



УДК 577.214.622

С. Б. Золотухин, Е. Ю. Маркелова, Г. В. Панасенко, В. Г. Найденов,
А. Д. Швед, Ю. Ю. Саутин, Я. В. Пацко

МЕТОД БЫСТРОГО КЛОНИРОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ кДНК. КЛОНИРОВАНИЕ кДНК ПРОЛАКТИНА ЧЕЛОВЕКА *

Описан метод быстрого и эффективного клонирования определенных кДНК. Метод, включающий цепную реакцию полимеризации с использованием синтетических олигонуклеотидов-затравок, применен для селективной амплификации кДНК пролактина, синтезированной на поли(А)-мРНК из гипофиза человека. Определение нуклеотидной последовательности вставки одной из рекомбинантных плазмид показало наличие полной последовательности кДНК пролактина, фланкированной синтетическими затравками.

Введение. Традиционный способ клонирования кДНК заданной специфичности заключается в конструировании представительной библиотеки рекомбинантных клонов, содержащих кДНК, синтезированную на поли(А)-содержащей мРНК (поли(А)-мРНК) (рис. 1, а). Скрининг такой библиотеки, количество клонов в которой достигает $5 \cdot 10^8$, проводится синтетическими олигонуклеотидами либо зондами, обладающими частичной гомологией с искомыми последовательностями. Этот этап является одним из наиболее трудоемких и часто приводит к обнаружению неполных кДНК-копий и необходимости проведения повторных скринингов или даже конструирования новых библиотек.

Ранее некоторыми исследователями было проведено обогащение специфическими последовательностями препаратов кДНК на этапах синтеза первой и второй цепей [1]. Такой подход, однако, приводил лишь к частичному обогащению, причем это достигалось за счет потери количества материала. Отличительной чертой данной работы является применение метода цепной реакции полимеризации (ЦРП) [2] для амплификации специфической кДНК, находящейся в гетерогенной популяции других последовательностей с последующим клонированием ее в составе бактериальной плазмиды (рис. 1, б).

Материалы и методы. Синтез олигодезоксирибонуклеотидов. Олигонуклеотиды синтезировали фосфоамидитным методом [3] на синтезаторе Gene Assembler («Pharmacia», Швеция). После удаления защитных групп обработкой тиофенолом и аммиаком олигонуклеотиды хроматографировали на колонке с Toyoreaf HW-40. Далее олигонуклеотиды отделяли от полимеров с меньшим числом звеньев с помощью препаративного электрофореза в 15 %-ном полиакриламидном геле в присутствии 7 М мочевины. Элюированный материал осаждали тремя объемами этанола в присутствии 0,5 М ацетата аммония.

Выделение поли(А)-мРНК из аденомы гипофиза человека. Ткань оперативно удаляемой аденомы замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C . Препарат суммарной и поли(А)-мРНК выделяли, как описано ранее [4, 5]. мРНК проверяли на наличие пролактин-специфических последовательностей методом гель-электрофореза и блоттинга с последующей гибридизацией с ^{32}P -меченым 24-звенным олигонуклеотидом-затравкой [6].

* Работа финансировалась в рамках Временного молодежного творческого коллектива.

Синтез кДНК, кДНК и двухспиральную кДНК (дс кДНК) синтезировали по методу Гублера [7].

ЦРП. 100 нг дс кДНК амплифицировали в системе 50 мкл, содержащей 30 мМ трис-ацетатный буфер, pH 8, 60 мМ Na-ацетат, 40 мМ Mg-ацетат, 1,5 мМ dNTPs, 1 мкМ олигонуклеотиды-затравки, 200 ед./мл ДНК-полимеразы *Thermus thermophilus* *HB* (НПО «Фермент», Вильнюс). Проводили 25 циклов: 95 °С, 1,5 мин; 45 °С, 2 мин; 70 °С, 5 мин. После окончания реакции ДНК обрабатывали смесью фенол : хлороформ,

