



УДК 577.143.5/6

НОВЫЙ ПРАЙМЕР ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК, КЛОНИРОВАННЫХ В M13mp-ВЕКТОРАХ

Болдырев А. Н., Сияжков А. Н., Петренко В. А.

*Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Векторы серии M13mp [1], производные ДНК нитчатого фага M13, широко используются в работах по секвенированию ДНК [2], исследованию специфичности действия мутагенов [3, 4], при проведении локализованного мутагенеза [5, 6], при выяснении механизма индуцированного мутагенеза [7] и т. д.

При решении некоторых из этих задач возникает потребность в праймерах для секвенирования, которые отстояли бы от полилинкерной области ДНК дальше, чем обычно используемый для этой цели 17-звенный праймер [8] (рис. 1). Ранее предложенный 15-звенный праймер [9], отвечающий этому требованию, не всегда обеспечивает получение безупречной картины секвенирования, что связано с наличием двух возможных мест связывания этого олигонуклеотида в векторных ДНК [8]. Другие синтетические праймеры, являющиеся фрагментами 15- и 17-звенных праймеров [10], имеют те же недостатки.

Это побудило нас к поиску, а затем и синтезу нового универсального праймера, пригодного для секвенирования клонированных генов. Мы рассматривали также использовать этот праймер для выяснения роли этильных групп при мутагенезе, вызываемом триэфирными аналогами олигонуклеотидов [11].

При выборе олигонуклеотида в качестве праймера мы предлагаем два критерия: 1) олигонуклеотид должен содержать на своем 5'-конце сайт (пента-октануклеотид) какой-либо эндонуклеазы рестрикции; 2) температура плавления гибридного комплекса [12] матрица-праймер должна превышать температуру плавления других гибридов, образование которых возможно из-за присутствия того же сайта рестрикции в векторе в других позициях.

При выборе олигонуклеотида мы остановились на *EcoRII*(CCTGG)-сайте рестрикции, наиболее близком к полилинкерной области (рис. 1). Нами был осуществлен синтез тридекадезоксинуклеотида 5'CCAGGGTT-

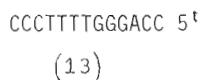
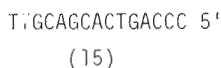
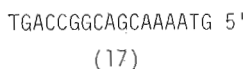
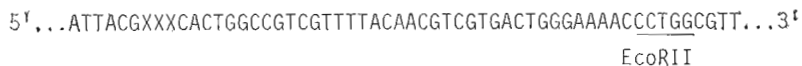


Рис. 1. Схема расположения универсальных праймеров для секвенирования с использованием векторов серии M13mp. XXX — полилинкерная область. Подчеркнут сайт узнавания рестриктазы *EcoRII*. Приведена структура праймеров (17) [8], (15) [19] и синтезированного нами (13)

ТТСССЗ' твердофазным фосфотриэфирным методом с наращиванием олигонуклеотидной цепи динуклеотидными блоками от 3'- к 5'-концу. В качестве носителя использовали полистирольный гель $s \times 2$, модифицированный карбоксильными группами [13].

Конденсирующим реагентом служила смесь 1-мезитилсульфонил-3-нитро-1,2,4-триазолида, калиевой соли 3-нитро-1,2,4-триазола и 18-краун-6 [14].

Как видно из рис. 1, ранее синтезированные [8, 9] праймеры располагаются ближе к 3'-концу полилинкерной области фаговой ДНК. Мы же 3'-конец нового праймера перенесли правее (см. рис. 1). Понятно, что такое перемещение не играет существенной роли, поскольку метод Сэнгера в настоящее время позволяет прочитывать в одном-двух гелях в среднем до 250–350 нуклеотидов.

Специфичность синтеза с помощью 13-звенного праймера была показана секвенированием ДНК, полученных по Сэнгеру на различных матрицах M13mp, как векторных, так и содержащих клонированные гены (рис. 2).

Так, с его помощью удалось исследовать широкий спектр превращений, индуцируемых олигонуклеотидами и их фосфотриэфирными аналогами в разработанной мутационной системе на основе ДНК фага M13 [11, 15]. Он также был использован для определения нуклеотидной последовательности транскрипционно слитого гена интерферона с геном Z' [16].

Мы надеемся, что синтезированный нами праймер (13) будет использован другими лабораториями в своих экспериментах.

Авторы выражают глубокую благодарность Л. Н. Семенову и Г. Ф. Сиволобовой за ценные критические замечания и конструктивные предложения при написании данной работы.

