

Новая эндонуклеаза рестрикции Bis I из *Bacillus subtilis* T30 узнаёт метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)↓NGC-3'

Категория: [Новые ферменты](#)

Просмотров: 8309

Е.В. Чмуж, Ю.Г. Каширина, Ю.Э. Томилова, Н.В. Мезенцева, В.С. Дедков, Д.А. Гончар, М.А. Абдурашитов, [С.Х. Дегтярев*](#)

Биотехнология, 2005, № 3, С. 22-26.

*Из природных изолятов выделен бактериальный штамм *Bacillus subtilis* T30, продуцент новой эндонуклеазы рестрикции Bis I. Этот фермент узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)↓NGC-3' и расщепляет ее, как указано стрелкой. Вследствие расщепления только модифицированной ДНК, фермент Bis I может найти широкое применение для определения метилированных участков на эукариотической ДНК.*

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальная система рестрикции-модификации (РМ) второго типа состоит из ДНК-метилтрансферазы (метилазы) и эндонуклеазы рестрикции (ЭР), которые узнают одну и ту же короткую (в большинстве случаев палиндромную) последовательность ДНК. Метилаза модифицирует определенные основания в сайтах узнавания на хозяйской ДНК, тем самым предотвращая ее расщепление соответствующей эндонуклеазой рестрикции. При этом ЭР способна разрушать чужеродную неметилированную ДНК, поступающую в клетку, в частности, ДНК бактериофагов. Таким образом, системы РМ защищают бактериальные клетки от вирусных инфекций.

В настоящее время известно более 250 ферментов рестрикции различных специфичностей (прототипов), большая часть которых относится ко второму типу и широко применяется в современной биотехнологии и молекулярной биологии [1]. Среди эндонуклеаз рестрикции второго типа известен всего один прототип, фермент DpnI, который узнаёт и расщепляет метилированную последовательность нуклеотидов 5'-G(6mA)⁺TC-3' и не расщепляет неметилированную ДНК. Однако модифицированным основанием в сайте узнавания DpnI является аденин [2]. Из эндонуклеаз, не относящихся к ЭР второго типа, известен фермент

McrBC, который узнает две разнесенные метилированные последовательности Pu(mC), но требует GTP в качестве кофактора и гидролизует ДНК в произвольном положении [3]. Можно также отметить, что существуют ферменты репарации класса VSR, расщепляющие полуметилированные субстратные ДНК по одной из цепей [4].

В данной работе описаны свойства новой эндонуклеазы рестрикции Bisl, узнающей и расщепляющей нуклеотидную последовательность 5'-G(5mC)↓NGC-3'. Данный фермент не требует для проявления активности кофакторов кроме ионов Mg^{2+} , и, следовательно, относится ко второму типу эндонуклеаз рестрикции. Так как он гидролизует только метилированную ДНК, его можно отнести к подтипу IIM, согласно предложенной недавно номенклатуре [5].

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Выращивание штамма-продуцента и выделение фермента. Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства штамма-продуцента *Bacillus subtilis* T30 изучали с использованием методик [6]. По совокупности морфологических и биохимических свойств и на основании анализа рибосомальной 16S РНК штамм был определен как *Bacillus subtilis* T30 [7].

Выращивание штамма проводили в ферментёре объемом 20 литров (LKB, Швеция) при температуре 30°C в питательной среде, содержащей 1% триптона (Organotechnie, Франция), 0.5% дрожжевого экстракта (Organotechnie, Франция), 0.5% NaCl и 0.05% $MgCl_2$, при pH 7.5 с аэрацией 10 л/мин и перемешиванием 200 об/мин. При достижении культурой поздней логарифмической стадии роста клетки осаждали с помощью центрифугирования. В результате получили 100 г биомассы, которую хранили при -20°C.

