



УДК 575.224 : 577.213.7

САЙТ-ЛОКАЛИЗОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ, НАПРАВЛЯЕМЫЙ  
ФОСФОТРИЭФИРНЫМИ АНАЛОГАМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ*Петренко В. А., Поздняков П. И., Кутряков С. М.,  
Болдырев А. И., Семенова Л. И., Сиволобова Г. Ф.**Всероссийский научно-исследовательский институт молекулярной биологии,  
п. Кольцово Новосибирской обл.*

Синтезированы олигодезоксирибонуклеотиды природного строения (17- и 20-мер), полностью комплементарные N-концевому участку гена *lacZ'* ДНК фага M13mp8, и их фосфотриэфирные аналоги, различающиеся количеством и расположением этильных заместителей при межнуклеотидных фосфатах. Исследовано мутагенное действие олигонуклеотидов в условиях сайт-локализованного мутагенеза.

Показано, что выход мутантов возрастает от 1—2 до 10% при использовании этильных аналогов вместо диэфирных олигонуклеотидов, а также ДНК-полимеразы I *E. coli* вместо ее кленовского фрагмента. Повышение эффективности мутагенеза объясняется устойчивостью фосфотриэфирных аналогов к действию 5' → 3'- и 3' → 5'-экзонуклеазных активностей ДНК-полимеразы. Обнаружена корреляция между выходом мутантов и термостабильностью комплексов олигонуклеотидов с ДНК. Показано, что аналоги обеспечивают количественное превращение одноцепочечной ДНК в двухцепочечную под действием ДНК-полимеразы I *E. coli*, что также способствует повышению эффективности мутагенеза. Обоснована возможность проведения сайт-локализованного мутагенеза *in vivo* с помощью природных комбинаций ферментов, присутствующих в клетке.

Наиболее точный и универсальный метод направленного изменения структуры генов основан на использовании олигонуклеотидов в качестве сайт-специфичных мутагенов [1]. Он стал незаменимым инструментом в молекулярной биологии, генетике и вирусологии и обещает найти применение в медицине при лечении генетических заболеваний [2]. Однако этот метод не вполне надежен, что стимулирует поиск новых, более эффективных его модификаций [3—7]. Описанные варианты метода различаются типом используемой векторной ДНК (фаг M13 [1] или плаزمид [3, 5]), условиями проведения отдельных стадий [4, 6] или способом отбора мутантов [5, 7]. Их объединяет единая стратегия включения мутаций, которая предполагает применение синтетического олигодезоксирибонуклеотида, несущего целевую мутацию (замену гетероциклического основания, вставку или делецию), как праймера для синтеза мутантной ДНК на одноцепочечной ДНК-матрице. Полученным гетеродуплексом трансформируют клетки *E. coli*, в которых ДНК реплицируется с образованием двунитевых кольцевых молекул двух типов: дикого и мутантного.

При проведении сайт-локализованного мутагенеза большинство проблем возникает на ключевой стадии ферментативного синтеза мутантной ДНК [8]. Короткие олигонуклеотиды весьма чувствительны к действию нуклеазных примесей, а также 3' → 5'- и 5' → 3'-экзонуклеазных активностей ДНК-полимеразы I, в результате чего вводимая мутация может теряться при получении ДНК. С этим связана необходимость тщательной очистки от нуклеаз, а также использования вместо природной ДНК-полимеразы I *E. coli* ее кленовского фрагмента, препараты которого, по многочисленным данным, отличаются нестандартностью и меньшей точностью проведения матричных реакций [6, 8].

Мы заинтересовались возможностью использования в качестве мутагенных затравок неприродных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов

Сокращения: MeOTg — метометокси триптил; ClPh — *n*-хлорфенил; N — остаток дезоксирибозиды (символ d (дезокс) везде для краткости опущен); ОЦ ДНК — одноцепочечная кольцевая ДНК; РФ ДНК — репликативная форма ДНК; TMS — триметилсилил.



Таблица 1

## Относительная хроматографическая подвижность этиловых эфиров олигонуклеотидов

Олигонуклеотид	$M_{исх}^*$	Олигонуклеотид	$M_{исх}^*$
GC	1,26	CA	1,33
GT	1,25	AA	1,25
TG	1,25	AT	1,11
CC	1,75	CAG	2,00

\*  $M_{исх}$  — отношение подвижностей этилового и хлорфенилового эфиров (ТСХ в системе В).

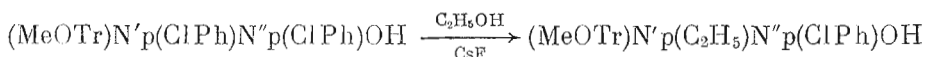
Таблица 2

## Условия элюции при выделении защищенных олигонуклеотидов обращенно-фазовой хроматографией на TMS-силикагеле

Длина олигонуклеотида	CH <sub>3</sub> CN в воде, % по объему	
	смеситель	резервуар
4—6	50	80
8—10	55	85
12—14	60	90
16—18	65	95
20 *	65	95

\* В качестве элюента использовали диоксан.

Для получения аналогов с заданным расположением этильных заместителей некоторые динуклеотидные и тринуклеотидные блоки, используемые в качестве фосфатных компонентов, предварительно превращали в этиловые эфиры (помечены звездочкой) путем переэтерификации их внутренних хлорфениловых эфиров в присутствии фторида цезия [10]:



Замещение хлорфенильного остатка на этильный при триэфирном атоме фосфора в присутствии фтористого цезия заканчивалось за 40—60 мин, что контролировали по образованию продукта с увеличенной по сравнению с исходным соединением хроматографической подвижностью при обращенно-фазовой ТСХ в системе В (табл. 1).

Сборку целевых олигонуклеотидов проводили в пиридине, в качестве конденсирующего агента использовали 1-метилсульфонилтетразол [14]. Время реакции при получении 4—8-мерных блоков составляло 40—60 мин, для более длинных олигонуклеотидов — 1,5—2 ч. Защищенные блоки и целевые олигонуклеотиды выделяли гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 или обращенно-фазовой хроматографией на TMS-силикагеле [15] в градиенте концентрации ацетонитрила в воде (табл. 2).

