

Новая эндонуклеаза рестрикции Glal узнает метилированную последовательность 5'-G(5mC)^GC-3'.



Категория: Новые ферменты

Просмотров: 6688

Чернухин В.А., Наякшина Т.Н., Абдурашитов М.А., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Михненко Н.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х

Биотехнология, 2006, № 4, С.31-35

Из бактериального штамма GL29 была выделена и охарактеризована новая эндонуклеаза рестрикции Glal. Этот фермент узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)^GC-3' и расщепляет ее, как указано стрелкой. Благодаря своей способности расщеплять только метилированную ДНК Glal может найти практическое применение в генно-инженерных работах, а также для определения статуса метилирования ДНК эукариот.

ВВЕДЕНИЕ

Как правило, системы рестрикции-модификации (РМ) типа II включают два фермента - эндонуклеазу рестрикции (ЭР) и ДНК-метилтрансферазу (М., МТазу). ЭР II-го типа узнают короткие специфические последовательности ДНК (длиной обычно 4-8 п.о.) и расщепляют ее внутри или вблизи сайта узнавания. Бактериальные МТазы метилируют сайт узнавания, защищая тем самым хозяйскую ДНК от расщепления собственным ферментом, тогда как чужеродная неметилированная ДНК расщепляется.

Однако известно несколько примеров бактерий, в которых эндонуклеаза рестрикции присутствует без соответствующей МТазы. В большинстве случаев эти рестриктазы относятся к так называемому подтипу IIM и расщепляют только метилированную ДНК. В настоящее время известно только два прототипа эндонуклеаз рестрикции подтипа IIM, которые узнают и расщепляют только метилированную ДНК. Эндонуклеаза рестрикции DpnI узнает и расщепляет 5'-G(6mA)^TC-3' [1], фермент рестрикции BslI расщепляет 5'-G(5mC)^NGC-3' [2].

В данной работе мы описываем новую эндонуклеазу рестрикции Glal, которая узнает нуклеотидную последовательность 5'-G(5mC)^GC-3', причем единственным кофактором является Mg^{2+} . Glal, подобно DpnI и BslI, принадлежит к подтипу IIM [3].

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Выращивание штамма-продуцента

Выращивание штамма проводили в ферментёре объемом 20 литров (LKB, Швеция) при температуре 28°C в питательной среде, содержащей 1% триптон (Organotechnie, Франция), 0.5% дрожжевой экстракт (Organotechnie, Франция), 0.5% NaCl и 0.05% $MgCl_2$, при pH 7.5 с аэрацией 10 л/мин и перемешиванием 200 об/мин. При достижении культурой поздней логарифмической стадии роста клетки осаждали с помощью центрифугирования. В результате получили 100 г биомассы, которую хранили при -20°C.

Выделение фермента

Выделение фермента проводили при 4°C путем колоночной хроматографии. 100 г замороженной биомассы суспендировали в 300 мл буфера А (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM ЭДТА, 7 mM β-меркаптоэтанол), содержащем 0.1 M NaCl, 0.3 мг/мл лизоцим, 0.1 mM фенилметилсульфонилфторид (PMSF), 0.1% тритон X-100, и инкубировали в течение 3 ч. при постоянном перемешивании. Далее клетки разрушали ультразвуком и центрифугировали в течение 30 мин при 12000 об/мин.

Супернатант пропускали через колонку с фосфоцеллюлозой P-11 ("Whatman", Англия) объемом 100 мл, предварительно уравновешенную буфером А, содержащим 0.1 M NaCl. Колонку промывали 200 мл буфера А с 0.1 M NaCl, затем линейным градиентом NaCl (0.1-0.65 M) в буфере А объемом 1000 мл, собирая фракции по 10 мл. Фракции, содержащие эндонуклеазу, объединяли, диализовали против 20 объемов буфера А с 0.1 M NaCl и наносили на колонку с 15 мл гепарин-сефарозы ("Bio-Rad", США). Элюцию проводили линейным градиентом NaCl (0.05-0.45 M) в буфере А объемом 300 мл, собирая фракции по 5 мл. Активные фракции объединяли и наносили на колонку с гидроксилапатитом объемом 4 мл, предварительно промытую уравнивающим буфером (0.01 M K_2HPO_4 , pH 7.2, 0.1 mM ЭДТА, 7 mM β-меркаптоэтанол, 0.05 M NaCl). Колонку промывали 10 мл уравнивающего буфера и проводили элюцию линейным градиентом в объеме 100 мл K_2HPO_4 (0.01-0.4 M) в уравнивающем буфере, собирая фракции объемом по 2.5 мл. Активные фракции объединяли и диализовали против 20 объемов концентрирующего буфера (50% глицерин, 0.05% тритон X-100; 10 mM Tris-HCl, pH 7.55, 0.1 mM ЭДТА, 7 mM β-меркаптоэтанол, 0.1 M NaCl). Препарат хранили при -20°C.

