



УДК 575.224.4

© 1991 г.

*И. И. Шехтер, Е. И. Ратманова, Б. П. Вейно,  
В. Г. Дебабов*

**САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
АДРЕСОВАННОГО ФРАГМЕНТИРОВАНИЯ ОДНОНИТЕВОЙ ДНК  
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГИБРИДОВ ГОМОЛОГИЧНЫХ БЕЛКОВ**

*Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных  
микроорганизмов, Москва*

Предложен вариант получения гибридов гомологичных белков с заданными границами методом многоточечного сайт-направленного мутагенеза с использованием адресованного фрагментирования однонитевой ДНК. С помощью двух специально сконструированных синтетических дезоксирибоолигонуклеотидов\* проводится выщепление одноцепочечного фрагмента одного из генов, который используется в качестве мутагенного праймера в многоточечном сайт-направленном мутагенезе второго гена. Подход адресованного фрагментирования продемонстрирован на примере рестриктаз *NcoI*, *HinfI*, *FokI*. С помощью данного метода был получен гибридный ген  $\alpha 2$ -интерферона человека, содержащий аминокислотную последовательность (24—54)  $\alpha$ -интерферона свиньи.

Одним из элементов изучения структурно-функциональных отношений в гомологичных белках, в частности в интерферонах, является исследование свойств гибридных молекул, состоящих из отдельных частей интересующих белков. Генно-инженерные методы получения гибридов предполагают использование сайтов эндонуклеаз рестрикции для конструирования рекомбинантных молекул [1]. В этом случае расположение сайтов рестрикции предопределяет структуру получаемого гибрида, не всегда совпадающую с поставленной исследователем задачей. При отсутствии удобных рестрикционных сайтов гибридная рекомбинантная технология представляет сложную генно-инженерную задачу [2].

В данной работе предложен вариант конструирования гибридных молекул с заданными границами методом многоточечного мутагенеза одного из генов с использованием в качестве праймера фрагмента однонитевой ДНК второго гена, полученного методом адресованного фрагментирования.

Процедура адресованного фрагментирования состоит в следующем: специально сконструированный олигонуклеотид, имеющий в своем составе сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции, а во фланкирующей последовательности — адрес данного сайта на ДНК, обеспечивает формирование функционального рестрикционного сайта для соответствующего фермента в строго фиксированном месте однонитевой молекулы. Последующая обработка комплекса олигонуклеотид — ДНК соответствующей рестриктазой позволяет ввести разрыв в последовательность ДНК. Аналогичная процедура с использованием двух олигонуклеотидов, комплементарных различным участкам ДНК, приводит к выщеплению фрагмента одноцепочечной молекулы. В общем виде схема получения гибридов гомологичных белков А и В представлена на рис. 1.

Следует отметить, что адресованное фрагментирование, позволяющее специфически расщеплять одноцепочечную ДНК, требует субклонирования

\* Символ «d» в изображениях дезоксирибоолигонуклеотидов опущен. *pinf* и *hinf* — гены интерферонов свиньи и человека.

