



УДК 577.243.7

ОБЩИЙ ПОДХОД К КОНСТРУИРОВАНИЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ДНК

*Чахламчева О. Г., Бурякова А. А., Мирских О. В.,
Ревердатто С. В., Ефимов В. А., Обвинников Ю. А.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

На основе химико-ферментативных методов синтеза полинуклеотидов разработан подход к конструированию протяженных искусственных ДНК. Общая стратегия подхода включает использование временных сайтов узнавания крупнорасщепляющих эндонуклеаз рестрикции для облегчения субклонирования и сборки отдельных фрагментов гена. Эффективность предлагаемой методологии продемонстрирована на примере синтеза функционально важного фрагмента гена бактериородопсина.

В последние годы в связи с интенсивным развитием физико-химической биологии, генетической инженерии и биотехнологии все возрастающее практическое значение приобретает химико-ферментативный синтез фрагментов нуклеиновых кислот, в частности искусственных генов биологически активных пептидов и белков [1–4]. Синтетический подход, несмотря на трудоемкость, обладает по сравнению с использованием клонированных кДНК или выделенных из природных источников геномных последовательностей значительно большими потенциальными возможностями. Прежде всего он позволяет получать двухцепочечные полинуклеотиды с заданной последовательностью оснований. В синтетические ДНК можно вводить целый ряд заранее запрограммированных элементов: сайты эндонуклеаз рестрикции и регуляторные сигналы транскрипции и трансляции. При планировании последовательностей синтетических генов могут использоваться кодоны с учетом особенностей микроорганизма, в котором предполагается проводить их экспрессию, что позволяет повысить уровень синтеза соответствующих мРНК и белков в клетке. Синтетический подход упрощает также проведение направленного мутагенеза генов и создает дополнительные возможности для получения аналогов кодируемых ими белков, имеющих замены в функционально активных участках полипептидной цепи.

Современные методы синтеза нуклеиновых кислот позволяют получать гены, кодирующие белки длиной более 100 аминокислотных остатков (а.о.). Первой стадией в такого рода исследованиях является химический синтез олигодезоксирибонуклеотидов, которые затем с помощью ряда ферментов нуклеинового обмена превращаются в двухцепочечные фрагменты ДНК. Методология сборки синтетических олигомеров в протяженные дуплексы была впервые предложена более 15 лет назад Х. Г. Кораной и соотр. [5] и долгое время оставалась практически неизменной. Разработанный Х. Г. Кораной подход (рис. 1а) состоит в многократной последовательной сшивке с помощью фермента ДНК-лигазы 10–20-звенных олигонуклеотидов с комплементарными, взаимно перекрывающимися последовательностями оснований сначала в большие дуплексы с выступающими одноцепочечными последовательностями на концах, а затем этих промежуточных дуплексов в целый ген, который затем клонируется в векторной молекуле [6]. Этот способ сборки был использован для получения целого ряда полинуклеотидов, в том числе генов некоторых интерферонов человека, длина которых составляла более 500 п.о. [3, 7].

С развитием методов синтеза олигонуклеотидов стало возможным быстро получать чисто химическими способами 30–60-звенные олигомеры [8, 9]. Это, с одной стороны, позволило упростить описанную выше мето-

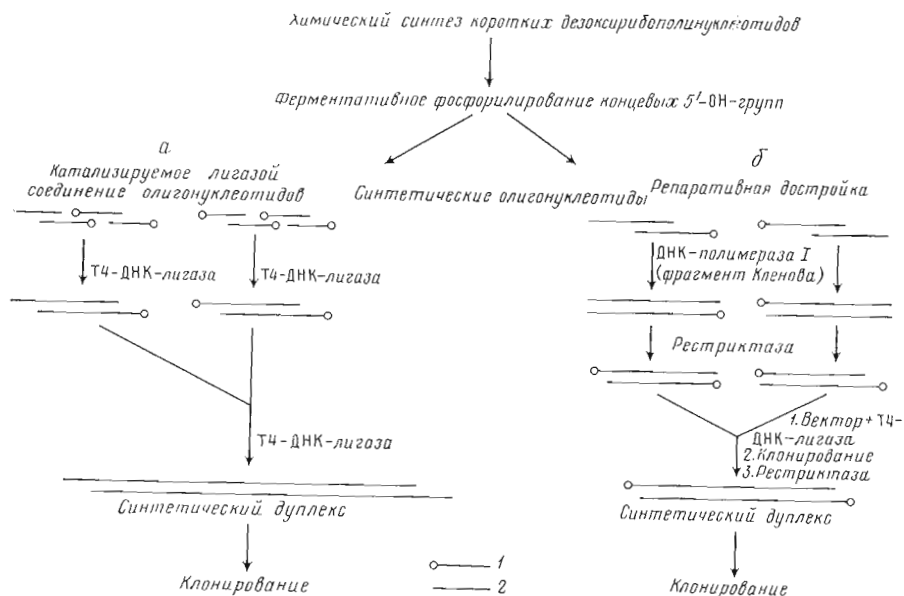


Рис. 1. Два подхода к получению двухцепочечных полинуклеотидов методами химико-ферментативного синтеза: *а* — подход, использующий для соединения отдельных фрагментов реакцию, катализируемую Т4-ДНК-лигазой; *б* — подход с применением репаративной достройки частичного дуплекса с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. 1 — 5'-фосфорилированный синтетический олигонуклеотид, 2 — олигонуклеотид, не имеющий фосфатной группы на 5'-конце

дологию, так как применение более длинных олигомеров позволяет существенно сократить число лигазных сшивок при сборке гена, а с другой — создало основу для разработки принципиально нового подхода к получению синтетических дуплексов, предложенного недавно К. Итакурой и сотр. [10, 11]. Этот подход заключается в репаративной достройке с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова) частичного дуплекса, образованного длинными олигонуклеотидами, в полностью двухцепочечный фрагмент ДНК. Структура двухцепочечных фрагментов планируется таким образом, чтобы при действии эндонуклеазы рестрикции один из концов фрагмента остался незатронутым, т. е. «тупым», а расщепление прошло по второму концу. Тогда при последующей лигазной сшивке фрагменты сшиваются между собой по «тупым» концам, а по «липким» концам встраиваются в вектор с восстановлением сайтов узнавания рестриктаз (рис. 1б). Одним из примеров применения этого способа явился синтез фрагмента гена человеческого лейкоцитарного интерферона α_2 длиной 132 п.о. [11].

Хотя первый из описанных выше подходов теоретически пригоден для построения генов любой длины, на практике по мере увеличения числа последовательных лигазных сшивок становится все труднее очищать продукты реакции и получать их в достаточном для дальнейшей работы количестве. Кроме того, при этом сильно возрастает расход исходных синтетических олигонуклеотидов. Второй подход в том виде, как он предложен авторами, пригоден только для получения фрагментов длиной не более 200–250 п.о. В связи с этим, как уже было показано ранее [2, 12, 13], более целесообразно для облегчения сборки гена, очистки его фрагментов и экономии нуклеотидного материала составлять его из отдельных субфрагментов-модулей, предварительно очищенных путем промежуточного клонирования.

