



УДК 577.213.7

ПЛАЗМИДЫ pMB123 И pMB124 — ВЕКТОРЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
СУБФРАГМЕНТОВ ДНК С ПРОИЗВОЛЬНЫМИ
«ЛИПКИМИ» КОНЦАМИ

Синяков А. П., Серпинский О. И., Данилюк Н. К.,
Чижиков В. Е., Дегтярев С. Х.

Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной
биологии, пос. Кольцово Новосибирской обл.

Для получения субфрагментов ДНК с произвольными, заранее запланированными «липкими» концами сконструированы векторы pMB123 и pMB124. Целевые векторы получены из *EcoRI-PstI*-фрагмента плазмиды pUR222 и синтетического полилинкера, содержащего между попарными сайтами эндонуклеаз рестрикции *FokI* и *HgaI* противоположной полярности набор сайтов эндонуклеаз рестрикции *SalGI*, *AccI*, *HindII*, *HindIII* (в pMB124 отсутствует) и *BamHI*. Для получения субфрагментов с произвольными «липкими» 5'-выступающими концами проводится клонирование целевой последовательности по *SalGI*- и *BamHI*-сайтам с последующей обработкой эндонуклеазами рестрикции *FokI* или *HgaI*. Применимость полученных векторов продемонстрирована на примерах получения субфрагментов с произвольно запланированными «липкими» концами, кодирующими последовательности аминокислот 32–60 и 60–98 человеческого интерлейкина-2.

В настоящее время в связи с интенсивным развитием биотехнологии все возрастающее практическое значение приобретает химико-ферментативный синтез фрагментов нуклеиновых кислот, в частности искусственных генов биологически активных пептидов и белков. Это обусловлено достоинствами данного подхода по сравнению с использованием клонированных кДНК или выделенных из природных источников геномных последовательностей [1].

Обычно, если целевой фрагмент ДНК достаточно велик, его разбивают на несколько субфрагментов, которые отдельно синтезируют, клонируют и затем собирают в целевую последовательность. Для успешного клонирования субфрагментов синтетического гена на его определенных участках должны содержаться узнаваемые эндонуклеазами рестрикции сайты, которые уникальны как для самого гена, так и для вектора, в котором он клонируется. Удобнее всего использовать сайты, имеющиеся в последовательности нуклеотидов синтезируемого гена. Однако чаще всего таких сайтов в гене нет или их недостаточно. Это обстоятельство чрезвычайно осложняет биохимическую работу, поскольку вызывает необходимость клонировать субфрагменты по сайтам, не встречающимся в последовательности нуклеотидов самого гена. В этом случае применяются различные линкеры и адаптеры. Однако при расщеплении рекомбинантной молекулы происходит не регенерация клонированной ДНК, а образование нового фрагмента, отличающегося от исходного наличием дополнительных нуклеотидов, привнесенных с линкером или адаптером. Чтобы удалить эти лишние нуклеотиды (это необходимо при сборке субфрагментов в целевую последовательность ДНК), приходится использовать специальные приемы, значительно усложняющие работу и увеличивающие ее объем [2]. Для получения после клонирования субфрагментов ДНК с произвольными, заранее запланированными «липкими» концами, удобными для сборки целевой структуры, предложено использовать несколько генетических конструкций. Прежде всего это «возвращающие» адаптеры [3, 4], отщепляемые рестриктазами *MboII* или *HgaI*. Однако из-за отсутствия универсальности и, следовательно, необходимости дополнительной работы по синтезу и присоединению к каждому новому субфраг-

менту ДНК такие адаптеры не нашли применения в генио-инженерных работах.

Для получения субфрагментов ДНК с заранее запланированными «липкими» концами более удобно применение плазмид серии pBBV [5]. Эти плазмиды содержат два сайта эндонуклеазы рестрикции *BbvII* противоположной полярности вокруг центрального сайта, по которому клонируют тупоконечный фрагмент. После клонирования рекомбинантную плазмиду гидролизуют эндонуклеазой *BbvII*, которая расщепляет полинуклеотидную цепь на расстоянии 2 нуклеотидов от 3'-конца сайта узнавания (GAAGAC) и 6 нуклеотидов от 5'-конца комплементарной ей последовательности (GTCTTC). Получаемые таким образом дуплексы — субфрагменты ДНК имеют 5'-выступающие концы любой заранее заданной последовательности.

Широкому применению плазмид серии pBBV для получения субфрагментов с заранее запланированными «липкими» концами препятствуют два обстоятельства: 1) недоступность рестриктазы *BbvII* как коммерческого препарата; 2) недостатки в конструкции самой плазмиды, предназначенной для клонирования тупоконечных фрагментов, не позволяют в полной мере использовать при химико-ферментативном синтезе субфрагментов «экономичный способ», предложенный Итакурой с сотр. [6] и заключающийся в репаративной достройке частично комплементарных полинуклеотидов. При получении протяженных фрагментов ДНК это приводит к значительному увеличению биохимической работы. Отмеченный недостаток связан с отсутствием в плазмидах типа pBBV набора сайтов других эндонуклеаз рестрикции между сайтами *BbvII*.

Более удобна в этом отношении плазида pNIMB [7], но вследствие труднодоступности и дороговизны эндонуклеазы рестрикции *HgaI* ее не использовали для получения субфрагментов с запланированными «липкими» концами.

Наиболее доступной из рестриктаз, гидролизующих полинуклеотидную цепь на расстоянии от сайта узнавания (а именно это свойство обеспечивает образование запланированного «липкого» конца), является эндонуклеаза рестрикции *FokI*. Эта рестриктаза гидролизует полинуклеотидную цепь на расстоянии 9 нуклеотидов от 3'-конца сайта узнавания (GGATG) и 13 нуклеотидов от 5'-конца комплементарной ее последовательности (CCTAC) [8].

