

## N.BstSE - сайт-специфическая нуклеаза из *Bacillus stearothermophilus* SE-589

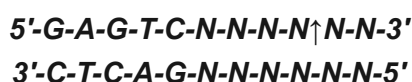
Категория: Новые ферменты

Просмотров: 3731

М.А. Абдурашитов, О.А. Беличенко, А.В. Шевченко, С.Х. Дегтярев

Молекулярная Биология Том 30 1996 Вып. 6

*Из штамма *Bacillus stearothermophilus* SE-589 выделена сайт-специфическая нуклеаза, узнающая и гидролизующая последовательность ДНК в указанном стрелкой положении:*



*Изучение свойств этого фермента, названного N.BstSE, свидетельствует о его вероятном родстве с эндонуклеазами рестрикции типа II.*

На сегодняшний день известно несколько типов ферментов, узнающих в ДНК определенные последовательности нуклеотидов и расщепляющих фосфодиэфирные связи в строго определенных позициях по отношению к сайту узнавания. К ним относятся прежде всего эндонуклеазы рестрикции типа II из прокариотических организмов и интрон-кодируемые эндонуклеазы эукариот и архебактерий [1]. В значительно меньшей степени выражена специфичность у топоизомераз, интеграз и ряда других ферментов, принимающих участие в рекомбинации [2].

Нами обнаружен новый фермент - сайт-специфическая нуклеаза, названная N.BstSE, близкая по свойствам к эндонуклеазам рестрикции типа II, но, в отличие от них, расщепляющая только одну из цепей двухцепочечной ДНК. Выделенная нами нуклеаза является строго специфичным ферментом и может быть использована в генно-инженерных работах.

### УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штамм *B. stearothermophilus* SE-589 из коллекции термофильных микроорганизмов ТОО "СибЭнзим" выращивали на питательной среде Лурия (10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта и 10 г/л NaCl, pH 7.6) при температуре 50°C и интенсивной аэрации среды. При достижении культурой поздней логарифмической стадии роста клетки осаждали путем центрифугирования.

Полученную биомассу суспендировали в буфере А, содержащем 10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 5 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреитол и 200 мМ КСl. Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе "Soniprep 150" ("MSE", Великобритания) в ледяной бане пятью импульсами длительностью по 45 с с интервалами 1 мин. Перед

последним импульсом к суспензии добавляли ингибитор протеаз - диизопропил-фторфосфат ("Merck", Германия) - до 0.001% и тритон Х-100 - до 0.1%. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 18000 об/мин.

Препарат сайт-специфической нуклеазы *N.BstSE* был получен с помощью трех последовательных этапов хроматографической очистки на фосфоцеллюлозе P11, DEAE-целлюлозе DE52 ("Whatman", Великобритания) и гепарин-сефарозе ("Sigma", США). При элюции применяли 0.2-1.0 М линейный градиент концентрации КСl в буфере А. Для выявления активности фермента во фракциях 1 мкл элюата добавляли к 50 мкл инкубационной смеси, содержащей 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреитол, 20 мкг/мл ДНК фага Т7. Реакцию проводили при 50°C. Через 30 мин к смеси добавляли 5 мкл раствора, содержащего 100 мМ EDTA, 40% сахарозы и 0.05% бромфенолового синего.

Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле в ТАЕ-буфере (50 мМ Трис-Ас, рН 8.0, 20 мМ NaAc, 2 мМ EDTA). После окрашивания бромистым этидием гель фотографировали в УФ-свете.

За единицу активности принимали количество фермента, необходимого для выявляемой электрофоретически полной фрагментации 1 мкг ДНК фага Т7 в реакционном объеме 50 мкл за 1 ч.

Для разделения продуктов ферментативного гидролиза радиоактивно меченных олигонуклеотидов применяли электрофорез в 20%-ном полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевины.

В работе использовали препараты ДНК, олигонуклеотиды, эндонуклеазы рестрикции и другие ферменты производства НПО "СибЭнзим".

