



УДК 577.243.7

СИНТЕЗ И КЛОНИРОВАНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ ГЕНОВ ЗЕИНОВ

*Ефимов В. А., Бурякова А. А., Пашикова И. Н.,
Чахламчева О. Г.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

С целью изучения структурно-функциональных отношений в запасных белках кукурузы — зеинах, а также для разработки подходов к конструированию методами белковой инженерии мутантных зеинов, обладающих повышенными питательными качествами, осуществлен химико-ферментативный синтез искусственных фрагментов ДНК, кодирующих зеин сZ22В1 (М22 кДа) и его мутанты.

Основные запасные белки кукурузы — зеины представляют собой микрогетерогенную смесь гидрофобных белков с молекулярными массами от 10 000 до 22 000, локализованных в эндосперме зерна в виде нерастворимых в воде «белковых тел». С целью изучения структурно-функциональных отношений в этих белках, а также для разработки подходов к конструированию методами белковой инженерии мутантных зеинов, обладающих повышенными питательными качествами, предпринят химико-ферментативный синтез искусственного фрагмента ДНК длиной около 800 п.о., кодирующего зеин сZ22В1 с молекулярной массой 22 000 [1].

По своим размерам зеины подразделяются на четыре основные группы 22, 19, 15 и 10 кДа. Все зеины имеют сходный аминокислотный состав, который характеризуется повышенным содержанием гидрофобных аминокислот, таких как пролин, аланин, фенилаланин, и практически полным отсутствием ряда важных в питательном отношении, незаменимых аминокислот: лизина, триптофана и гистидина. Анализ аминокислотной последовательности двух наиболее представительных групп зеиновых белков с молекулярными массами 22 и 19 кДа показал, что их молекулы устроены однотипно и содержат наряду с уникальными N- и C-концевыми последовательностями 9-кратные повторы 20-звенного аминокислотного кластера с практически универсальной последовательностью [2]. Последние, по-видимому, играют важную роль в организации пространственной структуры этих белков.

Синтезированные нами варианты гена зеина представляют собой двухцепочечные фрагменты ДНК длиной около 800 п.о. (рис. 1), последовательность которых практически полностью соответствует структуре гена сZ22В1 [1]. Некоторые незначительные изменения были внесены в них для облегчения процесса сборки гена и его последующего мутагенеза с целью увеличения количества остатков лизина и триптофана в различных местах полипептидной цепи соответствующего белка.

Ген зеина синтезирован в двух вариантах: с включением последовательности, кодирующей лидерный пептид, и без последней. Схема сборки этого фрагмента ДНК предполагала использование недавно разработанного нами подхода [3], основанного на предварительном клонировании модулей, содержащих временные рестриктивные сайты, и последующей сборке целевого полинуклеотида (рис. 1). Для этого ген зеина был разделен на восемь модулей длиной от 60 до 180 п.о. каждый, между которыми содержались сайты узнавания подходящими эндонуклеазами рестрикции. Причем, некоторые из них присутствовали в последовательности гена сZ22В1, другие, такие как *Clat*, *HindIII*, *SacI* и *XhoI*, были введены в нее в результате замены кодонов согласно генетическому коду, а третьи (*KpnI*, *BamHI*, *BglII*) вводились временно и должны были быть убраны

47 47 45 37 35 35 34 34 34 32



Рис. 2. Проверка гомогенности синтетических олигонуклеотидов, входящих в состав гена, электрофорезом в 10% денатурирующем акриламидном геле. Арабскими цифрами показано число мономерных звеньев в каждом олигонуклеотиде. ХС и ВРВ – положения маркерных красителей ксиленицианола FF и бромфенолового синего в геле

в процессе завершения сборки гена. На 5'- и 3'-концах гена были запланированы *EcoRI*- и *SalI*-сайты. Подобное деление гена предусматривало не только облегчение его сборки, но и дополнительные возможности для проведения его последующего мутагенеза путем замесы отдельных его модулей.

Первой стадией получения искусственных генов зеина явился химический синтез олигонуклеотидов: получено 40 олигодезоксирибонуклеотидов длиной от 30 до 50 мономерных звеньев каждый. Синтез проводился в автоматическом и полуавтоматическом режимах с использованием фосфоамидитного метода [4], а также предложенного нами ранее быстрого фосфотриэфириного метода, в основу которого положено использование O-нуклеофильного внутримолекулярного катализа [5]. Гомогенность синтезируемых олигонуклеотидов подтверждалась после удаления всех защитных групп и очистки хроматографическими методами гель-электрофорезом в денатурирующем 10% полиакриламидном геле (рис. 2).