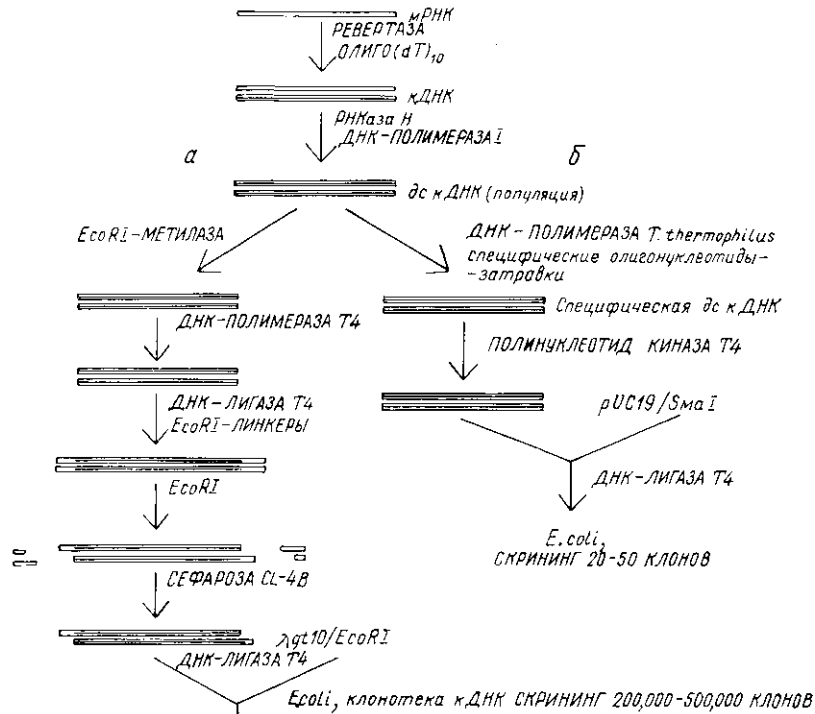


Рис. 1. Традиционная (а) и предлагаемая (б) схемы клонирования специфических кДНК

Fig. 1. Traditional (a) and suggested (b) schemes for the synthesis and cloning of specific cDNAs

затем — хлороформом и осаждали этанолом в присутствии 2 М ацетата аммония. Растворенную ДНК подвергали электрофорезу в 0,8 %-ном геле легкоплавкой агарозы («Bio-Rad», США). ДНК из геля элюировали, как описано ранее [6].

Клонирование дс кДНК пролактина. Элюированную дс кДНК фосфорилировали (5'-концы, образованные синтетическими олигонуклеотидами) с помощью полинуклеотидкиназы *T4* и клонировали в *SmaI*-сайт плазмиды *pUC19*, используя описанные методы [6]. Рекомбинантные клоны отбирали на селективных средах, содержащих X-gal и ИПТГ.

Определение нуклеотидной последовательности клонированной кДНК. Нуклеотидную последовательность кДНК пролактина определяли по методу Сэнгера [8], используя непосредственно рекомбинантную плазмиду *pHPr19* в качестве матрицы, универсальные затравки для прямого (17-звенный олигонуклеотид) и обратного секвенсов (16-звенный олигонуклеотид), а также пролактин-специфические олигонуклеотиды (16- и 24- и 43-звенные олигонуклеотиды). ДНК плазмиды *pHPr19* денатурировали, как описано в работе [9], синтез проводили фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I («Amersham», США).

Результаты и обсуждение. Целью данной работы являлось клонирование кДНК, кодирующей пролактин человека. Длина соответствующей поли(А)-мРНК, выделенной из ткани оперативно удаляемой аденомы гипофиза, составляет примерно 1000 н. п. (данные не приведены). Структурная часть этой мРНК начинается с нуклеотидной

последовательности, кодирующей сигнальный пептид длиной 28 аминокислот [10]. Отщепление этого пептида от препролактина происходит на стадии процессинга и транспорта белка, в результате чего из клетки выходит зрелый, физиологически активный гормон.

