



УДК 577.113.6:577.218

СИНТЕЗ 33-ЧЛЕННОГО ПОЛИНУКЛЕОТИДА,
СОДЕРЖАЩЕГО «core» att САЙТ ДНК
БАКТЕРИОФАГА λ , И ЕГО КЛОНИРОВАНИЕ

Кравченко В. В., Серпинский О. И., Сиялков А. Н.,
Цинов С. Г.

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

Твердофазным триэфирным методом синтезированы два полинуклеотида длиной 33 мононуклеотидных остатка, способных образовывать дуплекс с 5'-выступающими концами для встраивания в *EcoRI*-сайт клонирующего вектора. 33-звенные продукты синтеза были выделены электрофорезом в полиакриламидном геле и образующийся при их отжиге дуплекс проклонирован по *EcoRI*-сайту в плазмиде pUR222. Структура синтетического дуплекса после клонирования подтверждена анализом нуклеотидной последовательности по методу Максама – Гилберта. Синтезированный фрагмент содержит участок («core» att-сайт) ДНК бактериофага λ , обеспечивающий сайт-специфическое встраивание ДНК λ в хромосому *E. coli*.

Существующий в настоящее время способ химико-ферментативного синтеза фрагментов ДНК заключается в получении олигонуклеотидов длиной 10–15 звеньев и их последующей ферментативной сшивке в составе комплементарных комплексов с помощью ДНК-лигазы.

Таким способом в принципе может быть синтезирована ДНК любой длины и последовательности, однако его конкретная практическая реализация сопряжена с рядом трудностей. Во-первых, синтез олигонуклеотидов и их ферментативная сборка являются многостадийными и трудоемкими процессами, выход которых в целом низок. Во-вторых, на стадии лигазной сшивки олигонуклеотидов при получении участков ДНК, имеющих определенные особенности первичной структуры (прямые или обратные повторы, самокомплементарные последовательности), за счет неправильного комплексообразования олигомеров часто образуется значительное количество побочных продуктов. В ряде случаев это делает невозможным получение ДНК заданной структуры.

Одним из путей совершенствования способа получения искусственных фрагментов ДНК является переход к прямому химическому синтезу максимально длинных полинуклеотидов. Это позволит сократить число наиболее длительных и трудоемких стадий выделения промежуточных продуктов на всех этапах химического синтеза и ферментативной сшивки, а также повысить выход последней за счет увеличения селективности комплементарных взаимодействий полинуклеотидов по сравнению с олигонуклеотидами.

Современный фосфотриэфирный метод синтеза олиго- и полинуклеотидов в принципе позволяет синтезировать цепи длиной 30–40 звеньев [1–3], однако выходы на последних стадиях синтеза низки, а хроматографические методы выделения из сложных реакционных смесей не обеспечивают достаточной чистоты продуктов такой длины.

Недавно Итакуре с сотр. [4] удалось использовать для получения фрагмента ДНК, кодирующего часть лейкоцитарного интерферона α_2 , синтезированные твердофазным методом полинуклеотиды длиной 39–42 нуклеотидных звена. Нарастание нуклеотидной цепи проводили от 3'-к 5'-концу. Выделение целевых продуктов осуществляли с помощью гель-электрофореза с последующей ионообменной хроматографией полинуклеотидов на бензоилированной и нафтоилированной DEAE-целлюлозе.

В пашей лаборатории независимо разрабатывался способ получения и выделения полинуклеотидов. Для осуществления этой задачи был использован метод сборки полинуклеотидной цепи от 5'- к 3'-концу фосфотриэфирным методом на полимерном носителе с последующим клонированием продукта, имеющего липкие концы, в соответствующем векторе в качестве стадии выделения и характеристики. Молекулярное клонирование требует малых количеств исходных веществ, что дает возможность применить гель-электрофорез для выделения обогащенной фракции продукта из реакционной смеси, предварительно меченной с помощью [γ - 32 P] АТФ и полинуклеотидкиназы. Клонирование по липким концам обеспечивает высокую селективность встройки целевого продукта с данной первичной структурой перед побочными продуктами и поэтому не предъявляет высоких требований к его чистоте. Векторная моле-

