

КЛОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ ВРН4I ИЗ *BACILLUS PUMILUS* N4

В.С. ДЕДКОВ, Д.А. ГОНЧАР*, В.А. ЧЕРНУХИН, М.А. АБДУРАШИТОВ,
Е.Н. ЛОМАКОВСКАЯ, Н.М. ШИНКАРЕНКО, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

ООО «СибЭнзим», Новосибирск

ДНК бактериального штамма *Bacillus pumilus* N4, несущего систему рестрикции-модификации ВРН4I (сайт узнавания 5'-GGNNCC-3'), гидролизовалась эндонуклеазами рестрикции MfeI и EcoRI, и полученные продукты клонировались в вектор pUC19, линейаризованный EcoRI. Для отбора клонов, несущих ген эндонуклеазы рестрикции ВРН4I, было предложено использовать метод селекции, основанный на делении (разведении) полученной библиотеки клонов с прямым определением активности эндонуклеазы рестрикции в суммарных лизатах клеток. С помощью данного метода был выявлен рекомбинантный штамм *E. coli* N41 (pВРН4/MR), являющийся продуцентом фермента ВРН4I. Также была проведена селекция полученной библиотеки традиционным методом Венецианера и получены два различных клон, один из которых идентичен *E. coli* N41(pВРН4/MR), а второй — *E. coli* N7(pВРН4/MR), содержит вставку в плазмиде в противоположном направлении и проявляет меньшую активность. Была установлена структура ДНК плазмидной вставки штамма *E. coli* N41 (pВРН4/M)R и показано, что она содержит гены ДНК-метилтрансферазы М.ВРН4I и эндонуклеазы рестрикции ВРН4I. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности ферментов, кодируемых данными генами, выявил гомологию М.ВРН4I с другими метилазами, узнающими сайт 5'-GGNNCC-3' или сходный с ним. В аминокислотной последовательности М.ВРН4I выявлены все домены, характерные для 5mC-ДНК-метилтрансфераз.

Ключевые слова: эндонуклеаза рестрикции, неоизомер, ДНК-метилтрансфераза, селекция продуцента.

Введение

Бактериальные системы рестрикции-модификации (РМ-системы) являются одним из интереснейших объектов, изучаемых в молекулярной биологии. РМ-система включает в себя, как минимум, два фермента — сайт-специфические эндонуклеазы рестрикции (рестриктазу) и ДНК-метилтрансферазу (метилазу) [9, 14]. В настоящее время успешное развитие многих направлений молекулярной биологии, генетической инженерии и ДНК-диагностики немыслимо без расширения ассортимента эндонуклеаз рестрикции, которые являются одними из ключевых инструментов в этих областях науки.

Выделение эндонуклеаз рестрикции из природных штаммов часто осложняется необходимостью использования большого количества биомассы, сложных схем выделения, включающих в себя хроматографию с

дорогостоящими сорбентами, а также малым выходом целевого продукта. В связи с этим актуальным является клонирование генов этих ферментов в составе векторов в *E. coli* с целью создания штаммов суперпродуцентов. Успешное клонирование, в свою очередь, зависит от возможности использования эффективных методов отбора (селекции) целевых продуцентов из тысяч рекомбинантных клонов. Следовательно, разработка и оптимизация новых методов селекции клонов достаточно актуальна.

Ранее было показано, что рестриктаза ВРН4I из *Bacillus pumilus* N4 расщепляет последовательность 5'-G⁺GNNCC-3' [3], являясь первым неоизомером NlaIV (5'-GGN⁺NCC-3', <http://www.rebase.neb.com>). В отличие от NlaIV, при гидролизе ДНК рестриктазой ВРН4I образуются четырехнуклеотидные 5'-выступающие липкие концы, сходные с концами, получающимися при расщеплении ДНК эндонуклеазами рестрикции XhoII и BstX2I (сайт узнавания 5'-R⁺GATCY-3'), Acc65I (5'-G⁺GTACC-3'), HgiC1I и AccB1I (5'-G⁺GYRCC-3'), BamHI (5'-G⁺GATCC-3'), PspOMI (5'-G⁺GGCCC-3'), а также рядом других ферментов, что позволяет эффективно применять фермент ВРН4I в разнообразных генно-инженерных мани-

© 2013 г. Дедков В.С., Гончар Д.А., Чернухин В.А., Абдурашитов М.А., Ломаковская Е.Н., Шинкаренко Н.М., Дегтярев С.Х.

* Автор для переписки:

Гончар Данила Александрович

ООО «СибЭнзим»

630117 Новосибирск-117, ул. Академика Тимакова, 2/12

E-mail: gonchar@sibenzyme.ru

пуляциях. Однако продуктивность исходного штамма *B. pumilus* N4 невелика.

В данной работе мы клонировали эндонуклеазу рестрикции BpuN4I из *B. pumilus* N4. Для получения клона-продуцента фермента мы разработали метод селекции, основанный на делении (разведении) полученной библиотеки клонов с прямым определением активности эндонуклеазы рестрикции в суммарных лизатах клеток. Также была проведена селекция клонов по устойчивости к бактериофагу *in vivo* и по устойчивости рекомбинантной ДНК к рестриктазе BpuN4I *in vitro*. Установлена структура РМ-системы BpuN4I и проведен сравнительный аминокислотный анализ метилазы M.BpuN4I и рестриктазы R.BpuN4I, входящих в эту систему.

Материалы и методы

Штаммы. Штамм *Escherichia coli* ER2267 (F' proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zcf::mini-Tn10 (Kanr)/Δ(argF-lacZ)U169 glnV44 e14- (McrA-) rfbD1. recA1 relA1. endA1 spoT1. Thi-1 Δ(mcrC-mrr) 114::IS10) — получен из «New England Biolabs, Inc.» (США); штаммы: *Bacillus pumilus* N4, продуцент рестриктазы BpuN4I, *Escherichia coli* C600 (ΔcI857Sam7) и *Escherichia coli* QD5003 — получены из коллекции культур микроорганизмов НПО «СибЭнзим» (Новосибирск).

