



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.113.4:577.112.5

© 1991 г.

*Н. В. Тихунова, С. Я. Головин, Н. Н. Микрюков,  
Ю. Л. Хрипин, В. Ю. Черненко\*, Б. Г. Иванов\*\*,  
А. А. Ильичев, В. А. Петренко*

### СИНТЕЗ, КЛОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ КДНК $\alpha$ 1-АНТИТРИПСИНА ЧЕЛОВЕКА

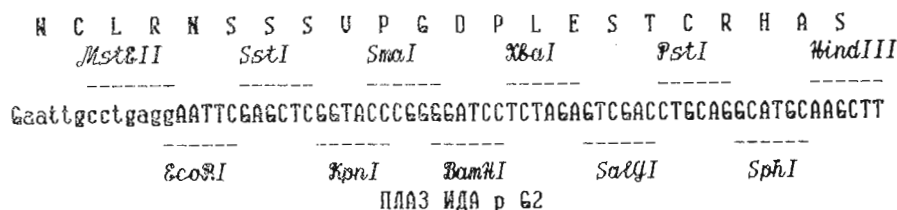
Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт биологически активных веществ, Бердск;

\* Институт молекулярной биологии и генетики АН УССР, Киев;

\*\* Новосибирский медицинский институт

$\alpha$ 1-антитрипсин человека (ААТ) является главным сывороточным ингибитором протеиназ и служит для защиты нижних дыхательных путей от протеолитического расщепления эластазой нейтрофилов [1]. ААТ продуцируется в основном гепатоцитами, а также макрофагами. Ген ААТ состоит из семи экзонов, значащая информация для гепатоцитарного белка ААТ кодируется в четырех экзонах, расположенных в 3'-концевой части гена [1]. ААТ в гепатоцитах человека синтезируется в виде предшественника из 418 аминокислотных остатков. Секретируемая форма ( $M$  52 кДа) содержит 394 аминокислотных остатка и 3 боковые углеводородные цепи.

(а)



(б)

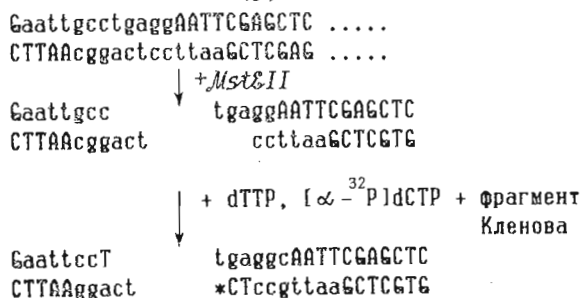


Рис. 1. Структура полилинкера (а) и схема введения метки (\*) в одну из цепей плазмиды рMG2 (б). Строчными буквами в нуклеотидных последовательностях выделены сайты эндонуклеаз рестрикции

Рис. 2. Первичная структура ДНК, комплементарной мРНК М1-аллеля  $\alpha$ 1-антитрипсина человека. Штриховой линией подчеркнута последовательность лидерного пептида, сплошной — уникальный сайт эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI



Концентрация ААТ в плазме крови человека в норме относительно высока — 200—400 мг% [2].

Ген ААТ обладает высокой степенью полиморфизма. Известно более 70 различных гаплотипов ААТ человека [3]. Среди них существуют такие генетические варианты, при которых уменьшается уровень ААТ в крови или синтезируется белок с пониженной активностью. У гомозиготных носителей патологических аллелей резко снижена антиэластазная активность сыворотки.

Это обуславливает беспрепятственное развитие воспалительных процессов в тканях, прежде всего в легких, что приводит к эмфиземе, а также в печени (цирроз), поджелудочной железе (панкреатиты), суставах (синовиты) [4]. Наиболее физиологичным методом терапии является применение чистого белка ААТ, выделенного из донорской крови. Ограниченность этого источника поставила вопрос о получении рекомбинантного белка ААТ методами микробиологического синтеза.

Ранее рядом авторов были получены рекомбинантные ДНК некоторых аллелей ААТ [1, 3]. Нами было проведено клонирование наиболее распространенного М1-аллеля ААТ. Выделение РНК из печени и синтез кДНК с использованием синтетических олигонуклеотидных праймеров проводили традиционными методами [5]. Молекулы двуцепочечной кДНК коннекторным способом встраивали по *Pst*I-сайту в плазмиду рМG2, специально созданную нами для быстрого определения первичной структуры клонированных последовательностей кДНК.

Плаزمида рМG2 (рис. 1) сконструирована на основе плазмиды рUC18 и содержит в составе полилинкера вблизи *Eco*RI-положения уникальный сайт для несимметричной эндонуклеазы рестрикции *Mst*EII (*Bse*2I.I, *Eco*3.I.I) — GGAGTCC. Этот сайт позволяет вводить радиоактивную метку в одну цепь плазмидной ДНК и проводить прямое секвенирование на плазмиде без выделения фрагментов.

Использование плазмиды рМG2 позволило провести быстрое и эффективное клонирование кДНК гена ААТ человека и определить ее нуклеотидную последовательность методом Максама — Гилберта [6]. кДНК гена ААТ представляет собой последовательность длиной 1278 п.о., кодирующую ААТ с сигнальным пептидом, а также 3'- и 5'-нетранслируемые районы (рис. 2).

Наличие сайта для эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI между последовательностью, кодирующей сигнальный пептид, и последовательностью зрелого ААТ позволяет легко конструировать плазмиды, способные к экспрессии зрелого ААТ. Определенная нами первичная структура кДНК гена ААТ совпадает с последовательностью, опубликованной для М1-варианта ААТ [7].

Клонированная кДНК гена ААТ представляет несомненный интерес как молекулярный зонд для исследования структурно-функциональной организации гена ААТ в тканях, а также как материал при создании штаммов-продуцентов ААТ человека.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kalsheker N.* // *Biosci. Rep.* 1989. V. 9. P. 129—138.
2. *Carrel R., Travis I.* // *Trends Biochem. Sci.* 1985. V. 10. № 1. P. 20—24.
3. *Brantly M., Nikiwa T., Crystal R.* // *Amer. J. Med.* 1988. V. 84. P. 13—31.
4. *Уорд А. М.* Иммунохимия в клинической лабораторной практике. М.: Медицина, 1981. С. 186—196.
5. *Маннигис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
6. *Maxam A. M., Gilbert W. G.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. № 2. P. 560—564.
7. *Long G. L., Chandra T., Woo S. L. C., Davie E. W., Kurachi K.* // *Biochemistry.* 1984. V. 23. № 21. P. 4828—4837.

Поступило в редакцию  
25.VI.1991

N. V. TIKUNOVA, S. Ya. GOLOVIN, N. N. MIKRJUKOV, Yu. L. KHRIPIN,  
V. Yu. TCHERNENCO \*, V. G. IVANOV \*\*, A. A. ILJITCEV, V. A. PETRENCO

**SYNTHESIS, CLONING AND SEQUENCING OF THE HUMAN  
 $\alpha$ 1-ANTITRIPSIN cDNA**

*Research and Technology Institute of Biologically Active Substances, Berdsk;*

*\* Institute of Molecular Biology and Genetics, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR,  
Kiev;*

*\*\* Novosibirsk Medical Institute, Novosibirsk*

cDNA coding for the human  $\alpha$ 1-antitripsin (AAT) has been cloned and sequenced in the specially constructed plasmid vector pMG2. The cDNA codes for the full size amino acid sequence of the AAT M1-allele and the leader sequence.