



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 8 * № 8 * 1982

УДК 547.963.32.04

ПРИМЕНЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПЛАЗМИДНЫЕ ДНК

Ефимов В. А., Чахмажчева О. Г.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Описана процедура скрининга бактериальных колоний *in situ* путем их гибридизации на нитроцеллюлозных фильтрах с синтетическими олиго- и полинуклеотидами различной длины. Исследована зависимость эффективности метода от длины и состава олигонуклеотида-зонда. Показано, что молекулярные зонды с длиной цепи 14 и более нуклеотидных звеньев обеспечивают надежную идентификацию колоний *E. coli* независимо от состава олигонуклеотида. Эффективность и избирательность метода повышается при переходе от 11–13-звенных к 16-звенным и более длинным зондам.

В настоящее время при работе с эукариотическими ДНК, в частности при выделении и идентификации генов, широко применяются методы получения рекомбинантных плазмид на основе бактериальных векторов. Сложность строения эукариотических геномов обычно вызывает необходимость скрининга большого числа бактериальных клонов для локализации специфической искомой последовательности ДНК. Для этих целей был предложен метод селекции рекомбинантных плазмид с помощью гибридизации с гомологичными фрагментами нукleinовых кислот, играющими роль «молекулярных зондов». В качестве таких зондов до последнего времени использовались высокомеченные препараты мРНК или достаточно большие фрагменты ДНК, выделенные из природных источников [1, 2]. Однако чаще всего природные фрагменты нукleinовых кислот труднодоступны или недоступны в индивидуальном виде и достаточных количествах. В таких случаях незаменимыми молекулярными зондами могут служить синтетические олиго- и полинуклеотиды, структура которых соответствует последовательности одного из участков искомого фрагмента ДНК [3–6]. В некоторых работах в качестве гибридизационных зондов для скрининга колоний использовались достаточно длинные (30–60-звенные) синтетические фрагменты ДНК [4, 5], в других – 11-, 13- или 14-звенные олиго-нуклеотиды [3, 7]. Однако систематические данные, касающиеся зависимости специфичности и эффективности скрининга колоний от длины молекулярного зонда, его нуклеотидного состава, размеров анализируемой ДНК и температурного режима гибридизации, отсутствовали. В связи с этим мы предприняли подобные исследования на модельных системах. Настоящая работа является частью этих исследований и посвящена определению оптимальных размеров молекулярных зондов, обеспечивающих надежную селекцию искомых колоний *in situ*.

Принцип метода гибридизации основан на способности полинуклеотидов узнавать комплементарные последовательности на ДНК и образовывать с ними двухцепочечные комплексы. Описаны две модификации этого метода. Одна из них включает предварительное выделение плазмидных ДНК из большого числа клонов и их последующую гибридизацию с меченым олиго- или полинуклеотидом [3]. Однако ввиду трудоемкости, поскольку, как правило, в подобного рода экспериментах необходимо выделить и проанализировать ДНК из сотен или тысяч клонов, этот подход получил ограниченное применение.

Более перспективна вторая разновидность метода, заключающаяся в гибридизации рекомбинантных плазмид с зондом *in situ* на поверхности

нитроцеллюлозных фильтров, на которых отпечатаны непосредственно бактериальные клоны, несущие рекомбинантные ДНК [2]. Таким образом можно проводить одновременный скрининг до нескольких десятков тысяч колоний и быстро идентифицировать те из них, которые содержат фрагменты ДНК, гомологичные последовательности молекулярного зонда. Отличие прямого скрининга колоний от селекции на уровне плазмидных ДНК заключается в том, что клетки наряду с плазмидной содержат и хромосомную ДНК. Ввиду больших размеров последней значительно возрастает вероятность неспецифической гибридизации, поскольку хромосомная ДНК может содержать участки, комплементарные или частично комплементарные последовательности молекулярного зонда. Отсюда возникает необходимость в более тщательном подборе длины зонда и условий гибридизации, чем в случае первого подхода.

Специфичность взаимодействия олигонуклеотида-зонда с ДНК зависит от нескольких факторов. Одним из главных факторов является длина зонда, которая определяет вероятность встречи комплементарной ему последовательности в исследуемой ДНК. В общем случае, чем большие размеры анализируемой ДНК, тем более длинный олигонуклеотид необходим для обеспечения специфичности гибридизации. Недостаточная длина зонда может привести к потере специфичности и обусловленной этим гибридизации с несколькими участками ДНК. В принципе средняя частота встречи олигонуклеотида какой-либо длины в некоторой ДНК со среднестатистическим распределением оснований с достаточной степенью точности может быть определена как отношение максимального числа олигонуклеотидов длиной n , содержащегося в ДНК длиной N , равного $(N-n+1)$, к теоретически возможному количеству олигонуклеотидов различной структуры длиной n , равному (4^n) , и выражена формулой

$$\mu = \frac{N-n+1}{4^n},$$

где μ — среднее число событий, N — длина анализируемой ДНК *, n — длина олигонуклеотида. На основании этой формулы можно ориентировочно определить длину зонда, достаточную для однозначной идентификации искомого гена. Очевидно, что подходящими зондами могут быть олигонуклеотиды, частота встречи которых ≤ 1 . Так, в молекуле ДНК *E. coli*, в которой содержание каждого из четырех оснований близко к 25 %, по-видимому, должны быть уникальными последовательности с длиной цепи ≥ 12 нуклеотидных звеньев ($N=8 \cdot 10^6$, $\mu \leq 0,48$) **.