Для успешного клонирования субфрагментов синтетического гена на его определенных участках должны содержаться сайты, узнаваемые эндонуклеазами рестрикции и уникальные как для самого гена, так и для вектора, в котором он клонируется. Обычно для этого используют сайты,

имеющиеся в последовательности синтезируемого гена [2, 4]. Однако чаще всего таких сайтов в гене либо нет, либо мало (не более 1–2 на несколько сот пар оснований). Это сильно ограничивало возможности химико-ферментативного синтеза двухцепочечных ДНК и создавало необходимость в использовании для получения полинуклеотидов значительной длины каких-то специальных приемов или подходов.

В ходе исследований, направленных на химико-ферментативный синтез, клонирование и осуществление экспрессии функционально активных фрагментов ДНК, нами был разработан общий подход к сборке двухцепочечных полинуклеотидов, позволяющий получать синтетические ДНК практически неограниченной длины. Описанию этого подхода и посвящено данное сообщение.

С х е м а 1

последовательность гена

.....CAATGG.....TTGCAG.....



последовательность гена с временными сайтами

.....CAAAGCTTTGG.....TTGAATTCAG.....

.....GTTCGAACC.....AACTTAAATC.....

HindIII

EcoRI

В основу предлагаемой методологии положены модульный принцип конструирования ДНК и использование временных сайтов крупнорасщепляющих эндонуклеаз рестрикции для клонирования отдельных субфрагментов и сборки целевого полинуклеотида. Дополнительные рестриктные сайты вводятся в последовательность гена в произвольно выбранных местах при планировании синтетической схемы и образуют границы модулей, из которых затем составляется ген. Такой временный дополнительный сайт можно ввести на любом участке ДНК, содержащем какой-либо самокомплементарный динуклеотид: АТ, ТА, СС или ГС. Для этой последовательности гена как бы раздвигается, и между этими двумя нуклеотидными остатками вводится тетра- или пентануклеотид, дополняющий его до структуры одного из возможных рестриктных сайтов (схема 1). Например, для появления в структуре ДНК сайта эндонуклеазы *EcoRI* (GAATTC) между нуклеотидными остатками динуклеотида ГС достаточно ввести тетра-нуклеотид ААТТ в обеих цепях ДНК. Таким образом, *EcoRI*-сайт может быть образован в любом месте на стыке G-C- и C-G-пар оснований. Соответственно *HindIII*-сайт (AAGCTT) можно ввести между основаниями любой А·Т-пары при добавлении тетра-нуклеотида АГСТ и т. д. (таблица). Для удаления созданного таким образом дополнительного рестриктного сайта синтезированную ДНК необходимо сначала расщепить соответствующей ему рестриктазой, а образовавшиеся при этом выступающие одноцепочечные последовательности удалить действием S_1 -нуклеазы. Полученные при этом «тупые» концы молекулы соединяются с помощью Т4-ДНК-лигазы (схема 2).

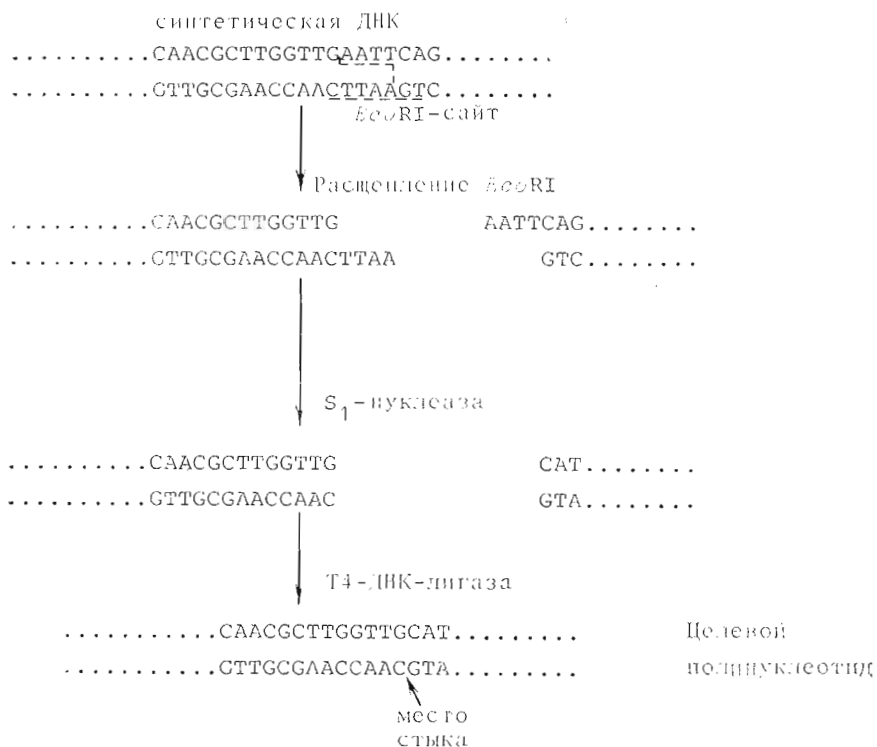
Разбивка последовательности ДНК на модули может проводиться произвольно. Однако при распределении дополнительных рестриктных сайтов следует учитывать возможности векторной молекулы, в которой предполагается клонировать модули гена и проводить их сборку. Например, при

Некоторые временные рестриктные сайты (в скобках соответствующий эндонуклеаза рестрикции), которые можно ввести в последовательность ДНК между остатками самокомплементарных динуклеотидов

