



УДК 577.213.7

ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ И КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА АНГИОГЕНИНА ЧЕЛОВЕКА В СОСТАВЕ ФАГА M13mp8

Коваленко С. П., Горн В. В. *, Каргинов В. А. **, Морозов И. В. *, Зарытова В. Ф. *, Мертвецов Н. П. *

Институт терапии Сибирского отделения
Академии медицинских наук СССР, Новосибирск;

*Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР;

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

На основе опубликованной аминокислотной последовательности ангиогенина человека с использованием кодонов активно экспрессирующихся генов *E. coli* была выведена нуклеотидная последовательность гена ангиогенина. Последовательность разделили на три блока для клонирования и на 43 олигонуклеотида для синтеза. Олигонуклеотиды синтезировали на автоматическом синтезаторе, лигировали в блоки, блоки последовательно клонировали в фаге M13mp8. Первичная структура ДНК проклонированного фрагмента, кодирующего человеческий ангиогенин, была подтверждена методом Сенгера.

Ангиогенин — белок, индуцирующий формирование сосудов *in vivo*, был впервые обнаружен среди белков, секретлируемых клетками человеческой карциномы [1]. Компьютерный анализ аминокислотной последовательности ангиогенина [2] и соответствующей последовательности ДНК [3] выявили его значительную гомологию с панкреатическими рибонуклеазами млекопитающих. Ангиогенин расщепляет 18S и 28S субъединицы рибосомы на крупные фрагменты, однако не действует на целый ряд РНК, расщепляемых панкреатическими рибонуклеазами [4]. Близость аминокислотных последовательностей ангиогенина и панкреатической рибонуклеазы и их различная субстратная специфичность делают ангиогенин привлекательной моделью для изучения связи между структурной организацией и специфичностью фермента. С другой стороны, ангиогенные свойства белка могут быть использованы для лечения целого ряда заболеваний, связанных с нарушением или задержкой неоваскуляризации, для заживления ран, ожогов, язв [5].

С целью получения достаточных для биохимических и медико-биологических исследований количеств белка нами ведутся работы по получению генно-инженерного продуцента ангиогенина. В настоящем сообщении описан химико-ферментативный синтез структурного гена ангиогенина человека и его клонирование в составе флага M13mp8.

Аминокислотная последовательность ангиогенина [2] была трансформирована в последовательность ДНК с использованием кодонов, наиболее часто встречающихся в интенсивно экспрессирующихся генах *E. coli* [6]. Несколько кодонов были заменены на синонимичные, с тем чтобы ввести в последовательность сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции и удалить образовавшиеся инвертированные повторы длиной 6 и более пар оснований. Удаление инвертированных повторов уменьшает вероятность образования шпилечных структур в молекуле мРНК ангиогенина и, следовательно, вероятность возникновения стерических препятствий на мРНК для белоксинтезирующего аппарата при экспрессии гена ангиогенина в *E. coli*.

Для правильной инициации трансляции перед первым кодоном ангиогенина ввели кодон АТГ, после С-концевого триплета ССГ — термини-

