

Новая сайт-специфическая ДНК-никаза N.Bst9I из *Bacillus stearothermophilus* 9

Категория: Новые ферменты

Просмотров: 4822

В.С. Дедков, М.А. Абдурашитов, Н.К. Янковский, Е.В. Килева, Т.В. Мякишева, Д.В. Попиченко, С.Х. Дегтярев

Биотехнология, 2001, № 4, С. 3-8

*В ходе скрининга бактериальных штаммов, выделенных из природных изолятов, нами обнаружен штамм *Bacillus stearothermophilus* 9, продуцирующий новую сайт-специфическую ДНК-никазу, названную N.Bst9I. N.Bst9I узнает и расщепляет в ДНК последовательность 5'-GAGTCNNNN[^]-3', являясь таким образом изошизомером ранее обнаруженного нами фермента N.BstSEI. Однако ферментативные свойства этих двух ферментов существенно различаются, причем использование N.Bst9I в генно-инженерных и биотехнологических работах предпочтительнее, так как он практически не проявляет дополнительную активность, характерную для N.BstSEI.*

Сайт-специфичные никазы (ССН, N.) представляют собой новый класс ферментов, расщепляющих ДНК. В отличие от родственных им эндонуклеаз рестрикции, вносящих разрывы в обе цепи молекулы ДНК, эти ферменты гидролизуют лишь одну из цепей двунитевой ДНК. Известно лишь несколько представителей этого класса в отличие от обширной группой описанных эндонуклеаз рестрикции, включающей более 3300 ферментов [1]. Данная работа посвящена обнаружению новой сайт-специфической никазы N.Bst9I, являющейся изошизомером N.BstSEI [2], и сравнению свойств двух ферментов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Скрининг штаммов бактерий проводили по модифицированному методу [3]. 20-30 мг биомассы клеток, выращенных на агаризованной L-среде, суспендировали в 200 мкл лизирующей смеси, содержащей 20 мМ трис-HCl, pH 8.0, 0.1 мкг/мл лизоцима и 0.01% тритона X-100. После 15 мин инкубации при комнатной температуре 2 мкл полученного лизата добавляли к 20 мкл рестрикционного буфера с ДНК (10 мМ трис-HCl, pH 7.6, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂ и 50 мкг/мл ДНК фага λ). Реакцию проводили в течение 1 ч при 55°C (для лизатов клеток термофильных штаммов) или при 37°C (для лизатов клеток мезофильных штаммов). Осаждали ДНК двумя

объемами этанола, высушивали осадок в течение 10 мин и растворяли в 10 мкл буфера S1 (30 mM ацетат натрия, pH 4.5, 50 mM NaCl, 0.1 mM ZnCl₂). Добавляли 0.1 ед. активности S1-нуклеазы и выдерживали смесь в течение 15 мин при 37°C. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 1%-ной агарозе в трис-боратном буфере.

Характеристика штамма-продуцента

Штамм выделен из пробы воды и грунта Медвежьего термального источника в районе Мутновского вулкана Камчатки. Клетки штамма - подвижные, палочки (0,6х3-6 мкм), образуют эллипсоидные споры (1,5х2,5 мкм), которые располагаются терминально и раздувают спорангии. Клетки грамположительные, хотя окраску удерживают слабо. Штамм аэробный, каталазоположительный, растет при температуре от +40 до +65°C. Вид идентифицировали по определителю [4] как штамм бактерии *Bacillus stearothermophilus* 9.

Культивирование штамма проводили при 55°C на среде с pH 7.7. Питательный бульон содержал 1%-ный триптон (Organotechnie, Франция), 0.5%-ный дрожжевой экстракт (Organotechnie, Франция), 0.1%-ный MgCl₂ и 0.001%-ный тиамин. 1 л ночной культуры помещали в ферментер (New Brunswick, США) в 20 л бульона и выращивали 4 ч при аэрации воздухом (15 л/мин) и перемешивании (300 об/мин) до 3 единиц оптической плотности при 550 нм. 86 г клеток осаждали центрифугированием и хранили при -20°C.

