

BstKTI – новый dam-чувствительный неошизомер эндонуклеазы рестрикции MboI, способный гидролизовать полуметилированный субстрат

Категория: [Исследование свойств ферментов](#)

Просмотров: 4886

[А.Н. Надеев](#), В.А.Чернухин, О.О. Севастьянова, Ю.Э. Томилова, Н.М. Шинкаренко, А.А. Евдокимов, С.Х. Дегтярев

Биотехнология, 2006, №2, с. 5-10

*Обнаружен штамм *Bacillus stearothermophilus* KT, являющийся продуцентом новой эндонуклеазы рестрикции BstKTI, которая является неошизомером рестриктазы MboI, узнающей последовательность 5'-↑GATC-3'. Получен препарат фермента и изучены его свойства, включая субстратную специфичность и место расщепления ДНК. Показано, что гидролиз ДНК осуществляется в положении 5'-GAT↑C-3'. В отличие от других изошизомеров рестриктазы MboI, BstKTI является чувствительным к dam-метилированию, но способен расщеплять полуметилированный по аденину субстрат. Кроме того, BstKTI гидролизует сайт 5'-GATC-3', в котором цитозин модифицирован в положении C5.*

Эндонуклеазы рестрикции узнающие и гидролизующие последовательность двуцепочечной ДНК, 5'-GATC-3', были открыты около тридцати лет назад. В настоящее время описано значительное количество ферментов, различающихся как местом гидролиза, так и чувствительностью к метилированию данного сайта узнавания. Среди известных изошизомеров рестриктазы MboI существуют ферменты чувствительные (то есть не способные расщеплять ДНК) к модификации в сайте узнавания, как аденина (называемые dam-чувствительными), так и цитозина [1]. Это свойство находит различные применения. Например, чувствительность к модификации аденинового остатка позволяет использовать такие ферменты для определения dam-метилирования ДНК и оценки степени такой модификации [2]. Наряду с этим разработан метод получения крупных фрагментов ДНК с помощью рестриктазы MboI, который может быть использован для конструирования геномных библиотек. Этот метод основан на частичном dam-метилировании геномной ДНК.

Среди рестриктаз узнающих последовательность 5'-GATC-3' наиболее часто встречаются изошизомеры MboI, расщепляющие обе цепи ДНК перед гуанином. В настоящее время в литературе описаны и другие неошизомеры MboI. Среди них рестриктаза BspKT6I с неясным

местом расщепления [3,4] и рестриктаза *Chai*, расщепляющая ДНК по сайту узнавания, в положении 5'-GATC↑-3' [5].

Статья посвящена выделению и анализу биохимических свойств нового неоизомера *MboI*, рестриктазы *BstKTI*, гидролизующей ДНК в положении 5'-GAT↑C-3'.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Для получения препарата эндонуклеазы рестрикции *BstKTI* клетки *B.stearothermophilus* КТ выращивали в ферментере (New Brunswick, США) при температуре 37°C. Бульон содержал 1% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт (Organotechnie, Франция), 0,5% NaCl, 0,05% MgCl₂ и 0,001% тиамин. Культуру выращивали в течение 4 ч до ОП₅₅₀ = 1.8, при 55°C, pH 7,5, аэрации воздухом 10 л/мин. Клетки (65 г) осаждали центрифугированием при 8000 об/мин и замораживали.

Выделение фермента *BstKTI* проводили при 4°C с использованием растворов: буфер А - 10 мМ Трис-HCl pH 7,6, 0,1 мМ ЭДТА и 7 мМ 2-меркаптоэтанол, буфер В - 50 мМ Трис-HCl pH 7,6, 0,1 мМ ЭДТА и 7 мМ 2-меркаптоэтанол. Биомассу клеток (20 г) суспендировали в 40 мл буфера А с добавлением 0,4 М NaCl, 1мМ фенилметилсульфонилфторида, 0,1 мг/мл лизоцима, 0,1% Тритона X-100. Клетки разрушали ультразвуком на Soniprep 150 ("MSE", Англия) с диаметром адаптера 2 см. Обработку проводили при амплитуде 20 мкм 7 раз по 1 мин с интервалами по 1 мин, охлаждая суспензию в ледяной бане. Экстракт осветляли при 15000 об/мин 30 мин в роторе JA-20 на центрифуге J2-21 ("Beckman", США). Экстракт объемом 40 мл наслаивали на колонку с биогелем А 0,5М ("Bio-Rad", США, V=500 мл) и проводили элюцию со скоростью 40 мл/ч. Далее осуществляли последовательную хроматографическую очистку на фосфоцеллюлозе P-II ("Whatman", Англия), бензил-ДЭАЭ целлюлозе ("Sigma", США) с использованием буфера А и на фенил-агарозе ("Sigma", Германия) с использованием буфера В.

