



УДК 577. 113.6 + 577.212.2

© 1990 г.

*В. Л. Друца, А. В. Кривонос, О. Н. Королева,
З. А. Шабарова*

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛНОЙ «БИБЛИОТЕКИ» МУТАНТОВ ОБЛАСТИ —35 МОДЕЛЬНОГО ПРОКАРИОТИЧЕСКОГО ПРОМОТОРА

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет
и межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Предложен и опробован новый подход к исследованию вариабельности гомологичных областей (2—8 пар нуклеотидов) регуляторных участков ДНК, заключающийся в одновременном химическом синтезе полного набора всех возможных структур исследуемой области с последующим одновременным тестированием их функции. Осуществлен химико-ферментативный синтез полного набора 40-звенных ДНК-дуплексов, по первичной структуре соответствующих модельному прокариотическому промотору и различающихся 6-звенными последовательностями в области —35. Выявлены особенности синтеза, выделения и секвенирования олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих протяженные вариабельные участки.

В последнее время благодаря развитию экспресс-методов определения первичной структуры ДНК [1] и появлению специальных программ для компьютерной обработки данных секвенирования [2] накапливается все больше сведений о том, что различные участки ДНК с одинаковой функцией сходны по первичной структуре. Для многих таких участков (например, терминаторов [3], промоторов [4], участков связывания рибосомы [5] и др.) выведены обобщенные структуры (консенсусы), включающие в себя области гомологии различной протяженности. Возникает естественный вопрос: какова функциональная значимость каждого из оснований в структуре того или иного консенсуса, т. е. каковы допустимые отклонения от «идеальной» структуры? Один из возможных экспериментальных подходов для исследования подобных проблем состоит в систематической замене каждого из оснований в выбранном для исследования фрагменте ДНК с последующим изучением влияния произведенной замены (приближающей к структуре консенсуса или удаляющей от нее) на функцию. Достигнутый уровень химического синтеза протяженных олигонуклеотидов* и создание эффективных методов сайт-специфического мутагенеза позволяет в настоящее время проводить такие работы как на полностью синтезированных ДНК-дуплексах, так и на природных векторных ДНК. Однако решение подобных задач становится слишком трудоемким, когда необходимо проверить таким образом не одну-две нуклеотидные пары, а всю, пусть даже небольшую, каноническую структуру.

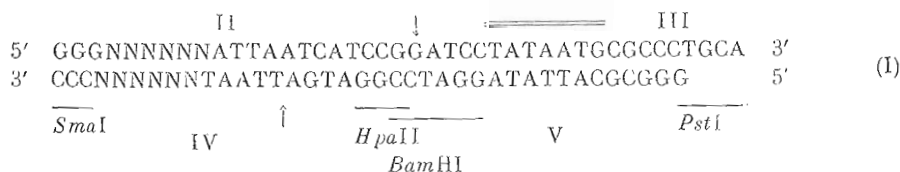
В настоящей работе мы предлагаем экономичный синтетический подход к исследованию вариабельности нуклеотидов в консервативных областях (протяженностью 2—8 п. о.) функционально значимых участков ДНК. Он базируется на одновременном синтезе полного набора фрагментов ДНК, включающего в себя все или почти все вариации нуклеотидных замен в анализируемом участке, которые должны быть представлены в наборе равными или по крайней мере не сильно различающимися долями. Далее полученный представительный набор фрагментов встраивается в векторную ДНК, выбираемую так, чтобы сразу после трансфор-

* Префикс «d» (дезоксн) всюду опущен.

