

ГЕНОМИКА.  
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.112.5+577.151.3+602.6

**ВЫЯВЛЕНИЕ НОНСЕНС-МУТАЦИЙ И МУТАЦИЙ СДВИГА РАМКИ СЧИТЫВАНИЯ В ГЕНЕ *BRCA1* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВОГО ПЛАЗМИДНОГО ВЕКТОРА pPhoA-frame**

© 2012 г. Н. И. Гуткина<sup>1\*</sup>, В. В. Богачев<sup>2</sup>, С. П. Коваленко<sup>1, 3\*</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и биофизики Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск, 630117

<sup>2</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”, Кольцово, Новосибирская обл., 630559

<sup>3</sup>Медицинский факультет Новосибирского государственного университета, Новосибирск, 630090

Поступила в редакцию 06.01.2012 г.

Принята к печати 15.02.2012 г.

Предложен способ выявления мутаций сдвига рамки считывания и нонсенс-мутаций в гене *BRCA1* человека. Способ заключается в создании рекомбинантных плазмид, в которых амплифицированный фрагмент гена находится в единой трансляционной рамке с геном щелочной фосфатазы *Escherichia coli* (*phoA*). Сконструирован плазмидный вектор pPhoA-frame, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую щелочную фосфатазу *E. coli*. Между кодонами 218 и 219 этой последовательности встроены сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции BglII, StuI, ApaI, SacII и предназначенный для клонирования фрагмент гена *BRCA1*. Наличие в изучаемом фрагменте мутаций, нарушающих целостность рамки считывания, оценивается визуально по отсутствию окрашенных колоний *E. coli*, трансформированных рекомбинантной плазмидой, на индикаторной чашке, содержащей субстрат для щелочной фосфатазы.

**Ключевые слова:** мутации сдвига рамки считывания, нонсенс-мутации, щелочная фосфатаза, рекомбинантные плазмиды.

DETECTION OF NONSENSE AND FRAME SHIFT MUTATIONS IN HUMAN *BRCA1* GENE USING NEW PLASMID VECTOR pPhoA-frame, by N. I. Gutkina<sup>1\*</sup>, V. V. Bogachev<sup>2</sup>, S. P. Kovalenko<sup>1,3\*</sup> (<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, 630117 Russia; <sup>2</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia; <sup>3</sup>Department of Medicine, Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia; \*e-mail: sp\_kovalenko@yahoo.com; gutkina.nadezhda@gmail.com). The technique for the detection of frame shift and nonsense mutations in *BRCA1* gene was suggested. The technique presumes the construction of recombinant plasmids where the tested DNA fragment placed in-frame with alkaline phosphatase gene of *Escherichia coli* (*phoA*). A special plasmid pPhoA-frame was constructed for such analysis, the plasmid contains DNA fragment coding for alkaline phosphatase of *E. coli*. Synthetic DNA fragment with BglII, StuI, ApaI and SacII sites was inserted into the DNA fragment coding for alkaline phosphatase of *E. coli* between Ala218 and Gly219 codons to facilitate the cloning of *BRCA1* gene fragments. Occurrence of the frame shift or nonsense mutation in the tested DNA fragment can be detected after transformation of *E. coli* by the recombinant plasmid containing the tested fragment. *E. coli* colonies with the newly constructed recombinant plasmids are plated out on the indicator agar. In the case of frame shift or nonsense mutation the colonies are not colored, DNA fragments without such mutations results in the formation of the blue colonies.

**Keywords:** alkaline phosphatase, frame shift mutations, nonsense mutations, recombinant plasmids.

Предрасположенность к развитию рака молочной железы и яичников во многих случаях определяется дефектами в генах *BRCA1* и *BRCA2*. В гене *BRCA1* найдено более 800, а в гене *BRCA2* более 700 мутаций, связанных с формированием

наследственных форм рака молочной железы и яичников [1]. Мутации встречаются по всей протяженности гена. Кроме того, описано значительное количество полиморфных вариантов этих генов, связь которых с канцерогенезом не установлена. Этот факт затрудняет поиск значимых мутаций при помощи различных модификаций гетеродуплексного анализа, так как эти методы выявляют любые изменения в нуклеотидной последова-

Принятые сокращения: pUC19+phoA – плаزمид pUC19, содержащая ген *phoA*.