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе работ по изучению бактериальных систем рестрикции-модификации было установлено, что штамм *B. stearothermophilus* SE-589 продуцирует фермент, специфически фрагментирующий некоторые из часто используемых субстратных ДНК (рис. 1а). Эта эндонуклеаза, получившая название *N.BstSE*, была выделена с помощью трех стадий колоночной хроматографии.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

**Рис. 1.** Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза ДНК эндонуклеазой *N.BstSE*.

а - Вирусные ДНК: фаг Т7 (1), аденовирус типа 2 (2) и фаг лямбда (3); б - плазмидные ДНК: рBR322 (1, 2), рUC19 (3, 4). Контрольные образцы ДНК, не обработанные ферментом (1, 3). Указаны релаксированная (R) и сверхспирализованная (S) формы плазмид. М - маркер длин фрагментов ДНК (ДНК лямбда + HindIII). Видимые полосы соответствуют фрагментам ДНК длиной 23130, 9416, 6557, 4361, 2322 и 2027 п.н

Выход очищенного фермента составил около 1000 ед. акт. на 1 г исходной биомассы. Препарат N.BstSE, проверенный по стандартным тестам [3], не содержал примесей неспецифических нуклеаз и/или фосфатаз.

Был установлен оптимальный состав реакционной смеси для нового фермента. На рис. 2 приведены результаты изучения влияния концентрации KCl и NaCl на степень гидролиза ДНК фага T7 эндонуклеазой N.BstSE. Из рис. 2 следует, что предпочтительным является использование в реакционном буфере ионов калия, а не натрия, наибольшую активность фермент проявляет при концентрации KCl 100-200 мМ. Подобным же образом отдельно провели оптимизацию состава инкубационной смеси по концентрации  $MgCl_2$ , pH и температуре проведения реакции. Также выяснили, что из всех возможных кофакторов, проверенных нами (ATP, S-аденозилметионин,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ), фермент нуждается только в ионах  $Mg^{2+}$ , а замена их на  $Mn^{2+}$  значительно снижает скорость реакции (данные не приведены). Максимальная активность фермента обнаружена в буфере, содержащем 10 мМ Трис-HCl, pH 8.5, 10 мМ  $MgCl_2$ , 150 мМ KCl и 1 мМ дитиотреитол при температуре 55°C.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

**Рис. 2.** Активность N.BstSE при различных концентрациях KCl и NaCl в реакционной смеси, содержащей 20 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 10 мМ  $MgCl_2$ , 1 мМ дитиотреитол, 20 мкг/мл ДНК фага T7

Определение субстратной специфичности фермента проводили стандартным образом, картируя места расщепления ДНК на различных субстратах [4]. Показали, что N.BstSE образует четыре двухцепочечных, разрыва на ДНК фага T7 и два - на ДНК аденовируса типа 2. Совместный гидролиз этих ДНК изучаемым ферментом и рестриктазами позволил определить, что ДНК фага T7 расщепляется приблизительно в положениях 13320, 20610, 24560 и 30520, а ДНК аденовируса типа 2 - в позициях 23910 и 35290. Сравнительный анализ приведенных участков ДНК (табл. 1) показал, что каждая из выявленных последовательностей ДНК содержит подпоследовательности 5'-GAGTC-3' и 5'-GACTC-3', причем первая всегда предшествует второй, а расстояние между ними варьирует в диапазоне от 9 до 17 п.н. Учитывая, что вторая последовательность является комплементарной первой, можно предположить, что N.BstSE узнает последовательность GAGTC (или комплементарную ей GACTC), но расщепляет ДНК только по одной цепи ДНК. На рис. 16 приведены данные по результатам инкубации N.BstSE с ДНК плазмид pBR322 и pUC19, содержащих по четыре предполагаемых сайта узнавания для N.BstSE. Нетрудно видеть, что под действием выделенного фермента сверхспирализованная плазмидная ДНК переходит в релаксированную форму, что свидетельствует о присутствии у препарата N.BstSE именно нуклеазной активности.

