

Эндонуклеаза рестрикции Bst19 I из штамма *Bacillus stearothermophilus*, узнающая последовательность ДНК 5'-GCATC-3'

Категория: Новые ферменты

Просмотров: 4030

Ю.Э.Томилова, В.С.Дедков, Н.М.Шинкаренко, Д.В.Попиченко, С.Х.Дегтярев

Биотехнология, 2002, №6, 17-20

*Выделен штамм *Bacillus stearothermophilus* 19 являющийся продуцентом новой эндонуклеазы рестрикции Bst19I. Получен препарат фермента и изучены его свойства, включая его субстратную специфичность и место расщепления ДНК. Эндонуклеаза рестрикции Bst19I идентифицирована как гетерошизомер рестриктазы SfaNI, узнающий последовательность 5'-GCATC-3' и гидролизующий ДНК на расстоянии 4 и 6 нуклеотидов от сайта узнавания на верхней и нижней цепях соответственно.*

Ферменты, расщепляющие специфические последовательности ДНК (эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы), широко распространены у прокариот и являются одними из ключевых инструментов в генной инженерии и интересными объектами изучения в молекулярной биологии. Поэтому обнаружение новых эндонуклеаз рестрикции является актуальной задачей.

При изучении микроорганизмов из пресноводного водоема нами был обнаружен штамм *Bacillus stearothermophilus* 19, являющийся продуцентом новых эндонуклеаз рестрикции, названных согласно общепринятой номенклатуре [1] Bst19I и Bst19II.

Целью данной работы являлось выделение и характеристика новых ферментов и изучение их свойств.

МЕТОДИКА

Для получения препаратов эндонуклеаз рестрикции Bst19I и Bst19II штамм-продуцент *Bacillus stearothermophilus* 19 выращивали в ферментере при температуре 55°C в 20 литрах среды содержащей: пептон – 10г/л, дрожжевой экстракт – 5г/л, NaCl – 5г/л, 5М MgCl₂ – 1мл/л и 5% раствор витамина В1 – 0.2 мл/л; pH 7.7. Клетки растили до оптической плотности 2.04 о.е. в течение 4 часов, затем осаждали центрифугированием (6000g, 30 мин при 4°C).

Биомассу клеток суспендировали в буфере, содержащем 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.2mM NaCl,

0.1mM EDTA, 7mM β -меркаптоэтанол и разрушали ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе Soniprep 150 ("MSE", Англия) в ледяной бане 7 импульсами длительностью по 1 минуте с интервалами в 2 минуты. Клеточный дебрис фракционировали в системе ПЭГ-декстран 10 минут при 4°C и осаждали центрифугированием (15000g, при 4°C). Выделение ферментов из супернатанта и их разделение проводили путем последовательной хроматографической очистки на следующих сорбентах: гепарин, ГАП, гепарин, сефакрил (S-200), ГАП, гепарин с последующим диализом и концентрированием против буфера, содержащего 10mM Tris HCl pH 7.6, 0.1M NaCl, 0.1mM EDTA, 7mM β -меркаптоэтанол и 50% глицерин.

Оптимальные условия проявления активности рестриктазы Bst19I определяли путем расщепления ДНК фага T7 в 5 стандартных буферных растворах (буфер В - 10 mM Tris-HCl pH 7.6 (при 25°C); 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; буфер G - 10 mM Tris-HCl pH 7.6 (при 25°C); 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; буфер О - 50 mM Tris-HCl pH 7.6 (при 25°C); 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 1 mM DTT; буфер W - 10 mM Tris-HCl pH 8.5 (при 25°C); 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 1 mM DTT; буфер Y - 33 mM Tris-ацетат pH 7.9 (при 25°C); 10 mM магния ацетат; 66 mM калия ацетат; 1 mM DTT) в течение 10 минут при 55°C, а также в течение 10 минут в ацетатном буфере (Y) при температурах 25°C, 37°C, 45°C, 55°C и 65°C. Продукты гидролиза в обоих случаях анализировали с помощью электрофореза.

Для определения последовательности нуклеотидов, узнаваемой эндонуклеазой рестрикции Bst19I, проводили гидролиз полученным ферментом препаратов ДНК с известной структурой: бактериофагов λ и T7, а также плазмид pUC19 и pBR322 при температуре 65°C в буфере, содержащем 10mM Tris-HCl, pH 8.5, при 25°C, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 1mM ДТТ. Продукты гидролиза разделяли в 1.5% агарозном геле в трис-боратном буфере, содержащем бромистый этидий и фотографировали в УФ-свете.

Место гидролиза ДНК рестриктазами Bst19I и Bst19II определяли с использованием синтетического олигонуклеотидного дуплекса, содержащего последовательность, узнаваемую ферментом, одну из цепей которого метили с 5'-конца при помощи T4-полинуклеотидкиназы. Продукты гидролиза разделяли в 20% полиакриламидном геле с 6M мочевиной и делали радиоавтограф.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При массовом скрининге штаммов [2] из пресноводного водоема был обнаружен штамм *Bacillus stearothermophilus* 19, продуцировавший рестриктазу с неясной субстратной специфичностью. В процессе хроматографической очистки клеточного экстракта этого штамма было обнаружено два фермента, проявлявших различную субстратную специфичность.

