

4. Site directed mutagenesis and the role of the oxianion hole in subtilisin / P. Bryan, M. W. Pantoliano, S. G. Quill et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 11.—P. 3743—3745
5. Птицын О. Б. Белок как отредактированный статистический сополимер // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 3.—С. 574—590.
6. Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики.—М.: Наука, 1977.—336 с.
7. Leatherbarrow R. J., Fersht A. R. Protein engineering // Protein Eng.—1986.—1, N 1.—P. 7—16.
8. Конструирование белковых молекул / А. В. Финкельштейн, М. П. Кирпичников, О. Б. Птицын, К. Г. Скрябин // Вест. АН СССР.—1988.—№ 1.—С. 102—111.
9. The protein bank. A computer-based archival file for macromolecular structures / F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams et al. // Eur. J. Biochem.—1977.—80, N 2.—P. 319—324.
10. Crystal structures of *E. coli* and *L. casei* dihydrofolate reductase / J. T. Bolin, D. J. Filman, D. A. Matthews et al. // J. Biol. Chem.—1982.—257, N 27.—P. 13650—13655.
11. Remington S. J., Ten Eyck L. F., Matthews B. W. Atomic coordinates for T4 phage lysozyme // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1977.—75, N 2.—P. 265—270.

Ин-т белка АН СССР, Пущино

Получено 29.03.88

УДК 547.963:577.213.3

ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ И ЭКСПРЕССИЯ МУТАНТНОГО ГЕНА ЛИЗОЦИМА ФАГА Т4

В. В. Леонтьев, О. И. Грязнова, А. Т. Гудков

Введение. Метод олигонуклеотид-направленного мутагенеза [1] открывает широкие возможности для исследования принципов функционирования белков и в перспективе создания новых белков с заданными свойствами.

В работе [2] теоретически рассматривается возможность «прививки» активного центра сериновых протеаз на поверхность белковой глобулы. Анализ пространственной структуры ряда белков показал, что одним из подходящих «носителей» привитого активного центра может стать лизоцим бактериофага Т4 [2].

Для экспериментальной проверки такой возможности в гене этого белка нами проведены нуклеотидные замены, изменяющие смысл кодонов для трех аминокислот (Asp10→His10, Asn101→Asp101, Arg148→Ser148); сконструированы плазмиды для экспрессии мутантного белка и белка дикого типа.

Материалы и методы. В работе использованы штаммы *Escherichia coli*: JM101 ($\Delta lacpro$, *thi*, *supE*, *F'* *traD36*, *proAB*, *lacI^q*, Z Δ M15), JM105 ($\Delta lacpro$, *thi*, *strA*, *endA*, *sbcB15*, *hsdR4*, *F'* *traD36*, *proAB*, *lacI^q*, Z Δ M15), RZ1032 (*H_{ijr}KL16*, *PO/45*, *lysA* (61-62), *thi-1*, *relA1*, *SpoT1*, *dut-1*, *ung-1*, *Zbd-279*: :*Tn10*), векторный бактериофаг M13mp18. Олигонуклеотиды синтезированы на автоматическом ДНК-синтезаторе «Gene Assembler» фирмы «Pharmacia» (Швеция), ферменты рестрикции и лигирования производства НПО «Фермент» (Вильнюс). Ген лизоцима фага Т4 любезно предоставлен д-ром Тибодо (Сэтл, США).

Общая схема работы представлена на рис. 1. Ген лизоцима, исходно встроенный в бактериофаг λ 1358 [3], переклонирован в фаг M13mp18 по сайтам *XbaI* и *HindIII*. Так был получен фаг M13eI.

Кольцевую однопонитевую ДНК этого фага выделяли фенольной депротенизацией зрелых фаговых частиц [4], выращенных на штамме RZ1032. Выделенная из этого штамма фаговая ДНК содержит определенный процент замен Т→У, не приводящих к изменению кодирующих функций, но делающих ее объектом интенсивной репарации в обычных штаммах *E. coli* [4]. Кольцевую ДНК отжигали с двунитовой ДНК родительского фага M13mp18, выделенной из обычного штамма и рестрицированной по сайтам *HindIII* и *SmaI*, получая, таким образом, «дуплекс с брешью» [5]. Затем к гену лизоцима с помощью гибридизации одновременно присоединяли три мутагенных олигонуклеотида:

I (СТААГАССТТСАТСТАТАС, Asp10→His10), II (GGAAAACCATATCAATCAATGC, Asn101→Asp101), III (CGTTGTAATGACTGATTTTGC, Arg148→Ser148).

