

УДК 547.963.3

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ГЕНА NSE ИЗ МОЗГА КРЫСЫСКОБЕЛЕВА Н. А., ЗАХАРЯН Р. А., БУХМАН В. Л.,  
КИСЕЛЕВ С. Л., МИХАЙЛОВ С. А.

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

Из коры головного мозга крысы выделена поли (А)+РНК, по которой синтезированы двуспиральные ДНК. На основе ДНК фага  $\lambda$ gt 10 получена клонотека структурных генов. Проведен скрининг клонотеки на наличие в банке мозга генов ДНК, несущих последовательности, специфичные  $\gamma$ -енолазному гену крысы. Анализ первичной структуры полученных генов показал их полную гомологию со структурой гена NSE крысы.

В тканях животных обнаружены три изоформы гликолитического белка енолазы (2-фосфо-Д-глицерат гидролиаза. КФ 4.2.1.11)— $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . Енолаза является димерным белком с величиной  $M_r$  субъединиц 46 кД.  $\alpha$ -Енолаза (NNE) находится во всех тканях организма,  $\beta$ —только в мышечной ткани,  $\gamma$ -енолаза (NSE)—в нейронах и нейроэндокринных клетках. Специфичность NSE позволяет использовать его в качестве молекулярного маркера при дифференциации нейронов [1]. Изучение молекулярных механизмов, контролирующих экспрессию генов NSE и NNE, может дать важную информацию о клеточной и тканевой специфичности экспрессии этих генов.

Успехи генетической инженерии позволили синтезировать различные структурные гены, вводить их в соответствующие векторы и размножить в составе рекомбинантных молекул ДНК. Ферментативный синтез генов *in vitro* является большим достижением современной биологии, позволяющим перейти к новому этапу в изучении структуры генома эукариот. Молекулярное клонирование структурных генов в составе рекомбинантных молекул обеспечивает получение ДНК в достаточном количестве для определения ее первичной структуры, а также для изучения соответствующих природных генов.

Представляет теоретический и практический интерес изучение экспрессии нейроспецифического белка NSE на транскрипционном и трансляционном уровне, проведение клонирования гена этого белка и конструирование штамма микроорганизма—продуцента биологически активного белка NSE, который по данным ряда авторов [2], может быть ценным диагностическим тестом при ряде нейроонкологических заболеваний.

В работе использовали dNTP, dT<sub>(18)</sub>, [<sup>32</sup>P] NTP, [<sup>32</sup>P] АТР-радиохимического центра „Amersham“ (Англия), актиномицин D („Calbiochem“, США), олиго (dT)—целлюлоза („Biochemicals“ США), агароза, трис, лизоцим, бромид этидия („Sigma“, США), нитроцеллюлозные фильтры, Hynbond-фильтры („Millipore“, США), GF/C-фильтры („Whatman“, Англия), сефадекс G-50 fine („Pharmacia Fine Chemicals“, Швеция), дрожжевой экстракт, триптон, агар („Difco“, США), а также другие реактивы аналитической чистоты. Все растворы приготовлены на деионизованной воде. ДНК-полимераза I из *E. coli* выделена по методу Jovin и соавт. [3]; ревертаза AMV („Life Sciences“, США), рестриктазы (П/О „Фермент“, Вильнюс).

В опытах использовали кору мозга беспородных крыс. Тотальную РНК из коры мозга крыс выделяли гуанидинизотиоционатным методом [4], а поли(A)<sup>+</sup> РНК на олиго (dT)-целлюлозе—по методу Aviv, Leder [5]. Препарат поли(A)<sup>+</sup> РНК подвергали повторной хроматографии и осаждали этанолом. Синтез двуспиральной ДНК и встраивание молекул ДНК в фаговый вектор λgt 10 проводили по методу Gulber, Heffman [6].

Анализ фаговых бляшек, содержащих последовательности, специфичные гену NSE крысы, осуществляли методом гибридизации фаговых ДНК, фиксированных на нитроцеллюлозном фильтре, используя в качестве молекулярного зонда [<sup>32</sup>P] меченный олигонуклеотид, химически синтезированный по известной структуре ДНК гена NSE [7].

Мечение олигонуклеотида проводили с помощью ДНК-полимеразы I (Кленов фрагмент) в присутствии [<sup>32</sup>P] dNTP, а также T<sub>4</sub> полинуклеотидкиназы в присутствии [<sup>32</sup>P] АТР [8]. Анализ меченых олигонуклеотидов проводили в 20%-ном ПААГ на 7 М мочеvine в TBE-буфере в течение 2,5 ч при 500 в. После электрофореза гель закладывали на радиоавтографию.

