



УДК 575.224.46.044 : 577.113.6

ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ОЛИГОНУКЛЕОТИДНАПРАВЛЕННОГО  
МУТАГЕНЕЗА ФРАГМЕНТОВ ДНКЕфимов В. А., Мирских О. В., Чахлахчева О. Г.,  
Овчинников Ю. А.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Усовершенствован метод направленного *in vitro* мутагенеза клонированных ДНК с помощью синтетических олигодезоксирибонуклеотидов. Сконструированы плазмидные векторы, облегчающие проведение данной процедуры. Показано, что разработанная методология позволяет получать мутантные ДНК с выходами до 20%.

В последнее время для изучения структурно-функциональных отношений в белках начинает успешно использоваться метод направленного мутагенеза соответствующих структурных генов [1]. Введение мутаций в гены позволяет получать генно-инженерными способами белки со специфическими изменениями в аминокислотной последовательности. Это в некоторых случаях может привести к получению молекул с повышенной или новой биологической активностью [2-4]. Кроме того, при наличии данных о первичной и пространственной структуре белка направленный мутагенез позволяет оценить вклад отдельных аминокислотных остатков в работу его активного центра, сборку его субъединиц и так далее, т. е. является одним из методов изучения механизма действия белка.

В известную последовательность ДНК мутационные изменения могут быть введены целым рядом способов [1, 5], однако наиболее точный и удобный метод введения специфических мутаций в клонированные фрагменты ДНК — использование в качестве специфических мутагенов синтетических олигодезоксирибонуклеотидов [6].

Общая стратегия метода олигонуклеотиднаправленного мутагенеза включает в себя использование синтетического олигодезоксирибонуклеотида, несущего желаемую мутацию (точечную замену гетеродвухцепочечного основания, делецию или вставку), в качестве «праймера» для синтеза ДНК на одноцепочечной кольцевой ДНК-матрице. Таким образом, олигонуклеотид включается в образующуюся вторую цепь ДНК, которая замыкается с помощью ДНК-лигазы. Полученным гетеродуплексом трансформируют клетки *E. coli*. Последующая репликация ДНК дает две формы клонированного гена: мутантную и исходную (дикую). Мутантная форма может быть легко идентифицирована на фоне исходных ДНК с помощью того же синтетического олигонуклеотида методом гибридизации [5-7].

Для проведения олигонуклеотиднаправленного мутагенеза обычно используют две системы: одноцепочечные фаговые ДНК (например, бактериофага M13 и его производных или  $\phi$ X174) или одноцепочечные плазмидные ДНК. Последняя система обычно требует меньшего количества операций, так как отпадает необходимость субклонировать интересующий район ДНК в фаге. При этом одноцепочечную плазмидную ДНК получают из суперскрученной двухцепочечной формы введением разрыва(ов) в одну из цепей действием некоторых эндонуклеаз рестрикции в присутствии этидийбромид (или ДНКазы I) с последующим удалением разорванной цепи экзонуклеазой [2, 8]. Однако эта процедура дает сравнительно низкие выходы мутантов — в среднем от 0,01 до 1%. Использование одноцепочечных фаговых ДНК более эффективно (выход достигает 2-5%). Но и этот подход имеет ряд недостатков, в частности длительность эксперимента и