Определение активности эндонуклеазы рестрикции BpuN4I. Определение активности рестриктазы BpuN4I в бактериальной культуре проводили, как описано ранее [1, 2]. Бактериальные клетки в количестве 0,05–0,2 мг суспендировали в 20 мкл лизирующего буфера, содержащего 0,2 мг/мл лизоцим («AppliChem», Германия), 0,1% Тритон X-100 («Sigma», США), 10 мМ Трис-НСl (рН 8,1), 1 мМ ЭДТА и инкубировали 30 мин при 22 °С. К полученному лизату добавляли 5 мкл смеси, содержащей 250 мкг/мл ДНК фага лямбда и 5-кратный SE-буфер Y (33 мМ Трис-ацетат (рН 7,9), 10 мМ ацетат магния, 66 мМ ацетат калия и 1 мМ ДТТ), и полученную смесь инкубировали 1 час при +37 °С. По окончании реакции к смеси добавляли 2,5 мкл стоп-буфера (0,25 М Na-ЭДТА (рН 8,5), 50% сахараоза, 0,1% бромфеноловый синий и 0,1 мг/мл РНКазы), перемешивали и 5 мкл полученной смеси наносили на 0,8% агарозный гель в буфере ТAE (40 мМ Трис-ацетат (рН 8,1), 20 мМ натрий ацетат, 1 мМ ЭДТА, 0,5 мг/л этидия бромид). Электрофорез вели при напряжении 5 В/см в течение 70 мин и затем фотографировали гель в ультрафиолете на приборе «Herolab GmbH» (Германия).

Получение геномной библиотеки *B. pumilus* N4. Все генно-инженерные процедуры, а также работа с бактериофагом лямбда выполнялись согласно [11]. ДНК *B. pumilus* N4, продуцента рестриктазы BpuN4I, выделяли, как описано ранее [12].

5 мкг ДНК *B. pumilus* N4 гидролизovali раздельно рестриктазами MfeI и EcoRI, как рекомендовано производителем. Полученные гидролизаты ДНК очищали экстракцией фенолом-хлороформом, переосаждали этанолом и полученный осадок растворяли в 25 мкл воды.

Для приготовления вектора готовили 400 мкл реакционной смеси, содержащей 40 мкл десятикратного SE-буфера EcoRI, 20 мкл ДНК pUC19 в концентрации 0,5 мг/мл, 340 мкл воды и 5 мкл рестриктазы EcoRI. Смесь инкубировали 1,5 часа при +37 °С, добавляли 20 единиц щелочной фосфатазы из кишечника теленка и инкубировали 30 мин. при +37 °С. Далее ДНК очищали экстракцией фенолом-хлороформом, переосаждали этанолом и растворяли в 20 мкл буфера TE.

Сшивку фрагментов ДНК *B. pumilus* N4 с полученным вектором проводили в 30 мкл смеси, содержащей 3 мкл десятикратного лигазного буфера, 3 мкл вектора pUC19/EcoRI, 15 мкл ДНК *B. pumilus* N4, гидролизованную ферментом EcoRI, 9 мкл ДНК *B. pumilus* N4, гидролизованную MfeI, и 1 мкл высокоактивной T4-ДНК-лигазы и инкубировали в течение ночи при +4 °С. Затем ДНК осаждали этанолом и растворяли в 12 мкл воды.

Полученной таким образом смесью рекомбинантных ДНК трансформировали клетки *E. coli* штамма ER2267 путем электропорации на приборе «Easysject Prima». Перед электропорацией к 50 мкл размороженных во льду клеток добавляли 4 мкл лигазной смеси. После трансформации к суспензии клеток добавляли 1 мл нагретого до +37 °С бульона LB, и клетки подращивали при +37 °С в течение 1 часа. Для подсчета трансформантов 10 мкл полученной культуры рассеивали в чашке Петри на агаризованной среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампицилина, и инкубировали ночь при +37 °С. Основную часть культуры засевали во флакон со 100 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампицилина и выращивали в течение ночи в термостатированной воздушной качалке при +37 °С и 140 об./мин.

Селекция потенциальных продуцентов методом деления библиотеки клонов. При достижении оптической плотности 2,5 единицы при 540 нм культуру разбавляли ТМ-буфером (10 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgSO₄ и 200 мкг/мл желатин) в 3000 раз и раскапывали в чашки Петри по 10 мкл на 30 секторов LB-агара с ампициллином.

Чашки инкубировали 2 дня при 22 °С. Каждую смесь колоний переносили петлей в ячейку планшета и суспендировали в 100 мкл буфера, содержащего 25% глицерин, 40 mM NaCl и 10 mM Трис-НCl (pH 7,6), и хранили при -18 °С. Параллельно из полученных суспензий отбирали аликвоты по 2 мкл в лизирующий буфер и тестировали активность рестриктазы, как описано выше. Суспензию клеток, содержащую рестриктазу, разводили ТМ-буфером в 10 раз и снова раскапывали в чашки Петри по 10 мкл на 30 секторов LB-агара с ампициллином. Клетки подращивали и тестировали в них активность фермента, как описано выше. Процедуру разведения повторяли до получения смеси клеток из единичных клонов (10–25 клонов), их рассевали на отдельные чашки и проводили определение активности фермента в отдельных клонах, как описано выше.