Вводимая последовательность	Самокомплементарный динуклеотид			
	АТ	ТА	СГ	СС
ААТТ	ΛΛGCTT (<i>Hind</i> III) *	[TCGGCA (<i>Nru</i> I)] TCTAGA (<i>Xba</i> I) *	[CAGCTG (<i>Pvu</i> II) *] [CATATG (<i>Nde</i> I) *] CCATGG (<i>Nco</i> I) * CCCCGG (<i>Sma</i> I, <i>Xma</i> I) * [CCGCGG (<i>Sac</i> II)]	GAATTC (<i>Eco</i> RI) *
ACGT				
ACCT	ACGCGT (<i>Mlu</i> I)	TGATCA (<i>Bcl</i> I) *	[CGATCG (<i>Pvu</i> I) *] CGGCCG (<i>Xma</i> III)	GAGCTC (<i>Sac</i> I) *
АТАТ				
САТГ	ACATCT (<i>Bgl</i> II) *	[TGGCA (<i>Mst</i> I)] [TGGCCA (<i>Bal</i> I) *]	CTCGAG (<i>Xho</i> I) * CTGCAG (<i>Pst</i> I) * CTTAAG (<i>Afl</i> II) CPyCGPuG (<i>Ava</i> I) *	GATATC (<i>Eco</i> RV) *
СССГ				
СГСС	[AGGCGT (<i>Stu</i> I)]	[TTCCAA (<i>Asu</i> II)] [TTTAAA (<i>Aha</i> III)]	GCGCCG (<i>Nar</i> I, <i>Bde</i> I) GGGCC (<i>Apa</i> I) GTTACC (<i>Kpn</i> I) *	[GCCGGC (<i>Nae</i> I)] GCCCGC (<i>Bss</i> HI)
СТАГ				
ГАТГ	[ATCGAT (<i>Cla</i> I)]		CTCCAC (<i>Sal</i> I) *	GGATCC (<i>Bam</i> HI) *
GCGC				
GGCC	[ATCGAT (<i>Cla</i> I)]		[GTTAAC (<i>Hpa</i> I) *] GGTACC (<i>Bst</i> EI) *	GGCGC (<i>Nar</i> I, <i>Bde</i> I) GGGCC (<i>Apa</i> I) GTTACC (<i>Kpn</i> I) *
GTAC				
ТАТА				
ТССА				
ТТАА				
УСГР				
GTNAC				

* Рестриктные сайты, имеющиеся в плазмидах pRE1 и pRE2. Сайты эндонуклеаз, образующих при расщеплении ДНК «ступень» или «липиче» концы с выступающими динуклеотидными последовательностями, заключены в квадратные скобки.

С х е м а 2



работе в плазмиде pBR322 целесообразнее всего вводить сайты в порядке их нахождения в векторе: *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *SalI* и т. д. Особенно удобны для осуществления описываемого в данной работе подхода плазмиды (или фаги), имеющие специальные полилинкерные участки, поскольку они позволяют расширить разнообразие используемых эндонуклеаз рестрикции, а следовательно, упростить разбивку гена на модули, увеличить количество последних и длину синтезируемой ДНК.

Два таких вектора, pPLE1 и pPLE2 (рис. 2), были получены на основе ранее сконструированной нами плазмиды pHS2 [14] в результате введения в нее синтетического дуплекса длиной 40 п.о., последовательность которого содержала уникальные сайты семи крупнорасщепляющих эндонуклеаз рестрикции: *BglII*, *XbaI*, *SacI*, *BstEII*, *NcoI*, *KpnI* и *BclI*. Этот полинуклеотид был получен в результате репаративной достройки частичного дуплекса, образованного двумя 24-звенными олигонуклеотидами. Синтез олигонуклеотидов проводился с помощью N-метилимидазольного фосфоритриэфирного метода [15]. Плазмиду pHS2 расщепляли рестриктазой *HindIII*, образовавшиеся при этом выступающие концы достраивали с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Клепова) в присутствии дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и синтетический дуплекс встраивали в pHS2 с помощью Т4-ДНК-лигазы. При этом осуществлялись обе возможные его ориентации в векторе: в случае одной из них *HindIII*-сайт восстанавливался на своем прежнем месте, а в другом случае переносился на 40 н.п. в сторону *BamHI*-сайта. После трансформации этой смесью компетентных клеток *E. coli* и скрининга образовавшихся на ампициллине колоний гибридизацией с одним из ³²P-меченых 24-звенных олигонуклеотидов из отобранных колоний выделяли плазмидную ДНК и с помощью рестриктоного анализа определяли ориентацию синтетической вставки. Структуры фрагментов вновь полученных векторов с полилинкерными последовательностями подтверждали анализом нуклеотидной последовательности [16].

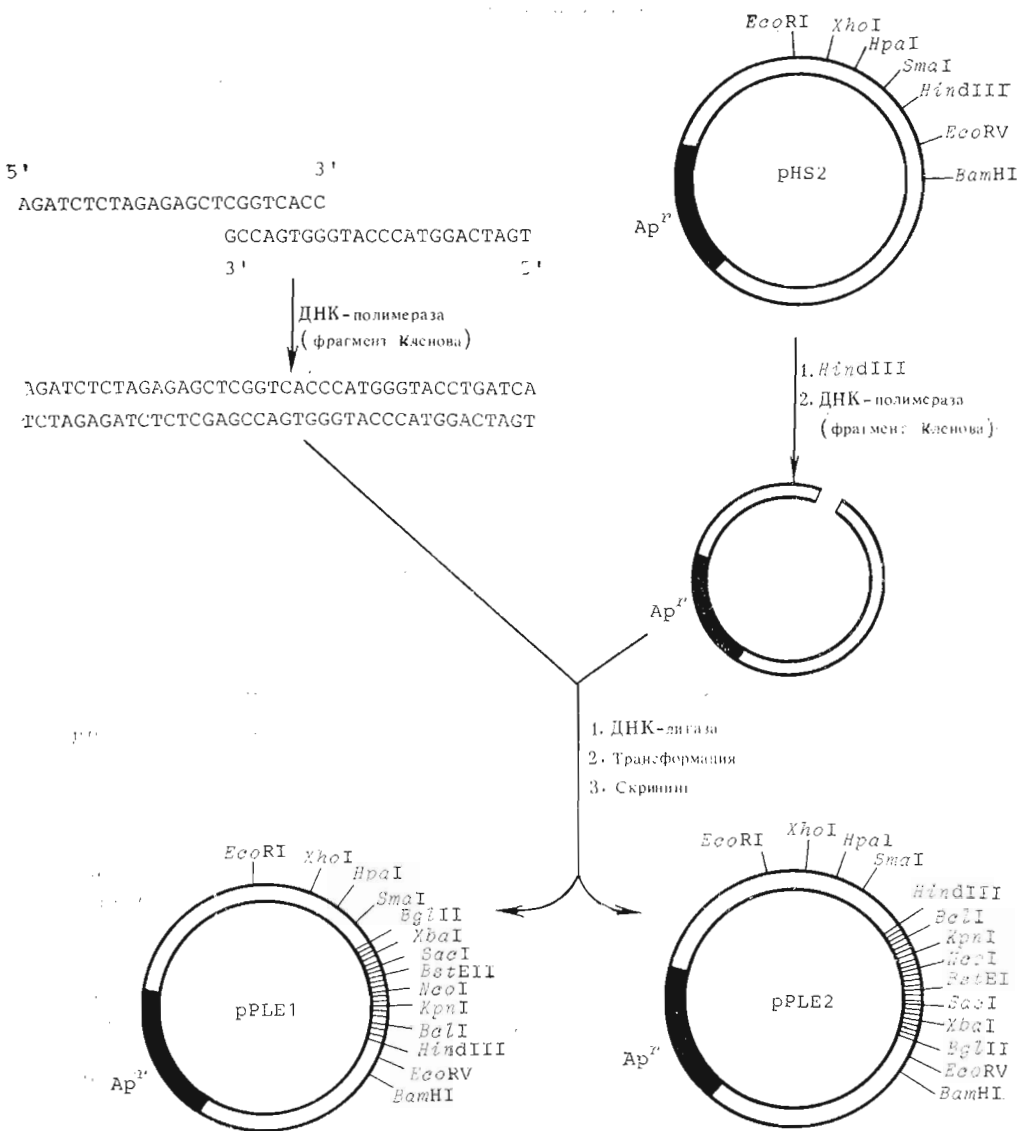


Рис. 2. Схема получения полилинкерных векторов pPLE1 и pPLE2. Заштрихованные участки соответствуют новым полилинкерным последовательностям, введенным в исходный вектор

