящее время рядом исследователей определена первичная структура этого белка [9—11]. Аминокислотная последовательность изученных субтипов достаточно консервативна. В составе белка HBsAg содержится несколько антигенных детерминант, одна из которых является группоспецифической, т. е. относительно консервативной. Химическая модификация аминокислот белка HBsAg [12], анализ гидрофильности аминокислотных остатков вдоль его молекулы [5], сравнение иммуногенности химически синтезированных пептидов [4—7] указывают на два участка, предположительно содержащие такие антигенные детерминанты HBsAg, — последовательности аминокислот 95—109 и 135—151. Наиболее вариабельный участок, обеспечивающий субтипное различие вирусов, — последовательность 110—140.

Настоящая работа описывает синтез фрагмента ДНК, кодирующего последовательность 93—109, его клонирование и экспрессию. При планировании нуклеотидной последовательности, кодирующей выбранный пептид (см. схему 1), мы основывались на литературных данных о встречаемости вырожденных кодонов у генов рибосомных белков *str*-оперона *E. coli* [13]. В полинуклеотиде предусмотрено наличие участков узнавания рестриктазы *Xba*I и *Sph*I для изменения размера кодирующей зоны с целью укорочения пептида за N- или C-конца. На концах полинуклеотида — полусайты рестриктаз *Eco*RI и *Vam*HI для соединения с вектором, обеспечивающие совпадение рамок считывания фрагмента гена хлорамфениколацетилтрансферазы и синтетического полинуклеотида (I).

Полинуклеотид (I) разбит на 12 сегментов, каждый из которых был синтезирован химически с использованием фосфоритриэфирного метода синтеза в растворе [14], исходя из защищенных нуклеозид-3'-фосфатов (экзоциклические аминогруппы гетероциклических оснований блокированы бензильной, 5'-гидроксилы — диметокситритильной, 3'-фосфаты — *n*-хлорфенильной и β-цианэтильной группами; вторичная гидроксильная группа 3'-концевого нуклеозида — ацетильным остатком). Нарастивание олигонуклеотидной цепи вели в направлении от 3'- к 5'-концу, используя в качестве конденсирующего агента триизопропилбензолсульфотетразолид. Защищенные олигонуклеотиды после каждой стадии синтеза выделяли хроматографией на силикагеле в градиенте метанола в хлороформе, полностью деблокированные олигонуклеотиды (1)–(12) (см. схему 1) — хроматографией на DEAE-целлюлозе в 7 М мочеvine, используя градиент концентрации NaCl, при pH 7,5 и 3,5 [15]. Гомогенность олигонуклеотидов проверяли электрофорезом в 20% полиакриламидном геле (ПАГ) в присутствии 8 М мочевины [16]. Подтверждение первичной структуры было получено с использованием методов нуклеотидных карт [17] и частичной химической дегградации по Максому — Гилберту [16].

PheLeuLeuValLeuLeuAspTyrGlnGlyMetLeuProValCysProLeu

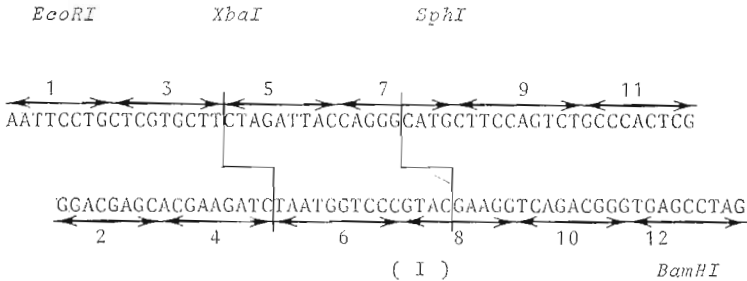


Схема 1. Аминокислотная последовательность участка 93–109 НВsAg и первичная структура синтетического полинуклеотида (I) с указанием содержащихся сайтов эндонуклеаз рестрикции. Цифрами 1–12 обозначены химически синтезированные олигонуклеотидные сегменты

