



УДК 547.962.32.07

## СИНТЕЗ СТРУКТУРНОГО ГЕНА ЛЕЙЦИН-ЭНКЕФАЛИНА

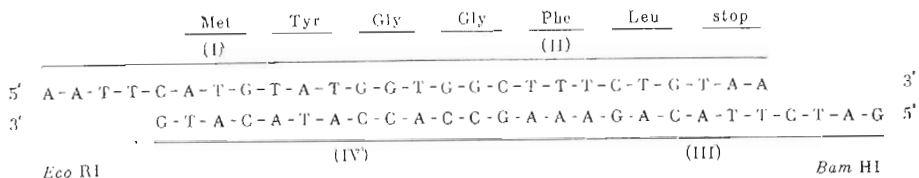
*Ефимов В. А., Чухмагчева О. Г.*

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

В ходе детального изучения структурно-функциональных отношений в нейропептидах и их высокомолекулярных предшественниках возникает необходимость получения этих соединений в больших количествах. Уникальные возможности для решения этой проблемы открывают методы генной инженерии.

Успехи, достигнутые за последние годы в области синтеза олиго- и полинуклеотидов со специфической последовательностью оснований [1—4], а также разработка технологии конструирования рекомбинантных молекул ДНК [5, 6] создали предпосылки для получения важных с практической точки зрения белков и пептидов путем химического синтеза соответствующего гена, встраивания его в подходящую векторную молекулу и последующего выражения генетического материала в бактериальной клетке. Принципиальная возможность такого подхода была недавно показана в работе Итакуры, Бойера и сотр., осуществивших синтез пептидного гормона соматостатина в клетках *E. coli* [7].

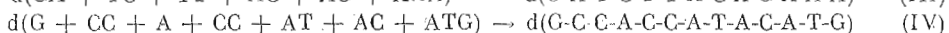
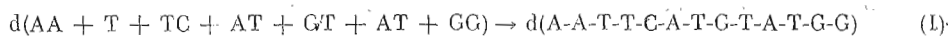
Основываясь на этих данных, мы предприняли химико-ферментативный синтез гена одного из олигопептидов мозга, пентапептида-анальгетика Леу-энкефалина, открытого в 1975 г. [8, 9]. Синтезированный нами фрагмент ДНК, помимо кодонов, соответствующих аминокислотам Леу-энкефалина, содержит метиониновый и терминирующий кодоны, а также выступающие одноцепочечные последовательности на 5'-концах цепей, соответствующие участкам узнавания нуклеазами рестрикции *Eco* RI и *Bam* HI, необходимые для встраивания этого дуплекса в плазмиду [7].



Последовательность оснований этого полинуклеотида была составлена нами из кодонов, выбранных произвольно из числа преимущественно встречающихся в генах, кодирующих белки *E. coli* и ее бактериофагов

с учетом следующих моментов. Во-первых, поскольку структурный ген предполагалось составить из четырех перекрывающихся сегментов, последовательность подбирали таким образом, чтобы исключить нежелательное внутри- и межмолекулярное их спаривание. Во-вторых, мы старались избежать наличия протяженных участков, богатых G-C-парами, за которыми следовали бы A-T-богатые участки, так как это может привести к терминации транскрипции [10]. И в-третьих, стремились создать максимальную повторяемость ди- и тринуклеотидных последовательностей в цепях дуплекса, что дало бы возможность многократно использовать одни и те же блоки при химическом синтезе отдельных сегментов.

Химический синтез четырех тридекадезоксирибонуклеотидов (I) — (IV) проводили блочным фосфодиэфирным методом с использованием в качестве 5'-концевых звеньев 5'-монометокситритилнуклеозидов и стандартных защитных групп для аминокислот гетероциклических оснований и 3'-гидроксидов [11], согласно следующим схемам:



5'-Монометокситритилсодержащие ди-, три- и тетра-нуклеотиды выделяли из реакционных смесей экстракцией органическими растворителями, а все остальные защищенные олигонуклеотиды — высокоскоростной ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе с водно-спиртовыми растворами бикарбоната триэтиламония в качестве элюента. Защищенные тридекануклеотиды выделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl, содержащего 7 М мочевины, а после удаления защитных групп очищали двукратной анионообменной хроматографией в присутствии 7 М мочевины сначала в нейтральном растворе, а затем при pH 3,5. Первичную структуру сегментов (I) — (IV) после введения  $^{32}P$  в 5'-концевую оксигруппу [12] подтверждали частичным гидролизом фосфодиэстеразой змеиного яда с последующим двухмерным фингерпринтированием [13].