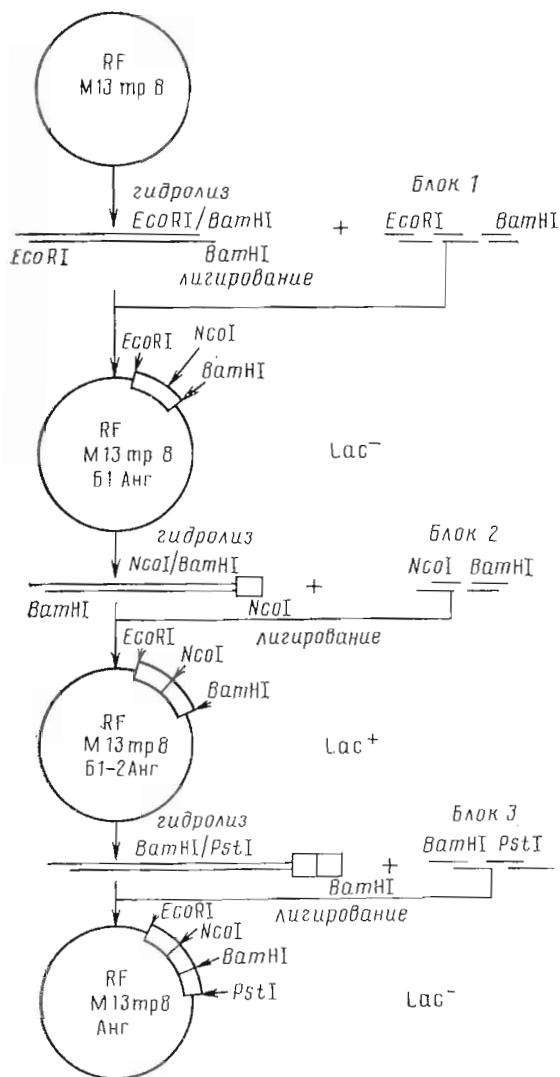


Рис. 1. Стратегия сборки гена ангиогенина (Ang)

рующие трансляцию кодоны TAA и TGA. Поскольку клонировать ген ангиогенина в полилишкере фага M13mp8 было запланировано по частям, полученная последовательность ДНК была разбита на три блока введением сайтов *NcoI* и *BamHI* в кодирующую часть гена. Кроме того, в начале кодирующей части гена был введен сайт *XhoI*, в конце — сайт *SalGI*, а вся последовательность фланкирована сайтами *EcoRI* и *PstI*. Рестрикционные сайты вводили без изменения аминокислотной последовательности ангиогенина.

Для удобства сборки гена из блоков была принята схема, при которой клонирование первого блока в фаге M13mp8 по сайтам *EcoRI* — *BamHI* приводит к преждевременной терминации α -пептида, кодируемого фрагментом гена *lacZ¹* фага M13. В результате на индикаторном газоне JM103 наряду с синими бляшками, образованными исходным фагом, появятся белые бляшки, образованные фагами, несущими вставку. Клонирование вслед за первым блоком второго по сайтам *NcoI* — *BamHI* восстанавливает рамку гена *lacZ¹* M13mp8, что делает вполне вероятным появление синих бляшек, образованных фагами, несущими 1-й и 2-й блоки. Клонирование 3-го блока по сайтам *BamHI* — *PstI* вновь приводит к терминации трансляции до начала функционально значимой части α -пептида, а значит, и бляшки, образованные фагом, несущим все три блока гена ангиогенина, не будут иметь окраски на индикаторном газоне JM103 (рис. 1).



Рис. 2. Нуклеотидная последовательность блоков для сборки гена ангиогенина. Стрелками обозначены химически синтезированные олигонуклеотиды, квадратными скобками — сшиваемые фрагменты блоков. Над нуклеотидной последовательностью приведена аминокислотная последовательность, обозначены сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции и сайты клонирования блоков в векторе. Блок 1 — олигонуклеотиды 1—18, блок 2 — олигонуклеотиды 19—30, блок 3 — олигонуклеотиды 31—43

Таким образом, присоединение каждого следующего блока к предыдущему можно контролировать фенотипически, что значительно упрощает работу по сборке целого гена из блоков.

Разбивка каждого блока на олигонуклеотиды проводилась с использованием любезно предоставленной А. Е. Никулиным (ВНИИ МБ) программы, обеспечивающей разбиение блока на олигонуклеотиды так, что минимизируется энергия формирования незапланированных дуплексов, а значит, и количество побочных продуктов реакции лигазной сшивки олигонуклеотидов. Все расчеты по поиску инвертированных последовательностей в гене ангиогенина и по оптимальному разбиению последовательности на олигонуклеотиды проводились на машинах ГПВЦ СО АН СССР.

Полная структура гена ангиогенина с разбивкой на блоки для клонирования, на фрагменты для лигазной сшивки и на олигонуклеотиды для синтеза приведена на рис. 2.