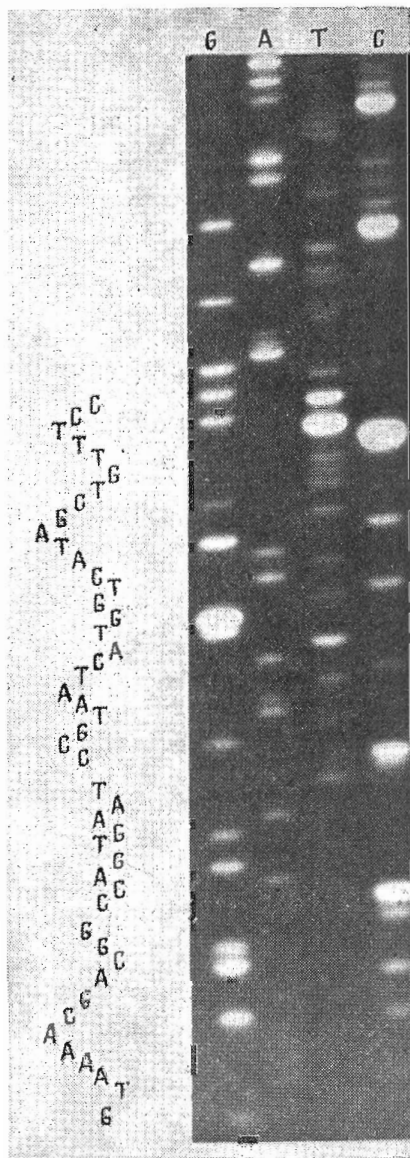


Рис. 2. Нуклеотидная последовательность прилегающей к 13-меру области векторной ДНК M13mp1

ЛИТЕРАТУРА

1. Norrander J., Kempe T., Messing J. *Gene*, 1983, v. 26, № 1, p. 101–106.
2. Sanger F., Coulson A. R., Barrell B. G., Smith A. J. H., Roe B. A. *J. Mol. Biol.*, 1980, v. 143, № 2, p. 161–178.
3. Demopoulos N., Davies R. W., Scazzocchio C. *FEBS Lett.*, 1982, v. 146, № 2, p. 376–380.
4. Петренко В. А., Семенова Л. Н., Болдырев А. Н., Киприянов С. М. *Молекул. генетика, микробиол. и вирусол.*, 1985, № 12, с. 19–25.
5. Zoller M. J., Smith M. *Meth. Enzymol.*, 1983, v. 100, p. 468–500.
6. Петренко В. А., Сиволобова Г. Ф., Семенова Л. Н., Болдырев А. Н., Каргинов В. А., Гуторов В. В. *Молекул. генетика, микробиол. и вирусол.*, 1985, № 8, с. 38–44.
7. Петренко В. А., Татъянов С. И., Болдырев А. Н., Семенова Л. Н., Сиволобова Г. Ф., Каргинов В. А. *Докл. АН СССР*, 1986, т. 290, № 1, с. 249–253.
8. Duckworth M. L., Gait M. J., Goelet P., Hong G. F., Singh M., Titmas R. C. *Nucl. Acids Res.*, 1981, v. 9, № 7, p. 1691–1706.
9. Messing J., Crea R., Seeberg P. H. *Nucl. Acids Res.*, 1981, v. 9, № 2, p. 309–321.
10. Lau P. C. K., Spencer J. H. *Bioscience reports*, 1982, v. 2, № 9, p. 687–696.

11. Петренко В. А., Поздняков П. И., Киприянов С. М., Болдырев А. Н., Семенова Л. Н., Сиволобова Г. Ф. Биорган. химия, 1986, т. 12, № 8, с. 1088–1100.
12. Wallace R. B., Johnson P. F., Tanaka T., Schödl M., Itakura K., Abelson J. Science, 1980, v. 209, № 4463, p. 1396–1400.
13. Сinyaков А. Н., Ломакин А. И., Попов С. Г. Биорган. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 68–74.
14. А. с. № 1265196 (СССР). Способ твердофазного синтеза дезоксиолигонуклеотидов/Сinyaков А. Н., Карпышев Н. Н. Заявл. 27.11.85, № 3850742/23-04. Оpubл. в Б. И., 1986, № 39, с. 69.
15. Петренко В. А., Семенова Л. Н., Сиволобова Г. Ф., Гуторов В. В., Каргинов В. А. Докл. АН СССР, 1985, т. 281, № 2, с. 476–481.
16. Петренко В. А., Татъков С. И., Сиволобова Г. Ф., Болдырев А. Н., Колокольцов А. А., Ерочкин А. М., Куличков В. А. Биорган. химия, 1987, т. 13, № 2, с. 259–262.

Поступило в редакцию
31.VII.1986

A NEW PRIMER FOR SEQUENCING DNA FRAGMENTS CLONED INTO M13mp VEHICLES

BOLDYREV A. N., SINYAKOV A. N., PETRENKO Y. A.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo,
Novosibirsk Region*

Tridecadeoxyribonucleotide d(CCAGGGTTTCCC) was prepared by solid phase crown-ether-catalyzed phosphotriester method and proposed as a new sequencing primer. This primer expands capacities of the Sanger dideoxy-chain-terminating method to solve various sequencing problems as compared to well-known universal primers. Criteria of the choice of an oligonucleotide primer without computer analysis of nucleotide sequence are described.