



УДК 547.963.32.07:577.143.6

ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ СТРУКТУРНОГО ГЕНА  
ВАЛИНОВОЙ тРНК ДРОЖЖЕЙ \*Берлин Ю. А., Лебедеко Е. Н., Каюшин А. Л.,  
Карнов В. А., Колосов М. Н.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Осуществлен химико-ферментативный синтез гена валиновой тРНК, дрожжей. Синтетический ген встроен в плазмиду рBR322 по *EcoRI*- и *HindIII*-сайтам, и его первичная структура доказана методом Максама – Гилберта.

Направленный синтез полидезоксинуклеотидов в сочетании с методологией рекомбинантных молекул ДНК служит основой важного подхода к искусственному получению биополимеров, а также эффективным инструментом изучения фундаментальных молекулярно-биологических процессов. В рамках исследования биосинтеза и структурно-функциональных свойств транспортных РНК мы осуществили химико-ферментативный синтез структурного гена валиновой тРНК, дрожжей. Стратегия подобных синтезов, разработанная в результате основополагающих работ Коррапы с сотр., включает химический синтез одноцепочечных олигонуклеотидов, их соединение с помощью ДНК-лигазы с образованием двух комплементарных полинуклеотидов, составляющих целевой дуплекс, и его встраивание в вектор [2]. Нуклеотидная последовательность 77-звенного дуплекса была выведена формальным путем из первичной структуры тРНК<sup>Val</sup> [3] и дополнена по концам половинными *EcoRI*- и *HindIII*-сайтами для последующего встраивания в клонирующий вектор (см. схему). Эта нуклеотидная последовательность была разбита на 14 одноцепочечных, частично перекрывающихся сегментов длиной 9–13 звеньев. Синтез 10 сегментов был осуществлен ранее (см. [4] и предшествующие работы); получение остальных четырех описано в настоящей работе.

Эти олигонуклеотиды были получены фосфотриэфирным методом [5] исходя из нуклеозид-3'-(*n*-хлорфенил)фосфатов, в которых аминогруппа бензоилирована, 5'-гидроксил в Р-компоненте защищен диметокситриэтильным остатком, а фосфат в ОН-компоненте — β-цианэтильной группой. Нуклеотидную цепь наращивали преимущественно блоками в направлении от 3'-к 5'-концу, причем в качестве 3'-концевого звена использовали 3'-ацетилнуклеозид, а в качестве конденсирующего реагента — 2,4,6-триизопропилбензосульфотетразолид (TPST). Целевой олигонуклеотид после полного деблокирования очищали анионообменной хроматографией в 7 М мочеvine в нейтральной и кислой среде и анализировали после 5'-<sup>32</sup>P-фосфорилирования с помощью электрофореза в 20% полиакриламидном геле, гомохроматографии и нуклеотидных карт (см. схему, таблицу и рис. 1).

Поскольку вероятность ошибок в ходе лигазных сшивок в общем случае возрастает с увеличением числа соединяемых компонентов, на следующем, промежуточном этапе синтеза три группы олигонуклеотидов были по отдельности сшиты лигазой с образованием дуплексов А, Б и В. При этом олигонуклеотиды, 5'-конец которых участвует в образовании фосфодиэфирной связи, были предварительно 5'-<sup>32</sup>P-фосфорилированы так, чтобы количество вводимой метки позволяло контролировать фосфорили-

\* Предварительное сообщение см. [1]. Префикс d (дезокси) для краткости всюду опущен, за исключением NTP.

