

Эндонуклеазы рестрикции Fall и FallI из *Flavobacterium aquatile* Ob10 узнают 5'-(8/13)AAG(N)5CTT(13/8)-3' и 5'-CG[^]CG-3', соответственно

Категория: Новые ферменты

Просмотров: 3837

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

Биотехнология, 2003, № 6, с 24-29

*Из водных изолятов нами выделен штамм *Flavobacterium aquatile* Ob10, который продуцирует две эндонуклеазы рестрикции Fall и FallI. Fall является новым прототипом и узнает последовательность ДНК 5'-(8/13)AAG(N)₅CTT(13/8)-3'. Фермент Fall стимулируется S-аденозилметионином и расщепляет ДНК с обеих сторон от узнаваемой последовательности. Таким образом, Fall принадлежит к Vcgl-подтипу эндонуклеаз рестрикции. FallI расщепляет ДНК по сайту 5'-CG↓CG-3', являясь, таким образом, изошизомером FnuDII.*

К настоящему времени открыто более 3000 эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз) типа II, из которых более 200 являются прототипами [1]. Они узнают короткие, обычно палиндромные (симметричные) последовательности из 4—8 нуклеотидных пар и в присутствии Mg²⁺ расщепляют ДНК внутри или вблизи узнаваемой последовательности, образуя на концах 5'-фосфат и 3'-гидроксил. Среди рестриктаз типа II есть ферменты, которые расщепляют ДНК с двух сторон от узнаваемой последовательности, вырезая из нее короткий фрагмент. Такие ферменты называют Vcgl-подобными рестриктазами по названию их прототипа [2, 3]. Они представляют несомненный научный интерес и используются в молекулярно-генетических работах.

В данной работе мы изучали штамм *F. aquatile* Ob10 и две его рестриктазы с целью обнаружить новый прототип Vcgl-подобной рестриктазы.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штамм *F. aquatile* Ob10 выделен нами из пресной воды в результате поиска продуцента рестриктаз по методике [4, 5]. Морфологические и физиолого-биохимические свойства штамма изучали с использованием методик [6]. Определение штамма до вида проводили по

определителю [7].

F. aquatile Ob10 выращивали в 24 качалочных колбах емкостью 750 мл с 300 мл бульона, содержащего 1%-ный триптон (Organotechnie, Франция), 0,5% дрожжевого экстракта (той же фирмы), 0,5% NaCl, 0,4% K₂HPO₄, 0,05% MgCl₂, 0,001% тиамин, pH 7,5, в инкубаторе G-25 (New Brunswick, США) при 28° со встряхиванием с частотой 170 об/мин в течение 20 ч. Клетки осаждали в центрифуге J-21C (Beckman, США) в роторе JA-10 при 8000 об/мин в течение 30 мин. Полученную биомассу (250 г) замораживали и хранили при -20°.

