



УДК 577.213.7

© 1991 г.

Н. К. Данилюк, О. И. Серпинский, А. Н. Сняжков

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНО-УСТОЙЧИВЫХ ПЛАЗМИД
СЕРИИ рFN

Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии, ИПО «Вектор» Минмедпрома СССР, пос. Кольцово Новосибирской обл.

Методом молекулярного клонирования с использованием вектора рUC18 и синтетических олигонуклеотидов сконструированы плазмиды рFN123 — рFN127, содержащие в полилинкерной области помимо сайтов широко используемых для клонирования фрагментов ДНК эндонуклеаз рестрикции также сайты узнавания специальных рестриктаз. Плазмиды рFN123 — рFN127 содержат по две пары сайтов узнавания рестриктаз *FokI* и *HgaI*, расположенных в противоположной ориентации; они предназначены для получения субфрагментов с уникальными расчетными 5'-концами. Дана сравнительная оценка стабильности новых плазмид и их производных и плазмид ранее полученной серии рМВ.

Введение этапов клонирования в схему синтеза фрагментов ДНК существенно изменило стратегию конструирования искусственных генов [1—3]. Использование метода молекулярного клонирования позволяет надежно сохранить клонированный фрагмент в составе плазмидной ДНК, выделить его в необходимых количествах, упростить схему получения протяженных искусственных ДНК. Выбор вектора для клонирования часто определяет эффективность и оригинальность последующих этапов сборки искусственных генов [4, 5].

Ранее для формирования расчетных липких 5'-концов в синтетических субфрагментах ДНК нами были использованы векторы рМВ123 и рМВ124 [6—8]. Эти векторы содержат между парными сайтами эндонуклеаз рестрикции *FokI* и *HgaI* противоположной полярности набор сайтов рестриктаз *SalGI*, *AccI*, *HincII*, *HindIII*, *BamHI*. При клонировании в них фрагмента по *BamHI*- и *SalGI*-сайтам с последующей обработкой рекомбинантной плазмиды эндонуклеазами рестрикции *FokI* или *HgaI* из ее состава выделяют субфрагменты с запланированными выступающими 5'-концами. Векторы рМВ123 и рМВ124 позволяют реализовать предложенный России с сотр. [9] экономичный вариант химико-ферментативного синтеза ДНК-дуплексов, который позволяет вдвое сократить объем работы по получению и анализу нуклеотидного материала. Преимущества, заложенные в конструкции этих векторов, были продемонстрированы нами при получении В- и С-субфрагментов, кодирующих соответственно участки 32—60 и 60—98 аминокислотной последовательности интерлейкина-2 человека [8]. Однако в процессе использования плазмид рМВ123 и рМВ124 выявился один существенный недостаток, а именно нестабильность полученных на их основе рекомбинантных плазмид.

При культивировании клеток *E. coli* штаммов ВМН7118 или JM 103, содержащих плазмиды рМВ123 и рМВ124 со встроенными субфрагментами В и С, происходило спонтанное образование их делеционных вариантов. Так, после однократно проведенного пассажа плазмиды, содержащая фрагмент В, сохранялась в 72% бактериального клеточного пула (таблица). После четырех пассажей уже только 49% клеток *E. coli*, трансформированных выделенной из третьего пассажа плазмидной ДНК, сохраняли исходный фенотип. В связи с этим возникла необходимость получения такого вектора, рекомбинанты которого обладали бы большей стабильностью и сохраняли при этом все присущие рМВ123 и рМВ124 достоинства.

Сравнение устойчивости фенотипического признака клонов *E. coli*, содержащих плазмиды серий рFII и рMB

Плазмиды, содержащиеся в клоне	Фенотип клона	Количество клонов с измененным фенотипом после трансформации клеток <i>E. coli</i> плазмидной ДНК, %			
		пассаж 1	пассаж 2	пассаж 3	пассаж 4
рMB123	Lac ⁺	0*	0	0	0
рMB124	Lac ⁻	1	2	0	2
рIL581	Lac ⁺	28	37	42	51
рFH123	»	0	0	0	0
рFH124	Lac ⁻	1	1	2	2
рFH125	Lac ⁺	0	0	0	0
рFH126	»	0	0	0	0
рFH127	»	0	0	0	0
рFL581	»	0	0	0	0
рFL912	Lac ⁻	0	0	0	0

* Обозначает число $\leq 0,01\%$.

