

НОВАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА РЕСТРИКЦИИ BpuN4I УЗНАЕТ И РАСЩЕПЛЯЕТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК 5'-G[↓]GNNCC-3'

В.А. ЧЕРНУХИН*, Н.А. МИХНЕНКОВА, Е.Н. ЛОМАКОВСКАЯ, Н.М. ШИНКАРЕНКО,
В.С. ДЕДКОВ, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Из бактериального штамма *Bacillus pumilus* N4 выделена новая эндонуклеаза рестрикции BpuN4I, определена ее субстратная специфичность и место расщепления ДНК. Эндонуклеаза рестрикции BpuN4I узнает последовательность ДНК 5'-G[↓]GNNCC-3' и расщепляет ее как указано стрелкой. Фермент, расщепляющий сайт 5'-GGNNCC-3' с образованием четырех нуклеотидных 5'-липких концов, обнаружен впервые. Рестриктаза BpuN4I является неоизомером фермента NlaIV, имеющего такую же последовательность узнавания, но образующего фрагменты ДНК с тупыми концами.

Ключевые слова: эндонуклеаза рестрикции, неоизомер.

Введение

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) являются сайт-специфическими ДНК-эндонуклеазами бактерий и, как правило, входят в состав систем рестрикции-модификации. К настоящему времени известно более 3900 систем рестрикции-модификации, узнающих около 330 различных последовательностей ДНК (<http://rebase.neb.com>) [5]. Некоторые рестриктазы имеют одинаковый сайт узнавания, однако расщепляют ДНК в различных позициях и называются неоизомерами.

В данной статье описывается новая рестриктаза BpuN4I, являющаяся неоизомером эндонуклеазы рестрикции NlaIV.

Материалы и методы

Выращивание штамма-продуцента. Биомассу *B. pumilus* N4 выращивали в бульоне, содержащем 1% триптон («Organotechnie», Франция), 0,5% дрожжевой экстракт («Organotechnie», Франция), 0,5% NaCl,

0,05% MgCl₂ и 0,001% тиамин, pH 7,0. Для засева использовали культуру, выращенную при 30 °С в течение 18 ч при встряхивании в 6 колбах объемом 500 мл, содержащих по 300 мл бульона. Выращивание проводили в 20 литрах в ферментере («New Brunswick», США) при 30 °С, аэрации 15 л/мин., перемешивании 200 об./мин. в течение 5 ч до плотности A550 = 3,4. Клетки осаждали на центрифуге J2-21 («Beckman», США) в течение 30 минут в роторе JA-10 при 8000 об./мин. и замораживали. Было получено 74 г замороженных клеток.

Выделение и очистка фермента. Выделение фермента проводили при 4 °С путем колоночной хроматографии. 10 г замороженной биомассы суспендировали в 40 мл буфера А (10 мМ Трис-НСl, pH 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол), содержащего 0,05 М NaCl, 0,3 мг/мл лизоцим, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид (PSMF), и инкубировали в течение 3 ч при постоянном перемешивании. Далее клетки разрушали ультразвуком и центрифугировали в течение 30 мин. в роторе JA-20 при 15000 об./мин. Супернатант пропускали через колонку с фосфоцеллюлозой P-11 («Whatman», Англия) объемом 30 мл, предварительно уравновешенную буфером А, содержащим 0,1 М NaCl, затем белок элюировали линейным градиентом NaCl (0,1 — 0,65 М) в буфере А объемом 500 мл, собирая фракции по 10 мл. Активные фракции объединяли и наносили на колонку с гидроксилапатитом объемом 2 мл, предварительно уравновешенную буфером В (0,01 М K₂HPO₄, pH 7,2, 7 мМ β-меркаптоэтанол). Колонку промывали 10 мл

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

* Автор для переписки:

Чернухин Валерий Алексеевич

ООО «СибЭнзим»

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

Тел./факс: +7 (383) 209-27-40

E-mail: valera@sibenzyme.ru

буфера В и проводили элюцию линейным градиентом K_2HPO_4 (0,01 – 0,2 М), в буфере В объемом 150 мл, собирая фракции объемом по 2 мл. Активные фракции объединяли и наносили на колонку с гепарин-сефарозой объемом 4 мл. Элюцию проводили линейным градиентом NaCl (0,1 – 0,7 М) в буфере А, объемом 120 мл, собирая фракции по 3 мл. Активные фракции объединяли и диализовали против 20 объемов концентрирующего буфера (10 мМ Трис-НCl, рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β -меркаптоэтанол, 0,05 М NaCl, 50% глицерин). Препарат хранили при -20°C .

Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе Терцик («ДНК-технология», Россия) в 100 мкл смеси, содержащей 100 нг бактериальной ДНК; однократный буфер («СибЭнзим», Россия) для Taq ДНК полимеразы (60 мМ трис-НCl (рН 8,5); 25 мМ KCl; 1,5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 0,1% Тритон X-100); 50 мкМ (каждый) дезоксинуклеозидтрифосфат; 0,1 мкМ (каждый) праймер и 1 ед. акт. Taq ДНК полимеразы. Профиль термоциклирования состоял из денатурации при 94°C в течение 3 мин. с последующим добавлением фермента во время паузы при 80°C и проведением 30 циклов: 94°C – 15 с, 45°C – 20 с, 72°C – 90 с. Завершающая стадия: 72°C – 120 с. Полученный фрагмент ДНК выделяли электрофорезом в 1%-ной агарозе и очищали при помощи набора QIAEX II («QIAGEN GmbH», Германия).

ПЦР фрагмента гена 16S РНК проводили с помощью следующих праймеров:

16S-direct 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCA-3'

16S-reverse 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили на приборе 310 Genetic Analyzer ABI PRISM™ («Applied Biosystems», США) в соответствии с рекомендациями производителя.

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

Результаты и обсуждение

Идентификация штамма. Штамм-продуцент нового фермента выделен нами из почвенных изолятов, как описано ранее [2, 3] и депонирован в Коллекции культур микроорганизмов НПО «СибЭнзим» под номером 8M06. Клетки – подвижные грамположительные палочки размером $0,7 \times (2-5)$ мкм. Образуют овальные эндоспоры, не раздувающие клетку, расположенные

центрально. Клетки аэробные, каталазоположительные, растут при температуре от 10 до 45°C . На питательном агаре при 30°C за ночь образуют колонии, которые немногие выпуклые, матово-блестящие, полупрозрачные, сероватые, до 4 мм в диаметре, нередко расплываются. При старении колонии белеют и становятся непрозрачными. Образуют кислоту и ацетон из глюкозы, но не газ. Не гидролизуют крахмал, не восстанавливают нитрат в нитрит. Содержание G+C в ДНК штамма, определенное по методу [1], составляет 40%.

Определение первичной структуры гена 16S рРНК. Полимеразную цепную реакцию с праймеров 16S-direct и 16S-reverse на ДНК бактерии с последующим выделением полученного фрагмента ДНК и определением его первичной структуры проводили, как описано в методах. В соответствии с классификатором (<http://rdp.cme.msu.edu>) данная последовательность 16S РНК соответствует бактерии рода *Bacillus*. Идентификация по определителю Берджи [4] также позволяет отнести изучаемый штамм к виду *Bacillus pumilus*. Следовательно, на основе полученных морфологических данных и структуры гена 16S РНК штамм 8M06 был определен нами как *Bacillus pumilus* N4, а продуцируемая им рестриктаза в соответствии с номенклатурой [6] названа BpuN4I.

Определение оптимальных условий действия фермента. Оптимальные условия активности рестриктазы определяли путем расщепления λ ДНК (50 мкг/мл) при 37 , 55 и 70°C в 5 стандартных SE буферных растворах: буфер В – 10 мМ трис-НCl (рН 7,6 при 25°C), 10 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ ДТТ; буфер G – 10 мМ трис-НCl (рН 7,6), 10 мМ $MgCl_2$, 50 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ; буфер O – 50 мМ трис-НCl (рН 7,6), 10 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ; буфер W – 10 мМ трис-НCl (рН 8,5), 10 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ; буфер Y – 33 мМ трис-ацетат (рН 7,9), 10 мМ ацетат магния, 66 мМ ацетат калия и 1 мМ ДТТ. За единицу активности BpuN4I принимали минимальное количество фермента, необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК фага λ в буфере Y за 1 ч при 37°C в 20 мкл инкубационной смеси.

Все дальнейшие реакции с рестриктазой BpuN4I проводили в оптимальных условиях в течение 1 часа.

