

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДНК-ЭНДОНУКЛЕАЗА *FaiI* УЗНАЕТ ВЫРОЖДЕННУЮ ЧЕТЫРЕХНУКЛЕОТИДНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ 5'-YA[^]TR-3'

Ю.Э. ТОМИЛОВА*, В.А. ЧЕРНУХИН, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Изучена субстратная специфичность новой сайт-специфической ДНК-эндонуклеазы *FaiI*, которая узнает и расщепляет последовательность 5'-YA[^]TR-3', а также гидролизует с меньшей активностью сайт 5'-YA[^]TU. При замене в последовательности узнавания одного из центральных АТ нуклеотидов фермент проявляет никазную активность, причем расщепляется та цепь сайта узнавания, в которой сохраняется тимин. *FaiI* расщепляет ДНК, содержащую в сайте узнавания 5-метилцитозин, N4-метилцитозин и N6-метиладенин.

Ключевые слова: сайт-специфическая эндонуклеаза, вырожденная последовательность узнавания, мелко расщепляющая эндонуклеаза.

Введение

Наиболее изученной группой сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз являются эндонуклеазы рестрикции II типа, которые узнают последовательность ДНК длиной 4–8 п.н. и требуют в качестве кофактора только ионы Mg²⁺ [5]. Некоторые из узнаваемых последовательностей рестриктаз представляют собой вырожденные сайты, то есть соответствующий фермент узнает сразу несколько последовательностей. Например, сайтом узнавания рестриктазы *AcsI* является последовательность RAATTU, которая включает в себя сайты AAATTT, GAATTT, AAATTC и GAATTC [2].

Как правило, все такие сайты расщепляются ферментом с одинаковой эффективностью и полностью, а картина гидролиза ДНК соответствует последовательному расщеплению субстратной ДНК по всем отдельным сайтам. Часть эндонуклеаз рестрикции при неоптимальных условиях реакции способны расщеплять неканонические последовательности узнавания, проявляя неспецифическую активность, так называемую *star activity* [1]. Это явление характерно для хорошо известных рестриктаз *EcoRI* [6], *BamHI* [3] и ряда других ферментов [4].

В данной работе представлена новая сайт-специфическая эндонуклеаза *FaiI* из *Flavobacterium*

aquatile B15, которая расщепляет вырожденную четырехнуклеотидную последовательность 5'-YA[^]TR-3', однако при тех же условиях реакции расщепляет и другие последовательности ДНК с меньшей активностью. То есть, фермент *FaiI*, по сравнению с обычными рестриктазами, имеет более высокий уровень неспецифической активности, которая к тому же проявляется в рекомендуемых условиях реакции.

Материалы и методы

В работе использовали следующие реактивы: акриламид, бис-акриламид («Хеликон», Россия), агароза («Hybaid-AGS», Германия), ЭДТА («Fluka AG», Швейцария), Tris («Promega», США), буферные растворы, ферменты, препараты ДНК, маркер молекулярных масс ДНК и олигонуклеотиды производства ООО «СибЭнзим».

Гидролиз ДНК эндонуклеазой *FaiI*. Плазмидную ДНК в количестве 1 мкг расщепляли в объеме 20 мкл в SE-буфере В (10 mM Tris HCl pH 7,9 – при 25 °C, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) при 50 °C. Продукты гидролиза плазмидной ДНК разделяли электрофорезом в 15% ПААГ в Трис-ацетатном буфере. После окрашивания в растворе бромистого этидия фотографировали в УФ свете.

Гидролиз олигонуклеотидов эндонуклеазой *FaiI*. В качестве субстратов для эндонуклеазы *FaiI* в экспериментах использованы олигонуклеотидные дуплексы следующего состава:

