



Посвящается памяти М.Н. Колосова
(к 70-летию со дня рождения)

УДК 547.963.32.057

ПОЛУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ИСКУССТВЕННЫХ ГЕНОВ МЕТОДОМ ПЦР НА СИНТЕТИЧЕСКОЙ МАТРИЦЕ

© 1997 г. А. И. Гуревич[#], Р. С. Есипов, А. Л. Каюшин, М. Д. Коростелева

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 29.10.96 г. Принята к печати 10.01.97 г.

Методом ПЦР на однострочной матрице, содержащейся в неочищенной смеси олигодезоксинуклеотидов по окончании автоматического синтеза, получен ряд искусственных генов. Изучены особенности применения такого способа.

Ключевые слова: синтез генов, ПЦР.

Традиционный путь химико-ферментативного синтеза искусственных генов включает в себя стадии химического синтеза комплекта перекрывающихся олигонуклеотидов, составляющих структуру цепей полинуклеотидного дуплекса, их выделение и очистку после деблокирования, 5'-фосфорилирование и, наконец, лигирование олигонуклеотидов после отжига комплементарных участков с последующим клонированием полученного дуплекса (иногда после расщепления концевых участков подходящими рестриктазами) (см., например, [1]). С развитием автоматического синтеза олигонуклеотидов стало реальным увеличение их длины с 20–30 до многих десятков нуклеотидов. Это сделало возможным удлинение с помощью ПЦР амплифицируемой матрицы за счет выступающей за ее пределы нуклеотидной последовательности праймеров [2–6].

Эта стратегия со ступенчатым наращиванием центральной части гена в результате нескольких ПЦР с разными концевыми парами праймеров позволила осуществить синтез гена длиной более 400 п. о. [7]. При этом авторы всех предложенных способов использовали олигонуклеотиды (после синтеза и деблокирования) в выделенном и очищенном виде.

В другом случае синтез длинных синтетических генов (более 650 п. о.) удалось осуществить при использовании в качестве матрицы для ПЦР обеих комплементарных цепей ДНК, получаемых при автоматическом синтезе, без выделения исходных полинуклеотидов из реакционной смеси [8].

Чтобы ускорить и упростить методику, мы использовали в нашем случае в качестве матрицы для ПЦР только одну из двух цепей ДНК, отвеча-

ющей требуемой структуре гена. Очевидно, что в этом случае вторая цепь ДНК образуется уже в ходе первого цикла ПЦР в результате достройки праймера, комплементарного 3'-концевому участку матрицы. Такой подход эквивалентен широко используемой комбинации обратной транскрипции мРНК и ПЦР (метод RT-PCR; см., например, работу [9]). В нашем случае матрицей служила одноцепочечная ДНК длиной до 170 н. о. без выделения ее из реакционной смеси, получаемой в результате синтеза. Образец матрицы мы лишь освобождали от ненуклеотидных примесей путем переосаждения ацетоном из раствора в 2 М перхлорате лития. В таком образце, судя по данным электрофореза в ПААГ после 5'-фосфорилирования с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и T4-полинуклеотидкиназой, полноразмерный фрагмент ДНК содержится лишь в незначительном количестве. С большим выходом образуются продукты прерванного синтеза длиной более 60 н. о. Прямое определение выхода полноразмерной матрицы в такой смеси по количеству DMT^+ -катиона, освобождающегося после заключительного детритилирования при автоматическом синтезе, невозможно из-за его низкой концентрации. Поэтому количество полученного полинуклеотида мы оценивали расчетным путем, принимая средний выход на стадии конденсации равным 98%. В таком случае теоретический выход синтеза, который проводили в масштабе 150 нмоль, должен составлять 7 нмоль для 150-мера и 2.6 нмоль для 200-мера. Несмотря на небольшую долю (менее 2–5%) полноразмерной матрицы в реакционной смеси, после амплификации с соответствующими праймерами мы успешно получили этим путем ряд синтетических генов. На рис. 1 приведена электрофореграмма продуктов ПЦР, структура которых изображена на рис. 2.