Селекцию потенциальных продуцентов по устойчивости к бактериофагу проводили по методу, описанному ранее [4, 15]. Клетки *E. coli*, содержащие библиотеку ДНК *B. pumilus* N4, подращивали во флаконе со 100 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина в течение ночи в термостатированной воздушной качалке при +37 °С и 140 об./мин. Культура достигала плотности 2,5 при 540 нм и имела титр 3×10^8 КОЕ/мл. 111 мкл культуры разбавляли в 1 мл ТМ-буфера и добавляли по 100 мкл в четыре ячейки планшета, содержащие по 100 мкл бактериофага лямбда с титром 12×10^8 , $2,4 \times 10^8$, $0,48 \times 10^8$ б.о.е./мл а также ТМ-буфер без бактериофага. Инфицирование проводили 15 мин. при +37 °С. Затем клетки последовательно разводили 5 раз, каждый раз отбирая 11,1 мкл из смеси и добавляя их к 100 мкл ТМ-буфера. По 50 мкл из каждого разбавления рассевали в чашки Петри на 1,4%-ный питательный агар с 50 мкг/мл ампициллина. Инкубировали 1 час при +42 °С, затем 20 часов — при +37 °С. Снижение титра клеток в 1000 раз после инфекции со множественностью до 40 фаговых частиц на клетку (б.о.е./КОЕ) рассматривали как результат селекции штаммов, потенциально устойчивых к бактериофагу.

Селекция потенциальных продуцентов по устойчивости рекомбинантной плазмиды к рестриктазе *Bpu*N4I. Для отбора целевых рекомбинантных плазмид по их устойчивости к действию рестриктазы *Bpu*N4I использовали метод Венецианера [13], получивший название Hungarian trick и успешно применяемый для клонирования ферментов различных РМ-систем [6, 7]. При этом трансформанты *E. coli*, выращенные в 100 мл селективной среды, собирали на центрифуге «Beckman J2-21» (USA) при 6000 об./мин. в течение 30 мин.

при 10 °С. Из осадка выделяли суммарную плазмидную ДНК с использованием набора QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Germany) по инструкции производителя. Полученную библиотеку рекомбинантных плазмид с концентрацией ДНК 0,4 мг/мл обрабатывали 10 мкл рестриктазы *Bpu*N4I в SE-буфере Y в течение 1 часа при 37 °С. Гидролизат ДНК осаждали 96%-ным этанолом и растворяли в 15 мкл воды. Полученным гидролизатом трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма ER2267 при 42 °С в течение 2 мин. и высевали их в чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Инкубировали при 37 °С в течение ночи и выделяли плазмидные ДНК из индивидуальных клонов. ДНК проверяли на наличие встроенного фрагмента и на устойчивость к гидролизу *Bpu*N4I.

Выращивание рекомбинантных штаммов *E. coli* проводили в бульоне LB, содержащем 1% триптон («Organotechnie», Франция), 0,5% дрожжевой экстракт («Organotechnie», Франция), 0,5% NaCl, 0,05% $MgCl_2$, 0,001% тиамин (pH 7,0) с добавлением 0,1 мг/мл ампициллина в двадцати колбах объемом 500 мл, содержащих по 300 мл бульона, при +30 °С со встряхиванием 130 об./мин. в течение 18 часов. Клетки осаждали на центрифуге J2-21 («Beckman», США) в течение 30 минут в роторе JA-10 при 8000 об./мин. и замораживали. Получали 12 г биомассы.

Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Препараты ферментов, ДНК, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и синтетических олигонуклеотидов, использованные в работе, произведены в НПО «СибЭнзим» (г. Новосибирск).

Результаты и обсуждение

Клонирование РМ-системы *B. pumilus* N4.

Штамм *Bacillus pumilus* N4 — продуцент новой эндонуклеазы рестрикции *Bpu*N4I [3] — является малопродуктивным, в связи с чем необходимо было клонировать данный фермент. На первом этапе мы провели выделение хромосомной ДНК из 3 г биомассы *B. pumilus* N4 и получили 2,8 мг ДНК с концентрацией 0,7 мг/мл. ДНК гидролизовали отдельно рестриктазами *Mfe*I (5'-C[^]AATTG-3') и *Eco*RI (5'-G[^]AATTC-3'), как описано в разделе «Материалы и методы». Плазмиду pUC19 линеаризовали рестриктазой *Eco*RI, дефосфо-

рилировали щелочной фосфатазой и сшивали с помощью Т4-ДНК-лигазы со смесью гидролизатов ДНК *B. pumilus* N4, после чего трансформировали клетки *E. coli* ER2267 [8] путем электропорации.

В результате трансформации было получено 20 тысяч клонов *E. coli*, несущих фрагменты ДНК *B. pumilus* N4 и представляющих библиотеку этого штамма.

Отбор рекомбинантных продуцентов рестриктазы BpuN4I. Для выявления штаммов-продуцентов целевого фермента из всего пула трансформантов использовали метод деления (разведения) библиотеки, а также методы селекции клонов-продуцентов рестриктазы по устойчивости к бактериофагу и по устойчивости плазмидной ДНК рекомбинантных клонов к расщеплению рестриктазой.

На рисунке 1 приведены результаты определения активности BpuN4I в последовательных разведениях суммарных лизатов клеток, вплоть до тестирования рестриктазы в отдельных клонах в последнем разведении.

Из рисунка 1 видно, что при первом разведении активность рестриктазы BpuN4I определяется в суспензии клеток под номером 19 (рис. 1а). Суспензию клеток под номером 19 разводили в 10 раз и определяли активность фермента на следующей стадии отбора. Как видно из рисунка 1б, активность проявилась в лизатах 11-, 14-, 20-й смесей, содержащих в каждой от 80 до 150 клонов (рис. 1б). Суспензию клеток под номером 11 разводили далее и обнаружили активность фермента в смесях под номерами 8 и 19 (рис. 1в). На заключительном этапе отбора смесь клеток под номером 8 рассевали до отдельных колоний, в которых тестировали активность рестриктазы BpuN4I (рис. 1г). Клон под номером 1 был взят для дальнейшей работы и обозначен как *E. coli* N41 (pBpuN4/MR).

Селекция потенциальных продуцентов по устойчивости к бактериофагу и по устойчивости рекомбинантной плазмиды к рестриктазе BpuN4I. Селекцию по устойчивости к бактериофагу проводили, как описано в разделе «Материалы и методы». При инфицировании со множественностью 8 б.о.е./КОЕ выжило 0,09% трансформантов. 300 из них пересеяли, однако активности BpuN4I в них не было обнаружено. Следовательно, нам не удалось провести селекцию библиотечных штаммов-продуцентов BpuN4I по устойчивости к бактериофагу.

