



УДК 577.214.3

СИНТЕЗ РНК С ПОМОЩЬЮ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ФАГА Т7: ТРАНСКРИПЦИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ДНК-МАТРИЦ В РАСТВОРЕ И НА ПОЛИМЕРНОМ НОСИТЕЛЕ

*Ёлов А. А., Волков Е. М., Рейнтамм Т. Г.,
Ореукая Т. С., Шабарова З. А.*

*Химический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

Для синтеза олигорибонуклеотидов заданной последовательности была осуществлена транскрипция синтетических ДНК РНК-полимеразой фага Т7. Обнаружена способность этого фермента транскрибировать ДНК-матрицу, иммобилизованную на гидразид-сефарозе. Показано, что для сборки ДНК-матриц, используемых при таком синтезе, одинаково применимы как фермент ДНК-лигаза, так и химическое лигирование с помощью бромциана.

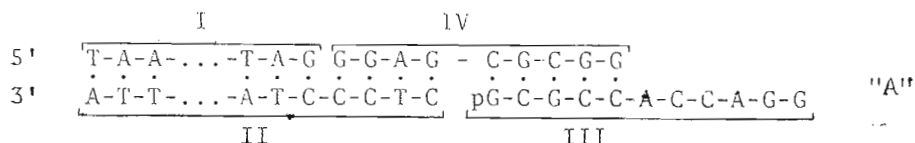
Для решения ряда задач молекулярной биологии и биотехнологии необходим синтез препаративных количеств РНК заданной структуры. Одним из путей решения этой проблемы может быть применение для такого синтеза РНК-полимеразы фага Т7. Этот фермент, для которого получены эффективные продуценты [1], способен многократно и высокоспецифично копировать как фрагменты ДНК, встроенные в специально сконструированные плазмиды [2], так и относительно короткие синтетические ДНК, содержащие промоторный участок. Использование последних экспериментально намного проще и позволяет получать препаративные (до 20 мг) количества заданных РНК с минимальным числом дополнительных нуклеотидных звеньев на концах [3]. Необходимые для этого ДНК-матрицы, если их длина превышает возможности синтеза на автоматах-синтезаторах и хроматографической очистки, можно получать путем сборки из более коротких фрагментов с помощью Т4-ДНК-лигазы или химических конденсирующих агентов [4, 5]. Вопрос о применимости таких методов для конструирования ДНК-матриц для РНК-полимеразы Т7 рассмотрен в данной работе. Кроме того, была изучена способность этого фермента транскрибировать ДНК, ковалентно закрепленные на твердом носителе. Известно, что иммобилизованные ДНК эффективно вступают в реакции, катализируемые ДНК-полимеразой I, ДНК-лигазой и рестриктазами [6]. На наш взгляд, транскрипция иммобилизованной ДНК РНК-полимеразой Т7 может послужить основой для создания нового технологического метода синтеза заданных РНК.

Конструирование ДНК-матриц для РНК-полимеразы Т7

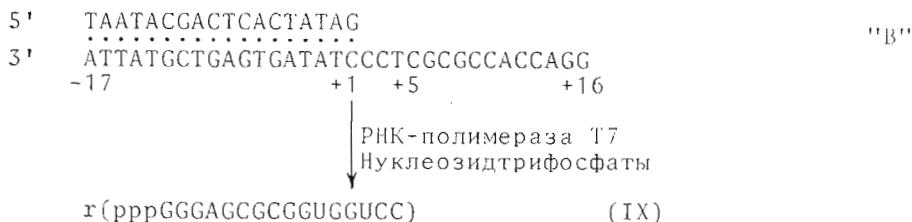
ДНК-матрицы для РНК-полимеразы Т7 получали путем сборки из синтетических олигодезоксирибонуклеотидов (I—VII). Фрагменты ТААТА-СГАСТСАСТАТАГ* (I) и СТСССТАТАГТГГАГТСГТАТТА (II) соответствуют двум цепям промотора РНК-полимеразы Т7 [2, 3]. С помощью этих олигонуклеотидов и фрагментов (III—VII) были сконструированы три ДНК-матрицы. Для получения одной из них («В») было проведено химическое лигирование фрагментов (II) и (III) в составе комплементарного

* Префикс «d» (дезокс) для простоты опущен. Для олигорибонуклеотидов используется индекс «r» (рибо).