Синтезированная по традиционной схеме кДНК содержала бы информацию, кодирующую сигнальный пептид препролактина. Такую кДНК невозможно было бы использовать в бактериальных клетках для

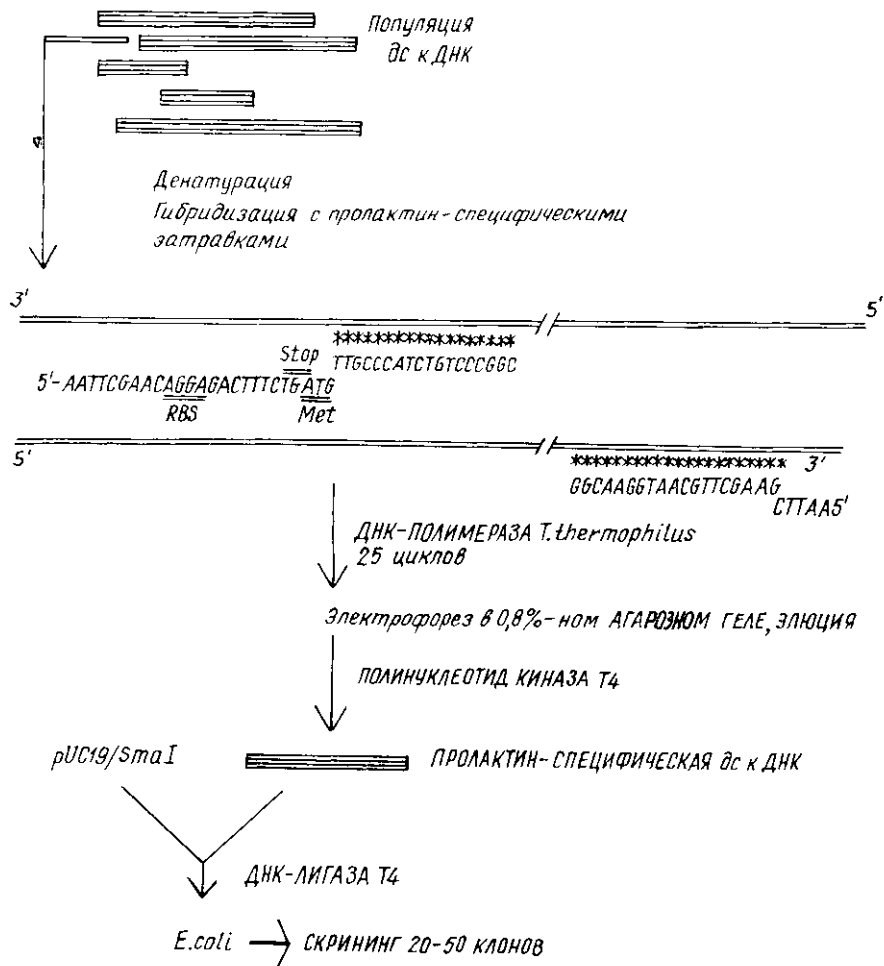


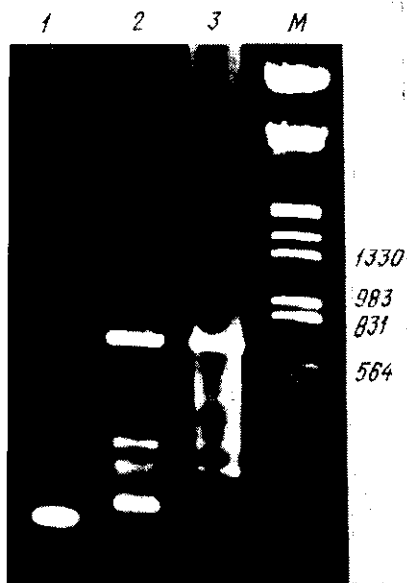
Рис. 2. Схема амплификации и клонирования кДНК пролактина человека

Fig. 2. Schematic drawing of amplification and cloning of human prolactin cDNA

синтеза белка, поскольку у бактерий нет соответствующей системы процессинга. Поставленная цель клонирования кДНК пролактина человека достигалась с помощью ЦРП для амплификации данной последовательности, находящейся в гетерогенной популяции кДНК. Для этого использовали два пролактин-специфических олигонуклеотида-затравки (рис. 2). 5'-Концевая затравка (43-звенный олигонуклеотид) содержит в своем составе 18 нуклеотидов, идентичных мРНК, начиная с кодона ТТГ, кодирующего Leu — первую аминокислоту процессированного гормона. Остальные 25 нуклеотидов содержат участок связывания с рибосомной РНК *E. coli* (RBS) и перекрывающиеся кодоны TGA (Stop) и ATG (Met), кодирующие терминирующий и иницирующий кодоны соответственно [11].

