



УДК 547.963.32.057

УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МЕТОД  
СИНТЕЗА ПРОТЯЖЕННЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК*Кобец М. Л., Ривкин М. И., Вогачев В. С.,  
Гумарев В. П.**Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск*

Описан простой и экономичный метод ферментативной сборки протяженного двуцепочечного фрагмента ДНК. Одноцепочечный полинуклеотид длиной 122 н.о., представляющий собой фрагмент синтетического гена  $\beta$ -интерферона человека, был собран из двух синтетических 36-звенных и 50-звенного полинуклеотидов на четырех 12-звенных олигодезокси-нуклеотидах комплементарной цепи. Вторая цепь полученного фрагмента была построена с помощью ДНК-полимеразы I и 12-звенной затравки, комплементарной его 3'-концу. Полученный дуплекс был клонирован в плазмидном векторе pBR322, и его структура подтверждена секвенированием.

Химико-ферментативный синтез протяженных фрагментов ДНК продолжает оставаться трудоемкой задачей, несмотря на существенные успехи в химическом синтезе олигонуклеотидов. Это связано с многостадийностью процесса ферментативной сборки олигонуклеотидов, возможностью побочных реакций, сложностями препаративного разделения продуктов лигирования. Стратегия химико-ферментативного синтеза, предложенная Кораной и сотр. [1], предусматривает химический синтез олигонуклеотидов, составляющих обе цепи фрагмента ДНК, отжиг комплементарных олигонуклеотидов и их последующее многостадийное лигирование. Разработка подходов, не требующих синтеза фрагментов комплементарной цепи, т. е. синтез лишь одной из цепей, могла бы существенно упростить сборку и уменьшить объем работы по химическому синтезу.

К настоящему времени описано два химико-ферментативных метода синтеза двуспиральных ДНК через одноцепочечные продукты [2, 3]. Метод Росси и сотр. [2] предусматривает химический синтез полинуклеотидов, имеющих 9–10-звенное перекрытие по 3'-концам, и последующую застройку комплементарных цепей с помощью фрагмента Кленова. При таком подходе достигается значительная экономия в синтезе. Метод, описанный в работе Коробко В. Г. и сотр. [3], состоит в раздельном лигировании обеих цепей из синтетических олигонуклеотидов и их гибридизации, что упрощает сборку, но не дает существенной экономии в синтезе.

В настоящей работе на примере химико-ферментативного синтеза фрагмента гена  $\beta$ -интерферона человека описан метод сборки протяженного одноцепочечного фрагмента ДНК с помощью коротких олигонуклеотидов комплементарной цепи, что позволяет существенно сократить количество необходимых для сборки синтетических олигонуклеотидов. Получаемые таким образом одноцепочечные фрагменты ДНК могут быть использованы непосредственно для молекулярного клонирования [4] или предварительно превращены в двуцепочечные с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli*, как описано в настоящей работе.

Последовательность нуклеотидов синтетического фрагмента, кодирующего аминокислотные остатки 73–102 зрелого  $\beta$ -интерферона человека [5], приведена на рис. 1а. Фрагмент был разбит на 12-звенные и один 14-звенный олигонуклеотиды, которые были синтезированы химически и затем сшиты с помощью ДНК-лигазы в одноцепочечные полинуклеотиды длиной 50 и 36 звеньев (I, Ia, II, III) (рис. 1б).

а

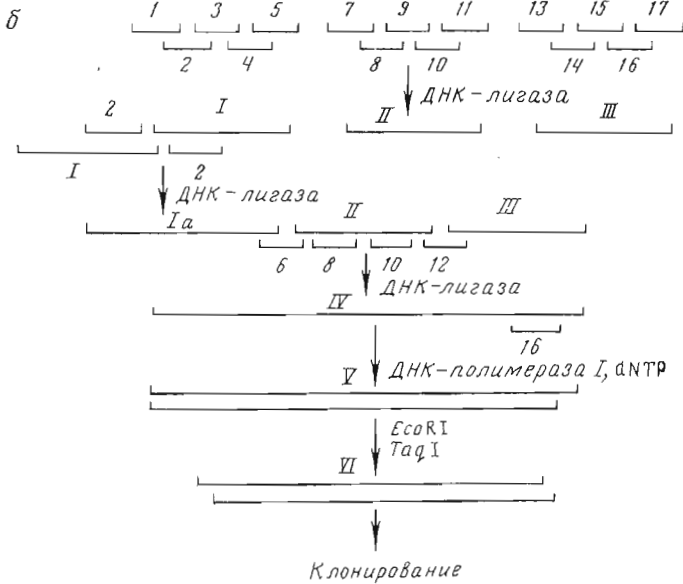
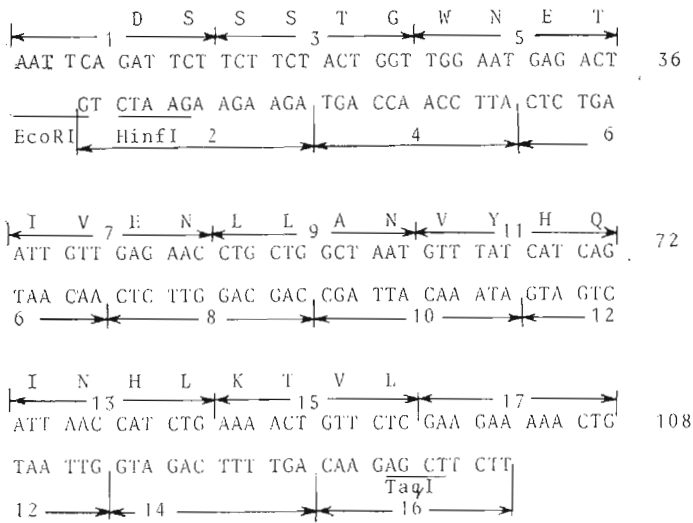