мации можно было бы обнаруживать у индивидуальных клонов наличие (или отсутствие) выраженной функции исследуемого участка. Клонированные в этом векторе индивидуальные последовательности набора секвенируют и определяют допустимые замены в исследуемом консенсусе, не приводящие к утрате его функции. В литературе описано использование синтезируемых одновременно смесей олигонуклеотидов, например, для получения зондов, учитывающих вырожденность генетического кода [6], для одновременного получения серии мутантов в некоторых вариантах метода сайт-специфического мутагенеза [7]. Однако в этих исследованиях не ставилась задача получения полного набора всех вариантов структур олигонуклеотидов. В случае зондов число различных структур в смесях, как правило, невелико, к тому же зондирование ДНК смешанными олигонуклеотидными зондами ведут в условиях большого мольного избытка последних, так что даже слабо представленные в смеси олигонуклеотиды всегда находят свою ДНК-мишень. В случае олигонуклеотиднаправленного мутагенеза проблема сводится лишь к получению набора конкретных клонов с запланированными изменениями первичной структуры ДНК для последующего их изучения [8]. В нашем же случае ставится задача получения и анализа полного набора (10^2 — 10^4) мутантов (составления и исследования полной библиотеки мутантов) для установления доли структур, сохраняющих функцию, и выявления конкретных нуклеотидных замен, не влияющих на функцию консенсуса или резко ее меняющих. Таким образом, для реализации предложенного подхода принципиально необходимо иметь возможность химического синтеза протяженных олигонуклеотидов с представительным набором вариаций структуры исследуемого участка ДНК и располагать подходящей тест-системой для быстрой оценки наличия у клонированной последовательности свойства (свойств), обусловленного наличием этого участка. В настоящем сообщении рассматриваются в основном проблемы химического синтеза смешанных олигонуклеотидов для подобных исследований.

В качестве объекта исследования нами были выбраны прокариотические промоторы, узнаваемые РНК-полимеразой *E. coli*. Выбор определялся тем, что в этих регуляторных участках обнаружены две высококонсервативные зоны в области нуклеотидов -10 и -35 , гомологичные последовательностям ТАТААТG (последовательность Прибноту) и ТТGАСА (последовательность Гилберта) [9], функциональная значимость которых подтверждается многочисленными экспериментальными данными (см., например, [10]). В то же время есть основания полагать, что при проявлении собственно промоторной функции доминирующую роль играет область нуклеотида -10 . Ранее нами было показано [11], что встраивание коротких синтетических фрагментов, содержащих «идеальную» последовательность Прибноту, в область ДНК, лишенную промоторных свойств, приводит к появлению в ней эффективного сигнала инициации транскрипции. Поскольку при этом структура области -35 была далека от канонической, возник вопрос: насколько она может варьировать при данной области -10 ? В литературе подобного рода исследования с получением широкого набора мутаций в области -35 не описаны.

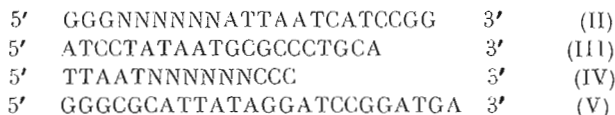
Для изучения вариативности области -35 нами были получены ДНК-дуплексы (I), моделирующие прокариотический промотор:



где N = A + G + C + T (1 : 1 : 1 : 1). Стрелками указаны места стыковки синтезированных олигонуклеотидов (наборов олигонуклеотидов), указаны сайты и полусайты эндонуклеаз рестрикции, двойной чертой отмечена последовательность Прибноту. В основу структуры положена нуклеотидная последовательность гибридного промотора *tacl* (известен

как один из самых сильных промоторов [12]) с некоторыми изменениями в спейсерной области, предположительно не влияющими на функцию. Структура содержит: 1) «идеальную» последовательность Прибнюу; 2) на расстоянии 17 п. о. (оптимальная величина сегмента между областями —10 и —35 [10]) — полностью вариабельную 6-звенную область —35; 3) сайты эндонуклеаз рестрикции *HpaII*, *BamHI* в спейсерной области и полусайты *SmaI* и *PstI* на концах дуплекса, необходимые для последующих генно-инженерных экспериментов. Область, прилегающая с 3'-конца к последовательности Прибнюу, содержит GC-богатую последовательность, предположительно участвующую в механизме строгого контроля [13], и практически полностью идентична структуре соответствующего участка промотора *tyrT* [14].

