



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 16 \* № 5 \* 1990

УДК 577.213.7

© 1990 г.

*М. А. Кулагина, Н. В. Скапцова, Н. В. Батчикова,  
А. Н. Куркин, А. В. Ажгаев*

## Н-ФОСФОНАТНЫЙ МЕТОД В СИНТЕЗЕ СТРУКТУРНОГО ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 ЧЕЛОВЕКА

*Всесоюзный научно-исследовательский институт биотехнологии,  
Москва*

Модифицированным Н-фосфонатным методом получено 32 олигодезоксирибонуклеотида, из которых ферментативным путем синтезирован ген интерлейкина-4 человека. Показано, что высокая степень чистоты олигонуклеотидов обеспечивает высокий процент искомой последовательности в клонированной ДНК.

Ранее мы сообщали о варианте синтеза олигонуклеотидов Н-фосфонатным методом с использованием защитных групп для эндоциклических амидных функций остатков гуанина и тимина [1]. По нашему мнению, такой подход в сочетании с двухстадийной очисткой с помощью ВЭЖХ позволяет в значительной мере исключить химическую модификацию нуклеиновых оснований и получить олигонуклеотиды высокого качества. Мы считаем, что ферментативная сборка и последующее клонирование синтетических генов во многом зависят от степени чистоты олигонуклеотидов.

Н-Фосфонатный метод в его классическом варианте позволяет синтезировать олигонуклеотиды с большим числом звеньев [2, 3]. Однако клонирование таких олигонуклеотидов приводит к большому числу «неправильных» плазмид, содержащих делеции и замены оснований [4]. Все это заставляет выполнять большую работу по секвенированию и в принципе ставит под сомнение возможность синтеза генов этим способом.

Настоящая работа представляет собой первый, по нашим сведениям, синтез структурного гена Н-фосфонатным методом на примере ДНК, кодирующей интерлейкин-4 человека (*hIL-4*).

Полипептид *hIL-4* — один из лимфокинов, обладающих рядом важнейших активностей, в частности способностью к стимуляции роста и регуляции активности В- и Т-клеток [5, 6] и усилению продукции иммуноглобулинов IgG и IgE [7, 8].

Полипептид *hIL-4* состоит из 129 аминокислотных остатков, его первичная структура [9] представлена на рис. 1. Нуклеотидная последовательность синтетического гена *hIL-4* (рис. 1) выведена нами исходя из аминокислотной последовательности с учетом частоты встречаемости кодонов в *E. coli* [10]. В начале гена предусмотрен *PstI*-сайт для возможной замены 5'-концевой кодирующей области в целях оптимизации экспрессии. В синтетическую последовательность входят также кодон инициации трансляции ATG и терминирующий кодон TAA, который из трех стоп-кодонов наиболее часто используется в *E. coli* и узнается обоими факторами терминации белоксинтезирующего комплекса [11]. Кроме того, фрагмент ДНК содержит также липкие *EcoRI*- и *HindIII*-концы.

Сокращения: SDS — додецилсульфат натрия; SSC — 0,15 M NaCl, 0,015 M цитрат натрия, pH 7,0; раствор Денхардта (50 ×) — 5 г фикола, 5 г поливинилпирролидона, 5 г бычьего сывороточного альбумина, воды до 500 мл.

16

1            5            10            15  
 Met His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser  
  
 10          20          30          40          50  
 \*            \*            \*            \*            \*  
 <----- Int1 -----><----- Int2 -----><----- Int3  
 AATT CGAT GCATAA ATGCGACATCAC CCTGCAGGAAATCATCAA ACTCTGA ACTCT  
 GCGTACGT ATTAC GCTGTAGTGGGACGT CTTAGTAGTTGAGACTTGAGA  
 <----- Int32 -----><----- Int31 ----->

20          25          30          35  
 Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile Phe Ala Ala  
  
 60          70          80          90          100        110  
 \*            \*            \*            \*            \*            \*  
 -----><----- Int4 -----><----- Int5 ----->  
 CTGACTGAA CAGAAA ACCCTGTGC ACTGAA CTGACCGT TACTGACAT CTTGCAGCT  
 GACTGACTT GTCT TTGGGACACGTGACTT GACTGGCA ATGACTGT AGAAAC GTCGA  
 <----- Int30 -----><----- Int29 -----><----- Int28 -----

40          45          50  
 Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln  
  