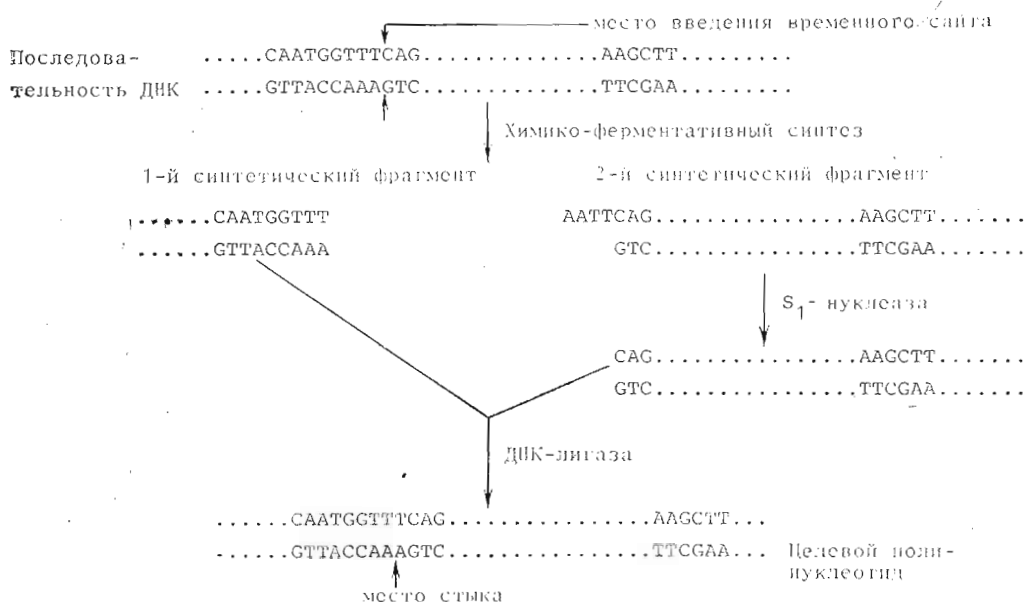
Отдельные двуитевые субфрагменты целевой ДНК могут быть получены любым из известных методов, показанных на рис. 1: лигированием полученных химически олигодезоксирибонуклеотидов [5], репаративной достройкой 3'-концов дуплекса, образованного двумя частично комплементарными олигомерами [10], или комбинацией этих методов. Перед соединением в одной плазмиде индивидуальные дуплексы-модули лучше предварительно очищать клопированием.

Сборку синтетического гена из готовых субфрагментов с использованием временных рестриктных сайтов можно проводить двумя способами. Один из них состоит в последовательном клонировании модулей синтезируемой ДНК в подходящем векторе, в результате чего собирается полный ген, содержащий помимо входящих в него нуклеотидов все дополнительные рестриктные сайты. Для уничтожения последних также последовательно проводят расщепление соответствующими эндонуклеазами рестрикции и обработку S_1 -нуклеазой (рис. 3а). Альтернативой использования нуклеаз является применение для удаления дополнительно введенного в

последовательность гена тетра nukлеотида олигонуклеотиднаправленного мутагена [14]. В этом случае для сборки гена целесообразно использовать синтетические субфрагменты с «липкими» концами, представляющими собой половинные сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции. Этот вариант сборки ДНК особенно полезен в тех случаях, когда предполагается получить несколько мутантных вариантов гена, что легко осуществляется простой заменой отдельных субфрагментов модифицированными последовательностями.

Второй, более быстрый способ сборки генов предусматривает последовательное соединение модулей друг с другом с одновременным уничтожением вспомогательных временных рестриктных сайтов (рис. 3б). В этом случае клонирование первого субфрагмента проводится так же, как и в предыдущем способе, затем после обработки соответствующей рестриктазой временный сайт на одном из концов этого встроенного в вектор модуля удаляется действием S_1 -нуклеазы. На противоположном конце молекулы генерируется половинный сайт следующей эндонуклеазы рестрикции. В подготовленный таким образом вектор вводится второй синтетический субфрагмент, имеющий «тупой» и «липкий» концы. «Тупой» конец используется для соединения с предыдущим, уже проклонированным субфрагментом, а «липкий» — для соединения со вторым концом векторной молекулы. При этом на стыке двух модулей сразу образуется последовательность, соответствующая оригинальной структуре гена. При таком варианте сборки не имеет значения, какая именно нуклеотидная пара находится на «тупом» конце вновь присоединенного модуля, т. е. разбивка целевого гена на модули может проводиться не только между двумя самокомплементарными нуклеотидами, как это показано на схеме 1, но и между любыми двумя нуклеотидами (схема 3).

Схема 3



Вышеизложенные способы сборки ДНК учитывают также возможность использования в качестве синтетических модулей дуплексов, имеющих оба «тупых» конца. При этом сокращается объем работы по химическому синтезу каждого субфрагмента, поскольку последовательности рестриктных сайтов можно практически полностью брать из векторной молекулы. Применение такого варианта подхода подробно рассматривается ниже на примере синтеза и клонирования модулей фрагмента гена бактериородопсина. В этом случае встает дополнительная задача определения правильной ориентации каждого субфрагмента гена в векторе после клонирования,

