

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УПРОЩЕННЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ κДНК НИЗКОКОПИЙНЫХ И МОЛЧАЩИХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ НА ПРИМЕРЕ РЕНАЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

В.И. Федченко*, А.А. Калошин

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121, Москва, Погодинская ул. 10; *e-mail: valfed38@yandex.ru

Разработан упрощенный «экзональный» метод получения κДНК низкокопийных и молчащих эукариотических генов. Он основан на сборе целевого гена с геномной ДНК путем прямого синтеза его экзонов с последующим их объединением ПЦР без дополнительной очистки ампликонов. При синтезе экзонов использовали прямые праймеры, которые включают примерно ~20 нуклеотидов 3'-концевой последовательности предыдущего от амплифицируемого экзона и ~20 нуклеотидов 5'-начальной последовательности амплифицируемого экзона. Обратные праймеры включали ~20 нуклеотидов комплементарной концевой последовательности амплифицируемого экзона. Прямой и обратный праймеры, фланкирующие собираемый ген, включали сайты рестрикции, необходимые для встраивания в экспрессирующий вектор. Такой подход позволяет быстро собрать практически любой эукариотический ген по известной нуклеотидной последовательности геномной ДНК, имеющейся в базе данных.

Key words: κДНК; ПЦР; экзон; клонирование; экспрессия**DOI:** 10.18097/BMCRM00101

ВВЕДЕНИЕ

Классические методы клонирования κДНК нового гена требуют выделения и очистки поли-А селективной мРНК из клеток или тканей с экспрессирующимся геном и последующим синтезом κДНК [1-3]. Выделение низкокопийных мРНК связано с определенными трудностями, а в случае тканей человека сопряжено с соблюдением юридически установленных процедур. Клонирование молчащих генов таким способом и вовсе невозможно.

В настоящее время анализ геномных последовательностей млекопитающих по определенным алгоритмам (gene prediction method) позволяет с достаточной точностью характеризовать геномные структуры. Наличие банка данных геномных последовательностей ДНК различных животных и человека (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), а также использование достаточно рутинной процедуры получения ПЦР-продуктов любых участков из геномной ДНК и последующем объединении таких участков ДНК позволяет достаточно быстро конструировать любые генетические конструкции с известной нуклеотидной последовательностью.

Методы ПЦР широко используются при клонировании различных нуклеотидных последовательностей и создании гибридных генов [4-6]. Для объединения двух фрагментов ДНК методом ПЦР сначала получают первый ПЦР-фрагмент, у которого с помощью синтетического олигонуклеотидного праймера на 5'-конце достраивают участок ДНК (около 20 нуклеотидов), комплементарный второму предыдущего 3'-концевому фрагменту ДНК. В результате отжига первого экзонного фрагмента со вторым экзональным фрагментом осуществляется амплификация объединяемого фрагмента ДНК.

В 1992 г. Booth с соавторами [7] амплифицировали индивидуальные экзоны человеческого цилиарного

нейротрофического фактора (human ciliary neurotrophic factor - CNTF), содержащего всего два экзона и один интрон. Были получены ПЦР-продукты первого и второго экзона, а затем эти экзоны объединяли и встраивали в плазмидный вектор с получением полной кодирующей последовательности CNTF. В этом случае была использована технология так называемого безлигированного клонирования (ligation-independent cloning – без использования эндонуклеаз рестрикции и лигазы) [8, 9]. Такая технология основывается на использовании олигонуклеотидных праймеров, в которых на 5'-конце дезокситимидиновые остатки заменяют дезоксиурициловыми остатками. После ПЦР ампликоны обрабатывают урацил-ДНК-гликозилазой (uracil DNA glycosylase – UDG), которая генерирует в ампликонах 3'-выступающие «липкие» (U)_n-концы. По этим концам происходит нековалентное объединение ПЦР-фрагментов и безковалентное встраивание их в экспрессионный вектор. Однако использование такой технологии объединения трех и более экзонов для получения полной кодирующей последовательности гена в современной литературе не описано.

В 2017 г. An с соавторами [10] описали метод получения полной кодирующей последовательности (κДНК) гена PIGR (human polymeric immunoglobulin receptor) человека, включающего 10 экзонов, посредством объединения единичных экзонов, полученных с матрицы ДНК при помощи ПЦР метода (Genomic DNA Splicing). Вначале авторы амплифицировали индивидуальные экзоны с матрицы геномной ДНК в отдельных реакционных средах с применением оптимизированных прямого и обратного праймеров в области интрона, которые фланкировали синтезируемые экзоны. После проведения амплификации экзонов ПЦР ампликоны подвергали электрофоретической очистке в агарозном геле. Во втором раунде ПЦР амплификации получали отдельные экзоны без интронных ДНК последовательностей. Для этого



Таблица 1. Праймеры, используемые в ПЦР амплификации 5-ти экзонов гена реналазы человека

Праймер	Структура праймера (5' → 3')
1Re-for	ggtcg ggatcc gatggcgcaggtgctgatcg
1Re-rev	cctgagtcgctcagccttctcc
2Re-for	ggacaaggctgacgactcagggggaagaatgactacagc
2Re-rev	cgttggtgtttttggcataatg
3Re-for	cattatgccaaaaaacaccaacg ttttatgatgaactgttagc
3Re-rev	ctgattctttcaagtaatgc
4Re-for	gcattactgaaagaatcaggtgcagaagtctacttc
4Re-rev	aggtggtgatgcaccttg
5Re-for	caaggtgacatcaccaccta aattagtgaaatgccaaagcc
5Re-rev	ctatattgccttctattatc
6Re-for	gataataagaacggcaatata gagtcacagaaatgggc
6Re-rev	cctgtgaatgtctccatttttgg
7Re-for	ccaaaatggagacattcacag gttacaatgctgctgcc
7Re-rev	gaggagct cgaga aatataattctttaaagc

Примечание. В структуре праймеров, нуклеотиды выделенные курсивом и жирным шрифтом, определяют область перекрывания смежных экзонов. Фланкирующие линкерные области праймера первого экзона (1Re-for) и обратного праймера седьмого экзона (7Re-rev) содержали соответственно сайты рестрикции BamHI и XhoI (нуклеотиды сайта рестрикции выделены жирным шрифтом и подчеркнуты).