 120        130        140        150        160        170  
 \*            \*            \*            \*            \*            \*  
 -----><----- Int6 -----><----- Int7 -----><  
 TCT AAAAAC ACTACCGAGA AAAGAA ACTTTCTGCCGTGCAGCTACCGTACTGCCGTCA  
 AGATTTTGATGGCTTTCTTGAAAGACGGCACGTCGATGGCATGACG CAGTC  
 -- Int28 -----><----- Int27 -----><----- Int26 --

55          60          65          70  
 Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe  
  
 180        190        200        210        220  
 \*            \*            \*            \*            \*  
 -----><----- Int8 -----><----- Int9 -----><  
 TTCTACTCTACCACGAAAAGGACACTCGCTGTCTGGCGCTACCGCACAGCAATT  
 AAGATGAGAGTGGTGCTTCCGTGAGCGACAGACCCCGCGATGGCGTGT CGTTAAG  
 -----><----- Int25 -----><----- Int24 --

75          80          85          90  
 His Arg His Lys Gln Leu Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly  
  
 230        240        250        260        270        280  
 \*            \*            \*            \*            \*            \*  
 - Int10 -----><----- Int11 -----><----- Int12 -  
 CACCGTCACAAACAGCTGATCCGCTT CCTGAAACGCTCTGGACCGTAACCTGTGGGG  
 GTGGCAGT GTTGTGCACTAGGCGAAGGACTTTGCAGACCTGGCATTGGACACCCCA  
 -----><----- Int23 -----><----- Int22 -----><-----

Рис. 1

95	100	105	110		
LeuAlaGlyLeuAsnSerCysProValLysGluAlaAsnGlnSerThrLeuGluAsn					
290	300	310	320	330	340
*	*	*	*	*	*
-----><----- Int13 -----><----- Int14 ----->					
CTGGCTGGTCTGAACCTTGCCCCGGTTAAAGAAGCTAACCGAGTCAACTCTGGAAAAC					
GACCGACCAGACTTGAGAACGGGCCATTCTCGATTGGTCAGATGAGACCTTTG					
-- Int21 -----><----- Int20 -----><-----					
115	120	125			
PheLeuGluArgLeuLysThrIleMetArgGluLysTyrSerLysCysSerSer					
350	360	370	380	390	400
*	*	*	*	*	*
-----><----- Int15 -----><----- Int16 ----->					
TTCCTGGAACGTCTGAAAACATCATGCGTGAGAAATACTCTAAAGTGCTCTTCCTA					
AAGGACCTTGCAGACTTTGAATAGTACGCACTCTTATGAGATTCAAGAGAAGGATTGCA					
Int19 -----><----- Int18 -----><----- Int17 ----->					

Рис. 1. Аминокислотная последовательность интерлейкина-4 человека и нуклеотидная последовательность синтетического гена. Стрелками указаны олигонуклеотиды Int1 — Int32, синтезированные в настоящей работе

Последовательность гена была разбита на 32 фрагмента длиной 23—28 звеньев таким образом, чтобы их перекрывание составило 10—14 пар оснований (олигонуклеотиды Int1 — Int32, рис. 1).

Синтез олигонуклеотидов Int1 — Int32 был выполнен с использованием модифицированного Н-фосфонатного метода, как описано в статье [1], только вместо триэтиламмониевых солей в данной работе применяли диазабициклоундененовые соли защищенных нуклеозид-3'-гидрофосфитов. Для очистки олигонуклеотидов использовалось сочетание анионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ на крупнопористых сорбентах с последующим обессоливанием гель-фильтрацией в воде [1]. Гомогенность синтетических олигонуклеотидов Int1 — Int32 проверяли электрофорезом в 20% денатурирующем ПААГ после введения по 5'-концу [<sup>32</sup>P]фосфата (рис. 2а—г).

Ферментативная сборка гена проводилась в два этапа (рис. 3). Сначала были получены блоки I—IV, каждый из которых является продуктом лигирования восьми фосфорилированных (за исключением Int1 и Int17) олигонуклеотидов. Анализ реакционных смесей электрофорезом в денатурирующем 15% ПААГ показал, что синтез обеих цепей каждого из блоков происходит с высокой эффективностью (рис. 4). Блоки выделяли препартивно из неденатурирующего 8% ПААГ. Второй этап сборки гена заключался в лигировании блоков I—IV в конечный продукт. Электрофотограмма аликвоты лигазной смеси представлена на рис. 5. В качестве маркеров длины использовали *Msp*I-гидролизат плазмиды pBR322, нанесенный на тот же гель (рестриктные фрагменты выявляли с помощью этидийбромида и УФ-облучения). Основной продукт лигазной реакции (указан стрелкой), который по подвижности в геле совпадает с рестриктым фрагментом 404 п.о., выделяли из неденатурирующего 8% ПААГ и клонировали в плазмиде pUC18 по *Eco*RI-и *Hind*III-сайтам.

