



УДК 577.113.4

© 1990 г.

*З. А. Шабарова, И. Н. Меренкова, Т. С. Орецкая,
Н. Н. Соколова*

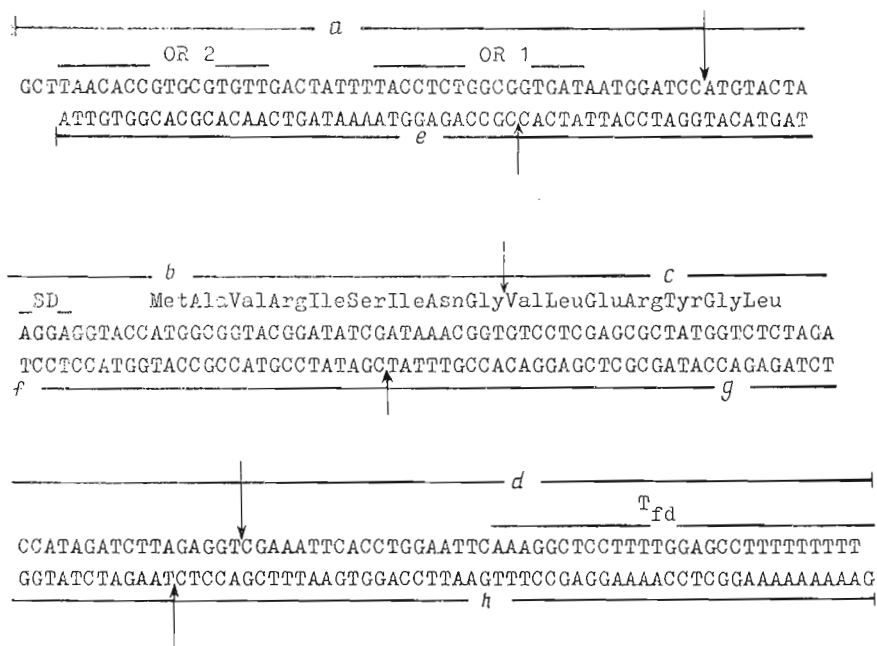
ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДНК-ДУПЛЕКСАХ XII *. НОВАЯ СТРАТЕГИЯ СБОРКИ ГЕНА

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет
и межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

В связи с интенсивным развитием генетической инженерии и биотехнологии возросло практическое значение синтетических ДНК-дуплексов, которые используются в качестве искусственных генов биологически активных пептидов и белков, а также регуляторных участков генома.

В настоящее время ДНК-дуплексы получают обычно ферментативным лигированием 5'-фосфорилированных олигодезоксирибонуклеотидов в комплементарных комплексах [2—4].

Ранее нами было показано [5, 6], что весьма эффективным и надежным методом соединения синтетических олигодезоксирибонуклеотидов является также химическое лигирование (ХЛ). Один из наиболее экспериментально простых и технологичных вариантов этого метода — конденсация олигодезоксирибонуклеотидов на комплементарной матрице при активации концевых фосфоэфирных групп олигомеров химическими реагентами — водорастворимым карбодимидом [6] или BrCN [7]. Этим мето-



Первичная структура ДНК-дуплекса. Стрелками указаны границы между олигоме-рами, соединенными путем ХЛ

* Сообщение XI см. [1].

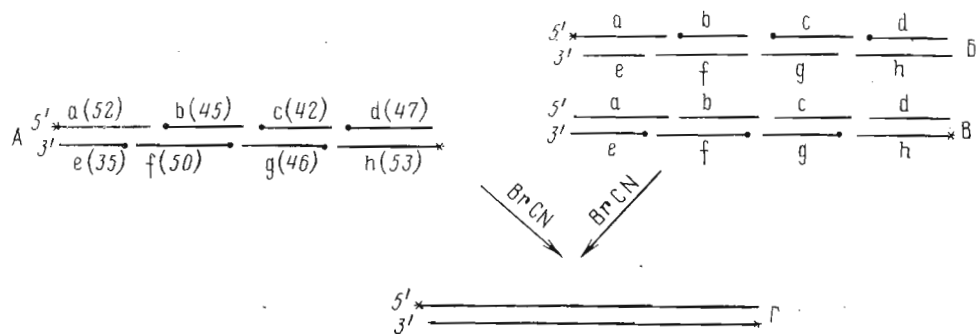


Рис. 1. Стратегия сборки гена: одновременное лигирование обеих цепей ДНК-дуплекса (А) и лигирование верхней (Б) и нижней (Б') цепей по отдельности. Точкой показаны концевые 5'-фосфатные группы, звездочкой — [5'-³²P]фосфат. Буквами обозначены олигонуклеотиды, цифрами в скобках — их длина

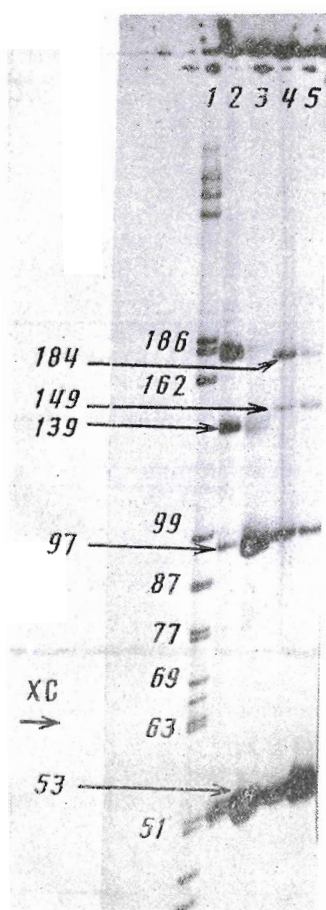


Рис. 2. Радиоавтограф (электрофорез в 8% ПААГ, содержащем 7 М мочевины) реакционных смесей, полученных после ферментативного (2, 4) и химического (3, 5) лигирования верхней и нижней цепей гена соответственно. 1 — контроль: гидролизат *TaqI*-рестриктазой плазмиды pHSB, полученной при клонировании в pUC19 [10]. Цифры слева указывают длину фрагментов. XC — ксиленцанол

дом были получены различные ДНК-дуплексы, содержащие функционально значимые участки [8], олигонуклеотидные повторы [9] и т. д.