Межнуклеотидные конденсации

Синтезированный олигонуклеотид *	Компоненты конденсации, мкмоль			Время, мин	Выход, %
	P-компонент	OH-компонент	TPST		
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]bzA≠Tp(xy)	680	450	1020	30	67
bzA≠T≠bzC(Ac)	105	72	207	40	41
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]bzG≠bzCp(xy)	191	115	357	45	80
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]bzA≠T≠bzCp(xy)	120	76	249	60	34
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]T≠Tp(xy)	130	105	267	40	90
bzG≠T≠Tp(xy)	156	104	312	45	43
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]bzC≠bzGp(xy)	233	156	550	30	83
bzG≠bzC≠bzA≠T≠bzC(Ac)	44	29	88	60	43
bzA≠T≠bzG≠bzG≠bzC≠bzA≠T≠bzC(Ac)	26	13	69	60	87
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]bzC≠bzG≠bzG≠T≠Tp(xy)	78	52	161	60	53
C-G-G-T-T=A-T-G-G-C-A-T-C (V) **	14	6	67	240	16 **
bzA≠T(Ac)	102	70	168	20	52
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]bzA≠bzGp(xy)	264	175	402	30	58
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]bzC≠bzCp(xy)	470	410	690	30	71
bzG≠bzA≠T(Ac)	47	31	91	45	36
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]bzC≠bzA≠bzGp(xy)	68	44	103	30	71
bzC≠bzG≠bzC≠bzCp(xy)	105	70	220	40	68
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]bzC≠bzA≠bzG≠bzG≠bzA≠T(Ac)	13	7	26	40	54
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]T≠T≠bzC≠bzG≠bzC≠bzCp(xy)	88	47	179	60	55
T-T-C-G-C-C=C-A-G-G-A-T (XII) **	7	4	33	180	13
bzC≠bzA(Ac)	77	78	121	45	68
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]bzA≠bzCp(xy)	180	145	274	30	73
T≠bzCp(xy)	310	200	460	30	93
bzA≠bzAp(xy)	470	310	940	20	62
bzA≠bzC≠bzC≠bzA(Ac)	69	53	120	60	48
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]bzA≠T≠bzCp(xy)	92	61	167	50	44
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]bzG≠bzA≠bzAp(xy)	350	230	710	30	86
bzA≠T≠bzC≠bzA≠bzC≠bzC≠bzA(Ac)	27	15	54	60	40
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]bzG≠bzC≠bzG≠bzA≠bzAp(xy)	33	14	66	60	26
G-C-G-A-A=A-T-C-A-C-C-A (XIII) **	4	3	18	210	28
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]T≠bzCp(xy)	270	180	540	30	80
bzC≠Tp(xy)	153	97	300	50	55
T≠bzG≠bzA≠T(Ac)	39	20	78	90	80
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]T≠bzG≠bzGp(xy)	54	36	108	70	84
[ (MeO) <sub>2</sub> Tr]bzA≠bzG≠bzC≠Tp(xy)	38	23	76	60	92
T≠bzG≠bzG≠T≠bzG≠bzA≠T(Ac)	20	11	60	70	69
A-G-C-T=T-G-G-T-G-A-T (XIV) **	3,5	1,5	14	180	3

\* Знаком ≠ обозначена межнуклеотидная связь, защищенная 4-хлорфенильным остатком; положение связи, образовавшейся в результате данной конденсации, обозначено символом ±: x - 4-хлорфенил, y - β-цианэтил.

\*\* В защищенном виде не выделяли; выход рассчитан на полностью деблокированный и очищенный олигонуклеотид. Знаком = обозначено положение межнуклеотидной связи, образовавшейся в заключительной конденсации.

рование и шивку (рис. 2), но не мешало последующему структурному анализу полинуклеотидов. Кроме того, были фосфорилированы сегменты (IV) (дуплекс А) и (X) (дуплекс В), тогда как в сегментах (I) и (XIV) 5'-гидроксил оставался свободным; благодаря этому дуплексы А и В могли быть далее без дополнительного фосфорилирования сшиты с дуплексом Б, и олигомеризация по самокомплементарным *EcoRI*- и *HindIII*-концам оказывалась невозможной. После отделения с помощью гель-фильтрации непрореагировавших исходных олигонуклеотидов (рис. 2) дуплексы А, Б и В метили по свободным 5'-концам с помощью полинуклеотидкиназы и [<sup>32</sup>P]АТФ или же по 3'-концам комплементарной достройкой с помощью бактериальной ДНК-полимеразы и смеси dNTP, часть которых содержит [<sup>32</sup>P]фосфат в α-положении; меченые олигонуклеотиды выделяли электрофорезом в денатурирующем полиакриламидном геле и их первичную структуру доказывали с помощью метода Максама - Гилберта (см., например, рис. 3).

Все три дуплекса - А, Б (после 5'-фосфорилирования) и В - были далее сшиты ДНК-лигазой, и смесь продуктов шивки, содержащую, судя по гель-электрофорезу, целевой 82-звенный полинуклеотид, после 5'-фосфорилирования использовали для встраивания синтетического гена в век-

