

НОВАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА AbsI ИЗ *ARTHROBACTER SPECIES 7M06* УЗНАЕТ ОКТАНУКЛЕОТИДНУЮ ПАЛИНДРОМНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК 5'-CC[^]TCGAGG-3'

В.А. ЧЕРНУХИН*, Ю.Г. КАШИРИНА, Ю.Э. ТОМИЛОВА, Д.А. ГОНЧАР,
В.С. ДЕДКОВ, Н.А. МИХНЕНКОВА, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «Сибэнзим», Новосибирск

Обнаружен бактериальный штамм *Arthrobacter species 7M06*, который является продуцентом новой сайт-специфической эндонуклеазы AbsI. Фермент AbsI узнает палиндромную октануклеотидную последовательность ДНК 5'-CC[^]TCGAGG-3' и гидролизует ее после второго цитозина, образуя, таким образом, 5'-выступающие «липкие» концы, которые совместимы с концами, образующимися при гидролизе ДНК эндонуклеазами рестрикции XhoI (5'-C[^]TCGAG-3'), PspXI (5'-VC[^]TCGAGB-3') и SalI (5'-G[^]TCGAC-3'). Среди всех известных редкощепящих эндонуклеаз рестрикции AbsI является единственным ферментом, не имеющим сайтов узнавания на стандартных субстратах, таких как ДНК фагов лямбда и T7, а также аденовирусной ДНК типа 2.

Ключевые слова: сайт-специфическая эндонуклеаза, эндонуклеаза рестрикции.

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы, ЭР) являются сайт-специфическими бактериальными ДНК-эндонуклеазами и входят обычно в состав так называемых систем рестрикции-модификации (РМ систем). Наиболее широкое практическое применение в молекулярной биологии и биотехнологии нашли ЭР второго типа, которые узнают короткую (как правило, 4-8 п.н.) последовательность ДНК и расщепляют ее внутри или вблизи сайта узнавания. В настоящее время описано более 250 различных сайтов узнавания ЭР второго типа, из которых только 9 представляют собой невырожденные палиндромные восьминуклеотидные последовательности [1].

В данной работе описаны получение и изучение свойств новой сайт-специфической эндонуклеазы AbsI, сайтом узнавания которой является восьминуклеотидная последовательность ДНК 5'-CC[^]TCGAGG-3'.

Материалы и методы

Морфологические и биофизические свойства штамма бактерий *Arthrobacter species 7M06* определяли

стандартным образом [2]. GC-состав хромосомной ДНК этого микроорганизма определяли, как описано ранее [3].

Выращивание клеток штамма *Arthrobacter species 7M06*. В качестве компонентов питательной среды для выращивания бактериальных клеток использовалась продукция фирмы «Organotechnie» (Франция). Культивирование проводили при 28 °С в колбах емкостью 700 мл с 300 мл среды LB (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl, (pH 7,6)) в термостатированных воздушных качалках G-25 («New Brunswick», США) со встряхиванием (170 об/мин). Клетки выращивались в течение двух суток до достижения оптической плотности 2,5 ед. при измерении на длине волны $\lambda = 550$ нм. Клетки осаждали центрифугированием в течение 30 мин. при 3000 g на центрифуге «Beckman J2-21» («Beckman», США) и замораживали.

Очистка препарата фермента AbsI. Все стадии очистки фермента проводили при 4 °С или на льду. Замороженную биомассу (30 г) суспендировали в течение 3 часов в 120 мл буфера А, содержащего 10 мМ К-фосфат (pH 7,2), 0,2 М KCl, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ 2-меркаптоэтанол. Клетки разрушали ультразвуком на дезинтеграторе Soniprep 150 («MSE», Великобритания) десятью 1-минутными импульсами с 1-минутными интервалами. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 12000 g в течение 30 мин. на центрифуге

* Автор для переписки:

© 2006 г. Чернухин Валерий Алексеевич,
сотрудник НПО «Сибэнзим»,
630117 Новосибирск, ул. Тимакова 2/12,
Тел. (3833) 33-49-91,
E-mail: valera@sibenzyme.ru

«Beckman J2-21». Из полученного супернатанта выделяли фермент AbsI путем хроматографической очистки на трех сорбентах. На первой стадии использовали 40 мл фосфоцеллюлозы P11 («Whatman», Великобритания). Элюцию фермента проводили 400 мл линейного градиента KCl (0,2–0,9 М) в буфере А. На второй стадии использовали 5 мл гидроксиапатита («BioRad», США). Фермент вымывали 120 мл линейного градиента К-фосфата (0,01–0,2 М) в буфере А. На третьей стадии использовали 4 мл гепарин-сефарозы («Sigma», США). Элюцию фермента проводили 60 мл линейного градиента KCl (0,3–1 М) в буфере А.

