

Эндонуклеаза рестрикции *FatI* из *Flavobacterium aquatile* NL3 расщепляет ДНК по сайту 5'- $\uparrow$ CATG - 3'

Категория: Новые ферменты

Просмотров: 3836

В.С. Дедков, Е.В. Килёва Д.В. Попиченко, С.Х. Дегтярев

Биотехнология, 2002, №5, С.3-7.

Новый продуцент эндонуклеазы рестрикции был получен из природных изолятов и идентифицирован как вид бактерии Flavobacterium aquatile NL3, а соответствующая рестриктаза названа FatI. Описаны способ очистки и определение активности фермента. Показано, что рестриктаза FatI образует фрагменты ДНК с 5'-CATG выступающими концами и может найти широкое применение в генетической инженерии.

Эндонуклеаза рестрикции типа II (рестриктаза) NlaIII из *Neisseria lactamica* узнает и расщепляет последовательность ДНК 5'-CATG $\uparrow$ -3' [1]. Известны изоизомеры этой рестриктазы HinIII [2] и Hsp92II [3] из *Haemophilus influenzae*, которые расщепляют ДНК в тех же точках, что и прототип. Описаны также гетероизомеры NlaIII, узнающие ту же последовательность ДНК, но расщепляющие ее по-другому. CviAI из вируса хлореллы расщепляет ДНК по сайту 5'-C $\uparrow$ ATG-3' [4], а HpyCH4I из *Helicobacter pylori* - по сайту 5'-CAT $\uparrow$ G-3' [5].

Целью данной работы было получение и изучение некоторых свойств рестриктазы *FatI* из бактерии *F.aquatile* NL3, которая является новым гетероизомером NlaIII, расщепляющим ДНК по сайту 5'- $\uparrow$ CATG - 3'.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штамм *F.aquatile* NL3 выявлен нами в результате поиска рестриктаз в природных изолятах по ранее описанной методике [6], [7]. Морфологические и физиолого-биохимические свойства штамма изучали с использованием методик [8]. Определение микроорганизма до вида проводили по определителю [9].

F.aquatile NL3 выращивали до стационарного состояния в ферментере 1601-013 (LKB, Швеция) при 28°C в 10 л среды, содержащей 1% триптона (Organotechnie, Франция), 0.5% дрожжевого экстракта (той же фирмы), 0.5% NaCl, 0.05% MgCl₂ и 0.001% тиамина при pH 7.5 и аэрации 5 л/мин и перемешиванием 200 об/мин. Клетки осаждали центрифугированием при 8000 об/мин и

замораживали. За единицу активности *FatI* принимали полное специфическое расщепление ферментом 1 мкг ДНК фага T7 за 1 ч при 50°C в 20 мкл буфера G: 10 mM трис-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl и 1 mM дитиотреитол (ДТТ). Реакцию останавливали добавлением по 5 мкл стоп-буфера: 0.25 M Na-ЭДТА, pH 8.5, 50%-ная сахароза и 0,25%-ный бромфеноловый синий. Фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 1%-ной агарозе (Qualex Gold-TM, Hybaid-AGS, Германия) в трис-ацетатном буфере с этидий-бромидом (0.5 мг/л) при напряжении 5 В/см за 1.5 ч по методике [10].

Выделение рестриктазы *FatI* проводили при 4°C. Хроматографическую очистку фермента проводили в 10 mM К-фосфатном буфере (pH 7.4), содержащем 7 mM β-меркаптоэтанол и 0.1 mM ЭДТА(буфер А). 80 г клеток суспендировали в 200 мл буфера А, содержащего 0.2 M NaCl, разрушали ультразвуком и осветляли при 12000 об/мин 45 мин. Экстракт пропускали через колонку с фосфоцеллюлозой P11 (Whatman, Англия) объемом 50 мл. Колонку промывали 0.2 M NaCl в буфере А, затем градиентом NaCl от 0.2 до 1.0 M (объемом 500 мл). Элюат собирали в 50 пробирок. Фракции 32-40, содержащие фермент, объединяли и наносили на колонку с 10 мл гидроксилапатита. Фермент элюировали буфером А с градиентом концентрации К-фосфата от 0.01 M до 0.3 M объемом 200 мл в 50 пробирок. Фракции 25-33 наносили на колонку с 5 мл фосфоцеллюлозы P11. Фермент смывали в градиенте NaCl от 0.2 M до 0.8 M объемом 100 мл в буфере А в 50 пробирок. Фракции 31-35 диализовали против буфера с 50%-ным глицерином и хранили при -20°C.

Оптимальные условия активности рестриктазы определяли путем расщепления ДНК фага T7 (50 мкг/мл в 50 мкл) при 37°C и 50°C в 5 стандартных SE буферных растворах: буфер В - 10 mM трис-HCl (pH 7.6 при 25 °C), 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 О - 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 результаты анализировали с помощью электрофореза. Затем в оптимальном буфере активность определяли при 30°C, 40°C, 50°C и 60°C.