Мы предположили, что повысить стабильность вектора и рекомбинантных плазмид можно путем изменения ориентации в них гена α -пептида β -галактозидазы. Векторы рMB123 и рMB124 сконструированы на основе плазмиды рUR222. При изменении в них ориентации гена α -пептида они превращаются в плазмиды, родственные серии рUC [10, 11]. Благодаря сходному расположению *PvuII*-сайтов в рMB123 и рUC18 оказалось возможным легко ввести намеченное изменение в структуру плазмиды рMB123 (см. рис. 1). Для этого сначала большой *PvuII*-фрагмент рUC18 циклизовали с помощью Т4-ДНК-лигазы. Полученную плазмиду рUC18, лишенную 5'-концевой части гена α -пептида, снова гидролизовали *PvuII* и затем лигировали с малым *PvuII*-фрагментом (316 п. о.) ДНК рMB123. Трансформация лигазной смесью компетентных клеток *E. coli* JM103 приводила к восстановлению фенотипа Lac⁺ у 37% выросших колоний, что свидетельствовало об образовании плазмиды с восстановленным геном α -пептида в необходимой ориентации. Из 6 Lac⁺-колоний были выделены плазмидные ДНК; судя по рестриктному анализу (*PvuII*, *BamHI*, *SalGI*, *BspI*), все 6 колоний содержали плазмиду одной конструкции, обозначенную рFH123 и являющуюся аналогом полученной ранее рMB123.

Плазмиды рFH124 была сконструирована из рFH123 аналогично тому, как это сделано при получении рMB124 [7]. Векторы рFH123 и рFH124 имеют одинаковую с плазмидами рMB123 и рMB124 полилинкерную область и содержат между парными противоположной полярности сайтами эндонуклеаз рестрикции *FokI* и *HgaI* набор сайтов рестриктаз *SalGI*, *AccI*, *HincII*, *HindIII* (в рFH124 этот сайт отсутствует) и *BamHI* (см. рис. 2). Эти плазмиды взаимно дополняют друг друга в случае клонирования фрагментов разной длины, состоящих из $3n$ или $3n \pm 1$ п. о. [12, 13].

Для увеличения выхода рекомбинантных плазмид, а также с целью последующего извлечения из них субфрагментов с другими расчетными выступающими 5'-концами нами были сконструированы плазмидные векторы рFH125 и рFH126. Они содержат вокруг центрального сайта *BamHI* (рFH125) и *SalGI* (рFH126) симметрично расположенные сайты узнавания рестриктаз *FokI* и *HgaI* противоположной полярности (рис. 2). Клонирование по центральному сайту в этих векторах не требует установления ориентации введенного фрагмента. Благодаря его симметричному расположению относительно сайтов узнавания *HgaI* или *FokI* гидролиз плазмиды этими рестриктазами приводит к выщеплению, независимо от ориентации, одного и того же фрагмента с выступающими уникальными 5'-концами.

Для конструирования плазмиды рFH125 в качестве исходной использовали рFH124 (схема, а). ДНК плазмиды гидролизовали рестриктазой *BamHI*, липкие концы достраивали с помощью ДНК полимеразы I (фрагмент Кленова). Линейную форму векторной ДНК обрабатывали рестрикта-