Для тестирования активности ЭР AbsI в хроматографическом профиле аликвоты по 1 мкл из фракций добавляли к 20 мкл реакционной смеси, содержащей 0,8 мкг ДНК рBlueScriptSK(+), предварительно линеаризованной рестриктазой ZrmI, в SE-буфер 5 «G» (10 мМ Трис-HCl (pH 7,6), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ), смесь инкубировали 15 мин. при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 5 мкл стоп-раствора, содержащего 0,1 М ЭДТА, 0,05% бромфенолового синего и 40% агарозы. Электрофоретическое разделение продуктов реакции проводили в 1%-ном агарозном геле в трис-боратном буфере.

После очистки на гепарин-сефарозе к фракциям, содержащим фермент, добавили БСА до концентрации 0,05 мг/мл и концентрировали диализом против буфера, содержащего 10 мМ К-фосфат (pH 7,2), 0,2 М KCl, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ 2-меркаптоэтанол и 50% глицерин.

В результате получили 2,5 мл препарата фермента. Препарат AbsI хранили при -20 °С.

Определение специфичности эндонуклеазы рестрикции AbsI. В качестве субстратов для определения сайта узнавания AbsI использовали ДНК фагов лямбда и Т7, аденовирусную ДНК типа 2 (Ad2), плазмиду рBlueScriptSK(+) (рBS) [4] и специально сконструированную плазмиду рUC19SE, получение которой описано ниже. Продукты гидролиза разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в трис-ацетатном буфере.

Для определения позиции гидролиза узнаваемой последовательности рестриктазой AbsI использовали олигонуклеотидный ДНК-дуплекс, одну из цепей которого метили с помощью γ -[³²P]-АТФ и Т4-полинуклеотидкиназы. Исходные олигонуклеотиды были синтезированы в НПО «СибЭнзим» (Россия). Продукты ферментативного гидролиза разделяли электрофорезом в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины. Радиоавтографию геля проводили с помощью прибора Cyclone Storage System («Packard Instrument Co.», USA).

Все использованные ферменты и маркеры молекулярной массы ДНК произведены в НПО «СибЭнзим».

Первичную последовательность ДНК определяли методом Сенгера на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

Результаты и обсуждение

Штамм *Arthrobacter species* 7M06 был выделен из природных изолятов в ходе поиска продуцентов рестриктаз, как описано ранее [5]. Определение штамма дало следующие результаты. Клетки штамма сферические, диаметром 0,5 мкм, в парах или одиночные. Грамположительные. Облигатно аэробные. Колонии на агаре Лурia бледно-желтые, гладкие, блестящие, непрозрачные, выпуклые, круглые, 1–2 мм в диаметре. В бульоне со встряхиванием образуют однородную муть. Каталазо-положительные, оксидазоотрицательные. Клетки растут при температуре от 4 до 40 °С. GC-состав хромосомной ДНК составляет 75%. Данный штамм определили как *Arthrobacter species* 7M06, а сайт-специфическую эндонуклеазу, выделенную из него, назвали AbsI.

На рисунке 1 приведены данные по расщеплению сайт-специфической эндонуклеазой AbsI различных субстратов. Как видно из рисунка, AbsI не гидролизует ДНК фагов лямбда и Т7, а также Ad2 ДНК, однако способен расщеплять плазмиду рBlueScriptSK(+), линеаризованную ферментом ZrmI (сайт узнавания 5'-AGT[^]ACT-3'). При совместном гидролизе рBlueScriptSK(+) рестриктазами Sfr274I (сайт узнавания 5'-C[^]TCGAG-3') и AbsI новые рестрикционные фрагменты не образуются. В связи с этим мы предположили, что AbsI имеет расширенный сайт узнавания фермента Sfr274I. В ДНК плазмиды рBlueScriptSK(+) сайт узнавания Sfr274I (5'-CTCGAG-3') является частью палиндромной последовательности 5'-CCTCGAGG-3', и эта последовательность нуклеотидов в дальнейшем рассматривалась как возможный сайт узнавания фермента AbsI. Для проверки этого предположения нами были синтезированы комплементарные олигонуклеотиды К61 и К62, образующие ДНК-дуплекс (палиндромная восьминуклеотидная последовательность выделена жирным шрифтом):