использовали праймеры, содержащие нуклеотидные последовательности, перекрывающие соседние экзоны. Затем проводили объединение экзонов ПЦР методом, получая полноразмерную последовательность кДНК. Особенность такого подхода заключается в том, что для получения отдельных экзонов использовали двухэтапную амплификацию и, следовательно, удвоенное количество праймеров для синтеза каждого экзона и с обязательной очисткой ДНК ампликонов.

В этом же году (2017) Davies с соавторами [11] так же применил «SPLICE» метод при получении полноразмерной кДНК последовательности гена SWS1 (short-wavelength-sensitive 1), содержащего 5 экзонов, из геномной ДНК лемура. Сначала в ходе ПЦР-амплификации авторы получали индивидуальные экзоны без интронных последовательностей с матрицы геномной ДНК.

Прямые и обратные праймеры были подобраны таким образом, чтобы у ампликонов в начале второго экзона находился конец первого экзона. В первом раунде амплификации получали отдельные экзоны, а во втором раунде получали парные экзоны 1-2, 2-3, 3-4, 4-5. Такие ампликоны очищали электрофоретически в агарозном геле, а затем проводили их клонирование с последующим секвенированием. В третьем раунде получали ПЦР-продукты 1-3 и 3-5 экзонов. И на заключительной стадии – ПЦР-продукт полной последовательности кДНК (1-5 экзоны). При таком подходе при получении кДНК использовалась трудоемкая работа по очистке каждого ПЦР-продукта, его клонирование с последующим секвенированием.

Развитие химически-автоматического олигонуклеотидного синтеза позволило удлинять олигонуклеотидную матрицу

при помощи ПЦР до несколько сотен нуклеотидов. Стратегия ступенчатого наращивания нуклеотидной последовательности в результате нескольких ПЦР позволила осуществить синтез гена длиной 400 пар оснований (п.о., b.p.) [12]. В работе Гуревич и др. удалось осуществить химический синтез гена на синтетической матрице длиной более 650 п.о. [13]. Однако химический синтез гена на данный момент является трудоемкой и дорогостоящей работой и для получения полных кодирующих областей генов широко не используется.

Для получения кДНК гена эукариот мы предлагаем упрощенный экзональный метод получения кодирующей последовательности гена непосредственно с геномной ДНК посредством синтеза отдельных экзонов с последующим их объединением. Такой подход можно использовать для эффективного и быстрого клонирования функционально молчащих генов и генов с низким уровнем экспрессии. Метод основан на получении рекомбинантного гена из геномной ДНК организма по его известным экзонным структурам, что позволяет собрать любой ген из банка данных библиотеки генов эукариот. Суть его состоит в том, что вначале синтезируются ПЦР продукты отдельных экзонов, которые включают перекрывающиеся участки смежных экзонов. На следующих этапах амплификации идет объединение экзонов без предварительной очистки ПЦР-продуктов от предыдущей стадии амплификации экзонов. Такая технология упрощенного «экзонального» метода была применена нами при клонировании гена реналазы человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

Для исследования были использованы следующие реагенты: Tersus-ДНК полимеразы («Евроген», Россия), эдонуклеазы рестрикции BamHI, XhoI и маркеры молекулярной массы («Ферментас», Латвия), Ni-сефароза («GE Healthcare», Швеция). Система для очистки фрагментов ДНК (Wizard® SV Gel и PCR Clean-Up) и ТА-вектор (pGEM®-T easy vector) были приобретены в «Promega» (США). Плазмидный экспрессионный вектор pET-28a(f+) получен от «Novagen» (Англия). Олигонуклеотиды для ПЦР (табл. 1) были синтезированы и очищены через ПААГ («Синтол», Россия). E. coli штаммы Rosetta (DE3) были куплены в «Novagen». Другие химические реактивы были приобретены у «Sigma-Aldrich» (Россия).

Получение матрицы ДНК человека

Геномную ДНК человека получали из лимфоцитов крови человека стандартным фенол-хлороформом методом экстракции [14, 15]. В работе использовали 0.5 мл цельной крови, полученной от здорового донора. Образец цельной крови смешивали с 0.5 мл 20 мМ трис-ацетатного буфера, pH 7.5, содержащего 22% сахарозу, 20 мМ MgCl₂, 1% Triton X-100 и центрифугировали 10 мин при 3800 об/мин, используя центрифугу Eppendorf 5415R (Германия). Осадок клеток ресуспендировали в том же буфере, разбавляли в два раза дистиллированной водой и центрифугировали, как указано выше. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в 0.9 мл 10 мМ трис-HCl-буфера, pH 7.5, содержащего 400 мМ NaCl и 2 мМ ЭДТА. После добавления

