



УДК 577.213.7

**СИНТЕЗ И КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТА ДНК,
СОДЕРЖАЩЕГО ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ САЙТ СВЯЗЫВАНИЯ
ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ мРНК С РИБОСОМОЙ****Синяков А. Н., Серпинский О. И., Данилюк Н. Б.**Всесоюзный научно-исследовательский институт
молекулярной биологии, п. Кольцово Новосибирской обл.*

Твердофазным триэфирным методом с использованием в качестве нуклеофильного катализатора калиевой соли 3-нитро-1,2,4-триазола в присутствии 18-краун-6 синтезировали ряд олигонуклеотидов, в том числе два полинуклеотида длиной 33 нуклеотидных остатка. Частично комплементарные полинуклеотиды достроили с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) до полного дуплекса, который расщепили эндонуклеазой *SalGI* и клонировали в плазмиде pUR222. Синтезированный фрагмент ДНК предшествует гену человеческого γ -интерферона в хромосоме и содержит предполагаемый сайт связывания мРНК с рибосомой.

Ранее ** нами была установлена эффективность «обнаженных анионов» 3-нитро-1,2,4-триазола (далее нитротриазол) для катализа реакции триэфирной конденсации. Применение калиевой соли нитротриазола в присутствии 18-краун-6 в качестве нуклеофильного катализатора позволило значительно интенсифицировать триэфирный метод получения олигодезоксинуклеотидов, приблизив его по выходам и скорости синтеза целевых продуктов к фосфитному методу. Первоначально ** в качестве носителя мы использовали модифицированный силикагель [1].

В настоящей работе мы исследовали применимость широко распространенного набухающего стиролдивинилбензолного полимера со степенью сшивки 2% для синтеза как олиго-, так и полинуклеотидов блочным вариантом предложенного способа с наращиванием олигонуклеотидной цепи от 3'-к 5'-концу. Фосфатным компонентом в этом случае служили 3-п-хлорфениловые эфиры защищенных динуклеозидифосфатов в концентрации 0,08—0,1 М. Конденсацию проводили в абс. пиридине в присутствии смеси 1-метилэтилсульфонил-3-нитро-1,2,4-триазола (0,5 М), калиевой соли нитротриазола (0,3 М) и 18-краун-6 (0,3 М). В конденсации использовали 3 экв. динуклеозидифосфатных производных по отношению к гидроксильному компоненту, закрепленному на полимерном носителе. На примере модельного синтеза нонацитидилата мы установили **, что оптимальное время проведения одной конденсации составляет 15 мин, что в 3 раза больше, чем при конденсации 3-п-хлорфениловых эфиров защищенных нуклеозидов с гидроксильным компонентом, присоединенным к силикагелю. Необходимость более длительного проведения конденсации в данном случае связана с диффузионным контролем реакций на набухающих полимерных носителях [2], а также с меньшей скоростью конденсации с 3-п-хлорфениловыми эфирами нуклеозидов вследствие стерических факторов [3].

Предложенным методом нами получен ряд олигонуклеотидов (таблица). Выход на одну стадию наращивания цепи в расчете на выделенный продукт составил 76—81%. Среди полученных соединений два 33-звенных полинуклеотида (I) и (II), которые, как и олигонуклеотиды, были выделены из реакционных смесей ионообменной хроматографией (рис. 1). Выход выделенного полинуклеотида (I) составил 1,9%, выход (II) — 1,35%. Пер-

* В формулах нуклеотидов префикс «d» (дезокс) для краткости опущен.

** Сообщение будет опубликовано в одном из ближайших номеров журнала «Биоорганическая химия».

Рис. 1. Хроматография на ионообменнике [4] реакционной смеси синтеза полинуклеотида (I) после удаления всех защитных групп. Элюцию проводили в градиенте концентрации K_2HPO_4 в 30% CH_3CN . Пунктирными линиями показана фракция, содержащая продукт синтеза

Рис. 2. Результаты гель-электрофореза при определении структуры полинуклеотида (II) (а) и клонированного фрагмента ДНК, содержащего нетранслируемую последовательность, предшествующую гену человеческого γ -интерферона (б)