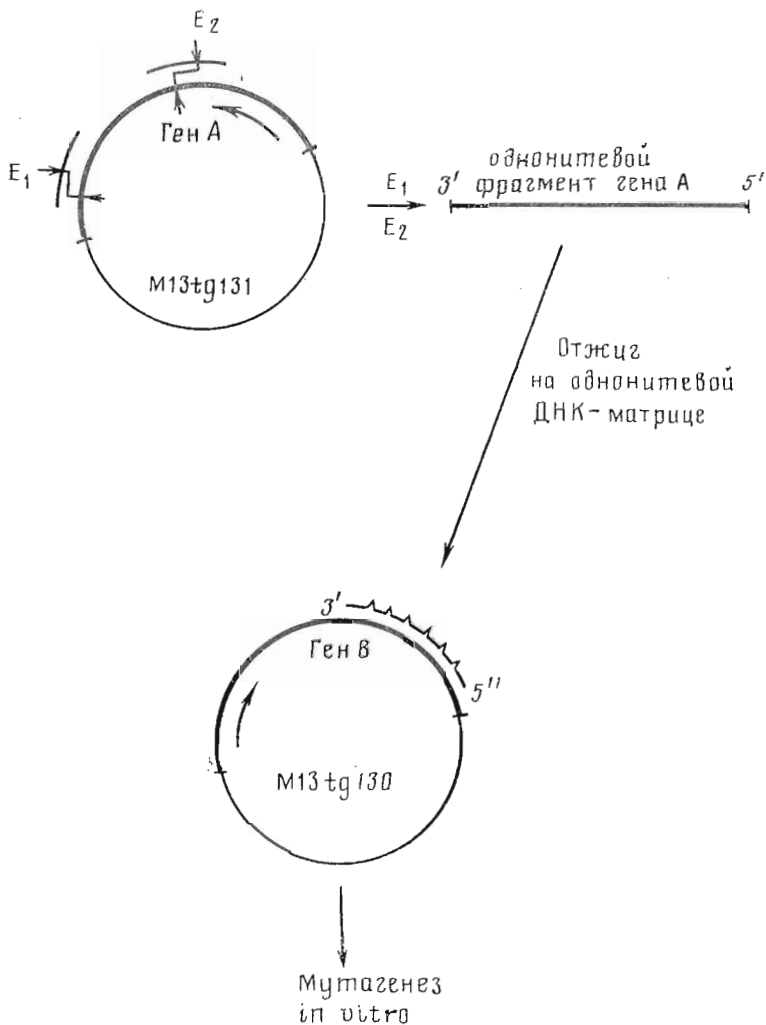


Рис. 1. Схема проведения мутагенеза с использованием олигонуклеотид-адресованного фрагментирования однонитевой ДНК.  $E_1$  и  $E_2$  — рестриктазы, расщепляющие комплекс ДНК с олигонуклеотидами. Стрелками внутри плазмиды указана ориентация клонированных гомологичных генов

генов, включающих выщепляемый фрагмент (ген А, рис. 1), в составе репликативных форм однонитевых фагов типа М13. При проведении мутагенеза на одноцепочечных фаговых векторах гены белков, составляющих гибридную молекулу, должны быть клонированы в М13 в противоположных ориентациях (рис. 1, гены А и В), что обеспечит образование комплекса между их гомологичными участками.

Получение гибридов сайт-направленным мутагенезом с применением адресованного фрагментирования однонитевой ДНК позволяет использовать не только рестриктазы, узнающие уникальные сайты, но также и мелкоцепящие ферменты, применение которых в обычном варианте конструирования гибридных молекул технически затруднено.

В настоящей работе возможности этого способа продемонстрированы на примере адресованного фрагментирования гена  $\alpha$ -интерферона свиньи с помощью рестриктаз *NcoI*, *HinfI* и *FokI*. Выбор ферментов был обусловлен тем, что рестриктаза *NcoI* имеет один сайт узнавания в исследуемой ДНК, в то время как для *HinfI* их насчитывается более 30. Рестриктаза *FokI* в сочетании со специальным синтетическим адаптером позволяет вводить разрыв в любую, заранее запланированную последовательность однонитевой ДНК [3].