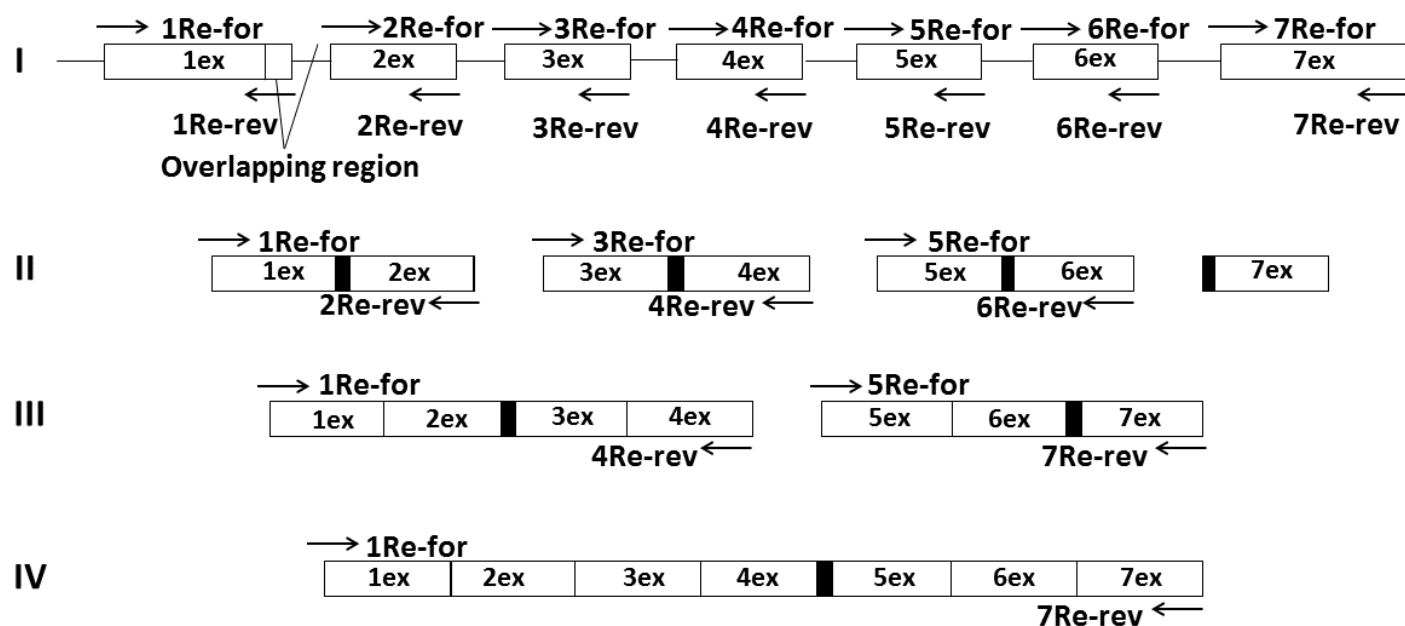


Рисунок 1. Схематическая иллюстрация получения полной нуклеотидной последовательности кДНК гена реналазы с матрицы ДНК человека. Получение кДНК разбито на 4 этапа. 1-й этап - синтез отдельных экзонов с геномной ДНК. 2-й по 4-й этапы – объединение амплифицированных экзонов. На рисунке обозначена область перекрывания экзонов, необходимая для их слияния.

0.1 мл 10 % SDS и протеиназы К (конечная концентрация 1 мг/мл) полученную смесь инкубировали при 58°C в течение 3 ч при перемешивании и затем последовательно обрабатывали одним объемом фенола и затем одним объемом фенол-хлороформа (1 : 1). После добавления 0.1 объема 3 М ацетата натрия, pH 5.0 и 0.6 объема изопропанола ДНК осаждали центрифугированием при 12000 об/мин в течение 15 мин с использованием той же центрифуги и затем промывали в холодном 70% этаноле. Очищенную ДНК растворяли в 200 мкл H₂O, не содержащей РНКазы, и ее концентрацию измеряли по поглощению при 260 нм с использованием УФ спектрофотометра Cary 50 (США). Образцы ДНК хранили при -20°C.

ПЦР метод

ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 6.7 мМ трис pH 8.8, 1.66 мМ (NH₄)₂SO₄; 0.02% Twin-20; 1 мМ MgCl₂; 0.2 мМ dNTP; 1% глицерин, 4 мМ (прямой и обратный) праймеры, 50–100 нг ДНК (или по 1 мкл ампликона от ПЦР) и 0.5 ед. Tersus-ДНК-полимеразы. Условия ПЦР: денатурация – 95°C в течение 5 мин – 1 цикл; элонгация – 92°C – 20 с, 55°C – 15 с, 72°C – от 30 с до 2-3 мин; количество циклов от 30 до 35; заключительный цикл 72°C – 3 мин. Время элонгации с Tersus-ДНК-полимеразой зависит от длины синтезируемого фрагмента. Синтез одиночных экзонов время элонгации – 30-40 сек, двойных экзонов – 1 мин, для четырех экзонов – 2 мин, при синтезе полноразмерной кДНК – 4 мин. При реамплификации матрицы ДНК использовали те же условия.

Электрофорез фрагментов ДНК проводили в 2% агарозном геле с использованием трис-боратного буфера pH 8.0 [16]. Электрофорез в 10% ПААГ проводили по Лэмбли [17].

Клонирование кДНК гена реналазы вначале проводили с плазмидой pGEM-T. Этот вектор включает на

3'-концах выступающий единственный Т-остаток, который значительно усиливает лигирование ПЦР продукта. В результате рестриктного анализа с последующим секвенированием отбирался клон, содержащий исходную нуклеотидную последовательность гена реналазы. Данную последовательность вырезали по сайтам рестрикции BamHI/XhoI и переклонировали в плазмиду pET-28a(+).

Трансформацию клеток *E. coli* проводили по методу Kushner [18]; алиquotы компетентных клеток (по 0.2 мл) хранили при -70°C. Трансформацию проводили по стандартному методу Cohen [19], используя 1 мкл вектора. Трансформированные клетки высевали на чашки с LB-агаром, содержащий антибиотик необходимый для селекции.

Экспрессию клонированного гена проводили следующим образом. Колонию клеток после трансформации, подращивали в 4 мл LB-среды с 50 мкг/мл каномидина (Km) в течение ночи. Ночную культуру пересевали в 200 мл этой же LB среды и наращивали культуру клеток до оптической плотности 0.5–0.7 ед. Затем вносили ИПТГ до концентрации 1.0 мМ и продолжали инкубировать клетки при интенсивном перемешивании еще 3 ч. Биомассу собирали центрифугированием при 5000 g и 4°C в течение 20 мин на Avanti J-E центрифуге («Beckman Coulter», США) и хранили при -20°C.

