



ИЗЪЕМ РЕДАКТОРУ

УДК 575.224.4

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНА α -ИНТЕРФЕРОНА СВИНЬИ МЕТОДОМ ОДНОВРЕМЕННОГО НАПРАВЛЕННОГО МНОГОТОЧЕЧНОГО МУТАГЕНЕЗА

*Чернов Н. П., Ростопшиов В. М., Ажикина Т. Л.,
Бородин А. М.*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

Ранее нами был предложен метод одновременного направленного многоточечного мутагенеза, при помощи которого был получен ген γ -интерферона быка на основе гена γ -интерферона человека [1]. В данной работе этот метод применен для получения гена α -интерферона свиньи из гена $\alpha 2$ -интерферона человека. Длина кодирующей части гена α -интерферона человека составляет 498 н.о., свиньи — 501 (степень гомологии 80,4%), соответствующие белки различаются 52 аминокислотами (степень гомологии 68,9%) [2].

Хотя различия в аминокислотных последовательностях довольно существенны, вырожденность генетического кода позволяет запланировать синтез такой пуклеотидной исследователности кодирующей α -интерферон свиньи, которая гомологична кДНК $\alpha 2$ -интерферона человека на 87,5%.

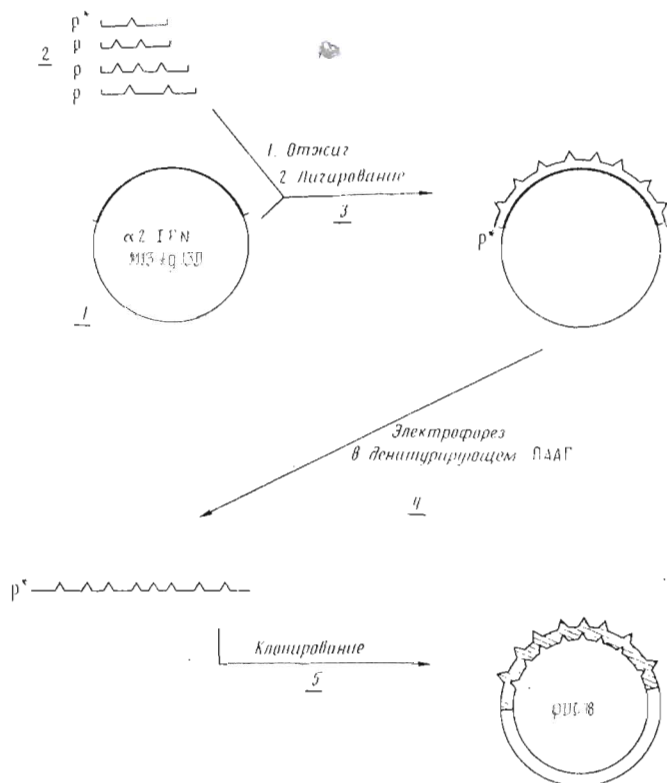


Рис. 1. Схема получения гена α -интерферона свиньи из гена $\alpha 2$ -интерферона человека. Подчеркнутые цифры соответствуют пунктам в схеме, приведенной в тексте

```

2.1 MetCysAspLeuProGlnThrHisSerLeuAlaHisThrArgAlaLeuArgLeuLeuAlaGln
1.1aattcATGTGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGCTCACACCAGGGCCTTGAGGCTCCTGGCAGAG
1.2 *****G*AG*AGG*:*A*:*T*****
2.2 GlySerArg Thr Met

2.1 MetArgArgIleSerProPheSerCysLeuAspHisArgArgAspPheGlySerProHisGluAla
1.1 ATGAGGAGAATCTCTCCTTTCTCTGCTTGGACCACAGACGTGACTTTGGATCTCCCATGAGGCC
1.2 *****A*****T*****A*G*:*A*:*T*****G*:*A*
2.2 Lys Leu AsnAsp His Phe Gln Asp

2.1 PheGlyGlyAsnGlnValGlnLysAlaGlnAlaMetAlaLeuValHisGluMetLeuGlnGlnThr
1.1 TTTGGGGGCAACCAGGTCCAAAGGCTCAAGCCATGGCTCTCGTCCATCAGATGCTCCAGCAGACC
1.2 *** *****G*A*CC*G*C*:*A*:*T*
2.2 GluThrIleProValLeu Ile Ile

1.2 PheGlnLeuPheSerThrGluGlySerAlaAlaAlaTrpAsnGluSerLeuLeuHisGlnPhe
1.1 TTCCAGCTCTTCAGCACAGAGGGCTCAGCTGCTGCTTGAATGAGAGCCTCTACACCAATTC
1.2 ***A*T*****A**A**T*****G*:*C*:*G*:*A*
2.2 Asn LysAsp Ser Asp Thr AspLys