Сокращение: DMT^+ – диметокситритил.

[#] Автор для переписки.

Этим путем мы синтезировали 156-членный дуплекс гена антигенной детерминанты *Plasmodium falciparum* (рис. 2а), который после расщепления рестриктазами *EcoRI* и *SalI* клонировали в *EcoRI/SalI*-векторе, приготовленном из плазмиды pteilmcsf [10]. Аналогично был получен 185-членный дуплекс жасмонатрегулируемого участка энхансера гена *pinI* картофеля (рис. 2б), который после расщепления рестриктазами *EcoRI* и *BamHI* клонировали в *EcoRI/BamHI*-векторе, полученном из плазмиды pBR322.

С целью расширения пределов применимости предлагаемого способа мы изучили возможность использования в одной ПЦР двух синтетических матриц, взаимно комплементарных по 3'-концевым участкам. Такой подход (метод SOE, splicing by overlap extention) был успешно использован ранее для сращивания с помощью ПЦР двух синтетических дуплексов за счет перекрывающихся концевых последовательностей [11]. Однако все попытки получить 232-членный дуплекс гена гексамера окситоциноиларгинина при амплификации по аналогичной схеме (рис. 2в) с использованием смеси двух неочищенных матриц (121- и 131-мера) были неудачными, хотя, как упомянуто выше, в работе [8] сходным методом были синтезированы значительно более длинные дуплексы. Вероятно, решающим фактором в нашем случае явилось не только присутствие в реакционной смеси большой доли укороченных с 5'-конца матричных полинуклеотидов, но и особенности их структуры (прежде всего наличие повторов), резко снижающие эффективность использования полноразмерной матрицы.

Синтез целевого 232-мера удалось осуществить в три этапа. На первом этапе мы провели ПЦР на неочищенном синтетическом 121-мере (кодирующем N-концевую тримерную часть гексамера окситоциноиларгинина) (рис. 2г), полученный дуплекс расщепили рестриктазами *HindIII* и *NcoI* и клонировали по этим сайтам в специально сконструированном векторе, содержащем полилинкер А:

HindIII KpnI NcoI SmaI SalI EcoRI
...AAGCTTGGTACCCATGGCCCGGGGTCGACGAATTC...

В результате была получена плазида рNох3 с геном N-концевого тримера окситоциноиларгинина.

Аналогично с помощью ПЦР на неочищенном синтетическом 131-мере, кодирующем С-концевую тримерную часть гексамера окситоциноиларгинина, по схеме, приведенной на рис. 2д, был получен второй дуплекс, который после расщепления рестриктазами *NcoI* и *EcoRI* клонировали в том же самом исходном векторе с полилинкером А. В результате была получена плазида рСох3 с геном С-концевого тримера окситоциноиларгинина.

п. о.

587—
540—
504—
458—
434—
267—
234—
213—
192—
184—
124—
123—

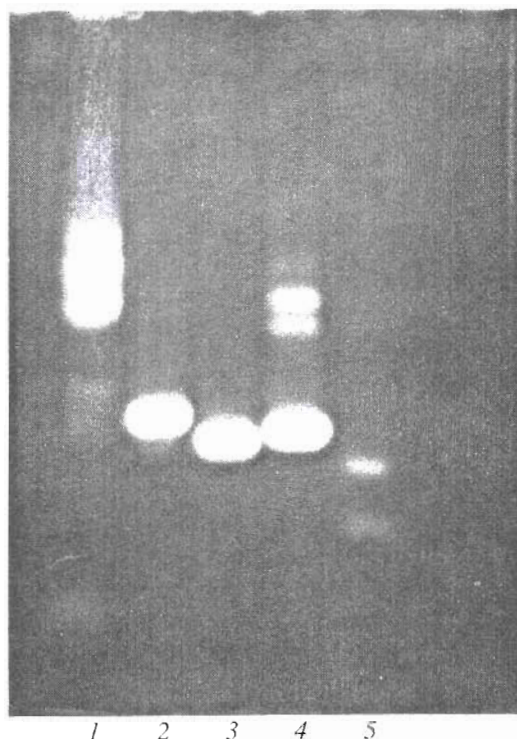


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР (2.5% агароза). 1 – стандарты (pBR322/*HaeIII*); 2–5 – продукты, схемы получения которых представлены на рис. 2б, 2а, 2ж, 2д соответственно.