Следующей стадией явилось соединение отдельных олигонуклеотидов в модули Z1-Z8 (рис. 1) с помощью ДНК-лигазы фага T4 в стандартных условиях. Модули Z1, Z2, Z5-Z8 получали лигированием четырех олигонуклеотидов, а модули Z3 и Z4 – сшивкой 6 и 8 олигомеров соответственно. Типичная картина, полученная при выделении продуктов лигазной сшивки гель-электрофорезом, приведена на рис. 3.

Клонирование отдельных модулей гена зеина и их сборку осуществляли в плазмиде pBR322 (Z1 и Z2), а также в полилинкерной плазмиде pPLE2, сконструированной нами ранее для этих целей [6] (рис. 4). Использование ее предполагает возможность проведения олигонуклеотид-направленного мутагенеза синтетического гена после окончания его сборки с использованием разработанной нами ранее методологии [7].

Схема сборки зенинового гена из отдельных модулей-фрагментов показана на рис. 4. Фрагменты Z1, Z2 и Z3 соединяли одновременно в плазмиде pPLEZ123, тогда как фрагменты Z5, Z6, Z7 и Z8 объединяли последовательно в плазмиде pPLEZ5678. Соединение этих крупных субфрагментов гена с модулем Z4 проводилось также в одном эксперименте. Полу-

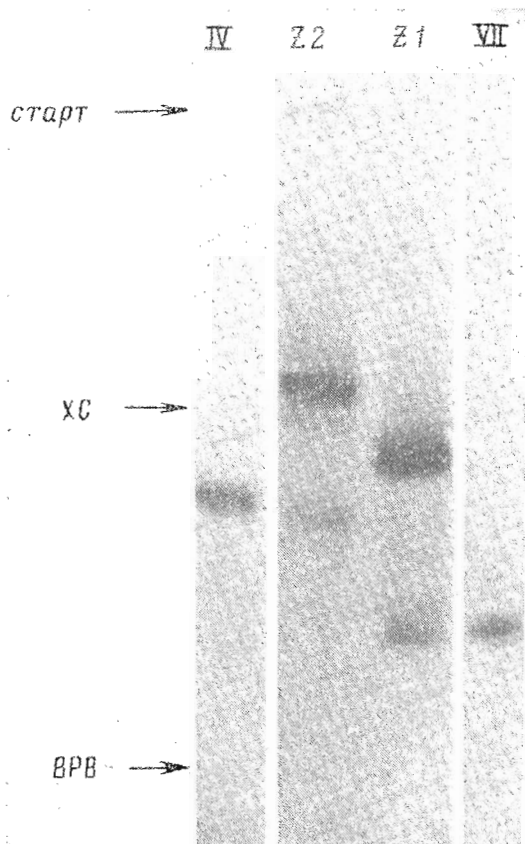


Рис. 3. Выделение продуктов лигазной сшивки олигонуклеотидов, составляющих модули Z1 и Z2, электрофорезом в 8% неденатурирующем полиакриламидном геле. Слева и справа от лигазных смесей — исходные олигонуклеотиды IV и VII длиной 30 и 48 звеньев соответственно

ченная в результате этого плаزمид рPLEZA1 содержала ген зеина, включая последовательность, кодирующую лидерный пептид, и три временных рестриктных сайта: *KpnI*, *BglII*, *BamHI*. *KpnI*-сайт удаляли направленным мутагенезом с использованием олигонуклеотида d(AACAACAGCAACAGTT) по методу [7], а другие два сайта — обработкой плазмиды соответствующей эндонуклеазой рестрикции и затем S_1 -нуклеазой с промежуточным отбором интермедиатов клонированием, как это описано в работе [6]. В качестве гибридизационных зондов при скрининге колоний в этих случаях были использованы 16-звенные олигонуклеотиды: d(AACAACAGCAACAGTT) — при удалении *KpnI*-сайта, d(ACТААСТАТGTСGAAC) — *BglII*-сайта, d(AGCAACAGCTGCTGCC) — *BamHI*-сайта. В результате была получена плазмидная ДНК рPLEZA4, несущая искусственный ген биосинтетического предшественника зеина. Для превращения последнего в ген, кодирующий зрелый зеин, плазмиду рPLEZA3 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *ClaI* и выщипавшийся модуль Z1 замещали на небольшой сплитический дуплекс (см. рис. 4), содержащий *EcoRI*- и *ClaI*-сайты и метиониновый кодон, в результате чего была получена плазмид рPLEZB. Аналогичным образом получали плазмиду рPLEZB1, содержащую укороченный ген зеина (без модуля Z1) с временными рестриктными сайтами.