При выборе зонда необходимо также учитывать возможность обеспечения такого температурного режима гибридизации, при котором олигонуклеотид связывался бы только с комплементарным ему участком ДНК, имеющим ту же длину, что и сам зонд, и не вступал во взаимодействие с другими районами ДНК, комплементарными отдельным его частям. Это достигается увеличением температуры гибридизации. С другой стороны, для каждого зонда существует верхний предел допустимой температуры гибридизации, зависящий от его длины и состава, выше которого уже не происходит комплексообразования между зондом и исследуемой ДНК. В общем случае температура гибридизации должна быть ниже температуры плавления дуплекса используемого зонда с ДНК, но выше температуры плавления комплекса анализируемой ДНК с отдельными фрагментами зонда, в силу своей длины имеющими частоту встречи в данной ДНК больше 1. Поскольку разность температур плавления близких по составу дуплексов олигонуклеотидов, различающихся по длине на одно звено, невелика и составляет обычно около 3–5 °C (см., например, таблицу), практически невозможно подобрать условия, при которых гибридизовался бы, например, только додекануклеотид и не взаимодействовали входящие

* Длина олигонуклеотидов и ДНК приводится как число нуклеотидных звеньев, из которых они состоят.

** Данные о длине геномов *E. coli* и человека приведены на основании работы [8]. При этом учитывалась суммарная длина комплементарных цепей ДНК.

Номер соединения	Олигонуклеотид * (длина цепи)	Содержание G+C, %	T _{пн.} , °C (±1°)	Степень комплексообразования, %	Температура гибридизации, °C **
(I)	A-G-C-A-A-A-G-C-G-A-A (11)	45,5	37	15	25–30
(II)	T-T-A-T-A-G-T-C-A-G-A (11)	27,2	28	8	23–27
(III)	G-A-A-G-C-C-C-G-A-A-A (11)	54,5	41	20	30–35
(IV)	T-T-G-C-A-T-C-A-A-A-A-A (12)	25	33	10	23–27
(V)	G-A-A-G-C-C-C-G-A-A-A-G (12)	58	45	30	35–40
(VI)	A-A-A-T-C-A-G-G-T-C-T-T (13)	31	38	12	25–32
(VII)	G-A-A-G-C-C-C-G-A-A-A-G-A (13)	54	47	40	35–42
(VIII)	T-T-G-C-A-T-C-A-A-A-A-G-A (14)	28,5	40	30	28–35
(IX)	G-A-A-G-C-C-C-G-A-A-A-G-A-C (14)	57	54	70	40–48
(X)	A-C-C-T-G-T-C-T-A-T-T-A-T-A (15)	33,3	45	60	30–40
(XI)	A-A-A-T-C-A-A-A-A-T-C-A-G-G-T (16)	25	51	62	30–45
(XII)	G-A-A-G-C-C-C-G-A-A-A-G-A-C-T-T (16)	50	59	75	35–55
(XIII)	A-A-A-T-C-A-G-G-T-C-T-T-A-C-C-C-T (18)	38,5	64	85	35–55
(XIV)	G-A-A-G-C-C-G-C-G-A-A-A-G-A-C-T-T-C-A-A-A (20)	45	68	90	40–63
(XV)	«минус»-нить промотора G 2 (93)	35,5	>70	100	50–60

* Символ d для обозначения дезоксирида везде опущен.

** Отмычка нитроцеллюлозных фильтров от фоновой радиоактивности проводилась при температуре гибридизации.

в его состав 10–11-звенные последовательности, которые в силу своей длины уже могут гибридизоваться с несколькими участками ДНК *E. coli* и создавать значительный фон. Следовательно, для обеспечения специфичности селекции реальная длина зонда должна быть больше его минимально возможной длины на 1–2-мононуклеотида, т. е. для ДНК *E. coli* она должна быть равна 13–14, а для ДНК человека ($N 5,8 \cdot 10^9$) — 16–18.

При скрининге бактериальных колоний *in situ* необходимо рассматривать два случая, когда размеры анализируемой ДНК больше или меньше размеров генома *E. coli*. В первом случае, который был фактически рассмотрен выше, при выборе длины зонда решающее значение имеют размеры исследуемой ДНК. Во втором, который, например, имеет место при селекции плазмид со встроеннымными в них синтетическими фрагментами нуклеиновых кислот, необходимо помимо длины анализируемой ДНК учитывать также и размеры ДНК *E. coli*, поскольку последняя присутствует в каждой колонии. Кроме того, необходимо принимать во внимание количество коний плазмид, несущих специфические фрагменты или целую молекулу исследуемой ДНК в бактериальной клетке. Известно, что плазмиды, производные от ColE1, обнаруживаются в клетке в количестве нескольких копий. Это число может быть увеличено примерно в 7–10 раз в результате амплификации [1], что приводит к значительному уменьшению влияния неспецифической гибридизации с хромосомной ДНК *E. coli*. С учетом вышеприведенных факторов можно предположить, что подходящими зондами в последнем случае должны быть олигонуклеотиды с длиной цепи не менее 10–11 нуклеотидных звеньев.

