

Эндонуклеаза рестрикции Ajnl из *Acinetobacter johnsonii* R2 — изошизомер EcoRII, узнаёт 5'- $\downarrow$ CCWGG-3', но не блокируется dcm-метилированием

Категория: [Новые ферменты](#)

Просмотров: 5262

[В.С. Дедков*](#), Н.А. Михненкова, Л.П. Власенко, Ю.Э. Томилова, Ю.Г. Каширина, Д.А. Гончар, С.Х. Дегтярёв

Биотехнология, 2004, № 3, С. 19-24

Из природных изолятов был выделен новый продуцент эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы), идентифицированный как вид Acinetobacter johnsonii R2, а его рестриктаза названа Ajnl. Описан способ очистки и оценки активности фермента. Показано, что рестриктаза Ajnl образует фрагменты ДНК с 5'-CCWGG выступающими концами, как и EcoRII, но не блокируется dcm-метилированием. Рестриктаза Ajnl может найти широкое применение в генетической инженерии.

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты рестрикции - модификации EcoRII открыты и изучены в числе первых RM-систем [1, 2]. Эндонуклеаза рестрикции (рестриктаза) EcoRII расщепляет ДНК по сайту 5'- $\downarrow$ CCWGG-3' (W - A или T), образуя 5'-выступающие концы из 5-и нуклеотидов [3]. ДНК метилтрансфераза M.EcoRII защищает хозяйскую ДНК от своей рестриктазы, модифицируя внутренний цитозин в последовательности 5'-C(5mC)WGG-3' на обеих цепях ДНК [1, 4]. Многие лабораторные штаммы *E. coli* имеют dcm-метилтрансферазу [5, 6], которая модифицирует ДНК идентично M.EcoRII. Плазмиды, выделенные из таких штаммов, устойчивы к действию рестриктазы EcoRII и её изошизомеров, что ограничивает применение этих ферментов в генетической инженерии. Неошизомеры рестриктазы EcoRII, подобные ApyI [7], MvaI [8, 9] и BstNI [10, 11], не блокируются dcm-метилированием, но расщепляют ту же последовательность ДНК иначе, по сайту 5'-CC $\downarrow$ WGG-3'. Такие изошизомеры во многих случаях могут заменить прототип, однако, не во всех. В генетической инженерии, например при получении геномных библиотек, удобно линеаризовать вектор крупнощепляющей рестриктазой, а донорную ДНК фрагментировать мелкощепляющим ферментом, образующим комплементарные концы ДНК. Не смотря на большое число прототипов, подобрать такую пару ферментов не просто, особенно если желательны выступающие 5'-концы. Такую пару могут составить рестриктазы SexAI (узнаёт 5-A $\downarrow$ CCWGGT-3') и EcoRII (узнаёт 5- $\downarrow$ CCWGG-3'). К сожалению, оба фермента чувствительны к dcm-

метилованию. Недавно обнаруженный нами фермент *MabI* - изошизомер рестриктазы *SexAI*, не блокируется dcm-метилированием, но подобных изошизомеров рестриктазы *EcoRII* ранее обнаружено не было.

Целью данной работы было получение и изучение некоторых свойств новой рестриктазы *Ajnl* из бактерии *Acinetobacter johnsonii* R2, которая является изошизомером *EcoRII* и не чувствительна к dcm-метилированию.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штамм *A. johnsonii* R2 выделен нами из пресной воды при поиске рестриктаз по методике [12, 13]. Морфологические и физиолого-биохимические свойства штамма изучали с использованием методик [14]. Определение микроорганизма до вида проводили по определителю [15].

A. johnsonii R2 выращивали до насыщения в 24-х качалочных колбах объёмом по 700 мл, содержащих по 300 мл среды, содержащей: 1% триптона (Organotechnie, Франция), 0.5% дрожжевого экстракта (той же фирмы), 0.5% NaCl, 0.05% MgCl₂, 0.001% тиамин, pH 7.5 в инкубаторе G-25 (New Brunswick, США) при 28°C со встряхиванием 170 об/мин в течение 20 ч. Клетки (33 г) осаждали центрифугированием при 8000 об/мин и замораживали.

