

Эндонуклеаза рестрикции ZraI из *Zoogloea ramigera* 11 узнает 5'-GAC[^]GTC-3'

Категория: Новые ферменты

Просмотров: 3827

В. С. Дедков, С. А. Синичкина, Д. В. Попиченко, С. Х. Дегтярёв

Биотехнология, 2001, № 6, с 3-7

Из природных изолятов нами выделен продуцент эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы), идентифицированный как вид бактерии Zoogloea ramigera 11, а его рестриктаза была названа ZraI. Описан способ очистки фермента и определения его активности. Показано, что фермент ZraI расщепляет ДНК с образованием тупых концов и может найти широкое применение в генетической инженерии.

Эндонуклеаза рестрикции типа II (рестриктаза) AatII из штамма бактерии *Acetobacter aceti* узнает и расщепляет последовательность 5'-GACGT↓C-3' в составе двухцепочечной ДНК [1, 2]. Этот фермент уже более 10 лет широко применяется в различных биотехнологических работах, так как его сайт узнавания присутствует во многих бактериальных и эукариотических векторах и повсеместно используется для клонирования фрагментов ДНК.

Целью данной работы было получение и изучение некоторых свойств рестриктазы ZraI из бактерии *Zoogloea ramigera* 11, которая является ложным изошизомером AatII.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штамм-продуцент эндонуклеазы рестрикции выявлен нами в результате поиска рестриктаз в природных изолятах по ранее описанной методике [3,4]. Морфологические и физиолого-биохимические свойства штамма изучали с использованием методик [5]. Определение штамма до вида проводили по определителю [6].

Z. ramigera 11 выращивали до насыщения в ферментере 1601-013 (LKB, Швеция) при 30° в 10л среды, содержащей 1% триптона (Organotechnie, Франция), 0,5% дрожжевого экстракта (той же фирмы), 0,05% MgCl₂ и 0,001%) тиамин, при pH 7,5 с аэрацией 5 л/мин и перемешиванием 200 об/мин. Клетки осаждали центрифугированием и замораживали. Получили 56 г биомассы с активностью рестриктазы ZraI 20000 ед/г.

За единицу активности ZraI принимали полное специфическое расщепление ферментом 1-го мкг

ДНК фага λ за 1 ч при 37° в 20 мкл буфера В: 10 mM трис-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 1 mM дитиотреитол (ДТТ). Фрагментацию ДНК выявляли горизонтальным электрофорезом в 1%-ной агарозе в трис-ацетатном буфере с этидийбромидом (0,5 мг/л) при напряжении 5 В/см за 1,5 ч по методике [7].

Выделение рестриктазы ZraI проводили при 4° в 10 mM трис-HCl (pH 7,5), в присутствии 7 mM меркаптоэтанола, 1 mM ЭДТА. 10 г клеток обрабатывали 0,05%-ным лизоцимом 1 ч в 30 мл 0,2 M NaCl, затем разрушали ультразвуком и осветляли центрифугированием 45 мин при 15000 об/мин. Экстракт пропускали через колонку с фосфоцеллюлозой P11 (Whatman, Англия) объемом 20 мл. Колонку промывали 0,1 M NaCl, затем градиентом NaCl от 0,1 до 0,8 M объемом 200 мл, элюат собирали в 50 пробирок. Фракции 7—21, содержащие фермент, объединяли, диализовали и наносили на колонку с 4 мл гепарин-сефарозы (Sigma, США). Фермент смывали в градиенте NaCl от 0 до 0,6 M объемом 120 мл в 40 пробирок. Фракции 15—23 диализовали и наносили на колонку с 4 мл целлюлозы DE-52 (Whatman, Англия). Фермент смывали в градиенте NaCl от 0 до 0,6 M объемом 60 мл в 30 пробирок. Фракции 6 — 15 диализовали против 0,1 M NaCl и наносили на колонку с 5 мл фосфоцеллюлозы P11. Фермент смывали в градиенте NaCl от 0,1 до 0,5 M объемом 80 мл в 30 пробирок. Фракции 20 — 23 объединили и диализовали против буфера с 50%-ным глицерином и хранили при -20°.