Для определения места расщепления ДНК рестриктазой *FatI* были синтезированы по ранее описанному методу [11] олигодезоксирибонуклеотид 5'-CTCTAAGCTTCATGTGATATCAGACTCGAGACC-3' и комплементарный ему олигодезоксирибонуклеотид 5'-GGTCTCGAGTCTGATATCACATGAAGCTTAGAG-3'. В соответствии с [10] 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 комплементарной цепью. Меченые дуплексы расщепляли рестриктазами (*FatI*, *AluI*, *EcoRV*) и экзонуклеазой III из *E.coli* и полученные таким образом фрагменты разделяли электрофорезом в 20%-ном ПААГ с 7 M мочевиной и затем осуществляли радиоавтографию геля.

Препараты ферментов - *AluI*, *EcoRV*, *MhII*, экзонуклеазы III, T4 полинуклеотидкиназы из *E.coli*, а также ДНК - фагов λ и T7, плазмид pUC19 и pBR322, маркера (ДНК фага λ, обработанная *BssT1I*), использованные в работе, произведены в НПО "СибЭнзим" (г. Новосибирск, <http://www.sibenzyme.ru>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериальный штамм продуцент рестриктазы *FatI* имеет следующие характеристики. Клетки - неподвижные палочки размером (0.6-0.8)х(2-4) мкм, грамтрицательные, спор не образуют. Штамм - аэробный, каталазо- и оксидазо-положительный, восстанавливает нитрат в нитрит. На питательном агаре рост колоний стимулировали (без образования кислоты) 2%-ная лактоза, сорбит и мальтоза, но не глюкоза, сахароза, глицерин, маннит, ацетат, этанол, дульцит, арабиноза и рамноза. Рост отсутствовал на минимальном агаре с добавлением углеводов. Культура росла при температуре от 10°C до 30°C при концентрации NaCl от 0 до 0.5% и pH 7-7.7. Культура при встряхивании в питательном бульоне Лурия образовывала однородную суспензию. При центрифугировании клетки давали объемный, рыхлый, текучий осадок оранжево-красного цвета. Колонии на агаре с разбавленной в 4 раза средой вырастали за 3 дня при 25°C и были круглые, 2-4 мм в диаметре, выпуклые, гладкие, блестящие, красные. Штамм идентифицировали по определителю [9] как вид бактерии *Flavobacterium aquatile* NL3, а его рестриктазу называли *FatI*, согласно номенклатуре [12]. Биомассу *F.aquatile* NL3 выращивали при аэрации в модифицированном бульоне Лурия. Из 1 л получали 30 г клеток. Фермент выделяли из клеточного экстракта с помощью последовательных хроматографических процедур на колонках фосфоцеллюлозы P11, гидроксилпатита и повторно - на колонке фосфоцеллюлозы. Из 80 г клеток получали 1.5 мл препарата *FatI* с активностью 1000 ед/мл. Активность эндонуклеазы рестрикции *FatI* определяли в 5 стандартных SE буферах при 37°C и 50°C.

Температура, °C	Активность <i>FatI</i> в различных буферах, %				
	B	G	O	W	Y
37	6	50	50	75	50
50	25	100	75	75	75

Таблица 1 Относительная активность *FatI* при расщеплении ДНК фага T7 при 37°C и 50°C в пяти стандартных SE-буферах

Как видно из таблицы 1 фермент наиболее активен при 50°C в SE-буфере G (10 mM трис-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl и 1 mM ДТТ). На рисунке 1 приведены данные по сравнительной активности фермента при 30°C, 40°C, 50°C и 60°C. Из рисунка видно, что в отличие от *NlaIII* и ее гетероизомеров, максимальная активность *FatI* наблюдается при 50°C. При этом, следует отметить, что штамм-продуцент *Flavobacterium aquatile* NL3 растет при температуре от 10°C до 30°C. Возможно, что в ходе эволюционных процессов исходный ген рестриктазы из термофильной бактерии попал в штамм *F.aquatile* NL3 путем горизонтального переноса.

Рис. 1. Определение температуры, оптимальной для активности *FatI*. 50 мкг/мл ДНК фага Т7 в пробах по 50 мкл инкубировали в буфере G с 10 ед/мл фермента 2 ч. Электрофорез проводили в 1%-ной агарозе 1.5 ч при напряжении 5 В/см. Дорожки: М - маркер (λ /BssT1I); 1 - 30 °С; 2 - 40 °С; 3 - 50 °С; 4 - 60 °С

Сайт ДНК, который узнает рестриктаза *FatI*, идентифицировали по картине фрагментации ДНК фагов λ [13] и Т7 [14], плазмид рUC19 [15] и рBR322 [16], нуклеотидная последовательность которых известна, приведенной на рис.2. Для приготовления маркера длины фрагментов Т7 ДНК расщепляли рестриктазой *MhI*. Сравнение известных картин расщепления ДНК различными эндонуклеазами рестрикции с данными, полученными на рис.2, позволило установить, что *FatI* имеет сайт узнавания 5'-CATG-3'. Таким образом, *FatI* является изошизомером рестриктазы *NlaIII* [1].