Для определения стадии роста культуры оптимальной для выделения рестриктазы измеряли в пробах оптическую плотность при 550 нм в 1 см (ОП₅₅₀). Клетки из 1 мл осаждали и замораживали. Осадки суспензировали до 10 ОП₅₅₀ в буфере, содержащем 0.02% лизоцим (Serva, Германия), 0.1% тритон X-100 в ТЕ-буфере: 10 mM трис-HCl (pH 7.7) и 1 mM ЭДТА. Лизис проводили 0.5 ч при 22°C. 100 мкл лизата дополняли буфером Y (см. далее) и 60 мкл отбирали в ячейку, содержащую 6 мкл λ ДНК (500 мкг/мл в ТЕ-буфере). Делали 5 последовательных 2-кратных разведений в пробах по 30 мкл смеси, содержащей 50 мкг/мл λ ДНК в буфере Y. Пробы инкубировали 2 ч при 55°C и анализировали мини-электрофорезом в 1% агарозе в трис-ацетатном буфере с этидийбромидом (0.5 мкг/л) при напряжении 5В/см за 70 мин по методике [16]. Маркёром длин ДНК служила λ ДНК, фрагментированная *BssT1*I. За единицу активности *Ajnl* принимали полное специфическое расщепление ферментом 1 мкг ДНК фага λ за 1 ч в этих условиях, а за единицу активности нуклеаз - гидролиз ДНК до 100 н.п. Обе активности относили к единице ОП₅₅₀ в 1 мл.

Выделение рестриктазы *Ajnl* проводили при 4°C. Все растворы содержали 10 mM К фосфатный буфер (pH 7.2), 7 mM β-меркаптоэтанол и 0.1 mM ЭДТА. 20 г клеток суспензировали в 60 мл 0.2 M NaCl с 0.03% лизоцимом и инкубировали 16 ч. Клетки разрушали ультразвуком и центрифугировали при 15000 об/мин 40 мин. Экстракт разбавляли 2-мя объёмами буфера и пропускали через колонку с фосфоцеллюлозой P11 (Whatman, Англия) объёмом 40 мл. Нуклеазы не задерживались. Колонку промывали 0.05 M NaCl, затем градиентом NaCl от 0.05 до 0.6 M (объёмом 400 мл). Элюат собирали в 50 пробирок. Фракции 17-23, содержащие фермент, объединяли и наносили на колонку с 5 мл гидроксилapatита и промывали 0.2 M NaCl. Фермент смывали в градиенте К фосфатного буфера в концентрации от 0.01 до 0.25 M объёмом 120 мл в 50 пробирок. Фракции 18-23 диализовали 1 ч против 1 mM K₂HPO₄, наносили на колонку с 4 мл гепарин-сефарозы (Sigma, США) и промывали её 0.05 M NaCl. Фермент смывали в градиенте NaCl от 0.05 до 0.6 M объёмом 100 мл в 50 пробирок. Фракции 18-24 диализовали против буфера с 50%-ным глицерином и хранили при -20°C.

Оптимальные условия активности рестриктазы определяли путём расщепления ДНК фага λ (50 мкг/мл в 50 мкл) при 37 и 55°C в 5 стандартных буферных растворах: буфер В - 10 мМ трис-НСl (рН 7.6 при 25°C), 10 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ ДТТ; буфер G - 10 мМ трис-НСl (рН 7.6), 10 мМ $MgCl_2$, 50 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ; буфер О - 50 мМ трис-НСl (рН 7.6), 10 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ; буфер W - 10 мМ трис-НСl (рН 8.5), 10 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ; буфер Y - 33 мМ трис-ацетат (рН 7.9), 10 мМ ацетат магния, 66 мМ ацетат калия и 1 мМ ДТТ. Инкубацию проб проводили 1 ч и анализировали электрофорезом. Затем в оптимальном буфере активность определяли при 30, 40, 50, 60 и 70°C.

Для определения места расщепления ДНК рестриктазой использовали синтетический дуплекс с последовательностью, узнаваемой *Ajnl*. Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы по методике [17]. По методикам [16] каждую цепь метили по 5'-концу при помощи T4 полинуклеотидкиназы и γ - ^{32}P -АТФ и гибридизовали с немеченой комплементарной цепью. Полученные таким образом меченые модификации дуплекса расщепляли рестриктазами *Ajnl*, а также *Psp6I* и *Bst2UI*. Фрагменты разделяли электрофорезом в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной. Гель сканировали на приборе "Cyclone" (Packard, США). Для контроля разделения фрагментов по нуклеотидам дуплекс обрабатывали экзонуклеазой III из *E.coli*.

