

Эндонуклеаза рестрикции Peci из бактериального штамма *Paracoccus species* 12 узнает последовательность ДНК 5'-ТТА[^]ТАА-3' и является изошизомером PsiI

 dnape.online/ru/2024/10/peci/

ДНК-узнающие ферменты

28 октября 2024 г.

Д.А. Гончар¹, В.А. Чернухин¹, В.С. Дедков¹, Н.А. Михненко¹, М.А. Абдурашитов¹, О.А. Беличенко¹, С.Х. Дегтярев¹

¹ ООО «СибЭнзайм» Новосибирск

* автор для переписки: Данила Гончар, ООО СибЭнзайм, ул. Тимакова, д. 2/12, Новосибирск, 630117, Россия; тел.: +7(383)333-4991; факс: +7(383)333-6853; E-mail: gonchar@sibenzyme.ru

Нами обнаружен бактериальный штамм *Paracoccus species* 12, который является продуцентом новой эндонуклеазы рестрикции, названной Peci. Этот фермент узнает шестинуклеотидную палиндромную последовательность ДНК 5'-ТТА[^]ТАА-3' и расщепляет ее с образованием «тупых» концов, как показано стрелкой. Таким образом, Peci является истинным изошизомером рестриктазы PsiI [1].

Препарат эндонуклеазы рестрикции Peci с концентрацией 10000 ед/мл был получен путем очистки в четыре хроматографические стадии. Оптимальными условиями реакции фермента являются SE-буфер 5 (Y) (33 мМ Трис-ацетат (pH 7.9), 10 мМ Mg-ацетат, 66 мМ К-ацетат, 1 мМ ДТТ) и температура 37°C.

Принятые сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин; ДТТ – дитиотреитол; ПААГ – полиакриламидный гель; п.н. – пары нуклеотидов; система РМ – система рестрикции-модификации; Трис – трис-(оксиметил)-аминометан; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; ЭР –эндонуклеаза рестрикции.

Ключевые слова: эндонуклеазы рестрикции, изошизомеры

Данные для цитирования:

Д.А. Гончар, В.А. Чернухин, В.С. Дедков, Н.А. Михненко, М.А. Абдурашитов, О.А. Беличенко, С.Х. Дегтярев. (2024) Эндонуклеаза рестрикции Peci из бактериального штамма *Paracoccus species* 12 узнает последовательность ДНК 5'-ТТА[^]ТАА-3' и является изошизомером PsiI, ДНК-узнающие ферменты, том 2024(1), DOI:



Эта статья доступна по лицензии [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались реактивы производства “Sigma-Aldrich” (США), “Fisher” (Германия), “Panreac” (Испания), “Диа-М” и “Хеликон” (Россия). Для хроматографической очистки фермента применялись следующие носители: фосфоцеллюлоза P11, гепарин-сефароза (“Sigma”, США), Bio-Gel A-1,5m, гидроксипатит (BioRad, США). Для выращивания бактериальных клеток использовались компоненты питательной среды фирмы “Organotechnie” (Франция).

Для экспериментов брали эндонуклеазы рестрикции, полинуклеотидкиназу фага T4, препарат ДНК фага Лямбда, маркеры молекулярного веса ДНК, реакционные SE-буферы “B100”, “B”, “G”, “O”, “W”, “Y”, “ROSE” производства ООО “СибЭнзайм” (Россия).

Морфологические и физико-биохимические свойства штамма изучали с использованием методик [2]. Определение рода микроорганизма проводили по определителю Берджи [3] и по результатам секвенирования ПЦР-фрагмента гена 16S рРНК.

Для определения места гидролиза межнуклеотидных связей использовали [³²P]-меченый ДНК-дуплекс, содержащий сайт узнавания целевого фермента. Исходные олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в компании “ДНК-Синтез” (Россия) и метились с помощью T4-полинуклеотидкиназы. Для разделения продуктов ферментативного гидролиза меченых олигонуклеотидов применяли электрофорез в 20% ПААГ, содержавшем 8 М мочевины.

Выращивание клеток штамма *P. species* 12

Клетки штамма *Parasoccus species* 12 выращивались в термостатированной качалке при 30°C в 0,5-литровых колбах с питательной средой LM (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl, pH 7,5) с добавлением 0,1% MgCl₂. Культура росла в течение 20-ти часов при 130 об/мин до оптической плотности A₅₅₀=2,0±0,5 о.е. Клетки собирались центрифугированием при 6000 об/мин в течение 30 мин на центрифуге J2-21 “Beckman” (США). Биомасса хранилась при –20 °C.

