



УДК 577.113.6:575.224.46:577.213.3

**ПРОИЗВОДНЫЕ ДНК ФАГА M13, СОДЕРЖАЩИЕ ФРАГМЕНТ ГЕНА
β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ, — УДОБНАЯ МУТАЦИОННАЯ СИСТЕМА
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НАПРАВЛЕННОГО ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ
МУТАГЕНЕЗА**

*Петренко В. А., Семенова Л. Н., Киприянов С. М.,
Болдырев А. Н., Сиволобова Г. Ф., Каргинов В. А.,
Гуторов В. В.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Предложена модельная система, позволяющая надежно тестировать индуцируемые олигонуклеотидами мутации: транзицию Т→С, делеции нуклеотидов Т и С (ΔТ, ΔС), вставку G, двойные мутации (А→G, ΔТ), (Т→С, А→G), крупные делеции (36 или 44 нуклеотида). Система включает девять производных ДНК фага M13, содержащих фрагмент гена β-галактозидазы, и олигодезоксирибонуклеотиды, не полностью комплементарные последовательности ДНК этого гена. Шесть производных ДНК получены в рамках работы методами локализованного мутагенеза, остальные были известны ранее. Вызываемые олигонуклеотидами мутации легко тестируются: а) по изменению фенотипа трансформированных бактерий (*Lac*⁺→*Lac*⁻); б) по включению или исключению сайтов рестрикции *Bam*HI, *Eco*RI и др.; в) гибридизацией ДНК с ³²P-мечеными олигонуклеотидами; г) секвенированием ДНК по методу Сэнгера. С использованием этой системы исследовано влияние на суммарную эффективность мутагенеза различных факторов, таких, как полнота синтеза РФ ДНК, термическая стабильность комплексов олигонуклеотид-ДНК, качество используемых в полимеразной реакции ферментов и субстратов, тип структурного превращения. Продемонстрирована возможность возникновения побочных мутаций при проведении олигонуклеотидаправленного мутагенеза. Показано, что уменьшение выхода мутантов прямо связано с действием репарирующих систем бактерий, приводящим к образованию молекулярных гомозигот.

Направленный олигонуклеотидами мутагенез, являющийся наиболее точным и универсальным методом введения определенных изменений в структуру ДНК [1], приобретает все большее значение в молекулярной биологии и вирусологии. Он основан на копировании структуры ДНК с использованием в качестве праймера олигонуклеотида, не полностью комплементарного заданному участку ДНК. При этом запланированная мутация вводится в состав «дочерней» цепи ДНК и закрепляется в потомстве при репликации ДНК (рис. 1). Метод включает получение специфического комплекса олигонуклеотида с ДНК; направленный олигонуклеотидом ферментативный синтез ДНК, комплементарной исходной ОЦ ДНК (получение РФ ДНК); трансформацию клеток *E. coli* препаратом РФ ДНК; выявление мутантов среди фагового потомства; анализ первичной структуры ДНК мутантов.

Противоречивость литературных данных, касающихся эффективности метода и роли в суммарном мутагенном эффекте различных факторов [2, 3], побудила нас подробно исследовать этот подход. С этой целью была создана модельная система на основе производных ДНК фага M13, позволяющая легко тестировать различные типы структурных превращений ДНК. Система включает производные ДНК фага M13, содержащие фрагмент гена β-галактозидазы, а также два олигонуклеотида-мутагена, индуцирующие взаимопревращения ДНК.

Вызываемые олигонуклеотидами мутации — транзиция Т → С, делеция ΔТ и ΔС, вставка G, двойные мутации типа (А → G, ΔТ), (Т → С, А → G),

Сокращения: ОЦ ДНК — одноцепочечная кольцевая ДНК; РФ ДНК — двухцепочечная кольцевая (репликативная форма) ДНК.

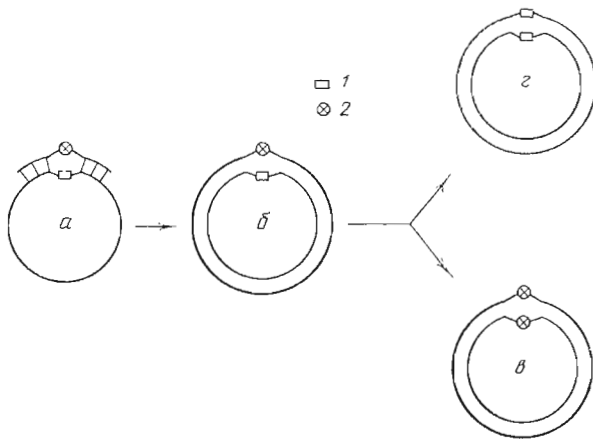


Рис. 1. Принципиальная схема проведения олигонуклеотиднаправленного мутагенеза. *a* — комплекс ОЦ ДНК с частично некомплементарным олигонуклеотидом; *b* — гетеродуплексная ДНК; *c* — мутантная ДНК; *d* — ДНК «дикого» типа; 1, 2 — пара некомплементарных нуклеотидов в *a* и *b*

крупные делеции (36 или 44 нуклеотида) — могут быть обнаружены по изменению фенотипа трансформированных бактерий ($Lac^+ \rightarrow Lac^-$), по включению или исключению сайтов рестрикции, гибридизацией ДНК с ^{32}P -мечеными олигонуклеотидами, секвенированием ДНК по Сэнгеру [4]. С использованием предложенной мутационной системы исследовано влияние на эффективность и точность мутагенеза таких факторов, как тип превращения ДНК, способ отделения двухцепочечной гетеродуплексной ДНК (РФ ДНК), качество используемых в полимеразной реакции ферментов и субстратов. Продемонстрирована возможность возникновения незапланированных мутаций при проведении олигонуклеотиднаправленного мутагенеза. Система оказалась удобной также при исследовании мутагенного действия неприродных фосфотриэфирных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов [5]. Часть данных опубликована ранее в виде краткого сообщения [6].

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов

Обобщенная структура N-концевого участка гена *lacZ'* (кодирующего N-концевой фрагмент β -галактозидазы) ДНК производных фага M13, а также структура олигонуклеотидов-праймеров и олигонуклеотидов-мутагенов представлены на рис. 2. Олигонуклеотиды (14)* и (13) служили для индукции взаимопревращений ДНК (рис. 3), а олигонуклеотиды (17), (15-1) и (15-2) — для анализа структуры мутантных ДНК по методу Сэнгера [4]. Праймеры (17) и (15-1) описаны ранее [7, 8]; праймер (15-2) специально сконструирован в ходе данного исследования для анализа мутаций, возникающих в M15-области гена β -галактозидазы [9].

Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали модифицированным фосфотриэфирным методом [10] по схемам:

- (13): $[(1 + 2) + (1 + 2)] + [(1 + 2) + (2 + 2)],$
 (14): $[(1 + 2) + (2 + 2)] + [(1 + 2) + (2 + 2)],$
 (17): $[(2 + 2) + (2 + 2)] + \{(2 + 2) + [2 + (1 + 2)]\},$
 (15-2): $[(1 + 2) + (2 + 2)] + [(2 + 2) + (2 + 2)].$

Моно- и динуклеотидные защитные блоки получали по известным методам [10, 11]. Сборку целевых олигонуклеотидов проводили в пиридине, в качестве конденсирующего агента использовали мезитилсульфонилтетразол. Время реакции при получении 4–8-звенных блоков составляло 40–60 мин, для более длинных олигонуклеотидов — 1,5–2 ч. Защищенные промежуточные блоки и целевые олигонуклеотиды

* Номер нуклеотида здесь и далее соответствует числу нуклеотидных звеньев.

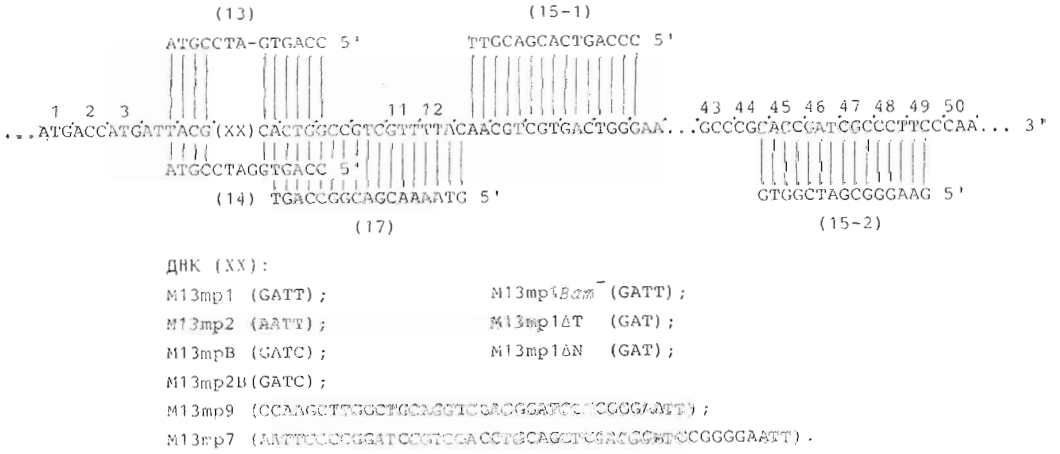
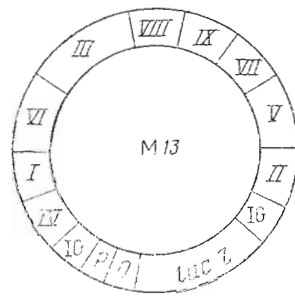


Рис. 2. Структура N-концевого участка гена Z', олигонуклеотидов-мутагенов (13, 14) и праймеров (15-1, 15-2, 17)

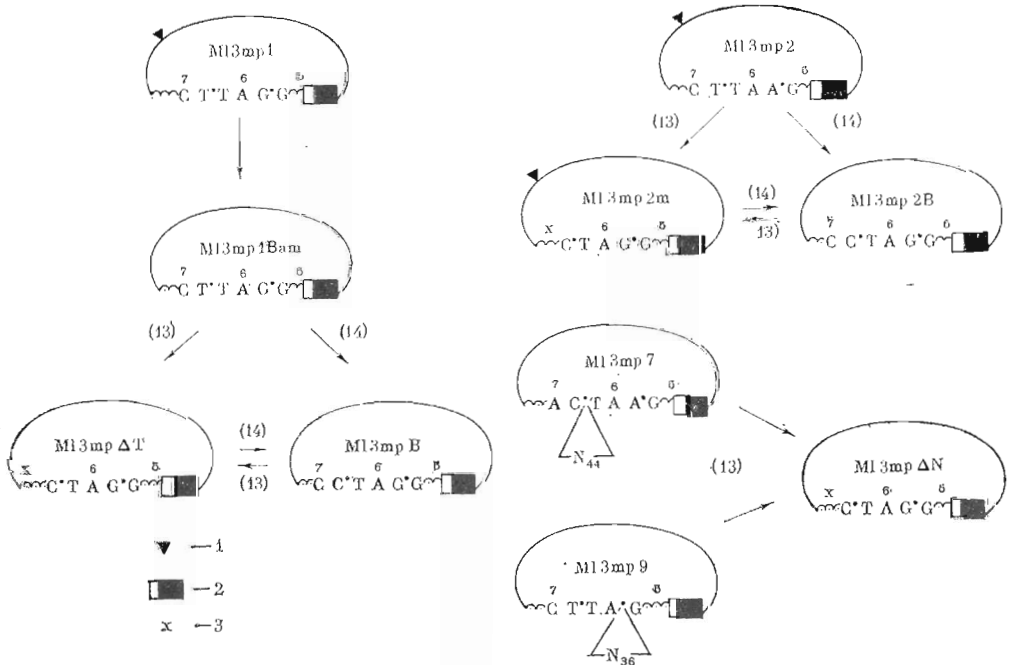


Рис. 3. Схема взаимопревращений ДНК производных фага M13. 1 — BamHI-сайт в положении 2220; 2 — промоторно-операторная область гена Z', 5, 6, 7 — кодоны гена Z'; 3 — случайные кодоны в мутантных генах; N₄₄, N₃₆ — полилинкерные участки в векторных ДНК

выделяли гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 или обращенно-фазовой хроматографией на триметилсилианизированном (ТМС) силикагеле, как описано в работе [12]. Снятие 5'-концевой монометокситрипильной защитной группы проводили трихлоруксусной кислотой в хлороформе, β -цианэтильной — триэтиламином в ацетонитриле [13]. Полное деблокирование целевых олигонуклеотидов осуществляли последовательно трихлоруксусной кислотой в хлороформе, 0,02 М раствором фторида цезия и водным аммиаком при комнатной температуре. Выделение олигонуклеотидов проводили на хроматографе Altex последовательно ионообменной и обращенно-фазовой хроматографией, структуру синтезированных олигомеров определяли по модифицированному методу Максама — Гилберта [14].