| ДНК        | Нуклеотидная последовательность                                                      |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>T7</b>  | 13313 13330 5'-TTTCGCTGGA <b>GAGTC</b> CCATTCTAATAC <b>GA</b> CTC ACTAAAGGAG-3'      |
|            | 20602 20622 5'-GAACTACATT <b>GAGTC</b> TAACAGTTACCGCGT <b>GA</b> CTC TCTTTGAGGC-3'   |
|            | 24547 24566 5'-ATGACCGAAC <b>GAGTC</b> AATCAGACCGCTTT <b>GA</b> CTC TGGTATTACT-3'    |
|            | 30512 30534 5'-GCTGCTAAAC <b>GAGTC</b> CGAGAGAAACGTAAACA <b>GA</b> CTC CTAAGTTCAT-3' |
| <b>Ad2</b> | 23904 23922 5'-ATCTTGTGAC <b>GAGTC</b> TTCTTCGTCCTCG <b>GA</b> CTC GAGACGCCGC-3'     |
|            | 35286 35300 5'-GTCATGTCCG <b>GAGTC</b> ATAATGTAA <b>GA</b> CTC GGTAACACA-3'          |

**Таблица 1.** Последовательности ДНК фага T7 и аденовируса типа 2 (Ad2), в которых при обработке N.BstSE происходит двухцепочечный разрыв

Примечание: Выделены участки гомологии. Цифрами отмечены их положения в общей последовательности данной ДНК.

Таким образом, мы пришли к заключению, что наблюдаемая фрагментация вирусных ДНК в данном случае вызвана близким расположением на каждой из двух цепей ДНК разрывов (ников), образующихся в результате независимых ферментативных реакций. Компьютерный расчет подтверждает это предположение. Поиск в ДНК трех вирусов и двух плазмид участков, на которых могли бы образоваться близко лежащие на разных цепях (на расстоянии не более 30 оснований) пары ников при обработке ферментом с сайтом узнавания GAGTC, не выявил других последовательностей, кроме указанных в табл. 1.

Чтобы определить, какая из цепей ДНК подвергается гидролизу, мы секвенировали по модифицированному методу Максама-Гилберта [5] фрагмент ДНК вируса оспы коров, содержащий сайт узнавания N.BstSE и отдельно расщепили его выделенным нами ферментом (рис. 3). Как видно из рис. 3а, ферментативному гидролизу подвергается только цепь, содержащая последовательность GAGTC, в положении, указанном стрелкой: GAGTCNNNN↑. Комплементарная цепь ДНК в области, прилегающей к участку узнавания (на снимке показан район длиной около 80 оснований), ферментом N.BstSE не расщепляется (рис. 3б). Данные по расщеплению меченных <sup>32</sup>P олигонуклеотидов, структура которых приведена в табл. 2, подтверждают, что расщепляется именно цепь, содержащая сайт GAGTC, и именно в указанном положении. Сравнение степени гидролиза ферментом одно- и двухцепочечных олигонуклеотидов свидетельствует о том, что N.BstSE способен расщеплять и одноцепочечную ДНК (рис. 4).

