



УДК 547.963.3

ПОЛУЧЕНИЕ КЛОНОТЕКИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК  
(БАНКА КЛОНОВ), СОДЕРЖАЩИХ НУКЛЕОТИДНЫЕ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ мРНК, СПЕЦИФИЧНЫЕ К  
БЕЛКУ NSE ИЗ МОЗГА КРЫСЫ

СКОБЕЛЕВА Н. А., ЗАХАРЯН Р. А., НАЗАРЯН К. Б., КАЗАРЯН Б. А.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Как известно, нейрон-специфическая енолаза (2-фосфо-D-глицерат гидролаза КФ 4.2.1.11)—NSE является молекулярным маркером для дифференциации нейронов [1]. Ранее нами были проведены исследования по биосинтезу белка NSE в бесклеточной белоксинтезирующей системе из ретикулоцитов кролика на поли (A)<sup>+</sup>РНК-матрице, выделенной из мозга крысы [2]. В настоящем сообщении приведены данные о получении рекомбинантных ДНК, содержащих последовательности мРНК, специфичные к белку NSE из мозга беспородных крыс.

В работе были использованы dNTP, dT<sub>(10)</sub> [<sup>3</sup>H] dCTP, [<sup>32</sup>P] АТФ («Amersham», Англия), актиномицин D («Calbiochem», США), олиго (dT)-целлюлоза («Biochemicals», США), агароза, трис, NEPES, хло-рамфеникол, лизоцим, бромид этидия («Sigma», США), нитроцеллюлозные фильтры («Millipore», США), GF/C-фильтры («Whatman», Англия), сефадекс G-50 fine, белок (A)-сефароза («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция), дрожжевой экстракт, триптон, агар («Difco», США) и другие аналитической чистоты реактивы. Все растворы приготовлены на деионизованной воде. Терминальная дезоксирибонуклеотидтрансфераза выделена по методу Vollum и соавт. [3], нуклеаза S<sub>1</sub>—по методу Сенченко и соавт. [4], ДНК-полимераза I из E. coli—по методу Jovin и соавт. [5]. Часть препаратов ревертазы из вируса птичьего миелобластома, использованных в работе, любезно предоставлена проф. Дж. Бирдом (США).

Выделение из мозга крысы свободных полисом и полисомной поли (A)<sup>+</sup>РНК, получение белка NSE и антисыворотки к этому белку описано ранее [2]. Обогащение и очистку препарата мРНК, специфичной к белку NSE, проводили по методу иммуоадсорбции [6].

Синтез структурных генов на поли (A)<sup>+</sup> РНК, выделенной из мозга крысы, включал следующие стадии: 1) синтез кДНК (компле-

ментарной ДНК) по матрице поли(А)-РНК, катализируемый ревертазой; 2) синтез второй нити ДНК (анти-кДНК) с помощью ДНК-полимеразы I; 3) обработка «шпильчатых» генов нуклеазой  $S_1$  для превращения их в открытую двуцепочечную форму [7]. После синтеза кДНК в системе обратной транскрипции получается смесь продуктов разной длины [8] (рис. 1). Эта кДНК в соответствии с данными другой работы [9] без добавления затравки может служить матрицей для синтеза ДНК, комплементарной кДНК, под действием ДНК-полимеразы I.

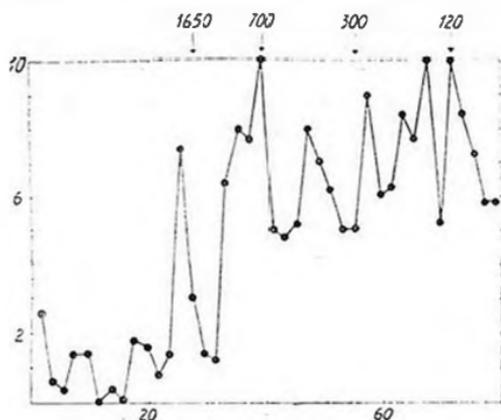


Рис. 1. Электрофретическое разделение  $[^{32}\text{P}]$ кДНК, синтезированных по матрице поли(А)-РНК из мозга крысы, в 4% ПААГ в 98%-ном формамиде [13]. Маркерами служили: тРНК (4S), рРНК (5S и 16S) и фрагменты ДНК фага  $\lambda$ . Цифрами сверху обозначено количество нуклеотидов в маркерах. По оси ординат — радиоактивность,  $10^{-3}$  имп/мин, по оси абсцисс — миграция, мм

