



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.113.4

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ТОЧКОВЫХ С → Т-ТРАНЗИЦИЙ
ПО УЧАСТКАМ ДНК, СООТВЕТСТВУЮЩИМ ВЫСТУПАЮЩИМ
КОНЦАМ САЙТОВ РЕСТРИКЦИИ

Медведев О. А., Тимченко Т. В., Дианов Г. Л.

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск

При проведении гено-инженерных работ в некоторых случаях возникает необходимость строго избирательно изменить рестрикционный сайт, не внося изменений в первичную структуру всей остальной ДНК. Используемые для этого методы, такие, как введение в сайты рестрикции коннекторных последовательностей или гидролиз нуклеазами выступающих концов с последующим сшиванием «тупых» концов ДНК-лигазой, приводят к существенным изменениям этих участков молекулы [1]. Наиболее точно произвести необходимую замену позволяют методы олигонуклеотидного мутагенеза [2]. Однако эти методы довольно трудоемки и не всегда просты в исполнении [3].

Нами предлагается простой метод введения точковых мутаций — замен остатков цитозина на тимин в содержащих остатки цитозина сайтах плазмидных ДНК, образующих выступающие 5'- или 3'-одноцепочечные участки после обработки рестриктазой. Метод может быть широко использован, поскольку известно большое количество сайтов рестрикции, содержащих цитозин. Схема предлагаемого метода приведена на рис. 1.

Метод опробован нами в модельном эксперименте — уничтожении уникального *Bam*HI-сайта в гене *tet* плазмиды pBR322. По завершении гидролиза рестриктазой *Bam*HI ДНК обрабатывали бисульфитом натрия и использовали для трансформации клеток *E. coli* без предварительного лигирования. Известно, что бисульфит натрия специфично модифицирует остатки цитозина в остатки урацила только в составе однонитевой ДНК [4, 5]. Это свойство реагента позволяет модифицировать избирательно цитозины «липких» концов, не изменяя химическую структуру нуклеотидов в иных участках молекулы ДНК. Во время репликации ДНК плазмиды в бактериальной клетке происходит замена U·G-пары на T·A, так что исходная G·C-пара меняется на T·A [6]. Отбор мутантных плазмид позволил получить ДНК с элиминированным сайтом рестрикции.

ДНК плазмиды (50 мкг) гидролизовали эндонуклеазой рестрикции *Bam*HI в 100 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 8,0), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреит, при 37° С. Линейную ДНК, имеющую «липкие» концы с последовательностью 5' GATC 3', обрабатывали бисульфитом натрия по методу [4] с некоторыми модификациями. Для этого смешивали 3 объема 4 М бисульфита натрия (pH 6,0), 1 объем раствора ДНК (0,5—1 мкг/мкл в 10 мМ трис-HCl (pH 8,0), 1 мМ EDTA), 0,04 объема 50 мМ гидрохинона и инкубировали 20 ч при 37° С. По окончании реакции раствор ДНК обессоливали на колонке с сефадексом G-50, концентрировали *n*-бутанолом, добавляли 4 объема раствора, содержащего 1 М трис-HCl (pH 9,2), 250 мМ NaCl, 10 мМ EDTA, и инкубировали 20 ч при 37° С для превращения промежуточного продукта модификации цитозина в $\ddot{\text{U}}$ рацил.

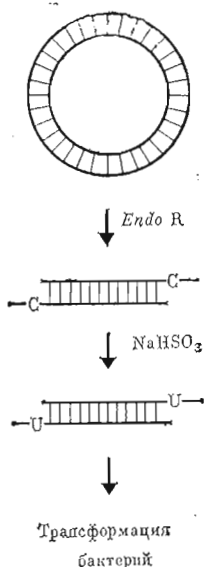


Рис. 1

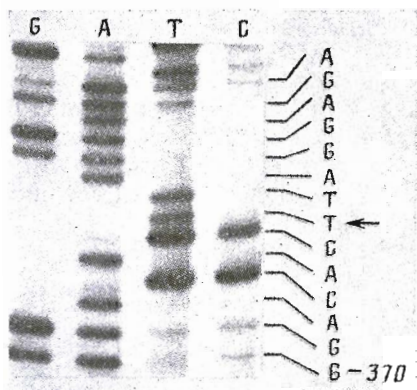


Рис. 2

Рис. 1. Принципиальная схема получения точковых замен в сайтах рестрикции, содержащих цитозин. *EndoR* — эндонуклеаза рестрикции

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность ДНК плазмиды в районе мутировавшего *Bam*HI-сайта. Стрелкой указано положение замены. Отмеченный гуанин соответствует 370-му нуклеотиду в первичной структуре ДНК плазмиды *pBR322* [10]

Модифицированную ДНК обессоливали на колонке с сефадексом G-50, переосаждали спиртом и использовали для трансформации клеток *E. coli* HB101.

