



УДК 577.113.6 + 577.214.42 + 577.213.3

© 1991 г.

В. Л. Друца, В. Р. Кабердин, О. Н. Королева

ПРОСТОЙ ПУТЬ ВВЕДЕНИЯ СИГНАЛА ИНИЦИАЦИИ
ТРАНСКРИПЦИИ В ВЕКТОРНЫЕ ДНК

Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биорганической химии им. А. Н. Белоозерского и химический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Предложен и опробован новый эффективный метод введения любых запланированных изменений в плазмидные векторы вблизи уникального сайта рестрикции, базирующийся на использовании двух олигонуклеотидных праймеров — мутагенного и вспомогательного. Проведен направленный мутагенез промотортестирующей плазмиды рНД-001-14-11: с эффективностью до 95% осуществлено встраивание последовательности ТАТААТG (бокс Прибноу) перед лишенным промоторного участка *gal*-опероном. По его экссиссии, подтвержденной данными S1-картирования точки инициации транскрипции *in vivo*, в районе вставки обнаружено формирование активного промоторного сигнала.

Ранее нами было показано, что встраивание относительно коротких 10—14-звенных синтетических олигонуклеотидов*, содержащих последовательность ТАТААТG (бокс Прибноу), в промотортестирующий вектор приводит к появлению явно выраженной промоторной активности в области вставки [1, 2]. Эти эксперименты, а также последние данные по направленному мутагенезу области «—35» прокариотических промоторов [3, 4] позволяют рассматривать последовательность Прибноу в качестве ключевого элемента для формирования в ДНК сигнала инициации транскрипции.

В продолжение исследований функциональной роли бокса Прибноу мы предприняли попытку сформировать промоторный сигнал в ДНК с помощью «минимальной» синтетической вставки. Однако, используя традиционные генно-инженерные приемы, невозможно или весьма затруднительно осуществлять эффективное встраивание коротких, например 7-звенных, олигонуклеотидов в строго определенные места векторных ДНК. Получающиеся после лигазной сборки смеси рекомбинантных плазмид оказываются сильно обогащенными продуктами полимеризации короткой синтетической ДНК-вставки, и выходы целевых клонов, как правило, крайне низки. С учетом этого в настоящем исследовании разработан эффективный способ «точного» встраивания синтетических фрагментов в ДНК с помощью набора специальных приемов, составляющих в совокупности достаточно общий метод сайт-специфического введения мутаций в двутяжевые векторы.

В литературе описано несколько способов олигонуклеотид-направленного мутагенеза на плазмидных векторах [5—8]. Однако в отличие от весьма эффективных и потому получивших широкое распространение методов сайт-специфического введения мутаций в однотяжевые векторы эти способы либо малоэффективны, либо осуществимы только в специальных векторных системах.

Предлагаемая нами схема введения мутаций (замен, делеций или, как в настоящей работе, вставок) в окрестности любого уникального сайта рестрикции произвольной кольцевой двутяжевой ДНК приведена на рис. 1. Вначале исходная ДНК расщепляется эндонуклеазой рестрикции и обрабатывается ДНК-полимеразой фага Т4 в отсутствие дезоксинок-

* Префикс «d» и приставка «дезокси» в написании олиго- и полинуклеотидов дезоксирибозы здесь и далее для краткости опущены. ПЦР — полимеразная цепная реакция, ПААГ — полиакриламидный гель.