1	5'-CGAGTT CAT GGCTGGGCCCCAAC-3'
2	3'-GCTCAAG TAC CGACCCGGGTTG-5'
3	5'-CGAGTT CAT AGCTGGGCCCCAAC-3'
4	3'-GCTCAAG TAT CGACCCGGGTTG-5'
5	5'-CGAGAT TAT AGCTGGGCCCCAAC-3'
6	3'-GCTCTA AAT ATCGACCCGGGTTG-5'
7	5'-CGAGTT TAT TACTGGGCCCCAAC-3'
8	3'-GCTCAA ATA ATGACCCGGGTTG-5'
9	5'-CGAGTT GAT GGCGCGGCCCAAC-3'
10	3'-GCTCA ACT ACCGCGCCGGGTTG-5'
11	5'-CGAGTT AAT CGCGCGGCCCAAC-5'
12	3'-GCTCA ATT AGCGCGCCGGGTTG-5'
13	5'-CGAGTT CGT GGCTGGGCCCCAAC-3'
14	3'-GCTCA AGC ACCGACCCGGGTTG-5'
15	5'-CGAGTT CTT GGCTGGGCCCCAAC-3'
16	3'-GCTCA AGA ACCGACCCGGGTTG-5'
17	5'-CGAGTT CAA GGCTGGGCCCCAAC-3'
18	3'-GCTCA AGT TCCGACCCGGGTTG-5'
19	5'-CGAGTT CAC GGCTGGGCCCCAAC-3'
20	3'-GCTCA AGT GCCGACCCGGGTTG-5'
21	5'-CGAGTT CGC GGCTGGGCCCCAAC-3'
22	3'-GCTCA AGC GCCGACCCGGGTTG-5'
23	5'-CGAGTT CAT GGCTGGGCCCCAAC-3'
24	3'-GCTCA AGT ACCGACCCGGGTTG-5'
25	5'-CTGAGTAC ATG TCCAAGGCCTTGGACTTAA-3'
26	3'-GACTCAT GTA CAGGTTCCGGAACCTGAATT-5'
27	5'-CTGAGTAC(N6A) TGT TCCAAGGCCTTGGACTTAA-3'
28	3'-GACTCAT GT(N6A) CAGGTTCCGGAACCTGAATT-5'
29	5'-CTGAGTA(5mC) ATG TCCAAGGCCTTGGACTTAA-3'
30	3'-GACTCAT GTA(5mC) AGGTTCCGGAACCTGAATT-5'
31	5'-CTGAGTA(N4C) ATG TCCAAGGCCTTGGACTTAA-3'
32	3'-GACTCAT GTA(N4C) AGGTTCCGGAACCTGAATT-5'

Предполагаемый сайт узнавания *FaeI* в каждом дуплексе выделен жирным шрифтом. Сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *FaeI* (5'-CATG[^]-3') подчеркнут.

Одну из цепей олигонуклеотидного дуплекса метили по 5'-концу с помощью T4 полинуклеотидкиназы и γ -[³²P]АТР. Меченый олигонуклеотид очищали гелефильтрацией на колонках MicroSpin G-25 (Amersham Biosciences UK Ltd., Великобритания) согласно протоколу производителя. Олигонуклеотидный дуплекс образовывали путем смешивания меченого олигонуклеотида

с комплементарным немеченным олигонуклеотидом до концентрации 180 нМ каждого в SE-буфере В. Реакционную смесь прогревали 5 минут при 95 °С, а затем остужали до комнатной температуры.

Гидролиз проводили 2 единицами фермента в 10 мкл реакционной смеси в течение 25 минут при 50 °С. Продукты гидролиза разделяли электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ с 7 М мочевиной в Трис-боратном буфере. Радиоавтограф геля получали с помощью Personal Molecular Imager (BioRad, USA).

За одну единицу активности принимали количество фермента, необходимое для гидролиза 1 пмоль олигонуклеотидного дуплекса 1/2 за 1 час при 50 °С в 20 мкл реакционной смеси, содержащей оптимальный SE-буфер В.

Результаты и обсуждение

Гидролиз плазмидной ДНК эндонуклеазой *FaiI*.

На рисунке 1 показана картина расщепления ДНК плазмиды *pUC19* различными количествами эндонуклеазы *FaiI*. Как видно из этого рисунка, глубина гидролиза плазмиды зависит от количества используемого фермента. Поскольку четкую картину исчерпывающего сайт-специфического гидролиза плазмидной ДНК получить не удалось, было предположено, что *FaiI* расщепляет нуклеотидные последовательности с разной эффективностью.

