

АссBSI - новая эндонуклеаза рестрикции из *Acinetobacter calcoaceticus* BS

Категория: Новые ферменты

Просмотров: 4654

М. А. Абдурашитов, Е. В. Килева, Т. В. Мякишева, В. С. Дедков, А. В. Шевченко, С. Х. Дегтярев
Прикладная Биохимия и Микробиология, 1997, том 33, № 5, с 556-558

Установлен сайт узнавания новой эндонуклеазы рестрикции АссBSI из бактериального штамма Acinetobacter calcoaceticus BS, представляющий собой непалиндромную последовательность нуклеотидов

5-GAGCGG-3'

3'-CTCGCC-5'

Разрыв обеих цепей ДНК рестриктаза АссBSI производит в середине узнаваемой последовательности, поэтому лигазная сшивка образующихся фрагментов приводит как к восстановлению сайтов узнавания АссBSI, так и к образованию палиндромных последовательностей, служащих сайтами узнавания рестриктаз SacI и SacII.

Несмотря на большое число открываемых ежегодно штаммов-продуцентов эндонуклеаз рестрикции второго класса [1], только немногие из них используются для производства препаратов этих ферментов. Обычно это связано с недостаточной продуктивностью и(или) доступностью ранее найденных изошизомеров, не отличающихся по своим свойствам от вновь открытых.

Нами выделена новая эндонуклеаза рестрикции АссBSI, которая благодаря необычности сайта узнавания и высокому содержанию в клетках штамма-продуцента представляет интерес как для научного изучения, так и для практического применения.

В данной работе показано решение поставленной задачи по определению специфичности новой рестриктазы и установлению гидролизуемых ею межнуклеотидных связей.

МЕТОДИКА

Бактериальный штамм "BS", идентифицированный нами по [2] как *Acinetobacter calcoaceticus*, был выделен из пробы воды пресноводного источника. Название новому ферменту дано по общепринятой номенклатуре [3].

Культивирование штамма проводилось на качалке при 120 об/мин и 30°C в питательной среде, содержащей (на 1 л) 7 г пептона, 3 г дрожжевого экстракта, 1 г ацетата калия и 1 г NaCl. Клетки, осажденные центрифугированием после 16 ч культивирования, разрушались УЗ. Выделение фермента проводили с использованием хроматографических стадий очистки на фосфоцеллюлозе Р-11, ДЭАЭ-целлюлозе и гепарин-сефарозе в приведенной последовательности. Отсутствие в полученном препарате примесей неспецифических нуклеаз и фосфатаз проверяли на радиоактивно меченном олигонуклеотидном субстрате по методу, описанному в работе [4].

Гидролиз ДНК эндонуклеазой рестрикции AccBSI проводили при 37°C в буфере, содержащем 30 мМ трис-ацетат, 10 мМ ацетат магния, 70 мМ ацетат калия и 1 мМ ДТТ, являющемся оптимальным для данного фермента. Образующиеся фрагменты ДНК разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле в трис-боратном буфере, содержащем бромистый этидий, и фотогафировали гель в УФ-свете.

Определение мест гидролиза проводили по модифицированному методу Максама-Гилберта [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения узнаваемой ферментом нуклеотидной последовательности вирусную и плазмидную ДНК нескольких типов полностью расщепляли рестриктазой AccBSI. Проводили сравнение полученной электрофореграммы (рис. 1) с рассчитанными с помощью компьютера картинками расщепления употребленных ДНК для более чем 200 известных на сегодня рестриктаз с различными сайтами узнавания [1]. Выяснилось, что идентичные картины гидролиза пяти различных ДНК образует эндонуклеаза рестрикции BsrBI, узнающая непалиндромную последовательность нуклеотидов:

5'-GAGCGG-3'

3'-CTCGCC-5'

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 1. . Расщепление эндонуклеазой рестрикции AccBSI различных ДНК.

1 - лямбда; 2 - T7; 3 - аденовирус 2; 4 - pBR322; 5 - pUC19, М - маркер длин фрагментов ДНК (ДНК лямбда + Bme18I).

Для определения мест разрезания ДНК новым ферментом рестрикции проводили

секвенирование α - ^{32}P -меченых EcoRI-PvuII (100 п. н.) и CfrI-PstI (206 п. н.) фрагментов плазмиды pUC19. Полученные данные (рис. 2) свидетельствуют о том, что разрезание ДНК эндонуклеазой рестрикции AccBSI производит в середине узнаваемой последовательности нуклеотидов на обеих цепях двунитевой ДНК, как указано стрелками:



Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 2. . Определение мест разрезания ДНК эндонуклеазой рестрикции AccBSI.