Получение набора дуплексов (I) осуществляли путем их ДНК-лигазной сборки из химически синтезированных олигонуклеотидов (II—V):



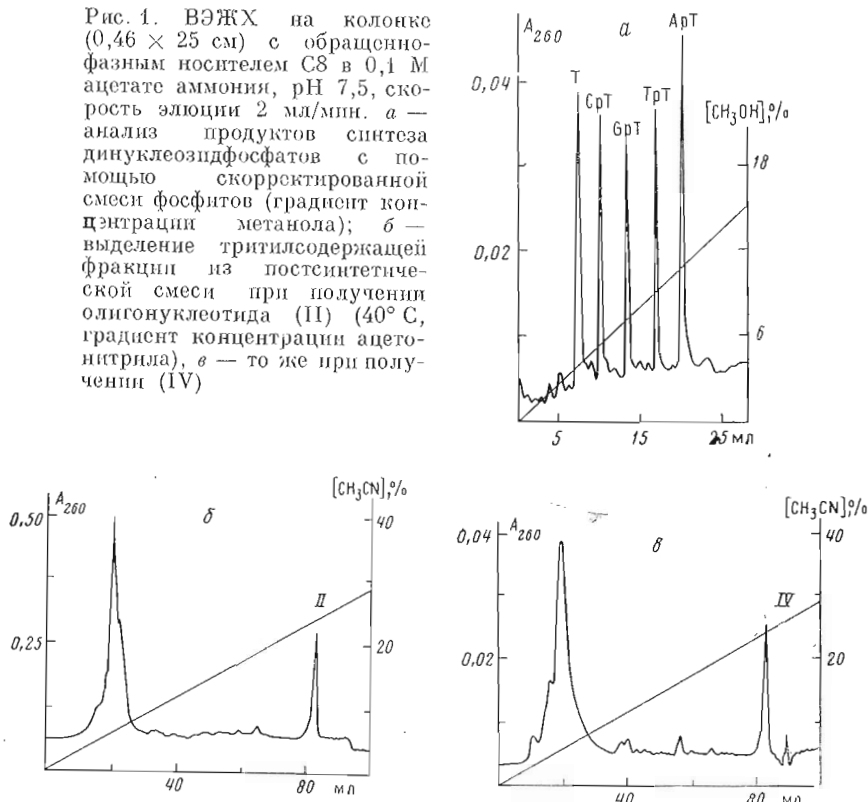
Синтез проводили по стандартной твердофазной амидофосфитной схеме [15].

В процессе синтеза олигонуклеотидов (II) и (IV) в шести циклах наращивания цепи в конденсацию вводили смесь всех четырех амидофосфитных компонентов. Известно, что реакционные способности амидофосфитных производных различных нуклеозидов неодинаковы [16, 17]. В нашем же случае необходимо было добиться присоединения их в соотношении, близком к эквимолярному. Мы попытались осуществить это, варьируя относительные концентрации разных амидофосфитных производных. Основой для выбора состава смеси амидофосфитных компонентов служил модельный эксперимент, в котором полимерный носитель с присоединенным первым нуклеозидом — тимидином — вводили в цикл конденсации со смесью всех четырех нуклеотидных амидофосфитов. Полученные динуклеозидфосфаты деблокировали и анализировали методом ВЭЖХ, определяя мольное содержание в смеси ТрА, ТрG, ТрС и ТрТ. На основе этих данных составляли новую смесь амидофосфитов и снова проводили весь эксперимент, добиваясь того, чтобы доли динуклеозидфосфатов приближались к эквимолярным. Такой эмпирический путь представляется нам наиболее эффективным, так как необходимо учитывать не только разницу в реакционноспособности амидофосфитов, но и трудно поддающееся количественной оценке качество конкретных амидофосфитных компонентов (содержание активного амидофосфита, наличие примесей-ингибиторов (или катализаторов) конденсации).