В настоящем сообщении мы описываем сборку гена (183 п. о.) из синтетических олигонуклеотидов с помощью высокоактивного конденсирующего агента — ВтСН. Синтезированный ДНК-дуплекс, структура которого представлена на схеме, является полноценным геном — в его состав входит сильный промотор (аналог λP_R , участки OR1 и OR2), участок инициации трансляции (SD + иницирующий кодон ATG) и терминатор транскрипции (T_{fd}). При транскрипции этого гена должна получаться 130-звенная мРНК, кодирующая пептид из 16 аминокислот.

Каждая из цепей ДНК-дуплекса разбивалась на 4 олигомера длиной от 35 до 53 нуклеотидов (обозначены на схеме и рис. 1 буквами а — h) так, чтобы в дуплексе эти олигомеры перекрывались на 5—14 звеньев. Синтез олигонуклеотидов проводили амидофосфитным мето-

дом на автомате-синтезаторе «Циклон». После удаления защитных групп олигомеры обессоливали на биогеле Р-2 и выделяли методом препаративного электрофореза в 8% денатурирующем полиакриламидном геле. 5'-Фосфорилирование олигомеров проводили с помощью АТР и Т4-полинуклеотидкиназы. Для введения радиоактивной метки в каждую из цепей при 5'-фосфорилировании олигомеров а и б использовали [γ - 32 P] АТР (рис. 1).

Сборка синтетического гена проводилась нами в двух вариантах: путем одновременной сборки обеих цепей (рис. 1А) и путем сборки каждой цепи по отдельности с использованием в этом случае в качестве матрицы нефосфорилированных олигонуклеотидов (рис. 1Б, В).

Эквимольные смеси олигонуклеотидов в 0,25 М морфолиноэтансульфонатном буфере, рН 7,5, нагревали до 97° С, а затем медленно охлаждали до 0° С, после чего добавляли 1000-кратный избыток BrCN (в расчете на мономер). Через 1 мин нуклеотидный материал осаждали этанолом, вновь растворяли его в том же буфере и повторно обрабатывали BrCN. Для сравнения параллельно с BrCN-индуцируемым химическим лигированием проводилось ферментативное лигирование дуплексов Б и В в течение 12 ч с использованием Т4-ДНК-лигазы. Все реакционные смеси анализировали в 8% ПААГ, содержащем 7 М мочевины. Как видно из рис. 2, во всех четырех случаях получают одинаковые олигомеры.

ДНК-дуплекс Г, полученный методом ХЛ в вариантах Б и В (рис. 1), был успешно клонирован в фаг M13mp11. Для получения вектора с соответствующими синтетическому фрагменту липкими концами репликативную форму ДНК фага расщепляли рестриктазами *Hind*III и *Xba*I, затем достраивали с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и ограниченного набора dNTP. Первичная структура полученного гена подтверждена секвенированием по Сэнгеру.

Предложенный нами метод сборки генетических структур с помощью BrCN может рассматриваться как альтернативный ферментативной сборке и в дальнейшем может стать основой технологии полностью химического синтеза генов.

Авторы признательны Е. А. Скрипкину (МГУ) за проведение генно-инженерных экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долинная Н. Г., Цытович А. В., Тевосян С. Г., Сергеев В. Н., Шабарова З. А. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 9. С. 1195—1209.
2. Khorana H. G. // Science. 1979. V. 203. № 4381. P. 614—625.
3. Itakura K. // Trends Biochem. Sci. 1982. V. 7. № 12. P. 114—116.
4. Engels I. W., Uhlmann E. // Angew. Chem. 1989. B. 28. № 6. P. 716—734.
5. Shabarova Z. A. // Physicochemical biology reviews, Soviet scientific reviews. Section D / Ed. Skulachev V. P. Harwood Acad. Publ. GmbH., 1984. P. 1—51.
6. Dolinnaya N. G., Sokolova N. I., Gryaznova O. I., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 9. P. 3721—3737.
7. Сокколова Н. И., Аширбекова Д. Т., Долинная Н. Г., Шабарова З. А. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1286—1288.
8. Yolov A. A., Gromova E. S., Kubareva E. A., Potapov V. K., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 24. P. 8969—8991.
9. Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Druza V. L., Melnikova N. P., Purmal A. A. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 21. P. 5747—5761.
10. Kagramanova V. K., Derchacheva N. I., Mankin A. S. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 9. P. 4158.

[Поступило в редакцию
26.II.1990]

Z. A. SHABAROVA, I. N. MERENKOVA, T. S. ORETSKAYA, N. I. SOKOLOVA CHEMICAL REACTIONS IN NUCLEIC ACID DUPLEXES. XII. NEW STRATEGY FOR ASSEMBLING A GENE

*Chemistry Department and A. N. Belozersky Laboratory of Molecular
Biology and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University*

An artificial gene comprising 183 bp has been assembled by template-directed condensation of 35- to 53-membered oligodeoxyribonucleotides with cyanogen bromide as condensing agent. The reaction is complete within several minutes at 0° C. The resulting gene was cloned into M13mp11 and sequenced using the Sanger procedure.