С целью увеличения содержания лизина и триптофана в дальнейшем предполагается введение мутаций как в уникальные N- и C-концевые последовательности зеина, так и в среднюю его часть, имеющую регулярно повторяющиеся кластеры аминокислот. Первоначально будут вводиться только незначительные изменения в структуру белка: заменяться отдельные аминокислотные остатки. При этом предполагается использование

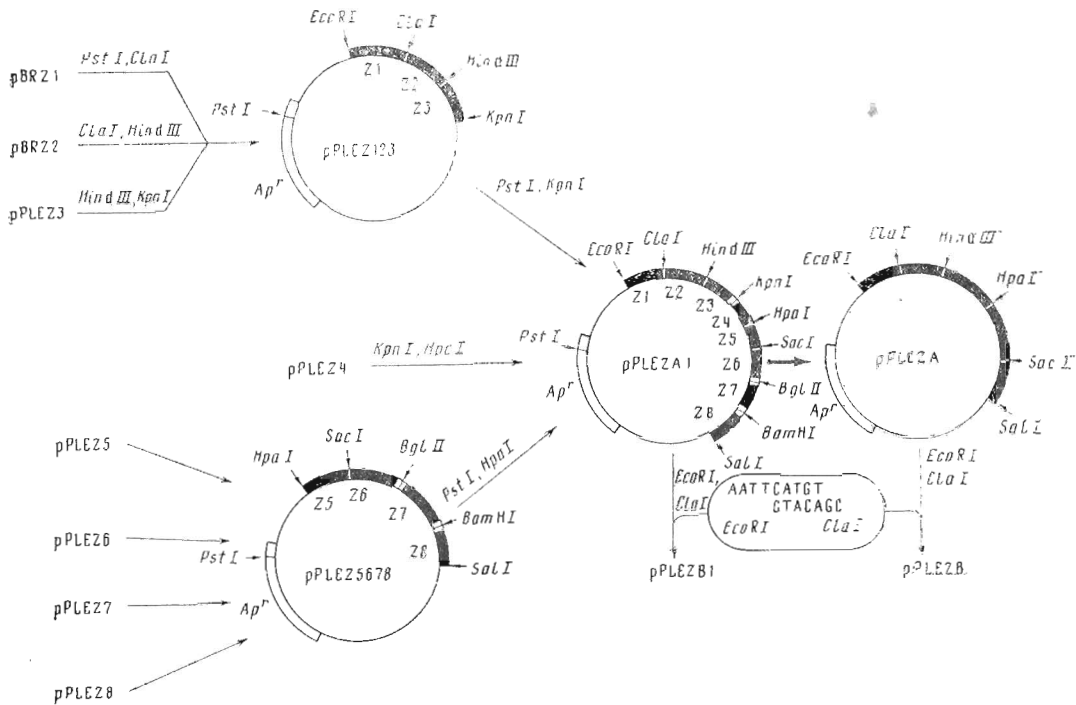


Рис. 4. Схема конструирования зинновых генов из отдельных модулей

процедуры олигонуклеотиднаправленного мутагенеза, а также другого подхода к введению мутаций, заключающегося в химико-ферментативном синтезе дуплекса, содержащего измененные последовательности в обеих цепях, и введении его в ген, в котором делетируется соответствующая часть обработкой эндонуклеазами рестрикции. Использование модульного принципа при синтезе гена упрощает его последующую модификацию последним способом. Кроме того, поскольку ген конструируется из целого ряда олигонуклеотидов, одновременно можно вносить изменения в несколько мест. Этот подход предпочтителен в тех случаях, когда требуется существенное изменение последовательности белка. Его применение запланировано в случае искусственного гена зинна для изучения закономерностей вторичной и третичной структур этого белка, а также функциональной роли повторяющегося 20-звенного аминокислотного кластера.