Выделение рестриктазы Fall проводили при 4°. Все растворы содержали буфер: 10 mM трис-HCl (pH 7,5), 7 mM β-меркаптоэтанол и 0,1 mM ЭДТА. 30 г клеток суспендировали в 10 мл буфера 4-кратной концентрации с 1 M NaCl, 0,05% лизоцимом и 35 мкг/мл PMSF, инкубировали 1 ч, разрушали ультразвуком и осветляли при 15000 об/мин 35 мин. Затем проводили гель-фильтрацию экстракта на колонке с Bio-Gel A-0,5 m (Bio-Rad, США) объемом 500 мл и высотой 70 см с 0,3 M NaCl. 500 мл элюата собрали в 50 пробирок. Фракции 13—19, содержащие рестриктазную активность, диализовали и наносили на колонку с фосфоцеллюлозой P11 (Whatman, Англия) объемом 20 мл. Колонку промывали 0,2 M NaCl, затем градиентом NaCl от 0,2 до 0,45 M объемом 400 мл. Градиент собрали в 30 пробирок, в которых выявляли активность двух рестриктаз (рис. 1). Из пробирок с фракциями 12—15 собрали раствор, содержащий мелкощепящую рестриктазу, которую назвали FallI, а из фракций 18—20 — среднещепящую Fall. Последнюю наносили на колонку гидроксилапатита объемом 1,5 мл, уравновешенного 10 mM K — фосфатным буфером (pH 7,2) с 0,1 M NaCl. Колонку промывали 10 мл того же буфера и элюировали фермент в градиенте от 0,01 до 0,4 M K-фосфатного буфера с 0,1 M NaCl объемом 80 мл, собирая его в 50 пробирок. Фракции 26—30, содержащие Fall, диализовали против 0,2 M NaCl и наносили на колонку фосфоцеллюлозы P11 объемом 4 мл. Колонку промывали 10 мл 0,2 M NaCl, затем градиентом NaCl от 0,2 до 0,4 M объемом 60 мл, который собирали в 40 пробирок. Фракции 27—33 диализовали против буфера, содержащего 10 mM трис-HCl, pH 7,5, 7 mM β-меркаптоэтанол, 0,25 M NaCl, 0,1 mM ЭДТА и 50%-ный глицерин. Для стабилизации фермента к нему добавляли ацетилованный БСА (Promega, США) до 0,2 мг/мл. Получили 2,5 мл препарата Fall с активностью 1500 ед/мл, который хранили при -20°. Вторую рестриктазу выделяли таким же образом. После хроматографии на гидроксилапатите FallI собирали фракции 18—24, а после рехроматографии на фосфоцеллюлозе P11 — фракции 20—26.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 1. Определение рестриктазной активности по расщеплению λ ДНК в присутствии SAM во фракциях после первой хроматографии на фосфоцеллюлозе P11

М—маркеры длины фрагментов ДНК (λ/ BssT1I);

2—30—фракции градиента NaCl

За единицу активности Fall принимали количество фермента, необходимое для полного

специфического расщепления 1 мкг ДНК фага λ , за 1 ч при 37° в 20 мкл буфера W: 10 mM трис-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl и 1 mM ДТТ с 30 мкМ SAM (New England Biolabs, США). Реакцию останавливали добавлением 5 мкл смеси 0,25 M Na-ЭДТА (pH 8), 50% сахарозы и 0,25% бромфенолового синего. Фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 1%-ной агарозе (Hybaid-AGS, Германия) в трис-ацетатном буфере с этидийбромидом (0,5 мг/л) при 5 В/см за 1,5 ч по методике [8].

Оптимальные условия рестрикции с использованием Fall и FallI определяли путем расщепления 2,5 мкг ДНК фага λ с 30 мкМ SAM (для Fall) обычно при 37° и 55° в 50 мкл одного из 5 стандартных буферных растворов: 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; и 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. Затем в оптимальном буфере активность фермента определяли при 30°, 40°, 50° и 60°.

Нуклеотидные последовательности, которые узнают рестриктазы Fall и FallI, идентифицировали по картинам фрагментации ДНК фагов λ [9] и T7 [10]. Расщепление ДНК в концентрации 50 мкг/мл проводили 1 ч при 37° в оптимальном буфере. Фрагменты разделяли с помощью электрофореза с маркером длины фрагментов ДНК (λ ДНК/BssT11) в 1 %-ной агарозе при 5В/см за 4 ч.

Для определения нуклеотидов, между которыми Fall расщепляет цепи ДНК, сайт, узнаваемый этой рестриктазой, встроили в плазмиду pUC19 [11] вблизи области праймера M13. Для этого по методикам [8] ДНК плазмиды с фрагментом вируса коровьей оспы [12] расщепляли рестриктазой Bse21I по сайту 5'-CC↓TNAGG-3' и достраивали 5'-выступающие концы при помощи фрагмента Кленова. Полученные фрагменты ДНК дополнительно расщепляли рестриктазой BamHI по сайту 5'-G↓GATCC-3'. Среди прочих был фрагмент длиной 273 п.н., имеющий слева липкий конец 5'-GATC (BamHI), через 45 п.н. от него — сайт, узнаваемый Fall, и справа — затупленный конец. При помощи ДНК-лигазы фага T4 встраивали полученные фрагменты в полилинкер плазмиды pUC19, расщепленной рестриктазами BamHI и SmaI. После трансформации *E. coli* отобрали клон, несущий плазмиду с нужной вставкой, ДНК плазмиды выделяли и секвенировали вставку дидезокси-методом [13, 14]. Для этого обратный праймер M13 (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), комплементарный 480—464 нуклеотидам верхней цепи ДНК pUC19, метили при помощи полинуклеотидкиназы фага T4 и γ -³²P-АТФ. Праймер гибридизовали с плазмидной ДНК и достраивали нижнюю цепь термосеквеназой в присутствии 4 дезоксинуклеозидтрифосфатов с добавлением одного из дидезоксинуклеозидтрифосфатов для терминации реакции после его встраивания. Таким образом определяли последовательность вставки с сайтом, который узнает Fall. Для определения точек расщепления на меченой цепи ДНК, достроенной без дидезоксинуклеозида, ее частично расщепляли рестриктазой Fall. Для определения же точек расщепления на немеченой цепи, наоборот, сначала ДНК расщепляли рестриктазой Fall, а затем достраивали до точек расщепления меченую цепь. Фрагменты разделяли электрофорезом в 6%-ном ПААГ с 6 M мочевиной и сканировали гель на приборе Cyclone (Packard, США).