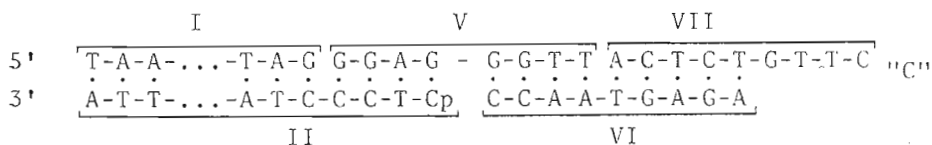
комплекса «А»:



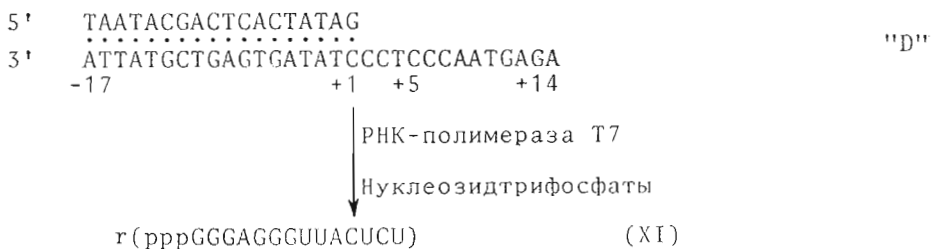
33-Звенный продукт конденсации олигодезоксинуклеотидов (II) и (III) — GGACCACCGCGCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA (VIII) совместно с (I) образует ДНК-матрицу «В», содержащую промоторный (-17...+5) и транскрибируемый (+1...+16) участки. Такие ДНК-матрицы эффективно копируются РНК-полимеразой T7 [2, 3]. Ожидаемый продукт транскрипции этим ферментом матрицы «В» (IX) является фрагментом 5S РНК *E. coli*:



Аналогичным образом с использованием олигодезоксинуклеотида AGGACCACCGCGp (IIIa) получали матрицу «В₁», отличающуюся от «В» тем, что ее нижняя цепь удлинена на одно dA-звено с 5'-конца. 17-Звенный транскрипт этой матрицы r(pppGGGAGCGCGGUGGUCCU) (IXa) через окисление 3'-концевого rU-звена [7] может быть превращен в 3'-фосфорилированный аналог олигорибонуклеотида (IX). Кроме того, в составе комплекса «С»



была проведена конденсация фрагмента (II) с фрагментом (VI) T4-ДНК-лигазой. Продукт этой конденсации AGAGTAAACCTCCCTATAGTGAGT-CGTATTA (X) совместно с олигодезоксинуклеотидом (I) также образует ДНК-матрицу для РНК-полимеразы T7:



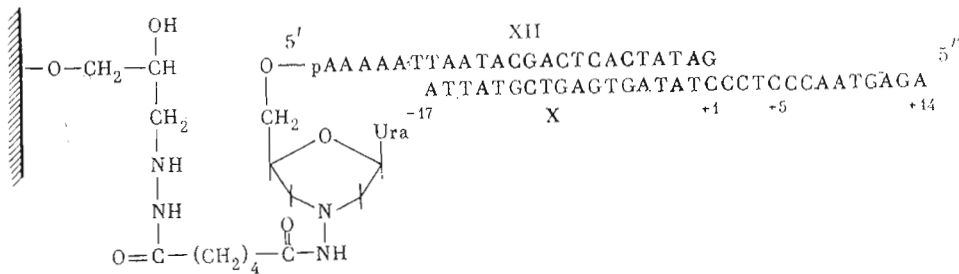
Химическое лигирование в комплексе «А» проводили по методу [5] с использованием бромциана как конденсирующего агента. Преимуществом последнего по сравнению с использовавшимся ранее водорастворимым карбодиимидом [4, 8] является быстрота реакции (высокий, более чем 90%, выход продукта достигается менее чем за 1 мин) и отсутствие модификации оснований ДНК [5]. При проведении конденсации олигонуклеотидов (II) и (III) в составе комплекса «А» выход продукта (VIII) составлял 50%. Аналогичным образом конденсацией олигодезоксинуклеоти-

