



УДК 577.214.3

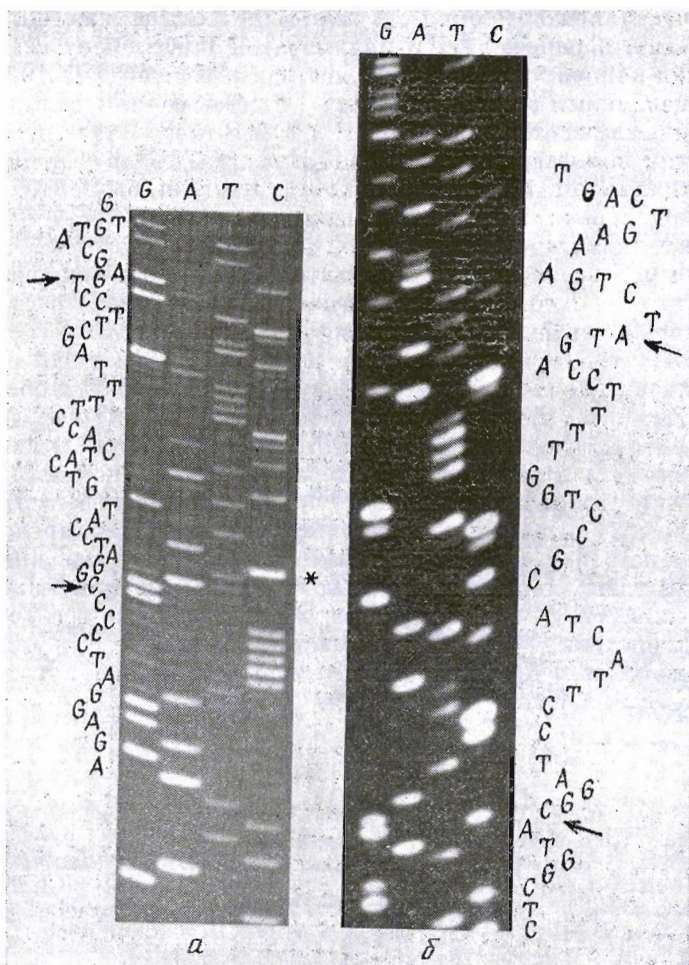
© 1990 г.

*Е. Н. Лебедево, О. В. Плуталов, Ю. А. Берлин***СИНТЕЗ ГЕНА ЗРЕЛОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА 1 α ЧЕЛОВЕКА ПУТЕМ АМПЛИФИКАЦИИ IN VITRO ДУПЛЕКСА мРНК-кДНК***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР,
Москва*

Проблема искусственного синтеза генов на протяжении многих лет решалась двумя основными способами — химико-ферментативным синтезом, в основе которого лежит методология, разработанная Кораной и в основных чертах — хотя и многократно модифицированная — сохранившаяся до настоящего времени, или же через кДНК с конструированием и анализом клонотек. Эти дополняющие друг друга способы, хотя и довольно трудоемкие, привели к множеству превосходных результатов (см., например, [1—3]). Появление метода полимеразной цепной реакции (ПЦР, или амплификация ДНК in vitro) [4], оказавшего огромное влияние на развитие молекулярной биологии и смежных дисциплин, не могло не затронуть и проблему синтеза генов. Так, очевидно, что знания коротких последовательностей, фланкирующих целевой ген, в принципе достаточно для его синтеза с помощью ПЦР исходя из смеси мРНК через кДНК; в случае полиаденилированных мРНК одной из этих последовательностей может служить oligo (A), что еще более упрощает задачу. Особенно привлекательной представляется возможность проведения ПЦР с использованием в качестве матрицы не двухцепочечной кДНК, а первичного продукта, образующегося в ходе ее синтеза в результате обратной транскрипции мРНК, — дуплекса мРНК-кДНК. Такой подход (ср. [5]) мы использовали для синтеза структурного гена зрелого интерлейкина 1 α (ИЛ-1 α), лимфокина с многообразной биологической активностью [6].

