



УДК 577.152.31*213'14

НОВЫЙ ТИП РАСЩЕПЛЕНИЯ
УЗНАВАЕМОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НУКЛЕОТИДОВ
САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭНДУНКЛЕАЗОЙ *Bst* 4.4I
ИЗ *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* 4.4

Грамаров В. М., Фоменков А. И. *, Матвиенко Н. И. *

Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной микробиологии,
Оболensk Московской обл.;

*Институт белка Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.

Сайт-специфическая эндонуклеаза *Bst*4.4I выделена из биомассы *Bacillus stearothermophilus* 4.4 хроматографией бесклеточного экстракта на Ультрагеле АСА-44 и гепарин-сефарозе. При гидролизе ДНК бактериофагов λ и M13 эндонуклеаза продуцирует дискретный набор фрагментов подобно сайт-специфическим эндонуклеазам типов II и III. В отличие от последних эндонуклеаза *Bst*4.4I может производить в районе узнаваемой последовательности два двунитевых разрыва ДНК на расстоянии 30—32 нуклеотидов один от другого.

Сайт-специфические эндонуклеазы, известные до настоящего времени, подразделяются по структурным и функциональным характеристикам на типы I—III [1, 2]. Одно из основных отличий эндонуклеаз типа II — их способность расщеплять двунитевую ДНК с образованием дискретного (электрофоретически) набора фрагментов, используя в качестве кофактора ионы Mg^{2+} . Эндонуклеазы типов II и III узнают на двунитевой ДНК последовательность из 4—8 нуклеотидов и производят в районе узнаваемой последовательности один двунитевой разрыв, продуцируя тупые или выступающие одонитевые концы [1, 3]. Выделенная нами из биомассы термофильного микроорганизма эндонуклеаза *Bst*4.4I (обозначенная в соответствии с принятой номенклатурой [4]) делает на двунитевой ДНК в районе узнаваемой последовательности два двунитевых разрыва на расстоянии 30—32 нуклеотидов один от другого (рис. 1).

Эндонуклеаза *Bst*4.4I была очищена гель-фильтрацией бесклеточного экстракта *Bacillus stearothermophilus* 4.4 на Ультрагеле АСА-44 и последующей хроматографией на гепарин-сефарозе (см. «Экспериментальную часть»). Конечный препарат не содержал заметного количества фосфатаз и неспецифических нуклеаз и был использован для выяснения узнаваемой последовательности и точек расщепления ДНК. Эндонуклеаза, используя в качестве кофактора ионы Mg^{2+} , гидролизует ДНК бактериофагов λ и M13mp19, давая дискретный набор фрагментов, подобно сайт-специфическим эндонуклеазам типа II и III. Репликативную форму ДНК бактериофага M13mp19 эндонуклеаза *Bst*4.4I гидролизует, как было установлено подробным физическим картированием, в районе 1860, 2680, 5810 и 6020 п.о. [5].

При гидролизе эндонуклеазой *Bst*4.4I ДНК бактериофага λ образуется около 15 фрагментов; некоторые узнаваемые сайты были нами установлены (в районе 36 660, 41 770 п.о.) [6]. При попытках идентифицировать узнаваемую последовательность нуклеотидов использовали подход, описанный в работе [7]. Фрагмент ДНК, содержащий узнаваемую последовательность, метилин ^{32}P по одному из концов с помощью полинуклеотидкиназы T4 или ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова). Меченые фрагменты модифицировали по методу [8], продукты реакции разделяли в 8% полиакриламидном геле. В качестве маркера точек расщепления ДНК эндонуклеазой на тот же гель наносили исходный ^{32}P -меченый фрагмент, гидролизованный эндонуклеазой *Bst*4.4I (рис. 1).