Для экспериментальной проверки этих выводов в качестве модельной системы нами были использованы плазмиды pP9E и pHd9E, содержащие синтетический промотор G2 ДНК бактериофага *fd* [9, 10], и одноцепочечная ДНК бактериофага *fd* («плюс»-нить), а в качестве молекуллярных зондов — олиго- и полинуклеотиды различной длины, структура которых соответствовала участкам «минус»-цепи промотора.

Для проведения гибридизации на колониях клетки *E. coli*, несущие плазмиды pP9E и pHd9E с клонированным синтетическим промотором G2, заряду с не содержащими данных плазмид бактериями высевались на чашки с агаром, предварительно покрытым нитроцеллюлозными фильтрами. Колонии переносились на другие нитроцеллюлозные фильтры, подращивали и лизировали. Для повышения эффективности скрининга перед лизисом колоний проводили в течение 24–48 ч амплификацию плазмидных ДНК в присутствии хлорамфеникола. Это должно было приводить к

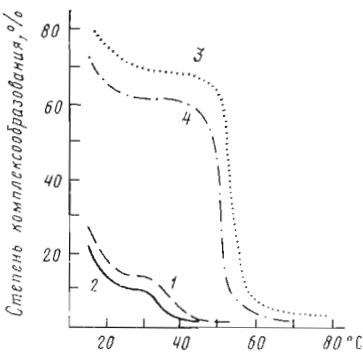


Рис. 1

Рис. 1. Кривые плавления комплексов одноцепочечной ДНК бактериофага *fd* с ун-декануклеотидом (I) – 1, тридекануклеотидом (VI) – 2, тетрадекануклеотидом (IX) – 3, гексадекануклеотидом (XI) – 4

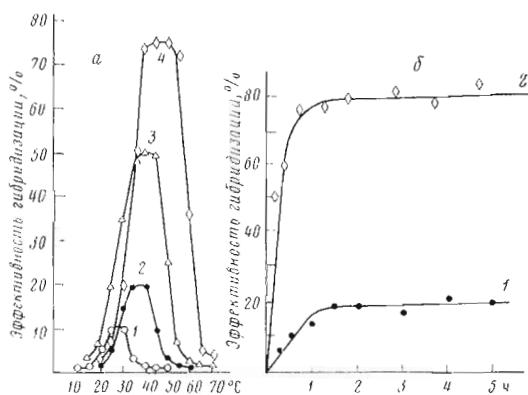


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость эффективности гибридизации *in situ* молекулярных зондов с колониями *E. coli*, содержащими плазмиды с промотором G2: а – от температуры для тридекануклеотидов (VI) – 1 и (VII) – 2, гексануклеотидов (XI) – 3 и (XII) – 4; б – от времени гибридизации для тридекануклеотида (VII) при 40°С (1) и гексануклеотида (XII) при 45°С (2). Эффективность гибридизации при данной температуре определяли как разность между радиоактивностью, связавшейся в результате гибридизации с промоторсодержащими клонами и колониями *E. coli*, которые не содержат промотора G2. За 100% принимали эффективность взаимодействия (–)-нити промотора G2 с колониями. Все олигонуклеотиды обладали одинаковой удельной радиоактивностью

снижению фона, обычно возникающего за счет связывания олигонуклеотидов с хромосомной ДНК *E. coli* [1]. ДНК денатурировали и фиксировали на фильтрах *in situ* для образования «ДНК-принта» (отпечатка ДНК) каждой колонии. Закрепленные таким образом на фильтрах плазмидные ДНК гибридизовали с 5'-³²P-меченными полинуклеотидами длиной от 11 до 20 мономерных звеньев каждый, структуры которых приведены в таблице, и 93-звенной «минус»-нитью промотора в буфере, содержащем 0,75 М NaCl. Результат гибридизации фиксировался с помощью радиоавтографии. Гибридизовавшиеся с зондами клоны *E. coli* давали на радиоавтографе темные пятна. На один фильтр, содержащий от 100 до 1000 колоний диаметром 1 мм, брали 20–50 пмоль меченого олигонуклеотида, что составляло 10–100-кратный избыток по отношению к плазмидной ДНК, закрепленной на фильтре. Чувствительность метода повышалась также использованием высокомеченных препаратов олигонуклеотидов.