Секвенирование α - ^{32}P -меченых EcoRI-PvuII (а) и CfrI-PstI (б) фрагментов плазмиды pUC19 по модифицированному методу Максама-Гилберта.

Е - продукты ферментативного гидролиза фрагментов ДНК рестриктазой AccBSI.

Таким образом, эндонуклеаза рестрикции AccBSI является истинным изошизомером рестриктазы BsrBI, выделяемой из *Bacillus stearothermophilus* [6]. Дальнейшее изучение свойств нового фермента показало, что он в отличие от прототипа термолабилен и полностью инактивируется при 65°C в течение 20 мин.

Следует отметить, что образование "тупых" концов при гидролизе ДНК является необычным свойством для рестриктаз, узнающих непалиндромные последовательности нуклеотидов. Кроме BsrBI и AccBSI только одна из таких эндонуклеаз рестрикции - MlyI, недоступная коммерчески, разрезает ДНК подобным образом, но при этом ее место гидролиза лежит за пределами узнаваемой последовательности. Нетипичным является также симметричное разрезание ферментом связей внутри непалиндромного сайта узнавания. Известно всего несколько подобных рестриктаз (BsiI, Bpu10I [7] и AciI [8]).

При лигазной сшивке фрагментов, образованных в результате обработки ДНК рестриктазой AccBSI, наряду с восстановлением сайта узнавания этого фермента возникают палиндромные последовательности из 6 пар нуклеотидов, служащие участками узнавания для рестриктаз SacI (GAGCT↓C) и SacII (CCGC↓GG). Это происходит благодаря тому, что последовательность нуклеотидов, узнаваемая новым ферментом, как бы составлена из половин сайтов узнавания указанных рестриктаз, разделенных гидролизуемой связью.

Учитывая то, что известно несколько случаев, когда изошизомеры этих рестриктаз продуцируются одним и тем же штаммом (SacI и SacII, SstI и SstII, Uba1094I и Uba1094II), представляется возможным происхождение рестриктазы AccBSI путем слияния генов двух различных сайт-специфических эндонуклеаз и объединения доменов, отвечающих за специфическое связывание с нуклеотидной последовательностью в одном белке.

Образование сайтов узнавания других рестриктаз при сшивке продуктов гидролиза

эндонуклеазой рестрикции AccBSI, очевидно, можно использовать при проведении генно-инженерных экспериментов.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 3. Лигазная сшивка фрагментов ДНК pBR322, полученных при обработке рестриктазой AccBSI, и расщепление продуктов лигирования рестриктазами AccBSI, Psp124BI (изошизомер SacI) и Sfr303I (изошизомер SacII).

1 - pBR322, расщепленная AccBSI;

2 - лигазная сшивка продуктов реакции с дорожки 1;

3- повторная обработка рестриктазой AccBSI продуктов лигазной сшивки;

4 - совместный гидролиз продуктов лигазной сшивки рестриктазами Psp124BI, Sfr303I и AccBSI;

5-совместный гидролиз продуктов лигазной сшивки рестриктазами Psp124BI и Sfr303I;

Следует также отметить, что стандартный метод проверки отсутствия примесей экзонуклеаз в препаратах сайт-специфических эндонуклеаз "рестрикция-сшивка-повторная рестрикция" [6] (рис. 3) в связи с исчезновением около 50% сайтов узнавания после лигазной сшивки для данной рестриктазы неприменим. Вместо него мы предлагаем использовать метод тестирования на олигонуклеотидном субстрате [4], обладающий необходимой чувствительностью.

Штамм-продуцент *A. calcoaceticus* BS высокотехнологичен. В биомассе клеток активность фермента составляет около 300000 ед/г, что на 2-3 порядка превышает обычный для рестриктаз подкласса II-S уровень. Чистота и высокая активность получаемых препаратов позволяют с успехом использовать новую эндонуклеазу рестрикции AccBSI в молекулярно-биологических экспериментах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roberts RJ., Macelis D. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. №13. P. 3125-3137.
2. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. V. 1. P. 303-307.
3. Smith H.C., Nathans D. // J. Mol. Biol. 1973. V. 81. № 3. P. 419-423.
4. Дегтярев С.Х., Речкунова Н.И. // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1988. Т. 14. Вып. 2. С. 102-105 ([Онлайн-версия](#)).
5. Приходько Г.Г., Петров Н.А., Чижиков В.Е., Дегтярев С.Х. // Биотехнология. 1988. Т. 4. № 5. С. 618-620. ([Онлайн-версия](#))
6. New England Biolabs Catalog. Beverly, 1995. P. 25, 206.
7. Degtyarev S.Kh., Rechkunova N.I., Kolyhalov A.A. et al. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 19. P. 5807-5810.
8. Polisson C, Morgan R. D. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. №19. P. 5911.