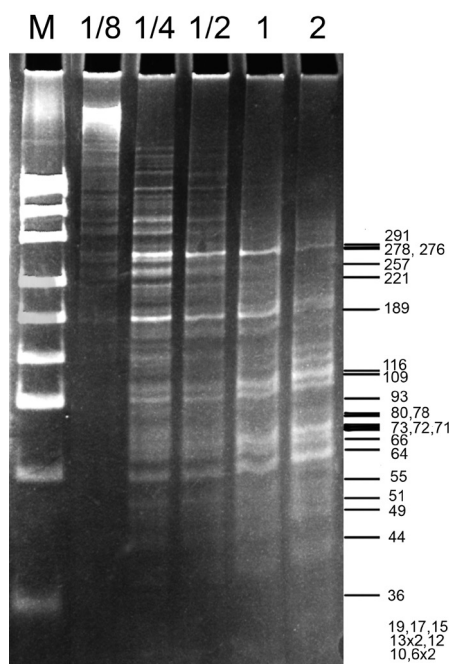


Рис. 1. Сайт-специфический гидролиз ДНК плазмиды *pUC19* различными количествами эндонуклеазы *FaiI* в течение 1 часа. Цифрами обозначено использованное количество единиц фермента. Справа приведена теоретическая картина расщепления по сайту 5'-YATR-3'. М — маркер молекулярных масс ДНК — *pUC19*/MspI

Определение субстратной специфичности эндонуклеазы *FaiI*. Для выявления последовательностей, узнаваемых ферментом *FaiI*, были проведены эксперименты по гидролизу олигонуклеотидных дуплексов различного состава. В результате было установлено,

что наиболее эффективно эндонуклеаза *FaiI* расщепляет сайт узнавания 5'-YATR-3'. На рисунке 2 представлены результаты расщепления олигонуклеотидных дуплексов, содержащих варианты указанного сайта, а также некоторые сайты с заменами первого и четвертого нуклеотидов ферментом *FaiI*.

В соответствии с данными рисунка 2 *FaiI* проявляет максимальную активность на субстратах, содержащих сайт узнавания 5'-YATR-3' (5'-CATG-3' — дуплекс 1/2, 5'-CATA-3' — дуплекс 3/4, 5'-TATG-3' — дуплекс 4/3, 5'-TATA-3' — дуплекс 5/6), где наблюдается полное расщепление ДНК. В случае замены пурина или пиримидина (5'-TATT-3' — дуплекс 7/8, 5'-AATA-3' — дуплекс 8/7, 5'-GATG-3' — дуплекс 9/10, 5'-CATC-3' — дуплекс 10/9) наблюдается частичный гидролиз ДНК. Подобная слабая активность приблизительно в 8–10 раз ниже активности на оптимальном субстрате, она наблюдается на всех сайтах вида 5'-YATY-3' (данные не приводятся). В случае одновременной замены обоих крайних нуклеотидов, то есть и пурина и пиримидина, расщепления вообще не происходит (5'-AATC-3' — дуплекс 11/12, 5'-GATT-3' — дуплекс 12/11).

На рисунке 3 приведены результаты гидролиза эндонуклеазой *FaiI* олигонуклеотидных дуплексов, содержащих сайт узнавания с заменами в центральной паре нуклеотидов.

Как видно из рисунка 3, при замене одного нуклеотида в центральной АТ паре фермент проявляет никазную активность, причем расщепляется та цепь сайта узнавания, в которой сохраняется тимин (дуплексы: 13/14 — 5'-CTTG-3' и 15/16 — 5'-CGTG-3'). Для исключения возможности влияния соседних нуклеотидов на никазную активность были проверены дуплексы того же состава, с зеркальным расположением цепей сайта узнавания (дуплексы 20/19 — 5'-CTTG-3' и 18/17 — 5'-CGTG-3'). Замена обоих центральных нуклеотидов приводит к полному отсутствию активности фермента (5'-CGCG-3' — дуплекс 21/22).

Определение места гидролиза ДНК эндонуклеазой *FaiI*. На рисунке 4 представлены результаты гидролиза олигонуклеотидного дуплекса 1/2 эндонуклеазой *FaiI* и рестриктазой *FaeI* (сайт узнавания 5'-CATG[^]-3'). Продукты частичного расщепления того же дуплекса экзонуклеазой III использованы в качестве маркера молекулярных длин.

