



УДК 577.113.6 + 577.214.42 + 577.213.3

© 1991 г.

В. Л. Друца, В. Р. Кабердин, О. Н. Королева*,
Н. А. Шилов**

ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД НАПРАВЛЕННОГО ВВЕДЕНИЯ МУТАЦИЙ В ПЛАЗМИДЫ И КЛОНИРОВАНИЯ ОДНОТЯЖЕВЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК

Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского МГУ;

**Химический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Описан трехпраймерный вариант предложенного ранее метода олигонуклеотид-направленного мутагенеза в плазмидных векторах, удобный также и для быстрого клонирования однотяжевых фрагментов ДНК — продуктов асимметричной полимеразной цепной реакции. Предлагаемым методом в плазмиде рНД-001-14-11 проведены делеции 59-звенного участка при одновременной встройке синтетической последовательности АТСТАТА (выход 81%) и вставка 26-звенной ПЦР-копии терминатора транскрипции фага fd (выход 67%).

В предыдущей работе [1] нами была предложена схема введения мутаций в ближние окрестности уникальных сайтов рестрикции плазмидных векторов, основанная на использовании двух олигонуклеотидных праймеров. Продолжая эти исследования, мы разработали более универсальный вариант описанного метода, предполагающий применение трех праймеров.

Ключевой гетеродуплекс предлагаемой нами схемы введения мутаций в произвольный плазмидный вектор приведен на рис. 1, а. Как и в предыдущем варианте метода [1], исходную плазмиду сначала расщепляют эндонуклеазой рестрикции и обрабатывают Т4-ДНК-полимеразой в отсутствие дезоксинуклеозидтрифосфатов для получения концевых участков в однотяжевой форме. Далее следует гибридизация с тремя олигонуклеотидами: мутагеном, комплементарным (за исключением участка введения мутации) одному из однотяжевых участков линейаризованного вектора, и адаптерами, полностью комплементарными его концам. В качестве мутагена могут выступать однотяжевые фрагменты природных ДНК, синтетические олигонуклеотиды, или однотяжевые продукты — копии природных ДНК или РНК, полученные, например, с помощью техники полимеразных цепных реакций. Мутаген и комплементарный той же цепи синтетический олигонуклеотид-адаптер должны иметь фосфатную группу на 5'-конце, второй же синтетический олигонуклеотид-адаптер не должен иметь концевого фосфата. Структуру 3'-концевых участков обоих адаптеров подбирают так, чтобы после гибридизации концы линейаризованного вектора можно было бы снова соединить ДНК-лигазой с восстановлением исходного сайта рестрикции. Далее полученный гибрид, как это подробно описано в работе [1], замыкают в кольцо ДНК-лигазой (см. рис. 1а), достраивают Т4-ДНК-полимеразой в присутствии ДНК-лигазы, обрабатывают ДНК-полимеразой *E. coli* и прямо используют для трансформации компетентных клеток.

Префикс «d» и приставка «дезокси» в написании олиго- и полинуклеотидов дезокси-ряда здесь и далее для краткости опущены; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ПААГ — полиакриламидный гель.

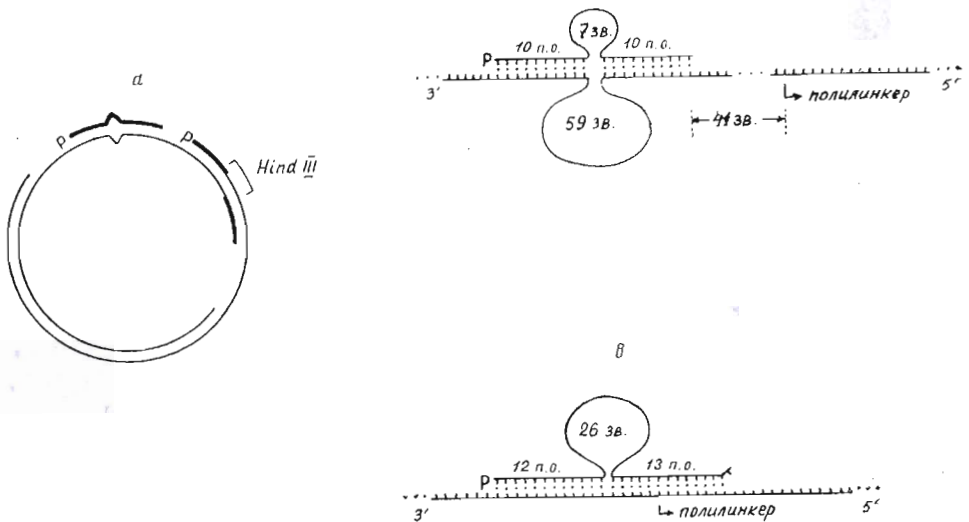
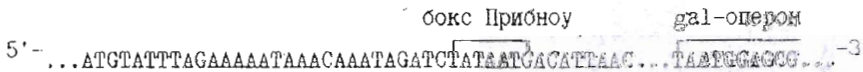