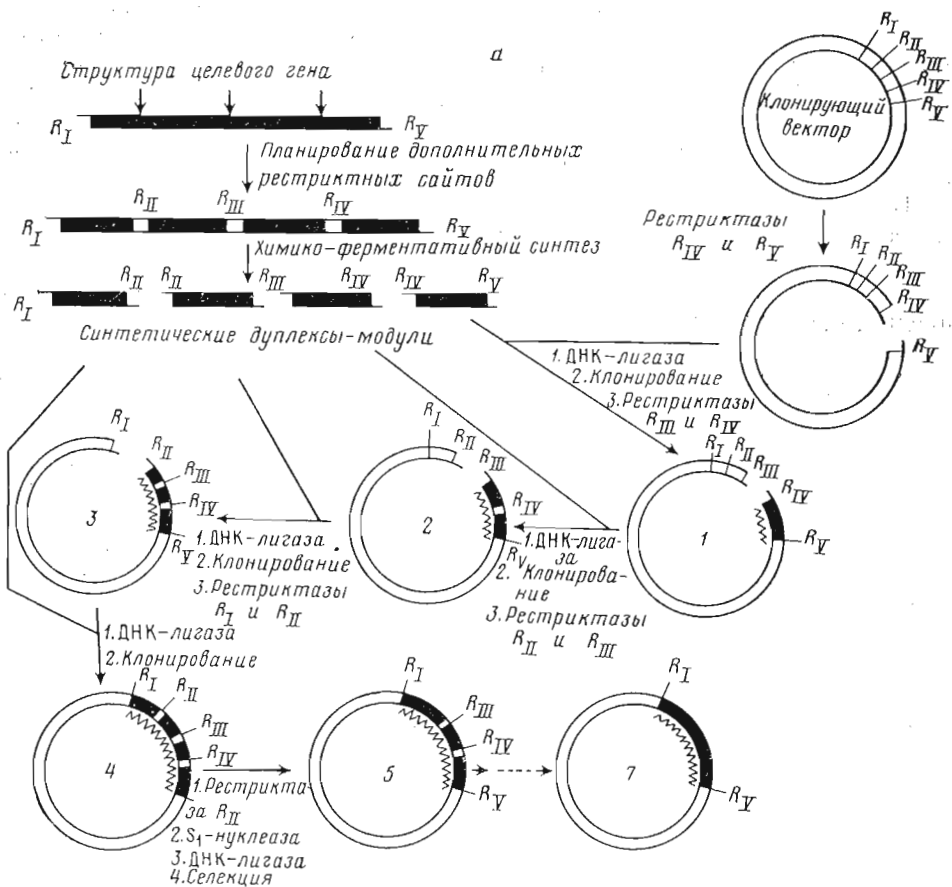


Рис. 3. Стратегия сборки синтетического гена (отмечен волнистой линией) из четырех субфрагментов-модулей с использованием временных рестриктных сайтов. а — в первоначально полученном гене (плазмида 4) содержатся все временные сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции, которые удаляют с помощью S_1 -нуклеазы один за другим с промежуточным клонированием интермедиатов, R_I , R_{II} и т. д. — сайты узнавания рестриктаз R_I , R_{II} и т. д. б — синтетические дуплексы-модули соединяются в векторной молекуле последовательно с одновременным удалением временных сайтов эндонуклеаз рестрикции

которая достаточно просто решается с помощью рестриктоного анализа или прямого анализа структуры рекомбинантной ДНК. Кроме того, скрининг рекомбинантных молекул на различных стадиях процесса сборки гена может быть значительно облегчен при использовании синтетических олигонуклеотидных молекулярных зондов [17]. Гибридизация с синтетическими зондами особенно эффективна при определении правильности стыковки отдельных модулей между собой и с вектором, поскольку существенно ускоряет этот процесс и сокращает объем работы по прямому подтверждению структуры синтезируемой ДНК.

Эффективность описываемого подхода была нами продемонстрирована на примере синтеза ряда ДНК, кодирующих функционально активные белки (см. ниже). В настоящем сообщении подробно рассматривается конструирование сегмента гена бактериородонина 198—231 а.о. Структура этого полинуклеотида была выведена на основе ранее установленной первичной структуры соответствующего белка [18] и генетического кода с учетом частоты использования различных кодонов в ДНК *E. coli* [19]. Помимо кодирующей части в полинуклеотиде содержались иницирующие и терминирующие кодоны, а на его концах — сайты эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *BamHI*, необходимые для введения этого полинуклеотида в клонирующий и экспрессирующий векторы. На рис. 4 показана структура полинуклеотида, его разбивка на три дуплекса-модуля и схема