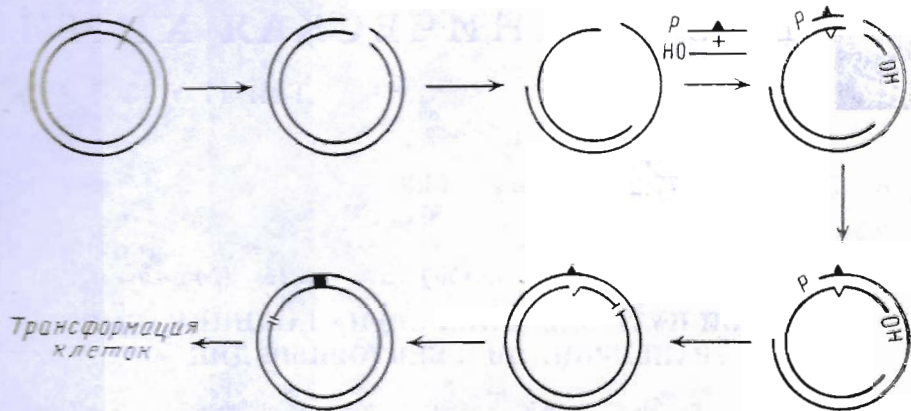


Рис. 1. Предлагаемая схема введения мутаций в двутижевой вектор (см. текст)

леозидтрифосфатов так, чтобы концевые участки линейризованного вектора на протяжении 100—200 нуклеотидов оказались в однотожевой форме. Далее следует гибридизация с синтетическими олигонуклеотидами: мутагеном, имеющим «запланированную» структуру, комплементарную (за исключением участка введения мутации) одному из однотожевых концов линейризованного вектора, и адаптером, полностью комплементарным другому его концу. Олигонуклеотид-мутаген должен иметь фосфатную группу на 5'-конце; олигонуклеотид-адаптер, напротив, не должен иметь концевого фосфата. Структуру 3'-концевых участков обоих олигонуклеотидов подбирают так, чтобы после гибридизации концы линейризованного вектора можно было бы снова соединить ДНК-лигазой с восстановлением исходного («базового») сайта рестрикции.

На следующем этапе полученный гибрид замыкают в кольцо ДНК-лигазой и достраивают его ДНК-полимеразой фага Т4 в присутствии dNTP, АТР и ДНК-лигазы, что ликвидирует разрыв в тяже 5'-фосфорилированного олигонуклеотида-мутагена. Основной продукт предшествующих манипуляций — кольцевой гетеродуплекс с разрывом в тяже олигонуклеотида-адаптера и нарушением двойной спирали в области мутагенеза. При этом целевая («мутантная») структура встроена в ковалентно замкнутый тяж ДНК, а исходная («дикого типа») структура — в тяж с искусственным разрывом, расположенным в направлении 3' → 5' («влево») на расстоянии всего нескольких десятков пар нуклеотидов. Воспользовавшись далее хорошо известной реакцией «ник-трансляции» [9], этот разрыв с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* можно легко сместить в направлении 5' → 3' («вправо») на расстояние нескольких сотен нуклеотидов, скопировав мутантный тяж как матрицу и фактически уничтожив структуру исходного вектора в области введения мутации. Полученную в результате всех перечисленных операций смесь ДНК (целевой мутантной и продуктов побочных превращений) можно прямо использовать в любой стандартной процедуре трансформации и клонирования.

В настоящей работе описанную выше схему мы успешно реализовали на плазмиде рHD-001-14-11, проведя одновременную делецию двух и вставку девяти нуклеотидных пар перед *gal*-опероном в области полилинкера. Структуры исходной и конечной мутантной ДНК, а также основного промежуточного гетеродуплекса в области проведения мутагенеза, базовый сайт эндонуклеазы рестрикции *HindIII* и использовавшиеся синтетические олигонуклеотиды (фосфорилированный 29-звенный олигонуклеотид-мутаген (а) и 17-звенный олигонуклеотид-адаптер (б)) показаны на рис. 2. Видно, что в конечной плазмиде помимо последовательности ТАТААТГ (бокс Прибноу) должен возникнуть сайт рестриктазы *BglIII* и исчезнуть сайты рестрикции *SalI* и *PstI*. Это позволяет достаточно точно и быстро оценивать выход целевых мутантов по рестриктному анализу плазмид большого числа клонов. Все ферментативные обработки

