



УДК 577.213.7

## КЛОНИРОВАНИЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ДНК

*Амирханов Н. В., Кузнецов К. Д., Ривкин М. И.,  
Кумарев В. П.*

*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск*

Клонирование синтетических ДНК до последнего времени обычно осуществляли, встраивая в векторную ДНК двухцепочечные фрагменты, в которых либо обе цепи были синтезированы химическим [1] или химико-ферментативным [2, 3] путем, либо одна из цепей была получена ферментативным способом [4, 5].

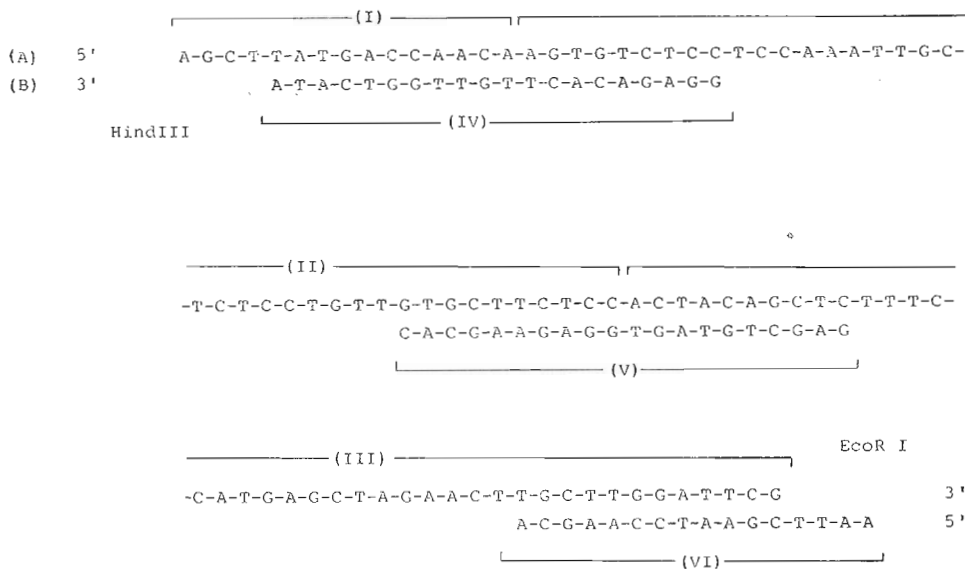
Цель данной работы — проверка принципиальной возможности клонирования одноцепочечной синтетической ДНК без дополнительной сборки второй комплементарной цепи.

Для клонирования был использован одноцепочечный полинуклеотид А (см. схему) длиной 93 нуклеотидных звена (н.з.), включающий в себя лидерную последовательность гена человеческого фибробластного интерферона [6]. Этот фрагмент был собран из химически синтезированных нами полинуклеотидов (I) — (III) длиной соответственно 15, 38 и 40 н.з. по методу, разработанному в нашей лаборатории. Согласно этому методу, полинуклеотидная цепь собирается лигированием синтетических фрагментов на коротких комплементарных им олигонуклеотидах («подложках» или «штифтах»), такие «подложки» не составляют в свою очередь сплошную комплементарную цепь. Встраивание полинуклеотида А в плазмидный вектор проводили в присутствии олигонуклеотидов (IV) и (VI), комплементарных соответственно 5'- и 3'-концам этого полинуклеотида. Олигонуклеотид (VI) использовали в данном случае в качестве «штифта» при лигазной сшивке полинуклеотида А с вектором.

В качестве вектора мы использовали плазмиду pBR327, которая была предварительно гидролизована рестриктазами *EcoRI* и *HindIII*. Смесь, состоящая из 1 пмоль одноцепочечного полинуклеотида А, 50 пмоль олигонуклеотида (IV), 50 пмоль олигонуклеотида (VI), 0,2 мкг плазмидной ДНК в 20 мкл 20 мМ трис-НСI-буфера (рН 7,6), содержащего 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ β-меркаптоэтанол и 0,1 мМ АТФ, была обработана 2 ед. акт. ДНК-лигазы фага T4 (4°С, 24 ч). Полученной смесью трансформировали клетки *E. coli* JC5183 по методу [7] и трансформанты отбирали на агаризованной среде с 50 мкг/мл ампицилина. С помощью гибридизации колоний на нитроцеллюлозных фильтрах [8] с <sup>32</sup>P-мечеными олигонуклеотидами (I) и (VI) из 550 полученных клонов было отобрано 400 трансформантов, гибридизующихся с обоими олигонуклеотидными зондами.

Для сравнения эффективности встраивания в зависимости от длины «штифта» в тех же условиях было осуществлено конструирование по второму варианту, где вместо олигонуклеотида (VI) длиной 16 н.з. был взят удлинённый олигонуклеотид ААТТССГААТССААГСААГТТСТАГСТСАТ·GGAAAGAGCTGTAGT в 44 н.з. (подчеркнута последовательность (VI)). После трансформации в этом варианте было получено 310 колоний-трансформантов, из них 155 колоний гибридизовались одновременно с олигонуклеотидами (I) и (VI). Таким образом, показано, что эффективность встраивания в присутствии «штифта» длиной 16 н.з. по крайней мере не хуже, чем при использовании более длинного «штифта».