Для подтверждения правильности селекции колоний проводилась проверка их фенотипических свойств, а также рестрикционный анализ выделенной плазмидной ДНК в сочетании с методом «блоттинга» [11]. В этих экспериментах для быстрого обнаружения рестрикционных фрагментов ДНК, содержащих промотор G2, был также использован метод гибридизации с синтетическими олигонуклеотидами различной длины [7]. Плазмидную ДНК расщепляли эндонуклеазами рестрикции *Hae*III, *Hind*III или *Bam*HI и полученные фрагменты разделяли электрофорезом в агарозном геле. Затем фрагменты ДНК из геля переносили на нитроцеллюлозные фильтры и гибридизовали с меченными олигонуклеотидами-зондами в условиях, аналогичных тем, которые были использованы при гибридизации на колониях. Гомологичный рестрикционный фрагмент обнаруживали радиоавтографией.

Для определения оптимальных условий гибридизации были проведены следующие эксперименты. Прежде всего исследовали зависимость степени комплексообразования между одноцепочечной ДНК бактериофага *fd* и синтетическими олигонуклеотидами различной длины и состава от температуры. С этой целью ³²P-меченные олигонуклеотиды смешивали с ДНК

бактериофага *fd* («плюс»-нить) в том же буфере, в котором проводили опыты по гибридизации на колониях, и после прогревания при 90° С медленно охлаждали до 15° С, отбирая аликвоты через определенные температурные интервалы, а затем инкубационную смесь медленно нагревали, аналогичным образом отбирая аликвоты. Отобранные пробы наносили на нитроцеллюлозные фильтры, которые связывали одноцепочечную ДНК вместе с присоединившимся к ней олигонуклеотидом. Избыток последнего отмывали и по уровню радиоактивности на фильтре определяли степень комплексообразования. Некоторые из полученных при этом кривых приведены на рис. 1. Среднюю точку на кривой тепловой денатурации дуплекса олигонуклеотида с ДНК фага *fd* принимали за температуру плавления ($T_{\text{пп}}$). Исследование ренатурации комплексов после плавления показало, что в пределах ошибки опыта плавление и ренатурация полностью обратимы.

Температуры плавления дуплексов олигонуклеотидов с ДНК приведены в таблице. Как и следовало ожидать, с увеличением длины олигонуклеотида и содержания в нем остатков гуанина и цитозина увеличивалась термическая устойчивость образованного им дуплекса с ДНК, а также степень комплексообразования, которая определялась как мольное отношение количества олигонуклеотида, вступившего в комплексообразование, к количеству находящейся в пробе одноцепочечной ДНК *fd*. Кроме того, из рис. 1 следует, что процесс комплексообразования между олигонуклеотидом и ДНК является двухступенчатым. На первой стадии образуется специфический дуплекс между олигонуклеотидом и комплементарным ему участком ДНК равной длины. При дальнейшем понижении температуры наблюдается второй подъем кривой, связанный с неспецифическим комплексообразованием между отдельными участками олигомера, не вступившего в специфическое взаимодействие, и другими районами ДНК, комплементарными этим участкам, длина которых сравнительно невелика.

Оптимальный температурный режим гибридизации подбирался для каждого олигонуклеотида индивидуально. Для этого проводилась серия опытов, в которых комплексообразование между находящейся в колониях денатурированной плазмидной ДНК и зондом осуществлялось при нескольких различных температурах. Последние выбирались в некотором интервале ниже и выше температуры плавления комплекса данного олигомера с ДНК бактериофага *fd*. На основании данных по эффективности гибридизации данного зонда с клонами *E. coli* при различных температурах были определены наиболее благоприятные для проведения гибридизации температурные интервалы (см. таблицу). Как можно видеть из таблицы и рис. 2а, оптимальная температура гибридизации в среднем лежит в интервале на 5–15° С ниже температуры плавления данного дуплекса, причем ширина интервала увеличивается по мере увеличения длины зонда.

Для определения времени, необходимого для достижения максимально возможного для данного олигонуклеотида уровня гибридизации, был приготовлен ряд нитроцеллюлозных фильтров с фиксированными на них образцами клонов *E. coli*, несущих плазмиду pP9E. Затем была проведена гибридизация образцов с олигонуклеотидами различной длины в оптимальном для них температурном режиме. Образцы гибридизовали в течение разного времени. При этом практически независимо от длины олигонуклеотида в исследованном нами интервале и их концентрации уровень гибридизации достигал максимума уже через 1,5–2 ч. Полученные для двух 13- и 16-звенных зондов результаты приведены на рис. 2б.

Как показали наши эксперименты, в оптимальных температурных условиях однозначная селекция клонов на нитроцеллюлозных фильтрах происходила при использовании в качестве молекулярного зонда 14–16-звенных и более длинных полинуклеотидов независимо от их состава.