5'-Концевую монометокситритильную защитную группу снимали по методике [16], β-цианэтильную — по [17]. Полное деблокирование целевых олигонуклеотидов осуществляли последовательной обработкой их трихлоруксусной кислотой в хлороформе, 0,02 М фтористым цезием и конц. аммиаком при комнатной температуре. Олигонуклеотиды выделяли ионообменной ВЭЖХ на хроматографе Altex. При этом увеличение количества этильных заместителей приводило к уменьшению времени удержания вещества на колонке. Дополнительную очистку диэфирных олигонуклеотидов и их аналогов осуществляли обращенно-фазовой ВЭЖХ. Наличие фосфотриэфирных группировок приводило к тому, что вещество, гомогенное по данным ионообменной хроматографии, выходило в виде несколь-

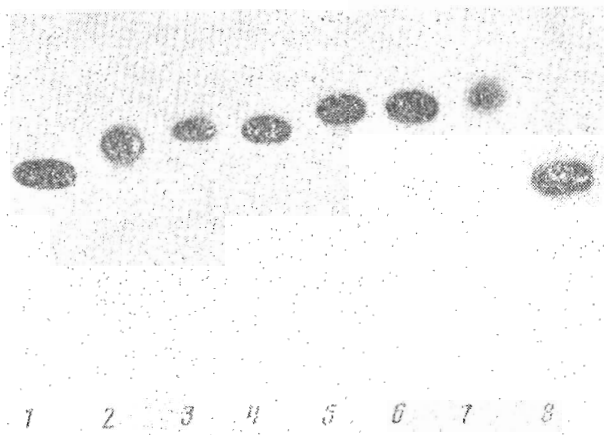


Рис. 1. Электрофоретический анализ  $^{32}\text{P}$ -меченых олигодезоксинуклеотидов (20% ПААГ, 7 М мочеви́на, 50 мМ трис-борат, рН 8,3, 1 мМ EDTA): 1 — (17), 2 — (17-Et<sub>2</sub>-1), 3 — (17-Et<sub>2</sub>-2(1)), 4 — (17-Et<sub>2</sub>-2(2)), 5 — (17-Et<sub>3</sub>(2)), 6 — (17-Et<sub>3</sub>(3)), 7 — (17-Et<sub>4</sub>), 8 — (17)

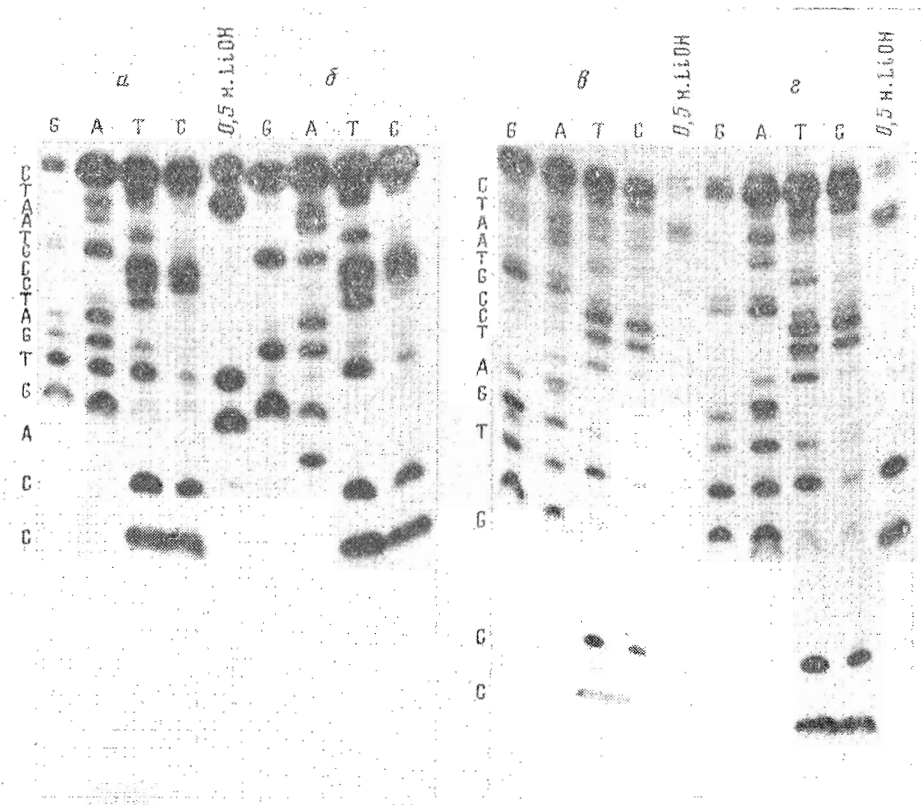


Рис. 2. Анализ олигодезоксинуклеотидов методом Максама — Гилберта: а — (17-Et<sub>2</sub>(2)), б — (17), в — (17-Et<sub>2</sub>-2(1)), г — (17-Et<sub>2</sub>-2(2)). LiOH — щелочное расщепление. По вертикали — первичная структура олигонуклеотидов

ких пиков при обращенно-фазовой хроматографии: в случае двух этильных заместителей — двумя пиками, в случае трех — тремя, в случае четырех — одним широким пиком. Электрофоретический анализ продуктов, соответствующих различным пикам каждого разделения, показал, что они гомогенны и несколько отличаются по подвижности от диэфирного олигонуклеотида (рис. 1).

