



УДК 547.963.32.057:577.213.3

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЗАМЕНЫ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ А ДНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ I *E. COLI* В ОЛИГОНУКЛЕОТИДНАПРАВЛЕННОМ МУТАГЕНЕЗЕ *Петренко В. А., Киприянов С. М., Селенова Л. Н., Болдырев А. Н.*

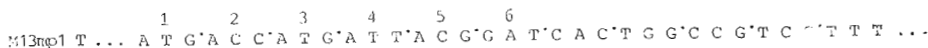
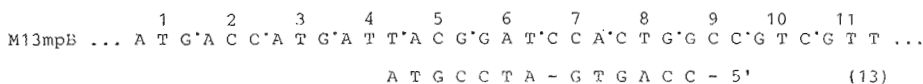
*Всероссийский научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Исследована возможность использования в опытах по олигонуклеотиднаправленному мутагенезу полной ДНК-полимеразы I *E. coli*. Найдены условия, в которых преобладает полимеразная активность фермента и не проявляется его 5'→3'-экзонуклеазная активность. Показано, что замена фрагмента Кленова более доступной ДНК-полимеразой I не приводит к уменьшению эффективности и точности мутагенеза.

Сайт-локализованный мутагенез, направляемый олигонуклеотидами, широко используется для получения точковых мутаций, вставок и делеций [1, 2]. Для мутагенеза олигонуклеотид гибридуется с одноцепочечной ДНК-матрицей и удлиняется *in vitro* с помощью кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I *E. coli*. Вновь синтезированная цепь ДНК замыкается в кольцо ДНК-лигазой фага T4, и полученная гетеродуплексная ДНК используется для трансформации компетентных клеток *E. coli*. Широко распространено мнение, что для ферментативного синтеза *in vitro* второй (мутантной) цепи ДНК необходимо использовать большой (кленовский) фрагмент ДНК-полимеразы I *E. coli* (ДНК-полимеразу А), не обладающий 5'→3'-экзонуклеазной активностью [1]. Считается, что использование интактной ДНК-полимеразы I *E. coli* с присущей ей 5'→3'-экзонуклеазной активностью будет приводить к деградации олигонуклеотида-мутагена и вследствие этого к падению эффективности мутагенеза [3]. При изучении мутагенеза, направляемого фосфотриэфирными аналогами олигонуклеотидов, мы обнаружили, что и в случае диэфирных праймеров относительно небольшой длины применение полной ДНК-полимеразы I *E. coli* для синтеза мутантной цепи гетеродуплексной ДНК *in vitro* дает больший выход мутантов, чем в опытах с использованием кленовского фрагмента ДНК-полимеразы [4].

Настоящая работа посвящена исследованию возможности использовать в опытах по олигонуклеотиднаправленному мутагенезу полную ДНК-полимеразу I, прежде всего по подбору условий, в которых преобладает полимеразная активность фермента и не проявляется его 5'→3'-экзонуклеазная активность. Для этой цели использовали разработанную ранее [5] мутационную систему, включающую, в частности, ДНК фага M13mpV и тридекадезоксирибонуклеотид-мутаген, не полностью комплементарный началу гена β-галактозидазы в ДНК фага M13mpV. Вводимая с помощью

