

Научная статья

Original article

УДК 577.214.6



**САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ *IN VITRO* МУТАГЕНЕЗ ПРИ ПОМОЩИ  
ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ**  
**SITE-DIRECTED MUTAGENESIS IN VITRO BY ISOTHERMAL  
AMPLIFICATION**

**Набережнов Денис Сергеевич**, кандидат биологических наук, Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта, Российской академии наук; г. Москва, [nds.xvii@gmail.com](mailto:nds.xvii@gmail.com)

**Naberezhnov Denis Sergeevich**, PhD, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Moscow, [nds.xvii@gmail.com](mailto:nds.xvii@gmail.com)

**Аннотация.** Методы изотермической амплификации ДНК получили широкое распространение в клинической диагностической практике как методы определения разных патогенов, главным образом вирусов. Предложенный нами новый метод изотермической амплификации основан на использовании амплификации, опосредованной никующим ферментом, в которой ДНК-дуплекс содержит повторы, позволяющие ему амплифицироваться неограниченное число раз без использования праймеров. Мы использовали новый метод изотермической амплификации ДНК для сайт-направленного мутагенеза участка искусственного интрона.

**Annotation.** Isothermal amplification of DNA is common clinical diagnostic methods of detection of various pathogens, mainly viruses. The new method of isothermal amplification based on nicking enzyme-assisted amplification and ends repeats of DNA which allowing to amplification an unlimited number of times without the use of primers is proposed. We used the new method of isothermal DNA amplification for site-directed mutagenesis of sequence of artificial intron.

**Ключевые слова:** молекулярное клонирование, изотермическая амплификация, сайт-направленный мутагенез, интроны, синтетическая биология

**Keywords:** molecular cloning, isothermal amplification, site-directed mutagenesis, introns, synthetic biology

## ВВЕДЕНИЕ

Изотермические методы амплификации ДНК являются альтернативой полимеразной цепной реакции (ПЦР). Особенностью изотермических методов является то, что увеличение количества ДНК происходит при постоянной температуре, поэтому количество ДНК увеличивается не импульсно (не со стадиями нагрева и охлаждения, как в ПЦР), а непрерывно и время, требуемое на проведение изотермической амплификации ДНК, сокращается в несколько раз. Изотермическая амплификация практически не применяется в научных целях по причине сложного подбора условий проведения реакции и того, что продукты реакции представляют собой не линейный фрагмент ДНК, а разветвленный конгломерат одноцепочечных, или двуцепочечных нитей, или одноцепочечную ДНК, поэтому такие продукты амплификации ДНК очень неудобны для исследователей.

В тоже время методы изотермической амплификации значительно различаются по принципам проведения, поэтому некоторые из них могут быть использованы для специфических исследовательских целей. Одним из видов изотермической амплификации является амплификация посредством самозаворачивающихся, модифицированных фосфотионатом концевых шпилек

(Phosphorothioated-Terminal Hairpin formation and Self-Priming extension, PS-THSP), предложенная лабораторией Эллингтона [1]. Эллингтон и соавторы использовали данную амплификацию в качестве модели первых молекулярных репликаторов для изучения вопроса происхождения жизни [2]. Скорость данного вида амплификации крайне низкая вследствие низкой эффективности заворачивания концевой последовательности и соответственно низкая эффективность амплификации. Также реакция имеет узкий температурный диапазон протекания. Для увеличения эффективности заворачивания концевой последовательности авторы использовали «экзотический» подход, состоящий в замене фосфата в сахарофосфатном на тиофосфат, что приводит к снижению термостабильности двухцепочечной ДНК и усилению «самоскладывания» концевых шпилек. Путем оптимизации количества тиофосфатов в исходной матрицы ДНК, авторы значительно увеличили эффективность самосвертывания и расширили температурный диапазон проведения реакции.

Данная реакция в первую очередь интересна тем, что протекает без использования праймеров, поэтому удобна для тех случаев, когда необходима амплификация ДНК требующая большого количества раундов удвоения, примером такого случая может быть получение случайной последовательности ДНК при помощи сайт-направленного мутагенеза.

Амплификация посредством самозаворачивающихся, модифицированных фосфотионатом концевых шпилек, была нами улучшена и применена для получения случайной последовательности искусственного интрона.

## МЕТОДЫ

### Последовательности ДНК.

*21-Amp99-AsiG-F*

AGGTGATGGGCACCGGTAAGT

*28-Amp99-PvuII-R*

AAGATCACGCTGTCCTCGGGGACAGCTG



**Агарозный гель-электрофорез.** Аликвоту реакционной смеси объемом 10 мкл смешивали с 10x Loading buffer (СибЭнзим, Россия) и подвергали гель-электрофорезу в 0,5% агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Продукты амплификации визуализировали при помощи ChemiDoc Touch Gel Imaging System (Bio-Rad, США).