Тестирование рестриктазной активности PstI

Для тестирования активности рестриктазы PstI в клетках 1 мл выросшей культуры переносили в 1,5-мл пробирки “Eppendorf” и центрифугировали при 5000 g

в течение 2 мин на микроцентрифуге “Eppendorf 5804” (Германия). Осадок суспендировали в 180 мкл воды и готовили грубый лизат клеток по методу, описанному ранее [4]. Затем аликвоту грубого лизата 5 мкл добавляли к 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг субстрата в реакционном буфере, и ставили серию разведений в 4 и 16 раз. Смесь инкубировали в термостате на 37°C в течение 1 ч. Продукты реакции наносили на 0,8% агарозный гель и проводили электрофорез в Трис-ацетатном буфере (50 мМ Трис-ацетат (pH 8,0), 20 мМ Na-ацетат, 2 мМ ЭДТА) при напряжении 120 V. После окрашивания бромистым этидием гель фотографировали в УФ-свете. В качестве субстрата для анализа рестриктазной активности использовали ДНК фага Лямбда. При тестировании активности ЭР PseI в хроматографическом профиле аликвоты по 1 мкл из фракций добавляли к 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг ДНК фага Лямбда в SE-буфере “Y”, инкубировали смесь в течение 15 мин при 37°C и проводили электрофорез. При тестировании активности очищенного препарата PseI брали 1 мкл неразбавленного фермента или 0,5, 1 и 2 мкл препарата PseI, разбавленного в 10 раз SE-буфером “B100”. Фермент добавляли к 50 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг ДНК фага Лямбда и один из шести реакционных буферов для эндонуклеаз рестрикции. Смесь инкубировали в течение 1 ч при 37°C и проводили электрофорез в агарозном геле.

Очистка препарата фермента ЭР PseI

Условия проведения выделения и используемые буферы. Выделение проводили при +4°C с использованием растворов на основе буферов:

- буфер А — 10 мМ Трис-HCl pH 7,6; 0,1 мМ ЭДТА и 7 мМ β-меркаптоэтанол;
- буфер Б -10 мМ К-фосфат pH 7,5; 0,1 мМ ЭДТА и 7 мМ β-меркаптоэтанол.

Экстрагирование. 15 г биомассы суспендировали в 75 мл буфера А, содержащего 0,1% тритон X-100, 0,2 М NaCl, 1 мг/мл лизоцим, 0,1 мМ PMSF (фенилметил-сульфонилфторид – ингибитор протеаз). После 1 часа перемешивания на магнитной мешалке суспензию клеток в стеклянном стакане на 150 мл термостатировали в ледяной бане и затем клетки разрушали ультразвуком при максимальной мощности с амплитудой 22–24 мкм на приборе Soniprep 150 («MSE», Англия) с насадкой диаметром 2 см десятью импульсами по 1,5 мин с интервалом 2 мин. Экстракт осветляли на центрифуге J2-M1 («Beckman», США) в течение 30 минут в роторе JA-20 при 15000 об/мин. Осадок отбрасывали.

Гель-фильтрация на биогеле. Супернатант наслаивали на колонку, заполненную 500 мл Bio-Gel A-1,5m, уравновешенного буфером А, содержащим 0,1% Тритон X-100 и 0,8 М NaCl. Элюцию проводили буфером А, содержащим 0,1% Тритон X-100 и 0,8 М NaCl. Фракции, содержащие максимум активности, собирали и диализовали против 3 литров буфера А в течение 2,5 часов, а затем наносили на колонку с фосфоцеллюлозой P-11 объемом 30 мл, предварительно уравновешенную буфером А с 0,1 М NaCl.

Хроматография на фосфоцеллюлозе P-11. Колонку промывали 60 мл буфера А с 0,1 М NaCl. Сорбированный материал элюировали линейным градиентом концентрации NaCl от 0,1 М–0,6 М в буфере А, объемом 400 мл. Собирали 50 фракций по 8 мл. Объединяли фракции, содержащие максимум активности, и наносили на колонку с гидроксилapatитом объемом 5 мл, уравновешенную буфером Б.

