



УДК 577.11 : 547.962.32.04

СИНТЕЗ И КЛОНИРОВАНИЕ ИСКУССТВЕННОГО  
СТРУКТУРНОГО ГЕНА ПЕПТИДА СНАДобрынин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В.,  
Власов В. П., Быстров Н. С., Колосов М. Н.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Ранее нами был синтезирован ген пептидного гормона брадикинина [1] и осуществлено его слияние *in vitro* с природным геном *lacZ* *E. coli* в составе плазмидного вектора [2]. Было показано [3], что полученная рекомбинантная плазида кодирует *in vivo* биосинтез гибридного белка, при расщеплении которого бромцианом образуется физиологически активный брадикинин. Продолжая исследования по созданию искусственных генов простейших пептидов, мы предприняли синтез ДНК, кодирующей аминокислотную последовательность Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu. Этот пептид является одним из нейрогормонов мозга и в эксперименте на животных вызывает такие изменения электроэнцефалограммы (дельта-ритмы), которые характерны для состояния сна, в связи с чем он получил название пептида сна (*delta sleep inducing peptide, DSIP* [4]).

Подобно брадикинину пептид сна не содержит остатков метионина, что позволяет использовать для его биосинтеза тот же общий подход, основанный на бромциановом расщеплении белка-предшественника, как это было впервые осуществлено К. Итакурой и др. [5] в случае соматостатина. Поэтому мы сконструировали ген пептида сна (рис. 1) аналогично гену брадикинина [1], за исключением его смысловой последовательности, заключенной между метиониновым и терминирующими триплетами. При проектировании этой последовательности основывались на литературных данных [6] о том, какие из вырожденных кодонов предпочтительно встречаются в матричных РНК, интенсивно транслируемых белоксинтезирующим аппаратом *E. coli*.

Структурный ген пептида сна был нами синтезирован в двух вариантах: с «липкими» концами *EcoRI/BamHI* (а) и *BamHI/SalI* (б) для встраивания в разные клонирующие векторы. В каждом варианте ген представлял собой дуплекс (XIII) · (XIV), состоящий из двух 41-звенных цепей, которые были получены лигазным шиванием 10–11-членных олигонуклеотидов (I)–(VIII), синтезированных фосфотриэфирным методом.

Использованный в первом варианте декануклеотид (VIIIa) был нами получен ранее [1, 2], а ундекануклеотид (VII) был синтезирован в настоящей работе из защищенного гексамера TGATAG (полупродукт в синтезе гена брадикинина [2]) и защищенного пентануклеотида GTCAg, полученного по схеме 1+(2+2). Синтез остальных восьми олигонуклеотидов, (Ia),

(Iб), (II) — (VI) и (VIIIб), проводили в направлении 3' → 5', наращивая цепь преимущественно динуклеотидными блоками.

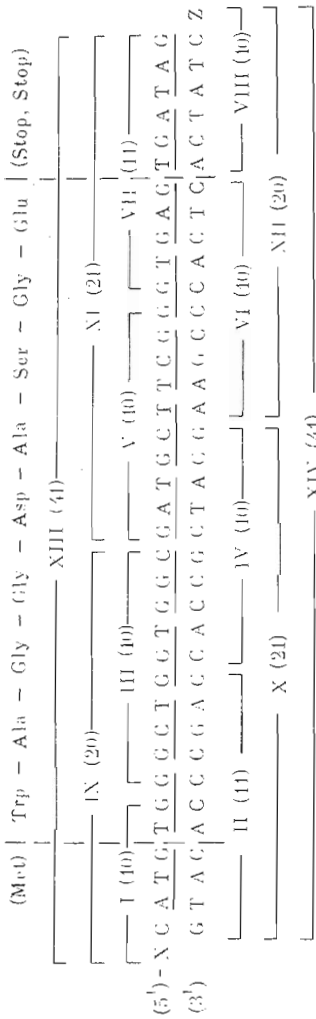
Исходными веществами для получения этих блоков служили синтезированные ранее [1, 2] цианэтилхлорфениловые эфиры N-защищенных 2'-дезоксиз-3'-нуклеотидов (5'-ОН-компоненты межнуклеотидных конденсаций) и триэтиламмониевые соли 5'-диметокситриэтил-N-ацил-2'-дезоксинуклеозид-3'-хлорфенилфосфатов (P-компоненты), которые, в свою очередь, синтезировали из защищенных нуклеозидов и *n*-хлорфенилфосфобистриазолидата в пиридине с последующим гидролизом фосфазолидных групп бикарбонатом триэтиламония. Полученные соли были устойчивы при хранении в пиридиновом растворе при -20° С по меньшей мере в течение месяца; фосфорилирование ими мононуклеотидных 5'-ОН-компонентов проводили по методу [7] действием триизопробилбензолсульфохлорида в присутствии 3 моль тетразола. Дальнейшие межнуклеотидные конденсации («двоек» и более крупных блоков) осуществляли с помощью триизопробилбензолсульфотетразолида. Полностью защищенные продукты конденсации выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя растворами метанола в хлороформе под давлением 2—4 атм. Для удаления P-цианэтильных групп использовали смесь триэтиламин — пиридин — вода (1 : 3 : 1) [8], а 5'-детритилирование, полное деблокирование, выделение незащищенных олигонуклеотидов и доказательство их структуры проводили как описано ранее [2].