Оставшиеся одонитевые участки заполняли с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I и лигировали [5].

Полученную таким образом кольцевую двунитевую ДНК очищали фильтрованием через нитроцеллюлозные фильтры [6] и трансформировали в штамм *JM101*. Одна из двух цепей ДНК, а именно содержащая замены Т→У, в большей степени становится объектом репарационных процессов *in vivo*; выход потомства другой (мутантной) цепи увеличивается. Мутантные клоны отбирали путем гиб-

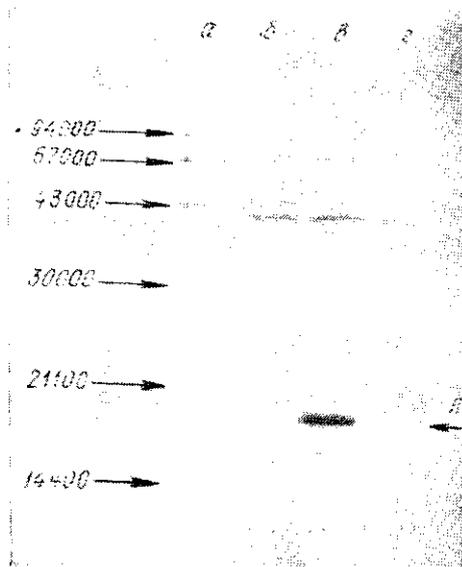
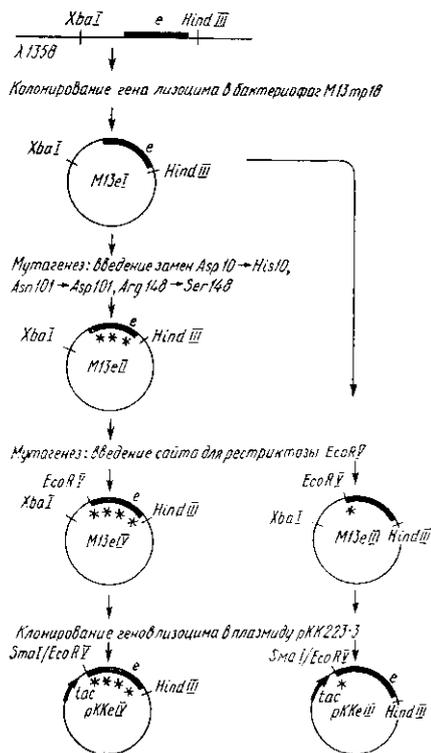


Рис. 1. Введение нуклеотидных замен в ген лизоцима бактериофага T4 и создание плазмид для экспрессии мутантного белка и белка дикого типа: *e* — ген лизоцима; * — замены нуклеотидов; *SmaI/EcoRV* — сшивка «тупых» концов, образованных рестриктазами *SmaI* и *EcoRV*

Fig. 1. Scheme of mutagenesis and expression vector construction for the lysozyme of phage T4: *e* — lysozyme gene; (*) — changed nucleotides; *SmaI/EcoRV* — ligation of *SmaI* and *EcoRV* «blunt» ends

Рис. 2. Индукция синтеза мутантного лизоцима и лизоцима дикого типа. Клетки штамма *JM105*, несущие плазмиды *pKKeIII* и *pKKeIV*, растили до оптической плотности 1 и к среде добавляли изопропилтиогаляктозид (0,002 %). Через 1 ч клетки осаждали, подвергали лизису в присутствии DS-Na и наносили аликвоты на форец: *a* — стандарты молекулярной массы; *b, в* — клетки, несущие *pKKeIII* до и после индукции соответственно; *г* — клетки, несущие *pKKeIV* после индукции. Л — лизоцим

Fig. 2. Induction of synthesis of the mutant and wild type lysozymes. Strain *JM105* with *pKKeIII* and *pKKeIV* plasmids were grown until the optical density reached 1 and then IPTG (0.002 %) was added. 1 hour later the cells were precipitated, lysed with DS-Na with the subsequent electrophoresis: *a* — standards of molecular weight; *b, в* — cells with *pKKeIII* before and after induction, respectively; *г* — cells with *pKKeIV* after induction, *л* — lysozyme

ридизации их ДНК с ³²P-мечеными олигонуклеотидами I—III на нитроцеллюлозных фильтрах [7]. Эффективность мутагенеза по данным гибридизации составляла около 40 %.