Выделение N.Bst9I

Выделение проводили при 4°C. Все растворы содержали 10 mM К-фосфатный буфер, pH 7.3, 7 mM меркаптоэтанол и 0.1 mM ЭДТА. 8 г клеток разрушали ультразвуком в 50 мл 0.1 M NaCl и осветляли центрифугированием при 20000 g 1 ч. Экстракт наносили на колонку (1.5х10 см) гепарин-сефарозы (Sigma, США), промывали 0.1 M NaCl и смывали фермент в градиенте концентрации NaCl (0.1-0.8 M) объемом 200 мл. Из 25 фракций собирали № 13-15 и наносили на колонку (2х3 см) гидроксилапатита, промывали 10 мл и элюировали фермент в градиенте К-фосфатного буфера от 0.01 до 0.4 M объемом 100 мл. Из 50 фракций собирали № 42-46, наносили на колонку (0.9х6 см) фосфоцеллюлозы P-11 (Whatman, Англия), промывали 0.2 M NaCl и смывали фермент в градиенте NaCl от 0.2 до 1 M объемом 60 мл. Собирали фракции № 35-40, диализовали против 50%-ного глицерина +0.2 M NaCl и хранили при -20°C.

Определение чистоты препарата

Определение чистоты проводили с помощью трех следующих тестов, применяющихся для определения качества препаратов эндонуклеаз рестрикции.

1. *Инкубация с ДНК в течение ночи.* 1 и 2 мкл препарата фермента добавляли к 1 мкг ДНК фага T7 в 50 мкл буфера Y (см. ниже) и инкубировали в течение ночи при 55°C. После

проведения электрофоретического разделения продуктов гидролиза не наблюдалось существенного расплывания или ослабления полос, соответствующих N.Bst9I-фрагментам ДНК, что свидетельствует об отсутствии в препарате значительного уровня неспецифических эндонуклеаз.

2. *Тест "рестрикция-сшивки-рестрикция"*. ДНК фага Т7 расщепляли пятикратным избытком ССН N.Bst9I и проводили сшивку образовавшихся фрагментов ДНК-лигазой фага Т4, что приводило к восстановлению молекул субстрата. Восстановленную ДНК вновь подвергали гидролизу препаратом N.Bst9I. Прохождение реакций лигазной сшивки и повторного расщепления ДНК свидетельствует об интактности концов фрагментов, образующихся при обработке препаратом фермента.
3. *Тест на олигонуклеотидных субстратах*. В качестве субстратов использовали 5'- γ -³²P-меченный олигонуклеотид и его дуплекс, содержащий немеченую комплементарную цепь. Субстраты обрабатывали 1 мкл препарата фермента N.Bst9I в течение 4 ч в оптимальных условиях, проводили электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях и получали радиоавтограф геля. Отсутствие дополнительных полос и снижения интенсивности пятен по сравнению с контролем (те же субстраты, не подвергшиеся обработке) свидетельствует об отсутствии в полученном препарате значительного уровня примесей фосфатаз, экзонуклеаз и неспецифической эндонуклеазной активности.

Определение места расщепления ДНК нуклеазой N.Bst9I

Место расщепления было определено на синтетическом олигонуклеотидном дуплексе, содержащем узнаваемую последовательность ферментов N.Bst9I и N.BstSEI (выделена жирным шрифтом):

5'-GGTCTC**GAGTCT**GATATCACATG AAGCTTAGAG-3'
3'-CCAGAG**CTCAG**ACTATAGTGTAC TTCGAATCTC-5'

Каждую цепь метили по 5'-концу при помощи Т4 полинуклеотидкиназы и γ -³²P-АТФ (4 Ки/ммоль, АОЗТ "Биосан", г. Новосибирск) и гибридизовали с немеченой комплементарной цепью. Полученные таким образом меченые модификации дуплекса расщепляли эндонуклеазами, разделяли фрагменты электрофорезом в 20%-ном ПААГ с 6 М мочевиной.

Тепловая инактивация нуклеаз

20 ед. активности фермента добавляли к 20 мкл оптимального буфера с 0.5 мкг бычьей тимусной ДНК. Смесь инкубировали в течение 20 мин при 65°C или 80°C, после чего в нее добавляли 0.5 мкг ДНК фага Т7 и инкубировали в течение 1 ч при оптимальной температуре.

