

ДНК-УЗНАЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ

Эндонуклеаза рестрикции Pse31I из штамма бактерии *Peribacillus species 31*, изошизомер Eco31I, узнает непалиндромную последовательность ДНК 5'-GGTCTC-3' (1/5)

Нами обнаружен бактериальный штамм *Peribacillus species 31*, который является продуцентом новой эндонуклеазы рестрикции, названной Pse31I. Фермент узнает шестинуклеотидную непалиндромную последовательность ДНК 5'-GGTCTC-3' и расщепляет ее в стороне от сайта узнавания в позициях 1/5: 5'-GGTCTC(N)₁¹/3'-CCAGAG(N)₅⁵-5'. Таким образом, Pse31I является истинным изошизомером рестриктазы Eco31I [1]. Штамм-продуцент идентифицировали по морфологическим и биохимическим признакам, а также по анализу первичной структуры фрагмента гена 16S рПНК. Pse31I имеет максимальную активность при 37°C и инактивируется инкубацией при 55 и 65°C. Фермент не расщепляет сайты с метилированным цитозином в верхней цепи (5'-GGTCT(5mC)-3') и/или в нижней цепи (3'-(5mC)CAGAG).

Оптимальными условиями работы фермента являются SE-буфер 5 (Y) (33 mM Трис-ацетат (pH 7,9), 10 mM Mg-ацетат, 66 mM K-ацетат, 1 mM ДТТ) и температура 37°C

В.А. Чернухин¹, В.С. Дедков¹, Н.А. Михненко¹, Н.А. Воронцова¹, М.А. Абдурашитов¹, Д.А. Гончар¹, [С.Х. Дегтярев¹](#)

¹ ООО «СибЭнзайм» Новосибирск

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

Нами обнаружен бактериальный штамм *Peribacillus species 31*, который является продуцентом новой эндонуклеазы рестрикции, названной Pse31I. Фермент узнает шестинуклеотидную непалиндромную последовательность ДНК 5'-GGTCTC-3' и расщепляет ее в стороне от сайта узнавания в позициях 1/5: 5'-GGTCTC(N)₁¹/3'-CCAGAG(N)₅⁵-5'. Таким образом, Pse31I является истинным изошизомером рестриктазы Eco31I [1]. Штамм-продуцент идентифицировали по морфологическим и биохимическим признакам, а также по анализу первичной структуры фрагмента гена 16S рПНК. Pse31I имеет максимальную активность при 37°C и инактивируется инкубацией при 55 и 65°C. Фермент не расщепляет сайты с метилированным цитозином в верхней цепи (5'-GGTCT(5mC)-3') и/или в нижней цепи (3'-(5mC)CAGAG).

Оптимальными условиями работы фермента являются SE-буфер 5 (Y) (33 mM Трис-ацетат (pH 7,9), 10 mM Mg-ацетат, 66 mM К-ацетат, 1 mM ДТТ) и температура 37°C.

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

Список сокращений: БСА – бычий сывороточный альбумин; ДТТ – дитиотреитол; T7 ДНК – ДНК бактериофага T7; λ ДНК – ДНК бактериофага λ; Трис – трис-(оксиметил)аминометан; ПААГ – полиакриламидный гель; рестриктаза, ЭР – эндонуклеаза рестрикции; ЭДТА – этилендиамин-тетрауксусная кислота; SAM – S-аденозил-L-метионин; M.SssI – ДНК-метилтрансфераза SssI; (5mC) – 5-метилцитозин;

Ключевые слова: штамм-продуцент, выделение фермента, эндонуклеаза рестрикции IIS-типа, чувствительность к (5mC)G-метилованию ДНК

Данные для цитирования:

В.А. Чернухин, В.С. Дедков, Н.А. Михненкова, Н.А. Воронцова, М.А. Абдурашитов, Д.А. Гончар, С.Х. Дегтярёв. (2025) Эндонуклеаза рестрикции Pse31I из штамма бактерии *Peribacillus species 31*, изошизомер Eco31I, узнает непалиндромную последовательность ДНК 5'-GGTCTC-3' (1/5), ДНК-узнающие ферменты, том 2025(1), DOI:



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

ВВЕДЕНИЕ.