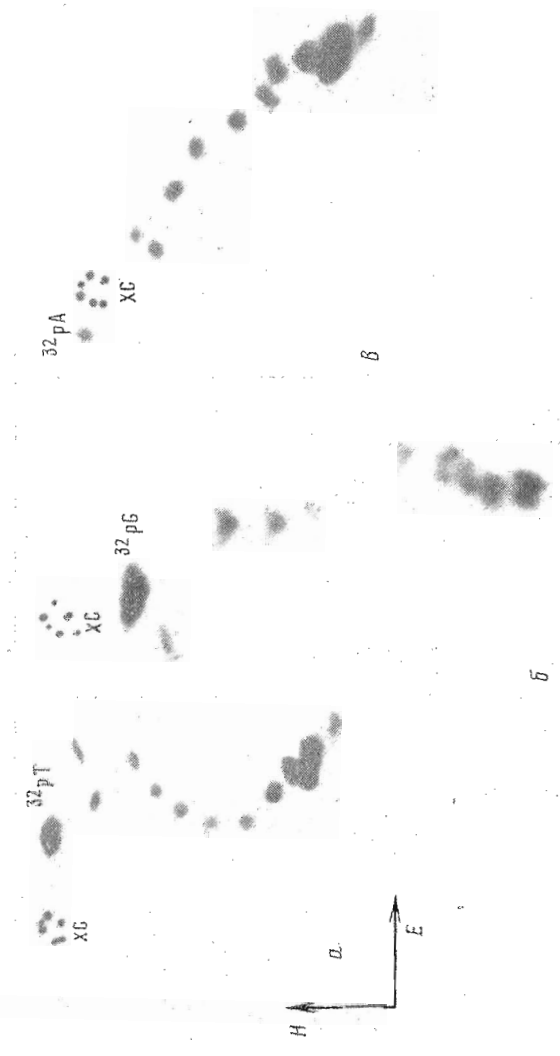
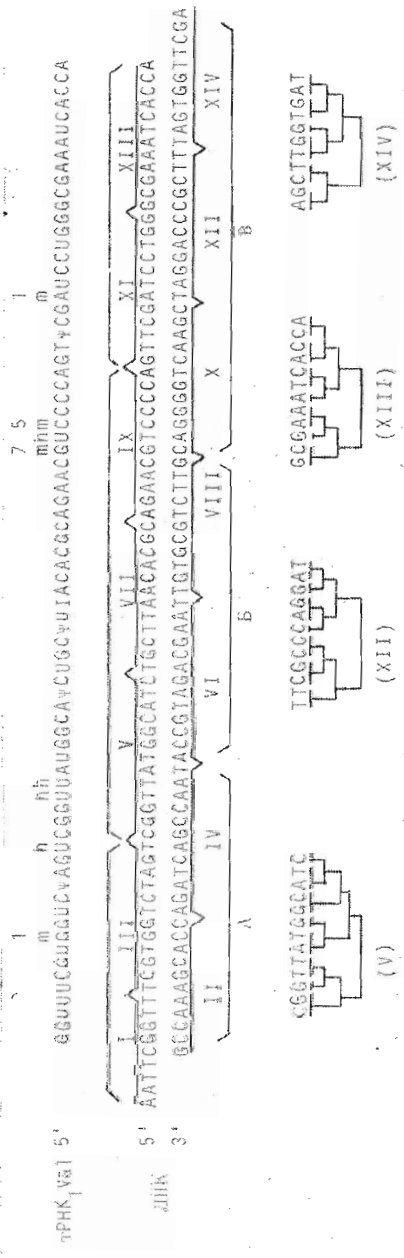


Рис. 1. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза 5'-<sup>32</sup>P-олигонуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда. E — направление электрофореза на полоске ацетицеллозы в пиридин-ацетатном буфере, pH 3,5 (≈100 В/см), H — направление гомохроматографии в гомосместе VI [45], XC — маркер клонцианол. FF, a — <sup>32</sup>pTTCGCCCCAGGAT, б — <sup>32</sup>pGCGAAATCACCA, e — <sup>32</sup>pA-CGCTTGGTGAT

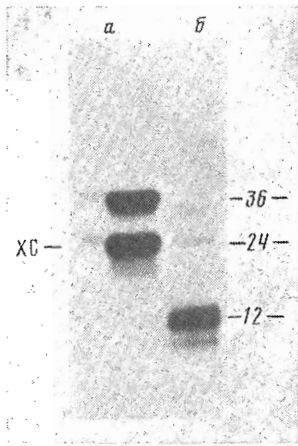


Рис. 2

Рис. 2. Аналитический электрофорез в 20% полиакриламидном геле (50 мМ триборат (рН 8,3), 1 мМ EDTA, 7 М мочевины) продуктов лигазной шивки сегментов V, рVI, рVII, рVIII и IX (синтез дуплекса Б) после гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-75 (1×7,5 см) в TES-буфере. а – продукты шивки (пик 1), б – исходные сегменты (пик 2)