Перед ферментативной «сборкой» полинуклеотидных цепей отдельные олигонуклеотидные сегменты фосфорилировали с использованием АТФ и Т4-полинуклеотидкиназы. «Сборку» осуществляли с помощью ДНК-лигазы фага Т4. Чтобы иметь возможность следить за эффективностью отдельных этапов процесса, при фосфорилировании одного из олигонуклеотидных сегментов (3, 5, 7, 9 или 11 на схеме 1) использовали $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ с низкой удельной активностью (50 Ки/ммоль); олигонуклеотиды (2), (4), (6), (8), (10), (12) не фосфорилированы. Анализ продуктов реакции показал, что эффективность процесса лимитируется участком сегментов (5) и (7), содержащих самокомплементарные участки, в ряде побочных реакций, приводящих к образованию неправильных структур. Эффективность «сборки» полной цепи составляла около 1%. Вторая цепь полинуклеотида была собрана аналогично. Продукты лигазной реакции выделяли элюцией из 8% денатурирующего ПАГ, фосфорилировали $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ с высокой удельной активностью (1000 Ки/ммоль) и анализировали их первичную структуру по методу Максама – Гилберта [16]. Обе цепи полинуклеотида смешивали, подвергали отжигу и использовали для введения в векторную ДНК.

Вектором служила плазмида pBR 325, которую обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *EcoRI*, *BamHI* и *BbrI* (см. схему 2), после чего вместо *EcoRI* – *BamHI*-фрагмента с помощью ДНК-лигазы вводили в плазмиду синтетический полинуклеотид (I). Рекомбинантными плазмидами трансформировали культуру клеток *E. coli* (штамм НВ101), отбирая трансформанты на среде с ампициллином. Из 4000 колоний более 90% имели фенотип $\text{Ar}^c\text{Sm}^r\text{Tc}^s$. Анализ подвижности плазмидной ДНК в агарозном геле показал, что 90% исследованных клонов содержали ДНК с ожидаемой молекулярной массой 2,7 Мда. ДНК из трех отобранных клонов была подвергнута картированию с помощью эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *BamHI*, также подтвердившему наличие в составе плазмиды «вставки» синтетического полинуклеотида. Наконец, анализ первичной структуры коротких фрагментов, образующихся при гидролизе плазмидной ДНК эндонуклеазами *MspI* или *BsuRI*, подтвердил, что отобранные клоны содержат в составе ДНК полинуклеотид, кодирующий участок белка НВsAg, в заданной ориентации и фазе считывания.

Экспрессию плазмидной ДНК исследовали в сопряженной бесклеточной системе транскрипции – трансляции с использованием $[\text{}^{35}\text{S}]\text{метионина}$ в качестве радиоактивного предшественника белков. Продуктом экспрессии участка ДНК, содержащего синтетический полинуклеотид (I) (см. схему 2), должен быть химерный белок, N-конец которого представлен 72 аминокислотными остатками N-концевой части хлорамфениколацетил-

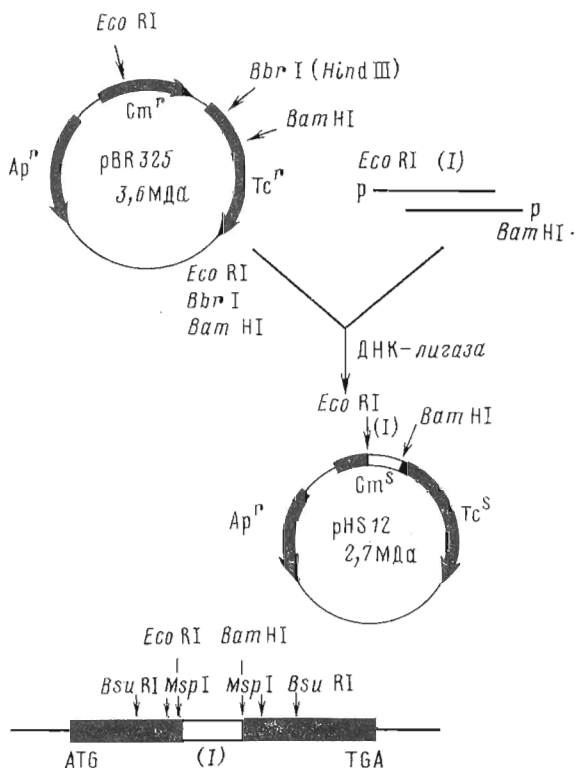


Схема 2. Схема получения плазмиды pHS12, содержащей полнуклеотид (I). Внизу структура участка ДНК, кодирующего химерный белок