Оптимальные условия проявления активности рестриктазы определяли путем расщепления ДНК фага λ , (50 мкг/мл в 50 мкл) при 37° и 55° в 5 стандартных буферных растворах: буфер В — 10 mM трис-HCl (pH 7,6 при 25°), 10 mM MgCl₂ и 1 mM ДТТ; буфер G — 10 mM трис-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl и 1 mM ДТТ; буфер O — 50 mM трис-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl и 1 mM ДТТ; буфер W — 10 mM трис-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl и 1 mM ДТТ; буфер Y — 33 mM трис-ацетат, pH 7,9, 10 mM ацетат магния, 66 mM ацетат калия и 1 mM ДТТ. Инкубацию проб проводили 1 ч и анализировали с помощью электрофореза.

Для определения места расщепления ДНК рестриктазой ZraI использовали дуплекс, для которого были синтезированы олигодезоксирибонуклеотиды по методике [8]. По методикам [7] каждую цепь метили по 5'-концу при помощи T4 полинуклеотидкиназы и γ -³²P-АТФ (4 Ки/ммоль, АОЗТ "Биосан", г. Новосибирск) и гибридизовали с немеченой комплиментарной цепью. Полученные таким образом меченые модификации дуплекса расщепляли рестриктазами, разделяли фрагменты с помощью электрофореза в 20%-ном ПААГ с 6 M мочевиной и радиоавтографировали. Для выявления фрагментов нуклеотидов после электрофоретического разделения дуплекс кроме того гидролизовали экзонуклеазой III из *E. coli*.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериальный штамм-продуцент фермента ZraI имеет следующие характеристики. Клетки — подвижные палочки размером (0,6—0,8)х(1,5—2) мкм, грамотрицательные, спор не образуют. Штамм — аэробный, каталазоотрицательный, оксидазоположительный, не восстанавливает нитрат в нитрит. На питательном агаре рост колоний стимулировали (без образования кислоты) 2%-ная глюкоза, мальтоза, сахароза, сорбит и маннит, но не глицерин, ацетат, этанол, дульцит, лактоза, арабиноза и рамноза. Рост отсутствовал на минимальном агаре с добавками углеводов.

Культура росла при температуре от 5 до 30° при концентрации NaCl от 0 до 0,5% и pH 7—7,7. В питательном бульоне Лурия без встряхивания культура образовывала гомогенную муть и поверхностную пленку. Колонии на агаре с разбавленной в 4 раза средой вырастали за 3 дня при 25° и были круглые, 1—2 мм в диаметре, выпуклые, гладкие, блестящие, прозрачные. При старении колоний их центры темнели. Штамм идентифицировали по определителю [6] как вид бактерии *Z. ramigera* 11, его рестриктазу называли ZraI по номенклатуре [9].

Биомассу *Z. ramigera* 11 выращивали при аэрации в модифицированном бульоне Лурия. Из 1 л получали 5,6 г клеток с активностью ZraI 20000 ед/г. Фермент выделяли из клеточного экстракта путем последовательных хроматографических процедур на колонках с фосфоцеллюлозой P11, гепарин-сефарозой, целлюлозой ДЕ-52. При выходе 9% получали 2,5 мл препарата ZraI с активностью 7000 ед/мл.

Оптимальные условия действия рестриктазы определяли в 5 стандартных буферных смесях при 37° и 55° (таблица 1).