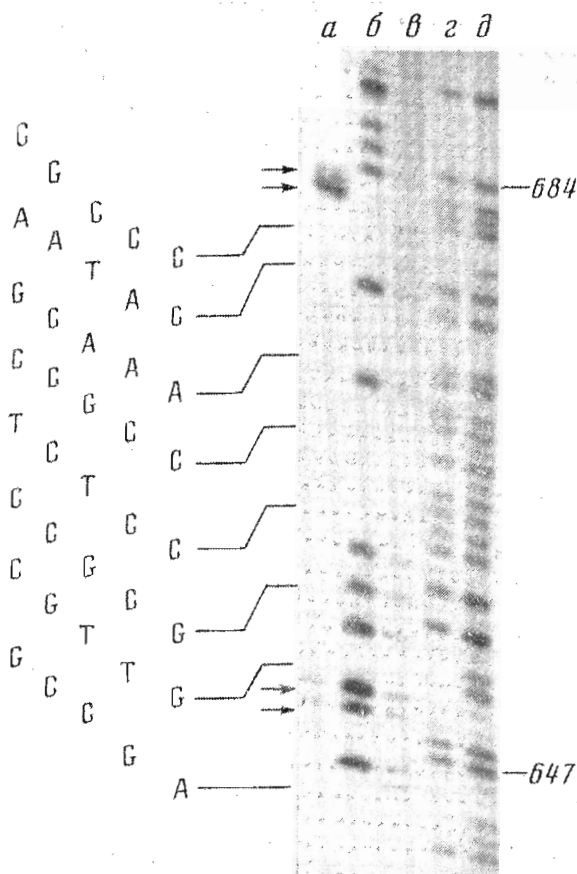


Рис. 1. Радиоавтограф электрофореграммы секвенирующего геля: *a* — *TaqI/BamHI*-фрагмент плазмиды pUC4.4.KmB, гидролизированный эндонуклеазой *Bst4.4I*; *b* — *d* — модификация нуклеотидов по G, A + G, C, C + T. Стрелками указаны точки расщепления, цифры соответствуют нумерации последовательности *I* (см. рис. 2)

На рис. 1 приведена последовательность одной из нитей ДНК сконструированной нами плазмиды pUC4.4KmB, содержащей два сайта *Bst4.4I*, которые были секвенированы по Максаму — Гилберту (см. «Экспериментальную часть»). Эта плазмида содержит часть гена *lacI* из плазмиды pUC19. Фрагменты ДНК на дорожке *a* показывают, что гидролиз ДНК происходит в точках с координатами 680, 679 и 649, 648 п.о. Секвенирование второй нити (данные не приведены) показало, что гидролиз ДНК происходит в двух точках, отстоящих друг от друга на 32 нуклеотида (рис. 2, последовательность *I*), при этом образуются выступающие 3'-концы.

Приведенная на рис. 2 последовательность нуклеотидов *I* представляет собой фрагмент гена *lacI* и содержится как в ДНК фага M13mp19 (6001 — 6230), так и в ДНК плазмиды pUC19 (684—455 п.о.) [5]. Совпадающая последовательность нуклеотидов ограничена левой вертикальной линией прямоугольника. Одна из точек расщепления ДНК эндонуклеазой *Bst4.4I* отстоит на 2 нуклеотида от границы общей последовательности *I* этих ДНК. Отсюда следует, что сайт узнавания эндонуклеазы *Bst4.4I* не выходит за пределы 6001 п.о. (M13mp19) или 694 п.о. (pUC19).

Для локализации правой границы сайта узнавания был использован имеющийся на плазмиде pUC4.4KmB сайт эндонуклеазы *CfrI* (646 — 651 п.о., pUC19). *CfrI/TaqI*-фрагмент ДНК плазмиды pUC4.4.KmB (647 — 906 п.о.) (рис. 3), меченный ^{32}P по *CfrI*-концу (см. «Экспериментальную часть»), расщеплялся эндонуклеазой *Bst4.4I*, из чего следует, что сайт узнавания последней не выходит за пределы 647 п.о. Суммируя