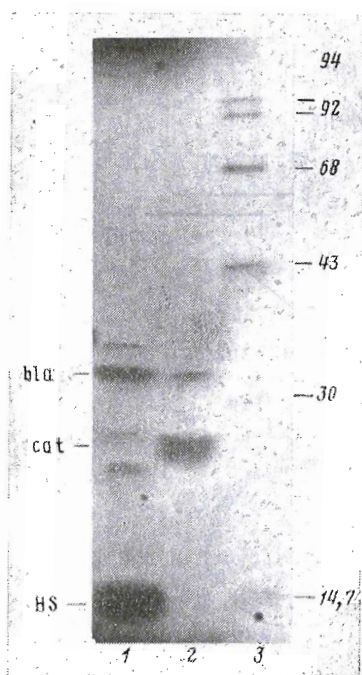
трансферазы; далее следуют 17 аминокислотных остатков, соответствующих последовательности 93—109 белка HBsAg; С-кошцевая часть белка кодируется коротким участком ДНК, предшествующим в данной фазе считывания терминирующему кодону в составе плазмидной ДНК. Продукт экспрессии должен иметь молекулярную массу около 16,5 кДа. Результаты анализа (см. рисунок) подтверждают исчезновение в продуктах трансляции хлорамфениколацетилтрансферазы и появление белка с молекулярной массой 16,5 кДа.

Таким образом, нам удалось экспрессировать в прокариотической системе рекомбинантную ДНК, кодирующую фрагмент белка HBsAg. Ближайшей задачей является определение иммунологической специфичности экспрессируемого гибридного белка.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксирибонуклеозиды производства НИКТИ БАВ Главмикробиопрома, силикагель для колоночной хроматографии L40-100 (Chemapol, ЧССР), DEAE-целлюлозу DE-23 (Whatman, Англия), пластинки для тонкослойной хроматографии на силикагеле Silufol UV 254 (Kavalier, ЧССР), пластинки с полиэтилениминцеллюлозой (Merck, ФРГ), целлогель (Serva, ФРГ), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78, Miles, США), фосфодиэстеразу змеиного яда (КФ 3.1.4.1, Worthington, Англия), Т4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1) и эндонуклеазы рестрикции (КФ 3.1.23.X) *EcoRI*, *BamHI*, *MspI*, *BsuRI* производства НИИ прикладной энзимологии Главмикробиопрома и *BbrI*, выделенную в Институте вирусологии АМН СССР; мочевицу, трис, гидразин, акриламид и N,N'-метиленбисакриламид (Serva, ФРГ), [$\gamma^{32}\text{P}$]АТФ и [^{35}S]метионин (Amersham, Англия), все остальные реактивы отечественного производства марки ос.ч. или х.ч.

Пиридин обезвоживали перегонкой над окисью бария и гидридом каль-



Авторадиограмма разделения в ПАГ ^{35}S -меченых белков, кодируемых плазмидами. 1 — белки, кодируемые рHS12; 2 — белки, кодируемые рBR325; 3 — маркерные белки (справа приведена их молекулярная масса в кДа). bla β -лактамаза; cat — хлорамфениколацетилтрансфераза, HS — гибридный белок, содержащий фрагмент HBsAg

ция. N-5'-O-3'-P-защищенные нуклеозид-3'-фосфаты, а также тризопропилбензолсульфотетразолид синтезировали по описанным методикам [14]. Удаление диметокситригильных и цианэтильных групп в полностью защищенных нуклеозид-3'-фосфатах проводили по методикам, описанным соответственно в работах [14] и [18].