Рис. 1. Схема ключевого гетеродуплекса (а) при конструировании плазмид с делецией/вставкой (б) и вставкой (в) (см. текст). Утолщенными линиями показаны синтетические олигонуклеотиды

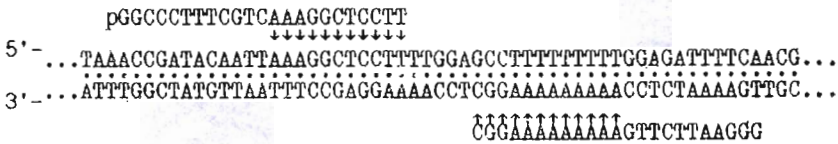
В настоящей работе трехпраймерную схему мы использовали для дизайна плазмиды рНД-001-14-11, базируясь на сайте рестрикции *Hind* III. В одном случае (рис. 1б) с помощью 27-звенного синтетического олигонуклеотида рАААСААТАГАТСТАТААТГАСАТТАА делетировали 59 п. о. при одновременной вставке 7 п. о. перед *gal*-опероном в области «левее» полилинкера. В мутантной плазмиде формировались бок Прибноу ТАТААТГ и уникальный сайт рестрикции *Bgl* II. В другом случае (рис. 1в) в той же области встраивали 26 п. о., используя в качестве мутагена однопятезевый 51-звенный продукт асимметричной ПЦР, содержащий копию природного терминатора фага fd. В качестве адаптеров в обоих случаях использовали фосфорилированный декануклеотид и нефосфорилированный гептадекануклеотид.

При конструировании делеции выход целевых мутантов оказалось возможным определять как по данным рестриктоного анализа плазмидных ДНК клонов, так и по фенотипическому признаку — ярко-малиновой окраске на агаре МакКонки — колоний клонов, несущих целевые мутантные плазмиды. Образующийся в них бок Прибноу формировал сигнал инициации транскрипции и обеспечивал достаточную для явного фенотипического проявления экспрессию плазмидного *gal*-оперона [1]:



Обе эти независимые оценки дали одну и ту же величину выхода целевых мутантов — около 81%. Соответствие структуры измененной области в полученной плазмиде целевой мутации подтверждено секвенированием (рис. 2а).

При встраивании терминатора транскрипции 51-звенный олигонуклеотид-мутаген получали методом асимметричной ПЦР [2] в два этапа. Сначала нарабатывали двупятезевую ПЦР-копию участка плазмиды рMac5-8 [3], содержащего терминатор фага fd. В качестве праймеров использовали эквимоллярные количества 23-звенных синтетических олигонуклеотидов I и II, 3'-концевые участки которых соответствовали началу и концу терминатора, а 5'-концевые участки должны были впоследствии обеспечить образование комплексарного комплекса одной из цепей (5'-фосфорилированной) ПЦР-копии с мутируемой плазмидой:



Праймер I на 5'-конце нес фосфатную группу, в которую для облегчения регистрации олигонуклеотидов вводили индикаторное количество ^{32}P -метки.

После амплификации (ПЦР) двутяжевый олигонуклеотид очищали от многочисленных побочных продуктов электрофорезом и копировали с помощью тех же праймеров I и II, но взятых в соотношении 50 : 1 соответственно, т. е. в условиях асимметричной ПЦР. Однотяжевую ПЦР-копию, содержащую 5'-фосфат, отделяли от избытка праймеров электрофорезом и прямо использовали для конструирования мутантной плазмиды.

