

Е. С. Федоренко, Д. М. Иродов,  
Л. И. Лихачева, С. М. Подольская, В. А. Кордюм

## КЛОНИРОВАНИЕ АВТОНОМНО РЕПЛИЦИРУЮЩИХСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

Клонированы фрагменты суммарной ДНК генома человека из лейкоцитов и клеток плаценты, способные обеспечивать автономное состояние клонирующего вектора *pYF40* (в который они заключались) в *Saccharomyces cerevisiae*. Получены два фрагмента соответствующих молекулярных масс: 6,5 (из лейкоцитов) и 3,4 тыс. п. н. (из клеток плаценты), обладающие высокой трансформирующей способностью в пекарских дрожжах ( $10^2$ — $10^3$  трансформантов на 10 мкг плазмидной ДНК). Выявлена продолжительная экспрессия гена *aro-A1* человека в составе экстрахромосомных рекомбинантных ДНК, содержащих клонированные автономно реплицирующиеся AP-последовательности в культуре клеток.

**Введение.** Для создания бифункциональных векторных систем используется широкий спектр вирусов, обеспечивающих интеграцию в хромосому, клонирование и экспрессию чужеродных последовательностей ДНК в клетках животных [1, 2]. Единственным, но существенным недостатком этого подхода является относительная неспецифическая интеграция вирусных последовательностей в хромосому и связанная с ней опасность онкогенной трансформации клеток-мишеней [3—5]. Для предотвращения онкогенного эффекта, опосредованного вирусными последовательностями, предлагается применение автономных векторных систем, не содержащих вирусной ДНК. Внехромосомная транскрипция маркерных генов в этих векторах осуществима лишь при их независимой от хромосомы репликации [6—8]. С помощью автономной экспрессии вводимого чужеродного генетического материала открывается принципиальная возможность создания молекулярных конструкций с заданным временем жизни. Важной особенностью репликативных векторов является их универсальность, т. е. пригодность для решения широкого круга задач, в том числе и для попыток блокирования ВИЧ-инфекции генноинженерными методами. Как следует из независимых публикаций, репликация у AP-последовательностей характеризуется низкой видовой специфичностью [9—11]. Чаще всего AP-последовательности одних эукариот способны к репликации в других, что помогает при их поиске. Из литературы известна возможность получения последовательностей, автономно реплицирующихся как в дрожжах, так и в клетках млекопитающих. В представленной работе клонированы AP-последовательности генома человека, обеспечивающие автономную репликацию рекомбинантных ДНК в дрожжах и в культуре клеток человека.

**Материалы и методы.** Штаммы. Плазмиды. Условия культивирования. В работе использовали дефектный по рекомбинации бактериальный штамм *Escherichia coli* DH1 ( $F^-$ , *rec A1*, *end A1*, *gus A96*, *thi-1*, *Sup E44*,  $\lambda^-$ ), а также ауксотрофный по лейцину и гистидину штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* LL-20 (*Leu2-3*; *Leu2-112*; *His3-15*; *His3-11*). Для наработки биомассы клетки *E. coli* культивировали в среде на основе аминокислоты (завод медпрепаратов, Санкт-Петербург) [12]. Дрожжи выращивали в полноценной питательной

© Е. С. ФЕДОРЕНКО, Д. М. ИРОДОВ, Л. И. ЛИХАЧЕВА, С. М. ПОДОЛЬСКАЯ,  
В. А. КОРДЮМ, 1994

среде YPD (1,5 %-й пептон, 1 %-й дрожжевой экстракт, 2 %-я глюкоза), для селекции трансформантов использовали среду (Yeast nitrogen base, «Difco», USA; 2 %-я глюкоза, 20 мкг/мл триптофана и 20 мкг/мл метионина) с добавлением аминокислот лейцина и гистидина (20 мкг/мл). Твердые среды содержали дополнительно 1,5 %-й агар-агар для *E. coli* и 2 %-й — для *S. cerevisiae*. Клетки *S. cerevisiae* трансформировали с помощью ацетата лития [13]. В работе использована культура перевиваемых фибробластов человека. Трансфекцию осуществляли методом кальциево-фосфатной преципитации, клетки после