Химический синтез полностью защищенных олигонуклеотидов проводили по методике, описанной в работе [15], деблокирование синтетических олигонуклеотидов в количестве 4–8 мг — по схеме, приведенной в работе [19], хроматографическое выделение полученных олигонуклеотидов — по методике, описанной в работе [15]. Олигонуклеотиды (1)–(12) (см. схему 1) были выделены в количестве от 100 до 450 нмоль.

Фосфорилирование олигонуклеотидов и фрагментов ДНК. Раствор олигонуклеотида (1 нмоль) в 12 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 9,0), 10 мМ MgCl_2 , 5 мМ дитиотреит, 0,1 мМ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (30–50 Ки/ммоль) и 4 ед. акт. T4-полинуклеотидкиназы, инкубировали 16 ч при 5° С. Реакцию останавливали прогреванием смеси в течение 10 мин при 65° С. Далее реакционную смесь без очистки использовали в реакциях лигазной «сборки». Фосфорилирование олигонуклеотидов и фрагментов ДНК с целью анализа первичной структуры проводили в том же буфере в течение 30 мин при 37° С, используя $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ с уд. акт. 1000–3000 Ки/ммоль. Фосфорилированные олигонуклеотиды подвергали электрофорезу в 20% ПАГ, содержащем 8 М мочевины (pH 8,3), элюировали из геля [16], осаждали тремя объемами ацетона, затем растворяли в воде.

Определение первичной структуры олигонуклеотидов и фрагментов ДНК. а) *Нуклеотидные карты.* 5'- ^{32}P -олигонуклеотиды подвергали частичному гидролизу фосфодиэстеразой змеиного яда, продукты реакции разделяли электрофорезом на ацетате целлюлозы и гомохроматографией на пластинках с полиэтиленминцеллюлозой, как описано в работе [17].

б) *Метод химической деградации.* Анализ проводили по методике Максама — Гилберта [16], увеличив время химической модификации в 2 раза; температура, при которой проводили реакции, 30° С.

«Сборка» полинуклеотида (I). Смешивали по 6 мкл растворов 5'- ^{32}P -меченых олигонуклеотидов 3, 5, 7, 9, 11 (см. схему 1) в буфере для киназной реакции и 17 мкл раствора смеси нефосфорилированных олигонуклеотидов 1, 2, 4, 6, 8, 10 и 12 (по 0,5 нмоль каждого олигонуклеотида) в буфере 10 мМ трис-HCl (pH 7,5), содержащем 10 мМ MgCl_2 . Раствор выдержи-

вали 10 мин при 60° С, затем в течение 3 ч охлаждали до 20° С и быстро — до 0° С. Добавляли дитиотреит до 5 мМ, 1 мкл 10 мМ АТР и 4 мкл (40 ед. акт.) ДНК-лигазы; смесь инкубировали 16 ч при 4° С. Продукты реакции анализировали электрофорезом в ПАГ в присутствии 8 М мочевины (трис-боратный буфер, рН 8,3).

Аналогично проводили сборку второй цепи полинуклеотида (I), используя 5'-³²P-олигонуклеотиды 2, 4, 6, 8 и 10 и нефосфорилированные 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 12.

Продукты реакции элюировали из геля по методике Максама — Гилберта [16] и проверяли их гомогенность электрофорезом в 8% ПАГ, содержащем 25 мМ лимонную кислоту и 7 М мочевины (рН 3,5).