Наконец, рекомбинацией *in vitro* плазмид рNох3 и рСох3 по *NcoI*-сайту была сконструирована плазида с целевым геном гексамера.

Ранее уже отмечалось [8], что при использовании ПЦР на синтетических матрицах возникает значительное число мутаций, которые авторы исправляли с помощью олигонуклеотиднаправленного мутагенеза. В наших случаях также наблюдались мутационные изменения синтетических генов, чаще всего точечные делеции. Так, например, анализ 8 клонов, полученных в результате клонирования продукта реакции, представленной на рис. 2а, показал, что только 2 клон содержат искусственный ген с интактной нуклеотидной последовательностью. В остальных 6 последовательностях в различных местах гена было отмечено по одной точечной делеции. Это позволяет сделать вывод, что ошибки возникли не при автоматическом синтезе полинуклеотида, а в ходе ПЦР.

Особенно много делеционных мутантов наблюдалось при амплификации в случаях рNох3 и рСох3 (рис. 2г, 2д), причем наряду с точечными мутациями здесь наблюдались делеции довольно крупных (до 50 п. о.) участков. По-видимому, причина этого заключается в высокой степени гомологии праймеров не только концевым, но и внутренним участкам матрицы. Действительно,

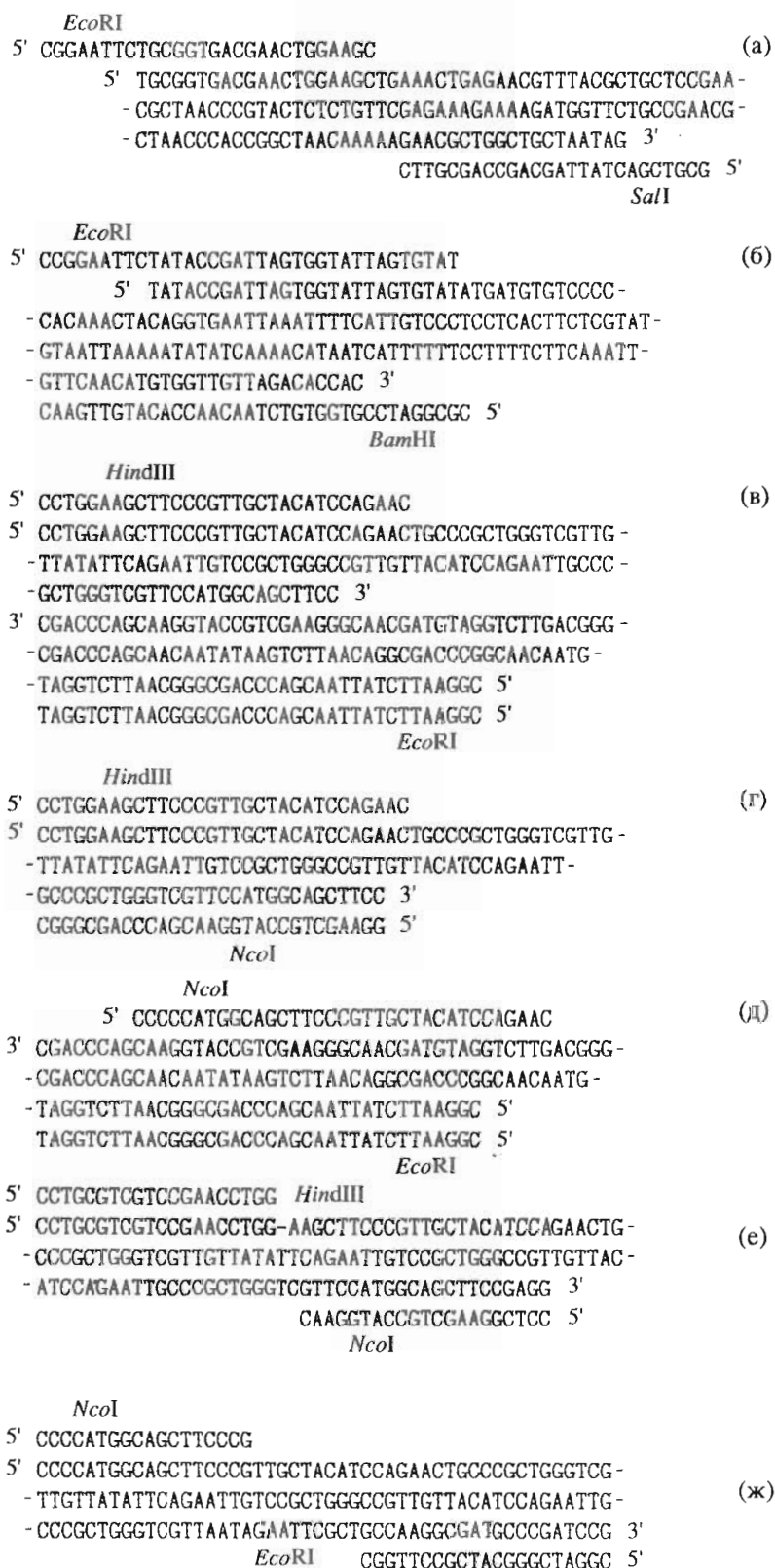


Рис. 2. Структуры синтетических матриц и праймеров для получения искусственных генов с помощью ПЦР. Структуры олигонуклеотидных праймеров и перекрывающихся концов матриц расположены на схеме против идентичных или ком-плементарных участков нуклеотидных последовательностей. Указаны сайты рестриктаз, использованных для расщеп-ления и последующего клонирования. (а) – схема получения гена антигенной детерминанты *Plasmodium falciparum*; (б) – схема получения участка энхансера гена *pin1* картофеля; (в) – нереализованная схема одностадийного получения гена гексамера окситоциноиларгинина; (г, е) – схемы получения гена N-концевого тримера окситоциноиларгинина; (д, ж) – схемы получения гена C-концевого тримера окситоциноиларгинина.