Схема превращения M13mpV в M13mp1ΔT в результате мутагенеза



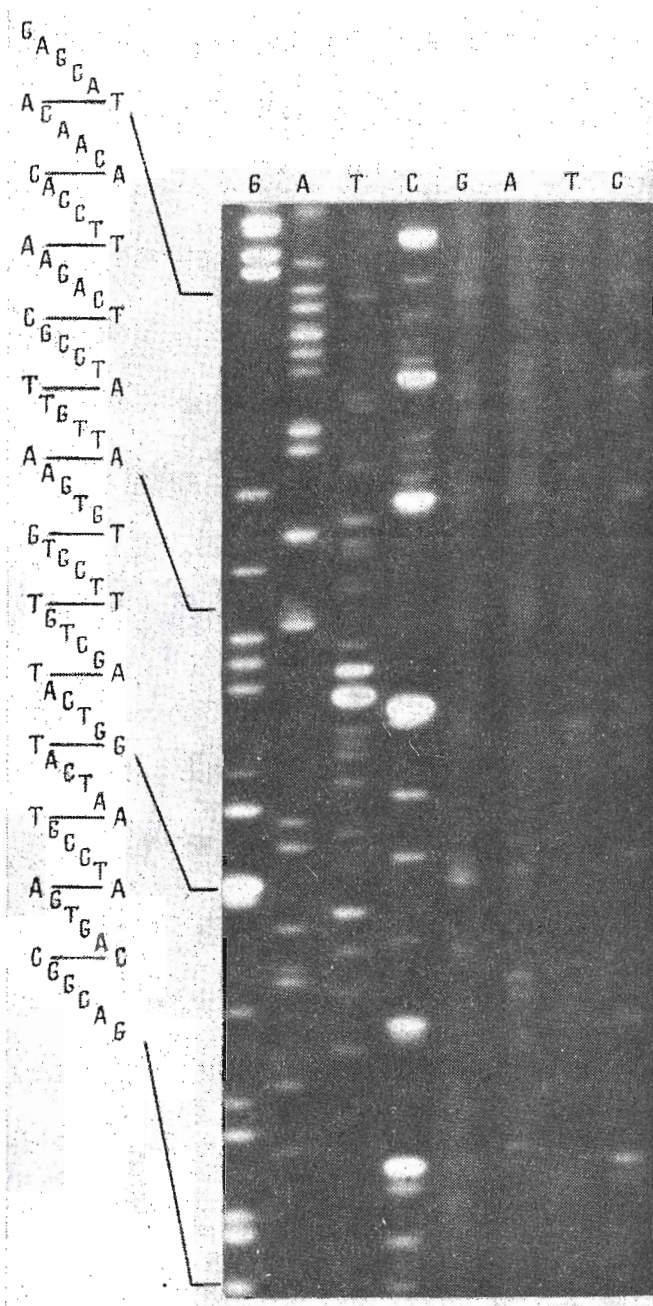


Рис. 1. Секвенирование ДНК по методу Сэнгера с использованием фрагмента Клейера (а) и полной ДНК-полимеразы I (б)

олигонуклеотида мутация ΔC (схема) приводит к изменению фенотипа ($Lac^+ \rightarrow Lac^-$) трансформированных бактерий, что легко тестируется на чашках с индуктором β -галактозидазы изопропилтио- β -D-галактопиранозидом и хромофорным субстратом β -галактозидазы 5-бром-3-индолил- β -D-галактопиранозидом [5]. Мутагенез проводили, используя полную ДНК-полимеразу I *E. coli* и ДНК-лигазу фаза T4 для синтеза *in vitro* мутантной цепи гетеродуплексной ДНК в условиях высоких концентраций (0,5 мМ) dNTP в реакционной смеси. Наличие 5' \rightarrow 3'-экзонуклеазной активности в ферменте подтверждали секвенированием ДНК по методу Сэнгера с использованием ДНК-полимеразы I *E. coli*. В этом случае картина секвенирования представляла собой «часток» полинуклеотидов, различающихся

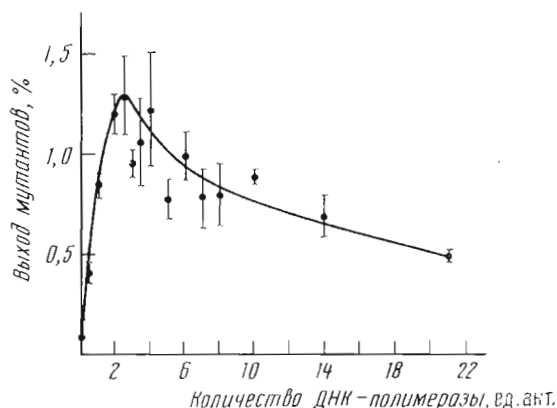


Рис. 2. Зависимость выхода мутантов ($\bar{X} \pm Sm$ [6]) от количества в реакционной смеси ДНК-полимеразы I *E. coli* (15° С, 20 ч, 10 ед. акт. ДНК-лигазы Т4). Приведены данные 3-4 независимых экспериментов

