



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013137909/10, 13.08.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.08.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.08.2013

(45) Опубликовано: 27.09.2014 Бюл. № 27

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 1602055 С, 30.10.1994.
ЧЕРНУХИН В.А. и др., Новая сайт-специфическая эндонуклеаза рестрикции VpuN4I узнает и расщепляет последовательность ДНК 5'-G[^]GNNCC-3', Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова, 27.06.2013, Т.9, No.2, с.5-8. US 20110207139 А1, 25.08.2011

Адрес для переписки:

630117, г.Новосибирск, а/я 5, Кучумовой Л.Я.

(72) Автор(ы):

Дедков Владимир Сергеевич (RU),
Гончар Данила Александрович (RU),
Ломаковская Елена Николаевна (RU),
Чернухин Валерий Алексеевич (RU),
Шинкаренко Надежда Михайловна (RU),
Дегтярев Сергей Харитонович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
"СибЭнзайм" (RU)

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ БАКТЕРИЙ Escherichia coli N41 (pVpuN4/MR)-ПРОДУЦЕНТ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ VpuN4I

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой рекомбинантный штамм бактерий Escherichia coli N41 (pVpuN4/MR), который получен путем трансформации штамма Escherichia coli ER2267 плазмидой pVpuN4/MR N41, полученной на основе плазмиды pUC19 и содержащей ген, кодирующий ДНК-метилтрансферазу M.VpuN4I, метилирующую один из цитозинов в положении С5 в последовательности 5'-GGNNCC-3', и ген рестриктазы VpuN4I. Настоящий рекомбинантный

штамм бактерий Escherichia coli N41 (pVpuN4/MR) является продуцентом сайт-специфической эндонуклеазы рестрикции VpuN4I, узнающей последовательность ДНК 5'-G[^]GNNCC-3'/3'-CCNNG[^]G-5' и расщепляющей обе её цепи после первого гуанина с образованием 5'-выступающих четырёхнуклеотидных липких концов. Настоящее изобретение позволяет получить рестриктазу заданной специфичности с высоким выходом. 3 ил., 4 пр.

RU 2 529 362 С1

RU 2 529 362 С1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 529 362**⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013137909/10, 13.08.2013

(24) Effective date for property rights:
13.08.2013

Priority:

(22) Date of filing: 13.08.2013

(45) Date of publication: 27.09.2014 Bull. № 27

Mail address:

630117, g.Novosibirsk, a/ja 5, Kuchumovoj L.Ja.

(72) Inventor(s):

**Dedkov Vladimir Sergeevich (RU),
Gonchar Danila Aleksandrovich (RU),
Lomakovskaja Elena Nikolaevna (RU),
Chernukhin Valerij Alekseevich (RU),
Shinkarenko Nadezhda Mikhajlovna (RU),
Degtjarev Sergej Kharitonovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"SibEhnzajm" (RU)**

(54) **RECOMBINANT STRAIN OF BACTERIA Escherichia coli N41 (pBpuN4/MR) -PRODUCER OF SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE OF RESTRICTION BpuN4I**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention is a recombinant strain of bacteria Escherichia coli N41 (pBpuN4/MR), which is obtained by transformation of the strain Escherichia coli ER2267 of plasmid pBpuN4/MR N41, obtained based on plasmid pUC19 and containing the gene encoding DNA-methyltransferase M.BpuN4I, methylating one of cytosines in position C5 in the sequence 5'-GGNNCC-3', and the restriction endonuclease gene BpuN4I. This recombinant strain of

bacteria Escherichia coli N41 (pBpuN4/MR) is the producer of the site-specific endonuclease of restriction BpuN4I which recognises DNA sequence 5'-G[^]GNNCC-3'/3'-CCNNG[^]G-5' and cleaves both its chains after the first guanine to form 5'-protruding four-nucleotide cohesive ends.

EFFECT: invention enables to obtain restriction endonuclease of the predetermined specificity with high yield.