Препараты ферментов: рестриктаз *Bst2UI* и *Psp6I*, экзонуклеазы III из *E.coli* и T4 полинуклеотидкиназы; а также препараты ДНК: фага λ , плазмиды PBR322 и маркера λ /BssT1I, использованные в работе, произведены в НПО "СибЭнзим".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериальный штамм продуцент рестриктазы *Ajnl* имеет следующие характеристики. Клетки неподвижные короткие палочки размером 1.3x2 мкм; располагаются одиночно, попарно, а также цепочками; спор не образуют. По Граму окрашиваются отрицательно и выглядят как кокки располагающиеся парами. Штамм аэробный, каталазоположительный и оксидазоотрицательный. Растёт на минимальном агаре с этанолом, ацетатом, аланином и аргинином но не с глюкозой, лактозой, рамнозой, арабинозой, сахарозой, мальтозой, галактозой, сорбитом, маннитом, дульцтом, инозитом, глицерином, цитратом, глицином, орнитином и гистидином. Небольшое количество кислоты образует при росте на питательном агаре с этанолом, но не с углеводами или с многоатомными спиртами. Не гидролизует желатин. Растёт при концентрации NaCl от 0 до 3%, рН 6.8 - 7.7, температуре от 4 до 30°C, но не при 37°C. Чувствителен к ампициллину, канамицину и хлорамфениколу, но устойчив к тетрациклину при концентрации антибиотика в питательном агаре 50 мкг/мл. В питательном бульоне Лурия без встряхивания культура образовывала гомогенную муть и осадок, а при концентрации NaCl 1.5 и 3% также и поверхностную плёнку. На питательном агаре колонии вырастали за 2 дня при 22°C и были круглые, расплывающиеся до 2 см в диаметре, приплюснутые и немного выпуклые в центре, зернисто-блестящие, полупрозрачные, сероватые с салатным оттенком. Штамм идентифицировали по определителю [15] как вид бактерии *Acinetobacter johnsonii* R2, а его рестриктазу называли *Ajnl* по номенклатуре [18].

Содержание рестриктазы и нуклеазы в культуре определяли как описано (см. "Условия эксперимента"). На рис. 1. представлена калибровочная электрофореграмма для определения активности рестриктазы *Ajnl* в лизате клеток. Полный специфический гидролиз субстратной ДНК

виден в 3-х разведениях лизата. Активность *Ajnl* в клетках после 48 ч выращивания соответствует 10 ед/ОП₅₅₀. В лизате клеток (дорожка 1) видно, что хозяйская ДНК содержит и плазмиды, в виде слабых полосок.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 1. Определение активности *Ajnl* в лизате *A. johnsonii* R2 после 48 ч роста. 1 - лизат клеток при плотности 10 ОП₅₅₀, 2 - λ ДНК + лизат 10 ОП₅₅₀, 3 - 5, 4 - 2.5, 5 - 1.25, 6 - 0.6, 7 - 0.3, 8 - 0 (λ ДНК без лизата). М - маркер (λ ДНК/*Bss*T1I)

Стадия роста культуры определяет урожай клеток, но от неё зависит и биосинтез целевого продукта. На рис. 2а видно, что в первые часы культивирования в клетках много нуклеазы, которая гидролизует ДНК до мелких фрагментов. Тем не менее, активность рестриктазы также проявляется, причём при разбавлении лизатов (рис. 2б) она видна во всех пробах. На рис. 3 видно, что стационарная фаза после 24 ч роста культуры представляется оптимальной для наработки биомассы, поскольку при наибольшем урожае клеток в них достаточно рестриктазы и уже нет нуклеаз. Кроме того, получать биомассу стационарной культуры технологически проще, чем логарифмической.

Рис. 2. Определение рестриктазы *Ajnl* и нуклеазы у *A. johnsonii* R2 в процессе его роста: а - плотностью клеток для лизиса 5 ОП₅₅₀, б - 0.6 ОП₅₅₀. Время роста: 1 - начало роста (0 ч), 2 - 2 ч, 3 - 4 ч, 4 - 6 ч, 5 - 24 ч, 6 - 48 ч. М - маркер, λ ДНК/*Bss*T1I

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 3. Содержание нуклеазы и рестриктазы *Ajnl* у *A. johnsonii* R2 в процессе роста

Биомассу *A. johnsonii* R2 выращивали при аэрации в модифицированном бульоне Лурия. Из 1 л получали 4 г клеток. Фермент выделяли из клеточного экстракта с помощью последовательных хроматографических процедур на колонках фосфоцеллюлозы P11, гидроксилапатита и гепарин-сефарозы. Из 20 г клеток получали 3.5 мл препарата *Ajnl* с активностью 5000 ед/мл. Оптимальные условия действия рестриктазы *Ajnl* определяли в пяти стандартных буферных смесях при 37°C и 55°C (см. таблицу). Фермент наиболее активен при 55°C в буфере Y (см. "Условия эксперимента").