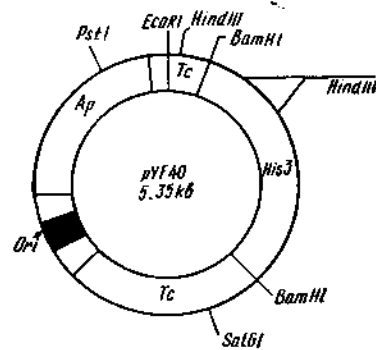
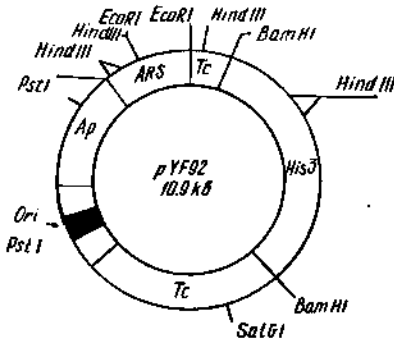


Рис. 1. Физическая карта плазмиды *pYF92*. Плазмида состоит из вектора *pBR322*, по *EcoRI*-сайту которого встроена 2 мкм ДНК дрожжей, являющаяся автономным репликоном. По *BamHI*-сайту находится маркерный ген *his3*.

Рис. 2. Физическая карта плазмиды *pYF40* — производной плазмиды *pYF92* с удаленной 2 мкм ДНК.

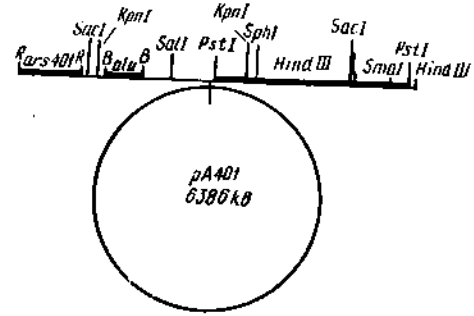
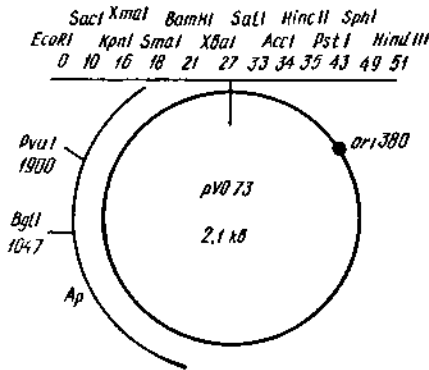


Рис. 3. Физическая карта плазмиды *pV073*, которая является производной плазмиды *pUC18* с делетированным районом «ядовитых» последовательностей ~600 п. н. и с инактивированным *lacZ*-геном.

Рис. 4. Физическая карта плазмиды *pA401* — производной плазмиды *pUC18*, в полилинкере которой клонированы: по *EcoRI*-сайту — репликон генома кукурузы (~1,2 тыс. п. н.), по *BamHI*-сайту *Alu*-фрагмент (300 п. н.) и по *PstI*-сайту — ген белка *AroA1*.

инкубации снимали с матрасов 0,2 %-м раствором Версена [14], плазмидную ДНК выделяли с помощью щелочного лизиса и фенол-хлороформной экстракцией. Для конструирования клонирующего вектора применяли дрожжевой репликативный вектор *pYF92* на основе плазмиды *pBR322*, содержащий омикронную ДНК и полученный из Ин-та биохимии и физиологии микроорганизмов АН РФ (рис. 1). Клонированный вектор *pYF40* получен удалением последовательности омикронной ДНК по *EcoRI*-сайтам (рис. 2). Плазмида *pV073*, не содержащая «ядовитых» последовательностей, получена из плазмиды *pUC18* вырезанием полилинкера по *PvuII*-сайту и двунаправленным экзогенным гидролизом нуклеазой *Bal31* с делетированием области, прилегающей к *ori*, и инактивированием *lacZ*-гена с последующим встраиванием того же полилинкера (рис. 3). Ряд плазмид: *pWTV*, *pWTC*, *pWTM* соз-

дан путем субклонирования по *EcoRI*-сайтам трех фрагментов соответствующих молекулярных масс (3,5; 2 и 1 тыс. п. н.), составляющих клонированный лейкоцитарный фрагмент ДНК генома человека (6,5 тыс. п. н.), в плазмиду *pWTA*, полученную из плазмиды *pVO73* встраиванием по *SmaI*-сайту *Apo-A1*-гена. Положительным контролем в работе служила плазида *pA401*, которая, кроме маркерного *apo-A1*-гена, содержит AP-последовательность генома кукурузы (рис. 4) [15].

