



УДК 575.224.4

© 1991 г.

И. И. Шехтер, А. В. Мочульский, В. П. Вейко,
В. Г. Дебабов

ПРИМЕНЕНИЕ УРАЦИЛ-РЕПАРАЦИОННОЙ СЕЛЕКЦИИ ПРИ ДЕЛЕТИРОВАНИИ ПРОТЯЖЕННОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК

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

Проведен сайт-направленный делеционно-инсерционный мутагенез с применением урацил-репарационной селекции мутантных форм ДНК. Использование одного олигонуклеотида дало возможность удалить 116 нуклеотидов и одновременно включить 4 нуклеотида для реконструкции области регуляции репликации плазмиды pBR322. Показано, что применение урацил-репарационной системы повышает эффективность процесса по сравнению с обычным вариантом мутагенеза более чем в 30 раз.

В настоящее время широкое распространение приобретает делеционный вариант сайт-направленного мутагенеза при проведении генно-инженерных работ, предполагающих прецизионную стыковку генетического материала. Решение подобных задач затруднено в случае удаления достаточно протяженных последовательностей ДНК вследствие малой эффективности делеционного процесса.

Совершенствование делеционного мутагенеза осуществлялось элиминированием родительского генотипа *in vitro* с помощью S1 нуклеазы [1], экзонуклеаз (*Bal31*, *ExoIII*, *λExo*) [2]. Применение подобных ферментов сталкивается с рядом сложностей, обусловленных свойствами этих ферментов.

Одним из способов приложения направленной селекции *in vivo* явилось использование *EcoK*-рестрицирующей системы [3]. Эта система требует наличия специально сконструированных векторов с соответствующими *EcoK*-сайтами; присутствие последних в мишени ДНК ограничивает применение метода.

Более перспективным представляется применение урацил-репарационной системы, также осуществляющей направленную селекцию мутантных форм ДНК в бактериальной клетке и хорошо зарекомендовавшей себя при проведении точечного сайт-специфического мутагенеза [4]. Система обладает простотой и эффективностью, однако, по данным [5, 6], применение ее ограничивалось необходимостью использования высокоэффективной модифицированной T7-ДНК-полимеразы. По мнению авторов указанных работ, ДНК-полимераза I *E. coli* (фрагмент Кленова) не может быть использована как для удаления, так и для встраивания протяженных последовательностей ДНК.

В настоящей работе показана возможность использования фрагмента Кленова в сочетании с урацил-репарационной селекцией для введения 116-нуклеотидной делеции в область регуляции репликации плазмиды pBR322, клонированной в M13tg131 (см. «Экспериментальную часть» — получение рекомбинантного фага M13tg131-ColEI).

В результате проведенного олигонуклеотид-направленного мутагенеза (рис. 1) был делегирован участок, содержащий промотор пресраймерной РНК (РНК II) ColEI- репликона плазмиды, и одновременно включено 4 нуклеотида для формирования сайта узнавания рестриктазы *BglII*.

Для мутагенеза использовали синтетический олигонуклеотид длиной 34 звена (см. рис. 1). По данным предварительного анализа (расчет про-

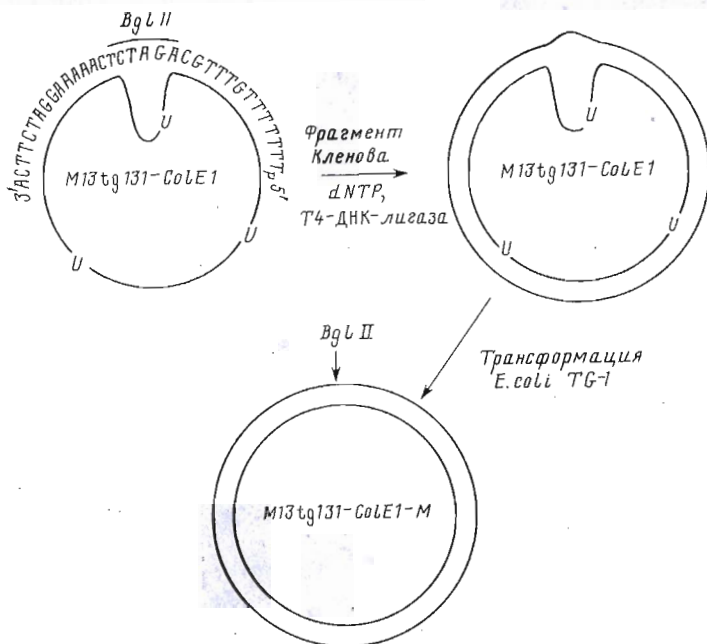


Рис. 1. Схема проведения олигонуклеотид-направленного делеционного мутагенеза M13tg131—ColE1

водили с помощью программы «DNA-sun», разработанной во ВНИИгенетике), «выщелчивание» однонитевой ДНК в комплексе матрица — праймер не формировало устойчивого стебля в основании шпильчатой структуры. Это определило структурные особенности олигонуклеотидного праймера (протяженность фланкирующих участков) и условия его отжига (постепенное понижение температуры от 70 до 30° С в течение 1,5 ч), а также использование эффективной системы проведения мутагенеза.