дов (II) и (IIIa) был получен 34-звенный фрагмент AGGACCACCGCGCT·CCSTATAGTGAGTTCGTATTA (VIIIa).

Ферментативное лигирование олигонуклеотидов (II) и (VI) в составе комплекса «С» проводили по методу [8]. Продукт (X) образуется с выходом около 90%, причем выход снижается до 50–60%, если в комплексе отсутствует фрагмент (VII), а при отсутствии фрагмента (I) продукт (X) вообще не образуется. Аналогичным образом было проведено ферментативное лигирование олигонуклеотидов (II) и (III) в составе комплекса «А» (предварительно олигонуклеотид (III) был обработан фосфоноэстеразой для удаления 3'-концевой фосфатной группы). Выход продукта (VIII) составил в этом случае около 50%, как и при рассмотренном выше химическом лигировании. Продукты (VIII), (VIIIa) и (X) были выделены гель-электрофорезом, а их первичная структура была подтверждена секвенированием по методу Максама – Гилберта в твердофазном варианте [9].

ДНК-матрицы «В», «В₁» и «D» получали путем смешивания соответственно фрагментов (VIII), (VIIIa) и (X) с фрагментом (I) непосредственно перед проведением полимеразной реакции. Для формирования дву-тяжкового промоторного участка, по-видимому, не обязательен рекомендуемый авторами [3] отжиг смеси двух цепей при 65°С. Проведение этого отжига не повышает эффективность транскрипции.

Для получения ДНК-матрицы, иммобилизованной на полимерном носителе, был синтезирован олигонуклеотид rU(5'→5')d(AAAAТТААТА·CGACTCAСТАТАG) (XII). Данный фрагмент после окисления rU-звена путем конденсации образовавшегося диальдегида с гидразидными группами носителя [10] с последующим восстановлением образовавшегося аддукта борогидридом натрия [11] был ковалентно закреплен на гидразид-сефарозе. Полученный таким образом полимер-олигонуклеотид способен к комплементарным взаимодействиям с фрагментом (X) (или VIII), при этом образуется иммобилизованная ДНК-матрица, пригодная для транскрипции с помощью РНК-полимеразы T7:



Транскрипция синтетических ДНК

Все синтезированные ДНК-матрицы в растворе эффективно транскрибировались РНК-полимеразой T7 в условиях, аналогичных описанным в литературе [2, 3]. Как видно из рис. 1 и 2, в результате РНК-полимеразной реакции образуется целевой продукт – 16-звенный (IX) при использовании матрицы «В», 17-звенный (IXa) – при использовании «В₁» и 14-звенный (XI) для «D». В каждом случае дополнительно образуются продукты, удлиненные на 1–2 звена, и короткие побочные продукты длиной от 2 до 8 звеньев, что соответствует литературным данным [3]. Для анализа и выделения продуктов РНК-полимеразных реакций применяли помимо гель-электрофореза ион-парную хроматографию (рис. 3). Первичную структуру очищенных целевых продуктов (IX) и (XI) подтверждали с помощью химического метода секвенирования [12].