Рестриктазы IIS-типа [2] расщепляют ДНК вне сайта узнавания, образуя уникальные липкие концы, что позволяет их использовать в некоторых технологиях генетической инженерии. В данной работе изучен один из таких ферментов Pse31I.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штамм *Peribacillus sp. 31* выращивали в LM-бульоне, содержащем 1% триптон (Organotechnie, Франция), 0,5% дрожжевой экстракт (той же фирмы), 0,5% NaCl, 0,05% MgCl₂ и 0,001% тиамин. Рассевали на LM-агаре – 1,5% агар (C.E. Roepel GmbH, Германия) в LM-бульоне. Среды готовили по 0,3 л в 0,5-литровых конических колбах. Для получения биомассы культуру выращивали в колбах с бульоном при 25°C со встряхиванием 2 дня. Клетки собирали центрифугированием на центрифуге Beckman J2-M1 (США) в роторе JA-10 при 4°C, 8000 об/мин в течение 20 мин. С 10 л получали 43,7 г биомассы, которую замораживали при -20°C.

Очистка препарата эндонуклеазы рестрикции Pse31I

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

буфер А – 10 мМ Трис-НСl, рН 7,6; 0,1 мМ ЭДТА и 7 мМ β-меркаптоэтанол;

буфер Б – 60 мМ Трис-НСl, рН 7,6; 0,1 мМ ЭДТА и 7 мМ β-меркаптоэтанол, 1 М сульфат аммония;

Экстрагирование. 43,7 г биомассы суспендировали в 150 мл буфера А, содержащего 0,1% Тритон Х-100, 0,2 М NaCl, 1 мг/мл лизоцим, 0,1 мМ PMSF (фенилметил-сульфонилфторид – ингибитор протеаз) в течение 2 часов на магнитной мешалке. Далее суспензию клеток в стеклянном стакане на 200 мл термостатировали в ледяной бане, 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 2 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.

Хроматография на фосфоцеллюлозе P-11. Супернатант смешивали со 100 мл фосфоцеллюлозы, предварительно промытой 500 мл буфера А, содержащего 0,1 М NaCl, 0,01% Тритон Х-100 в стакане в течение 30 мин. После инкубации смесь переносили в колонку, промывали 100 мл буфера А, фермент элюировали линейным градиентом концентрации NaCl 0,1–0,5 М с 0,01% Тритоном Х-100 в буфере А, объемом 1000 мл. Собирали 100 фракций по 10 мл. Объединяли

фракции, содержащие максимум целевой активности, куда добавляли Трис-НСl, рН 7,6, до концентрации 60 мМ и сульфат аммония до концентрации 1 М, после чего фермент наносили на колонку с фенил-сефарозой объемом 5 мл, уравновешенную буфером Б.

Хроматография на фенил-сефарозе. Сорбированный материал элюировали линейным градиентом концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ от 1 М до 0 М общим объемом 300 мл. Собирали 50 фракций по 6 мл. Объединяли фракции, содержащие максимум активности, к которым добавили 300 мкл БСА (10 мг/мл). Полученный раствор с целевой активностью диализовали против 1500 мл буфера А, содержащего 1% глицерин, в течение ночи. Утром ставили повторный диализ в 900 мл буфера А, содержащего 0,1 М NaCl и 1% глицерин в течение 1 часа.

Хроматография на гепарин-сефарозе. Диализованный фермент наносили на колонку с 5 мл гепарин-сефарозы, уравновешенной буфером А с 0,1 М NaCl. Элюировали фермент буфером А с линейным градиентом концентрации NaCl от 0,1 М до 0,5 М объемом 100 мл. Получили 50 фракций по 2 мл. Активные фракции концентрировали в буфере А с 0,2 М NaCl и 55% глицерином.

В результате получили 2 мл целевого препарата Pse31I с активностью 10000 ед./мл.

