



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.21

ПОЛУЧЕНИЕ ОДНОНАПРАВЛЕННЫХ ДЕЛЕЦИЙ В ПЛАЗМИДЕ С ПОМОЩЬЮ ДНК-«ПРОТЕКТОРА» И ЭКЗОНУКЛЕАЗЫ *Bal31*

Нурминский Д. И., Шевелев Ю. Я., Калмыкова А. И.

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

Получение серии направленных делеций, начинающихся от сайта узнавания эндонуклеазы во фрагменте ДНК, используют при определении нуклеотидной последовательности протяженных участков ДНК, а также при выполнении разнообразных генно-инженерных манипуляций. В то время как получение делеций, распространяющихся в обе стороны от данного сайта, не представляет проблемы [1], получить однонаправленные делеции в заданном направлении часто бывает затруднительно.

Для получения однонаправленных делеций обычно используется экзонуклеаза *EcoIII*, гидролизующая одну из цепей ДНК в направлении 3' →

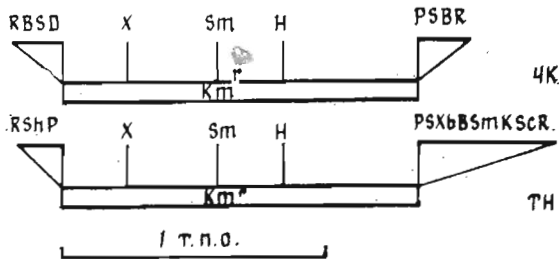


Рис. 1. Структура «протекторов» 4К [5] и TH. Km^r — ген устойчивости к канамицину. Сайты рестрикции: R — *EcoRI*, B — *BamHI*, S — *SalGI*, P — *PstI*, H — *HindIII*, Sm — *SmaI*, Sh — *SphI*, Sc — *SacI*, K — *KpnI*, X — *XhoI*, Xb — *XbaI*

→5' в дуплексах с 5'-выступающими или тупыми концами. Если 3'-конец ДНК, образовавшийся после обработки ее рестриктазой, достроен ДНК-полимеразой с помощью дезоксирибонуклеозид- α -трифосфатов, то он становится устойчивым к действию *EcoIII*. Это создает возможность проведения делеции лишь в одном, заданном направлении после расщепления ДНК в точке, прилегающей к месту первого разрыва, какой-либо другой рестриктазой [2–4].

Использование данного метода ограничено тем, что в точке начала делеций должны присутствовать сайты двух соответствующих рестриктаз.

Очевидно, более удобен метод, позволяющий получать однонаправленные делеции, начинающиеся от единственного сайта узнавания любой выбранной рестриктазы. Мы предлагаем такой метод, основанный на использовании экзонуклеазы *Bal31* [1], которая гидролизует обе цепи ДНК в обоих направлениях от сайта рестрикции. Для защиты части плазмиды, не подлежащей расщеплению *Bal31*, предлагается расположить рядом с ней фрагмент ДНК произвольной последовательности — «протектор», ко-