Хроматография на гидроксилapatите. Колонку промывали 10 мл буфера Б. Фермент элюировали линейным градиентом 10–100 мМ калий–фосфатного буфера (рН 7,5) в буфере Б с 0,05 М NaCl объемом 150 мл. Собирали 50 фракций по 3 мл. Объединяли фракции с максимальной активностью и диализовали против 1 литра буфера А в течение 1,5 часов, а затем наносили на колонку с гепарин-сефарозой, объемом 2 мл, предварительно уравновешенную буфером А с 0,05 М NaCl.

Хроматография на гепарин-сефарозе. Колонку промывали 10 мл буфера А с 0,05 М NaCl. Сорбированный материал элюировали линейным градиентом концентрации NaCl 0,05–0,5 М в буфере А, объемом 150 мл. Собирали 50 фракций по 3 мл.

Концентрирование и хранение препарата фермента

Фракции, содержащие максимальную активность, объединяли, к ним добавляли BSA до концентрации 0,2 мг/мл и диализовали против 350 мл концентрирующего буфера (10 мМ Трис-HCl, рН 7,6; 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол, 0,2 М NaCl, 50% глицерин) при перемешивании на магнитной мешалке в течение 16 ч. Препарат хранили при -20°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика штамма-продуцента

Исследуемый бактериальный штамм был нами выделен из пробы пресной воды в ходе поиска микроорганизмов – продуцентов эндонуклеаз рестрикции. Бактерия растёт на LM-агаре достаточно медленно: за 5 дней при 24°C образует круглые колонии до 3 мм в диаметре. Колонии приплюснутые, блестящие, полупрозрачные, бледно-розовые. Клетки – короткие палочки 0,7x2 – 3 мкм, редко-удлинённые, неподвижные, грамотрицательные, каталазо- и оксидазоположительные, аэробные. Растут при температуре от 20 до 30°C, но не при 8 или 37°C.

На основании морфолого-биохимических данных и анализа последовательности 16S рРНК (данные не приводятся) штамм идентифицировали как *Paracoccus species* 12. А обнаруженный фермент был назван *PesI* согласно общепринятой номенклатуре.

Получение препарата фермента *PesI* и изучение его свойств

В результате наработки культуры клеток штамма *P. species* 12 выход биомассы составил $2,1 \pm 0,5$ г/л. После хроматографической очистки из 15 г биомассы было получено 6 мл препарата эндонуклеазы рестрикции *Pst*I с концентрацией 10000 ед./мл.

В ходе дальнейшей работы нами были определены оптимальные условия для работы фермента. Для этого использовали реакционную смесь, содержащую 1 мкг ДНК фага Лямбда, один из шести буферов для эндонуклеаз рестрикции, исходный и разбавленный препарат фермента *Pst*I, и два варианта температуры реакции – 37 и 55°C. Результаты приведены на рисунках 1 и 2.

Рисунок 1

Электрофореграмма результатов измерения активности препарата фермента *Pst*I в шести SE-буферах для эндонуклеаз рестрикции на ДНК фага Лямбда при 37°C.

Дорожки: 1 – исходная ДНК фага λ ; 2, 4, 6, 8, 10, 12 – ДНК λ + 0,5 мкл препарата *Pst*I, разбавленного в 10 раз SE-буфером “B100”; 3, 5, 7, 9, 11, 13 – ДНК λ + 1 мкл препарата *Pst*I, разбавленного в 10 раз SE-буфером “B100”; 14 – 1 kb ДНК-маркеры молекулярного веса (от 0,25 до 10 т.п.н.). Продукты расщепления разделены в 0,8 % агарозном геле.