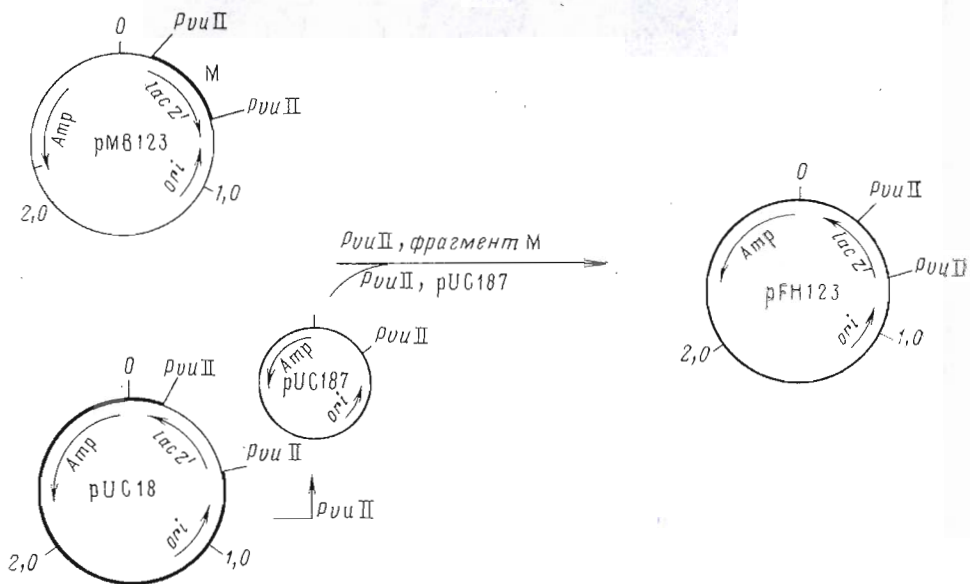


Рис. 1. Схема получения векторной плазмиды pFH124

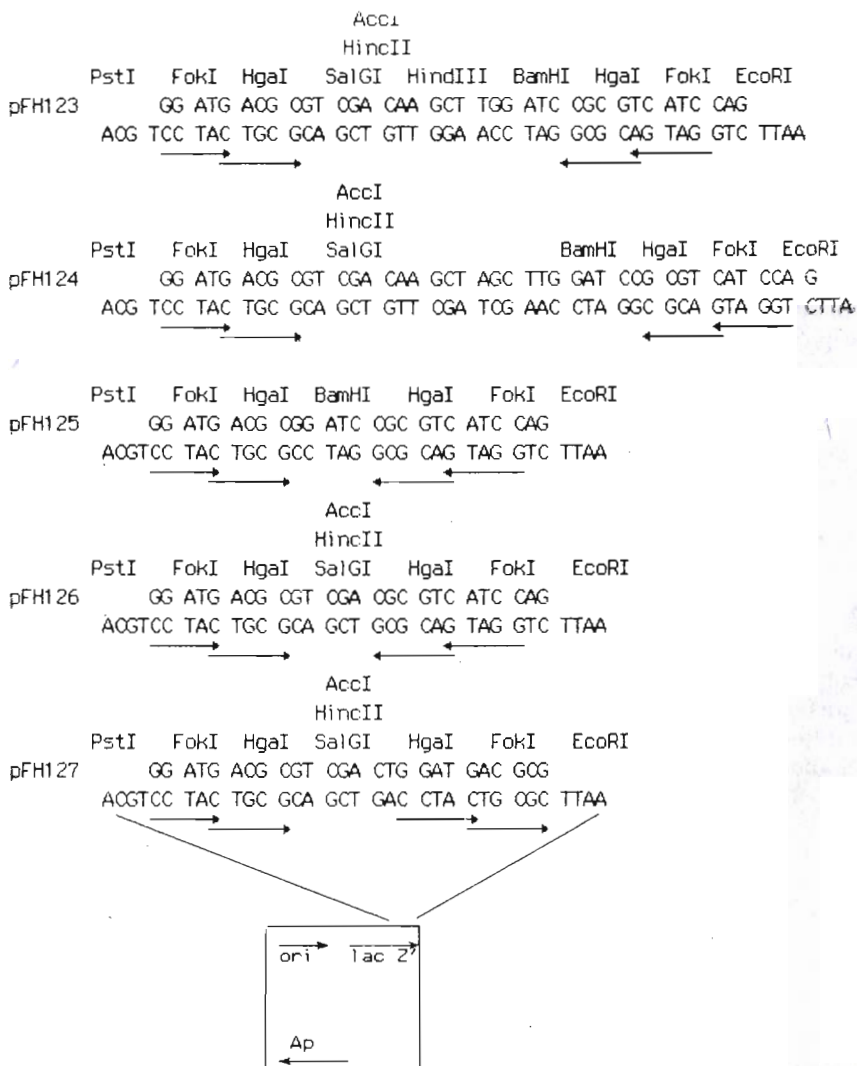
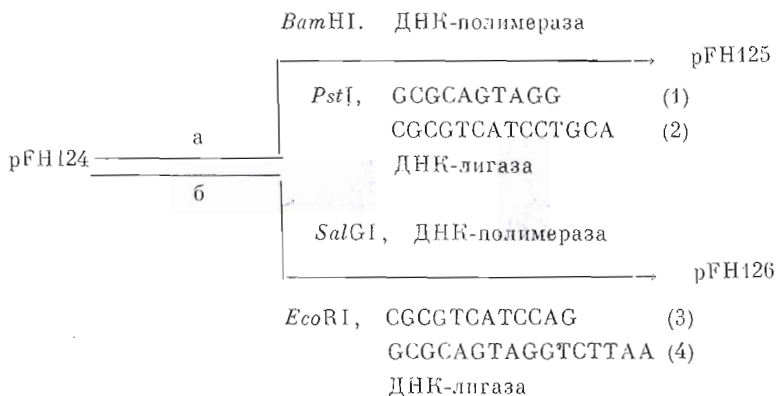