\* Эл. почта: sp\_kovalenko@yahoo.com; gutkina.nadezhda@gmail.com

тельности, что приводит к необходимости прямого секвенирования.

Большая часть (около 90%) патологических мутаций в генах *BRCA1/BRCA2* представлена мутациями сдвига рамки трансляции и нонсенс-мутациями, которые приводят к преждевременной терминации трансляции. Такие мутации выявляют с использованием метода “укороченных белков” (Protein Truncation Test, PTT), основанного на анализе продуктов трансляции в бесклеточной системе *in vitro* [2]. Однако это дорогая, трудоемкая и недостаточно хорошо воспроизводимая процедура, результаты которой часто интерпретируются неоднозначно.

Предлагаемый нами способ выявления нонсенс-мутаций и мутаций сдвига рамки основан на клонировании амплифицированных фрагментов гена в составе плазмиды в единой рамке трансляции с репортерным геном. Целостность рамки слитого белка оценивается по активности фермента, кодируемого репортерным геном. Отсутствие окраски колоний трансформированных клеток на индикаторных чашках свидетельствует о том, что анализируемый фрагмент ДНК содержит мутацию.

Аналогичный метод поиска мутаций, нарушающих целостность рамки считывания, так называемый “yeast based stop-codon assay” заключается в конструировании плазмид с последующей трансформацией дрожжевых клеток [3–6]. К недостаткам этого подхода можно отнести сложность работы с клетками дрожжей, которые долго растут и нуждаются в специальных средах для культивирования, а также нередко возникающие проблемы с трансформацией.

Работа с бактериальной системой вектор-хозяин существенно проще. Ряд исследователей, в том числе и мы, проверяли возможность использования для детекции мутаций бактериальных плазмид с репортерным геном, кодирующим  $\alpha$ -пептид  $\beta$ -галактозидазы *Escherichia coli* (*LacZ $\alpha$* ) [7–9]. Однако эта система часто дает ложноотрицательные результаты: колонии клеток-трансформантов имеют *Lac*<sup>+</sup>-фенотип, несмотря на наличие стоп-кодонов в тестируемой ДНК. Проблема заключается в том, что бактериальная клетка может использовать в качестве сайтов инициации трансляции эукариотические кодоны, расположенные после терминирующих кодонов, т.е. возможна так называемая реинициация трансляции [10, 11]. Таким образом, выявление мутаций с использованием *LacZ $\alpha$* -содержащих плазмид возможно только в участках гена, не содержащих сайты реинициации трансляции, что существенно ограничивает изучение таких сложных генов, как *BRCA1*.

Цель данной работы состояла в разработке метода определения нонсенс-мутаций и мутаций

сдвига рамки, в котором используется бактериальная система вектор-хозяин, но результаты не зависят от реинициации трансляции с кодонов внутри эукариотической ДНК. Мы решили эту задачу, сконструировав новый плазмидный вектор (pPhoA-frame), содержащий ген щелочной фосфатазы *E. coli* (*phoA*) в качестве репортерного. Между кодонами 218 и 219 гена *phoA* встроены фрагменты ДНК, предназначенный для клонирования фрагментов ДНК. Район встраивания линкера был выбран ранее [12] таким образом, чтобы встроены в ген *phoA* фрагмент чужеродной ДНК не влиял существенно на ферментативную активность белка. Кроме того, белок, синтезируемый в случае реинициации трансляции после стоп-кодона, возникшего в результате нонсенс-мутации или мутации сдвига рамки, не должен обладать ферментативной активностью.

Возможность обнаружения мутаций, нарушающих целостность рамки считывания, с использованием плазмиды pPhoA-frame показана в опытах по клонированию фрагментов гена *BRCA1*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**В работе использовали** следующие ферменты и реактивы: эндонуклеазы рестрикции и Т4-поли-нуклеотидкиназу фирмы “СибЭнзим” (Россия), Т4-ДНК-лигазу, Таq-ДНК-полимеразу, dNTP (“Лаборатория Медиген”, Россия), агарозу, хлорид кальция, хлорид магния, пептон, дрожжевой экстракт, бактоагар, 5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-фосфат (X-фосфат) (“Sigma”). Для трансформации использовали клетки *E. coli*, штамм XL1-Blue (“Stratagene”).

Олигонуклеотиды синтезированы фирмой “Лаборатория Медиген”.