Рис. 1. Структура (а) и схема сборки (б) фрагмента синтетического гена  $\beta$ -интерферона человека. Арабскими цифрами обозначены химически синтезированные олигонуклеотиды, римскими — промежуточные продукты ферментативной сборки

Полиуклеотиды (I)–(III) были использованы как исходные для демонстрации двух приемов сшивки протяженного одноцепочечного полиуклеотида на коротких стыкующих фрагментах комплементарной цепи. Сборка двуспиральных фрагментов из синтетических олигонуклеотидов проводится обычно через образование двуспиральной структуры с шпиками, которые репарируются затем ДНК-лигазой. Было интересно установить, насколько существенно влияет на этот процесс совершенство структуры дуплекса, т. е. какой набор компонентов одной цепи достаточен для сшивки другой цепи. С этой целью была проведена оценка выхода лигирующего модельного фрагмента длиной 108 н.о. при разных вариантах использования олигонуклеотидов комплементарной цепи.

В первом варианте полиуклеотиды (I)–(III) длиной 36 н.о. обрабатывались ДНК-лигазой в присутствии олигонуклеотидов 6 и 12, а во втором — в присутствии олигонуклеотидов 6, 8, 10 и 12, которые служи-

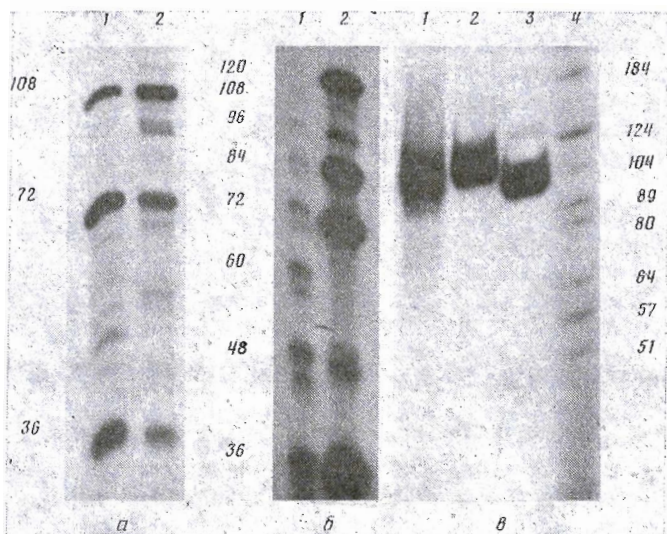


Рис. 2. Электрофоретический анализ продуктов ферментативной сборки фрагмента гена  $\beta$ -интерферона. а — разделение в 10% ПААГ с 7 М мочевиной продуктов лигирования полинуклеотидов (I)–(III) на олигонуклеотидах (6), (12) и (6), (8), (10), (12) (1 и 2 соответственно) с образованием модельного одноцепочечного полинуклеотида длиной 108 н.о. б — разделение в 10% ПААГ с 7 М мочевиной продуктов лигирования фрагмента (IV) — 2; 1 — продукты полимеризации 12-звенного олигонуклеотида (маркер), в — разделение в 10% ПААГ продуктов обработки фрагмента (V) рестриктазами *TaqI* (1) и *EcoRI* (2); 2 — исходный дуплекс, 4 — *BspRI*-гидролизат ДНК плазмиды pBR322 (маркер)

ли в качестве стыкующих фрагментов, или так называемых штифтов. Эти олигонуклеотиды были использованы без предварительной хроматографической очистки и без кинирования. Оказалось (рис. 2а), что продукт длиной 108 н.о. есть при обоих вариантах сшивки, хотя, как и следовало ожидать, выход повышается с  $\sim 1$  до  $\sim 12\%$ , если нижняя цепь заполнена без промежуточных результатов были получены нами и при лигировании более длинного модельного полинуклеотида длиной 144 н.о. из четырех 36-звенных полинуклеотидов на трех (первый вариант, с промежутками) или семи (второй вариант) додекануклеотидах, однако выход продукта был при этом  $\sim 0,1$  и  $\sim 2-3\%$  соответственно.

