

Лекция 4 Мутагенез *in vitro*

Мутагенез *in vitro*.

Конструирование штаммов - продуцентов первичных метаболитов на основе *Escherichia coli*.

Направленный мутагенез молекул ДНК *in vitro*. Генноинженерные делеции и вставки последовательностей ДНК. Статический мутагенез гибридных ДНК. Сегмент-направленный мутагенез *in vitro*.

Метод инсерционного локализованного мутагенеза. Создание геномной библиотеки. Скрининг полученной коллекции. Скрининг с помощью гибридизации, иммунологический скрининг, скрининг по активности белка. Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ДНК фага M13. Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием плазмидной ДНК. Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ПЦР-амплификации. Случайный мутагенез. Случайный мутагенез с использованием «вырожденных» олигонуклеотидных праймеров. Случайный мутагенез с использованием аналогов нуклеотидов.

4.1 Мутагенез *in vitro*.

Долгое время создание микробных продуцентов биологически активных веществ основывалось на применение методов мутагенеза *in vivo*.

Однако мутагенез *in vivo* имеет и ряд недостатков:

- воздействию мутагена подвергается весь геном;
- возникает ряд множественных мутаций, что затрудняет их идентификацию.

Появление методологии генной инженерии позволяет внедрить в селекцию промышленных штаммов методы мутагенеза *in vitro*, с помощью которых можно вносить специфические изменения в нуклеотидные последовательности отдельных генов.

В наиболее простом варианте ген, в последовательность которого необходимо внести изменения, клонируют в составе вектора по удобным сайтам рестрикции. Затем его выделяют и подвергают обработке мутагеном *in vitro*. Вследствие проведения реакции *in vitro* дозы мутагена могут быть достаточно высокими, что значительно повышает частоту мутагенеза. Такой подход использован при создании штамма-продуцента гомосерина. Была выделена гибридная плазида, содержащая в своем составе весь треониновый оперон, а для сверхсинтеза гомосерина необходима работа только двух первых генов оперона, поэтому последующее превращение гомосерина в треонин должно быть заблокировано. Эта цель достигалась обработкой *in vitro* гибридной плазмиды гидроксиламином. Затем такой плазмидой трансформировали *Thg* В⁻ штамм и отобрали мутанты, продуцирующие гомосерин в большом количестве.

4.2 МЕТОД ИНСЕРЦИОННОГО ЛОКАЛИЗОВАННОГО МУТАГЕНЕЗА

Для получения стабильных неревертирующих мутаций в определенном гене можно применить метод инсерционного локализованного мутагенеза. Для этого ген клонируют на плазмиде и встраивают в него фрагмент ДНК, кодирующий устойчивость к антибиотику. Затем клетки трансформируют сконструированной гибридной плазмидой, содержащей указанный детерминант, фланкированный последовательностями, гомологичными хромосомному гену. В результате двойного кроссинговера происходит интеграция гена лекарственной устойчивости в гомологичный район хромосомы. Трансформанты отбирают на селективных средах с антибиотиками.

4.3 Направленный мутагенез

Внесение специфических изменений в кодирующие последовательности ДНК, приводящих к определенным изменениям в аминокислотных последовательностях, называется направленным мутагенезом.

Для направленного мутагенеза клонированных генов используют разные экспериментальные подходы:

- в одних случаях вносят изменения в специфические сайты клонированного гена (сайт-специфический мутагенез);
- в других - случайным образом изменяют короткий фрагмент клонированного гена (случайный мутагенез).

Одним из наиболее простых методов внесения точковых мутаций в клонированный ген является сайт-специфический (олигонуклеотид-направленный) мутагенез.

Для его проведения необходимо знать:

- 1) точную нуклеотидную последовательность той области ДНК, которую требуется изменить;
- 2) характер аминокислотных замен.

3.2.1. Олигонуклеотид-направленный мутагенез

Впервые в 1978 г. эту методику применил Д. Хатчинсон при постановке мутагенеза на фаге фХ 174. Традиционная схема сайт-специфического мутагенеза сводится к следующему:

