



УДК 547.963.32.04

ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ФАГА Т7 И ЕЕ КЛОНИРОВАНИЕ. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ Т7 С СИНТЕТИЧЕСКИМ ПРОМОТОРОМ IN VITRO

*Иванова Е. М., Кутявин И. В., Шлетнев А. Г.,
Шаманин В. А.*

*Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Пять олигодезоксирибонуклеотидов длиной от 6 до 12 звеньев синтезированы фосфоритриэфирным методом, исходя из 5'-*n*-хлорфениловых эфиров нуклеотидов, и сплиты при помощи ДНК-лигазы-Т4 в 23-звенный двухцепочечный полинуклеотид, представляющий собой промоторный участок для РНК-полимеразы фага Т7. Показано, что синтетический промотор образует с РНК-полимеразой Т7 двойной комплекс и обеспечивает специфическую транскрипцию *in vitro*. Исследована топография взаимодействия РНК-полимеразы Т7 с синтетическим промотором. Получены рекомбинантные плазмидные ДНК, содержащие синтетический промотор для РНК-полимеразы Т7. Методом Максама — Гилберта определена первичная структура синтетического промотора до и после его клонирования. Показано, что ДНК рекомбинантной плазмиды, содержащая промотор, стимулирует синтез РНК в присутствии РНК-полимеразы фага Т7 в системе *in vitro*.

Одним из наиболее интересных примеров белок-нуклеинового взаимодействия является взаимодействие РНК-полимераз с промоторами в процессе транскрипции. Исследовать структурно-функциональные взаимоотношения фермента и промотора в процессе транскрипции можно, лишь зная первичную структуру как промотора, так и РНК-полимеразы. Ранее в работах [1, 2] была установлена нуклеотидная последовательность гена I.0 ДНК фага Т7, кодирующего фагоспецифичную РНК-полимеразу, которая представляет собой односубъединичный белок с молекулярной массой около 98 000. Благодаря простой организации по сравнению с бактериальными РНК-полимеразами и в силу того, что РНК-полимеразе Т7 присущи все функции фермента матричного синтеза, она является удобным объектом для исследования молекулярных механизмов белок-нуклеинового взаимодействия.

С целью изучения функциональной топографии комплекса РНК-полимеразы фага Т7 с промотором мы предприняли химико-ферментативный синтез промоторного участка (промотор генов III класса) ДНК фага Т7 и клонирование его в плазмидном векторе, так как химико-ферментативный подход дает возможность получать промоторный участок в индивидуальном виде и необходимых количествах для исследований подобного рода. Выбор объекта определялся прежде всего тем, что промоторы генов III класса являются наиболее сильными, под их контролем осуществляется транскрипция структурных генов фага Т7, и структура этих промоторов обладает значительной консервативностью: 23 пары оснований для этого класса промоторов идентичны [3].

Для получения промоторной области РНК-полимеразы фага Т7 последовательность 23-звенного двухцепочечного полинуклеотида была условно разбита на пять сегментов (III), (VII), (XIII), (XVIII), (XXV) (см. схему 1), химический синтез которых осуществляли по ранее опубликован-

Использованы стандартные сокращения, рекомендуемые комиссией по номенклатуре IUPAC — IUB; символ \neq применен для обозначения триэфирной межнуклеотидной связи, символ δ в сокращенном написании дезоксирибонуклеотидов везде опущен; BSNF — бензолсульфонитротриазолид, ПААГ — полиакриламидный гель.

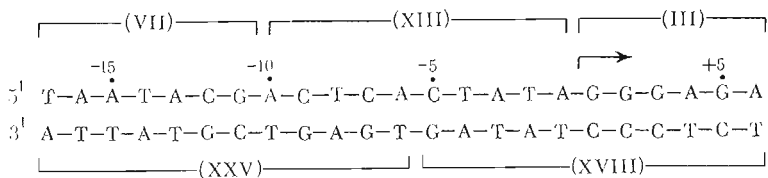


Схема 1. Промотор РНК-полимеразы фага T7. (III), (VII), (XIII), (XVIII), (XXV) — олигонуклеотиды, синтезированные в данной работе. Точка инициации транскрипции РНК-полимеразой T7 показана стрелкой

ному триэфирному методу [4]. Схема синтеза промотора составлялась таким образом, чтобы гибридизация всех олигонуклеотидов приводила к перекрыванию комплементарных последовательностей и обеспечивала одностороннее протекание реакции лигирования.

В качестве исходных мономеров использовал $5'$ -*n*-хлорфенил- $5'$ - β -цианэтил-N-ацилднклеозид- $5'$ -фосфаты (ОН-компонент) и $5'$ -*n*-хлорфенил-N-ацил- $3'$ -O-левулинил- $5'$ -фосфаты (Р-компонент). Аминогруппы гетероциклических оснований блокировали обычным способом: гуанин — изобутирильной, цитидин — анизольной, аденин — бензольной защитными группами. Для блокирования $5'$ -концевого фосфата олигонуклеотидов (III), (XXV), (XIII), (XVIII) использовали дицианэтильную защитную группу, для блокирования $5'$ -ОН-группы гептануклеотида (VII) — метокситриэтильную.

Наращивание олигонуклеотидной цепи проводили блочным методом. Р-компонент получали удалением $5'$ -Р-защитной цианэтильной группы олигонуклеотида, ОН-компонент — удалением $3'$ -левулинильной группы. Конденсирующий реагент бензолсульфонитротриазолид на всех стадиях синтеза использован в 2–3-кратном избытке по отношению к Р-компоненту. Время конденсации 1–2 ч. Соотношение Р- и ОН-компонентов, за исключением нескольких конденсаций, близко к эквимолярному (см. табл. 1–5).

Синтез гексануклеотида (III) проводили конденсацией триплеклеотидов (I) (ОН-компонент) и (II) (Р-компонент) (см. табл. 1 и схему 2).

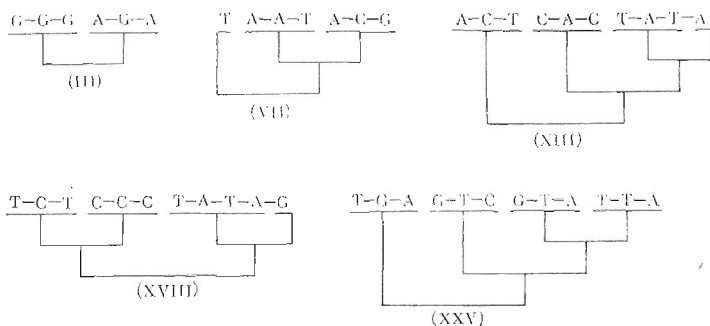


Схема 2. Принципиальная схема синтеза олигонуклеотидных сегментов верхней (III, VII, XIII) и нижней цепи (XVIII, XXV) промоторного фрагмента (см. схему 1)

Гептануклеотид (VII) был получен по схеме $4+(3+3)$ (см. табл. 2 и схему 2). Первоначально из триплеклеотидов (IV) и (V) был осуществлен синтез гексануклеотида (VI), который затем использовали в качестве Р-компонента в синтезе гептануклеотида (VII) при взаимодействии с (MeOTr)T.

