



мом 12 * № 2 * 1986

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 575.224.4:577.213.3

МУТАГЕНЕЗ, НАПРАВЛЕННЫЙ ФОСФОТРИЭФИРНЫМИ АНАЛОГАМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

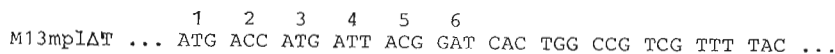
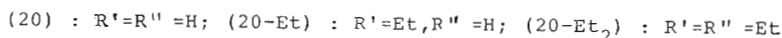
*Петренко В. А., Поздняков П. И., Киприянов С. М.,
Болдырев А. Н., Семенова Л. Н., Сиволобова Г. Ф.*

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

Направленный олигонуклеотидами мутагенез стал незаменимым инструментом в молекулярной биологии, генетике и вирусологии [1]. Метод, однако, не является вполне надежным, что стимулирует поиск новых, более эффективных его модификаций [2].

В настоящей работе показано, что триэфирные аналоги олигонуклеотидов [3—6] в качестве мутагенных затравок при проведении направленного мутагенеза могут дать больший эффект, чем олигонуклеотиды природного строения.

Способность фосфотриэфирных аналогов олигонуклеотидов служить специфическими затравками при синтезе ДНК, а также их мутагенную активность проверяли на матричной ДНК фага M13mpV, полученного нами из фага M13mp1 [7] в результате удаления сайта рестриктазы *Bam*HI в положении 2220 и транзиции первого нуклеотида 7-го кодона (T→C) гена *lacZ'* (кодирующего N-концевой фрагмент β-галактозидазы), при которой вводится новый сайт рестриктазы *Bam*HI [8]. Структура N-концевого участка гена *lacZ'* в M13mpV приведена на схеме вместе со структурой мутагенных олигонуклеотидов — 20-мера (20), его моноэтилового (20-Et) и диэтилового (20-Et₂) эфиров, которые индуцируют делецию одного нуклеотида (второй нуклеотид 7-го кодона), приводящую к изменению фенотипа (Lac⁻) делеционного мутанта M13mp1ΔT [8].



Олигонуклеотиды получали следующим образом. 20-Мер (20) природного строения синтезировали модифицированным фосфотриэфирным методом [9] по схеме $[2+(2+2)] + \{[2+(2+2)] + [(2+2)+(2+2)]\}$. Защищенные олигонуклеотидные блоки, а также целевой деблокированный 20-мер выделяли и характеризовали, как описано [8]. Фосфотриэфирные аналоги синтезировали по схемам: $[2+(2+2)] + \{2^* + (2+2) + [(2+2)+(2+2)]\}$ — для моноэтильного производного (20-Et) и $\{[2+(2+2)] + 2(2^*+2) + \{2^* + [(2+2)+(2+2)]\}\}$ — для диэтильного производного (20-Et₂).

Этильные группы вводили в динуклеотидные блоки (помечены звездочкой) путем переэтерификации хлорфенильного остатка в тризамещенном фосфате в присутствии фтористого цезия [3]. Этилированные динуклеотиды выделяли обращенно-фазовой хроматографией [6] с выходом 85—