Выделение рекомбинантного белка осуществляли методом аффинной хроматографии с использованием Ni-сефарозы в 8 М буферном растворе мочевины. Биомассу, содержащую рекомбинантный белок, денатурировали в растворе, содержащем 8 М мочевины, 0.1 М NaH₂PO₄, 0.01 М трис, pH 8.0. Лизат переносили в колбу, добавляли к нему суспензию Ni-сефарозы (1 мл суспензии на 25 мл лизата) и инкубировали 2 ч при комнатной температуре в шейкере с легким покачиванием (40 об/мин). Полученную суспензию пропускали через колонку с использованием хроматографической системы Biologic LP («Bio-Rad», Германия). Отмывку сорбента со связавшимся белком

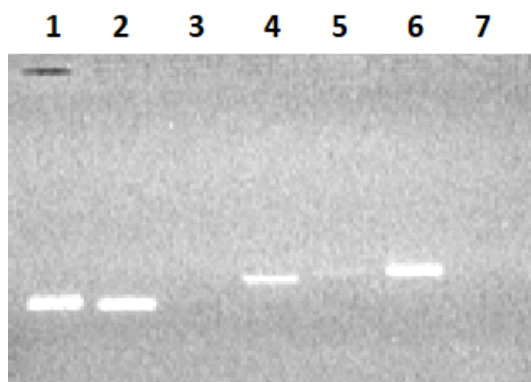


Рисунок 2. Электрофорез в 2 % агарозном геле ДНК (ампликоны экзонов полученные с геномной ДНК). Номер экзона соответствует номеру дорожки в геле.

осуществляли тем же буфером, который использовали при денатурации биомассы, но с pH 6.3, а затем с pH 5.9. Элюцию проводили с использованием аналогичного буферного раствора (pH 4.5). Препараты очищенных рекомбинантных белков растворяли в 50 мМ буферном растворе трис-НСl (pH 9.0) с помощью ступенчатого диализа при температуре 4°С против нескольких перемен буферного раствора (50 мМ трис-НСl, pH 9.0), содержащих 6 М, 4 М, 2 М и 1 М мочевины, а затем против буферного раствора, не содержащего мочевины. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически.

Секвенирование ДНК проводили на капиллярном ДНК секвенаторе 310 DNA analyzer («Applied Biosystems», США) с использованием BigDye Terminator v 3,1 Cycle Sequencing Kit в соответствии с рекомендациями фирмы производителя. Полученную последовательность ДНК соотносили с геном реналазы (NM_001031709, GeneBank), используя программу BLAST, доступную на сайте National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Согласно нуклеотидной последовательности банка данных (код доступа GenBank www.ncbi.nlm.nih.gov. Homo sapiens NM_001031709), ген реналазы включает семь кодирующих областей (экзонов). Следовательно, для синтеза полной кодирующей последовательности реналазы методом ПЦР необходимо было синтезировать 14 праймеров (семь «прямых» и семь «обратных»). Для подборки праймеров использовали следующий подход. Прямой праймер (1Re-for-forward) первого экзона содержал фланкирующую область около 15 нуклеотидов и включал сайт рестрикции BamHI, который использован для встраивания в вектор рЕТ-28a(+). Остальные прямые праймеры (1Re-for-7Re-for) включали две части. Первая часть содержала последовательность (20±3 нуклеотидов) конца предыдущего экзона и служила связующим звеном между экзонами (область перекрытия, см. рис.1). Вторая часть праймера состояла из 20±3 нуклеотидов начала амплифицируемого экзона. Длину праймера подбирали в зависимости от А-Т/Г-С состава последовательности ДНК. Обратные праймеры (Re-rev – reverse) конструировали (20±3 нуклеотидов) так, чтобы они были комплементарны последовательности концевой части амплифицируемого экзона. Праймер последнего экзона (7Re-rev) содержал фланкирующую область (до 15 нуклеотидов),

которая включала сайт рестрикции XhoI, необходимый для встраивания в плазмидный вектор рЕТ-28a(+). (табл. 1).

Синтез кДНК гена реналазы человека проводили на матрице ДНК человека, полученной из лимфоцитов цельной крови. Полную кодирующую область гена реналазы собирали в 4 этапа (рис. 1).

На первом этапе на матрице ДНК человека методом ПЦР получали семь единичных экзонов. При амплификации одиночных экзонов обычно получают минорные полосы фрагментов ДНК экзонов с хорошим выходом продукта ампликонов в реакции. Однако при амплификации экзонов 3, 5 и 7 синтезировались фрагменты ДНК экзонов с малым выходом ПЦР продукта (рис 2).

Для увеличения выхода продукта амплификации, при амплификации 3-го экзона увеличивали концентрацию матрицы геномной ДНК в 3 раза (150 нг ДНК), а при реамплификации 5-го и 7-го экзона в качестве матрицы использовали ампликоны от первой амплификации (1-2 мкл реакционной смеси). В результате амплификации с матрицы ДНК семи экзонов в отдельных ПЦР и последующей реамплификации экзонов 3, 5 и 7 были получены ампликоны ДНК экзонов: 1Re – 131 п.о., 2Re – 126 п.о., 3Re – 166 п.о., 4Re – 179 п.о., 5Re – 193 п.о., 6Re – 197 п.о., 7Re – 172 п.о. (рис. 3).