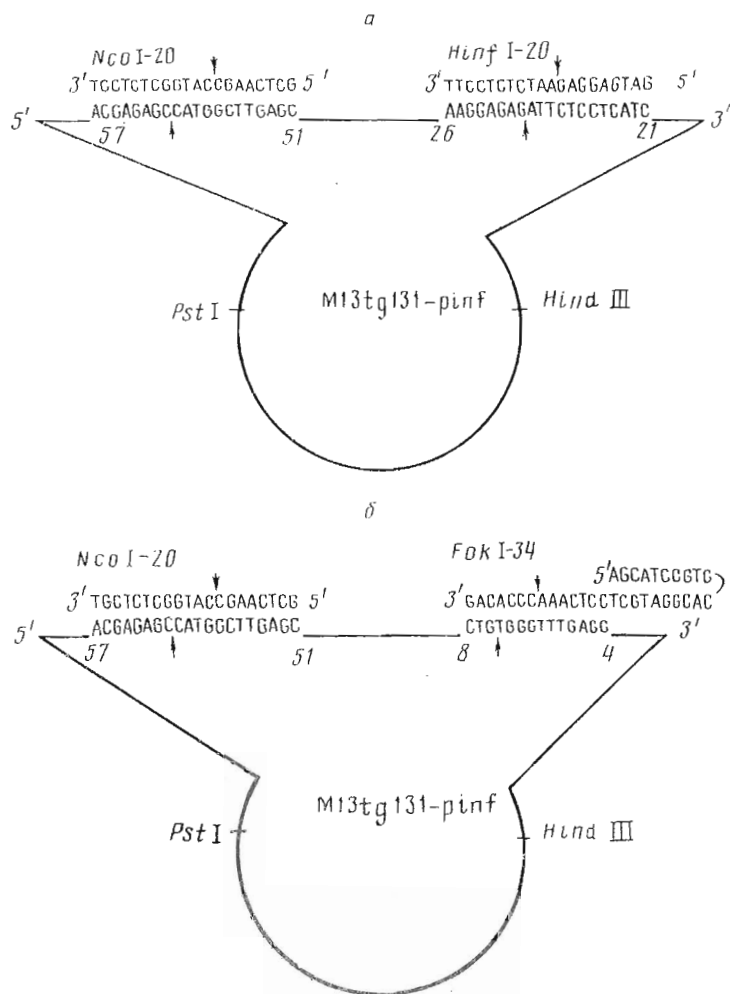


Рис. 2. Схема адресованного фрагментирования гена  $\alpha$ -интерферона свиньи с использованием праймеров *NcoI*-20 и *HinfI*-20 (a), *NcoI*-20 и *FokI*-34 (б) (сайты узнавания рестриктаз указаны стрелками). Цифрами обозначены соответствующие номера аминокислотных остатков  $\alpha$ -интерферона свиньи

Адресованное фрагментирование гена  $\alpha$ -интерферона свиньи с помощью рестриктаз *HinfI* и *NcoI* было проведено для получения гибрида  $\alpha$ -интерферонов человека и свиньи, в котором аминокислотная последовательность (24—54)  $\alpha$ 2-интерферона человека заменена на соответствующую область  $\alpha$ -интерферона свиньи (рис. 2a). 20-Звенные олигонуклеотидные праймеры (*HinfI*-20 и *NcoI*-20), содержащие сайты узнавания соответствующих рестриктаз, гибридизовали с одноцепочечной ДНК фага M13tg131, включающей ген  $\alpha$ -интерферона свиньи. Последующая обработка ферментами *HinfI* и *NcoI* комплекса олигонуклеотидов с ДНК позволила выщепить 91-нуклеотидный фрагмент, содержащий последовательность, кодирующую аминокислотные остатки 24—54  $\alpha$ -интерферона свиньи. После разделения рестрикционной смеси в ПААГ (рис. 3a) и элюции одноцепочечный фрагмент использовали в качестве праймера в многочечном мутагенезе  $\alpha$ 2-интерферона человека, ген которого был переклонирован в составе фага M13tg130. Мутагенез проводили с использованием урацил-репарационной селекции мутантов [4], позволяющей вести процесс с повышенной эффективностью. Поиск мутантных клонов осуществляли гибридизацией с использованием 17-звенного олигонуклеотида, комплементарного участку гена, отвечающего области 32—37  $\alpha$ -интерферона свиньи. Определение нуклеотидной последовательности фаговых ДНК, выделенных из отобранных клонов, подтвердило наличие

