



УДК 577.113.6

© 1992 г.

Н. В. Смелкова, А. А. Елов, Э. А. Шабарова

КОНСТРУИРОВАНИЕ ДНК-МАТРИЦ ЗАДАНОЙ СТРУКТУРЫ  
ДЛЯ СИНТЕЗА РНК ПОСРЕДСТВОМ ПОЛИМЕРАЗНЫХ  
ЦЕПНЫХ РЕАКЦИЙ

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

На основе сочетания химического синтеза ДНК и полимеразных цепных реакций проведено конструирование ДНК-матриц заданной структуры, кодирующих целевые мРНК. Полученные ДНК имели длину от 136 до 246 звеньев, содержали промотор фага T7 или *E. coli* и кодировали 136-звенные мРНК.

Для получения протяженных РНК заданной структуры, в частности мРНК для внеклеточного синтеза белка [1], наиболее перспективным в настоящее время представляется синтез РНК путем транскрипции с помощью РНК-полимеразы фага T7 или SP6 [2]. Такой подход в свою очередь ставит задачу конструирования ДНК-матриц заданной структуры. Эта задача, на наш взгляд, может быть успешно решена с использованием ПЦР [3], которые позволяют не только получать индивидуальные копии выбранных фрагментов любых ДНК, но и соединять эти фрагменты в определенном месте [4]. Последнее в сочетании с химическим синтезом фрагментов ДНК дает возможность получать ДНК-матрицы заданной наперед структуры. Их длина ограничена только возможностями ПЦР, которая позволяет получать ДНК длиной до 2900 п. о. [3] и более [5]. Некоторые примеры такого конструирования рассмотрены в данной работе.

Синтетический ген, на основе которого нами был получен набор ДНК-матриц, представляет собой одноцепочечную 184-звенную ДНК, имеющую последовательность: 3' ATTGTGGCACGCSACAACCTGATAAAAATGGAGACCAGCACTATTACCTAGGTACATGATTCCTCCATGGTACCGCCAT G C C TATATAGCTATTTGCCACAGGAGCTCGCGATACCAGAGATCTGGGTATC T A GAATCTCCAGCTTTAAGTGGACSTTAAGTTTCCGAGGAAAACCTCG G AAAAAAAAAG 5' (син-одДНК). Эта ДНК содержит все основные функциональные участки гена: промотор РНК-полимеразы *E. coli* (аналог  $\lambda_{PR}$ ) и мРНК-кодирующий участок, включающий в себя участок инициации трансляции (последовательность Шайн-Дальгарно (SD)+иницирующий кодон ATG) и терминатор транскрипции (*term fd*). Указанные участки отмечены на рис. 1 (см. последовательность ДНК-матрицы (PG)). При транскрипции этого гена должна получаться 132-звенная мРНК, кодирующая пептид из 16 аминокислот.

Синтез ДНК-матриц осуществлялся в два этапа. На первом этапе с помощью ПЦР [3] в син-одДНК вводился 28-звенный фрагмент плазмиды pUC18 или фага M13mp8, включающий в себя последовательность стан-

\* Использование сокращения: ПЦР – полимеразная цепная реакция; (PG) и (TG) – ДНК-матрицы с промоторами РНК-полимераз *E. coli* и фага T7 соответственно (см. рис. 1); (PGL) и (TGL) – аналоги (PG) и (TG), содержащие (UM) – дополнительный 80-звенный участок плазмиды pUC18 с rU-звеном на конце (см. рис. 2).