3'-Концевая затравка (24-звенный олигонуклеотид) частично комплементарна мРНК в ее 3'-некодирующей области. Схема эксперимента представлена на рис. 2. Синтезированную на поли(А)-мРНК из

деномы гипофиза дс кДНК денатурировали, гибридизовали с опианными выше олигонуклеотидами и проводили синтез комплементарных цепей с помощью ДНК-полимеразы *T. thermophilus*. Амплифицированную кДНК подвергали электрофорезу в 0,8 %-ном агарозном геле (рис. 3). После элюции соответствующей зоны в области 700 н. п.



5'-концы дс кДНК пролактина фосфорилировали и использовали непосредственно для клонирования в *Sma*I-сайт плазмиды *pUC19*. Скрининг нескольких десятков клонов, выросших на соответствующих индикаторных средах, позволил обнаружить клоны, содержащие кДНК пролактина. Одна из рекомбинантных плазмид, названная *pHPr19*, представлена на рис. 4.

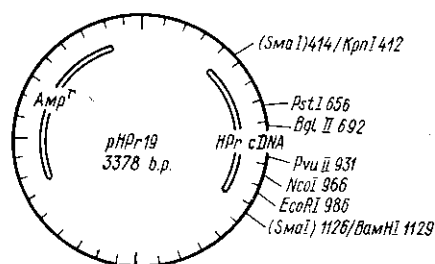


Рис. 3. Электрофорез в 0,8 %-ном агарозном геле ДНК, синтезированной в цепной реакции полимеризации: 1 — отрицательный контроль реакции ЦРП (без фермента); 2 — амплифицированная кДНК пролактина человека (препарат 1); 3 — то же (препарат 2); М — маркеры молекулярной массы, размеры обозначены в н. п.

Fig. 3. 0.8 %-Agarose gel analysis of DNA synthesized in polymerase chain reaction: 1 — negative reaction control (blank); 2 — amplified human prolactin cDNA (sample 1); 3 — the same (sample 2); M — molecular weight markers (in. b. p.)

Рис. 4. Физическая карта плазмиды *pHPr19*, содержащей кДНК пролактина человека. Обозначены сайты узнавания нескольких рестриктаз в последовательности кДНК пролактина и их положения относительно всей плазмиды (в н. п.). Инактивирование встраиванием сайта *Sma*I обозначено скобками

Fig. 4. Physical map of the recombinant plasmid *pHPr19* containing human prolactin cDNA. The recognition sites of some restrictases in the prolactin sequence (in b. p.) re indicated with respect to the total plasmid length. Insertional inactivation of *Sma*I site is indicated by brackets

Нуклеотидная последовательность кДНК пролактина определена непосредственно в составе плазмиды *pHPr19*. Для этой цели были использованы три пролактин-специфические затравки и две затравки, прилегающие к полилинкерной области *pUC19*. Нуклеотидные последовательности кДНК пролактина человека, определенная нами и опубликованные ранее, представлены на рис. 5. Единственное обнаруженное нами отличие — точечная инсерция Т в положении 639 некодирующей области, что, по-видимому, является отражением аллельного полиморфизма гена пролактина человека и не является следствием использования ЦРП для клонирования.