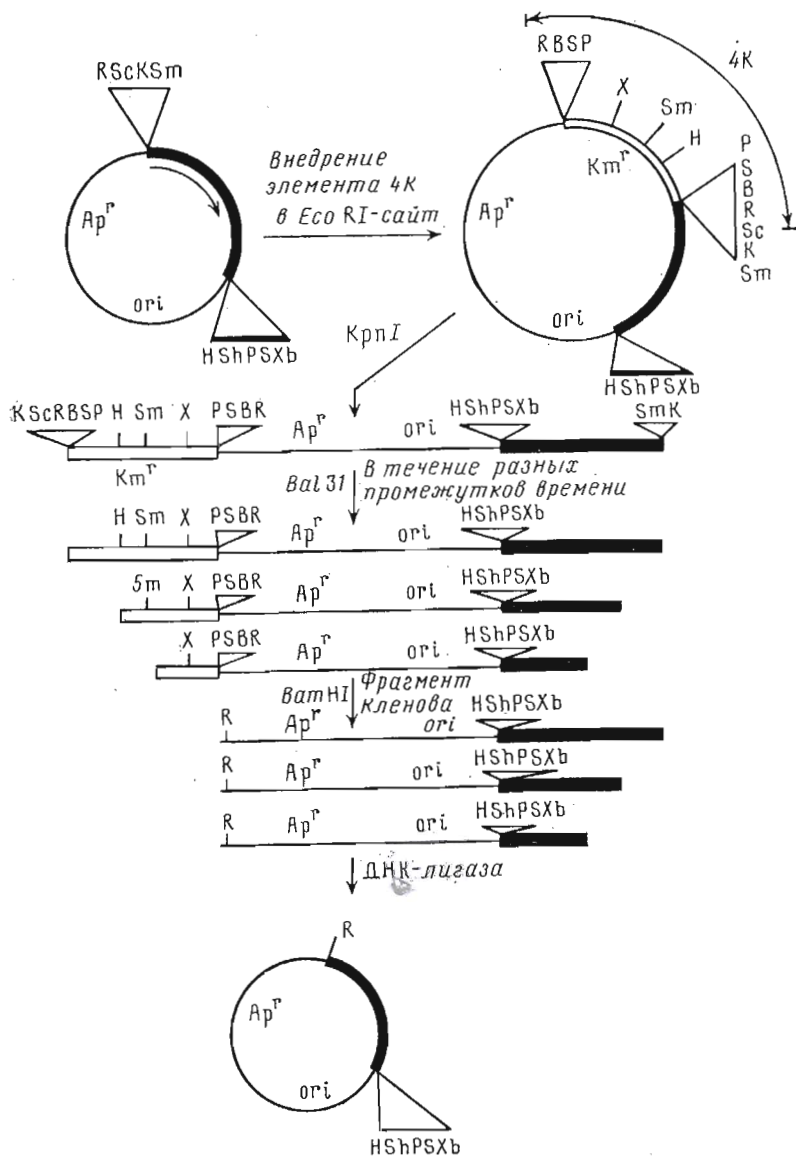


Рис. 2. Схема получения однонаправленных делеций при помощи *Bal31* и 4К-«протектора» в *BglIII*-фрагменте 1,5 т.п.о., клонированном в *BamHI*-сайт полилинкера рUC19. ДНК рUC19 обозначена линией, делетируемый фрагмент — толстой линией, последовательность 4К-«протектора» — двойной линией, стрелкой указано направление протекания делеций из целевой последовательности. Ap^r — ген устойчивости к ампициллину. Обозначения рестриктаз как на рис. 1

торый сам будет расщепляться *Bal31*, но сохранит нужную часть плазмиды в неприкосновенности.

При получении во фрагментах ДНК делеций размером до 1,5 т.п.о. в качестве «протектора» можно использовать элемент 4К, несущий ген устойчивости к канамицину [5]. Наличие гена Km^r облегчает отбор клонов, включающих «протектор». Особые преимущества имеет сконструированный нами на основе 4К элемент ТН (Trojan Horse) (рис. 1), использование которого позволяет осуществлять направленное разрушение (делемирование) прилегающего к нему фрагмента.

На примере использования 4К-«протектора» рассмотрим метод получения однонаправленных делеций в *BglIII*-фрагменте ДНК размером 1,5 т.п.о., клонированном в *BamHI*-сайт полилинкера рUC19 (рис. 2). Для получения таких делеций после внедрения элемента 4К в *EcoRI*-сайт плазмиды мы линейаризовали ее рестриктазой *KpnI*, сайт узнавания кото-

рой в полилинкере рUC19 расположен между «протектором» и фрагментом, в котором требовалось получить направленные делеции. После обработки линейаризованной плазмиды *Bal31* в течение разных интервалов времени остатки «протектора» удаляли, гидролизуя ДНК рестриктазой *VamHI*. Образовавшиеся концы ДНК достраивали фрагментом Кленова и циклизовали укороченные молекулы ДНК-лигазой фага Т4. В результате мы получили серию плазмид, несущих различные делетированные варианты исходного фрагмента, которые были использованы для секвенирования по методу Максама — Гилберта. Мечение укороченных фрагментов осуществляли по *EcoRI*-концу ДНК. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей позволил составить полную последовательность исходного фрагмента, что доказало пригодность предлагаемого метода получения однонаправленных делеций.

При использовании элемента 4K в качестве «протектора» необходимо, как и в методе с использованием *EcoIII*, присутствие в районе начала делеций по крайней мере двух сайтов рестрикции: один для внедрения элемента 4K, другой — для последующей линейаризации плазмиды. Это обусловлено тем, что по краям элемента 4K расположены одинаковые сайты рестрикции, что делает невозможным линейаризацию плазмиды по любому из этих сайтов.

Для получения однонаправленных делеций от любого уникального сайта рестрикции удобно пользоваться элементом TH (рис. 1), полилинкер которого содержит ряд уникальных сайтов рестрикции, пригодных для последующей линейаризации плазмиды перед обработкой *Bal31*. Элемент TH можно внедрить в сайт узнавания любой рестриктазы. Для этого нужно затупить *EcoRI*-концы элемента и при необходимости концы плазмидной ДНК, полученные при ее обработке соответствующей рестриктазой (если только внедрение не осуществляется в *EcoRI*-сайт), затем осуществить лигирование по тупым концам. Линейаризацию плазмиды с TH-«протектором» для последующей обработки *Bal31* можно проводить по любому сайту рестрикции (кроме *PstI*), находящемуся в полилинкере этого элемента.

Для получения делеций размером более 1,5 т. п. о. длина «протекторов» может быть увеличена, причем необходимое для этого внедрение других фрагментов ДНК в тело «протектора» легко тестировать по утрате клонами устойчивости к канамицину.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Poncz M., Solowiejczyk D., Ballantine M., Schwartz E., Surrey S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 14. P. 4298–4302.
2. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. // Gene. 1983. V. 33. № 1. P. 103–119.
3. Henikoff S. // Gene. 1984. V. 28. № 3. P. 351–359.
4. Laughon A., Boulet A. M., Bermingham J. R., Jr., Laymon R. A., Scott M. P. // Moll. Cell. Biol. 1986. V. 6. № 12. P. 4676–4689.
5. Vieira J., Messing J. // Gene. 1982. V. 19. № 3. P. 259.

Поступило в редакцию
29.VII.1988

После доработки
27.II.1989

GENERATION OF UNIDIRECTIONAL DELETIONS IN PLASMID DNA USING EXONUCLEASE *Bal31*

NURMINSKII D. I., SHEVELEV Yu. Ya., KALMYKOVA A. I.

*Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A method of generating unidirectional deletions from the cleavage site of any endonuclease by means of exonuclease *Bal31* is developed. DNA sequence to be prevented from *Bal31* hydrolysis is protected by a special «potector» element TH (Trojan Horse) inserted upstream of the sequence.