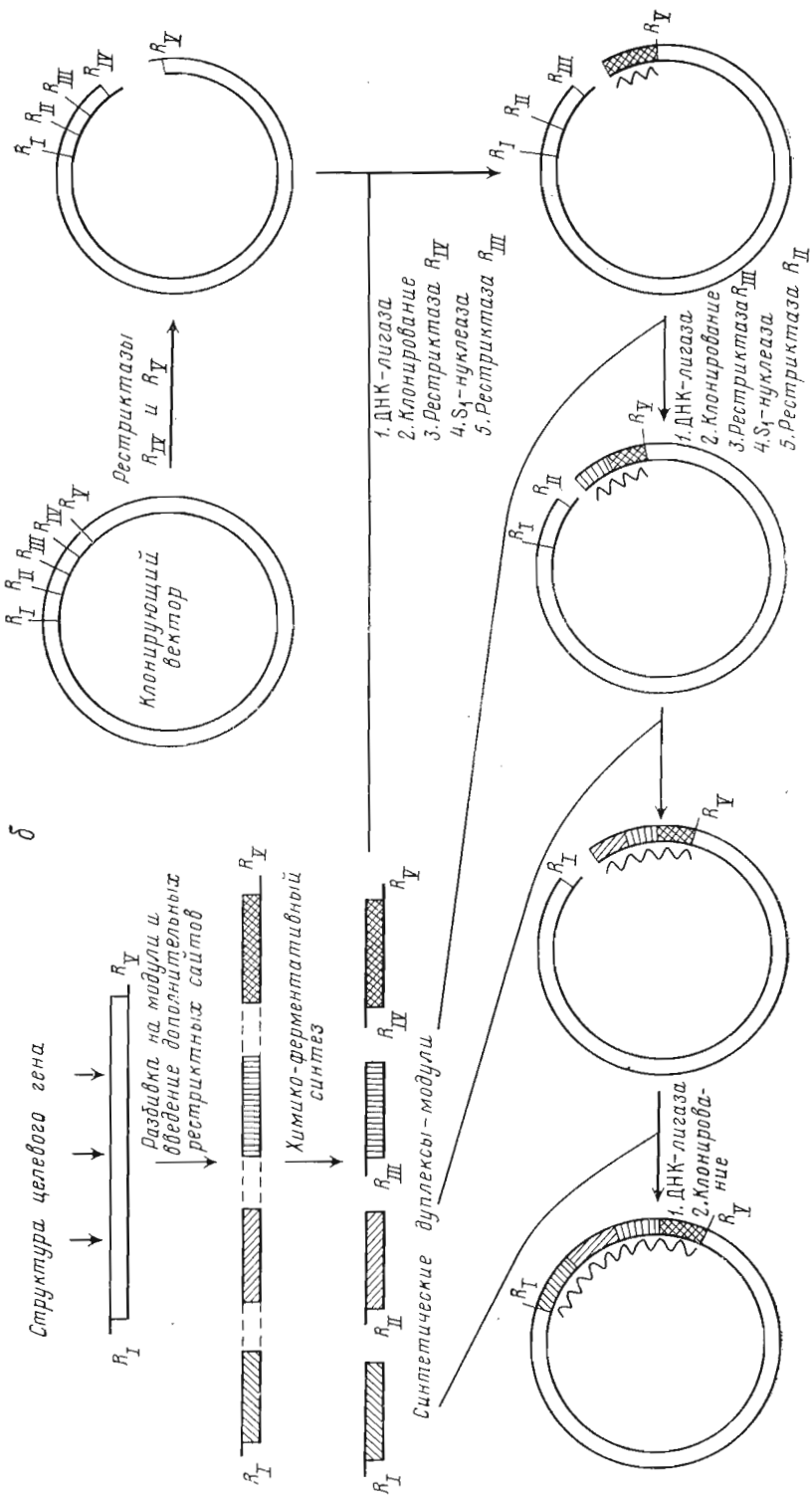


Рис. 36

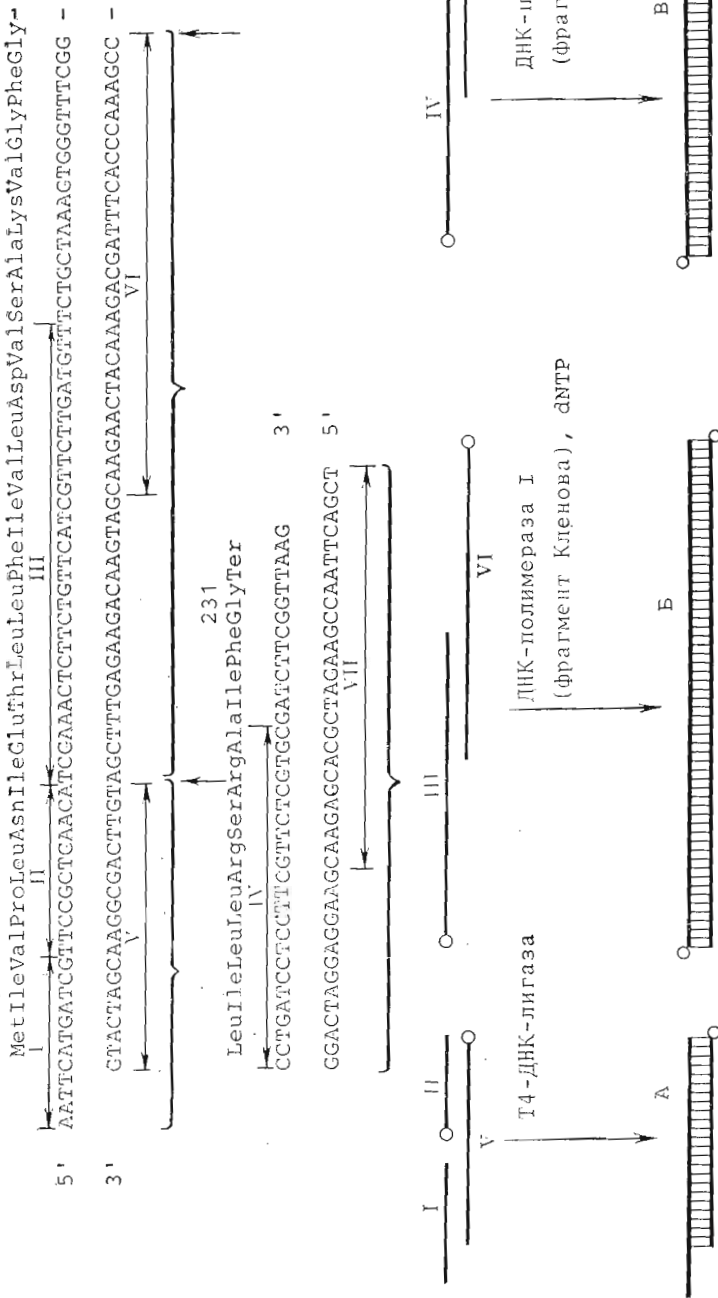
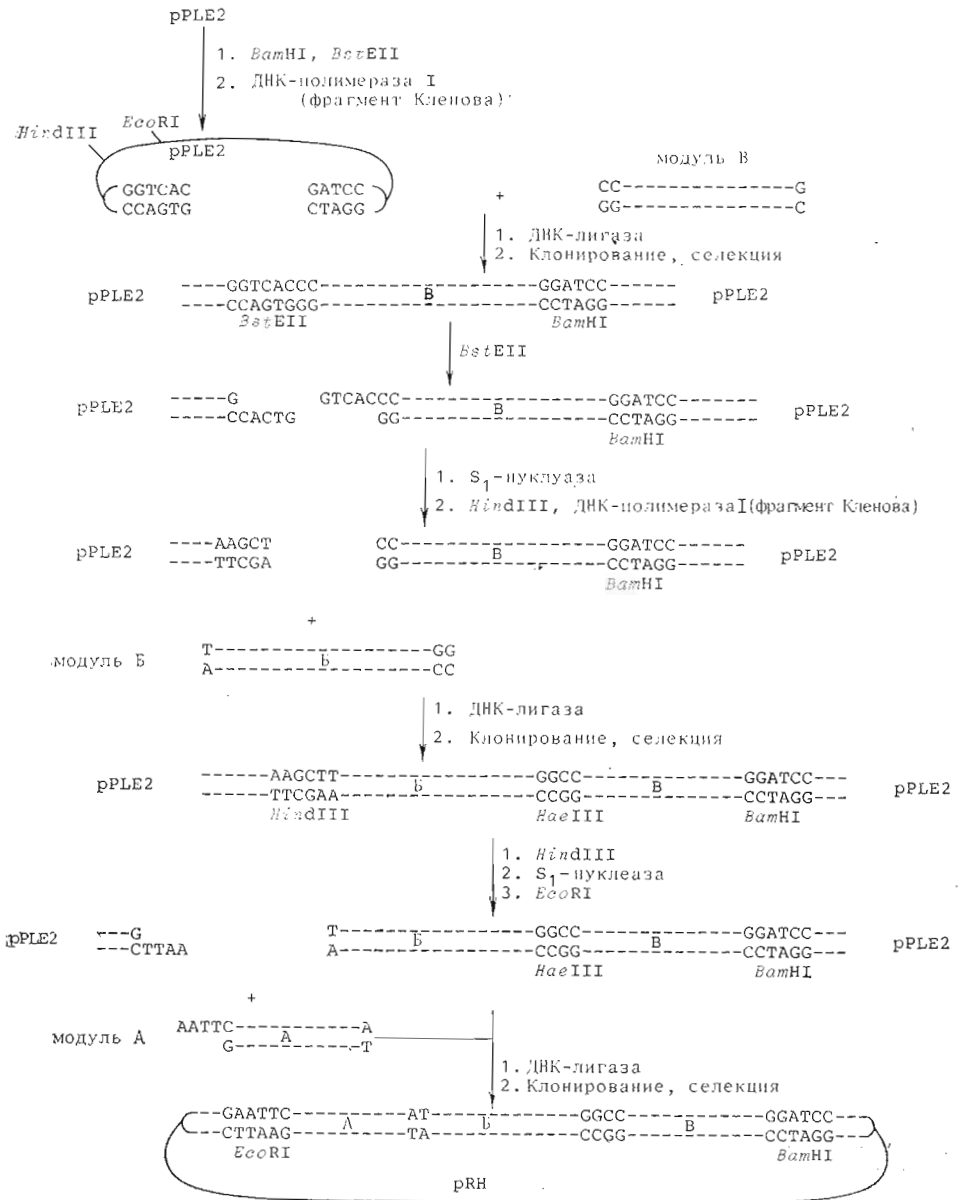


