



УДК 577.213.3

© 1991 г.

А. А. Ёлов, Е. М. Волков, З. А. Шабарова

СИНТЕЗ РНК С ПОМОЩЬЮ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ T7 И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ДНК В РЕАКТОРЕ ПРОТОЧНОГО ТИПА

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет

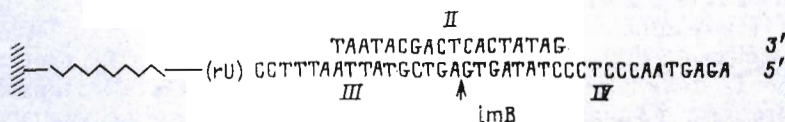
Путем ДНК-лигазной сборки синтетических олигодезоксирибонуклеотидов на полимерных носителях получена иммобилизованная ДНК-матрица, содержащая промотор РНК-полимеразы фага T7 и кодирующая 14-звенный олигорибонуклеотид. Показано, что с помощью этой матрицы можно проводить синтез РНК в реакторе проточного типа. В качестве носителей использовались сефароза 4В и Toyopearl HW-55.

В предыдущей работе [1] нами была впервые продемонстрирована принципиальная возможность синтеза РНК путем транскрипции РНК-полимеразой фага T7 ДНК-матрицы, ковалентно закрепленной на полимерном носителе, что, как отмечалось, может стать основой нового технологического метода синтеза заданных РНК. Опубликованные вскоре после ее выхода данные о проведении транскрипции коротких иммобилизованных ДНК РНК-полимеразой *E. coli* [2] свидетельствуют о том, что этот подход начинает получать распространение. В настоящей работе рассматривается конструирование короткой иммобилизованной ДНК-матрицы с использованием для этой цели носителей двух типов, ее транскрипция РНК-полимеразой T7 и создание на основе этого процесса опытного образца РНК-синтезирующего реактора.

В первой нашей работе [1] был установлен факт транскрипции РНК-полимеразой T7 комплементарного комплекса, образованного иммобилизованной верхней цепью узнаваемого этим ферментом промоторного участка и 31-звенным фрагментом (I) (система imA)*:



В такой системе, однако, после проведения транскрипции, отбора от носителя жидкой фазы и повторной инкубации иммобилизованной ДНК с ферментом выход РНК снижался не менее чем вдвое по сравнению с первым циклом реакции. Это можно объяснить недостаточной прочностью удерживания нижней цепи (I), комплементарно связанной с закрепленной на носителе верхней цепью лишь в пределах 18-звенного промоторного участка. Диссоциации комплементарного комплекса imA может способствовать предпологаемое в одной из работ [3] частичное разделение цепей ДНК при взаимодействии РНК-полимеразы T7 с промотором. Сказанное подтверждается тем, что в данной работе этот нежелательный эффект удалось преодолеть (см. ниже), закрепив ДНК за 3'-конец нижней (матричной) цепи:



* Префикс «d» (дезокс) здесь и в дальнейшем опущен. Для обозначения последовательностей РНК используется индекс «r» (рибо).

Характеристика	Тип носителя	
	сефароза 4В	ТР
Количество гидразидных групп после модификации поверхности, мкмоль на 1 мл суспензии	7,5	75
Выход продукта иммобилизации фрагмента (III), %	40—50	70—80
Выход продукта лигирования иммобилизованного олигонуклеотида (III) с олигонуклеотидом (IV) на матрице (II), %	50—60	60—70