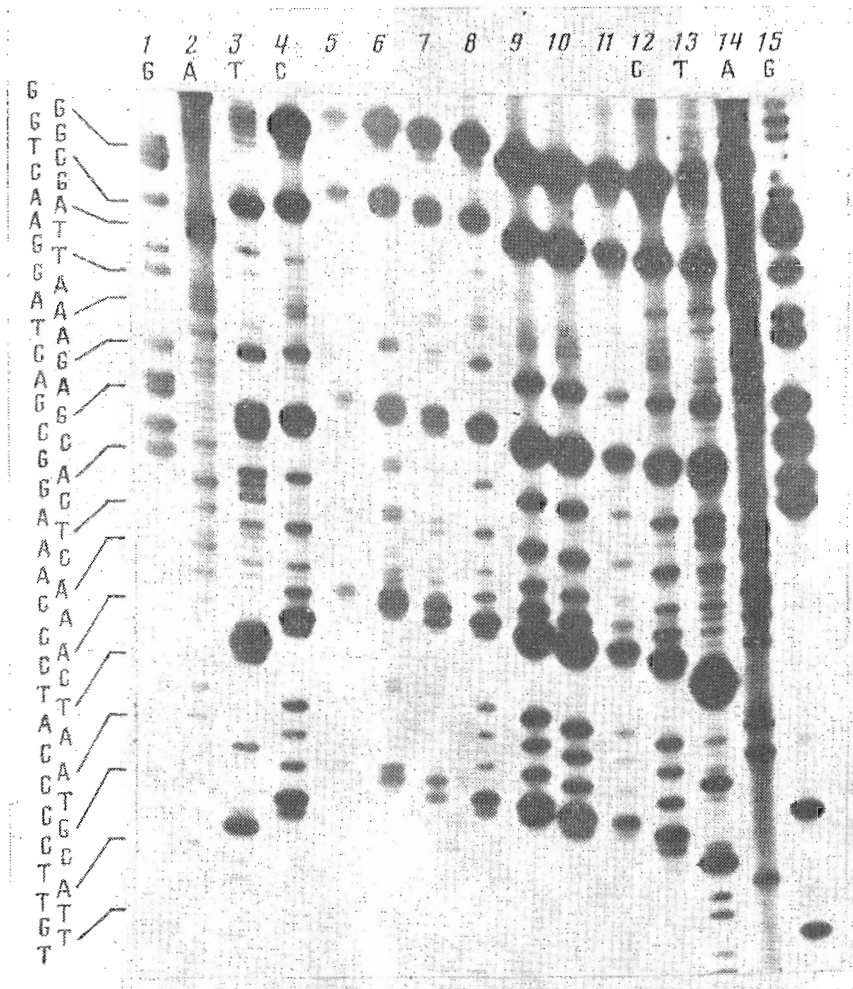


Рис. 3. Исследование специфичности связывания олигонуклеотидов с ДНК М13mpV (описание в тексте): 1—15 — реакции терминации для олигонуклеотидов: 1 — 4, 8, 12—15 — (17); 5 — (17-Et<sub>1</sub>); 6 — 17-Et<sub>2</sub>-2 + 17-Et<sub>3</sub>(2); 7 — [(17) + (17-Et<sub>2</sub>-2)]; 9 — 17-Et<sub>3</sub>(2); 10 — (17-Et<sub>2</sub>-2); 11 — (17-Et<sub>2</sub>-1)

Структуру синтезированных олигомеров определяли модифицированным методом Максама — Гилберта [18]. Картина расщепления олигонуклеотидов соответствовала их первичной структуре, а присутствие на электрофореграммах дополнительных дублетных полос (рис. 2), обусловленных разрывом фосфотриэфирных связей в щелочных условиях, служило дополнительным доказательством наличия и положения этилированных фосфатов. При этом продукты, соответствующие различным пикам обращенно-фазовой хроматографии, давали одинаковую картину расщепления, что позволило сделать вывод о том, что они являются стереоизомерами.

Анализ продуктов расщепления меченых аналогов олигонуклеотидов (0,5 M LiOH, 2,5 мин, 90° C) подтверждал вывод о количестве и положении фосфотриэфирных узлов (стереоизомеры давали одинаковый набор продуктов расщепления, диэфирные олигонуклеотиды не гидролизировались).

Связывание синтезированных диэфирных и модифицированных олигонуклеотидов с одноцепочечной ДНК М13mpV исследовали с помощью метода секвенирования по Сэнгеру [19] и гибридизацией на нитроцеллюлозных фильтрах [20]. Обнаружено, что как диэфирные, так и модифицированные олигонуклеотиды независимо от типа изомера образуют специфические комплексы с заданным участком ДНК М13mpV. Данные секвенирования показаны на рис. 3. Для фосфодиэфирного олигомера (17) представле-

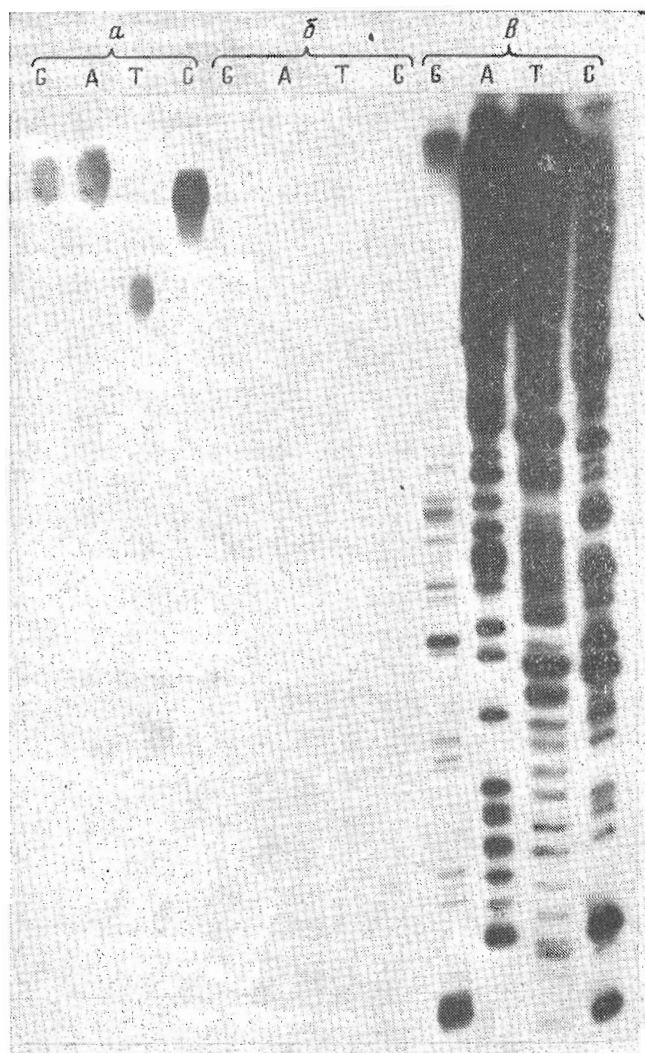


Рис. 4. Ингибирование матричной реакции на ДНК тетраэтиловым эфиром ( $17\text{-Et}_4$ ): секвенирование по методу Сэнгера с использованием в качестве праймера смеси  $[17\text{-Et}_3(2) + 17\text{-Et}_4]$  (а),  $17\text{-Et}_4$  (б) и  $17\text{-Et}_3(2)$  (в)