Температура, °C	Активность <i>Ajnl</i> в различных буферах, %				
	B	G	O	W	Y
37	3	6	6	25	25
55	75	50	12	75	100

Последовательность нуклеотидов ДНК, которую узнаёт рестриктаза *Ajnl*, а также её отношение к dcm-метилированию определяли по картине фрагментации dcm- ДНК фага λ [19] и dcm+ ДНК плазмиды PBR322[20] (Рис. 4). Для сравнения использовали изоизомеры рестриктазы *EcoRII*, из которых *Psp6I* блокировалась dcm-метилированием, а *Bst2UI* - нет. Рестриктазы *Ajnl* *Bst2UI* и *Psp6I* идентично расщепляли dcm- ДНК фага λ. Таким образом, *Ajnl* узнаёт последовательность 5'-CCWGG-3'. Благодаря тому, что фаг был индуцирован из штамма *E. coli* JM110 дефектного по dcm-метилазе [21], его ДНК расщепляется рестриктазой *Psp6I*. Однако, подобно *EcoRII*, фермент *Psp6I* чувствителен к dcm-метилированию (5'-C(5mC)WGG-3') и не расщепляет dcm+ ДНК PBR322 из *E. coli* XL1-Blue [21]. Однако такую ДНК расщепляют рестриктазы *Bst2UI* и *Ajnl*. Также как и *BstNI* рестриктаза *Ajnl* термофильна и не блокируется dcm-метилированием, но также как *EcoRII* она обнаружена в мезофильном виде бактерии. Термофильные изоизомеры *EcoRII* известны, например: *PspGI* из термофила *Pyrococcus species* GI-H [22] или *Psp6I*, который мы

нашли в мезофиле *Pseudomonas species 6* (<http://www.sibenzyme.ru>). Однако, dcm-метилирование эти ферменты блокирует. Поскольку термофильная *Ajnl* не блокируется dcm-метилированием, но обнаружена в мезофильном штамме, мы допустили, что она может отличаться от *BstNI* по месту гидролиза ДНК.

Рис. 4. Гидролиз ДНК для определения сайта узнаваемого рестриктазой *Ajnl*, а также её отношения к dcm-метилированию ДНК: а - dcm- ДНК фага λ; б - dcm+ ДНК плазмиды pBR322; 1 - ДНК + *Bst2UI*; 2 - *Ajnl*; 3 - *Psp6I*; 4 - исходная ДНК; М - маркер, λ ДНК/*BssT1I*.

Нуклеотиды, между которыми *Ajnl* расщепляет цепи ДНК определяли на дезоксирибонуклеотидном дуплексе, содержащем сайт, который узнаёт рестриктаза (в рамке).

5'-AAGGTCA	CCTGG	GACGAACGCGTCGACCGGTATACTAA-3'
3'-TTCCAGT	GGACC	CTGCTTGCGCAGCTGGCCATATGATT-5'

Для идентификации на электрофореграмме 3'-нуклеотидов дуплекс обрабатывали рестриктазой *Bst2UI*, расщепляющей 5'-CC↓WGG-3', а также экзонуклеазой III из *E.coli*. На рис. 5 видно, что рестриктаза *Ajnl* расщепляет цепи дуплекса по 5'-↓CCWGG-3', что соответствует местам гидролиза ДНК рестриктазой *EcoRII*. Однако, в отличие от *EcoRII*, рестриктаза *Ajnl* не блокируется dcm-метилированием ДНК, но является изошизомером рестриктазы *EcoRII*. В базе данных [<http://rebase.neb.com>] подобные изошизомеры *EcoRII* не отмечены. Мы полагаем, что обнаруженный нами фермент *Ajnl* найдёт применение в молекулярно-генетических исследованиях.

13. Дедков В.С., Дегтярёв С.Х. // Приклад. биохим. 1992. Т. 28. С. 309-313.
14. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. / Под ред. Н. С. Егорова М., 1995.
15. Определитель бактерий Берджи. / Под ред. Хоулта Дж. и др.: 9-е издание в 2-х томах: Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина, М., 1997.
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М., 1984.
17. Горбунов Ю.А., Зиновьев В.В., Овечкина Л.Г. и др. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. С. 1629-1637.
18. Smith H.O., Nathans D.// J. Mol. Biol. 1973. V. 81. P. 419-423.
19. Sanger F., Coulson A.R., Hong G.F. et al.// J. Mol. Biol. 1982. V. 162. P. 729-773.
20. Sutcliffe J.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 3737-3741.
21. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual: Second Edition, CSH, USA. - 1989. - V. 3. - Appendix A.9-A.13.
22. Morgan, R., Xiao, J.-P., Xu, S.-Y. // Appl. Environ. Microbiol. - 1998. - V. 64. - P. 3669-3673.