



УДК 577.113.4 : 577.21

ВВЕДЕНИЕ *cos*-УЧАСТКА В ДНК ФАГА M13
И ЕЕ УПАКОВКА В БЕЛКИ ФАГА λ Забаровский Е. Р., Дежирёв Д. Г., Нурбекёв М. К.,
Киселев Л. Л.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Разработка метода расшифровки первичных структур нуклеиновых кислот на основе одноцепочечных матриц с применением терминаторов [1] позволила перейти к так называемому киросиквенсу — определению нуклеотидных последовательностей длиной в тысячи оснований [2, 3]. Этот метод стимулировал создание векторов на основе фага M13, позволяющих легко получать большие количества рекомбинантной одноцепочечной ДНК [3]. Однако возможности киросиквенса при использовании фагов группы M13 реализуются не полностью из-за сложностей, связанных с молекулярным клонированием достаточно больших фрагментов ДНК в этих векторах: низкого выхода рекомбинантной фаговой ДНК, нестабильности вставок, низкой эффективности трансформации клеток *E. coli*. Особенно сложно клонировать большие фрагменты ДНК по «тупым» концам, поскольку использование полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000), стимулирующего лигирование таких молекул, приводит к образованию высокомолекулярных продуктов [4].

С другой стороны, созданы особые векторы для клонирования больших фрагментов ДНК-космиды, содержащие *cos*-участок фага λ , который обеспечивает упаковку рекомбинантной ДНК в белки оболочки фага λ *in vitro* [5]. Космиды невелики по размеру (3—6 тыс. п.о.), и в них можно клонировать фрагменты ДНК длиной до 45 тыс. п.о.

Таким образом, для целей киросиквенса было бы оптимальным совмещение достоинств фага M13 и космидных векторов, т. е. создание вектора, в котором можно было бы клонировать большие фрагменты и получать рекомбинантные ДНК в одноцепочечной форме.

Для этих целей можно было бы использовать упаковку рекомбинантной ДНК в белки фага M13 *in vitro*, поскольку известно, что в фаговые частицы может упаковаться ДНК величиной до 50 тыс. п.о. [6]. Однако такая система, насколько нам известно, еще не разработана, и поэтому мы решили пойти по другому пути — ввести в ДНК фага M13 *cos*-участок фага λ , наличие которого позволяет производить упаковку рекомбинантных молекул ДНК в белки оболочки фага λ *in vitro* и тем самым значительно увеличивать эффективность трансфекции бактериальных клеток.

Принцип конструирования гибридного фага, обозначенного как MС18, представлен на схеме (рис. 1). В работе использован вариант фага M13 — mp18 [3] и *cos*-участок из космиды pHC79 [5]. Клонирование *cos*-участка по *Hind*II-сайту полилинкера обеспечивает возможность последующего встраивания фрагмента ДНК практически по любому из сайтов рестрикции в полилинкере, что удобно для дальнейшего определения первичной структуры по методу киросиквенса.

Получение экстрактов и упаковку ДНК в белки фага λ проводили как описано [7]. Лигирование ДНК проводили в течение 12—16 ч при 4° С в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН ~ 7,5), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреит, 1,5 мМ АТР, 12% ПЭГ-6000 и 2—10 ед. акт. Т4 ДНК-лигазы на 1 мкг ДНК. Суммарная концентрация ДНК составляла ~ 0,1 мг/мл. Очистку ДНК от ПЭГ-6000 проводили как описано ранее [8]. Трансфекцию клеток *E. coli* JM109 проводили следующим образом: к 0,5 мл свежей куль-