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 2. Расщепление канонических ДНК рестриктазой *FatI* для идентификации ее сайта узнавания. Электрофорез ДНК (50 мкг/мл) проводили в 2%-ной агарозе при напряжении 5 В/см 4 ч. Дорожки: 1 - гидролизат ДНК фага λ , 2 - фага Т7. 3 - плазмиды рUC19, 4 - плазмиды рBR322, М - маркер, Т7 ДНК/*MhI* (*SduI*)

На рисунке 3 приведены результаты определения места расщепления ДНК ферментом *FatI*. Для определения длин получаемых фрагментов дуплексы обрабатывали также рестриктазами *AluI*, *EcoRV*, а также экзонуклеазой III из *E.coli*. Из данных, приведенных рис. 3, видно, что *FatI* расщепляет олигонуклеотидный дуплекс по сайту 5'↑CATG-3'. Таким образом, *FatI* является новым гетероизомером рестриктазы *NlaIII*. Данный фермент может найти широкое применение в генетической инженерии. Например, фрагменты ДНК, получаемые после гидролиза рестриктазой *FatI*, имеют липкие концы 5'-CATG и могут быть встроены в плазмиды, линейаризованные рестриктазами *BspHI* (5'-T↑CATGA-3'), *NcoI* (5'-C↑CATGG-3') и *PciI* (5'-A↑CATGT-3'), а также их изошизомерами [17].

Рис. 3. Определение места гидролиза олигонуклеотидного дуплекса, являющегося мишенью *FatI*. Электрофорез фрагментов различных ДНК после рестрикции проводили в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной: на дорожках 1-4 - дуплекс с верхней цепью, меченной ³²P по 5'-концу (слева в рамке приведены сайты, узнаваемые *FatI* и *AluI*): 1 - исходный дуплекс; 2 - дуплекс + *AluI*; 3 - экзонуклеаза III; 4 - *FatI*. Дорожки 5 - 7 - помечена нижняя цепь (справа в рамке приведены сайты, узнаваемые *FatI* и *EcoRV*): 5 - *EcoRV*; 6 - экзонуклеаза III. 7 - *FatI*

ЛИТЕРАТУРА

1. Qiang, B. Q., Schildkraut, I.// *Nucleic Acids Res.* - 1986 - V. 14.- P. 1991-1999.
2. Лазаревикайте Л., Манелиене З., Падегимииене А. и др.//*Биоорг.хим.*- 1990. - Т. 16. - С. 889-897.
3. *Life Science Catalog 2000.* Promega Corporation. - USA, 2000. - p. 36.
4. Zhang, Y., Nelson, M., Nietfeldt, J.W., et al.//*Nucleic Acids Res.* - 1992. - V. 20. - P. 5351-5356.

5. Xu, Q., Morgan, R.D., Roberts, R.J., Blaser, M.J.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2000. - V. 97. - P. 9671-9676.
6. Белавин П.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Метод определения эндонуклеаз рестрикции в колониях бактерий.//Прикл. Биохим. Микробиол - 1988. - Т. 24. - С. 121-124. ([интернет-версия](#))
7. Дедков В.С., Дегтярёв С.Х.// Приклад. биохим. - 1991.- Т.28.- С. 309-313.
8. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. / Под ред. Н. С. Егорова. - М., 1995.
9. Определитель бактерий Берджи. / Под ред. Хоулта Дж. и др.: 9-е издание в 2 томах. Пер. с англ. / Под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. - М., 1997.
10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. - М., 1984.
11. Горбунов Ю.А., Зиновьев ВВ., Овечкина Л. Г. и др.//Биоорган, химия. - 1987.- Т. 13. - С. 1629-1637.
12. Smith, H.O., Nathans, D.//J. Mol. Biol. - 1973.- V. 81.- P.419-423.
13. Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., etal. //J. Mol. Biol. 1982.- V. 162. - P. 729-773.
14. Dunn, J., Studier, F. W.//J. Mol. Biol. - 1983. - V. 166.- P.477-535.
15. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J.//Gene. - 1985. - V. 33.- P. 103-119.
16. Sutcliffe, J.G.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1978. - V. 75.- P. 3737-3741.
17. New England Biolabs. 2000-01 Catalog & Technical Reference. - USA, 2000. - P. 184, 238-241.