Цель настоящей работы — создание векторов, позволяющих в полной мере использовать стратегию «экономичного способа» получения ДНК-дуплексов с произвольными, заранее запланированными «липкими» концами с использованием как эндонуклеазы рестрикции *HgaI*, так и значительно более доступной эндонуклеазы рестрикции *FokI*.

Целевые векторы pMB123 и pMB124 сконструированы на основе плазмиды pUR222. Для этого в *EcoRI-PstI*-фрагмент ДНК плазмиды pUR222 были встроены полилинкеры (рис. 1), содержащие между парными сайтами эндонуклеаз рестрикции *FokI* и *HgaI* противоположной полярности набор сайтов эндонуклеаз рестрикции *SalGI*, *AccI*, *HindII*, *HindIII* (в pMB124 последний сайт отсутствует) и *BamHI*. Полилинкерный фрагмент расположен в кодирующей последовательности α -пептида β -галактозидазы [9, 10].

Конструирование проводили в несколько этапов. ДНК плазмиды pNIMB [7] расщепляли эндонуклеазами рестрикции *BamHI* и *EcoRI* и лигировали с олигонуклеотидами (I) и (II) (таблица) с помощью T4-ДНК-лигазы. Полученной смесью трансформировали клетки *E. coli* BMH7118 и проводили отбор клонов, устойчивых к ампициллину, с фенотипом *lac*⁻ (промежуточная плазида pMB121, рис. 2). Аналогично из *PstI-SalGI*-фрагмента ДНК плазмиды pNIMB и олигонуклеотидов (III) и (IV) (таблица) получена промежуточная плазида pMB120, имеющая также *lac*⁻-фенотип. Полилинкерные фрагменты pMB120 и pMB121 приведены на рис. 1. Из индивидуальных клонов выделяли ДНК плазмиды pMB121, которую гидролизовали эндонуклеазами рестрикции *PstI* и *SalGI* и лигировали с олигонуклеотидами (III) и (IV) (таблица). Полученной лигазной смесью транс-

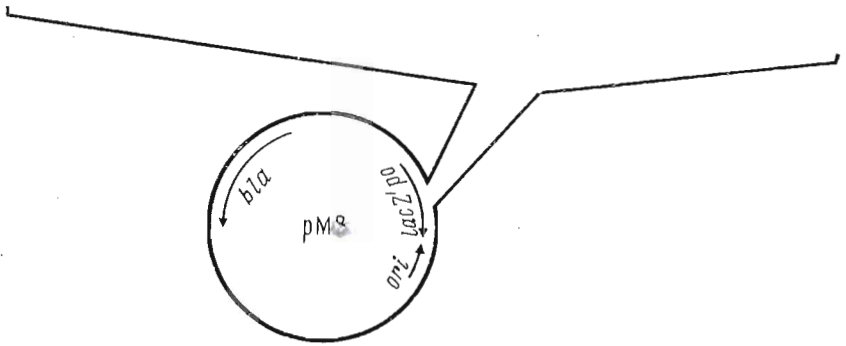
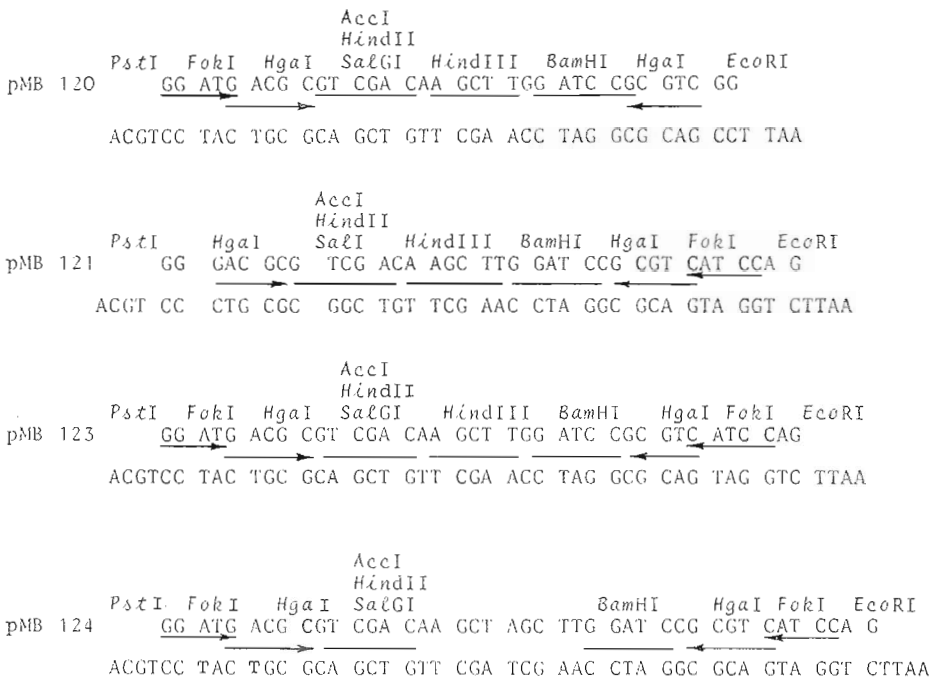