Активность рестриктазы определяли на ДНК бактериофага Т7 (ООО «СибЭнзайм», Россия). Использовали SE-буферы производства «СибЭнзайм»: буфер В – 10 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl_2 , 1 мМ ДТТ; буфер G – 10 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl_2 , 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ; буфер O – 50 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl_2 , 100 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ; буфер W – 10 мМ Трис-НСl (рН 8,5), 10 мМ MgCl_2 , 100 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ; буфер Y – 33 мМ Трис-ацетат (рН 7,9), 10 мМ магний-ацетат, 66 мМ калий-ацетат, 1 мМ ДТТ; буфер ROSE – 17 мМ Трис-ацетат рН 7,9, 5 мМ Трис-НСl рН 7,9, 5 мМ магний-ацетат, 5 мМ MgCl_2 , 33 мМ калий-ацетат, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ. В качестве ДНК-маркера использовали гидролизат λ ДНК/BssT1I с фрагментами: 19329, 7743, 6223, 4254, 3472, 2690, 1882, 1489, 925, 421 и 74 п.н. того же производителя, в концентрации 50 мкг/мл, который наносили на гель для электрофореза по 0,3 мкг. Расщепление ДНК проводили в пробах по 50 мкл, содержащих 50 мкг/мл Т7 ДНК, 100 мкг/мл БСА и SE-буфер. Для электрофореза в пробы добавляли по 10 мкл Стоп-буфера (100 мМ Na-ЭДТА (рН 8,5), 50% сахарозы и 0,3% Понсо 4R (Roha, Индия). Электрофорез проводили в 0,8% агарозе (Conda, Испания) в буфере TAE (40 мМ Трис-ацетат, (рН 8,0), 20 мМ Na-ацетат, 1 мМ Na-ЭДТА с 0,5 мг/л бромистого этидия) при 5 В/см в течение 1 ч.

Гель фотографировали в ультрафиолете через оранжевый светофильтр на установке Herolab (Германия).

ACTCGCSTGCATGAAGCCGGAATCGYTAGTAATCGCGGATCATCATGTCGCGGGCGAGGACGTTT
CGGGACAAGGTACCCGTAGAGTTTCACCCCGGCTCAGTTGTAACAAGGTAACCGTAGAGTTTGA
TCATGGCTCAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGA

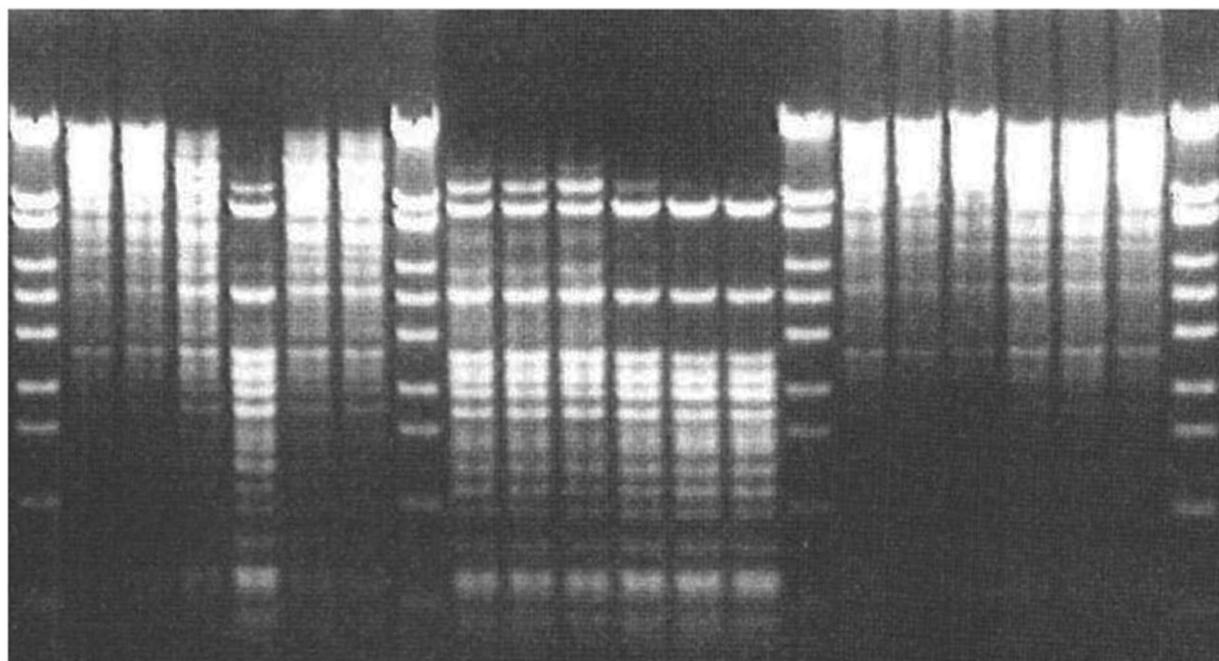
На основе установленной последовательности фрагмента гена 16S рPHK определили принадлежность штамма-продуцента к роду *Peribacillus* семейства *Bacillaceae*, используя Nucleotide BLAST [4] и определитель SILVAngs [5]. Морфология штамма также соответствовала его семейству [6]. Штамм назвали *Peribacillus species 31*, а выделенную из него рестриктазу, по номенклатуре, Pse31I.