Синтез декаплеклеотида (XIII) проводили по схеме $3+[3+(3+1)]$ (см. табл. 3).

Тетрануклеотид (XI), полученный конденсацией триплеклеотида (X) и мононуклеотида, использовали в качестве Р-компонента в синтезе гептануклеотида (XII) при взаимодействии его с триплеклеотидом (IX). Дека-

Условия синтеза гексануклеотида pG-G-A-G-A (III)

Олигонуклеотид	OH-Компонент, ммоль	P-Компонент, ммоль	BSNT, ммоль	Pу, мл	t, ч	ВЫХОД, %	R(Tr) T*
(CNEt) ₂ pbG \mp ibG \mp ibG (Lev) (I)	(CNEt) ₂ pbG, 0,037	(ClPh)pbG \mp ibG (Lev), 0,037	0,10	0,4	1	32	0,44
(CNEt) ₂ pbG \mp ibG \mp ibG (Ia)	(CNEt, ClPh)pbzA, 0,04	(ClPh)pbG \mp bzA (Lev), 0,042	0,10	0,4	1	65	0,18
(CNEt, ClPh)pbzA \mp ibG \mp bzA (Lev) (II)	(CNEt) ₂ pbG \mp ibG \mp ibG, 0,007	(ClPh)pbzA \mp ibG \mp bzA (Lev), 0,015	0,045	0,2	4,5	82	0,92
(CNEt) ₂ pbG \mp ibG \mp ibG \mp bzA (Lev) (III)						77	0,43

* Здесь и в других таблицах — подвижность олигонуклеотида относительно 5'-трифитими дна по данным ТСХ.

Условия синтеза гептануклеотида T-A-A-T-A-C-G (VII)

Олигонуклеотид	OH-Компонент, ммоль	P-Компонент, ммоль	BSNT, ммоль	Pу, мл	t, ч	ВЫХОД, %	R(Tr) T
(CNEt, ClPh)pbzA \mp bzA \mp T (Lev) (IV)	(CNEt, ClPh)pbzA \mp bzA, 0,15	(ClPh) pT (Lev), 0,16	0,32	0,75	1	79	1,05
(CNEt, ClPh)pbzA \mp bzA \mp T (IVa)	(CNEt, ClPh)pbzA \mp anC, 0,08	(ClPh)pbG (Lev), 0,08	0,16	0,40	1	92	0,71
(CNEt, ClPh)pbzA \mp anC \mp ibG (Lev) (V)	(CNEt, ClPh)pbzA \mp bzA \mp T, 0,053	(ClPh)pbzA \mp anC \mp ibG (Lev), 0,053	0,11	0,10	1,5	66	0,97
(CNEt, ClPh)pbzA \mp bzA \mp T \mp bzA \mp anC \mp ibG (Lev) (VI)	(MTr)T, 0,054	(ClPh)pbzA \mp bzA \mp T \mp bzA \mp anC \mp ibG \mp anC \mp ibG (Lev), 0,042	0,084	0,10	2	79	0,94
(MeOTr)T \mp bzA \mp bzA \mp T \mp bzA \mp anC \mp ibG (Lev) (VII)						66	1,09

Условия синтеза декануклеотида pA-C-T-C-A-C-T-A-T-A (XIII)

Олигонуклеотид	OH-Компонент, ммоль	P-Компонент, ммоль	BSNT, ммоль	PV, мл	t, ч	Выход, %	R(Tp)T
(CNEt, ClPh) panC≡bzA≡anC(Lev) (IX)	(CNEt, ClPh) panC, 0,08	(ClPh) pbzA≡anC(Lev), 0,08	0,16	0,3	1	56	1,09
(CNEt, ClPh) panC≡bzA≡anC (IXa)	(CNEt, ClPh) pT≡bzA, 0,16	(ClPh) pT(Lev), 0,18	0,36	0,4	1	97	0,95
(CNEt, ClPh) pT≡bzA≡T(Lev) (X)	(CNEt, ClPh) pT≡bzA, 0,16	(ClPh) pT≡bzA≡T(Lev), 0,059	0,12	0,5	2	96	0,75
(CNEt, ClPh) pT≡bzA≡T (Xa)	(CNEt) ₂ pbzA, 0,059	(ClPh) panC≡T(Lev), 0,05	0,10	0,3	1,5	88	0,77
(CNEt) ₂ pbzA≡anC≡T (VIIIa)	(CNEt, ClPh) pT≡bzA≡T, 0,11	(ClPh) pbzA(Lev), 0,13	0,27	1	1	79	1,00
(CNEt, ClPh) pT≡bzA≡T≡bzA(Lev) (XI)	(CNEt, ClPh) panC≡bzA≡anC, 0,04	(ClPh) pT≡bzA≡T≡bzA(Lev), 0,05	0,10	0,3	1,5	85	1,09
(CNEt, ClPh) panC≡bzA≡anC≡T≡bzA≡T≡bzA(Lev) (XII)	(CNEt) ₂ pbzA≡anC≡T, 0,037	(ClPh) panC≡bzA≡anC≡T≡bzA≡T≡bzA(Lev), 0,037	0,075	0,2	2	~	1,06

Условия синтеза undекануклеотида pT-C-T-C-C-T-A-T-A-G (XVIII)

Олигонуклеотид	OH-Компонент, ммоль	P-Компонент, ммоль	BSNT, ммоль	PV, мл	t, ч	Выход, %	R(Tp)T
(CNEt) ₂ pT≡anC≡T(Lev) (XIV)	(CNEt) ₂ pT, 0,12	(ClPh) panC≡T(Lev), 0,13	0,26	1	1	52	0,96
(CNEt) ₂ pT≡anC≡T (XIVa)	(CNEt, ClPh) panC, 0,15	(ClPh) panC≡anC(Lev), 0,17	0,34	0,6	1	87	0,67
(CNEt, ClPh) panC≡anC≡anC(Lev) (XV)	(CNEt) ₂ pT≡anC≡T, 0,05	(ClPh) panC≡anC≡anC(Lev), 0,09	0,18	0,5	2	61	1,06
(CNEt) ₂ pT≡anC≡T≡anC≡anC(Lev) (XVI)	(CNEt, ClPh) pT≡bzA≡T≡bzA, 0,03	(ClPh) pibC(Lev), 0,05	0,10	0,2	1,5	93	4,08
(CNEt) ₂ pT≡anC≡T≡anC≡anC (XVIa)	(CNEt) ₂ pT≡anC≡T≡anC≡anC≡T≡bzA≡T≡bzA≡ibG(Lev) (XVII)	(ClPh) pT≡bzA≡T≡bzA≡T≡bzA≡T≡bzA≡ibG(Lev), 0,018	0,04	0,1	2	90	1,00
(CNEt, ClPh) pT≡bzA≡T≡bzA≡ibG(Lev) (XVII)	(CNEt) ₂ pbzA≡anC≡T, 0,016		0,04	0,1	2	88	0,89
(CNEt) ₂ pT≡anC≡T≡anC≡anC≡T≡bzA≡T≡bzA≡ibG(Lev) (XVIII)			0,04	0,1	2	54	0,99
			0,04	0,1	2	88	1,03