Определение оптимальных условий активности

Определение проводили с использованием набора из 6 рестрикционных буферов производства ООО "СибЭнзим" следующего состава: буфер В - 10 мМ трис-НСl, рН 7.6, 10 мМ MgCl₂ и 1 мМ дитиотреитол (ДТТ); буфер G - 10 мМ трис-НСl, рН 7.6, 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ; буфер О - 50 мМ трис-НСl, рН 7.6, 10 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ; буфер W - 10 мМ трис-НСl, рН 8.5, 10 мМ MgCl₂, 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; буфер N - 10 мМ трис-НСl, рН 8.5, 10 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl, 1 мМ ДТТ, 0.1 мг/мл БСА. К 50 мкл буфера добавляли 1 мкг ДНК фага Т7 и определенное количество препарата фермента, перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при 55°С или 65°С. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 1%-ной агарозе в трис-боратном буфере.

За единицу активности N.Bst9I принимали полное специфическое расщепление 1 мкг ДНК фага Т7 за 1 ч в оптимальных условиях.

Препараты ферментов и ДНК, использованные в работе, произведены в ООО "СибЭнзим" (г. Новосибирск).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Скрининг бактериальных штаммов из коллекции ООО "СибЭнзим" проводили с использованием ДНК фага λ и нуклеазы S1, способной гидролизовать ДНК в местах расположения одно цепочных разрывов (см. раздел "Условия эксперимента"). В ходе скрининга был найден штамм, продуцирующий сайт-специфичную нуклеазу. Микробиологические свойства выявленного штамма 9 являются типичными для представителей вида *B. Stearothermophilus* [4]. В соответствии с номенклатурой новая нуклеаза получила название N.Bst9I.

Очистку фермента N.Bst9I проводили из 8 г биомассы путем разрушения клеток ультразвуком и последующей очистки фермента с помощью колоночной хроматографии. После проведения трех стадий хроматографической очистки на гепарин-сефарозе, гидроксилапатите и фосфоцеллюлозе был получен препарат новой нуклеазы N.Bst9I. Выход получаемого фермента N.Bst9I составляет 32000 ед. активности на 1 г биомассы клеток. В последующих тестах была показана пригодность данного препарата для использования в молекулярно-биологических экспериментах. Установлено, что выделенный фермент гидролизует ДНК фага Т7 и аденовируса-2 так же, как ранее описанная нуклеаза N.BstSEI с сайтом узнавания 5'-GAGTC-3' и, таким образом, является ее изоизомером.

Для определения места гидролиза ДНК нуклеазой N.Bst9I синтетический олигонуклеотид, структура которого приведена в разделе "Условия эксперимента", расщепляли этим ферментом и нуклеазой N.BstSEI. Длина фрагментов, образующихся при обработке олигонуклеотида обоими ферментами, совпадает (рис. 1) и это показывает, что N.Bst9I расщепляет ДНК в той же позиции, что и N.BstSEI:

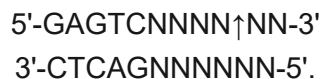


Рис. 1. Определение позиции расщепления ДНК ферментом N.Bst9I на олигонуклеотидном дуплексе: Дуплекс содержит меченую верхнюю (1-3) или нижнюю (4) цепь. 1 - после обработки N.BstSEI; 2 - после обработки экзонуклеазой III E. coli (маркер длин фрагментов); 3-4 - после обработки N.Bst9I

Несмотря на тождественность сайтов узнавания и участка гидролиза ДНК, сайт-специфические признаки N.Bst9I и N.BstSEI отличаются по биохимическим свойствам. N.Bst9I является более термостабильным ферментом, поскольку не инактивируется в результате инкубации при 65°C за 20 мин, в то время как N.BstSEI полностью теряет свою активность при такой обработке. Оба фермента могут быть инактивированы прогревом при более высокой температуре - 80°C за такой же промежуток времени (рис. 2).

Рис. 2. Тепловая инаktivация нуклеаз: 1-2 - N.BstSEI; 3-4 - N.Bst9I. Препарат фермента предварительно прогрев при 65°C (1 и 3) или при 80°C (2 и 4).

Максимальный уровень активности N.Bst9I наблюдается в буферах Y и N. Оптимальным же буфером для N.BstSEI является буфер N, а использование буфера Y приводит к значительному снижению активности (рис. 3).