Рис. 4. Структура синтетического полинуклеотида, соответствующего функционально активному фрагменту бактериородопсина и схема сборки его субфрагментов из синтетических олигонуклеотидов. Вертикальными стрелками показаны места деления гена на субфрагменты, горизонтальными - границы отдельных олигонуклеотидов. Кругами обозначены 5'-фосфаты



получения отдельных модулей-субфрагментов из синтетических олигонуклеотидов. Первый модуль (А) был получен лигазной сшивкой олигодезоксирибонуклеотидов (I), (II) и (V); второй (Б) — репаративной достройкой частичного дуплекса, образованного 32-звенными олигонуклеотидами (III) и (VI), и третий модуль (В) — аналогичной достройкой 24-звенных олигонуклеотидов (IV) и (VII). Химический синтез всех олигомеров осуществлялся N-метилимидазолидным фосфотриэфирным методом [15].

В качестве вектора для клонирования субфрагментов А, Б и В и сборки целевого полинуклеотида была выбрана плаزمид рPLE2. Сборку проводили вторым из вышеописанных способов (см. рис. 3б). Первоначально в рPLE2 между *BamHI*- и *BstEII*-сайтами вводился дуплекс В (схема 4). Для этого после расщепления рPLE2 эндонуклеазами *BamHI* и *BstEII* образовавшиеся при этом выступающие концы достраивали с помощью ДНК-полимеразы и dNTP. Полученный при этом большой фрагмент выделяли электрофорезом в 1% агарозном геле и соединяли с дуплексом В

с помощью Т4-ДНК-лигазы. Полученной ДНК трансформировали компетентные клетки *E. coli*, трансформанты высевали на чашки, содержащие 25 мг/л ампициллина. Выросшие колонии анализировали на присутствие плазмид со встроенным в них синтетическим фрагментом В гибридизацией с ³²P-меченым олигонуклеотидом (IV). Из отобранных колоний выделяли плазмидную ДНК; ориентацию синтетической вставки в векторе и ее структуру определяли прямым секвенированием малого фрагмента *BstEII* — *BamHI*. Одну из выбранных плазмид с правильной ориентацией модуля В последовательно обрабатывали эндонуклеазой *BstEII*, S₁-нуклеазой, рестриктазой *HindIII* и ДНК-полимеразой. Полученный при этом большой фрагмент соединяли с модулем Б с помощью Т4-ДНК-лигазы. После трансформации *E. coli* проводили отбор колоний, содержащих плазмидные ДНК с этой вставкой, аналогично тому, как это описано выше для модуля В. Правильность стыковки субфрагментов Б и В, а также ориентацию Б в векторе подтверждали рестриктным анализом. При правильной ориентации Б в месте его соединения с В возникал сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *HaeIII*.

Для соединения модуля А с остальной частью олигонуклеотида плазмиду, несущую Б+В, последовательно обрабатывали *HindIII*, S₁-нуклеазой и *EcoRI*. Затем модуль А клонировали в подготовленном таким образом векторе. Скрининг колоний, содержащих искомые рекомбинантные ДНК, на присутствие фрагмента А и правильность его соединения с Б+В проводили с помощью гибридизации с меченым 16-звенным олигонуклеотидом d(AGTTTCGATGTTTCAGC), синтезированным специально для этой цели. Его структура соответствовала участку соединения фрагментов А и Б. Таким образом был собран весь целевой полинуклеотид, первичную структуру которого подтверждали анализом по методу Максама — Гилберта [16].

Элементы описываемого в настоящей работе подхода были использованы нами ранее при синтезе гена проинсулина человека (~290 п.о.) из четырех субфрагментов [20] и гена препроинсулина* (более 350 п.о.). Та же методология успешно применяется нами в настоящее время для синтеза ряда полинуклеотидов, в том числе промоторной области P_L* бактериофага λ.

В качестве одного из возможных путей усовершенствования процесса сборки длинных двухцепочечных полинуклеотидов ранее был предложен метод, использующий для клонирования субфрагментов ДНК «возвращающих» адаптеров, несущих сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *MboII*, *HphI* [21] или *HgaI* [22]. Однако вследствие ряда недостатков, в частности использования дорогостоящих эндонуклеаз рестрикции и значительного объема дополнительной синтетической работы, этот метод не нашел широкого распространения. Видимо, более перспективен недавно предложенный метод, основанный на применении для клонирования субфрагментов гена плазмидных векторов типа pBVV со встроенными в них сайтами эндонуклеазы рестрикции *BbvII* [23]. Однако и этот метод не лишен недостатков, поскольку для его осуществления необходимо иметь специально сконструированные векторы и достаточно редкую и труднодоступную эндонуклеазу рестрикции.

В отличие от этих методов разработанный нами подход к сборке двухцепочечных ДНК имеет существенное преимущество, заключающееся в его универсальности, т. е. в возможности его воспроизведения практически на любых общедоступных клонирующих векторах, в частности на pBR322. При наличии ограниченного набора из 3—4 удобных сайтов эндонуклеаз рестрикции можно собирать длинные ДНК, основываясь только на структуре последней и на заранее продуманной разбивке ее на субфрагменты. Кроме того, он органично включает в себя все ранее предложенные методы синтеза дуплексов. Совершенно очевидно, что подобным образом можно конструировать фрагменты ДНК значительно большей длины, чем практикуется в настоящее время, используя в качестве векторов как плазмиды,

* Сообщение будет опубликовано отдельно.

так и ДНК фагов. При этом размеры модулей могут колебаться в достаточно широких пределах (от 40–50 до 200–300 п.о.), а размеры целевого гена практически неограниченны.

Экспериментальная часть

В работе использованы эндонуклеазы рестрикции (Boehringer, ФРГ), S₁-нуклеаза (Sigma, США); Т4-ДНК-лигаза, Т4-полинуклеотидкиназа и ДНК-полимераза I *E. coli* (фрагмент Кленова) фирмы P-L Biochemicals (США).

Химический синтез олигодезоксирибонуклеотидов осуществляли фосфотриазирным N-метилимидазольным методом, как описано ранее [8, 15]. Синтетические олигонуклеотиды после удаления защитных групп очищали препаративным гель-электрофорезом и обращенно-фазовой хроматографией и их структуры подтверждали методом Максама — Гилберта [16]. 5'-Фосфорилирование олигонуклеотидов проводили с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и [γ -³²P]АТР (3000 Ки/ммоль, Amersham, Англия) [20].