Как видно из рисунка 4, длина фрагмента ДНК, образующегося при расщеплении олигонуклеотидного дуплекса ферментом *FaiI*, на два нуклеотида короче,

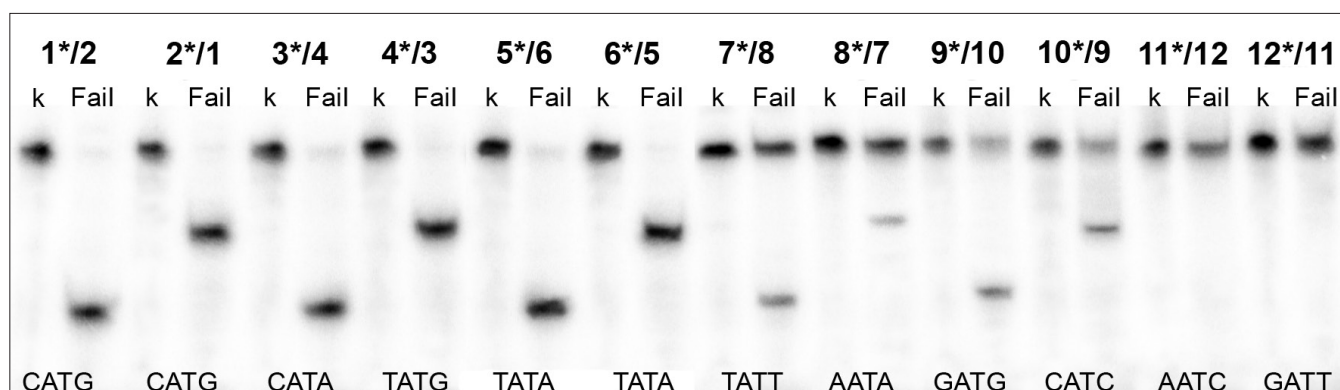


Рис. 2. Исходные (k) и гидролизованные эндонуклеазой FaiI (Fail) олигонуклеотидные дуплексы с заменами 1-го и 4-го нуклеотидов в сайте узнавания. * обозначены 5'-³²P меченные олигонуклеотиды в дуплексе. Внизу приведены последовательности ДНК в сайте узнавания фермента

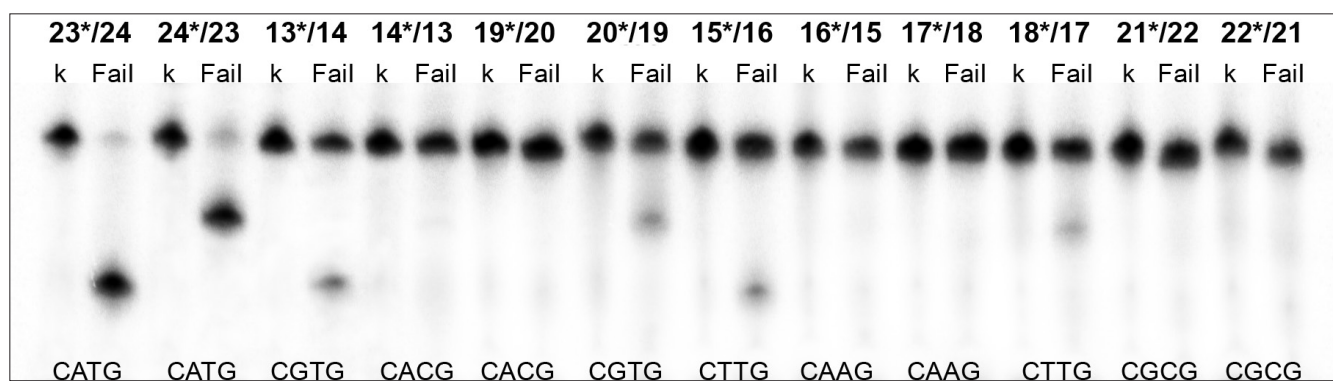


Рис. 3. Исходные (k) и гидролизованные эндонуклеазой FaiI (Fail) олигонуклеотидные дуплексы с заменами 2-го и 3-го нуклеотидов в сайте узнавания. * обозначены 5'-³²P меченные олигонуклеотиды в дуплексе. Внизу приведены последовательности ДНК в сайте узнавания фермента