**Конструирование плазмид.** Для создания плазмидного вектора pPhoA-frame мы использовали сконструированную нами ранее [12] плазмиду pUC19 со вставкой гена *phoA* щелочной фосфатазы *E. coli* с заменой T999 → G в кодоне Ala218 (pUC19+*phoA*). В результате такой модификации сформирован сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции SacII, который можно использовать для встраивания фрагментов ДНК между Ala218 и Gly219.

Плазмидную ДНК pUC19+*phoA* с сайтом SacII, линейаризованную эндонуклеазой рестрикции Sfr303I, использовали в качестве вектора для клонирования химически синтезированного фрагмента, содержащего сайты узнавания BglII, StuI и ApaI (подчеркнуты):

TAGATCTGGTAGGCCTGGAGGGCCCGC  
CGATCTAGACCATCCGGACCTCCCGG

Два комплементарных олигонуклеотида фосфорилировали Т4-поли-нуклеотидкиназой, затем отжигали и лигировали с вектором. Полученную

плазмиду (pPhoA-frame) использовали для клонирования фрагментов гена *BRCA1*.

Плазмиду pGEM7Zf(+), содержащую экзон 11 гена *BRCA1* [10], гидролизовали BglII и HpaI. Фрагмент экзона размером 227 п.н. после элюции из геля лигировали с плазмидной ДНК pPhoA-frame, гидролизованной BglII и PseI. Полученная рекомбинантная плазида содержит фрагмент экзона 11 в единой рамке трансляции с геном щелочной фосфатазы.

Плазмиду pPhoA-frame с фрагментом экзона 11 гидролизовали BglII и KpnI и лигировали с химически синтезированным фрагментом, содержащим ту же последовательность, но с заменой 3 н. (подчеркнуты):

PstI

GATCTGCAGAGAGTAGCAGTATTTAATAGGTAC  
ACGTCTCTCATCGTCATAAAATTATC

Две замены приводят к появлению стоп-кодонов, одна – к появлению нового PstI-сайта, необходимого для рестрикционного анализа клонов.

Экзон 20 гена *BRCA1* амплифицировали с использованием следующих праймеров:

F (старт 71595) – 5'-aatcgctagatctcagcatgattttgaagtcagagg-3' и R (старт 71695) – 5'-ttaattaagggcccaggaggagctttaccttctg-3'. Полужирным выделена комплементарная часть праймеров. На 5'-конце добавлены последовательности, которые содержат сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции (подчеркнуты) BglII и ApaI (праймеры F и R соответственно). Реакционная смесь содержала 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 мМ Трис-НСl (рН 8.8), 0.01% Twin 20, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 300 мкМ каждого dNTP, 0.5 мкМ каждого праймера, 50 нг геномной ДНК и 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы. Условия термоциклирования: денатурация – 94°C, 2 мин, затем 35 циклов (94, 60 и 72°C по 20, 30 и 60 с соответственно). Продукт амплификации гидролизовали BglII и ApaI и лигировали с плазмидой pPhoA-frame, лигированной BglII и ApaI. Полученная рекомбинантная плазида содержит экзон 20 (с небольшими прилегающими участками интронов) в единой рамке трансляции с геном щелочной фосфатазы.

**Трансформация и анализ рекомбинантных плазмидных ДНК.** Компетентные клетки (*E. coli*, штамм XL1-Blue) готовили стандартным методом с использованием CaCl<sub>2</sub>. Компетентные клетки инкубировали с лигазной смесью (вектор + фрагмент) и высевали на чашки с 1.5%-ным агаром, содержащим ампициллин (50 мкг/мл), тетрациклин (12.5 мкг/мл), 30 мМ Na-фосфатный буфер (рН 7.5) и 160 мкг/мл X-фосфата. Плазмидную ДНК выделяли с использованием стандартного метода щелочного лизиса. Структуру плазмид анализировали рестрикционным анализом и под-

тверждали секвенированием. Секвенировали продукты ПЦР, полученные с универсальными праймерами: (F) 5'-cagctatgaccatgattacg-3' и (R) 5'-acgttgtaaaacgacggccag-3'. Условия реакции: 94°C, 2 мин, затем 30 циклов (94, 60 и 72°C по 15, 25 и 60 с соответственно). Последовательности секвенирующих праймеров подбирали в районе вставки в гене щелочной фосфатазы: (F) 5'-ggcggcg-gcgcaaaaacc-3' и (R) 5'-gtgcctgttcacgcagcg-3'.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

