

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ BspACI

Тарасова М.В. – аспирант, младший научный сотрудник
Новосибирский государственный университет (г. Новосибирск)
ООО «СибЭнзайм»

Системы рестрикции-модификации (РМ системы) представляют собой набор прокариотических ферментов, состоящий из эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы), одной или нескольких ДНК-метилтрансфераз, и (в некоторых системах) контрольного белка. Эндонуклеазы рестрикции относятся к классу ферментов, узнающих определенную последовательность нуклеотидов молекулы ДНК и специфически расщепляющие молекулу ДНК внутри или рядом с этой последовательностью. ДНК-метилтрансферазы модифицируют определенную последовательность ДНК клетки-хозяина, защищая ее от гидролиза соответствующей эндонуклеазой рестрикции. Благодаря специфическому расщеплению молекул ДНК эндонуклеазами рестрикции именно РМ системы II типа представляют большой практический интерес и являются одними из важнейших ферментов молекулярной биологии и генной инженерии. На сегодняшний день известны, по данным REBASE, около 280 различных последовательностей, узнаваемых эндонуклеазами рестрикции [1]. Выделение эндонуклеаз рестрикции и метилтрансфераз из так называемых диких штаммов осложняется необходимостью использования большого количества биомассы, сложных схем выделения, включающих хроматографии с дорогостоящими сорбентами. В связи с этим приобретает актуальность клонирование генов этих ферментов в составе векторов *E.coli* с целью создания штаммов суперпродуцентов.

Ранее в научном подразделении ООО «СибЭнзайм» была идентифицирована эндонуклеаза рестрикции BspACI (прототип – Acil [2]) грамположительной аэробной бактерии *Bacillus psychrodurans* AC, установлен ее участок узнавания и позиции расщепления ДНК (5'-C↓CGC -3'/5'-G↓CGG-3') [3]. Рестриктаза BspACI является привлекательным ферментом, находящим широкое применение в молекулярной биологии и генной инженерии, благодаря короткому (4 нуклеотида) непалиндромному сайту узнавания. Целью нашей работы является получение штаммов-продуцентов *E. coli* рестриктазы и метилтрансферазы РМ системы BspACI, что позво-

лит существенно снизить стоимость ферментов относительно таковых, выделяемых из природного штамма *Bacillus psychrodurans* AC. Для осуществления этой цели поставлены следующие задачи: клонирование, установление первичной структуры генов РМ системы BspACI, а также последующая их экспрессия в составе векторов *E.coli*, и выделение рекомбинантных ферментов.

Материалы и методы

В работе используются эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигаза фага T4, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli*, dATP, dTTP, dGTP, dCTP производства ООО «СибЭнзайм» (Новосибирск). Генно-инженерные манипуляции проводили согласно [4]. Хромосомную ДНК *Bacillus psychrodurans* AC выделяли методом фенольной экстракции [4], плазмидную ДНК выделяли с использованием колонок QIAGEN (Германия) согласно рекомендациям производителя. Нуклеотидную последовательность ДНК определяли по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе «Gene analyzer» ABI 310 [5], праймеры для полимеразной цепной реакции (ПЦР) рассчитывали с помощью программы «OLIGO» [6].

Результаты

На первом этапе работы необходимо было создать геномную библиотеку штамма *Bacillus psychrodurans* AC для обнаружения генов, относящихся к РМ системе BspACI. Для этого хромосомную ДНК *Bacillus psychrodurans* AC гидролизировали рестриктазами PstI, Zsp2I. Полученные фрагменты клонировали в составе плазмидного вектора pUC19 по участку рестрикции PstI. Проводили электропорацию клеток *E. coli* ER2267 лигированными молекулами ДНК, выделяли суммарную «библиотеку», состоящую из набора плазмид, и обрабатывали ее рестриктазой BspACI с целью выявления плазмиды, обладающей защитой к действию эндонуклеазы рестрикции BspACI. После повторной трансформации клеток получили восемь клонов. Плазмидные

ДНК всех этих клонов обладали устойчивостью к действию рестриктазы BspACI и содержали вставку длиной 4 тысячи пар нуклеотидов. Плазмида названа pMBspACI.

После установления нуклеотидной последовательности pMBspACI и анализа аминокислотных последовательностей, соответствующих обнаруженным открытым рамкам трансляции, оказалось, что вставка содержит два гена метилтрансфераз M1.BspAC и M2.BspAC.