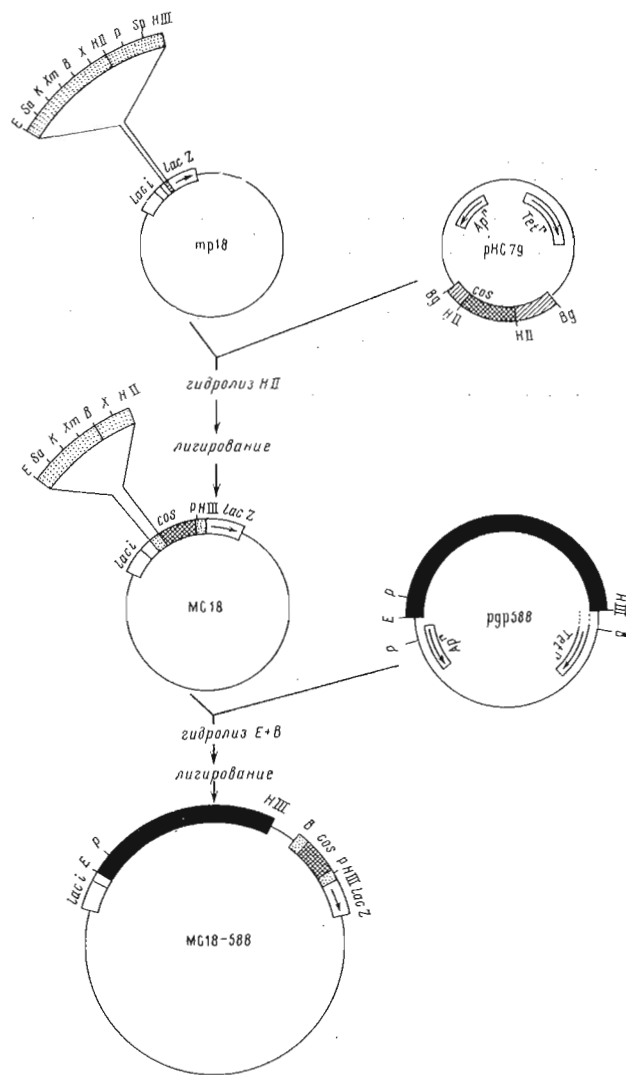


Рис. 1. Схема конструирования фага MC18.
Сокращения: *E* — *EcoRI*, *Sa* — *SacI*, *K* — *KpnI*, *Xm* — *XmaI*, *B* — *BamHI*, *X* — *XbaI*, *HII* — *HindII*, *P* — *PstI*, *Sp* — *SphI*, *HIII* — *HindIII*, *Bg* — *BgIII*.

Для упрощения на векторных молекулах и в полилинкере указаны не все участки расщепления рестриктазами

туры бактерий (0,6—1,2 ОЕ₆₀₀) добавляли суспензию фаговых частиц и инкубировали 15—30 мин при 37° С без перемешивания и рассеивали на чашку Петри (Ø 10 см).

Полученный таким образом фаг, содержащий *cos*-участок фага λ , использовали в качестве вектора для молекулярного клонирования *BamHI* — *EcoRI*-фрагмента плазмиды рGP588 [9], который содержит участок генома человека, гомологичный нуклеотидным последовательностям онкогена *mos* и ретровируса лейкоза мышей Молони [9]. Этот фрагмент был клонирован по *BamHI*—*EcoRI*-сайтам MC18 (схема), причем существенных перестроек в результате клонирования не было обнаружено (рис. 2), несмотря на наличие по крайней мере семи *Alu*-повторов, которые обычно являются причиной нестабильности таких ДНК. На рисунке видно, что размеры образующихся в результате гидролиза фрагментов соответствуют ожидаемым (*BamHI*—*EcoRI*-фрагмент рGP488 ~ 5 тыс. п.о. и фрагмент *HindII*—*HindII* с *cos*-участком ~ 1 тыс. п.о.), как следует из схемы клонирования.

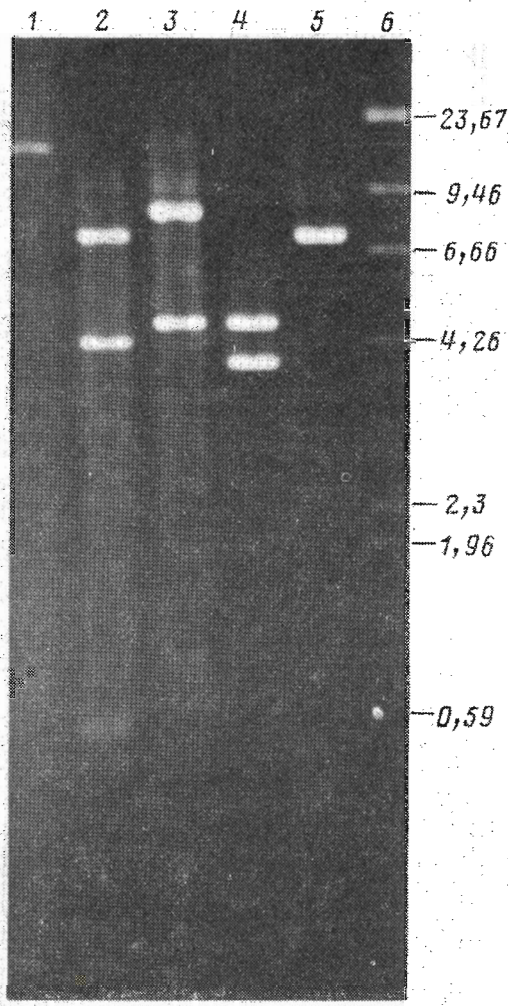


Рис. 2. Электрофорез в 1% агарозе ДНК фагов MS18-588 (1-3), rGP588 (4), mp18 (5), λ (6). При гидролизе ДНК использовали следующие рестриктазы: *EcoRI* (1, 5), *EcoKI* + *BamHI* (3, 4), *EcoRI* + *BamHI* + *HindIII* (2), *HindIII* (6). Справа указаны размеры маркерных фрагментов ДНК в тыс. п. о.