Селекция по устойчивости пула рекомбинантных плазмид к рестриктазе BpuN4I дала положительный результат. Суммарную плазмидную ДНК 20 тысяч трансформантов *E. coli*, представляющих библиотеку ДНК *B. pumilus* N4, обрабатывали рестриктазой BpuN4I, как описано в разделе «Материалы и методы». После

этого гидролизатом повторно трансформировали клетки *E. coli* и получили 20 клонов. Определение в них активности рестриктазы показало наличие фермента BpuN4I в четырнадцати клонах.

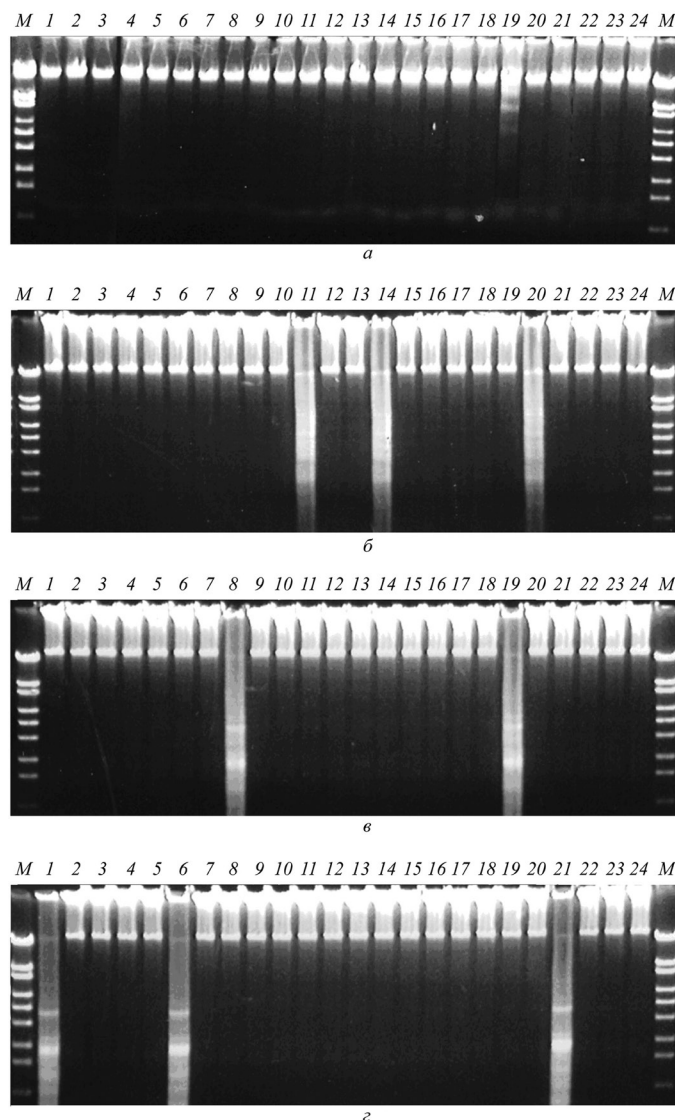


Рис. 1. Определение активности BpuN4I в лизатах клеток, полученных из 10^3 (а), 10^2 (б), 10 (в) и из отдельных клонов (г) в процессе выделения продуцента из библиотеки. Дорожки: 1–24 — лизаты клеток + ДНК бактериофага лямбда, М — маркер (ДНК бактериофага лямбда + BssT1I). Электрофорез в 0,8% агарозном геле. На первом этапе мы применили метод деления (разведения) полученной библиотеки из 20000 клонов с тестированием эндонуклеазы рестрикции в суммарных лизатах клонов, как описано в «Материалах и методах»

Выделенные из данных клонов плазмиды проявили устойчивость к BpuN4I, что свидетельствует о наличии в них генов рестриктазы и метилазы РМ-системы BpuN4I. Анализ ДНК плазмид показал, что часть из них идентична ранее полученному клону *E. coli* N41 (pBpuN4/

MR), тогда как остальные плазмиды были одинаковы и содержали фрагмент ДНК с РМ-системой BpuN4I, ориентированный в противоположном направлении. Для дальнейшей работы мы выбрали один клон из второго набора и обозначили его как *E. coli* N7 (pBpuN4/MR).

Таким образом, селекция полученной библиотеки клонов при помощи предлагаемого метода деления (селекции) с прямым определением активности фермента, а также метода отбора клонов по устойчивости их ДНК к рестриктазе BpuN4I дала положительный результат.

Данные по сравнительному анализу активности фермента BpuN4I в клонах *E. coli* N41 и *E. coli* N7 представлены на рисунке 2. Равные количества клеток каждого штамма суспендировали в лизирующем буфере и определяли активность фермента, как описано в разделе «Материалы и методы». При этом проводили двукратные разбавления лизата в реакционной смеси. Из рисунка 2 видно, что активность BpuN4I в клетках *E. coli* N41 в два раза выше, чем в *E. coli* N7.

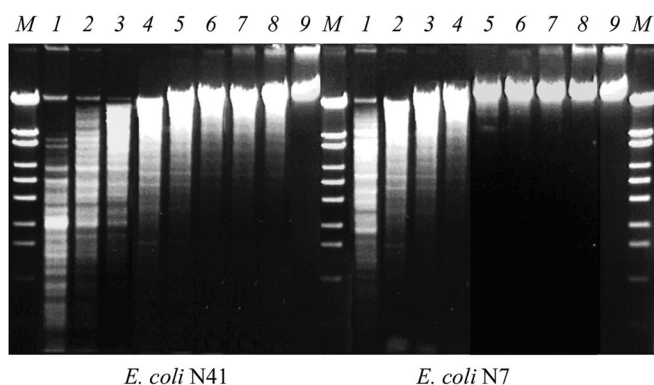


Рис. 2. Определение активности BpuN4I в разведениях лизатов клеток рекомбинантных продуцентов. Дорожки: 1 – 2-кратное разбавление клеток культуры в реакционной смеси; 2 – 4-кратное; 3 – 8×; 4 – 16×; 5 – 32×; 6 – 64×; 7 – 130×; 8 – 250×; 9 – без лизата. М – маркер длины ДНК (λ ДНК+BssT1I), состоящий из фрагментов 19329, 7743, 6223, 4254, 3472, 2690, 1882, 1489, 925 421 и 74 пар нуклеотидов. Электрофорез в 0,8% агарозном геле

Анализ структуры вставки ДНК плазмиды pBpuN4/MR N41. Нами была установлена первичная структура ДНК вставки плазмиды наиболее продуктивного штамма *E. coli* N41 и полученная нуклеотидная последовательность была депонирована в GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/BpuN4I_RM.sqn BpuN4I_RM KF150199).