Условия синтеза додекануклеотида pT-G-A-G-T-C-G-T-A-T-T-A (XXV)

Олигонуклеотид	ОН-Компонент, ммоль	Р-Компонент, ммоль	ESNT, ммоль	pV, мл	t, ч	Выход, %	P ₁ (Tr)T
(CNEt) ₂ pT≠ibG≠bza (Lev) (XIX)	(CNEt) ₂ pT, 0,045	(ClPh) pibG≠bza (Lev), 0,042	0,10	0,2	1,5	61	0,59
(CNEt) ₂ pT≠ibG≠bza (XIXa)	(CNEt, ClPh) pibG, 0,16	(ClPh) pT≠anC (Lev), 0,16	0,32	1	1	68	0,37
(CNEt, ClPh) pibG≠T≠anC (XX)	(CNEt, ClPh) pibG, 0,16	(ClPh) pT≠bza (Lev), 0,16	0,32	1	1	48	0,91
(CNEt, ClPh) pibG≠T≠anC (XXa)	(CNEt, ClPh) pibG, 0,16	(ClPh) pT≠bza (Lev), 0,16	0,32	1	1	84	0,72
(CNEt, ClPh) pibG≠T≠bza (Lev) (XXI)	(CNEt, ClPh) pT, 0,16	(ClPh) pT≠bza (Lev), 0,16	0,32	1	1	46	0,91
(CNEt, ClPh) pibG≠T≠bza (XXIa)	(CNEt, ClPh) pibG≠T≠anC, 0,047	(ClPh) pibG≠T≠bza (Lev), 0,10	0,20	0,5	1,3	94	0,63
(CNEt, ClPh) pT≠T≠bza (Lev) (XXII)	(CNEt, ClPh) pibG≠T≠anC, 0,047	(ClPh) pibG≠T≠bza (Lev), 0,10	0,10	0,2	1,5	84	1,00
(CNEt, ClPh) pibG≠T≠bza (Lev) (XXIII)	(CNEt) ₂ pT≠ibG≠bza, 0,017	(ClPh) pibG≠T≠anC≠ibG≠bza (Lev), 0,045	0,04	0,1	1,5	73	1,03
(CNEt, ClPh) pibG≠T≠anC≠ibG≠T≠T≠bza (Lev) (XXIV)							
(CNEt, ClPh) pibG≠T≠anC≠ibG≠T≠bza≠T≠T≠bza (Lev) (XXV)							

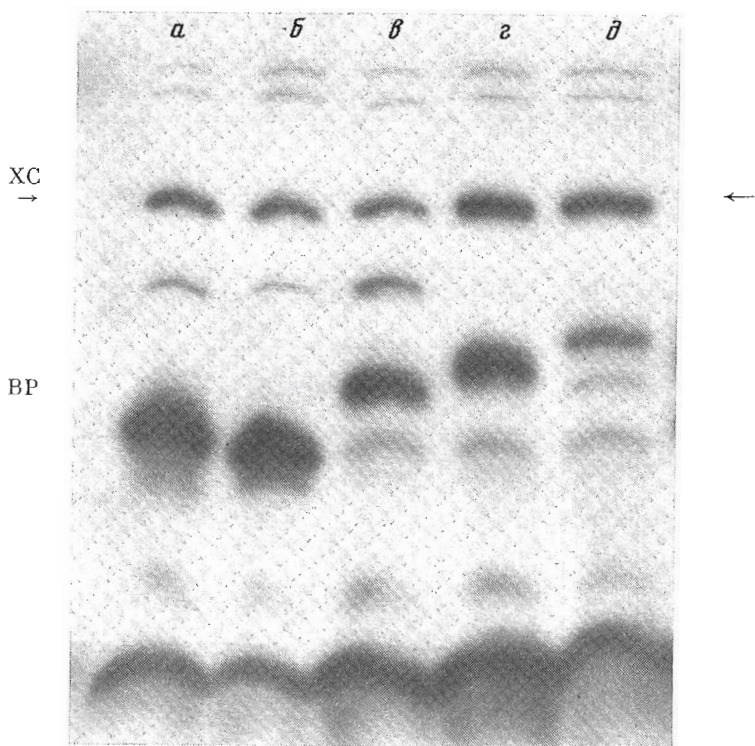


Рис. 1. Анализ продуктов лигазных сшивок олигонуклеотидов (III), (VII), (XIII), (XVIII), (XXV) (радиоавтограф электрофореграммы в 20% ПААГ с 7 М мочевиной). Реакции лигирования проводили как описано в «Экспериментальной части», где ^{32}P -меченым был взят один из олигонуклеотидов: а — олигонуклеотид (III), б — (VII), в — (XIII), г — (XVIII), д — (XXV). ХС — ксилленцианол FF, ВР — бромфеноловый синий. Стрелкой указано положение цепей 23-звенного синтетического промоторного фрагмента

нуклеотид (XIII) получали конденсацией гептануклеотида (XII) (Р-компонент) и тринуклеотида (VIII) (ОН-компонент).

Ундекануклеотид (XVIII) был получен по схеме $(3+3)+(4+1)$ (см. табл. 4) конденсацией гексануклеотида (XVI) (ОН-компонент) и пентануклеотида (XVII) (Р-компонент). Гексануклеотид (XVI) синтезировали конденсацией тринуклеотидов (XIV) (ОН-компонент) и (XV) (Р-компонент), пентануклеотид (XVII) — конденсацией тетрануклеотида (XI) и мононуклеотида.

Додекануклеотид (XXV) получали по схеме $3+[3+(3+3)]$ (см. табл. 5) последовательным наращиванием цепи тринуклеотидами. Конденсацией тринуклеотидов (XXI) и (XXII) получали гексануклеотид (XXIII), который использовали в качестве Р-компонента в синтезе попануклеотида (XXIV) при взаимодействии с тринуклеотидом (XX). Конденсацией тринуклеотида (XIX) и нонануклеотида (XXIV) был получен додекануклеотид (XXV).

Продукты межнуклеотидных конденсаций и олигонуклеотидные блоки со свободными 3'-ОН-группами, полученные после удаления левулинилльной защиты, выделяли адсорбционной хроматографией на силикаты.

Полное деблокирование синтезированных олигонуклеотидов, т. е. удаление N-ацильных, n-хлорфенильных, левулинилльных и дигидроэтильных защитных групп проводили аммонолизом [5]. (MeOTr)-группу гептануклеотида (VII) удаляли обработкой уксусной кислотой. Полностью деблокированные олигонуклеотиды выделяли ионообменной хроматографией на целлюлозе DE-32.