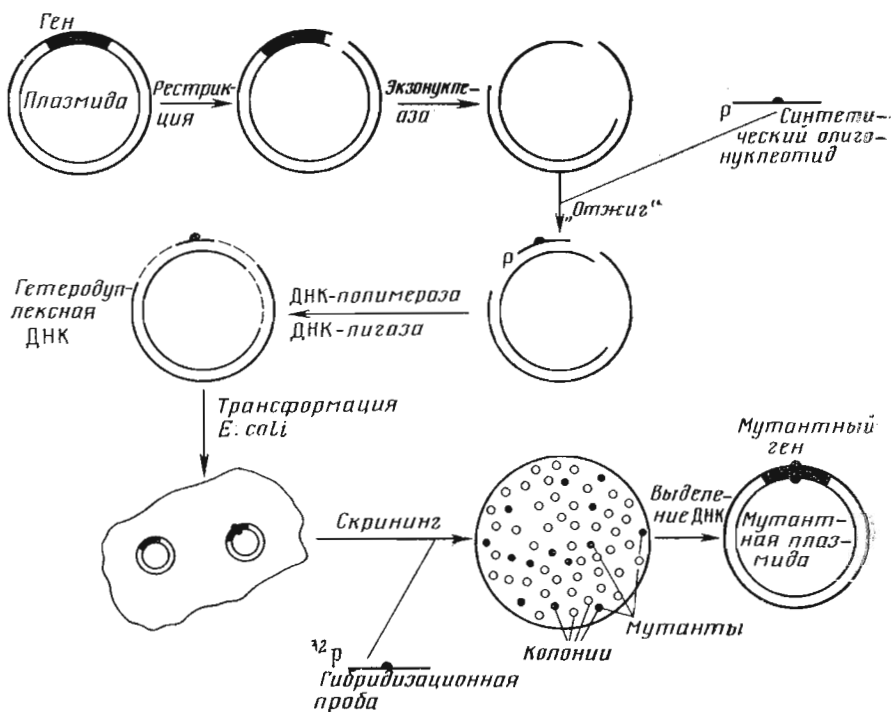


Рис. 1. Схема проведения олигонуклеотиднаправленного мутагенеза с использованием линейной формы плазмидной ДНК. Зачерненный полукруг на синтетическом олигонуклеотиде и плазмидной ДНК показывает участок с измененной последовательностью

необходимость специальных обработок для увеличения выхода мутантной ДНК. Кроме того, применение в обоих случаях дестройки праймера ДНК-полимеразой на протяженной, полностью одноцепочечной, циркулярной матрице ведет к возникновению «ложных» мутаций. Снижение выхода целевой мутации происходит также из-за наличия в реакционной смеси большого количества молекул ДНК с не полностью дестроенной второй цепью, поскольку ДНК-полимераза с трудом преодолевает участки матрицы, имеющие вторичную структуру, в частности район инициации репликации [9, 10].

С целью повышения выхода мутаций и упрощения общей методологии нами была разработана модифицированная процедура олигонуклеотиднаправленного мутагенеза (рис. 1), основными моментами которой являются:

1) использование для клонирования генов и введения мутаций специально сконструированных плазмидных векторов pBRS1, pHS1 и pHS2, которые являются производными плазмиды pBR322 и содержат последовательности, узнаваемые рестриктазами *Sma*I и *Hpa*I, дающими «тупые» концы; гены вводятся в эти плазмиды по рестриктным сайтам, расположенным в непосредственной близости от имеющихся в векторах уникальных последовательностей, узнаваемых эндонуклеазами рестрикции;

2) использование линейной двухцепочечной формы плазмидной ДНК, полученной в результате расщепления суперскрученной формы рестриктазами, в качестве исходной для проведения направленного мутагенеза;

3) контролируемое удаление одной из цепей ДНК с 3'-концов линейного дуплекса с помощью экзонуклеазы III или ДНК-полимеразы фага T4, в результате чего образуется двухцепочечная молекула ДНК, имеющая на 5'-концах выступающие одноцепочечные последовательности, включающие в себя участок предполагаемой замены (мутации);

4) комплексообразование синтетического олигонуклеотида, структура которого содержит желаемую мутацию, с приготовленной плазмидной ДНК и последующая дестройка одноцепочечных концов молекулы с помощью