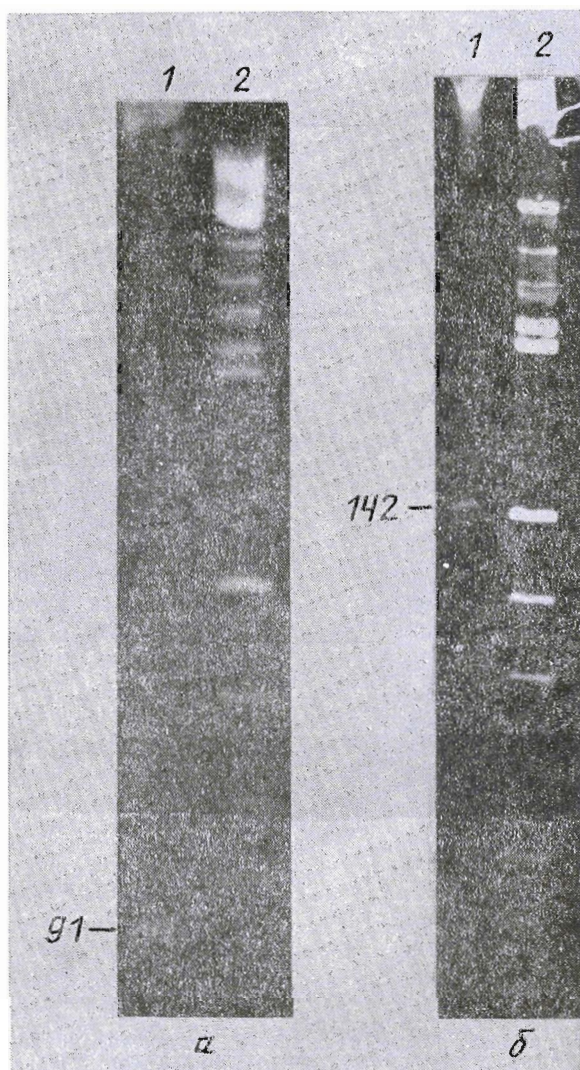


Рис. 3. Электрофоретическое разделение фрагментов адресованного расщепления одноцепочечной ДНК M13tg131—pinf1 рестриктазами *Hinf*I и *Nco*I 1(а), *Fok*I и *Nco*I 1(б), 2 (а, б) — ДНК-маркеры (pBR322, рестрицированная *Bsp*RI). Стрелками указаны длины фрагментов (число нуклеотидов в выщепленном одноцепочечном участке) гена  $\alpha$ -интерферона свиньи

области 24—54 аминокислотных остатков гена  $\alpha$ -интерферона свиньи в составе гена  $\alpha 2$ -интерферона человека (рис. 4). Гибридный ген переклонируют в экспрессионный вектор. Синтезированный в *E. coli* и выделенный с помощью иммуноаффинной хроматографии белковый препарат проходит биологическое тестирование.

Адресованное фрагментирование получило дополнительные возможности при использовании рестриктазы *Fok*I и может представлять метод конструирования гибридных молекул при отсутствии сайтов рестрикции. *Fok*I является эндонуклеазой IIС-класса. Ферменты данного типа (*Bsp*MI, *Mbo*II, *Fok*I) характеризуются тем, что расщепляют ДНК на определенном расстоянии от сайта узнавания, оставляя сайт узнавания интактным [3]. Как было указано выше, применение специально сконструированного адаптера с дуплексным сайтом узнавания *Fok*I и одонитевым адресом на интересующей ДНК дает возможность гидролизовать последовательность ДНК в строго определенном, с точностью до нуклеотида, месте. Синтезированный 34-звенный олигонуклеотид, удовлетворяю-