Анализ нуклеиновых кислот. Полученные фрагменты тестировали на принадлежность к геному человека DOT-гибридиза-

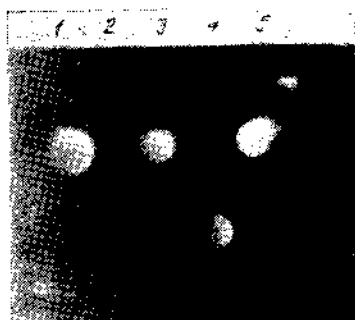


Рис. 5. Авторадиограмма DOT-гибридизации хромосомной ДНК хориона человека: 1 — *pYF92-his<sup>r</sup>*; 2 — *pBR322*; 3 — *pYF440-his<sup>r</sup>*; 4 — ДНК хориона человека; 5 — *pYF441*

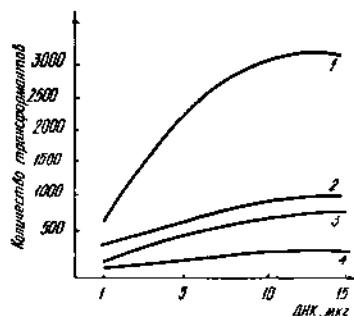


Рис. 6. Уровни частоты трансформации дрожжей суммарными препаратами рекомбинантных ДНК из лейкоцитов и клеток плаценты человека: 1 — положительный контроль (*pYF92*), 2 — рекомбинанты с фрагментами лейкоцитарной ДНК; 3 — рекомбинанты с фрагментами ДНК плаценты; 4 — отрицательный контроль (*pYF40*)

цией с хромосомной ДНК хориона человека. В качестве отрицательного контроля использована плазида *pBR322*. Все зонды были мечены  $^{32}\text{P}$ -dCTP (рис. 5).

Биологическую активность клонированных фрагментов ДНК генома человека проверяли по отличию в частоте трансформации контрольной плазмидой *pYF40* (рис. 6), которая составляла 1—10 трансформантов на 10 мкг пДНК. Как положительный контроль репликативной трансформации использовали плазмиду *pYF92* ( $10^3$  трансформантов на 10 мкг пДНК).

Биологическую активность полученных фрагментов ДНК в культуре клеток человека определяли, выделяя плазмидную ДНК из трансфектантов после 240 ч инкубирования с последующей трансфекцией *E. coli*.

Наличие продукта маркерного гена *apo-A1* тестировали в среде, отобранной через определенные промежутки времени (48, 96, 168, 240 ч), методом сэндвич-ИФА с использованием поликлональных антител кролика к белку *Apo-A1*. Белок *Apo-A1* человека получали по методу [16], кролей иммунизировали, вводя подкожно в несколько точек на спине 100 мкг белка *Apo-A1* с полным адъювантом Фрейнда. С недельным интервалом осуществляли еще две инъекции белка с неполным адъювантом Фрейнда, а также бустер-инъекцию без адъюванта в краевую вену уха. Через 7—8 дней отбирали кровь, содержащую специфические антитела к *Apo-A1* человека. Антитела из сыворотки крови очищали двукратным высаливанием 33 %-м раствором сульфата аммония с последующей ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе [17]. Конъюгат «антитела к *Apo-A1* человека + пероксидаза хрена» получали по методу [18].

**Результаты и обсуждение.** Для клонирования AP-последовательностей ДНК генома человека созданы суммарные смеси рекомбинантов на основе плазмиды *pYF40*, содержащих *EcoRI*-фрагменты плацентарной ДНК генома человека. Для обогащения редко встречающимися последовательностями, смеси проводили через *E. coli*. После селек-

тивной трансфекции дрожжей у варианта с обогащенным препаратом рекомбинантов выявлен повышенный уровень трансформации относительно нижнего (отрицательного) контроля (рис. 6).

На рис. 6 представлены результаты анализа уровней трансформаций дрожжей контрольными плазмидами ДНК и рекомбинантами с ДНК генома человека. При скринировании около 100 трансформантов из каждой группы опытов (плацентарная хромосомная ДНК, лейкоцитарная хромосомная ДНК) выявлены четыре рекомбинантные молекулы, содержащие вставки разных размеров (рис. 7, дорожки 4—7). Совпадение по электрофоретической подвижности *EcoRI*-рестриктов (длиной 5,35 тыс. п. н., рис. 7, дорожки 4—7) и *VamHI*-рестриктов (дорожки 10—13) рекомбинантных плазмид с такими же рестриктиками исходной плазмиды *pYF40* доказывает расположение вставок в клони-