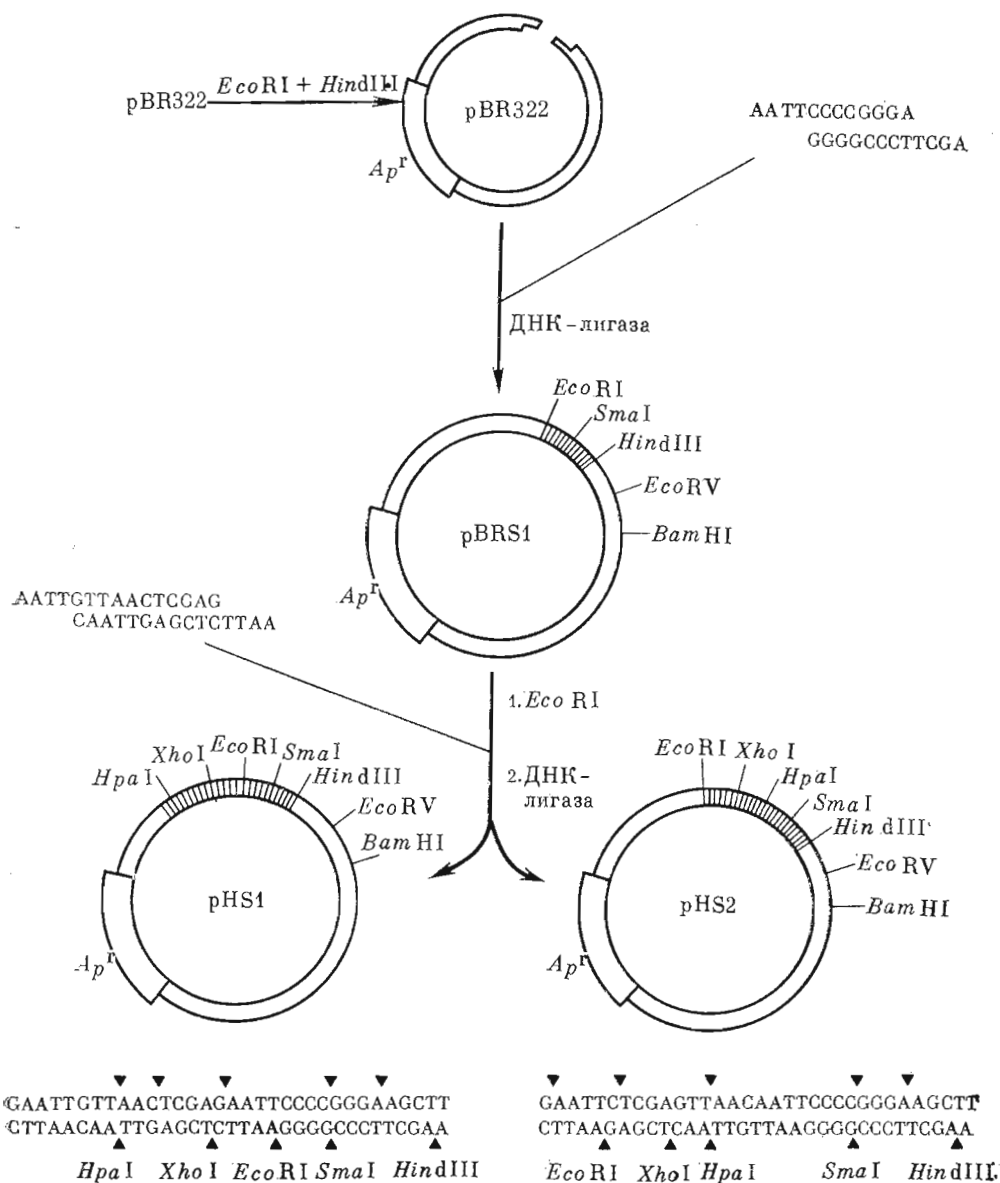


Рис. 2. Схема конструирования плазмидных векторов pBRS1, pHS1 и pHS2. Показаны рестриктивные сайты и последовательности синтетических вставок (внизу) при различных ориентациях в плаزمидах pHS1 и pHS2

ДНК-полимеразы в присутствии ДНК-лигазы, которая обеспечивает замыкание полученного гетеродуплекса в циклическую молекулу;

5) скрининг колоний, полученных в результате трансформации бактериальных клеток гетеродуплексной кольцевой ДНК, гибридизацией на нитроцеллюлозных фильтрах с <sup>32</sup>P-меченым олигонуклеотидом-мутагеном.

Использованные в работе рекомбинантные векторы pBRS1, pHS1 и pHS2 были получены на основе плазмиды pBR322 с использованием химически синтезированных олигонуклеотидов d(AATTCCTCGAGTTAACAATTCCCGGGAAGCTT) (I), d(AGCTTCCCGGG) (II), d(AATGTTAACTCGAG) (III) и d(AATTCTCGAGTTAACAATTCCCGGGAAGCTT) (IV).