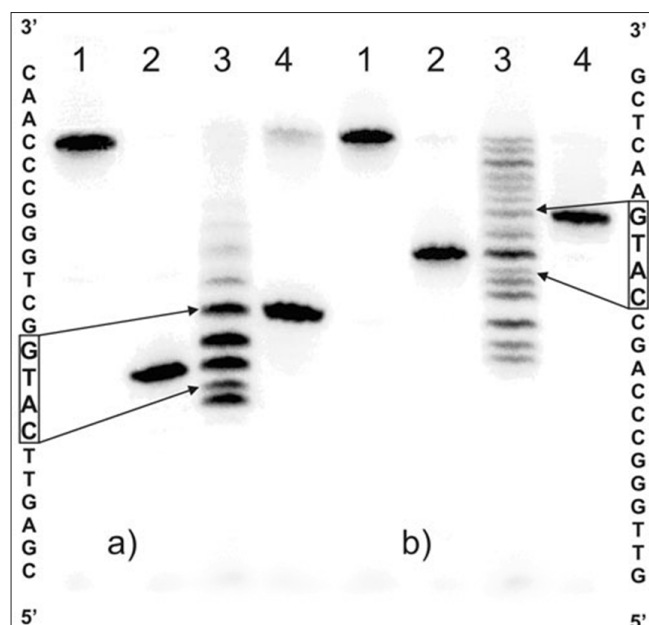


Рис. 4. Определение места гидролиза FaiI на дуплексе 1/2 в сравнении с FaeI: а) – 5'-³²P меченный олигонуклеотид 1; б) – 5'-³²P меченный олигонуклеотид 2. 1 – дуплекс 1/2; 2 – дуплекс 1/2 + FaiI; 3 – дуплекс 1/2 + EhoIII; 4 – дуплекс 1/2 + FaeI

чем длина продукта гидролиза FaeI. Следовательно, эндонуклеаза FaiI расщепляет последовательность ДНК 5'-CATG-3' сразу после аденина, образуя тупые концы.

В настоящее время описано лишь небольшое количество сайт специфических эндонуклеаз, узнающих и расщепляющих короткие (3–4 нуклеотида) вырожденные последовательности ДНК. К таким ферментам относится эндонуклеаза рестрикции CviJI и ее изоэнзимы из *Chlorella virus*, узнающие и расщепляющие нуклеотидную последовательность 5'-RGCY-3' [7]. CviJI правомерно относить к эндонуклеазам рестрикции, поскольку она входит в состав соответствующей системы рестрикции-модификации. При этом метилаза РМ-системы CviJI модифицирует клеточную ДНК, делая ее устойчивой к расщеплению рестриктазой CviJI.

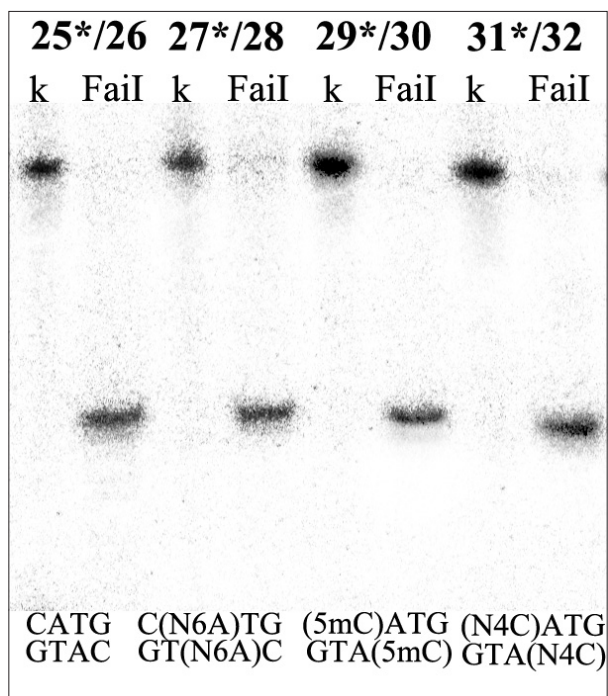


Рис. 5. Исходные (k) и гидролизованные эндонуклеазой FaiI (FaiI) олигонуклеотидные дуплексы с метилированными основаниями в сайте узнавания. * обозначены 5'-³²P меченные олигонуклеотиды в дуплексе. Внизу приведены сайты узнавания фермента