Изучение транскрипции синтезированных ДНК-матриц РНК-полимеразой T7 показало, что матрица «В» транскрибируется одинаково эффективно и с образованием одинаковых продуктов независимо от того, химическое или ферментативное лигирование было использовано при ее син-



Рис. 1

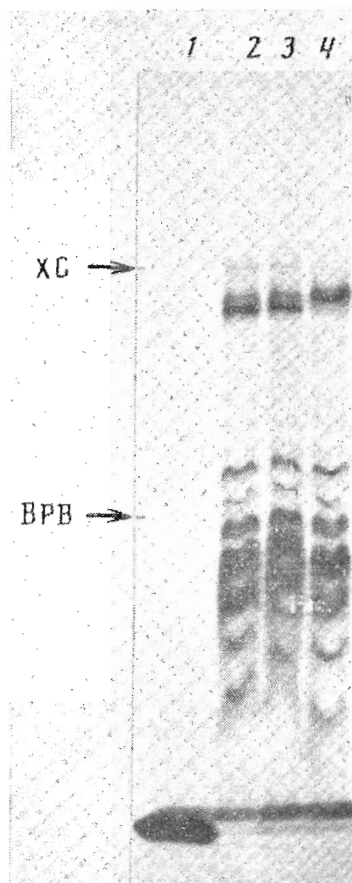


Рис. 2

Рис. 1. Радиоавтограф электрофореза продуктов транскрипции РНК-полимеразой Т7 ДНК-матриц «D» (2) и «B» (3) в денатурирующем 20% полиакриламидном геле. 1 — смесь до обработки ферментом. Для обеих матриц реакционная смесь содержала 400 нМ ДНК, 68 мкг/мл фермента, по 1 мМ АТФ, ГТФ, УТФ и СТР (последний взят в смеси с $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{СТР}$). Время реакции 1 ч, 37° С. ХС и ВРВ — положение красителей-маркеров ксиленицианола FF и бромфенолового синего соответственно

Рис. 2. Радиоавтограф электрофореза продуктов транскрипции РНК-полимеразой Т7 ДНК-матрицы «B», полученной химическим (2) и ферментативным (3) лигированием, а также ДНК-матрицы «B₁» (4). 1 — смесь до обработки ферментом. Условия реакции и анализа приведены в подписи к рис. 1

тезе (рис. 2). Это свидетельствует о том, что оба типа лигирования одинаково применимы при сборке ДНК-матриц для РНК-полимеразы Т7. Данный результат указывает на возможность проведения крупномасштабных синтезов как коротких, так и протяженных РНК заданной последовательности без использования трудоемких гено-инженерных методов при конструировании ДНК-матриц. Отметим также, что указанный результат является подтверждением того, что в результате химического лигирования, как и при ДНК-лигазной реакции, образуются немодифицированные ДНК, пригодные для использования в системе транскрипции.

Нами был обнаружен ряд особенностей протекания рассматриваемой полимеразной реакции. Привлекает внимание сильное различие выходов целевых транскриптов: около 40 РНК-копий (IX) и около 240 РНК-копий (XI) на молекулу ДНК-матрицы «B» или «D» соответственно. Концентрации последних, при которых достигаются эти выходы, также оказались различными: соответственно 390 и 80 нМ. Аналогичные данные для разных ДНК-матриц приводятся и в литературе [3]. Отметим также, что количество коротких побочных продуктов по сравнению с целевым продуктом