Температура, °C	Активность ZraI в различных буферах, %				
	B	G	O	W	Y
37	100	75	12	25	75
55	75	75	6	12	75

Таблица 1. Относительная активность ZraI при расщеплении ДНК фага λ при 37° и 55° в пяти стандартных буферах

ZraI наиболее быстро расщепляла ДНК фага λ при 37° в 10 mM трис-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ. Поскольку и при 55° обнаружена значительная активность, мы сравнили ее величину при температуре 30°, 37°, 50° и 60° в буфере B. Однако оптимальной оказалась температура 37°. Подобно прототипу AatII, рестриктаза ZraI активна в буфере Y и ингибируется 0,1 M NaCl (в буферах O и W).

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 1. Идентификация сайта ДНК, который узнает рестриктаза ZraI:

- 1 - λ ДНК + ZraI;
- 2 - λ ДНК + ZraI и AatII;
- 3 - λ ДНК + AatII (узнает 5'-GACGTC-3');
- М - маркер длины ДНК (λ. ДНК + BssTII)

Сайт ДНК, который узнает рестриктаза ZraI, идентифицировали по картине фрагментации ДНК фага λ, нуклеотидная последовательность которой известна [10]. На рис. 1 видно, что рестриктазы ZraI и AatII, а также их смесь идентично фрагментировали ДНК. Следовательно, ZraI узнает на ДНК тот же сайт, что и AatII (5'-GACGTC-3') и является ее изошизомером.

Место, по которому ZraI расщепляет ДНК, определяли на дезоксирибонуклеотидном дуплексе, содержащем сайт, который узнает рестриктаза (выделен).

5'-GCGTAAGTCCAG**GACGTC** TGGACTAGTGCGC-3'
3'-CGCATTCAAGGT**CTGCAG**ACCTGATCACGCG-5'

На рис. 2 видно, что места, которые расщепляли рестриктазы AatII и ZraI, разделены двумя нуклеотидами. Если AatII расщепляет узнаваемую последовательность по 5'-GACGT↓C-3', то ZraI — по 5'-GAC↓GTC-3'. Таким образом, рестриктаза ZraI расщепляет ДНК с образованием тупых концов и является первым ложным изошизомером AatII. Она может найти более широкое применение в генетической инженерии, так как сшивка по тупым концам возможна не только для фрагментов, образованных ZraI, но и для многих других рестриктаз, а использование AatII такой возможности не дает.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 2. Определение нуклеотидов, между которыми ZraI гидролизует узнаваемую последовательность в олигонуклеотидном дуплексе:

- а — верхняя цепь помечена ³²P по 5'-концу;
- б — помечена нижняя цепь;
- 1 — исходный дуплекс;
- 2 — дуплекс + AatII (узнает и расщепляет 5'-GACGT↓C-3');
- 3 — экзонуклеаза III;
- 4 — ZraI

ЛИТЕРАТУРА

1. Sugisaki, K, Maekawa, Y., Kanazawa, S., Takanami, M. // Nucleic Acids Res. — 1982. — V. 10. — P. 5747—5752.
2. Sato, H., Suzuki, T., Yamada, Y. // Agric. Biol. Chem. — 1990. —V. 54. —P. 3319—3325.
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: Тез. докл. 6-го рабочего совещания по программе "Плаزمиды". — Пушино-на-Оке. — М., 1981. — С. 50—51.

4. Дедков В.С., Дегтярёв С.Х. // Приклад, биохим. — 1991. — Т. 28. — С. 309—313.
5. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. / Под ред. Н. С. Егорова — М., 1995.
6. Определитель бактерий Берджи. / Под ред. Дж. Хоулта и др.: 9-е издание в 2 томах: Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. — М., 1997.
7. Маниатис Т., Фрыч Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. — М., 1984.
8. Горбунов Ю.А., Зиновьев В.В., Овечкина Л.Г. и др. // Биоорган, химия.—1987.—Т. 13. — С. 1629—1637.
9. Smith, И.О., Nathans, D.// Mol. Biol.—1973.—V. 81.— P. 419—423.
10. Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., et al. // J. Mol. Biol.— 1982. —V. 162. — P. 729—773.