Экспресс-анализ плазмидных ДНК клонов на присутствие целевой вставки в этой серии экспериментов был также выполнен методом ПЦР [4]. По электрофоретической подвижности продуктов ПЦР, полученных на различных произвольно выбранных клонах, можно было судить о наличии в их плаزمидях целевой вставки длиной 26 п. о. и оценить выход мутантов. На рис. 3 приведен подобный анализ нескольких клонов плазмид, прошедших процедуру встраивания терминатора. В произвольной выборке из 24 плазмид, проанализированных таким образом, 16 содержали вставку необходимой длины, и, следовательно, выход «вставочного» мутагена составил около 67%. Для одного из «мутантных» клонов точное соответствие плазмидной ДНК запланированной структуре было подтверждено секвенированием (рис. 2б).

Из литературы известно, что клонирование ПЦР-продуктов обычными методами сопряжено со значительными трудностями, обусловленными свойством Taq-ДНК-полимеразы присоединять в ПЦР-дуплексе дополнительные 3'-концевые звенья [5]. При клонировании, тупыми концами для удаления мешающих концевых однотяжевых участков проводят специальную обработку ПЦР-дуплексов T4-ДНК-полимеразой [6]. Однако чаще используют другой прием [7]: при планировании ПЦР-праймеров в них вводят дополнительные, некомплементарные амплифицируемой ДНК 5'-концевые фрагменты с уникальными сайтами рестрикции. После амплификации, обработки подобранными рестриктазами и очистки получают ПЦР-дуплекс, пригодный для прямого клонирования. В случае же клонирования продуктов ПЦР по предлагаемой в настоящей работе технологии проблемы дополнительных звеньев не существует: при достройке гетеродуплекса «лишнее» (некомплементарное матрице) звено будет удалено T4-ДНК-полимеразой благодаря наличию у нее мощной «корректирующей» 3' → 5'-экзонуклеазной активности. Для экспериментальной проверки этого, на наш взгляд, достаточно очевидного утверждения мы проверили наличие в мутантных плазмидях уникального сайта рестрикции *Sma*I. Дело в том, что структура и способ встраивания 51-звенного ПЦР-продукта были выбраны так, что его 3'-конец перекрывал в гетеродуплексе половину *Sma*I-сайта полилинкера и нарушения структуры этого участка плазмиды после достройки и клонирования можно было легко идентифицировать рестриктным анализом, не прибегая к трудоемкому секвенированию. На практике оказалось, что ни в одном из 20 проанализированных клонов плазмид, содержащих ПЦР-вставку, не было обнаружено нарушений *Sma*I-сайта. Учитывая эти данные, можно считать, что дополнительное 3'-звено однотяжевого ПЦР-продукта не оказывает заметного влияния на точность (нет побочного мутагена в районе вставки) и эффективность (67%-ный выход!) его встраивания в плазмиду.

Таким образом, в настоящей работе была продемонстрирована высокая эффективность предложенной нами схемы олигонуклеотиднаправлен-