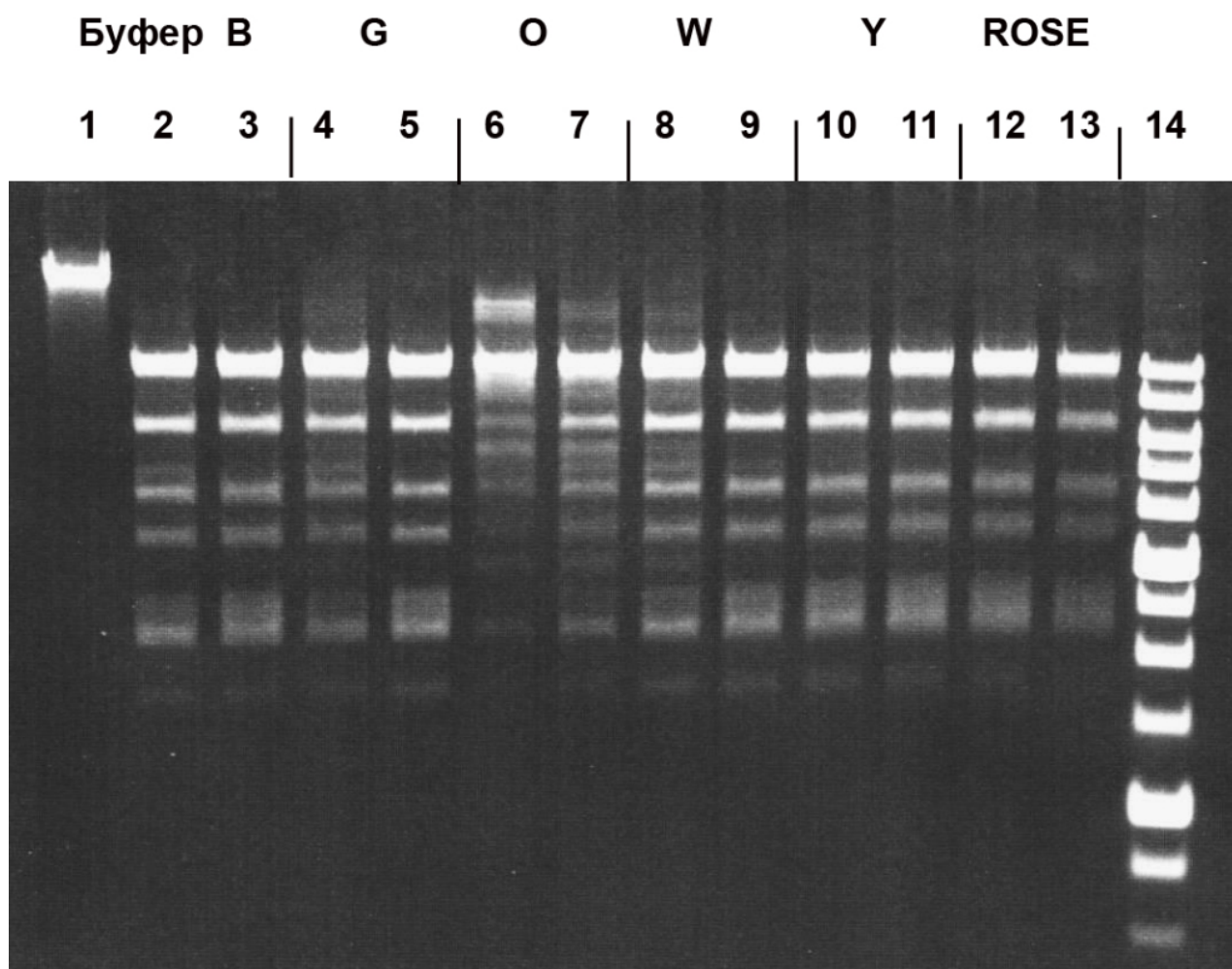
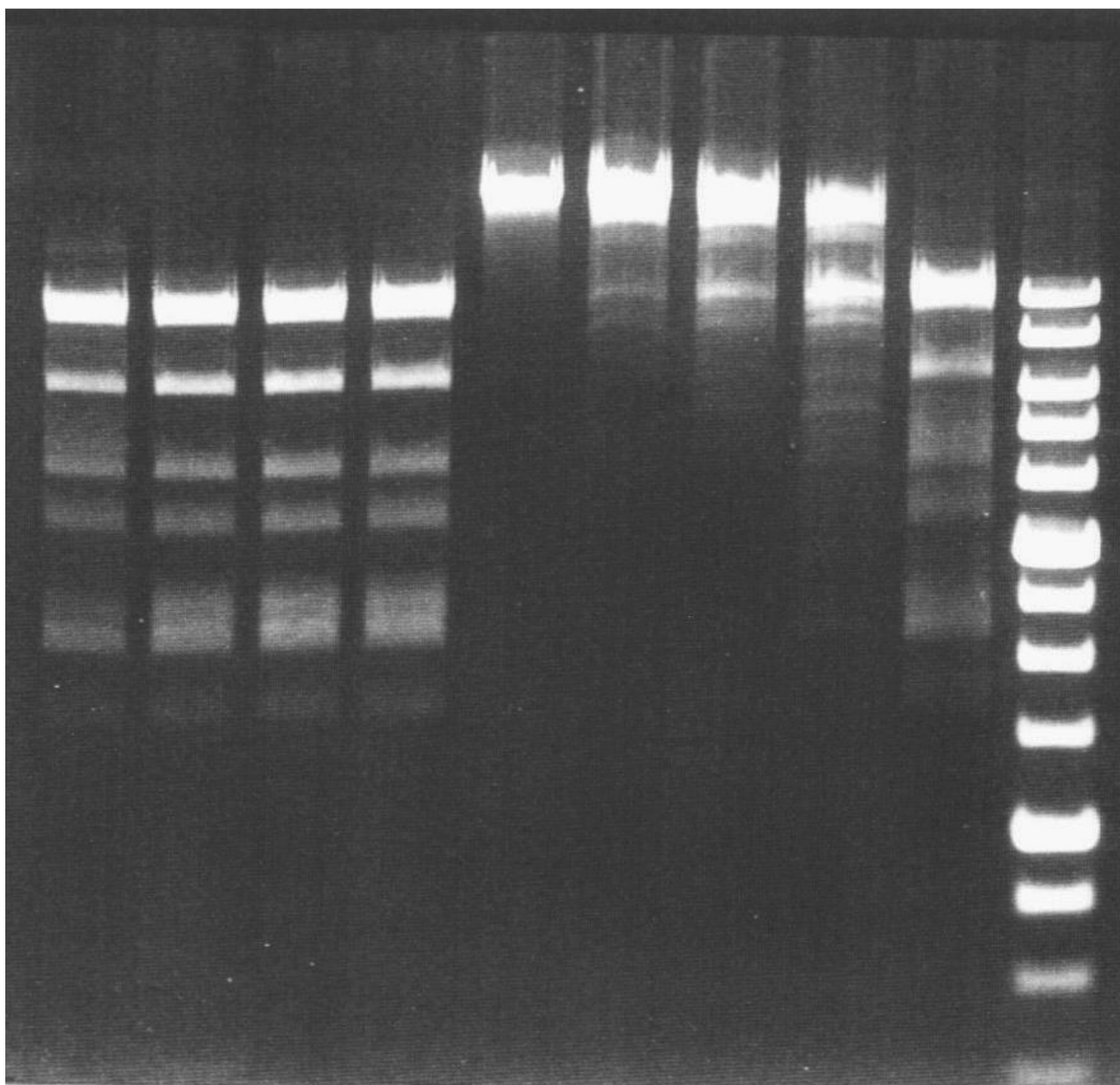