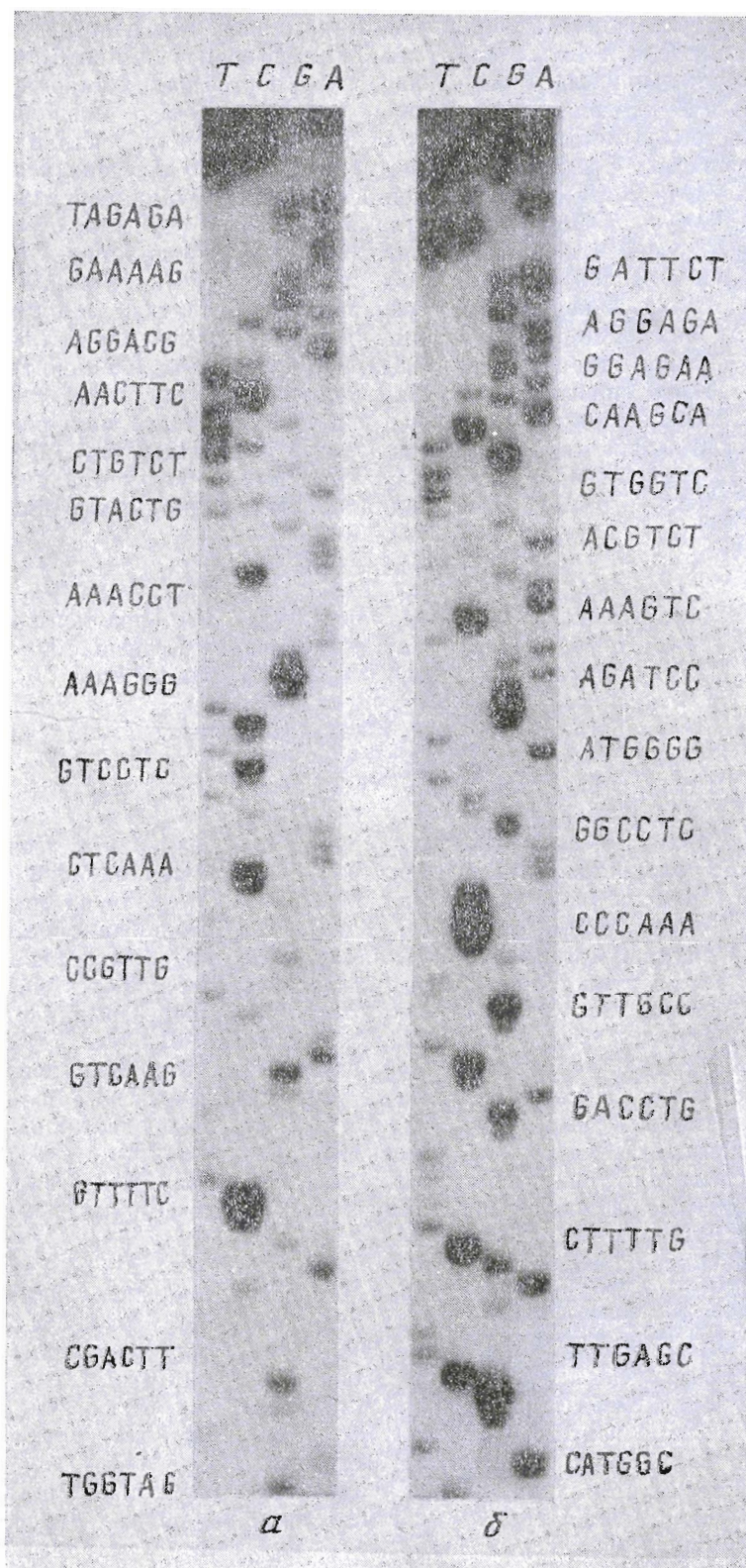


Рис. 4. Анализ по Сэнгеру первичной структуры фрагмента гена  $\alpha 2$ -интерферона человека (*a*), гена гибридного белка (*b*)

щий этим требованиям, использовали для введения разрыва в область 7-го аминокислотного кодона гена  $\alpha$ -интерферона свиньи (рис. 26), не содержащую специфических последовательностей каких-либо рестриктаз. Совместное использование праймеров *NcoI*-20 и *FokI*-34 позволило выщипать 142-нуклеотидный фрагмент гена  $\alpha$ -интерферона свиньи (рис. 36).

Адресованное фрагментирование может успешно применяться в многоточечном мутагенезе при получении гибридов гомологичных белков. Процедура проще, быстрее выполнима и удобнее ступенчатого варианта мутагенеза. Следует обратить внимание на конструкцию праймеров: расположение сайтов рестрикции, длину фланкирующих областей. Асимметричное расположение сайта узнавания рестриктазы в олигонуклеотиде, непротивоположное фланкирование, а также применение белка, взаимодействующего с одноцепочечной ДНК [5], позволят уменьшить фон неспецифического связывания олигонуклеотида.

