



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 113.4:577.21

ПОЛУЧЕНИЕ КЛОНОТЕК ГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ЧАСТИЧНОЙ ДОСТРОЙКИ ЛИПКИХ КОНЦОВ ДНК

Забаровский Е. Р., Алликлетс Р. Л.*

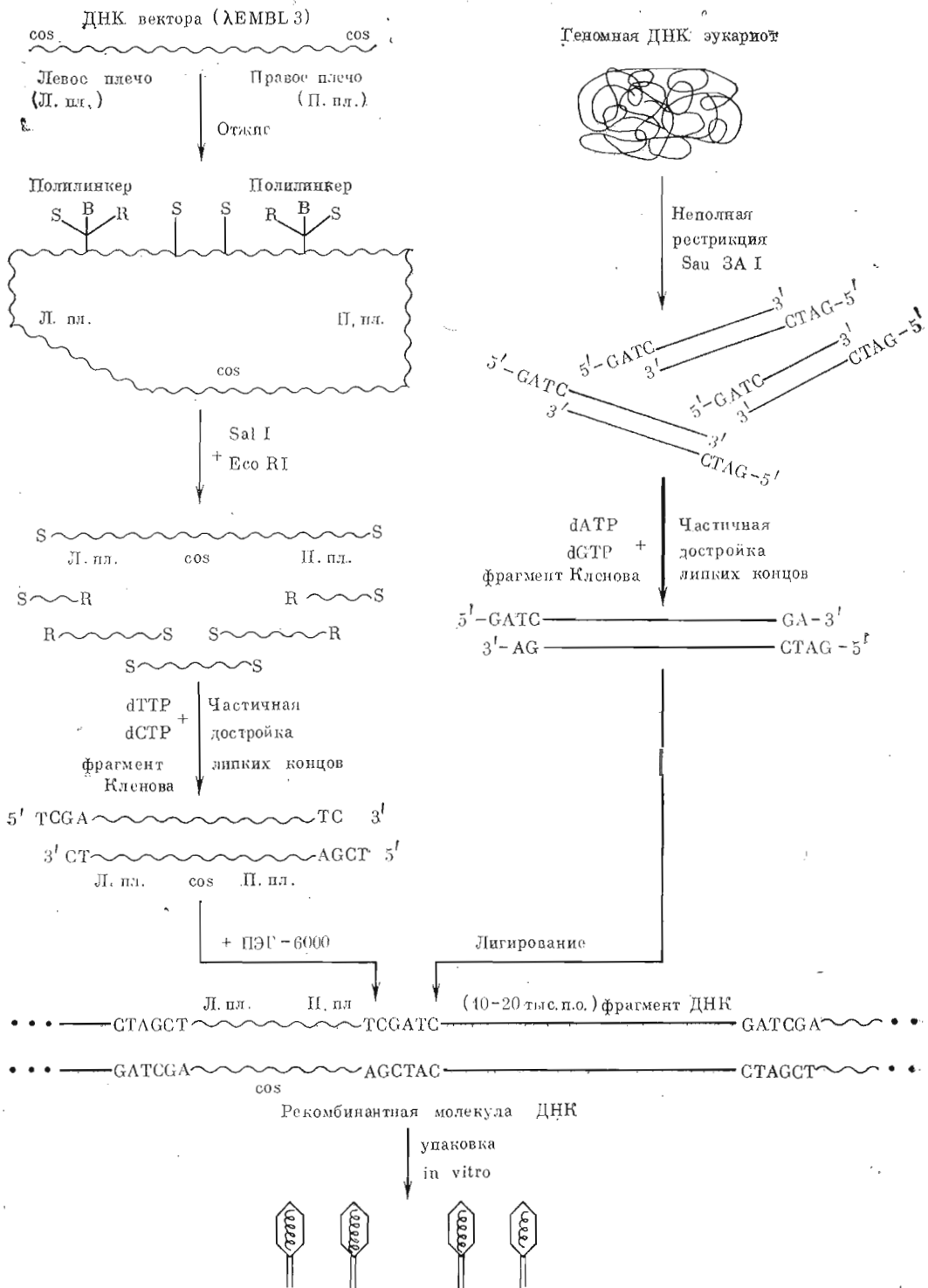
Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

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

Получение клонотек генов различных организмов — от вирусов до человека — стало важным инструментом изучения геномов. Методы получения клонотек постоянно совершенствуются как путем конструирования новых векторов, так и благодаря разработке новых способов элиминации перекombinantных (диких) векторов, в частности фагов [1, 2]. Наиболее распространенный метод (см. [1]) включает неполный гидролиз геномной ДНК, выделение фракции требуемого размера (10–20 тыс. п.о. для λ -векторов) и лигирование этой ДНК с очищенными концевыми фрагментами («плечами») фага. В частности, таким образом нами была получена клонотека генов человека в векторе λ Харон 4А [3]. Несмотря на очевидные достоинства, этот метод требует значительного количества исходной геномной ДНК (~1 мг) и занимает немало времени. Во многих случаях исходные количества геномной ДНК ограничены микрограммами, и тогда описанный метод становится непригодным.