На рисунке 3 приведена физическая карта плазмиды pBpuN4/MR N41, которая содержит MfeI-фрагмент

ДНК *B. pumilus* N4, встроенный в вектор pUC19/EcoRI. Длина фрагмента составляет 3495 п.н. Встроенный фрагмент включает протяженные открытые рамки считывания, направленные в одну сторону. Как показано ниже, одна из этих рамок (1695–3023) представляет ген bpuN4IM, кодирующий ДНК-метилтрансферазу BpuN4I, а другая (624–1646) – ген bpuN4IR, кодирующий эндонуклеазу рестрикции BpuN4I.

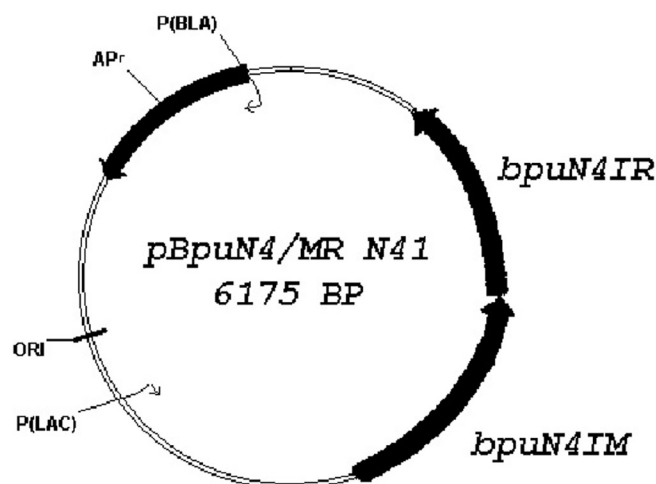


Рис. 3. Физическая карта рекомбинантной плазмиды pBpuN4/MR N41: ORI – точка начала репликации плазмиды pBpuN4/MR; APc – ген BLA, обеспечивающий устойчивость к ампициллину, P(BLA) – промотор гена BLA; P(LAC) – промотор гена lacZ; bpuN4IR – ген, кодирующий эндонуклеазу рестрикции BpuN4I; bpuN4IM – ген, кодирующий ДНК-метилтрансферазу BpuN4I

Рисунок 4 иллюстрирует результаты множественного выравнивания аминокислотной последовательности первой открытой рамки считывания с реально существующими и наиболее гомологичными белками, оказавшимися ДНК-метилтрансферазами с сайтами узнавания 5'-GGNNCC-3' или сходными. Таким образом, первая открытая рамка считывания кодирует фермент ДНК-метилтрансферазу М.ВруN4I. Анализ аминокислотной последовательности метилазы показал, что М.ВруN4I содержит все десять консервативных мотивов, характерных для цитозин (C5)-ДНК-метилтрансфераз (КФ 2.1.1.73) [5, 10].

Ввиду отсутствия во встроенном фрагменте других протяженных рамок считывания, мы сделали вывод, что вторая открытая рамка считывания кодирует ген рестриктазы R.ВруN4I. На рисунке 5 представлено множественное выравнивание R.ВруN4I и наиболее гомологичных белков.