43 олигонуклеотида длиной от 15 до 22 звеньев были синтезированы на серийном отечественном автоматическом синтезаторе «Виктория-4М» производства СКТБ спецэлектроники и автоматического приборостроения

СО АН СССР с использованием фосфитамидного метода [7]. После завершения синтеза и удаления всех защитных групп, кроме 5'-концевой диметокситритильной, продукт выделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, удаляли диметокситритильную группу и рехроматографировали на колонке с обращенно-фазовым носителем [8].

Синтезированные олигонуклеотиды 5'-фосфорилировали с помощью полинуклеотидкиназы, смешивали в эквимольных количествах для сшивки фрагментов блоков и лигировали с помощью ДНК-лигазы фага Т4. Каждая цепь фрагмента блока сшивалась отдельно, как описано в [9], продукты реакции разделяли в полиакриламидном геле, образовавшиеся фрагменты ДНК выделяли электроолюцией. Цепи фрагментов блоков смешивали в эквимольных количествах и лигировали с предварительно подготовленным вектором. При клонировании блока 1 были отобраны фаги, дающие белые бляшки, при клонировании блока 2 — фаги, дающие синие бляшки, и при клонировании блока 3 — вновь фаги, дающие белые бляшки на индикаторном газоне JM103. Наличие вставки в фаге на каждом этапе подтверждали гибридизацией с соответствующими исходными олигонуклеотидами. Первичные структуры ДНК гибридных фагов анализировали методом Сенгера [10] после сборки полноразмерного гена. В качестве праймеров наряду с универсальным 17-членным [10] использовали олигонуклеотиды, синтезированные ранее для сборки структурной части гена ангиогенина (олигонуклеотиды 38, 30, 22, 14 — рис. 2). Это позволило с большей надежностью устанавливать структуру анализируемых фрагментов.

При секвенировании ДНК двух гибридных фагов было обнаружено, что в одном случае гибридный фаг содержит синтезированный ген ангиогенина человека, структура которого полностью соответствует запланированной. В ДНК второго фага структурный ген содержал замену пары С·G на Т·А в позиции 208, что приводит к замене аминокислоты Gly⁶⁷ на Lys.

Таким образом, осуществлен химико-ферментативный синтез фрагмента ДНК длиной 389 нуклеотидных пар, кодирующего полную аминокислотную последовательность ангиогенина. Наличие сайтов *Xho*I в начале и *Sal*GI в конце кодирующей части фрагмента дает широкий спектр возможностей для экспериментов по экспрессии гена в различных системах. Фрагмент проклонирован в фаге M13mp8, что позволяет изучать структурно-функциональную организацию ангиогенина методом олигонуклеотиднаправленного мутагенеза [11].

Авторы выражают благодарность А. Е. Никудину за предоставленную программу разбиения последовательности ДНК на олигонуклеотиды, С. Х. Дегтяреву за препарат высокоочищенной рестриктазы *Nco*I, А. В. Бондарю за помощь в работе.

Экспериментальная часть

В работе использовали *E. coli* JM103, бактериофаг M13mp8, рестриктазы (КФ 3.1.23. х) *Eco*RI, *Bam*HI, *Pst*I, ДНК-лигазу фага Т4 (КФ 6.5.1.1), ДНК-полимеразу А (КФ 2.7.7.7; ИПО «Фермент», Вильнюс); dNTP, ddNTP, изопропил-β-D-тиогаалактозид (IPTG), 5-броминидоксил-3-β-D-галактопиранозид (Y-Cal) (НИКТИ БАВ, Бердск). Рестриктаза *Nco*I получена от С. Х. Дегтярева (НИКТИ БАВ, Бердск).

Методики выполнения экспериментов (условия обработки ДНК различными ферментами, электрофоретическое разделение фрагментов ДНК, трансфекция клеток *E. coli*, выделение одно- и двуцепочечных фаговых ДНК, анализ нуклеотидной последовательности ДНК) см. в работах [10, 12].