Выделение рекомбинантной фаговой ДНК λgt 10, содержащей последовательности, специфичные гену NSE крысы, проводили следующим образом: к клеточному лизату добавляли NaCl (5%) и хлороформ (0,1%), лизат центрифугировали 10 мин при 15000 об/мин, к супернатанту добавляли ПЕГ 6000 до концентрации 10% и выдерживали в ледяной бане в течение 1 ч, осаждали фаг центрифугированием при 15000 об/мин в течение 10 мин, осадок растворяли в буфере TE, содержащем 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, добавляли ДНКазу I (25 мг/мл) и выдерживали 1 ч при 37°. К раствору добавляли 0,5% ДДС-Na, 10 мМ ЭДТА и протениазу К (100 мг/мл), смесь инкубировали 1 ч при 37°. Проводили депротенинизацию раствора фенолом, ДНК осаждали спиртом.

Обработку рекомбинантных фаговых ДНК рестриктазой EcoR I и электрофорез продуктов рестрикции в 1%-ной агарозе проводили по методу Maniatis и соавт. [4].

Фрагмент ДНК, несущий последовательности гена NSE, элюировали из агарозы и субклонировали в плазмидном векторе GEM-4 в клетках *E. coli* HM 514. [7]. Плазмиды выделяли по методу Birnboim, Doly [9].

Первичную структуру ДНК NSE крысы определяли по методу Sanger'a и соавт. [10].

### Результаты и обсуждение

Из коры мозга крысы выделена поли (A)<sup>+</sup> РНК, по которой синтезированы двуспиральные ДНК с помощью ревертазы, ДНК-полимеразы I. По тупым концам генов пришиты EcoR I—линкеры и с помощью T<sub>4</sub> лигазы получены рекомбинантные ДНК, где в качестве вектора использованы EcoR I—фрагменты ДНК фага  $\lambda$ gt 10 [6]. После упаковки рекомбинантных фаговых ДНК, клетки *E. coli* HM514 инфицировали рекомбинантным фагом, высевали на чашки и проводили скрининг фаговых бляшек на наличие в мозговой клонотеке ДНК, несущих последовательности, специфичные  $\gamma$ -енолазному гену крысы. В качестве молекулярного зонда при скрининге мозговой фаговой клонотеки использовали два 15-членных олигонуклеотида с комплементарным участком в 7 нуклеотидов, химически синтезированными по известной структуре ДНК  $\gamma$ -енолазного гена крысы [11]. Мечение олигонуклеотидов осуществляли с помощью ДНК-полимеразы I (Кленов фрагмент) в присутствии меченых [ $\alpha^{32}$ P] dNTP [8]. В результате ДНК-полимеразной реакции происходит достройка олигонуклеотидов мечеными трифосфатами, что дает возможность получить двуспиральную высокомеченную ДНК, которая после денатурации использовалась для скрининга мозговой клонотеки. Двуспиральный меченый олигонуклеотид значительно повышает вероятность обнаружения нужного гена в фаговой клонотеке (рис. 1).

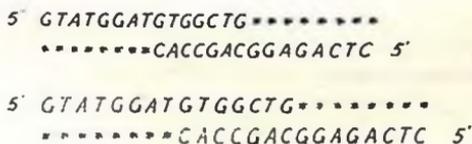


Рис. 1. 15-членные олигонуклеотиды с комплементарными последовательностями, использованными в качестве молекулярного зонда при скрининге мозговой фаговой клонотеки на наличие в ней последовательностей ДНК, специфичных гену NSE крысы. Достройка олигонуклеотидов производилась ДНК-полимеразой I (Кленов фрагмент) в присутствии четырех [ $\alpha^{32}$ P] dNTP. \*—меченые комплементарные нуклеотиды

Было проанализировано около 120000 рекомбинантных фагов, из которых выявлено 2 фага, гибридизующихся с меченым молекулярным зондом. Из рекомбинантных гибридизующихся фагов, несущих последовательности ДНК гена NSE, выделяли фаговую ДНК, которую обрабатывали рестриктазой EcoR I для выщепления чужеродного

фрагмента ДНК. Размеры вставок ДНК в фаге  $\lambda$ gt 10 были определены электрофорезом продуктов рестрикции в 1%-ной агарозе и составили 1,6—1,4 кб. (рис. 2). Гибридирующие фрагменты элюировали из агарозы low melting и субклонировали в плазмидном векторе GEM-4. Для трансформации использовали клетки *E. coli* NM 514.



Рис. 2. Электрофорез в 1%-ной агарозе продуктов рестрикции рекомбинантных фаговых ДНК эндонуклеазой *EcoR* I. 1— $pNSE_8$ ; 2— $pNSE_{10}$ ; 3—ДНК фага  $\lambda$ , обработанная рестриктазами *EcoR* I и *Hind* III. Фрагменты использованы в качестве маркеров

Была определена первичная структура двух генов, обозначенных нами  $pNSE_8$  и  $pNSE_{10}$ . Анализ первичной структуры этих генов показал их полную гомологию с нуклеотидной последовательностью  $\gamma$ -енолазного гена крысы, определенной ранее [11] (рис. 3).