M. BpuN4I	1	MAKVKFIDLFAGIGGIRSGFEQAFSENNIVPECVFTSEIKKHAIKVLEENYS----HGIFAGDITKVD--VDEIFDFDIL	
M. NgoBV	GGNNCC	1	MOQIKFIDLFSGMSCHIRKGFQACRKQSVACECVFTSEIKPAALEVLKONYP----DEVYGDITKIE--TGDIFDFDIL
M. NlaIV	GGNNCC	1	MOQIKFIDLFSGMSCHIRKGFQACRKQSVACKCVFTSEIKPAALEVLKONYP----DEVYGDITKIE--TGDIFDFDIL
M. BanI	GGYRCC	1	--MKIKFIDLFAGIGGIRSGFEQAFSENNIVPECVFTSEIKKHAIKVLEENYS----HGIFAGDITKVD--VDEIFDFDIL
M. HgiCI	GGYRCC	1	--MKIKFIDLFAGIGGIRSGFEQAFSENNIVPECVFTSEIKKHAIKVLEENYS----HGIFAGDITKVD--VDEIFDFDIL
M. HgiBI	GGWCC	1	MOQIFIDLFAGIGGIRSGFEQAFSENNIVPECVFTSEIKKHAIKVLYONWP--TDGVTHNLGIDITQIQ-----QLEAHQVIL
M. Sau3AI	GATC	1	MNKIKRVVLEFAGVGGFRUGLQENTKNG--IFDIITWANGWPSRKIQHAFDCYSKRFKNGIHNSNRDIAQVSDDEEMATEADMI
M. BpuN4I	75	LAGFPFCQPFSSGCKRLGFS-----TRGTLFFETIERILFAKRPYCGFLENVPGVVKHDLLENPKDKMCTTSTINIVLETLGY	
M. NgoBV	GGNNCC	75	LAGFPFCQAFSSAGKRLGFS-----TRGTLFFEDVARILKAKPKGFTLENVGLVTHDRKDSQKIGRTITVILETLALGY
M. NlaIV	GGNNCC	75	LAGFPFCQAFSSAGKRLGFS-----TRGTLFFEDVARILKAKPKGFTLENVGLVTHDRKDSQKIGRTITVILETLALGY
M. BanI	GGYRCC	71	LAGFPFCQPFSSVAGKQGGFS-----TRGTLFFEDVARILKAKPKGFTLENVGLVTHDRKDSQKIGRTITVILETLALGY
M. HgiCI	GGYRCC	70	LAGFPFCQPFSSVAGKQGGFS-----TRGTLFFETIERILFAKRPYCGFLENVGLVTHDRKDSQKIGRTITVILETLALGY
M. HgiBI	GGWCC	70	VGVVPCQPFSSVAGKQGGFS-----TRGTLFFEDVARILKAKPKGFTLENVGLVTHDRKDSQKIGRTITVILETLALGY
M. Sau3AI	GATC	80	VGVVPCQPFSSVARSNLNELGILQGGKGVLEWQITIRYIQNTFFPKYILLENVORLLKSPS---SQR--GRDFAVMLSTINELGY
M. BpuN4I	152	KVWVKVLDKDFGLAOSKRIETIAGTKKE-----ISLENFAKSSCKLODILLKGLPTKES--NFTOMLFKFKPE----	
M. NgoBV	GGNNCC	152	YVSWKVLNAKDFGIPONRRRIYILGSLKSP-----DLSEFETSPSEKLNHLESGLPTES--PFIKKILKFFPS----
M. NlaIV	GGNNCC	152	YVSWKVLNAKDFGIPONRRRIYILGSLKSP-----DLSEFETSPSEKLNHLESGLPTES--PFIKKILKFFPS----
M. BanI	GGYRCC	141	GVSYLLINSSTFGVONRVRIYILGILGSPKPLTITSNVGAADSHKYN--EQISLFDSE--YATVKDILEDSESEKRYCS
M. HgiCI	GGYRCC	140	GV--YLINSSTFGVONRVRIYILGILGSPKPLTITSNVGAADSHKYN--EQISLFDSE--YATVKDILEDSESEKRYCS
M. HgiBI	GGWCC	140	SVFYKILNSFDGVAONRVRIYILGILGSPKPLTITSNVGAADSHKYN--EQISLFDSE--YATVKDILEDSESEKRYCS
M. Sau3AI	GATC	156	NVEWRVINAADYGNARRRVFIIPGYKQD-----LNYSKAMESEPLDKIYHNLFAEAFPIEDYANKNVNR-----

M. BpuN4I	220	-----ELYGKSIDKRGCKNNIHSWDILGKCEVSEOKILLGLLKERKKHWAEEK--IDWMDGMP	
M. NgoBV	GGNNCC	220	-----ELYGKSVKDRGCKNNIHSWDILGKCAVTEEEKOLLNILLKERKKHWAEEK--IDWMDGMP
M. NlaIV	GGNNCC	220	-----ELYGKSVKDRGCKNNIHSWDILGKCAVTEEEKOLLNILLKERKKHWAEEK--IDWMDGMP
M. BanI	GGYRCC	218	DEFIGQLSKVGNFELHGYRLIDYRG--NSIHSWELGKGCDSDEIEMNALTANRRKKIYG--THQDGKAL
M. HgiCI	GGYRCC	219	TDFVNKLAFIGHPI--KNGKRLIDYRG--NSIHSWELGKGCDSDEIEMNALTANRRKKIYG--THQDGKAL
M. HgiBI	GGWCC	217	G--YNKLTFRGAFN-----DFFILNDINCPSTIHSWELIYPT--TEREKQICMIMNRENSRYGDCDCEPMYSQDIABL
M. Sau3AI	GATC	223	-----THITHDIVDI--SDNFSQFYNSE--IMKNGELITDITPKYERSVTLGELIESNVDDGFSL

M. BpuN4I	283	TLEEKTFYFPHENIKEMCEDITKRGYIKLHPKSLVVEEFREDGVSVKRPNPNIEKGNITVIGKISFEFNKILDPNDIA	
M. NgoBV	GGNNCC	283	TKAQISTFYKHPDLONILDSITDKGYIVLHPKQKIGGQ-----RIKDESLPKGNIVSGKKSFEINKILDPNDIA
M. NlaIV	GGNNCC	283	TKAQISTFYKHPDLONILDSITDKGYIVLHPKQKIGGQ-----RIKDESLPKGNIVSGKKSFEINKILDPNDIA
M. BanI	GGYRCC	290	TLEQIRTFYHNDQLEVIITKSLQKGYVREBNK-----BNPVCGNMSFEVVKFELDPDSIS
M. HgiCI	GGYRCC	290	TLEQIRTFYHNDQLEVIITKSLQKGYVREBNK-----BNPVCGNMSFEVVKFELDPDSIS
M. HgiBI	GGWCC	288	VAGLAELQTLVEKRILQYDPGKYEFFNRRLSGGIDG-----TYRIELPNAREFGTLTARGMHDEIAEISVSGANA
M. Sau3AI	GATC	282	NQDQIDKPKYLKRGPKKIKRTTKGHEYYFSE-----GGMSETDSELEFARTM

M. BpuN4I	363	PTIVADVSRIGIVDGE--ITRLILQGLKGLFGFPDTEKFNVDDEGFDLLGNVSVVPVVKALCKRKLCHSVSVNSLEVTH	
M. NgoBV	GGNNCC	354	PTIFAMDMEHLFVVGNGC--ITRLILQGLKGLFGFPDTEKFNVDDEGFDLLGNVSVVPVVKALCKRKLCHSVSVNSLEVTH
M. NlaIV	GGNNCC	354	PTIFAMDMEHLFVVGNGC--ITRLILQGLKGLFGFPDTEKFNVDDEGFDLLGNVSVVPVVKALCKRKLCHSVSVNSLEVTH
M. BanI	GGYRCC	345	ITITSSDAHKLGVVQNNV--PRITIPRECARLOGFPDDILHSNDNFAMKOLGNSVTVKVEKVIDELFQNNVNFQGMK
M. HgiCI	GGYRCC	345	ITITSSDAHKLGVVQNNV--PRITIPRECARLOGFPDDILHSNDNFAMKOLGNSVTVKVEKVIDELFQNNVNFQGMK
M. HgiBI	GGWCC	361	EYKHNFIQ--VLIPKR--YRKIVVSAARLOGFPDSEOFHPSQSANFRLGNSVAVPVVVAUGKALQCVLKFQELCEV
M. Sau3AI	GATC	329	LTSESSINRSTHFLNVDVYRTLPIDAEIRLNGFPDNTWTEGMPKIMRVFCMGNALVPELITRIQNOIEKIDSITNDEFSQ