Выделение фермента проводили при 4°C путем колоночной хроматографии. 15 г сырой биомассы суспендировали в 50 мл лизирующего буфера (10 mM Tris-HCl, pH 7.55, 0.1 mM ЭДТА, 7 mM β-меркаптоэтанол, 0.1 M NaCl, 0.3 мг/мл лизоцим, 0.1 mM фенилметилсульфонилфторид (PMSF)) и инкубировали в течение 3 ч. при постоянном перемешивании. Далее клетки разрушали ультразвуком и центрифугировали в течение 30 мин при 15000 об/мин. Экстракт пропускали через колонку с фосфоцеллюлозой P-11 («Whatman», Англия) объемом 40 мл. Колонку промывали 80 мл буфера А (10 mM Tris-HCl, pH 7.55, 0.1 mM ЭДТА, 7 mM β-меркаптоэтанол) с 0.1 M NaCl, затем линейным градиентом NaCl (0.15-0.65 M) в буфере А объемом 400 мл, собирая фракции по 8 мл. Фракции, содержащие эндонуклеазу, объединяли, диализовали против 20 объемов буфера А с 0.1 M NaCl и наносили на колонку с 7 мл гепарин-сефарозы («Bio-Rad», США). Элюцию проводили линейным градиентом NaCl (0.2M-0.65 M) в буфере А объемом 140 мл, собирая фракции по 2.8 мл. Активные фракции объединяли, диализовали против 20 объемов буфера А с 0.1 M NaCl и наносили на колонку с 4 мл фосфоцеллюлозы P-11 («Whatman», Англия). Фермент элюировали линейным градиентом NaCl (0.2-0.65 M) в буфере А объемом 80 мл, собирая фракции по 2 мл. Активные фракции объединяли и диализовали против 20 объемов концентрирующего буфера (50% глицерин, 10 mM Tris-HCl, pH 7.55, 0.1 mM ЭДТА, 7 mM β-меркаптоэтанол, 0.1 M NaCl). Препарат хранили при -20°C.

Выявление активности фермента

В качестве субстрата для определения активности *BisI* использовалась плаزمида *pFsp4HI1*, линейаризованная ЭР *BamHI*. Данная плазмида содержит ген ДНК метилтрансферазы *M.Fsp4HI*, которая метилирует первое цитозиновое основание в последовательности 5'-GCNGC-3'. Как было предварительно установлено, наибольшую активность *BisI* проявляет в буфере следующего состава: 10 mM Трис-НСl (pH 9.0), 10 mM MgCl₂, 150 mM KCl и 1mM дитиотреитол. Поэтому все эксперименты по расщеплению различных субстратных ДНК ферментом *BisI* проводили в данном буфере. Реакции проводились в 50 мкл реакционной смеси, содержащей ДНК, при 37°C в течение 1 часа. Фрагменты ДНК разделялись гель-электрофорезом в 1% и 2% агарозе.

Определение сайта узнавания и позиций гидролиза ДНК

Сайт узнавания новой эндонуклеазы рестрикции устанавливали путем сравнения картины гидролиза ДНК *pFsp4HI1* ферментом *BisI* с теоретически рассчитанной картиной расщепления этого же субстрата по сайту GCNGC. Определенный таким образом сайт узнавания был подтвержден в дальнейших экспериментах по расщеплению ДНК плазмиды *pUC19*, модифицированной ДНК-метилтрансферазой *M.Fsp4HI*, а также гидролизом синтетических олигонуклеотидных дуплексов.

Позиции гидролиза в сайте узнавания были установлены с помощью определения длин фрагментов, образуемых при расщеплении [³²P]-меченных синтетических олигонуклеотидов ферментом *BisI*. Для разделения продуктов гидролиза применяли электрофорез в 20% ПААГ в трис-боратном буфере, содержащем 7 М мочевины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериальный штамм-продуцент фермента *BisI* имеет следующие характеристики. На среде Лурия-Бертрани образует светло-серые, непрозрачные, зернистые, слегка выпуклые колонии с ровными краями. Клетки подвижные, палочковидные, размером 0.6-0.8x1.5-2.5 мкм, часто формирующие цепочки. Образуют эллиптические центрально-расположенные эндоспоры без разбухания спорангия. Не способны к анаэробному росту, каталазоположительные, реакция Фогес-Проскауэра положительная. Гидролизуют крахмал и казеин, не деградируют тирозин. Образуют кислоты из D-глюкозы, D-ксилозы, D-маннитола и D-арабинозы.

Биомассу *Bacillus subtilis* T30 выращивали при аэрации в питательном бульоне. Из 1 л получали 5.0 г клеток. Фермент выделяли из клеточного экстракта путём последовательных хроматографических процедур, как описано в разделе "Условия эксперимента". В результате получали 2 мл препарата *BisI* с активностью 200 ед/мл.