**Молекулярное клонирование.** Плазмида pSB-IR-pA-Pause\_Site- $\beta$ -actin-HybInt-TurboGFP(99intr12)-MODC-IntrHBB-bGHpA-SV40pr-BleoR-SV40pA, использованная в экспериментах получена лигированием двух фрагментов ДНК. В качестве исходной плазмиды была использована плазмида pSB-IR-pA-Pause\_Site- $\beta$ -actin-HybInt-TurboGFP(ins)-MODC-IntrHBB-bGHpA-SV40pr-BleoR-SV40pA, ранее полученная в нашей лаборатории. Конкатемер d209-AT был рестрицирован эндонуклеазами рестрикции AsiGI и PvuII и клонирован в плазмиду pSB-IR-pA-Pause\_Site- $\beta$ -actin-HybInt-TurboGFP(ins)-MODC-IntrHBB-bGHpA-SV40pr-BleoR-SV40pA по сайтам рестрикции AsiGI и PvuII.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для повышения эффективности амплификации посредством самозаворачивающихся, модифицированных фосфотионатом концевых шпилек, концевые повторы, образующие шпильки, были заменены на AT-повторы, характеризующиеся легкой денатурацией [3–5]. Так же в ампликон добавлена последовательность узнавания никазы Nt.BstNBI, аналогично амплификации опосредованная никлирующим ферментом [6–8].

Интроны используются в исследованиях в молекулярной биологии, а также в биотехнологии там, где требуется высокий уровень экспрессии трансгена, поскольку благодаря IME (Intron-Mediated Enhancement of Gene Expression, интрон-опосредованное усиление экспрессии генов) способствуют увеличению экспрессии [9,10].

Общая схема ампликона, включающая последовательность интрона и концевые повторы, ответственные за самоамплификацию, представлена на рисунке 1.

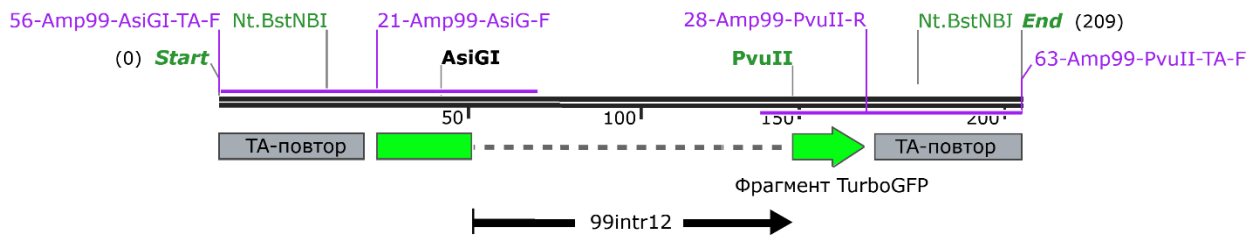


Рисунок 1. Общая схема ампликона, использованного для мутагенеза интрона.

В качестве матричной последовательности была взята последовательность интрона 99intr12, полученного ранее в нашей лаборатории. Сначала интрон, находящийся в рамке считывания белка TurboGFP был амплифицирован при помощи обычной ПЦР. Затем полученный ампликон был подвергнут изотермической амплификации, для чего аликвота реакционной смеси ПЦР переносилась в реакционную смесь амплификации, опосредованной шпилькой, содержащую праймеры 21-Amp99-AsiG-F и 28-Amp99-PvuII-R, выполняющие корректирующую роль тех участков последовательности ДНК, где мутагенез не требуется. После изотермической амплификации аликвоту снова переносили в новую реакционную смесь. Процесс повторяли 5 раз. Результаты амплификации приведены на рисунке 2, а.



Рисунок 2. Продукты амплификации последовательной изотермической амплификации (а). Продукт амплификации гидролизованый эндонуклеазами

рестрикции AsiGI и PvuII (б).

Как видно из рисунка продукт амплификации представляет собой конкатемер, состоящий из более чем 500 мономеров. Длина конкатемера практически не изменяется в зависимости от раунда амплификации. Продукт последней амплификации рестрицировали эндонуклеазами рестрикции AsiGI и AfeI для выделения фрагмента ДНК нужной последовательности (рис. 2, б), после чего его клонировали в плазмиду и секвенировали по Сэнгеру. Полученную мутагенезом последовательность сравнивали с исходной последовательностью интрона 99intr12 (рис. 3).

**GTAAGTAGACCTGACTGGCCTAGCCGTCTTCGTTACACGTGGTCCACA  
TGGTCCSTTTGACTGCACТААТАСТААСГCGTTCTTCTTCSTTTTTTC**CAG**  
GTAAGT**AAAAATAATAAT**CTAGTAGTCTTCTTT**AAATAATATAAATAAA**  
**AAAAATAAAGAAAAAATAATATAATAATATCATTCSTTTTTTCSTTTTT**CAG******

Рисунок 3. Сравнение последовательности исходного экзона 99intr12 (вверху) и последовательности полученной в результате 5 раундов изотермической амплификации (внизу). Красным цветом показаны нуклеотиды, подвергнувшиеся замене. Синим цветом показаны нуклеотиды включенные в праймеры.