1.2 TyrThrGlyLeuAspGlnGlnLeuArgAspLeuGluAlaCysValMetGlnGluAlaGlyLeu
1.1 TACACTGGACTCGACCAGCAGCTGAGGGACCTGGAAGCCTGTGTGATGCAGGAGGGGGGCTG
1.2 *****A**T*****AT*****A*G*:*T*G*
2.2 Glu Tyr Asn Ile Gly Val Val

1.2 GluGlyThrProLeuLeuGluGluAspSerIleArgAlaValArgLysTyrPheHisArgLeu
1.1 GAAGGGACTCCCTGCTGGAGGAGGATCCCATTCGGGCTGTGAGGAAATACTTCCACAGACTC
1.2 AC*A*****A**A*****T*****G*:*A*
2.2 ThrGlu MetLys Leu Gln Ile

1.2 ThrLeuTyrLeuGlnGluLysSerTyrSerProCysAlaTrpGluIleValArgAlaGluVal
1.1 ACTCTCTATCTGCAAGAGAAGAGCTACAGCCCTTGTGCTGGGAGATTGTGAGAGCAGAAGTC
1.2 *****A*****AA*****G*
2.2 Lys Lys Val Ile

1.2 MetArgSerPheSerSerSerArgAsnLeuGlnAspArgLeuArgLysLysGluTer
1.1 ATGAGATCTTTTCTTCGTCAAGAACTTGCAGACAGATTAAGAAAGAAGGAATGAggatcctgca
1.2 *****T*****TC*****A*T*****GT*****
2.2 Leu Ser GluSer Ser

```

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность (1.1) синтетического гена α -интерферона свиньи и кодируемая им аминокислотная последовательность (2.1). Нуклеотидная (1.2) и аминокислотная (2.2) последовательности гена α 2-интерферона человека. В последовательности гена α 2-интерферона человека указаны только нуклеотиды, отличающиеся от запланированной последовательности α -интерферона свиньи, одинаковые для обоих генов нуклеотиды указаны звездочками в аминокислотной последовательности α 2-интерферона человека (2.2) приведены только аминокислотные остатки, отличающиеся от соответствующих аминокислотных остатков α -интерферона свиньи. Вертикальные черточки между нуклеотидными звеньями указывают границы синтезированных олигонуклеотидов

Схема получения клонированного гена α -интерферона свиньи состоит из следующих этапов (рис. 1):

- 1) клонирование исходного гена в фазе M13,
- 2) синтез олигонуклеотидов, составляющих значащую цепь гена α -интерферона свиньи, комплементарную клонированной цепи гена α 2-интерферона человека,

- 3) лигирование синтетических олигонуклеотидов с использованием клоноированной цепи гена $\alpha 2$ -интерферона человека в качестве матрицы,
- 4) выделение лигированной цепи α -интерферона свиньи,
- 5) клонирование полученного одноцепочечного фрагмента в составе вектора, предварительно обработанного рестриктазами, одна из которых дает выступающий 5'-, а другая — 3'-конец.