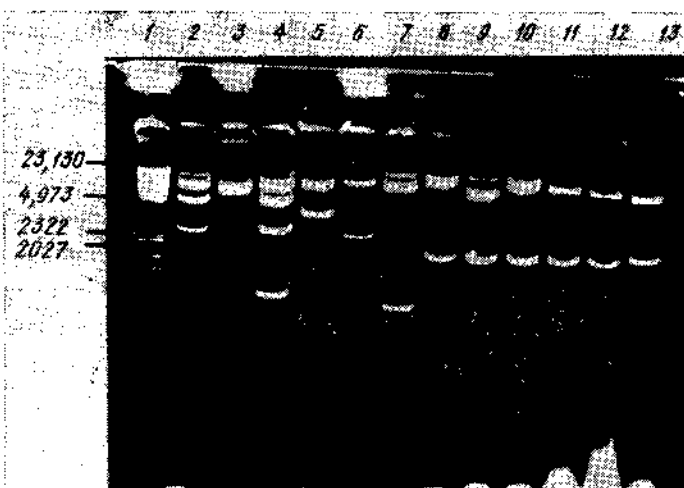


Рис. 7. Электрофореграмма рестрицированных плазмид по сайтам:  $\lambda$ -*HindIII* (дорожка 1, контроль), *EcoRI* (2—7) и *VamHI* (8—13): 2, 8—*pYF92*; 3, 9—*pYF40*; 4, 10—*pYF440*; 5, 11—*pYF441*; 6, 12—*pYF442*; 7, 13—*pYF443*

рующем векторе. Полученные плазмиды обозначены как *pYF440*, *pYF442* (содержащие фрагменты лейкоцитарной хромосомной ДНК, рис. 7, дорожки 4 и 6) и *pYF441*, *pYF443* (содержащие фрагменты плацентарной хромосомной ДНК, рис. 7, дорожки 5 и 7).

Полученные плазмиды были использованы в дальнейшей работе по тестированию их биологической активности (репликации) в дрожжах. Наивысшая трансформирующая способность в дрожжах из рекомбинантов обнаружена у плазмиды *pYF440* —  $10^{-3}$  трансформантов на 10 мкг ДНК (рис. 8). Она содержит вставку из лейкоцитов, состоящую из трех *EcoRI*-фрагментов размерами 3,5; 2 и 1 тыс. п. н., что не позволило однозначно идентифицировать AP-последовательность (рис. 7, дорожка 4). У остальных рекомбинантов выявлены более низкие уровни трансформации, сравнимые с контролем.

Для доказательства принадлежности полученных AP-последовательностей к геному человека была проведена DOT-гибридизация (рис. 5). В качестве зонда использовали нативную суммарную ДНК хориона. Отрицательным контролем служила плаزمида *pBR322*. Для исключения фона неспецифического связывания ДНК из тестируемых плазмид был удален *his3*-ген. Как видно из рисунка, положительную реакцию выявлено у плазмиды *pYF92-his<sup>-</sup>*, содержащей омикронную ДНК дрожжей [19], видимо, имеющую гомологию с геномной ДНК человека, скорее всего, из-за наличия консенсуса репликации и прилегающих к нему областей.

Для более детального тестирования полученных фрагментов из лейкоцитарной ДНК генома человека было проведено субклонирова-

ние каждого *EcoRI*-фрагмента отдельно друг от друга в вектор, очищенный от эукариотических сейленсеров («ядовитых» последовательностей, ингибирующих эукариотические регуляторные элементы) и содержащий маркерный ген *aro-A1* человека. Полученными конструкциями трансфицировали культивируемые фибробласты кожи человека.

Результаты, представленные на рис. 9, показывают, что максимальный уровень белка *Aro-A1* человека, секретируемого в культуральную среду, тестировался после 168 ч инкубирования трансфектантов.