К61: 5'-gtat**cctc**gaggtcctgatcaaggt-3'

К62: 5'-accttgatcagg**acctc**gaggatac-3'

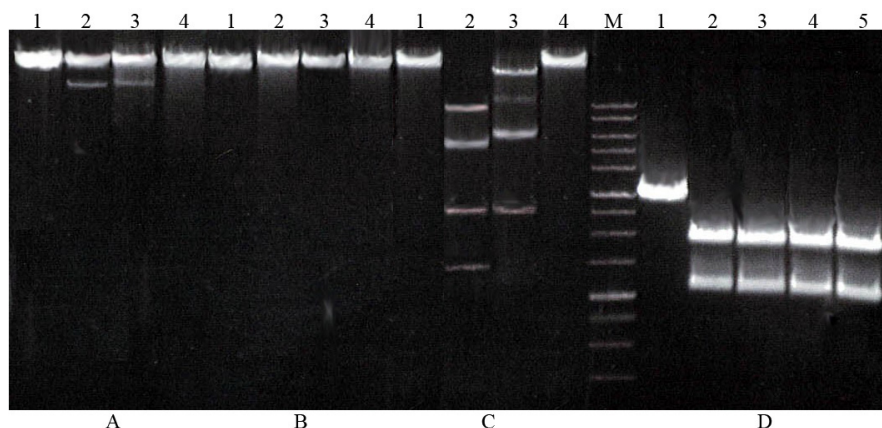


Рис.1. Электрофорез препаратов ДНК фага лямбда (А), фага Т7 (В), Ad2 (С) и плазмиды рBS/ZrmI (D), обработанных рестриктазами Sfr274I, PspXI и AbsI. Дорожки: 1 – исходная ДНК; 2 – гидролиз Sfr274I; 3 – гидролиз PspXI; 4 – гидролиз AbsI; 5 – гидролиз Sfr274I и AbsI; М – 1kb ДНК-маркер

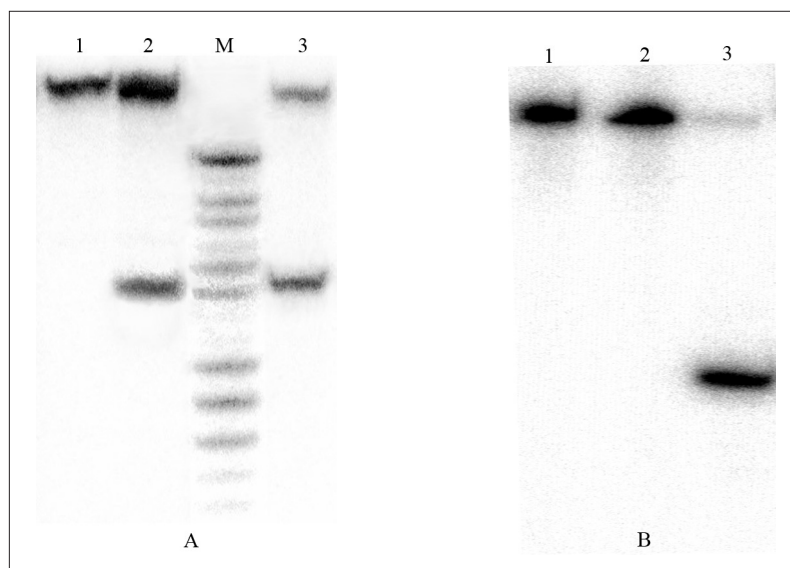


Рис. 2. Определение позиции расщепления ДНК эндонуклеазой рестрикции AbsI с использованием γ -[^{32}P]-меченных олигонуклеотидных дуплексов K62*/K61(A) и Xho3*/Xho4(B).