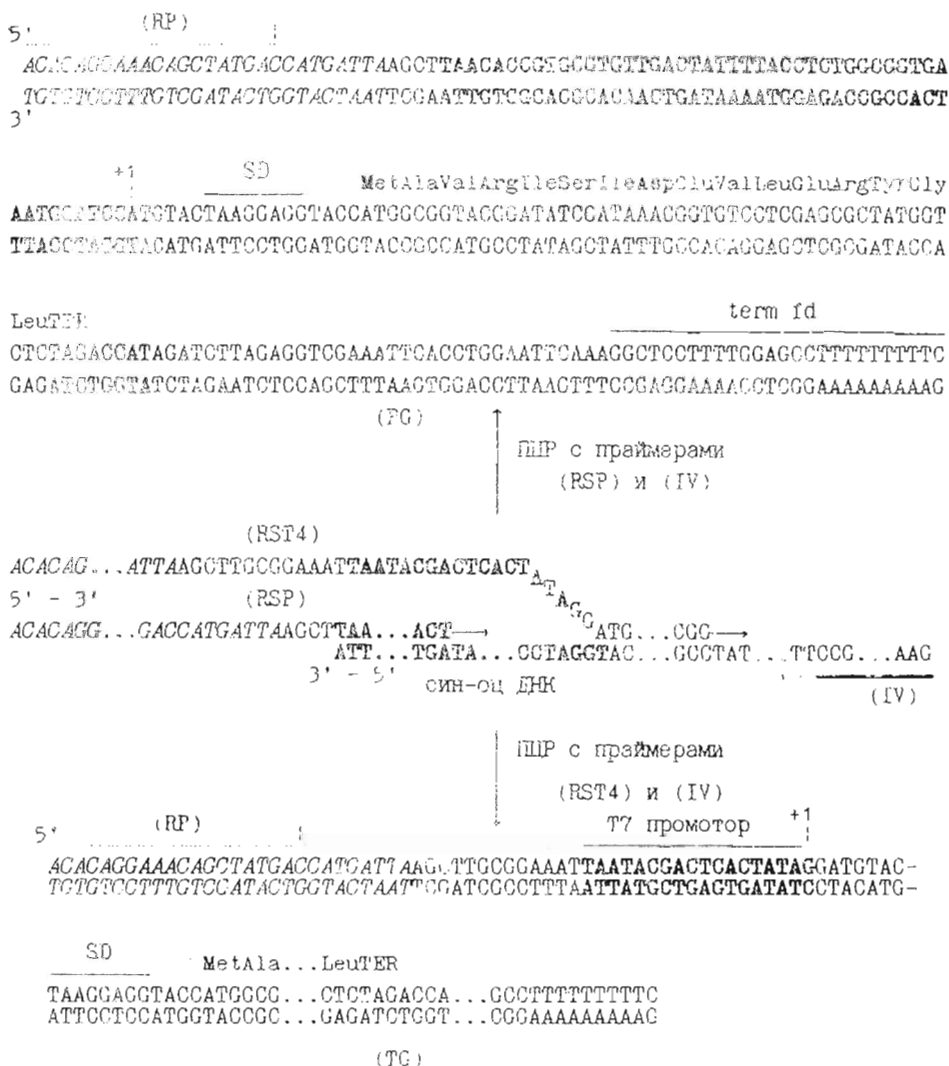


Рис. 1. Схема синтеза ДНК-матриц (PG) и (TG) путем ПЦР. Структура (PG) приведена полностью; в случае (TG) опущены участки, полностью идентичные для (PG) и (TG). Жирным шрифтом выделены промоторные участки, курсивом – 28-звенный фрагмент плазмиды типа pUC18, включающий в себя праймер (RP). Жирной линией обозначен олигонуклеотидный праймер, стрелки указывают направление полимеразной достройки (5'–3'). Над смысловым участком ДНК приведена последовательность кодируемого пептида

дартного праймера для секвенирования (RP). Наличие такого участка позволило ввести полученные продукты (PG) и (TG) (см. рис. 1) в указанный вектор с помощью PCR в варианте SOE [4]. Последняя в данной работе была применена также для введения в полученные ДНК-матрицы дополнительных участков (см. схему на рис. 2), которые содержат концевое gU-звено, присоединенное 5'–5'-связью. Наличие такого звена позволяет закрепить ДНК на полимерном носителе, что, как уже отмечалось [6], может сделать полимеразный синтез РНК технологичным и в перспективе автоматическим.

Схема синтеза посредством ПЦР ДНК-матриц (PG) (содержит промотор РНК-полимеразы *E. coli*) и (TG) (содержит промотор РНК-полиме-