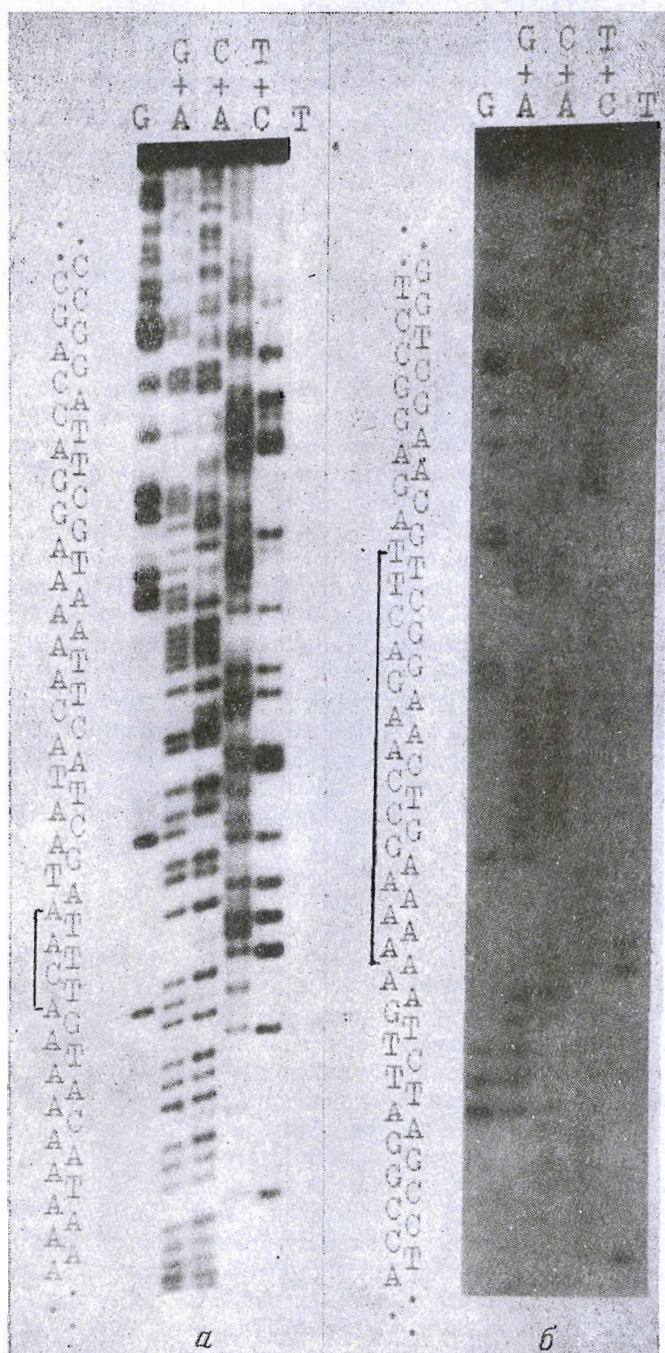


Рис. 2. Секвенирование методом Максама — Гилберта [³²P]дуплексов — ПЦР-копий мутантных участков плазмид при конструировании делеции/вставки (а) и вставки (б). Вверху обозначены реакции расщепления оснований: «G» — 0,01 М диметилсульфат, 20° С, 1 мин; «A + G» — 50% муравьиная кислота, 60° С, 1 мин; «A + C» — 1,2 М NaOH, 90° С, 10 мин; «C + T» — 60% водный гидразин, 37° С, 2 мин; «T» — 5 мМ перманганат калия, 20° С, 2 мин. Буквы слева — читаемая последовательность нуклеотидов. Прямыми скобками показаны структуры целевых вставок

ного мутагенеза при введении в векторные ДНК достаточно крупных делеций и вставок вдали от базового уникального сайта рестрикции. Успешное использование наряду с синтетическими олигонуклеотидами продуктов асимметричной ПЦР открывает также новые возможности для быстрого, эффективного и, самое главное, точно направленного переноса протяженных фрагментов природных ДНК в любое, не ограниченное

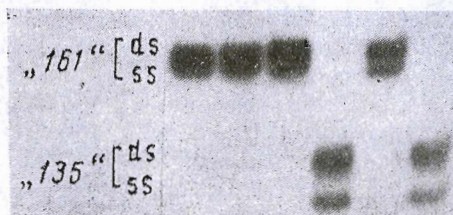


Рис. 3. Радиоавтограф электрофоретического анализа в 8% ПААГ [^{32}P]-продуктов ПЦР на экспресс-лизатах клонов с плазмидами, прошедшими встраивание терминатора фага fd. Показаны подвижности: «135» — ПЦР-копии выбранного участка исходной плазмиды («ds» — дуплекс, «ss» — одноцепочечная копия); «161» — ПЦР-копии того же участка с целевой 26-звенной вставкой

наличием сайтов рестрикции место векторных молекул для последующего клонирования.

Экспериментальная часть

В работе использованы ферменты: эндонуклеазы рестрикции (КФ 3.1.23.x) *Hind*III, *Bgl*II, *Sma*I (20—50 ед. акт./мкл), полинуклеотидкиназа фага T4 (КФ 2.7.1.78; 2,4 ед. акт./мкл), ДНК-лигаза фага T4 (КФ 6.5.1.1; 20 ед. акт./мкл), ДНК-полимераза фага T4 (КФ 2.7.7.7; 15 ед. акт./мкл), ДНК-полимераза *Thermus aquaticus*, Taq (КФ 2.7.7.7; 7 ед. акт./мкл), ДНК-полимераза I *E. coli* (КФ 2.7.7.7; 10 ед. акт./мкл) — производства НПО «Ферментас» (Вильнюс); лизоцим (КФ 3.2.1.17, Serva, ФРГ). Используются также дезоксинуклеозидтрифосфаты и АТФ (Sigma, США); акриламид, N,N'-метиленбисакриламид (BDH, Англия); трис, EDTA, дитиотреит, MgCl_2 (Merck, ФРГ); ампициллин, галактоза (Fluka, Швейцария); агароза (Mariner Colloids, США); агар МакКонки, бакто-триптон, дрожжевой экстракт (Difco, США); [γ - ^{32}P]АТФ с удельной радиоактивностью 37 ПБк/моль (Изотоп).