Из рисунка видно, что большинство нуклеотидов (56 из 91) подверглись замене. Большая часть нуклеозидов (62,5%) заменилась на аденозин. Замена на тимидин, цитозин и гуанина составили соответственно 26,8%, 8,9% и 1,8%. Неожиданным оказалось предпочтение легкоплавких пар для замены, поскольку эффект предпочтения аденозина Vst-полимеразой не описан. В тоже время последовательности, находящиеся в составе праймеров, замене не подверглись. Таким образом описанный метод изотермической амплификации может быть использован для получения случайной последовательности ДНК.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-60031.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

### Литература

1. Jung C., Ellington A.D. A primerless molecular diagnostic: phosphorothioated-terminal hairpin formation and self-priming extension (PS-THSP) // *Anal Bioanal Chem.* 2016. Vol. 408, № 30. P. 8583–8591.
2. Park D., Ellington A.D., Jung C. Selection of self-priming molecular replicators // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47, № 5. P. 2169–2176.
3. von Hippel P.H., Johnson N.P., Marcus A.H. 50 years of DNA ‘Breathing’: Reflections on Old and New Approaches // *Biopolymers.* 2013. Vol. 99, № 12. P. 923–954.
4. Lilley D.M. The kinetic properties of cruciform extrusion are determined by DNA base-sequence. // *Nucleic Acids Res.* 1985. Vol. 13, № 5. P. 1443–1465.
5. Bikard D. et al. Folded DNA in Action: Hairpin Formation and Biological Functions in Prokaryotes // *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010. Vol. 74, № 4. P. 570–588.
6. Qian C. et al. Nicking enzyme-assisted amplification (NEAA) technology and its applications: A review // *Analytica Chimica Acta.* 2019. Vol. 1050. P. 1–15.
7. Walker G.T. et al. Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. // *Nucleic Acids Res.* 1992. Vol. 20, № 7. P. 1691–1696.
8. Van Ness J., Van Ness L.K., Galas D.J. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. Vol. 100, № 8. P. 4504–4509.
9. Akua T., Berezin I., Shaul O. The leader intron of AtMHX can elicit, in the absence of splicing, low-level intron-mediated enhancement that depends on the internal intron sequence // *BMC Plant Biol.* 2010. Vol. 10. P. 93.
10. Shaul O. How introns enhance gene expression // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2017. Vol. 91. P. 145–155.



### References

1. Jung C., Ellington A.D. A primerless molecular diagnostic: phosphorothioated-terminal hairpin formation and self-priming extension (PS-THSP) // *Anal Bioanal Chem.* 2016. Vol. 408, № 30. P. 8583–8591.
2. Park D., Ellington A.D., Jung C. Selection of self-priming molecular replicators // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47, № 5. P. 2169–2176.
3. von Hippel P.H., Johnson N.P., Marcus A.H. 50 years of DNA ‘Breathing’: Reflections on Old and New Approaches // *Biopolymers.* 2013. Vol. 99, № 12. P. 923–954.
4. Lilley D.M. The kinetic properties of cruciform extrusion are determined by DNA base-sequence. // *Nucleic Acids Res.* 1985. Vol. 13, № 5. P. 1443–1465.
5. Bikard D. et al. Folded DNA in Action: Hairpin Formation and Biological Functions in Prokaryotes // *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010. Vol. 74, № 4. P. 570–588.
6. Qian C. et al. Nicking enzyme-assisted amplification (NEAA) technology and its applications: A review // *Analytica Chimica Acta.* 2019. Vol. 1050. P. 1–15.
7. Walker G.T. et al. Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. // *Nucleic Acids Res.* 1992. Vol. 20, № 7. P. 1691–1696.
8. Van Ness J., Van Ness L.K., Galas D.J. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. Vol. 100, № 8. P. 4504–4509.
9. Akua T., Berezin I., Shaul O. The leader intron of AtMHX can elicit, in the absence of splicing, low-level intron-mediated enhancement that depends on the internal intron sequence // *BMC Plant Biol.* 2010. Vol. 10. P. 93.
10. Shaul O. How introns enhance gene expression // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2017. Vol. 91. P. 145–155.

© Набережнов Д. С., 2023 *Международный журнал прикладных наук и технологий "Integral" №1/2023*

Для цитирования: Набережнов Д. С. САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ *IN VITRO* МУТАГЕНЕЗ ПРИ ПОМОЩИ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

// *Международный журнал прикладных наук и технологий "Integral" №1/2023*