M. BpuN4I	442	I----	
M. NgoBV	GGNNCC	423	----
M. NlaIV	GGNNCC	423	----
M. BanI	GGYRCC	424	LANVV
M. HgiCI	GGYRCC	420	----
M. HgiBI	GGWCC	437	----
M. Sau3AI	GATC	409	LRLF-

Рис. 4. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей *M. BpuN4I* и наиболее гомологичных по структуре TRD белков. В выравнивание включены только ДНК-метилтрансферазы с достоверно установленными сайтами узнавания. Район TRD обозначен звездочками

<i>R. BpuN4I</i>	1	MVESLYSTIYFIKGGISLRQCIKPKKMSFDEFKQTYSPFFIDENYENLVDSIDSIVDSLKNMKEI--GTIEGLMDYI
<i>WP_018195440</i>	1	-----MVDPSQEQKRVRTVIEHTTEFKPVREVEEADENKNAVVLVDSTLSLRQKVALYG--CREDVFEHL
<i>WP_009413428</i>	1	-----MRSVDDKFLTVIDKNTYFFNT--KFEQEGYGYINSVKETLLIVKNKVETEG--LKKEIFEWLL
<i>YP_002378322</i>	1	-----MVEKTKQKELNIVIEKNTYFYFNK--EFEQEGYGYINSVKETLLIVKNKVETEG--LKKEIFEWLL
<i>R. BpuN4I</i>	79	QSDEESDANILSLGFSAEKFMRTITSMFRMTQGDNFN-----TEWKLSCIRAKMLTNSAFANKICRLL
<i>WP_018195440</i>	64	QSNPSGLDSILALTGFSAEKSLKRLITFAKVVDDSTLNALLCRDLKDA--EPHREWSFDEIRALLKRNKAFAGIURLF
<i>WP_009413428</i>	61	AEKENGKALLALTGFSNEYLKRLITIRIVDDAELNKIVFKDKYNEKNPNNIQESDNTIQKIQNDEFFRKCVNIE
<i>YP_002378322</i>	65	LR-EYGLDSILALTGFSDESLKRLITIRATNDSTLRVSLKTKWSS--SVENINENWNEKIKSLVINKNDRREGIVNLF
<i>R. BpuN4I</i>	142	LNGASDEEFSDTTEKGYLDNLTDLERTLQQLTDKRLKRLVQKRDCKYNNVDGCRVEDLTETARKIKLEKGVGITYERE-
<i>WP_018195440</i>	141	ERCKQVETILQKFLPLFEFNKLGVRK--LQSEEAALDTVARYRLKGLTKASKGSPERVIEQCLQAQGIKFERG----
<i>WP_009413428</i>	141	EEGASIEFLTNTTIELEBKLSISK--LKSEIPELIDSLVRYKKGSGYSGMKGNPEVTVIELLDRGLTYQTGDLTEL
<i>YP_002378322</i>	143	EEGATIEFLVKTITAPENKLSISK--LKSEVESIIDLTRYKVKGSYSGMKGNNAETVIAEVIDSLNLSYETCKLKD
<i>R. BpuN4I</i>	220	--KEVFNIAKMDFTIPNNNDYVILIEVSQYITSSAQTTRKEVEVKTSEEIRRHNIQNGKIDAEVNFIEGGWLGROSDM
<i>WP_018195440</i>	212	--KLEKVRRTDFIIPNNKSEKLVIESSYVITSSSGGDKAKTEQEVREDLQRHYK--DVLFWGFDGIGWVVRKDL
<i>WP_009413428</i>	218	ISNAPNNKRTMDFTIPNNKSEKLVIESSYVITSSSGGDKAKTEQEVREDLQRHYK--DVLFWGFDGIGWVVRKDL
<i>YP_002378322</i>	220	VREHKSNIRTMDFIIPNNKSEKLVIESSYVITSSSGGDKAKTEQEVREDLQRHYK--DVLFWGFDGIGWVVRKDL
<i>R. BpuN4I</i>	300	RKLIVHCSYVININTLMLESIIIVKHVPDKFTTKEKPELID
<i>WP_018195440</i>	287	ERTVSAFDVFTFADEIQRBRQRLCDVFK-----
<i>WP_009413428</i>	294	KRVATMEDVFTFHTDELRRFEKLLIETFKNDK-----
<i>YP_002378322</i>	296	ARVATMEDVFTFHTDELRRFEKLLIETFKNDK-----

Рис. 5. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей *R. BpuN4I* и наиболее гомологичных белков

Для гипотетических белков указаны номера GenBank (WP_018195440 — candidate division EM19 bacterium SCGC AAA471-D06; WP_009413428 — *Capnocytophaga* sp. oral taxon 326; YP_002378322 — *Cyanothece* sp. PCC 7424). Звездочками обозначен предположительный каталитический участок ферментов. В отличие от метилазы, нам не удалось выявить существенной гомологии рестриктазы BpuN4I с другими эндонуклеазами рестрикции с известным сайтом узнавания, что связано с их большой генетической вариабельностью.