На рисунке 5 приведены данные по расщеплению последовательности 5'-CATG-3', содержащей различные метилированные основания, ферментом FaiI. Как видно из этого рисунка, FaiI расщепляет последовательность узнавания с метилированными основаниями N6A, N4C и 5mC. Таким образом, наличие указанных метилированных оснований в сайте узнавания фермента не блокирует его активность и остается неясным, почему ДНК *Flavobacterium aquatile* B15 не расщепляется

ферментом FaiI in vivo. Можно предположить, что FaiI является секретлируемым ферментом, в связи с чем клетки *Flavobacterium aquatile* B15 не нуждаются в соответствующей ДНК-метилтрансферазе. Возможно также, что ДНК *Flavobacterium aquatile* B15, в отличие от других бактериальных ДНК, дополнительно модифицирована, например, гликозилирована, и эта модификация блокирует гидролиз ДНК ферментом FaiI. Дальнейшие исследования позволят определить причину устойчивости ДНК *Flavobacterium aquatile* B15 к расщеплению ферментом FaiI.

Заключение

По сравнению с рестриктазами, которые, как правило, узнают и гидролизуют в ДНК последовательности из 4 и более нуклеотидов, эндонуклеаза FaiI расщепляет ДНК значительно глубже и соответственно может быть использована для более мелкой фрагментации ДНК и получения соответствующих геномных библиотек (quasi-random shotgun library) [7]. Кроме того, продукты расщепления ДНК в виде олигодезоксирибонуклеотидов могут применяться при мечении ДНК и картировании фрагментов рестрикционного анализа [7].

Литература

1. Янулайтис А.А. Ферменты рестрикции и их применение. Итоги науки и техники. ВИНТИ. Биотехнология. Т. 17. — М., 1989. — С. 201.
2. Degtyarev S.Kh., Kolyhalov A.A., Rechkunova N.I., Abdurashitov M.A. AcsI, a new restriction endonuclease from *Arthrobacter citreus* 310 recognizing 5'-Pu⁺AATTPy-3' // Nucleic Acids Research. — 1992. — Vol. 20. — P. 3789.
3. George J., Blakesley R.W., Chirikjian J.G. Sequence-specific endonuclease BamHI // J. Biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 6521–6524.
4. Malyguine E., Vannier P., Yot P. Alteration of the specificity of restriction endonucleases in the presence of organic solvents // Gene. — 1980. — Vol. 8. — P. 163–177.
5. Pingoud A., Jeltch A. Structure and function of type two restriction endonucleases // Nucleic Acid Research. — 2001. — Vol. 29. — P. 3705–3727.
6. Polisky B., Greene P., Garfin D.E., McCarthy B.J., Goodman H.M., Boyer H.W. Specificity of substrate recognition by the EcoRI restriction endonuclease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1975. — Vol. 72. — P. 3310–3314.
7. Swaminathan N., Mead D.A., McMaster K., George D., Van Etten J.L., Skowron P.M. Molecular cloning of the three base restriction endonuclease R.CviJI from eukaryotic *Chlorella virus* IL-3A // Nucleic Acids Research. — 1996. — Vol. 24. — P. 2463–2469.

SITE-SPECIFIC DNA ENDONUCLEASE Fail RECOGNIZES DEGENERATE FOUR-NUCLEOTIDE SEQUENCE 5'-YA[^]TR-3'

Ju.E. TOMILOVA, V.A. CHERNUKHIN, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme, Ltd., Novosibirsk

We have studied a substrate specificity of new site-specific DNA endonuclease Fail. Fail recognizes and cleaves nucleotide sequence 5'-YA[^]TR-3', displaying a weak activity in digestion of 5'-YA[^]TY sites. Replacement of one nucleotide in a central AT pair results in a nicking activity of the enzyme, which hydrolyses a chain carrying T in the recognition site. Fail cleaves DNA with 5-methylcytosine, N4-methylcytosine and N6-methyladenine in the recognition sequence.

Keywords: site-specific endonuclease, degenerative recognition sequence, fine splitting endonuclease.