Определение оптимального SE-буфера и температуры работы фермента проводили путём инкубации проб по 50 мкл, содержащих 50 мкг/мл Т7 ДНК, 100 мкг/мл БСА, SE-буфер: В, G, O, W, Y или R (ROSE) – и 1% по объёму препарата Pse31I при 24°C, 37°C и 55°C в течение 1 ч с последующим электрофорезом в 0,8% агарозном геле. Полученная электрофореграмма представлена на рисунке 2. Как видно из этого рисунка рестриктаза Pse31I наиболее активна в SE-буферах Y и R при 37°C (рис. 2, таблица 1). При 55°C активность незначительна, вероятно, из-за инактивации фермента.

Рисунок 2

Активность Pse31I в расщеплении Т7 ДНК при разной температуре в SE-буферах: В, G, O, W, Y и R (ROSE); М – маркер λ /BssT1I. Пробы, содержащие 50 мкг/мл Т7 ДНК, 100 мкг/мл БСА, SE-буфер и 1% по объёму Pse31I, инкубировали 1 ч и анализировали электрофорезом в 0,8% агарозе.

М В G O W Y R М В G O W Y R М В G O W Y R М



24°C

37°C

55°C

Таблица 1

Активность Pse31I при 37°C в стандартных SE-буферах

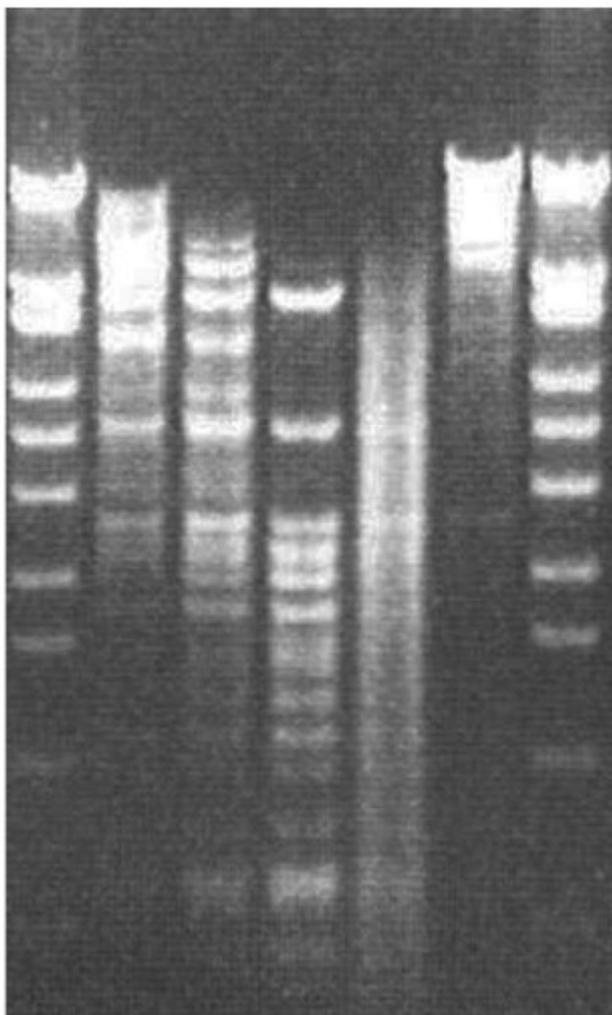
B	G	O	Y
25-50	75-100	10-25	25

На рисунке 3 приведен анализ активности целевого фермента при разных температурах. Как видно из этого рисунка, рестриктаза в оптимальном SE-буфере Y наиболее активна при 37°C, а при 42°C наблюдается дополнительная нуклеазная активность

