



УДК 577.113.5

**СИНТЕЗ, КЛОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ
СТРУКТУРЫ ДНК, КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ мРНК ПРОЛАКТИНА
ИЗ ГИПОФИЗА ЧЕЛОВЕКА**

*Мертвецов Н. Ш., Головин С. Я., Зеленин С. М.,
Морозова Т. В., Каргинов В. А.*, Чехранова М. Б.**,
Бондарь А. А., Скобелыцина Л. М., Чесноков В. Н.,
Стефанович Л. Е., Панков Ю. А.***

*Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского
отделения Академии наук СССР;*

** Институт клинической и экспериментальной медицины Сибирского отделения
Академии медицинских наук СССР, Новосибирск;*

*** Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Пролактин является важным белковым гормоном млекопитающих [1]. По структуре и биологическим свойствам он имеет общие черты с гипофизарным гормоном роста (соматотропином) и плацентарным лактогеном [1–3]. Матричная РНК пролактина синтезируется в передней доле гипофиза млекопитающих и кодирует полипептид из 199 аминокислот [4–6]. Рядом авторов клонированы и секвенированы ДНК, комплементарные мРНК пролактина из гипофиза быка [7], крысы [8], из пролактиномы человека [3], определена структура генов пролактина быка [9] и крысы [2].

В представленной работе мы применили технику клонирования кДНК, позволяющую использовать при синтезе кДНК суммарную РНК клеток и существенно повышающую выход второй цепи кДНК при синтезе за счет последовательного введения в систему ревертазы и Кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I [10]. С помощью этой техники, используя препараты мРНК, выделенные из гипофиза и пролактиномы человека, мы осуществили клонирование и определение первичной структуры ДНК-копии мРНК пролактина человека.

Гипофизы человека получали как секционный материал из Московского городского НИИ скорой помощи им. П. В. Склифосовского МЗ СССР (Москва) через 12–24 ч и замораживали в жидком азоте. Опухолевый материал (пролактиному) получали из Института нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко. Тотальную РНК из гипофизов человека выделяли при помощи фенольной депротенинизации или центрифугированием лизированной ткани через подушку 5,7 М CsCl, а также осаждением 3 М LiCl в 8 М мочеvine [11]. РНК из пролактиномы человека выделяли по методу [12] с использованием 4 М гуанидилизотиоцианата.

poly(A)-содержащую РНК выделяли аффинной хроматографией на poly(U)-сефарозе 4В. Трансляцию poly(A)⁺-мРНК проводили в бесклеточной системе из ретикулоцитов кролика в присутствии [³⁵S]метионина [13]. Продукты трансляции poly(A)⁺-мРНК анализировали электрофорезом в 12,5% ПААГ с SDS с последующей радиофлуорографией [14]. Для идентификации пролактина человека на электрофореграммах использовали иммуопреципитацию пролактина специфическими антителами кролика на пролактин быка [15].

Антитела получали путем иммунизации кроликов высокоочищенным бычьим пролактином по стандартной схеме [15]. Использованный нами пролактин не содержал заметных белковых примесей и имел молекулярную массу 23 кДа, что соответствует литературным данным. О чистоте

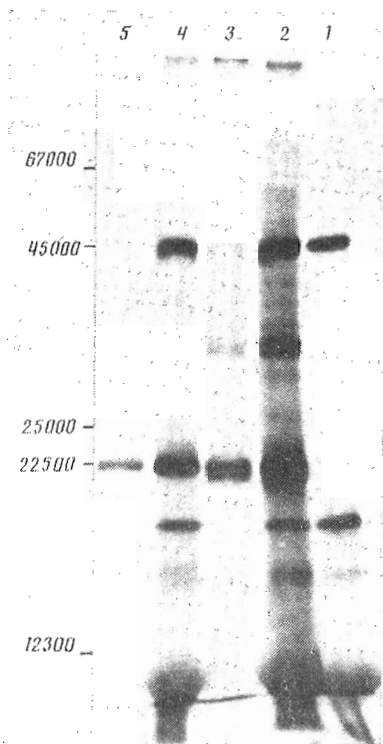


Рис. 1. SDS-электрофорез в ПААГ⁺ продуктов трансляции poly(A)⁺-мРНК, выделенной из интактной ткани гипофиза человека (2, 3) и пролактиномы человека (4, 5), в бесклеточной системе из ретикулоцитов кролика; гели 3, 5 получены после иммунопреципитации продуктов трансляции на геле антителами к пролактину. 1 – безматричный синтез; приведена молекулярная масса белков-свидетелей (сверху вниз): БСА, альбумин куриного яйца, химотрипсиноген А из поджелудочной железы быка, бычий пролактин, цитохром с лошади

препарата пролактина из гипофиза быка и полученных антител свидетельствует также образование единственной дуги преципитации в условиях двойной иммунодиффузии. По результатам анализа методом Гейдельбергера [15] 1 мл антисыворотки содержал 0,25 мг пролактиновых антител и преципитировал в зоне эквивалентности 32 мкг пролактина.