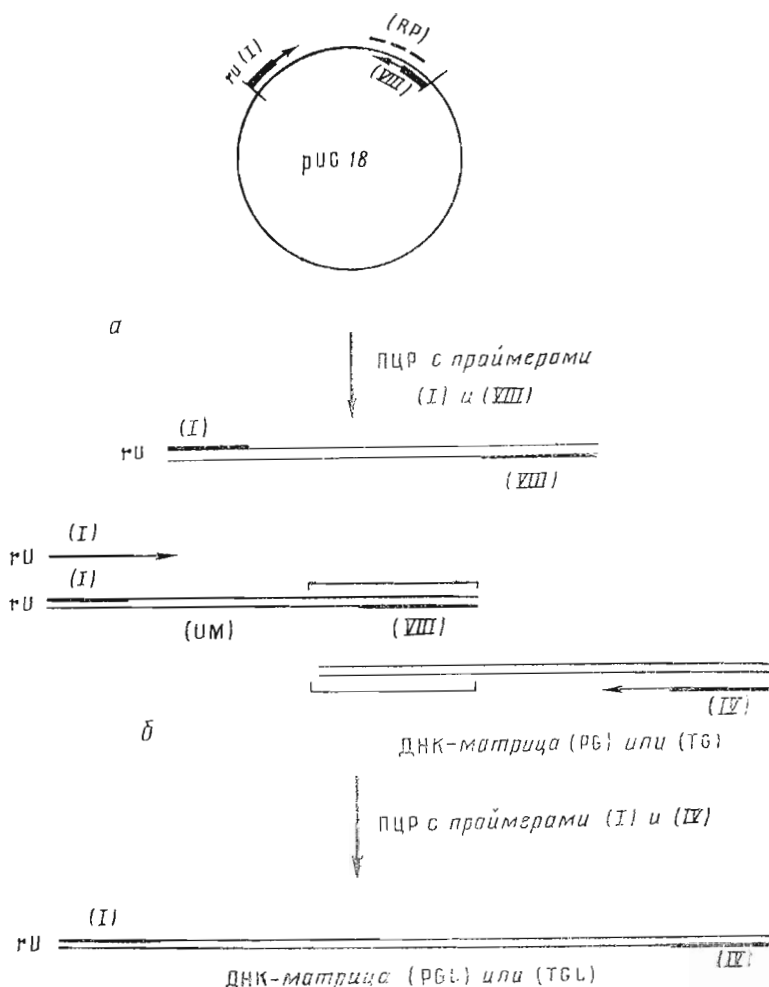


Рис. 2. Схема синтеза ДНК-матриц (PGL) и (TGL) путем ПЦР-копирования (*a*) и направленного соединения (*б*). Жирной линией обозначены олигонуклеотидные праймеры, стрелки указывают направление полимеразной достройки (5'-3'). Скобки указывают области перекрытия в районе «обратного праймера» (RP)

разы флага Т7), включающих в себя 28-звенный фрагмент, содержащий последовательность (RP), приведена на рис. 1. Для введения этого фрагмента использовали протяженные праймеры (RSP) или (RST4) (см. таблицу). В последнем случае, используя праймер (RST4) вместо (RSP), промотор  $\lambda p_R$  мы заменили на промотор РНК-полимеразы флага Т7. В результате этого были получены ДНК-матрицы (PG) и (TG).

Как видно из рис. 3, амплификация син-оцДНК посредством ПЦР в присутствии пар праймеров (RSP)-(IV) и (RST4)-(IV) проходит так же эффективно, как и обычное ПЦР-копирование двуспирального 121-звенного фрагмента ДНК, описанного нами в предыдущей работе [7].

На втором этапе работы мы вводили в синтезированные ранее ДНК-матрицы посредством SOE-PCR [4] 80-звенный фрагмент плазмиды pUC18-(UM). Этот фрагмент получен с помощью праймеров (I) и (VIII) и введен в синтезированные ранее ДНК-матрицы (PG) и (TG). В результате были получены новые ДНК-матрицы (PGL) и (TGL). Схема их синтеза приведена на рис. 2.

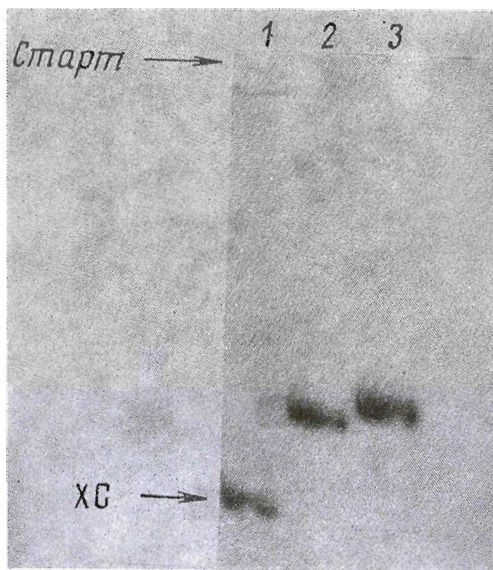


Рис. 3. Радиоавтограф электрофореза продуктов ПЦР, проводимой в присутствии праймеров (RST4) и (IV) (2) или (RSP) и (IV) (3). Праймер (IV) содержал  $^{32}\text{P}$ -меченую 5'-концевую фосфатную группу. Для сравнения проведено ПЦР-копирование 121-звенного фрагмента ДНК, полученного нами в предыдущей работе [7] (где он обозначен СВС) в присутствии 20-звенных праймеров (1). Здесь и далее ХС – положение красителя ксиленианола