Олигонуклеотиды получены твердофазным амидофосфитным методом с последующей очисткой электрофорезом в 20% ПААГ. Их первичную структуру подтверждали методом Максама — Гилберта [8].

Штамм клеток *E. coli* F165' (*gal*⁻) и плаزمида pHD-001-14-11, содержащая ген устойчивости к ампициллину и *gal*-оперон *E. coli*, промоторная область которого заменена на полилинкер фага M13mp8, а также плазмиды pMac5-8 любезно предоставлены профессором Г. Фрицем (Геттингенский университет, ФРГ). Для культивирования клеток использовали среду «duty»: 16 г бакто-триптона, 10 г дрожжевого экстракта и 5 г NaCl на 1 л воды.

Выделение кольцевой ковалентно замкнутой плазмидной ДНК в preparативных количествах (без мультипликации плазмиды, с очисткой ультрацентрифугированием в градиенте плотности CsCl) вели по прописи [9].

Синтез 51-звенного [^{32}P]дуплекса — копии терминаторного участка (с 1298-й по 1349-ю п. о.) плазмиды pMac5-8 [3] — осуществляли как описано в работе [10]. ПЦР (30 циклов: 94° С, 1 мин; 50° С, 2 мин; 72° С, 1 мин) проводили в 50 мкл буферного раствора, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 8,3), 1,65 мМ MgCl_2 , 50 мМ KCl, 0,15 мМ EDTA, 0,01% желатин, 1 нг плазмидной ДНК, нефосфорилированный праймер (1,0 мкМ, 0,012 OE_{260}), [^{32}P]праймер (1,0 мкМ, 0,012 OE_{260} , $7 \cdot 10^4$ имп./мин), четыре дезоксинуклеозидтрифосфата (0,2 мМ каждый) и Taq-ДНК-полимеразу (3,5 ед. акт), в термоциклере фирмы Perkin — Elmer — Cetus (США). Водный слой покрывали сверху минеральным маслом. По окончании ПЦР реакционную смесь экстрагировали равным объемом смеси хлороформа с изоамиловым спиртом (24 : 1), осаждали олигонуклеотиды тремя объемами холодного этанола и выделяли [^{32}P]ПЦР-дуплекс электрофорезом в 8% ПААГ с последующей элюцией и осаждением этанолом.

Однотяжевую копию полученного ПЦР-дуплекса нарабатывали аналогично, используя оптимальные для асимметричной ПЦР [2] условия: 100 мкл реакционной смеси помимо Таq-ДНК-полимеразы и стандартных компонентов буфера содержали 51-звенный ПЦР-дуплекс (0,2 пмоль), нефосфорилированный праймер (0,01 мкМ, $2,4 \cdot 10^{-4}$ ОЕ₂₆₀), [³²P]праймер (0,5 мкМ, 0,012 ОЕ₂₆₀, $5 \cdot 10^4$ имп./мин).

Подготовку исходной плазмиды для мутагенеза проводили как описано в работе [1]. Конструирование мутантных плазмид вели по прописанной работе с использованием вместо двух праймеров: при конструировании гетеродуплексов на 2 мкг подготовленной плазмидной ДНК брали $1,0 \cdot 10^{-3}$ ОЕ₂₆₀ 10-звенного фосфорилированного олигонуклеотида-адаптера (10-кратный мольный избыток), $1,6 \cdot 10^{-3}$ ОЕ₂₆₀ 17-звенного нефосфорилированного олигонуклеотида-адаптера (10-кратный мольный избыток) и $2,6 \cdot 10^{-3}$ ОЕ₂₆₀ 27-звенного фосфорилированного олигонуклеотида-мутагена (10-кратный мольный избыток) или $2,6 \cdot 10^3$ имп./мин 51-звенного фосфорилированного однотяжевого [³²P]продукта асимметричной ПЦР (36 ГБк/моль, около $1,5 \cdot 10^{-3}$ ОЕ₂₆₀, 3-кратный мольный избыток).

Приготовление компетентных клеток, трансформацию и клонирование проводили как описано в работе [1]. Плазмидную ДНК клонов выделяли щелочным экспресс-методом [9], расщепляли рестриктазами *Hind*III, *Bgl*II или *Sma*I и анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле.