Очевидно, что успех в использовании этого приема зависит от способности сшиваемых одноцепочечных олигонуклеотидов образовывать вторичные структуры. Особенно это существенно для первого варианта, когда длинные полинуклеотиды собираются на коротких стыкующих «штифтах». Наличие вторичной структуры в местах взаимодействия со «штифтами» должно мешать сборке. В полинуклеотидах (I)–(III) коцевые участки не вовлекаются в образование стабильных вторичных структур, поэтому 1%-ный выход реакции лигирования для данного конкретного случая, по-видимому, близок к максимальному. Не исключено, однако, что оптимизация условий реакции или незначительное изменение длины штифтов существенно увеличат выход. Для клонирования достаточно 5–50 пмоль фрагмента, который можно использовать как в одноцепочечном виде, так и после превращения его в двуцепочечный. Таким образом, эти эксперименты показали, что для лигирования достаточно длинных одноцепочечных фрагментов ДНК не требуется полный набор олигонуклеотидов комплементарной цепи, что позволяет существенно сократить объем работы по химическому синтезу.

Одна из цепей фрагмента гена  $\beta$ -интерферона длиной 122 н.о. была получена из 50-звенного и двух 36-звенных полинуклеотидов (Iа), (II) и (III) (рис. 1б–IV). С целью получения максимального выхода был выбран второй вариант сшивки с заполнением комплементарной цепи без промежутков. В результате лигирования с последующим электрофорезом

этот полинуклеотид был получен с выходом 12% (рис. 2б). На следующем этапе этот полинуклеотид был использован в качестве матрицы при застройке комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы I и 12-звенной затравки, комплементарной 3'-концу.

На рис. 2в приведены данные анализа полученного застройкой дуплекса (V) длиной 122/116 нуклеотидов. Видно, что полученный продукт имеет ожидаемую длину и содержит сайты расщепления для рестриктаз *EcoRI* и *TaqI*, расположенные на концах фрагмента в соответствии с запланированной структурой. Следует отметить, что образующаяся на конце 122-звенного полинуклеотида (IV) совершенная шпилька, по-видимому, не препятствует работе ДНК-полимеразы, так как в противном случае не восстанавливался бы сайт рестриктазы *EcoRI*, расположенный на расстоянии 14 н.о. от 5'-конца матрицы и вовлекаемый в эту структуру.

Фрагмент длиной 95/93 н.п., полученный после обработки полинуклеотида (V) рестриктазами *EcoRI* и *TaqI*, был клонирован в pBR322 по *EcoRI*- и *Clal*-сайтам. Колонии с фенотипом Tc<sup>s</sup> и Ap<sup>r</sup> анализировали гибридизацией с <sup>32</sup>P-меченым 24-звенным олигонуклеотидом. 74% клонов давали положительный сигнал при гибридизации. Плазмидная ДНК из двух произвольно выбранных клонов была охарактеризована рестрикционным анализом, и оказалось, что обе гибридные плазмиды несут вставку нужных размеров.

Определение последовательности ДНК-вставок, проведенное по обеим цепям, показало, что фрагмент одного из клонов имел структуру, соответствующую запланированной, а во фрагменте второго клона была обнаружена вставка А·Т-пары в положение 6 и замена С·G на G·С-пару в положении 72 (рис. 1а). Объяснить происхождение этих перестроек довольно затруднительно, можно лишь отметить, что в обоих случаях изменение структуры обнаружено в последовательности TCAGATT. Клон с правильной структурой фрагмента был использован при сборке полного гена β-интерферона человека [6].

Получаемые описанным методом одноцепочечные полинуклеотиды могут быть непосредственно использованы для клонирования, как описано ранее [4]. Однако очевидно, что требования к очистке синтетических олигонуклеотидов, из которых собирается одноцепочечный полинуклеотид, в этом случае очень высоки. С другой стороны, эти полинуклеотиды могут быть предварительно превращены в двуцепочечные с помощью ДНК-полимеразы I, как описано в настоящей работе. Кроме упрощения клонирования эта процедура, по-видимому, дополнительно очищает синтетические фрагменты, так как известно, что по крайней мере некоторые химические модификации препятствуют работе ДНК-полимеразы [7]. Вполне вероятно, что с помощью этого подхода окажется возможным конструирование фрагментов ДНК значительно большей длины, чем описано в настоящем сообщении.

Авторы благодарят Л. В. Баранову, Н. В. Амирханова, Л. В. Обухову, С. И. Вершинину, В. В. Гулевича за помощь в синтезе олигонуклеотидов.

