



УДК 577.214

ПЛАЗМИДНЫЙ ВЕКТОР pSSC1 ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ
СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ И ИХ РЕГЕНЕРАЦИИ
С УНИКАЛЬНОЙ КОНЦЕВОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ

Кузнецов К. Д., Колочева Т. И., Ривкин М. И.,
Кумарев В. П.

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск

Клонирование генов, полученных путем химического синтеза, на практике осуществляется в двух вариантах. Один вариант предполагает клонирование генов, которые полностью собираются *in vitro* из синтетических олигонуклеотидов [1]. В другом варианте используют молекулярное субклонирование для выделения и очистки отдельных фрагментов ДНК гена, предназначенных для последующей их сборки в полную последовательность [2]. Использование такого блочного метода клонирования синтетических генов требует разбивки полной последовательности на фрагменты, имеющие на концах рестриктивные сайты. Такая разбивка может быть затруднена отсутствием: а) соответствующих рестриктаз; б) подходящих векторов, содержащих необходимые для встройки клонируемых фрагментов сайты рестрикции; в) рестрикционных сайтов внутри гена или возможности перекодировки (с учетом вырожденности кода) участков внутри гена под рестрикционные сайты, по которым проводится разбивка. Эти проблемы удачно были решены авторами работы [3], предложившими удобный общий метод регенерации клонированных фрагментов ДНК независимо от их структуры и наличия рестриктивных сайтов на концах дуплекса. Этот метод, основанный на применении специальных векторов pBBV и эндонуклеазы рестрикции *BbvII*, был успешно использован для клонирования гена, кодирующего белок вириона VP1 вируса ящура [4].

Единственным неудобством этого метода, как нам кажется, является тот факт, что встраивание клонируемого фрагмента в вектор осуществляется по тупым концам, образованным рестриктазой *SmaI*. Известно, что лигирование по тупым концам гораздо менее эффективно, чем по липким, что ведет к меньшему выходу рекомбинантов. Мы попытались сконструировать плазмидный вектор pSSC1, который был бы лишен этого неудобства.

Вектор pSSC1 сконструирован на основе плазмиды pBR327 [5]. Для этой цели синтезирован полилинкер, содержащий сайты рестрикции для ферментов *FokI*, *HgaI*, *EcoRI*, *PstI*. На рис. 1 приведена схема вектора и показано взаимное расположение сайтов рестрикции в полилинкере. Расщепление эндонуклеазой *FokI* происходит в положении 9/13 по отношению к сайту узнавания, а *HgaI* — в положении 5/10, как изображено на рис. 2 [6, 7]. При этом образуются фрагменты с 5'-выступающими тетра-нуклеотидными (*FokI*) и пентануклеотидными (*HgaI*) концами любой произвольной последовательности. В отличие от *BbvII*, *FokI* и *HgaI* расщепляют ДНК значительно дальше от сайта узнавания, что позволяет в нуклеотидной последовательности между сайтом узнавания и местом расщепления ДНК разместить сайты для клонирования *EcoRI*-*PstI*-фрагментов (рис. 2). Расположение рестриктивных сайтов *EcoRI* и *PstI* таково, что эндонуклеазы *FokI* и *HgaI*, гидролизующие ДНК в одном месте, отсекают эти сайты от клонированных по ним фрагментов. Наличие в полилинкере сайтов узнавания для двух рестриктаз, *FokI* и *HgaI*, по-

Рис. 1. Схема плазмидного вектора pSSC1 (вверху). Первичная структура полилинкера (внизу): прописными буквами представлены структуры синтезированных олигонуклеотидов длиной 33 (верхняя цепь) и 41 (нижняя цепь) остатков, встроенных в плазмиду pBR327 по *EcoRI*- и *PstI*-сайтам

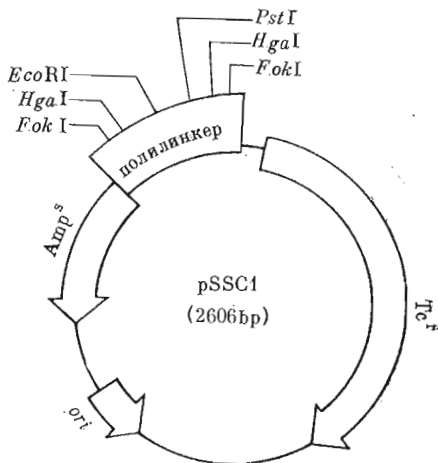


Рис. 2. Схема применения полилинкера pSSC1 для клонирования и регенерации синтетических полинуклеотидов ДНК