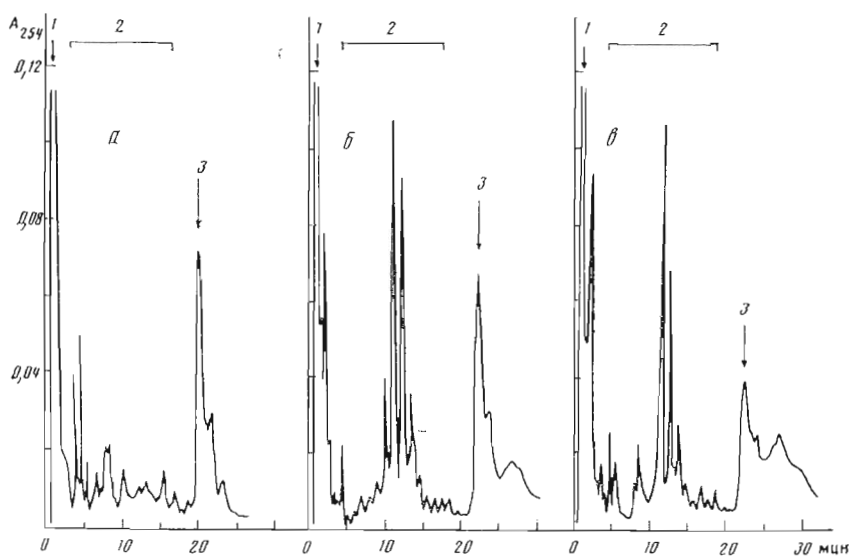


Рис. 3

Рис. 3. Ион-парная хроматография (условия приведены в «Экспер. части») продуктов транскрипции РНК-полимеразой Т7 ДНК-матриц «D» (а) и «В» (б, в). Концентрация фермента 68 мкг/мл, GTP, UTP, ATP и CTP соответственно, мМ: 1,7; 1,1; 0,6 и 0,6 (а); 2,25; 0,5; 0,25 и 1,0 (б); 4,5; 1,0; 0,5 и 2,0 (в). Время реакции 1,5 (а, б) или 3 ч (в). Пики: 1 – нуклеозидтрифосфаты, 2 – короткие побочные продукты, 3 – целевой транскрипт

Рис. 4. Ион-парная хроматография продуктов транскрипции РНК-полимеразой Т7 ДНК-матрицы, иммобилизованной на полимерном носителе. Условия реакции и анализа продуктов приведены в «Экспер. части». Пик целевого транскрипта (XI) указан стрелкой

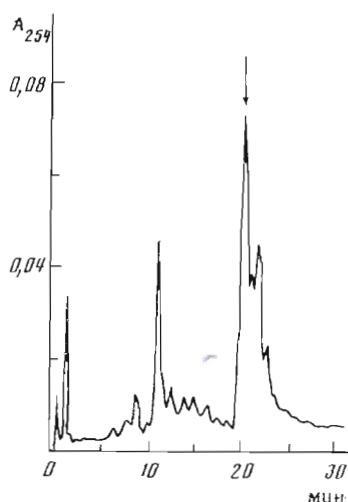


Рис. 4

при транскрипции матрицы «В» намного выше, чем в случае матрицы «D» (рис. 1 и 3). Оптимальная концентрация фермента в обоих случаях составляла 40–70 мкг/мл, нуклеозидтрифосфатов (каждого) – 1 мМ. Обнаружено, что содержание целевого продукта в реакционной смеси существенно возрастает, если нуклеозидтрифосфаты вводить в реакцию в соотношении, соответствующем его нуклеотидному составу, а не эквимолярную смесь, как это предлагается в литературе [2, 3]. Повышение концентрации нуклеозидтрифосфатов в сочетании с увеличением времени реакции приводит к снижению содержания целевого продукта по сравнению с побочными, особенно близкими ему по длине (рис. 3в).

Для проверки способности исследуемого фермента транскрибировать иммобилизованную ДНК-матрицу суспензию полимерного носителя с привитым на него фрагментом (XII) инкубировали в присутствии фрагмента (X) в условиях проведения РНК-полимеразной реакции. При этом накапливается, как и ожидалось, смесь продуктов того же состава, что и при транскрипции ДНК матрицы «D» в растворе (рис. 4). Этот результат указывает на способность РНК-полимеразы Т7 транскрибировать ДНК-матрицу, иммобилизованную на полимерном носителе. Отсутствие перехода олигонуклеотида (XII) в раствор было подтверждено инкубацией носи-

теля в тех же условиях без фрагмента (X) и последующей дополнительной обработкой отделенной жидкой фазы РНК-полимеразой Т7 в присутствии фрагмента (X). Образование продуктов транскрипции при этом практически не наблюдается.