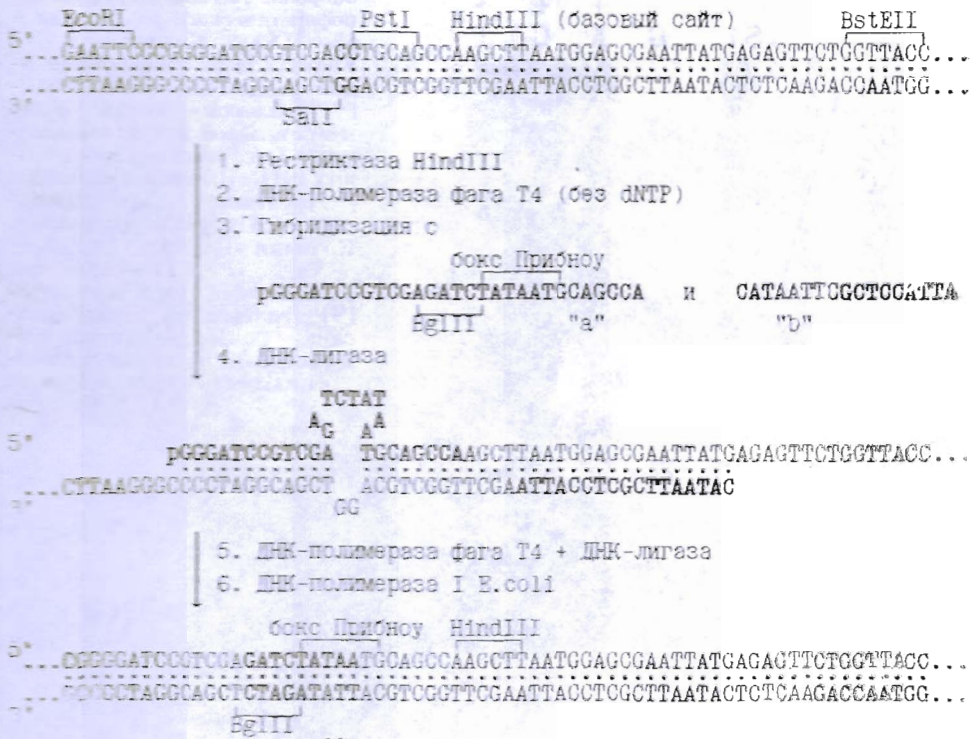


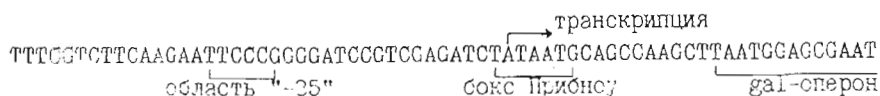
Рис. 2. Изменения в плазмиде рНD-001-14-11 при мутагенезе. Выделены жирным шрифтом делелируемый участок, синтетические олигонуклеотиды — мутаген (а) и адаптер (б) — и целевая вставка. Показаны сайты рестрикции, бокс Прибыноу и начало gal-оперона. Приведена последовательность операций (ферментативных обработок). Стрелками обозначена середина 142-звенного участка мутантной плазмиды, копирувавшегося с помощью ПЦР (см. текст)

и гибридизацию проводили в стандартных условиях. При необходимости остановки реакции и/или смены буфера (рис. 2, стадии 1, 2 и 5) реакционные смеси экстрагировали хлороформом, ДНК осаждали этанолом и переводили в новый буфер.

Клонирование рекомбинантных ДНК проводили с использованием стандартного кальциевого метода трансформации *E. coli* [9]. Клетки штамма F165' (gal⁻), акцептировавшие плазмиды, отбирали на агаре МакКонки с галактозой (1%) и ампициллином (50 мкг/мл), сразу выявляя колонии ярко-малинового цвета, который должен был бы появиться у клонов с нашей целевой мутацией (вставкой в плазмиде) [1]. Доли ярко-малиновых колоний в разных экспериментальных сериях (всего проанализировано таким способом более 10⁴ колоний) составляли 85—95%.