Рис. 2. Первичная структура и набор сайтов эндонуклеаз рестрикции полилинкерной области плазмид pFH123—pFH127. Стрелками обозначено направление от сайтов связывания рестриктаз *FokI* и *HgaI* к месту гидролиза цепи ДНК



зой *Pst*I и лигировали с 20-кратным избытком олигонуклеотидов (1) и (2). Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* JM103, 35% устойчивых к ампициллину колоний имели *Lac*⁺-фенотип. Из 10 клонов была выделена ДНК, которую тестировали на отсутствие сайта *Sal*GI путем сравнения ее *Bsp*I-гидролизата с гидролизатом плазмиды рFN124. На рис. 3 видно, что они различаются подвижностью только одного фрагмента, содержащего область полилинкера. Конструирование плазмиды рFN126 было выполнено аналогично с помощью олигонуклеотидов (3) и (4) (схема, б). После сравнительного анализа *Bsp*I-гидролизатов исходной и вновь полученной ДНК структура полилинкерной области была определена модифицированным методом Максама — Гилберта. По причине устойчивой компрессии плазмид рFN125 и рFN126 в области полилинкера электрофорез секвенционных гелей проводили при 56° С. При секвенировании ДНК трех отобранных клонов было обнаружено, что две из них имеют структуру, соответствующую рFN126. ДНК третьего клона, обозначенная рFN127 (см. рис. 2), содержала незапланированную ориентацию сайтов узнавания *Fok*I и *Hga*I, являющихся, по-видимому, результатом неоднородности приготовленной лигазной смеси.

Для проверки устойчивости рекомбинантных плазмид, образующихся при использовании новых векторов, мы клонировали в них упомянутые выше синтетические дуплексы В и С, исходя из длины фрагмента и удобства фенотипического отбора рекомбинантов как описано ранее в работе [8]. После стадий лигирования и скрининга бактериальных клонов были получены новые рекомбинантные плазмиды рFL581 и рFL912, аналоги рекомбинантов рIL581 и рIL912.

Полученные векторные плазмиды рFN123 — рFN127 и их производные рFL912 и рFL581 обладали более устойчивой генетической конструкцией. Плазмиды стабильно сохранялись в клетках *E. coli* JM103 в процессе четырех пассажей (таблица).