Замена участка *EcoRI*-*HindIII* в плазмиде pBR322 синтетическим дуплексом, состоящим из олигонуклеотидов (I) и (II), позволила получить pBRS1, имеющую сайт рестрикции *SmaI* [11]. Включение по *EcoRI*-сайту плазмиды pBRS1 двухцепочечного участка, состоящего из 15-меров (III) и (IV), в свою очередь приводило к образованию плазмид, содержащих

Время действия экзонуклеазы, мин	Количество нуклеотидов, отщепленных от 3'-конца цепи ДНК **	
	экзонуклеаза III	ДНК-полимераза фага T4
5	200-300	50-100
10	500-600	100-150
15	800-1000	200-300
20	1500-2000	400-500
30	2000-4000	800-1000

\* Условил проведения реакций см. в «Экспериментальной части».

\*\* Указано примерное суммарное количество нуклеотидов, отщепленных одновременно с двух 3'-концов двухцепочечной ДНК.

*HpaI*-сайт. Поскольку векторы pHS1 и pHS2 различаются только ориентацией 15-звенной вставки, их разделение проводилось после трансформации лигазной смесью клеток *E. coli* на уровне ДНК, выделенных из колоний, отобранных гибридизацией с олигонуклеотидом (III), а также рестриктивным анализом и прямым определением первичной структуры фрагмента *EcoRI* — *HindIII*. Поскольку олигонуклеотид (III) имеет на 5'-конце половинный сайт рестриктазы *EcoRI*, а на 3'-конце — полный сайт *EcoRI*, во вновь образованных плаزمидах сохраняется лишь один *EcoRI*-сайт. Схемы получения рекомбинантных ДНК приведены на рис. 2.

Подвергающиеся мутагенезу гены могут клонироваться в составе векторов pBRS1, pHS1 и pHS2 по любому удобному рестриктному сайту, находящемуся в районе *EcoRI* — *BamHI*. Соответственно для получения линейной формы плазмидной ДНК может быть использована как эндонуклеаза рестрикции *SmaI*, так и *HpaI*, а также *EcoRV*. В зависимости от места встраивания и ориентации гена необходимо учитывать, какой из цепей ДНК должен быть комплементарен синтетический фрагмент-мутаген.

Ограниченная деградация ДНК под действием экзонуклеазы обеспечивается небольшим количеством вводимого в реакцию фермента и строго определенным временем его действия. Подбор условий деградации линейной двухцепочечной формы плазмиды экзонуклеазами осуществлялся на плазмиде pBRS1. Реакция проводилась непосредственно после окончания рестрикции *SmaI* в течение 30 мин. Через определенные промежутки времени отбирали аликваты, которые обрабатывали  $S_1$ -нуклеазой *Aspergillus oryzae* и подвергали электрофорезу в агарозном геле для определения длины нерасщепленной двухцепочечной ДНК. Результаты проведенных экспериментов (таблица) показали, что за 5 мин инкубации экзонуклеаза III *E. coli* отщепляет до 300-400 остатков от 3'-конца цепи ДНК при использовании 4-5 ед. акт. этого фермента на 1 мкг ДНК. T4-ДНК-полимераза работает несколько медленнее и отщепляет такое же количество остатков за 20 мин.

В комплексообразование с подготовленной линейной плазмидной ДНК вводится от 20- до 100-кратного мольного избытка 5'-фосфорилированного синтетического олигонуклеотида. Размеры последнего зависят от характера проводимого изменения, но, видимо, не должны быть меньше 14-16-звенного даже при введении точечной мутации. «Отжиг» проводится нагреванием смеси олигонуклеотида и ДНК при 50-55° С в течение 5 мин в буфере, содержащем трис-HCl (рН 7,5), MgCl<sub>2</sub> и NaCl, с последующим медленным охлаждением до 10° С. При этой же температуре осуществляется достройка одноцепочечных участков ДНК ДНК-полимеразой I *E. coli* (Клеповский фрагмент) в присутствии четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, дитиотрисита и лигирования в присутствии АГР.