Оптимальные условия проявления активности рестриктазы *BstKTI* определяли путем гидролиза ДНК фага λ в пяти стандартных буферных растворах [6] (буфер №1 (В): 10мМ трис HCl, pH 7,6 (при 25°C), 10мМ MgCl₂, 1мМ ДТТ; буфер №2 (G): 10мМ трис-HCl, pH 7,6 (при 25°C), 10мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 1мМ ДТТ; буфер №3 (O): 50мМ трис-HCl, pH 7,6 (при 25°C), 10мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl, 1мМ ДТТ; буфер №4 (W): 10мМ трис-HCl, pH 8,5 (при 25°C), 10мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl, 1мМ ДТТ; буфер №5 (Y): 33мМ трис-ацетат, pH 7,9 (при 25°C), 10мМ ацетат магния, 66мМ ацетат калия, 1мМ ДТТ) в течение 1ч при температурах 37°C и 55°C. Продукты гидролиза разделяли в 1% агарозном геле, окрашивали бромистым этидием и фотографировали гель в УФ-свете. Для определения активности *BstKTI*, в реакционную смесь, прогретую при 37°C и содержащую 1 мкг ДНК фага λ в 50 мкл буфера SE-4(«W») последовательно добавляли 0,5, 1, 2 мкл фермента и проводили гидролиз при 37°C в течение 1 часа. Реакцию останавливали добавлением к каждой пробе по 5 мкл смеси для остановки реакции - 0,05%-ный бромфеноловый синий, 50% глицерин, 0,1 М ЭДТА. Электрофорез проводили в 1% агарозном геле в течение 1 часа при 200 мА в трис-ацетатном буфере pH 8,0. За единицу активности (ед. акт.) принимали количество фермента, достаточное для полной фрагментации 1 мкг ДНК фага λ за 1 час при 37°C в буфере SE-4(«W»).

Отсутствие примесей неспецифических эндонуклеаз, в препарате рестриктазы *BstKTI*, выявляли путем инкубирования 1 мкг ДНК фага λ с 1 мкл фермента в 50 мкл реакционной смеси в буфере SE-4 («W») в течение 16 ч при 37°C. При этом картина гидролиза ДНК не отличалась от характерной для *BstKTI* [7]. Отсутствие примесей экзонуклеаз и фосфатаз выявляли реакциями

рестрикция-лигирование-рестрикция с 2-кратным избытком фермента, а также инкубацией 2 ед. акт. фермента с 5'-³²P-меченым олигонуклеотидом (20 п.о., одно- и двуцепочечным) в течение 3 ч при 37°C в буфере SE-2 («G») [8]. Пробы подвергали электрофорезу в 20% ПААГ с 8 М мочевиной. Стабильность 5'- меченого олигонуклеотида указывала на отсутствие примесных активностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выход биомассы составил 5 г/л. Из 50 г биомассы было получено 15000 единиц активности с концентрацией фермента 3 ед/мкл.

Максимальную активность фермент BstKTI проявлял в температурном диапазоне 46-50°C. При 37°C активность составляла 90% от максимальной, при 55°C – 80% от максимальной. Наибольшая активность фермента проявлялась в буфере №4 (W).