Для трансформации использовали клетки *E. coli* HB101. Рекомбинантные клоны, выросшие на чашках с ампилиллином, тестировали на наличие синтетического гена путем гибридизации с <sup>32</sup>P-меченным олигонуклеотидом Int13. Более 90% клонов дали положительный ответ. Из 24 произвольно взятых гибридизующихся клонов методом «быстрого лизиса» [12] были выделены плазмиды; все они содержали уникальные сайты рестриктаз *Sph*I и *Pst*I и *Eco*RI/*Hind*III-сегменты нужной длины по данным электрофореза в 1% агарозном геле (электрофотограммы не представлены).

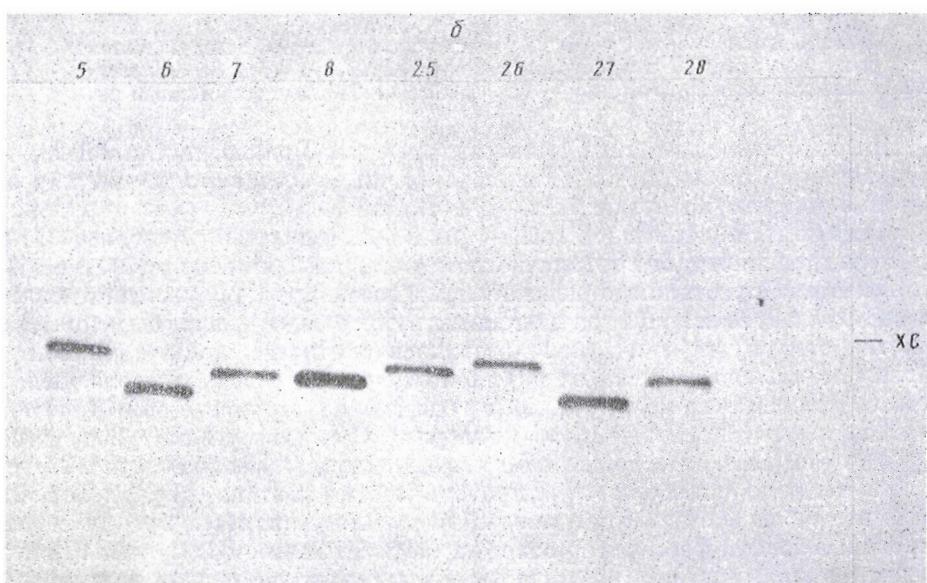
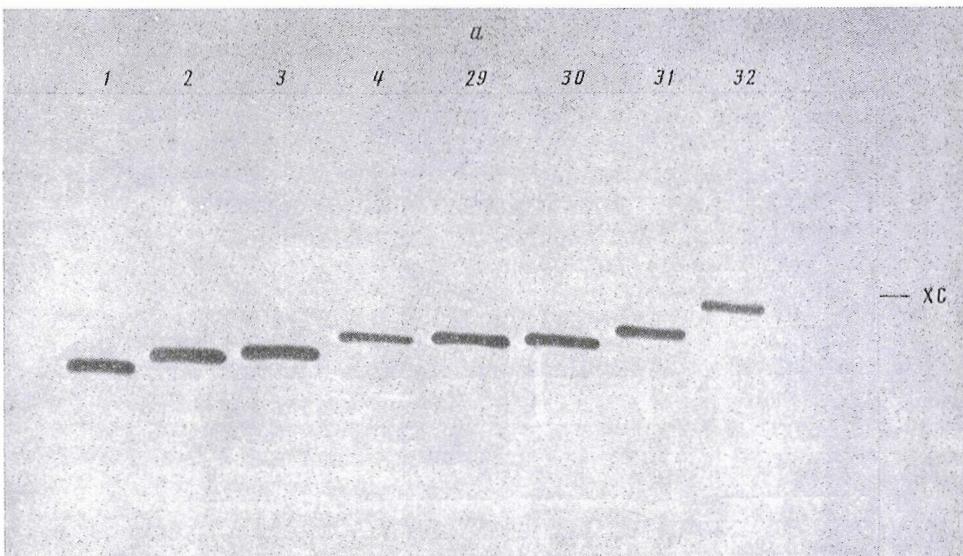


Рис. 2, а, б

Четыре произвольно выбранные плазмида анализировали далее путем секвенирования *EcoRI / HindIII*-фрагмента методом Максама — Гилберта [13]; три клона из четырех содержали нужную последовательность синтетического hIL-4, представленную на рис. 1. Четвертый клон отличается от них отсутствием одного остатка А в блоке AAAA (№ 359—362) и наличием дополнительного звена G между Т-373 и G-374.