Энзиматическое соединение синтезированных олигонуклеотидов (III), (VII), (XIII), (XVIII) и (XXV) проводили в одну стадию. Проведено пять отдельных лигазных сшивок, где олигонуклеотиды были взяты в

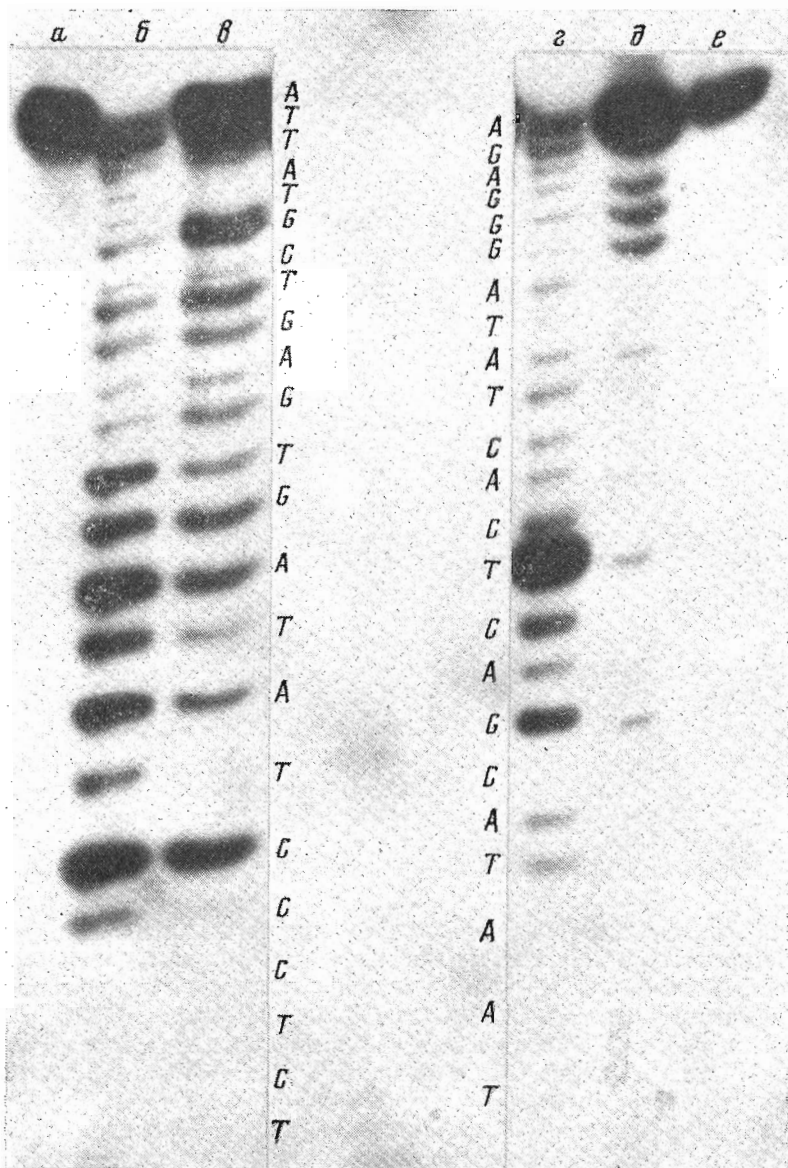


Рис. 2. Анализ продуктов гидролиза ДНКазой комплекса синтетического промотора с РНК-полимеразой T7 (радиоавтограф электрофореграммы в 20% ПААГ с 7 М мочевиной). В опытах *а-в* использовали дуплекс промотора ^{32}P -меченного по 5'-концу транскрибируемой цепи (см. рис. 1, колонка *б*); в опытах *г-е* использовали дуплекс промотора ^{32}P -меченного по 5'-концу нетранскрибируемой цепи (см. рис. 1, колонка *г*). *б, д* — продукты гидролиза дуплексов промотора ДНКазой в отсутствие РНК-полимеразы T7; *а, е* — синтетический промотор после инкубации с РНК-полимеразой T7; *в, г* — продукты гидролиза синтетического промотора ДНКазой в комплексе с РНК-полимеразой T7

эквимолярных количествах и один из них содержал 5'-концевую ^{32}P -метку. Продукты лигазных сшивок разделяли электрофорезом в 20% ПААГ с 7 М мочевиной (см. рис. 1). Цепи фрагмента длиной в 23 основания элюировали из геля электрофоретически на бумагу DE-81 и затем с бумаги вещество элюировали 1,5 М NaCl. Выход продуктов реакции лигазной сшивки составлял 31–43%. Структура цепей промоторного фрагмента, полученных таким образом (рис. 1, колонки «б» и «г»), была определена модифицированным методом Максама — Гилберта [6–8].

Цепи промоторного фрагмента отжигали при 90°С 5 мин в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl (pH 7,9), 20 мМ MgCl₂, и охлаждали до 37°С для образования дуплекса. Полученный двухцепочечный фрагмент



Рис. 3. Электрофорез транскриптов в 20% ПААГ с 7 М мочевиной. *а* – транскрипт, полученный в присутствии дуплекса синтетического промотора и РНК-полимеразы Т7, как описано в «Экспериментальной части»; *б, в* – транскрипты, полученные на фрагменте *VspI-1460* ДНК фага Т7 с помощью РНК-полимеразы *E. coli* [20]. Реакционная смесь (20 мкл) содержала: 2 пмоль матрицы, 3 мкг РНК-полимеразы *E. coli* (3000 ед. акт./мг), 25 мМ трис-НСl (рН 7,9), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол и нуклеозидтрифосфаты: *б* – 0,1 мМ УТР, [α -³²P]GTP (10 Ки/ммоль); *в* – 0,1 мМ GTP, УТР и [α -³²P]АТР (5 Ки/ммоль). Реакционную смесь инкубировали 15 мин при 37° С, добавляли 10 мкг тРНК, осаждали этанолом, осадок растворяли в 5 мкл 7 М мочевины и подвергали электрофорезу

был использован нами в дальнейшем для исследования связывания и транскрипции в присутствии РНК-полимеразы Т7. Промоторный фрагмент, ³²P-меченный по одной из цепей, инкубировали с РНК-полимеразой Т7 для образования комплекса, а затем обрабатывали панкреатической ДНКазой. Продукты гидролиза разделяли электрофорезом в 20% ПААГ с 7 М мочевиной (см. рис. 2). В качестве маркеров использовали гидролизат промоторного фрагмента, полученный в отсутствие РНК-полимеразы Т7, и промоторный фрагмент, связанный с РНК-полимеразой Т7, но не обработанный ДНКазой. После определения радиоактивности полос в геле, соответствующих продуктам гидролиза промотора в присутствии и в отсутствие РНК-полимеразы Т7, можно сделать качественные выводы о топографии взаимодействия РНК-полимеразы Т7 с синтетическим промотором. Из результатов, представленных на рис. 2, видно, что в случае, когда используется промотор, ³²P-меченный по нетранскрибируемой *l*-цепи, РНК-полимераза Т7 облегчает гидролиз ДНКазой участка нетранскрибируемой *l*-цепи в районе тимидина, находящегося в –8-м положении относительно точки старта транскрипции. В случае, когда используется ³²P-меченная транскрибируемая цепь, РНК-полимераза Т7 в комплексе с дуплексом защищает от гидролиза ДНКазой участок от цитидина (+2) до тимидина (–6) (см. схему 1 и рис. 2) и облегчает гидролиз промотора в области, предшествующей этому участку. Полученные результаты согласуются с данными по метилированию и доступности промоторного участка к действию нуклеаз, специфичных к одноцепочечным ДНК в составе комплекса РНК-полимеразы с фрагментом ДНК фага Т7, содержащим промотор класса II или III [9, 10].