- фрагмент ДНК, в котором необходимо получить мутацию, переводят в однонитевую форму на каком-либо фаговом векторе;
- синтезируют олигонуклеотид размером 7-21 п. н. (синтез олигонуклеотидов - линкеров, адаптеров, праймеров, промоторов - проводят химическим способом, наращивая их цепочки путем присоединения определенных звеньев к заданной последовательности). Синтезируемый олигонуклеотид должен быть комплементарен сайту ДНК, в который предполагается ввести мутацию. При этом исследователь может получить на нем различные точечные мутации - делеции, вставки, транзиции и трансверсии, которые должны находиться в центральной части нуклеотида;
- олигонуклеотид гибридизуют с однонитевой фаговой ДНК и используют для синтеза *in vitro* второй цепочки ДНК. Эти манипуляции проводят с помощью «кленовского» фрагмента ДНК (это фрагмент, который получают при обработке ДНК-полимеразы I с помощью трипсина или субтилизина. Он сохраняет только активность большой субъединицы этого фермента, т. е. полимеразную и 3'-5' экзонуклеазную активности);
- с помощью лигазы получают ковалентно замкнутое кольцо фаговой ДНК, нуклеазой S1 убирают незавершенные продукты синтеза;
- кольцевой ДНК трансформируют сферопласты *E. coli*. После трансформации и последующего акта репликации потомство анализируют на наличие клеток дикого типа и мутантов (их соотношение должно быть равным 1:1). Выход мутантов можно увеличить, если суммарную ДНК, выделенную из фагов, повторно использовать для синтеза *in vitro* с помощью тех же синтетических праймеров.

Существует несколько типов олигонуклеотид-направленного мутагенеза.

Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ДНК фага M13.

1. Встраивают ген-мишень в двухцепочечную форму вектора на основе бактериофага M13.
2. Выделяют одноцепочечную форму вектора (плюс-цепь M13).

3. Смешивают одноцепочечную форму вектора, несущего ген-мишень с синтетическим олигонуклеотидом, который комплементарен сегменту клонированного гена за исключением одного нуклеотида. Этот отличающийся нуклеотид находится примерно посередине олигонуклеотида и соответствует тому нуклеотиду кодона мРНК, который необходимо изменить.

4. Затравкой для инициации синтеза ДНК служит 3'-конец спарившегося олигонуклеотида, а интактная цепь ДНК М13 - матрицей. Репликация осуществляется с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I и при наличии в среде четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, ДНК-лигаза фага Т4 замыкает синтезированную цепь в кольцо.

5. Двухцепочечными молекулами ДНК фага М13, содержащими некомплементарные нуклеотиды, трансформируют клетки *E. coli*.

6. Происходит лизис клеток и образование бляшек. Часть фаговых частиц содержит ДНК дикого типа, а часть - мутантную ДНК.

7. Фаговые частицы, содержащие мутантную ДНК. Идентифицируются с помощью ДНК-гибридизации.

Основным недостатком этого типа олигонуклеотид-направленного мутагенеза является тот факт, что для получения мутантного гена необходим его перенос из плазмиды в фаговую ДНК, а после завершения мутагенеза - обратно в плазмиду. Поэтому были разработаны другие типы олигонуклеотид-направленного мутагенеза, основанные на применении плазмидных ДНК.

Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием плазмидной ДНК.

Плазмидный вектор несет:

- полилинкер, в который будет встраиваться ген-мишень;
- ген устойчивости к тетрациклину;
- ген устойчивости к ампициллину, в котором заменен один нуклеотид, благодаря чему этот ген находится в неактивном состоянии.

Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием плазмидной ДНК проводят следующим образом:

1. Ген, в который необходимо внести точковую мутацию, встраивают по сайтам рестрикции в полилинкер вектора и трансформируют полученной рекомбинантной плазмидой клетки *E. coli*.

2. Для перевода плазмиды в однонитевую форму ее денатурируют щелочью.

3. Производят отжиг плазмиды с тремя различными нуклеотидами, каждый из которых имеет свою функцию:

- первый - предназначен для внесения изменений в клонированную ДНК-мишень;
- второй - для устранения мутации в гене устойчивости к ампициллину;
- третий - для замены одного нуклеотида в гене устойчивости к тетрациклину благодаря чему этот ген переходит в неактивное состояние.

4. Олигонуклеотиды служат затравками для синтеза ДНК, а интактная кольцевая молекула ДНК - матрицей.

5. Одноцепочечные разрывы в новосинтезированной цепи зашиваются с помощью ДНК-лигазы T4.

6. Полученными двухцепочечными молекулами плазмиды трансформируют клетки *E. coli*.

Трансформантов отбирают по признаку устойчивости к ампициллину и чувствительности к тетрациклину. Примерно 90 % из них содержат специфическую мутацию в клонированном гене.

Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ПЦР-амплификации.