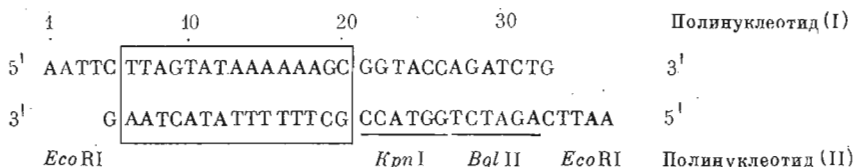


Рис. 1. Первичная структура 33-членных полинуклеотидов с «core» att-сайтом (отмечен рамкой) ДНК бактериофага λ . Сайты для рестриктаз *Kpn*I и *Bgl*II подчеркнуты

кула со встроенным фрагментом может быть легко амплифицирована и синтетический полинуклеотид выделен стандартными методами в количествах, необходимых для молекулярно-биологических исследований.

В качестве примера реализации такого подхода нами осуществлен синтез 33-членного фрагмента, содержащего «core» att-сайт бактериофага λ . По имеющимся данным, последовательность «core» att-сайта длиной 15 пар оснований содержится в центральной части фагового и бактериального сайтов интеграции [5]. Именно в пределах этой последовательности происходит сайт-специфическая рекомбинация, в результате которой ДНК фага λ встраивается в хромосому *E. coli* [5-6]. При этом «core» att-сайт выступает в роли акцептора, а полный фаговый att-сайт (POP') является донором в реакции рекомбинации [6].

В качестве вектора для клонирования синтетического фрагмента ДНК была выбрана плаزمида pUR222. Эта плаزمида несет ген « α -пептида» β -галактозидазы, внутри которого находится ряд уникальных сайтов рестрикции [7]. Клонирование синтезированной вставки по месту расщепления рестриктазой *Eco*RI приводит к терминации синтеза « α -пептида», так как клонируемый фрагмент в обеих ориентациях содержит стоп-кодны в рамке считывания данного гена. Это позволяет отбирать клоны, содержащие рекомбинантную плазмиду, на индикаторной среде, поскольку клетки *E. coli* ВМН 7118, несущие такую плазмиду, не обладают галактозидазной активностью.

Синтез цепей фрагмента ДНК (рис. 1) осуществляли твердофазным фосфотриэфирным методом на полистирольном носителе с карбоксильными якорными группами [8]. Нарастивание цепи проводили защищенными тринуклеотидными блоками со свободной 5'-гидроксильной группой от 5'- к 3'-концу. На последней стадии присоединяли динуклеотиды с 3'-бензоильной защитной группой. Реакцию конденсации проводили с помощью мезитилсульфохлорида в присутствии тетразола [9] в течение 8 ч. В качестве временной защитной группы по атому фосфора использовали цианэтильную группу. Защитные группы удаляли, как описано в работах [8, 10].

Реакционную смесь после полного деблокирования продукта обессоливали на колонке с биогеом Р-2, а затем часть ее метили с помощью [γ - 32 P] АТФ и полинуклеотидкиназы и подвергали электрофорезу. Полосу, соответствующую продукту, вырезали, полинуклеотид выделяли электроэлюцией и определяли его количество спектрофотометрически. Содержа-