Рисунок 3

Активность Pse31I в расщеплении T7 ДНК при разной температуре в SE-буфере Y. M – маркер λ /BssT1I. Пробы по 50 мкл, содержащие 50 мкг/мл T7 ДНК, 100 мкг/мл БСА, SE-буфер и 1% по объёму Pse31I, инкубировали 1 ч и анализировали электрофорезом в 0,8% агарозе

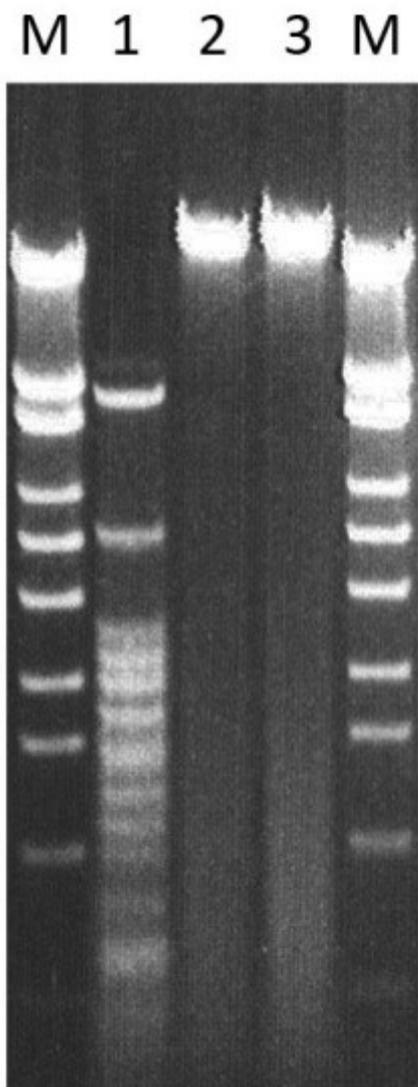
M 22° 30° 37° 42° 55° M



Как оказалось, Pse31I инактивируется прогреванием при 55°C и 65°C за 20 мин, что следует из результатов, представленных на рисунке 4.

Рисунок 4

Активность Pse31I после прединкубации 1 мкл фермента в SE-буфере Y с 50 мкг/мл ДНК фага T7M в реакционной смеси объемом 50 мкл при различных температурах: 1 – при 24°C 20 мин; 2 – при 55°C 20 мин; 3 – при 65°C 20 мин; после прединкубации проводили гидролиз ДНК 1 ч при 37°C. Маркер – λ /BssT1I. Электрофорез в 0,8% агарозе