Рис. 1

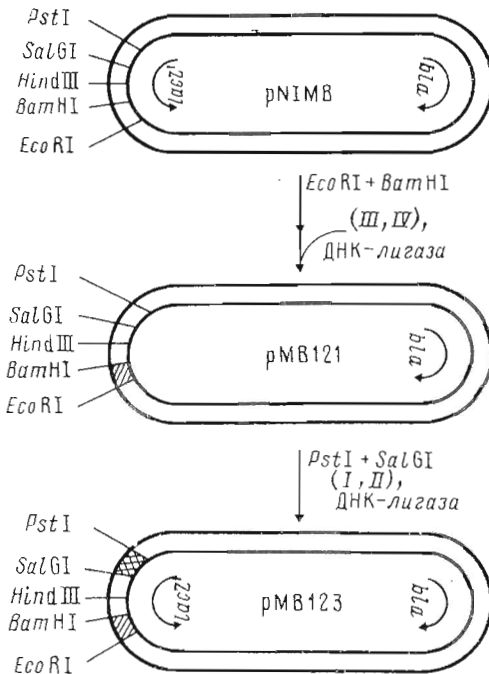


Рис. 1. Нуклеотидная последовательность полиликерной области плазмид рМВ. Показан набор сайтов эндонуклеаз рестрикции. Все плазмиды, кроме рМВ123, имеют генотип *lacZ*⁻. Подчеркнуты сайты редкоцепляющих рестриктаз. Стрелками указано направление от сайтов узнавания к местам гидролиза соответствующими рестриктазами

Рис. 2. Схема конструирования векторной плазмиды рМВ123

Структура и выход синтезированных олиго- и полидезоксирибонуклеотидов

Номер нуклеотида	Структура олигонуклеотида (5' → 3')	Выход *, %
(I)	GATCCGCGTCATCCAG	74,5
(II)	AATTCTGGATGACGCG	78,2
(III)	GGATGACGCG	75,1
(IV)	TCGACGCGTCATCCTGCA	77,2
(V)	CCGTCGACAAGAATCCCAAACCTCACCAGAAT	79,7
(VI)	ATGTA AAAACTTAAATGTGAGCATTCTGGTGA	81,3
(VII)	GCCCAAGAAGGCCACAGAALCTGAAACATCT	79,5
(VIII)	CCCAGATCTCTAAACACTGAAGATGTTTCA	77,3
(IX)	CCCAGATCTAGAAGAAGAALCTCAAACCTCTGGAAGAAGTG	76,2
(X)	GAAAATTTTGTCTTGTGCTAAATTCAGCACTTCTTCCAG	80,3
(XI)	ACTTACGTCCCGTGACTTAAATCTCCAAATCAACGTAAT	81,2
(XII)	CCTGTCGACCSTTCCAGTTCAGTACAATTACGTTGATA	77,4

* В расчете на исходный нуклеозид, закрепленный на полимере.

формировали клетки *E. coli* BMH7418 и проводили отбор клонов, устойчивых к ампициллину, с фенотипом *lac*⁺ (плазмиды рМВ123).

Вектор рМВ124 получали из рМВ123. Для этого ДНК плазмиды рМВ123 гидролизовали эндонуклеазой рестрикции *Hind*III, достраивали липкие концы ДНК-полимеразой (фрагмент Кленова) и лигировали полученный дуплекс. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* BMH7418 и проводили отбор клонов, устойчивых к ампициллину и имеющих *lac*⁻-фенотип. Структура полилинкерной области всех полученных векторов доказана секвенированием по модифицированному методу Максама — Гилберта (рис. 3).

Для получения субфрагментов с любыми запланированными «липкими» концами проводится клонирование фрагментов ДНК по *Sal*GI- и *Bam*HI-сайтам с последующей обработкой рекомбинантной ДНК эндонуклеазами рестрикции *Fok*I или *Hga*I. При этом образуются 5'-выступающие тетра-нуклеотидные (*Fok*I) или пентануклеотидные (*Hga*I) концы любой заданной последовательности. Расположение рестриктных сайтов *Sal*GI и *Bam*HI таково, что эндонуклеазы *Fok*I и *Hga*I, гидролизующие ДНК в одном месте, отсекают эти сайты от клонированных по ним фрагментов.

Конструкция рМВ123 и рМВ124 облегчает поиск колоний с рекомбинантными плазмидами. Поскольку полилинкер для клонирования субфрагментов расположен в кодирующей последовательности α -пептида β -галактозидазы, вставка субфрагмента может нарушить его рамку считывания (рис. 1) и привести к изменению фенотипа, полезному для селекции рекомбинантов. Поэтому в качестве клетки-хозяина при работе с вектором рМВ123 и рМВ124 удобно использовать такой штамм, как *E. coli* (*lacZ*ΔM15).

Конструкция рМВ124 также облегчает поиск колоний с рекомбинантными плазмидами по фенотипическому признаку, причем именно в тех случаях, когда это невозможно при применении рМВ123. Это связано с тем, что сам полилинкер для клонирования субфрагментов (рис. 1) вызывает нарушение рамки считывания α -пептида β -галактозидазы, вследствие чего бактериальные клетки, содержащие рМВ124, имеют фенотип *lac*⁻ в отличие от бактериальных клеток, содержащих плазмиду рМВ123. При клонировании одного и того же субфрагмента по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Sal*GI и *Bam*HI в векторах рМВ123 и рМВ124 происходит образование одной и той же рекомбинантной плазмиды. Следовательно, бактериальные клетки рекомбинантов имеют в обоих случаях один и тот же фенотип. Таким образом, эти две плазмиды взаимно дополняют друг друга и позволяют выбрать наиболее удобный вариант для поиска рекомбинантов при клонировании субфрагментов. В частности, субфрагмент общей длиной (*3n*) п. о. или, если внутри него находится АТG-кодон, — (*3n*+2) п. о. от этого АТG-кодона до 3'-конца субфрагмента имеет смысл клонировать