Производные ДНК фага М13 — компоненты мутационной системы

Часть производных ДНК фага М13, включенных в мутационную систему (М13mp2, М13mp9, М13mp7), описана ранее [15], большинство получено в ходе данной работы путем индукции соответствующих структурных превращений олигонуклеотидами.

ДНК М13mp1 получена ранее [16] путем клонирования фрагмента лактозного оперона *E. coli* длиной 830 п.о. в области между генами IV и II ДНК фага М13 (рис. 2). ДНК М13mp2 отличается от ДНК М13mp1 присутствием *EcoRI*-сайта в начале гена Z' , кодирующего N-концевую часть β -галактозидазы [17]. ДНК М13mp7 и ДНК М13mp9 — производные ДНК М13mp2, содержащие целый ряд точковых мутаций в геноме М13, а также отличающиеся наличием полилинкерных клонирующих областей в гене Z' [15].

ДНК М13mp1*Bam*⁻ — производное ДНК М13mp1, в котором с помощью сайт-локализованного мутагенеза исключена последовательность GGATCC в районе 2220. Этот лишний сайт *Bam*HI препятствовал получению вектора М13mpB, содержащего *Bam*HI-сайт в гене Z' . Превращение G → A²²²⁰ осуществлено с помощью мутагенеза, направляемого *MspI*-фрагментом 1924—2378 ДНК фага М13mp7 (ранее эта мутация была введена в геном фага М13mp7 путем химического мутагенеза [15]). Мутагенный фрагмент длиной 455 п.о. выделяли из гидролизата *MspI* РФ ДНК фага М13mp7 и отжигали его совместно с ОЦ ДНК М13mp1 (ср. [18]). Полученным комплексом трансформировали клетки *E. coli* и из потомства выделяли варианты М13mp1*Bam*⁻, РФ ДНК которых устойчивы к действию рестриктазы *Bam*HI.

ДНК М13mp1 Δ T получали путем удаления остатка T⁶³²⁵ из ДНК М13mp1*Bam*⁻ с помощью 13-мера (13) (рис. 2, 3), предварительно убедившись в специфичности связывания олигонуклеотида с заданным участком ДНК. Данные о структуре комплекса 13-мер — ДНК М13mp1*Bam*⁻ получены нами при терминации полимеразной реакции в условиях секвенирования по Сэнгеру [6]. Для получения мутанта М13mp1 Δ T 13-мер, связанный с матричной ДНК М13mp1*Bam*⁻, элонгировали с помощью фрагмента Клевова ДНК-полимеразы I в присутствии dNTP и синтезированной ДНК замыкали в кольцо действием ДНК-лигазы фага T4. Из потомства трансформированных клеток *E. coli* JM103 выделяли Лас⁻-колонии, фаг из колоний дополнительно очищали клонированием и структуру ДНК подтверждали секвенированием.

ДНК М13mp2m в отличие от ДНК М13mp1 Δ T содержит *Bam*HI-сайт в положении 2220. Она получена путем мутагенеза ДНК М13mp2 с помощью 13-мера, который индуцировал одновременно транзицию A → G и делецию Δ T. Направленность превращения доказана секвенированием ДНК из Лас⁻-клонов.

ДНК М13mp Δ N подобно ДНК М13mp1 Δ T и М13mp2m содержит инактивированный ген Z' , однако отличается от них некоторыми точковыми мутациями в генах фага М13, введенными при получении векторов М13mp7 и М13mp9 [15]. ДНК М13mp Δ N получена путем делеционного мутагенеза ДНК М13mp7 и М13mp9 с помощью 13-мера. Структура модифицированного участка ДНК подтверждена секвенированием.

ДНК М13mpB и М13mp2B отличаются от ДНК М13mp1*Bam*⁻ и М13mp1 соответственно транзицией T → C, приводящей к возникнове-

нию *Bam*HI-сайта в гене *Z'*. Мутации индуцированы действием мутагена (14) (рис. 2, 3) на ДНК *M13mp1Bam*⁻ или *M13mp1ΔT* (для *M13mpB*), а также ДНК *M13mp2* или *M13mp2m* (для *M13mp2B*). Специфичность превращения подтверждена секвенированием.

Тестирование взаимопревращений ДНК

Способы тестирования мутантов как на стадии их получения, так и при оценке эффективности мутагенеза зависят от типа превращений ДНК (рис. 3). Использование 13-мера как мутагена приводило к получению ДНК *M13mp1ΔT*, *M13mp2m* или *M13mpΔN*, в которых отсутствует один нуклеотид в районе седьмого кодона гена *Z'*. Это сопровождалось потерей способности мутантов продуцировать в клетках *E. coli* JM103 активную β-галактозидазу и легко обнаруживалось при выращивании трансформированных бактерий на индикаторной среде в присутствии индуктора β-галактозидазы — изопропилтио-β-*D*-галактопиранозида (IPTG) и хроматофорного субстрата фермента — 5-броминдоксил-β-*D*-галактопиранозида (Y-Gal). Так выявлялись лишь колонии, содержащие 100% мутантов.

Вставка одного нуклеотида в ДНК *M13mp1ΔT* и *M13mp2m* сопровождалась восстановлением фазы считывания гена *Z'* в полученных мутантах *M13mpB* и *M13mp2B*. В этом случае признак *Lac*⁺ выявлялся и в присутствии в колониях исходного варианта с фенотипом *Lac*⁻. При получении мутантов *M13mpB* из *M13mp1Bam*⁻ и *M13mp2B* из *M13mp2* фенотип индуцированных этими фагами бактерий не изменялся. Для поиска мутантов в этом случае использовали гибридизацию ОЦ ДНК с меченым 14-мером. Этот тест основан на различии в термостабильности комплексов, образованных олигонуклеотидом-мутагеном с полностью ему комплементарной мутантной ДНК и не полностью комплементарной исходной ДНК (рис. 4).