Рестриктный анализ плазмидных ДНК-клонов в нескольких сериях экспериментов (всего проанализировано 120 клонов) показал наличие в более чем 98% из них базового сайта рестрикции *HindIII*, а в 85—95% — введенного сайта *BglII* при отсутствии уничтожившихся сайтов *SaII* и *PstI*. Остальные анализировавшиеся плазмиды — побочные продукты мутагенеза неспределенной структуры. Области, подвергавшиеся мутагенезу в плазмидных ДНК нескольких клонов (предположительно целевых мутантов), дополнительно анализировали путем секвенирования методом Максама — Гилберта [10] (расщепление рестриктазой *BstEII*, дефосфорилирование, ³²P-мечение полинуклеотидкиназой, расщепление рестриктазой *EcoRI*, выделение малого *BstEII/EcoRI*-фрагмента в денатурирующем 8% ПААГ, секвенирование). Все они оказались идентичными и полностью соответствовали структуре целевого мутанта (см. рис. 2).

Учитывая то, что данные рестриктоного анализа строго коррелировали



синтез мРНК начинается со второй позиции бокса Прибноу. Такое расположение не характерно для природных промоторов [13], однако в случае искусственных наблюдалось неоднократно [14, 15], что объясняют влиянием на позицию точки инициации транскрипции помимо бокса Прибноу участков, фланкирующих эту последовательность, и, в частности, области «-35» [16, 17].

Таким образом, из полученных нами данных следует, что появление промоторного сигнала в районе вставки обусловлено образованием последовательности ТАТААТГ, так как в ближайших ее окрестностях нет каких-либо иных структур, характерных для прокариотических промоторов. Подобный эффект — функционирование промотора при отсутствии близкой к канонической структуры в области —35-го нуклеотида, — уже наблюдали [18—20]. На данном этапе исследований транскрипции в *E. coli* можно, по-видимому, считать бокс Прибноу последовательностью, наличия которой в ДНК вполне достаточно для формирования промоторного сигнала, а участки, фланкирующие ее, — лишь вспомогательными элементами, влияющими на регуляцию промотора и расположение точки инициации транскрипции. Если это так, то вводимая нашим или любым другим способом последовательность ТАТААТГ будет всегда, независимо от окружения, обеспечивать формирование в рекомбинантной ДНК промоторного сигнала, и ее можно использовать как мини-промотор в молекулярно-биологических и генно-инженерных исследованиях.

В заключение отметим также, что предлагаемая в настоящей работе техника введения искусственного промоторного сигнала имеет достаточно универсальный характер и может быть с успехом применена для проведения направленного мутагенеза любого типа (замены нуклеотидных пар, делеции, вставки) в окрестностях любого уникального сайта рестрикции плазмидных ДНК.

Экспериментальная часть

В работе использованы ферменты: эндонуклеазы рестрикции (КФ 3.1.23.x) *HindIII*, *Sall*, *PstI*, *BglII*, *EcoRI* (20—50 ед. акт./мкл), полинуклеотидкиназа фага Т4 (КФ 2.7.1.78; 2,4 ед. акт./мкл), ДНК-лигаза фага Т4 (КФ 6.5.1.1; 20 ед. акт./мкл), ДНК-полимераза фага Т4 (КФ 2.7.7.7; 15 ед. акт./мкл), ДНК-полимераза *Thermus aquaticus*, Taq (7 ед. акт./мкл), ДНК-полимераза I *E. coli* (10 ед. акт./мкл) — производства НПО «Ферментас», Вильнюс; эндонуклеаза рестрикции *BstEII* (10 ед. акт./мкл, BRL, Англия); нуклеаза S1 (КФ 3.1.30.1; 300 ед. акт./мкл, Boehringer, ФРГ); лизоцим (КФ 3.2.1.17, Serva, ФРГ). Используются также дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, АТФ и пиперазин-N,N'-бис-(2-этансульфоновая) кислота (PIPES; Sigma, США); акриламид, N,N'-метиленабисакриламид (BDH, Англия); трис, EDTA, дитиотреит, MgCl₂ (Merck, ФРГ); ампициллин, галактоза (Fluka, Швейцария); агароза (Mariner colloids, США); агар МакКонки, бакто-триптон, дрожжевой экстракт (Difco, США); [γ -³²P]АТФ с удельной радиоактивностью 1000 Ки/ммоль (Изотоп).