ны результаты реакций со всеми терминаторами (дорожки 1—4, 12—15), что позволяет прочесть структуру ДНК вблизи участка связывания (показана в вертикальных столбцах). Для аналогов получены такие же результаты, однако на рисунке для сравнения представлены лишь данные реакций с С-терминатором. Легко проследить закономерность в понижении подвижности продуктов терминации при переходе от диэфирного олигомера 17 (дорожки 4, 8, 12) к его ди-, три- и тетраэтиловым производным (дорожки 11, 10, 9, 5; пробы 1—8 и 9—15 наносили на гель в разное время), обусловленном уменьшением их заряда и увеличением массы. Это дополнительно подтверждает наличие фосфотриэфирных узлов в олигонуклеотидах-праймерах и сохранность этих звеньев в ходе ферментативного матричного синтеза ДНК.

При исследовании связывания с ДНК аналога с четырьмя этильными заместителями ( $17\text{-Et}_4$ ) потребовалось изменить условия проведения реакции. Оказалось, что использование  $17\text{-Et}_4$  в обычных избытках по отношению к матричной ДНК приводит к ингибированию ДНК-полимеразы I *E. coli* (рис. 4б). Этот эффект сохранялся и при использовании смеси  $17\text{-Et}_3$  с заведомо активным аналогом  $17\text{-Et}_3$  (рис. 4а). Способность аналога

Олиго- мер	Температура, °С									ВЦ ДНК
	10	20	30	35	45	50	55	60	65	
17										M13 mpB mp1ΔT
17-Et <sub>2</sub> -2(2)										M13 mpB mp1ΔT
17-Et <sub>3</sub> (3)										M13 mpB mp1ΔT
17-Et <sub>3</sub> (2)										M13 mpB mp1ΔT
17-Et <sub>2</sub> -2(1)										M13 mpB mp1ΔT
17-Et <sub>2</sub> -1										M13 mpB mp1ΔT
17-Et <sub>4</sub>										M13 mpB mp1ΔT

Рис. 5. Термостабильность комплексов олигонуклеотидов с ДНК M13mpB и ДНК M13mp1 ΔT (описание в тексте)

17-Et<sub>4</sub> служить праймером удалось показать лишь в условиях, когда он используется в недостатке по отношению к матричной ДНК.

Термостабильность комплексов олигонуклеотидов с комплементарной ДНК M13mp1ΔT и не полностью комплементарной ДНК M13mpB оценивали методом гибридизации [20]. Метод основан на измерении количества <sup>32</sup>P-меченого олигонуклеотида, который связывается с ДНК, фиксированной на нитроцеллюлозном фильтре (рис. 5). Полученные результаты указывают на то, что положение этильных заместителей оказывает заметное влияние на термическую устойчивость комплексов. Так, температуры разрушения комплексов с ДНК изомеров 17-Et<sub>2</sub>-2 и 17-Et<sub>2</sub>-1 различаются примерно на 20° С. Различие между стереоизомерами не столь велико (ср. 17-Et<sub>2</sub>-2(1) и 17-Et<sub>2</sub>-2(2)).

В ряду исследованных олигонуклеотидов аналоги 17-Et<sub>2</sub>-2 и 17-Et<sub>3</sub> образуют комплексы с ДНК, не уступающие по прочности комплексам ДНК с диэфирным 17-мером. Это согласуется с данными по секвенированию ДНК M13mpB при использовании смеси праймеров (рис. 3, дорожки 6, 7) в условиях недостатка матрицы. Как видно из рис. 3, происходит образование дублетных полос в результате наложения картин секвенирования, причем доля продуктов терминации от каждого праймера приблизительно одинакова. Следовательно, этилирование межнуклеотидных фосфатных групп не влияет на способность олигонуклеотидов образовывать специфические комплексы с ДНК и служить праймерами в полимеразной реакции.

Полученные комплексы использовались для образования двухцепочечной кольцевой ДНК [8]. Для большинства олигомеров независимо от структуры в условиях реакции (15° С, 20 ч; 22° С, 6 ч) происходило количественное превращение одноцепочечной ДНК в двухцепочечную репликативную форму (сверхскрученную или релаксированную) под действием ДНК-полимеразы I или ее кленовского фрагмента и ДНК-лигазы фага T4 (рис. 6). Исключение составил аналог 17-Et<sub>4</sub>, в присутствии которого провести реакцию полимеризации не удалось, что служит дополнительным подтверждением его ингибирующего действия на полимеразу.

Препаратами двухцепочечной ДНК трансформировали компетентные клетки *E. coli* JM103. Мерой эффективности индуцированного олигонуклео-