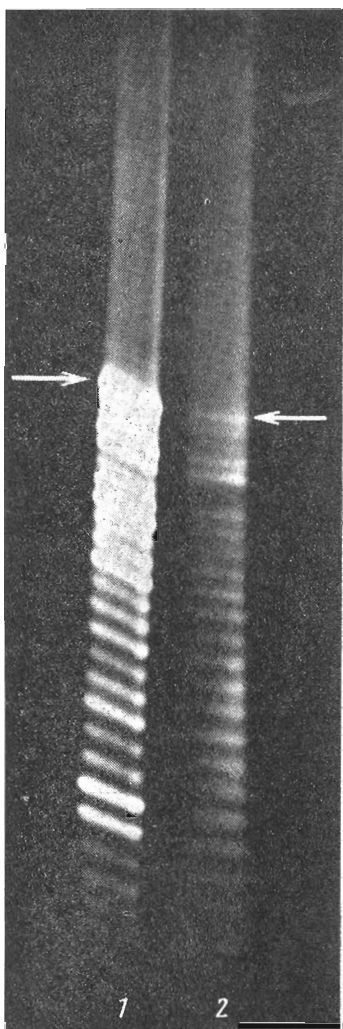


Рис. 2

Рис. 2. Результаты гель-электрофореза продуктов синтеза полинуклеотидов (I) и (II) (дорожки 1 и 2 соответственно), меченных $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ с помощью полинуклеотидкиназы (условия см. в «Экспер. части»). Стрелкой отмечены блоки, которые были выделены из геля и использованы для клонирования

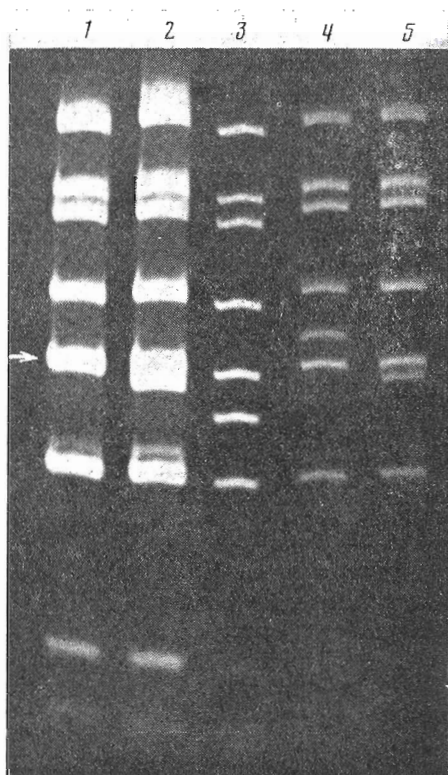


Рис. 3

Рис. 3. Результаты гель-электрофореза *BspI* и (*BspI*+*BglII*)-гидролизатов ДНК плазмид: 1 – ДНК pUR-att.1+*BspI*; 2 – ДНК pUR-att.1+*BspI*+*BglII*; 3 – ДНК pUR+*BspI* [7]; 4 – то же, что 1, но ДНК pUR-att.3; 5 – то же, что 2, но ДНК pUR-att.3. Стрелкой отмечено положение *BspI*-фрагмента со вставкой из ДНК pUR-att.1, которое совпадает с положением фрагмента *BspI*-627 [7] из ДНК pUR222. Электрофорез вели в 4% полиакриламидном геле, как указано в работе [11]

ние продуктов в исходной смеси, рассчитанное по данным электрофореза, составило 3,1% в случае полинуклеотида (I) и 2,4% в случае полинуклеотида (II). Результаты гель-электрофореза представлены на рис. 2.

После гель-электрофореза выделенные 33-членные блоки отжигали для образования дуплекса и лигировали с *EcoRI* гидролизатом ДНК плазмиды pUR222. Полученной смесью трансформировали CaCl_2 -обработанные клетки *E. coli* BMH 7418, которые затем высевали на индикаторную среду с X-Gal. Плазмидные ДНК из двух неокрашенных клонов, обозначенные pUR-att.1 и pUR-att.3, анализировали на наличие синтетической вставки. Рестриктивный анализ с помощью эндонуклеаз *BglII* и *BspI* (рис. 3) показал наличие вставки и *BglII*-сайта, отсутствующих в родительской плазмиде pUR222. Однако, как следует из электрофоретической подвижности *BspI* фрагментов этих плазмид, длины вставок в ДНК pUR-att.1 и pUR-att.3 различны.

Для окончательного выяснения структуры ДНК в гибридных плазмидах нами были определены нуклеотидные последовательности в областях вставок. Установленные структуры приведены на рис. 4. Нуклеотидная последовательность ДНК в pUR-att.3 соответствует ожидаемой. Структура ДНК pUR-att.1 отличается от таковой в pUR-att.3 в районе сайта *KpnI*, а также в векторной части плазмиды в области сайта *EcoRI*. Обе плазмиды содержат в составе синтетического фрагмента 15-членную последовательность сайта интеграции и вместе с полученной ранее плазмидой pPP' * [12] использованы для изучения механизма функционирования минимальной системы сайт-специфической рекомбинации.