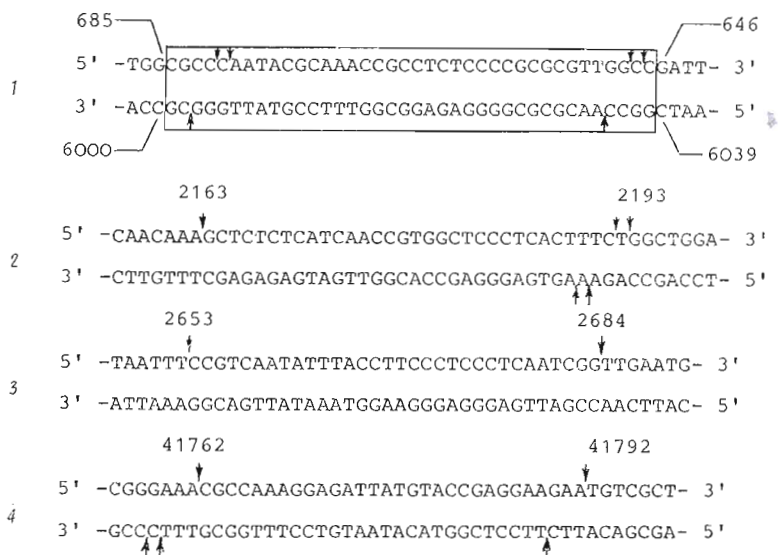


Рис. 2. Последовательности, узнаваемые эндонуклеазой *Bst4.4I*. Стрелками указаны точки расщепления, цифры — координаты (число пар оснований) на ДНК плазмиды рUC4.4KmB (1) в гене устойчивости к канамицину транспозона Tn903 (2), фагов M13 (3) и λ (4). В последовательности 1 рамкой ограничен предполагаемый сайт узнавания, цифры сверху — координаты (п. о.) на ДНК плазмиды рUC19, снизу — на ДНК фага M13mp19 (см. текст)

изложенные выше соображения, можно заключить, что *Bst4.4I*-сайт расположен в пределах 647—684 п.о. (рUC19) или 6001—6083 п.о. (M13mp19) (сайт узнавания заключен в рамку в последовательности 1, рис. 2).

Были также установлены координаты других точек расщепления (рис. 2) в гене устойчивости к канамицину транспозона Tn903 (2) [9], в ДНК фагов M13 (3) и λ (4) (рис. 2).

Анализ приведенных выше последовательностей показал, что эндонуклеаза *Bst4.4I* гидролизует двухнитевую ДНК в двух точках на каждой нити на расстоянии 30—32 нуклеотидов, при этом образуются выступающие 3'-концы. В некоторых случаях наблюдали в одной из точек гидролиз у двух соседних нуклеотидов (обозначены двойной стрелкой).

Сравнивая структуру четырех приведенных выше последовательностей, мы не пришли к какому-либо однозначному выводу относительно структуры сайта узнавания ДНК эндонуклеазой *Bst4.4I*. Подобный результат был получен ранее при изучении сайт-специфических эндонуклеаз из дрожжей [10]. В районе расщепления ДНК эндонуклеазой *SceI* не было найдено гомологии среди нескольких узнаваемых последовательностей [10].

Можно предположить, что дальнейшее изучение взаимодействия эндонуклеазы *Bst4.4I* с узнаваемой последовательностью (содержащей замены нуклеотидов, вставки, делеции) поможет локализовать конкретные нуклеотиды, участвующие во взаимодействии с ферментом. Относительно малая частота встречаемости сайтов *Bst4.4I* на различных ДНК (~15 сайтов на ДНК фага λ , отсутствие сайтов на ДНК фХ174 и рBR322) свидетельствует о достаточно протяженной структуре узнаваемой последовательности. Подобную частоту встречаемости сайтов имеют сайт-специфические эндонуклеазы типа II, узнающие последовательность из 6—7 нуклеотидов.