Дорожки: 1 – исходный дуплекс; 2 – гидролиз рестриктазой AbsI; 3 – гидролиз рестриктазой Sfr274I; М – гидролиз экзонуклеазой III из *E. coli*

Общей частью первичной структуры данного дуплекса и плазмиды рBlueScriptSK(+) является именно последовательность ДНК 5'-CCTCGAGG-3'. В том случае, если данный олигонуклеотид будет расщепляться ферментом AbsI, последовательность ДНК 5'-CCTCGAGG-3' будет являться сайтом узнавания этого фермента. На рисунке 2б приведен радиоавтограф электрофоретического разделения продуктов гидролиза олигонуклеотидного дуплекса K62*/K61 рестриктазами AbsI, Sfr274I, а также экзонуклеазой III из *E. coli*. Как видно из этого рисунка, AbsI расщепляет олиго-

нуклеотидный дуплекс K62*/K61, а длина фрагмента ДНК, полученного в результате расщепления дуплекса, совпадает с длиной фрагмента ДНК, образованного в результате расщепления рестриктазой Sfr274I.

Следовательно, фермент AbsI узнает последовательность ДНК 5'-CCTCGAGG-3', а место гидролиза олигонуклеотида ферментами AbsI и Sfr274I совпадает, то есть оба фермента расщепляют ДНК в последовательности 5'-CC[^]TCGAGG-3' после второго цитозина.

Для определения возможности вырождения установленного сайта узнавания фермента AbsI мы

проанализировали наличие в различных субстратах последовательностей ДНК, отличающихся от последовательности 5'-CCTCGAGG-3' на один нуклеотид.

В таблице 1 приведены данные по существованию таких нуклеотидных последовательностей в ДНК фагов лямбда и T7 и в Ad2 ДНК. С учетом симметричности последовательности 5'-CCTCGAGG-3' всего таких замен возможно 12, из которых 11 содержатся в упомянутых субстратах (табл. 1). Так как AbsI не гидролизует ДНК фагов лямбда и T7 и Ad2 ДНК, следовательно, присутствующие в них 11 последовательностей ДНК не являются сайтами узнавания AbsI. Последовательность ДНК 5'-TCTCGAGG-3' является единственной, отсутствующей в субстратных ДНК, использованных в данной работе (табл. 1).

Для проверки способности фермента AbsI гидролизовать эту последовательность мы синтезировали следующие олигонуклеотиды, образующие ДНК-дуплекс:

Xho3: 5'-gca ata atc **tcg agg** cct aga gga ata agc-3'

Xho4: 5'-gct tat tcc tct agg **cct cga** gat tat tgc-3'

В указанной первичной структуре последовательность 5'-TCTCGAGG-3' и комплементарная ей 5'-CCTCGAGA-3' выделены жирным шрифтом.

На рис. 2а приведена радиоавтография геля после электрофоретического разделения продуктов обработки этого дуплекса ферментами. Как видно на рисунке, фермент AbsI не гидролизует дуплекс Xho3*/Xho4 (³²P-меченная цепь обозначена символом *).

Таблица 1

**Однонуклеотидные замены в сайте 5'-CCTCGAGG-3'
и их наличие в ДНК фагов лямбда и T7 и Ad2 ДНК**

Однонуклеотидные замены в сайте 5'-CCTCGAGG-3'	ДНК-субстраты, в которых присутствует сайт (в скобках указаны позиции, с которых начинается последовательность)
5'-ACTCGAGG-3'*	Фаг лямбда (33497)
5'-GCTCGAGG-3'	Ad2 (5777, 8243)
5'-TCTCGAGG-3'	—
5'-CATCGAGG-3'	Фаг T7 (23430, 31496), Ad2 (24884)
5'-CGTCGAGG-3'	Фаг лямбда (17654), фаг T7 (23202), Ad2 (23849, 24203)
5'-CTTCGAGG-3'	Фаг T7 (6057, 8975, 18705)
5'-CCACGAGG-3'	Ad2 (930)
5'-CCGCGAGG-3'	Фаг лямбда (10, 3159), Ad2 (11342, 13090, 19053)
5'-CCCCGAGG-3'	Ad2 (16880)
5'-CCTAGAGG-3'	Фаг T7 (10310)
5'-CCTGGAGG-3'	Ad2 (12167, 13183, 14981, 25421)
5'-CCTTGAGG-3'	Фаг T7 (82, 13863, 14655, 14982, 19021, 32888, 39006, 39858), Ad2 (9199)