На рис. 3 представлены результаты транскрипции синтетического промотора РНК-полимеразой Т7 в присутствии GTP и [α -³²P]АТР. В качестве маркеров для определения длины транскриптов использовали РНК, синтезируемые РНК-полимеразой *E. coli* в присутствии неполного набора

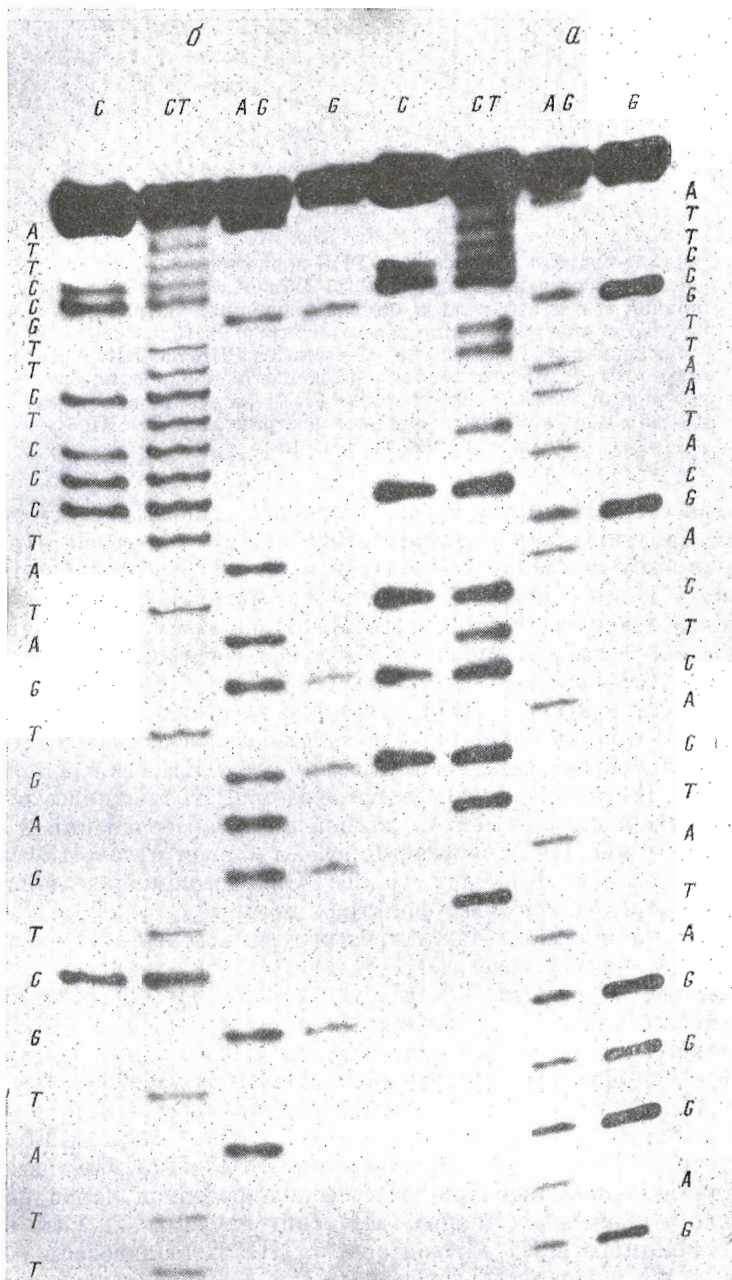


Рис. 4. Анализ нуклеотидной последовательности цепей клонированного промотора (радиоавтограф электрофореграммы 20% ПААГ с 7 М мочевиной). *а* – верхняя цепь, *б* – нижняя цепь *EcoRI*-фрагмента (см. схему 1) плазмиды pBR325-pT7a

нуклеозидтрифосфатов на промоторном фрагменте *Bsp*-1460 ДНК фага T7 [11]. Видно, что РНК-полимераза T7 синтезирует на промоторном фрагменте транскрипт длиной в 6 оснований, как и следовало ожидать в данном случае.

Таким образом, синтезированный нами 23-звенный двухцепочечный фрагмент ДНК обладает свойствами, присущими промоторам РНК-полимеразы T7.

Для клонирования синтетического промотора РНК-полимеразы T7 дуплексе лигировали с олигонуклеотидным линкером А-С-Г-Г-А-А-Т-Т-С-С-Г-Т, содержащим сайт рестрикции эндонуклеазы *EcoRI*, и после гидролиза этой рестриктазой продукты разделяли электрофорезом в 20%

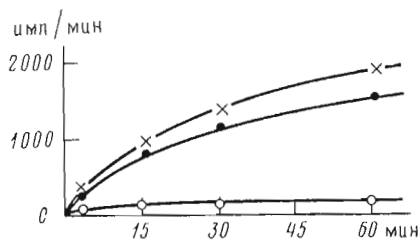


Рис. 5. Кинетика синтеза РНК РНК-полимеразой Т7 на ДНК рекомбинантной плазмиды pBR325-pT7a. Аликвоты из реакционной смеси отбирали в моменты времени, указанные на рисунке, и анализировали скорость синтеза РНК как описано в «Экспериментальной части». ○ — синтез РНК на ДНК плазмиды pBR325, предварительно расщепленной эндонуклеазой рестрикции *Bam*HI; ● — синтез РНК на ДНК плазмиды pBR325-pT7a, также расщепленной рестриктазой *Bam*HI; × — синтез РНК на ДНК ффага Т7

ПААГ. В качестве стандартов при определении длин олигонуклеотидов использовали продукты лигирования линкера самого на себя. Промотор с пришитым к нему линкером после гидролиза рестриктазой *Eco*RI должен иметь длину 35 пар оснований. Фрагмент, имеющий такую подвижность в геле, электрооблюковали на бумагу DE-81, затем смывали 1,5 М NaCl и подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50.

Для конструирования рекомбинантных ДНК с синтетическим промотором РНК-полимеразы Т7 ДНК плазмиды pBR325 гидролизировали рестриктазой *Eco*RI и дефосфорилировали щелочной фосфатазой *E. coli*. Белки удаляли фенольной экстракцией и плазмидную ДНК осаждали и промывали этанолом. Подготовленную таким образом ДНК плазмиды лигировали с *Eco*RI-промоторным фрагментом длиной в 35 пар оснований и полученной рекомбинантной ДНК трансформировали клетки *E. coli* HB101. Трансформанты отбирали по фенотипу Ar^r , Tc^r , Sm^s и с помощью гибридизации колоний на нитроцеллюлозных фильтрах по методу [12] с ^{32}P -меченым синтетическим промотором. Из четырех полученных Ar^r -, Tc^r -, Sm^s -клонов были выделены плазмидные ДНК и произведен их анализ с помощью эндонуклеаз рестрикции *Bsp*I и *Eco*RI. Анализ *Bsp*I-гидролизатов ДНК рекомбинантных плазмид, обозначенных нами как pBR325-pT7, показал, что три клона содержат идентичные вставки, а один клон — вставку, соответствующую длине двух промоторных *Eco*RI-фрагментов. Все вставки из состава ДНК плазмид выщеплялись рестриктазой *Eco*RI.