Для определения узнаваемой ферментом последовательности, различные фаговые ДНК полностью расщепляли рестриктазой BstKTI. Проводили сравнение полученной электрофореграммы (рис. 1) с рассчитанными с помощью компьютера картинками расщепления использованных ДНК для всех известных в настоящее время рестриктаз с различными сайтами узнавания. Выяснилось, что идентичные картины гидролиза двух различных ДНК (фага λ и фага T7) образует эндонуклеаза рестрикции MboI, узнающая палиндромную последовательность нуклеотидов 5'-GATC-3'. Исследуемый фермент расщепляет только немодифицированную ДНК. Если для реакции использовать dam-метилованную ДНК, например ДНК фага λ (рис. 1, дорожка 4), то гидролиз не наблюдается. Таким образом, BstKTI является чувствительным к dam-метилированию.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 1. Электрофоретическая картина гидролиза ДНК рестриктазой BstKTI в 1% агарозном геле.

- 1, 5 - маркеры (гидролизат ДНК фага λ рестриктазой Bme18I);
- 2 - немодифицированная ДНК фага λ, обработанная рестриктазой BstKTI;
- 3 - немодифицированная ДНК фага T7, обработанная рестриктазой BstKTI;
- 4 - ДНК фага λ, модифицирована dam-метилазой и обработанная рестриктазой BstKTI.

Место гидролиза ДНК рестриктазой BstKTI определяли с использованием синтетического олигонуклеотидного дуплекса, содержащего последовательность, узнаваемую ферментом. Использовали олигонуклеотиды следующей структуры:

№1: 5'-ACCTTGATCAGGACCTCGAGGATAC-3'

№2: 5'-GTATCCTCGAGGTCCTGATCAAGGT-3'

Одну из цепей дуплекса метили с 5' конца при помощи T4-полинуклеотидкиназы и [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP. Продукты гидролиза разделяли в 20%-ном полиакриламидном денатурирующем геле с 8М мочевиной и получали радиоавтограф, который приведен на рис. 2. Как видно из этого рисунка, BstKTI гидролизует последовательность 5'-GATC-3' перед цитозином.

Мы исследовали способность фермента BstKTI гидролизовать сайты 5'-GATC-3', в которых метилирован аденин или цитозин в положении C5. Неспособность BstKTI расщеплять сайты, в которых модифицирован аденин следует из отсутствия гидролиза данным ферментом ДНК фага λ (рис. 1), а также других dam-метилованных субстратов, например, хромосомной ДНК бактериального штамма *Thermus ruber* 9 (рис. 3а), являющегося продуцентом изошизомера MboI, рестриктазы Tru9II [6]. Модификация аденина в хромосомной ДНК штамма *T. ruber* 9 в обеих цепях по сайту 5'-GATC-3' подтверждается тем, что данная ДНК расщепляется рестриктазой MspI. Эндонуклеаза рестрикции MspI [6] является изошизомером рестриктазы DpnI, способной гидролизовать только 5'-G(mN6A)TC-3'/5'-G(mN6A)TC-3' сайт, где (mN6A) – аденин, модифицированный в положении N6 [9].

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 2. Определение места гидролиза ДНК эндонуклеазой рестрикции BstKTI. Радиоавтограф электрофореграммы продуктов расщепления олигонуклеотидного дуплекса, в котором одна из цепей (№1) мечена фосфором ^{32}P по 5'-концу. $\gamma^{32}\text{P}$ меченные олигонуклеотиды, обозначены знаком *.

- 1 – исходный дуплекс 1*/2;
- 2 – дуплекс, обработанный рестриктазой Kzo9I;
- 3 – дуплекс, обработанный экзонуклеазой ExoIII;
- 4 – дуплекс, обработанный рестриктазой BstKTI.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 3. Гидролиз хромосомных ДНК из бактериальных штаммов *T. ruber* 9 (а) и *K. zopfii* 9 (б).

- 1 - исходная хромосомная ДНК *T. ruber* 9 (а) и *K. zopfii* 9 (б);
- 2 - хромосомная ДНК, обработанная рестриктазой MspI;
- 3 - хромосомная ДНК, обработанная рестриктазой Kzo9I;

4 - хромосомная ДНК, обработанная рестриктазой BstKTI, 5 - маркер (гидролизат ДНК фара λ рестриктазой Bme18I).