Авторы выражают благодарность Н. И. Соколовой и Д. Т. Аширбековой за помощь при проведении химического лигирования, В. Н. Ташлицкому за проведение хроматографических анализов продуктов транскрипции и С. Н. Кочеткову (Институт молекулярной биологии, Москва) за предоставление препарата РНК-полимеразы Т7.

Экспериментальная часть

Синтез олигодезоксинуклеотидных блоков (I)–(V) амидофосфитным методом на автомате-синтезаторе «Виктория-4М» и их выделение методом ВЭЖХ проводили по описанному ранее методу [13]. Для получения 3'-фосфорилированных олигонуклеотидов (III) и (IIIa) вначале синтезировали их аналоги, содержащие дополнительное гU-звено на 3'-конце, которое затем окисляли и удаляли как описано ранее [7]. Олигонуклеотид (XII) получали по методу [7]. Олигонуклеотиды (VI) и (VII) были любезно предоставлены Т. Н. Шубиной (ВНИИ молекулярной биологии Минмедбиопроста СССР).

РНК-полимераза фага Т7 была выделена и любезно предоставлена нам С. Н. Кочетковым (Институт молекулярной биологии АН СССР). Фермент хранили при -20°C в 30 мМ трис-НСI-буфере (рН 8,0), содержащем 0,6 мМ EDTA, 3 мМ меркаптоэтанол, 43% глицерина (по объему).

Химическое лигирование олигонуклеотидов в составе комплекса (VIII) проводили по методу [5]. Ферментативное лигирование осуществляли с помощью Т4-ДНК-лигазы как описано ранее [8] после предварительного 5'-фосфорилирования (II) Т4-полинуклеотидкиназой. Продукты выделяли электрофорезом в 12% ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

Транскрипцию синтетических ДНК РНК-полимеразой Т7 проводили в буфере 40 мМ трис-НСI (рН 8,1), 10 мМ MgCl_2 , 5 мМ дитиотреит, 1 мМ спермидин, 4–8% глицерин (по объему). Концентрации ДНК, фермента и цуклеозидтрифосфатов были различными для разных экспериментов. Реакционные смеси инкубировали при 37°C от 1 до 3 ч. Далее фермент экстрагировали смесью хлороформ – изоамиловый спирт (24 : 1) и нуклеотидный материал осаждали этанолом. В том случае, если для анализа состава продуктов использовали гель-электрофорез, перед транскрипцией в реакционную смесь добавляли [α - ^{32}P]СТР и проводили автордиографию геля после разделения.

Ион-парную хроматографию продуктов транскрипции проводили на колонке $4,6 \times 250$ мм Si 100 polyol C18 (10 мкм) (Serva, ФРГ) в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 2 мМ тетрабутиламин, в градиенте концентрации ацетонитрила от 5 до 40% при 47°C и скорости элюции 1 мл/мин. По площади пика целевого продукта (рис. 3) определяли его выход в расчете на ДНК-матрицу.

Прививку олигонуклеотида (XII) на гидразид-сефарозу, полученную согласно [10], осуществляли следующим образом: 0,7 ОЕ₂₆₀ фрагмента (XII) в 6 мкл воды окисляли 2 мкл 0,1 М NaIO_4 в течение 1 ч, затем добавляли 2 мкл 10% этиленгликоля и выдерживали еще 15 мин. К полученной смеси добавляли 130 мкл 0,05 М $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COOK}$ (рН 5,0), 1 М КСI и наносили на 200 мкл предварительно отмытой гидразид-сефарозы, после чего выдерживали смесь 3 ч при комнатной температуре. Далее носитель промывали 10 раз водой, суспендировали в 0,5 мл 0,1 М трис-НСI (рН 8,2) и добавляли 8 мг NaNH_2 . Через 2 ч готовый носитель снова промывали водой (10 раз по 0,5 мл). Загрузка составляла примерно 1 нмоль фрагмента (XII) на 200 мкл носителя. При проведении транскрипции иммобилизованной ДНК-матрицы 10 мкл этого носителя инкубировали в 100 мкл буфера для РНК-полимеразы Т7 (см. выше), содержащего 200 нМ фрагмент (X), 1,7; 1,1; 0,6 и 0,6 мМ GTP, UTP, ATP и