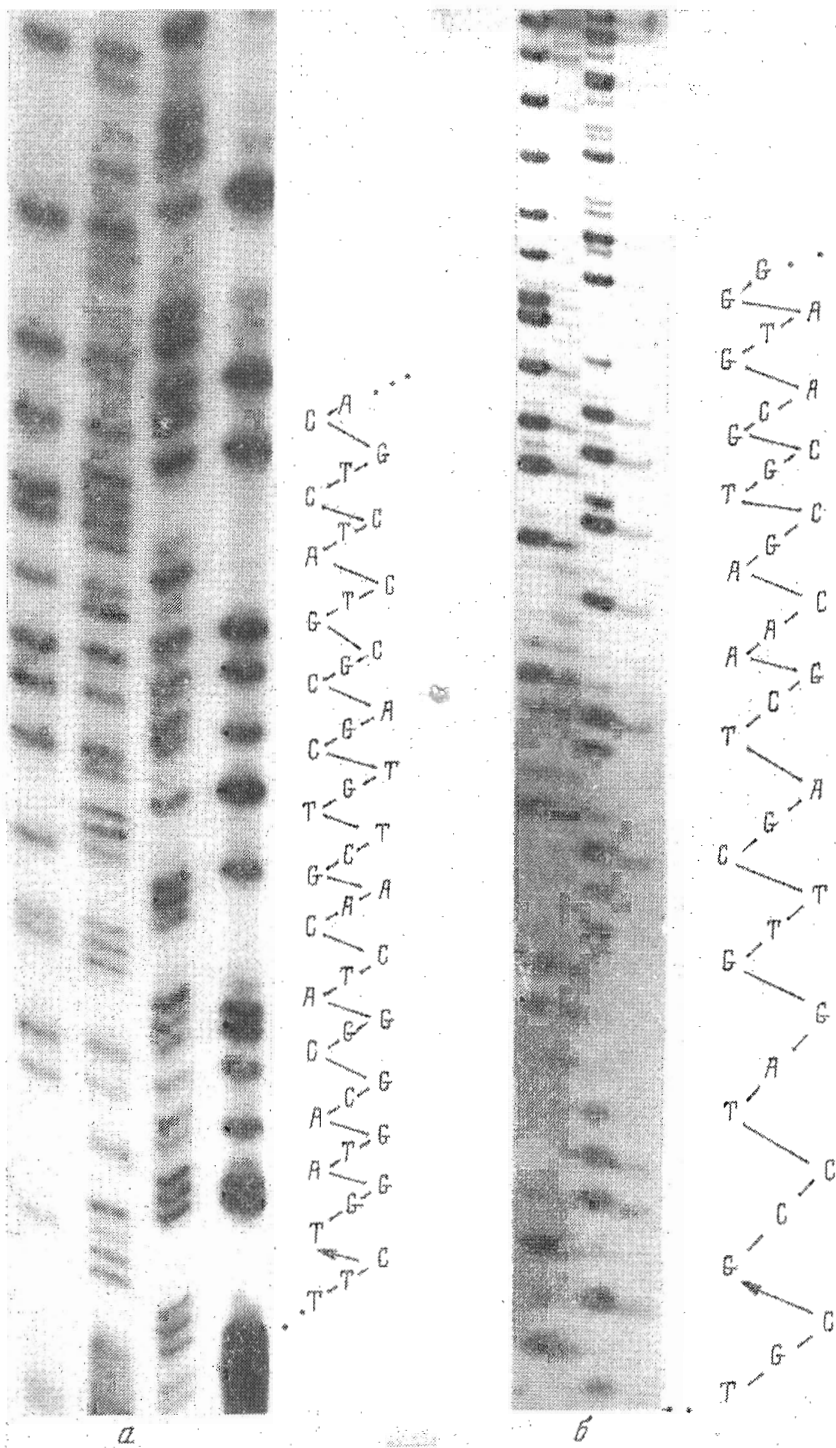
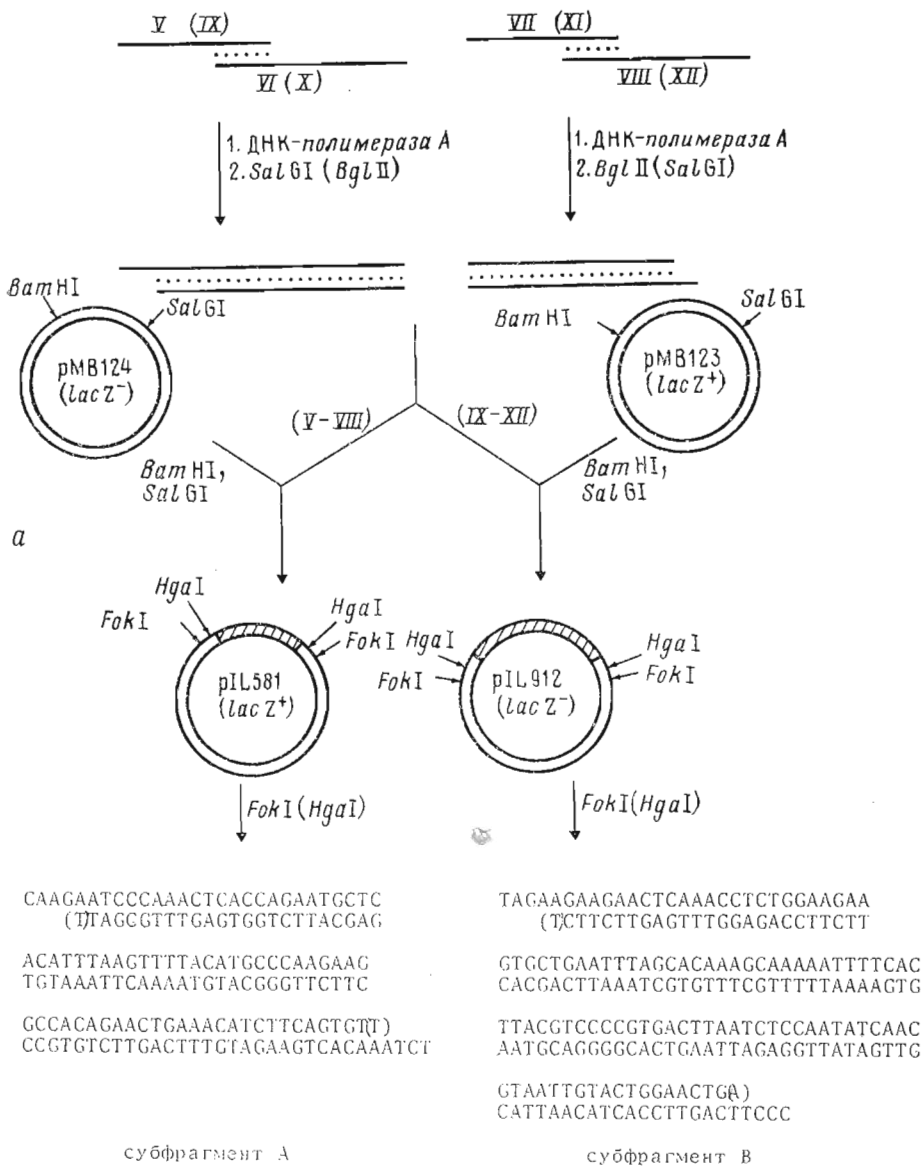