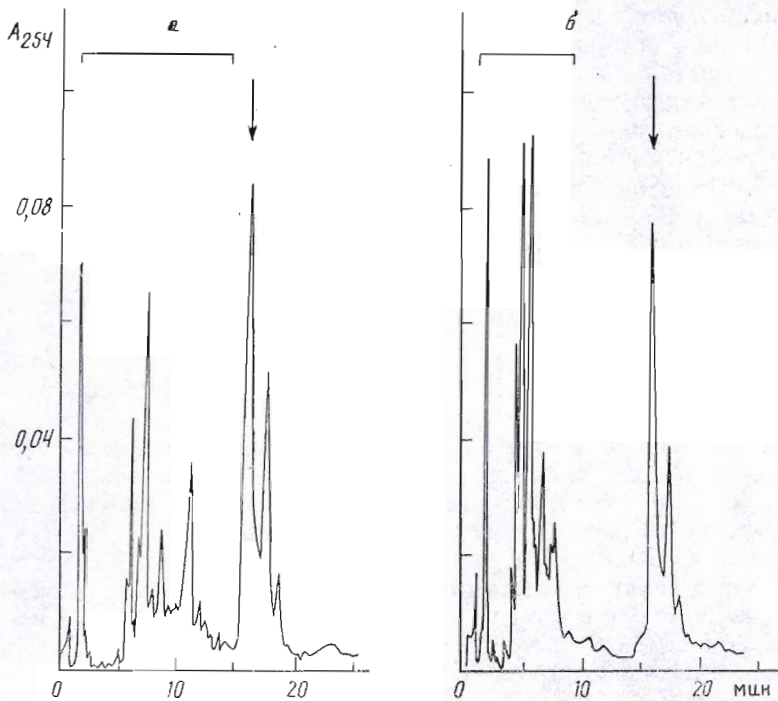
Система *imB* кодирует тот же олигорибонуклеотид $r(\text{pppGGGAGGGUUACUCU})$ (V), что и *imA*. Синтез фрагмента (V) с помощью РНК-полимеразы T7 и синтетической ДНК-матрицы рассматривался нами ранее [1]. Для создания *imB* был синтезирован олигодезоксирибонуклеотид $\text{AGTCTATTAAATTTCC}(rU)$ (III) с rU -звеном на 3'-конце, который после иммобилизации на носителе по описанным методикам [1, 4] соединялся с фрагментом $\text{AGAGTAACCCSTCCSTATAGTG}$ (IV) на матрице (II) с помощью ДНК-лигазы, как описано ниже (место стыка олигонуклеотидов (III) и (IV) указано стрелкой).

В качестве носителя для иммобилизации ДНК помимо использованной ранее сефарозы 4В [1] в данной работе нами был опробован Toyoparl NW-55 (далее обозначаемый ТР), рекомендуемый фирмой Toyo Soda (Япония) для иммобилизации ферментов и аффинной хроматографии. Этот пористый гидрофильный носитель содержит на поверхности ONCH_2 -группы и выгодно отличается от сефарозы высокой устойчивостью к механическим воздействиям, нагреванию, замораживанию, а также к смене растворителя, в котором он суспендирован. Такие свойства делают его привлекательным для получения иммобилизованных ДНК-матриц, предназначенных для работы в реакторах проточного типа.

Ковалентная связь между носителем и ДНК была создана с помощью тех же «мостиковых» групп, что и в предыдущей работе [1]. Они были синтезированы путем обработки суспензии сефарозы или ТР эпихлоргидрином и затем дигидразидом адипиновой кислоты по известной методике [4]. В результате на поверхности носителя образуются H_2NNHCO -группы [4].

Как видно из таблицы, такая модификация поверхности, ранее проводившаяся на сефарозах, весьма эффективно проходит и в случае ТР, для которого удалось достичь довольно высокой концентрации поверхностных NH_2NH -групп. Последнее обстоятельство, по-видимому, способствовало более эффективному протеканию реакции этих групп с окисленным NaIO_4 3'-концевым rU -звеном фрагмента (III), приводящей к его иммобилизации. Нами были получены суспензии сефарозы или ТР, содержащие 1—2 OE_{260} (8—16 нмоль) иммобилизованного олигонуклеотида (III) на 1 мл. Восстановление аддукта боргидридом натрия не проводили, так как при этом с носителя смывается до 40% иммобилизованного олигонуклеотида, возможно из-за восстановления гидразидных групп. Полученные нами величины загрузки носителя олигонуклеотидом намного ниже возможных при использовании реакций такого типа [4]. Однако, поскольку реакция транскрипции в растворе проводится при довольно низких концентрациях ДНК [1, 5], оптимальными для ее проведения на носителе будут, по-видимому, низкие, а не высокие величины удельной загрузки полимера ДНК-матрицей.