Еще одним подходом к получению точковых мутаций является сайт-специфический мутагенез с использованием ПЦР-амплификации, который заключается в следующем:

- ген, в определенную последовательность которого нужно внести мутацию (ген-мишень) встраивают в плазмидный вектор;
- препарат помещают в две разные пробирки;
- в первую из них добавляют по два специфических праймера для ПЦР: 1 и 2, во вторую - праймеры 3 и 4;
- праймеры 2 и 4 полностью комплементарны участку клонированного гена или прилегающей к нему последовательности;
- праймеры 1 и 3 комплементарны другому участку, но содержат один некомплементарный нуклеотид;
- праймеры 2 и 4 связываются с разными цепями ДНК;
- праймеры 1 и 3 также комплементарны разным цепям молекулы ДНК и так как они содержат один некомплементарный нуклеотид, то в результате ПЦР будет происходить замена обоих нуклеотидов в паре;
- положение сайтов гибридизации праймеров 1 и 2, 3 и 4 отличается и ПЦР-продукты в разных пробирках имеют разные концы.

1. Проводят ПЦР, в результате которой образуются линейные молекулы.
2. По окончании ПЦР содержимое пробирок объединяют.
3. Проводят денатурацию, а затем ренатурацию.
4. В результате образуются две исходные линейные амплифицированные молекулы и две кольцевые плазмиды, каждая из которых несет два одноцепочечных разрыва в разных локусах молекулы.
5. Полученными продуктами трансформируют клетки *E. coli*.
6. В клетках *E. coli* стабильно поддерживаются в виде плазмид и наследуются только кольцевые, а не линейные молекулы, при этом все они несут сайт-специфическую мутацию.

Таким образом, с помощью описанного метода можно вносить точечные мутации в клонированный ген, при этом отпадает необходимость во встраивании гена в ДНК фага M13 и в переносе мутантного гена из M13-вектора в экспрессирующий вектор.

3.2.2. Случайный мутагенез

Использование сайт-специфического мутагенеза для получения мутантных клонов часто бывает невозможно, так как:

- бывает неизвестна точная нуклеотидная последовательность той области ДНК, которую требуется изменить;
- какую аминокислотную, а следовательно, нуклеотидную замену нужно произвести, чтобы получить белок с нужными свойствами.

Поэтому разработаны подходы для изменения не только конкретных нуклеотидных пар в определенном сайте, но и изменения определенного нуклеотидного сайта всеми возможными способами.

Случайный мутагенез с использованием «вырожденных» олигонуклеотидных праймеров.

Синтезируют «вырожденные» олигонуклеотидные праймеры, т. е. такие, в одном из сайтов которых находятся разные нуклеотиды. При использовании таких праймеров после ПЦР образуется набор мутантных штаммов с различными нуклеотидными заменами в специфическом сайте.

Таким образом, в данном сайте происходят разные аминокислотные замены, в результате которых могут случайно синтезироваться белки с полезными свойствами.

Если ни один из образующихся белков не обладает нужными свойствами, процедуру надо начинать сначала, т. е. синтезируют новый набор «вырожденных» праймеров, который комплементарен другой области гена. Если работа увенчалась успехом, то амплифицированные молекулы встраивают в соответствующий плазмидный вектор. Этот подход позволяет получить измененные гены со случайными мутациями.

Случайный мутагенез с использованием аналогов нуклеотидов.

1. Ген-мишень встраивают в плазмиду рядом с двумя тесно расположенными сайтами рестрикции. Эти сайты подбирают так, чтобы 3'-конец сайта расщепления, расположенного рядом с клонированным геном, был укорочен, а 3'-конец с другой стороны плазмиды выступал.

2. Плазмидную ДНК обрабатывают указанными рестриктазами.

3. В реакционную смесь добавляют экзонуклеазу III *E. coli*. Этот фермент способен расщеплять молекулу ДНК только с укороченных 3'-концов. Экзонуклеаза III отщепляет от укороченного 3'-конца цепи по одному нуклеотиду.

4. Через определенное время реакцию останавливают.

5. Заполняют пробел с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. В реакционную смесь добавляют все четыре дезоксинуклеозидтрифосфата (dNTP) и в небольшом количестве - аналог одного из них. В результате получают плазмиды, содержащие ген-мишень, в одном или нескольких сайтах которого находится аналог соответствующего нуклеотида.

6. Обрабатывают продукт нуклеазой S1 для образования тупых концов, лигируют с помощью ДНК-лигазы T4.

7. Плазмидами трансформируют клетки *E. coli*, которые там реплицируются, и в комплементарную цепь включаются нуклеотиды, отличные от исходных, в том сайте, где находится аналог нуклеотида.

Недостаток подходов, разработанных для случайного мутагенеза, состоит в том, что в клонированном гене образуется большое число случайных мутаций, необходимым этапом работы является тестирования каждого клона для идентификации того, который детерминировал бы синтез нужного белка. Рассмотрим некоторые способы получения таких мутантов.