Таким образом, наши результаты убедительно показывают, что предлагаемый нами вариант Н-фосфонатного метода синтеза олигонуклеотидов можно успешно использовать в синтезе относительно больших генов. Значительно менее капризный в отношении соблюдения безводных и бескислородных условий, чем традиционный фосфамидитный метод, Н-фосфонатный подход может быть использован практически в любой генно-инженерной лаборатории.

В заключение необходимо отметить, что, по нашему убеждению, залогом успешного синтеза генов является высокая степень чистоты олигонуклеотидов, используемых в работе. Наши данные свидетельствуют о том,

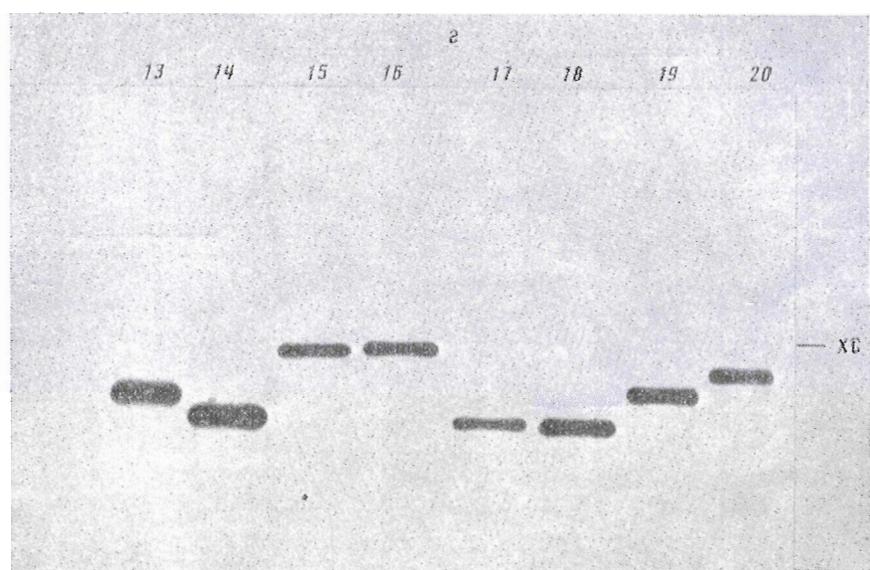
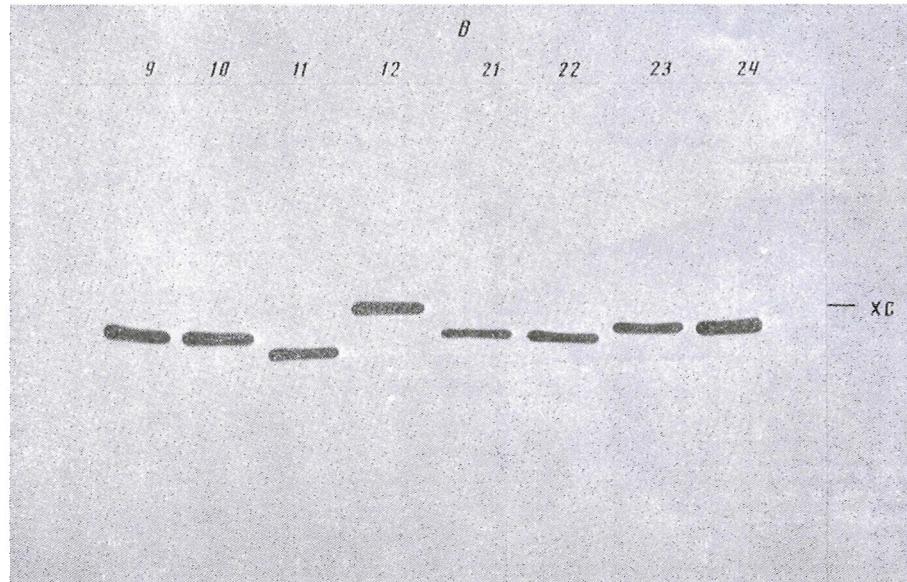


Рис. 2. Радиоавтограмма  $^{32}\text{P}$ -меченых олигонуклеотидов Int1 — Int32 (номер олиго- нуклеотида соответствует номеру дорожки), сгруппированных по блокам (см. рис. 3), после электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ. ХС — ксиленцианоловый голубой

что скрупулезная очистка нуклеотидного материала в значительной мере оправдывает себя и обеспечивает высокий процент искомой последовательности (не менее 75%) в клонированной ДНК.