Идентификацию ДНК, содержащих сайты рестрикции в гене *Z'*, проводили с помощью рестрикционного анализа (рис. 5). Так, гидролиз РФ ДНК *M13mp1*, *M13mp2*, *M13mp1ΔT*, *M13mp2m*, *M13mpB* и *M13mp2B* рестриктазой *MspI* приводит к образованию 16 фрагментов, обнаруживаемых в ПААГ (рис. 5а, дорожка 9). При одновременном действии на ДНК *M13mp1*, *M13mp2* и *M13mp2m* рестриктаз *Bam*HI и *MspI* появляется дополнительный фрагмент длиной 296 п.о. (дорожки 8, 5 и 2), что подтверждает наличие в этих ДНК *Bam*HI-сайта в положении 2220. Отсутствие в *MspI/Bam*HI-гидролизате ДНК *M13mpB* и в *MspI/Eco*RI-гидролизате ДНК *M13mp2* фрагмента длиной 250 п.о. (дорожки 6 и 4 соответственно) свидетельствует о том, что эти ДНК содержат рестриктные сайты в положении 6231. При обработке *MspI*-гидролизатов ДНК *M13mp2m* и *M13mp1ΔT* рестриктазами *Eco*RI и *Bam*HI подтвердилось отсутствие в этих ДНК сайтов соответствующих рестриктаз (дорожки 3 и 7). Аналогичным образом было показано наличие двух *Bam*HI-сайтов в РФ ДНК *M13mp2B* (дорожка 1, рис. 5а). Эти данные подтверждены при анализе продуктов гидролиза РФ ДНК рестриктазами *Bam*HI и *Eco*RI в агарозном геле (рис. 5б).

Окончательное подтверждение первичной структуры ДНК мутантов получали путем их секвенирования по методу Сэнгера [4].

В совокупности перечисленные способы позволяли легко проследить за превращениями ДНК, индуцируемыми олигонуклеотидами, и подтвердить структуру мутантов.

Исследование основных факторов, влияющих на эффективность мутагенеза

Определяющим при проведении олигонуклеотиднаправленного мутагенеза является качество кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I, который используется в матричном синтезе мутантной ДНК. Наличие в ферменте остаточной 5' → 3'-экзонуклеазной активности, как предполагают [2, 3], может привести к разрушению олигонуклеотида и удалению вво-

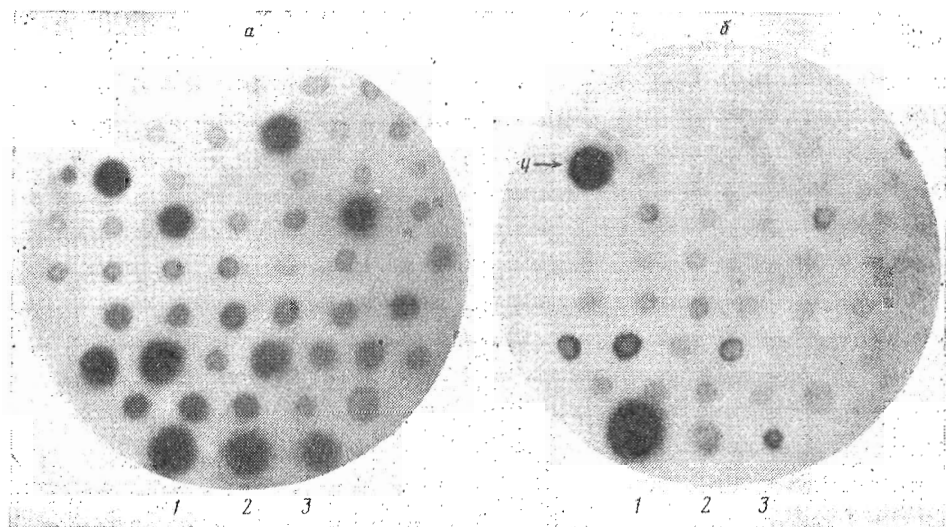


Рис. 4. Поиск мутантов M13mp2B гибридизацией ОЦ ДНК с ^{32}P -меченым 14-мером на нитроцеллюлозных фильтрах при 26 (а) и 47° С (б). 1 — ДНК M13mpB (контроль); 2 — ДНК M13mp2; 3 — ДНК M13mp2m; 4 — мутантная ДНК M13mp2B

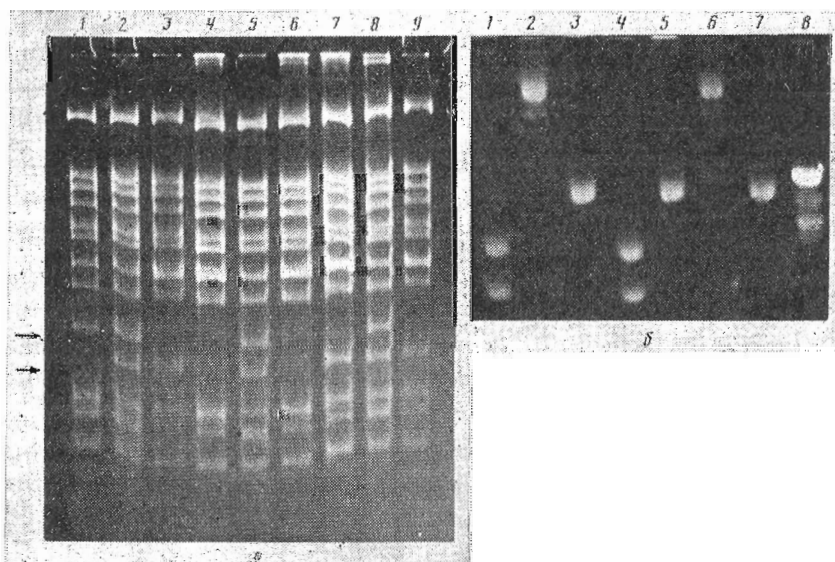


Рис. 5. Рестрикционный анализ РФ ДНК производных фага M13. а — электрофорез в 6% ПААГ. 1 — ДНК M13mp2B+MspI+BamHI, 2 — ДНК M13mp2m+MspI+BamHI, 3 — ДНК M13mp2m+MspI+EcoRI, 4 — ДНК M13mp2+MspI+EcoRI, 5 — ДНК M13mp2+MspI+BamHI, 6 — ДНК M13mpB+MspI+BamHI, 7 — ДНК M13mp1ΔT+MspI+BamHI, 8 — ДНК M13mp1+MspI+BamHI, 9 — ДНК M13mp2+MspI. Открытой и закрытой стрелками показано положение фрагментов длиной 296 и 250 п.о. соответственно; б — электрофорез в 1% агарозном геле. 1 — ДНК M13mp2B+BamHI, 2 — ДНК M13mp2m+EcoRI, 3 — ДНК M13mp2m+BamHI, 4 — ДНК M13mp2+EcoRI+BamHI, 5 — ДНК M13mpB+BamHI, 6 — ДНК M13mp1ΔT+BamHI, 7 — ДНК M13mp1+BamHI, 8 — ДНК фага λ+EcoRI