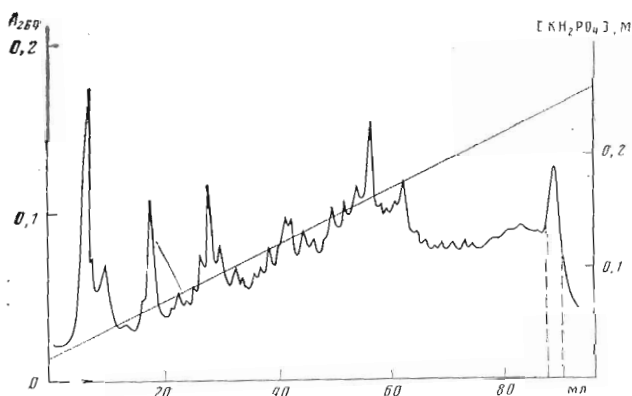


Рис. 1

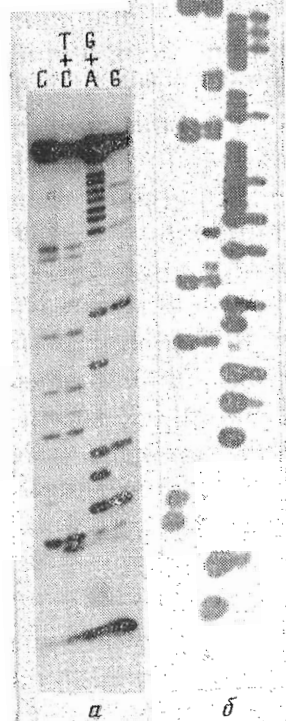


Рис. 2

вичная структура индивидуальных олиго- и полинуклеотидов подтверждена методом Максама — Гилберта: на рис. 2а приведено доказательство структуры полинуклеотида (II). Синтезированные полинуклеотиды использовали для создания генетической конструкции, содержащей ДНК-копию нетранслируемого фрагмента мРНК, предшествующего гену человеческого γ -интерферона.

Хорошо известно, что подавляющее число мРНК имеет нетранслируемую 5'-концевую последовательность [5, 6]. Эти так называемые лидерные последовательности мРНК играют важную роль в процессе инициации трансляции у прокариот [7]. Однако в отличие от прокариот для эукариотических лидерных мРНК до настоящего времени не сложилось четкого представления об их структурной организации и функции при инициации трансляции. Существует ряд гипотез; в частности, авторы работы [8] предположили у эукариотических лидерных мРНК наличие сайта связывания с рибосомой, который взаимодействует с 18S рРНК. Предполагаемый в этой работе сайт имеет структуру AUCCACC. Нетранслируемая об-

Синтезированный нуклеотид	Время конденсации, мин	Количество исходного нуклеотида на носитель, ммоль	Выход конечного продукта синтеза		
			ОЕ ₂₆₀	% (на исходный нуклеотид)	% (средний на цикл наращивания цепи)
CCCCCCCCCC	5	5,0	48,0	14,7	61,9
CCCCCCCCCC	10	3,85	57,1	22,6	69,0
CCCCCCCCCC	15	2,8	78,3	42,2	80,6
CCCCCCCCCC	30	5,0	139,0	42,3	80,7
СТААТГТАТТТГСТС	15	3,35	87,6	17,1	77,7
СТСТААТГТАТТТГСТС	15	3,35	67,6	11,9	76,7
CCCCGTCGACACTTCTTTGGCTTAATTCTCTCG (I)	15	4,0	23,9	1,9	78,1
CCCCGATCGAGCTCATCGTTTCCGAGAGAATTA (II)	15	4,0	18,8	1,35	76,4

ласть мРНК, предшествующая гену человеческого γ-интерферона, содержит последовательность нуклеотидов, имеющих высокую степень гомологии с этим сайтом. Поэтому с целью изучения влияния структуры мРНК перед точкой инициации трансляции на эффективность экспрессии гена в эукариотической клетке нами осуществлен химико-ферментативный синтез ДНК копии этого фрагмента.

Целевой фрагмент был получен в соответствии с предложенным Итакурой и сотр. [9] способом из двух частично комплементарных полинуклеотидов (I) и (II) (рис. 3) путем достройки их ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) и последующего клонирования полученного дуплекса. Полинуклеотиды (I) и (II) содержат целевой фрагмент, фланкированный рестрикционными сайтами *SalGI* и *PvuI* (*Sau3A*). Кроме того, для обеспечения возможности расщепления дуплекса этими эндонуклеазами он содержит на 5'- и 3'-концах соответственно последовательности CCC и GGG. Дуплекс, полученный после достройки полинуклеотидов (I) и (II), можно было клонировать разными способами. Нами был выбран вариант клонирования в векторе pVR222 с затупленным *PstI*- и липким *SalGI*-концами. Это приводит к появлению рядом с клонированным фрагментом в гибридной плазмиде двух дополнительных сайтов эндонуклеаз, *EcoRI* и *BamHI*, и сохранению сайтов, присутствующих в самом фрагменте. Наличие большого числа разных рестрикционных сайтов упрощает генно-инженерные операции с клонированным фрагментом. Структура фрагмента после клонирования была подтверждена анализом по методу Максама — Гилберта (рис. 26).