Полученная гетеродуплексная ДНК используется для трансформации компетентных клеток *E. coli* HB101. Из выросших за 16-18 ч инкубации на LB-среде, содержащей 1% агара и 25-30 мкг/мл ампициллина, нескольких тысяч колоний обычно скринировалось несколько сотен (чаще

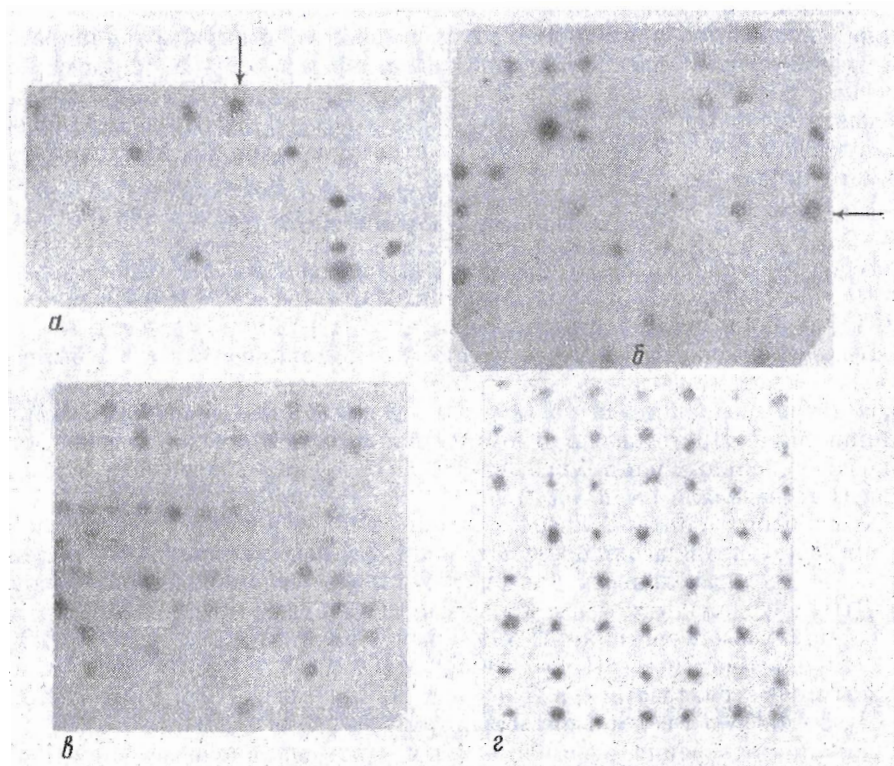


Рис. 3. Радиоавтограммы нитроцеллюлозных фильтров после проведения гибридизации *in situ* колоний *E. coli*, содержащих рекомбинантные плазмиды после проведения мутагенеза, с синтетическим  $^{32}\text{P}$ -меченым 18-звенным олигонуклеотидом-мутагеном. *a* и *б* — первая трансформация; *в* и *г* — повторная трансформация ДНК, выделенной из колоний, показанных стрелками на *a* и *б*

200) клонов. Отбор последних осуществляли методом гибридизации с  $^{32}\text{P}$ -меченым олигонуклеотидом-мутагеном в качестве высокоспецифичной пробы. Гибридизацию проводили в условиях работы [12]. Температуру реакции подбирали в зависимости от длины олигонуклеотида и характера замены. Как уже сообщалось ранее [2], выделенная из отобранных таким образом клонов ДНК чаще всего содержит смесь исходной и мутантных плазмид. Для их разделения необходима повторная трансформация *E. coli* препаратом плазмиды, выделенным из такой смешанной колонии. При этом вполне пригодны препараты, получаемые одним из существующих быстрых методов выделения плазмидной ДНК на микроуровне, например методом [13], использованным в данной работе. Как видно из рис. 3, при повторной трансформации гибридизация с синтетическим зондом позволяет выявить «чистые» мутантные клоны, которые обычно составляют от 40 до 90% всех вторично полученных колоний. Проведенные эксперименты показывают, что в использованных нами условиях выход мутантных клонов после первой трансформации бактерий гетеродуплексной ДНК доходит до 10–20% от общего количества колоний. Причем частичное удаление одной из цепей плазмидной ДНК, которое затрагивает в основном район введения замены в ее последовательность, значительно уменьшает вероятность образования незапланированных, ложных мутаций на других участках плазмиды. Кроме того, упрощается «задача» для ДНК-полимеразы и не затрагивается район инициации репликации.

