

Рис. 1. Результаты гибридизации радиоактивно меченых олигонуклеотидных зондов, комплементарных мРНК  $\alpha$ -субъединицы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы с иммобилизованной poly(A<sup>+</sup>)-РНК из почек свиньи. *a* — 15 мкг poly(A<sup>+</sup>)-РНК; *b* — 5 мкг poly(A<sup>+</sup>)-РНК. 1 — гибридизация РНК с зондом I; 2–4 — гибридизация РНК с зондами из фракций I–III (см. рис. 2); 5 — гибридизация РНК с зондом Ib (см. схему 2). Стрелками указано положение 28S и 18S РНК

большинстве случаев успех в поиске положительных клонов при длине зонда 14–17 достигается при вырожденности не более 32 [2].

Разработано несколько различных подходов для уменьшения вырожденности зондов. Например, в ряде случаев оказалось удачным использование G в третьем положении кодона [4], а также I [5] при неопределенности A/G и A/G/C/T соответственно. Другой способ уменьшения вырожденности основан на синтезе уникальных последовательностей с использованием статистически наиболее вероятных для данного типа клеток кодонов [6]. Однако оба метода не гарантируют полного сохранения комплементарности зонда с искомой последовательностью и потому их целесообразнее использовать для синтеза более длинных зондов.

В настоящей работе предложен и использован метод обогащения нуклеотидных зондов по специфической последовательности путем фракционирования исходной смеси синтетических олигонуклеотидов (64 варианта) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В других экспериментах для уменьшения вырожденности использовался также заново синтезированный четырьмя группами по 16 вариантов препарат зонда I. Результаты эксперимента позволяют сопоставить оба способа уменьшения вырожденности олигонуклеотидных зондов.

На схеме приведена структура пептида из триптического гидролизата  $\alpha$ -субъединицы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы [1] и соответствующий ему олигонуклеотидный зонд I. Этот зонд представляет собой смесь 64 17-звенных олигонуклеотидов, из которых лишь один комплементарен искомой мРНК.

Гибридизация этого зонда с poly(A<sup>+</sup>)-РНК, выделенной из мозгового слоя почек свиньи, показала, что кроме полосы мРНК  $\alpha$ -субъединицы фермента, дающей положительный сигнал гибридизации в области 25–26S, имеется высокий фон неспецифического связывания в области 28S и 18S РНК (рис. 1).

Фракционирование зонда I осуществлялось с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Оптимальные условия разделения были подобраны в серии аналитических экспериментов на трех типах сорбентов:  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (Waters, США), Zorbax ODS (Du Pont, США) и Nucleosil 7C<sub>18</sub> (Machery-Nagel, ФРГ). Цель этих опытов заключалась в поиске условий, обеспечивающих наиболее полное отделение фракций, содержащих искомый зонд, от основной массы нуклеотидного материала. Степень обогащения фрак-

ций элюата по специфической последовательности оценивалась гибридизацией с poly(A<sup>+</sup>)-РНК.

В ходе препаративного деления на колонке Nucleosil C<sub>18</sub> исходная смесь олигонуклеотидов была разделена на пять фракций (рис. 2). Обессоливание фракций проводилось на биоэле Р-4. На рис. 1 (дорожки 2—4) приведены результаты гибридизации первых трех фракций элюата: самый сильный сигнал дает олигонуклеотидный зонд первой фракции, нуклеотиды остальных фракций практически не давали положительной гибридизации.

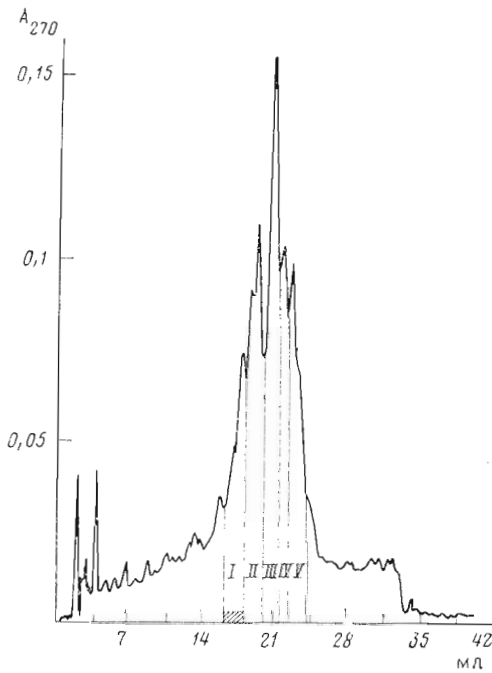


Рис. 2. Обогащение зонда I с помощью ВЭЖХ на колонке (4,6×250 мм) с сорбентом Nucleosil 7C<sub>18</sub>. Элюирующие буферы: А — 0,1 М СН<sub>3</sub>СООНН<sub>4</sub> (рН 7,0), В — 0,1 М СН<sub>3</sub>СООНН<sub>4</sub> (рН 7,0), 60% СН<sub>3</sub>ОН. Скорость элюирования 0,7 мл/мин. Прямоугольником на оси абсцисс обозначены границы обогатенной фракции, гибридирующей с мРНК