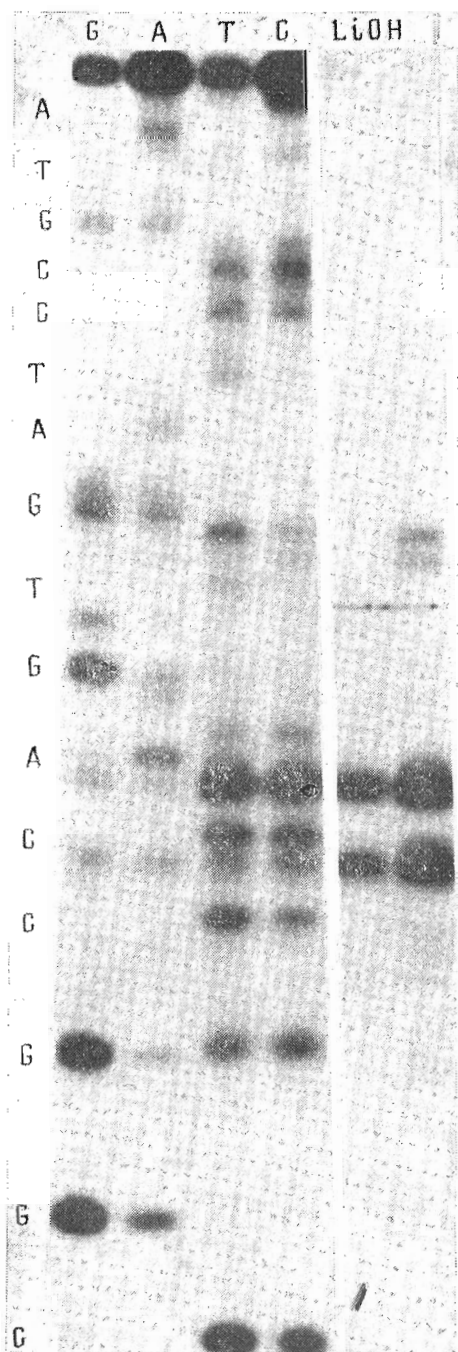
90% и использовали далее в синтезе как нуклеотидные компоненты. Наличие в них этилированных фосфатов подтверждали ^{31}P -ЯМР-спектроскопией [3]. Структуру олигонуклеотидов подтверждали секвенированием по Максому — Гилберту [10]; присутствие на электрофореграммах дополнительных дублетных полос (рисунок), обусловленных разрывом фосфотриэфирных связей в щелочных условиях, служило дополнительным доказательством наличия и положения этилированных фосфатов.

Синтезированные олигонуклеотиды образовывали специфические комплексы с заданным участком ДНК М13mpV. Об этом свидетельствовало определение структуры смежной области секвенированием дидезокси-методом по Сэнгеру [11].

Олигонуклеотиды не различались также по способности праймировать синтез второй цепи ДНК-полимеразой. Независимо от структуры затравки (20), (20-Et) или (20-Et₂) наблюдалось количественное превращение одноцепочечной ДНК в двухцепочечную репликативную форму ДНК под действием ДНК-полимеразы I или ее большого фрагмента Кленова (ДНК-полимераза A, КФ 2.7.2.7) (по данным электрофореза в 1% агарозном геле).

Полученными препаратами ДНК трансформировали компетентные клетки *E. coli* JM103. Мерой эффективности индуцированного олигонуклеотидами мутагенеза служило относительное количество мутантных колоний, а также доля мутантных фаговых частиц в потомстве [8]. Результаты анализа суммированы в таблице, из которой видно, что этилирование фосфатных групп олигонуклеотидов приводит к заметно-му увеличению выхода индуцируемых мутантов. Этот эффект усиливается при замене ДНК-полимеразы A на полноценную ДНК-полимеразу I *E. coli*.

Для доказательства специфич-



Секвенирование диэтилового эфира 20-мера 20-Et₂ по Максому — Гилберту. Сверху буквами обозначены соответствующие реакции. LiOH — продукты щелочной обработки моноэтилового 20-Et (слева) и диэтилового (справа) эфиров. Сбоку — последовательность 3'-концевой части олигонуклеотида

Эффективность направленного олигонуклеотидами мутагенеза

№ п. п.	Олигонуклеотид *	ДНК-поли- мераза **	Выход мутантов, % ^{3*} , ^{1*}	
			колоний	фагов
1	(20)	A	1,5±0,2	0,8±0,1
2	(20-Et)	A	1,8±0,4	1,1±0,2
3	(20-Et ₂)	A	2,1±0,6	2,1±0,3
4	(20)	I	3,3±0,3	3,5±0,5
5	(20-Et)	I	7,0±2,7	9,7±2,8
6	(20-Et ₂)	I	7,6±0,9	7,5±1,7

* Структура олигонуклеотидов представлена на схеме.

** ДНК-полимеразы A и I — производства НИКТИ БАВ (г. Бердск).

^{3*} Среднее арифметическое значение и стандартная ошибка рассчитаны по результатам 3—4 независимых опытов с 2—4 высевами порознь трансформированных различающихся по срокам получения препаратов бактериальных клеток *E. coli* JM 103 в каждом опыте.