#### Экспериментальная часть

В работе использовали трис, акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, персульфат аммония (Merck), агарозу, ATP, бромистый этидий (Sigma), мочевину, ос. ч. (Союзреактив), агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco).

Ферменты: T4-полинуклеотидкиназа, ДНК-лигаза фага T4 (НИО «Фермент», Вильнюс), рестрикционные эндонуклеазы *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *SphI* и ДНК-полимераза I (фрагмент Кленова) производства PL

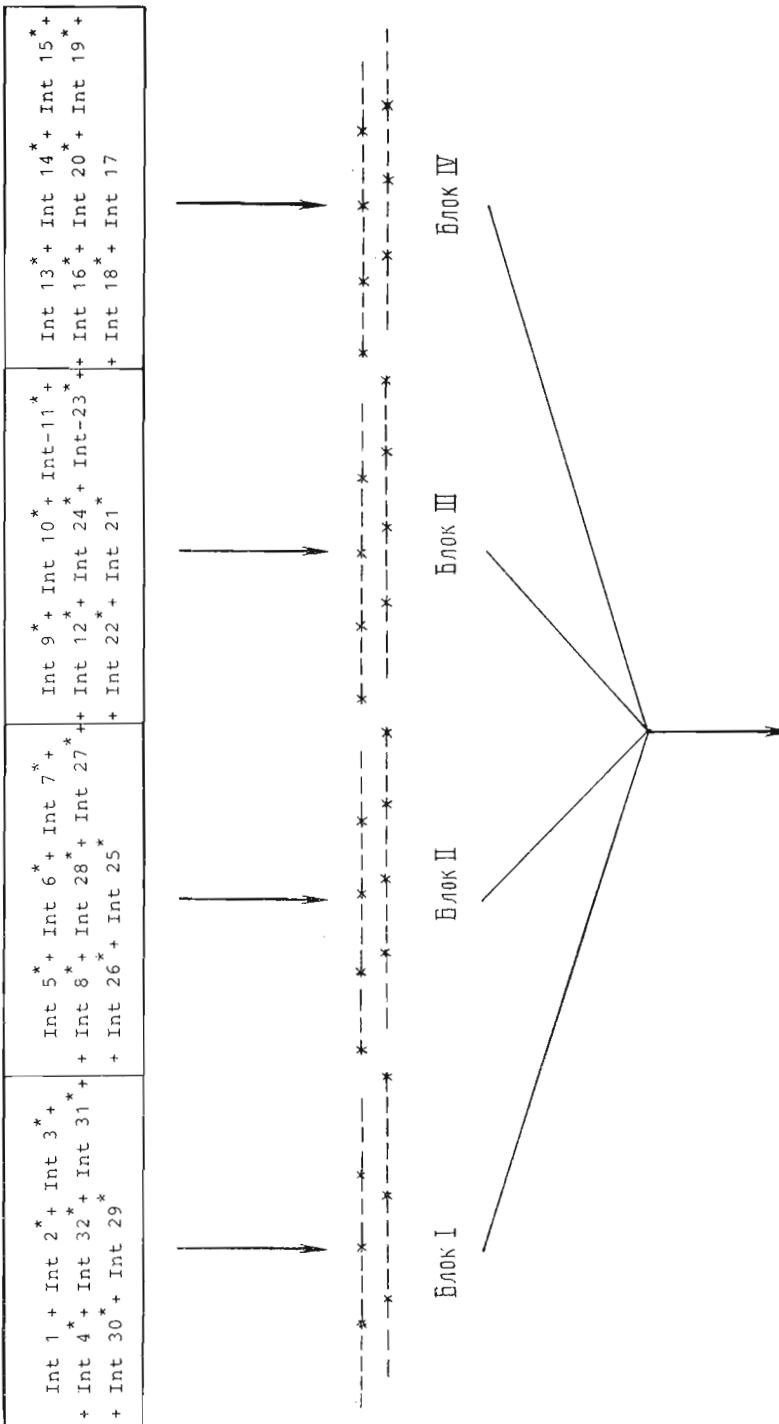


Рис. 3. Схема сборки гена hIL4 с помощью ДНК-лигазы. Звездочкой отмечены 5'-фосфорилированные олигонуклеотиды