На втором этапе методом ПЦР проводили парное объединение экзонов 1Re со 2Re, 3Re с 4Re и 5Re с 6Re. Матрицей служили ампликоны ДНК одиночных экзонов, а праймерами для первой пары – 1Re-for и 2Re-rev; для второй пары – 3Re-for и 4Re-rev; третьей пары – 4Re-for и 4Re-rev. Связующим звеном при объединении экзонов служила область перекрытия (~20 нуклеотидов), которая была общей для экзонов, т.е. концевая область начального экзона соответствовала начальной области следующего экзона. В результате амплификации трех отдельных ПЦР были получены три фрагмента ДНК парных экзонов: 1Re-2Re – 236 п.о., 3Re-4Re – 325 п.о., 5Re-6Re – 370 п.о. (рис. 1, 4а).

На третьем этапе объединяли парные экзоны: 1Re-2Re с 3Re-4Re и 5Re-6Re 7Re1. В качестве матрицы были использованы ампликоны парных экзонов от второго этапа, а

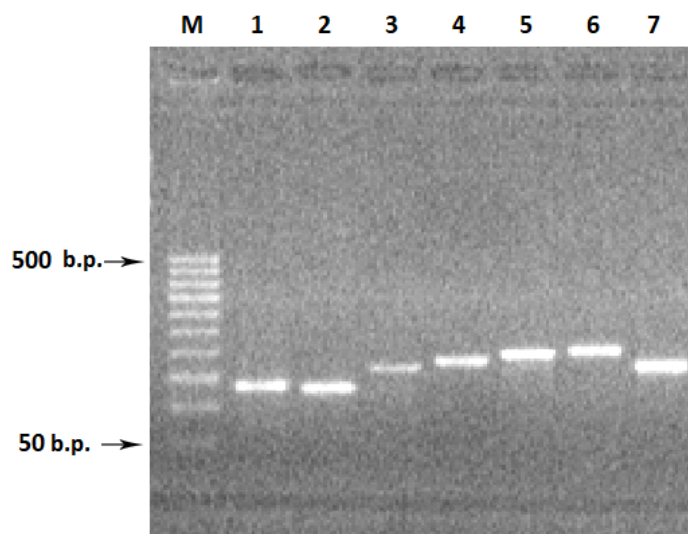


Рисунок 3. Электрофорез в 2 % агарозном геле продуктов ПЦР амплификации 1 - 7 экзонов. Номер экзона соответствует номеру дорожки в геле. М - ДНК маркер: 50 п.о., 100 п.о., 150 п.о., 200 п.о., 250 п.о., 300 п.о., 350 п.о., 400 п.о., 450 п.о., 500 п.о.