Олигонуклеотиды получены твердофазным амидофосфитным методом с последующей очисткой ВЭЖХ на колонке (0,46 × 25 см) с обращенно-фазовым носителем С18 в градиенте ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония, рН 7,5. Их первичную структуру подтверждали методом Максама — Гилберта [10].

Штамм клеток *E. coli* F165' (*gal*⁻) и плазмида рHD-001-14-11, содержащая ген устойчивости к ампициллину и *gal*-оперон *E. coli*, промоторная область которого заменена на полилинкер фага М13mp8, любезно предоставлены профессором Г. Фрицем (Геттингенский университет, ФРГ).

Для культивирования клеток использовали среду *dyt*: 16 г бакто-триптона, 10 г дрожжевого экстракта и 5 г NaCl на 1 л воды.

Выделение кольцевой ковалентно замкнутой плазмидной ДНК в preparативных количествах (без мультипликации плазмиды, с очисткой ультрацентрифугированием в градиенте плотности CsCl) вели по прописи [9]. Одноцепочечную (оц) ДНК фага M13mp9 получали как описано в работе [21]. Клеточную РНК выделяли по прописи работы [20]. Секвенирование фрагментов плазмидных ДНК и ПЦР-дуплекса выполняли методом Максама — Гилберта [10].

Расщепление исходной плазмиды [9]. 40 мкг плазмиды pHN-001-14-11 обрабатывали в 360 мкл буфера средней ионной силы (10 mM трис-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM дитиотрент) 200 ед. акт. рестриктазы *Hind*III (37° C, 2 ч), экстрагировали равным объемом смеси фенол — хлороформ (1 : 1) и осаждали ДНК двумя объемами этанола. Осадок растворяли в TE-буфере (10 mM трис-HCl, pH 8,0, 0,25 mM EDTA). Аликвоту, содержащую 18 мкг ДНК, переносили в пластиковую пробирку, добавляли 36 мкл 10-кратного ДНК-лигазного буфера (см. ниже) и доводили объем до 360 мкл. К раствору добавляли T4-ДНК-полимеразу (5 мкл, 75 ед. акт.), инкубировали 5 мин при 37° C, экстрагировали смесь равными объемами фенола, затем смесями фенола с хлороформом (1 : 1) и хлороформа с изоамиловым спиртом (24 : 1), осаждали ДНК двумя объемами этанола и осадок растворяли в TE-буфере. Аликвоту полученного раствора (0,5 мкг ДНК) в 10 мкл S1-буфера (0,05 M ацетат натрия, pH 4,6, 0,28 M NaCl, 4,5 mM ZnSO₄) обрабатывали S1-нуклеазой (6 ед. акт., 37° C, 30 мин) и наносили в ячейку 1% агарозного геля. Величину оставшегося двутяжевого фрагмента ДНК определяли электрофорезом в присутствии свидетеля-маркера (*Bst*EII-гидролизат ДНК фага λ). Анализ показал, что после обработки T4-ДНК-полимеразой в одנותяжевой форме высвободились 5'-концевые участки линейаризованной плазмиды длиной приблизительно 300—500 нуклеотидов.