Выявление активности фермента

В качестве субстрата для определения активности Glal использовалась плаزمида pHspAI. Данная плазмиды была получена путем встраивания фрагмента ДНК штамма *Haemophilus species A1*, несущего ген HspAI ДНК метилтрансферазы, в плазмиду pUC19. Активность Glal I определяли, проводя инкубацию в 50 мкл реакционной смеси, содержащей плазмиду pHspAI. Реакционная смесь включала 1 мкг ДНК плазмиды pHspAI, 33 mM Трис-ацетат (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 66 mM ацетат калия и 1mM дитиотрейтол. После инкубирования в течение одного часа при 37°C реакция останавливалась добавлением 10 мкл стоп-буфера.

Одна единица активности фермента определялась как количество фермента, которое необходимо для полного расщепления 1 мкг ДНК плазмиды pHspAI при 37°C в течение 1 часа в 50 мкл реакционной смеси.

Определение сайта узнавания и позиций гидролиза ДНК

Сайт узнавания новой эндонуклеазы устанавливали путем сравнения картины гидролиза ДНК pHspAI ферментом Glal с теоретически рассчитанной картиной расщепления этого же субстрата по сайту 5'-GCGC-3'.

Для достижения полного гидролиза ДНК высокоактивный препарат Glal получали на концентрате (Vivaspin 500, "Sartorius"). В результате получили препарат фермента с концентрацией 500 ед/мл. 2 мкл этого препарата вносили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг ДНК плазмиды pHspAI и инкубировали при 37°C в течение 1 часа.

Позиции гидролиза в сайте узнавания были установлены расщеплением [³²P]-меченных синтетических олигонуклеотидов ферментом Glal. Продукты гидролиза разделяли электрофорезом в 20% ПААГ в трис-боратном буфере, содержащем 7 М мочевины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате выращивания штамма GL29 в питательном бульоне выход сырой биомассы составил 5 г клеток на 1 литр культуры. Очистку Glal проводили как описано в разделе "Условия эксперимента". В результате было получено 1.8 мл препарата Glal с активностью 100 ед/мл.

Эндонуклеаза Glal не гидролизует стандартные вирусные и плазмидные ДНК, такие как ДНК фагов Лямбда (dam+/dcm+ и dam-/dcm-), T7, аденовируса-2, плазмид pUC19 и pBR322. Мы также протестировали как возможные субстраты для Glal некоторые плазмиды, содержащие гены других бактериальных метилаз, модифицирующих цитозинового основания в ДНК: M.Fsp4HI (сайт узнавания 5'-GCNGC-3'), M.FauIA и M.FauIB (сайты узнавания 5'-CCCGC-3' и 5'-GCGGG-3', соответственно). Расщепления данных плазмид не происходило. При этом Glal расщепляет ДНК плазмиды pHspAI, которая несет ген метилазы M.HspAI (узнаваемая последовательность 5'-GCGC-3'). Данная плазмиды была получена лигированием EcoRI-фрагмента ДНК *Haemophilus species A1*, длиной 1.4 т.п.о и несущего ген МТазы HspAI, и плазмиды pUC19, лигированной по сайту EcoRI.

Первичная аминокислотная последовательность M.HspAI, полученная из нуклеотидной последовательности гена M.HspAI показывает высокую гомологию с M.HinP1I - 99% (рис. 1). Поскольку M.HinP1I метилирует С5-положения внутренних цитозинового оснований в сайте 5'-GCGC-3' [4], мы сделали вывод, что M.HspAI также метилирует этот сайт с образованием 5'-G(5mC)GC-3' последовательностей, присутствующих в плазмиде pHspAI.