Результаты и обсуждение. По результатам повторной гибридизации был отобран клон *M13eII*, содержащий все три нуклеотидные замены. Для получения мутантного белка в препаративных количествах на основе плазмиды *pKKe223-3* («Pharmacia») была сконструирована плаزمида *pKKeIV*. С помощью олигонуклеотида IV (TATATTCATGATATCTCCTAAG) в ДНК фага *M13eII* непосредственно перед инициирующим кодом ATG гена лизоцима был введен сайт рестрикции для рестриктазы *EcoRV* (GATATC) для отделения от гена нуклеотидной последовательности, фланкирующей его с 5'-конца. Эта последовательность, предположительно, играет негативную роль в трансляции мРНК лизоцима [8], что может понизить уровень экспрессии

белка. В результате введения нового сайта рестрикции был получен фаг *M13elIV*. Используя новый *EcoRV*-сайт и сайт рестрикции для рестриктазы *HindIII*, ген лизоцима вырезали из фага *M13elIV* и встраивали в плазмиду *pKK223-3* по сайтам *HindIII* и *SmaI*. Исходная плазида содержит гибридный регулируемый *lac*-промотор, а также сигналы терминации транскрипции и последовательность Шайна — Дальгарно. В полученной плазмиде эта последовательность отделена от иницирующего кодона лизоцима фрагментом ДНК длиной 17 нуклеотидов. Аналогичным образом сайт рестрикции для рестриктазы *EcoRV* был введен в ДНК фага *M13elI* и получена плазида *pKKeIII*, содержащая ген лизоцима дикого типа.

Плазидами *pKKeIII* и *pKKeIV* трансформировали клетки штамма *JM105* (рис. 2). Клоны, содержащие эти плазмиды, после индукции изопропилногалактозидом (1—2 ч) продуцируют белок в количестве около 15 % общей массы белков клеточного лизата (по результатам денситометрирования гелей, окрашенных Кумасси). В настоящее время ведется работа по выделению мутантного белка и исследованию его ферментативной активности и физико-химических характеристик.

SITE-DIRECTED MUTAGENESIS AND EXPRESSION OF MUTATED LYSOZYME GENE OF PHAGE T4

V. V. Leontjev, O. I. Gryaznova, A. T. Gudkov

Institute of Protein Research,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region

Summary

Oligonucleotide site-directed mutagenesis of the lysozyme gene of phage *T4* was used to carry out three amino acid substitutions. It has been suggested earlier that this can create an active site on the surface of the lysozyme molecule. Two vectors were constructed for expression of the mutant and wild type lysozyme genes.

1. Leatherbarrow R. J., Fersht A. R. Protein engineering (review) // *Protein Eng.*—1986.—1, N 1.—P. 7—16.
2. Финкельштейн А. В. Можно ли привить белковой глобуле «чужой» активный центр? // *Биополимеры и клетка.*—1989.—5, № 1.—С. 89—93.
3. Owen J. E., Schulz D. W., Taylor A. Nucleotide sequence of the lysozyme gene of bacteriophage T4 // *J. Mol. Biol.*—1983.—165, N 2.—P. 229—248.
4. Kunkel T. A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—82, N 2.—P. 488—492.
5. Cramer W., Schughart K., Fritz H.-J. Directed mutagenesis of DNA cloned in filamentous phage. Influence of hemimethylated GATC sites on marker recovery from restriction fragment // *Nucl. Acids Res.*—1982.—10, N 20.—P. 6475—6485.
6. Taylor J. W., Ott J., Eskstein F. The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphothiolate-modified DNA // *Ibid.*—1985.—13, N 24.—P. 8765—8785.
7. Zoller M. J., Smith M. Oligonucleotide-directed mutagenesis using *M13*-derived vectors: an efficient general procedure for production of point mutation in any fragment DNA // *Ibid.*—1982.—10, N 20.—P. 6487—6500.
8. Perry L. J., Heynecker H. L., Wetzel R. Non-toxic expression in *Escherichia coli* of a plasmid-encoded gene for phage T4 lysozyme // *Gene.*—1985.—38, N 1/3.—P. 259—264.

Ин-т белка АН СССР, Пушкино

Получено 29.03.88