димой мутации. Для оценки качества ферментов в работе использовали следующий прием. Нефосфорилированный по 5'-концевой ОН-группе олигонуклеотид-праймер (17) отжигали с ОЦ ДНК-матрицей и вводили в полимеразную реакцию в присутствии ДНК-лигазы фага T4. Из-за отсутствия фосфата на 5'-конце новосинтезированной нити ДНК она не может замыкаться в кольцо под действием лигазы. Однако в присутствии 5' → 3'-экзонуклеазных примесей 5'-концевой нуклеозид (вероятно, вместе с соседними нуклеотидами) отщепляется и лигазная сшивка образую-

Номер опыта	Превращение ^{1*} (контролируемый признак ^{2**})	Структура гетеродуплекса ^{3*}	Стабильность дуплекса ^{4*} , °C	
			T _m	ΔT
1	mp1 <i>Bam</i> ⁻ → mp1Δ1 ⁺ (Lac ⁺ → Lac ⁻)	...G-ATCC... ...CTTAGG...	35	10
2	mp1 <i>Bam</i> ⁻ → mpB (<i>Bam</i> ⁻ → <i>Bam</i> ⁺ , гибридизация)	...GGATCC... ...CTTAGG...	37	15
3	mp1ΔT → mpB (Lac ⁻ → Lac ⁺ , <i>Bam</i> ⁻ → <i>Bam</i> ⁺)	...GGATCC... ...C-TAGG...	37	15
4	mpB → mp1ΔT (Lac ⁺ → Lac ⁻ , <i>Bam</i> ⁺ → <i>Bam</i> ⁻)	...G-ATCC... ...CCTAGG...	37	15
5	mp2 → mp2m (Lac ⁺ → Lac ⁻ , <i>EcoR</i> ⁺ → <i>EcoR</i> ⁻)	...G-ATCC... ...CTTAAG...	32	15
6	mp2m → mp2B (Lac ⁻ → Lac ⁺ , <i>Bam</i> ⁺ → <i>Bam</i> ⁺⁺)	...GGATCC... ...C-TAGG...	37	15
7	mp2 → mp2B, гибридизация	...GGATCC... ...CTTAAG...	35	10
8	mp9 → mpΔN (Lac ⁺ → Lac ⁻)	...GATCCG... ...CT GC...	27	15
9	mp7 → mpΔN (Lac ⁺ → Lac ⁻)	...TGATCC... ...ACTAAG...	27	15

^{1*} В сокращенных названиях ДНК опущено обозначение M13.

^{2*} Lac⁺ — окрашивание колоний в синий цвет в присутствии IPTG и Y-Gal, соответствует сайту, РФ ДНК расщепляется эндонуклеазой *Bam*HI (рис. 5б); *EcoR*⁺ — ДНК содержит *EcoRI*-для поиска мутантов использовали гибридизацию с 14-мером (14) (рис. 2).

^{3*} Верхняя цепь (5' → 3') соответствует олигонуклеотиду или (—)цепи гетеродуплексной петлевые участки гетеродуплексов длиной 36 и 44 нуклеотида соответственно.

^{4*} T_m — температура разрушения комплекса олигонуклеотида с ДНК, определенная в опы-

^{5*} Гетеродуплексную ДНК (РФ ДНК) очищали ультрацентрифугированием в градиенте плот-

^{6*} Рассчитывали в предположении, что гетерозиготная колония содержит поровну мутант-

щегося 5'-фосфата с 3'-ОН-группой становится возможной. Замкнутую РФ ДНК, образование которой свидетельствует о деградации олигонуклеотида, обнаруживали ультрацентрифугированием в градиенте плотности щелочной сахарозы (РФ ДНК, имеющая большую плотность, опережает по подвижности ОЦ и линейную ДНК). Препараты производства НИКТИ БАН (г. Бердск), а также предоставленные С. Х. Дегтяревым (ВНИИ молекулярной биологии, Кольцово) не проявляли в этом тесте 5' → 3'-эксонуклеазных активностей. Взятые для сравнения образцы фермента, полученного путем субтилизинового расщепления ДНК-полимеразы I, в том же тесте обнаруживали способность к 5' → 3'-эксонуклеазному разрушению ДНК.

Важным фактором, определяющим эффективность направляемого олигонуклеотидами мутагенеза, является полнота превращения ОЦ ДНК в РФ ДНК [3]. Это связано с тем, что носителем исходного генотипа является ОЦ ДНК, а мутантный признак принадлежит вновь синтезируемой цепи ДНК, входящей в состав РФ ДНК. Предварительно образование РФ ДНК исследовали, используя в качестве праймера 17-мер (17) (рис. 2), полностью комплементарный участку ДНК гена *Z'*. О полноте превращения ОЦ ДНК в РФ ДНК судили по данным электрофореза в геле 1% агарозы. Обнаружено, что с использованием коммерческих препаратов dNTP не всегда удается достичь количественного копирования исходной ОЦ ДНК. Это связано, очевидно, с присутствием в препаратах примесей моно- и дифосфатов нуклеозидов, которые, возможно, образуются при хранении и достигают, по данным микроколоночной ионообменной хроматографии, 50% суммарного нуклеотидного материала. В связи с этим в работе использовались синтетические препараты, полученные в лаборатории путем конденсации активированных производных

Выход мутантов (%) после трансформации бактерий				Доля колоний, % ^{6*}		
смесь ДНК		очищенной РФ ДНК ^{5*}		гомозигот		гетеро- зигот
колоний	фагов	колоний	фагов	мутантных	исходных	
8±3	7±5	11±1	27±19	11	57	32
—	—	30	—	—	—	—
5±0,2	3,9±0,4	6,6±0,3	4,0±0,7	1,4	93,4	5,2
5±1	6±3	7,2±0,5	12±3	7,2	83,2	9,6
0,6±0,3	0,6±0,2	4±1	—	—	—	—
6±1	1,5±0,3	15±12	—	—	—	—
—	—	—	0,7	—	—	—
1,2±0,6	0,3	0,5±0,1	0,5±0,2	0,5	99,5	0
0,4±0,3	—	—	—	—	—	—

активной β-галактозидазе; *Vam+*, *Vam++* — ДНК содержит один (+) или два (++) *Vam*HI-сайт, РФ ДНК подвергается расщеплению эндонуклеазой *EcoRI* (рис. 5б); в опытах 2 и 7 ДНК, нижняя цепь (3' → 5') — исходной (+)-цепи ДНК; малой и большой дугами обозначены тах по гибридизации (см. «Экспер. часть»).
ности щелочной сахарозы (опыты 1—7) или электрофорезом в геле 1% агарозы.
ные и исходные варианты фага.