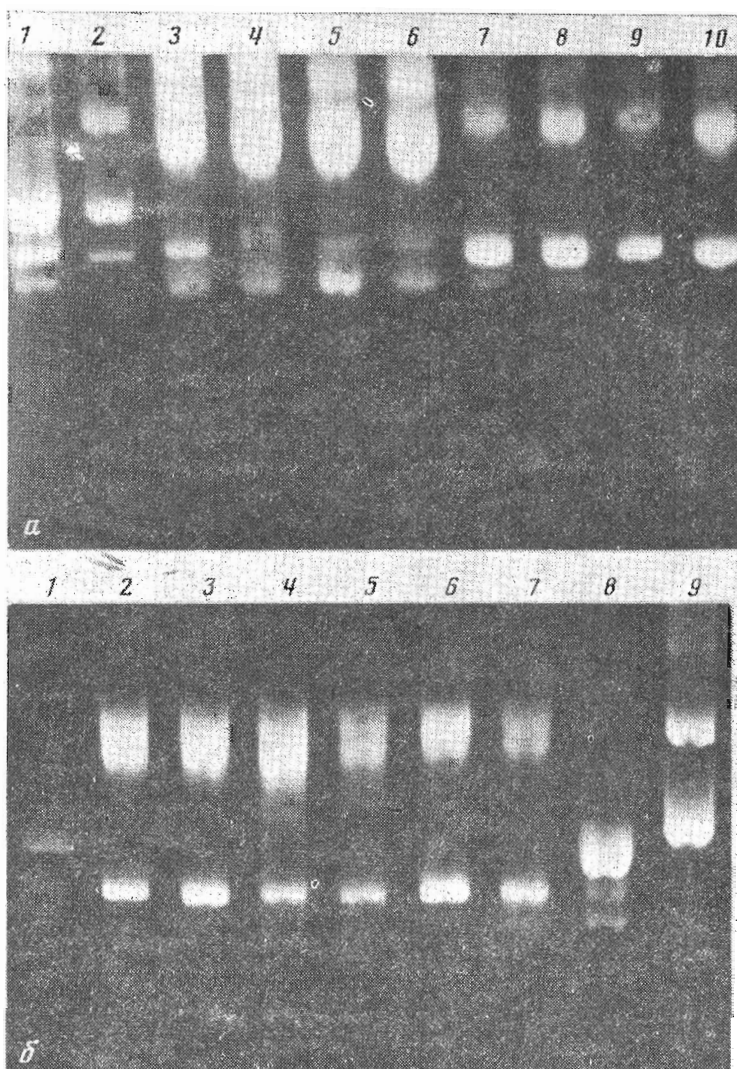


Рис. 6. Синтез двухцепочечной ДНК на матрице М13mpВ, направляемый олигонуклеотидами 20-мерами (а) и 17-мерами (б). а: 1 — ОЦ ДНК М13 mpВ; 2 — РФ ДНК М13 mpВ; 3—6 — реакции, катализируемые кленовским фрагментом ДНК-полимеразы I *E. coli* и направляемые 20-мерами; 20 (дор. 3, 4), 20-Et (дор. 5), 20-Et<sub>2</sub> (дор. 6); 7—10 — реакции, катализируемые ДНК-полимеразой I *E. coli* и направляемые 20 (дор. 7, 8), 20-Et (дор. 9), 20-Et<sub>2</sub> (дор. 10). б: остается неизменным

тидами мутагенеза служило относительное количество мутантных колоний, а также доля мутантных фаговых частиц в потомстве, определявшиеся по работе [12]. Результаты анализа суммированы в табл. 3. Из данных, полученных с 20-мерами, следует, что этилирование фосфатных групп олигонуклеотидов заметно увеличивает выход индуцированных мутантов. Этот эффект усиливается при замене фрагмента Кленова на полноценную ДНК-полимеразу I *E. coli*. Это позволило нам отказаться от применения препаратов фрагмента Кленова, отличающихся нестандартностью и меньшей доступностью, и использовать в дальнейшем только полную ДНК-полимеразу I *E. coli*. Данные по выходу мутантов, индуцированных 17-мером (17) и его этильными аналогами, показывают, что наилучшими мутагенами являются олигонуклеотиды, несущие две или три разнесенные этильные группировки, причем различные изомеры проявляют разный по величине мутагенный эффект. Следует подчеркнуть, что выход мутантов коррелирует с термостабильностью комплексов олигомером-мутагенов с ДНК.



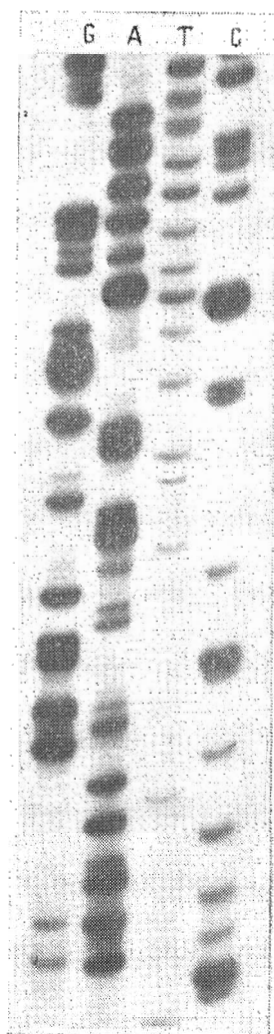


Рис. 7

Рис. 7. Структурный анализ (по методу Сэнгера) ДНК М13mpВ элонгацией праймера 20-Et с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli*

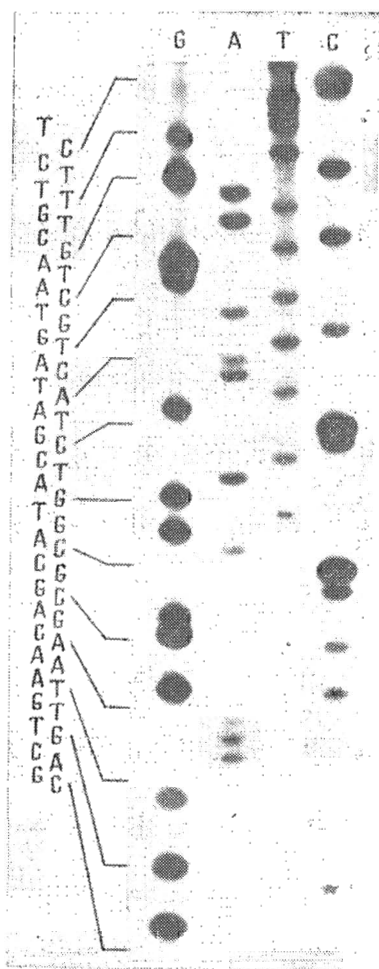


Рис. 8

Рис. 8. Анализ мутантной ДНК М13mp1ΔТ по методу Сэнгера. По горизонтали — реакции термминации, по вертикали — нуклеотидная последовательность измененного участка

Повышение эффективности мутагенеза при использовании фосфотриэфирных аналогов олигонуклеотидов можно объяснить их большей стабильностью к нуклеазам в условиях синтеза мутантной ДНК, а также, возможно, устойчивостью синтезированной гибридной ДНК к ферментам репарации. Устойчивость аналогов к действию 5' → 3'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы I находит подтверждение в экспериментах по секвенированию ДНК М13mpВ по Сэнгеру с использованием в качестве праймеров аналогов олигомеров и по применению в параллельных опытах ДНК-полимеразы I и фрагмента Кленова. При действии ДНК-полимеразы I на олигомер природного строения он разрушается, что приводит к «смазыванию» картины секвенирования. Напротив, при использовании этильных производных картины, полученные с помощью обоих ферментов, не различаются (рис. 7).