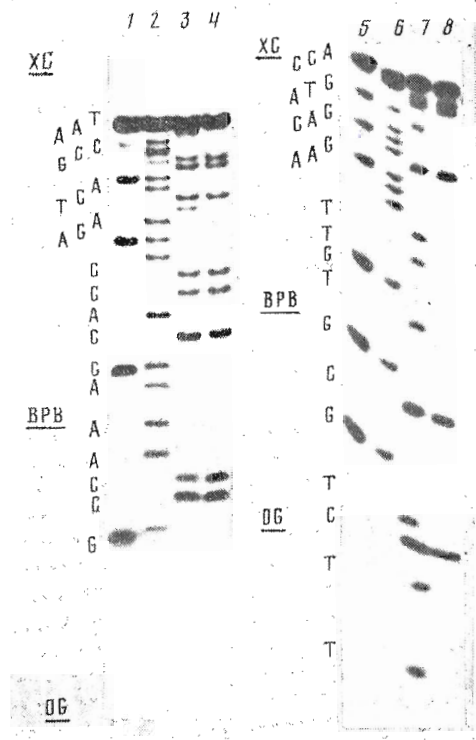


Рис. 3

Рис. 3. Анализ нуклеотидной последовательности методом Максама – Гилберта длинной цепи дуплекса А (23-мер рIV+рII, мечен по 3'-концу действием ДНК-полимеразы, [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP и dTTP, электрофорез в 20% полиакриламидном геле, карманы 1–4, последовательность 5'→3' сверху вниз) и короткой цепи дуплекса Б (24-мер рVI+рVIII, мечен по 5'-концу с помощью полинуклеотидкиназы и [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP; электрофорез в 15% полиакриламидном геле, карманы 5–8, последовательность 5'→3' снизу вверх). 1, 5 – модификация по G (10 мин), 2, 6 – по A+G (20 мин), 3, 7 – по T+C (40 мин), 4, 8 – по C (40 мин). BPB и OG – маркеры бромфенолового синь и оранжевый G

тор. В качестве вектора служила плазида рBR322, у которой удален малый фрагмент *EcoRI-HindIII*. Поскольку этот участок существен для выражения генов, определяющих устойчивость к тетрациклину [6], его удаление или замена в общем случае приводят к утрате этого признака бактериаль-носителем модифицированной плазмиды, что лежит в основе отбора рекомбинантов. Как было показано контрольным опытом, присутствие малого *EcoRI-HindIII*-фрагмента в процессе рекомбинации *in vitro* приводит к появлению лишь незначительного числа  $Ar^rTc^r$ -колоний, содержащих исходную плазмиду. Поэтому при получении рекомбинантных ДНК фрагменты не разделяли, но проводили их дефосфорилирование (ср. [7]), с тем чтобы избежать фона  $Ar^rTc^r$ -колоний, не связанных с встраиванием синтетического дуплекса (см. «Эксп. часть»). Лигирование полученного таким образом вектора с продуктом шивки дуплексов А, Б и В и последующая трансформация клеток *E. coli* привели к появлению ряда  $Ar^rTc^r$ -колоний. Выборочный анализ бактериальных клонов показал, что этот фенотип определяется содержащейся в них плазмидой рEL17. По электрофоретической подвижности в агарозном геле эта плазида не отличается по размеру от рBR322 и содержит уникальные *EcoRI*- и *HindIII*-сайты, а при ее обработке обеими этими рестриктазами образу-

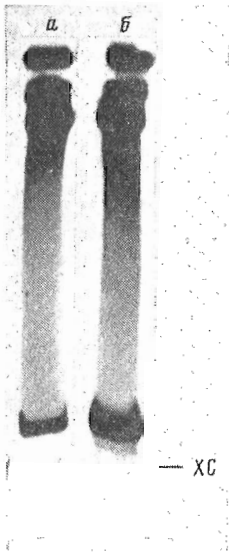


Рис. 4

Рис. 4. Выделение из плазмиды pEL17 меченого по 3'-концу структурного гена  $\text{tRNK}^{\text{Val}}$  электрофорезом в 10% полиакриламидном геле (50 мМ трис-борат (pH 8,3), 1 мМ EDTA). а — последовательная обработка *EcoRI*, ДНК-полимеразой +  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP} + \text{dTTP}$  и *HindIII*. б — последовательная обработка *HindIII*, ДНК-полимеразой +  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP} + [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP} + \text{dATP} + \text{dTTP}$  и *EcoRI*