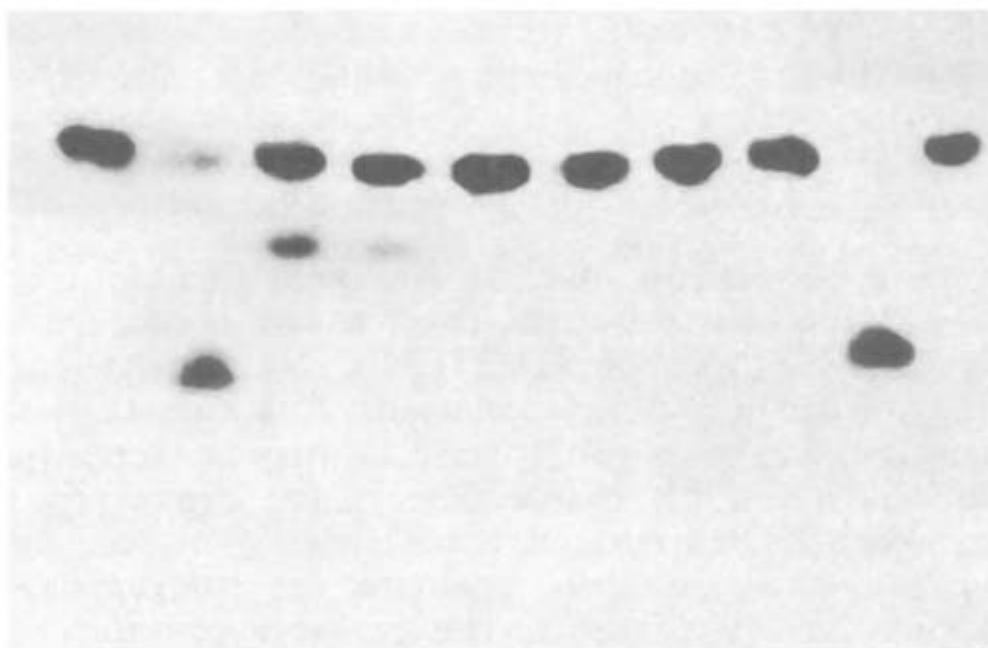
| Олигонуклеотид | Последовательность                    |
|----------------|---------------------------------------|
| <b>A</b>       | 5-CGTGGTCTC <b>GAGTC</b> TTCACCTGG-3  |
| <b>B</b>       | 5-CCAGGTGAA <b>GA</b> CTC GAGACCACG-3 |

**Таблица 2.** Нуклеотидные последовательности комплементарных олигонуклеотидов, использованных в работе

Примечание: выделен участок, узнаваемый N.BstSE

**Рис. 3.** Определение расщепляемой N.BstSE фосфодиэфирной связи путем секвенирования фрагмента ДНК, содержащего сайт узнавания фермента: а - цепь ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность GAGTC; б - комплементарная ей цепь. N - продукты гидролиза того же фрагмента ДНК эндонуклеазой N.BstSE

|                                           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ A}$ | + | + | + | + | + |   |   |   |   |   |
| B                                         | + | + | + |   |   |   |   |   |   |   |
| A                                         |   |   |   |   |   |   |   | + | + | + |
| $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ B}$ |   |   |   |   |   | + | + | + | + | + |
| <i>Hinf</i> I                             |   | + |   |   |   |   |   |   | + |   |
| N- <i>Bst</i> SE                          |   |   | + | + |   |   | + | + |   |   |



**Рис. 4.** Радиоавтограф электрофоретического разделения продуктов гидролиза олигонуклеотидов А, В и их дуплекса никазой N-*Bst*SE и рестриктазой *Hinf*I (сайт узнавания G↑ANTC).

На рис. 5 показаны результаты стандартного для рестриктаз теста "рестрикция-сшивки-рестрикция", примененного для N-*Bst*SE. ДНК фага Т7 расщепляли никазой N-*Bst*SE, продукты гидролиза сшивали ДНК-лигазой фага Т4 и затем повторно расщепляли ферментом N-*Bst*SE. Видно, что препарат фермента является достаточно чистым и может быть использован в генно-

инженерных опытах. Сам факт наличия лигазной сшивки, наряду с данными по подвижности продукта никазой реакции (рис. 3а), свидетельствует о том, что расщепление фосфодиэфирной связи в ДНК ферментом *N.BstSE* происходит с оставлением фосфата на 5'-конце ДНК-продукта.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

**Рис. 5.** Лигазная сшивка фрагментированной никазой *N.BstSE* ДНК фара Т7 и повторный ферментативный гидролиз. ДНК Т7 (1), ДНК Т7, фрагментированная *N.BstSE* (2), продукты реакции с дорожки 2 после обработки ДНК-лигазой Т4 (3), повторный гидролиз ДНК с дорожки 3 никазой *N.BstSE* (4)

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обнаруженный нами фермент *N.BstSE* отличается от описанных ранее в литературе. Хотя топоизомераза I из *E. coli* и ряд других ферментов способны производить расщепление одной цепи двухцепочечной ДНК, они, как правило, имеют и другие ферментативные активности (например, ДНК-лигазную), которых нет у *N.BstSE*, и не обладают настолько отчетливо выраженной сайт-специфичностью [2].