Синтез олигонуклеотидов. Для автоматического синтеза олигонуклеотидов в качестве мономеров использовали 5'-О-диметокситритил-N-ацилдезоксинуклеотид-3'-(Р-метил, динизопропиламидо)фосфиты, полученные согласно методу [5]; тетразол (Fluka) сублимировали при 120° С/1 мм рт. ст.; ацетонитрил (ч) и хлористый метилен (ч) перегоняли последовательно над P₂O₅ и СаН₂. Для синтеза каждого олигонуклеотида использовали 30 мг полимера (CPG — 500 А, Fluka) с емкостью по присоединенному нуклеозиду 30—40 мкмоль/г. Время одного цикла наращивания цепи составляло 9 мин. Обращенно-фазовую хроматографию синтезированных олигонуклеотидов проводили с использованием хроматографа Altex-332 (США) на колонках (4,6 × 250 мм) с Lichrosorb RP-18. После двухкратной хроматографии выход продукта составлял 200—1000 мкг, средний выход на стадию в расчете на выделенный продукт 88—92%.

Лигирование олигонуклеотидов. Для сшивки верхней цепи фрагмента 1 блока 1 (рис. 2) смесь олигонуклеотидов 3 и 5 (по 2 нмоль каждого) инкубировали 15 мин при 37° С с 1 — 10 мкКи [γ -³²P]АТР и 10 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы в 50 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂ и 5 мМ дитиотреит. Затем добавляли АТР до конечной концентрации 0,7 мМ и инкубировали еще 15 мин при 37° С. После этого смесь прогревали 5 мин при 70° С, охлаждали до 20° С, добавляли по 2 нмоль олигонуклеотидов 1, 2, 4, 6 и 90 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т4 и инкубировали 4—8 ч при 14° С. Реакцию останавливали прогреванием смеси 5 мин при 65° С, после чего ДНК осаждали этанолом, растворяли в 15 мкл 50% формамида и наносили на 15% ПААГ с 7 М мочевиной. Электрофорез проводили 2—3 ч при 1500 В, после чего гель радиоавтографировали. Аналогично проводили сшивку нижней цепи фрагмента, а также сшивку цепей других фрагментов.

Выделение фрагментов ДНК из геля. По результатам радиоавтографии определяли местоположение продукта реакции лигазной сшивки в полиакриламидном геле. Полоску геля, содержащую соответствующий фрагмент, вырезали, ДНК из геля извлекали электроолицией на бумагу DE-81 (Whatman) и смывали 100 мкл 1 М NaCl. ДНК осаждали этанолом, растворяли в 20 мкл воды и использовали для дальнейших манипуляций.

Сшивка блоков и клонирование. Цепи фрагментов 1—3 блока 1 (по 5 пкмоль каждой цепи) инкубировали 30 мин при 37° С в 20 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит и 0,7 мМ АТР, в присутствии 10 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы. Затем смесь прогревали 5 мин при 70° С, охлаждали до 20° С, добавляли 1 мкг ДНК фага M13mp8 (RF-форма), предварительно гидролизованной рестриктазами EcoRI и BamHI. К смеси добавляли 20 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т4 и инкубировали 16 ч при 8° С. Аликвоту смеси использовали для трансфекции *E. coli*. Аналогично клонировали блоки 2 и 3, используя каждый раз в качестве вектора рекомбинантный фаг, полученный в предшествующем клонировании (см. рис. 1). Изменение цвета колоний фагов на индикаторном газоне *E. coli* при клонировании каждого блока всякий раз свидетельствовало о появлении новых рекомбинантных клонов (рис. 1). При каждом клонировании получали 5—20% рекомбинантных фагов.