Встраивание двухспиральной кДНК в плазмидный вектор рВВ 322 проводили с помощью метода дГ-дЦ коннекторов по участку узнавания рестрикционной эндонуклеазы Pst I, находящемуся в гене, кодирующем устойчивость к ампициллину. В полученной двухспиральной кДНК формировали липкие концы наращиванием 25—30 остатков дезоксицитидиловой кислоты с помощью терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазы, а в молекуле вектора—рВВ 322, расщепленной рестриктазой Pst I, включением примерно 25 остатков дезоксигуаниловой кислоты. Вектор и двухспиральную кДНК, подготовленные таким образом, смешивали и отжигали как описано в работе Clarke, Carbon [10], после чего использовали для трансформации клеток *E. coli* JC [11]. Эффективность трансформации с помощью ДНК рВВ 322 составляла  $10^8$  колоний на мкг ДНК, а эффективность трансформации рекомбинантной ДНК была равна  $10^5$  колоний/мкг ДНК. Всего было получено  $12 \cdot 10^5$  колоний трансформантов, устойчивых к тетрациклину, из них  $5 \cdot 10^3$  были чувствительны к ампициллину, то есть должны были содержать вставку в области гена, определяющего устойчивость к ампициллину. Рекомбинанты анализировали с помощью гибридизации колоний, используя в качестве молекулярного зонда высокоочищенную  $[^{32}\text{P}]$  кДНК (У.А.  $6 \cdot 10^8$  имп/мин/мкг), синтезированную в системе обратной транскрипции по матрице мРНК, специфичной к белку NSE, обогащенной на белок А-серафозе методом иммунопреципитации [6].

Клоны, устойчивые к тетрациклину, но чувствительные к ампициллину

лину, выращивали в течение ночи на нитроцеллюлозных фильтрах, после чего проводили гибридизацию колоний, как описано в работе Thayer [12]. Радиоавтограф одного из фильтров с колониями после гибридизации приведен на рис. 2. Колонии, дающие сильный сигнал, составили 39 из  $2 \cdot 10^3$  проанализированных клонов. Полученные клоны обозначены как клоны серии pRSE.

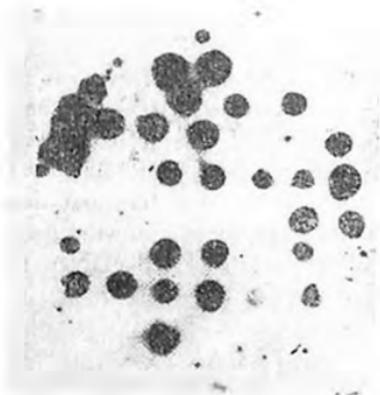


Рис. 2. Колонии *E. coli*, перенесенные на нитроцеллюлозный фильтр и дающие положительный сигнал при гибридизации с [ $^{32}P$ ]кДНК, синтезированной по обогащенной мРНК NSE

Известно, что метод клонирования с применением дГ-дЦ коннекторов по Pst I-сайту плазмиды pBR 322 удобен тем, что вставка двухспиральной кДНК может быть выщеплена из состава рекомбинантной молекулы с помощью рестриктазы Pst I. Мы тестировали плазмиды на чувствительность к рестриктазе Pst I и установили, что в 33 из 39 плазмид происходит выщепление вставки двухспиральной ДНК, то есть клоны с регенерированными по обе стороны от двухспиральной кДНК Pst I-сайтами составляют около 84% от количества проанализированных клонов.