Исследуемый фермент не чувствителен к модификации цитозина в сайте узнавания в положении C5. Это подтверждается его способностью расщеплять хромосомную ДНК из бактериального штамма *Kurthia zopfii* 9, в которой сайты 5'-GATC-3' модифицирован в положение C5 (рис. 3б). Данный штамм является продуцентом эндонуклеазы рестрикции Kzo9I. Как видно из рисунка, хромосомная ДНК *K.zopfii* 9 не гидролизует только рестриктазой MspI, что означает, что она не модифицирована по аденину.

Чувствительность исследуемого фермента к модификации в сайте узнавания аденина и цитозина в положении C5, а так же способность расщеплять полуметилированный по аденину субстрат, проверялась на синтетических олигонуклеотидных дуплексах, составленные из следующих олигонуклеотидов:

№3: 5'-GTCGTGCGATCGCGTACGTTTG-3'

№4: 5'-CAAACGTACGCGATCGCACGAC-3'

№5: 5'-GTCGTGCG(N6mA)TCGCGTACGTTTG-3'

№6: 5'-CAAACGTACGCG(N6mA)TCGCACGAC-3'

№7: 5'-GTCGTGCGAT(5mC)GCGTACGTTTG-3'

№8: 5'-CAAACGTACGCGAT(5mC)GCACGAC-3',

где 5mC - цитозин, метилированный в положении 5.

На рис.4 представлен радиоавтограф электрофореграммы продуктов расщепления олигонуклеотидного дуплекса, в котором одна из цепей мечена по 5'-концу $\gamma^{32}\text{P}$. Как видно из данного рисунка, BstKTI расщепляет ДНК, в которой в сайте узнавания обе цепи неметилированы (дорожка 2), в одной из цепей метилирован аденин (дорожки 4, 6), в обеих цепях метилирован цитозин (дорожка 8); одновременно с этим фермент не способен расщеплять ДНК, если в сайте узнавания обе цепи модифицированы по аденину (дорожка 10). Из этих данных можно сделать вывод о том, что BstKTI обладает комбинацией свойств, связанных с чувствительностью к модификации сайта узнавания. Фермент, будучи dam-чувствительным, способен гидролизовать полуметилированный субстрат.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 4. Радиоавтограф электрофореграммы продуктов расщепления олигонуклеотидного дуплекса, в котором одна из цепей мечена фосфором ^{32}P по 5'-концу. Время гидролиза 1 час. Олигонуклеотиды, меченные радиоактивным фосфором ^{32}P по 5'-концу, обозначены знаком *. 1 – исходный дуплекс 3*/4 (неметилированный сайт); 2 – дуплекс 3*/4, обработанный 1 ед. акт. рестриктазы BstKTI;

3 – исходный дуплекс 4*/5 (полуметилированный по аденину сайт); 4 – дуплекс 4*/5, обработанный 1 ед. акт. рестриктазы BstKTI (гидролиз неметилированной цепи); 5 – исходный дуплекс 5*/4 (полуметилированный по аденину сайт); 6 – дуплекс 5*/4, обработанный 1 ед. акт. рестриктазы BstKTI (гидролиз метилированной цепи); 7 – исходный дуплекс 7*/8 (полностью метилированный по цитозину сайт в положении C5); 8 – дуплекс 7*/8, обработанный 1 ед. акт. рестриктазы BstKTI; 9 – исходный дуплекс 5*/6 (полностью метилированный по аденину сайт); 10 – дуплекс 5*/6, обработанный 1 ед. акт. рестриктазы BstKTI.

Следует отметить, что в настоящее время неизвестно других dam-чувствительных ферментов, которые могли бы с высокой эффективностью расщеплять полуметилированный по аденину сайт 5'-GATC-3'. Хотя существует изошизомер MboI, рестриктаза Sau3AI, которая способна гидролизовать полуметилированный по аденину сайт 5'-GATC-3', но этот фермент не является dam-чувствительным, поскольку, способен расщеплять и полностью модифицированный по аденину сайт 5'-GATC-3' [1]. Кроме того, Sau3AI в отличие от BstKTI является чувствительным к метилированию цитозина в положении C5: он не способен расщеплять как полностью модифицированный по цитозину сайт, так и полуметилированный [1]. Данные по чувствительности к метилированию рестриктаз прототипа MboI приведены в таблице 1.