В случае использования тридека- и более коротких олигонуклеотидов возможность идентификации искомых клонов, чувствительность и эффективность гибридизации в значительной мере зависели от нуклеотидного состава зонда и четкого соблюдения правильного температурного режима. Так, из трех исследованных нами 11-звенных фрагментов положительный

результат был получен только с олигонуклеотидом (III), содержащим более 50% G+C. Соединения (I) и (II), так же как и додекануклеотид (IV), оказались непригодными в качестве зондов для скрининга. При использовании 13-звенного зонда (VI) с небольшим содержанием G+C (31%) радиоактивные пятна, соответствующие гибридизующимся колониям, не обладали необходимой интенсивностью и мало отличались от фона, возникающего при взаимодействии олигонуклеотидов с хромосомной ДНК *E. coli* (рис. 3A), что может с большой вероятностью привести к ошибкам при скрининге (особенно в случае селекции колоний большой плотности). В то же время из рис. 3A (б и в) следует, что 16-звенный олигонуклеотид (XI) с низким содержанием G+C (25%) и 13-звенный зонд (VII) (54% G+C) дают совершенно однозначный ответ при использовании их в качестве зонда для скрининга колоний *in situ*.

С увеличением размеров зонда возрастала не только надежность, но и эффективность метода. Как видно из рис. 2а, эффективность гибридизации клонов с ^{32}P -меченными 16-звенными олигонуклеотидами практически в 5 раз выше, чем с тридекануклеотидами, и в 10 раз выше, чем с ундекануклеотидами, имеющими тот же уровень радиоактивности и близкий состав. По-видимому, очень низким уровнем эффективности гибридизации 11–12-звенных олигонуклеотидов с небольшим содержанием G+C и объясняется отсутствие положительных результатов при использовании их в качестве зондов. При увеличении содержания G+C в олигонуклеотидах равной длины также происходит повышение эффективности гибридизации. Следует отметить, что с увеличением длины зонда интервал температур, при котором наблюдается достаточный для надежного скрининга уровень чувствительности, становится шире, что значительно упрощает работу с зондом. При использовании 13-звенных и более коротких олигонуклеотидов необходимо более тщательно соблюдать оптимальный температурный режим. В противном случае будет нарушена специфичность гибридизации.

Недавно В. Валлас и др. [7] показали, что надежность идентификации клонов, несущих гибридные плазмиды, с помощью 13-звенных зондов возрастает, если опыты по гибридизации проводить на колониях, иммобилизованных на фильтрах «Ватман 540». Однако в ходе проведенных нами экспериментов, в которых в качестве носителя для колоний были использованы фильтры этого типа, мы не обнаружили существенной разницы в результатах по сравнению с опытами на нитроцеллюлозе. В этом случае чувствительность и надежность скрининга также возрастала при переходе от тридекануклеотида к более длинным зондам. Кроме того, нитроцеллюлозные фильтры более удобны при скрининге колоний большей плотности, чем «Ватман 540».

В то же время для получения однозначного результата при комплексообразовании с рестрикционными фрагментами плазмидных ДНК оказалось вполне достаточно 11–12-звенных олигонуклеотидов независимо от их состава. Однако и в этом случае чувствительность скрининга существенно возрастала при переходе к более длинным зондам, содержащим больший процент G+C (рис. 3Б).

На основании полученных нами данных можно сделать вывод, что оптимальные размеры зондов при скрининге колоний *E. coli* *in situ* лежат в интервале между 14- и 18-звенными олигонуклеотидами, поскольку именно такие зонды обеспечивают надежную идентификацию колоний независимо от своего состава.

16–18-звенные олигонуклеотиды-зонды в силу своих размеров и обеспечиваемого ими уровня эффективности метода могут применяться для обнаружения и выделения фрагментов ДНК практически из любого организма (в частности, для скрининга банка человеческих генов), в особенности, если анализируемая ДНК получается в результате клонирования кДНК, синтезированной обратной транскрипцией предварительно обогащенной мРНК. Как показали результаты экспериментов по использованию 16-звенных синтетических олигонуклеотидов для выделения и идентификации генов лейкоцитарного интерферона человека, полученных подобным образом, эта длина зонда вполне достаточна для обеспечения надежной