Для преодоления этих недостатков мы модифицировали описанный метод [4], используя в качестве векторов фаги λ EMBL3 и λ EMBL3a [2] (схема). ДНК вектора разрезали рестриктазами *SalI* и *EcoRI*; здесь и далее реакции останавливали прогреванием при 65°С в течение 10 мин. Затем смесь инкубировали 1 ч при 42°С для отжига липких концов фаговой ДНК, после чего добавляли dCTP и dTTP до концентрации 50 мкМ и ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) (6 ед. акт. фермента на 15 мкг ДНК), инкубировали 30 мин при 20°С, ДНК осаждали равным объемом изопропилового спирта и осадок растворяли в ТЕ-буфере (10 мМ трис-НСl, рН 7,5; 1 мМ EDTA). Если концентрация векторной ДНК достаточно высока (~250 мкг/мл), концентрирование можно не проводить.

Независимо геномную ДНК, выделенную по методу [5] из печени крысы и почек свиньи (размер ДНК — 60–100 тыс. п.о.), частично расщепляли рестриктазой *Sau3AI* в соответствующем буфере [1], так, чтобы размеры основной массы фрагментов составили 10–24 тыс. п.о. После инактивации рестриктазы добавляли dATP и dGTP до концентрации 50 мкМ и 1 ед. акт. фрагмента Кленова на 2 мкг ДНК и реакцию достройки концов вели 30 мин при 20°С. Полученные таким образом векторная и геномная ДНК не способны к самолигированию и могут соединяться только друг с другом, что подтверждается опытами (табл. 1). Лигирование проводили 16 ч при 4°С в растворе, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреит, 1,5 мМ АТР, 12% полиэтиленгликоль (ПЭГ-6000) и 2–10 ед. акт. Кнопфа ДНК-лигазы фага T4 на 1 мкг ДНК. Суммарная концентрация ДНК обычно составляла 0,1 мг/мл. О необходимости ПЭГ-6000 для лигирования можно судить по данным, представленным в табл. 1 (см. также [6]), хотя наличие его в растворе ДНК существенно снижает эффективность ее последующей упаковки (табл. 2). Для удаления ПЭГ-6000 в раствор добавляли NaCl до 0,6 М, после инкубации (1 ч, 0°С) ДНК осаждали центрифугированием (10 мин, 12 000 об/мин [7]) и растворяли в ТЕ-буфере.



Общая схема эксперимента. S, B, R – сайты рестриктаз *SalI*, *BamHI*, *EcoRI*

Эффективность упаковки фага *in vitro* в зависимости от соотношения векторной и геномной ДНК

Соотношение геномной и фаговой ДНК	Число близкочисляющих единиц (б.о.е.) * на 1 мкг ДНК	
	фага	геномной
0 : 1 (самолигирование фага)	(0,6–1,5) · 10 ⁴	—
2 : 1	(0,3–1,5) · 10 ⁶	(0,2–0,75) · 10 ⁶
1 : 1	(0,3–1,5) · 10 ⁶	(0,3–1,5) · 10 ⁶
1 : 1 **	(0,3–1,0) · 10 ⁶	(0,3–1,0) · 10 ⁵
1 : 2	(0,1–0,25) · 10 ⁶	(0,2–0,5) · 10 ⁶

* Упаковка исходной ДНК EMBL3a — 1–4 · 10⁷ б.о.е./мкг.

** Лигирование проводили без ПЭГ-6000.

Таблица 2

Эффективность упаковки ДНК * фага в зависимости от концентрации ПЭГ-6000 в растворе

Концентрация (вес — объем) ПЭГ-6000	Число б.о.е. на 1 мкг ДНК фага	Концентрация (вес — объем) ПЭГ-6000	Число б.о.е. на 1 мкг ДНК фага
0	~10 ⁷	13	(0,7–2) · 10 ⁶
2	~10 ⁷	20	(0,4–0,6) · 10 ⁶
8	(1–6) · 10 ⁶	30	(0,5–0,9) · 10 ⁵

* Получение экстрактов и упаковку ДНК проводили как описано в работе [1].