Рис. 1. Гидролиз ДНК эндонуклеазой рестрикции Bst19I.

М – 1kb ДНК маркер, 1 – гидролизат ДНК фага лямбда,
2 – гидролизат ДНК фага T7, 3 – гидролизат ДНК pUC19,
4 – гидролизат ДНК pBR322

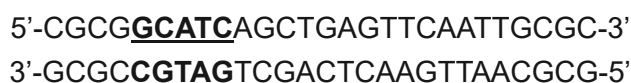
При анализе электрофоретических картин гидролиза ДНК полученными рестриктазами и сравнении их с рассчитанными с помощью компьютера картинami расщепления данных субстратов известными эндонуклеазами рестрикции, было установлено что картина гидролиза одного из ферментов (Рис.1) соответствует набору фрагментов, образующихся при расщеплении данных субстратов рестриктазой, узнающей последовательность нуклеотидов 5'-GCATC-3'. Таким образом, он является изошизомером рестриктазы SfaNI, узнающей ту же последовательность и расщепляющей субстрат в положении GCATC(5/9). Второй фермент был идентифицирован, как изошизомер часто встречающегося фермента MboI, узнающего последовательность 5'-GATC-3'.

Рис. 2. Определение оптимальных условий проявления активности эндонуклеазы рестрикции Bst19I

1. Активность в стандартных буферах: М – 1kb ДНК маркер
2. Активность при различных температурах: М – 1kb ДНК маркер

В процессе определения оптимальных условий проявления активности рестриктазы Bst19I обнаружено, что быстрее всего она расщепляет субстрат в ацетатном буфере (буфер Y - 33 mM Tris-ацетат pH 7.9 (при 25°C); 10 mM магния ацетат; 66 mM калия ацетат; 1 mM DTT) и при 65°C (рис.2).

Место расщепления ДНК рестриктазой Bst19I определяли на олигонуклеотидном дуплексе, содержащем последовательность, узнаваемую ферментом (выделена):



Так как на каждой цепи фермент узнает разные последовательности, то проводили две реакции. В каждом случае одну из цепей метили по 5'-концу ^{32}P и гибридизованный дуплекс расщепляли рестриктазами Bst19I и SfaNI. На рис.3 видно, что рестриктаза Bst19I расщепляла первую цепь на одно основание (рис.3.1), а вторую – на 3 основания (рис.3.2) ближе к узнаваемой последовательности по сравнению с местами гидролиза SfaNI. Из этого можно заключить, что новая эндонуклеаза рестрикции Bst19I расщепляет субстрат в положении GCATC(4/6) и является гетерошизомером фермента SfaNI.

Рис. 3. Определение места гидролиза ДНК эндонуклеазой рестрикции Bst19I.

1. ^{32}P меченная верхняя цепь олигонуклеотидного дуплекса:
а - контроль; б - гидролиз SfaNI;
с - гидролиз экзонуклеазой III; д - гидролиз Bst19I
2. ^{32}P меченная нижняя цепь олигонуклеотидного дуплекса:

a - контроль; b - гидролиз SfaNI;
c - гидролиз экзонуклеазой III; d - гидролиз Bst19I

Таким образом, при расщеплении ДНК фермент Bst19I образует 5'-выступающие динуклеотидные липкие концы, что является почти уникальным явлением. Кроме указанного фермента лишь одна из известных рестриктаз IIS типа – FaeI - расщепляет ДНК подобным образом.

Место расщепления ДНК эндонуклеазой рестрикции Bst19I полностью соответствует месту гидролиза ДНК прототипом данного фермента ([^]GATC). Следовательно, Bst19I является истинным изоизомером фермента MboI, и, для авторов настоящей работы, дальнейшего интереса не представляет.

К настоящему времени описано несколько изоизомеров рестриктазы SfaNI выделенных из штаммов различной систематической принадлежности [3,4], однако большинство из них являются истинными изоизомерами, т.е. узнают и расщепляют ДНК аналогично прототипу. Единственный обнаруженный ранее гетероизомер, аналогичный Bst19I (REBASE Ref Num 393) [5], до сих пор не изучен.

Поэтому новая система рестрикции-модификации интересна для дальнейшего изучения и сравнения с системой рестрикции-модификации SfaNI.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith H.O., Nathans D. // J. Mol. Biology. – 1973.- N81. – P. 419-423.
2. Белавин П. А., Дедков В. С., Дегтярев С. Х. // Прикладная биохимия и микробиология.- 1988.- Том XXIV.- Вып.1.- С.121-124. ([интернет-версия](#))
3. Зелинская Н.В., Матвиенко Н.Н., Железная Л.А., Матвиенко Н.И. // Биохимия. – 1995.- №12. – С. 1999-2010.
4. Briggs R.E., Tatum F.M., Casey T.A., Frank G.H. // Appl. Environ. Microbiol. - 1994. - N6 – p. 2006-2010.
5. Roberts R.J., Macelis D. //Nucleic Acids Research. – 2001. – vol.29. – N1. – P. 268-269.