Мутагенез осуществляли в двух вариантах: с использованием урацил-репарационной селекции и без ее применения. В первом случае ДНК-матрица для мутагенеза содержала некоторое количество остатков урацила, что достигалось выращиванием фаговых частиц в культуре дефектного по ферментам репарации урацилов штамма *E. coli* RZ1032 (*dut*⁻, *ung*⁻) в присутствии уридина. Во втором случае фаги выращивались в штамме *E. coli* TG1 (*dut*⁺, *ung*⁺) с нормально функционирующей репарацией и не содержали нехарактерных для ДНК гетероциклических оснований.

Достройку цепи делеционного праймера проводили с помощью фрагмента Кленова в присутствии ДНК-лигазы фага Т4. Температура и время ферментативной стадии были выбраны исходя из накопленного нами опыта работы при осуществлении серии точечных сайт-специфических мутагенезов. Из представленных на рис. 2 данных о ферментативной стадии видно, что при использовании матриц обоих типов эффективность элонгации мутагенного праймера приблизительно одинакова.

Полученными гетеродуплексными молекулами, содержащими в «минус»-цепях мутационно измененную нуклеотидную последовательность, а в «плюс»-цепях в одном случае некоторое количество урацилов, а в другом — только характерные для ДНК основания, трансформировали штамм *E. coli* TG1 (*dut*⁺, *ung*⁺) для осуществления биологической селекции мутантов. Наличие урацилов в последовательности ДНК направляло действие репарирующего фермента (урацил-N-гликозилазы) на разрушение «плюс»-цепи ДНК, несущей аллель дикого типа, что приводило к преимущественному размножению мутантного фагового потомства. Это должно было резко увеличить выход мутантных форм в проводимом мутагенезе.

Эффективность мутагенеза оценивали по данным гибридизационного скрининга фаговых бляшек. Она составила 5% при использовании урацил-

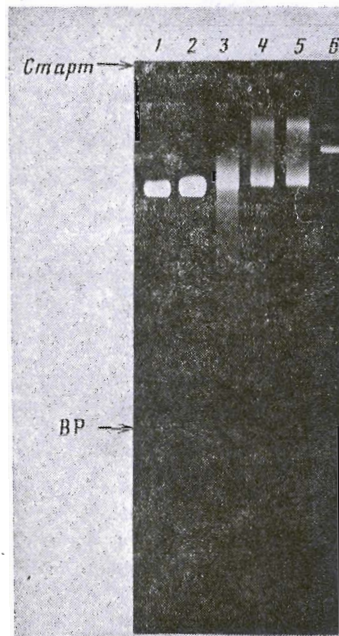


Рис. 2. Электрофорез в 1% агарозном геле однонитевой ДНК-матрицы, содержащей (1) и не содержащей (2) остатков урацила; ДНК после ферментативной достройки в отсутствие праймера (3) и в присутствии праймера на содержащей (4) и не содержащей остатков урацила (5) матрицах; репликативной формы ДНК фага M13tg131—ColE1 (6). Электрофорез проводили при напряжении 120 В в трис-боратном буфере [7]. ВР — бром-феноловый синий

содержащей матрицы и менее 0,15% при проведении мутагенеза по стандартной схеме [8]. Как было отмечено выше, стадия ферментативной достройки в обоих случаях прошла с одинаковой эффективностью, что дает основание полагать, что именно применение направленной селекции *in vivo* повышает эффективность процесса более чем в 30 раз.

Рестрикционный анализ репликативных форм мутантных фагов подтвердил появление дополнительного *VglII*-сайта. Доказательство полного соответствия с запланированной реконструкцией было получено секвенированием мутантных форм ДНК по Сэнгеру.

Полученные результаты позволяют заключить, что использование урацил-репарационной системы при проведении делеционного мутагенеза значительно повышает эффективность процесса. Следует отметить, что фрагмент Кленова, несмотря на его меньшую по сравнению с модифицированной ДНК-полимеразой T7 5'—3'-полимеразную активность, может быть с успехом использован в делеционном варианте сайт-направленного мутагенеза.

Экспериментальная часть

В работе применяли ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова), ДНК-лигазу и полинуклеотидкиназу фага T4 (Pharmacia, Швеция); эндонуклеазы рестрикции фирмы Amersham (Англия), НПО «Фермент» (Вильнюс).

