

Эндонуклеаза рестрикции BmtI из *Bacillus megaterium* S2 расщепляет ДНК по 5'-GCTAG^C-3

Категория: Новые ферменты

Просмотров: 4345

В.С. Дедков, Т.Н. Наякшина, Д.В. Попиченко, С.Х. Дегтярёв

Биотехнология, 2003, №1, с 11-15

Обнаружен новый штамм - продуцент эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) BmtI, который был идентифицирован как бактериальный вид Bacillus megaterium S2. Описаны схема очистки фермента и некоторые его свойства. Показано, что рестриктаза BmtI является гетерошизомером хорошо известного фермента NheI (расщепляет 5'-G^CCTAGC-3') и разрушает ДНК, образуя фрагменты с выступающими CTAG-3'-концами. Рестриктаза BmtI может быть использована в генетической инженерии.

Эндонуклеаза рестрикции типа II (рестриктаза) NheI из *Neisseria mucosa heidelbergensis* узнает и расщепляет в ДНК последовательность 5'-G^CCTAGC-3' [1]. В других видах бактерий обнаружены немногие изошизомеры этой рестриктазы, которые узнают и расщепляют последовательность ДНК идентично прототипу. К ним относится изошизомер AsuNHI, обнаруженный нами в штамме *Actinobacillus suis* NH [2]. В базе данных (<http://www.rebase.com>) указан и гетерошизомер рестриктазы NheI, который по-другому расщепляет узнаваемую последовательность: Acell из цианобактерии *Anabaena sedgwickii*, расщепляющий 5'-GCTAG^C-3'. Однако гетерошизомеры NheI в настоящее время в литературе не описаны и не производятся.

Целью данной работы было получение из штамма *Bacillus megaterium* S2 рестриктазы BmtI и ее изучение. Показано, что новый фермент является гетерошизомером рестриктазы NheI.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штамм *B. megaterium* S2 выявлен нами в пробе грунта при поиске рестриктаз 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].

Концентрацию белка при выделении рестриктазы определяли по разности оптической плотности при 228,5 и 234,5 нм по методу [7].

За единицу активности BmtI принимали количество фермента, способное осуществлять полное специфическое расщепление 1 мкг ДНК фага λ (предварительно обработанной рестриктазой HindIII) за 1 ч при 37° в 20 мкл буфера W с БСА: 10 mM трис-HCl, pH 8,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl и 1 mM ДТТ с 50 мкг/мл ацетилованного БСА (Promega, США). Реакцию останавливали добавлением по 5 мкл стоп-буфера: 0,25 M Na-ЭДТА, pH 8,5, 50% сахара и 0,25% бромфеноловый синий. Фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 1%-ной агарозе (Qualex Gold™, Hybaid-AGS, Германия) в трис-ацетатном буфере с этидийбромидом (0,5 мг/л) при напряжении 5 В/см за 1,5 ч по методике [8].

Оптимальные условия активности рестриктазы определяли путем расщепления 2,5 мкг ДНК фага λ (предварительно обработанной рестриктазой HindIII) при 37° и 55° в пяти стандартных буферных растворах (объем пробы 50 мкл): 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. Пробы инкубировали 1 ч и анализировали с помощью электрофореза. Затем в оптимальном буфере активность определяли при 30°, 40, 50 и 60°.

Последовательность нуклеотидов, которую узнает рестриктаза BmtI, идентифицировали по картине фрагментации ферментом канонических ДНК. В качестве препарата фермента использовали лизат клеток агаровой культуры по методике [4]. Расщепление 50 мкг/мл ДНК проводили 1 ч при 37° в буфере W. Электрофорез ДНК проводили 4 ч в 0,7%-ной агарозе при напряжении 5 В/см, используя в качестве маркера гидролизат λ -ДНК/BssT1I (Styl).

Для определения места расщепления ДНК рестриктазой BmtI использовали дуплекс из олигодезоксирибонуклеотидов (ООО «СибЭнзим», г. Новосибирск). По методикам [8] каждую цепь метили по 5'-концу при помощи T4 полинуклеотидкиназы и γ -³²P-АТФ и гибридизовали с немеченой комплементарной цепью. Полученные таким образом меченые модификации дуплекса расщепляли рестриктазой BmtI, а также AsuNHI (изошизомер NheI), разделяли фрагменты электрофорезом в 20%-ном ПААГ с 6 M мочевиной и делали радиоавтограф. Для контроля разделения фрагментов по длине нуклеотидов дуплекс обрабатывали экзонуклеазой III из E. coli.