^{1*} Спонтанный фон Lac⁻-мутантов ~0,1%.

ности и направленности мутагенеза из каждого опыта отбирали мутантные фаговые клоны и определяли первичную структуру их ДНК в участке связывания олигонуклеотидов. Во всех вариантах наблюдалась лишь одна и та же мутация — делеция нуклеотида С. Наличие этильных заместителей при межунклеотидных фосфатах в олигонуклеотидах не вызывало дополнительных изменений в структуре мутантных ДНК. Повышение эффективности мутагенеза при использовании фосфотриэфирных аналогов олигонуклеотидов следует, по-видимому, объяснить их большей стабильностью в условиях ферментативного синтеза второй нити ДНК, а также устойчивостью синтезированной гибридной ДНК к действию ферментов репарации.

Используя аналоги (20-Et) и (20-Et₂) как праймеры для секвенирования ДНК M13mpV по Сэнгеру и сравнивая результаты, полученные в параллельных опытах с ДНК-полимеразами I или A, мы убедились, что присутствие триэфирного узла защищает олигонуклеотиды от действия 5'→3'-экзонуклеазной активности полного фермента. В других экспериментах наблюдалось также ингибирование 3'→5'-экзонуклеазного действия полимераз вблизи фосфотриэфирных связей.

Введение в олигонуклеотиды защиты от нуклеаз, а также использование вместо ДНК-полимеразы A, нестандартности препаратов которой часто является главной помехой при проведении мутагенеза [1, 12], полноценной ДНК-полимеразы I, вероятно, позволит расширить возможности метода направленного олигонуклеотидами мутагенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zoller M. J., Smith M. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 20, p. 6487-6500.
2. Kramer W., Drutsa V., Jansen H.-W., Kramer B., Pflugfelder M., Fritz H.-J. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 24, p. 9441-9456.
3. Петренко В. А., Поздняков П. И., Сиволобова Г. Ф., Шубина Т. Н. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 431-435.
4. Данилюк Н. К., Петренко В. А., Поздняков П. И., Сиволобова Г. Ф., Шубина Т. Н. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 5, с. 703-709.
5. Данилюк Н. К., Петренко В. А., Поздняков П. И., Попов С. Г., Сиволобова Г. Ф., Шубина Т. Н. Молекуляр. биология, 1982, т. 16, № 5, с. 1116-1120.
6. Петренко В. А., Поздняков П. И. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 832-837.
7. Gronenborn B., Messing J. Nature, 1978, v. 272, p. 375.
8. 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.
9. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353-371.
10. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984, с. 416-420.
11. Sanger F., Coulson A. R., Barrell B. G., Smith A. J. H., Roe B. A. J. Mol. Biol., 1980, v. 143, p. 161-178.
12. Baas P. D., Teertstra W. R., van Mansfeld A. D. H., Jansz H. S., van der Marel G. A., Veneman G. H., van Boom J. H. J. Mol. Biol., 1981, v. 152, p. 645-639.

Поступило в редакцию

31.V.1985

После доработки 12.IX.1985

MUTAGENESIS DIRECTED BY PHOSPHOTRIESTER ANALOGUES OF OLIGONUCLEOTIDES

PETRENKO V. A., POZDNYAKOV P. I., KIPRIYANOV S. N., BOLDYREV A. N.,
SEMYONOVA L. N., SIVOLOBOVA G. F.

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

20-mer oligodeoxyribonucleotides d-ACGACGG(R')CCAG(R'')TGATCCGTA, where $R'=R''=H$ (20), $F'=Et$, $R''=H$ (20-Et), or $R'=R''=Et$ (20-Et₂) were synthesized by modified triester method. Ethylated dinucleotide blocks were prepared by transesterification method from chlorophenyl derivatives. Structures of oligonucleotides were confirmed by Maxam — Gilbert method. Mutagenesis induced by oligonucleotides was studied on DNA of M13mpB phage. Oligonucleotides were not totally complementary to this DNA in the region of 4–11 codons of Z'-gene. They all were shown to direct the formation of the designed deletion mutants, phosphotriester analogues (20-Et) and (20-Et₂) being more effective mutagens. The specificity of oligonucleotides: DNA binding and mutant DNA structure were shown by Sanger method.