(схема 2). Результаты гибридизации с poly(A<sup>+</sup>)-РНК (рис. 1) четко показали, что вариант зонда Ib, содержащий последовательность GGC, гибридизуется с мРНК, причем интенсивность сигнала гибридизации сравнима с таковой при обогащении зонда хроматографическим путем.

Как уже упоминалось выше, при скрининге зондом I библиотеки кДНК, содержащей ~2·10<sup>4</sup> клонов, нам не удалось обнаружить положительных клонов. При использовании для гибридизации хроматографически обогатенной фракции зонда I были обнаружены клоны, дающие положительный сигнал гибридизации (рис. 3). Еще более четкий результат был получен при использовании зонда Ib, содержащего 16 вариантов олигонуклеотида (рис. 3). При гибридизации на колониях нами было проверено несколько описанных методов гибридизации и отмывки зондов. Наилучшие результаты с точки зрения уменьшения фона, обусловленного неспецифическим связыванием, были получены при использовании для гибридизации смеси гепарина, пирофосфата натрия и коктейля Блотто в дополнение к обычно применяемому раствору Денхардта (см. «Экспериментальную часть»).

При скрининге библиотеки клонов, полученной с «рассеянной» затравкой (статистический гидролизат ДНК) (10<sup>5</sup> клонов), зондом Ib было выявлено 17 положительных колоний. Один из клонов (pB 804) содержал вставку 449 п.о. с внутренним сайтом PstI. Анализ нуклеотидной последовательности этой вставки позволил установить структуру 17,4 кДа фрагмента α-субъединицы Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-азы [7].



США); формамид (BRL, США); метанол (Pierce, США); РНК дрожжей (Serva, ФРГ); фикола 400 (Pharmacia, Швеция); поливинилпирролидон, М 44 000 (BDH, Англия); БСА, фракция V (Calbiochem, США); NaCl (ос. ч., СССР); [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]АТФ, уд. акт. 5000 Ки/моль (Amersham, Англия). Полинуклеотидкиназа фага T4 была любезно предоставлена А. В. Честухиным (ИБХ АН СССР).

*Синтез олигонуклеотидов* проводили фосфотриэфирным методом в растворе [8]. *Олигонуклеотиды метили* по 5'-концу [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]АТФ с помощью полинуклеотидкиназы по методу [9].

*Обогащение зонда* осуществляли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке (4,6×250 мм) Nucleosil 7C<sub>18</sub> (Machery-Nagel, ФРГ), хроматограф Du Pont Instruments (Du Pont, США). Образец (30 мкг) наносили на колонку в объеме не более 200 мкл. Элюирование нуклеотидов осуществляли линейным градиентом концентрации метанола в 0,1 М CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, рН 7,0 (рис. 3). Олигонуклеотиды детектировали спектрофотометрически ( $\lambda$  270 нм). Аналитические опыты проводили, используя 1–3 мкг материала исходного зонда.

*Обессоливание обогащенной фракции* проводили с помощью гель-проникающей хроматографии на колонке (1×20 см) с биогелем Р-4 (100–200 меш), уравновешенным трижды дистиллированной водой. Предварительно фракцию упаривали на роторном испарителе до объема 500 мкл. После обессоливания фракцию упаривали до объема 440 мкл и хранили при температуре от –5 до –10° С. Из 30 мкг исходного зонда в конечном итоге получили 5 мкг обогащенной фракции.

*Выделение мРНК* из мозгового слоя почек свиньи, фракционирование мРНК в сахарозном градиенте, синтез и клонирование кДНК проводили как описано ранее [10].

*Гибридикация мРНК с олигонуклеотидными зондами.* 5–10 мкг poly(A<sup>+</sup>)-РНК подвергали электрофоретическому разделению в 1,5% агарозном геле, содержащем 2,2 М формальдегид [11]. Детекцию специфической мРНК радиоактивно меченым олигонуклеотидным зондом проводили на высушенном геле, без переноса РНК на твердый носитель [12].