Рис. 3. Сравнение активности N.BstSEI и N.Bst9I в различных буферах, содержащих ДНК фага T7: верхний ряд - ДНК, обработанная N.BstSEI; нижний ряд - ДНК, обработанная N.Bst9I. К - необработанная ДНК, остальные буквы - названия буферов. Для каждого буфера использовали три реакционные смеси, содержащие 1, 2 или 4 ед. активности фермента (слева направо)

Наиболее важным различием в свойствах ферментов является наличие дополнительной гидролизующей активности у N.BstSEI по сравнению с N.Bst9I. Как видно из рис. 4, добавление в реакционную смесь небольшого избытка N.BstSEI приводит к дополнительной фрагментации субстратной ДНК. Ранее мы предположили, что эволюционно N.BstSEI произошла от эндонуклеазы рестрикции, узнающей ту же нуклеотидную последовательность 5'-GAGTC-3' [2]. В самом деле, на сегодня выявлено несколько эндонуклеаз рестрикции, узнающих и гидролизующих ДНК по сайту 5'-GAGTC(4/5)-3' [1]. Нетрудно видеть, что сайт узнавания и место

гидролиза ДНК по верхней цепи у таких рестриктаз совпадает с таковыми для нуклеаз N.BstSEI и N.Bst9I.

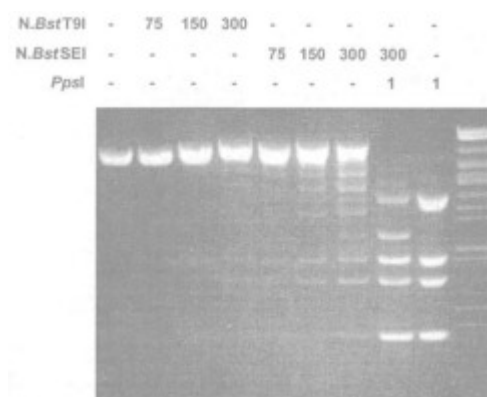


Рис. 4 Фрагментация ДНК pBR322, линейаризованной Ama87I, при обработке избыточными количествами ферментов и эндонуклеазой рестрикции PpsI. Указано количество ед. активности ферментов в реакции. Последняя дорожка - маркер длины фрагментов ДНК λ/Bme18I

Таким образом, мутации в генах таких рестриктаз, существенно уменьшающие скорость гидролиза ДНК по второй цепи, могут привести к появлению сайт-специфических нуклеаз. Сравнение электрофоретических картин гидролиза ДНК избытком N.BstSEI и PpsI, а также данные по совместному расщеплению субстрата двумя ферментами указывают на то, что, по-видимому, N.BstSEI проявляет слабую рестриктазную активность, расщепляя ДНК и по нижней цепи узнаваемой последовательности (см. рис. 4). Этот вывод вполне согласуется с вышеприведенным предположением о происхождении нуклеазы N.BstSEI. В отличие от N.BstSEI новая сайт-специфичная нуклеаза N.Bst9I не проявляет существенного уровня остаточной активности по расщеплению второй цепи (см. рис. 4), что делает ее более предпочтительным ферментом для применения в генно-инженерных и биотехнологических работах. Другим важным преимуществом N.Bst9I является повышенное содержание этого фермента в клетках штамма *B. Stearothermophilus* 9 по сравнению с содержанием N.BstSEI в клетках штамма *B. Stearothermophilus* SE-589. Выход получаемого фермента N.Bst9I более чем в 16 раз превышает выход фермента N.BstSEI.

Работа получила финансовую поддержку подпрограммы "Геном человека" ФЦНТП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники гражданского назначения".

ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts, R.J., Macelis, D. II Nucleic Acids Res. -- 2000. - V. 28. - P. 306-307.
2. Абдурашитов М.А., Беличенко О.А., Шевченко А.В., Дегтярев С.Х. II Молек. биол. - 1996. - Т. 30. - № 6. - С. 1261-1267.
3. Белавин П.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. II Прикл. биохим. микробиол. - 1988. - Т. 24. - № 1. - С. 121-124. ([интернет-версия](#))
4. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. - Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. - V. 2. - P. 1105-1139.