



УДК 577.213.7;575.224.46.044;577.113.6

© 1992 г. В. А. Бейлинсон, С. В. Ревердатто, В. А. Ефимов

НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ГЕНОВ НЕКОТОРЫХ
РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина, РАН, Москва

Проведен мутагенез двух предварительно клонированных растительных генов — запасного белка кукурузы — зеина *cZ22B1* и белка D1 из фотосистемы II ячменя (*psbA*). В гене зеина с целью повышения питательной ценности белка произведена замена участка, соответствующего шестому α -спиральному тяжу на синтетический фрагмент, содержащий три дополнительных лизиновых кодона. На основе гена *psbA* с помощью олигонуклеотиднаправленного мутагенеза получено пять вариантов замены кодона Ser²⁶⁴: на Gly, Ala, Cys, Asp и Thr. Полученные конструкции предполагается использовать для структурно-функциональных исследований.

В продолжение начатых ранее в нашей лаборатории структурно-функциональных исследований ряда растительных белков — запасного белка кукурузы зеина *cZ22B1* [1] и белков фотосистемы II ячменя [2–8] предпринят направленный мутагенез генов, кодирующих данные белки, с целью создания новых белковых форм, отличных по свойствам от дикого прототипа: обладающих повышенными питательными качествами в случае зеина и пониженным средством к гербицидам в случае белка D1.

Ген запасного белка кукурузы был получен нами ранее химико-ферментативным синтезом и клонирован в векторе pPLE2 в двух вариантах, один из которых кодировал биосинтетический предшественник (плазмида pPLEZA), а второй — зрелый зеин (плазмида pPLEZB) [1]. В ходе дальнейшей работы эти полинуклеотиды были перенесены в вектор pBSM (Stratagene, USA) с получением конструкций pBZIV и pBVZ соответственно. Использование векторов серии pBS позволяет получать плазмиду как в двунитчатой, так и в однострочной форме, что удобно для секвенирования или мутагенеза. Для повышения питательной ценности в зеин вводились остатки Lys. С этой целью проводилась замена участка ДНК, кодирующего 6-й тяж белка, на фрагмент, содержащий триплет Lys (Leu¹⁶⁴ → Lys, Ala¹⁶⁵ → Lys, Gln¹⁷⁴ → Lys). Одновременно с целью стабилизации вторичной структуры [9] был внесен еще ряд аминокислотных замен (Ser¹⁶⁰ → Glu, Ala¹⁶⁵ → Glu, Pro¹⁷⁰ → Glu, Tyr¹⁷² → Trp).

Плазмиды pBZIV и pBVZ расщепляли по сайтам эндонуклеаз рестрикции *HpaI* и *SacI* и полученные фрагменты выделяли агарозным гель-электрофорезом. Фрагмент ДНК, кодирующий пептид с вышеуказанными заменами, получали сшивкой шести предварительно фосфорилированных в присутствии [γ -³²P]АТФ и полинуклеотидкиназы фага T4 олигонуклеотидов (кроме 5'-концевых) с помощью ДНК-лигазы фага T4 с образованием дуплекса, показанного на рис. 1. Дуплекс очищали электрофорезом в неденатурирующем ПААГ и вводили в плазмиды pBZIV и pBVZ по сайтам *HpaI*–*SacI*. После трансформации в клетки *E. coli* MV1193 выросшие колонии отбирали с помощью гибридизации с ³²P-меченым олигонуклеотидом d(CAAGTGGCTTGAAGTCTAGCCCGAAGGAAGTG). Структуру синтетической вставки подтверждали секвенированием по ме-

EcoRI	ClaI	HindIII	HpaI	SacI	NarI	Sall

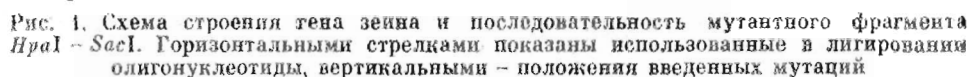


Рис. 2. Схема олигонуклеотиднаправленного мутагенеза гена *psbA* дикого типа. Названия мутирующих олигонуклеотидов соответствуют аминокислотным заменам, вносимым в белок дикого типа (приведены вводимые мутагенозом кодоны). Звенья, идентичные (—) цепи, обозначены черным ромбом; указаны только звенья муту- рующих олигонуклеотидов, комплементарные (+) цепи. Отмечены вводимые сайты рестриктаз *SphI* и *NaeI*.

тоту Сэнгера [10]. Таким образом были получены две новые плазмиды, несущие мутантные гены зеина: pBZIV.6 и pBZV.6.

Ранее было показано, что замена всего лишь одной аминокислоты в белке D1 фотосистемы II приводит к резкому изменению конфигурации места связывания вторичного акцептора электронов хинона Q_b (quinone binding pocket) [11–13]. Это же место является мишенью для ряда гербицидов (атразин, диурон). С целью изучения функциональной топографии реакционного центра белка D1 была проведена замена кодона остатка Ser²⁶⁴ на кодоны, соответствующие аминокислотам Gly, Ala, Cys, Asn, Thr.