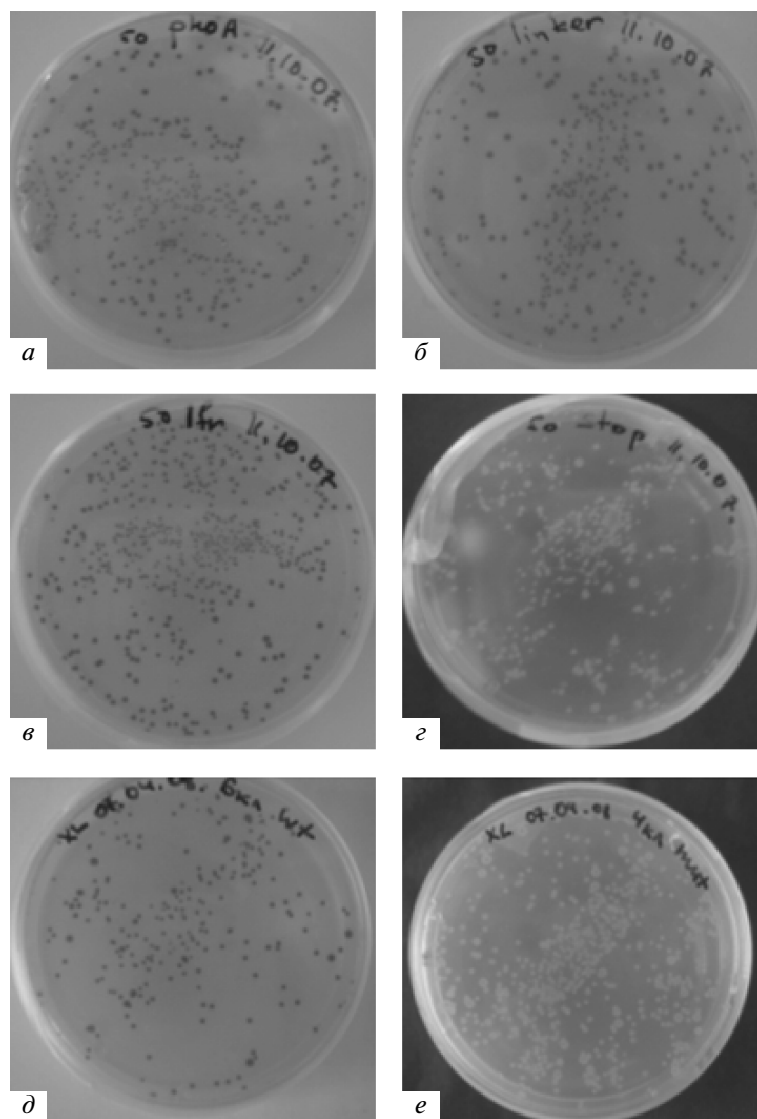
В ген щелочной фосфатазы, входящий в состав плазмиды pUC19+phoA (см. раздел “Экспериментальная часть”), между кодонами Ala218 и Gly219 встроили полилинкер – фрагмент размером 27 п.н., который содержит сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции BglII, StuI и ApaI и предназначен для клонирования фрагментов гена *BRCA1*. Схема полученной плазмиды (pPhoA-frame) представлена на рис. 1. Вставка полилинкера не повлияла существенно на активность щелочной фосфатазы, которую оценивали по окраске колоний *E. coli*, трансформированных исходной плазмидой pUC19+phoA и pPhoA-frame (рис. 2а,б).

Используя плазмиду pPhoA-frame в качестве вектора, мы получили ряд рекомбинантных плазмид, содержащих фрагменты гена *BRCA1*, встроены таким образом, чтобы они находились в единой рамке трансляции с геном *phoA*. Был встроены BglII–HpaI-фрагмент экзона 11 размером 227 п.н., а также экзон 20 (84 п.н.), который клонировали полностью с небольшими прилегающими участками интронов. Размер фрагмента экзона 11, встроенного в ген *phoA* между кодонами Ala218 и Gly219, составил 243 п.н., экзона 20–117 п.н.