На рис. 2 представлена схема полилинкерных областей всех векторов типа рFN. Помимо маркера устойчивости к ампициллину (*Ap*), плазмидного репликона (*ori*) они содержат ген α -пептида (*lacZ'*), в состав которого входят сконструированные полилинкерные районы (их нуклеотидная последовательность на рис. 2 изображена расчлененной на кодоны от иницирующего АТГ α -пептида). Представленный набор векторов позволяет клонировать разнообразные фрагменты ДНК и получать из них субфрагменты с уникальными 5'-концами путем гидролиза рестриктазами *Fok*I или *Hga*I. Благодаря *Bsp*I-сайту, расположенному вблизи полилинкерной области, полученные плазмиды можно использовать для секвенирования встроенного фрагмента без выделения последнего из радиоактивной полимеразной смеси. Плазмиды могут быть полезны для экспрессии встроенных генов под контролем *P*_{*lac*}-промотора, поскольку конструкция полученных векторов позволяет легко получать экспрессирующий вариант нуклеотидной последовательности, включающей небольшую 5'-концевую область α -пептида β -галактозидазы.

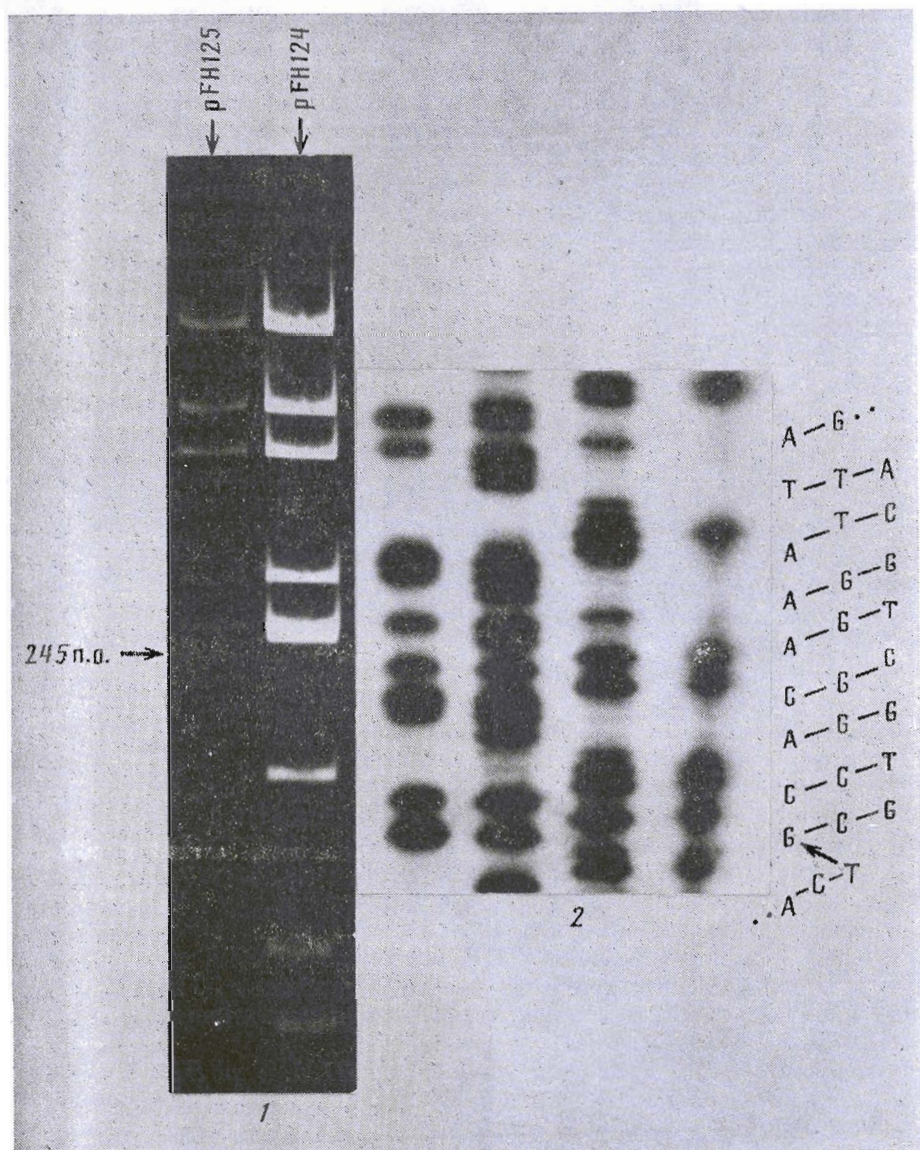


Рис. 3. Всп-гидролизаты векторных плазмид (1); радиоавтограф секвенирующего геля полилинкерной области плазмиды pFH125 (2)

Экспериментальная часть

В работе использовали рестриктазы (КФ 3.1.23x) *PvuII*, *HindIII*, *SalGI*, *EcoRI*, *PstI*, *BspI*, *BamHI*, ДНК-лигазу фага T4 (КФ 6.5.1.1) производства ВНИИ прикладной энзимологии (Вильнюс). ДНК-полимераза I (фрагмент Клевова, КФ 2.7.7.7), рестриктаза *FokI* любезно предоставлены С. Х. Дегтяревым (НИКТИ БАВ, Бердск). Применяли 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозид (X-gal) и изопропилтио-β-D-галактопиранозид (IPTG) производства НИКТИ БАВ (Бердск), дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты (Sigma, США), бумагу DE-81 (Whatman, Англия), [γ-³²P]АТФ (1000 Ки/ммоль), [α-³²P]dTTP, [α-³²P]dATP (1000 Ки/ммоль) отечественного производства, агарозу (Sigma, США), акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, пептон, дрожжевой экстракт (Serva, Швеция). Гидразингидрат (Fluka, Швейцария) перегоняли над щелочью, диметилсульфат (Arola, ГДР), пиперидин (х. ч.) перед использованием перегоняли. Олигонуклеотиды были получены фосфоритриэфирным твердофазным методом как описано в работе [8]. Приготовление сред, ферментативные

реакции, электрофорез в ПААГ, трансформацию компетентных клеток *E. coli* JM103 проводили как описано в работе [14]. Плазмидную ДНК из культуры клеток *E. coli* выделяли по методу [15].

Получение вектора pFH123. 50 мкг ДНК плазмиды pMB123 гидролизовали эндонуклеазой рестрикции *PvuII* в 100 мкл раствора, содержащего буфер А (50 мМ трис-НСl, рН 7,5; 10 мМ MgCl₂; 10 мМ 2-меркаптоэтанол) и 50 мМ NaCl, 1 ч при 37° С. Реакционную смесь прогревали 2 мин при 65° С, добавляли 10 мкл 0,1% красителя бромфенолового синего в 50% глицерина и подвергали электрофорезу в 4% ПААГ. Малый *PvuII*-фрагмент элюировали из геля, сорбируя его на ионообменную бумагу DE-81. Фрагмент элюировали 1,5 М LiClO₄ (рН 8) (2 × 25 мкл) при 50° С. ДНК из полученного раствора осаждали 10 объемами 2% LiClO₄ в ацетоне. Осадок промывали спиртом, высушивали на воздухе и растворяли в 30 мкл ТЕ-буфера (10 мМ трис-НСl, 1 мМ EDTA, рН 8).

