



УДК 547.963.32.057:577.213.3

© 1993 А. И. Гуревич, Т. А. Качалина,
А. Л. Каюшин, М. Д. Коростелева, А. И. Мирошников

КЛОНИРОВАНИЕ ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА ОКСИТОЦИНА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

При клонировании синтетического гена тримера окситоцина наблюдаются делеции, обусловленные разрывами в одной из цепей плазмидной ДНК. Такие делеции происходят в значительно меньшей степени при клонировании ковалентно замкнутой циклической двунитчатой ДНК.

При химико-ферментативном синтезе и клонировании искусственных генов олигомеров коротких пептидов (в частности, окситоцина) мы столкнулись с трудностями, возникающими при достижении цели традиционным путем. Известно, что повторяющиеся последовательности в ДНК могут служить причиной разнообразных рекомбинантных перестроек [1]. Поэтому в синтезированных нами структурах с целью уменьшить гомологию отдельных участков полинуклеотидов для кодирования одних и тех же аминокислот были использованы разные кодоны.

Схема сборки искусственных генов *V/E* и *H/E* из олигонуклеотидов А — J представлена на рис. 1.

Для клонирования гена *V/E* был использован вектор, полученный расщеплением плазмиды рFPCP10 [2] рестриктазами *Bam*HI и *Eco*RI, а для клонирования гена *H/E* — вектор, полученный расщеплением плазмиды рTE2IL3 [2] рестриктазами *Hind*III и *Eco*RI.

Вначале мы конструировали плазмиды с искусственными генами *V/E* и *H/E*, используя традиционно оптимальные методы [3]. Сборка гена *V/E* была проведена с помощью лигазной шивки 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов В, С, D, G и E с нефосфорилированными А и H. Аликвоту полученной реакционной смеси лигировали с *Bam*HI/*Eco*RI-вектором и клонировали в *E. coli* HB101.

Сборку гена *H/E* проводили сходным образом с помощью лигазной шивки фосфорилированных олигонуклеотидов В, С, D, F, G и J с нефосфорилированными I и H. Аликвоту полученной лигазной смеси лигировали с *Hind*III/*Eco*RI-вектором и клонировали в *E. coli* HB101.

Клоны, содержащие рекомбинантные плазмиды, отбирали путем гибридизации колоний с мечеными олигонуклеотидами В и H и рестриктоного анализа (рестриктазы *Bam*HI, *Pst*I, *Hind*III, *Eco*RI и *Bgl*II). Структура рекомбинантных плазмид определена секвенированием их по Сенгеру с использованием в качестве праймеров олигонуклеотидов В и H. Вместо ожидаемых были получены укороченные структуры *V'/E'* и *H'/E'* (рис. 2). Это могло произойти как в результате делеций в правильно собранных участках генов *V/E* и *H/E*, так и вследствие

```

BamHI   A                               B                               C                               D                               EoRI
.GATCCGAAGTGC TACATCCAGAAC-TGCCCCGCTGGGT AAATGTTATATATCSAGAATTGTCC-CCTGGGCAAGTGT TACAGCCAGAATTGCCCG-CTGGGTAAATAATAG
GCTTTACG-ATGTAGGCTCTG ACGGGCGACCCA-TTTACAAATATAAGTCTTACAGG CGACCCGTTCSA-ATGTAGGCTTTACGGGC GACCCATTATTATCTTAA
                                                                                               F                               G                               H

HindIII I                               B                               C                               D                               EoRI
AGCTTCCAAATGC TACATCCAGAAC-TGCCCGCTGGGT AAATGTTATATATCSAGAATTGTCC-CCTGGGCAAGTGT TACAGCCAGAATTGCCCG-CTGGGTAAATAATAG
AGCTTTACG-ATGTAGGCTCTG ACGGGCGACCCA-TTTACAAATATAAGTCTTACAGG CGACCCGTTCSA-ATGTAGGCTTTACGGGC GACCCATTATTATCTTAA
                                                                                               F                               G                               H
                                                                                               J

```

Рис. 1. Схема сборки искусственных генов B/E и H/E и H/E из олигонуклеотидов A — J. Указаны полусайты рестриктаз в векторных плазидах

синтезаторе Milligen 7500. После окончания синтеза и полного деблокирования олигонуклеотиды выделяли с помощью анионообменной ВЭЖХ на колонке Hypersil APS NH₂ (Alltech; 4,6 × 250 мм) в градиенте концентрации сульфата аммония (0—0,6 М) в 0,05 М КН₂РO₄, рН 5,5, содержащем 60% формамида. Олигонуклеотиды дополнительно очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке с Nucleosil 120-5 C18 (Macherey-Nagel) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония, рН 6,5; гомогенность синтезированных продуктов проверяли электрофорезом в ПААГ. Выход продукта составлял 2—3 ОЕ₂₆₀.

Эксперименты по фосфорилированию и лигированию синтетических олигонуклеотидов проводили в условиях, описанных в работах [3, 4]. Плазмидные ДНК секвенировали в соответствии с работой [6]. Гидролиз рестриктазами осуществляли в универсальном буфере KGB [7].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуревич А. И., Микульскис А. В., Некрасова О. В., Черненко Е. А. // Мол. генетика, вирусол. и эпидемиол. 1988. № 1. С. 33—36.
2. Гуревич А. И., Скапцова Н. В., Луценко С. В., Смирнов В. А., Куркин А. Н., Ажаев А. В. // Биоорг. химия. 1991. Т. 17. № 5. С. 647—652.
3. Theriault N. Y., Carter J. B., Pulaski S. P. // Biotechniques. 1988. V. 6. № 5. P. 470—474.
4. Кулагина М. А., Скапцова Н. В., Батчикова Н. В., Куркин А. Н., Ажаев А. В. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 5. С. 625—634.
5. Conley E. C., Saunders V. A., Jackson V., Saunders J. R. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 22. P. 8919—8932.
6. Краев А. С. // Мол. биология. 1988. Т. 22. № 5. С. 1164—1197.
7. McClelland M., Hanish J., Nelson M., Patel J. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 1. P. 364.

Поступила в редакцию
17.IX.1992

После доработки
19.I.1993

*A. I. Gurevich, T. A. Kachalina, A. L. Kayushin,
M. D. Korosteleva, A. I. Miroshnikov*

CLONING OF TANDEMELY REPEATED SEQUENCES OF THE OXYTOCIN GENE

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Cloning of a synthetic gene of the oxytocin trimer is accompanied by deletions, caused by nicks in the plasmid DNA. Use of covalently closed circular double-stranded DNA greatly reduces the number of the deletions.