Рис. 3. Радиоавтограф секвенирующего геля полилинкерных областей плазмид рМВ123 (а) и рМВ124 (б)



CAAGAATCCCAAACCTACCAGAATGCTC
(TTAGGGTTTGAGTGGTCTTACGAG

ACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAG
TGAAATTCAAATGTACGGGTCTTTC

GCCACAGAACTGAAACATCTTCACTGTT)
CCGTGTCTTGACTTTGTAGAAGTCACAAATCT

TAGAAGAAGAACCTCAAACCTCTGGAAGAA
(TCTTCTTGAGTTTGGAGACCTTCTT

GTGCTGAATTTAGCACAAAGCAAAAATTTTCAC
CAGCACTTAAATCGTGTTCGTTTTTAAAGTG

TTACGTCGCCCGTGAAGTAAATCTCCAATATCAAC
AATGCAGGGGCACTGAATTAGAGGTTATAGTTG

GTAATTTGTACTGGAACTGA)
CATTAACATCACCTTGACTTCCC

Рис. 4. Способ получения, схема клонирования (а) и нуклеотидная последовательность субфрагментов А и В (б), кодирующих соответственно аминокислотные остатки 32–60 (pIL581) и 60–98 (pIL912) интерлейкина-2 человека, с заранее запланированными «липкими» концами. При расщеплении ДНК pIL581 и pIL912 эндонуклеазой рестрикции *HgaI* в полученных субфрагментах отсутствуют нуклеотидные остатки, взятые в скобки

в плазмиде pMB124, поскольку в этом случае легко осуществить отбор по фенотипу.

Аналогично можно использовать векторы pMB120 и pMB121. Для получения субфрагментов с произвольно запланированными «липкими» концами нами осуществлено клонирование фрагментов ДНК, кодирующих аминокислотную последовательность 32–60 (субфрагмент А) и 60–98 (субфрагмент В) человеческого интерлейкина-2. Дуплекс для клонирования, составляющий субфрагмент А, получали «экономичным способом» [6, 11] (рис. 4) путем репаративной достройки частично комплементарных полинуклеотидов (V–VIII) (таблица) с последующей обработкой эндонуклеазами рестрикции *BglII* или *SalGI*. Дуплекс для клонирования, составляющий субфрагмент В, был получен аналогично, путем репаративной достройки частично комплементарных полинуклеотидов (IX–XII) (табли-

ца) с последующей обработкой теми же эндонуклеазами. В соответствии с изложенным выше для удобства фенотипического отбора субфрагмент А был клонирован в рМВ123, а субфрагмент В — в рМВ124. После обработки рекомбинантной ДНК эндонуклеазой рестрикции *FokI* или *HgaI* выделены субфрагменты с запланированными «липкими» концами (рис. 4). Первичная структура субфрагментов подтверждена методом Максама — Гилберта. Наличие в плазмиде (помимо полилинкерной области) еще 5 сайтов узнавания рестриктазы *FokI* не создает существенных проблем при выделении субфрагментов, так как фрагменты *FokI*-гидролизата обладают уникальными липкими концами, не комплементирующими с расчетным 5'-выступающим концом сконструированного субфрагмента. Возможно небольшое ограничение в минимуме длины клонируемого фрагмента по причине того, что один из прилегающих к полилинкерной области сайтов узнавания рестриктазы *FokI* расположен на расстоянии 94 п. о., другой же сайт находится на расстоянии ~1200 п. о. Тем не менее степень однородности выделенного субфрагмента В оказалась достаточной для его успешного использования на последующих этапах работы.

Из рис. 5 можно видеть, что «липкие» концы субфрагментов позволяют осуществить однозначную сборку их во фрагмент ДНК, кодирующий последовательность 32—98 человеческого интерлейкина-2.