Определение сайт-специфичности BpuN4I. Сайт, узнаваемый рестриктазой, определяли по картинам расщепления различных ДНК. На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов расщепления ДНК фагов λ и T7 эндонуклеазами рестрикции BpuN4I и PspN4I, причем последняя имеет узнаваемую

последовательность 5'-GGNNCC-3' (www.sibenzyme.com). Поскольку фрагменты ДНК были идентичны, это значит, что PspN4I и BruN4I узнают и расщепляют одну и ту же последовательность ДНК. То есть, эндонуклеаза рестрикции BruN4I узнает и расщепляет разнесенную тетрануклеотидную последовательность 5'-GGNNCC-3'.

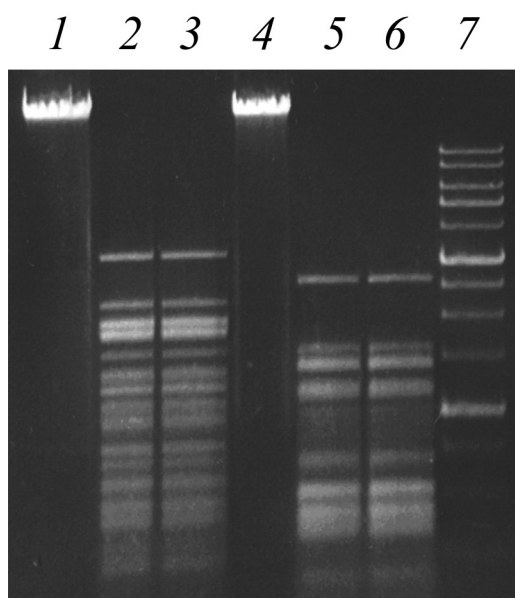


Рис. 1. Гидролиз ДНК фагов лямбда и T7 эндонуклеазами рестрикции PspN4I и BruN4I. Электрофорез в 1% агарозном геле. Дорожки: 1 – ДНК фага λ ; 2 – ДНК фага λ + PspN4I; 3 – ДНК фага λ + BruN4I; 4 – ДНК фага T7; 5 – ДНК фага T7 + PspN4I; 6 – ДНК фага T7 + BruN4I; 7 – маркер молекулярной массы ДНК 1 kb (производство НПО «СибЭнзим»)

Определение позиции гидролиза ДНК рестриктазой BruN4I. Для подтверждения правильности установленной последовательности узнавания BruN4I и определения позиции расщепления ДНК мы проводили гидролиз синтетического олигонуклеотидного дуплекса, образованного из комплементарных олигонуклеотидов KpnI-1 и KpnI-2. Узнаваемая BruN4I последовательность выделена рамочкой.

5'-³²P-GCGCGAAGCTTGGTACCACGTAATTGCGCG-3'
3'-CGCGCTTCGAACCATGGTGCATTAACGCGC-5'

Определение места гидролиза ДНК BruN4I осуществляли путем сравнения длин фрагментов, образуемых при расщеплении эндонуклеазой рестрикции BruN4I с позициями гидролиза эндонуклеазы PspN4I (расщепляющей сайт узнавания 5'-GGNNCC-3' между центральными нуклеотидами N) и Acc65I (расщепляющей сайт узнавания 5'-GGTACC-3' после

первого гуанина). В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой ExoIII из *E. coli*. На рисунке 2 приведен радиоавтограф электрофореграммы продуктов расщепления радиоактивно меченного дуплекса KpnI-1*/KpnI-2 в 20% ПААГ, с 7М мочевиной.

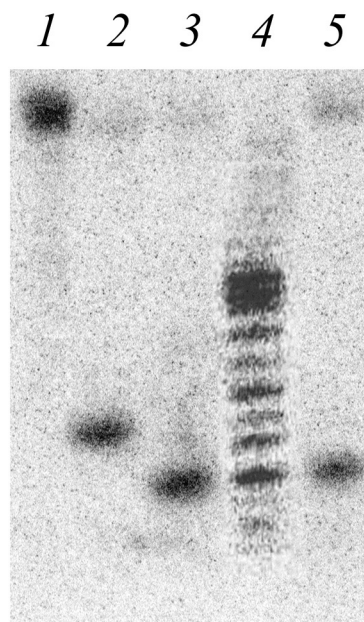


Рис. 2. Определение места расщепления ДНК эндонуклеазой рестрикции BruN4I. Меченые олигонуклеотиды со знаком *. Дорожки: 1 – дуплекс KpnI-1*/KpnI-2; 2 – дуплекс KpnI-1*/KpnI-2 + PspN4I; 3 – дуплекс KpnI-1*/KpnI-2 + BruN4I; 4 – дуплекс KpnI-1*/KpnI-2 + ExoIII; 5 – дуплекс KpnI-1*/KpnI-2 + Acc65I