3 dwg, 4 ex

R U 2 5 2 9 3 6 2 C 1

R U 2 5 2 9 3 6 2 C 1

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к генной инженерии и микробиологической промышленности, и касается нового рекомбинантного штамма бактерий *Escherichia coli* (*E.coli*), который может быть использован для получения высокоактивного препарата эндонуклеазы рестрикции *BpuN4I*, узнающей и расщепляющей последовательность ДНК 5'-G[↓]GNNCC-3' после первого гуанина на обеих цепях.

Главными биотехнологически значимыми параметрами эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз) являются узнаваемая последовательность, позиция гидролиза относительно этой последовательности и активность препарата фермента, выделенного из соответствующего штамма-продуцента.

Наиболее близким к заявляемому штамму - прототипом, является штамм *Neisseria lactamica*, продуцирующий рестриктазу *NlaIV*, которая узнает последовательность нуклеотидов 5'-GGN[^]NCC-3' и расщепляет ее после центрального нуклеотида N с образованием «тупых» концов [1].

Недостатком известного штамма является то, что продуцируемая им сайт-специфическая эндонуклеаза не расщепляет узнаваемую последовательность после первого гуанина и не обеспечивает появления четырехнуклеотидных 5'-выступающих липких концов. Это свойство оказывается существенно важным при проведении генно-инженерных манипуляций, когда необходимо с помощью рестриктаз разной специфичности получить сходные липкие концы.

В настоящее время не описаны штаммы бактерий, являющиеся продуцентами сайт-специфических эндонуклеаз, узнающих и расщепляющих последовательность ДНК 5'-G[↓]GNNCC-3' после первого гуанина на обеих цепях.

Задачей изобретения является получение рекомбинантного штамма *E.coli*, продуцирующего сайт-специфическую эндонуклеазу, которая узнает и расщепляет обе цепи нуклеотидной последовательности ДНК 5'-G[↓]GNNCC-3'/3'-CCNNG[↑]G-5'.

Поставленная задача решается путем получения штамма бактерий *E.coli* N41 (p*BpuN4/*MR) - продуцента сайт-специфической эндонуклеазы рестрикции, узнающей и расщепляющей последовательность нуклеотидов:



где стрелками указаны позиции расщепления ДНК.

Технический результат: получение рекомбинантного штамма бактерий *E.coli*, продуцирующего рестриктазу заданной специфичности с более высоким выходом по сравнению с исходным природным штаммом.

Предлагаемый штамм-продуцент получен трансформацией ДНК плазмиды p*BpuN4/*MR N41 клеток *E.coli* ER2267. Плазида p*BpuN4/*MR N41 получена в результате клонирования в *E.coli* участка хромосомной ДНК штамма *Bacillus pumilus* N4, являющегося продуцентом рестриктазы *BpuN4I*, который выделен из природного материала (почвы) в результате целенаправленного систематического поиска, но не является высокопродуктивным (активность препарата фермента, выделенного из него, составляет 1000 е.а./мл).

Плазида p*BpuN4/*MR N41 является рекомбинантной, содержит ген, кодирующий ДНК-метилтрансферазу M.*BpuN4I*, метилирующую один из цитозинов в положении C5 в последовательности 5'-GGNNCC-3', а также ген рестриктазы *BpuN4I*.

На фигуре 1 представлена физическая карта плазмиды p*BpuN4/*MR N41, где ORI - точка начала репликации плазмиды p*BpuN4/*MR;

Ar^r - ген BLA, обеспечивающий устойчивость к ампициллину;

P(BLA) - промотор гена BLA;

P(LAC) - промотор гена lacZ;

bpuN4IR - ген, кодирующий эндонуклеазу рестрикции BpuN4I;

bpuN4IM - ген, кодирующий ДНК-метилтрансферазу BpuN4I.