Препараты ферментов рестриктаз BamHI и Bse21I (прототип — Saul), большой фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I, Vent ДНК-полимераза, T4 полинуклеотидкиназа, а также ДНК фагов λ и T7, плазида pUC19, маркер λ /BssT11, обратный олигонуклеотидный праймер M13 для pUC 19

ДНК, а также дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, использованные в работе, произведены в НПО "СибЭнзим" (г. Новосибирск).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм — продуцент рестриктаз, выделенный из пресной воды, имеет следующие характеристики. Клетки — неподвижные, грамтрицательные палочки размером 0,5х1,5 мкм, располагаются поодиночке или парами. Штамм — аэробный, каталазо- и оксидазоположительный, не восстанавливает нитрат в нитрит. Расщепляет казеин, крахмал и твин 80. Образует кислоту из глюкозы, мальтозы и лактозы, но не из арабинозы, галактозы, рамнозы, сахарозы, маннита, сорбита, дульцита, инозита, глицерина, этанола и ацетата. На минеральной среде с углеводами штамм не растет; на питательном агаре Лурия растет при pH 7—8, температуре от 10° до 30°, концентрации NaCl от 0 до 1%. Колонии на питательном агаре круглые 3—4 мм в диаметре выпукло-приплюснутые, блестящие, грязно-желтого цвета. В бульоне со встряхиванием клетки образуют однородную муть, при центрифугировании оседают в виде рыхлого полужидкого осадка желто-оранжевого цвета. Штамм идентифицировали по определителю [7] как вид бактерии *Flavobacterium aquatile* Ob10, а его рестриктазы называли Fall и FallI, согласно номенклатуре [15].

Рестриктазы выделяли, как описано в "Условиях эксперимента".

Температура, °C	Активность Fall в различных буферах, %				
	B	G	O	W	Y
37	25	50	75	100	50
55	6	12	25	25	12

Таблица 1. Относительная активность Fall при расщеплении λ ДНК при 37° и 55° в стандартных условиях в присутствии 30 мкМ SAM

Оптимальные условия действия рестриктазы Fall определяли в 5 стандартных буферных смесях при 37° и 55° (табл. 1). Фермент наиболее активен при 37° в буфере W с добавлением 30 мкМ SAM, который стимулирует активность рестриктазы в десятки раз. В отсутствие SAM максимум активности наблюдался в буфере Y (данные не приведены), который оптимален для сходной BcgIподобной рестриктазы BpII [16]. Вторая рестриктаза FallI наиболее активна при 37° в буфере Y.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 2. Расщепление ДНК рестриктазами Fall (а) и Fall (б)

1 — λ ДНК;

2 — T7 ДНК; M— маркеры (λ BssT1I)