Присутствие триэфирных звеньев обеспечивает также устойчивость олигонуклеотидов к 3' → 5'-экзонуклеазам. Так, при действии на <sup>32</sup>P-меченые 20-меры 20-Et и 20-Et<sub>2</sub> Т4-ДНК-полимеразы, которая в отсутст-

Эффективность направленного сайт-специфического мутагенеза \*

Номер опыта	Олигонуклеотид **	Выход мутантов, % ***	
		колоний	фагов
1	20	1,5±0,2	0,8±0,1
2	20-Et	1,8±0,4	1,1±0,2
3	20-Et <sub>2</sub>	2,1±0,6	2,1±0,3
4	20	3,3±0,3	3,5±0,5
5	20-Et	7,0±2,7	9,7±2,8
6	20-Et <sub>2</sub>	7,6±0,9	7,5±1,7
7	17	0,73±0,06	
8	17-Et <sub>2</sub> -1	0,14±0,04	
9	17-Et <sub>2</sub> -2(1)	3,19±0,43	
10	17-Et <sub>2</sub> -2(2)	8,25±1,31	
11	17-Et <sub>3</sub> (1)	4,23±0,65	
12	17-Et <sub>3</sub> (2)	8,36±0,62	
13	17-Et <sub>3</sub> (3)	4,26±1,11	
14	17-Et <sub>4</sub>	Не обнaryжено	

\* В опытах 1-3 использовался фрагмент Кленова, в опытах 4-14 — полная ДНК-полимераза 1 *E. coli*.

\*\* Структура приведена на схеме 1.

\*\*\* Среднее арифметическое и стандартная ошибка по результатам 3-4 независимых опытов; в каждом опыте сделано 2-4 высева клеток *E. coli* JM103, трансформированных порознь и различающихся по срокам получения. Спонтанный фон *lac*-мутантов ~ 0,1%. В случае 17-меров подсчет фаговых частиц в потомстве не проводили.

вие dNTP проявляет 3' → 5'-экзонуклеазную активность, образуются олигомеры длиной 10 и 13 звеньев соответственно, обнаруживаемые электрофорезом в ПААГ. Это указывает на торможение экзонуклеазы вблизи фосфотриэфирных связей.

Для доказательства специфичности и направленности мутагенеза из каждого опыта произвольно отбирали несколько мутантных клонов и определяли первичную структуру их ДНК в участке связывания олигонуклеотидов-мутагенов [19]. Во всех вариантах наблюдалась единичная мутация ΔС [12], обусловленная неполной комплементарностью затравок матрицы (рис. 8). Наличие этильных заместителей при межнуклеотидных фосфатах не вызывало дополнительных изменений в структуре мутантных ДНК.

То, что этильные группы не мешают правильному копированию матрицы, было подтверждено экспериментами *in vitro*, в которых гексануклеотид <sup>32</sup>rTACGGA, комплементарный 3'-концевой области 20- и 17-меров, использовали как праймер, а аналоги 20-Et<sub>2</sub> и 17-Et<sub>2</sub>-2(1) — как матрицу при проведении полимеразной реакции (схема 2). В результате были получены комплементарные этилированным аналогам 20- и 14-меры, структура которых определена модифицированным методом Максама — Гилберта [48].

Схема 2



Введение в олигонуклеотиды защиты от нуклеаз, а также использование полноценной ДНК-полимеразы *E. coli* вместо фрагмента Кленова позволяет повысить эффективность и точность сайт-локализованного мутагенеза, расширить его возможности. Полученные результаты дают основание рассчитывать на проведение мутагенеза с помощью природных комбинаций ферментов, присутствующих в клетке. В предварительной серии опытов нами получены с высокими выходами мутанты, индуцированные добавлением аналогов мутагенных олигонуклеотидов к смеси ДНК и бактериальных клеток. Структура полученных мутантов подтверждена секвенированием. Подробные данные по направленному изменению структуры генов *in vivo* будут представлены в последующих публикациях.

### Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксирибонуклеозиды отечественного производства; 1,2,4-триазол (Fluka, Швейцария); тетразол, 2,4,6-мезитилсульфохлорид, пластинки для ТСХ Kieselgel 60F<sub>251</sub> и Kieselgel 60F<sub>251</sub> silanisiert (Merck, ФРГ); [<sup>32</sup>P]rATP (1000 Ки/моль), [<sup>32</sup>p]dNTP (C, A, T) (1000 Ки/моль) отечественного производства.

ДНК-лигаза фага T4 (КФ 6.5.1.1), полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) и ДНК-полимераза (КФ 2.7.7.7) фага T4 получены из НИКТИ БАВ (Бердск); фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I (КФ 2.7.7.7) любезно предоставлен С. Х. Дегтяревым, ДНК-полимераза I *E. coli* (КФ 2.7.7.7) — И. А. Назаренко (ВНИИ МБ, пос. Кольцово). Остальные реактивы и среды описаны в работе [21].

ТСХ проводили в системах хлороформ — этанол (метанол), 9 : 1 (А); ацетон — вода, 1 : 1 (Б) (обращенно-фазовая); гель-фильтрацию — на сефадексе LH20 в системе хлороформ — этанол, 7 : 3 (В).