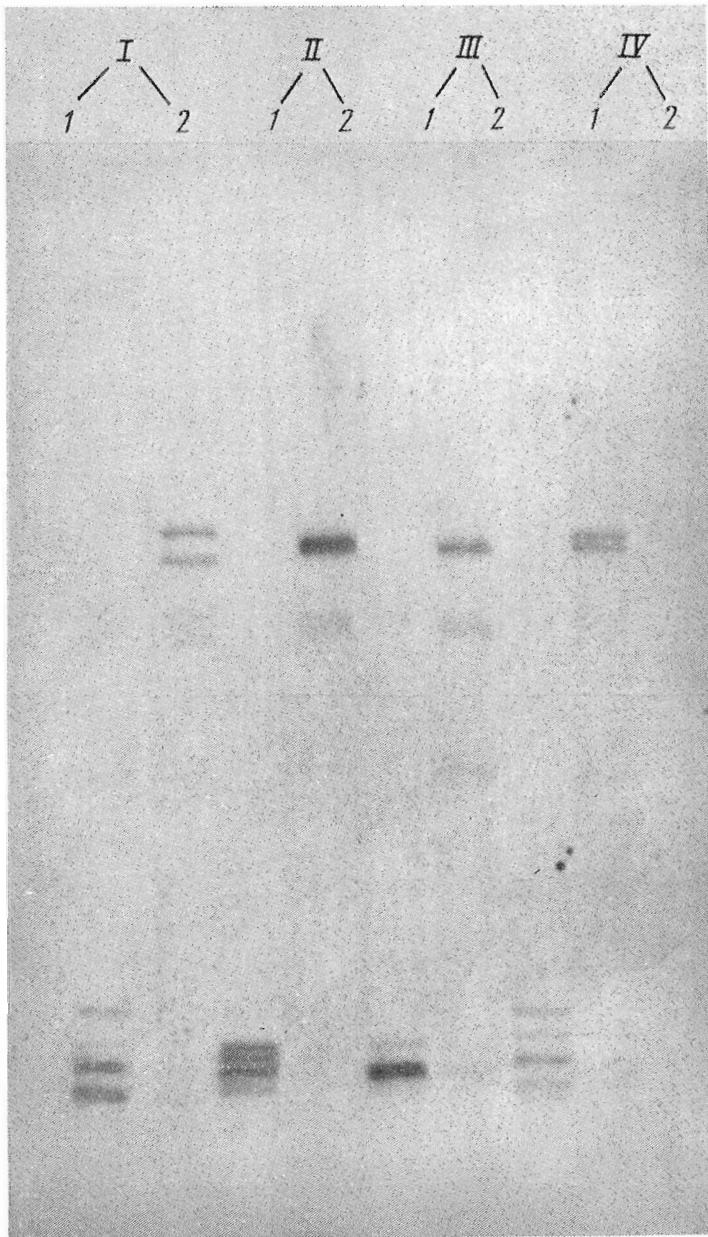


Рис. 4. Проверка эффективности лигирования синтезированных олигонуклеотидов при сборке блоков I—IV (см. рис. 3) гена hIL-4 (радиоавтограмма 15% денатурирующего ПААГ): 1 — исходные олигонуклеотиды, 2 — продукты их лигирования

Biochemicals (Англия), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (5000 Кн/ммоль) и [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (100 Кн/ммоль) отечественного производства.

*Синтез олигонуклеотидов* вели как описано в работе [1]. В реакции конденсации вводили 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-еновые соли защищенных нуклеозид-3'-гидрофосфитов.

*Фосфорилирование олигонуклеотидов.* Аналитическое фосфорилирование олигонуклеотидов для проверки их гомогенности проводили 1 ч при 37° С в 20 мкл раствора, содержащего 0,05 мкг олигонуклеотида, 66 мМ трис-HCl (рН 9,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотрейт, 1 мкКи [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 1 мкМ ATP, 1 мкл (4 ед.акт.) T4-полинуклеотидкиназы. К 2 мкл смеси добавляли 10 мкл 95% формамида, содержащего 0,01% бромфенолового синего и 0,01% кси-