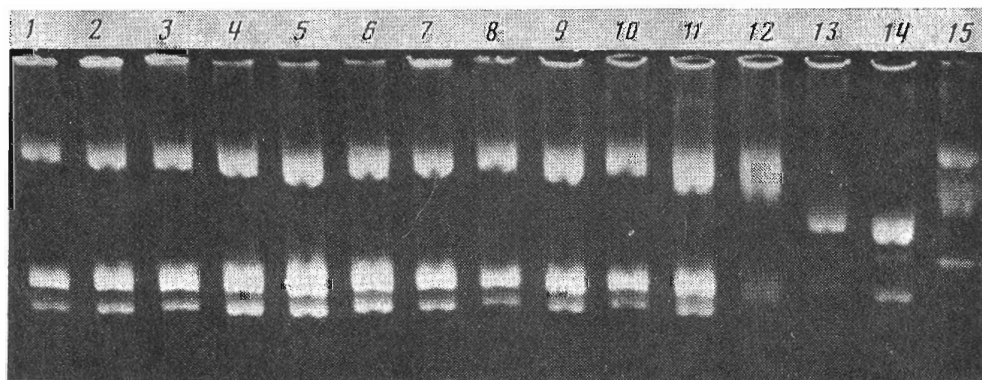


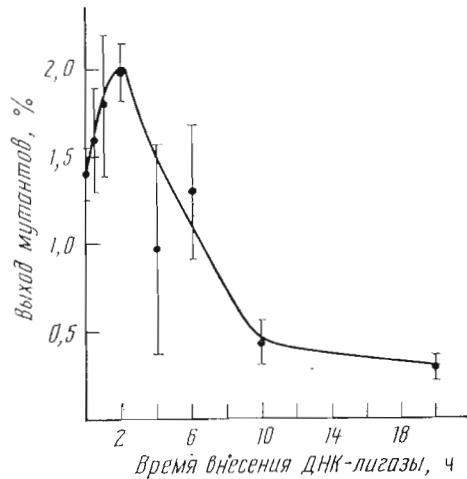
Рис. 3. Образование двухцепочечной ДНК при использовании различных количеств ДНК-полимеразы I в присутствии ДНК-лигазы Т4 (электрофорез в 1% агарозном геле). Содержание ДНК-полимеразы I *E. coli* в пробе (ед. акт.): 1 - 21; 2 - 14; 3 - 10; 4 - 8; 5 - 7; 6 - 6; 7 - 5; 8 - 4; 9 - 3; 10 - 2; 11 - 1; 12 - 0,5; 13 - 0,25; 14 - 0; 15 - репликативная форма ДНК М13mpV

на одно звено, во всех четырех реакциях (G-, A-, T-, C-реакции) из-за деградации вновь синтезированной цепи ДНК под действием 5'→3'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы I (рис. 1). В контрольных экспериментах с использованием кленовского фрагмента ДНК-полимеразы наблюдалась нормальная картина секвенирования прилегающего к праймеру участка ДНК.

Кривая зависимости выхода мутантов от количества ДНК-полимеразы I в реакционной смеси имеет вид колокола (рис. 2). Низкий выход мутантов при использовании менее чем 1 ед. фермента, по-видимому, объясняется тем, что такого количества полимеразы недостаточно для завершения синтеза мутантной цепи ДНК (рис. 3). При избытке же фермента часть молекул ДНК-полимеразы может связаться с 5'-концом олигонуклеотида-мутагена, что приводит, очевидно, к уничтожению неспаренности и падению эффективности мутагенеза.