Таким образом, сконструированные векторы вполне пригодны для получения субфрагментов с заранее запланированными «липкими» концами. Конструкция рМВ123 и рМВ124 дает возможность в отличие от плазмид типа рВВV клонировать субфрагмент из нескольких частей в рМВ123 и рМВ124. Каждый из субфрагментов А и В получен из двух дуплексов за одно клонирование. При получении субфрагментов в рВВV необходимо осуществить три клонирования: отдельно каждый из тупоконечных дуплексов, а затем, после получения «липких» концов, сборку в субфрагмент. Применение рМВ123 и рМВ124 позволяет уменьшить объем биохимической и гено-инженерной работы при получении целевых последовательностей ДНК. Несомненным преимуществом является также использование при получении произвольных «липких» концов субфрагментов коммерчески доступных эндонуклеаз рестрикции *FokI* и *HgaI*. В большинстве случаев можно ограничиться использованием только одной рестриктазы *FokI*, значительно более дешевой и более доступной, чем *HgaI*. Вместе с тем возможность использования для создания одного запланированного «липкого» конца различных эндонуклеаз рестрикции значительно упрощает выбор стратегии сборки протяженных последовательностей ДНК, поскольку всегда можно заменить случайно совпавшие четырехчленные «липкие» концы, образованные *FokI*, на пятизвенные, образованные *HgaI*.

В период, когда материал находился во ВНИИ ГПЭ на экспертизе, в журнале «Биоорганическая химия» за 1986 г. (т. 12, № 6, с. 842—845) вышло краткое сообщение Кузнецова К. Д., Колочевой Т. И., Ривкина М. И., Кумарева В. П. «Плазмидный вектор рSSC1 для клонирования синтетических полинуклеотидов и их регенерации с уникальной концевой нуклеотидной последовательностью».

Экспериментальная часть

В работе использовали рестрикционные эндонуклеазы (КФ 3.1.21.3) *SalGI*, *EcoRI*, *PstI*, *BspI*, *BamHI*, *HindIII* производства ВНИИ прикладной энзимологии (г. Вильнюс), Т4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.4), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), ДНК-полимеразу (фрагмент Кленова, КФ 2.7.7.7), *FokI* (НИКТИ БАН, Бердск), дезоксирибонуклеотид-5'-трифосфаты (Sigma, США), [γ -³²P] АТФ (1000 Ки/ммоль), [α -³²P] ТТР (1000 Ки/ммоль) отечественного производства.

Использованы также бумага DE-81 (Whatman, Англия), акриламид, метиленабисакриламид; N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (Sigma, США), фильтры HAWP (Milipore, США).

Синтез олиго- и полидезоксирибонуклеотидов. Олиго- и полидезоксирибонуклеотиды получали твердофазным фосфотриэфирным методом [11].

В качестве носителя использовали силихром С-80 или пористое стекло SPG-1000, модифицированное по методу [12]. Нарастивание олигонуклеотидной цепи проводили от 3'-к 5'-концу с использованием динуклеозиддифосфатных производных [10]. Выделение целевого продукта после деблокирования реакционной смеси [11] осуществляли путем последовательных хроматографий на Lichrosorb PR18 сначала в 0,1 М триэтиламмонийацетате в градиенте ацетонитрила 15–40%. Затем раствор выделенного трифилолигонуклеотида упаривали досуха, растворяли в 2,5 мл 80% водной уксусной кислоты и выдерживали при комнатной температуре 45 мин. Раствор упаривали досуха, растворяли остаток в 1 мл дистиллированной воды и хроматографировали на Lichrosorb PR18 в 0,05 М триэтиламмонийацетате в градиенте ацетонитрила 5–20%. Структура и выходы целевых нуклеотидов (в расчете на исходный нуклеозид, прикрепленный к носителю) указаны в таблице.

Конструирование ДНК рМВ121. 5 мкг ДНК плазмиды рN1MB, выделенной известными методами [13, 14], гидролизovali 1 ч при 37°С совместно эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Eco*RI в 50 мкл раствора, содержащего буфер А (20 мМ трис-НСl (рН 7,8), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ 2-меркаптоэтанол) и 100 мМ NaCl. Реакционную смесь после добавления 5 мкл 0,4 М EDTA, рН 8,0, экстрагировали равным объемом водного фенола и изоамилового спирта. Затем к реакционной смеси добавляли ацетат натрия до концентрации 0,3 М (рН 7,0) и осаждали ДНК двумя объемами этанола. Полученный препарат вектора рN1MB растворяли в 50 мкл буфера TE (10 мМ трис-НСl (рН 7,8), 1 мМ EDTA). К 5 мкл раствора вектора рN1MB добавляли по 20 пмоль олигонуклеотидов (I и II), 2 ед. акт. ДНК-лигазы фага T4 в 30 мкл буфера Б (20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ 2-меркаптоэтанол и 0,5 мМ АТФ). Реакционную смесь выдерживали 12 ч при 10°С, затем использовали для трансформации клеток *E. coli* ВМН7118 [15]. Суспензию клеток после трансформации высевали на 1,5% LB-агар, содержащий 75 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозид (X-Gal). Чашки инкубировали 12 ч при 37°С. Из колоний, имеющих lac⁻ фенотип, щелочным методом выделяли ДНК плазмиды рМВ121; *Bsp*I- и *Fok*I-гидролизаты полученной ДНК анализировали в 4% ПААГ. Клон, имеющий дополнительный *Fok*I-сайт в плазмидной ДНК, выращивали в 100 мл среды, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, в течение 16 ч при 37°С на качалке (200 об/мин). Клетки собирали центрифугированием (6000 об/мин, 10 мин, 4°С), плазмидную ДНК рМВ121 выделяли щелочным методом с последующей дополнительной очисткой в градиенте плотности CsCl [14]. Структуру встроенного полилинкера подтверждали секвенированием по методу Максама — Гилберта [16].