Чтобы доказать присутствие промотора РНК-полимеразы Т7 в составе рекомбинантных ДНК, одна из плазмид pBR325-pT7a была выделена в препаративном количестве. При этом была определена первичная структура вставки и произведен анализ РНК, синтезируемых *in vitro* в присутствии РНК-полимеразы Т7. С этой целью ДНК гидролизировали рестриктазой *Eco*RI и во фрагменты вводили 3'-концевую ^{32}P -метку с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* в присутствии АТФ, [α - ^{32}P]ТТР. Смесь фрагментов денатурировали прогревом в 75% диметилсульфоксиде и цепи разделяли электрофорезом в 15% ПААГ по [13]. Цепи малого *Eco*RI-фрагмента элюировали из геля и их первичную структуру определяли согласно [6–8] (см. рис. 4). Из полученных результатов следует, что ДНК плазмиды pBR325-pT7a содержит синтезированный нами промотор РНК-полимеразы Т7, который входит в состав малого *Eco*RI-фрагмента.

Матричные свойства ДНК плазмиды pBR325-pT7a были проверены после гидролиза ее эндонуклеазой *Bam*HI в системе, содержащей буфер, нуклеозидтрифосфаты, рифампицин, РНК-полимеразу Т7. Кинетика синтеза РНК РНК-полимеразой Т7 на ДНК плазмиды pBR325-pT7a приведена на рис. 5. Видно, что ДНК плазмиды pBR325-pT7a стимулирует синтез РНК в присутствии антибиотика. Это указывает на то, что синтетический промотор в составе ДНК плазмиды используется РНК-полимеразой Т7.

Таким образом, нами синтезирован 23-звенный двухцепочечный фрагмент ДНК, содержащий промотор РНК-полимеразы фага T7; исследованы его свойства при взаимодействии и при транскрипции РНК-полимеразой T7; сконструирована рекомбинантная плазмида, в которой этот промотор проявляет свои свойства. Синтетический промотор для РНК-полимеразы T7, полученный с помощью химико-ферментативного подхода, а также рекомбинантные плазмиды могут быть использованы как доступный источник промотора для проведения различных биохимических исследований белок-нуклеинового взаимодействия.

Экспериментальная часть

В работе использованы *n*-хлорфениловые эфиры N-замещенных нуклеозид-5'-фосфатов, 5'-метокситритилтимидин производства ОХП НИОХ СО АН СССР, DEAE-целлюлоза DE-32, бумага DE-81 (Whatman, Англия), силикагель Kieselgel 60 (Merck, ФРГ), сефадексы G-10, G-50 (Pharmacia, Швеция); щелочная фосфатаза, тРНК, эндонуклеазы рестрикции *Bsp*I, *Eco*RI, *Bam*HI производства СКТБ БАВ Главмикробиопром (Новосибирск), панкреатическая ДНКаза (Worthington, США). Полинуклеотидкиназа фага T4 предоставлена М. И. Ривкиным (ИЦиГ), ДНК-полимераза *E. coli* — В. В. Потаповым (ИЦиГ), ДНК-лигаза фага T4 — В. Г. Коробко (ИБХ). РНК-полимеразу фага T7 выделяли по методу [14], удельная активность фермента 120 000 ед. акт./мг. Смешанные 5'-цианэтиловые-5'-*n*-хлорфениловые эфиры N-ацилнуклеозид-5'-фосфатов и динуклеотидные блоки получены по аналогии с [15]. ТСХ проводили в системе хлороформ — метанол, 8,5:1,5. Использовали [γ -³²P]АТФ (3000 Ки/ммоль), [α -³²P]АТФ и [α -³²P]ТТР (3000 Ки/ммоль) фирмы Amersham (Великобритания). ДНК фага T7 любезно предоставлена Т. Г. Максимовой (НИОХ). ДНК плазмид рBR325 и рBR325-рT7 выделяли из клеток, выращенных на LB-среде. Амплификацию плазмидной ДНК проводили с хлорамфениколом по методу [16], а выделение ДНК — по методу [17].

Межнуклеотидная конденсация. Смесь Р- и ОН-компонентов упаривали на ротормном испарителе с абсолютным пиридином, растворяли в абсолютном пиридине и добавляли 2—3 эквивалента бензолсульфонитротриазолида. За ходом реакции следили по данным ТСХ. После окончания реакции к реакционной смеси добавляли два объема воды и инкубировали 10—20 мин. Затем раствор трижды промывали равным объемом хлороформа. Объединенные хлороформные фракции упаривали и остатки пиридина удаляли при упаривании с толуолом. Продукт конденсации выделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (50 мл). Вещество элюировали градиентом концентрации этанола в хлороформе (5—15%, 500 мл).

Удаление защитных групп. Удаление Р-защитной цианэтильной группы осуществляли по [18], 3'-О-левулинильной группы — по [19]. Полное деблокирование осуществляли добавлением 10 мл 25% раствора аммиака к 0,1 мл раствора олигонуклеотида в пиридине. Смесь выдерживали 7 сут при 20° С и затем 5 ч при 50° С. Гептануклеотид дополнительно обрабатывали 9 мл смеси пиридин — уксусная кислота — вода (1:14:3) и выдерживали 40 ч при 20° С для удаления метокситритильной группы.

Выделение олигонуклеотидов. После удаления защитных групп олигонуклеотиды хроматографировали на колонке (1,3×15 см) с DEAE-целлюлозой (DE-32) в градиенте концентрации NaCl в буфере с 7 М мочевиной и 0,01 М трис-НСl, рН 7,0 (500 мл, скорость 1 мл/мин). Рехроматографию олигонуклеотидов проводили на этой же колонке в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine при рН 3,7 (500 мл, скорость элюции 1 мл/мин).

Дефосфорилирование олигонуклеотидов. К раствору олигонуклеотида (1 нмоль в 100 мкл ТЕ-буфера (10 мМ трис-НСl (рН 8,0), 0,1 мМ EDTA)) добавляли 0,1 ед. акт. щелочной фосфатазы и выдерживали 1 ч при 37° С. Фермент удаляли экстракцией 100 мкл смеси фенол — хлороформ (3:1).

Результаты хроматографии олигонуклеотидов

Олигонуклеотид	Количество, ОЕ ₂₈₀	Хроматография, рН 7,0		Хроматография, рН 3,7	
		градиент NaCl, М	выход, ОЕ ₂₈₀	градиент NaCl, М	выход, ОЕ ₂₈₀
(III)	495	0-0,35	164		
(VII)	1460	0-0,25	405	0-0,25	300
(XIII)	1310	0-0,40	138	0-0,35	105
(XVIII)	1000	0-0,35	269	0-0,35	220
(XXV)	900	0-0,40	132	0-0,35	95

Олигонуклеотид отделяли гель-фильтрацией на колонке (3 мл) с сефадексом G-50 в ТЕ-буфере.