Примененный нами метод клонирования специфических последовательностей кДНК является экономичным, быстрым и позволяет, избегая стадии конструирования и скрининга представительных библиотек кДНК, получить клон требуемой специфичности, имея в распоряжении не больше 1 мкг поли(А)-РНК. Опубликованный недавно метод клонирования кДНК, синтезированной на суммарной клеточной РНК [14] с последующей амплификацией специфической последовательности по описанному выше методу, позволит существенно упростить технику клонирования. Кроме того, этот подход позволяет клонировать

полноразмерные копии кДНК, так как размеры определяются самим экспериментатором с помощью синтетических олигонуклеотидов-затравок. Метод, по-видимому, универсален и позволяет клонировать как кДНК с уже известной последовательностью, так и ранее не клонированные кДНК. В таком случае структура 5'-концевого олигонуклеотида

1	CAATCGAACAGGAGACTTCTGATG.TTG.CCC.ATC.TGT.CCC.GGC	52
2	-----	
3	CGA.TGC.CAG.GTG.ACC.CTT.CGA.GAG.CTG.TTT.GAC.CGC.GCC.GTC.GTC.	97
4	-----	
5	CTG.TCC.CAC.TAC.ATC.CAT.AAC.CTC.TCC.TCA.GAA.ATG.TTC.AGC.GAA.	142
6	-----	
7	TTC.GAT.AAA.CGG.TAT.ACC.CAT.GGC.CGG.GGG.TTC.ATT.ACC.AAG.GCC.	187
8	-----	
9	ATC.AAC.AGC.TGC.CAC.ACT.TCT.TCC.CTT.GCC.ACC.CCC.GAA.GAC.AAG.	232
10	-----	
11	GAG.CAA.GCC.CAA.CAG.ATG.AAT.CAA.AAA.GAC.TTT.CTG.AGC.CTG.ATA.	277
12	-----	
13	GTC.AGC.ATA.TTG.CGA.TCC.TGG.AAT.GAG.CCT.CTG.TAT.CAT.CTG.GTC.	322
14	-----	
15	ACG.GAA.GTA.CGT.GGT.ATG.CAA.GAA.GCC.CCG.GAG.GCT.ATC.CTA.TCC.	367
16	-----	
17	AAA.GCT.GTA.GAG.ATT.GAG.GAG.CAA.ACC.AAA.CGG.CTT.CTA.GAG.GGC.	412
18	-----	
19	ATG.GAG.CTG.ATA.GTC.AGC.CAG.GTT.CAT.CCT.GAA.ACC.AAA.GAA.AAT.	457
20	-----	
21	GAG.ATC.TAC.CCT.GTC.TGG.TCG.GGA.CTT.CCA.TCC.CTG.CAG.ATG.GCT.	502
22	-----	
23	GAT.GAA.GAG.TCT.CGC.CTT.TCT.GCT.TAT.TAT.AAC.CTG.CTC.CAC.TGC.	547
24	-----	
25	CTA.CGC.AGG.GAT.TCA.CAT.AAA.ATC.GAC.AAT.TAT.CTC.AAG.CTC.CTG.	592
26	-----	
27	AAG.TGC.CGA.ATC.ATC.CAC.AAC.AAC.AAC.TGC.TAA.GCCACATCCATTTC	637
28	-----	
29	ATCTATTTCTGAG AAGTCCCTT AATGATCGTTCCTGCTTGCTTCAATT	690
30	-----	
31	-----	
32	-----	
33	-----	

Рис. 5. Нуклеотидная последовательность кДНК пролактина человека, определенная нами (1), в работах [12] (2) и [13] (3). В случаях 2 и 3 указаны только отличия в нуклеотидных последовательностях. Исползованные для ЦРП олигонуклеотиды заключены в прямоугольники

Fig. 5. The nucleotide sequence of the cloned human prolactin cDNA (1) in comparison with that of Cooke et al — 2 (12) and that of Mertvetsov et al — 3 (13). The synthetic oligonucleotides-primers used for PCR are boxed

определяется на основании частичной аминокислотной последовательности пяти — шести N-концевых остатков исследуемого белка (с учетом вырожденности кода и частоты встречаемости кодонов). Этот олигонуклеотид обеспечивает специфичность реакции ЦРП. Структура 3'-концевого олигонуклеотида может быть универсальна: олиго(dT)₁₂₋₁₅ GGTCGACC, где (dT)₁₂₋₁₅ обеспечивает гибридизацию с поли(A)-последовательностью на 3'-конце мРНК, а GGTCGACC фиксирует 3'-конец кДНК при ее амплификации и содержит удобный для клонирования сайт *SalGI*, редко встречающийся в геноме эукариот.