* жирным шрифтом обозначены нуклеотиды, которые отличаются при сравнении с последовательностью ДНК 5'-CCTCGAGG-3'

Таким образом, AbsI не расщепляет последовательностей ДНК, полученных изменением одного из нуклеотидов в сайте 5'-CCTCGAGG-3'. Полученные данные подтверждают, что именно невырожденная последовательность нуклеотидов 5'-CCTCGAGG-3' является сайтом узнавания фермента AbsI.

Для проверки сайта узнавания фермента AbsI и получения еще одного субстрата для этой эндонуклеазы мы изменили первичную структуру широко используемой плазмиды pUC19, заменив последовательность 5'-GC-3' в положении 437-438 на последовательность 5'-CG-3'. Для этого были синтезированы комплементарные олигонуклеотиды Xho1 и Xho2, формирующие ДНК-дуплекс с выступающими липкими концами, совместимыми с липкими концами, образуемыми при расщеплении рестриктазами XbaI (5'-T[^]CTGAG-3') и HindIII (5'-A[^]AGCTT-3'):

Xho1: 5'-ctagagtcgactgtttaacctcgaggcatgca-3'

Xho2: 5'-agcttgcatgcctcgagggtttaaacagtcgact-3'

Олигонуклеотидный дуплекс сшивался с pUC19, гидролизованной ферментами XbaI и HindIII, и продуктом лигазной сшивки трансформировали компетентные клетки *E. coli* RR1. Среди полученных в результате трансформации клонов выбрали один, из которого была выделена плазмида pUC19SE. Плазмида pUC19SE содержит последовательность 5'-CCTCGAGG-3' в положении 434-441, что было подтверждено определением нуклеотидной последовательности данной плазмиды. На рисунке 3 приведены результаты расщепления плазмиды pUC19SE, линейаризованной ферментом DriI (сайт узнавания 5'-GACNNN[^]NNGTC-3'). Как видно из рисунка, AbsI расщепляет линейаризованную плазмиду pUC19SE, тогда как исходная плазмида pUC19 этим ферментом не гидролизуется (данные не приводятся).

Для определения активности фермента AbsI мы также использовали плазмиду pUC19SE. AbsI проявляет максимальную активность в специальном реакционном буфере следующего состава: 20 мМ ТрисHCl (при pH 8,0), 20 мМ MgCl₂, 0,01% Тритон X-100, 1 мМ ДТТ. За одну единицу активности данной сайт-специфической эндонуклеазы принималось такое минимальное количество фермента, при котором происходит полный гидролиз 1 мкг ДНК плазмиды pUC19SE, предварительно линейаризованной рестриктазой DriI, в 50 мкл реакционной смеси, содержащей AbsI-реакционный буфер при 37 °С. Полученный нами препарат фермента имел концентрацию 1000 ед/мл.

Среди всех известных редкощепляющих эндонуклеаз рестрикции AbsI является единственной эндонуклеазой, не имеющей сайтов узнавания ни на одном из стандартных субстратов (ДНК фагов лямбда и T7, а также ДНК аденовируса типа 2), используемых при поиске новых ферментов рестрикции.

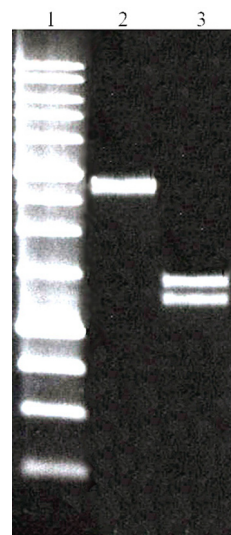


Рис. 3. Расщепление ферментом AbsI ДНК плазмиды pUC19SE, линейаризованной DriI.