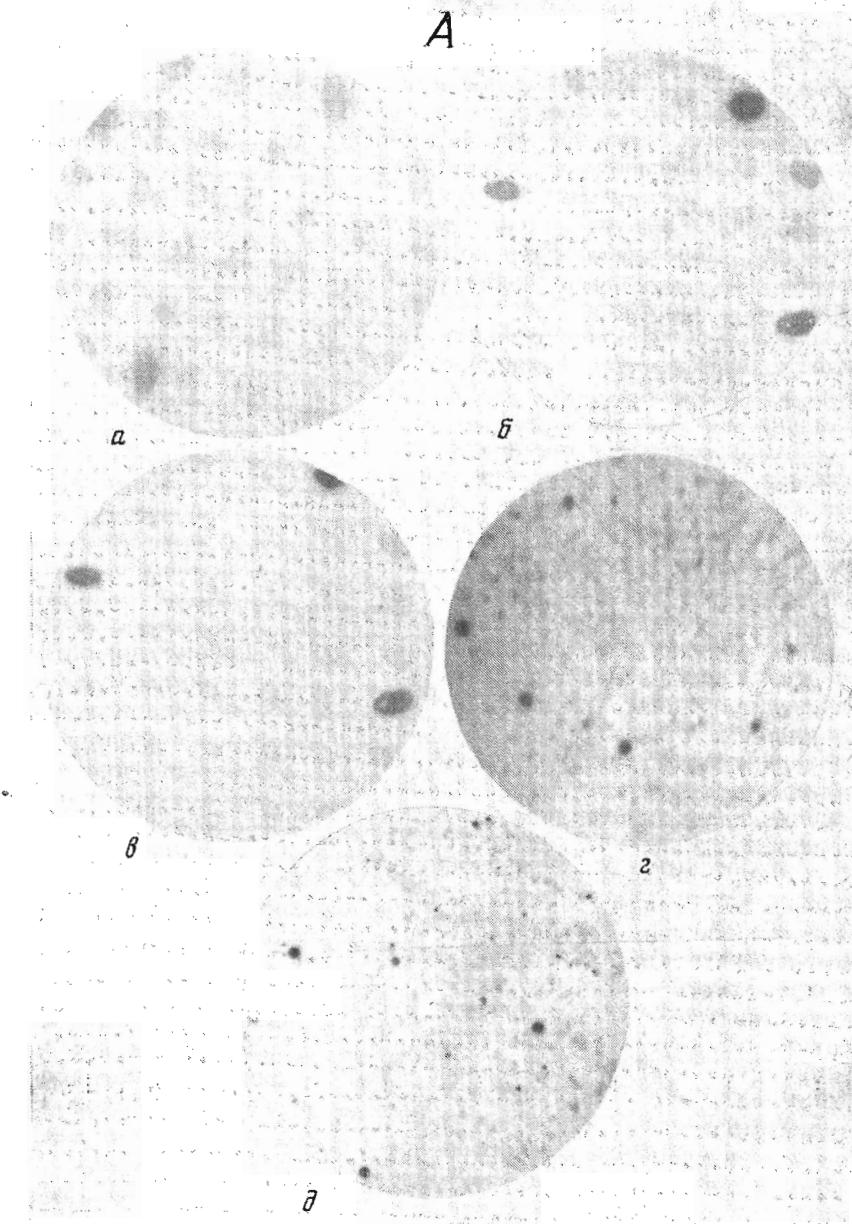


Рис. 3. Радиоавтографы гибридизации на нитроцеллюлозных фильтрах: *A* – клонов *E. coli*, содержащих плазмиду pHD9E, с 13-звенными (VI) – *а* и (VII) – *б*, 16-звенными (XI) – *в* и (XII) – *г* и 20-звенным (XIV) – *д* олигонуклеотидами. В случаях (*а*) – (*е*) колонии нанесены на фильтры переколом; *Б* – фрагментов ДНК, полученных в результате расщепления плазмид pP9E и pHD9E эндонуклеазами рестрикции, последующего электрофореза в агарозном геле и «блоттинга», с меченными ундекануклеотидом (III) – *б*, тридекануклеотидом (VII) – *в*, гексадекануклеотидом (XII) – *г*; *е* – электрофореграмма ^{32}P -меченых рестрикционных фрагментов плазмидных ДНК

идентификации *in situ* колоний *E. coli*, содержащих рекомбинантные плазмиды со встроеннымными в них эукариотическими генами [12].

Экспериментальная часть

В работе использованы аденоинтрифосфат (Sigma, США), трис (Merck, ФРГ), нитроцеллюлозные фильтры и бумага ВА 85 (Schleicher und Schüll, ФРГ), бактериальные среды и агар (Difco, США), агароза для электрофореза (Bic-Rad, США), эндонуклеазы рестрикции *Hind*III, *Bam*HI и *Hae*III (P-L Biochemicals, США). 5'-Фосфорилирование синтетических олигону-

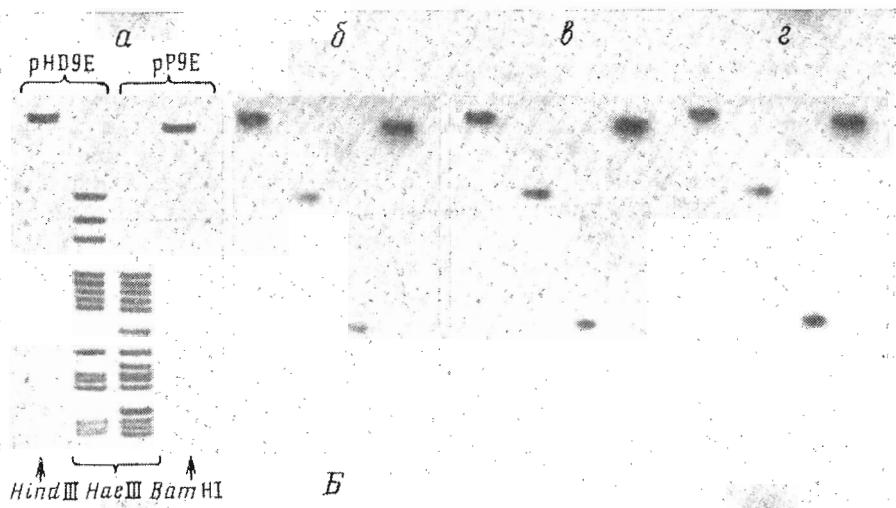


Рис. 3, Б

клеток осуществляли с помощью $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATР (удельная радиоактивность ~ 2000 КИ/ммоль; Amersham, Англия) и Т4-полинуклеотидкиназы (P-L Biochemicals, США). Меченные олигонуклеотиды выделяли гель-фильтрацией на колонке с сепадексом G-50 (Pharmacia, Швеция).

