



УДК 547.963.32.07

ПОЛНОСТЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ИСКУССТВЕННЫЕ ГЕНЫ
БРАДИКИНИНА И ПЕПТИДА СНА*Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В.,
Власов В. П., Колосов М. Н.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Быстрый прогресс химико-ферментативного синтеза ДНК в последние годы привел к крупным успехам в создании простейших генетических структур. Были синтезированы короткие ДНК, которые после слияния с природными генами кодировали *in vivo* биосинтез целевых аминокислотных последовательностей (например, соматостатина [1] и других пептидов в виде С-концевых фрагментов β -галактозидазы), а обратной транскрипцией в комбинации с частичным химическим синтезом были получены структурные гены некоторых истинных белков, таких, как соматотропин [2]. Все эти синтетические гены экспрессировались в живой клетке под контролем природных промоторов, но они не способны функционировать самостоятельно (поскольку лишены собственных участков инициации транскрипции и трансляции) и в этом отношении не вполне соответствуют представлению о гене как о минимальной функциональной единице ДНК (или РНК), обеспечивающей биосинтез одной полипептидной цепи. В настоящей работе впервые получен полностью синтетический искусственный ген, который наряду со структурной (кодирующей) частью содержит неприродный промотор, оператор, а также участок связывания рибосомы и способен к прямой экспрессии в бактериальной клетке, т. е. является функционально активным.

Для конструирования полных искусственных генов нами ранее был синтезирован модельный промотор *E. coli* [3] и было показано, что он обеспечивает эффективную транскрипцию природного гена *tet* в плазмиде pBR322 [4]. Далее этот промотор был сочленен с синтетическим участком связывания рибосомы, ограниченным уникальным сайтом *Bam*HI, по которому должен быть вставлен экспрессируемый структурный ген [5]. С другой стороны, нами был получен искусственный структурный ген пептидного гормона брадикинина [6], однако он начинался с *Eco*RI-сайта (для слияния с геном *lacZ*), вследствие чего его нельзя было просто соединить с искусственной регуляторной областью, оканчивающейся сайтом *Bam*HI. Поэтому мы заново синтезировали структурный ген брадикинина в ином варианте — в виде дуплекса с «липкими» концами *Bam*HI и *Sal*I (рис. 1).

Использованные в этом синтезе олигонуклеотиды (II)–(VII) были получены ранее [6], а 5'-концевые нонануклеотид (I) и декануклеотид (VIII) синтезированы стандартным фосфотриэфирным методом

(Met) Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - Arg (Stop, Stop)

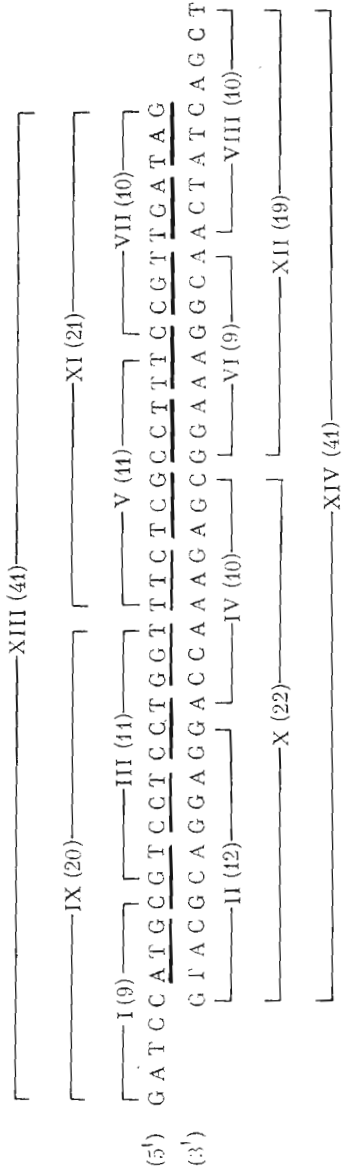


Рис. 1. Искусственный структурный ген брадикинина и кодируемая им аминокислотная последовательность. Подчеркнуты трилеты, соответствующие кодонам мРНК. Римскими цифрами обозначены синтезированные олигонуклеотиды, в скобках указана их величина (число мононуклеотидных звеньев)