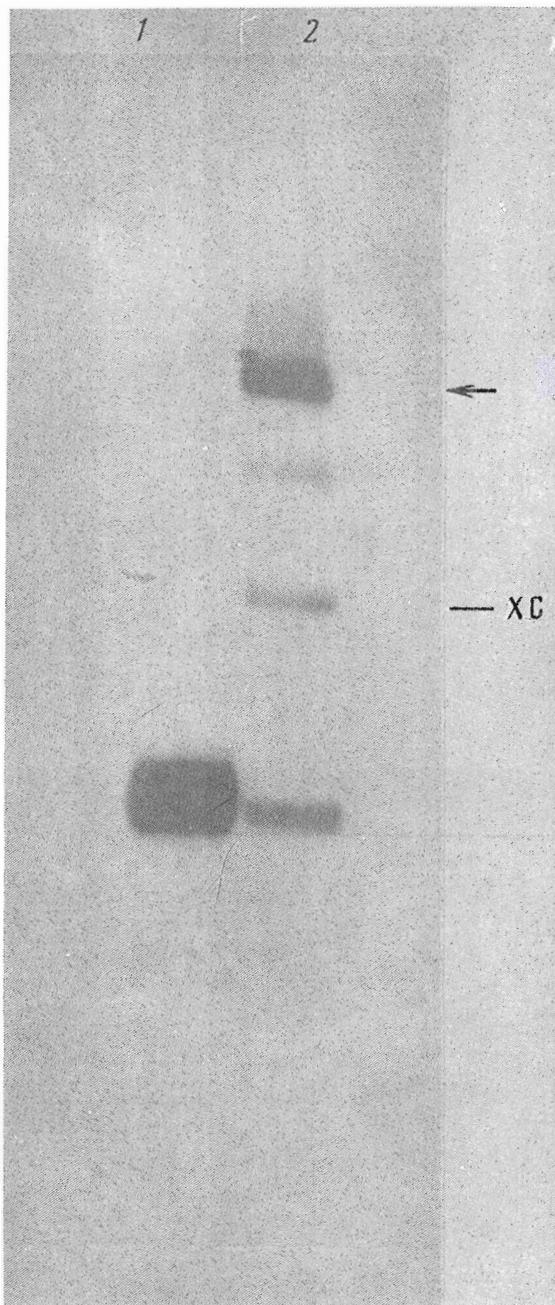


Рис. 5. Сборка гена hIL-4 (радиоавтограмма 8% ПААГ): 1 — смесь блоков I—IV (см. рис. 3), 2 — продукты их лигирования. Стрелкой указано положение гена hIL-4

ленцианолового голубого, нагревали 2 мин при 100° С. Препараты наносили на 20% денатурирующий ПААГ. Препартивное фосфорилирование олигонуклеотидов проводили в течение 1,5 ч при 37° С в 60 мкл раствора, содержащего 100 пмоль олигонуклеотида, 66 мМ трис-HCl (рН 9,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотрейт, 10 мкКи [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 200 мкМ ATP и 2 мкл (8 ед. акт.) T4-полинуклеотидкиназы. После окончания реакции киниривания добавляли до 10 мМ EDTA и нагревали 10 мин при 100° С.

**Лигирование олигонуклеотидов.** В препартивное лигирование было взято по 25 пмоль фосфорилированных олигонуклеотидов (Int1 и Int17 не фосфорилированы). Смеси соответствующих олигонуклеотидов нагре-

вали 5 мин при 100° С, переносили в термостат с температурой 70° С и отжигали до 25° С в течение 5–6 ч. В смесь добавляли 1/10 объема лигазного буфера, содержащего 0,66 М трис-HCl (рН 7,5), 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ дитиотреит, 0,5 мМ ATP, 1 мкл (45 ед. акт.) ДНК-лигазы. Конечный объем составлял 300 мкл. Инкубацию вели 18 ч при 4° С. Растворы экстрагировали равным объемом смеси фенол — хлороформ (1 : 1), ДНК осаждали спиртом, растворяли в 10 мкл воды и разделяли электрофорезом в 8% неденатурирующем ПААГ с последующей элюцией из геля.

**Элюция блоков из ПААГ.** Положение блоков I—IV в ПААГ определяли с помощью радиоавтографии. Полоску геля, содержащую нужный материал, вырезали, растирали и проводили элюцию (16 ч при 37° С) 5 объемами буфера, содержащего 25 мМ трис-HCl (рН 7,6) и 5 мМ EDTA. После центрифугирования элюат наносили на колонку с DEAE-Toyopearl 650M (30 мкл). ДНК элюировали 200 мкл 3 М ацетата натрия и осаждали объемами спирта.