СТР соответственно, 34 мкг/мл фермента при 37° С в течение 1,5 ч. Затем отделяли жидкую фазу и фракционировали ее на DEAE-целлюлозе. Нуклеозидтрифосфаты, фермент и наиболее короткие продукты транскрипции элюировали 0,1 М LiClO₄. Основную часть транскриптов элюировали 0,5 М LiClO₄, осаждали ацетоном и анализировали ион-парной хроматографией (рис. 4). Такое же фракционирование на DEAE-целлюлозе проводили и перед хроматографическим выделением целевого транскрипта при крупномасштабных (1–2 мл реакционной смеси) синтезах в растворе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tabor S., Richardson C. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 4. P. 1074–1078.
2. Lowary P., Sampson J., Milligan J., Groebe D., Uhlenbeck O. C. // Structure and Dynamics of RNA. Plenum Press. NATO ASI Series. 1986. V. 110. P. 69–76.
3. Milligan J. F., Groebe D. R., Witherell G. W., Uhlenbeck O. C. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 21. P. 8783–8798.
4. Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Drutsa V. L., Melnikova N. P., Parmal A. A. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 21. P. 5747–5761.
5. Соколова Н. И., Аширбекова Д. Т., Долинная Н. Г., Шабарова З. А. // Биоорганической химии. 1987. Т. 13. № 9. С. 1286–1288.
6. Goldkorn T., Proskor D. J. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 22. P. 9171–9191.
7. Волков Е. М., Романова Е. А., Круг А., Орещкая Т. С., Поганов В. К., Шабарова З. А. // Биоорганической химии. 1988. Т. 14. № 8. С. 1034–1039.
8. Громова Е. С., Ёлов А. А., Кубарева Е. А., Метелев В. Г., Шабарова З. А. // Молекулярная биология. 1986. Т. 20. № 1. С. 29–40.
9. Rosenthal A., Schwertner S., Hahn V., Hunger H.-D. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 4. P. 1173–1184.
10. Устаев М. Б., Ремме Я. Л., Лунд А. Я., Виллемс Р. Л.-Э. // Биоорганической химии. 1979. Т. 5. № 3. С. 365–369.
11. Agarwal S., Christodoulou C., Gait M. J. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 15. P. 6227–6245.
12. Peattie D. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 4. P. 1760–1764.
13. Грязнов С. М., Чернов И. П., Поганов В. К., Пурмаль А. А., Метелев В. Г., Ёлов А. А., Шабарова З. А. // Биоорганической химии. 1986. Т. 12. № 12. С. 1604–1611.

Поступила в редакцию
17.VI.1988

RNA SYNTHESIS BY THE T7 PHAGE RNA POLYMERASE: TRANSCRIPTION OF SYNTHETIC DNA TEMPLATES IN SOLUTION AND ON POLYMER SUPPORT

YOLOV A. A., VOLKOV E. M., REINTAMM T. G.,
ORETSKAUA T. S., SHABAROVA Z. A.

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University

Transcription of synthetic DNA by T7 RNA polymerase was used to obtain oligoribonucleotides of defined sequence. The enzyme's ability to transcribe DNA immobilized on hydrazid-sepharose was revealed. DNA templates used in such synthesis can be constructed by means of enzymatic (DNA ligase) or chemical ligation (cyanogen bromide).