По белку максимальный всплеск наблюдался в варианте с плазмидой *pWTV*, содержащей наибольший субклонированный *EcoRI*-фрагмент. Сниженный уровень *Aro-A1*, тестирующийся во всех рекомбинантах после 240 ч инкубирования, свидетельствует об уменьшении

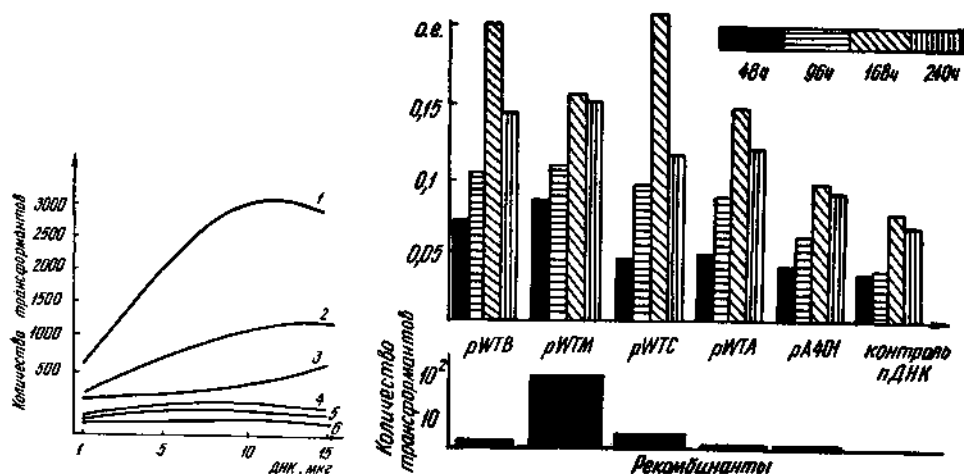


Рис. 8. Различия в уровнях трансформации дрожжей полученными рекомбинантными плазмидами: 1 — pYF92; 2 — pYF440; 3 — pYF441; 4 — pYF40; 5 — pYF442; 6 — pYF443

Рис. 9. Диаграмма зависимости уровней белка *Aro-A1* в культуральной среде от вида рекомбинантных молекул

количества биологически активных матриц плазмидной ДНК с маркерным геном *aro-A1*. Диаграмма, представленная на рис. 9, показывает частоту трансформации *E. coli* плазмидной ДНК, выделенной из трансфицированных фибробластов кожи человека после 240 ч инкубации культуры. Наибольшее количество трансформантов ( $\sim 10^2$  на 1 мкг пДНК) наблюдалось в опыте с плазмидой *pWTM*, содержащей наименьший субклонированный *EcoRI*-фрагмент. Отличие на два порядка от контроля частоты трансформации доказывает преимущество длительного персистирования именно данного рекомбинанта, включающего субклонированный *EcoRI*-фрагмент лейкоцитарной ДНК генома человека ( $\sim 1$  тыс. п. н.). В опыте использовали плазмиду *pA401* с AP-последовательностью из генома кукурузы. Как видно из рис. 9, по белковому уровню и частоте трансформации данная конструкция уступает рекомбинантам с фрагментами ДНК генома человека. У варианта с плазмидой *pWTC*, содержащей субклонированный *EcoRI*-фрагмент размером  $\sim 2$  тыс. п. н., обнаружен сравнимый с плазмидой *pWTV* всплеск синтеза белка *Aro-A1*, хотя уровни трансформаций *E. coli* этими двумя плазмидами сопоставимы с контролем. Полученные данные указывают на то, что субклонированные *EcoRI*-фрагменты ДНК генома человека (3,5 и 2 тыс. п. н. соответственно) несут в себе или являются частью регуляторных элементов транскрипции.

Субклонированный *EcoRI*-фрагмент размером  $\sim 1$  тыс. п. н. в составе плазмиды *pWTM*, судя по трансформации, — автономно реплицирующаяся последовательность, способная поддерживать генетические

матрицы маркерного гена в большом количестве копий относительно других рекомбинантов. Это позволяет тестировать белковый продукт (*apo-A1* человека) на более высоком уровне относительно контроля.

Є. С. Федоренко, Д. М. Іродов, Л. І. Лихачова, С. М. Подольська, В. А. Кордюм

## КЛОНУВАННЯ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ДНК ГЕНОМУ ЛЮДИНИ, ЯКІ АВТОНОМНО РЕПЛІКУЮТЬСЯ

### Резюме

Клоновано фрагменти сумарної ДНК геному людини із лейкоцитів і клітин плаценти, здатні забезпечувати автономний стан клонуемого вектора *pYF40* (у який їх вміщено) в *Saccharomyces cerevisiae*. Отримано два фрагменти відповідних молекулярних мас: 6,5 (із лейкоцитів) і 3,4 тис. п. н. (із клітин плаценти), яким притаманна висока трансформуюча здатність у пекарських дріжджах ( $10^2$ — $10^3$  трансформантів на 10 мкг плазмідної ДНК). Виявлено продовжену експресію гена *apo-A1* людини у складі екстрахромосомних рекомбінантних ДНК, що містять клоновані АР-послідовності, які автономно реплікуються.