Существенное значение для повышения эффективности упаковки имеет выбор соотношения векторной и геномной ДНК (табл. 1). В наших условиях оптимальным оказалось весовое соотношение 1 : 1, хотя, по-видимому, это зависит от условий расщепления геномной ДНК. Количество нерекомбинантных (диких) фагов не превышает 3%, поэтому отпадает необходимость в амплификации фагов на бактериях, резистентных к нерекомбинантным фагам.

Таким образом, предложенная схема позволяет в оптимальных условиях быстро (за 2–3 сут) получать клонотекки генов из микроколичеств ДНК (2–10 мкг). Это достигается отказом от наиболее длительных, трудоемких, связанных к тому же со значительными потерями материала операций, обычно применяемых для получения клонотек (фракционирование геномной ДНК, выделение «плечей»).

Когда количество материала крайне ограничено (1–2 мкг геномной ДНК), можно рекомендовать некоторые дополнения и изменения к предложенной схеме, каждое из которых увеличивает эффективность получения рекомбинантных фагов. Мы, в частности, применяли лигирование концов ДНК вектора до расщепления рестриктазами и фракционирование геномной ДНК, после неполной рестрикции, с помощью ПЭГ-6000 [7]; кроме того, для достройки концов лучше использовать обратную транскриптазу, которая не обладает экзонуклеазной активностью.

Полученные клонотекки по репрезентативности практически не уступают сконструированным традиционным способом, и 1 млн. рекомбинантных фагов с вероятностью ~99% содержит данный ген при сложности генома 3 · 10⁹ п.о. [1, 8].

Несмотря на то что эта схема конструирования клонотек была использована только для фагов EMBL3 и EMBL3a, она применима для любых векторов как фагов, так и космид по *SalI*-участку. Создание клонотек генов по описанной схеме делает эту процедуру рутинной и позволяет параллельно получать много клонотек, исходя из микрограммовых количеств ДНК.

Авторы благодарят Л. Л. Киселева и И. М. Чумакова за интерес к работе, обсуждение и ценные замечания по ходу экспериментов и помощь в оформлении статьи, а также Д. Демирова за ценные методические сове-

ты и А. Н. Гуляеву за техническую помощь. Фаги EMBL3 и EMBL3a были любезно предоставлены нам Европейской лабораторией молекулярной биологии (Гейдельберг).

Литература

1. Маниагис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
2. Frischauf A.-M., Lehrach H., Poustka A., Murray N. J. Mol. Biol., 1983, v. 170, № 4, p. 827-854.
3. Забаровский Е. Р., Чумаков Н. М., Прасолов В. С., Киселев Л. Л. Докл. АН СССР, 1980, т. 255, № 5, с. 1275-1277.
4. Hung M.-C., Wensink P. C. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 4, p. 1863-1874.
5. Blin N., Stafford D. W. Nucl. Acids Res., 1976, v. 3, № 9, p. 2303-2308.
6. Zimmerman S. B., Pfeiffer B. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 19, p. 5852-5856.
7. Lis J. T., Schleif R. Nucl. Acids Res., 1975, v. 2, № 3, p. 383-390.
8. Seed B., Parker R. C., Davidson N. Gene, 1982, v. 19, № 2, p. 201-209.

Поступило в редакцию
31.1.1985

GENE LIBRARY CONSTRUCTION BY THE USE OF PARTIAL FILLING OF STICKY ENDS

ZABAROVSKY E. R., ALLIKMETS R. L.*

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;

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

To prepare gene libraries, the incomplete filling of protruding ends has been used. DNAs from phages EMBL 3 and EMBL 3a were sequentially digested with *SalI* and *EcoRI*, followed by addition of dTTP, dCTP, and DNA polymerase I (Klenow's fragment). Separately, a genomic DNA was partially cleaved with *Sau3AI*, followed by addition of dATP, dGTP, and Klenow's fragment. The fragmented phage and genomic DNAs were mixed and ligated, and the recombinant DNAs packed in vitro with the phage proteins. The effectiveness of packaging per microgram of genomic DNA was 10^5 to 10^6 (for the wild phage DNA, 10^7). The proposed procedure is very rapid and needs only microgram quantities of genomic DNA for preparing a representative gene library. It is also useful for other vectors, containing *SalI* sites.