Структурной основой синтеза послужили данные о нуклеотидной последовательности гена ИЛ-1 α и соответствующей кДНК, а также о структуре зрелого лимфокина, включающей в себя аминокислотные остатки 113—271 предшественника [7]. Эти данные позволили сконструировать прямой и обратный дезокси-нуклеотидные праймеры — соответственно 30-членники (5') CGGATCCATGTCATCACSTTTTGGCTTCCT (USP, upstream primer) и (5') CGGATCCCTTACTACGCCTGGTTTTCAGTA (DSP, downstream primer) — для амплификации участка кДНК, соответствующего зрелому ИЛ-1 α . Праймеры были синтезированы твердофазным амидофосфитным методом [8] и очищены электрофорезом на ПААГ с последующей гель-фильтрацией. Каждый из этих праймеров содержит на 3'-конце 20-звенную последовательность, гомологичную 5'-концевому участку (USP) и комплементарную 3'-концевому участку (DSP) смысловой цепи гена, а на 5'-конце — BamHI-сайт, дополнительно фланкированный одним звеном. Кроме того, прямой праймер включает в себя иницирующий кодон ATG, а обратный — добавочный терминирующий кодон TAA в виде соответствующей комплементарной последовательности (терминирующий кодон TAG, отвечающий нативной структуре гена, задан в составе 20-звенного 3'-концевого участка этого праймера).

Для получения гена ИЛ-1 α мы исходили из суммарной полиаденилированной мРНК, выделенной из моноцитов человека (С. А. Кетлинский, ВНИИОЧБ, Ленинград). Синтез первой цепи кДНК проводили в течение 40 мин при 42° С в 20 мкл инкубационной смеси, содержащей 1 мкг мРНК,



Секвенирование плазмиды pSIEL4 методом Сенгера [9] с 5'-³²P-мечеными праймерами (5')GСТАТGACCATGATTACGCC (с *Hind*III-конца полилинкера pUC19) (A) и (5')TTGТААААСGACGССAGT (с *Eco*R1-конца полилинкера pUC19) (B) (электрофорез в 8% ПААГ). Показаны участки стыков векторной ДНК и вставки гена, начинающейся с праймеров для амплификации (нижняя стрелка соответствует 5'-концевому звену, верхняя — 3'-концевому звену амплификационного праймера): A — стык с проксимальным концом гена (праймер USP), B — стык с дистальным концом гена (праймер DSP)

5 пмоль праймера DSP, 10 мкКи [α -³²P]dCTP, а также буфер для синтеза 1-й цепи, Na-пирофосфат, смесь четырех dNTP, 20 ед. акт. ингибитора РНКазы из плаценты человека (HPR1) и 20 ед. акт. обратной транскриптазы из набора для синтеза кДНК (cDNA Synthesis System Plus, Amersham). Около 50% радиоактивной метки включилось в состав высокомолекулярной фракции, удерживаемой DEAE-бумагой при промывке 0,5 M Na₂HPO₄.

Последующую ПЦР проводили в 50 мкл инкубационной смеси, содержащей 2 мкл смеси после синтеза 1-й цепи кДНК (см. выше), по 10 пмоль праймеров USP и DSP, 67 мМ трис-HCl (pH 8,8), 6,7 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 6,4 мМ EDTA, четыре dNTP (1 мМ каждый), 8,5 мкг бычьего сывороточного альбумина (конечная концентрация 170 мкг/мл) и 2 ед. акт. термостабильной ДНК-полимеразы *Thermus thermophilus* (ЛИЯФ АН СССР, Гатчина). Проводили 30 циклов, включающих в себя денатурацию (1 мин при 94°С), отжиг (2 мин при 55°С) и элонгацию (3 мин при 72°С). После проведения еще 30 циклов ПЦР с использованием в качестве матрицы 5 мкл смеси из предыдущей амплификации синтезированный фрагмент (500 п. о.) был очищен электрофорезом в 8% ПААГ

с последующей электроэлюцией и гель-фильтрацией на сефадексе G-50 (выход 1,2 мкг), обработан ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) для выравнивания концов и встроен в плазмидный вектор pUC19, предварительно расщепленный рестриктазой *Sma*I и дефосфорилированный фосфатазой из кишечника теленка (Boehringer). В результате последующей трансформации компетентных клеток HB101 или TG1 и выращивания на среде с ампициллином (100 мкг/мл) и Xgal (20 мкг/мл) были отобраны клоны, содержащие рекомбинантную плазмиду (pSIEL).