В первом модельном эксперименте использовали смесь амидофосфитов с концентрацией каждого $\sim 0,025$ М. Анализ динуклеозидфосфатов в этом случае показал, что их мольные соотношения хорошо коррелируют с данными, полученными ранее для N,N-диизопропиловых амидофосфитов [17]. После двух коррекций удалось подобрать смесь, применение которой позволяет прийти к близкому к эквимолярному (A : G : C : T = 24,8 : 25,4 : 24,5 : 25,3; анализ см. рис. 1а) присоединению нуклеотидных звеньев. Подбранную таким образом смесь использовали для синтеза вариабельных участков олигонуклеотидов (II) и (IV).

При синтезе смешанных олигонуклеотидов (II) и (IV) принципиально важно было добиться высоких выходов на всех стадиях и получить целевой продукт — в каждом случае представительную смесь 4096 олигонуклеотидов равной длины — в качестве основного компонента конечной смеси олигонуклеотидов. Это позволило бы не проводить прецизионную очистку продукта методом ВЭЖХ. Из-за весьма заметных различий в хроматографической подвижности отдельных компонентов в подобных сложных смесях олигонуклеотидов равной длины при очистке всегда существует неприемлемо высокий риск потерять часть олигонуклеотидов или даже просто обогатить смесь какими-то компонентами. В ситуациях же, подобных на-

Рис. 1. ВЭЖХ на колонке (0,46 × 25 см) с обращенно-фазным носителем С8 в 0,1 М ацетате аммония, рН 7,5, скорость элюции 2 мл/мин. *а* — анализ продуктов синтеза динуклеозидфосфатов с помощью скорректированной смеси фосфитов (градиент концентрации метанола); *б* — выделение тритилсодержащей фракции из постсинтетической смеси при получении олигонуклеотида (II) (40° С, градиент концентрации ацетонитрила), *в* — то же при получении (IV)



шей методы разделения конечной смеси не должны влиять на качественный и количественный состав целевых олигонуклеотидных смесей.

В нашем случае синтеза олигонуклеотидов (II) и (IV) прошли удачно, и при их выделении мы ограничились следующими процедурами: выделение тритилсодержащей фракции методом ВЭЖХ (рис. 1 б, в); детритилирование 80% уксусной кислотой и обессоливание на DEAE-целлюлозе (удаление коротких 2—6-звенных примесных олигонуклеотидов). Олигонуклеотиды (III) и (V) после обессоливания дополнительно очищали методом ион-парной ВЭЖХ [18].

Структура синтезированных олигонуклеотидов подтверждена секвенированием по методу Максама — Гилберта [1] (рис. 2). Здесь необходимо сделать два замечания относительно олигонуклеотидных смесей (II) и (IV). Во-первых, несмотря на весьма большую гетерогенность по составу, как 22-звенная олигонуклеотидная смесь (II), так и 14-звенная (IV) двигались в 20% денатурирующем ПААГ компактными зонами, соответствовавшими по подвижностям 22- и 14-звенным олигонуклеотидам. С одной стороны, именно это позволило провести их секвенирование, а с другой, дает возможность в случае не вполне удачных синтезов выделять их электрофорезом в денатурирующем ПААГ. Во-вторых, для секвенирования смешанных олигонуклеотидов, подобных смесям (II) и (IV), необходимо использовать химические реакции модификации с избирательностью строго по одному гетероциклическому основанию. Для большей надежности мы использовали 6 различных типов модификации (см. рис. 2). При не слишком различающихся глубинах модификации наличие на радиоавтографе секвенирующего геля в местах, соответствующих «смешанным буквам», зон с одинаковыми подвижностями и приблизительно равной интенсивности в колонках, соответствующих «индивидуальным» модификациям, указывает не только на наличие в олигонуклеотидных смесях (II) и (IV) олигонуклеотидов с соответствующими нуклеотидным звеньями всех четырех типов, но и на их приблизительно равные доли.