Энзиматическое сшивание синтетических олигонуклеотидов в каждом из двух вариантов синтеза было выполнено в три этапа: [(I)+(III)] · [(II)+(IV)] → (IX) · (X), затем [(V)+(VII)] · [(VI)+(VIII)] → (XI) · (XII) и, наконец, (IX) · (X) + (XI) · (XII) → (XIII) · (XIV).

Для получения левой половины гена смесь эквимольных количеств олигонуклеотидов (II), (III) и (IV) фосфорилировали T4-полинуклеотидкиназой, после чего прибавляли 15% избыток декануклеотида (Ia) или (Iб), смесь отжигали и образовавшийся четырехкомпонентный комплекс [(Ia) или (Iб)] · (pII) · (pIII) · (pIV) сшивали T4-ДНК-лигазой в течение 4 ч при 7° С. Продукты сшивки выделяли хроматографией на сефадексе G-50; дуплекс (IXa) · (pX) был получен с выходом 75%, а дуплекс (IXб) · (pX) — с выходом 68%. Для структурного анализа оба дуплекса дефосфорилировали бактериальной щелочной фосфатазой, затем вводили 5'-концевую метку действием T4-полинуклеотидкиназы в присутствии [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]гАТФ, комплементарные цепи разделяли (электрофорезом на ацетилцеллюлозе в 7 М мочевины с последующей гомохроматографией на DEAE-целлюлозе) и их нуклеотидную последовательность определяли модифицированным методом Максама — Гилберта, как в работе [2].

Аналогично синтезирована правая половина гена: лигированием олигонуклеотидов (pV), (pVI) и (pVII) с (VIIIa) был получен дуплекс (pXI) · (XIIa) (выход 63%), а с (VIIIб) — дуплекс (pXI) · (XIIб) (выход 75%). На заключительном этапе синтеза обе половины гена были таким же способом соединены между собой, причем *EcoRI/BamHI*-дуплекс (XIIIa) · (XIVa) выделен на биогеле А 0,5 m с выходом 60%, а *BamHI/SalI*-дуплекс (XIIIб) · (XIVб) — с выходом 88%. Структура этих двух промежуточных и двух конечных продуктов синтеза была доказана тем же методом, что и в предыдущих лигазных сшивках.

Синтезированный ген с «липкими» концами *EcoRI/BamHI* был интегрирован в плазмиде pBR322. С этой целью плазмидную ДНК гидролизовали рестриктазами *EcoRI* и *BamHI*, больший фрагмент отделяли центрифугированием в градиенте сахарозы и лигировали с 5'-фосфорилированным синтетическим дуплексом (pXIIIa) · (pXIVa). Полученным веществом трансформировали *E. coli* HB101 по методу [9], трансформанты отбирали на среде, содержащей ампициллин (25 мкг/мл), и проверяли на чувствительность к тетрациклину. Из Ar<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>-колоний была выделена рекомбинантная плаزمид, обозначенная pDSP1, структура которой доказана рест-



a: X = AATT, Z = GATC (3'); б: X = GATC, Z = TCGA (3')

Рис. 4. Искусственный структурный ген пептида сна и кодируемая им аминокислотная последовательность: *a* — дуплекс *EcoRI/VamHI*, *б* — дуплекс *VamHI/SalI*. Подчеркнуты триплеты, соответствующие кодам мРНК. Рямскими цифрами обозначены синтезированные олигонуклеотиды и продукты их лигазного сшивания, в скобках указана их величина (число мононуклеотидных звеньев)