Приведенная выше методика была использована для введения мутаций в ген инсулина человека [11], промотор G2 ДНК бактериофага fd [14] и другие клонируемые синтетические ДНК. Данная методология может быть использована не только на вышеописанных плазмидях, но и на любых других, если в самом изменяемом гене имеется уникальный как для него, так и для содержащей его плазмиды участок узнавания эндонуклеазой

рестрикции, образующей в результате расщепления «тупые» концы. Она также может быть применена для проведения олигонуклеотиднаправленного мутагенеза и на репликативной форме фаговых ДНК, например производных ДНК бактериофага M13 (M13mp8, M13mp9, M13mp12 и др.), имеющих удобные для клонирования фрагменты ДНК полилинкерные последовательности и уникальные участки узнавания рестриктазами указанного типа.

### Экспериментальная часть

В работе использованы эндонуклеазы рестрикции, ДНК-полимераза I *E. coli* (Кленовский фрагмент), экзонуклеаза III *E. coli* (P-L Biochemicals, США), S<sub>1</sub>-нуклеаза *Asp. oryzae* (Sigma), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ (Amersham, Англия). ДНК-полимераза, ДНК-лигаза и полинуклеотидкиназа фага T4 были выделены по методу [15].

Бактерии выращивали на LB-среде [16] с добавлением 25–30 мкг/мл ампициллина. Приготовление компетентных клеток *E. coli* и трансформацию бактериальных клеток проводили как описано в работе [13]. Плазмидную ДНК выделяли по методу [17].

Химический синтез олигодезоксирибонуклеотидов осуществляли быстрым N-метилимидазольным методом [18], исходя из моно- и динуклеотидов. Последовательность олигонуклеотидов и клонированных фрагментов ДНК определяли методом Максама — Гилберта [19].

Эндонуклеазой рестрикции *Sma*I расщепляли ДНК в буфере с 20 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl (pH 8,0), 6 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 мМ дитиотреитом, а остальными рестриктазами — в буфере с 20 мМ трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ NaCl и 1 мМ дитиотреитом.

Для приготовления рекомбинантных плазмид линейную форму исходной плазмиды, полученную обработкой циркулярной формы (2–5 мкг) рестриктазой, смешивали с 50–100 пмоль соответствующего синтетического дуплекса в 100 мкл буфера, содержащего 0,05 М трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит, 500 мкМ АТФ, и сшивали в присутствии 10–15 ед. акт. ДНК-лигазы в течение 5–10 ч при 10°С. Аликвоты реакционной смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli*.

Подбор условий расщепления одной из цепей ДНК экзонуклеазами проводили на плазмиде pBRS1. После расщепления 20 мкг ДНК *Sma*I в 300 мкл буфера смесь разделяли на две равные части. К одной из них прибавляли 40 ед. акт. экзонуклеазы III, к другой — 50 ед. акт. T4-ДНК-полимеразы. Инкубацию проводили при 25 и 37°С соответственно. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты по 30 мкл, к ним прибавляли 1 М ацетат натрия (pH 4,5) до концентрации 50 мМ, NaCl — до 200 мМ, ZnCl<sub>2</sub> — до 2 мМ и 1 мкл (4 ед. акт.) S<sub>1</sub>-нуклеазы *Asp. oryzae*. После 15-мин инкубации при 20°С реакцию останавливали прибавлением этилендиамина тетрауксусной кислоты. Образцы наносили на 1,5% агарозный гель и проводили электрофорез при 60 В в течение 3 ч. В качестве свидетелей использовали гидролизаты ДНК фага  $\lambda$  рестриктазой *Hind*III, ДНК  $\phi$ X174 — *Hpa*I и ДНК pBR322 — *Pst*I, *Eco*RI и *Bam*HI одновременно. Полученные результаты приведены в таблице.

Для проведения *in vitro* мутагенеза двухцепочечную ДНК, содержащую вступающие одноцепочечные 5'-концевые участки необходимой длины, в количестве 1–2 мкг смешивали с 40–200 пмоль 5'-фосфорилированного олигонуклеотида-мутагена в 50 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ NaCl. Смесь нагревали до 50–55°С и через 5 мин медленно охлаждали до 10–12°С. Затем прибавляли дитиотреит до концентрации 1–2 мМ, четыре дезоксинуклеозидтрифосфата — до концентрации 300 мкМ, АТФ — до 100 мкМ, 30–40 ед. акт. ДНК-полимеразы I (Кленовский фрагмент) и 20 ед. акт. ДНК-лигазы. Через 5–6 ч аликвоты этой реакционной смеси объемом 1–5 мкл использовали непосредственно для трансформации компетентных клеток *E. coli*.