Для увеличения степени комплементарности между олигонуклеотидами и матрицей в последовательность синтетического гена введены нейтральные замены. В целях облегчения анализа клонированных последовательностей, а также для возможности сборки гена из нескольких фрагментов ДНК, в структурную часть гена α -интерферона свиньи введены сайты рестрикции. Для интеграции гена в экспрессирующие векторы на 5'- и 3'-концах запланированы сайты рестриктаз *EcoRI* и *PstI*.

Последовательность гена α -интерферона свиньи разбивалась на олигонуклеотиды таким образом, чтобы на их 5'- и 3'-концах было не менее 2 нуклеотидов, комплементарных матрице.

В результате планирования кодирующая цепь гена α -интерферона свиньи собиралась из 14 олигонуклеотидов длиной от 26 до 52 нуклеотидов, комплементарных матрице на 75–92% (рис. 2).

Синтез олигонуклеотидов проводили фосфитамидным методом на сконструированном в нашей лаборатории полуавтоматическом синтезаторе. Очистку полностью деблокированных олигонуклеотидов осуществляли при помощи гель-электрофореза в денатурирующем ПААГ. Очищенные олигонуклеотиды фосфорилировали с помощью полинуклеотидкиназы фаза Т4. Лигирование всех олигонуклеотидов осуществляли в один прием. В качестве матрицы использовали ген $\alpha 2$ -интерферона человека, содержащийся в однонитевом фаге М13.

В процессе работы были оптимизированы условия отжига и лигирования олигонуклеотидов на частично комплементарной матрице. Показано, что отжиг эффективно проходит при понижении температуры с 65 до 20°С в течение 2 ч; максимальная эффективность лигирования достигается за 2 ч. Увеличение времени лигирования не приводило к заметному увеличению количества полинуклеотидной цепи. Полноразмерную цепь гена α -интерферона свиньи выделяли при помощи электрофореза в ПААГ.

Были изучены различные варианты клонирования одноцепочечных синтетических фрагментов. Клонирование полноразмерной цепи в векторе рUC18 проводили как с использованием коротких олигонуклеотидов, которые после отжига давали на 3'- и 5'-концах клолируемой цепи липкие концы, отвечающие сайтам рестрикции соответствующих рестриктаз, так и без них. Достройка второй цепи фрагментом Клепова ДНК полимеразы *E. coli* не приводила к повышению эффективности клолирования.

Анализ рекомбинантных клонов осуществляли секвенированием ДНК по методу Сэнгера [3, 4]. Было проанализировано 6 из 48 клонов, давших положительный сигнал при гибридизации с соответствующим олигонуклеотидом, 3 из которых содержали запланированную последовательность. Нуклеотидная последовательность синтетического гена отличается от природной (рис. 2), однако кодируемая им аминокислотная последовательность полностью соответствует α -интерферону свиньи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Росташов В. М., Чернов И. П., Ажикина Т. Л., Свердлов Е. Д. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 295. № 4. С. 1016–1020.
2. Lefevre F., la Bonnardiere C. // J. Interferon Res. 1986. V. 6. № 4. P. 349–360.
3. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
4. Бородин А. М., Данилкович А. В., Чернов И. П., Ажикина Т. Л., Росташов В. М., Моисеуская Г. С. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1179–1182.

Поступило в редакцию
6.V.1989

APPLICATION OF SIMULTANEOUS MULTIDIRECTED MUTAGENESIS
IN OBTAINING THE PIG α -INTERFERONE GENE

CHERNOV I. P., ROSTAPSHOV V. M., AZHIKINA T. L., BORODIN A. M.

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

A method of obtaining the pig α -interferon gene by means of simultaneous multidirected mutagenesis of the human $\alpha 2$ -interferon gene is presented. Nucleotide homology between these genes is 80,4%. Fourteen synthetic oligonucleotides forming a pig α -interferon gene's strand were ligated on a single-stranded template, carrying a cDNA of the human $\alpha 2$ -interferon gene. The obtained DNA fragment was cloned in the single-stranded or double-stranded form. It was found that the method does not affect the cloning efficiency. The primary structure of the gene was confirmed by sequencing.