Фосфорилирование олигонуклеотидов. Раствор олигонуклеотида (100 пмоль) в 30 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl (рН 9,5), 1 мМ спермидин, нагревали 2 мин при 90° С, быстро охлаждали до 0° С, к нему добавляли трис-НСl, рН 9,5, до концентрации 50 мМ, MgCl₂ до 10 мМ, β-меркаптоэтанол до 10 мМ, [γ-³²P]АТР до 10 мкМ (1000 Ки/μмоль), 7 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы и инкубировали 1 ч при 37° С. Реакцию останавливали добавлением EDTA до 10 мМ и продукт реакции выделяли гель-фильтрацией на колонке (3 мл) с сефадексом G-50.

Ферментативное соединение олигонуклеотидов. Смесь олигонуклеотидов (III), (VII), (XIII), (XVIII), (XXV) по 1 нмоль каждого (один из олигонуклеотидов содержал 5'-кошцевую ³²P-метку) в 100 мкл 50 мМ трис-НСl (рН 7,4), 10 мМ MgCl₂ прогревали 5 мин при 90° С, охлаждали в течение 5 ч до 10° С и оставляли при этой температуре на 12 ч. К реакционной смеси добавляли АТР до концентрации 0,1 мМ, β-меркаптоэтанол до 10 мМ, 140 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т4 и инкубировали 12 ч при 10° С. Продукты реакции разделяли электрофорезом в пластинах (20×40××0,05 см) 20% ПААГ с 7 М мочевиной. После локализации пятен радиоактивные вещества с помощью электроэлюции переносили из геля на бумагу DE-81 в ТВЕ-буфере (50 мМ трис-борат (рН 8,3), 1 мМ EDTA). Промоторный фрагмент с бумаги DE-81 элюировали ТВЕ-буфером, содержащим 1,5 М NaCl, и осаждали этанолом. Структуру ³²P-цепей промоторного фрагмента определяли модифицированным методом Максама — Гилберта [6—8]. Продолжительность реакций модификации в данном случае составила: G—20, A+G—40, T+C и C—60 мин.

Олигонуклеотидный *EcoRI*-линкер A-C-G-G-A-A-T-T-C-C-G-T фосфорилировали как описано выше. Реакцию лингирования 1 нмоль линкера с 150 пмоль 23-звонного промоторного фрагмента проводили как описано выше. Смесь инкубировали 12 ч при 5° С, добавляли NaCl до 100 мМ и обрабатывали эндонуклеазой *EcoRI*. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20% ПААГ с 7 М мочевиной. Гель радиоавтографировали. Промоторный фрагмент с пришитым линкером после обработки рестриктазой *EcoRI* должен иметь длину 35 пар оснований. Фрагмент соответствующей величины элюировали из геля, как описано выше. Выход конечного продукта составил 20%.

Конструирование рекомбинантных плазмид. К 2 мкг ДНК плазмиды pBR325 в 50 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂ и 100 мМ NaCl, добавляли 10 ед. акт. рестриктазы *EcoRI* и инкубировали 1 ч при 37° С. Фермент инактивировали добавлением EDTA до концентрации 10 мМ, прогреванием в течение 5 мин при 65° С и экстракцией 100 мкл фенола, насыщенного ТЕ-буфером. Линеаризованную по *EcoRI*-сайту ДНК плазмиды pBR325 осаждали этанолом, осадок промывали спиртом, высушивали и растворяли в 50 мкл буфера, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 0,1 мМ АТР. К смеси добавляли 1 пмоль промоторного *EcoRI*-фрагмента (35 пар оснований) и 6 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т4. Реакционную смесь инкубировали 12 ч при 5° С и использовали для трансформации клеток *E. coli*

по методу [20]. *E. coli* HB101 выращивали в 100 мл среды LB [24] до мутности D_{550} 0,5, бактериальные клетки осаждали центрифугированием и суспендировали в 50 мл 50 мМ CaCl₂. Клетки выдерживали 30 мин при 0°С, центрифугировали (15 мин при 3500 об/мин) и суспендировали в 3 мл 50 мМ CaCl₂. К 200 мкл суспензии клеток прибавляли 30 нг смеси продуктов лигирования, указанных выше. Затем клетки инкубировали 30 мин при 0°С, 2 мин при 42°С и добавляли 1 мл среды LB. После 30 мин инкубации при 37°С смесь высевали на чашки с LB-агаром, содержащим ампициллин и тетрациклин по 20 мкг/мл. Из 24 клонов, проверенных на устойчивость к хлорамфениколу (100 мкг/мл), были обнаружены 4 клона с фенотипом Cm^r. Трансформанты *E. coli* HB101 с фенотипом Ap^r, Tc^r, Cm^r выращивали 16 ч в 5 мл среды LB, содержащей ампициллин и тетрациклин по 20 мкг/мл, при 37°С (в препаративном масштабе клетки выращивали в 250 мл LB-среды) с амплификацией плазмидной ДНК хлорамфениколом по методу [16]. Клетки осаждали центрифугированием (15 мин при 3500 об/мин) при 0°С. Плазмидные ДНК выделяли по методу [17].

Рестрикционный анализ ДНК гибридных плазмид и определение первичной структуры вставок. ДНК рекомбинантных плазмид pBR325-pT7 (20 мкг) в 20 мкл буфера, содержащего 25 мМ трис-HCl (pH 7,9), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол, гидролизовали 1 ч при 37°С в присутствии 2 ед. акт. эндонуклеазы *Bsp*I, либо 2 ед. акт. эндонуклеазы *Eco*RI, либо обеих этих эндонуклеаз. Реакционную смесь наносили на пластину (20×20×0,1 см) 4% ПААГ и проводили электрофорез в TBE-буфере в течение 4 ч при 200 В. После окрашивания геля водным раствором бромистого этидия было обнаружено, что в одном из фрагментов *Bsp*I-гидролизата ДНК плазмиды pBR 325-pT7 имеется вставка, которая удаляется из состава плазмиды при гидролизе ДНК эндонуклеазой *Eco*RI (в качестве маркеров при электрофорезе использовали гидролизаты ДНК плазмид pBR 322 и pBR 325 эндонуклеазой *Bsp*I).

После гидролиза 25 мкг ДНК одной из гибридных плазмид — pBR325-pT7a эндонуклеазой *Eco*RI фермент удаляли смесью фенол — хлороформ (3:1). ДНК осаждали 75% этанолом с 0,5 М NaOAc, осадок промывали этанолом, высушивали и растворяли в 20 мкл буфера, содержащего 20 мМ трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 0,1 мМ dATP, 2 мМ [α-³²P]TTP (3000 Ки/ммоль). К смеси прибавляли 4 ед. акт. ДНК-полимеразы I *E. coli* и инкубировали 30 мин при 20°С, затем добавляли EDTA до 10 мМ, NaCl до 0,5 М и ДНК осаждали этанолом, осадок промывали спиртом и растворяли в 75% диметилсульфоксиде с 0,05% бромфеноловым синим. Смесь прогревали 5 мин при 100°С, охлаждали до 0°С и цепи *Eco*RI-фрагмента разделяли электрофорезом в пластине (20×40×0,05 см) 15% ПААГ. После элюции из геля цепи подвергали частичной химической модификации по [6—8]. Продолжительность модификации в данном случае составила: для G — 25, A+G — 40, C+T и, C — 60 мин. Установленная нуклеотидная последовательность приведена на рис. 4.

