



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.962.32.07

СИНТЕЗ СТРУКТУРНОГО ГЕНА БРАДИКИНИНА

Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В.,
Болдырева Е. Ф., Чернов Б. К., Колосов М. Н.

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

С целью изучения экспрессии простейших генетических структур нами осуществлен химико-энзиматический синтез неприродного структурного гена пептидного тканевого гормона брадикинина. Этот ген (рис. 1) сконструирован аналогично искусственному гену соматостатина [1] с учетом частоты использования вырожденных кодонов в геномах колифагов. Его центральная часть (нуклеотиды 9—35) предназначена кодировать аминокислотную последовательность брадикинина; она ограничена спереди иницирующим триплетом ATG*, а сзади — тандемом терминирующих триплетов TGA и TAG. На концах гена имеются «половинные сайты»

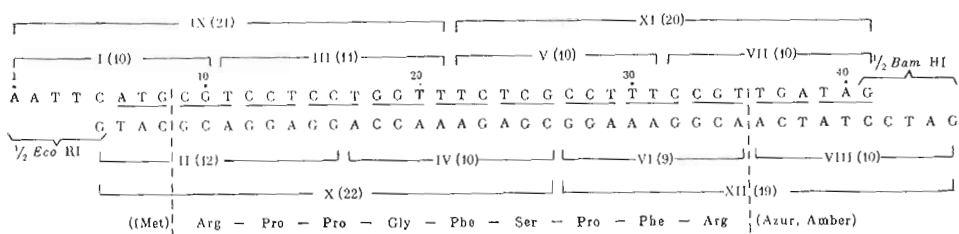


Рис. 1. Искусственный структурный ген брадикинина и кодируемая им аминокислотная последовательность. Подчеркнуты триплеты, соответствующие кодам мРНК. Римскими цифрами обозначены синтезированные олигонуклеотиды и продукты их лигазной сшивки, в скобках указана их величина (число мононуклеотидных звеньев)

рестриктаз *EcoRI* и *BamHI* для интеграции с вектором и последующей регенерации из рекомбинантной ДНК.

При планировании схемы синтеза ген был разделен на 8 сегментов таким образом, чтобы их гибридизация приводила к достаточно большому (≥ 4 нуклеотидных пар) перекрыванию комплементарных последовательностей и обеспечивала однозначное протекание реакции лигазного сшивания. Эти 8 сегментов, представляющие собой олигодезоксирибонуклеотиды (I)–(VIII) длиной от 9 до 12 звеньев, были синтезированы фосфоритриэфирным методом [2] исходя из соответствующих нуклеозидов и 3'-мононуклеотидов, в которых 5'-гидроксил защищен диметокситригильной группой, фосфатный остаток — *n*-хлорфенильной и β -цианэтильной груп-

* Все упоминаемые в статье нуклеотиды относятся к дезоксирияду, поэтому префикс d для краткости везде опущен.

ных количеств (^{33}pII), ($^{33}\text{pIII}$) и (^{33}pIV) с 10%-ным избытком (I) отжи- гали в буфере, содержащем 67 мМ трис·HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl_2 , 10 мМ дитиотреит, 0,1 мМ АТР, и спшивали Т4 ДНК-лигазой (800 ед/мл) при 10°. Через 4 ч, когда 50% ^{33}p -групп приобрели устойчивость к бактериаль- ной щелочной фосфатазе, хроматографией на сефадексе G-50 был выделен двухцепочечный олигонуклеотид (IX)·(^{33}pX) с выходом 75%. Его струк- тура была подтверждена анализом ближайших соседей (гидролиз фосфо- диэстеразой змеиного яда: ^{33}pG и ^{33}pC , 1:1; гидролиз микрококковой нуклеазой+фосфодиэстераза селезенки: C^{33}p и A^{33}p , 1:1) и доказана мо- дифицированным [5, 6] методом Максама — Гилберта [7] после введения 5'- ^{32}P -метки (см. выше). Затем аналогичным лигированием (^{33}pV) с ($^{33}\text{pVII}$) и (^{33}pVI) с (VIII) был получен с выходом 80% дуплекс (^{33}pXI)·(XII), структура которого была доказана теми же методами (гид- ролиз фосфодиэстеразой змеиного яда: ^{33}pA , ^{33}pC и ^{33}pT , 1:1:1; гидролиз микрококковой нуклеазой+фосфодиэстераза селезенки: A^{33}p и T^{33}p , ~1:1).

На заключительной стадии синтеза две половины гена были спшиты между собой. Для этого смесь (IX)·(^{33}pX) и (^{32}pXI)·(XII) (по 25 пмоль каждого) инкубировали с 80 ед. Т4 ДНК-лигазы в указанном выше буфе- ре 4 ч при 10°. После хроматографии на сефадексе G-75 был получен син- тетический ген брадикинина с выходом 85%. С целью доказательства структуры его 5'- ^{32}P -фосфорилировали и дополнительно очистили электро- форезом в 15% полиакриламидном геле, но разделить комплементарные цепи по методу [7] или [8] не удалось. Поэтому для введения одиночной 5'- ^{32}P -метки был использован обходный путь. Дуплекс (^{33}pXI)·(XII) ^{33}P -фосфорилировали по 5'-концу нижней цепи и затем лигировали (2 ч при 10°) с дуплексом (IX)·(^{33}pX). Продукт лигазной спивки выделили хро- матографией на сефадексе G-50, ^{32}P -фосфорилировали полинуклеотидки- назой и гидролизовали рестриктазой *Bam*HI в буфере, содержащем 0,1 М трис·HCl (pH 7,5), 5 мМ MgCl_2 и 10 мМ меркаптоэтанол. Полученный таким путем 5'- ^{32}P -мономеченный ген брадикинина был очищен электрофо- резом в 20% полиакриламидном геле в присутствии 7 М мочевины, и структура его верхней цепи была доказана химической деградацией по модифицированному методу Максама — Гилберта (рис. 2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heineker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. (1977) Science, 198, 1056—1063.
2. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. (1977) Nucleic Acids Res., 4, 353—371.
3. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. С., Быстров Н. С., Болдырева Е. Ф., Чернов В. К., Колосов М. Н. (1978) Биоорган. химия, 4, 1600—1611.
4. Jay E., Vambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) Nucleic Acids Res., 1, 331—353.
5. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) Биоорган. химия, 3, 1420—1422.
6. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. (1978) Биоорган. химия, 4, 1281—1283.
7. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 560—564.
8. Szalay A. A., Crohmann K., Sinsheimer R. L. (1977) Nucleic Acids Res., 4, 1569—1578.

Поступило в редакцию
5.1.1979

THE SYNTHESIS OF A STRUCTURAL GENE FOR BRADYKININ

DOBRYNIN V. N., KOROBKO V. G., SEVERTSOVA I. V.,
BOLDYREVA E. F., CHERNOV B. K., KOLOSOV M. N.

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

An artificial structural gene for the peptide hormone bradykinin has been prepared by T4 DNA ligase catalyzed joining of eight chemically synthesized oligodeoxynucleotides. It is a short double stranded DNA (37 b.p. long) with 5'-protruding left and right ends identical to ones generated by restriction nucleases *Eco*RI and *Bam*I, respectively. The gene consists of nine sense triplets (coding for the amino acid sequence of bradykinin) preceded by the initiation triplet (ATG) and followed by the two termination triplets (TGA and TAG). Its nucleotide sequence was proved by the nearest neighbour analysis and by the modified Maxam-Gilbert method.