Для проведения мутагенеза была взята ранее полученная нами конструкция, представляющая собой клонированный в плазмиде pBSP по

EcoRI-сайту фрагмент хлоропластной ДНК ячменя (2,2 т.п.о.), содержащий ген *psbA* [2]. После удаления предшествующего гену *EcoRI/BglII*-фрагмента длиной около 1 т.п.о. полученная плазмида pABE была выделена в однонитчатой форме («+»-цепь) и использована для дальнейшей работы. Мутагенез осуществлялся с помощью набора «Oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis system», фирмы Amersham (Англия) в соответствии с прилагавшимся протоколом. Использовались пять синтетических 22-звенных олигонуклеотидов, частично комплементарных кодирующей цепи гена в районе кодона Ser²⁶⁴ и несущих по три нуклеотидные замены каждый (рис. 2). Наличие мутаций подтверждали рестриктивным анализом и секвенированием по методу Сэнгера [10]. Внесение одновременно трех точечных замен, одна из которых незначительная, существенно облегчало последующий отбор мутантных форм гена путем скрининга колоний мутирующим олигонуклеотидом, поскольку разница в температуре гибридизации относительно гена дикого типа составляла 10–15° С. Дополнительными удобства представляло возникновение сайта эндонуклеазы рестрикции *SphI* в случае замены Ser²⁶⁴→Cys и сайта *NaeI* при замене Ser²⁶⁴→Gly.

В настоящее время проводятся эксперименты по экспрессии генов *psbA* и зеинов в системах *in vivo* и *in vitro*.

Экспериментальная часть

В работе использованы экзонуклеазы рестрикции фирм PL Biochemicals (США), Boehringer (ФРГ) и НПО «Ферментас» (Литва); Т4-ДНК-лигаза, Т4-полинуклеотидкиназа, ДНК-полимераза I *E. coli* (фрагмент Кленова) и экзонуклеаза III фирмы PL Biochemicals (США); дезокси- и дидезоксинуклеотидтрифосфаты, нуклеаза S1 фирмы Boehringer (ФРГ), а также нитроцеллюлозные мембраны (Schleicher und Schüll, ФРГ). Выделение плазмидной ДНК, рестрикционный анализ и гибридизацию на нитроцеллюлозных фильтрах проводили согласно руководству [14]. Лигирование вели 12 ч при 7° С в буфере, содержащем 66 мМ трис-НСl (рН 8,0), 6,6 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреит, 100 мкг/мл BSA, 0,2 мМ АТФ и 25 ед. акт./мл Т4-ДНК-лигазы. Аликвотами лигазных смесей трансформировали клетки *E. coli* (штамм MV1193).

Одноцепочечную матрицу получали по методике, описанной нами ранее [15]. Нуклеотидную последовательность определяли по методу Сэнгера [10] с модификациями [16]. Синтетические олигонуклеотиды – праймеры и зонды были получены на автоматическом синтезаторе «390 В» фирмы Applied Biosystems (США) с использованием скоростного фосфоритриэфирного метода на основе кислород-нуклеофильного катализа [17].

Авторы приносят благодарность О. Г. Чахмахчевой за ценные замечания и обсуждение полученных результатов и Н. Н. Полушину за синтез олигонуклеотидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ефимов В. А., Бурякова А. А., Пашкова И. Н., Чахмахчева О. Г. // Биоорганическая химия. Т. 14. № 11. С. 1538–1544.
2. Ефимов В. А., Андреева А. В., Дмитрикова Е. В., Пашкова И. Н., Резердатто С. В., Юнг Р., Чахмахчева О. Г. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 1117–1124.
3. Ефимов В. А., Андреева А. В., Резердатто С. В., Чахмахчева О. Г. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1573–1576.
4. Ефимов В. А., Андреева А. В., Резердатто С. В., Чахмахчева О. Г. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 10. С. 1369–1385.
5. Efimov V. A., Andreeva A. V., Reverdatto S. V., Jung R., Chakhmakcheva O. G. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 12. P. 5685.
6. Efimov V. A., Andreeva A. V., Reverdatto S. V., Chakhmakcheva O. G. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 12. P. 5686.

7. Reverdatto S. V., Andreeva A. V., Buryakova A. A., Chakhmakheva O. G., Efimov V. A. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 7. P. 2859.
8. Reverdatto S. V., Andreeva A. V., Buryakova A. A., Chakhmakheva O. G., Efimov V. A. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 10. P. 3996.
9. Marqusee S., Baldwin R. L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 8898-8902.
10. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463-5467.
11. Boyer S. K., Mullet J. E. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 16. P. 8184.
12. Hirschberg J., McIntosh L. // Science. 1983. V. 22. P. 1346-1349.
13. Rochai J. D., Erickson J. // TIBS. 1988. V. 13. P. 56-59.
14. Маниатис Т., Фритч Э., Самбрук Д. Ж. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
15. Ефимов В. А., Андреева А. В., Дмитрикова Е. В., Пашкова И. Н., Реввердатто С. В., Юнг Р., Чухмакхева О. Г. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 1117-1121.
16. Strauss E. S., Kober J. A., Siu G., Hood L. E. // Anal. Biochem. 1986. V. 154. № 1. P. 353-360.
17. Efimov V. A., Buryakova A. A., Dubey I. Y., Polushin N. N., Chakhmakheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 16. P. 6525-6540.

Поступила в редакцию
12.II.1992

V. A. BEILINSON, S. V. REVERDATTO, V. A. EFIMOV

DIRECTED MUTAGENESIS OF GENES OF SOME PLANT PROTEINS

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy
of Sciences, Moscow*

Mutagenesis of two previously cloned plant genes, maize storage protein cZ22B1 gene and barley Photosystem II protein D1 gene (*psbA*), was carried out. To improve the nutritional quality of zein, the DNA region corresponding to the protein sixth α -helix rod was substituted by a synthetic segment bearing three sodon changes for Lys. Additional stabilization of this helix was achieved by three more codon changes for Glu. By means of oligonucleotide directed mutagenesis five different copies of *psbA* gene were obtained, bearing single codon change of Ser²⁶⁴ (wild type) for Gly, Ala, Cys, Asn, and Thr, respectively. These constructs can be used for studying functional topography of protein D1 and core region.