Можно было предположить, что сохранение эффективности мутагенеза при использовании питательной ДНК-полимеразы I вместо ДНК-полимеразы А обусловлено присутствием ДНК-лигазы, молекулы которой связываются с 5'-концом олигонуклеотида-мутагена, защищая таким образом праймер от 5'→3'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы. В таком случае добавление в инкубационную смесь лигазы после ДНК-полимеразы приводило бы к падению эффективности мутагенеза. Чтобы проверить это, мы исследовали зависимость выхода мутантов от времени добавления

Рис. 4. Зависимость выхода мутантов ($X \pm Sm$ [6]) от времени добавления ДНК-лигазы T4 к смеси ДНК M13mpV, 13-мера и ДНК-полимеразы I *E. coli* (15° С, 2,5 ед. акт. ДНК-полимеразы I, 20 ед. акт. ДНК-лигазы T4). Представлены данные 3 независимых экспериментов



ДНК-лигазы к полимеразной смеси, содержащей ДНК M13mpV, 13-мер и ДНК-полимеразу I *E. coli*, в условиях синтеза гетеродуплексной ДНК. Согласно рис. 4, эффективность мутагенеза уменьшается при добавлении лигазы через 4–6 ч после начала полимеразной реакции, что соответствует времени завершения синтеза мутантной цепи ДНК при 15° С (рис. 5). Таким образом, проявление 5'→3'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы I начинается только после завершения синтеза мутантной цепи в случае, если эта цепь не замыкается в кольцо ДНК-лигазой.

Многие авторы предлагают проводить ферментативные реакции синтеза мутантной гетеродуплексной ДНК *in vitro* в течение 20 ч [1, 2, 7]. Нами показано, что полимеразная реакция завершается при 15° С за 6 ч (рис. 5) и при комнатной температуре (20–23° С) за 4 ч (данные не приведены). Чтобы ДНК-лигаза T4 замкнула в кольцо уже синтезированную мутантную цепь, достаточно 1 ч при 15° С (рис. 6). Поэтому с использованием предлагаемых модификаций можно втрое сократить длительность ферментативных реакций при проведении олигонуклеотиднаправленного мутагенеза.

Выход анализируемых в модельной системе мутантов составлял 1,5–2,0% (рис. 2 и 4) при использовании ДНК-полимеразы I *E. coli* и 1,6±0,3% при использовании кленовского фрагмента (данные шести независимых экспериментов). Анализ по методу Сэнгера [8] первичной структуры нескольких мутантных ДНК, полученных с использованием ДНК-полимеразы, подтвердил точность превращений.

Кленовский фрагмент более дорог и менее доступен по сравнению с ДНК-полимеразой I *E. coli*. Он отличается меньшей точностью копирования ДНК, особенно при прохождении структурированных участков ДНК-матрицы, что является одной из причин возникновения незапланированных делеций и вставок при проведении олигонуклеотиднаправленного мутагенеза [2, 9]. Данные, полученные нами в экспериментах по сайт-локализованному мутагенезу генов, указывают на то, что использование ДНК-полимеразы I при проведении реакций синтеза мутантной цепи ДНК *in vitro* позволяет повысить точность сайт-локализованного мутагенеза (эти результаты будут опубликованы позднее).

Из представленных в настоящей работе данных следует, что для олигонуклеотиднаправленного мутагенеза целесообразно применять ДНК-полимеразу I *E. coli* вместо обычно используемой ДНК-полимеразы А.

Экспериментальная часть

Фаги M13mpV и M13mp1ΔT, олигонуклеотид (13), штамм *E. coli* JM103 описаны ранее [5]. В работе использовали кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I *E. coli* и ДНК-лигазу фага T4 производства НИКТИ БАН (Бердск), ДНК-полимеразу I *E. coli*, любезно предоставленную И. А. Назаренко (ВНИИ МБ), агарозу фирмы Sigma (Туре I, low EEO).

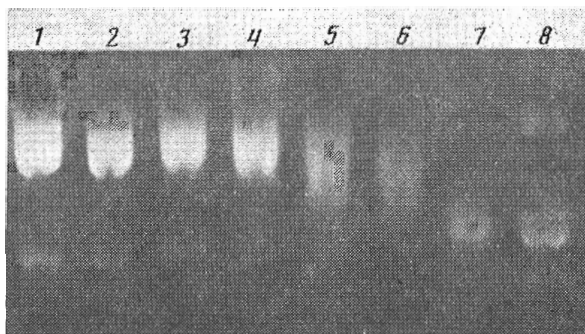


Рис. 5. Кинетика полимеразной реакции (без лигазы 2,5 ед. акт. ДНК-полимеразы I в опыте) при 15°С (электрофорез в 1% агарозном геле). Длительность полимеразной реакции (время инкубации, ч): 1—20; 2—10; 3—6; 4—4; 5—2; 6—1; 7—0; 8—репликативная форма ДНК М13mpV