Специфическими антителами на пролактин из продуктов трансляции poly(A)⁺-мРНК из гипофиза человека и пролактиномы осаждается радиоактивно меченный полипептид с молекулярной массой 22 500, соответствующей молекулярной массе пролактина. На рис. 1 видно, что мРНК пролактиномы существенно обогащена специфической мРНК пролактина по сравнению с тканью интактного гипофиза человека.

Синтез одно- и двухцепочечных комплементарных ДНК проводили при помощи обратной транскриптазы AMV. Клонирование кДНК пролактина человека осуществляли по ранее опубликованной методике [10], используя для трансформации штамм *E. coli* JC 5183. Поиск клонов, содержащих кДНК пролактина, проводили путем гибридизации колоний *E. coli* с синтетическим олигонуклеотидом (5')ACSTTCTCAGAAATA, комплементарным участку мРНК пролактина.

Рестрикционный анализ выделенных гибридных плазмид показал наличие вставок размером 500–1000 п.о. Одна из гибридных плазмид, pHPr1 24 с размером вставки 900 п.о., использовалась для определения первичной структуры кДНК пролактина методом Максама – Гилберта [16] (рис. 2). Расшифрованная последовательность нуклеотидов кодирует аминокислотную последовательность пролактина, за исключением N-концевой последовательности из 16 аминокислот.

Определенная нами нуклеотидная последовательность кДНК пролактина человека из интактного гипофиза совпадает с последовательностью, опубликованной Кок и др. [3] для кДНК из пролактиномы человека; она обнаруживает замены в положениях 246 и 786 цепи матричной РНК (рис. 2). Выявленные замены нуклеотидов приходится на третьи положения кодонов и не вызывают замен в аминокислотной последовательности белка. Следует отметить также, что клонированная нами кДНК по сравнению с данными [3] имеет дополнительно 7 нуклеотидов на 3'-конце мРНК.

AspLeuPheAspArgAlaValValLeuSerHisTyrIleHisAspLeuSerSerGluMet GACCTGTTGACCGCGCCGTCGTCCTGTCCCACTACATCCA1AACC1CTCCTCAGAAATG	20 60
PheSerGluPheAspLysArgTyrThrHisGlyArgGlyPheIleThrLysAlaIleAsn TTCAGCGAATTCGATAAACGGTATACCCATGGCCGGGGTTCATTACCAAGGCCATCAAC	40 120
SerCysHisThrSerSerLeuAlaThrProGluAspLysGluGlnAlaGlnGlnMetAsn AGC1GCCACACTTCTTCCCTTGCCACCCCGAAGACAAGGAGCAAGCCCAACAGATGAAT	60 180
GlnLysAspPheLeuSerLeuIleValSerIleLeuArgSerFrpAsnGluProLeuTyr CAAAAAGACTTTCTGAGCCTGATAGTCAGCATATTACGATCCTGGAAATGAGCC1CTGAT	80 240
HisLeuValThrGluValArgGlyMetGlnGluAlaProGluAlaIleLeuSerLysAla CATCTGCTCACGGAAGTACGTGGTATGCAAGAAGCCCGGAGGCTATCCTATCCAAAGCT	100 300
ValGluIleGluGluGlnThrLysArgLeuLeuGluGlyMetGluLeuIleValSerGln GTAGAGATTGAGGAGCAAACCAAACGGCTTCTAGAGGGCATGGAGCTGATAGTCAGCCAG	120 360
ValHisProGluThrLysGluAsnGluIleTyrProValTrpSerGlyLeuProSerLeu TTCATCTCTGAAACCAAAGAAAATGAGATCTACCCTGTCTGGTCGGGACTCCATCCCTG	140 420
GlnMetAlaAspGluGluSerArgLeuSerAlaTyrTyrAsnLeuLeuHisCysLeuArg CAGATGGCTGATGAAGAGTCTCGCCTTTC1GCTTATTATAACCTGCTCCACTGCTTACGC	160 480
GlnMetAlaAspGluGluSerArgLeuSerAlaTyrTyrAsnLeuLeuHisCysLeuArg CAGATGGCTGATGAAGAGTCTCGCCTTTC1GCTTATTATAACCTGCTCCACTGCTTACGC	160 480
ArgAspSerHisLysIleAspAsnTyrLeuLysLeuLeuLysCysArgIleIleHisAsn AGGGATCACATAAAAATCGACAATATTCTCAAGCTCTGAAGTCCCGAATCATCCACAAC	180 540
AsnAsnCys *** AACAAC TGCTAAGCCSACATCCATTTCATCTA TTTCTGAGAAGGTCTTAAATGATCCGTT	600
CCATTGCAAGCTCTTTTAGTTGTATCTCTTTTGAATCCATGCTTGGGTGTAACAGGTCF	660
CCTCTTAAAAATAAAAAGTACTCCTTAGAGACATCAAAATCT - poly (A)	704