Дезоксирибонуклеозиды (А, С, G) N-ацелировали по методике [22]. Монометокситрипильную защитную группу удаляли по методу [16], β-цианэтильную — по методу [17].

*Получение ди- и тринуклеотидов, содержащих этильные заместители по межнуклеотидным фосфатам.* 50—100 мкмоль *n*-хлорфенильного производного ди- или тринуклеотида высушивали азетропной отгонкой с абс. пиридином (2 × 3 мл). К остатку добавляли 0,3—0,6 мл сухого хлороформа, 0,3—0,6 мл (5—10 ммоль) абс. этанола, быстро присыпали безводный фтористый цезий (0,5—1 ммоль) и энергично встряхивали до растворения большей части фторида. Через 40—60 мин (ТСХ в системе Б) к смеси добавляли 0,2—0,4 мл воды и встряхивали. Органический слой отделяли, водную фазу промывали 20% этанолом в хлороформе (2 × 1 мл), органические вытяжки упаривали, растворяли в 20% ацетонитриле и наносили на колонку (1 × 20 см) с TMS-силикагелем. Элюировали градиентом ацетонитрила в воде по 50 мл (20 → 60%). Гомогенность выделенных продуктов определяли ТСХ в системе Б.

*Межнуклеотидная конденсация.* Нуклеозидный и нуклеотидный компоненты в соотношении 1 : 1,5 высушивали многократным упариванием с абс. пиридином, добавляли 2,5-кратный избыток 1-мезитилсульфонилтетразола в расчете на нуклеотид. Через 30—60 мин (ТСХ в системе А) реакцию останавливали добавлением воды (1/10 объема) при охлаждении, смесь упаривали, высушивали отгонкой с *n*-пропанолом и остаток хроматографировали на колонке (2,5 × 60 см) с сефадексом LH-20 в системе В (150 мл/ч). Целевой продукт выходит с колонки первым (ТСХ в системе А). При синтезе некоторых олигонуклеотидов выделение защищенных промежуточных блоков и конечных продуктов проводили на колонке (1,5 × 20 см) с TMS-силикагелем в градиенте ацетонитрила в воде (табл. 2, смеситель и резервуар по 100 мл).

*Полное удаление защитных групп и выделение олигонуклеотидов.* Полностью защищенный олигонуклеотид, очищенный обращенно-фазовой хроматографией, или реакционную смесь обрабатывали 10% раствором трихлоруксусной кислоты в хлороформе по [16]. Остаток после упаривания растворяли в 1 мл пиридина, добавляли 5 мл смеси диоксан — пиридин — вода (8 : 1 : 1), содержащей 0,02 M CsF, и выдерживали 24 ч при 20°С. Смесь упаривали, приливали 5—10 мл раствора пиридин — конц. NH<sub>3</sub>, 1:10, оставляли на 2 сут, упаривали и остаток обессоливали на колонке (1 × 30 см) с биогелем P4 в 0,005 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Из первого пика целевой олигонуклеотид выделяли ионообменной ВЭЖХ на хроматографе

Altex на колонке с Partisil SAX-10 (3,2 × 250 мм) в градиенте К-фосфатного буфера 0,02—0,3 М, рН 6,5, в 30% ацетонитриле. Дополнительную очистку проводили обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке с Lichrosorb RP-18 (3,2 × 250 мм) в градиенте ацетонитрила в 0,05 М триэтиламмоний-ацетате (5—20%, рН 6,5). Структуру олигонуклеотидов подтверждали модифицированным методом Максама — Гилберта [18].

*Ферментативный гидролиз.* К 0,01 ОЕ<sub>266</sub> 5'-<sup>32</sup>P-меченого олигонуклеотида в 50 мкл буфера, содержащего 0,01 М трис-НСl (рН 8,9), 0,001М MgCl<sub>2</sub>, добавляли 2—3 ед. акт. ДНК-полимеразы фага Т4. Через каждые 5 мин пробы по 5 мкл прогревали 15 мин при 65° С. Суммарный гидролизат упаривали и анализировали электрофорезом в 20% ПААГ.

*Щелочной гидролиз.* К 0,01 ОЕ<sub>266</sub> 5'-фосфорилированного олигонуклеотида в 5 мкл воды добавляли 5 мкл 1 М LiOH и выдерживали 2,5 мин при 90° С. Добавляли 200 мкл 2% LiClO<sub>4</sub> в ацетоне, центрифугировали, осадок промывали этанолом (2 × 200 мкл) и анализировали электрофорезом в 20% ПААГ.

*Общая методика мутагенеза.* Комплекс ОЦ ДНК М13mpV (1 пмоль) с 5'-фосфорилированным олигонуклеотидом-мутагеном (20 пмоль) получали по работе [8]. К смеси добавляли 10 мкл раствора, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ дитиотреит, 1 мМ каждого из четырех dNTP и гАТР, 2,5 ед. акт. ДНК-полимеразы I *E. coli* и 10 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т4. Смесь инкубировали 5 мин при 22° С, а затем 20 ч при 15° С или 6 ч при 22° С. Фермент инактивировали прогреванием смеси в течение 10 мин при 65° С. Полноту образования двухцепочечной ДНК контролировали электрофорезом в 1% агарозе.

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* JM103 и выделение мутантной ДНК проводили как описано в работе [21].

Структуру мутантной ДНК фага М13 определяли по методике [19].

Температуру разрушения комплексов ОЦ ДНК с олигонуклеотидами определяли по методу [20] в следующем варианте: объем гибридизационной смеси 2 мл, начальная температура 10° С, время гибридизации 2 ч. После гибридизации фильтры отмывали при разных температурах (рис. 5) в течение 5 мин в условиях высокой ионной силы (0,9 М NaCl, 0,09 М цитрат натрия).