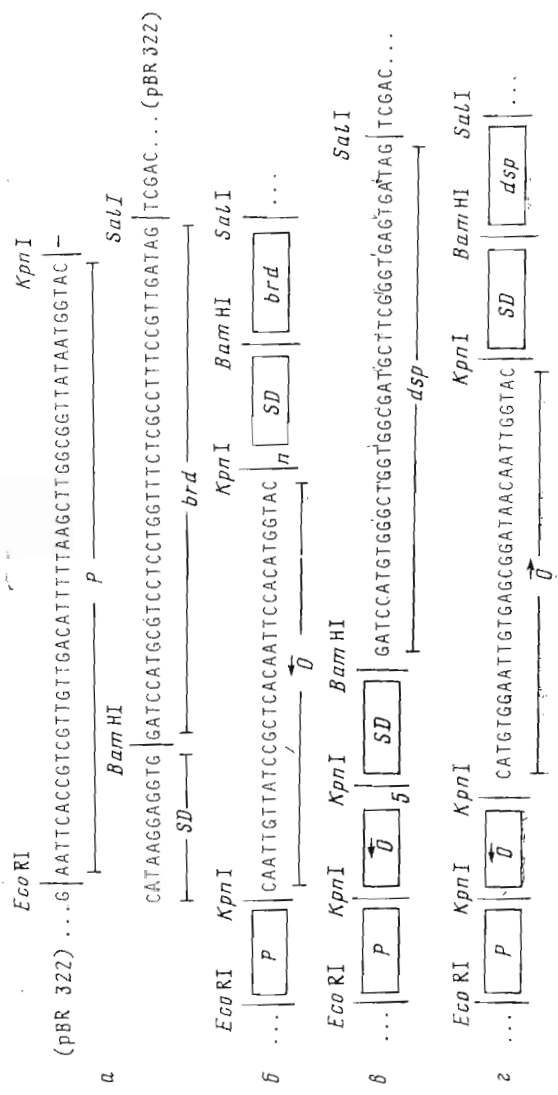


Рис. 2. Структура полностью синтезированных искусственных генов брадикинина и пептида сна, интегрированных в плазмиде pBR322. Приведена нуклеотидная последовательность верхней цепи (5'→3'). Обозначены промотор (P), оператор в-природной (O) и не природной ориентации (O'), последовательность Шайна и Дальгарно (SD), структурные гены брадикинина (brd) и пептида сна (dsp). α - рекомбинантная плазида pBRD1; β - pBRD27-1 (n=1), pBRD27-2 (n=2), pBRD27-3 (n=3), pBRD22 (n=5); ε - pDSP2; ζ - pDSP3

с триизопропилбензолсульфотетразолидом в качестве конденсирующего реагента. Лигазные шивки проводили в три этапа, как описано в работе [6]. Конечный продукт лигирования — 41-членный дуплекс (XIII) · (XIV) — выделяли электрофорезом в 15% полиакриламидном геле (ПАГ), 5'-фосфорилировали T4-полинуклеотидкиназой с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{rATP}$ и клонировали в *E. coli*, причем в качестве вектора использовали плазмиду pBR322mpt4 [5], которая содержит искусственный промотор и синтетический участок связывания рибосомы.

С этой целью ДНК pBR322mpt4 была гидролизована рестриктазами *Bam*HI и *Sal*I, большой фрагмент выделен электрофорезом в 5% ПАГ и лигирован с 5'-фосфорилированным дуплексом (^{32}P XIII) · (^{32}P XIV). Подученным веществом трансформировали компетентные клетки *E. coli* HB101, трансформанты выращивали на среде, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, и проводили селекцию на присутствие в плазмидной ДНК дополнительного (по сравнению с исходным вектором) сайта эндонуклеазы *Taq*XI [7], поскольку искусственный структурный ген брадикинина содержит узнаваемую этой рестриктазой пентануклеотидную последовательность CCTGG. Строение выделенной рекомбинантной плазмиды pBRD1 было подтверждено определением нуклеотидной последовательности синтетической вставки. Для этого плазмиду pBRD1 разрезали эндонуклеазой *Eco*RI, 3'-концы достраивали ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) с $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP} + \text{dTTP}$, ДНК гидролизовали рестриктазой *Msp*I и ^{32}P -меченный *Eco*RI/*Msp*I-фрагмент длиной около 140 пар оснований анализировали методом Максама — Гилберта. Результаты анализа представлены на рис. 2а.

В скопструированной таким образом рекомбинантной плазмиде pBRD1 иницирующий кодон структурного гена брадикинина *brd* отделен от старта транскрипции искусственного промотора (*P*) только 15 нуклеотидами, включая 10-членную последовательность Шайна — Дальгарно (*SD*). На основании литературных данных (см. обзор [8]) можно предполагать, что для эффективной инициации трансляции необходимо большее удаление иницирующего кодона от начала мРНК. Поэтому мы вставили в плазмиду pBRD1 по *Kpn*I-сайту между промотором и последовательностью Шайна — Дальгарно синтетический *lac*-оператор (*O*), чтобы удлинить лидерную часть мРНК и создать возможность управлять активностью гена путем его индукции или репрессии. В результате была получена [9] серия плазмид pBRD с синтетической вставкой типа *P*—*O*_n—*SD*—*brd* (рис. 2б), содержащей до пяти tandemных операторов. Предполагалось, что такие искусственные гены окажутся способными к прямой экспрессии в бактериальной клетке, однако проверить это предположение не представлялось возможным из-за отсутствия специфической антисыворотки к брадикинину и недостаточной чувствительности других методов анализа.