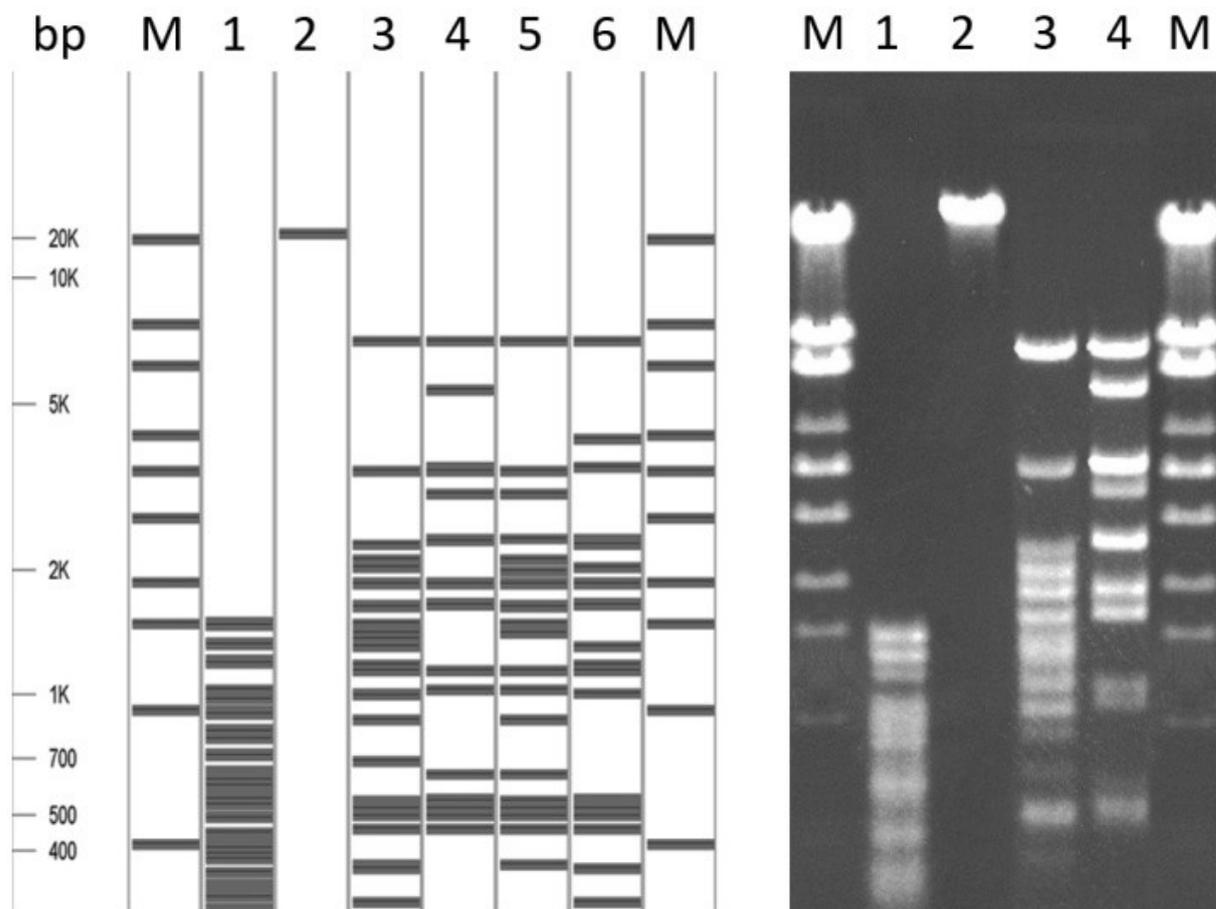


Чувствительность Pse31I к (5mC)G-метилированию определяли на ДНК фага T7, метилированной M.SssI, как описано в условиях эксперимента. Контролем метилирования является устойчивость модифицированной ДНК к расщеплению ЭР HspAI (G[^]CGC) (дорожки 1 и 2). Pse31I узнаёт непалиндромный сайт GGTCTC, крайние цитозины которого могут быть метилированы M.SssI по одной из цепей ДНК: GGTCTCg и GAGACCg, реже, по обеим. Моделирование метилирования по [7] показало, что на T7 ДНК можно выявить (5mC)G-метилирование каждой цепи сайта, узнаваемого Pse31I по блокированию его расщепления (рис. 5, дорожки 3,4,5 и 6). В эксперименте метилирование как цепи с сайтом GGTCT(m5C), так и

цепи с сайтом GAGAC(m5C) блокировало Pse31I на 95–100% (рис. 5, дорожки 3 и 4).

Рисунок 5

Расчётное и экспериментальное определение чувствительности Pse31I к 5mCG-метилированию T7 ДНК: 1 – исходная ДНК + HspAI (G[^]CGC), 2 – (5mC)G-метилированная ДНК + HspAI, 3 – исходная ДНК + Pse31I (GGTCTC(1/5)), 4 – (5mC)G-метилированная ДНК + Pse31I, 5 – GGTCT(m5C)-метилированная ДНК + Pse31I, 6 – GAGAC(m5C)-метилированная ДНК + Pse31I, М – λ ДНК + BssT1I. 50 мкг/мл T7 ДНК в SE-буфере Y инкубировали со 100 ед/мл Pse31I при 37°C в течение 1ч. Электрофорез в 0,8% агарозе