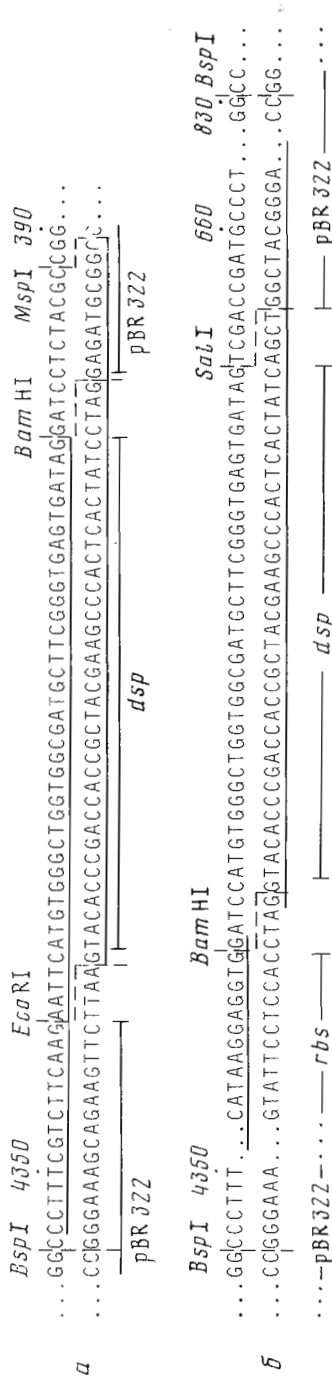


Рис. 2. Структура гена пептида сна (*dsp*) и примыкающих участков ДНК в рекомбинантных плазидах *pDSP1 (a)* и *pDSP2 (б)*. Подчеркнуты нуклеотидные последовательности, экспериментально установленные в настоящей работе. Цифры — радиус нуклеотидов *pBR 322* дана по Сатклиффу [10].

риктным анализом (с *BspI* и *MspI*) и определением нуклеотидной последовательности в области синтетической вставки. Для этого плазмиду рDSP1 разрезали эндонуклеазой *EcoRI*, 3'-концы достраивали ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) с [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP+dTTP, радиоактивную ДНК гидролизовали нуклеазой *MspI* и меченый *EcoRI/MspI*-фрагмент длиной около 55 пар оснований (п. о.) выделяли электрофорезом в 5% полиакриламидном геле (ПАГ). В параллельном эксперименте использовали соответственно *BamHI*, [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP+[ $\alpha$ - $^{32}$ P]dGTP+dCTP+dTTP, *BspI* и получили меченый *BspI/BamHI*-фрагмент длиной 61 п. о. Результаты определения нуклеотидной последовательности обоих фрагментов модифицированным методом Максама — Гилберта представлены на рис. 2а.

Вектором для синтетического гена с «липкими» концами *BamHI/SalI* послужила сконструированная нами плазида рBRD22, которая является производным рBR322 и отличается тем, что в ней сегменты *EcoRI* — *BamHI* и *BamHI* — *SalI* заменены другими фрагментами ДНК, причем непосредственно перед участком узнавания *BamHI* находится последовательность Шайна — Дальгарно сайта связывания рибосомы (*rbs*). Эту плазмиду гидролизовали рестриктазами *BamHI* и *SalI*, больший фрагмент выделяли электрофорезом в 4,5% ПАГ и лигировали с 5'-фосфорилированным дуплексом (рXIIIб) · (рXIVб). Последующие стадии — трансформацию *E. coli* HB101 и селекцию трансформантов — проводили так же, как в варианте а, но для рестриктного анализа плазмидной ДНК из  $\text{Ar}^{\text{r}}\text{Tc}^{\text{s}}$ -клонов использовали эндонуклеазу *HindII*. Рекombинантная плазида рDSP2, в которой число (три) и расположение сайтов *HindII* соответствовало ожидаемому, была далее проанализирована аналогично плазмиде рDSP1 (см. выше), т. е. путем расщепления рестриктазой *BamHI*, достройки 3'-концов  $\alpha$ -мечеными dATP+dGTP и немечеными dCTP+dTTP с последующим гидролизом *BspI* и определением нуклеотидной последовательности методом Максама — Гилберта. Установленная при этом первичная структура изображена на рис. 2б.