Конструирование мутантной плазмиды. 2 мкг плазмидной ДНК, обработанной T4-ДНК-полимеразой, смешивали в 50 мкл ДНК-лигазного буфера (50 mM трис-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0,1 mM EDTA) с $2,8 \cdot 10^{-3}$ OE₂₆₀ 29-звенного олигонуклеотида (10-кратный мольный избыток) и $1,6 \cdot 10^{-3}$ OE₂₆₀ 17-звенного олигонуклеотида (10-кратный мольный избыток), нагревали до 60° C, выдерживали при этой температуре 3 мин и медленно (3 ч) охлаждали до 20° C. Добавляли АТФ до концентрации 1 mM, ДНК-лигазу (20 ед. акт.), выдерживали смесь 2 ч при 20° C, добавляли смесь четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов до концентрации каждого 0,25 mM, добавляли T4-ДНК-полимеразу (15 ед. акт.), выдерживали смесь 3 ч при 20° C, снова добавляли ДНК-лигазу (20 ед. акт.), выдерживали еще 2 ч при 20° C, экстрагировали смесью фенол — хлороформ (1 : 1) и осаждали ДНК двумя объемами этанола. Осадок растворяли в 50 мкл ДНК-лигазного буфера, содержащего смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (0,25 mM каждый), добавляли ДНК-полимеразу I (10 ед. акт.) и инкубировали 1 ч при 16° C. Полученную смесь, содержащую целевую мутантную плазмиду, использовали прямо для трансформации компетентных клеток *E. coli* F165'.

Приготовление компетентных клеток и трансформацию проводили 2 ч при 0° C в 0,05 M CaCl₂ по прописи [9]. После прогрева (3 мин, 43° C) и подрачивания (среда *dyt*, 1 ч, 37° C) трансформированные клетки высевали на чашках Петри с твердым агаром МакКонки (50 мкг на 1 мл ампициллина, 1% галактозы) и инкубировали их при 37° C. За ночь формировались колонии ярко-малинового цвета и неокрашенные. Плазмидную ДНК из выбранных колоний выделяли щелочным экспресс-методом [9], расщепляли рестриктазами *Sal*I, *Pst*I, *Bgl*II или *Hind*III и анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле.

Синтез 142-звенного [³²P]дуплекса-копии, содержащего целевую мутацию, осуществляли как описано в работе [11]. ПЦР (30 циклов: 94° C, 1 мин; 50° C, 2 мин; 72° C, 1 мин) проводили в 50 мкл буферного раствора, содержащего 10 mM трис-HCl, pH 8,3, 1,65 mM MgCl₂, 50 mM KCl,

0,15 мМ EDTA, 0,01% желатин, нефосфорилированный праймер (2,7 мкМ, 0,03 ОЕ₂₆₀), [³²P]праймер (1,1 мкМ, 0,01 ОЕ₂₆₀, 200 000 имп/мин), четыре дезоксинуклеозидтрифосфата (0,2 мМ каждый) и ДНК-полимеразу Taq (7 ед. акт.), в термоциклере фирмы Perkin — Elmer — Cetus (США). Водный слой покрывали сверху минеральным маслом (50 мкл). По окончании ПЦР реакционную смесь переносили из-под масла в пластиковую пробирку, экстрагировали равным объемом смеси хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1), осаждали олигонуклеотиды тремя объемами холодного этанола и выделяли ПЦР-³²P]дуплекс электрофорезом в 8% ПААГ с последующей элюцией и осаждением тремя объемами холодного этанола.