После выделения и секвенирования олигонуклеотиды были ферментативно 5'-фосфорилированы [21] и шиты с помощью ДНК-лигазы с об-

разованием продуктов поликонденсации, соответствующих по подвижности полноразмерным верхней и нижней цепям дуплекса (I) (38- и 42-звенные олигонуклеотиды), его димера (80-звенные фрагменты) и полимеров наряду с многочисленными «промежуточными» продуктами поликонденсации (рис. 3). Аналогичные результаты получены со смесями, где всего один из олигонуклеотидов (II)—(V) содержал ^{32}P -метку. Эти данные свидетельствовали о пригодности блоков (II)—(V) для встраивания в векторную ДНК с образованием в ней участка со структурой типа дуплекса (I).

Для оценки промоторных свойств индивидуальных составляющих дуплекса (I) мы выбрали уже опробованную в нашей лаборатории [11, 22] систему, базирующуюся на плазмиде рНД-001-14-11 со встроенным *gal*-опероном, промоторный участок которого заменен на полилинкер из ДНК фага М13mp8, и клетках *E. coli* штамма F165', дефектных по *gal*-оперону. В этой системе введение в область полилинкера векторной ДНК фрагмента ДНК с промоторными свойствами приводит к ярко-малиновому окрашиванию колоний клеток F165', несущих рекомбинантный вектор, на чашках с агаром Макконки, содержащим галактозу. Для получения рекомбинантных ДНК большой *SmaI/PstI*-фрагмент вектора после дефосфорилирования лигировали с блоками (II)—(V) в условиях, отработанных при их пробной полимеризации, реакционной смесью трансформировали клетки F165' и трансформанты высевали на агар Макконки, как это описано ранее [11]. По предварительным данным, не менее 90% структур из смеси, составляющей дуплекс (I), обладают заметной промоторной активностью. В дальнейшем предполагается подробно исследовать функционирование подобных структур *in vivo* и определить требования, которые могут предъявляться к первичной структуре области — 35 сильного прокариотического промотора.

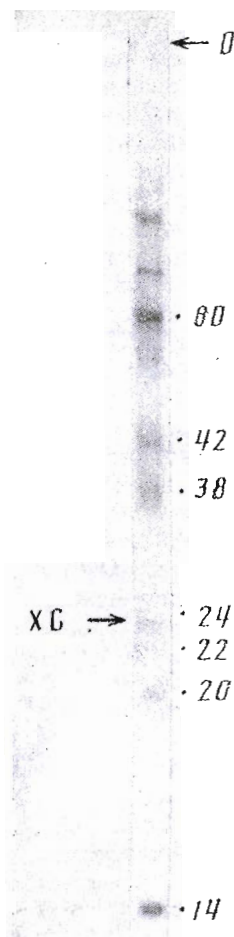


Рис. 3. Электрофорез в 20% ПААГ продуктов ферментативной поликонденсации ^{32}P -меченых олигонуклеотидов (II)—(V). 0 — старт, ХС — положение красителя ксилендианола. Указана длина цепи продуктов реакции

Экспериментальная часть

Использованы дезоксирибонуклеозиды фирмы Calbiochem; акриламид, N,N'-метиленабисакриламид (BDH); PCl_3 , морфолин, трис, EDTA, дитиотреит, MgCl_2 (Merck); диметокситритилхлорид, АТФ (Serva); ампициллин, галактоза (Fluka); агароза, легкоплавкая агароза (Mariner Colloids), агар Макконки, бакто-триптон, дрожжевой экстракт (Difco); $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1000 Ки/ммоль, Изотоп).

Препараты ферментов: полинуклеотидкиназа фага Т4 (КФ 2.7.1.78; 2420 ед. акт./мл), ДНК-лигаза фага Т4 (КФ 6.5.1.1; 5000 ед. акт./мл), эндонуклеазы рестрикции (2—20 ед. акт./мл) *SmaI*, *PstI* производства НПО «Фермент» (Вильнюс).