Синтез промоторной области G₂ бактериофага *fd* и получение рекомбинантной плазмида pP9E были описаны нами ранее [9, 10, 13]. Плазмиду pH9E получали аналогично плазмиде pP9E в результате введения промотора p9E по EcoRI-сайту в плазмиду pH68-17, сконструированную в Институте генетики Кёльнского университета (ФРГ) и любезно предоставленную Г.-И. Фритцем. Трансформацию клеток *E. coli* K12 *F*₊165' ($\text{F}^+\Delta gal-T1$) плазмидой pH9E и выделение плазмидных ДНК осуществляли как было описано нами ранее [9]. Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции *Hae*III, *Bam*HI и *Eco*RI проводили 1 ч при 37°C в 20 мМ трис-HCl, содержащем 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреит. Фермент инактивировали прогреванием при 60°C в течение 5 мин.

Химический синтез 11–13-звенных олигонуклеотидов (I, II, VI) был описан ранее. 12–20-звенные фрагменты (III–V, VII–XI) были получены в результате лигазной сшивки более коротких олигонуклеотидов или частичной достройки последних с помощью ДНК полимеразы I *E. coli* на одноцепочечной ДНК бактериофага *fd*, как на матрице (см. работу [13]).

Определение температур плавления комплексов олиго- и полинуклеотидов с одноцепочечной ДНК бактериофага *fd*. ДНК бактериофага *fd* («плюс»-нить) (100 мкг) растворяли в 2 мл буфера, содержащего 0,75 М NaCl, 150 мМ трис-HCl (рН 8,0). К раствору ДНК прибавляли 0,05 нмоль ^{32}P -меченного олигонуклеотида ($\sim 1 \cdot 10^6$ имп/мин) и полученную смесь нагревали до 90°C. Затем инкубационную смесь медленно охлаждали со скоростью 0,5°C/мин и отбирали пробы через каждые 2–3°C, выдерживая их при температуре отбора в течение 5 мин. Отобранные аликовты (20 мкл) быстро доводили до объема 500 мкл буфером того же состава и той же температуры, наносили на миллипоровые фильтры (тип НА-0,45, диаметр 24 мм) и быстро промывали 3 мл того же буфера при температуре отбора пробы. Фильтры высушивали и просчитывали в толуольном сцинтилляторе на счетчике «Mark II» (Nuclear Chicago, США). Когда температура гибридизационной смеси достигала 20°C, начинали нагревание проб с той же скоростью до 90°C, отбирая аликовты, как описано выше.

Гибридизация на колониях. Стерильный нитроцеллюлозный фильтр (диаметр 90 мм) помещали на свежеприготовленную чашку с 1% LB-агаром (1% триpton, 1% NaCl, 0,5% дрожжевой экстракт), содержащим 50 мкг/мл ампциллина. Ночную культуру клеток ($\sim 10^2$ – 10^3) в 250 мкл LB-бульона наносили на поверхность фильтра и инкубировали при 37°C

в течение 10–16 ч, пока колонии на фильтре не достигали 0,1–0,2 мм в диаметре. Затем проводили перепечатку колоний на другой фильтр, как описано в работе [2], и фильтры — реплику и матрицу — помещали на LB-агар и инкубировали до появления отчетливых колоний. Далее фильтр-реплику переносили на чашку с агаром, содержащим 200 мкг/мл хлорамфеникола, и инкубировали 24–48 ч при 37° С. Лизис колоний происходил при обработке фильтра 0,5 М NaOH (2×5 мин) с последующей промывкой 1 М трис-HCl, pH 8,0 (2×5 мин), а затем 1 М трис-HCl, содержащим 1,5 М NaCl (2×5 мин). Фильтр подсушивали на воздухе и прогревали 2 ч при 80° С в вакууме. Гибридизацию с ^{32}P -меченными олигонуклеотидами проводили в течение 3–6 ч в силиконизированной чашке Петри диаметром 100 мм в 3–5 мл буфера, содержащего 0,75 М NaCl, 150 мМ трис-HCl (pH 8,0), 5 мМ EDTA, 0,1% додецилсульфат натрия и 200 мкг/мл суммарной tРНК. Затем фильтр промывали в 25 мл 0,75 М раствора NaCl в том же буфере (2×15 мин) при температуре гибридизации и радиоавтографировали в течение 12–48 ч. Радиоавтограф совмещали с матричным фильтром и отбирали колонии, соответствующие темным пятнам на радиоавтографе.