Таким образом, в настоящей работе с помощью предложенного нами варианта высокоэффективного метода синтеза олиго- и полинуклеотидов получена ДНК-копия нетранслируемой области мРНК, содержащая

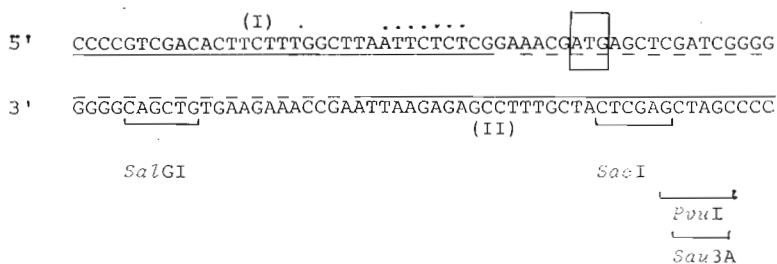


Рис. 3. Полученный химико-ферментативным способом фрагмент ДНК, содержащий нетранслируемую нуклеотидную последовательность, предшествующую гену человеческого γ-интерферона. Сплошной линией подчеркнуты полинуклеотиды (I) и (II), полученные химическим синтезом, штриховой — участки фрагмента, достроенные с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова). Кодон инициации трансляции выделен рамкой, гипотетический сайт связывания мРНК с рибосомой — точками. Участки узнавания эндонуклеазами рестрикции отмечены скобкой

участок, гомологичный предполагаемому сайту связывания мРНК с рибосомой. Этот фрагмент можно использовать для получения рекомбинантных ДНК, содержащих разнообразные структурные гены, с целью изучения их экспрессии. Кроме того, его можно применять как специфический зонд для выявления последовательностей ДНК, содержащих ген γ -интерферона человека, методом гибридизации нуклеиновых кислот.

Экспериментальная часть

В работе использовали: рестрикционные эндонуклеазы *SalGI* (КФ 3.1.23.37), *EcoRI* (КФ 3.1.23.13), *BspI* (КФ 3.1.23.62), *PstI* (КФ 3.1.23.31) производства ВНИИ прикладной энзимологии (Вильнюс), Т4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78) и дезоксирибонуклеозиды производства НИКТИ БАВ (Бердск), ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) (КФ 2.7.7.7) (любезно предоставлена В. Г. Коробко, ИБХ, Москва), дезоксирибонуклеотид-5'-трифосфаты (Sigma, США), бумагу DE-81 (Whatman, Англия), биогель P-2 (Bio-Rad Laboratories, США), Sephadex G-50, тонкий (Pharmacia, Швеция), тетраметилгуанидин (Fluka, Швейцария), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1000 Ки/ммоль), $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ (1000 Ки/ммоль) и 18-краун-6 отечественного производства.

Получение *n*-нитробензальдоксимата тетраметилгуанидиния, введение якорной карбоксильной группы и первого нуклеозидного звена в полимер осуществляли как описано в работе [10].

Общая методика синтеза олигонуклеотидов. Цикл наращивания олигонуклеотидной цепи включает детритилирование полимер-нуклеозида (-олигонуклеотида) и проведение стадии конденсации. Детритилирование осуществляли перемешиванием навески полимера, содержащего 5 мкмоль тритилнуклеозида (олигонуклеотида), в 2 мл 3% CCl_3COOH в хлороформе в течение 3 мин при 20° С. Полимер отфильтровывали, добавляли новую порцию кислоты и перемешивали еще 3 мин. Затем полимер отфильтровывали, промывали хлороформом (3 × 4 мл) и пиридином (3 × 4 мл). Детритилированный полимер-нуклеозид (-олигонуклеотид), 15 мкмоль $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{Np}(\text{PhCl})\text{N}(\text{PhCl})$, 45 мкмоль калиевой соли нитротриазола и 45 мкмоль 18-краун-6 высушивали упариванием с абс. пиридином (3 × 3 мл), добавляли 0,15 мл абс. пиридина и 75 мкмоль 1-метилтенсульфонил-3-нитро-1,2,4-триазола, перемешивали 15 мин. Затем полимер отфильтровывали, промывали пиридином (1 × 3 мл) и хлороформом (3 × 3 мл). Далее цикл наращивания цепи повторяли.