Препараты ферментов (рестриктаза AsuNHI, экзонуклеаза III, T4 полинуклеотидкиназа из E. coli), а также ДНК (фага λ , аденовируса-2, маркеров λ /BssT1I и λ /HindIII), использованные в работе, произведены в ООО «СибЭнзим» (Новосибирск, <http://www.sibenzyme.ru>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериальный штамм - продуцент рестриктазы BmtI, имеет следующие характеристики. Клетки, неподвижные грамположительные палочки размером (1-1,2)х(2-4) мкм, располагаются поодиночке и в коротких изломанных цепочках. Клетки образуют эллипсоидные споры без параспоральных телец и не раздувают спорангии. Штамм аэробный, каталазоположительный, оксидазоотрицательный, восстанавливает нитрат в нитрит. Не расщепляет крахмал, казеин и твин-80. Не образует ацетон из глюкозы. Заметное количество кислоты образует из рамнозы, но не окисляет маннит, этанол, глюкозу, галактозу, сахарозу, дульцит, сорбит, мальтозу, инозит,

ацетат, глицерин, арабинозу и лактозу. На минеральной среде с углеводами не растет. На питательном агаре Лурия растет при pH 7-8, температуре от 4 до 40°, концентрации NaCl от 0 до 2 %. Колонии на питательном агаре круглые, 3-7 мм в диаметре, выпуклые, блестящие, серого цвета. Штамм идентифицировали по определителю [6] как вид бактерии *Bacillus megaterium* S2, а его рестриктазу назвали BmtI согласно номенклатуре [9].

B. megaterium S2 выращивали в 24 качалочных колбах емкостью 500 мл с 300 мл бульона, состоящего из 1% триптона (Organotechnie, Франция), 0,5% дрожжевого экстракта (той же фирмы), 0,5% NaCl, 0,05% MgCl₂, 0,001% тиамина, pH 7,5, в инкубационной емкости G-25 (New Brunswick, США) при 30° со встряхиванием (170 об/мин 20 ч). Клетки осаждали 20 мин в центрифуге J-21C (Beckman, США) с использованием ротора JA-10 при 8000 об/мин. Получили 103 г полужидкой биомассы, которую замораживали и хранили при -20°.

Выделение рестриктазы BmtI проводили по схеме [10] при 4° в смеси, содержащей 10 mM К-фосфатный буфер, pH 7,2, 7 mM β-меркаптоэтанол и 0,1 mM ЭДТА. 10 г клеток суспендировали в 30 мл буфера с 0,05 M NaCl, 0,05% лизоцима и 0,05% PMSF, инкубировали 1,5 ч, разрушали ультразвуком и осветляли при 15000 об/мин 30 мин. Экстракт пропускали через колонку фосфоцеллюлозы P11 (Whatman, Англия) объемом 30 мл, колонку промывали сначала 60 мл 0,05 M NaCl, затем 300 мл градиента концентрации NaCl от 0,05 до 0,8 M. Элюат собирали в 25 пробирок. Фракции 19-22, содержащие фермент, объединяли, наносили на колонку с 3,5 мл гидроксилапатита и промывали 10 мл 0,2 M NaCl. Фермент смывали 200 мл градиента концентрации К-фосфатного буфера, pH 7,2, от 0,01 до 0,25 M в 50 пробирок. Фракции 15-21 диализовали против буфера, содержащего 10 mM трис-HCl, pH 7,6, 7 mM β-меркаптоэтанол, 0,25 M NaCl, 0,1 mM ЭДТА и 50% глицерина. Получили 7,5 мл препарата, который хранили при -20°. Результаты выделения суммированы в табл. 1.

Стадия выделения	Объем фракции, мл	Белок, мг	Активность BmtI	
			общая, ед.	удельная, ед/мг
Экстракт	35	280	900 000	3 200
Элюат с фосфоцеллюлозы P11	48	19	500 000	26 000
Элюат с гидроксилапатита	7,5	0,2	230 000	1 200 000

Таблица 1. Выделение рестриктазы BmtI из 10 г биомассы

Из 10 г клеток после их разрушения и хроматографической очистки на фосфоцеллюлозе P11 и гидроксилапатите получали 7,5 мл препарата BmtI с активностью 30000 ед/мл. Выход фермента составил 26% при очистке по белку в 375 раз.

Оптимальные условия действия рестриктазы BmtI определяли в пяти стандартных буферных смесях при 37° и 55° (табл. 2). Фермент наиболее активен при 37° в буфере W (см. «Условия эксперимента»). В отличие от NheI и ее изошизомеров, рестриктаза BmtI малоактивна в буфере В при низкой ионной силе.