Дорожки: 1 – 1kb ДНК-маркер; 2 – pUC19SE/DriI; 3 – pUC19SE/DriI, обработанная эндонуклеазой AbsI

Поскольку XhoI и AbsI содержат в сайте узнавания одну и ту же палиндромную шестинуклеотидную последовательность 5'-CTCGAG-3' и расщепляют ее в одном и том же месте, можно предположить, что эволюционно эндонуклеаза AbsI произошла из ЭР, узнающей сайт 5'-CTCGAG-3'. Помимо AbsI, XhoI и его изошизомеров известно еще несколько ферментов с другой специфичностью, имеющих сайты узнавания с внутренней последовательностью 5'-C[^]TCGAG-3'. Среди них можно отметить недавно открытую рестриктазу PspXI, узнающую вырожденную восьминуклеотидную последовательность 5'-VC[^]TCGAGB-3', которая может рассматриваться как промежуточное звено между ферментами, имеющими шестинуклеотидные и невырожденные восьминуклеотидные сайты узнавания [6]. Кроме того, известен изошизомер XhoI, который гидролизует сайт 5'-C[^]TCGAG-3' при условии, что перед ним с 5'-конца нет динуклеотида СТ, то есть этот фермент не расщепляет последовательность 5'-СТC[^]TCGAG [7].

AbsI является новым и перспективным инструментом для генно-инженерных работ, который может быть

использован при крупноблочной фрагментации ДНК. Помимо этого, поскольку при расщеплении по сайту узнавания AbsI образуются такие же липкие концы, как при гидролизе рестриктазами XhoI (5'-C[^]TCGAG-3'), PspXI (5'-VC[^]TCGAGB-3') и Sall (5'-G[^]TCGAC-3'), новая сайт-специфическая эндонуклеаза AbsI может применяться совместно с этими ферментами при клонировании фрагментов ДНК.

Литература

1. Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. REBASE restriction enzymes and methyltransferases // Nucleic Acids Research. — 2003. — Vol. 31. — P. 418–420.
2. *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., 1997.
3. Дедков В.С. Определение GC-состава в ДНК бактерий при помощи эндонуклеаз рестрикции // Биотехнология. — 2004. — № 4. — С. 77–82.
4. Short J.M., Fernandez J.M., Sorje J.A., Huse W.D. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties // Nucleic Acids Research. — 1988. — Vol. 16. — P. 7583–7600.

5. Белафин П.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Метод определения эндонуклеаз рестрикции в колониях бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. — 1988. — Т. 24. — № 1 — С. 50–51.
6. Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Беличенко О.А., Дедков В.С., Мезенцева Н.В., Томилова Ю.Э., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции PspXI узнает необычную последовательность ДНК 5'-VCTCGAGB-3' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2005. — Т. 1 — № 1. — С. 18–23.
7. Gingeras T.R. and Brooks J.E. Cloned restriction/modification system from *Pseudomonas aeruginosa* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1983. — Vol. 80. — P. 402–406.

Список сокращений:

РМ система — система рестрикции-модификации,
 ЭР — эндонуклеаза рестрикции,
 Трис — трис-(оксиметил)-аминометан,
 ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота,
 ДТТ — дитиотрейтол,
 п.н. — пары нуклеотидов,
 Ad2 — аденовирус типа 2,
 рBS — плазмида рBlueScriptSK(+),
 БСА — бычий сывороточный альбумин.

NEW EIGHT BASES CUTTER AbsI FROM ARTHROBACTER SPECIES RECOGNIZES PALINDROMIC DNA SEQUENCE 5'-CC[^]TCGAGG-3'

V.A. CHERNUKHIN, Ju.G. KASHIRINA, Ju.E. TOMILOVA, D.A. GONCHAR,
 V.S. DEDKOV, N.A. MIKHENKOVA, S.Kh. DEGTAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

Bacterial strain *Arthrobacter species* 7M06 producing site-specific endonuclease AbsI has been discovered. AbsI recognized palindromic octanucleotide DNA sequence 5'-CC[^]TCGAGG-3' and hydrolyzes it after second cytosine, producing 5'- sticky ends, which were compatible with sticky ends after DNA cleavage by restriction endonucleases XhoI (5'-C[^]TCGAG-3'), PspXI (5'-VC[^]TCGAGB-3') and Sall (5'-G[^]TCGAC-3'). Among all known rare-cutting site-specific endonucleases AbsI was the only enzyme which has no recognition sequences in standard substrates Lambda and T7 DNA and Adenovirus type 2 DNA.

Keywords: site-specific endonuclease, restriction endonuclease.