Исходя из того, что гены эндонуклеазы рестрикции и метилтрансферазы одной РМ системы тесно сцеплены друг с другом, мы предположили, что ген рестриктазы располагается следом за генами двух метилтрансфераз. Последовательность нуклеотидов фрагмента, следующего за клонированным участком, была определена с помощью метода селективной супрессии ПЦР [7]. На расстоянии 90 п.н. справа от гена *bspACM1* была обнаружена третья открытая рамка трансляции, по-видимому, соответствующая гену рестриктазы BspACI. Планируется клонирование этого гена в составе экспрессирующего вектора pBAD/Thio, разработка оптимальной схемы выделения рекомбинантной рестриктазы. На сегодняшний день изучена активность рестриктазы, выделенной из дикого штамма, на метилированных субстратах. Такая информация чрезвычайно полезна при работе с ДНК млекопитающих, что еще раз подчеркивает важность изучаемого фермента.

Ген метилтрансферазы M1.BspAC, в данный момент, клонирован в составе экспрессирующего вектора pJW2 [8] по сайтам рестрикции BamHI и FauNDI. После трансформации лигазной смеси в штамм *E.coli* RRI и отбора выросших при 30°C клонов была получена рекомбинантная плазмида pM1BspACI, несущая функционально активный ген *bspAC1M1*. Из целевого клона была наработана биомасса, и из нее был выделен гомогенный препарат рекомбинантной метилтрансферазы M1.BspACI. Для данного фермента были определены оптимальные условия работы (30°C, реакционный буфер: 100 mM Трис HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.2 mg/ml BSA, 2% глицерин, pH=8), стационарные кинетические параметры реакции метилирования, а также метилируемое основание (первый цитозин последовательности 5'-CCGC-3').

Ген второй метилтрансферазы клонирован в составе вектора pJW2 по сайтам BglII и SalI. Из наработанной биомассы клеток, несущих плазмиду с функционально активным

геном *bspAC1M2* выделен препарат M2.BspACI. Определяются оптимальные условия его работы и кинетические характеристики.

Коммерциализация результатов работы

Стоимость эндонуклеазы рестрикции Acil (прототипа BspACI): у New England BioLabs Inc. (США), единственной коммерческой организации, выделяющей фермент из рекомбинантного штамма, составляет 7530 руб за 1000 единиц фермента, 1882 руб – за 200 единиц. В ООО «СибЭнзайм» стоимость нативной эндонуклеазы рестрикции BspACI составляет 8360 руб и 2090 руб соответственно (с учетом курса доллара 30.8617 руб за доллар на 14.09.09). В обоих случаях за единицу активности принимается количество фермента, необходимое для гидролиза 1 мкг ДНК фага лямбда за 1 час при 37°C в 50 мкл реакционной смеси. Экспрессия генов в составе векторов *E.coli* и выделение рекомбинантных ферментов понижает их стоимость на 30-50 %, таким образом, мы получим штамм-продуцент эндонуклеазы рестрикции BspACI, который будет являться более привлекательным для покупателей на отечественном и зарубежном рынках, а также штаммы-продуценты метилтрансфераз M1.BspACI и M2.BspACI, ферментов, не имеющих коммерчески доступных аналогов.

Приведенные выше перспективы коммерциализации по сути дела представляют собой мероприятия по импортозамещению. Значение подобных разработок в настоящее время устойчиво повышается в связи со все шире внедряющимися в клинко-диагностическую практику методами молекулярно-биологического исследования при идентификации личности, установлении родства. Кроме того, молекулярно-биологические и генетические методы, среди которых получение рестрикционных карт генетического материала, все глубже проникают и в криминалистическую практику.

Таким образом, все вышесказанное свидетельствует о наличии перспектив коммерциализации предлагаемой разработки.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ

1. Статья «Новая сайт-специфическая эндонуклеаза BspACI из *Bacillus psychrodurans* AC узнает последовательность 5'-C↓CGC-3'/5'-G↑CGG-3'» представлена к опубликованию в журнал «Вестник биотехнологии»

и физико-химической биологии имени Ю.А.Овчинникова».

2. Ломоносов-2009: Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология»; 13-18 апреля 2009г., Москва, МГУ имени Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов/ Сост.: А.Н. Демидова и др.– М.: МАКС Пресс, 2009. – С. 192-193.

3. Материалы XLVII Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Биология / Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2009. С. 146-147.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>

2. Polisson C, Morgan RD. // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18(19). P.5911.

3. <http://russia.sibenzyme.com/productinfo.phtml?id=793>

4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.

5. Сайки Р., Гилленстен У., Эрлих Г. // Анализ генома. Методы / Под ред. Дейвиса К. М.: Мир, 1990. С. 184-190.

6. Pearson W.R., Lipman D.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 2444-2448. Siebert P.D., Chenchik A., Kellogg D.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. // Nucleic Acids Res. 1995. V. 23. P. 1087-1088.

7. Kossykh V.G., Schlagman S.L., Hattman S.M. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. No. 24. P. 14389-14393.