Требуемые аминокислотные остатки предполагается вводить по отдельности в соответствии с мутационной таблицей, построенной путем анализа большого числа гомологичных белков [8]. Для введения определенного остатка выбирается позиция, в которой присутствует наиболее близкая в эволюционном отношении аминокислота. Так, триптофан можно пробовать вводить в позиции 2 и 16, в которых присутствует тирозин или фенилаланин, причем первый более предпочтителен. Остаток лизина наиболее близок к аргинину, который присутствует в N- и C-концевых участках белка, но отсутствует в обобщенной последовательности общего элемента — консенсусе, выведенном авторами работы [9]. Однако аргинин встречается в некоторых природных вариантах общего элемента, поэтому, по-видимому, целесообразно ввести в консенсус аргинин в 18-ю позицию, а затем пробовать заменить его на остаток лизина.

С целью изучения структурно-функциональных особенностей повторяющегося элемента зинна и введения в него остатка лизина был осуществлен синтез дуплекса, кодирующего консенсус (рис. 5). Этот двухцепочный полинуклеотид состоял из комплементарных 63-звенных олигонуклеотидов, химический синтез которых проводился фосфорамидитным методом [4] на полимерном носителе на основе макропористого стекла с использованием на определенных стадиях синтеза смешанных нуклео-

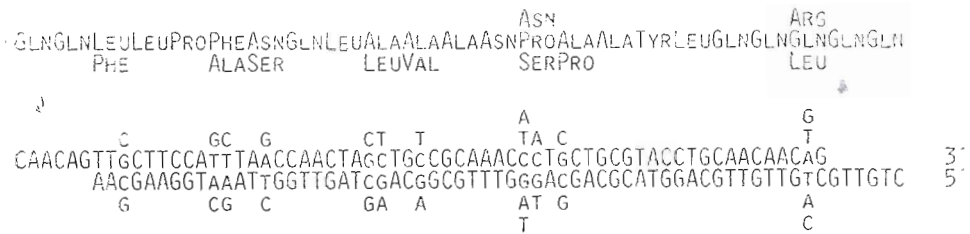


Рис. 5. Последовательность синтетического вырожденного дуплекса, кодирующего возможные мутанты консенсуса зенина. Маленькими буквами показаны вырожденные нуклеотидные остатки. Сверху дана последовательность пептида, кодируемого этим дуплексом, с учетом возможных вариаций аминокислотной последовательности

тидных компонентов, состоящих из фосфорамидитов двух или трех различных нуклеозидов. В результате каждый из 63-меров представлял собой микрогетерогенную смесь олигонуклеотидов. Дуплекс, полученный в результате отжига этих смешанных олигонуклеотидов, имел вырожденность по основаниям в нескольких точках нуклеотидной цепи, в результате чего он кодировал ряд гомологичных полипептидов, имевших различия в аминокислотной последовательности в соответствующих местах пептидной цепи.

В структуре дуплекса, кодирующего консенсус, была заложена возможность его полимеризации в присутствии ДНК-лигазы за счет комплементарности выступающих 5'-гексануклеотидных последовательностей. После доработки «липких» концов продуктов мультикопирования Т4-ДНК-полимеразой в присутствии четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов мультимеры синтетического 63-звенного дуплекса, содержащие от 2 до 7 копий последнего, выделяли гель-электрофорезом и встраивали в ген природного зенина наряду с мономерным вариантом. Для этого плазмиду рPLEA1 (или рPLEZB1) расщепляли эндонуклеазами *Kpn*I и *Bam*HI с последующим удалением одноцепочечных концов S₁-нуклеазой. Синтетические дуплексы, содержащие от 1 до 7 копий «консенсуса», вводились в этот вектор. Ориентацию вставок определяли гибридизацией с ³²P-меченым олигонуклеотидом (CAACAGCAACAGTT^GCTT).

В дальнейшем предполагается осуществить экспрессию полученных таким образом синтетических генов зенинов в бактериальных клетках и в растениях и изучить стабильность, функциональную роль и питательные качества белков, кодируемых мутантными генами.

Экспериментальная часть

В работе использованы эндонуклеазы рестрикции (Boehringer, ФРГ), и (Pharmacia, Швеция), Т4-ДНК-лигаза, Т4-полипептидакиназа и ДНК-полимераза I *E. coli* (фрагмент Кленова, Р-Л Biochemicals, США).