Конструирование плазмиды рН S12. К 10 мкг ДНК плазмиды рBR 325 в 200 мкл буфера, содержащего 0,1 М трис-НСl (рН 7,5), 5 мМ MgCl₂ и 5 мМ дитиотреит, добавляли 10 ед. акт. эндонуклеазы *Bam*HI и 10 ед. акт. *Bbr*I (изошизомер *Hind*III). Смесь инкубировали 1 ч при 37° С, затем выдерживали 10 мин при 70° С, прибавляли 20 ед. акт. эндонуклеазы *Eco*RI и выдерживали 1 ч при 37° С. Белки экстрагировали фенолом (0,2 мл, рН 8,0) и смесью (0,2 мл) хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1). ДНК осаждали 70% этанолом, высушивали, растворяли в 100 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреит и 0,5 мМ АТР. Добавляли 0,5 пмоль фосфорилированного полинуклеотида (I) (смесь двух фосфорилированных цепей в 24 мкл того же буфера без АТР, выдержанная 10 мин при 80° С и охлажденная в течение 3 ч до 20° С) и 20 ед. акт. ДНК-лигазы. Смесь инкубировали 16 ч при 13° С и использовали для трансформации клеток *E. coli* HB101 по методу Коэна и соавт. [20]. 10 мкл смеси приливали к 200 мкл суспензии компетентных клеток, смесь выдерживали 45 мин при 0° С, 3 мин при 42° С. Добавляли 2 мл среды LB [21] и после 30 мин инкубации при 37° С смесь высевали на чашки с LB-агаром, содержащим ампициллин (20 мкг/мл). Из 240 клонов, проверенных на устойчивость к хлорамфениколу и тетрациклину (по 20 мкг/мл), 228 были чувствительны к этим антибиотикам. Ap^rСm^sТс^s-трансформанты выращивали 16 ч при 37° С в 5 мл среды LB, содержащей ампициллин (20 мкг/мл), осаждали центрифугированием при 0° С, плазмидную ДНК выделяли по методу, описанному в работе [22].

Анализ ДНК рекомбинантных плазмид. ДНК рекомбинантных плазмид из трех клонов (плазмиды рHS3, рHS6 и рHS12) подвергли рестрикционному анализу. Для этого 5 мкг ДНК растворяли в 30 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl (рН 7,9), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂ и 10 мМ меркаптоэтанол, и гидролизовали 1 ч при 37° С в присутствии эндонуклеаз *Bsu*RI, смеси *Bsu*RI и *Eco*RI или *Bsu*RI и *Bam*HI (по 3 ед. акт. каждой нуклеазы). Гидролизат фракционировали в 8% ПАГ (трис-боратный буфер, рН 8,3; 6 ч, 150 В), используя в качестве маркеров продукты гидролиза ДНК плазмид рBR322 и рBR325 эндонуклеазами *Msp*I и *Bsu*RI. Гель окрашивали раствором бромистого этидия. В *Bsu*RI-гидролизатах всех проанализированных плазмид обнаружен фрагмент ДНК, содержащий сайты эндонуклеаз *Eco*RI и *Bam*HI. Определение первичной структуры этого фрагмента подтвердило наличие в его составе последовательности полинуклеотида (I).

Синтез белка в бесклеточной системе и анализ продуктов экспрессии плазмиды рHS12. Получение препарата S30 из клеток *E. coli* Q13 и синтез белка осуществляли в основном по методу Зюбей и соавт. [23] с некоторыми модификациями. Клетки разрушали лизоцимом. Из стандартной реакционной смеси [23] исключали 3',5'-*cyclo*-AMP, CaCl₂, полиэтиленгликоль и все витамины, кроме фолиевой кислоты. Концентрацию ацетата магния снижали до 8,5 мМ. Пробы объемом 50 мкл содержали 50 мкКи [³⁵S]метионина (уд. акт. 1320 Ки/ммоль), 5 мкг ДНК плазмиды (рHS12 или рBR325) и 0,25–0,3 мг белков фракции S30. Пробы инкубировали 1 ч при 36° С, центрифугировали 10 мин при 20 000 об/мин, ³⁵S-меченые белки супернатанта разделяли в 15% ПАГ в буферной системе Лэммли [24]. Наносимые пробы были стандартизованы по ³⁵S-метке (500 000 имп/мин).