Сайты ДНК, которые узнают рестриктазы Fall и FallI, идентифицировали по картине фрагментации ДНК фагов λ [9] и T7 [10] с использованием программы "DNASIS". Рис. 2, а свидетельствует, что FallI узнает 5'-CGCG-3', и таким образом принадлежит к числу изошизомеров рестриктазы FnuDII. Как и прототип, она расщепляет сайт по центру, что было определено на синтетическом олигонуклеотидном дуплексе (данные не приведены). Другая рестриктаза Fall узнает новую для известных рестриктаз последовательность 5'-AAG(N)₅CTT-3' (см. рис. 2, б). Хотя эта последовательность палиндромна, тем не менее, она сходна с сайтом 5'-(8/13)GAG(N)₅CTC(13/8)-3', который узнает рестриктаза BpII [16]. Сходство последовательностей, а также то, что активность Fall стимулировалась SAM, позволило предположить, что новая рестриктаза подобна Bcgl.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 3. Определение точек ДНК, расщепляемых Fall

1 — ДНК, достроенная термосеквензой с ³²P-меченного праймера, + Fall;

2 — ДНК, расщепленная Fall и достроенная до точек расщепления;

G, A, T и C—терминация достраивания с помощью соответствующих дидезоксинуклеозидов.

Секвенированные нуклеотиды пронумерованы относительно последовательности, узнаваемой Fall (выделена рамкой)

Точки расщепления ДНК рестриктазой Fall определяли, как описано в разделе "Условия эксперимента". На рис. 3 (дорожки G, A, T, C) видно, что на участке ДНК, секвенированной с помощью дидезокси-метода, имеется сайт, который узнает Fall. Меченую цепь рестриктаза расщепляла с двух сторон от узнаваемой последовательности: 5'-↓(N)₈AAG(N)₅CTT(N)₁₃↓-3' (см. рис. 3, дорожка 7). Для определения же точек расщепления на немеченой цепи, наоборот, сначала ДНК расщепляли рестриктазой Fall, а затем достраивали меченую цепь до точек расщепления (см. рис. 3, дорожка 2). Достраивание заканчивалось до и после узнаваемой последовательности: 5'-↓(N)₁₃AAG(N)₅CTT(N)₈-3' — над точками расщепления немеченой цепи. Таким образом, Fall расщепляет обе цепи ДНК на одинаковом расстоянии от узнаваемой последовательности, выщепляя ее в составе фрагмента 5'-(8/13)AAG(N)₅CTT(13/8)-3'.

Фермент	Узнаваемая последовательность	Стимуляция с помощью SAM	Ссылка*
<i>Psrl</i>	(7/12) GAAC(N) ₆ TAC (12/7)	-	i
<i>AloI</i>	(7/12) GAAC(N) ₆ TCC (12/7)	-	[17], f
<i>Ppil</i>	(7/12) GAAC(N) ₅ CTC (13/8)	-	f
<i>BsaXI</i>	(9/12) AC(N) ₅ CTCC (10/7)	-	n
<i>BaeI</i>	(10/15) AC(N) ₄ GTAYC (12/7)	+	[18], n
<i>Bsp24I</i>	(8/13) GAC(N) ₆ TGG (12/7)	+	[19]
<i>BcgI</i>	(10/12) CGA(N) ₆ TGC (12/10)	+	[3,4],n
<i>BpII</i>	(8/13) GAG(N) ₅ CTC (13/8)	+	[13], f
<i>Fall</i>	(8/1 3)AAG(N) ₅ CTT(13/8)	+	i
<i>HaeIV</i>	(7/13) GAY(N) ₅ RTC (14/9)	-	[20]
<i>Hin4I</i>	(8/13) GAY(N) ₅ VTC (13/8)'	-	[21], f
<i>CjePI</i>	(7/13) CCA(N) ₇ TC (14/8)	+	[22]
<i>CjeI</i>	(8/14) CCA(N) ₆ GT (15/9)	+	[22]

Таблица 2. Специфичность эндонуклеаз рестрикции подтипа BcgI

Производители: i—НПО "СибЭнзим", Новосибирск; f—MBI Fermentas, Литва; n—New England Biolabs, США.

Таким образом, Fall относится к BcgI-по-добным рестриктазам. Она похожа по специфичности на рестриктазу BpII [16] и также стимулируется SAM.