Использование двух адаптеров с сайтом узнавания *FokI*-рестриктазы и различными адресами, соответствующими граничным точкам требуемых гибридов, значительно расширит возможности конструирования гибридных молекул в отсутствие подходящих рестрикционных сайтов.

### Экспериментальная часть

В работе применяли ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова)• ДНК-лигазу и полинуклеотидкиназу фага T4 (Pharmacia, Швеция), РНКазу А (Sigma, США), эндонуклеазы рестрикции *FokI*, *HinfI*, *NcoI* (Amersham, Англия).

В работе использовали бактериальные штаммы *E. coli*: TG1 (K12,  $\Delta(lac-pro)$ , *supE*, *thi*, *hsdD5/F' traD36*, *proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>*, *laq1<sup>q</sup>*, *laqZ*  $\Delta$ M15), RZ1032 (HfrKL16 PO/45 [*LysA* (61—62)], *dut1*, *ung1*, *thi1*, *relA1*, *Zbd*—279::Tn10, *supE44*).

Рекомбинантные фаги M13tg130-*hinf- $\alpha$ 2* и M13tg131-*pinf*, содержащие гены  $\alpha$ -интерферонов человека и свиньи соответственно, были получены согласно [6]. Фаги выращивали при 37° С в течение ночи на среде LB [6] в культурах клеток штаммов *E. coli* RZ1032 и TG1 с добавлением уридина в первом случае. Однонитевые ДНК-матрицы для мутагенеза и адресованного фрагментирования выделяли по методике работы [7].

Приготовление компетентных клеток *E. coli*, трансформацию и выделение плазмидной ДНК проводили как описано [6].

*Синтетические олигонуклеотиды* для адресованного фрагментирования одноцепочечной ДНК и склеивания мутантных клонов получали твердофазным фосфоамидитным методом [8]. После деблокирования целевые олигонуклеотиды выделяли методом препаративного гель-электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле [9]. Гомогенность синтезированных препаратов подтверждали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ [9].

*Адресованное фрагментирование ДНК* осуществляли следующим образом: 5 мкг (2,5 пмоль) одноцепочечной ДНК смешивали с 25 пмоль синтетических олигонуклеотидов *HinfI*-20 (GATGAGGAGAATCTCTCCTT) и *NcoI*-20 (CCTCAAGCCATGGCTCTCGT) в 20 мкл раствора, содержащего 10 мМ трис-НСl (рН 8,0), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, и инкубировали 1 ч при 55° С. Для адаптера *FokI*-34 (AGCATCCGTGCACGGATGCTCCTCAAAC-CCACAG) использовали более мягкие условия отжига: постепенное понижение температуры от 70 до 20° С в течение 1,5 ч, так как этот праймер имел короткий адрес на ДНК (14 комплементарных оснований). Гидролиз фосфодиэфирной связи на участке комплекса ДНК—олигонуклеотид проводили в течение 1 ч при 37° С в 100 мкл смеси, содержащей 33 мМ трис-ацетат (рН 7,9), 66 мМ ацетат калия, 10 мМ ацетат магния, 0,5 мМ дитиотреит, при помощи рестрикционных эндонуклеаз, в первом случае *HinfI* и *NcoI*, а во втором — *FokI* и *NcoI*.

После переосаждения этиловым спиртом в присутствии тРНК и последующей обработки РНКазой при 20° С в течение 0,5 ч рестрикционную смесь анализировали в 10% ПААГ. Фрагмент *HinfI*-*NcoI* извлекали из



ПААГ методом электроэлюции на DEAE-целлюлозу (DE-81) и использовали в качестве праймера в многоточечном сайт-направленном мутагенезе  $\alpha 2$ -интерферона человека.