Как видно из рисунка 2, фрагменты ДНК, образованные гидролизом BruN4I и Acc65I соответствующих дуплексов, имеют одинаковую длину, что свидетельствует об идентичности позиций гидролиза узнаваемой последовательности у этих ферментов на данном дуплексе. В то же время протяженность меченного P^{32} фрагмента, образованного гидролизом PspN4I, на два нуклеотида длиннее. Таким образом, BruN4I узнает последовательность ДНК 5'-GGNNCC-3' и расщепляет ее после первого гуанина на обеих цепях ДНК, образуя 5'-выступающие тетрануклеотидные концы. Данный фермент является неошизомером NlaIV.

Заключение

При гидролизе узнаваемой последовательности рестриктазой BruN4I образуются 5'-выступающие

«липкие» концы, сходные с концами, образованными в результате гидролиза ДНК ферментами с гексануклеотидным сайтом узнавания, расщепляющими некоторые варианты последовательности 5'-GGNNCC-3': Acc65I (сайт узнавания 5'-G[↓]GTACC-3'), HgiCII (сайт узнавания 5'-G[↓]GYRCC-3'), BamHI (5'-G[↓]GATCC-3'), PspOMI (5'-G[↓]GGCCC-3'). Сайты узнавания перечисленных выше рестриктаз входят в состав полилинкерных последовательностей наиболее распространенных векторов для клонирования ДНК.

Учитывая этот факт, а также сходные липкие концы, образующиеся при гидролизе данными ферментами, можно предположить, что описанный новый фермент BpuN4I окажется полезным для генно-инженерных манипуляций.

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».

Литература

1. Дедков В.С. Определение содержания G+C в ДНК бактерий при помощи эндонуклеаз рестрикции // Биотехнология. — 2004. — № 4. — С. 77–82.
2. 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.
3. Дедков В.С., Погребняк В.Б. Определение эндонуклеаз рестрикции в лизатах из отдельных колоний бактерий и измерение активности BamHI, PstI и MspI у бактерий, выращенных на питательном агаре и в бульоне / Внехромосомные генетические элементы: значение для науки и практики: 6-е рабочее совещание по программе «Плазмида». Тезисы докладов. — М., 1981. — С. 50–51.
4. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта и др.: 9-е изд. в 2 томах: Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. — М., 1997.
5. Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. REBASE — a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes // Nucleic Acids Res. — 2010. — Vol. 38. — P. 234–236.
6. Smith H.O., Nathans D. A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes // J. Mol. Biol. — 1973. — Vol. 81. — P. 419–423.

Список сокращений:

ДТТ — дитиотреитол;

Трис — трис (оксиметил) аминометан;

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота;

BSA-Ас — бычий сывороточный альбумин ацетилированный;

N — нуклеотид, содержащий аденин или цитозин или гуанин или тимин.

A NEW SITE-SPECIFIC RESTRICTION ENDONUCLEASE BpuN4I RECOGNIZES AND CLEAVES DNA SEQUENCE 5'-G[↓]GNNCC-3'

V.A. CHERNUKHIN, N.A. MIKHENKOVA, E.N. LOMAKOVSKAYA,
N.M. SHINKARENKO, V.S. DEDKOV, S.Kh. DEGTAREV

SibEnzyme Ltd, Novosibirsk

A new restriction endonuclease BpuN4I from *Bacillus pumilus* N4 has been isolated. The substrate specificity and cleavage position of BpuN4I have been studied. BpuN4I recognizes and cleaves DNA sequence 5'-G[↓]GNNCC-3' as indicated by arrow. BpuN4I is a first restriction enzyme which cleaves a recognition site GGNNCC-3' producing the four base pairs 5'-sticky ends. BpuN4I is a neoschizomer of NlaIV which cleaves the same recognition site producing blunt ends.

Keywords: restriction endonuclease, neoschizomer.