Эффективность трансфекции *E. coli* JM109 рекомбинантной ДНК составляла 10^5 — 10^6 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на 1 мкг ДНК вектора при эффективности упаковки ДНК фага λ EMBL3A [10] $\sim 10^6$ БОЕ/мкг ДНК. Поскольку получение экстрактов с эффективностью упаковки 10^7 — 10^8 БОЕ/мкг ДНК λ EMBL3A [7] не вызывает затруднений, эффективность трансфекции бактериальных клеток рекомбинантной ДНК фага MS можно увеличить в десятки раз.

ФАГ MS18 был также использован для клонирования по «тупым» концам *EcoRI*—*HindIII*-фрагмента rGP588 $\sim 4,5$ тыс. п.о. по *EcoRI*-участку MS18 (данные не приводятся). «Липкие» концы, образующиеся после расщепления рестриктазами, достраивали с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* фрагмент Кленова.

Таким образом, была показана возможность упаковки рекомбинантной ДНК фага M13, содержащего *cos*-участок, в белки фага λ и эффективной трансфекции такой ДНК клеток *E. coli*. Возможно, разработанная нами система будет наиболее удобной для клонирования больших фрагментов ДНК, особенно при встраивании в вектор фрагментов ДНК по «тупым»

концам. Поскольку ДНК фага М13 длиной ~50 тыс. п.о. [6] может упаковываться в инфекционные частицы фага, это открывает возможность для создания библиотек генов на основе фагов типа МС.

Другое преимущество фагов типа МС — крайне низкая эффективность упаковки исходных векторных молекул (1—0,1% от разрезанных и лигированных), что повышает выход рекомбинантных фагов (обычно 10—60%). Остаточная способность репликативной формы фага МС18 упаковываться в белки фага λ , по-видимому, связана с присутствием конкатемерных молекул. Разрезанная по полилинкеру ДНК МС18 практически не образует жизнеспособных фаговых частиц при упаковке в белки фага λ (<10 БОЕ/мкг ДНК при эффективности упаковки ~10⁶ БОЕ/мкг ДНК бактериофага λ EMBL3A).

Использование фага МС для kilosиквенса будет описано отдельно.

Авторы благодарят И. М. Чумакова за ценные критические замечания по ходу работы и А. Н. Гуляеву за помощь в проведении экспериментов. Фаг λ EMBL3A был любезно предоставлен нам Европейской лабораторией молекулярной биологии (Гейдельберг).

ЛИТЕРАТУРА

1. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 12, p. 5463—5467.
2. Henikoff S. Gene, 1984, v. 28, № 3, p. 351—359.
3. Caleste J.-P., Vieira J., Messing J. Gene, 1985, v. 33, № 1, p. 103—119.
4. Zimmerman S. B., Pfeiffer B. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 19, p. 5852—5856.
5. Hohn B., Collins J. Gene, 1980, v. 11, № 4, p. 291—298.
6. Messing J. Proceedings of the third cleveland symposium on macromolecules. Amsterdam: Elsevier, 1981, p. 143—153.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984, с. 244—254.
8. Забаровский Е. Р., Алликметс Р. Л. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 849—852.
9. Забаровский Е. Р., Чумаков И. М., Прасолов В. С., Киселев Л. Л. Молекулярн. биология, 1984, т. 18, № 1, с. 60—82.
10. Firschauf A.-M., Lehrach H., Poustka A., Murray N. J. Mol. Biol., 1983, v. 170, № 4, p. 827—854.

Поступило в редакцию
25.11.1986

INSERTION OF *cos* SITE INTO DNA OF PHAGE M13 AND ITS PACKAGING INTO λ PHAGE PROTEINS

ZABAROVSKY E. R., DEMIROV D. G., NURBEKOV M. K., KISSELEV L. L.

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

The *cos*-site of λ phage from pHC79 cosmide is transferred to DNA from M13 mp18 phage. The recombinant DNA thus obtained (MC18) is efficiently packaged into λ proteins in vitro. The *Bam*HI-*Hind*III fragment of pGP588 (a pBR322 derivative containing fragment of human DNA) is subcloned into MC18. Although this pGP588 fragment contains numerous *Alu* repeats, no essential rearrangements of the insert were revealed. The efficiency of infection by recombinant DNA packaged with λ proteins is about 1·10⁵ pfu/ μ g DNA, whereas in the similar conditions the efficiency of λ EMBL3A was 1·10⁶ pfu/ μ g. It is assumed that the MC vectors might be suitable for cloning and sequencing large fragments either with cohesive or blunt ends. It opens also the way to construct genomic libraries in single-stranded phages.