нуклеотидов с пирофосфатом по методике, аналогичной предложенной в работе [19]. Препараты очищали до гомогенного состояния ионообменной хроматографией и хранили в виде сухих триэтиламмониевых солей в течение 3 лет при -20°C без заметного ухудшения качества. Использование таких трифосфатов обеспечивало количественное превращение ОЦ ДНК в двухцепочечную.

Используя в качестве праймеров олигонуклеотиды-мутагены (13) и (14), мы обнаружили, что результат ферментативной реакции зависит как от свойств ДНК-матрицы, так и от специфической структуры дуплекса олигонуклеотид-ДНК. Так, ДНК M13mp7 в полимеразной реакции образует ферму ДНК, отличающуюся от РФ ДНК низкой подвижностью в геле. Дуплексы с двумя неспаренными нуклеотидами в отличие от дуплексов, имеющих один неспаренный нуклеотид, дают меньший выход РФ ДНК. Объясняется это, очевидно, различиями в термической стабильности комплексов (таблица).

Чтобы выяснить роль структуры комплексов ДНК — олигонуклеотид в мутагенезе, оценивали выход индуцированных мутантов в серии независимых экспериментов. Для этого компетентные клетки *E. coli* JM103 трансформировали препаратом гетеродуплексной ДНК, полученной ферментативным способом с помощью мутагенных праймеров, и клетки выращивали на твердой и в жидкой среде. Каждая из негативных колоний могла содержать исходный фаг, смесь исходного и мутантного фагов или мутантный фаг. Долю колоний, содержащих мутантные фаги, рассматривали как характеристику эффективности мутагенеза. Фагами, выделенными из бульона, заражали клетки *E. coli* JM103. Они давали негативные колонии, содержащие мутантный или же исходный фаг, соотношение которых также служило мерой эффективности мутагенеза. Соотношение

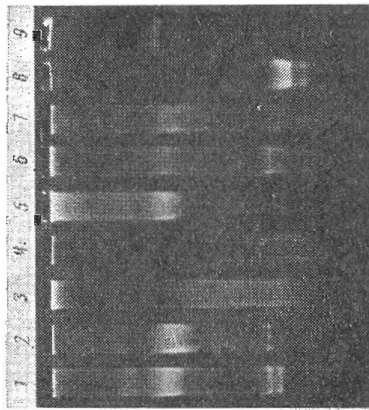


Рис. 6. Ферментативный синтез гетеродуплексной ДНК на матрицах: 1 — М13прВ, 2 — М13пр2м, 3 — М13пр1; 4 — М13пр2; 5 — М13пр7; 6 — М13пр8; 7 — М13пр9; 8 — контрольная ОЦ ДНК М13пр9; 9 — контрольная РФ ДНК М13пр9. В качестве праймера использовали фосфорилированный 13-мер (13, рис. 2)

Рис. 7. Участок ДНК производных фага М13. Δ — положение делегированного нуклеотида (G); ∇ — вставка нуклеотида (G); стрелками обозначены границы делегированной области. IG — межгенная область фага М13; P, O — промоторно-операторная область гена lacZ' (кодирующего N-концевую часть β-галактозидазы)

Рис. 6

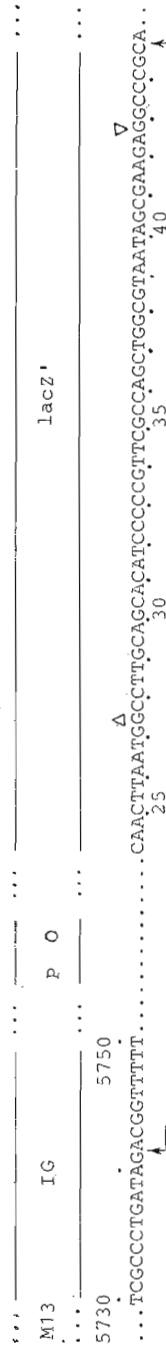


Рис. 7

мутантных колоний и мутантных фагов служило для оценки количества гомозиготных инфицированных бактериальных клонов (см. таблицу).

Обращает на себя внимание прежде всего то, что ДНК, образующие с олигонуклеотидами-мутагенами менее прочные комплексы, с меньшей эффективностью подвергаются мутагенезу (таблица, опыты 5, 7, 9). Это является, очевидно, следствием неполного превращения ОЦ ДНК в гетеродуплексную РФ ДНК, о чем свидетельствуют данные электрофореза (рис. 6). После выделения РФ ДНК (см. ниже) и трансформации бактериальных клеток очищенным препаратом выходы мутантов в опыте 5 возрастают почти на порядок, что подтверждает предположение о важной роли полноты синтеза мутантной цепи ДНК. Однако в опыте 8 очистка РФ ДНК не привела к повышению выхода мутантов. Такая же ситуация наблюдалась и в других предварительных опытах. Это заставило нас предположить, что наряду с факторами, обеспечивающими чистоту ферментативного синтеза мутантной нити ДНК, важное влияние на эффективность направленного мутагенеза может оказывать специфическая структура гетеродуплекса, определяющая, по-видимому, эффективность закрепления мутации в бактериальной клетке в ходе репликации или репарации.

Чтобы оценить влияние структуры гетеродуплексов ДНК на эффективность мутагенеза, необходимо было отделить их от исходных ОЦ ДНК и незамкнутых двухцепочечных ДНК, которые могли присутствовать в смеси наряду с РФ ДНК после ферментативной достройки олигонуклеотидов-праймеров. Это достигалось центрифугированием в градиенте плотности щелочной сахарозы, ранее использовавшимся для повышения эффективности мутагенеза, направленного олигонуклеотидами [1]. В рекомендованном варианте [3] центрифугированию подвергают ферментативно полученную радиоактивную ДНК и РФ ДНК обнаруживают по профилю радиоактивности во фракциях градиента. Для обнаружения РФ ДНК после центрифугирования мы применили спектрофотометрию фракций градиента с использованием хроматографических систем «Обь-4» (НИОХ) или Isco (США), что позволяло исключить применение радиоактивных dNTP в полимеразной реакции. Раствор, содержащий РФ ДНК, нейтрализовали и использовали для трансформации клеток *E. coli* JM103.