Эндонуклеаза *BisI* не гидролизует стандартные вирусные и плазмидные ДНК, используемые для нахождения и определения активности эндонуклеаз рестрикции, такие как ДНК фагов λ(*dam*+/*dcm*+ и *dam*-/*dcm*-), T7, аденовируса-2, плазмид *pUC19* и *pBR322*. При этом новый фермент специфически расщепляет ДНК плазмиды *pFsp4HI1*, которая метилирована по сайтам 5'-GCNGC-3', благодаря содержащемуся в ней гену метилазы *M.Fsp4HI* (рис. 1Б). При этом, как видно из рисунка, длины фрагментов, полученные экспериментально, хорошо совпадают с расчетными размерами фрагментов ДНК, полученных при расщеплении плазмиды *pFsp4HI1* по

сайтам 5'-GCNGC-3'. В экспериментах были также протестированы плазмиды, содержащие гены других бактериальных метилаз, метилирующих цитозиновые основания в ДНК: M.HhaI (сайт узнавания GCGC), M.FauI A и M.FauI B (сайты узнавания CCCGC и GCGGG, соответственно). При инкубации данных плазмид с препаратом BspI гидролиз ДНК не происходит. Из полученных результатов следует, что фермент BspI узнает и расщепляет последовательность ДНК 5'-GCNGC-3', метилированную ферментом M.Fsp4HI. Для подтверждения сайта узнавания фермента BspI ДНК плазмиды pUC19 была исчерпывающе метилирована ДНК-метилтрансферазой M.Fsp4HI, модифицирующей последовательности 5'-GCNGC-3'. Из рис. 1А видно, что ДНК плазмиды pUC19 устойчива к действию фермента BspI, но расщепляется эндонуклеазой рестрикции Fsp4HI (сайт узнавания 5'-GCNGC-3'). Тогда как ДНК плазмиды pUC19, модифицированная ферментом M.Fsp4HI, наоборот, устойчива к действию рестриктазы Fsp4HI, но расщепляется эндонуклеазой рестрикции BspI. При этом, картины гидролиза в обоих случаях совпадают. Таким образом, все полученные экспериментальные данные показывают, что сайтом узнавания новой эндонуклеазы рестрикции BspI является метилированная последовательность 5'-GCNGC-3'.

Рис. 1. Сравнение длин фрагментов, образуемых при расщеплении плазмидных ДНК, линейаризованных ЭР BamHI, эндонуклеазами BspI и Fsp4HI. **А** - электрофорез в 2% агарозном геле; **Б** - в 1% агарозном геле. pUC19met - ДНК плазмиды pUC19, метилированная ферментом M.Fsp4HI. М - маркер молекулярного веса 1 Kb (СибЭнзим). В правом столбце приведены расчетные длины фрагментов ДНК, получаемых при расщеплении плазмиды pFsp4HI1 по сайтам 5'-GCNGC-3' и длина исходной плазмиды, линейаризованной рестриктазой BamHI.

Для подтверждения этих данных и определения места гидролиза ДНК, были проведены эксперименты по расщеплению ряда синтетических олигонуклеотидных дуплексов, содержащих эту последовательность с метилированным или неметилированным цитозиновым остатком (сайты 5'-GCNGC-3' подчеркнуты):

L7: 5' GAGTTTAGGCGGCTATCGATCT 3'

L8: 5' AGATCGATAGGCGGTAAACTC 3'

L9: 5' GAGTTTAG(5mC)GGCTATCGATCT 3'
L10: 5' AGATCGATAG(5mC)CGCTAAACTC 3'
L11: 5' GAGTTTAG(5mC)AGCTATCGATCT 3'
L12: 5' AGATCGATAG(5mC)TGCTAAACTC 3'

Полученные результаты представлены на рисунке 2. Как следует из электрофореграммы, Bsl действительно расщепляет лишь метилированные нуклеотидные последовательности 5'-G(5mC)NGC-3'.

Рис. 2. Расщепление олигонуклеотидных дуплексов эндонуклеазами Bsl и Fsp4Hl. Меченные олигонуклеотиды отмечены знаком *.