Y. S. Fedorenko, D. M. Irodov, L. I. Lihacheva, S. M. Podolskaya, V. A. Kordium

## CLONING OF HUMAN ARSs

### Summary

In this study we cloned two fragments of total DNA of human genome from leukocytes and placental cells, which capable provide of autonomously state of *pYF40* cloning vector (in which there was consisted) in *Sacch. cerevisiae*. The obtained fragments have in length: 6,5 (from leukocyte) and 3,4 kb (from placental cells), respectively. This fragments can provide high transformation in yeast ( $10^2$ — $10^3$ ) transformants (10  $\mu$ g plasmid DNA).

We have obtained long expression of *apo-A1* human gene carried by extrachromosomal recombinant DNA, which contain cloned ARSs (autonomously replications sequences).

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Duesberg P. H. Transforming genes of retroviruse // Quant. Biol. Cold Spring Harbor Symp.—1980.—44.— P. 13—29.
2. Sorge J., Wright D., Erdman V. D. Amphotropic retrovirus vector system for human cell gene transfer // Mol. and Cell. Biol.—1984.—4.— P. 1730—1737.
3. Myers R. M., Tjian R. Construction and analysis of simian virus 40 origins defective in tumor antigen binding and DNA replication // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1980.—77.— P. 6491—6493.
4. Hanahan D., Lane D., Lipsich L. Characteristic of an SV40-plasmid recombinant and its movement into and out of the genome of a murine cell // Cell.—1980.—21.— P. 127—139.
5. Graham F. L. Biological activity of tumor virus DNA // Adv. Cancer Res.—1977.—25.— P. 1—51.
6. O'Hare K., Benist C., Breathnach R. Transformation of mouse fibroblasts to metotrexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dehydrofolate reductase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78.— P. 1527—1531.
7. Mellon P., Parker V., Glusman Y., Maniatis T. Identification of DNA sequence required for transcription of the human *L1-globin* gene in new SV40 host-vector system // Cell.—1981.—28.— P. 279—288.
8. Mitrani-Rozerbaum S., Maroteaux L., Mory Y. Indusable expression of the human interferon gene linked to a bovine papilloma virus DNA vector and maintained extrachromosomally in mouse cells // Mol. and Cell. Biol.—1983.—3.— P. 233—240.
9. Di Maio D., Maniatis T. Intact bovine papilloma virus-human DNA recombinant plasmids that propagate as episomes in mouse cells and bacteria // Eukaryotic viral vectors / Ed. Y. Gluzman.—New York: Cold Spring Harbor. Lab., 1982.— P. 93—97.
10. Оганесян Н. А., Чепурной А. И., Вельнов В. В. и др. Изучение стабильности гибридных плазмид, реплицирующихся в *Sac. cerevisiae* за счет фрагментов вируса полисомы // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 1.— С. 21—29.
11. Montiel J. F., Norburu C. J. et al. Characterization of human chromosomal DNA sequences which replicate autonomously in *Sacch. cerevisiae* // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 2.— P. 1049—1053.

12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.—384 с.
13. Гловер Д. Новое в клонировании ДНК. Методы.— М.: Мир, 1989.—229 с.
14. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков.— М.: Мир, 1983.— С. 54—56.
15. Шульженко В. Н., Кордюм В. А. Клонирование последовательностей ДНК генома кукурузы, способных к автономной репликации в *Saccharomyces cerevisiae* // Биополимеры и клетка.—1987.—3, № 5.— С. 270—274.
16. Климов А. М., Усатенко М. С., Денисенко А. Д. и др. Выделение аполипротеинов А-I, А-II и Е и их оценка с помощью ракетного иммуноэлектрофореза в плазме крови больных с дис- $\alpha$ -липопротеинемией // Биохимия.—1981.—№ 4.— С. 590—602.
17. Zevy H. B., Sober H. A. A simple chromatographic method for preparation of gamma globulin // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.—1960.—103.— P. 250—252.
18. Wilson W. B., Nakane P. K. Immunofluorescence and related staining techniques // Eds W. Knapp et al.— Amsterdam, 1978.— P. 215—224.
19. Jayaram M., Li Y. Y., Broach J. R. The yeast plasmid 2  $\mu$ m circle encodes components required for its high copy propagation // Cell.—1983.—34.— P. 95—104.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики НАН Украины, Киев

Получено 22.02.94