Рисунок 2

Электрофореграмма результатов измерения активности препарата фермента PseI при температурах 37 и 55°C в SE-буфере “Y” на ДНК фага Лямбда.

Дорожки: 1-4 – инкубация при 37°C; 6-9 – инкубация при 55°C; 5 – исходная ДНК фага λ; 1, 6 – ДНК λ + 0,5 мкл препарата PseI, разбавленного в 10 раз SE-буфером “B100”; 2, 7 – ДНК λ + 1 мкл препарата PseI, разбавленного в 10 раз SE-буфером “B100”; 3, 8 – ДНК λ + 2 мкл препарата PseI, разбавленного в 10 раз SE-буфером “B100”; 4, 9 – ДНК λ + 1 мкл неразбавленного препарата PseI; 10 – 1 kb ДНК-маркеры молекулярного веса (от 0,25 до 10 т.п.н.). Продукты расщепления разделены в 0,8 % агарозном геле.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Анализ полученных результатов позволил заключить, что фермент проявляет максимальную активность в SE-буфере “Y” (33 мМ Трис-ацетат (pH 7,9), 10 мМ Mg-ацетат, 66 мМ К-ацетат, 1 мМ ДТТ) и универсальном буфере “ROSE” (рис.1, дор.10-13). Оптимальной температурой для работы ЭР PseI является температура 37°C

(рис.2, дор.1-4). При этих условиях активность фермента составила 10000 ед./мл. Активность PseI при 55°C составила менее 10% от оптимальной. При этом полная инактивация ЭР PseI в реакционной смеси происходила при нагревании до 65°C за 20 мин (данные не приведены).

Сравнение полученной с помощью PseI картины гидролиза ДНК фага Лямбда с теоретически рассчитанными данными расщепления ее последовательности по сайтам эндонуклеаз рестрикции позволило сделать вывод, что фермент PseI гидролизует данный субстрат по сайту 5'-TTATAA-3' и является, таким образом, изошизомером рестриктазы Psil.