Полное удаление защитных групп и выделение олигонуклеотидов. После завершения последней стадии синтеза полимер-олигонуклеотид детритилировали, отмывали хлороформом (3 × 3 мл), пиридином (3 × 3 мл) и обрабатывали в течение 36 ч 0,5 М раствором *n*-нитробензальдоксимата тетраметилгуанидиния в смеси пиридин — вода (7 : 3). Полимер отфильтровывали и промывали пиридином (3 × 5 мл) и 50% водным пиридином (3 × 5 мл). Фильтраты объединяли и упаривали досуха. К остатку добавляли 10 мл конц. аммиака и выдерживали 12 ч при 20° С. После удаления защитных групп реакционную смесь обессоливали на колонке (2,5 × 25 см) с биогелем P-2 и хроматографировали на ионообменнике [4], а затем — на LiChrosorb RP18. Выходы целевых олигонуклеотидов приведены в таблице.

Синтез дуплекса, содержащего предполагаемый сайт связывания мРНК с рибосомой. Полинуклеотиды (I) и (II) (по 20 пмоль после ионообменной хроматографии обессоливали на колонке (0,4 × 25 см) с сефадексом G-50 в буфере, содержащем 1 мМ трис-НCl (рН 7,8) и 0,1 мМ EDTA. Фракции с полинуклеотидами упаривали до объема 40 мкл. Для получения полного дуплекса брали по 10 пмоль каждого полинуклеотида. Достройку дуплекса проводили при 10° С в течение 40 мин в 50 мкл буфера, содержащего 20 мМ трис-НCl (рН 7,6), 10 мМ MgCl_2 , 10 мМ 2-меркаптоэтанол (буфер А), четыре dNTP (каждый в концентрации 100 мкм) и 7 ед. акт. ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова). По окончании реакции смесь прогревали 15 мин при 65° С, добавляли NaCl до концентрации

150 мМ, новую порцию 2-меркаптоэтанола до концентрации 10 мМ и гидролизировали эндонуклеазой *SalGI* (10 ед. акт.) в течение 3 ч при 37° С. Затем фрагмент осаждали этанолом и наносили на 8% ПААГ. Электрофорез проводили в течение 3 ч при 10 В/см в буферном растворе, содержащем 40 мМ трис-ацетат (рН 8,0), 20 мМ ацетат натрия, 1 мМ EDTA. Из геля фрагмент выделяли электроолюцией на бумагу DE-81, как описано в работе [11].

Получение рекомбинантных плазмид. 10 мкг ДНК рUR222 с клонированным по *SalGI*-сайту фрагментом длиной ~950 п.о. (получен ранее из эукариотического источника) гидролизировали эндонуклеазой *PstI*, как описано в работе [12], затем добавляли 7 ед. акт. ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и инкубировали 45 мин при 20° С. По окончании реакции смесь прогревали 15 мин при 65° С, добавляли NaCl до концентрации 150 мМ и гидролизировали эндонуклеазой *SalGI* (5 ед. акт.), как описано выше. Полученные фрагменты разделяли в 3,5% ПААГ, векторную часть элюировали из ПААГ аналогично синтезированному дуплексу. В лигазную реакцию брали 0,1 пмоль ДНК рUR222 (с тупым *PstI*- и липким *SalGI*-концом) и 1 пмоль синтетического дуплекса. Реакцию проводили в 30 мкл при 10° С в течение 14 ч, как описано в работе [13]. Третью часть реакционной смеси использовали для трансформации клеток *E. coli* ВМН 71-18 [14], обработанных CaCl₂. Трансформанты отбирали на 1,5% LB-агаре, содержащем 50 мкг/мл ампициллина. Выросшие клоны были проанализированы методом ДНК — ДНК-гибридизации [15] с помощью [³²P]ДНК-зонда, полученного путем достройки 1 пмоль полинуклеотидов (I) и (II) до полного дуплекса в присутствии 15 мкКи [α-³²P]dTTP, dGTP, dATP и dCTP (условия достройки см. выше). Из двух гибридизующихся клонов была выделена плазмидная ДНК.