Химический синтез олигонуклеотидов осуществляли фосфоамидитным методом [4] на синтезаторе фирмы Pharmacia и фосфоритриэфирым методом с применением внутримолекулярного О-нуклеофильного катализа [5] в полуавтоматическом режиме. Синтетические олигонуклеотиды после удаления защитных групп очищали препаративным гель-электрофорезом и обращенно-фазовой хроматографией на приборе «FPLC System» (Pharmacia, Швеция), а их структуры подтверждали методом химических модификаций [10]. 5-фосфорилирование олигонуклеотидов осуществляли с помощью Т4-полипептидакиназы и [γ -³²P] АТФ (3000 Ки/ммоль, Amersham, Англия).

Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции осуществляли в течение 1 ч при 37° С в буфере, содержащем 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 2 мМ дитиотреит, с использованием 0,5–1 ед. акт. фермента на 1–2 мкг ДНК.

Обработка ДНК (10 мг) S₁-нуклеазой (1 ед. акт.) проводилась при 20° С в течение 10–15 мин в растворе, содержащем 50 мМ ацетат натрия (рН 4,5), 200 мМ NaCl и 1 мМ ZnCl₂.

Реакции лигирования проводили с 250–500 пмоль олигомеров в реакционной смеси (100 мкл), содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 7,5) 10 мМ NaCl₂, 5 мМ дитиотреит, 100 мМ АТФ и 20 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы, при 40° С, в течение 6–12 ч.

Конструирование рекомбинантных плазмид и трансформацию компетентных клеток *E. coli*, а также скрининг колоний гибридизацией с мечеными синтетическими олигонуклеотидами осуществляли согласно работе [11]. Плазмидные ДНК выделяли, как описано в работе [12].

Пуклоситидные последовательности клопированных ДНК определялись по методу Максама — Гилберта с использованием фрагментов, меченных по 3'-концу с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Клепова) [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Marks M. D., Lindell J. S., Larkins B. A. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 30. P. 16451—16459.
2. Argos P., Pedersen K., Marks M. D., Larkins B. A. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 17. P. 9984—9990.
3. Chakhmakhcheva O. G., Efimov V. A., Mirskikh O. V., Reverdatto S. V., Buryakova A. A., Ovchinnikov Yu. A. // Chem. Scr. 1986. V. 26. № 1. P. 31—35.
4. McBride L. J., Kierzek A., Beausage S. L., Caruthers M. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 8. P. 2040—2048.
5. Efimov V. A., Buryakova A. A., Dubey I. Y., Polushin N. N., Chakhmakhcheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 16. P. 6525—6540.
6. Чухмакчева О. Г., Бурякова А. А., Мирских О. В., Ревердатто С. В., Ефимов В. А., Овчинников Ю. А. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 41. С. 1533—1546.
7. Ефимов В. А., Мирских О. В., Чухмакчева О. Г., Овчинников Ю. А. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 5. С. 621—627.
8. Atlas of Protein Sequence and Structure/Ed. Dayhoff M. O. V. 5. Washington: The National Biomedical Research Foundation, 1972.
9. Argos P., Petersen K., Marks M. D., Larkins B. A. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 17. P. 9984—9990.
10. Maxam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.
11. Ефимов В. А., Чухмакчева О. Г. // Биооргани. химия. 1982. Т. 8. № 8. С. 2084—2093.
12. 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.

Поступила в редакцию
15.III.1988

SYNTHESIS AND CLONING OF ARTIFICIAL ZEIN GENES

EFIMOV V. A., BURYAKOVA A. A., PASHKOVA I. N.,
CHAKHMAKHCHEVA O. G.

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

To investigate structure-function relationships in zein proteins and to develop an approach to the construction of mutant zeins of improved nutritional qualities, the chemical-enzymatic synthesis of a gene for zein cZ22B1 (22kd) has been undertaken. This 806-base pair long DNA fragment consists of about 40 synthetic oligonucleotides, mostly 30–60-mers. The synthesis was planned with the use of a universal methodology for the artificial gene construction. The choice of appropriate sites for altering amino acid sequence and the possibility of obtaining by directed mutagenesis of the gene corresponding to modified zeins containing residues Trp and Lys in specified positions of the polypeptide chain is discussed.