Гибридизация с олигонуклеотидными зондами. Отобранные по измененной окраске колоний фаги рассевали до отдельных колоний, чтобы исключить примеси исходных фагов. После рассева отдельные колонии фагов помещали в пробирки с 5 мл среды YT × 2 [10], добавляли 50 мкл экспоненциальной культуры *E. coli* JM103 и встряхивали 5 ч при 37° С. Клетки отделяли центрифугированием, по 1 мкл супернатанта наносили на нитроцеллюлозные фильтры, фильтры высушивали на воздухе и готовили далее как описано в работе [12]. Предгибридизацию проводили при 42° С в растворе, содержащем 0,2% SDS, 6 × SSC, 1 × раствор Денхардта [12], 50 мкг/мл ДНК из моллюсков лососа. Гибридизация с ³²P-меченым олигонуклеотидом проводили 2 ч при 42° С в том же растворе с добавлением зонда до (0,3—3) · 10⁶ имп · мин⁻¹ · мл⁻¹. Фильтр отмывали 4 раза по 10 мин 5 × SSC при 20° С и 1 раз 30 мин 4 × SSC при 42° С. Фильтр высушивали и экспонировали 1—10 ч с усиливающим экраном ЭУВ 3. 90—95% проанализированных клонов при клонировании блоков 1 и 3 и 100% при клонировании блока 2 эффективно гибридизовались с соответствующими олигонуклеотидами. Из супернатантов, содержащих положительно гибридизующиеся клоны, осаждали фаги [10], выделяли одноцепочечную ДНК и анализировали ее структуру по методу Сэнгера [10] в соответствии с прописью фирмы Amersham.

Во время подготовки статьи к публикации появилось сообщение о химико-ферментативном синтезе и экспрессии гена ангиогенина в *E. coli* [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Fett J. W., Strydom D. J., Lobb R. R., Alderman E. M., Bethune J. L., Riordan J. F., Vallee B. L. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. № 20. P. 5480—5486.
2. Strydom D. J., Fett J. M., Lobb R. R., Alderman E. M., Bethune J. L., Riordan J. F., Vallee B. L. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. № 20. P. 5486—5494.
3. Kurachi K., Davie E. W., Strydom D. J., Riordan J. F., Vallee B. L. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. № 20. P. 5494—5499.
4. Shapiro R., Riordan J. F., Vallee B. L. // *Biochemistry*. 1986. V. 25. № 12. P. 3527—3532.
5. Folkman J., Klagsbrun M. // *Science*. 1987. V. 235. № 4787. P. 442—447.
6. Maruyama T., Gojobori T., Aota Sh., Ikemura T. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14 Suppl. P. 151—197.
7. Грязнов С. М., Горн В. В., Зарытова В. Ф. и др. // *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук*. 1987. Вып. 1. № 2. С. 119—123.
8. Adams S. P., Kavka K. S., Wykes E. J., Holder S. B., Galluppi G. R. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1983. V. 105. № 3. P. 661—663.
9. Коробко В. Г., Добрыню В. И., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Шингарова Л. Н., Чувило С. А., Филиппова Л. Ю., Звонок Н. М., Васильева Т. Е., Колосов М. П. // *Биоорган. химия*. 1987. Т. 13. № 1. С. 69—81.
10. Sanger F., Niblen S., Coulson A. R. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. № 12. P. 5463—5467.
11. Carter P. // *Biochem. J.* 1986. V. 237. № 1. P. 1—7.
12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэлбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1987.
13. Denèfle P., Kovarik S., Guittou J.-D. et al. // *Gene*. 1987. V. 56. № 1. P. 61—70.

Получила в редакцию
13.XI.1987

CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS OF THE SYNTHETIC GENE
CODING FOR HUMAN ANGIOGENIN AND ITS CLONING
IN M13mp8 PHAGE

KOVALENKO S. P., GORN V. V.*, KARGINOV V. A.**
MOROZOV I. V.*, ZARYTOVA V. F.*, MERTVETSOV N. P.*

*Institute of Therapy, Siberian Division of the Academy of Medical Sciences
of the USSR; * Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry,
Siberian Division of the Academy of Sciences of the USSR; ** Institute
of Clinical and Experimental Medicine, Siberian Division of the
Academy of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The nucleotide sequence coding for human angiogenin has been deduced from the published amino acid sequence with the use of codons preferentially utilized in highly expressed *E. coli* genes. It was divided into forty-three oligonucleotides, which were synthesized by automatic gene assembler and then joined by DNA ligase into three double-stranded blocks, the blocks were consequently cloned and ligated in M13mp8 phage, and the resultant 389-bp DNA sequence coding for human angiogenin was analysed by chain-terminator sequencing technique.