оба синтетических гена включают в себя тример гена окситоциноиларгинаина и, несмотря на использование в этих трех структурных единицах различных кодонов, в них сохраняется высокая степень гомологии.

Значительно успешнее проходила амплификация с короткими праймерами, не содержащими последовательностей, даже в малой степени гомологичных внутренним участкам гена (рис. 2е, 2ж).

Таким образом, одонитчатые полинуклеотиды, содержащиеся в неразделенной смеси олигодезоксинуклеотидов по окончании автоматического синтеза, могут успешно использоваться в качестве матриц для получения искусственных генов методом ПЦР.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали трис, акриламид, N, N'-метиленисакриламид, персульфат аммония (Merck); N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин (Reanal), агарозу, АТР, dNTP, бромистый этидий (Sigma); мочевины, ос. ч. ("Реахим"); агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco); [γ - 32 P]АТР, [α - 32 P]dАТР (2000 Ки/ммоль, Обнинск); T4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1), T4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78); Taq-ДНК-полимеразу, модифицированную T7-ДНК-полимеразу (КФ 2.7.7.7); рестрикционные эндонуклеазы (КФ 32.1.23.x) BamHI, NcoI, HindIII, EcoRI и SalI (Fermentas, Вильнюс).

Условия экспериментов по получению рекомбинантных плазмид, трансформации компетентных клеток, клонированию, а также гель-электрофорезу и выделению ДНК из гелей приведены в работе [6]. Гидролиз рестриктазами проводили в универсальном К-глутаматном буфере [7].