Конструирование ДНК рМВ120. 5 мкг ДНК плазмиды рN1MB расщепляли действием 10 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции *Pst*I в 50 мкл раствора, содержащего буфер А и 50 мМ NaCl, 1 ч при 37°С. Затем к реакционной смеси добавляли NaCl до концентрации 150 мМ, 2-меркаптоэтанол до 20 мМ и 10 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции *Sal*GI, выдерживали 1 ч при 37°С. Реакционную смесь после добавления 6 мкл 0,4 М EDTA, рН 8,0, экстрагировали равным объемом водного фенола и изоамилового спирта. ДНК вектора рN1MB осаждали этанолом и растворяли в 5 мкл TE-буфера. К 5 мкл раствора вектора рN1MB добавляли по 20 пмоль олигонуклеотидов (III) и (IV), 2 ед. акт. ДНК-лигазы фага T4 в 30 мкл буфера Б. Расщепленную смесь выдерживали 12 ч при 10°С. Колонии с рекомбинантными плазмидами рМВ120, а также плазмидную ДНК рМВ120 получали как описано выше.

Конструирование ДНК рМВ123. Из 5 мкг ДНК плазмиды рМВ121 гидролизом эндонуклеазами рестрикции *Pst*I и *Sal*GI в описанных выше условиях готовили вектор рМВ121. К 5 мкл раствора полученного вектора в TE-буфере добавляли по 20 пмоль олигонуклеотидов (III) и (IV), 2 ед. акт. ДНК-лигазы фага T4 в 30 мкл буфера Б и выдерживали реакционную смесь 12 ч при 10°С. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* ВМН7118. Из колоний (получение см. выше), имеющих lac⁺ фенотип, выделяли плазмидную ДНК. После рестрикционного анализа с

помощью эндонуклеаз *BspI* и *FokI*, определяли ее первичную структуру в районе встроеного полилинкера по методу Максама — Гилберта [16].

Конструирование ДНК рМВ124. 5 мкг ДНК плазмиды рМВ123 гидролизали 10 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции *HindIII* в 50 мкл буфера А, содержащего 50 мМ NaCl, в течение 1 ч при 37° С. Затем в реакционную смесь добавляли четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата до концентрации 100 мкМ (каждого) и воду до общего объема 100 мкл, прибавляли 1 ед. акт. ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и выдерживали 30 мин при 20° С. Реакционную смесь разбавляли 5 мкл 0,4 М EDTA (рН 8,0) и экстрагировали водным фенолом и изоамиловым спиртом. ДНК осаждали двумя объемами этанола; 0,5 мкг полученной ДНК обрабатывали 2 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т4 в буфере Б в течение 16 ч при 10° С. Реакционную смесь использовали для трансформации клеток *E. coli* ВМН7118. Из колоний, имеющих *lac*⁻-фенотип, выделяли плазмидную ДНК щелочным методом. *BspI*- и (*BspI*+*HindIII*)-гидролизаты полученной ДНК анализировали в 4% ПААГ. Первичную структуру в районе встроеного полилинкера определяли по методу Максама — Гилберта.

Синтез дуплекса, кодирующего аминокислотную последовательность 30—62 человеческого интерлейкина-2. Реакционную смесь, содержащую по 100 пмоль меченого [γ -³²P] АТФ олигонуклеотида (V) и фосфорилированного холодным АТФ олигонуклеотида (VI), в 100 мкл буфера В (60 мМ трис-HCl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ 2-меркаптоэтанол) нагревали 10 мин при 50° С, охлаждали до 20° С, добавляли четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата до концентрации 250 мкМ (каждого) и 10 ед. акт. ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова). Реакционную смесь инкубировали 30 мин при 20° С, добавляли 10 мкл 0,4 М EDTA (рН 8,0), экстрагировали водным фенолом. ДНК-дуплекс осаждали ацетоном, содержащим 2% LiClO₄, промывали этанолом, сушили на воздухе, осадок растворяли в воде. Полученный дуплекс расщепляли 500 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции *SalGI* в 200 мкл буфера Б, содержащего 150 мМ NaCl, в течение 12 ч при 37° С. Аналогично получали дуплекс из олигонуклеотидов (VII)—(VIII), который расщепляли обработкой в течение 12 ч при 37° С 200 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции *BglII* в 200 мкл буфера Б, содержащего 50 мМ NaCl. Оба рестрикта выделяли с помощью гель-электрофореза в 8% ПААГ.

Клонирование синтетического дуплекса. Реакционную смесь, содержащую по 2 пмоль приготовленных дуплексов и 0,25 пмоль векторной ДНК, полученной из рМВ124 совместным расщеплением эндонуклеазами рестрикции *BamHI* и *SalGI*, обрабатывали 2 ед. акт. ДНК-лигазы в описанных выше условиях. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* ВМН7118. Из колоний, имеющих *lac*⁺-фенотип, гибридизующихся с Р³²-мечеными зондами (V) и (VIII) (получены по методу [11]), выделяли ДНК, которую дополнительно анализировали с помощью *BspI*- и (*EcoRI*+*PstI*)-гидролиза.