Структурный анализ ДНК. 40 мкг ДНК гидролизировали эндонуклеазой *BspI* (30 ед. акт.) в 160 мкл буфера А в течение 1 ч при 37° С. Затем в реакционную смесь добавляли 30 ед. акт. эндонуклеазы *EcoRI* и инкубировали смесь 1 ч при 37° С. По окончании реакции раствор прогревали 2 мин при 65° С. Полученный набор рестриктов разделили электрофорезом в 6% ПААГ. Фрагмент длиной 267 п.о., содержащий синтетическую вставку, выделяли электроолюцией на бумагу DE-81, нуклеотидный материал элюировали 10 мин с бумаги 2 М LiCl (2 × 20 мкл) при 55° С, осаждали ацетоном, осадок промывали ацетоном, спиртом и сушили в вакууме. Выделенный фрагмент (25 пмоль) растворяли в 20 мкл буфера А, добавляли dATP, dCTP до концентрации 100 мкМ, 20 мкКи [α-³²P]dTTP, 4 ед. акт. ДНК-полимеразы I и смесь инкубировали 15 мин при 20° С. Затем добавляли 5 мкл 0,1% ксилендианола в формамиде и выделяли меченый фрагмент электрофорезом в 10% ПААГ с 7 М мочевиной. Фрагмент элюировали из геля и определяли его нуклеотидную последовательность модифицированным методом Максама — Гилберта [16].

Авторы выражают благодарность С. И. Ястребову и Т. П. Артамоновой за проведение анализов нуклеотидных последовательностей поли- и олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. Биоорг. химия, 1986, т. 12, № 2 с. 213—219.
2. Реакция на полимерных подложках в органическом синтезе/Ред. Ходж П., Шеррингтон Д. М.: Мир, 1983, с. 84—87.
3. Ikuta S., Chattopadhyaya R., Dickerson R. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 16, p. 6511—6522.
4. А. с. 1153976 (СССР). Способ получения сорбента/Ястребов С. И. Оpubл. в Б. И., 1985, № 17.
5. Kozak M. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 2, p. 857—872.
6. Gren E. J. Biochimie, 1984, v. 66, № 1, p. 1—29.
7. Shine J., Dalgarno L. Nature, 1975, v. 254, № 5495, p. 34—38.
8. Sargan D. R., Gregory S. P., Butterworth P. H. W. FEBS Lett., 1982, v. 147, № 2, p. 133—136.
9. Rossi J. J., Kierzek R., Hung T., Walker P. A., Itakura K. J. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 16, p. 9226—9229.

10. Сinyaков А. Н., Ломакин А. И., Ямщиков В. Ф., Попов С. Г. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 4, с. 490—498.
11. Кравченко В. В., Серпинский О. И., Сinyaков А. Н., Попов С. Г. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 2, с. 220—225.
12. Маниатис Т., Фриз Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984, с. 107—117.
13. Rütger U., Kosken M., Otto K., Müller-Hill B. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 16, p. 4087—4098.
14. Серпинский О. И., Каргинова Е. А., Микрюков Н. Н., Кравченко В. В., Зайчиков Е. Ф., Максимова Т. Т., Оликиенко А. И., Плетнев А. Г., Митина Ю. Л. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 840—846.
15. Grunstein M., Hogness D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, № 10, p. 3961 — 3965.
16. Maxam A. M., Gilbert W. Methods Enzymol., 1980, v. 65, p. 499—560.

Поступила в редакцию
25.VII.1985
После доработки
26.IX.1985

SYNTHESIS AND CLONING OF THE DNA FRAGMENT CONTAINING A PUTATIVE SITE FOR EUKARYOTIC mRNA BINDING TO RIBOSOME

SINYAKOV A. N., SERPINSKI O. D., DANILYUK N. K.

*All-Union Research Institute of Molecular Bio'ogy,
Kol'tovo, Novosibirsk Region*

A series of oligonucleotides, including two polynucleotides of 33 bases long, were synthesized by a solid-phase phosphotriester method. Potassium salt of 3-nitro-1,2,4-triazole in the presence of 18-crown-6 ether was used as nucleophilic catalist. The partly complementary polynucleotides were elongated by DNA-polymerase I (Klenow fragment) to the full duplex, which was digested with *SalGI* and was inserted into a plasmid pUR222. The synthesized DNA fragment precedes the gene of human γ -interferon in the chromosome and contains the site for mRNA binding to ribosome.