Репаративный синтез дуплексов проводили в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 2 мМ дитиотреит, а достройку «липких» концов рестриктных сайтов осуществляли в рестрикционном буфере. Во всех случаях использовали 100 мкМ растворы dNTP и 2–4 ед. акт. ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова) на 100 мкл реакционной смеси. Реакцию проводили в течение 30 мин при 20°С и останавливали фенольной экстракцией белка и осаждением ДНК спиртом.

ДНК расщепляли эндонуклеазами рестрикции в соответствующих буферах [20]. Реакции проводили в течение 1 ч при 37°С с использованием 0,5–1 ед. акт. фермента на 1–2 мкг ДНК.

ДНК обрабатывали S₁-нуклеазой в 50 мМ ацетате натрия (рН 4,5), содержащем 200 мМ NaCl и 1 мМ ZnCl₂. На 10 мкг ДНК использовали 1 ед. акт. фермента. Инкубацию проводили при 20°С в течение 10–15 мин.

Конструирование рекомбинантных плазмид и трансформацию компетентных клеток *E. coli*, а также скрининг колоний гибридизацией с мечеными синтетическими олигонуклеотидами осуществляли согласно [17, 20].

В реакцию лигирования вводили по 250–500 пмоль каждого 5'-фосфорилированного олигомера и 300–600 пмоль 5'-нефосфорилированных олигомеров. Реакцию проводили в 100 мкл 50 мМ трис-НСl-буфера (рН 7,5), содержащего 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, 200 мкМ АТР, в присутствии 20 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы в течение 6–12 ч при 10°С. Двухцепочечные фрагменты ДНК (по 1–5 пмоль каждого) лигировали в 50 мкл того же буфера в присутствии 100 мкМ АТР. Для сшивания «тупых» концов полинуклеотидов реакцию проводили при 20°С в течение 12–14 ч.

Продукты реакций полимеразной достройки и ДНК-лигазной реакции выделяли гель-электрофорезом в неденатурирующем полиакриламидном геле (8–15%). В качестве электродного буфера использовали 0,05 М трис-борат (рН 8,3). Длинные фрагменты ДНК выделяли электрофорезом в 1% агарозном геле при том же рН. Фрагменты ДНК выделяли из гелей электроолюющей либо олюющей 0,5 М ацетатом аммония в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия [20].

ЛИТЕРАТУРА

1. Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. Science, 1977, v. 198, № 4321, p. 1056–1063.
2. Crea R., Kraszewski A., Hirose T., Itakura K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 12, p. 5765–5769.
3. Edge M. D., Greene A. R., Heathcliff G. R., Meacock P. A., Schuch W., Scanlon D. B., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F. Nature, 1981, v. 292, № 5825, p. 756–762.
4. Овчинников Ю. А., Долганов Г. М., Ефимов В. А., Монастырская Г. С., Свердлов Е. Д., Ходкова Е. М., Чазмахчева О. Г., Честухин А. В., Шемякин М. Ф. Докл. АН СССР, 1979, т. 248, № 6, с. 1486–1491.

5. Khorana H. G., Büchi H., Caruthers M. H., Chang S. H., Gupta N. K., Kumar A., Ohtsuka E., Sgaramella V., Weber H. In: Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. N. Y.: Cold Spring Harbor, 1968, v. 33, p. 35-44.
6. Khorana H. G. Science, 1979, v. 203, № 4381, p. 614-625.
7. Jay E., Macknight D., Lutze-Wallace C., Harrison D., Wishart P., Liu W.-Yu., Asundi V., Pomeroy-Cloney L., Rommens J., Englington L., Pawlak J., Jay F. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 10, p. 6311-6317.
8. Efimov V. A., Buryakova A. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 23, p. 8369-8387.
9. Adams S. P., Kavka K. S., Wykes E. J., Holder S. B., Galluppi G. R. J. Amer. Chem. Soc., 1983, v. 105, № 3, p. 661-663.
10. Itakura K. TIBS, 1982, v. 7, № 12, p. 442-445.
11. Rossi J. J., Kierzek R., Huang T., Walker P. A., Itakura K. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 16, p. 9226-9229.
12. Ikehara M., Ohtsuka E., Tokunaga T., Taniyama Y., Iwai S., Kitano K., Miyamoto S., Ohgi T., Sakuragawa Y., Fujiyama K., Kobayashi M., Miyake T., Shibahara S., Ono A., Ueda T., Tanaka T., Baba H., Miki T., Sakurai A., Oishi T., Chisaka O., Matsubara K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 19, p. 5956-5960.
13. Brousseau R., Scarpulla R., Sung W., Hsiung H. M., Narang S. A., Wu R. Gene, 1982, v. 17, № 3, p. 279-289.
14. Efimov V. A., Mirskikh O. V., Chakhmakhcheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1985, v. 181, № 2, p. 407-411.
15. Efimov V. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 21, p. 6675-6694.
16. Mazam A. M., Gilbert W. Methods in Enzymol., 1980, v. 65, p. 499-560.
17. Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. Биооргани. химия, 1982, т. 8, № 8, с. 2084-2093.
18. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. FEBS Lett., 1979, v. 100, № 2, p. 219-224.
19. Robinson M., Lilley R., Little S., Emtage J. S., Yarranton G., Stephens P., Milligan A., Eaton M., Humphreys G. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 17, p. 6663-6671.
20. Ovchinnikov Yu. A., Efimov V. A., Ivanova I. N., Reverdatto S. V., Skiba N. P., Chakhmakhcheva O. G. Gene, 1984, v. 31, № 1-3, p. 65-78.
21. Narang S. A., Brousseau R., Hsiung H. M., Sung W., Scarpulla R., Changas G., Lau L., Hess B., Wu R. Nucl. Acids Res. Symp. Ser., 1980, № 7, p. 377-385.
22. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Северцова И. В., Быстров Н. С., Колосов М. Н. Биооргани. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 830-839.
23. 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.

Поступила в редакцию
22.V.1985

GENERAL APPROACH TO THE DOUBLE-STRANDED DNA CONSTRUCTION

CHAKHMAKHCHEVA O. G., BURYAKOVA A. A., MIRSKIKH O. V.,
REVERDATTO S. V., EFIMOV V. A., OVCHINNIKOV Yu. A.

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

A useful and efficient approach to the synthesis of DNA duplexes of practically unlimited length has been developed. The proposed methodology is based on the use of temporary restriction sites for subcloning and assembling the segments of the desired DNA. It allows the utilization of chemically synthesized oligonucleotides of various length (from 10- to 100-mers) for the duplex construction. The application of this approach to the synthesis of a gene for the functionally active bacteriorhodopsin fragment is described.