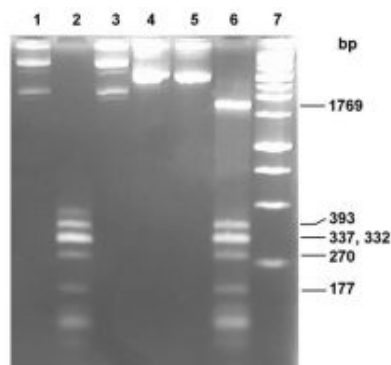
	1	50
M. HinP1I	MEKLFITDFCAGIGGGIGLELHGMECIAHSEVDLHAKTYEIFFHDSRI	
M. HspAI	MEKLFITDFCAGIGGGIGLELHGMECIAHSEVDLHAKTYEIFFHDSRI	
	51	100
M. HinP1I	LGDLTQLAPKSLPFDLHAGTFCQTFSTIGKEDGFLDRGQITYYLSHI	
M. HspAI	LGDLTQLAPKSLPFDLHAGTFCQTFSTIGKEDGFLDRGQITYYLSHI	
	101	150
M. HinP1I	LKVKVVFVFILHNVKGLVHHQGETLSILELLECONYDVTYKVLDSQFY	
M. HspAI	LKVKVVFVFILHNVKGLVHHQGETLSILELLECONYDVTYKVLDSQFY	
	151	200
M. HinP1I	GTQMBERTYFTGIRKIDHSDYVTFEPKSHHSHLSNYLGGGKYKFLI	
M. HspAI	GTQMBERTYFTGIRKIDHSDYVTFEPKSHHSHLSNYLGGGKYKFLI	
	201	250
M. HinP1I	MKTFFNYDHHKYNDRISLDQTYEKQVYVIMBQSDIRTYENKIPTLHG	
M. HspAI	MKTFFNYDHHKYNDRISLDQTYEKQVYVIMBQSDIRTYENKIPTLHG	
	251	300
M. HinP1I	RHGILYVKDQQLYKLSGYEALLQGFPKEIAQKADYKLPDSKILSQAGH	
M. HspAI	RHGILYVKDQQLYKLSGYEALLQGFPKEIAQKADYKLPDSKILSQAGH	
	301	322
M. HinP1I	AMGVHVIQETAEKLLISTHGGK	
M. HspAI	AMGVHVIQETAEKLLISTHGGK	

Рис. 1. Выравнивание первичных структур ДНК-метилтрансфераз HspAI и HinP1I. Идентичность последовательностей составляет 99%. Неидентичные аминокислотные остатки подчеркнуты

На рисунке 2 приведены результаты сравнительного расщепления плазмидных ДНК эндонуклеазами рестрикции Glal и HspAI. Как видно из рисунка длины фрагментов ДНК, образующихся в результате гидролиза ДНК pHspAI, соответствуют предсказанным для случая расщепления эндонуклеазой рестрикции, узнающей сайт 5'-GCGC-3'. Эти данные показывают, что Glal узнает и расщепляет нуклеотидную последовательность 5'-G(5mC)GC-3'.

Рис. 2. Сравнение длин фрагментов, образуемых при расщеплении плазмидных ДНК, эндонуклеазами Glal и HspAI. Электрофорез в 2% агарозном геле.

Дорожки: 1 - ДНК плазмиды pUC19; 2 - ДНК плазмиды pUC19, обработанная рестриктазой HspAI; 3 - ДНК плазмиды pUC19, обработанная рестриктазой Glal; 4 - ДНК плазмиды pHspAI; 5 - ДНК плазмиды pHspAI, обработанная рестриктазой HspAI; 6 - ДНК плазмиды pHspAI, обработанная рестриктазой Glal; 7 - маркер молекулярного веса 1 Kb (СибЭнзим). В правом столбце приведены расчетные длины фрагментов ДНК, получаемых при расщеплении плазмиды pHspAI по сайтам 5'-GCGC-3'

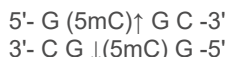


Для окончательного подтверждения этих данных и определения места гидролиза ДНК, мы использовали синтетические олигонуклеотидные дуплексы, содержащие метилированный или неметилированный цитозиновый остаток (сайты 5'-GCGC-3' подчеркнуты):

- 1: 5'-GTGCATGG(5mC)GCCTATGCG-3'
- 2: 5'-CGCATAGG(5mC)GCCATGCAC-3'
- 3: 5'-GTGCATGGCGCGCTATGCG-3'
- 4: 5'-CGCATAGGCGCCATGCAC-3'

Результаты расщепления этих олигонуклеотидных дуплексов представлены на рис. 3. Как видно из рисунка, метилированный дуплекс 1/2 расщепляется Glal, тогда как дуплекс 3/4 с неметилированными цитозинами не расщепляется.