Для получения иммобилизованной ДНК-матрицы *imB* конденсировали закрепленный на носителе фрагмент (III) с олигонуклеотидом (IV) на матрице (II) с помощью ДНК-лигазы. Предварительно иммобилизованный олигонуклеотид (III) 5'-фосфорилировали, обрабатывая суспензию носителя Т4-полинуклеотидкиназой в присутствии АТР. Параллельно в аналогичных условиях проводили лигирование тех же фрагментов в растворе с выходом, близким к количественному. При этом была получена не закрепленная на носителе ДНК-матрица, входящая в состав *imB*



Ион-парная хроматография продуктов транскрипции ДНК-матрицы В в растворе (а) и на носителе (б). Пик целевого 14-звенного транскрипта (V) указан стрелкой. Короткие побочные продукты отмечены сверху скобкой

(в этом случае она обозначается В). Как видно из таблицы, ДНК-лигазная реакция на носителе довольно эффективна (выход продукта достигал 70%). На поверхности полимерного носителя была осуществлена (хотя и с невысокой эффективностью) даже ДНК-лигазная сборка довольно протяженного синтетического гена [6]. Эти факты позволяют утверждать, что ферментативное лигирование с участием ковалентно закрепленного олигонуклеотида — перспективный метод получения иммобилизованных ДНК.

При инкубации *imB* в растворе, содержащем РНК-полимеразу Т7 и нуклеозидтрифосфаты, в жидкой фазе накапливаются продукты транскрипции. Их выход примерно вдвое ниже, чем при транскрипции того же количества ДНК-матрицы В в растворе в тех же условиях. Наблюдаемое снижение эффективности транскрипции при иммобилизации ДНК-матрицы практически одинаково как для сефарозы, так и для ТР. Оно может быть объяснено как недостаточным расстоянием от промотора до точки закрепления ДНК на носителе (5 нуклеотидных звеньев в случае *imA* и *imB*), так и просто тем, что иммобилизованная ДНК локализуется в приповерхностном слое и не может равномерно распределиться по всему объему реакционной смеси. При транскрипции ДНК-матрицы В как в растворе, так и на носителе образуются сходные составы продуктов: в смеси присутствует целевой 14-звенный транскрипт, некоторое количество более длинных продуктов и довольно много коротких побочных продуктов длиной 2—8 звеньев (рисунок). Такой состав типичен для транскрипции коротких синтетических ДНК-матриц РНК-полимеразой Т7 [1, 5]. Можно, однако, заметить, что в случае *imB* образуется несколько большее количество коротких побочных продуктов по сравнению с целевым олигорибонуклеотидом (V), чем при транскрипции матрицы В в растворе. Не исключено, что этот небольшой эффект, наблюдаемый для носителей обоих типов, отражает те или иные особенности транскрипции ДНК, иммобилизованной на носителе по используемой в данной работе схеме.

Проведенные нами эксперименты показали, что транскрипция комплекса *imB* вполне может быть осуществлена в реакторе проточного типа.

Мы использовали корпус реактора от синтезатора олигонуклеотидов «Виктория-4М», который представляет собой стеклянную трубку диаметром 3 мм и длиной 30 мм (общий объем 210 мкл), закрытую с двух сторон титановыми или тефлоновыми фильтрами с отводящими шлангами. При работе реактор, внутри которого находилась суспензия системы *in vitro* (70—100 пмоль иммобилизованной ДНК-матрицы В), термостатировался при 37° С. Нами был использован следующий цикл операций: затягивание в реактор 200 мкл раствора, содержащего нуклеозидтрифосфаты и РНК-полимеразу Т7 в буфере (см. «Экспериментальную часть»), инкубация (1 ч) и выпуск жидкой фазы, содержащей продукты реакции. Этот цикл повторялся многократно с целью проверки возможности получения нескольких порций продукта с одной и той же иммобилизованной матрицей. После каждого цикла раствор, вышедший из реактора, анализировали путем отделения на DEAE-целлюлозе нуклеозидтрифосфатов от продуктов транскрипции. Количество последних для обоих носителей было примерно одинаково: 1—1,5 ОЕ₂₆₀ на цикл. Эта величина не снижалась по крайней мере для трех последовательных циклов, что говорит о работоспособности реактора такого типа. Цикл операций, подобный приведенному выше, может быть осуществлен автоматически.