Следует также принять во внимание, что конкретные нуклеотиды, формирующие сайт эндонуклеазы *Bst4.4I* и общие для всех сайтов (в отличие от известных сайт-специфических эндонуклеаз типа II и III), не будут обнаружены. Ранее было высказано предположение, что искажения B-конформации ДНК, которые зависят от нуклеотидного состава фрагментов, окружающих последовательность узнавания, могут влиять на взаимодействие ДНК — фермент [11]. Возможно, что последователь-

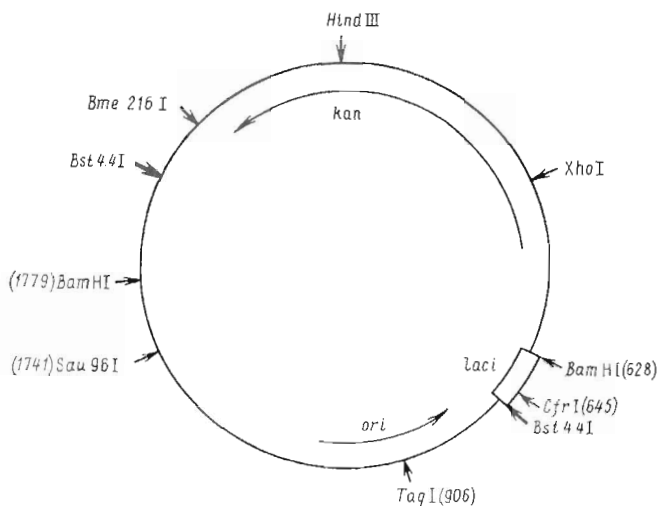


Рис. 3. Физическая карта плазмиды pUC4.4.KmB (указаны только сайты расщепления, упоминающиеся в работе)

ность, узнаваемая эндонуклеазой *Bst*4.4I, формируется совокупностью нуклеотидов, образующих «поверхность», узнавания, комплементарную «поверхности» фермента. Отсутствие видимой гомологии в нескольких узнаваемых последовательностях *Bst*4.4I может свидетельствовать об образовании одинаковых «поверхностей» узнавания на ДНК набором различных нуклеотидов. Ту же возможность можно предположить для эндонуклеазы *Sce*I [10].

Экспериментальная часть

Использовали сайт-специфические эндонуклеазы *Cfr*1, *Cfr*101, *Bam*HI, *Mva*I, *Pst*I, полинуклеотидкиназу фага T4, ДНК-лигазу фага T4, ДНК фага λ C1857s7 производства НПО «Фермент» (Вильнюс), ДНК полимеразу I (фрагмент Кленова), эндонуклеазу III *E. coli* производства НИКТИ БАВ (Бердск). Эндонуклеазу *Pvu*II выделяли хроматографией на фосфоцеллюлозе и голубой сефарозе из штамма *E. coli* PB5RM, содержащего гены рестриктазы и метилазы *Pvu*II [12]. Эндонуклеазы *Taq*I, *Bme* 216 I выделяли как описано ранее [13, 14]. Ферментативные реакции проводили в условиях, рекомендованных в публикации [15]. Генетин-сефарозу синтезировали по методу [13].

ДНК плазмид pUC4K [16], pUC19 и их производных, репликативную форму фага M13mp19 выделяли неточным методом [17] с последующей очисткой гель-фильтрацией на *Toyopearl* HW-75 (Toyo Soda, Япония).

Культура *Bacillus stearothermophilus* 4.4 выделена В. М. Крамаровым из горячих источников Долины Гейзеров (Кропоский заповедник, Камчатка). Культуру поддерживали на твердой среде (2% агар) с составом, рекомендованным для термофильных бактерий [18]. Клетки выращивали при умеренной аэрации на жидкой среде [18] при 65° С до поздней логарифмической фазы, биомассу собирали центрифугированием.