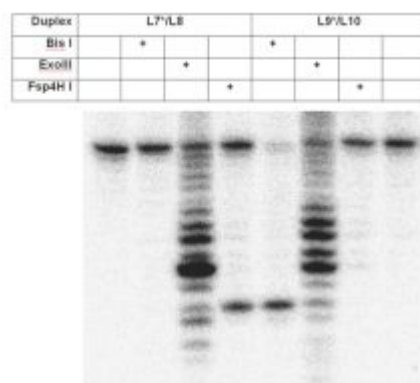
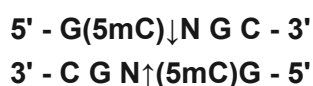


Рис. 3. Определение места расщепления ДНК эндонуклеазой Bsl на олигонуклеотидных

дуплексах. Меченные олигонуклеотиды отмечены знаком *. ExoIII - экзонуклеаза III из *E. Coli* (использована для получения маркеров длин фрагментов олигонуклеотида).

На рисунке 3 приведены результаты гидролиза олигонуклеотидных дуплексов L7/L8 и L9/L10 эндонуклеазами BslI и Fsp4NI. Сравнение длин фрагментов, образуемых при расщеплении этих субстратов, указывает на то, что BslI расщепляет метилированный дуплекс так же, как Fsp4NI расщепляет аналогичный неметилированный дуплекс. Следовательно, BslI расщепляет сайт узнавания как показано стрелками:



Детальное изучение расщепления различных метилированных олигонуклеотидов ферментом BslI будет описано в последующих публикациях.

Таким образом, в настоящей работе мы описали новую сайт-специфическую эндонуклеазу рестрикции BslI, продуцируемую штаммом *B. Subtilis* T30. Следует подчеркнуть, что это первый обнаруженный сайт-специфический фермент рестрикции второго типа, сайтом узнавания которого является палиндромная нуклеотидная последовательность, содержащая 5-метилцитозин. Вероятно, эндонуклеаза рестрикции BslI не является членом классической двухкомпонентной системы РМ, поскольку в этом случае необходимость защиты хозяйской ДНК от ЭР отпадает. Косвенным подтверждением этого предположения служит нечувствительность хромосомной ДНК штамма-продуцента к действию BslI (данные не приведены).

На наш взгляд, узнавание метилированных участков ДНК, свойственное BslI, может рассматриваться как следующий этап в эволюции отношений между бактериями и фагами. Как показывает анализ расшифрованных геномов бактерий, системы РМ широко распространены среди прокариот. Это, вероятно, вызвало появление бактериофагов, несущих гены метилаз, что обеспечивает устойчивость их ДНК к действию, по крайней мере, некоторых бактериальных эндонуклеаз рестрикции. В частности, известен ряд бактериофагов рода *Bacillus*, которые содержат мультиспецифические ДНК-метилазы, осуществляющие модификацию цитозиновых оснований с образованием 5-метилцитозина в ДНК этих фагов [8]. Присутствие в бактериальной клетке эндонуклеазы, подобной BslI, может служить защитой от фагов, содержащих метилированную ДНК.

Следует отметить, что BslI может найти применение для выявления и анализа метилированных участков ДНК эукариот, которые обычно содержат значительную долю 5-метилцитозиновых оснований. Как известно, эта нуклеотидная модификация играет большую роль в регуляции клеточных процессов, но до сих пор остается недостаточно изученной [9].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J., and Macelis, D. // Nucleic Acids Res. - 2003. - V. 31. - P. 418-420.
2. Lacks, S., and Greenberg, B.J. // Biol. Chem. - 1975. - V. 250. - P. 4060-4066.
3. Sutherland, E., Coe, L., and Raleigh, E.A. // J. Mol. Biol. - 1992. - V. 225. - P. 327-358.
4. Hennecke, F., Kolmar, H., Brundl, K., and Fritz, H.-J. // Nature. - 1991. - V. 253. - P. 776-778.
5. Roberts, R.J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A.S., Bickle T.A., et al. // Nucleic Acids Res. - 2003. - V. 31. - P. 1805-1812.
6. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. - М., 1995.
7. 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.
8. Gunthert, U., Lauster, R., and Reiners, L. // Eur. J. Biochem. - 1986. - V. 159. - P. 485-492.
9. Costello, J.F., and Plass, C. // J. Med. Genet. - 2001. - V. 38. - P. 285-303.