Защита от гидролиза хозяйской ДНК продуцентов эндонуклеаз рестрикции может осуществляться ДНК-метилтрансферазами трех типов: модифицирующих цитозин в положении N4 или C5, или модифицирующих аденин в положении N6 [10]. Для того, чтобы выяснить с помощью какого типа модификации ДНК по сайту 5'-GATC-3' осуществляется защита от собственной рестриктазы BstKTI в штамме *B.stearothermophilus* КТ, мы провели гидролиз хромосомной ДНК из данного штамма рестриктазами MspI, Kzo9I и BamHI (рис. 5). Как видно из рисунка, хромосомная ДНК гидролизуется MspI, что свидетельствует о том, что ДНК dam-метилирована. Гидролиз хромосомной ДНК эндонуклеазами рестрикции Kzo9I и BamHI, которые блокируются модификацией цитозина в сайте 5'-GATC-3' в положении C5 и N4 соответственно, свидетельствует об отсутствии модификации цитозина в данной хромосомной ДНК. Отсутствие гидролиза ферментом BstKTI объясняется dam-модификацией ДНК.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 5. Гидролиз хромосомной ДНК из бактериального штамма *B.stearothermophilus* КТ.

- 1, 7 - маркер (гидролизат ДНК фага λ рестриктазой Bme18I);
- 2 - исходная хромосомная ДНК *B.stearothermophilus* КТ;
- 3 - хромосомная ДНК, обработанная рестриктазой BstKTI;
- 4 - хромосомная ДНК, обработанная рестриктазой BamHI;
- 5 - хромосомная ДНК, обработанная рестриктазой MspI;
- 6 - хромосомная ДНК, обработанная рестриктазой Kzo9I.

Нами показано, что в штамме *B.stearothermophilus* КТ, являющимся продуцентом эндонуклеазы рестрикции BstKTI, хозяйская ДНК dam-модифицирована. На сегодня не известно как

осуществляется защита хозяйской ДНК в пострепликативный период, когда хромосомная ДНК преимущественно полуметилирована. Этот вопрос требует дальнейшего исследования, и по-видимому связан с системой жесткой регуляции экспрессии гена эндонуклеазы рестрикции.

Способность BstKTI расщеплять полуметилированный по аденину субстрат одновременно с чувствительностью к dam-метилированию может иметь различные применения в биотехнологии. Данное свойство может быть использовано для детекции полуметилированной ДНК, например, при исследовании процесса репликации, полимеразной цепной реакции первоначально dam-метилированной ДНК и т.д. Кроме того, фермент BstKTI может применяться для направленного гидролиза сайтов 5'-GATC-3' на dam-модифицированной субстратной ДНК.

Благодаря довольно высокому содержанию фермента в клетках штамма продуцента, BstKTI представляет интерес как для научных исследований, так и для практического применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hermann, A., Jeltsch, A. // *Biotechniques*. — 2003. — V.34. — P. 924-930.
2. Dreiseikmann, B., Eichenlaub, R., Wackernagel, W. // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1979. — V. 562. — P. 418-428.
3. Shapovalova, N.L., Zheleznaia, L.A., Matvienko, N.L. // *Nucleic Acids Res.* — 1993. — V. 21 — P. 5794.
4. Шаповалова Н.Л., Железная Л.А., Матвиенко Н.Л. // *Биохимия*. — 1994. — Т. 59 — С. 1730-1738.
5. Roberts, R.J., Macelis, D. // *Nucleic Acids Res.* — 1996. — V. 24. — P. 223-235.
6. Каталог СибЭнзим. <http://www.sibenzyme.com>.
7. Дегтярев С.Х., Речкунова Н.И. // *Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук*. — 1998. — В. 2. — С. 102-105.
8. New England Biolabs. Catalog. NEB Inc. USA. p. 12. (2002)
9. Lacks, S.A. // *Methods Enzymol.* — 1980. — V. 65. — P. 138-146.
10. Gromova, E.S., Khoroshaev, A.V. // *Mol. Biol.* — 2003. — V. 37. — P. 300-314.