В период подготовки данной статьи были опубликованы еще две работы, подтверждающие универсальность предлагаемого подхода [15, 16].

A FAST METHOD FOR CLONING OF SPECIFIC cDNA.
CLONING OF HUMAN PROLACTIN cDNA

S. B. Zolotukhin, E. Yu. Marketova, G. V. Panasenko,
V. G. Naidenov, A. D. Shved, Yu. Yu. Sautin, Ya. V. Patsko
Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the USSR, Kiev
Institute of Endocrinology and Metabolism,
Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev;
Institute of Neurosurgery,
Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

A method allowing fast and effective cloning of particular cDNA is described. Pairs of synthetic oligonucleotides-primers are used for polymerize chain reaction mediated selective amplification of prolactin cDNA synthesized on human pituitary poly(A)-mRNA. Sequence of one of the recombinant plasmid insert revealed a full-length prolactin cDNA, flanked by the synthetic primers.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmid A., Cattaneo K., Billeter M. A. A procedure for selective full length cDNA cloning of specific RNA sequences // Nucl. Acids Res.—1987.—16, N 10.— P. 3987—3996.
2. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase / R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel et al. // Science.—1988.—241, N 4864—4865.— P. 487—491.
3. Atkinson T., Smith M. Solid phase synthesis of oligo-deoxyribonucleotides by phosphate-triester method // Oligonucleotide synthesis. A practical approach / Ed. M. J. Gait.—New York: IRL press, 1984.— P. 35—82.
4. Comcrinsky P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolated by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction // Anal. Biochem.—1987.—162, N 2.— P. 156—159.
5. Aviv H., Leder P. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1972.—69, N 6.— P. 1408—1412.
6. Мануйлис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.—479 с.
7. Gubler U., Hoffman B. J. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries // Gene.—1983.—25, N 2—3.— P. 263—269.
8. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminator inhibitors // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74, N 12.— P. 5463—5467.
9. Double stranded DNA sequencing as a choice for DNA sequencing / H. Zhang, R. Scholl, J. Browse, C. Somerville // Nucl. Acids Res.—1988.—16, N 3.— P. 1220.
10. Evans G. A., Huncko J., Rosenfeld M. G. Preprolactin represents the initial product of prolactin in mRNA translation // Endocrinology.—1977.—101, N 3.— P. 1807—1814.
11. Создание «искусственных гибридных оперонов с частично перекрывающимися генами» для достижения экспрессии гетерологических генов в клетках *Escherichia coli* / С. М. Машко, А. Л. Лapidус, М. Э. Трухан и др. // Молекуляр. биология.— 1987.— 21, № 5.— С. 1297—1310.
12. Human prolactin cDNA structural analysis and evolutionary comparisons / N. E. Cooke, D. Coit, J. Rhine et al. // J. Biol. Chem.—1981.—256, N 8.— P. 4007—4014.
13. Синтез, клонирование и определение первичной структуры ДНК, комплементарной мРНК пролактина из гипофиза человека / Н. П. Мертвецов, С. Я. Головин, С. М. Зеленин и др. // Биоорг. химия.— 1987.—13, № 12.— С. 1687—1690.
14. Lu X., Werner D. Construction and quality of cDNA libraries prepared from cytoplasmic RNA not enriched in poly(A)⁺RNA // Gene.—1988.—71, N 1.— P. 157—164.
15. Белявский А. В., Раевский К. Амплификация тотальной кДНК *in vitro* // Докл. АН СССР.— 1988.—303, № 6.— С. 1498—1501.
16. Frohman M. A., Dush M. K., Martin G. R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85, N 23.— P. 8998—9002.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН УССР, Киев

Получено 05.05.89

Ин-т эндокринологии и обмена веществ МЗ УССР, Киев
Ин-т нейрохирургии МЗ УССР, Киев