Из гибридизирующихся клонов выделены и очищены рекомбинантные плазмиды, которые анализировали методом гибридно-селективной трансляции по белку NSE в бесклеточной белоксинтезирующей системе из ретикулоцитов кролика. Детальные данные по их характеристике будут опубликованы отдельно.

Полученные рекомбинантные плазмиды, содержащие вставку структурного гена NSE, могут быть использованы в качестве молекулярного зонда в опытах по гибридизации для выделения пре-мРНК, исследования процессинга этой пре-мРНК, картирования природного гена NSE, а также для определения аминокислотной последовательности NSE по нуклеотидной последовательности мРНК.

Авторы благодарят В. Л. Бухмана и проф. Л. Л. Киселева за проявленный интерес и помощь, оказанные при выполнении данной работы.

ISOLATION OF RECOMBINANT DNAs LIBRARY (BANK OF CLONES), CONSISTENT OF MESSENGER RNAs NUCLEOTIDE SEQUENCES SPECIFIC TO NSE PROTEIN FROM RAT BRAIN

SKOBELEVA N. A., ZAKHARYAN R. A., NAZARYAN K. B., KAZARYAN B. A.

Institute of Experimental Biology, ArmSSR Acad. Sci., Yerevan

Double-stranded DNA synthesized from rat poly (A)<sup>+</sup> RNA by the subsequent action of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase and E. coli DNA polymerase I was splitted with nuclease S1 and inserted into PstI site in the plasmid pBR 322 by poly(dG)-poly(dC) homopolymer extension technique using terminal deoxynucleotidyltransferase. E. coli transformants have been shown to contain rat NSE sequences by colony hybridization with [<sup>32</sup>P] cDNA synthesized on enriched mRNA of rat NSE protein.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zomzely-Neurath C. E.—In: Handbook of Neurochemistry (ed. A. Lajtha), v. 4, p. 403—433, N. Y., Plenum Press, 1983.
2. Скобелева Н. А., Бухман В. Л., Захарян Р. А., Назарян К. Б., Казарян Б. А. Нейрохимия, т. 3, № 3, 280—283, 1984.
3. Bollum F. J., Chang L. M. S., Tsiapalis C. M., Darson J. W.—In: Methods enzymol. 1 ed. Grossman L., Moldave K.—N. Y.—London: Acad. Press., v. 29, part E., p. 70—80, 1974.
4. Семченко В. Н., Колбановская Е. Ю., Бонсров А. А. Молекуляр. биология, т. 13, № 6, с. 1377—1383, 1978.
5. Jovin T. H., Enguland P. T., Bertch L. L. J. Biol. Chem., v. 244, № 11, p. 2996—3008, 1969.
6. Kraus J. P., Rosenberg L. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 79, № 13, p. 4015—4019, 1982.
7. Скобелева Н. А., Коалов К. А., Прасолов В. С., Дубовая В. И., Джумагалиев Е. Б., Гауас Г. Г., Фролова Л. Ю. Молекуляр. биология, т. 15, № 6, с. 1224—1233, 1981.
8. Efstratiadis A., Maniatis T., Kafatos F. C., Jeffrey A., Vournakis J. N. Cell., v. 4, № 4, p. 267—278, 1975.
9. Efstratiadis A., Kafatos F. C., Muxam A. M., Maniatis T. Cell., № 7, № 2, p. 279—288, 1976.
10. Clarke L., Carbon J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 72, № 11, p. 4361—4365, 1975.
11. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular Cloning A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.).
12. Thayer R. E. Anal. Biochem., v. 98, № 1, p. 60—63, 1979.
13. Фролова Л. Ю., Теннов А. В., Газарян К. Г., Тарантул В. Э., Баранов Ю. Н., Кутель Ч., Грютцман Х., Хан В., Хише Ф., Гравеская Н. А., Киселев А. Л. Молекуляр. биология, т. 10, № 4, с. 944—951, 1976.

Поступил 10. VI 1986