Как видно из рис. 4, эффективность ПЦР в условиях соединения двух фрагментов ДНК была, как и в нашей предыдущей работе [7], практически такой же, что и при ПЦР-копировании непрерывного фрагмента ДНК. Сравнивая интенсивность полос на радиоавтографе (см. рис. 4), приходим к выводу, что на эффективность включения праймера не влияет тип ПЦР (как простое ПЦР-копирование, так и полимеразная рекомбинация идут практически одинаково).

Первичная структура всех ДНК-матриц (PG) и (TG), (PGL) и (TGL) была подтверждена секвенированием по Сэнгеру [8] с использованием праймеров (RP), (II), (IV) и (VIII). Полученные последовательности оказались идентичными ожидаемым, места соединений прочитывались однозначно.

#### Последовательности олигодезоксирибонуклеотидов (5' → 3'), использованных в работе

Последовательности олигонуклеотидов	Шифр
d(ACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTAAGCTTAAACAGCGTGCGTGTTGACT)	(RSP)
d(ACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTAAGCTTGC GGAAATTAATACGACTCACTATAGGATGTA CTAAGGAGGTACCATGGCGG)	(RST4)
(rU)(5'→5')d(ATGCTTCCGGCTCGTATGTT)	(I)
d(CCTTAGTACATCCTATAGTGA)	(II)
d(TAATACGACTCACTATAG)	(III)
d(CCGAGGAAAACCTCGGAAAAAAAAAAG)	(IV)
d(GATGTA CTAAGGAGGTACCATGGCGG)	(V)
d(ACGCCTTAAATTATCCTG)	(VI)
d(CATGATTAAGCTTGC GGAAAT)	(VII)
d(GTCGATACTGGTACTAATACGA)	(VIII)
d(CATGATTAAGCTTAAACAGCGTGCGTGTTGACT)	(IX)

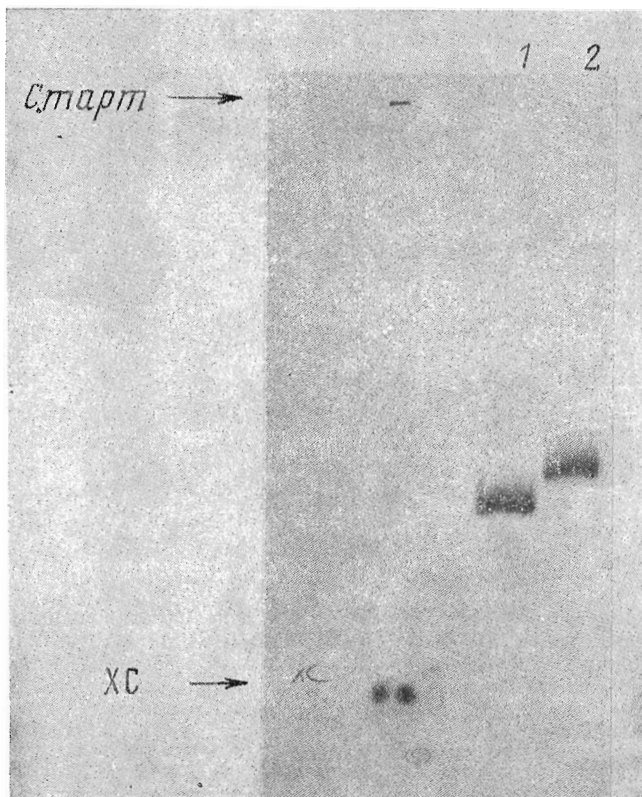


Рис. 4. Радиоавтограф электрофореза продуктов ПЦР-копирования (TG) в присутствии праймеров (RP) и (IV) (1), а также смеси (UM) и (TG) в присутствии праймеров (I) и (IV) (2). В обоих случаях праймер (IV) содержал  $^{32}\text{P}$ -меченую 5'-концевую фосфатную группу