Рис. 6. Кинетика лигазной реакции (электрофорез в 1% агарозном геле). Длительность лигазной реакции (время инкубации, ч). 1—20; 2—8; 3—6; 4—4; 5—2; 6—1; 7—проба после полного завершения полимеразной реакции (2,5 ед. акт. ДНК-полимеразы I, 15°С, 20 ч) перед добавлением 10 ед. акт. лигазы; 8—одноцепочечная ДНК М13mpV; 9—репликативная форма ДНК М13mpV

Фосфорилирование олигонуклеотида для мутагенеза проводили по методике [1]. Мутагенез осуществляли следующим образом: 1 нмоль одноцепочечной ДНК М13mpV смешивали с 20 пмоль 5'-фосфорилированного 13-мера в 10 мкл раствора, содержащего 0,02 М трис-НСl (рН 7,5), 0,01 М MgCl₂, 0,05 М NaCl, 1 мМ дитиотреит. Смесь прогревали 5 мин при 55°С, затем инкубировали 5 мин при 20–23°С, добавляли 10 мкл раствора, содержащего 0,02 М трис-НСl (рН 7,5), 0,01 М MgCl₂, 10 мМ дитиотреит, 1 мМ dCTP, 1 мМ dGTP, 1 мМ dTTP, 1 мМ dATP, 1 мМ АТР, 0–24 ед. ДНК-полимеразы I *E. coli* и 10–20 ед. ДНК-лигазы T4. Смесь инкубировали 20 ч при 15°С или 6 ч при 20–23°С. По окончании реакции ферменты инактивировали прогреванием реакционной смеси (65°С, 10 мин). Аликвоты 1–2 мкл из реакционных смесей использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli*. Условия трансформации, отбор мутантов и выделение ДНК описаны в работе [10]. Реакционную смесь анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле. Первичную структуру выделенных мутантных ДНК анализировали по методу Сэнгера [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Zoller M. J., Smith M. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 20, p. 6487–6500.
2. Chan V.-L., Smith M. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 5, p. 2407–2419.
3. Smith M., Gillam S. In: Genetic engineering, 1981, v. 3, p. 1–32.
4. Петренко В. А., Поздняков П. И., Киприянов С. М., Болдырев А. Н., Семенова Л. Н., Сиволобова Г. Ф. Биооргани. химия, 1986, т. 12, № 8, с. 1088–1100.
5. 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.
6. Гордон А., Форд Р. Слутник химика. М.: Мир, 1976, с. 515.

7. Carter P., Bedouelle H., Winter G. Nucl. Acids Res., 1985, v. 13, № 12, p. 4431-4443.
8. Sanger F., Coulson A. R., Barrel B. G., Smith A. J. H., Roe B. A. J. Mol. Biol., 1980, v. 143, № 2, p. 161-178.
9. Osinga K. A., Van der Bliek 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. 8596-8608.
10. Петренко В. А., Сиволобова Г. Ф., Семенова Л. Н., Болдырев А. И., Каргинов В. А., Гуторов В. В. Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология, 1985, № 8, с. 38-44.

Поступила в редакцию
16.VI.1986

THE EFFICIENCY OF THE SUBSTITUTION OF DNA POLYMERASE A BY *E. COLI* DNA POLYMERASE I

PETRENKO V. A., KIPRIYANOV S. M., SEMENOVA I. N., BOLDYREV A. N.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo,
Novosibirsk Region*

The possibility to use the *E. coli* intact DNA polymerase I in the oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis of DNA has been studied. Optimal conditions of the extension activity of this enzyme were found. We have shown that the substitution of the Klenow fragment of the *E. coli* DNA polymerase by the intact DNA polymerase I did not decrease the efficiency and fidelity of the oligonucleotide-directed mutagenesis.