Таким образом, нами осуществлены в двух вариантах химико-ферментативный синтез искусственного структурного гена пептида сна (*dsp*) и его клонирование в плазмидных векторах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Чернов Б. К., Колосов М. Н. Синтез структурного гена брадикинина. — Биорган. химия, 1979, т. 5, № 5, с. 776—778.
2. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Северцова И. В., Чернов Б. К., Колосов М. Н., Городецкий С. И., Слюсаренко А. Г., Капелинская Т. В., Лисенков А. Ф., Дубинин Н. П. Синтез олиго- и полинуклеотидов. XXVIII. Химико-ферментативный синтез и клонирование искусственного структурного гена брадикинина. — Биорган. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1802—1815.
3. Городецкий С. И., Капелинская Т. В., Лисенков А. Ф., Слюсаренко А. Г., Дубинин Н. П. Клонирование и выражение химически синтезированной гена гормона пептида брадикинина в бактериальной клетке. — Докл. АН СССР, 1980, т. 250, № 1, с. 208—212.
4. Monnier M., Dudler L., Gachter R., Maier P. F., Tobler H. J., Schoenenberger G. A. The delta sleep inducing peptide (DSIP). Comparative properties of the original and synthetic nonapeptide. — *Experientia*, 1977, v. 33, № 4, p. 548—552.
5. Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W. Expression in *E. coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. — *Science*, 1977, v. 193, p. 1056—1063.
6. Grantham R., Gautier C., Gouy M. Codon frequencies in 119 individual genes confirm consistent choices of degenerate bases according to genome type. — *Nucleic Acids Res.*, 1980, v. 8, № 9, p. 1893—1912.
7. Seth A. K., Jay E. A study of the efficiency and the problem of sulfonation of several condensing reagents and their mechanisms for the chemical synthesis of deoxyoligoribonucleotides. — *Nucleic Acids Res.*, 1980, v. 8, № 22, p. 5445—5459.
8. Crea R., Krasziowski A., Hirose T., Itakura K. Chemical synthesis of genes for human insulin. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, № 12, p. 5765—5769.
9. Hershey J. D., Boyer H. W., Yanofsky C., Lovett N. A., Helinski D. R. Plasmid ColE1

- as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 9, p. 3455—3459.
10. Sutcliffe J. G. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322.— Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1978, v. 43, p. 77—90.

Поступило в редакцию  
25.VI.1981

## SYNTHESIS AND CLONING OF AN ARTIFICIAL STRUCTURAL GENE FOR DELTA SLEEP INDUCING PEPTIDE

DOBRYNIN V. N., KOROBKO V. G., SEVERTSOVA I. V.,  
VLASOV V. P., BYSTROV N. S., KOLOSOV M. N.

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

An artificial structural gene for delta sleep inducing peptide has been constructed of deoxyoligonucleotides (I)–(VIII) prepared by the phosphotriester method using TPS-tetrazolide as a coupling reagent. The oligonucleotides were joined in three steps by four-component ligations [(I+III)]·[(II+IV)], [(V+VII)]·[(VI+VIII)] and (IX)·(X)+(XI)·(XII), two series of the ligations having been carried out starting with the oligonucleotides (1) and (VIII) of both the a and b type and resulting in the *EcoRI*/*BamHI* and *BamHI*/*SalI* terminated double-stranded DNAs (XIIIa)·(XIVa) and (XIIIb)·(XIVb), respectively. The synthetic DNAs were inserted into plasmid vectors by substitution of the respective restriction endonucleases fragments. On cloning the former DNA in pBR322 and the latter one in pBRD22 (a substitution derivative of pBR322), two recombinant plasmids designated pDSP1 and pDSP2, respectively, have been isolated. The structures of the synthetic and recombinant DNAs obtained were proved by sequence determination by the Maxam — Gilbert method.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

---

Сдано в набор 20.08.81      Подписано к печати 30.09.81      Т-24028      Формат бумаги 70×108<sup>1</sup>/<sub>16</sub>  
Высокая печать      Усл. печ. л. 14,0      Усл. кр.-отт. 12,5 тыс.      Уч.-изд. л. 14,2      Бум. л. 5,0  
Тираж 878 экз.      Зак. 747

---

Издательство «Наука». 103717, ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21  
2-я типография издательства «Наука». 121099, Москва, Шубинский пер., 10