ДНК-матрицы (TG) и (TGL), как и следовало ожидать, эффективно транскрибируются РНК-полимеразой T7. Как видно из рис. 5, при этом образуются продукты, имеющие электрофоретическую подвижность, аналогичную подвижности предполагаемой 136-звенной мРНК. По интенсивности полосы количество этого продукта в смеси может быть оценено приблизительно в 10 мкг. Это соответствует синтезу примерно 500 РНК-копий на 1 молекулу ДНК-матрицы. Результат проведенной работы свидетельствует о том, что соединение выбранных фрагментов ДНК в строго заданной точке путем полимеразной рекомбинации в сочетании с химическим синтезом ДНК является универсальным методом получения ДНК-матриц любой желаемой структуры. Полученные матрицы, как уже отмечалось, кодируют модельные мРНК, которые и были синтезированы путем транскрипции (рис. 5). Кроме того, ДНК-матрица (PG) используется в нашей лаборатории как субстрат для изучения механизма действия рестриктаз *EcoRII* и *MvaI*.

#### Экспериментальная часть

В работе использован синтетический одноцепочечный 184-звенный ген (син-одДНК), полученный в нашей лаборатории Т. С. Орецкой, Т. Г. Рейнгаммом и Е. А. Кубаревой с помощью ДНК-лигазы из синтетических 5'-фосфорилированных и не имеющих концевых фосфатных групп олиго-

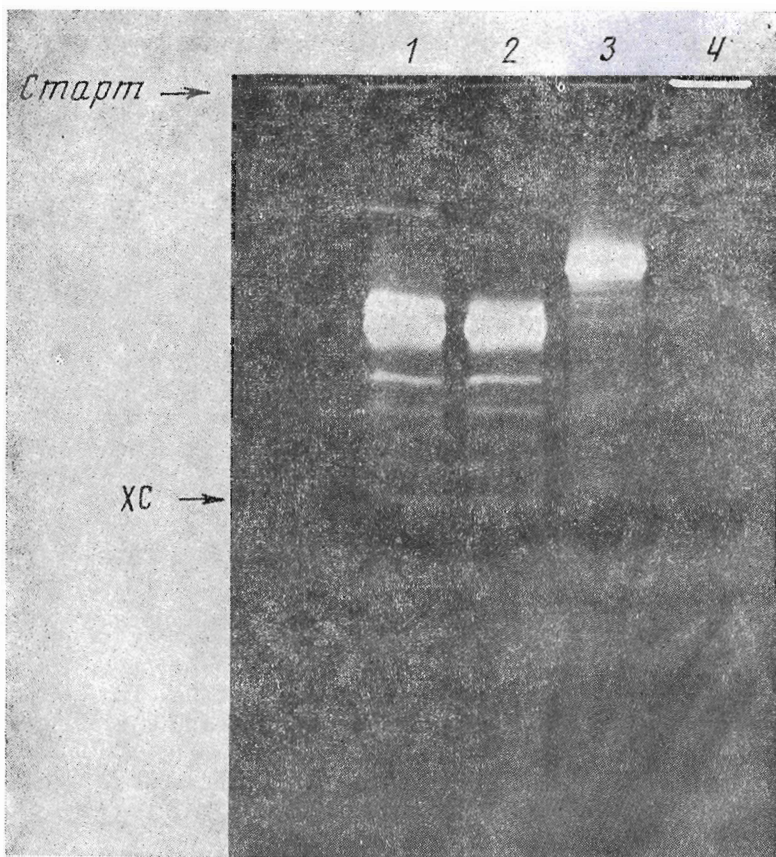


Рис. 5. Электрофорез продуктов транскрипции (TGL) (1), (TG) (2) и фрагмента плазмиды pMZ41 (см. работу [7], где он обозначен AD), кодирующий 175-звенную мРНК (3). Гель прокрашен бромистым этидием. Для оценки количества вещества по интенсивности полосы в ячейку (4) нанесен 1 мкг плазмиды pGEM1

нуклеотидов. Нуклеотидная последовательность гена составляет основную часть нижней цепи ДНК-матрицы (PG) (звенья -52-+132) (см. рис. 1). Для конструирования ДНК-матрицы путем ИЦР применяли олигонуклеотиды (I)–(III) и праймер (RP) (см. табл. 1), использованные нами в предыдущих работах [6, 7], а также олигонуклеотидные блоки (IV)–(VI), применявшиеся для сборки гена. Синтез этих олигонуклеотидов был осуществлен на синтезаторе «Виктория-4М», очистка, так же как и синтез, проведена как описано ранее [9]. Олигонуклеотиды были синтезированы Т. С. Орцкой и Е. А. Кубаревой на автомате-синтезаторе «Cyclone». Протяженные праймеры (RST4) (84 звена) и (RSP) (52 звена) получали путем ферментативного лигирования олигонуклеотидов с помощью Т4-ДНК-лигазы. В случае (RST4) сшивали олигонуклеотиды (RP), (VII), (III) и (V) на матрицах (VIII), (VI) и (II), а в случае (RSP)–(RP) и (IX) на матрице (VIII). Для наблюдения за ходом реакции в 5'-конец праймера (RP) вводили  $^{32}\text{P}$ -меченую фосфатную группу с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . Продукты лигирования выделяли электрофорезом в 12% ПААГ, содержащем 7 М мочевины. Выход и количество продуктов определяли по радиоактивной метке.