Заключение

РМ-систему рестрикции-модификации BpuN4I (сайт узнавания 5'-GGNNCC-3') из штамма *B. pumilus* N4, содержащую уникальный неоизомер рестриктазы NlaIV, клонировали в *E. coli*. Для отбора рекомбинантных продуцентов рестриктазы нами был предложен метод селекции, основанный на делении (разведении) полученной библиотеки клонов с прямым определением активности эндонуклеазы рестрикции в суммарных лизатах клеток. С помощью предложенного метода был выявлен рекомбинантный штамм *E. coli* N41(pBpuN4/MR), являющийся продуцентом фермента BpuN4I. Была установлена структура ДНК плазмидной вставки штамма *E. coli* N41(pBpuN4/MR) и показано, что она содержит гены ДНК-метилтрансферазы M.BpuN4I и эндонуклеазы рестрикции BpuN4I. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности ферментов, кодируемых данными генами, выявил гомологию M.BpuN4I с другими метилазами, узнающими сайт 5'-GGNNCC-3' или сходный с ним. В аминокислотной последовательности M.BpuN4I выявлены все 10 доменов, характерных для 5mC-ДНК-метилтрансфераз.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по государственному контракту, заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы». Государственный контракт № 14.512.11.0051.

Литература

1. Дедков В. С., Дегтярев С.Х. Определение эндонуклеаз рестрикции в колониях микроорганизмов *Streptomyces* и

Nocardia. // Прикл. биохимия и микробиология. — 1992. — Т. 28. — С. 309–313.

2. Дедков В.С., Погребняк В.Б. Определение эдонуклеаз рестрикции в лизатах из отдельных колоний бактерий и измерение активности BamHI, PstI и MspI у бактерий, выращенных на питательном агаре и в бульоне / В кн.: Внехромосомные генетические элементы: значение для науки и практики: 6-е рабочее совещание по программе «Плазмида». Тезисы докладов. — М., 1981. — С. 50–51.
3. Чернухин В.А., Михненко Н.А., Ломаковская Е.Н., Шинкаренко Н.М., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая эндонуклеаза рестрикции BpuN4I узнает и расщепляет последовательность ДНК 5'-G⁺GGNNCC-3' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2013. — Т. 9. — № 2. — С. 5–8.
4. Bougueleret L., Schwarzstein M., Tsugita A., Zabeau M. Characterization of the genes coding for the EcoRV restriction and modification system of *Escherichia coli* // Nucleic Acids Res. — 1984. — Vol. 12. — P. 3659–3677.
5. Klimasauskas S., Nelson J.L., Roberts R.J. The sequence specificity domain of cytosine-C5 methylases // Nucleic Acids Res. — 1991. — Vol. 19. — P. 6183–6190.
6. Morgan R.D., Xu Q. Type II restriction endonuclease, Hpy188I, obtainable from *Helicobacter pylori* J188 and a process for producing the same // United States Patent 6258583. — 2001.
7. Morgan R.D., Xu Q. Type II restriction endonuclease, Hpy99I, obtainable from *Helicobacter pylori* J99 and a process for producing the same // United States Patent 6280992 B. — 2001.
8. New England BioLabs, Inc. 2000–01 Catalog & Technical Reference. USA. — P. 226–229.
9. Roberts R.J., Halford S.E. Type II restriction enzymes / In: Nucleases (Linn S.M., Lloyd R.S., Roberts R.J. Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. — 1993. — P. 35–88.
10. S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions / Editors: Cheng X., Blumenthal R.M. — World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, 1999.
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1987.
12. Smith C.L., Klc S.R. and Cantor C.R. / Davies K. (ed.). Genome Analysis: A Practical Approach. — IRL Press, Oxford. UK, 1987.
13. Szomolanyi, E., A. Kiss, and P. Venetianer. Cloning the modification methylase gene of *Bacillus sphaericus* R in *Escherichia coli* // Gene. — 1980. — Vol. 10. — P. 219–225.
14. Wilson G.G., Murray N.E. Restriction and modification systems // Annu. Rev Genet. — 1991. — Vol. 25. — P. 585–627.

15. Zhu Z., Pedamallu C.S., Fomenkov A., Benner J., Xu S-Y. Cloning of NruI and Sbo13I restriction and modification system in E.coli and amino acid sequences comparison of M.NruI and M.Sbo13I with other amino-methyltransferases. // BMC Research notes. – 2010. – Vol. 3. – P. 139.

Список сокращений:

б.о.е. — бляшку образующая единица (активная частичка бактериофага),
БСА — бычий сывороточный альбумин,
е.а. — единицы активности (фермента).

КОЕ — колонию образующая единица (живая клетка бактерии),
о.е. — оптические единицы плотности,
ПААГ — полиакриламидный гель,
п.н. — пары нуклеотидов ДНК.
РМ системы — системы рестрикции-модификации,
SE-буферы — буферы для сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз производства ООО, «СибЭнзим» (<http://www.sibenzyme.com/>).

CLONING OF BPUN4I RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEM WITH APPLICATION OF THE LIBRARY DIVIDING METHOD

V.S. DEDKOV, D.A. GONCHAR, V.A. CHERNUKHIN, M.A. ABDURASHITOV,
E.N. LOMAKOVSKAYA, N.M. SHINKARENKO, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd, Novosibirsk

The BpuN4I restriction-modification system of *Bacillus pumilus* N4 (recognition site 5'-GGNNCC-3') includes an unique neoshizomer of NlaIV restriction endonuclease. RM-system BpuN4I was cloned in *Escherichia coli*. Selection of the cloned library for a recombinant producer of BpuN4I restriction endonuclease was achieved by a suggested method of subsequent dilution of the obtained clones with the direct determination of the enzyme activity in the pools of recombinant cells. The classical selection methods were used as well: selection of the clones resistant to bacteriophage and selection of the clones resistant to a target restriction endonuclease. Two variants of recombinant BpuN4I producer were obtained and their activity was determined. Nucleotide sequence of DNA insertion of the most productive strain was determined and deposit in GenBank data base. Primary structure of DNA methyltransferase M.BpuN4I and restriction endonuclease BpuN4I was determined. The amino acid sequence of M.BpuN4I has revealed all ten domains specific for 5mC-DNA-methyltransferases.

Keywords: restriction endonuclease, neoschizomer, DNA-methyltransferase, selection of a producer.