Защищенные олигонуклеотиды синтезировали традиционным амидофосфитным методом на синтезаторе ASM-102U (БИОССЕТ, Новосибирск) и затем деблокировали. Праймеры для амплификации выделяли как описано в работе [12]. Синтез образцов, служащих матрицами для ПЦР, проводили в масштабе 150 нмоль и затем освобождали от ненуклеотидных примесей путем переосаждения ацетоном из раствора с 2 М LiClO₄; полученный образец растворяли в 100 мкл воды и в инкубационную смесь для амплификации вводили 1 мкл раствора переосажденной смеси.

ПЦР осуществляли на амплификаторе DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus) в 50 мкл инкубационной смеси, содержащей около 20 пмоль

ДНК матрицы (молярная концентрация полноразмерной матрицы в смеси синтетических олигонуклеотидов рассчитана исходя из среднего выхода на стадии конденсации 98% и длины полноразмерного продукта), по 80 пмоль соответствующих праймеров, сумму dNTP (каждый в концентрации 0.5 мМ), 67 мМ трис-HCl (pH 8.3), 6 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит, 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 9 мкг желатина и 5 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы. Для предотвращения испарения на реакционную смесь наслаивали силиконовое масло. Инкубацию проводили в ДНК-амплификаторе в следующем режиме: денатурация – 30 с при 94°C, отжиг – 30 с при 52°C, элонгация – 30 с при 72°C. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 2.5% агарозном геле и фрагменты ДНК выделяли путем электроэлюции на ионообменную бумагу NA45.

Полученные ДНК секвенировали с дидезоксiterминаторами и секвеназой (модифицированной T7-ДНК-полимеразой).

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 96-04-48407).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Theriault N.Y., Carter J.B., Pulaski S.P. // *Biotechniques*. 1988. V. 6. P. 470–474.
2. Sandhu G.S., Aleff R.A., Kline B.C. // *Biotechniques*. 1992. V. 12. P. 14–16.
3. Prodromou C., Pearl L.H. // *Protein Eng.* 1992. V. 5. P. 287–289.
4. Ye Q.-Z., Johnan L.L., Boragi V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. V. 186. P. 143–149.
5. Jayaraman K., Puccini C.J. // *Biotechniques*. 1992. V. 12. P. 392–398.
6. Shuldiner A.R., Tanner K., Scott L.A., Moore C.A., Jesse R. // *Anal. Biochem.* 1991. V. 194. P. 9–15.
7. Di Donato A., de Nigris M., Russo N., Di Biase S., D'Alessio G. // *Anal. Biochem.* 1993. V. 212. P. 291–293.
8. Ciccarelli R.B., Gunyuzlu P., Huang J., Scott C., Oakes F.T. // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. P. 6007–6013.
9. Mallet F., Oriol G., Mary C., Verrier B., Mandrand B. // *Biotechniques*. 1995. V. 18. P. 678–687.
10. Гуревич А.И., Есипов П.С., Качалина Т.А., Каюшин А.Л. // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21. С. 282–288.
11. Horton R.M., Hunt H.D., Ho S.N., Pullen J.K., Pease L.R. // *Gene*. 1989. V. 77. P. 61–68.
12. Гуревич А.И., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мирошников А.И. // *Биоорганическая химия*. 1993. Т. 19. С. 629–632.

Synthesis of Artificial Genes by PCR on a Synthetic Template

A. I. Gurevich, R. S. Esipov, A. L. Kayushin, and M. D. Korosteleva

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miĭlukho-Maklaya 16/10,
GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

Received October 29, 1996; in final form, January 10, 1997

Abstract—Artificial genes were synthesized by the PCR method. Single-stranded DNA contained in an unpurified mixture of oligodeoxynucleotides after automated synthesis was used as a template. The features of this approach were studied.

Key words: gene synthesis, PCR.