### Экспериментальная часть

В работе были использованы ферменты производства НИКТИ БАВ (Бердск); рестриктазы *HinfI* и *TaqI*, T4-полинуклеотидкиназа любезно предоставлены П. М. Чумаковым, В. Г. Коробко и В. И. Рыбаковым. Клонирование, обработку рестриктазами, трансформацию, выделение и секвенирование ДНК плазмид проводили как описано в работе [8]. 12-Звенные олигонуклеотиды синтезировали модифицированным фосфоритриэфирным методом [9].

36-Звенные полинуклеотиды (I)–(III) получали лигированием 5'-фосфорилированных 12-звенных олигонуклеотидов (по 5 нмоль) в 250 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 7,6), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ дитиотреит, 0,5 мМ АТФ в присутствии 12 ед. акт. ДНК-лигазы фага T4 в течение 14 ч при 10° С (I и II) и 20° С (III). Здесь и далее нужные меченые соединения выделяли препаративным гель-электрофорезом с последующей электроэлюцией (выход 30–40%).

Для получения 50-звенного полинуклеотида (Ia) по 0,5 нмоль полинуклеотида (I) и олигонуклеотида (2) обрабатывали 20 ед. акт. ДНК-лигазы в 50 мкл лигазного буфера 14 ч при 10° С. Выход 60%.

Сшивку фрагмента (IV) длиной 122 п.о. из полинуклеотидов (Ia), (II) и (III) (по 0,2 нмоль) проводили на четырех 12-звенных комплементарных олигонуклеотидах (6, 8, 10 и 12) (по 0,2 нмоль), которые также были фосфорилированы к сшивке, но не фосфорилированы, в 100 мкл буфера для лигирования в присутствии 20 ед. акт. ДНК-лигазы при 10° С в течение 24 ч. Выход 19%.

При получении двуцепочечного фрагмента (V) для ферментативной достройки второй цепи использовали 20 нмоль фрагмента (IV) и 1 нмоль олигонуклеотида (16) в качестве затравки. Реакцию проводили в 40 мкл 50 мМ трис-HCl-буфера (pH 7,6), содержащего 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит, 0,1 мМ dNTP в присутствии 2 ед. акт. ДНК-полимеразы 1. Далее смесь обрабатывали фенолом и хроматографировали на биогеле P-6. Полученный дуплекс (V) обрабатывали рестриктазами *EcoRI* и *TaqI*, фенолом, хроматографировали на биогеле P-6 и лигировали с 0,5 мкг плазмиды pBR322, обработанной *EcoRI* и *ClaI*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Khorana H. G., Büchi H., Caruthers M. H., Chang S. H., Gupta N. K., Kumar A., Ohtsuka E., Sgarbetta V., Weber H. // Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. V. 33. N. Y.: Cold Spring Harbor, 1968. P. 35-44.
2. Rossi J. J., Kierzek R., Huang T., Walker P. A., Itakura K. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 16. P. 9226-9229.
3. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Северцова И. В., Колосов М. Н. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. № 5. С. 1250-1253.
4. Амирханов Н. В., Кузнецов К. Д., Ривкин М. И., Кумарев В. П. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 9. С. 1283-1285.
5. Taniguchi T., Ohno S., Fujii-Koriyama Y., Muramatsu M. // Gene. 1980. V. 10. № 1. P. 11-15.
6. Кумарев В. П., Ривкин М. И., Амирханов Н. В., Баранова Л. В., Богачев В. С., Кобец М. Л., Ошевский С. И., Обухова Л. В., Рыбаков В. И., Кузнецов К. Д., Вершинина С. И., Гулевич В. В. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 290. № 1. С. 244-248.
7. Ide H., Kow J. D., Wallace S. S. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 22. P. 8035-8052.
8. Маннати Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. // Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984.
9. Кумарев В. П., Баранова Л. В., Богачев В. С., Лебедев А. В., Обухова Л. В. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 10. С. 1348-1358.

Поступила в редакцию  
20.III.1987

#### AN IMPROVED METHOD OF THE LONG DNA SEGMENT SYNTHESIS

KOBETS M. L., RIVKIN M. I., BOGACHEV V. S., KUMAREV V. P.

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Academy of Sciences  
of the USSR, Novosibirsk*

A simple and economy method of the biochemical assembling of long double-stranded DNA segments is described. A single-stranded polydeoxynucleotide 122 bases long representing a fragment of synthetic gene of human  $\beta$ -interferon was assembled from three synthetic fragments 36 (two) and 50 bases long on four complementary 12-mers as templates. This single-stranded polynucleotide was converted, in the presence of DNA polymerase 1 and a 12-meric primer, in to the full-length double-stranded DNA (the  $\beta$ -interferon gene segment). It was cloned into an *E. coli* plasmid vector pBR322 and its sequence confirmed.