Плазмида рНД-001-14-11 и штаммы клеток *E. coli* F165' (*gal*⁻) любезно предоставлены Г. Фрицем (ФРГ).

Химический синтез олигонуклеотидов (II)—(V) осуществляли твердофазным амидофосфитным методом [15] в ручном варианте с использованием в качестве мономеров для наращивания цепи N-ацил-5'-O-диметокситритилнуклеозид-3'-метилморфолидофосфитов. Синтез вели «вручную» в реакторе колоночного типа при непрерывном слабом токе сухого аргона.

Время конденсации 3 мин, весь цикл наращивания очередного звена (де-тритилирование 0,1 М трифторуксусной кислотой в хлористом метиле, промывка ацетонитридом, конденсация, промывка ацетонитридом, кепирование смесью N-метилимидазол — уксусный ангидрид, 2 : 1, промывка ацетонитридом, окисление 0,2 М раствором I₂ в смеси пиридин — уксусная кислота, 9 : 1, промывка ацетонитридом, промывка хлористым метиленом) занимал около 9 мин. Во всех случаях конденсация осуществлялась с выходом не ниже 94% (по DMTr⁺). При синтезе олигонуклеотидов (II) и (IV) в шести стадиях наращивания цепи использовали смесь фосфитных нуклеотидов в соотношениях, подобранных экспериментально.

Во всех случаях синтез проводили на 10 мг полимерного носителя на основе СРG с загрузкой исходного нуклеозида 10—12 мкмоль/г.

Очистку олигонуклеотидов после удаления защитных групп, а также анализ смесей динуклеозидфосфатов в экспериментах по подбору условий эквивалентного включения нуклеотидов при синтезе переменных областей олигонуклеотидов осуществляли ВЭЖХ на колонке 0,46 × 25 см с обращенно-фазным носителем С8 в градиентах метанола или ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония, рН 7,5. Выход олигонуклеотидов (ОЕ₂₆₀): II — 0,92, III — 4,38, IV — 0,06, V — 0,06.

Анализ первичной структуры олигонуклеотидов осуществляли методом Максама — Гилберта [1]; реакцию по «Т» с перманганатом калия проводили как описано в работе [20], реакцию по «А» с диэтилпирокарибонатом [19] (5% по объему) проводили в 0,1 М калий-ацетатном буфере, рН 5,5, при 60° С в течение 5 мин.

Лигирование эквимольной смеси 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов (II)—(V) (0,6 нмоль (~1 нКи) каждого) ДНК-лигазой фага Т4 (10 ед. акт.) осуществляли при 10° С в течение 16 ч в 20 мкл раствора, содержащего 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ меркаптоэтанол, 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ АТР. Перед добавлением фермента реакционную смесь отжигали 4 ч путем охлаждения от 70 до 10° С.

Электрофорез в 20% ПААГ во всех случаях проводили в пластинах (0,2 × 200 × 400 мм) в трис-боратном буфере, рН 8,3, содержащем 7 М мочевины, 0,1 М EDTA, при 1 кВ.

Выделение плазмидной ДНК рНD-001-14-11 методом щелочного лизиса, расщепление ее эндонуклеазами рестрикции *Sma*I и *Pst*I и последующее выделение электрофорезом в легкоплавкой агарозе проводили по стандартным методикам [23].