Гибридизация рестриктных фрагментов плазмидных ДНК. Продукты расщепления плазмидных ДНК эндонуклеазами рестрикции после прибавления в реакционную смесь красителей-маркеров разделяли электрофорезом в 2% горизонтальном агарозном геле (20×20×0,3 см, 100 В, 2 ч). В качестве электродного буфера использовали 40 мМ трис (pH 8,2), 50 мМ ацетат натрия, 1 мМ EDTA. После проведения электрофореза гель выдерживали 30 мин в 0,25 М HCl (2×200 мл), промывали водой и помещали на 30 мин в 0,5 М NaOH, содержащий 1,5 М NaCl (2×200 мл) для денатурации ДНК. Гель нейтрализовали в течение 1 ч в 1 М ацетате аммония, содержащем 0,02 М NaCl (2×200 мл). Перенос фрагментов ДНК из геля на листы нитроцеллюлозы проводили в течение 16 ч, как описано в работе [14]. Нитроцеллюлозные листы высушивали 2 ч в вакууме при 70–80° С и проводили гибридизацию фрагментов ДНК с меченными олигонуклеотидами в условиях, аналогичных предыдущему опыту.

Авторы глубоко признательны акад. Ю. А. Овчинникову за постоянный интерес к данной работе и д-ру хим. наук Е. Д. Свердову за обсуждение полученных результатов. Авторы также признательны Г.-И. Фритцу (ФРГ) за предоставление образца плазмиды pHD 68-17 для клонирования промоторов и Г. М. Долганову за помощь в проведении экспериментов по клонированию промотора G2 ДНК бактериофага *fd*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grunstein M., Hogness D. S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, № 10, p. 3961–3965.
2. Hanahan D., Meselson M. Gene, 1980, v. 10, № 1, p. 63–67.
3. Wallace R. B., Shafler J., Murphy R. F., Bonner J., Hirose T., Itakura K. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 11, p. 3543–3557.
4. Sood A. K., Pereira D., Weismann S. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 1, p. 616–620.
5. Edge M. D., Greene A. R., Heathcliffe G. R., Meacock P. A., Schuch W., Scanlon D. B., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F. Nature, 1981, v. 292, № 5825, p. 756–762.
6. Houghton M., Stewart A. G., Doel S. M., Emtage J. S., Eaton M. A. W., Smith J. C., Patel T. P., Lewis H. M., Porter A. G., Birch J. R., Cartwright T., Carey N. H. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 9, p. 1913–1931.
7. Wallace B., Johnson M. J., Hirose T., Mijake T., Kawashima E. H., Itakura K. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 4, p. 879–894.
8. Корнберг А. Синтез ДНК. М.: Мир, 1977, с. 23.
9. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмачева О. Г., Долганов Г. М., Ревердатто С. В. Биоорганская химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1682–1692.
10. Efimov V. A., Chakhmakhcheva O. G., Lipkin V. M., Ovchinnikov Yu. A. In: 4th Symposium USSR-FRG, Structure and transcription of genome. Yerevan, 1981, p. 12–13.
11. Southern E. M. J. Mol. Biol., 1975, v. 98, № 3, p. 503–517.
12. Овчинников Ю. А., Свердов Е. Д., Монастырская Г. С., Царев С. А., Ходкова Е. М., Ефимов В. А., Чахмачева О. Г., Соловьев В. Д., Кузнецов В. П., Кавсан В. М. Докл. АН СССР, 1982, т. 262, № 3, с. 725–728.

13. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмачева О. Г. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 138–144.
14. Smith G. E., Summers M. D. Anal. Biochem., 1980, v. 109, № 1, p. 123–129.

Поступила в редакцию
22.II.1982

USE OF SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES FOR SCREENING BACTERIAL COLONIES CARRYING HYBRID PLASMIDS

EFIMOV V. A., CHAKHMAKHCHEVA O. G.

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

A procedure is described for rapid screening of *E. coli* colonies carrying recombinant plasmids with the fused synthetic G2 promoter region of phage *fd* DNA. It involves hybridization with 14 synthetic oligonucleotides of chain length from 11 to 20 nucleotides. The colonies to be screened are formed on nitrocellulose filters and fixed to them in situ. The synthetic oligomers are complementary to the (+)-strand of the promoter region. The thermal stability of the duplexes formed between oligonucleotides and SS *fd* DNA has been measured, and the optimal hybridization conditions were established for each oligonucleotide. The dependence of the hybridization reaction efficiency upon the length of the oligonucleotide and its composition has been examined. It was shown that the oligonucleotides with the chain length from 13 to 16 mononucleotides are effective hybridization probes for isolation of the *E. coli* colonies carrying specific cloned DNA sequences, whereas the oligonucleotides of chain length 11–12 nucleotides are less effective. The efficiency of hybridization of bacterial colonies with 16-mers is almost five times higher than with 13-mers of similar structure in optimal hybridization conditions. The method is also 1.5–2-fold more effective with the oligonucleotides containing 50–60% of G+C, than with the probes of the same length and 25–30% G+C.