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории биохимии вирусов Института вирусологии В. А. Карпову за помощь в лигазной «сборке» полинуклеотида (I), Г. Н. Мизяковой за выращивание и выделение плазмид и С. Н. Хилько за участие в обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lamb J. R., Eckels D. D., Lake P., Woody J. N., Green N. Nature, 1982, v. 300, № 5887, p. 66-69.
2. Baron M. N., Baltimore D. Cell, 1982, v. 28, № 2, p. 395-404.
3. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A., Rowlands D. J., Brown F. Nature, 1982, v. 298, № 5869, p. 3033.
4. Lerner R. A., Green N., Alexander H., Fu-Tong-Liu, Sutcliffe J. G., Shinnick T. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 6, 3403-3407.
5. Hopp T. P., Woods K. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 6, p. 3824-3828.
6. Prince A. M., Ikram H., Hopp T. P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 2, p. 579-582.
7. Dreesman G. R., Sanchez Y., Ionescu-Matiu J., Sparrow J. T., Six H. R., Peterson D. L., Hollinger F. B., Melnick J. L. Nature, 1982, v. 295, № 5845, p. 158-160.
8. Bhatnagar P. K., Papas E., Blum H. E., Milich D. R., Nitecki D., Karls M. J., Vyas G. N. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 14, p. 4400-4404.
9. Valenzuela P., Gray P., Quiroga M., Laldivar J., Goodman H. M., Rutter W. J. Nature, 1979, v. 280, № 5725, p. 815-819.
10. Galibert F., Mandart E., Fitoussi F., Tiollais P., Charnay P. Nature, 1979, v. 281, № 5733, p. 646-650.
11. Charnay P., Mandart E., Hampe A., Fitoussi F., Tiollais P., Galibert F. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 2, p. 335-346.
12. Neurath A. R., Strick N., Oleszko W. R. J. Virol. Methods, 1981, v. 3, № 3, p. 115-125.
13. Post L. E., Nomura H. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 12, p. 4660-4666.
14. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353-371.
15. Берлин Ю. А., Звонко Н. М., Каюшин А. Л. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1182-1195.
16. Maxam A. M., Gilbert W. In: Methods in Enzymology / Eds Grossman L., Moldave K. New York - London: Acad. Press, 1980, v. 65, p. 499-560.
17. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. Nucl. Acids Res., 1974, v. 1, № 3, p. 331-353.
18. Crea R., Krasziewski A., Hirose T., Itakura R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 12, p. 5765-5769.
19. Берлин Ю. А., Тактакишвили М. О., Колосов М. П., Заалишвили Н. М. Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 5, с. 710-720.
20. Choen S. N., Chang A. C. Y., Hsu L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 8, p. 2110-2114.
21. Миллер Д. В кн.: Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976, с. 395.
22. Birnboim H. C., Doly J. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 6, p. 1513-1523.
23. Zubay G., Chambers D. A., Cheong L. S. In: The Lactose Operon / Eds Beckwith G. R., Zipser D. Cold Spring Harbor Laboratory, 1970, p. 375-391.
24. Laemmli U. K. Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680-685.

Поступила в редакцию
4.IV.1983

SYNTHESIS AND EXPRESSION OF THE DNA FRAGMENT CODING FOR ANTIGENIC DETERMINANT OF THE PROTEIN OF HEPATITIS VIRUS B SURFACE ANTIGEN

SMIRNOV V. D., SERGIENKO O. V., SKRIPKIN E. A.,
DUBICHEV A. G., LUNIN V. G., GRIGORIEV V. G.,
TIKHONENKO T. I., KARELIN V. P.

D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow;
K. I. Skryabin Academy of Veterinary, Ministry of Agriculture
of the USSR, Moscow

With the use of chemical-enzymatic synthesis, a polynucleotide (I) has been obtained which codes the amino acid sequence 93-109 of the hepatitis B surface antigen (HBsAg). The plasmid pHS12, constructed by insertion of (I) into pBR325 between *EcoRI* and *BamHI* sites, transformed *E. coli* HB101 cells. The plasmid expression in cell-free system produced a himeric protein, its molecular weight corresponding to that a polypeptide containing the heptadecapeptide from HBsAg. An approach is discussed for creating a new type of vaccines on the basis of himeric proteins containing the antigenic determinants of virus proteins.