По этой причине структурный ген брадикинина в плазмиде pBRD22 был нами заменен специально синтезированным [10] искусственным структурным геном дельта-пептида сна (DSIP), так как в лаборатории химии белка нашего института в это время был разработан высокочувствительный метод радиоиммунного анализа DSIP, позволяющий определять его в количестве 10^{-15} моль. В результате замены в pBRD22 гена *brd* на *dsp* была получена плаزمида pDSP2 (рис. 2в), в которой все пять операторных участков имеют ориентацию ($\leftarrow O$), противоположную природной ($O \rightarrow$). Чтобы уменьшить число операторов и изменить их ориентацию, плазмида pDSP2 была нами гидролизована рестриктазой *Kpn*I и религирована, как описано в статье [9]. Одна из выделенных при этом плазмид, обозначенная pDSP3, содержала два операторных остатка; прямым определением ее нуклеотидной последовательности было установлено, что в этой плазмиде второй (считая от промотора) оператор имеет природную ориентацию (рис. 2г).

Таким образом, в результате этой работы получены полностью синтетические искусственные гены брадикинина и пептида сна типа $P-(\leftarrow O)_n-SD-(brd \text{ или } dsp)$ и $P-(\leftarrow O)-(O\rightarrow)-SD-dsp$. Функциональная активность последнего гена в составе рекомбинантной плазмиды рDSP3 была исследована нами совместно с сотрудниками лаборатории химии белка (В. В. Рожанец, Р. Ю. Юхананов). Было установлено, что при индукции IPTG в клетках *E. coli*, несущих эту плазмиду, образуется пептид, иммунохимически идентичный DSIP, т. е. была впервые обнаружена прямая экспрессия *in vivo* искусственного гена короткого пептида, которой не удалось осуществить в случае полусинтетического гена соматостатина [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin.— Science, 1977, v. 198, p. 1056–1063.
2. Goeddel D. V., Heyneker H. L., Hozumi T., Arentzen R., Itakura K., Yansura D. G., Ross M. J., Miozzari G., Crea R., Seeburg P. H. Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone.— Nature, 1979, v. 281, p. 544–548.
3. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В., Колосов М. Н. Химико-ферментативный синтез модельного промотора транскрипции и участка узнавания РНК-полимеразы *Escherichia coli*.— Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 783–785.
4. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Чувило С. А., Шингарова Л. Н., Колосов М. Н. Модификация промотора *tet* в плазмиде рBR322.— Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1743–1745.
5. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Чувило С. А., Северцова И. В., Колосов М. Н. Промоторные векторы с синтетическим участком узнавания рибосомы.— Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 12, с. 1877–1880.
6. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Чернов Б. К., Колосов М. Н. Синтез структурного гена брадикинина.— Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 5, с. 776–778.
7. Грачев С. А., Мамаев С. В., Гуревич А. П., Игошин А. В., Колосов М. Н., Слюсаренко А. Г. Рестрикционная эндонуклеаза *TaqXI* из *Thermus aquaticus*.— Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 4, с. 628–630.
8. Steitz J. A. Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA.— In: Biological regulation and development. V. 1, Gene Expression / Ed. Goldberg K. E. Plenum Press, 1979, p. 349–399.
9. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Власов В. П., Колосов М. Н. Синтез и клонирование *lac*-оператора *E. coli*.— Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1740–1744.
10. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В., Власов В. П., Быстров Н. С., Колосов М. Н. Синтез и клонирование искусственного структурного гена пептида сна.— Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1745–1749.

Поступила в редакцию 17.VII.1981

FULLY-SYNTHETIC ARTIFICIAL GENES FOR BRADYKININ AND THE δ -SLEEP INDUCING PEPTIDE

KOROBKO V. G., DOBRYNIN V. N., SEVERTSOVA I. V.,
VLASOV V. P., KOLOSOV M. N.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow

Complete artificial genes of two types have been constructed of cloned synthetic DNAs (Fig. 2), that consist each of (i) the model promoter sequence *P* for RNA polymerase, (ii) the partial lactose operator sequence *O*, (iii) the extended Shine — Dalgarno sequence *SD*, and (iv) the *brd* or *dsp* sequence coding for the peptide hormone bradykinin or for the delta sleep inducing peptide (DSIP), respectively, every sequence being flanked with two different restriction nuclease sites except for the operator which carries the same *KpnI* sites on both ends. A series of the genes obtained contain several tandem operators whose direction is opposite to that of the natural operator in *lac* operon; this type genes are schematically formulated as $P-(\leftarrow O)_n-SD-(brd \text{ or } dsp)$ where *n* is 1 through 5. The second type is represented by a gene $P-(\leftarrow O)-(O\rightarrow)-SD-dsp$ containing an inverted repeat of the operator whose translation would give rise to a stable hairpin structure in the leader portion of the corresponding messenger RNA. The gene was found to directly express in *E. coli* on induction with IPTG, the gene product being identified as DSIP and quantified by a radioimmunoassay developed in the protein chemistry department of this institute.