Фрагмент экзона 11 вырезали эндонуклеазами рестрикции BglII и HpaI из ранее полученной плазмиды pGEM7Zf(+), содержащей этот экзон гена *BRCA1* [10], и встраивали в плазмиду pPhoA-frame по сайтам BglII и StuI. Экзон 20 амплифицировали с использованием праймеров, содержащих на 5'-конце сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции BglII и ApaI, и после рестрикции встраивали в плазмиду pPhoA-frame по этим сайтам. Колонии клеток, трансформированных рекомбинантными плазмидами, в обоих случаях имели достаточно интенсивную окраску (рис. 2в,д).

Чтобы показать возможность детекции нонсенс-мутаций, BglII–KpnI-фрагмент экзона 11 заменили химически синтезированным фрагментом с однонуклеотидными заменами, которые приводят к появлению стоп-кодонов внутри этого фрагмента. Схема опыта представлена на рис. 3. Нарушение целостности рамки трансляции привело к полному отсутствию окрашивания коло-





**Рис. 2.** Окраска колоний клеток *E. coli*, трансформированных различными рекомбинантными плазмидами. *a* – Плазмида pUC19 + *phoA*. *б* – Плазмида pPhoA-frame; *в–е* – плазмида pPhoA-frame с вставками фрагментов гена *BRCA1*. *в* – BglII–HpaI-фрагмент экзона 11. *г* – BglII–HpaI-фрагмент экзона 11 с двумя стоп-кодонами. *д* – экзон 20 без мутации. *е* – экзон 20 с мутацией 5382insC.

редину последовательности *phoA*. В этом заключается принципиальное отличие плазмиды pPhoA-frame от плазмид, в которых полилинкер находится после нескольких (от 6 до 15 в разных плазмидах) первых кодонов, не влияющих существенно на ферментативную активность репортерного белка. В то же время, при использовании плазмиды pPhoA-frame белок, синтезированный в результате реинициации трансляции внутри клонированного фрагмента, не может обладать ферментативной активностью, поскольку у него отсутствует N-концевая часть, равная половине всей аминокислотной последовательности фермента.

Возможность использования плазмиды pPhoA-frame для обнаружения нонсенс-мутаций

и мутаций сдвига рамки проверяли в опытах по клонированию фрагментов гена *BRCA1* человека: BglII–HpaI-фрагмента экзона 11 и экзона 20 с прилегающими участками интронов. В случае фрагментов, которые не содержат мутаций, нарушающих рамку считывания, колонии трансформированных клеток были интенсивно окрашены. Стоп-кодона в фрагменте экзона 11 и мутация сдвига рамки в экзоне 20 (5382insC) приводили к полному отсутствию окраски клонов.

Таким образом, показана принципиальная возможность выявления нонсенс-мутаций и мутаций сдвига рамки при помощи клонирования фрагментов гена в единой трансляционной рамке с геном *phoA E. coli* в составе плазмидного вектора



8. Гуткина Н.И., Гайдамакова Е.К., Варлаханова Н.В., Коваленко С.П. 2002. Изучение возможности использования слитых белков для детекции нонсенс-мутаций и мутаций сдвига рамки в гене *brca1*. *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*. **1**, 31–36.
9. Moon Y.J., Kang Y., Choi J.H., Lee K.H. 2007. Detection of heterozygous nonsense mutations in genes of interest using an *Escherichia coli*-based stop codon assay. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **46**, 137–143.
10. Gutkina N.I., Varlakhanova N.V., Lysova M.V., Kovalenko S.P. 2002. Limitations on the recombinant plasmid selection by Lac<sup>+</sup>/Lac<sup>-</sup> colony phenotype detection. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **298**, 37–40.
11. Real S.M., Marzese D.M., Gomez L.C., Mayorga L.S., Roque M. 2006. Development of a premature stop codon-detection method based on a bacterial two-hybrid system. *BMC Biotechnol.* **6**:38 <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/6/38>
12. Максюттов А.З., Бакулина А.Ю., Гуткина Н.И., Коваленко С.П. 2012. Введение чужеродных пептидов в поверхностные петли щелочной фосфатазы. *Молекуляр. биология*. **46**, 654–662.
13. Guzman C.A., Piatti G., Walker M.J., Guardati M.C., Pruzzo C. 1994. A novel *Escherichia coli* expression-export vector containing alkaline phosphatase as an insertional inactivation screening system. *Gene*. **148**, 171–172.
14. Boulain J.C., Ducancel F. 2004. Expression of recombinant alkaline phosphatase conjugates in *Escherichia coli*. *Methods Mol. Biol.* **267**, 101–112.