Наличие и характер вставки в этой плазмиде, выделенной из четырех клонов, были подтверждены их рестриктным анализом. Так, размер *Bam*HI-фрагмента (500 п. о.), отвечающего синтезированному гену, соответствует размерам реперных фрагментов ДНК фага λ (λ /*Bgl*III 415 и 649, λ /*Hind*III 564, λ /*Sall* 499 п. о.). Далее, этот *Bam*HI-фрагмент расщепляется рестриктазой *Eco*RI (сайт находится в 5-м экзоне гена) с образованием фрагментов 431 и 69 п. о., а рестриктазой *Eco*31I (сайт находится в 7-м экзоне гена) — на фрагменты 326 и 174 п. о. Определение полной первичной структуры вставки по методу Сенгера [9] (см. рисунок, иллюстрирующий нуклеотидную последовательность концевых участков гена) доказало, что осуществлены синтез и клонирование структурного гена зрелого ИЛ-1 α , который фланкирован *Bam*HI-сайтами, содержит кодоны инициации и терминации трансляции и пригоден для прямой экспрессии.

Существенно, что данный метод синтеза не только не требует создания и анализа клонотеки, но даже не нуждается в синтезе двухцепочечной кДНК и к тому же в принципе может довольствоваться суммарной клеточной РНК без ее фракционирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frank R., Meyerhans A., Schwelanus K., Blocker H. // Meth. Enzymol. 1987. V. 154. P. 221—249; Matthes H. W. D., Staub A., Chambon P. // *ibid.* P. 250—287; Caruthers M. H., Barone A. D., Beaucage S. L., Dodds D. R., Fisher E. F., McBride L. J., Matteucci M., Stabinski Z., Tang J.-Y. // *ibid.* P. 287—313; Horvath S. J., Firca J. R., Hunkapiller T., Hunkapiller M. W., Hood L. // *ibid.* P. 314—326.
2. Groger G., Ramalho-Ortigao F., Steil H., Seliger H. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 16. P. 7763—7771.
3. Янковский Н. К. Конструирование и анализ клонотек геномов (Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 16). М.: ВИНТИ, 1989.
4. PCR Technology: principles and applications for DNA amplification. / Ed. Ehrlich H. A. New York, London: Stockton, Macmillan, 1989.
5. Brenner C. A., Tam A. W., Nelson P. A., Engleman E. G., Suzuki N., Fry K. E., Larrick J. W. // BioTechniques. 1989. V. 7. № 10. P. 1096—1103.
6. The physiologic, metabolic, and immunologic actions of interleukin 1 (Progress in leukocyte biology. V. 2) / Eds Kluger M. J., Oppenheim J. J., Pwanda M. C. N. Y.: Alan R. Riss, Inc., 1985.
7. Furutani Y., Notake M., Fukui T., Ohue M., Nomura H., Yamada M., Nakamura S. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 8. P. 3167—3179.
8. Sinha N. D., Biernat J., McManus J., Koster H. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 11. P. 4539—4557.
9. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. V. 2. P. 13.70—13.77.

Поступило в редакцию
29.VI.1990

SYNTHESIS OF THE HUMAN MATURE INTERLEUKIN 1 α GENE
BY MEANS OF THE IN VITRO AMPLIFICATION
OF THE mRNA-cDNA DUPLEX

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

Mixture of polyadenylated mRNAs from human monocytes has been subjected to the reverse transcription specifically initiated from the mRNA encoding interleukin 1 α by a synthetic polynucleotide complementary to the mRNA's coding 3'-end to yield the corresponding mRNA-cDNA duplex. Under conditions of the polymerase chain reaction, with the above polynucleotide as a downstream primer and an upstream primer corresponding to the beginning of the mature interleukin 1 α (AA 113—271) gene, the mRNA-cDNA duplex yielded the desired gene, whose structure was proved by the restriction and sequence analyses. The gene, containing translation initiation and termination triplets, can be used for producing interleukin 1 α in various expression systems and as a probe in studies of the lymphokine's biosynthesis. This method of the gene synthesis does not need construction and analysis of cDNA libraries nor synthesis of double-stranded DNA, and can, in principle, make use of the total (non-fractionated) cellular RNA.