Данные об эффективности направленного мутагенеза для различных типов превращений (см. таблицу) позволяют высказать некоторые предположения о возможных путях закрепления мутаций в зависимости от структуры гетеродуплекса ДНК. Ранее считалось, что верхний предел олигонуклеотида направленного мутагенеза составляет 50%, поскольку (+)-цепь гетеродуплексной РФ ДНК относится к дикому, а (-)-цепь — к мутантному типу. Редупликация такой ДНК в трансформированной бактериальной клетке должна приводить к равным количествам обоих вариантов фага и, следовательно, к образованию смешанной (гетерозиготной) колонии. Данные опыта говорят о том, что такой путь закрепления мутаций действительно возможен. Однако в других случаях более вероятно, что гетеродуплекс является мишенью для ферментов репарации, которые до репликации корректируют молекулярную гетерозиготу [20]. В рассматриваемой мутационной модели фага M13 репарация с большой вероятностью может проходить до репликации, поскольку область, подвергаемая мутагенезу, максимально отдалена от сайта инициации репликации [21]. Это подтверждается тем, что выходы гетерозиготных колоний в большинстве опытов низки. Понятно, что эффективность мутагенеза в этом случае зависит от направленности процесса репарации. В опыте 8, например, предпочтительная направленность репарации с образованием гомозигот исходного типа целиком определяет низкую эффективность мутагенеза, так что в этом случае предпочтительно закрепляется генотип (+)-цепи гетеродуплексной ДНК. Из сравнения табличных данных следует, что небольшие мутационные изменения узнаются ферментами репарации менее эффективно, чем сложные. Показательно, что с уменьшением термостабильности гетеродуплексов вероятность образования гетерозигот снижается. По-видимому, частичное расплетение нитей ДНК

является серьезным поводом для вмешательства репаративной системы клетки.

Таким образом, структура гетеродуплексной области ДНК служит сигналом для репаративной системы бактериальной клетки, а окружение этой области определяет тенденцию процесса к сохранению генотипа той или иной цепи ДНК, чаще всего исходной. Это может быть связано с тем, что копия ДНК, полученная ферментативно *in vitro*, не содержит метилированных оснований [22] и поэтому репарация идет с сохранением «знакомой» клеточным репаративным системам нити ДНК. В последнее время предложен ряд подходов, позволяющих в принципе обойти это серьезное препятствие [5, 22, 23].

Исследование точности сайт-локализованного мутагенеза

При проведении матричных реакций с использованием кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I существует вероятность включения в состав новосинтезированной нити ДНК незапланированных, случайных мутаций, что обусловлено пониженной специфичностью фермента по сравнению с нативной ДНК-полимеразой I *E. coli*. Это обнаружилось при исследовании превращения ДНК M13mp1ΔT в ДНК M13mpB (таблица, опыт 3), контролируемого по изменению фенотипа Lac⁻ → Lac⁺. С целью проверки точности направленного мутагенеза был проведен анализ структуры ДНК в N-концевой области гена Z' вариантов с мутантным и исходным фенотипами. Для секвенирования использовали праймер 15-2, связывающийся за областью M15 гена Z' в районе кодонов 45–49 (рис. 2). ДНК нескольких мутантных клонов содержали искомую мутацию T → C. Однако часть вариантов, сохраняющих исходный Lac⁻-фенотип, также содержала мутации. Так, из шести отобранных клонов один содержал *Vat*HI-сайт в области шестого кодона, т. е. претерпел направленное изменение, но одновременно в области M15 содержал делецию (ΔG), а за областью M15 — вставку (VG) (рис. 7). Это привело к изменению аминокислотной последовательности в области α-пептида β-галактозидазы и утрате мутантом способности к α-комплементации. Другой мутант содержал делецию размером 604 нуклеотида, затрагивающую регулярную область лактозного оперона, часть гена Z' и часть генома фага M13, расположенную между генами IV и II, как показано на рис. 7*. Все эти данные указывают на необходимость тщательного анализа мутантов, получаемых методом сайт-локализованного мутагенеза и не имеющих отчетливых селективируемых признаков.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что основные проблемы, возникающие при проведении сайт-локализованного мутагенеза, связаны с получением мутантной нити ДНК. Точность и эффективность этой стадии определяется целым рядом факторов, таких, как качество кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I и dNTP, специфичность связывания олигонуклеотида-мутагена с ДНК, термостабильность образующегося комплекса и др. Использование мутационной модели позволяет оценить влияние каждого из факторов на суммарную эффективность мутагенеза. Особую роль играет, как выяснилось, структура получаемой гетеродуплексной ДНК, содержащей мутантную нить. Вероятность и путь закрепления мутации в бактериальной клетке, по-видимому, в основном определяется именно этим фактором. В частности, структура гетеродуплекса определяет вероятность его репарации с образованием ДНК исходного или мутантного типов.

Полученные при исследовании мутационной модели данные позволили нам сформулировать новый подход к получению направленных мутаций, предполагающий использование в качестве мутагенов фосфотриэфирных

* Интересно, что, по некоторым данным [21], в делетированной области находится участок *ori* фаговой ДНК и сайт никкирования РФ ДНК. Данные о свойствах полученного мутанта будут опубликованы позднее.

аналогов олигодезоксирибонуклеотидов [5]. Важное преимущество таких производных по сравнению с олигонуклеотидами природного типа состоит в их устойчивости к нуклеазам. Фосфотриэфирные звенья в составе олигонуклеотида мутагена защищают вводимую мутацию от действия экзонуклеазных активностей ДНК-полимеразы I и, возможно, от ферментов репарации клетки, что обеспечивает повышение эффективности и точности метода сайт-локализованного мутагенеза [5]. Кроме того, при использовании фосфотриэфирных аналогов олигонуклеотидов открывается возможность индукции мутаций *in vivo* путем включения олигонуклеотида в состав мутантной ДНК под действием бактериальных ферментов при репликации [12]. Таким способом устраняется действие всех факторов, оказывающих негативное влияние на эффективность сайт-локализованного мутагенеза.