Таким образом, в настоящей работе нами продемонстрирована возможность успешного применения варианта твердофазного метода синтеза олигонуклеотидов с наращиванием цепи от 5'-к 3'-концу в сочетании с гель-

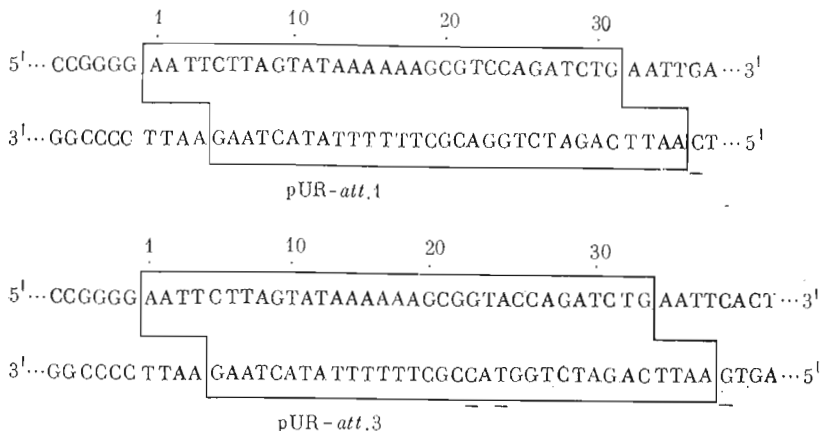


Рис. 4. Нуклеотидные последовательности рекомбинантных плазмид pUR-att.1 и pUR-att.3. Синтетический фрагмент отмечен рамкой. Отличия в структуре pUR-att.1 и pUR-att.3 подчеркнуты

электрофорезом и методом молекулярного клонирования для получения полинуклеотидов. Показано, что полистирольный носитель пригоден для синтеза 33-членных фрагментов ДНК с выходом, достаточным для их использования в молекулярно-биологических экспериментах. Учитывая высокую разрешающую способность гель-электрофореза в полиакриламидном геле и селективность молекулярного клонирования, предложенный метод, по-видимому, можно применить и для синтеза более длинных фрагментов ДНК.

Экспериментальная часть

В работе использовали: рестрикционные эндонуклеазы *EcoRI* (КФ 3.1.23.13), *BspI* (КФ 3.1.23), *BglII* (КФ 3.1.23.10) производства ВНИИ прикладной энзимологии (Вильнюс), T4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1), T4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78) и дезоксинуклеозиды производства НИКТИ БАН (Новосибирск), [γ - 32 P]ATP (2000–3000 Ки/ммоль) и [α - 32 P]dGTP (2000–3000 Ки/ммоль) (Amersham, Англия), дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты, ДНК-полимеразу из *Micrococcus lysodeikticus* (КФ 2.7.7.7), X-Gal (Sigma, США), бумагу DE-81 (Whatman, Англия), биогель P-2 (Bio-Rad Laboratories, США). Общие сведения об эксперименте см. в работах [8, 11, 13].

Для спектрофотометрических измерений использовали спектрофотометр Perkin — Elmer (США).

Химический синтез полинуклеотидов проводили на полистирольном носителе Bio-Beads Sx2 (Bio-Rad Laboratories, США), в который были введены карбоксильные группы, как описано в работе [8].

* Плазмида pPP' содержит полный фаговый att-сайт.

Введение первого нуклеотидного звена. 1 г карбоксил-полимера и 0,5 ммоль dbzAp(CiPh)(CNEt) высушивали упариванием с сухим пиридином (3×10 мл), добавляли 5 мл сухого пиридина и 378 мг (1,5 ммоль) мезитиленсульфонилтетразолида, перемешивали 20 ч при 20° С, прибавляли 0,4 мл метанола и перемешивали еще 12 ч. Полимер отфильтровывали, тщательно промывали пиридином (6×10 мл) и хлороформом (4×10 мл) и сушили в вакууме. Нагрузку носителя по нуклеотиду определяли спектрофотометрически, обрабатывая в течение 20 ч навеску полимер-нуклеотида 27% аммиачно-метанольным раствором и последующей промывкой полимера метанолом. Содержание нуклеотида на полимере составляло 100 мкмоль на 1 г полимера.