Ⓢ

Рис. 2. Первичная структура ДНК, комплементарной мРНК пролактина человека (секвенированный район). Сплошной линией подчеркнуты нуклеотиды, отсутствующие в опубликованной ранее [3] последовательности; приведены замены нуклеотидов в кДНК из пролактиномы [3]. Штриховой линией отмечен участок, комплементарный олигонуклеотидному зонду

Клонированная кДНК пролактина представляет существенный интерес как инструмент для молекулярной гибридизации при определении содержания специфической мРНК пролактина в тканях, а также как материал при конструировании бактериальных продуцентов — производных пролактина, применяемых в медико-биологических исследованиях.

Авторы статьи приносят благодарность С. Н. Федорову за предоставление биологических препаратов (пролактином), С. Х. Дегтяреву за предоставление ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова), А. С. Левиной за синтез олигонуклеотида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Graig R. L., Hall L. // Genetic Engng. 1983. V. 4. P. 57—125.
2. Chien Y.-H., Thompson B. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 8. P. 4583—4587.
3. Cooke N. E., Coit D., Shine J., Baxter J. D., Martial J. A. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 8. P. 4007—4016.
4. Teyssot B., Houdebine L.-M. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 110. № 1. P. 263—272.
5. Brennessel B. A., Biswas D. K. // Cell. Biol. 1980. V. 87. № 1. P. 6—13.
6. Stone R. T., Maurer R. A., Gorski J. // Biochemistry. 1977. V. 16. № 22. P. 4915—4921.
7. Nilson Y. H., Thomason A. R., Horowitz S., Sasavage N. L., Blenvis Y., Albers R., Salser W., Rottman F. M. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 7. P. 1561—1573.
8. Gubbins E. J., Maurer R. A., Hartley J. L., Donelson J. E. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 6. № 3. P. 915—930.
9. Camper S. A., Luek D. N., Yao Y., Woychik R. P., Goodwin R. G., Lyons R. H., Rottman F. M. // DNA. 1984. V. 3. № 3. P. 237—249.
10. Мерзляков Н. П., Головин С. Я., Беклемишев А. Б., Каргинов В. А., Мамаев Л. В., Скобеляцина Л. М., Зеленин С. М., Морозов И. В., Бондарь А. А., Панков Ю. А. // Биохимия. 1987. Т. 52. Вып. 5. С. 707—714.

11. *Auffray C., Rougeon F.* // Eur. J. Biochem. 1980. V. 107. № 1. P. 303–314.
12. *Ullrich A., Chirgwin J., Pictet R., Tischer E., Rutter W. J., Goodman H. M.* // Science. 1977. V. 196. № 4296. P. 1313–1319.
13. *Pelham H. R. S., Jackson R. J.* // Eur. J. Biochem. 1976. V. 67. № 1. P. 247–256.
14. *Laskey R. A., Mills A. D.* // Eur. J. Biochem. 1975. V. 56. № 2. P. 335–341.
15. *Гусев А. И.* Иммунохимический анализ/Ред. Зильбер Я. А. М.: Медицина, 1968. С. 99–117.
16. *Maxam A. M., Gilbert W.* // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.

Поступило в редакцию
27.II.1987
После доработки
3.VI.1987

**SYNTHESIS, CLONING AND SEQUENCING OF cDNA
COMPLEMENTARY TO mRNA OF PROLACTIN FROM
THE HUMAN PITUITARY GLAND**

MERTVETSOV N. P., GOLOVIN S. Y., ZELENIN S. M., MOROZOVA T. V.,
KARGINOV V. A.*, CHEKHRANOVA M. K.**, BONDAR A. A., SKOBEL'TSINA L. M.,
CHESNOKOV V. N., STEPHANOVICH L. E., PANKOV Y. A.**

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division
of the Academy of Sciences of the USSR: * Institute
of Experimental Endocrinology and Hormone Chemistry, Academy
of Medical Sciences of the USSR, Moscow: ** Institute of Clinical
and Experimental Medicine, Siberian Branch of the Academy
of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The poly(A)-containing mRNA from human pituitary and prolactinoma have been purified and translated in the cell-free system from rabbit reticulocytes. mRNA from prolactinoma was shown to be enriched with specific prolactin mRNA. DNA complementary to the prolactin mRNA from human pituitary was obtained and cloned. Sequencing of the 900 bp insert by the Maxam – Gilbert technique suggested the cDNA cloned to code for the previously published amino acid sequence, mismatches with mRNA from prolactinoma occurring at the third positions of codons and thus not causing amino acid substitutions.