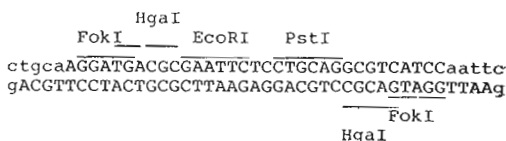


Рис. 1

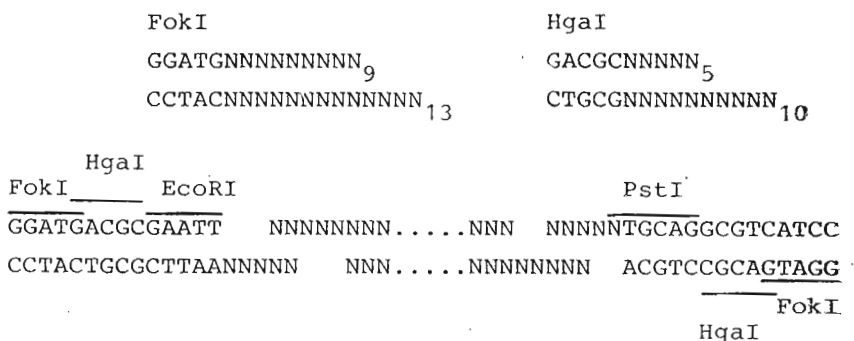


Рис. 2

звояет избежать тех затруднительных случаев, когда сайты узнавания, по которым осуществляется извлечение клонированных фрагментов, попадаются внутри этих фрагментов.

Использование двух разноименных сайтов рестрикции, *EcoRI* и *PstI*, в полилинкере для вставки клонируемого фрагмента в вектор pSSC1 несет в себе определенный смысл, который заключается в двух положительных моментах. Во-первых, это позволяет с высоким выходом получать рекомбинантные молекулы, поскольку предотвращается замыкание вектора самого на себя при лигазной шивке. Во-вторых, в результате гидролиза ДНК рестриктазами *EcoRI* и *PstI* образуются 5'- и 3'-выступающие одноцепочные концы, что позволяет использовать вектор pSSC1 для клонирования одноцепочечных полинуклеотидов без помощи сайтобразующих концевых олигонуклеотидов. Ранее в работе [8] была продемонстрирована возможность клонирования одноцепочечных синтетических полинуклеотидов длиной по крайней мере 93 остатка.

В данной работе были использованы два олигонуклеотида длиной 41 и 33 нуклеотида, которые были синтезированы фосфитным методом [9] на полуавтоматическом синтезаторе «Ген-1М», созданном в СКТБ СЭ и АПСО АН СССР. Синтезированные олигонуклеотиды были очищены гелеэлектрофорезом в полиакриламидном геле. Полученный полилинкер встраи-

вался в плазмиду pBR327, предварительно обработанную рестриктазами *EcoRI* и *PstI*. При этом сайты рестрикции, по которым происходило встраивание, не восстановились. Поэтому *EcoRI*- и *PstI*-сайты, находящиеся внутри полилинкера, являются уникальным в плазмиде pSSC1. Структура полилинкера подтверждена секвенированием по методу [10].

Таким образом, получен плазмидный вектор pSSC1, который позволяет извлекать клонированные по *EcoRI*- и *PstI*-сайтам фрагменты ДНК с помощью рестриктаз *FokI* и *HgaI*, отсекающих *EcoRI*- и *PstI*-сайты. Получаемые таким путем дуплексы имеют 5'-выступающие концы любой заранее заданной последовательности, что позволяет направленно сшивать их в более длинные ДНК (гены).

Авторы выражают благодарность В. Ф. Ямщикову за критические замечания и полезное обсуждение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brown E. L., Belagaje R., Ryan M. J., Khorana H. G. Meth. Enzymol., 1979, v. 68, p. 109—151.
2. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. Докл. АН СССР, 1983, т. 270, № 3, с. 743—747.
3. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Шингарова Л. Н., Быстрова Н. С., Филиппов С. А., Болдырева Е. Ф., Колосов М. П., Матвиенко Н. И., Крамаров В. М. Докл. АН СССР, 1984, т. 278, № 4, с. 1002—1005.
4. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Северцова И. В., Колосов М. П. Докл. АН СССР, 1984, т. 278, № 5, с. 1250—1253.
5. Soberon X., Covarrubias L., Bolivar F. Gene, 1980, v. 9, p. 287—305.
6. Sugisaki H., Kanazawa S. Gene, 1981, v. 16, p. 73—78.
7. Brown N. L., Smith M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 3213—3216.
8. Амирханов Н. В., Кузнецов К. Д., Ривкин М. И., Кумарев В. П. Биоорганическая химия, 1985, т. 11, № 9, с. 1283—1285.
9. Varone A. D., Tang J.-Y., Caruthers M. H. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 10, p. 4051—4061.
10. Чувило С. А., Красченко В. В. Биоорганическая химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1634—1637.

Поступило в редакцию
13.XII.1985

PLASMID VECTOR pSSC1 FOR CLONING SYNTHETIC POLYNUCLEOTIDES AND FOR THEIR REGENERATION WITH A UNIQUE TERMINAL NUCLEOTIDE SEQUENCE

KUZNEDELOV K. D., KOLOCHEVA T. I., RIVKIN M. I.,
KUMAREV V. P.

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

For subcloning separate synthetic gene fragments, a plasmid vector pSSC1 was constructed by inserting a synthetic polylinker into plasmid pBR 327 at the *EcoRI*—*PstI* sites. There are two *FokI* and *HgaI* sites at the ends of this polylinker in the opposite orientation, with the *EcoRI* and *PstI* sites between them. DNA fragments cloned at the *EcoRI* and *PstI* sites can be regenerated by either *FokI* or *HgaI*, the *EcoRI* and *PstI* sites being deleted from the cloned sequences. Such fragments have unique cohesive ends that allows their directed ligation into longer DNA (genes).