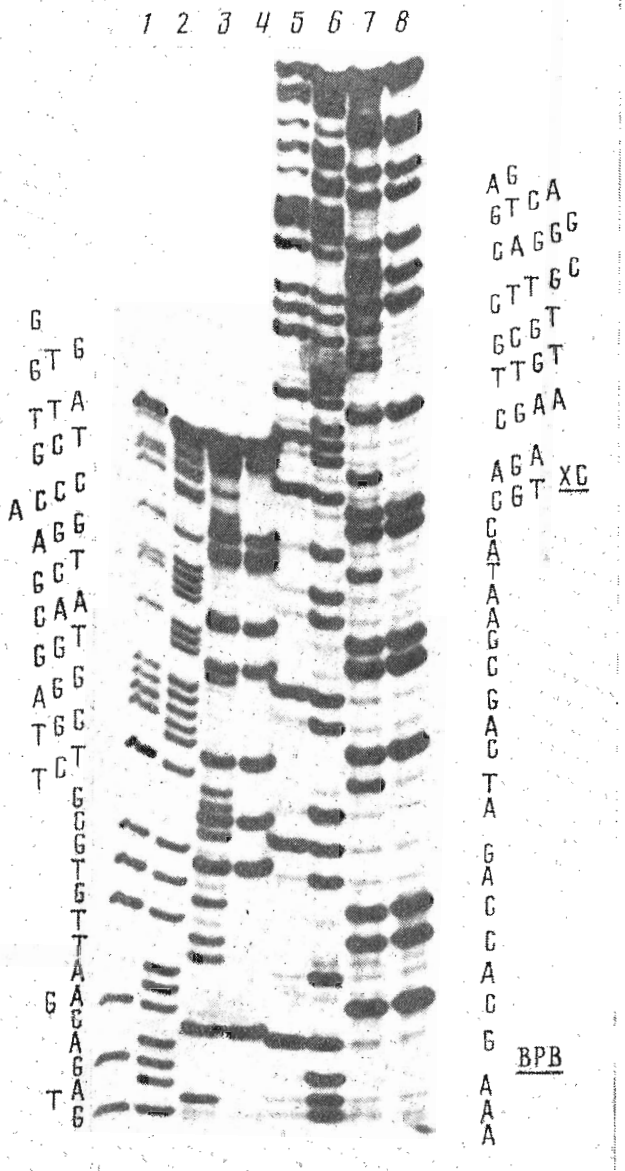


Рис. 5

Рис. 5. Определение нуклеотидной последовательности структурного гена  $\text{tRNK}^{\text{Val}}$  в составе *EcoRI-HindIII*-фрагмента рекомбинантной плазмиды pEL17 методом Максама — Гилберта. Фрагмент метили по *EcoRI*-концу с помощью ДНК-полимеразы I и  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP} + \text{dTTP}$  (см. рис. 4а). Электрофорез в 15% полиакриламидном геле. 1 и 5, 2 и 6, 3 и 7, 4 и 8 — соответственно модификация по G (5 мин), A + G (10 мин), T + C (20 мин), C (20 мин). Направление 5'→3' сверху вниз. Вторая порция вещества (карманы 5–8) нанесена после того, как ВРВ в первой порции (1–4) прошел всю длину геля

ется фрагмент длиной около 80 пар оснований. После избирательного введения [ $^{32}$ P]фосфата с помощью ДНК полимеразы (рис. 4) был проведен анализ первичной структуры этого фрагмента модифицированным методом Максама — Гилберта [8—10] по обеим комплементарным цепям, который доказал, что *EcoRI-HindIII*-вставка содержит нуклеотидную последовательность структурного гена валиновой тРНК, дрожжей (результаты анализа одной из цепей представлены на рис. 5).

Синтез гена, описанный в настоящей работе, делает возможными исследования, связанные с биосинтезом и функционированием эукариотической валиновой тРНК, в частности сравнительное изучение выражения искусственного и природного генов в бактериальных и дрожжевых клетках.

### Экспериментальная часть

В работе использованы дезоксирибонуклеозиды, дезоксирибонуклеозид-5'-фосфаты, АТФ, дитиотреит (Calbiochem), трис, акриламид, N,N-метилпипераккриламид (Reanal и Merck), DEAE-целлюлоза DE-23 (Whatman), DEAE-целлюлоза NN 300 DEAE и целлюлоза MN 300 (HR) (Serva), полоски ацетилцеллюлозы (3×55 см, Schleicher und Schüll), силикагель L 40—100 (Chemapol), сефадекс G-50 и G-75, сверхтонкий (Pharmacia), биогель A-5m (BioRad), фосфодиэстераза змеиного ядра (VPDE; КФ 3.1.4.1), фосфодиэстераза селезенки (КФ 3.1.4.18), панкреатическая ДНКаза (КФ 3.1.4.5), микрококковая нуклеаза (КФ 3.1.4.7; Worthington), ДНК-полимераза 1 *E. coli* (КФ 2.7.7.7; Boehringer), T4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) [4], щелочная фосфатаза *E. coli* (BAP; КФ 3.1.3.1) [11]. T4-ДНК-лигаза (КФ 6.5.1.1) и эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* и *HindIII* были любезно предоставлены А. А. Яцулайтисом (Вильнюс). TES-буфер: 1 мМ трис-HCl (pH 7,6), 1 мМ NaCl, 0,1 мМ EDTA.