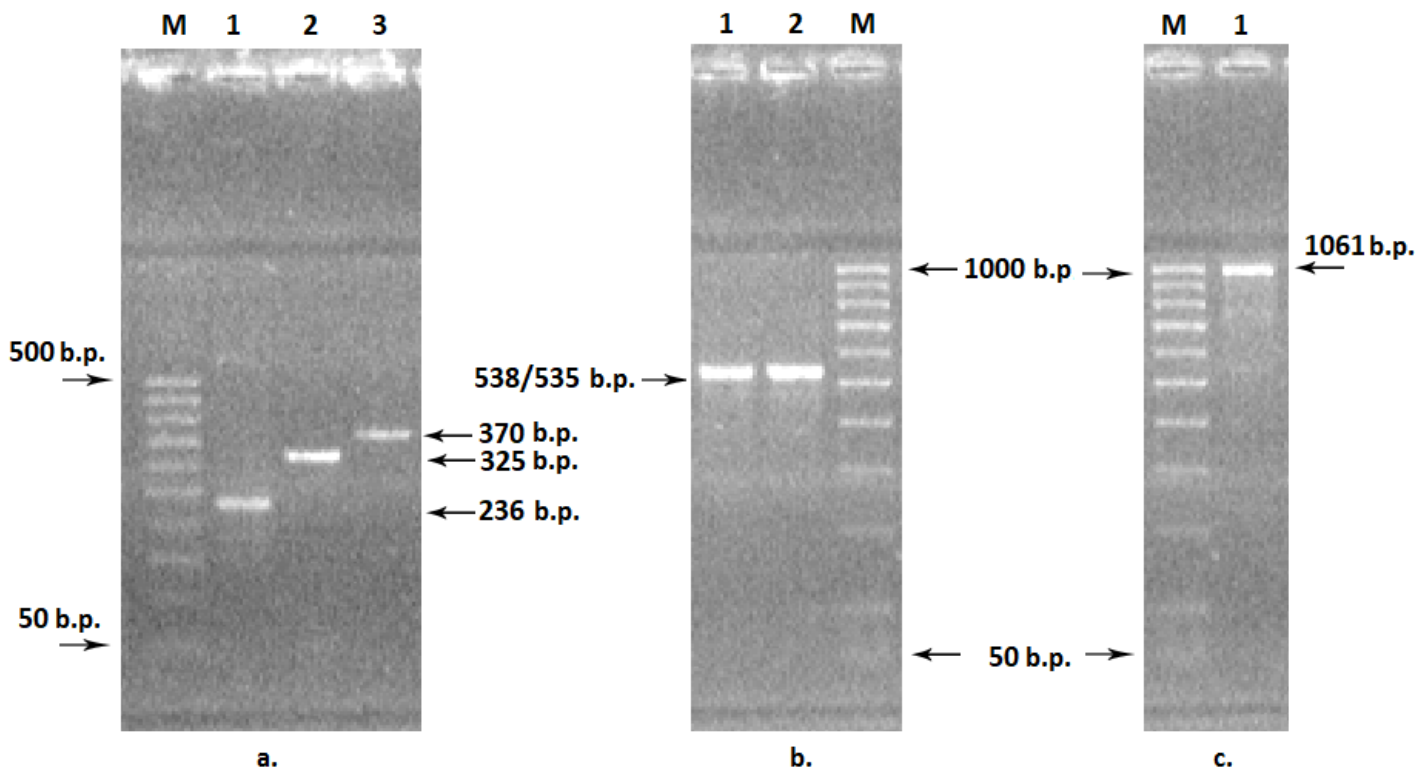


Рисунок 4. Электрофорез в 2 % агарозном геле продуктов ПЦР амплификации: (а) парных экзонов: 1 - 1Re-2Re – 236 п.о.; 2 - 3Re-4Re – 325 п.о.; 3 - 5Re-6Re – 370 п.о.; М - ДНК маркер 50 п.о., 100 п.о., 150 п.о., 200 п.о., 250 п.о., 300 п.о., 350 п.о., 400 п.о., 450 п.о., 500 п.о.; (б) при объединении четырех и трех экзонов: 1 - 1Re-4Re – 538 п.о.; 2 - 5Re-7Re – 535 п.о.. М - ДНК маркер 50 п.о., 100 п.о., 200 п.о., 300 п.о., 400 п.о., 500 п.о., 600 п.о., 700 п.о., 800 п.о., 900 п.о., 1000 п.о.; (с) при слиянии четырех и трех экзонов, полученных после третьего раунда амплификации: 1 - 1Re-7Re – 1061 п.о.; М - ДНК маркер 50 п.о., 100 п.о., 200 п.о., 300 п.о., 400 п.о., 500 п.о., 600 п.о., 700 п.о., 800 п.о., 900 п.о., 1000 п.о.

праймерми служили 1Re-fog для первой ПЦР и 4Re-rev и 5Re-fog и 7Re-rev для второй ПЦР. В результате амплификации двух отдельных ПЦР были получены 2 фрагмента ДНК объединенных 4-х экзонов и 3-х экзонов: 1Re-4Re – 538 п.о., 5Re-7Re – 535 п.о. (рис. 4б).

На четвертом заключительном этапе синтеза полноразмерной кДНК гена реналазы человека объединяли фрагменты ДНК четырех и трех экзонов - 1Re-4Re с 5Re-7Re. В качестве матрицы использовали ампликоны ДНК экзонов от третьего этапа, а праймерми служили 1Re-fog и 7Re-rev. В результате синтеза был получен фрагмент ДНК 1Re-7Re – 1061 п.о., фланкирующие концы прямого и обратного праймеров содержали сайты рестрикции BamHI и XhoI, соответственно (рис. 4с).

Клонирование и экспрессия

Конечный ПЦР продукт сборки экзонов - фрагмент ДНК размером 1061 п.о. - вначале очищали в 2% агарозном геле, а затем проводили выделение и очистку с помощью системы для очистки фрагментов ДНК (Wizard), согласно протоколу производителя. Очищенный таким образом фрагмент ДНК был встроен в плазмиду рGEM-T. В результате рестриктоного анализа были отобраны 5 клонов. После секвенирования клонированной последовательности ДНК и проведения BLAST анализа (программное обеспечение (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) был выбран вариант гена реналазы, который соответствовал нуклеотидной последовательности гену реналазы человека

банка данных (код доступа GenBank www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001031709). Эта последовательность была вырезана по сайтам рестрикции BamHI/XhoI и переклонирована в вектор рЕТ-28a(+). При встраивании кДНК последовательности в вектор рЕТ-28a(+) ген реналазы находился под контролем T7-промотора и Lac-оператора (рис. 5).

Полученный экспрессионный вектор был обозначен как рЕТ-RenI. Экспрессию проводили в клетках *E.coli Rosetta* (DE3). В результате экспрессии был получен белок, который на N-конце содержал 6 гистидиновый пептид (6xHis), необходимый для очистки белка на колонке с Ni-Sepharose. Экспрессированный белок анализировали электрофоретически в 10 % ПААГ (рис. 6). По расчетным данным, белок реналазы содержит 342 аминокислотных остатка (а.о.), включал 6 гистидинов и соответствовал молекулярной массе 39 кДа.

ОБСУЖДЕНИЕ

При амплификации фрагментов ДНК одиночных экзонов используется матрица геномной ДНК человека, выделенной из лимфоцитов крови. Выделение геномной ДНК является рутинной процедурой и не занимает много времени. Если амплификация экзона дает незначительный выход целевого продукта, то повторная амплификация ДНК (реамплификация) экзонов дает хороший выход целевого продукта. Так, в нашем случае, при амплификации с матрицы геномной ДНК 3-й и 7-й экзоны при электрофорезе в агарозном геле не выявлялась видимая полоса целевого ампликона или получали низкий выход ПЦР продукта 5-го экзона (рис. 2). В этом случае на первом этапе амплификации экзонов либо увеличивали

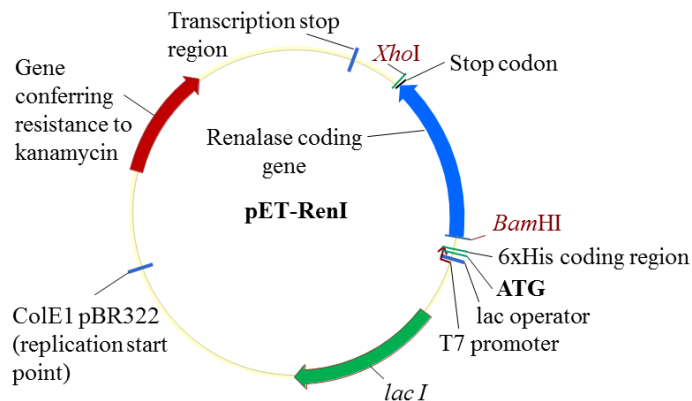


Рисунок 5. Схема экспрессионного вектора pET-RenI.

в 2–3 раза концентрацию матрицы геномной ДНК (при амплификации экзона 3), либо проводили реамплификацию (в случае амплификации экзонов 5 и 7). Реамплификацию проводили в тех же условиях за исключением того, что вместо матрицы геномной ДНК использовали ампликоны ДНК от ПЦР (1–2 мкл), а количество циклов уменьшали до 30. При амплификации ДНК объединяемых экзонов в качестве матрицы используется 0.5–1 мкл ПЦР смеси ДНК ампликонов экзонов без предварительной их очистки, что значительно упрощает и ускоряет процедуру следующего этапа амплификации. Незначительная примесь праймеров или ампликоны от предыдущей амплификации не влияют на амплификацию ДНК при объединении экзонов и не дают побочные ПЦР ампликоны. Это свидетельствует о том, что процесс амплификации главным образом осуществляется на ДНК ампликонах, добавляемых в качестве матрицы.