Удаление β-цианэтильной группы и проведение стадии конденсации. Навеску полимера, содержащую 5 мкмоль защищенного нуклеотида, перемешивали 3 мин при 20° С в 1 мл 2% раствора пентаметилгуанидина в сухом диоксиде, полимер отфильтровывали, добавляли свежую порцию раствора пентаметилгуанидина и перемешивали еще 3 мин. Полимер отфильтровывали, промывали сухим диоксидом (3×5 мл) и сухим пиридином (3×5 мл). Децанэтилированный полимер-нуклеотид (полинуклеотид), 15 мкмоль нуклеозидного компонента и 9,5 мг (135 мкмоль) тетразола высушивали упариванием с сухим пиридином (3×3 мл), добавляли 3 мл сухого пиридина и 9,8 мг (45 мкмоль) мезитиленсульфонилхлорида. Реакционную смесь концентрировали до объема 0,5–0,7 мл и перемешивали 8 ч при 20° С, полимер отфильтровывали, промывали сухим пиридином (3×3 мл) и сухим диоксидом (3×3 мл).

Полное удаление защитных групп. Полимер-полинуклеотид (100 мг) обрабатывали 36 ч 2 мл 0,5 М раствора *n*-нитробензальдоксимата лития в смеси пиридин–вода (7:3) при 20° С. Полимер отфильтровывали и промывали пиридином (4×5 мл) и 50% водным пиридином (4×5 мл). Фильтраты объединяли и упаривали досуха. К остатку добавляли 10 мл конц. аммиака и выдерживали 20 ч при 20° С. После удаления защитных групп реакционные смеси обессоливали на колонке размером 2,5×25 см с биогеом Р-2. Получено 780 ОЕ₂₆₀ реакционной смеси полинуклеотида (I) и 612 ОЕ₂₆₀ полинуклеотида (II).

Выделение полинуклеотидов. Реакционные смеси после обессоливания упаривали до концентрации ~50 ОЕ₂₆₀/мл. По 1 мкл полученного раствора обрабатывали полинуклеотидкиназой в присутствии [γ -³²P]АТР, затем добавляли по 10 мкл соответствующих исходных нефосфорилированных смесей, осаждали спиртом, растворяли в 80% формамиде и разделяли в 20% полиакриламидном геле (20×10×0,1 см), приготовленном на 0,05 М трис-боратном буфере (рН 8) с 7 М мочевиной. Участок геля, содержащий фрагмент длиной 33 нуклеотидных остатка, после идентификации его положения радиоавтографией вырезали и подвергали электроолюции на кружок из бумаги DE-81 диаметром 5 мм. С бумаги полинуклеотид элюировали 40 мкл 1 М раствора NaCl. Выход продуктов по отношению к исходному нуклеотиду на носителе, рассчитанный по поглощению при 260 нм, составил 1,2% для полинуклеотида (I) и 0,8% для полинуклеотида (II).

Получение рекомбинантных плазмид. К 1 мкг *EcoRI*-гидролизата ДНК рUR222 добавляли по 10 пкмоль синтетических полинуклеотидов (I) и (II), осаждали спиртом, осадок растворяли в 30 мкл буфера 1, содержащего 20 мМ трис-HCl (рН 7,8), 50 мМ NaCl и 10 мМ MgCl₂, смесь нагревали 3 мин до 60° С, охлаждали до 37° С, добавляли 2-меркаптоэтанол и АТР до концентрации соответственно 10 и 0,5 мМ, 2 ед. акт. T4-ДНК-лигазы и инкубировали 14 ч при 12° С. Третью часть реакционной смеси использовали для трансформации клеток *E. coli* ВМН 7418 [11], обработанных CaCl₂. Трансформанты отбирали на 1,5% LB-агаре, содержащем 40 мкг/мл ампицилина и 40 мкг/мл X-Gal. Из двух неокрашенных колоний при пробном анализе были выделены плазмиды, обозначенные рUR-att.1 и рUR-att.3. Обе ДНК содержали сайт эндонуклеазы *Bgl*II.