Поскольку *Bam*HI-сайт находится в гене устойчивости к тетрациклину, среди трансформантов были идентифицированы мутанты по гену *tet*. ДНК мутантных плазмид выделяли по методу [7] и характеризовали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле после гидролиза эндонуклеазой рестрикции *Bsp*RI. Результаты анализа представлены в таблице. Среди полученных трансформантов были обнаружены 15 делеционных, 1 инсерционный и 15 точковых мутантов.

Молекулярные механизмы образования делеционных мутантов были рассмотрены нами ранее [8].

Для двух произвольно выбранных точковых мутантов была определена нуклеотидная последовательность *Taq*I-*Bsp*RI-фрагмента в районе *Bam*HI-сайта по методу [9]. У обоих мутантов произошла замена одного и того же цитозина на тимин (рис. 2). При этом TGG-кодон, кодирующий триптофан в смысловой нити ДНК, заменяется на бессмысленный кодон TGA.

Метод достаточно прост в исполнении, высок выход точковых мутаций (1—5%). Более того, как нами было показано ранее для ДНК, модифици-

Анализ мутантов по гену *tet*, возникающих в результате трансформации клеток *E. coli* линейной ДНК плазмиды *pBR322*, обработанной бисульфитом натрия

Эффективность трансформации	Количество трансформантов	Характеристика мутаций		
		делеции	точковые	инсерции
10^{-7}	80	5	5	0
10^{-6}	700	6	8	1
10^{-6}	680	4	2	0

рованной по «липким» концам О-метилгидроксиламином, предварительная молекулярная селекция позволяет поднять уровень мутантов среди трансформантов до 50—60% [11]. Для этого необходимо после модификации провести лигирование ДНК и затем повторный гидролиз плазмидной ДНК той же эндонуклеазой рестрикции. При этом молекулы, содержащие модифицированный цитозин в одной из нитей ДНК, сохраняют кольцевую структуру и получают преимущество при трансформации бактерий, а в результате этого существенно возрастает доля мутантов среди трансформантов [11].

После того как статья была отправлена в журнал, в печати появилась работа [12], в которой предложен аналогичный подход для получения точковых мутаций в сайтах рестрикции и продемонстрирована эффективность такого подхода на примере получения C → T-транзиций в сайтах узнавания для эндонуклеаз рестрикции *HindIII* и *XmaI* плазмиды pUC4K.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маниакас Т., Фрич Э., Сэлбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1982. С. 479.
2. Zoller M. J., Smith M. // Meth. Enzymol. 1983. V. 100. P. 468—500.
3. Smith M. // Ann. Rev. Genet. 1985. V. 19. P. 423—462.
4. Shortle D., Nathans D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 5. P. 2170—2174.
5. Hayatsu H. // Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 1976. V. 16. P. 75—124.
6. Shortle D., Bolstein D. // Meth. Enzymol. 1983. V. 100. P. 457—468.
7. Birnboim H. C. // Meth. Enzymol. 1983. V. 100. P. 243—255.
8. Салганик Р. И., Тимченко Т. В., Дианов Г. Л. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 296. № 1. С. 226—230.
9. Maxam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. Part 1. P. 499—560.
10. Peden K. W. C. // Gene. 1983. V. 22. № 3. P. 277—280.
11. Dianov G. L., Vasyunina E. A., Ovchinnikova L. P., Sinitsina O. I., Salganik R. I. // Mutation Res. 1986. V. 159. № 1. P. 41—46.
12. Merlo D. J., Thomson D. V. // Anal. Biochem. 1987. V. 163. № 1. P. 79—87.

Поступило в редакцию
5.II.1987
После доработки
7.XII.1987

A METHOD FOR INDUCING C → T TRANSITIONS INTO DNA SEQUENCES OF RESTRICTION SITES

MEDVEDEV O. A., TIMCHENKO T. V., DIANOV G. L.

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division,
Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

A new method for inducing of C → T substitutions into cytosine-containing restriction sites is developed. The method, based on the selective modification of cytosine residues in DNA sticky ends by sodium bisulfite, was illustrated by induction of a base substitution (C → T) at the *BamHI* site of pBR322 plasmid DNA.