Результаты проведенной работы выявили наличие у ТР таких преимуществ перед сефарозой, как отсутствие агрегации частиц, устойчивость к замораживанию или замене воды на этанол. Последнее обеспечивает большую сохранность системы носитель — ДНК на основе ТР (5 мес и более), чем в случае сефарозы (не более 2 мес). Однако для обоих носителей со временем все же наблюдается снижение выхода РНК при транскрипции иммобилизованной ДНК. Это ставит задачу подбора и синтеза новых «мостиковых» групп для соединения носителя с ДНК, обеспечивающих устойчивость системы наряду с ее матричной активностью. Другая важная задача дальнейшей работы — иммобилизация на носителе ДНК-матриц, кодирующих протяженные РНК, в частности мРНК, необходимые для внеклеточного синтеза белка [7]. Для получения таких ДНК-матриц, имеющих любую заданную структуру, могут быть использованы ДНК-полимеразные цепные реакции [8] и основанный на них процесс направленного соединения выбранных фрагментов ДНК — полимеразной рекомбинации [9]. Работы в этих направлениях уже начаты в нашей лаборатории.

Экспериментальная часть

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов (III) и (IV) амидофосфитным методом на синтезаторе «Виктория-4М» и их выделение методом ВЭЖХ проводили как описано ранее [10]. Получение фрагментов (I) и (II) было рассмотрено в нашей предыдущей работе [1].

РНК-полимераза фага Т7 была выделена и любезно предоставлена нам С. Н. Кочетковым (Институт молекулярной биологии АН СССР).

Модификацию поверхности обоих носителей проводили по методике, описанной в литературе [4]. Концентрацию поверхностных гидразидных групп в полученных при этом препаратах определяли с помощью цветной реакции [11], используя в качестве реагента пикриновую кислоту. Носитель на фильтре обрабатывали избытком пикриновой кислоты в этаноле и затем отмывали этанолом. Далее с помощью смеси этанола и насыщенного водного аммиака (1 : 1 по объему) проводили разрушение комплексов, образованных пикриновой кислотой с закрепленными гидразидными группами. При этом пикрат-анионы переходили в раствор, по оптической плотности которого ($\epsilon_{374} = 17\ 000$) определяли их количество. Последнее считали эквивалентным количеству гидразидных групп в анализируемом образце носителя.

Иммобилизацию фрагмента (III) на поверхности обоих носителей проводили по методике, описанной нами ранее [1], используя окисление 3'-концевого гуанина.

Ферментативное лигирование иммобилизованного олигонуклеотида (III) с олигонуклеотидом (IV) на матрице (II) осуществляли, используя

5'-меченый фрагмент (IV) для наблюдения за ходом реакции. 30—100 мкл водной суспензии носителя с иммобилизованным олигомером (III) вначале промывали 2 раза по 300 мкл буфера (50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, 1 мМ спермидин, 1 мМ АТР), после чего добавляли 40 мкл того же буфера и 2—3 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы. Смесь инкубировали при 37° С 30 мин, затем охлаждали и добавляли еще 20 мкл того же буфера, содержащего по 150—450 пмоль олигонуклеотидов (III) и (IV), и затем 5—10 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы. Выдержав смесь 15—18 ч при 10° С, носитель с иммобилизованной ДНК-матрицей (imB) центрифугировали и промывали 2 раза по 300 мкл буфера, в котором далее проводилась транскрипция (см. ниже). Путем просчета по Черенкову радиоактивности носителя и отобранной жидкой фазы определяли относительное количество меченого олигомера (IV), соединившегося с иммобилизованным фрагментом (III), т. е. выход продукта лигирования. В качестве контроля проводили этот же эксперимент без добавления ДНК-лигазы или матрицы (II) (при этом не более 2—3 % меченого олигонуклеотида (IV) сорбиривалось на носителе), а также лигирование в тех же условиях в растворе, заменяя иммобилизованный фрагмент (III) эквивалентным количеством свободного. В последнем случае получали ДНК-матрицу В (смесь анализировали гель-электрофорезом); первичную структуру ее 38-звенной нижней цепи подтверждали секвенированием по методу Максама — Гилберта [12].