Экспериментальная часть

Фаги, штаммы, среды и растворы описаны в работе [24]. Выделение фагов, ОЦ ДНК, РФ ДНК, титрование, трансформация проводили как описано в работе [23]. Фосфорилирование олигонуклеотидов осуществляли по методике [3]. Олигонуклеотиднаправленный синтез ковалентно-замкнутой ДНК проводили в ранее описанных условиях [3]. Полученный препарат ДНК использовали для трансформации клеток *E. coli* JM103, обработанных СаС₂. Двухцепочечную ковалентно-замкнутую ДНК выделяли центрифугированием реакционной смеси в градиенте плотности щелочной сахарозы [3]. Фракции ДНК обнаруживали спектрофотометрически. Структуру мутантных ДНК фага M13 определяли по методу Сэнгера [4]. Температуру разрушения комплексов ОЦ ДНК с олигонуклеотидами измеряли по методу [25] со следующими изменениями: объем смеси для гибридизации 2 мл, начальная температура гибридизации 10° С, время гибридизации 2 ч. Фильтры отмывали через каждые 5° С в течение 5 мин. За температуру разрушения (T_m) дуплекса принимали температуру в середине интервала (ΔT), в котором происходит смыв радиоактивности с фильтра.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zoller M. J., Smith M. Meth. Enzymol., 1983, v. 100, p. 468–500.
2. Baas P. D., Teertstra W. R., van Mansfeld A. D. M., Jansz H. S., van der Marèl G. A., Veeneman G. H., van Boom J. H. J. Mol. Biol., 1981, v. 152, № 4, p. 615–639.
3. Zoller M. J., Smith M. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 20, p. 6487–6500.
4. Sanger F., Coulson A. R., Barrell B. G., Smith A. J. H., Roe B. A. J. Mol. Biol., 1980, v. 143, № 2, p. 161–178.
5. Петренко В. А., Поздняков П. И., Киприянов С. М., Болдырев А. Н., Семенова Л. Н., Сиволобова Г. Ф. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 2, с. 289–292.
6. Петренко В. А., Семенова Л. Н., Сиволобова Г. Ф., Гуторов В. В., Каргинов В. А. Докл. АН СССР, 1985, т. 281, № 2, с. 476–481.
7. Duckworth M. L., Gait M. J., Goelet P., Hong G. F., Singh M., Titmas R. C. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 7, p. 1691–1706.
8. Gardner R. C., Howarth A. J., Hahn P., Brown-Luedi M., Shepherd R. J., Messing J. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 12, p. 2871–2888.
9. Welby J. K., Fowler A. V., Zabin J. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 13, p. 6804–6810.
10. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A. Can. J. Chem., 1976, v. 54, № 2, p. 670–672.
11. Ti G. S., Gaffney B. L., Jones R. A. J. Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 5, p. 1316–1319.
12. Петренко В. А., Поздняков П. И., Киприянов С. М., Болдырев А. Н., Семенова Л. Н., Сиволобова Г. Ф. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 8, с. 1088–1100.
13. Горбунов Ю. А., Данилюк Н. К., Ильичев А. А., Красных В. Н., Ломакин А. И., Попов С. Г., Щелкунов С. Н. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 5, с. 647–660.
14. Барам Г. И., Грачев С. А. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 10, с. 1420–1422.
15. Norrander J., Kempe T., Messing J. Gene, 1983, v. 26, № 1, p. 101–106.
16. Messing J., Gronenborn B., Müller-Hill B., Hofschneider P. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 9, p. 3642–3646.
17. Gronenborn B., Messing J. Nature, 1978, v. 272, № 5651, p. 375–377.
18. Borrias W. E., Wilschut I. J. C., Vereijken J. M., Weisbeek P. J., Arkel G. A. Virology, 1976, v. 70, № 1, p. 195–197.
19. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 886–894.
20. Тарасов В. А. Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза. М.: Наука, 1982, с. 102–107.
21. Wezenbeek P. M. G. F., Hulsebos T. J. M., Schoenmakers J. G. G. Gene, 1980, v. 11, № 2, p. 129–148.
22. Kramer W., Drutsa V., Jansen H.-W., Kramer B., Pflugfelder M., Fritz H.-J. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 24, p. 9441–9456.
23. Ефимов В. А., Мирских О. В., Чахмахчева О. Г., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 5, с. 621–627.

24. Петренко В. А., Сиволобова Г. Ф., Семенова Л. Н., Болдырев А. Н., Кarginov В. А., Гyторов В. В. Молекул. генетика, микробиол. и вирусол., 1985, № 8, с. 38-44.
25. Chan V.-L., Smith M. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 5, p. 2407-2419.

Поступила в редакцию
23.I.1986
После доработки
3.IV.1986

VARIANTS OF PHAGE M13 DNA CARRYING A FRAGMENT OF THE
 β -GALACTOSIDASE GENE AS A CONVENIENT MUTATIONAL SYSTEM FOR
STUDY OF OLIGONUCLEOTIDE-DIRECTED MUTAGENESIS

PETRENKO V. A., SEMYONOVA L. N., KIPRIYANOV S. M., BOLDYREV A. N.,
SIVOLOBOVA G. F., KARGINOV V. A., GUTOROV V. V.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Kol'tsovo,
Novosibirsk Region*

A model system is developed to test oligonucleotide-directed mutations: T→C transition, T and C deletions (Δ T and Δ C), C insertion, double mutations (A→G, Δ T), (T→C, A→G), and large oligonucleotide deletions (36 or 44 nucleotides). The system includes 9 variants of the phage M13 DNA carrying fragment of β -galactosidase gene, and oligodeoxyribonucleotides partially noncomplementary to DNA sequence of this gene. Six variants are obtained by the site-localized mutagenesis, the other were described earlier. Induced mutations are easily tested a) by phenotype change of transformed bacteria (Lac⁺→Lac⁻); b) by formation or loss of the sites for *Bam*HI and *Eco*RI restrictases; c) by DNA hybridization with ³²P-labeled oligonucleotides; and d) by DNA sequencing by the Sanger method. The system is used to study the role of some factors, such as completeness of RF DNA synthesis, thermal stability of the oligonucleotide: DNA complex, quality of enzymes and substrates used in polymerase reaction, mutation type or the efficiency of mutagenesis. A number of unexpected mutations were observed in the course of oligonucleotide-directed mutagenesis. Lower yields of some mutants induced by oligonucleotides are shown to be due to the action of repair systems of bacteria.