Экспресс-лизаты для ПЦР-анализа готовили непосредственно из выросших на твердом агаре МакКонки клеток. Для этого небольшие доли индивидуальных колоний стерильной палочкой переносили в полипропиленовые пробирки с 0,1 мл 10 мМ трис-НСl-буфера (рН 8,0), 0,25 мМ EDTA; взвесь под слоем минерального масла прогревали 5 мин при 99° С и центрифугировали (10 000 об./мин, 1 мин). На амплификацию отбирали по 5 мкл супернатанта прямо из-под масла.

При анализе клонов на присутствие целевой вставки ПЦР проводили на экспресс-лизатах клеток в условиях, описанных выше для 51-звенного ПЦР-дуплекса. В этих экспериментах использовали 18-звенные праймеры ААССТАТАААААТАГСГСГ (1,1 мкМ, 0,01 ОЕ₂₆₀) и [5'-³²P]pGACTTCCAATGTAACCGC (1,1 мкМ, 0,01 ОЕ₂₆₀, $5 \cdot 10^4$ имп./мин), амплифицирующие на исходной плазмиде дуплекс в 135 п. о., а на мутантной плазмиде со вставкой fd-терминатора — дуплекс в 161 п. о.

Определение первичных структур участков мутантных плазмид, подвергавшихся реконструкции, проводили секвенированием их [³²P]ПЦР-копий по методу Максама — Гилберта [4, 8]. В случае вставки терминатора «препаративный» ПЦР на экспресс-лизате клеток отобранного клона проводили с теми же 18-звенными праймерами: нефосфорилированным (1,1 мкМ, 0,01 ОЕ₂₆₀) и 5'-³²P-меченым (0,5 мкМ, 0,005 ОЕ₂₆₀, $1,5 \cdot 10^5$ имп./мин). Первичную структуру другой мутантной плазмиды в области делеции / вставки определяли по ПЦР-дуплексу, который был получен с использованием 17-звенных праймеров [5'-³²P]pGTCTCATGAGCGGATAC (0,5 мкМ, 0,005 ОЕ₂₆₀, $3 \cdot 10^5$ имп./мин) и САТААТТСГСТССАТТА (1,0 мкМ, 0,01 ОЕ₂₆₀), амплифицирующих на исходной плазмиде дуплекс в 213 п. о., а на мутантной плазмиде с нашей делецией / вставкой — дуплекс в 161 п. о. При двукратном избытке немеченых праймеров в ПЦР-дуплексы удавалось вводить до 90% [³²P]-праймеров. Реакционные смеси после проведения ПЦР экстрагировали равными объемами хлороформа с изоамиловым спиртом (24 : 1), олиго- и полинуклеотиды осаждали тремя объемами холодного этанола, осадок промывали 70% этанолом, подсушивали на воздухе и растворяли в нескольких микролитрах воды. Реакции химической модификации проводили прямо с аликвотами полученных растворов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Друца В. Л., Кабердин В. Р., Королева О. Н. // *Биоорганик. химия*. 1991. Т. 17. № 7. С. 945—952.
2. Gyllenstein U. V., Ehrlich H. A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. № 20. P. 7652—7656.

3. *Stanssens P., Opsomer C., McKeown Y. M., Kramer W., Zabeau M., Fritz H.-J.* // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 12. P. 4441—4454.
4. *Gussov D., Clackson T.* // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 10. P. 4000.
5. *Clark J. M.* // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 20. P. 9677—9686.
6. *Fors L., Suavedra R. A., Hood L.* // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 9. P. 2793—2799.
7. *Vallette F., Mege E., Reiss A., Adesnik M.* // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 2. P. 723—733.
8. *Maxam A. M., Gilbert W.* // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.
9. *Мануатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
10. *Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Sharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A.* // Science. 1988. V. 239. № 4839. P. 487—491.

Поступила в редакцию
7.V.1991

V. L. DRUTSA, V. R. KABEREIN, O. N. KOROLEVA, I. A. SHILOV

**EFFICIENT METHOD FOR SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF PLASMIDS
AND CLONING OF SINGLE-STRANDED DNA FRAGMENTS**

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

A three primer variant of the earlier devised oligonucleotide-directed mutagenesis in plasmids is described, useful also for the fast cloning of single-stranded DNA products of the asymmetric polymerase chain reaction (PCR). Using this method for plasmid pHD-001-14-11, a 59 b. p. deletion and a 7 b. p. insertion were simultaneously introduced at 81% frequency, and the PCR-copied phage fd transcription terminator (26 b. p.) was inserted with the yield of 67%.