Комплексообразование синтетического промотора с РНК-полимеразой T7 и транскрипция. Комплексообразование РНК-полимеразы T7 с 23-звенным двухцепочечным синтетическим промотором, меченным ³²P по одной из цепей, проводили при 37°С в 20 мкл буфера: 20 мМ трис-HCl (pH 7,9), 20 мМ MgCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 0,05 мМ рифампицин. 5 пмоль дуплекса и 3 мкг РНК-полимеразы T7 инкубировали 10 мин при 37°С для образования комплекса и добавляли 1 мкл панкреатической ДНКазы (1 мг/мл). Смесь инкубировали 5 мин и продукты гидролиза фракционировали электрофорезом в пластине (20×40×0,05 см) 20% ПААГ с 7 М мочевиной. В качестве маркеров использовали гидролизаты ³²P-меченого синтетического промотора, полученные в отсутствие РНК-полимеразы, а также промоторный фрагмент после инкубации с РНК-полимеразой T7. Гель радиоавтографировали, полосы геля, соответствующие продуктам гидролиза, вырезали и просчитывали по Черенкову на счетчике «Mark-III» (Nuclear Chicago).

Транскрипцию с синтетического промотора проводили в течение 10 мин при 37°С, используя 5 пмоль промотора и 3 мкг РНК-полимеразы Т7 в буфере, указанном выше. Реакцию инициировали добавлением нуклеозидтрифосфатов: 0,4 мМ ГТР и 0,1 мМ [α -³²Р]АТР (10 Ки/ммоль). Реакционную смесь выдерживали 20 мин при 37°С, добавляли 20 мкг тРНК, NaCl до 0,5 М и осаждали этанолом. Осадок растворяли в 5 мкл 7 М мочевины, содержащей 0,5% бромфенолового синего и 0,5% кселенцианола FF, и подвергали электрофорезу в 20% ПААГ с 7 М мочевиной. Результаты представлены на рис. 3. В качестве маркеров использовали РНК, синтезируемые РНК-полимеразой *E. coli* на фрагменте *BspI*-1460 ДНК фага Т7 в присутствии неполного набора нуклеозидтрифосфатов.

Кинетика синтеза РНК с помощью РНК-полимеразы Т7. Реакционную смесь (25 мкл), содержащую 2 ОЕ/мл ДНК (ДНК Т7, либо ДНК рBR325, либо ДНК рBR325-рТ7а), 2 мкг РНК-полимеразы Т7, 40 мМ трис-HCl (рН 7,9), 20 мМ MgCl₂, 10 мМ β -меркаптоэтанол, 0,05 мМ рифампицин, инкубировали 5 мин при 37°С и добавляли 2,5 мкл 4 мМ нуклеозидтрифосфатов (АТР, ГТР, СТР, УТР и [³H]УТР, 9 мКи/ммоль). Из реакционной смеси отбирали в определенные моменты времени (0, 5, 15, 30, 60 мин) аликвоты по 5 мкл, добавляли 10 мкг тРНК и наносили их на квадраты бумаги Whatman 3MM (1×1 см). Квадраты отмывали холодной 5% трихлоруксусной кислотой (5×20 мин, 200 мл), смесью этанола с эфиром (1:1) и считали на счетчике «Mark-III».

Авторы глубоко признательны Д. Г. Кнорре, М. А. Грачеву, В. Ф. Зарытовой, по инициативе которых было проведено настоящее исследование, за постоянный интерес и ценные советы. Авторы выражают благодарность В. Г. Коробко (Институт биоорганической химии, Москва), В. В. Потапову, М. И. Ривкину за препараты ферментов, Т. Г. Максимовой за ДНК фага Т7, Т. М. Шубиной за олигонуклеотидный линкер, С. М. Зеленину за участие в экспериментах по взаимодействию РНК-полимеразы Т7 с синтетическим промотором.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grachev M. A., Pletnev A. G. FEBS Lett., 1981, v. 127, № 1, p. 53–56.
2. Stahl S. J., Zinn K. J. Mol. Biol., 1981, v. 148, № 4, p. 481–485.
3. Rosa M. D. Cell, 1979, v. 16, № 4, p. 815–825.
4. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кутявин И. В. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 224–230.
5. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353–371.
6. Maxam A. M., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 3, p. 560–564.
7. Коробко В. Г., Грачев С. А. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1420–1422.
8. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1281–1283.
9. Strothkamp R. E., Oakley J. L., Coleman J. E. Biochemistry, 1980, v. 19, № 6, p. 1074–1080.
10. Osterman H. L., Coleman J. E. Biochemistry, 1981, v. 20, № 17, p. 4884–4892.
11. Grachev M. A., Zaychikov E. F. FEBS Lett., 1980, v. 115, № 1, p. 23–26.
12. Thayer R. E. Anal. Biochem., 1979, v. 98, № 1, p. 60–63.
13. Szalay A. A., Grohman K., Sinsheimer R. L. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 10, p. 1569–1578.
14. Nilles E. G., Conlon S. W., Summers W. C. Biochemistry, 1974, v. 13, № 10, p. 3904–3916.
15. Дроздова Л. И., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. Изв. СО АН СССР, 1981, т. 1, № 1, с. 125–130.
16. Clewell D. B. J. Bacteriol., 1972, v. 110, № 3, p. 667–676.
17. Guerry P., Le Blanc D. J., Falkow S. J. J. Bacteriol., 1973, v. 116, № 9, p. 1064–1066.
18. Adamiak R. W., Barciszewska M. Z., Biala E., Craseskowiak K., Kiersch R., Kreszewski A., Morkiewicz W. T., Wiewiorowski M. Nucl. Acids Res., 1976, v. 3, № 10, p. 3397–3408.
19. Van Boom J. H., Burgers P. M. J. Tetrahedron Lett., 1976, v. 52, № 10, p. 4875–4878.
20. Hershfield V., Boyer H. W., Yanofsky C., Lovett M. A., Helinsky D. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 10, p. 3455–3459.

**CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS AND CLONING OF A PROMOTES FOR T7
PHAGE RNA-POLYMERASE. INTERACTION OF T7 RNA-POLYMERASE WITH
THE SYNTHETIC PROMOTES IN VITRO**

IVANOVA E. M., KUTYAVIN I. V., PLETNEV A. G., SHAMANIN V. A.

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Five deoxyoligonucleotides, ranging in length between 6 and 12 nucleotide residues, have been synthesized by a novel triphosphoester method, starting with nucleotide 5'-*p*-chlorophenyl esters, and enzymatically joined by T4 DNA ligase into a 23 b.p. long doublestranded polynucleotide having the structure of a promoter for T7 phage RNA-polymerase. The synthetic promoter forms a binary complex with T7 RNA-polymerase and induced specific in vitro transcription. Topography of the interaction of T7 RNA-polymerase with the synthetic promoter has been studied by partial DNase digestion. Recombinant plasmids have been obtained which contain the synthetic promoter. Recombinant plasmid DNA is efficiently transcribed in vitro by T7 RNA-polymerase. The structures of both the synthetic and cloned promoter have been confirmed by sequencing.