*Анализ матричных свойств этиловых эфиров олигонуклеотидов.* 250 пмоль 20-Et<sub>2</sub> или 17-Et<sub>2</sub>-2(1) и 250 пмоль <sup>32</sup>P-TACGGA в 20 мкл буфера, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ NaCl и 1 мМ дитиотреит, выдерживали сначала 5 мин при 55° С, а затем 30 мин при 6—8° С. К смеси добавляли 5 мкл буфера, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит, четыре dNTP (каждый 1 мМ), 1 ед. акт. фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Смесь выдерживали 70 ч при 6—7° С и анализировали в 20% ПААГ. После электрофореза соответствующие полосы вырезали и подвергали электроэлюции в 0,01 М трис-боратном буфере, рН 8,3, при 500 В в течение 1 ч. Элюцировали на DE-бумагу (Whatman DE-84), предварительно несколько раз промытую раствором 2 М LiCl с 5 мМ EDTA (рН 8), водой и этанолом, затем экстрагировали с бумаги 1,5 М LiCl (2 × 30 мкл) в течение 15 мин при 55° С. Элюаты объединяли, разбавляли 6 объемами 2% раствора LiClO<sub>4</sub> в ацетоне. Осадок после центрифугирования промывали спиртом и высушивали. Структуру олигонуклеотидов определяли модифицированным методом Максама — Гилберта [18].

Авторы выражают глубокую признательность В. А. Бадаевой и Г. Н. Харькиной за большую помощь в синтезе олигодезоксирибонуклеотидов, С. Х. Дегтяреву и И. А. Назаренко — за препараты ДНК-полимеразы I и ее кленовского фрагмента, Беликову С. И. за рекомендацию по выделению защищенных олигонуклеотидов на сефадексе LH-20.

1. Zoller M. J., Smith M. Meth. Enzymol., 1983, v. 100, p. 468—500.
2. Temple G. F., Dozy A. M., Roy K. L., Kan Y. W. Nature, 1982, v. 296, № 5857, p. 537—540.
3. Ефимов В. А., Мирских О. В., Чазмахчева О. Г., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 5, с. 621—627.
4. Kramer W., Druza V., Jansen H.-W., Kramer B., Pflugfelder M., Fritz H.-J. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 24, p. 9441—9456.
5. Wallace R. B., Schold M., Johnson M. J. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 15, p. 3647—3656.
6. Baas P. D., Teertstra W. R., van Mansfeld A. D. M., Jansz H. S., van der Marel G. A., Veeneman G. H., van Boom J. H. J. Mol. Biol., 1981, v. 152, № 4, p. 615—639.
7. Charles A. D., Gautier A. E., Edge M. D., Knowies J. R. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 14, p. 7930—7932.
8. Zoller M. J., Smith M. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 20, p. 6487—6500.
9. Петренко В. А., Поздняков П. И., Киприянов С. М., Болдырев А. Н., Семенова Л. Н., Сиволобова Г. Ф. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 2, с. 289—292.
10. Петренко В. А., Поздняков П. И., Сиволобова Г. Ф., Шубина Т. Н. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 431—435.
11. Gronenborn B., Messing J. Nature, 1978, v. 272, № 5651, p. 375.
12. Петренко В. А., Семенова Л. Н., Сиволобова Г. Ф., Гуторов В. В., Каргинов В. А. Докл. АН СССР, 1985, т. 281, № 2, с. 476—481.
13. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353—371.
14. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A. Can. J. Chem., 1976, v. 54, № 3, p. 670—672.
15. Калашников В. В., Самуков В. В., Шубина Т. Н., Ямщиков В. Ф. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 5, с. 666—672.
16. А. с. 828671 (СССР). Способ удаления тритильных защитных групп с производных нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов/Беликов С. И., Горбунов Ю. А., Попов С. Г. Заявл. 14.05.79, № 2768602/23-04. Оpubл. в Б. И., 1982, № 12.
17. А. с. 809866 (СССР). Способ удаления цианэтильной защитной группы с производных моно- и олигонуклеотидов/Беликов С. И., Горбунов Ю. А., Попов С. Г. Заявл. 14.05.79, № 2793503/23-04. Оpubл. в Б. И., 1982, № 12.
18. Барам Г. И., Грачев С. А. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 10, с. 1420—1422.
19. Sanger F., Coulson A. R., Barrell B. G., Smith A. J. H., Roc B. A. J. Mol. Biol., 1980, v. 143, № 2, p. 161—178.
20. Chan V.-L., Smith M. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 5, p. 2407—2419.
21. Петренко В. А., Сиволобова Г. Ф., Семенова Л. Н., Болдырев А. Н., Каргинов В. А., Гуторов В. В. Мол. генетика, микробиол. и вирусол., 1985, № 8, с. 38—44.
22. Ti G. S., Gaffney B. L., Jones R. A. J. Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 5, p. 1316—1319.

Поступила в редакцию  
5.XII.1985

После доработки  
14.II.1986

#### SITE-LOCALIZED MUTAGENESIS DIRECTED BY PHOSPHOTRIESTER ANALOGUES OF OLIGONUCLEOTIDES

PETRENKO V. A., POZDNYAKOV P. I., KIPRIYANOV S. M.,  
BOLDYREV A. N., SEMYONOVA L. N., SIVOLOBOVA G. F.

All-Union Institute of Molecular Biology, Kol'tsovo,  
Novosibirsk Region

17- and 20-mer oligodeoxyribonucleotides and their analogues, containing one to four phosphate groups esterified with ethyl alcohol in different positions of oligonucleotide chain, were synthesized by modified triester method. Ethylated di- and trinucleotide blocks were prepared by transesterification method from chlorophenyl derivatives. The structures of the oligonucleotides were confirmed by Maxam — Gilbert sequencing method. Oligonucleotides were not totally complementary to the N-terminal region of *lac Z'* gene (coding for N-terminal fragment of  $\beta$ -galactosidase) of phage M13mp8 DNA and induced the formation of the proposed deletion mutant DNA M13mp1AT. Phosphotriester analogues were more effective mutagens as compared to phosphodiester oligonucleotides due to their stability to nucleases. The use of *E. coli* DNA-polymerase I provided the increase in the mutant yields in case of the phosphotriester analogues. The stability of the analogues to 5'  $\rightarrow$  3'- and 3'  $\rightarrow$  5'-endonuclease action, the specificity of oligonucleotide: DNA binding and the structure of mutant DNA were studied by the Sanger sequencing method.