Плазмиды из четырех произвольно выбранных гибридных клонов (условно обозначенных нами К1, К2, К3 и К4) были подвергнуты гидро-



Первичная структура фрагмента ДНК, включающего в себя лидерную последовательность гена человеческого фибробластного интерферона [6]. (I)–(VI) – синтезированные химическим способом олигонуклеотиды. Цепь А и олигонуклеотиды (IV) и (VI) использованы при клонировании в составе векторной плазмиды. Олигонуклеотиды (IV) и (V) использованы в качестве «штифтов» при лигазной сборке цепи А

лизу рестриктазами *EcoRI* и *HindIII* с последующим секвенированием полученных вставок по методу Максама – Гилберта [9]. Такой анализ показал наличие в трех из них ожидаемой вставки размером 93 нуклеотидные пары (н.п.) (клоны К1, К2 и К3) и в одном клоне – вставки размером на 16 н.п. больше ожидаемой (клон К4). Первичная структура *EcoRI/HindIII*-вставок, полученных из клонов К1, К2 и К3, полностью соответствует структуре исходного полинуклеотида А. *EcoRI/HindIII*-вставка из клона К4 имеет структуру, схожую с полинуклеотидом А, отличающуюся лишь последним нуклеотидом на 3'-конце и дополнительными 16 н.п. (эти данные будут опубликованы позже).

Таким образом, нами продемонстрирована принципиальная возможность клонирования синтетических ДНК в виде одноцепочечного фрагмента с использованием коротких концевых олигонуклеотидов, образующих структуры соответствующих сайтов для лигазного сшивания с векторной ДНК. Такой способ позволяет, во-первых, экономить труд и время, расходовавшиеся ранее на лигажную сшивку второй цепи [3], а во-вторых, при использовании возможностей современного способа синтеза довольно длинных полинуклеотидов [1, 5, 10] уменьшить затраты труда также на химический синтез исходных олигонуклеотидных блоков. В случае же полного химического синтеза одной из цепей клонируемой ДНК необходимость в синтезе комплементарной цепи отпадает вообще.

Авторы выражают благодарность Л. В. Обуховой за получение большого *EcoRI/HindIII*-фрагмента плазмиды pBR327.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Adams S. P., Kavka K. S., Wykes E. J., Holder S. B., Galuppi G. R. J. Amer. Chem. Soc., 1983, v. 105, № 3, p. 661–663.
2. Edge M. D., Greene A. R., Heathcliffe G. R., Meacock P. A., Schuch W., Scanlon D. B., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F. Nature, 1981, v. 292, p. 756–762.
3. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Северцова И. В., Колосов М. Н. Докл. АН СССР, 1984, т. 278, № 5, с. 1250–1253.
4. Rossi J. J., Kierzek R., Huang T., Walker P. A., Itakura K. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 16, p. 9226–9229.
5. Rink H., Lierch M., Sieber P., Meyer T. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 16, p. 6369–6387.

6. Taniguchi T., Matei N., Schwarzstein M., Nagata S., Muramutsu M., Weissmann C. Nature, 1980, v. 285, p. 547-550.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984, с. 241-242.
8. Thayer R. E. Anal. Biochem., 1978, v. 98, № 1, p. 60-63.
9. Maxam A., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 3, p. 560-564.
10. Efimov V. A., Buryakova A. A., Reverdatto S. V., Chakhmakheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. Nucl. Acids Res., 1983, v. 12, № 23, p. 8369-8387.

Поступило в редакцию  
21.III.1985

## CLONING OF SINGLE-STRANDED SYNTHETIC DNA

AMIRKHANOV N. V., KUZNEDELOV K. D., RIVKIN M. I., KUMAREV V. P.

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the  
Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The method for cloning a single-stranded synthetic DNA with the short complementary oligonucleotides, that form corresponding restriction sites, is proposed. The potency of the method is demonstrated by cloning a single-stranded polynucleotide A (93 nucleotide residues (n. r.)) in plasmid vector pBR327. The polynucleotide A includes a leader structure of the human fibroblast interferon gene. Oligonucleotides (IV) (20 n.r.) and (VI) (16 n.r.) were taken as strengthening complements and to create the sticky ends for the restrictases *HindIII* and *EcoRI*. 72% of the obtained clones appeared to be hybrid. Four hybrid clones were analyzed, and three of them carried the desirable insertion. The primary structures of these insertions are confirmed by sequencing.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

---

Сдано в набор 19.06.85	Подписано к печати 13.08.85	Т-15993	Формат бумаги 70×108 <sup>1/16</sup>
Высокая печать	Усл. печ. л. 12,6	Усл. кр.-отт. 11,6 тыс.	Уч.-изд. л. 14,5
	Тираж 890 экз.	Зак. 1506.	Бум. л. 4,5

---

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Наука»,  
103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21  
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 6