Картирование точки инициации транскрипции с помощью S1-нуклеазы осуществляли по способу [9] с модификациями. Смешивали водные растворы ПЦР-³²P]дуплекса (5,2 мкмоль, 20 000 имп/мин), тРНК-носителя (50 мкг) и РНК, выделенной из 2 мл культуры *E. coli* F165', содержащих целевую мутантную плазмиду, в поздней логарифмической фазе роста ($A_{600} = 0,8$), добавляли 0,1 объема водного калий-ацетатного буфера (3 М, рН 5,5) и осаждали полинуклеотиды тремя объемами холодного этанола. Осадок растворяли в 30 мкл гибридизационного буфера (40 мМ пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфонат), рН 6,4, 0,4 М NaCl, 1 мМ EDTA в 80% деионизованном формамиде) и инкубировали сначала 10 мин при 72° С, а затем 3 ч при 42° С. К охлажденной до 20° С гибридизационной смеси добавляли 300 мкл свежеприготовленного S1-буфера (0,05 М ацетат натрия, рН 4,6, 0,28 М NaCl, 4,5 мМ ZnSO₄), содержащего оцДНК фага M13mp9 (20 мкг/мл) и S1-нуклеазу (30 ед. акт.), и инкубировали 30 мин при 20° С. Реакцию останавливали добавлением EDTA (до 0,1 М), фермент экстрагировали равным объемом смеси фенол — хлороформ (1 : 1), продукты гидролиза осаждали тремя объемами холодного этанола и анализировали электрофорезом в 8% ПААГ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Королева О. Н., Друза В. Л., Шабарова З. А. // Биополимеры и клетка. 1986. Т. 1. № 6. С. 307—311.
2. Королева О. Н., Друза В. Л., Шабарова З. А. // Биополимеры и клетка. 1988. Т. 4. № 1. С. 7—14.
3. Oliphant A. R., Struhl K. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 15. P. 7673—7683.
4. Horwitz M. S. Z., Loeb L. A. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 29. P. 14724—14731.
5. Schold M., Colombero A., Reyes A. A., Wallace R. B. // DNA. 1984. V. 3. № 6. P. 469—477.
6. Efimov V. A., Mirskikh O. V., Chakhmakhcheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. // FEBS Letters. 1985. V. 181. № 2. P. 407—411.
7. Palermo D. P., Hess G. F. // DNA. 1987. V. 6. № 3. P. 273—279.
8. Bellini A. V., de Ferra F., Grandi G. // Gene. 1988. V. 69. № 2. P. 325—330.
9. Мануатис Т., Фрич Э., Сэлбрук Дж. // Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
10. Maxam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.
11. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. // Science. 1988. V. 239. № 4839. P. 487—491.
12. Sollner-Webb B., Reeder R. H. // Cell. 1979. V. 18. № 2. P. 485—499.
13. Rosenberg M., Court D. // Ann. Rev. Genet. 1979. V. 13. P. 319—353.
14. Jacquet M.-A., Reiss C. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 5. P. 1137—1143.
15. Jacquet M.-A., Ehrlich R., Reiss C. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 8. P. 2933—2945.
16. Carpousis A. J., Stefano J. E., Gralla J. D. // J. Mol. Biol. 1982. V. 157. № 4. P. 619—633.
17. Mulligan M. E., Brosius J., McClure W. R. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 6. P. 3529—3538.
18. Backendorf C., Brandsma J. A., Kartasova T., van de Putte P. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 17. P. 5795—5810.
19. Johnston F., Ponnambalam S., Busby S. // J. Mol. Biol. 1987. V. 195. № 3. P. 745—748.
20. Jacquet M.-A., Ehrlich R. // Biochimie. 1985. V. 67. № 9. P. 987—997.
21. Краев А. С. // Молекуляр. биология. 1988. Т. 22. № 5. С. 1164—1198.

Поступила в редакцию
20.XII.1990

**A SIMPLE WAY OF INSERTION OF THE TRANSCRIPTION INITIATION
SIGNAL IN DNA VEHICLES**

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic
Chemistry and Chemical Department of Moscow State University, Moscow 119899*

A new effective method of site-specific mutagenesis in the close vicinity of unique restriction sites of plasmids, based on the use of two oligonucleotide primers, mutagenic and auxiliary, has been suggested. A site-specific insertion of Pribnow box (TATAATG) before promoterless *gal* operon of the promoter-testing plasmid pHD-001-14-11 has been performed with the yield of mutants up to 95%. Data on the *gal* operon expression and S1-nuclease mapping of the transcription start point indicate the formation of an active promoter in the region of the insertion.