Прегибридикацию, гибридикацию и отмывку геля осуществляли по стандартной методике [12]. Температура гибридикации для зонда I, определенная эмпирически, составляла 40° С. Отмытый гель экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-В с усиливающим экраном при –70° С в течение 16–48 ч.

*Скрининг библиотеки кДНК.* Бактериальные колонии лизировали на нитроцеллюлозном фильтре, нейтрализовали и запекали, как описано в работе [13].

Прегибридикацию, гибридикацию и отмывку нитроцеллюлозных фильтров проводили по методике, описанной в работе [14]. Для уменьшения неспецифического связывания во все растворы добавляли гепарин, пирофосфат натрия и коктейль Блотто (раствор обезжиренного сухого молока) как описано в работах [15, 16]. Высушенные фильтры экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-В в течение 16–48 ч.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арзамасова И. М., Аристархова Е. А., Шафиева Г. И., Назимов Н. В., Алданова И. А., Модянов Н. Н. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 12, с. 1598–1606.
2. Reyes U., Wallace R. B. In: Genetic Engineering / Ed. Setlow R. B. N. Y.—L.: Plenum Press, 1984, v. 6, p. 157–173.
3. Gubler U., Monahan J. J., Lemedico P. T., Bhatt R. S., Collier K. J., Hoffman B. J., Bohlen P., Esch F., Ling N., Zeitin F., Bruzeau P., Poonian M. C., Glage L. P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 14, p. 4311–4314.
4. Gubler U., Chua A. O., Hoffman B. J., Collier K. J., Eng J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 14, p. 4307–4310.
5. Takahashi Y., Kato K., Hayashizaki Y., Wakabayashi T., Ohtsuka E., Matsuki S., Ikehara M., Matsubara K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1985, v. 82, № 4, p. 1931–1935.
6. Lathe R. J. Mol. Biol., 1985, v. 183, № 1, p. 1–12.
7. Овчинников Ю. А., Монастырская Г. С., Арсенян С. Г., Броуде Н. Е., Петрухин К. Е., Гришин А. В., Арзамасова И. М., Северцова И. В., Модянов Н. Н. Докл. АН СССР, 1985, т. 283, № 5, с. 1278–1280.

8. *Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bhal C. P., Wu R.* Nucleic Acid Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353-371.
9. *Маниагис Т., Фрич Э., Сэмбурк Дж.* В кн.: Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984, с. 134-135.
10. *Петрухин К. Е., Броуде Н. Е., Арсенян С. Г., Гришин А. В., Джанджугазян К. Н., Модянов Н. Н.* Биооргани. химия, 1985, т. 11, № 12, с. 1607-1613.
11. *Маниагис Т., Фрич Э., Сэмбурк Дж.* В кн.: Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984, с. 197-198.
12. *Meinkoth J., Wahl G.* Anal. Biochem., 1984, v. 138, № 2, p. 264-284.
13. *Маниагис Т., Фрич Э., Сэмбурк Дж.* В кн.: Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984, с. 294-295.
14. *Hanahan D., Meselson M.* In: Methods in Enzymology / Eds Wu R., Grossman L., Moldave K. N. Y.-L.: Acad. Press, 1983, v. 100, p. 333-342.
15. *Johnson D. A., Gautsch J. A., Sportsman J. K., Elder J. H.* Gene Anal. Techn., 1984, v. 1, № 1, p. 3-8.
16. *Sigh L., Janes K. V.* Nucleic Acid. Res., 1984, v. 12, № 14, p. 5627-5638.

Поступила в редакцию  
5.VII.1985

**SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES WITH HIGH DEGREE OF DEGENERACY USED AS HYBRIDIZATION PROBES FOR IDENTIFICATION OF mRNA AND cDNA CLONES CODING FOR  $\alpha$ -SUBUNIT OF Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase**

PETRUKHIN K. E., GRISHIN A. V., ARSENYAN S. G.,  
BROUDE N. E., GRINKEVICH V. A., FILIPPOVA L. Yu., SEVERTSOVA I. V.,  
MODYANOV N. N.

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

Oligonucleotides deduced from the amino acid sequence of a hexapeptide Lys-Asp-Phe-Ala-Glu-Asn were synthesized and used as probes to screen a pig kidney cDNA library for a specific DNA sequence coding for the  $\alpha$ -subunit of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. It was shown that the mixed oligoprobe, consisting of 64 heptadecamers, could be only suitable for mRNA blot analysis. To identify the clones with specific cDNA inserts, mixed oligoprobes were fractionated by HPLC technique. For the same purpose a new set of oligonucleotides, synthesized as four groups of 16 different heptadecamers each, was used.