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

Рекомбинантный фag M13tg131—ColE1 получали клонированием фрагмента *PstI — TaqI* плазмиды pBR322 (1100 н. п.) в составе репликативной формы фага M13tg131 согласно работе [7].

Приготовление компетентных клеток *E. coli*, трансформацию и выделение плазмидной ДНК проводили по [7].

Выращивание фагов осуществляли при 37° С в течение 16—20 ч на среде LB в культурах клеток штаммов *E. coli* RZ1032 и TG1 с добавлением уридина (0,25 мкг/мл) в первом случае. Выделение одноцепочечных ДНК проводили по [9].

Синтетические олигонуклеотиды для мутагенеза получали твердо-фазным фосфоамидитным методом [10] и очищали методом препаративного электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле. Целевые олигонуклеотиды выделяли из геля электроолюцией на DEAE-целлюлозу (DE-81). Гомогенность синтезированных препаратов подтверждали с помощью ВЭЖХ на обращенно-фазных колонках.

Урацилсодержащую ДНК-матрицу для мутагенеза получали выделением фаговой ДНК из частиц, выращенных в культуре штамма RZ1032. В отличие от работы [4] первичную фаговую бляшку для инфицирования культуры клеток при выращивании фага в объеме получали трансформацией компетентных клеток RZ1032 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 [4] дало возможность за один цикл выращивания получить фаги, содержащие достаточное количество урацилов для селекционного отбора мутантных форм.

Мутагенез осуществляли следующим образом: 50 пмоль олигонуклеотида фосфорилировали в 20 мкл раствора, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 8,0), 10 мМ MgCl₂, 1 мМ АТР, 5 мМ дитиотреит с помощью 2,4 ед. акт. полинуклеотидкиназы фага T4. Половину киназной смеси использовали для отжига с 1 мкг (0,5 пмоль) фаговой ДНК, выделенной из культуры RZ1032, оставшуюся часть гибридизовали с 1 мкг фаговой ДНК, выделенной из TG1. Условия отжига указаны выше. К 20 мкл гибридизационной смеси добавляли 30 мкл раствора, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 8,0), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, 0,5 мМ АТР, 0,5 мМ dTTP, 0,5 мМ dCTP, 0,5 мМ dGTP, 0,5 мМ dATP, 2 ед. акт. фрагмента Кленова и 2 ед. акт. ДНК-лигазы фага T4. Смесь инкубировали 15 мин при 20° С, затем 18 ч при 12° С. Для осуществления биологической селекции мутантных форм ДНК аликвоты реакционных смесей (в первом случае 25 мкл, во втором — 12 мкл) использовали при трансформации компетентных клеток штамма *E. coli* TG1.

Скрининг мутантов проводили гибридизацией фаговых бляшек *in situ* [7] с помощью 5'-³²P-меченого мутагенного олигонуклеотида. Нуклеотидную последовательность выделенных форм ДНК определяли по методу Сэнгера [9].

Авторы выражают глубокую благодарность д-ру Т. А. Кункелю (Nat. Inst. Environ. Health Sci., USA) за любезно предоставленный штамм *E. coli* RZ1032, а также В. Ф. Лебедеву (ВНИИгенетика, сектор математического моделирования) за помощь в проведении расчетов вторичной структуры ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eghtedarzadeh M. K., Henikoff S. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 12. P. 5115.
2. Bellini A. V., Ferrar F., Grandi G. // Gene. 1988. V. 69. P. 325—330.
3. Shen W., Wayne M. Y. // Gene. 1988. V. 70. P. 205—211.
4. Kunkel T. A., Roberts J. D., Zakour R. A. // Meth. Enzymol. 1987. V. 154. P. 367—382.
5. El-Gewely M. R., Su T. // Gene. 1988. V. 69. P. 81—89.
6. Venkitaraman A. R. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 8. P. 3314.
7. Маннати С., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984.
8. Zoller M. J., Smith M. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 20. P. 6487—6500.
9. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463—5467.
10. McBride L. J., Caruthers M. H. // Tetrahedron Lett. 1983. V. 24. № 3. P. 245—248.

Поступила в редакцию
28.II.1990

После доработки
15.X.1990

I. I. SHECHTER, A. V. MOCHULSKY, V. P. VEIKO, V. G. DEBABOV
APPLICATION OF THE URACIL REPAIR SYSTEM FOR EXTENSIVE
DELETION OF DNA

Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

A procedure for extensive deletion mutagenesis of DNA using the uracil repair system is exemplified by reconstruction of the pBR322 replication regulatory region cloned into M13tg131. By means of an oligonucleotide primer the 116-nucleotide fragment was excised and four nucleotides were introduced to form a *Bgl*III restriction site. Use of the uracil repair selection provided a 30-fold increase in the deletion mutagenesis efficiency.