*Химический синтез олигонуклеотидов.* Получение защищенных нуклеозидов и нуклеотидов, избирательное деблокирование и межнуклеотидные конденсации проводили как описано ранее [4]. Реакцию конденсации останавливали добавлением равного объема воды, через 30 мин смесь упаривали и маслообразный остаток обрабатывали по методу [5] (при синтезе ундекануклеотида (XIV)) или же следующим образом. Следы воды и пиридина удаляли упариванием с толуолом, остаток в хлороформе наносили на 1-см слой силикагеля, промывали хлороформом и затем элюировали 8% метанолом в хлороформе (при этом отделяются вещества, остающиеся при ТСХ на старте). Элюат упаривали и хроматографировали на колонке с силикагелем в линейном градиенте концентрации метанола в хлороформе. После проведения заключительной межнуклеотидной конденсации реакционную смесь разлагали водой, упаривали и остаток обрабатывали 30% водн. NH<sub>3</sub> (8 ч при 20°С и 12 ч при 50°С) для удаления 3'-O-, N- и Р-защитных групп, а затем, после упаривания досуха, проводили детритилирование действием 80% AcOH (30 мин при 20°С) и снова упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl<sup>-</sup>) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины и 10 мМ трис-HCl, pH 7,5; фракции, отвечающие целевому незащищенному олигонуклеотиду, разбавляли водой до концентрации соли 0,05 М и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Сорбент промывали 0,05 М ТЕАВ, после чего олигонуклеотид элюировали 1 М ТЕАВ, раствор несколько раз упаривали с водным спиртом и рехроматографировали на DEAE-целлюлозе (Cl<sup>-</sup>) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины при pH 3,5. После нейтрализации элюата водн. NH<sub>3</sub> снова проводили обессоливание на DEAE-целлюлозе (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), упаривали и остаток подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-50 в 0,05 М ТЕАВ. После упаривания или лиофилизации вещество хранили в водном растворе при -20°С. Концентрацию вещества определяли по величине A<sub>260</sub> (без учета гипохромии), используя следующие значения ε<sub>260</sub> для мононуклеотидов: 9300 (дpT), 7400 (дpC), 15300 (дpA), 11800 (дpG). Результаты проведенных синтезов представлены в таблице.

5'-<sup>32</sup>P-Фосфорилирование олигонуклеотидов, частичный гидролиз VPDE и двухмерное разделение продуктов гидролиза проводили как описано ранее [4]. Фингерпринты олигонуклеотидов (XII) — (XIV) приведены на рис. 1, фингерпринт тридекануклеотида (V) идентичен описанному ранее [12] для продукта фосфодиэфирного синтеза.

Лигазные шивки синтетических олигонуклеотидов проводили в буфере, содержащем 60 мМ трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит, 0,1 мМ АТР, 7—12 мкМ олигонуклеотиды и 400—800 ед. акт./мл Т4-ДНК-лигазы, в течение 16 ч при 4° С или 4 ч при 10° С; обычно перед прибавлением АТР и лигазы реакционную смесь отжигали, нагревая 5—10 мин при 70° С и затем постепенно охлаждая в течение 3 ч (при получении дуплекса В показано, что отжиг не влияет на результат шивки). Количество исходных олигонуклеотидов рассчитывали по количеству 5'-<sup>32</sup>P-фосфата, а в случае 5'-ОН-сегментов — по величине A<sub>260</sub> (эти сегменты брали с 20% избытком). По окончании реакции добавляли EDTA до концентрации 50 мМ, фермент инактивировали нагреванием в течение 2 мин при 90° С, раствор быстро охлаждали и хроматографировали на колонке с сефадексом G-75 в TES-буфере. Первый пик, содержащий продукты шивки, лиофилизovali. Реакционную смесь и продукты лигазной шивки после выделения анализировали электрофорезом в 20% полиакриламидном геле в 50 мМ трис-боратном буфере (рН 8,3), 1 мМ EDTA и 7 М мочевины (см., например, рис. 2). Кинетику и правильность ковалентного соединения олигонуклеотидов анализировали по превращению [<sup>32</sup>P]фосфата из концевое в межнуклеотидный, устойчивый к действию ВАР, и с помощью метода ближайших соседей [4]. Степень лигазной шивки при получении дуплексов А, Б и В составляла 55—65%. Синтезированные дуплексы метили [<sup>32</sup>P]фосфатом по 5'-концу с помощью полинуклеотидкиназы и [<sup>32</sup>P]АТР или же по 3'-концу действием ДНК-полимеразы и [<sup>32</sup>P]dNTP, меченые полинуклеотиды выделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и анализировали методом Максама — Гилберта (см. ниже и рис. 3).

*Лигазная шивка дуплексов А, Б и В с образованием структурного гена валиновой rPHK.* К смеси 0,48 нмоль дуплекса А, 0,40 нмоль дуплекса Б и 0,40 нмоль дуплекса В в 76 мкл воды прибавляли 10 мкл 10-кратного лигазного буфера (0,6 М трис-НСl (рН 7,6), 0,1 М MgCl<sub>2</sub> и 0,01 М дитиотреит) и смесь фрагментов денатурировали нагреванием до 80° С с последующим отжигом в течение 5 ч до 10° С. После прибавления 10 мкл 1 мМ АТР и 4 мкл (80 ед. акт.) Т4-ДНК-лигазы реакционную смесь инкубировали 4 ч при 10° С. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл 0,5 М EDTA и прогреванием 2 мин при 100° С, после чего проводили гель-фильтрацию на сефадексе G-75 в TES-буфере. Вещества, содержащиеся в первом пике, лиофильно высушивали и фосфорилировали с помощью [<sup>32</sup>P]АТР (2 нмоль, 2 мкКи) и Т4-полинуклеотидкиназы (3 ед. акт.) в стандартных условиях [4].