Транскрипцию ДНК на носителе и в растворе осуществляли в условиях, аналогичных описанным ранее [1] (50 мМ трис-HCl-буфер (pH 8,4), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, 1 мМ спермидин, АТР, GTP, CTP, UTP (каждый 1 мМ) и 80 мкг/мл РНК-полимеразы Т7). В 200 мкл этой смеси инкубировали 50 мкл суспензии комплексов imA или imB, содержащей примерно 100 пмоль ДНК или столько же ДНК-матрицы В в растворе, в течение 1 ч при 37° С. В случае иммобилизованной ДНК транскрипцию проводили как в реакторе (см. выше), так и просто в пробирке. Далее отбирали жидкую фазу и анализировали ее хроматографией на DEAE-целлюлозе со ступенчатой элюцией 0,1 и 0,5 М LiClO₄ как описано ранее [1]. При достижении концентрации LiClO₄ 0,1 М элюируются непрореагировавшие нуклеозидтрифосфаты, а 0,5 М — продукты транскрипции. По количеству последних, определяемому спектрофотометрически, оценивали эффективность реакции синтеза РНК. Продукты транскрипции осаждали ацетоном, их состав анализировали ион-парной хроматографией как описано ранее [1].

Авторы выражают глубокую благодарность Т. С. Орецкой за помощь при синтезе олигонуклеотидов, В. Н. Ташлицкому за проведение хроматографических разделений и С. Н. Кочеткову за предоставление РНК-полимеразы фага Т7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Елов А. А., Волков Е. М., Рейнтамм Т. Г., Орецкая Т. С., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 2. С. 159—165.
2. Денисова Л. Я., Загребельный С. Н., Пустошилова Н. М., Веняминова А. Г., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Репкова М. Н., Шишкина И. Г. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 562—565.
3. Martin C. T., Coleman J. F. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 10. P. 2690—2696.
4. Устаев М. Б., Ремме Я. Л., Лунд А. Я., Виллемс Р. Л.-Э. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 3. С. 365—369.
5. Milligan J. F., Groebe D. R., Witherell G. W., Uhlenbeck O. C. // Nucl. Acids Res. 1987. № 21. P. 8783—8798.
6. Hostomsky Z., Smrt J., Arnold L., Tochik Z., Paces V. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 12. P. 4849—4856.
7. Спириин А. С., Четверин А. Б., Воронин Л. А., Баранов В. И., Алазов Ю. Б. // Вестн. АН СССР. 1989. № 11. С. 30—38.
8. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. I., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Ehrlich H. A. // Science. 1988. V. 239. № 4839. P. 487—491.
9. Yulov A. A., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 13. P. 3983—3986.
10. Грязнов С. М., Чернов И. П., Попанов В. К., Пурмаль А. А., Метелев В. Г., Елов А. А., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1604—1611.

11. Туркова Я. Аффинная хроматография. М.: Мир, 1980. С. 240.
12. Maxam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.

Поступила в редакцию
21.VI.1990

После доработки
4.X.1990

A. A. YOLOV E. M. VOLKOV Z. A. SHABAROVA

**RNA SYNTHESIS BY USE OF T7 RNA POLYMERASE AND IMMOBILIZED
DNA IN A FLOWING-TYPE REACTOR**

Department of Chemistry, M.V. Lomonosov State University

The DNA ligase-induced assembly of synthetic oligodeoxyribonucleotides on polymer supports was used to obtain immobilized DNA, containing the T7 RNA polymerase promoter and coding for a 14-membered oligoribonucleotide. The obtained template can carry out RNA synthesis in a flowing-type reactor. Sepharose 4B and Toyopearl HW-55 were used as supports.