10 мкг ДНК pUC18 гидролизовали рестриктазой *PvuII* в условиях, описанных для pMB123. 10 мкл реакционной смеси после отжига (5 мин, 65° С) инкубировали 12 ч при 10° С с 50 ед. T4-ДНК-лигазы в 20 мкл буфера А, содержащего 0,25 мМ АТР. Десятую часть реакционной смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* JM103, обработанных CaCl₂. Трансформанты отбирали на 1,5% L-агаре, содержащем 50 мкг/мл ампициллина, X-gal, 10⁻³ М IPTG. Колонии с Lac⁻-фенотипом культивировали в 5 мл среды в течение ночи при 37° С. 1 мкг плазмидной ДНК, выделенной из полученной биомассы, гидролизовали *PvuII* в объеме 30 мкл. Реакционную смесь осаждали 10 объемами 2% LiClO₄ в ацетоне, осадок промывали этанолом, сушили. Затем, растворив его в 30 мкл буфера Б, инкубировали 12—16 ч при 10° С с 1 мкг малого *PvuII*-фрагмента в присутствии 50 ед. акт. T4-ДНК-лигазы. Третью часть реакционной смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* JM103. Из 50 мл клеточной суспензии бактерий с фенотипом Lac⁺ щелочным методом выделяли плазмидную ДНК. Сухой остаток осветленного лизата растворяли в 15 мл ТЕ-буфера и добавляли равный объем 5 М LiCl, выдерживали 15 мин во льду, центрифугировали. К супернатанту добавляли 2 объема этилового спирта и выдерживали еще 20 мин при -20° С. Выпавший осадок ДНК центрифугировали, промывали этанолом и сушили на воздухе. Осадок ДНК растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера. 8 мкл полученного раствора использовали для рестрикционного анализа (*PvuII*, *BspI*, *BamHI*, *SalGI*).

Конструирование векторных плазмид pFH125 и pFH126. а) 10 мкг ДНК pFH124 гидролизовали 1 ч при 37° С 20 ед. акт. рестриктазы *SalGI* в 50 мкл буфера А с 150 мМ NaCl. Затем реакционную смесь осаждали 2% LiClO₄ в ацетоне. Промытый и высушенный осадок растворяли в 50 мкл буфера А. К раствору добавляли dNTP до концентрации 100 мМ, 6 ед. акт. ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и реакционную смесь выдерживали 10 мин при 20° С. Затем смесь прогревали 2 мин при 65° С, добавляли 2 мкл 5 М NaCl, 20 ед. акт. рестриктазы *EcoRI* и выдерживали раствор еще 1 ч при 37° С. ДНК из раствора осаждали 2% LiClO₄ в ацетоне. Осадок растворяли в 100 мкл буфера Б. К раствору добавляли по 100 пмоль олигонуклеотидов (1) и (2) (см. рис. 3а), 20 ед. акт. T4-ДНК-лигазы и выдерживали реакционную смесь 12 ч при 10° С. 10 мкл лигазной смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* JM103. Из колоний, имеющих Lac⁺-фенотип, выделяли плазмидную ДНК. После рестрикционного анализа (*BspI*, *BamHI*) первичную последовательность в районе полилинкера определяли модифицированным методом Максама — Гилберта [16].

б) 10 мкг ДНК pFH124 гидролизовали эндонуклеазой *BamHI* в 50 мкл буфера А с 100 мМ NaCl. Спустя 1 ч при 37° С реакционную смесь осаждали 10 объемами 2% LiClO₄ в ацетоне. Промытый и высушенный осадок ДНК обрабатывали ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) в условиях, описанных выше. Затем в раствор добавляли 1 мкл 5 М NaCl, 10 ед. акт. рестриктазы *PstI* и выдерживали еще 1 ч при 37° С. После прогревания (2 мин, 65° С) в реакционную смесь добавляли по 100 пмоль олигонуклеотидов (3) и (4) (см. рис. 3б), 2 мкл 10 мМ АТР, 20 ед. акт. T4-ДНК-лигазы

и инкубировали 12—16 ч при 10° С. Третью часть лигазной смеси использовали для трансформации клеток *E. coli* JM103. Плазмидную ДНК, выделенную из колоний с Lac⁺-фенотипом, анализировали с помощью рестриктаз *Bsp*I и *Sal*GI. Первичную последовательность района полилинкера определяли по методу [16].