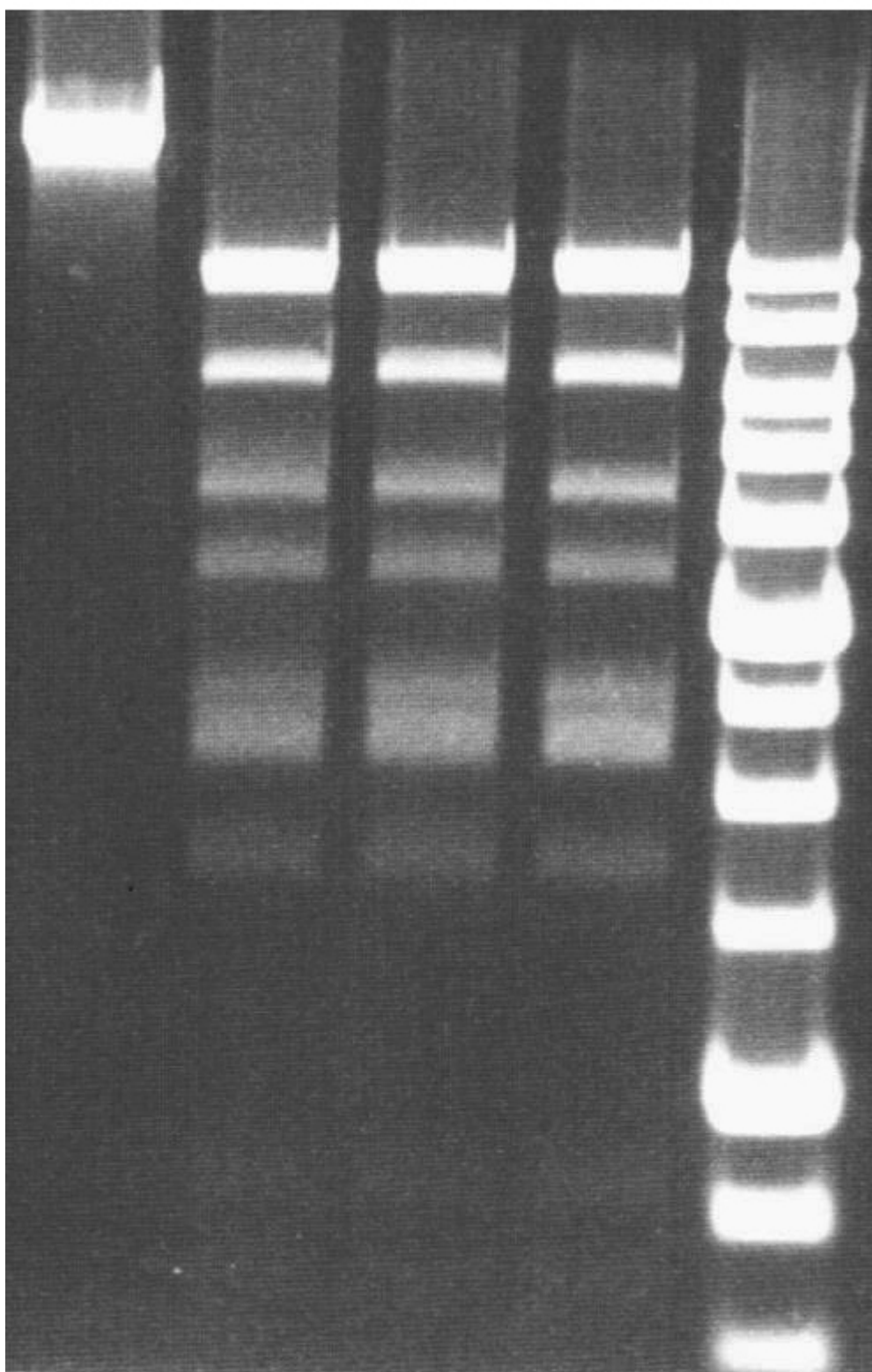
Для подтверждения этого результата нами был осуществлен совместный гидролиз ДНК фага Лямбда в SE-буфере "Y" при 37°C ферментами PseI и Psil. Результаты приведены на рисунке 3.

Рисунок 3

Электрофореграмма результата совместного гидролиза ДНК фага Лямбда препаратами ферментов PseI и Psil.