Выделение эндонуклеазы *Bst* 4.4I. Биомассу (5 г) суспендировали в 10 мл буфера А (0,02 М калий-фосфат (рН 7,0), 1 мМ EDTA, 2 мМ дитиотреит, 0,2 М NaCl), разрушали ультразвуком при охлаждении льдом (дезинтегратор MSE, амплитуда 16 мкм, общее время разрушения 10 мин; 36 с звук - 24 с пауза) и центрифугировали при 100 000 *g*. Хроматографировали на колонке (2,5 × 300 см) с Ультравелом АСА-44 (LKB) в том же буфере (20 мл/ч, фракции по 5 мл), при этом эндонуклеаза элюировалась со свободным объемом буфера. Рехроматографировали на колонке (1 × 5 см) с генетин-сефарозой 4В, элюируя в линейном градиенте концентрации NaCl (0,2 — 1 М) (объем градиента 40 мл, фракции по 1 мл, скорость элюции 4 мл/ч). Фракции, содержащие эндонуклеазу (0,35—0,45 М NaCl), объединяли, диализовали 16 ч против буфера А, содержащего 50% глицерин, и хранили при -20° С. Из 5 г биомассы получено 1000 ед. акт. эндонуклеазы *Bst*4.4I. За 1 ед. акт. означали количество фермента, полностью гидролизующее за 1 ч 1 мкг ДНК фага λ при 65° С в реакционной смеси (25 мкл), содержащей 0,05 М трис-HCl, рН 7,9, и 5 мМ MgCl₂.

Получение плазмиды pUC4.4.KmB. ДНК плазмиды pUC19 гидролизовали эндонуклеазами *Pvu*II и *Cfr*10I, добавляли *Bam*HI-фрагмент плазмиды pUC4K [16], содержащий ген устойчивости к канамицину транспозона Tn903 [9], одонитивные концы доставляли с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и набора dNTP и лигировали 16 ч при 12° С ДНК-лигазой T4. Затем прогревали 10 мин при 70° С, гидролизовали эндонуклеазами *Bgl*I и *Eco*RI и этой смесью трансформировали клетки *E. coli* HB101, отбирая клоны с фенотипом Km^R Amp^S. Эти клоны содержали плазмиды pUC4.4.KmB, которая представляла собой сочетание *Pvu*II/*Cfr*10I-фрагмента (628—1779 н. о.) плазмиды pUC19 и гена устойчивости к канамицину, фланкированного *Bam*HI-сайтами (см. рис. 3). Нумерация последовательности нуклеотидов части ДНК плазмиды

pUC4.4.KmV принята соответствующей нумерации ДНК плазмиды pUC19 в области их общей последовательности.

Секвенирование последовательностей 1—4. Последовательность 1. ДНК плазмиды pUC3.4.KmV гидролизовали эндонуклеазой *Bam*HI, метили ³²P с помощью полинуклеотидкиназы или ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и гидролизовали эндонуклеазой *Taq*I (см. рис. 3).

*Bam*HI/*Taq*I-фрагмент выделяли электрофорезом в 10% ПААГ, модифицировали по Максому — Гилберту [8] и продукты реакции разделяли в 8% ПААГ. В качестве маркера использовали тот же фрагмент, гидролизованный эндонуклеазой *Bst*4.4I.

Последовательность 2 находилась во фрагменте гена устойчивости к канамицину *Bme*2161 — *Bam*HI. Фрагмент метили ³²P по *Bme*2161-концу, секвенировали и анализировали аналогично описанному выше.

Последовательность 3. Репликативную форму ДНК фага M13mp19 гидролизовали эндонуклеазой *Nde*I, метили ³²P, затем гидролизовали эндонуклеазой *Clal*, *Clal*/*Nde*I-фрагмент (2527—2723 п. о.), выделенный из 10% ПААГ, химически модифицировали, продукты реакции разделяли в 8% ПААГ, в качестве маркера использовали исходный фрагмент, гидролизованный эндонуклеазой *Bst*4.4I.