Полученные описанным выше способом тридекануклеотиды попарно соединяли с помощью T4-полинуклеотидлигазы. Для этого 5'- $^{32}P$ -меченные сегменты (II) и (IV) «отжигали» с немечеными сегментами (I) и (III), имеющими на 5'-конце свободную гидроксильную группу (для предотвращения сшивания сегментов по самокомплементарным концам, соответствующим рестриктным «сайтам»), и инкубировали с ДНК-лигазой в течение 5 ч при 10° в условиях работы [14]. За ходом реакции следили по превращению [ $^{32}P$ ]фосфата из концевого в межнуклеотидный, устойчивый к действию щелочной фосфатазы *E. coli*, и с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле. Полученный в результате этого двухцепочечный полинуклеотид отделяли от исходных соединений геле-фильтрацией на сефадексе G-100 при 4° в 0,1 М бикарбонате триэтиламония (pH 7,5). Правильность ковалентного соединения сегментов подтверждалась деградацией полинуклеотидной цепи до 3'- и 5'-моонуклеотидов (анализ ближайших соседей) до и после разделения цепей дуплекса [14].

Таким образом был получен структурный ген Leu-энкефалина, содержащий метиониновый и терминирующий кодоны, а также участки узнавания рестриктазами *Eco* RI и *Bam* HI и представляющий собой 22-звенный двухцепочечный полинуклеотид с выступающими тетра-нуклеотидными липкими концами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Khorana H. G., Agarwal K. L., Besmer P., Büchi H. et al. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 565—570.
2. Bahl C. P., Wu R., Itakura K., Katagiri K., Narang S. A. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 91—94.
3. Yansura D. G., Goeddel D. V., Caruthers M. H. (1977) *Biochemistry*, **16**, 1772—1780.
4. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. (1979) *Биоорганич. химия*, **5**, 138—142.
5. Helinski D. R. (1978) *Trends in Biochemical Sciences*, **3**, 10—14.
6. Vosberg H. P. (1977) *Hum. Genet.*, **40**, 1—72.
7. Itakura K., Hirose T., Crea R., Giggs A., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. (1977) *Science*, **198**, 1056—1063.
8. Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris R. H. (1975) *Nature*, **258**, 577—579.
9. Ашмарин И. П., Еропкин М. Ю., Ковалева Т. А., Рожанец В. В. (1978) *Молекулярн. биология*, **12**, 965—979.
10. Bertrand K., Korn L., Lae F., Platt T., Squires C. L., Squires C., Yanofsky C. (1975) *Science*, **189**, 22—26.
11. van de Sande J. H., Caruthers M. H., Kumar A., Khorana H. G. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 571—586.
12. Richardson C. (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **54**, 158—165.
13. Sanger F. (1973) in: *Virus Research* (Fox C. F., Robinson W. S., eds.), pp. 573—599, Acad. Press, New York — London.
14. Sgaramella V., Khorana H. G. (1972) *J. Mol. Biol.*, **72**, 427—444.

Поступило в редакцию  
17.XI.1978

## THE SYNTHESIS OF A STRUCTURAL GENE FOR LEU-ENKEPHALIN

EFIMOV V. A., CHAKHMAKHCHEVA O. G.

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

A double-stranded deoxyribonucleotide, representing the structural gene for Leu-enkephalin, has been synthesized by a combination of chemical and enzymatic methods. In addition to the 5 codons of Leu-enkephalin, a methionine codon preceding the normal NH<sub>2</sub>-terminal amino acid of this peptide and one nonsense codon after its COOH-terminal codon were built into the nucleotide sequence. To facilitate the insert into plasmid DNA, the 5' ends of this fragment have single-stranded cohesive termini for the Eco RI and Bam HI restriction endonucleases. This polynucleotide was prepared from the four chemically synthesized 13-nucleotide long segments by the action of T4 DNA ligase.