Конструирование рекомбинантных плазмид, приготовление компетентных клеток *E. coli* штамма F165' и трансформацию их плазмидами осуществляли как описано ранее [22]. Чашки Петри с агаром Макконки готовили и анализировали на них трансформированные клетки по методу [24].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maxam A. M., Gilbert W. // *Methods Enzymol.* 1980. V. 65. P. 499—560.
2. Queen C., Wegman M. N., Korn L. J. // *Nucl. Acids Res.* 1982. V. 10. № 1. P. 449—456.
3. Васильев Г. В., Гуревич А. И., Малина З. А., Артемьев И. В. // *Биоорган. химия.* 1980. Т. 6. № 12. С. 1802—1807.
4. Harley C. B., Reynolds R. P. // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. № 5. P. 2343—2361.
5. Stormo G. D., Schneider T. D., Gold L. M. // *Nucl. Acids Res.* 1982. V. 10. № 9. P. 2971—2996.
6. Демиров Д. Г., Друза В. Л., Чумаков И. М. // *Докл. АН СССР.* 1988. V. 301. № 1. С. 226—229.
7. Goff S. A., Short-Russell S. R., Dice J. F. // *DNA.* 1987. V. 6. № 4. P. 381—388.
8. Wells J. A., Vasser M., Powers D. B. // *Gene.* 1985. V. 34. № 3. P. 315—323.
9. Rosenberg M., Court D. // *Ann. Rev. Genet.* 1979. V. 13. P. 319—353.
10. Siebenlist U., Simpson R. B., Gilbert W. // *Cell.* 1980. V. 20. № 2. P. 269—281.
11. Королева О. Н., Друза В. Л., Шабарова З. А. // *Биополимеры и клетка.* 1985. Т. 1. № 6. С. 307—311.
12. de Boer H. A., Comstock L. J., Vasser M. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1983. V. 80. № 1. P. 21—25.
13. Lamond A. I., Travers A. A. // *Cell.* 1985. V. 41. № 1. P. 6—8.
14. Ryan M. J., Belagaje R., Brown E. L., Fritz H.-J., Khorana G. // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. № 21. P. 10803—10810.

15. *Matteucci M. D., Caruthers M. H., Palm J.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1981. V. 103. № 11. P. 3185—3191.
16. *Elmblad A., Josephson S., Palm J.* // *Nucl. Acids. Res.* 1982. V. 10. № 10. P. 3291—3301.
17. *Zon G., Gallo K. A., Samson C. J.* // *Nucl. Acid Res.* 1985. V. 13. № 22. P. 8181—8196.
18. *Волков Е. М., Романова Е. А., Круг А., Орецкая Т. С., Потанов В. К., Шабарова З. А.* // *Биоорганич. химия.* 1988. Т. 14. № 8. С. 1034—1039.
19. *Krayev A. S.* // *FEBS. Letters.* 1981. V. 130. № 1. P. 19—22.
20. *Rubin C. M., Schmid C. W.* // *Nucl. Acids Res.* 1980. V. 8. № 20. P. 4613—4619.
21. *Королева О. Н., Друца В. Л., Долинная Н. Г., Цытович А. В., Шабарова З. А.* // *Молекуляр. биология.* 1984. Т. 18. № 1. С. 146—160.
22. *Королева О. Н., Друца В. Л., Шабарова З. А.* // *Биополимеры и клетка.* 1988. Т. 4. № 1. С. 7—14.
23. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* *Молекулярное клонирование.* М.: Мир, 1984.
24. *Rosenberg M., McKenney K., Schümperli D.* // *Promoters: structure and function* / Eds R. L. Rodriguez, M. J. Chamberlin. N. Y.: Praeger Publishers, 1982. P. 387—406.

Поступила в редакцию
23.X.1989

V. L. DRUTSA, A. V. KRIVONOS, O. N. KOROLEVA, Z. A. SHABAROVA

**CONSTRUCTION OF A COMPLETE «LIBRARY» OF MUTANTS AT — 35
REGION OF MODEL PROKARYOTIC PROMOTER**

*Department of Chemistry and A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and
Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University*

A novel approach to study the variability of consensus sites of regulatory regions of DNA is proposed. The overall strategy includes chemical synthesis of representative series of all possible DNA structures under investigation, cloning and screening according to their function. The chemical-enzymatic synthesis of a complete library of 40-bp DNA duplexes, corresponding to the model prokaryotic promoter and differing in 6-membered segments at —35 region, is described.