Другими авторами [10, 11] также описан метод получения полной кодирующей последовательности гена посредством объединения единичных экзонов полученных с матрицы геномной ДНК методом ПЦР. Однако в первой работе используется двухэтапная амплификация при синтезе каждого экзона с обязательной очисткой ампликонов от каждой ПЦР, а во второй работе – трудоемкая процедура очистки ампликонов и их анализ на нативность нуклеотидной последовательности. В нашем случае, при клонировании полной последовательности кДНК гена реналазы, идентичность нуклеотидной последовательности кДНК анализировали только на конечном этапе сборки гена. Полную кДНК последовательность гена реналазы клонировали вначале в вектор pGEM-T. В результате рестриктного анализа (BamHI/XhoI) клонов в рекомбинантной плазмиде pGEM-T выявляли фрагменты ДНК размером 1060 п.о. По данным секвенирования кДНК гена реналазы в рекомбинантных плаزمиде, выделенных из пяти отобранных клонов, в нуклеотидной последовательности гена реналазы 1-го клона были обнаружены три точечные мутации в положении 107, 342 и 723. Однако эти мутации затрагивали третий нуклеотид вырожденных триплетов и не меняли кодируемые аминокислоты. Ген реналазы клона 2 и клон 4 имел мутации, затрагивающие аминокислотную последовательность белка. Ген реналазы 3-го и 5-го клона не содержал точечных мутаций. Исходя из этих данных можно сделать вывод, что в клонах, содержащих рекомбинантный ген реналазы, с высокой вероятностью можно отобрать последовательность, которая соответствует нуклеотидной последовательности гена реналазы человека из базы данных (код доступа GenBank www.ncbi. Homo sapiens

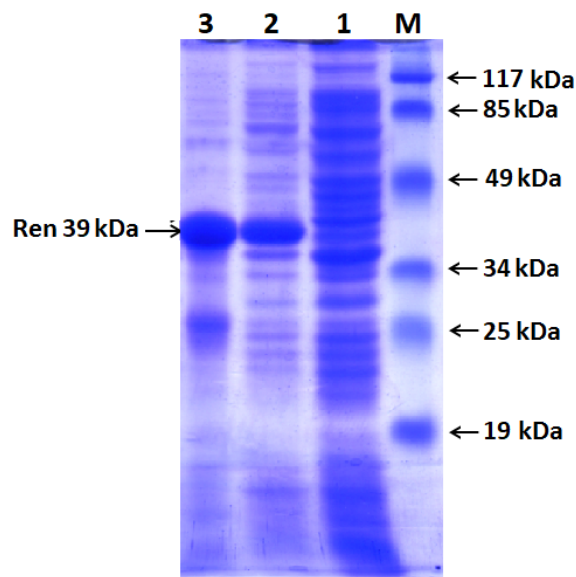


Рисунок 6. Электрофорез в 10 % ПААГ белков клеток *E.coli* при экспрессии гена реналазы: 1 – тотальный белок клеток без индукции; 2 – тотальный белок после индукции клеток ИПТГ; 3 – белок реналазы с молекулярной массой 39 кДа (Рен 39 кДа) после очистки на колонке с Ni-Sepharose; М – маркер молекулярной массы белков (19 кДа, 25 кДа, 34 кДа, 49 кДа, 85 кДа и 117 кДа).

NM_001031709). Следует отметить, что сама ПЦР может вводить мутации в амплифицированную ДНК. Такие мутации являются результатом недостаточно высокой репликативной точности работы Taq ДНК-полимеразы. Для понижения мутационного давления обычно уменьшают общее количество циклов в амплификации ДНК, либо используют термостабильную ДНК полимеразу с корректирующей активностью [9, 12, 20]. Для наших целей мы использовали Tersus-ДНК полимеразу («Евроген»), представляющую собой, специально разработанную смесь термостабильных ДНК полимераз для эффективной амплификации длинных фрагментов ДНК и обладающей корректирующей 3'→5' экзонуклеазной активностью.

Суммируя результаты, полученные при помощи предлагаемого нами «экзонового» метода клонирования рекомбинантного гена реналазы, следует отметить следующие преимущества данного метода:

- данный подход является универсальным и простым методом при клонировании рекомбинантных генов, который не требует значительных временных и материальных затрат в отличие от известных в настоящее время методик;

- алгоритм подбора праймеров прост и производится исходя из банка данных нуклеотидной последовательности геномной ДНК, а число праймеров равно удвоенному числу экзонов клонируемого гена;

- для данного метода не требуются клетки и ткани животных или человека в которых повышена экспрессия клонируемого гена. Использование ткани человеческого материала может быть сопряжено (например, в случае посмертного материала) с соблюдением юридически установленных процедур.