В табл. 2 мы расположили 13 известных BcgI-подобных рестриктаз, включая и Fall, с учетом сходства узнаваемых последовательностей. Видно, что эти последовательности часто весьма схожи: так для Psrl и AloI они отличаются только 1-ым нуклеотидом из 7. Все узнаваемые последовательности внутри вырожденные. Для BpII, Fall и HaeIV они палиндромные, что характерно и для рестриктаз типа II. Асимметричные вырожденные последовательности делают сходными по субстратной специфичности BcgI-подобные ферменты и рестриктазы типа I. Фрагменты ДНК, которые выщепляют BcgI-подобные ферменты, весьма похожи. Их длина составляет обычно 32, иногда 33 и 34 нуклеотидные пары. Концы фрагментов — 3'-выступающие, имеют длину от 2 до 6 нуклеотидов. 7 рестриктаз стимулируются в присутствии SAM. В настоящее время из 13 BcgI-подобных рестриктаз 9 являются коммерчески доступными. Fall как рестриктаза с неизвестной ранее специфичностью, возможно, найдет применение в молекулярных-генетических работах. Например, как BcgI-подобная рестриктаза она может быть использована для создания перекрывающихся геномных библиотек [23].

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BCA — бычий сывороточный альбумин;
ДТТ — дитиотреитол;
PMSF — фенилметилсульфонилфторид;
SAM — S-аденозилметионин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts, R. J. Mace lis, D. II Nucleic Acids Res. — 2001. — V. 29. —P. 268—269.
2. Kong, H., Morgan, R. D., Maunus, R. E., Schildkraut, I. II Nucleic Acids Res. — 1993. — V. 21. — P. 987—991.
3. Kong, H., Roemer, S. E, Waite—Rees, P. A., et al // J. Biol. Chem. — 1994. — V. 269. — P. 683—690.
4. 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". — Пущино-на-Оке. — М, 1981. —С. 50—51.
5. Дедков В. С., Дегтярёв С. Х. II Приклад. биохим. — 1991. — Т. 28. — С. 309—313.
6. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. / Под ред. Н. С. Егорова. — М, 1995.
7. Определитель бактерий Берджи. / Под ред. Дж. Хоулта и др.: 9-е издание в 2-х томах: Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. — М: Мир, 1997.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. — М.: Мир, 1984.
9. Sanger, F, Coulson, A. R., Hong, G F, et al // J. Mol. Biol. — 1982. —V. 162. —P. 729—773.
10. O.Dunn,J.,Studier,F. W. II J. Mol. Biol. —1983.— V. 166.— P. 477—535.
11. Yanisch—Perron, C, Vieira, J., Messing, J. II Gene. —1985. — V. 33. —P. 103—119.
12. Shchelkunov, S. N., Safronov, P. F., Totmenin, A. V., et al. II Virology. — 1998. — V. 243. — P. 432—460.
13. Sanger, F, Nicklen, S, Coulson, A. R. II Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1977. — V. 74. — P. 5463—5467.
14. От K Y.,SeebwgPH.limA.—1985.— V.4.—P. 165—170.
15. Smith, H. O., Nathans, D. //J. Mol. Biol.—1973.—V. 81.— P. 419—423.
16. Vitkute, J., Maneliene, Z, Petrusyte, M., Janulaitis, A. //Nucleic Acids Res. — 1997. — V. 25. — P. 4444 -4446.
17. Cesnaviciene, E., Petrusyte, M., Kaslauskienes, Z.M., et al. II J. Mol. Biol. — 2001. — V. 314. — P. 205—216.
18. Sears, L. E., Zhou, B., Aliotta, J. M., et al. II Nucleic Acids Res. —1996. —V. 24. —P. 3590—3592.
19. Degtyarev, S. K., Rechkunova, N. I., Zernov, Y. P., et al. // Gene. —1993. —V. 131. —P. 93—95.
20. Piekarowicz, A., Golaszewska, M., Sunday, A. O., et al. // J. Mol. Biol. —1999. —V. 293. —P. 1055—1065.

21. Halford, S E, Bilcock, D. T., Stanford, N. P., et al. // Biochem. Soc. Trans. — 1999. — V. 27. — P. 696—699.
22. Vitor, J. M. B., Morgan, R. D. // Gene. — 1995.— V. 157. — P. 109—110.
23. Poizes, G, Charlier, J.—P., Marcais, B., Be His, M. //DNA Seq. — 1991. — V. 2. — P. 65—67.