Скрининг колоний гибридизацией с <sup>32</sup>P-меченым олигонуклеотидом-мутагеном проводили на нитроцеллюлозных фильтрах. Температуру гиб-

ридизации выбирали на основании данных, полученных в работе [12]. Фильтры промывали в течение 30–45 мин с использованием 2–3 смен промывочного буфера. Температура при этом была такой же, как и при гибридизации. Фильтры экспонировали с рентгеновской пленкой в течение 12–20 ч.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Harris T. Nature, 1982, v. 299, № 1, p. 298–299.
2. Dalbadie-McFarland G., Cohen L. W., Riggs A. D., Morin C., Itakura K., Richards J. K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 11, p. 6409–6413.
3. Wilkinson A. J., Fersht A. R., Blow D. M., Carter P., Winter G. Nature, 1984, v. 307, № 5947, p. 187–188.
4. Kin-Ming Lo, Jones S. S., Hackett N. R., Khorana H. G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 8, p. 2285–2289.
5. Smith M. Trends in Biol. Sci., 1982, v. 7, № 12, p. 440–442.
6. Adelman J. P., Hayflock J. S., Vasser M., Seeburg P. H. DNA, 1983, v. 2, № 3, p. 183–193.
7. Larson G. P., Itakura K., Ito H., Rossi J. J. Gene, 1983, v. 22, № 1, p. 31–39.
8. Wallace R. B., Johnson P. F., Tanaka S., Schold M., Itakura K., Abelson J. Science, 1980, v. 209, № 4463, p. 1396–1400.
9. Nilsson B., Uhlen M., Josephson S., Gatenbeck S., Philipson L. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 22, p. 8019–8030.
10. Osinga K. A., Van der Block A. M., Van der Horst G., Groot Koerkamp M. J. A., Tabak H. F., Veeneman G. H., Van Boom J. H. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 24, p. 8595–8608.
11. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. Докл. АН СССР, 1983, т. 270, № 3, с. 743–747.
12. Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 8, с. 2084–2093.
13. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. In: Molecular cloning. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 86–96, 249–255.
14. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 138–144.
15. Dolganov G. M., Chestukhin A. V., Shemyakin M. F. Eur. J. Biochem., 1981, v. 114, № 2, p. 247–254.
16. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976, с. 395.
17. Birnboim H. C., Doly J. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 6, p. 1513–1523.
18. Efimov V. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 21, p. 6675–6694.
19. Maxam A. M., Gilbert W. Methods Enzymol., 1980, v. 65, p. 499–559.

Поступила в редакцию  
3.XII.1984

#### EFFECTIVE METHOD FOR OLIGONUCLEOTIDE-DIRECTED MUTAGENESIS OF DNA FRAGMENTS

EFIMOV V. A., MIRSKIKH O. V., CHAKHMAKHCHEVA O. G.,  
OVCHINNIKOV Yu. A.

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

A procedure has been designed for changing specific nucleotides in a DNA sequence with efficiency. The method involves the use of the specially constructed cloning vectors pBRS1, pHS1, and pHS2. These plasmids are derivatives of pBR322 in which the *EcoRI* – *HindIII* region has been replaced by synthetic duplexes carrying *SmaI*, *HpaI* and *XhoI* sites, in addition to *EcoRI* and *HindIII* sites. The DNA fragment to be mutagenized is cloned in pHS1 (or pBRS1, or pHS2) using restriction sites close to the *SmaI* and *HpaI* sites. The recombinant plasmid obtained is digested with one of these enzymes to produce double-stranded DNA with blunt ends. This linear DNA is a substrate for exonuclease III (or T4 DNA polymerase). The digestion under controlled conditions produces duplex with protruding single-stranded 5'-regions which include the site of the desired mutation. The synthesis of DNA by DNA-polymerase I (Klenow's fragment), primed in part by the synthetic oligonucleotide containing the desired mutation, leads to the linear heteroduplex. The closed circular heteroduplex is formed by ligation. After transformation into *E. coli*, DNA replication generates homoduplexes, some of which contain the mutation. Colony hybridization with the same <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide is used to select mutants. The yield of the mutants is 10–20%. This technique can be extended to replicative form of M13 vectors. It can be also applied to any DNA sequence which has a unique site of restriction endonuclease generating blunt ends.