Определение позиции гидролиза ДНК ферментом. Чтобы определить место гидролиза ДНК новым ферментом мы использовали радиоактивно-меченый с 5'-конца олигонуклеотидный дуплекс Bso31I*/ Bso31IK (меченая цепь отмечена «*»), содержащий сайт узнавания Bso31I (подчеркнут):

Bso31I*: 5'-AGCTTCCTAGGGTCTCCGGAATATTAATGACTCGAGT-3'

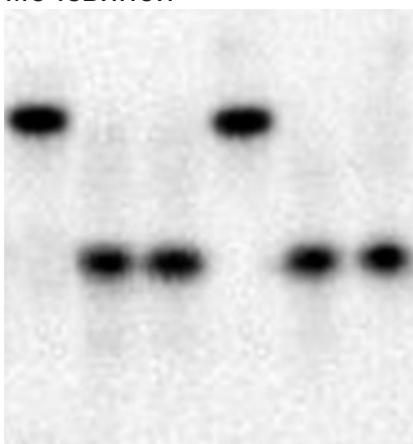
Bso31IK: 5'-ACTCGAGTCATTAATATTCCGGAGACCTAGGA-3'

Данный дуплекс расщепляли новым ферментом Pse31I и отдельно контрольным ферментом Bso31I.

Реакцию проводили с 1 пмоль дуплексов Bso31I*/ Bso31IK и Bso31IK*/ Bso31I 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 6 представлена автордиограмма геля после электрофореза.

Рисунок 6

Определение позиции гидролиза Pse31I на олигонуклеотидном дуплексе Bso31I/Bso31IK. Дорожки: 1 – исходный дуплекс Bso31I*/Bso31IK; 2 – дуплекс Bso31I*/Bso31IK + 1 мкл Pse31I; 3 – дуплекс Bso31I*/Bso31IK + 1 мкл Bso31I; 4 – исходный дуплекс Bso31IK*/Bso31I; 5 – дуплекс Bso31IK*/Bso31I + 1 мкл Pse31I; 6 – дуплекс Bso31IK*/Bso31I + 1 мкл Bso31I. Электрофорез в 20% ПААГ с 8М мочевиной



Из данных, представленных на рисунке 6, следует, что позиции гидролиза Pse31I совпадают с позициями гидролиза Bso31I: оба фермента расщепляют двуцепочечную ДНК в стороне от сайта узнавания 5'-GGTCTC-3' в позициях 1/5. Таким образом, Pse31I образует в результате гидролиза ДНК четырёхнуклеотидный 5'-выступающий конец и является истинным изошизомером Bso31I.

Новый фермент Pse31I может найти применение в области генетической инженерии, молекулярной биологии, биотехнологии и ДНК-диагностики. Благодаря 100%-ной активности в универсальном SE-буфере "ROSE" и эффективном гидролизе ДНК при типичной для большинства эндонуклеаз рестрикции температуре 37°C, а также возможности инактивации фермента при 65°C, данную ЭР можно использовать в различных экспериментах.

Список литературы

1. Butkus V., Bitinaite J., Kersulyte D., Janulaitis A. A new restriction endonuclease Eco31I recognizing a non-palindromic sequence. *Biochim Biophys Acta*. 1985 Dec 18;826(4):208-12. doi: [10.1016/0167-4781\(85\)90008-9](https://doi.org/10.1016/0167-4781(85)90008-9).
2. Pingouda A., Fuxreiterb M., Pingouda V. and Wendea W. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 685–707. 1420-682X/05/060685-23. DOI [10.1007/s00018-004-4513-1](https://doi.org/10.1007/s00018-004-4513-1)
3. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *J. Bacteriol.* – 1991. – Vol. 173. – P. 697 – 703., DOI: [10.1128/jb.173.2.697-703.1991](https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991)
4. 4. Nucleotide BLAST. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
5. 5. SILVAngs. URL: <https://www.arb-silva.de/aligner>
6. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>
7. Дедков В.С. Определение специфичности ДНК-метилтрансферазы M.Bsc4I в клеточном лизате при помощи блокирования эндонуклеаз рестрикции и компьютерного моделирования // *Молекул. генетика, микробиол. и вирусол.* – 2009. – № 3. – С. 3-8.