Структурный анализ ДНК. 20–25 мкг ДНК гидролизовали 40 ед. эндонуклеазы SalGI (КФ 3.1.23.37) в буфере 1 (с добавлением 2-меркаптоэта-

нола до 10 мМ), осаждали спиртом, осадок растворяли в 100 мкл этого же буфера, добавляли dATP, TTP и dCTP до концентрации 50 мкМ, 20 мкКи [α - 32 P]dGTP, 0,2 ед. ДНК-полимеразы I (КФ 2.7.7.7) и смесь инкубировали 30 мин при 12° С. По окончании реакции смесь прогревали 3 мин при 70° С, ДНК осаждали спиртом, осадок растворяли в буфере 1 и проводили исчерпывающий гидролиз действием нуклеазы *RspI* (КФ 3.1.23; 40 ед. акт. фермента). Радиоактивный фрагмент длиной около 60 пар оснований выделяли после электрофореза в 7% полиакриламидном геле. Фрагмент из геля извлекали, как указано в работе [11], и определяли его нуклеотидную последовательность модифицированным методом Максама — Гилберта [14].

ЛИТЕРАТУРА

1. Sood A. K., Narang S. A. Nucl. Acids Res., 1981, v. 4, № 8, p. 2757—2765.
2. Arentner A., Reese C. B. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1977, № 4, p. 445—460.
3. Demoe K. K., Miyoshi K., Itakura K. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 3, p. 706—708.
4. Rossi J. J., Kierzek R., Hung T., Walker P. A., Itakura K. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 16, p. 9226—9229.
5. Laudy A., Ross W. Science, 1977, v. 197, p. 1147—1160.
6. Hsu P.-L., Röss W., Landy A. Nature, 1980, v. 285, № 5760, p. 85—91.
7. Rütter U., Koenen M., Otto K., Muller-Hill B. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 16, p. 4087—4098.
8. Синяков А. Н., Ломакин А. И., Ямщиков В. Ф., Попов С. Г. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 4, с. 490—498.
9. Seth A. K., Jay E. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 22, p. 5445—5459.
10. Синяков А. Н., Ломакин А. И., Попов С. Г. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 68—74.
11. Серпинский О. И., Каргинова Е. А., Микрюков Н. И., Кравченко В. В., Зайчиков Е. Ф., Максимова Т. Т., Оникиенко А. И., Плетнев А. Г., Митина Ю. Л. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 840—846.
12. Кравченко В. В., Микрюков Н. И. Докл. АН СССР, 1982, т. 264, № 4, с. 999—1001.
13. Кравченко В. В., Василенко С. К., Гилева И. П., Зайцев Б. Н. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 2, с. 217—222.
14. Maxam A. M., Gilbert M. In: Methods in Enzymology, v. 65. Nucl. Acids. Part 1/Eds Grossman L., Moldave K. N. Y.: Acad. Press, 1980, p. 499—560.

Поступила в редакцию
1.VI.1983
После доработки
1.VIII.1983

SYNTHESIS OF 33-MEMBERED POLYNUCLEOTIDE CONTAINING THE «core» att SITE OF PHAGE λ DNA AND ITS CLONING

KRAVCHENKO V. V., SERPINSKI O. I., SINYAKOV A. N., POPOV S. G.

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

Two polynucleotides containing 33 monomeric units were synthesized by a solid-phase phosphotriester method. These polynucleotides form a duplex with protruding 5'-ends, which allows to clone the duplex in *EcoRI* site of a cloning vehicle. Each polynucleotide was purified by electrophoresis in polyacrylamide gel, and the duplex obtained was cloned in *EcoRI* site of pUR 222 plasmid DNA. The structure of the cloned duplex containing the «core» att site of phage λ was confirmed by sequencing.