Контроль стабильности плазмид pFH123—pFH127 и их производных. Колонию, содержащую плазмидную ДНК, выращивали в 5 мл среды LB (с 50 мкг/мл ампициллина) в течение ночи при 37° С. Клетки собирали центрифугированием в течение 2 мин при 6000 об/мин. 0,01 мкг выделенной из биомасс плазмидной ДНК трансформировали клетки *E. coli* JM103. Суспензию клеток после трансформации высевали на четыре чашки с селективной средой, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, X-gal, 10⁻³ M IPTG. Чашки инкубировали 16 ч при 37° С. Проводили подсчет колоний с разным фенотипом, определяли их процентное соотношение. В таблице приведено среднее содержание (%) клонов с измененным фенотипом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wosnick M. A., Barnett R. W., Vicentini A. M., Erfle H., Elliott R., Summer Smith M., Mahtei N., Davies R. W. // *Gene*. 1987. V. 60. № 1. P. 115—127.
2. Rink H., Liersch M., Sieber P. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. № 16. P. 6369—6387.
3. Williams D. P., Regier D., Akiyoshi D., Genbaujfe F., Murphy J. R. // *Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16. № 22. P. 10453—10468.
4. Чатмачева О. Г., Бурыкова А. А., Мирских О. В., Ревердатто С. В., Ефимов В. В., Овчинников Ю. А. // *Биоорганическая химия*. 1985. Т. 11. № 11. С. 1533—1546.
5. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Звонок Н. М., Василева Т. Е., Колосов М. Н. // *Биоорганическая химия*. 1987. Т. 13. № 1. С. 69—81.
6. Сinyaков А. Н., Серпинский О. И., Данилюк Н. К., Чижиков В. Е., Дегтярев С. Х. Вектор рМВ 123 для получения фрагментов ДНК с произвольными «липкими» концами и способ его конструирования. А. с. № 1446159 СССР // *Б. И.* 1988. № 47. С. 122.
7. Сinyaков А. Н., Серпинский О. И., Данилюк Н. К., Чижиков В. Е., Дегтярев С. Х. Вектор рМВ 124 для получения фрагментов ДНК с произвольными «липкими» концами и способ его конструирования. А. с. № 1446160 СССР // *Б. И.* 1988. № 47. С. 122.
8. Сinyaков А. Н., Серпинский О. И., Данилюк Н. К., Чижиков В. Е., Дегтярев С. Х. // *Биоорганическая химия*. 1989. Т. 15. № 5. С. 637—648.
9. Rossi J. J., Kierzek R., Hung T., Walker P. A., Itakura K. J. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. № 16. P. 9226—9229.
10. Ruter U., Koenen M., Otto K., Miller-Hill B. // *Nucl. Acids Res.* 1981. V. 9. P. 4087—4098.
11. Vieira J., Messing J. // *Gene*. 1982. V. 19. P. 259—268.
12. Сinyaков А. Н., Данилюк Н. К., Серпинский О. И. Вектор рFH 123 для получения фрагментов ДНК с произвольными «липкими» концами и способ его конструирования. А. з. № 4387511/30-13. Положит. решение от 14.02.89 г.
13. Сinyaков А. Н., Данилюк Н. К., Серпинский О. И. Вектор рFH 124 для получения фрагментов ДНК с произвольными «липкими» концами и способ его конструирования. А. з. № 4387533/30-13. Положит. решение от 14.02.89 г.
14. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 107—224.
15. Birnboim H., Doly J. // *Nucl. Acids Res.* 1979. V. 7. № 6. P. 1513—1523.
16. Данилюк Н. К., Ястребов С. И., Артамонова Т. П., Попов С. Г. // *Биоорганическая химия*. 1986. Т. 12. № 9. С. 1185—1188.

Поступила в редакцию
11.1.1990

N. K. DANILYUK, O. I. SERPINSKI, A. N. SINYAKOV

CONSTRUCTION OF pFH SET OF PLASMIDS AND ESTIMATION OF THEIR STABILITY

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

By cloning synthetic oligonucleotides into pUC18 plasmid, pFH123 — pFH127 plasmids have been constructed. Their polylinker area, along with sites of widely used restriction endonucleases, contains two pairs each of *Fok*I and *Hga*I sites in the opposite orientation to provide subfragment with unique predetermined 5'-ends. Comparative stability of the new plasmids and their derivatives has been studied and compared with that of the earlier constructed pMB plasmids.