Мутагенез проводили с использованием урацил-репарационной системы отбора мутантных клонов ДНК [4, 10]. Урацилсодержащую ДНК-матрицу для мутагенеза получали из фаговых частиц, выращенных в культуре штамма RZ1032 на среде, содержащей 0,25 мкг/мл уридина. В отличие от методики работы [10] первичную фаговую бляшку для инфицирования культуры клеток при выращивании фага в объеме получали трансформацией компетентных клеток RZ1032 исходной фаговой ДНК. Возможность применения полученной матрицы для проведения мутагенеза в урацил-репарационной системе оценивали по частоте трансформации штамма TG1 урацилсодержащей ДНК. Введенное изменение в методику [10] дало возможность за один цикл выращивания получить фаги, содержащие достаточное количество урацилов для селекционного отбора мутантных форм.

Элюированный фрагмент гена  $\alpha$ -интерферона свиньи гибридизовали с 1 мкг ДНК-матрицы, включающей в себя ген  $\alpha 2$ -интерферона человека (M13tg130-hinf- $\alpha 2$ ), в 30 мкл смеси, содержащей 10 мМ трис-HCl (pH 8,0) и 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, постепенным понижением температуры от 70 до 30° С в течение 1,5 ч. К 30 мкл гибридизационной смеси добавляли 20 мкл раствора, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 8,0), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ дититротрит, 0,5 мМ АТР, 0,5 мМ dТТР, 0,5 мМ dСТР, 0,5 мМ dGTP, 0,5 мМ dАТР, 2 ед. акт. фрагмента Кленова и 2 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т4. Смесь инкубировали при 20° С 15 мин, затем при 12° С в течение ночи. Для осуществления биологической селекции мутантных форм ДНК аликвоту (10 мкл) реакционной смеси использовали при трансформации компетентных клеток штамма *E. coli* TG1. Скрининг мутантов осуществляли гибридизацией фаговых бляшек *in situ* [6] с помощью <sup>32</sup>P-меченого олигонуклеотида (TCCAAAGTCACGTCTGT). Первичную структуру выделенных форм ДНК определяли по методу Сэнгера [7] с использованием в качестве праймера синтетического олигонуклеотида TGAGTCSTTTGTGCTGA. Мутантный ген  $\alpha 2$ -интерферона человека был переклонирован по сайтам *Pst*I и *Hind*III на плазмидный вектор для экспрессии в штамме *E. coli* TG1. После разрушения биомассы клеток ультразвуком гибридный белок очищали методом аффинной хроматографии на иммуносорбенте.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meister A., Gilles U., Mogensen K. E., Gresser J., Tovey M. G., Grutter M., Meyer F. // J. Gen. Virol. 1986. V. 67. № 8. P. 1633—1643.
2. Shafferman A., Velan B., Cohen S., Leitner M., Grosfeld H. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 13. P. 6227—6237.
3. Szybalski W. // Gene. 1985. V. 40. № 2/3. P. 169—173.
4. Kunkel T. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 2. P. 488—492.
5. Milavetz B. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 8. P. 3322.
6. Мануатис Т., Фриш Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984.
7. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463—5467.
8. McBride L. J., Caruthers M. H. // Tetrahedron Lett. 1983. V. 24. № 3. P. 245—248.
9. Efimov V. A., Reverdatto S. V., Chakhmakcheva O. G. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 21. P. 6675—6693.
10. Kunkel T. A., Roberts J. D., Zakour R. A. // Meth. Enzymol. 1987. V. 154. P. 367—382.

Поступила в редакцию  
28.II.1990

После доработки  
31.VII.1990

I. I. SHECHTER, K. I. RATMANOVA, V. P. VEIKO, V. G. DEBABOV  
SITE-DIRECTED MUTAGENESIS WITH TARGETING RESTRICTED SINGLE  
STRANDED DNA

*Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow*

Site-directed multiple mutagenesis to obtain hybrides of homologous proteins was carried out by means of the oligonucleotide-targeting digestion of ss DNA. The procedure is more convenient, rapid and simple than the step-by-step approach. To demonstrate different approaches to targeting digestion of ss DNA, *NcoI*, *HinfI*, *FokI* endonucleases were used for DNA cleavage. A hybride of the human and porcine IFN- $\alpha$ 2-genes has been constructed.