Дорожки: 1 – исходная ДНК λ; 2 – ДНК λ + 1 мкл препарата PseI; 3 – ДНК λ + 1 мкл препарата Psil; 4 – ДНК λ + 1 мкл препарата PseI и 1 мкл препарата Psil; 5 – 1 kb ДНК-маркеры молекулярного веса (от 0,25 до 10 т.п.н.). Продукты расщепления разделены в 0,8 % агарозном геле.

1 2 3 4 5



Поскольку при совместном гидролизе двумя ферментами никаких изменений в картине распределения фрагментов не возникает, можно сделать окончательный вывод об одинаковой субстратной специфичности Peci и Psil.

Чтобы определить место гидролиза ДНК новым ферментом мы использовали двуцепочечный радиоактивно-меченый с 5'-конца олигонуклеотид (дуплекс) 11a*/11aK (меченая цепь отмечена *), содержащий сайт узнавания PstI (подчеркнут):

11a*: 5'-CGAGTTTTATAACTGGGCCCAAC-3'

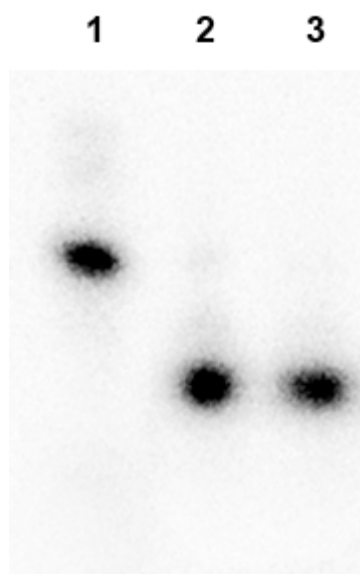
11aK: 3'-GCTCAAAATATTGACCCGGGTG-5'

Данный дуплекс расщепляли новым ферментом PstI или контрольным ферментом PstI.

Реакцию проводили с 1 пмоль дуплекса 11a*/11aK в 10 мкл реакционной смеси в течение 1 ч при 37°C в реакционном SE-буфере "Y". Продукты гидролиза наносили на 20% ПААГ с 8М мочевиной и проводили электрофорез в Трис-боратном буфере. На рисунке 4 представлена авторадиограмма геля после электрофореза.

Рисунок 4

Определение позиции гидролиза PstI на олигонуклеотидном дуплексе 11a*/11aK. Дорожки: 1 – исходный дуплекс 11a*/11aK; 2 – дуплекс 11a*/11aK + 1 мкл PstI; 3 – дуплекс 11a*/11aK + 1 мкл PstI. Электрофорез в 20% ПААГ с 8М мочевиной.



Из полученных данных следует, что позиция гидролиза PstI совпадает с позицией гидролиза PstI (отмечена стрелкой): 5'-TTA[^]TAA-3'. Таким образом, PstI образует в результате гидролиза ДНК «тупые» концы и является истинным изошизомером PstI.

В таблице 1 приведено сравнение активности ферментов PstI и PstI в шести основных SE-буферах для эндонуклеаз рестрикции.

Таблица 1

Активность препаратов эндонуклеаз рестрикции PstI и PstI в шести основных SE-буферах для эндонуклеаз рестрикции (в % от максимальной)

SE Буфер	B	G	O	W	Y	ROSE
PecI	50-75	75-100	10-25	25-50	100	100
PsiI	100	25-50	10-25	25-50	75-100	40

Новый фермент PеcI может найти применение в области генетической инженерии, молекулярной биологии, биотехнологии и ДНК-диагностики. Благодаря 100%-ной активности в универсальном SE-буфере “ROSE” данную ЭР можно эффективно использовать для совместного (двойного) гидролиза ДНК рестриктазами.

Список литературы

1. Абдурашитов А., Беличенко О.А., Лебедева Н.А., Дегтярев С.Х. 1999. Psi I, новая эндонуклеаза рестрикции, узнающая последовательность ДНК 5'-ТТА[^]ТАА-3'. *Биохимия*. 64, № 4, 481–482.
2. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под ред. Н.С. Егорова. М., 1995.
3. Определитель бактерий Берджи. Под ред. Дж. Хоулта и др.: 9-е издание в 2-х томах. Пер. с англ. под ред. Г.А. Заварзина. М., 1997.
4. Белавин П.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. 1988. Метод определения эндонуклеаз рестрикции в колониях бактерий. *Прикл. Биохим. Микробиол.* 24, 121-124.