*Получение векторной ДНК для встраивания синтетического гена.* Смесь 15 мкг ДНК pBR322 и 20 ед. акт. HindIII в буфере, содержащем 6 мМ трис-НСl (рН 7,4), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит и 50 мМ NaCl, инкубировали 1 ч при 37° С, затем прибавляли 10-кратный EcoRI-буфер (0,4 М трис-НСl (рН 7,6), 0,1 М MgCl<sub>2</sub>, 0,01 М дитиотреит и 0,5 М NaCl) и 20 ед. акт. EcoRI и снова инкубировали 1 ч при 37° С. Далее к реакционной смеси прибавляли 5-кратный фосфатазный буфер (0,25 М трис-НСl (рН 8,9), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>), 35 ед. акт. ВАР и инкубировали 1 ч при 37° С. Инкубационную смесь трижды экстрагировали равным объемом фенола, насыщенного трис-НСl, рН 7,5, затем трижды эфиром, и смесь большого и малого фрагментов pBR322 осаждали спиртом из 0,3 М AcONa, центрифугировали и растворяли в 75 мкл TES-буфера. Часть ДНК (7,5 мкл) обрабатывали полинуклеотидкиназой и АТР, затем Т4-ДНК-лигазой (2 ед. акт., 16 ч при 6° С) и использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* HB101 [13] (100 мкл суспензии клеток в 0,1 М CaCl<sub>2</sub> с концентрацией ~0,5·10<sup>9</sup> клеток/мл; инкубация 50 мин при 0° С, 2 мин при 42° С, разбавление 5 мл УТ-бульона и инкубация 2 ч при 37° С).

Трансформанты высевали (аликвоты 0,1 мл) на 1,5% УТ-агар, содержащий ампициллин (150 мкг/мл) или ампициллин и тетрациклин (соответственно 150 и 20 мкг/мл). После 24 ч инкубации при 37°С на АрТс-среде было получено 5–7 колоний, а на Ар-среде — 40–60 колоний. В результате трансформации бактериальных клеток векторной ДНК, не обработанной киназой и лигазой, не наблюдается появления колоний, устойчивых к антибиотикам.

*Встраивание синтетического гена в векторную ДНК и клонирование.* Продукты лигазной шивки дуплексов А, Б и В (см. выше) растворяли в 20 мкл воды, прибавляли 10 мкл раствора векторной ДНК (2 мкг рВR322, обработанной *Hind*III, *Eco*RI и *ВАР*), 4 мкл 10-кратного лигазного буфера, 4 мкл 1 мМ АТФ, 2 мкл (4 ед. акт.) Т4-ДНК-лигазы и инкубировали 3 ч при 10°С. Затем прибавляли 12 мкл 1 мМ АТФ, 12 мкл 10-кратного лигазного буфера, 6 мкл (12 ед. акт.) лигазы и 90 мкл воды и инкубировали 16 ч при 10°С. Полученную реакционную смесь использовали для трансформации 100 мкл суспензии компетентных клеток *E. coli* HB101 (условия трансформации см. выше). При высеве части трансформированных клеток (0,1 мл из общего объема 5 мл) было получено более 250 Ар<sup>r</sup>-трансформантов; посев нетрансформированных бактериальных клеток в разведении 10<sup>-5</sup> на УТ-агар дал около 200 колоний, что соответствует эффективности трансформации 1,2·10<sup>-5</sup>. Реплики с Ар- на АрТс-чашки не дали Ар<sup>r</sup>Тс<sup>r</sup>-колоний.

*Анализ клонов и выделение рекомбинантной ДНК рEL17, содержащей синтетический ген валиновой тРНК<sub>1</sub> дрожжей.* Ар<sup>r</sup>Тс<sup>r</sup>-трансформанты выращивали при 37°С в 10 мл УТ-бульона, содержащего 150 мкг/мл ампицилина, 3–4 ч до  $A_{260}$  0,6–0,8, добавляли хлорамфеникол (170 мкг/мл) и продолжали инкубацию 16 ч. Из полученной биомассы плазмидную ДНК выделяли по методу [14] и анализировали по электрофоретической подвижности в 1% агарозном геле и по наличию единичных *Eco*RI- и *Hind*III-сайтов. Препаративное выделение ДНК из 1 л бактериальной культуры проводили тем же методом; при этом было показано, что относительное уменьшение реакционных объемов в 10–20 раз по сравнению с исходной методикой [14] не снижает выхода ДНК. После обработки РНКазой, депротенинизации смесью хлороформ–изоамиловый спирт (24:1) и осаждения спиртом ДНК выделяли гель-фильтрацией на колонке с биогелем А-5m (8 мг) в буфере, содержащем 0,5 М NaCl, 1 мМ EDTA, 10 мМ трис-HCl, pH 7,6. Далее ДНК осаждали спиртом; выход около 500 мкг. Эффективность трансформации *E. coli* HB101 (отбор по признаку Ар<sup>r</sup>) составила 2,8·10<sup>-3</sup> для ДНК рEL17 и 1,1·10<sup>-3</sup> для ДНК рВR322.