Ферментативные свойства *N.BstSE* наиболее близки к свойствам эндонуклеаз рестрикции типа II. Характерными особенностями этих ферментов являются:

1. способность узнавать короткие (4-8 п.н.), часто палиндромные, последовательности нуклеотидов;
2. расщепление обеих цепей на двухцепочечной ДНК внутри узнаваемого участка или вблизи него;
3. потребность в ионах  $Mg^{2+}$  для гидролиза ДНК.

Новая сайт-специфическая эндонуклеаза из термофильного микроорганизма *B. stearothermophilus* SE-589 обладает приведенными свойствами, за исключением того, что этот фермент гидролизует только одну из цепей ДНК. Более того, его способность расщеплять короткие олигонуклеотиды является аналогичной свойствам эндонуклеаз рестрикции [6]. Сравнение специфичности *N.BstSE* с сайтами узнавания различных рестриктаз показало, что одна из них (*PleI*) имеет последовательность узнавания GAGTC(4/5) [1]. Нетрудно видеть, что сайты узнавания и место расщепления верхней цепи ДНК ферментами *N.BstSE* и *PleI* совпадают, но *PleI*, в отличие от *N.BstSE*, гидролизует и вторую цепь ДНК.

По этим причинам мы предполагаем, что происхождение *N.BstSE* связано с мутацией, произошедшей в гене эндонуклеазы рестрикции, узнающей последовательность GAGTC(4/5), и

приведшей к утрате ферментом способности расщеплять вторую цепь ДНК.

На сегодня известно два типа бактериальных ферментов, взаимодействующих высокоспецифичным образом с непротяженными участками ДНК: ДНК-метилазы и эндонуклеазы рестрикции. Их принято обозначать буквами M и R. Например, *EcoRI*-рестриктаза и метилаза обозначаются *R.EcoRI* и *M.EcoRI* соответственно, хотя в повседневной практике рестриктазу обычно называют просто *EcoRI*. Для обозначения нового типа ферментов - сайт-специфических нуклеаз, - мы предлагаем поступать аналогичным образом и ставить перед обозначением штамма букву N. Таким образом, эндонуклеаза из *B. stearothermophilus* SE-589 получила название *N.BstSE*.

Доступность и простота использования нового фермента позволяют надеяться, что обнаруженная нами нуклеаза *N.BstSE* найдет широкое применение как в генно-инженерных работах, так и в исследовании свойств эндонуклеаз рестрикции и других сайт-специфических ферментов.

Авторы выражают благодарность Т.А. Маденой (СибЭнзим) и Н.А. Петрову (НИИ молекулярной биологии ГНЦ "Вектор") за помощь при проведении экспериментов, В.С. Дедкову (СибЭнзим) за ценные критические замечания о содержании рукописи.

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Roberts R.J., Macelis D. // *Nucleic Acids Res.* 1993. V. 21. P. 3125-3137.
2. Kornberg A., Baker T.A. // *DNA Replication*. 2nd ed. New York. W.H. Freeman and comp., 1991. P. 379-832.
3. Дегтярев С.Х., Речкунова Н.И. // Изв. СОАН СССР. Серия биол. наук. 1988. №14. С. 102-105.
4. Brown N.L., Smith M. // *Methods Enzymol.* 1980. V. 65. P. 391-404.
5. Приходько Г.Г., Петров Н.А., Чижиков В.Е., Дегтярев С.Х. // *Биотехнология*. 1988. Т. 4. С. 618-620.
6. New England Biolabs 1995 Catalog. P. 208-209.