**Лигирование блоков и их очистку ПААГ** проводили как описано выше для блоков I—IV.

**Клонирование гена hIL-4.** Для лигирования гена с вектором смешивали 0,1 мкг векторной ДНК pUC18/EcoRI/HindIII с 0,2 мкг EcoRI — HindIII-фрагмента, выделенного из геля. К полученной смеси добавляли по 2 мкл 10× лигазного буфера, ATP до 0,5 мМ, воду до 20 мкл и 1 мкл (2,5 ед. акт.) ДНК-лигазы. Контрольное лигирование вектора «самого на себя» проводили в тех же условиях без добавления экзогенной ДНК. Инкубацию вели 18 ч при 4° С. Половиной лигазной смеси трансформировали компетентные клетки *E. coli* HB101 по стандартной методике [14]. После высева на чашки с YT-агаром, содержащим ампидиллин (50 мг/л), число Ap<sup>R</sup>-клонов составило 40 (контроль) и 1100 (опыт).

**Гибридизация клонов.** 266 клонов перекопали на нитроцеллюлозный фильтр и растили в течение ночи при 37° С. Фильтры обрабатывали при 20° С 10 мин 0,5 М NaOH, затем 5 мин 1 М трис-HCl (рН 7,5) и 5 мин буфером, содержащим 1,5 М NaCl и 0,5 М трис-HCl. Фильтры запекали 1 ч при 80° С. Предгибридизацию проводили 2 ч в 6 × SSC, 0,1% SDS, 10 × × раствор Денхарта, 10 мкг/мл ДНК-носителя *E. coli* при 60° С. Гибридизацию <sup>32</sup>P-меченным олигонуклеотидом Int13 проводили 2 ч в растворе 6 × SSC, 0,1% SDS при 60° С, отмывали 4 × SSC, 0,1% SDS 30 мин при 40° С, далее 2 × SSC, 0,1% SDS 30 мин при 40° С, далее 0,5 × SSC, 0,1% SDS 1 ч при 40° С. Гибридизовался 241 клон.

**Выделение плазмидной ДНК.** Плазмидную ДНК выделяли методом быстрого лизиса [12] и анализировали обработкой рестриктазами в стандартных условиях.

**Нуклеотидные последовательности EcoRI/HindIII-фрагментов** плазмид четырех произвольно взятых клонов определяли методом Максама — Гилберта [13]. Цепь, кодирующую hIL-4, секвенировали с обоих концов путем введения 3'-концевой метки в HindIII-сайт при помощи [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP и ДНК-полимеразы I (фрагмента Кленова), а также введение 5'-концевой метки в EcoRI-сайт при помощи [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP и T4-полинуклеотидкиназы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скапчова Н. В., Куркин А. Н., Ажаев А. В. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 7. С. 940—946.
2. Garegg P. J., Rezberg T., Stawinski J., Stromberg R. // Chem. scr. 1985. V. 25. P. 280—282.
3. Froehler B. C., Matteucci M. D. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 4. P. 469—472.
4. Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5399—5407.
5. Noelle R., Krammer P. H., Ohara J., Uhr J. W., Vitetta E. S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 14. P. 6149—6153.
6. Mosmann T. R., Bond M. W., Coffman R. L., Ohara J., Paul W. E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 12. P. 5654—5658.
7. Coffman R. L., Carty J. // J. Immunol. 1986. V. 136. № 1. P. 949—954.
8. Coffman R. L., Ohara J., Bond M. W., Carty J., Zlotnik A., Paul W. E. // J. Immunol. 1986. V. 136. № 4. P. 4538—4541.

9. Yokota T., Otsuka T., Mosmann T., Banchereau J., De France T., Blanchard D., DeVrieso J. E., Lee F., Arai K.-I. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 13. P. 5894—5898.
10. Ikemura T. // J. Mol. Biol. 1982. V. 158. № 4. P. 573—597.
11. Sharp P. M., Bulmer M. // Gene. 1988. V. 63. № 1. P. 141—145.
12. Birnboim H. C., Doly I. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. № 6. P. 1513—1522.
13. Maxam A. M., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560—564.
14. Cohen C. N., Chang A. C. Y., Hsu L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 8. P. 2110—2114.

Поступила в редакцию  
14.VII.1989

После доработки:  
15.IX.1989

M. A. COULAGINA, N. V. SCAPTSOVA, N. V. BATCHIKOVA,  
A. N. KURKIN, A. V. AZHAYEV

### H-PHOSPHONATE METHOD IN THE SYNTHESIS OF THE HUMAN INTERLEUKIN 4 STRUCTURAL GENE

*All-Union Research Institute of Biotechnology, Moscow*

A modified H-phosphonate method was used to synthesize 32 oligodeoxyribonucleotides ranging in length from 23 to 28, which were enzymatically joined together to give the human interleukin 4 gene. The high degree of the oligonucleotide purity, achieved through the application of anion-exchange and reverse phase HPLC, ensures the high percentage of the desired sequence (about 75%) in the cloned DNA.