*Анализ первичной структуры клонированного гена тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup>.* Раствор 30 мкг (~11 пмоль) ДНК рEL17 и 50 ед. акт. *Eco*RI в 25 мкл *Eco*RI-буфера инкубировали 1 ч при 37°С и ДНК осаждали спиртом. Полученный препарат инкубировали 1 ч при 20°С в 50 мкл раствора, содержащего 40 пмоль (100 мкКи) [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP, 400 пмоль dTTP, 30 мМ трис-HCl (pH 7,6), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ DTT и 3 ед. акт. ДНК-полимеразы, после чего меченую ДНК выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50 (1 мл) в TEE-буфере. Первый пик концентрировали лиофилизацией в три раза, ДНК осаждали спиртом и инкубировали 1 ч при 37°С с 30 ед. акт. *Hind*III в 30 мкл буфера (см. выше). После осаждения ДНК растворяли в 10 мкл формамида, содержащего по 0,1% ксиленианола FF (ХС), бромфенолового синего (ВРВ) и оранжевого G (OG), и подвергали электрофорезу в 10% полиакриламидном геле в 7 М мочеvine. ДНК из соответствующей зоны (см. рис. 4) экстрагировали буфером, содержащим 0,5 М AcONH<sub>4</sub>, 10 мМ (AcO)<sub>2</sub>Mg, 0,1% SDS и 0,5 мМ EDTA, и осаждали спиртом в присутствии 80 мкг тРНК в качестве носителя. Полученный препарат анализировали модифицированным методом Максама–Гилберта [8–10], используя следующие реагенты: 1% Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в 50 мМ HCONH<sub>4</sub>, pH 3,5 (модификация по G, 4 мин при 20°С), 66% HCOOH (G+A, 8 мин), N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (C+T, 16 мин), N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O в 3 М NaCl и 0,25 М NaOH (C, 16 мин), см. рис. 5. Аналогично проводили гидролиз ДНК рEL17 рестриктазой *Hind*III и последующую достройку с помощью ДНК-полимеразы и [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP,



[ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP, dTTP и dATP. Малый меченый *EcoRI-HindIII*-фрагмент (рис. 4) выделяли электрофорезом после расщепления ДНК рестриктазой *EcoRI* и проводили анализ его первичной структуры методом Максама — Гилберта.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Берлин Ю. А., Лебедево Е. Н., Каюшин А. Л., Карпов В. А., Колосов М. Н. XII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, 1981. Рефераты докладов и сообщений, № 2, с. 119—120.
2. Khorana H. G. In: *Frontiers in Bioorganic Chemistry and Molecular Biology*/Eds. Ovchinnikov Yu. A., Kolosov M. N. Elsevier, 1979, p. 191—224.
3. Баев А. А., Венкстерн Т. В., Мирзабеков А. Д., Крутилина А. Л., Ли Л., Аксельрод В. Д. Молекулярн. биология, 1967, т. 1, № 5, с. 754—766.
4. Берлин Ю. А., Каюшин А. Л., Тактакишвили М. О., Лебедево Е. Н., Коробко В. Г., Чувпило С. А., Колосов М. Н. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 7, с. 1026—1036.
5. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353—371.
6. Sutcliff J. G. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1978, v. 43, p. 77—90.
7. Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tischer E., Rutter W. J., Goodman H. M. Science, 1977, v. 196, № 4296, p. 1313—1319.
8. Maxam A. M., Gilbert W. In: *Methods in Enzymology*/Eds Grossman L., Moldave K. New York — London: Acad. Press, 1980, v. 65, p. 499—560.
9. Коробко В. Г., Грачев С. А. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1420—1422.
10. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. Биоорган. химия, 1978, т. 4 № 9, с. 1281—1283.
11. Garen A., Levinthal C. Biochim. et biophys. acta, 1960, v. 38, № 2, p. 470—481.
12. Берлин Ю. А., Каюшин А. Л., Звонок Н. М., Якимов С. А., Колосов М. Н. Биоорган химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1793—1802.
13. Cohen S. N., Chang A. C. Y., Hsu L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 8, p. 2110—2114.
14. Birnboim H. C., Doly J. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 6, p. 1513—1523.
15. Jay E., Vambara R., Padmanabhan R., Wu R. Nucl. Acids Res., 1974, v. 1, № 3, p. 331—353.

Поступила в редакцию  
2.VIII.1982

#### THE CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS OF THE STRUCTURAL GENE CODING FOR THE YEAST tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub>

BERLIN Yu. A., LEBEDENKO E. N., KAYUSHIN A. L., KARPOV V. A.,  
KOLOSOV M. N.

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

Structural gene coding for the yeast tRNA<sup>Val</sup><sub>1</sub> has been synthesized and cloned in the pBR322 DNA.