Бактерии *E. coli* ВМН7118, содержащие плазмиды рIL581 со вставкой требуемого размера, выращивали в 100 мл LB-среды. Для получения целевого субфрагмента, соответствующего части гена человеческого интерлейкина-2 с заранее запланированными «липкими» концами, 15 мкг ДНК плазмиды рIL581 (см. рис. 4) в 15 мкл буфера А, содержащего 50 мМ NaCl, обрабатывали 1 ч при 37° С 20 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции *FokI* или *HgaI*. Целевой фрагмент длиной 83 нуклеотидные пары выделяли с помощью электрофореза в 6% ПААГ. Структуру полученного фрагмента подтверждали методом Максама — Гилберта [17].

Получение субфрагмента в ДНК, кодирующего аминокислотную последовательность 60—98 человеческого интерлейкина-2. Аналогично описанному выше из олигонуклеотидов (IX)—(XII) (таблица) получали дуплексы (рис. 4), которые клонировали в рМВ123. Векторную ДНК рМВ123 получали аналогично вектору рМВ124. Из колоний, имеющих *lac*⁻-фенотип, гибридизующихся с Р³²-мечеными зондами (IX) и (XII), выделяли ДНК, которую дополнительно анализировали с помощью *BspI*- и (*EcoRI*+*PstI*)-гидролиза.

Колонии, имеющие плазмиды рIL912 со вставкой требуемого размера,

выращивали в 100 мл LB-среды. Для получения целевого субфрагмента, соответствующего части гена человеческого интерлейкина-2, с заранее запланированными «липкими» концами 15 мкг ДНК плазмиды pIL912 в 150 мл буфера А, содержащего 50 мМ NaCl, обрабатывали 1 ч 20 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции *FokI* или *HgaI* при 37°С.

Целевой фрагмент длиной 114 п. о. выделяли с помощью электрофореза в 6% ПААГ. Структура полученного фрагмента подтверждена методом Максама — Гилберта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stewart A. G., Richardson H., Roberts S., Warwick J., Edwards K., Bell L., Smith J., Derbyshire R. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 19. P. 6597–6609.
2. Колосов М. Н., Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Чувпило С. А., Быстров Н. С., Берлин Ю. А., Каюшин А. А., Буткус В. В., Полякова И. А., Болдырева Е. В., Сандажиев Л. С., Попов С. Г., Шубина Т. Н., Кравченко В. В., Серпинский О. И., Ямщиков В. Ф., Беликов С. И., Сinyaков А. Н., Сиволобова Г. Ф. Способ получения искусственного гена интерферона $\alpha 2$ и способ получения полипептида с активностью интерферона микробиологическим способом. А. с. № 1092176 СССР // Б. И. 1984. № 18.
3. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Колосов М. Н. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 6. С. 830–839.
4. Narang S. A., Brousseau R., Hsing H. M. // Nucl. Acid. Res. Symp. Ser. 1980. V. 8. № 7. P. 377–385.
5. 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.
6. Rossi J. J., Kierzek R., Hung T., Walker P. A., Itakura K. J. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 16. P. 9226–9229.
7. Kravchenko V. V., Serpinsky O. I., Sivolobova G., Schubina T. N. Conference metabolic plasmids. Tallin, 1982. P. 240.
8. Roberts R. J. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 1. P. 167–204.
9. Сinyaков А. Н., Серпинский О. И., Данилюк Н. К., Чижиков В. Е., Дегтярев С. Х. Вектор pMB123 для получения фрагментов ДНК с уникальными липкими концами и способ его конструирования: А. з. № 4149175/28-13 (158829). Полож. решение от 30.09.87 г.
10. Сinyaков А. Н., Серпинский О. И., Данилюк Н. К., Чижиков В. Е., Дегтярев С. Х. Вектор pMB124 для получения фрагментов ДНК с уникальными липкими концами и способ его конструирования: А. з. № 4149175/28-13 (158829). Полож. решение от 30.09.87 г.
11. Сinyaков А. Н., Серпинский О. И., Данилюк Н. К. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 655–660.
12. Ястребов С. И. Способ получения сорбента: А. с. № 11553976 СССР // Б. И. 1985. № 17.
13. Birnboim H. C., Doly J. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. № 6. P. 1513–1517.
14. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 98–107.
15. Серпинский О. И., Каргинова Е. А., Микрюков Н. Н., Кравченко В. В., Зайчиков Е. Ф., Максимова Т. Т., Оникиенко А. И., Плетнев А. Г., Мигина Ю. Л. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 6. С. 840–846.
16. Данилюк Н. К., Ястребов С. И., Артамонова Т. П., Попов С. Г. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1185–1188.
17. Maxam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.

Поступила в редакцию
11.III.1988

После доработки
19.VII.1988

pMB123 AND pMB124 VECTORS FOR PRODUCING DNA FRAGMENTS WITH UNIQUE PROTRUDING ENDS

SINYAKOV A. N., SERPINSKI O. I., DANILYUK N. K.,
CHIZHIKOV V. E., DEGTYAREV S. K.

All-Union Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk Region

For preparing a DNA fragment with unique protruding ends, plasmid vectors pMB123 and pMB124 were constructed by inserting a synthetic polylinker into plasmid pUR222 at the *EcoRI-PstI* sites. The polylinker contains two *FokI* and *HgaI* sites at its ends in opposite orientation flanking a combination of *SalGI*, *AccI*, *HindII*, *HindIII* (the latter site is absent from pMB124) and *BamHI* sites. DNA fragment cloned at the *SalGI* and *BamHI* sites can be regenerated by either *FokI* or *HgaI* treatment, the *SalGI* and *BamHI* sites being deleted from the cloned sequence. Fragments coding for parts of human interleukin-2 were cloned in these vectors.