Последовательность 4. *Bam*HI/*Eco*RI-фрагмент 41 732—41 972 п. о. ДНК фага λ c1857s7 [6] клонировали в плазмиде pBR322 по *Eco*RI- и *Bam*HI-сайту [19]. Полученную рекомбинантную плазмиду pBR: λ 3240 гидролизовали эндонуклеазой *Bam*HI, метили ³²P и гидролизовали эндонуклеазой *Taq*I. Фрагменты разделяли в 10% ПААГ; *Bam*HI/*Taq*I-фрагмент (41 732—41 874 п. о. [6]), содержащий сайт *Bst*4.4I, выделяли из 10% ПААГ и проанализировали по Максому — Гилберту в 8% ПААГ. В качестве маркера использовали исходный фрагмент, гидролизованный эндонуклеазой *Bst* 4.4I.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yuan R. // Ann. Rev. Biochem. 1981. V. 50. P. 285—315.*
2. Modrick P. // Quart. Revs Biophys. 1979. V. 12. № 3. P. 315—369.
3. Kessler C., Neumaier P., Wolf W. // Gene. 1985. V. 33. № 1. P. 1—102.
4. Smith П. О., Nathans D. // J. Mol. Biol. 1973. V. 81. № 3. P. 419—423.
5. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. // Gene. 1985. V. 33. № 1. P. 103—119.
6. Sanger F., Coulson A. R., Hong G. F., Hill D. F., Petersen G. B. // J. Mol. Biol. 1982. V. 162. № 3. P. 729—773.
7. O'Connor C. D., Metcalf E., Wrighton C. J., Harris T. J. R., Saunders J. R. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 17. P. 6701—6708.
8. Maxam A. M., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560—564.
9. Oka A., Sugisaki H., Takanami M. // J. Mol. Biol. 1981. V. 147. № 2. P. 217—226.
10. Watabe H., Shibata T., Ando T. // J. Biochem. 1984. V. 95. № 6. P. 1677—1690.
11. Frederick C. A., Grable J., Melia M., Samudzi C., Jenjacob L., Wang B. C., Greene P., Boyer H. W., Rosenber J. M. // Nature. 1984. V. 309. № 5966. P. 327—331.
12. Крамаров В. М., Прохорова С. О., Смолянинов В. В. Рекомбинантная ДНК pBP5RM, способ ее получения и штамм-продуцент *E. coli* (С600)P5RM. А.с.1294824 СССР // Б.И. 1987. № 9.
13. Bickle T. A., Pirrotta V., Imber R. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 8. P. 2561—2572.
14. Пачкунов Д. М., Крамаров В. М., Добрица А. П., Матвиенко Н. И. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 1. С. 127—129.
15. New England Biolabs. Catalog 1986/1987.
16. Vieira J., Messing J. // Gene. 1982. V. 19. № 3. P. 259—268.
17. McMaster G. K., Samulski K. J., Stein G. B. // Anal. Biochem. 1980. V. 109. № 1. P. 47—54.
18. Логинова Л. Т., Егорова Л. А. Новые формы термофильных бактерий. М., 1977. С. 85.
19. Sutcliffe J. C. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1978. V. 43. P. 77—90.

Поступила в редакцию—

14.XII.1987

После доработки

18.II.1988

A NEW TYPE OF CLEAVAGE OF THE RECOGNITION SEQUENCE BY A SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE *Bst*4.4I FROM *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* 4.4

KRAMAROV V. M., FOMENKOV A. I.*, MATVIENKO N. I.*

All-Union Research Institute of Applied Microbiology, Obolensk;
*Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR,
Pushchino, Moscow Region

A site-specific endonuclease *Bst*4.4I was isolated from the cell extract of *Bacillus stearothermophilus* 4.4 and partially purified by chromatography on Ultragel Aca-44 and heparin-Sepharose. It was shown that the endonuclease cleaves λ and M13 DNA yielding distinct fragments just as enucleases of II and III types but, in contrast to them can produce two two-strand cuts separated with 30 to 32 nucleotides in the region of the recognition site.