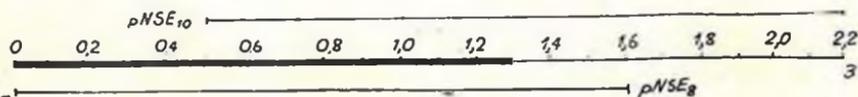


Рис. 3. Схематическое изображение генов  $pNSE_8$  и  $pNSE_{10}$ . Кодированная область гена выделена жирной линией

Таким образом, в результате проведенной работы получен  $\gamma$ -енолазный ген крысы, который был использован нами в качестве молекулярного зонда для нахождения гена NSE человека в клонотеке генов кДНК. Поиск гена NSE человека проводили в кДНК мозговой человеческой клонотеке, сконструированной на основе фага  $\lambda$ gt II («Clontech», США). Для скрининга клонотеки использовали меченый в системе ник-трансляции [4] ген NSE крысы размером 1,6 кб, предварительно вырезанный из плазмиды  $pNSE_8$  рестрикционной

обработкой эндонуклеазой EcoR I. Известно, что кодирующая область генов NSE крысы и человека имеет 91% гомологии по нуклеотидной последовательности [13], а гомология по нуклеотидной последовательности в кодирующей области генов NSE и NNE крысы составляет 75% [11].

В результате проведенной работы нами получены две плазмиды, содержащие последовательности ДНК, гибридизующиеся с геном NSE крысы. Определение первичной структуры клонированных ДНК показало, что плазида, содержащая вставку ДНК размером 1,3 кб и обозначенная нами рNSE-II, содержит последовательности ДНК, соответствующие гену NSE человека [13], в то время как плазида (р NNE-II) с размером чужеродной ДНК 900 нуклеотидных последовательностей несет последовательности гена NNE. Сравнение нуклеотидной последовательности кодирующей области гена NNE, полученного нами, с известной структурой гена NNE человека показало, что гомология составляет 96,1% [14].

Таким образом, нами получены гены NSE крысы, NSE и NNE человека, которые будут использованы в дальнейшем для изучения структурной организации этих генов, их транскрипционной и трансляционной активности, а также для получения рекомбинантной плазмиды, экспрессируемой в клетках *E. coli*. Полученный белок NSE может найти применение для получения антител и приготовления диагностикумов для клинического использования в диагностике ранних стадий рака легкого и других онкологических заболеваний нейроэндокринного происхождения [12].

## MOLECULAR CLONING AND SEQUENCING OF RAT BRAIN NSE GENE

SKOBELEVA N. A., ZAKHARYAN R. A., BUKHMAN V. L., KISELEV S. I., MIKHAILOV S. A.

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenian Republic, Yerevan

cDNAs for rat gamma-enolase (neuron-specific enolase, NSE; EC 4.2.1.11) were isolated from a cDNA library using colony hybridization with synthetic oligonucleotides. The isolated cDNA clones coding for the rat gamma-enolase were sequenced. The sequences of the obtained cDNAs were completely identical to the known rat gamma-enolase gene sequence.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Zomzely-Neurath C. E.—In: Hand book of neurochemistry (ed. Lajtha A.), v. 4, p. 493—433, Plenum, Press, N. Y., 2nd Ed., 1983.
2. Carney N. D., Ihde D. C., Cohen M. N., Marangos P. J., Bunn P. J., Gazdar A. F. Lancet, v. 8272, p. 583—585, 1982.

3. *Jovin T. M., Englund P. T., Bertch L. L.* J. Biol. Chem., v. 244, № 11, p. 2996—3008, 1969.
4. *Manlatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* Mol. cloning. Cold Spring Harbor, N. Y., 1982.
5. *Aviv H., Leder P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA., Biol. Sci., v. 69, p. 1408—1412, 1972.
6. *Gulber U., Heffman B.* Gene, v. 25, p. 263—271, 1983.
7. *Davis L. G., Dibner M. D., Patley J. F.* Basis methods in Molec. biol., N. Y., Amsterdam, London, 1986.
8. *Davis K. E.*—In: Human genetic diseases. (ed. Ricknood D., Hances D. B.), p. 255—261. Oxford, Washington, 1986.
9. *Birnboim B. C., Doly J.* Nucl. Acid. Res., v. 7, № 6, p. 1513—1523, 1979.
10. *Sanger R., Coulson A. R., Barrell B. G., Smith A. J.* Mol. Biol., v. 143, p. 161—178, 1980.
11. *Sakimura K., Kushija E., Ohnata M., Odani Sh., Takahashi Y.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 82, p. 7453—7457, 1985.
12. *Carney D. N., Teeling M.* Eur. J. of Cancer & clinical oncology, v. 24, № 5, p. 825—830, 1988.
13. *Van Obberghen E., Bishop III J. C., Zomzely-Neurath C., Lazzarini R. A.* J. Neuroscience Res., v. 19, p. 450—456, 1989.
14. *Giallongo A., Feo S., Moore R., Croce C. M., Showe L. C.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 83, p. 6741—6745, 1986.

Поступила 28 VI. 1990