Данный подход клонирования генов мы использовали при клонировании гена реналазы-1 и -2 [21, 22], а также при клонировании различных форм реналазы в плазмидные вектора pET-28 и pcDNA4 (Fedchenko et al., in preparation).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Здоровые добровольцы дали информированное согласие на использование их образцов крови в исследовательских целях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы и частично поддержана грантом РФФИ № 17–04–00484 (2017–2019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jayakumara, Huang, W.-Y., Raetz, B., Chirala, S.S., Wakil, S.J. (1996). Cloning and expression of the multifunctional human fatty acid synthase and its subdomains in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 14509–14514.
2. Dae, W.K., Won, S.E., Sang, H.J., Chang, S.Y., Young, H.K., Soo, H.C., Hee, S.C., So, Y.K., Hyeok, Y.K., Jung, H.K., Oh-Shin, K., Sung-Woo, C., Jinseu, P., Soo, Y.C. (2003). Molecular Gene Cloning, Expression, and Characterization of Bovine Brain Glutamate Dehydrogenase. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, **36** (6), 545–551.
3. Salah, E.E., Abdalla, M., Eltayb, W.A., El-Arabey, A.A., Ganash, M., Alshammari, F.D., Barreto, G., Ashraf, G.M. (2019). Molecular cloning, expression, purification, and functional characterization of SP-22 gene from *Bombyx mori*. J. Cell. Biochem., [Epub ahead of print] DOI: 10.1002/jcb.28826.
4. Yon, J., Fried, M. (1989). Precise gene fusion by PCR. Nucleic Acids Res., **17**(12), 4895. DOI: 10.1093/nar/17.12.4895
5. Ciccarelli, R.B., Gunyuzlu, P., Huang, J., Scott, C., Oakes, F.T. (1991). Construction of synthetic genes using PCR after automated DNA synthesis of their entire top and bottom strands. Nucleic Acids Res., **19**(21): 6007–6013.
6. Haoming, G., Jose, P., Rey, G., Donella, J.W. (1991). Full length mouse glycophorin gene constructed, using recombinant polymerase chain reaction. Biochem. Biophys. Res. Commun., **177** (1), 202–208.
7. Booth, P.M., Buchman, G.W., Rashtchian, A. (1994). Assembly and cloning of coding sequences for neurotrophic factors directly from genomic DNA using polymerase chain reaction and uracil DNA glycosylase. Gene, **146**, 303–308.
8. Nisson, P.C., Rashtchian, A., Watkins, P.C. (1991). Rapid and efficient cloning of alu-PCR products using uracil DNA glycosylase. PCR Methods Appl., **1**, 120–123.
9. Rashtchian, A., Buchman, G., Schuster, D., Berninger, M. (1992). Uracil DNA glycosylase-mediated cloning of PCR-amplified DNA: application to genomic and DNA cloning. Anal Biochem. **206**, 91–97.

10. An, X., Lu, J., Huang, J., Zhang, B., Liu, D., Zhang, X., Zhou, Y., Tong, Y. (2007). Rapid Assembly of Multiple-Exon cDNA Directly from Genomic DNA. PLoS ONE, **2**(11):e1179.
11. Davies, W.L., Carvalho, L.S., Hunt, D.M. (2007) SPLICE: A technique for generation in vitro spliced coding sequences from genomic DNA. BioTechniques, **43**, 785–789.
12. Di Donato, A., de Nigris, M., Russo, N., Di Biase, S., D'Alessio G. (1993). A method for synthesizing genes and cDNAs by the polymerase chain reaction. Anal Biochem. **212**(1), 291–293.
13. Gurevich, A.I., Esipov, R.S., Kaiushin, A.L., Korosteleva, M.D. (1997) Construction of artificial genes by PCR methods using the synthetic template. Bioorgan. Khim., **23** (6), 495–496.
14. Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, **16** (3), 1215.
15. Grimberg, J., Nawoschik, S., Belluscio, L., McKee, R., Turck, A., Eisenberg, A. (1989). A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. Nucleic Acids Res., **17**, 8390.
16. Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.Y., Kim, Y. H. (2012) Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. J. Vis. Exp., **62**, e3923, DOI: 10.3791/3923.
17. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**, 680–685.
18. Kushner, S. R. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. In: Genetic engineering (Boyer H.B. and Nicosia S., eds.), p. 17, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
19. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **69**, 2110–2114.
20. Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol., **155**, 335–50.
21. Fedchenko, V.I., Kaloshin, A.A., Mezhevskina, L.M., Buneva, O.A., Medvedev A.E. (2013) Construction of the Coding Sequence of the Transcription Variant 2 of the Human Renalase Gene and Its Expression in the Prokaryotic System. Int. J. Mol. Sci., **14**, 12764–12779; DOI: 10.3390/ijms140612764.
22. Fedchenko, V., Kopylov, A., Kozlova, N., Buneva, O., Kaloshin, A., Zgodina, V., Medvedev A. (2016). Renalase Secreted by Human Kidney HEK293T Cells Lacks its N-Terminal Peptide: Implications for Putative Mechanisms of Renalase Action. Kidney Blood Press Res, **41**, 583–593.

Поступила: 27.05.2019
 После доработки: 28.05.2019
 Принята к публикации: 03.06.2019

A SIMPLIFIED METHOD FOR OBTAINING CDNA OF LOW-COPY AND SILENT EUKARYOTIC GENES USING HUMAN RENALASE AS AN THE EXAMPLE

V.I. Fedchenko *, A.A. Kaloshin

Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: valfed38@yandex.ru.

A simplified «exon» method was developed for producing cDNA of low-copy and silent eukaryotic genes. It is based on assembly of the target gene from genomic DNA by direct synthesis of its exons, followed by their PCR-based joining without further purification of the amplicons. During the synthesis of exons, direct primers were used; these included about ~ 20 nucleotides of the 3'-terminal sequence previous (from the amplified) exon and ~ 20 nucleotides of the 5'-initial sequence of the amplified exon. Reverse primers included ~ 20 nucleotides complementary to the terminal sequence of the amplified exon. Forward and reverse primers flanking the gene to be assembled included the restriction sites necessary for insertion into the expression vector. Using this approach it is possible to assemble almost any eukaryotic gene with a known nucleotide sequence of genomic DNA available in the database.

Keywords: cDNA, PCR, exon, cloning, expression

FUNDING

This study performed within the framework of the Program of Basic Scientific Research of the State Academies of Sciences for 2013–2020 was partially supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research No. 17–04–00484 (2017–2019).

Received: 27.05.2019, revised: 28.05.2019, accepted: 03.06.2019