Для определения места расщепления ДНК эндонуклеазой Glal проводили сравнение длин фрагментов, образуемых при расщеплении олигонуклеотидного дуплекса 3/4 рестриктазами Glal и PspN4I (сайт узнавания 5'-GGNNCC-3'). Как видно из рисунка 3, фосфодиэфирная связь гидролизуется этими ферментами в одном и том же месте. На основе этих данных можно сделать вывод, что эндонуклеаза Glal, также как PspN4I, гидролизует сайт 5'-GG(5mC)GCC-3' в середине последовательности. Таким образом, Glal узнает и расщепляет следующую последовательность:



где стрелками показаны позиции расщепления ДНК.

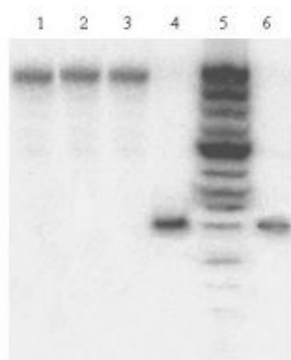


Рис. 3. Расщепление олигонуклеотидных дуплексов эндонуклеазами Glal и PspN4I. Меченные олигонуклеотиды отмечены знаком *.

Дорожки: 1 - дуплекс 3*/4 с неметилированным сайтом 5'-GCGC-3', 2 - дуплекс 3*/4, обработанный эндонуклеазой Glal, 3 - дуплекс 1*/2 с метилированным сайтом 5'-GCGC-3', 4 - дуплекс 1*/2, обработанный эндонуклеазой Glal, 5 - дуплекс 1*/2, обработанный экзонуклеазой III E. Coli (использована для получения маркеров длин фрагментов олигонуклеотида), 6 - дуплекс 1*/2, обработанный эндонуклеазой PspN4I (сайт узнавания 5'-GGN^NCC-3').

Детальное изучение способности Glal расщеплять сайт узнавания с различным распределением метильных групп будет представлено в последующих публикациях.

Таким образом, в настоящей работе мы описали новую сайт-специфичную эндонуклеазу Glal, принадлежащую к редкой группе рестриктаз, которые узнают только метилированную последовательность. Известные представители этой группы перечислены в таблице 1. Их сравнение показывает, что сайты узнавания этих трех ферментов имеют явные сходства: 1) для расщепления необходимо метилирование второго основания в сайте узнавания; 2) место расщепления находится сразу за метилированным основанием. Сайт узнавания для BslI сходен с сайтом для Glal и отличается только на один неопределенный нуклеотид (N), расположенный в середине сайта. Следует отметить, что DpnI и Glal расщепляют ДНК с образованием тупых концов, тогда как их аналоги, гидролизующие такие же, но неметилированные сайты в ДНК, расщепляют последнюю с образованием липких концов.

Эндонуклеаза рестрикции	Сайт узнавания	Позиции расщепления ЭР, узнающими аналогичные, но неметилированные сайты
DpnI	G(6mA)↑TC	MboI - ↑GATC, ChaI - GATC↑, BstKTI - GAT↑C
BslI	G(5mC)↑NGC	Fnu4HI - GC↑NGC, BthCI - GCNG↑C
Glal	G(5mC)↑GC	HhaI - GCG↑C, HinP1I - G↑CGC

Таблица 1. Сайты узнавания ЭР группы II M.

Рассмотренное сходство сайтов узнавания для Glal, BslI и DpnI может отражать общее эволюционное происхождение ферментов группы II M.

Как обсуждалось ранее [2], роль ферментов, которые узнают и расщепляют только метилированную ДНК, может быть связана с защитой бактерии от заражения фагами, содержащими метилированную ДНК. Известно, что ряд бактериофагов содержит гены сайт-специфических ДНК-метилтрансфераз, что приводит к метилированию ДНК фагов [5].

Glal может быть полезным для определения статуса метилирования эукариотической ДНК, потому что сайт узнавания Glal содержит метилированную CG последовательность, специфичную для эукариотических геномов.

Авторы статьи выражают благодарность А.Р. Ахмедовой за помощь в выделении фермента Glal.

Патент РФ № 2287012 C1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lack, S., Greenberg, B. J. // Biol. Chem. - 1975. V.250 P.4060-4066.

2. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Мезентцева Н.В., Дедков В.С., Гончар Д.А., Абдурашитов М.М., Дегтярев С.Х. // Биотехнология. 2005 №3 С.22-26 ([интернет-версия](#)).
3. Pingoud, A., and Jeltsch A. // Nucleic Acids Res. 2001. V.29. P.3705-3727.
4. Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D. // Nucleic Acids Res. 1988. V.33 P.230-232.
5. Gunthert, U., Lauster, R., and Reiners, L. // Eur. J. Biochem. - 1986. - V.159. - P.485-492.