Полимеразные цепные реакции (ПЦР) проводили в 100 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ трис-HCl (рН 8,8), 6,7 мМ MgCl<sub>2</sub>, 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 мМ меркаптоэтанол, 170 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, dATP, dTTP, dCTP и dGTP (0,05 мМ каждый), по 100 пмоль каждого праймера, один из которых был мечен [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP по 5'-концу, и 0,1 пмоль исходной ДНК. В случае SOE-PCR брали по 0,1 пмоль каждой из двух ДНК. Смесь обрабатывали ДНК-полимеразой (5 ед. акт.) из *Thermus thermophilis* (НПО «Ока», г. Пущино) или из *Th. aquaticus* (НПО «Ферментас», Вильнюс). Смесь покрывали 40 мкл минерального масла и подвергали 20–25 циклам ПЦР на амплификаторе (Techne, Англия). Каждый цикл состоял из трех стадий: стадии денатурации (95° С, 1 мин), стадии гибридизации праймера (55° С, 2 мин) и стадии полимеразной реакции (70° С, 2 мин; в последнем цикле 10 мин). Содержимое реакционных смесей осаждали этанолом, продукт реакции выделяли электрофорезом в неденатурирующем 8% ПААГ.

Транскрибирование ДНК-матриц проводили в 10 мкл смеси, содержащей 40 мМ трис-HCl (рН 8,8), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ дитиотреит, 1 мМ спермидин, 4–8% глицерин (по объему), 0,1 пмоль ДНК, АТР, СТР, ГТР, УТР (0,5 мМ каждый), 78 мкг/мл РНК-полимеразы фага Т7. Реакцию проводили в течение 1 ч при 37° С. Смесь анализировали электрофорезом в 8% ПААГ, содержащем 7 М мочевицу. РНК-полимераза фага Т7 была выделена и любезно предоставлена С. Н. Кочетковым (Институт молекулярной биологии АН СССР).

Авторы выражают благодарность Т. С. Орецкой, Е. А. Кубаревой, Т. Г. Рейнтаму и Е. М. Волкову за предоставление олигонуклеотидных праймеров и синтетического гена, С. Н. Кочеткову за предоставление РНК-полимеразы фага Т7, а также студентам А. В. Козловой и С. В. Ткачку за участие в проведении эксперимента.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Спириг А. С., Четверин А. Б., Воронин Л. А., Баранов В. И., Алахов Ю. Б. // Вестн. АН СССР. 1989. № 11. С. 30–38.
2. Krupp G. // Gene. 1988. V. 72. № 1. P. 75–89.
3. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. // Science. 1988. V. 239. № 4839. P. 487–491.
4. Horton R. M., Hunt H. D., Ho S. N., Pullen J. K., Pease L. R. // Gene. 1989. V. 77. № 1. P. 61–68.
5. Swarz K., Hansen-Hagge T., Bartram C. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 4. P. 1097.
6. Елов А. А., Волков Е. М., Рейнтам Т. Г., Орецкая Т. С., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 2. С. 159–165.
7. Yelov A. A., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 13. P. 3983–3986.
8. Sanger F., Nicklen S., Coulson F. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5464–5467.
9. Грязнов С. М., Чернов И. П., Поганов В. К., Пурмаль А. А., Метелев В. Г., Елов А. А., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1604–1611.

Поступила в редакцию  
17.VI.1991

N. V. SMELKOVA, A. A. YOLOV, Z. A. SHABAROVA

#### CONSTRUCTION OF mRNA-CODING DNA TEMPLATES OF PRESET STRUCTURE BY MEANS OF POLYMERASE CHAIN REACTIONS

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

Combination of chemical DNA synthesis and polymerase chain reactions has been used for obtaining DNA templates of preset structure coding for target mRNAs. The obtained DNA were 136 to 246 bp in length, contained promoters for RNA polymerases of phage T7 or *E. coli* and coded for 136-membered mRNA.