Температура, °C	Активность BmtI в различных буферах, %				
	B	G	O	W	Y
37	12	50	75	100	50
55	12	12	6	6	12

Таблица 2 Относительная активность BmtI при расщеплении λ /HindIII ДНК при 37° и 55° в пяти стандартных буферах

Сайт ДНК, который узнает BmtI, идентифицировали по картине фрагментации ДНК фага λ [11] и аденовируса-2 [12], нуклеотидные последовательности которых известны. На рис. 1 видно, что BmtI узнает последовательность 5'-GCTAGC-3', как и ее прототип NheI [1].

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 1. Расщепление канонических ДНК лизатом клеток *B. megaterium* S2 для идентификации сайта ДНК, который узнает рестриктаза BmtI:

1—лизат

2—лизат + ДНК фага λ

3 — ДНК аденовируса-2

M— маркер, λ -ДНК/BssT1I (Styl)

Связь каких именно нуклеотидов между собой расщепляет BmtI определяли с использованием дезоксирибонуклеотидного дуплекса, содержащего сайт узнавания рестриктазы (выделен):

5'-ATTCAGCAGCT**GCTAGC**ATCGATATCG-3'
3'-TAAGTCGTCGAC**GATCG**TAGCTATAGC-5'

Для идентификации на электрофореграмме 3'-концевых нуклеотидов дуплекс обрабатывали рестриктазой AsuNHI, расщепляющей 5'-G $\uparrow$ CTAGC-3', а также экзонуклеазой III из *E. coli*.

На рис. 2 видно, что рестриктаза BmtI расщепляет цепи дуплекса по 5'-GCTAG $\uparrow$ C-3'. Таким образом, BmtI является гетероизомером рестриктаз AsuNHI и NheI, которые расщепляют ДНК по последовательности 5'-G $\uparrow$ CTAGC-3'. Известен фермент AceII, расщепляющий ДНК аналогично BmtI, однако он коммерчески недоступен и его свойства не описаны в литературе. Мы полагаем, что обнаруженный нами фермент BmtI найдет применение в молекулярно-генетических исследованиях.

Рис. 2. Определение нуклеотидов дуплекса известного состава (см. текст), связь между которыми гидролизует BmtI: а- верхняя цепь олигонуклеотидного дуплекса помечена ^{32}P по 5'-концу; б - нижняя цепь дуплекса помечена Р.

Использованные ферменты:

- 1 — BmtI,
- 2 — экзонуклеаза III;
- 3 — AsuNHI (узнает и расщепляет 5'-G[^]CTAGC-3'),
- д — исходный дуплекс

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДТТ — дитиотреитол;
БСА — бычий сывороточный альбумин;
PMSF — параметилсульфонилфторид

ЛИТЕРАТУРА

1. Xu, S., Xiao, J. European Patent Office. EP 1096015, 2001.
2. Dedkov, V. S., Degtyarev, S. Kh. // Biol. Chem. (F. Hoppe—Seyler). — 1998. — V. 379. — P. 573—574.
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 «Плазмида». Пушино-на-Оке. — М., — 1981. — С. 50—51.
4. Дедков В.С., Дегтярёв С.Х. // Приклад, биохим. — 1992.—Т. 28. —С. 309—313. ([интернет-версия](#))
5. Руководство к практическим занятиям по микробиологии // Под ред. Н. С. Егорова. — М., 1995.
6. Краткий определитель бактерий Берги // Под ред. Дж. Хоулта. 9-е изд. Пер. с англ. канд. биол. наук С. Ш. Тер-Казарьяна / Под ред. чл.-корр. АН СССР Г.А. Заварзина. — М, 1980.
7. Ehresmann, B.H., Imbalt, P., Well, I.H. // Anal. Biochem. — 1973. —V. 54. —P. 454—463.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Пер. с англ. — М., 1984.
9. Smith, И.О., Nathans, D. // J. Mol. Biol. —1973. —V. 81. — P. 419—423.
10. Greene, P. J., Heyneker, H.L., Bolivar, F., et al. // Nucleic Acids Res. — 1978. — V. 5. — P. 2373—2380.
11. Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., et al. // J. Mol. Biol. — 1982. —V. 162. — P. 729—773.

12. Roberts, R.J., Akisjarvi, G., Alestrom, P., et al. Adenovirus DNA. // Ed. W. Doerfler. - Boston, Lancaster: Martinus Nijhoff Publishing, 1986. —P. 151.