5 Сконструированной плазмидой pBpuN4/MR N41 трансформируют клетки E.coli штамма ER2267. Трансформантов отбирают на селективной агаризованной питательной среде, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, по резистентности к антибиотику, т.е. способности к росту в его присутствии. Содержание рекомбинантной рестриктазы BpuN4I составляет не менее 25000 е.а./г влажной биомассы.

10 Преимуществом заявляемого штамма по сравнению с наиболее близким аналогом является то, что при расщеплении ДНК продуцируемой им рестриктазой BpuN4I образуются четырехнуклеотидные 5'-выступающие липкие концы, сходные с концами, получающимися при расщеплении ДНК такими эндонуклеазами рестрикции, как, например, XhoII и BstX2I (сайт узнавания 5'-R[^]GATCY-3'), Acc65I (5'-G[^]GTACC-3'),
15 AccVI (5'-G[^]GYRCC-3'), BamHI (5'-G[^]GATCC-3'), а также рядом других рестриктаз [2], что позволяет эффективно применять фермент BpuN4I в разнообразных генно-инженерных манипуляциях.

Штамм E.coli N41 (pBpuN4/MR) имеет следующие характеристики.

Культурально-морфологические признаки.

20 Клетки мелкие палочковидной формы, грамтрицательные, 1×3,5 мкм, подвижные. Штамм хорошо растет на обычных питательных средах (МПА, МПБ, LB-бульон, LB-агар, минимальная среда с глюкозой). При росте на агаризованной среде LB колонии круглые, гладкие, полупрозрачные, блестящие, серые. Край ровный, диаметр колоний 1-3 мм, консистенция пастообразная. Рост в жидких средах (LB, минимальная среда с
25 глюкозой) характеризуется ровным помутнением, осадок легко седиментирует.

Физиолого-биохимические признаки.

Клетки растут при 4-42°C, оптимум pH 6,8-7,6. В качестве источника азота используют как минеральные соли аммония, так и органические соединения: аминокислоты, пептон, триптон, дрожжевой экстракт. В качестве источника углерода при росте на минимальной
30 среде используют глицерин, углеводы, аминокислоты.

Генетические признаки, устойчивость к антибиотикам.

Штамм-хозяин Escherichia coli ER2267 (F' proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zff::mini-Tn10 (KanR)/ Δ(argF-lacZ)U169 glnV44 e14-(McrA-) Δ(mcrC-mrr)). Проявляет устойчивость к канамицину (до 25 мкг/мл).

35 Штамм E.coli N41 (pBpuN4/MR) дополнительно проявляет устойчивость к ампициллину (до 300 мкг/мл), обусловленную наличием гена устойчивости в ДНК рекомбинантной плазмиды pBpuN4/MR N41.

Условия хранения штамма.

40 Штамм E.coli N41 (pBpuN4/MR) хранят на агаризованной среде LB со 100 мкг/мл ампициллина на чашках Петри или в стеклянных пробирках со скошенным агаром при 4°C. Пересевы на свежие среды делают один раз в месяц. Может храниться не менее года в среде LB, содержащей 30% глицерин, при -50-70°C.

Длительное хранение штамма осуществляют в лиофильно высушенном состоянии или в растворе 30% глицерина при температуре -70°C.

45 Для культивирования штамма применяют среду следующего состава (г/л): пептон - 10, дрожжевой экстракт - 5, NaCl - 5, ампициллин 0,0001. Культивирование проводят при 37°C с аэрацией до достижения стационарной стадии роста. Выход препарата фермента составляет ~0,433 мл/г сырой биомассы с концентрацией 16000 е.а./мл.

Продуцируемая новым рекомбинантным штаммом рестриктаза VruN4I характеризуется следующими свойствами:

1. Узнает и расщепляет последовательность 5'-GGNNCC-3' на обеих цепях ДНК после первого гуанина.

5 3. Не расщепляет вышеприведенную последовательность, если внутренние цитозины на обеих цепях метилированы.

4. Оптимальная температура реакции 37°C.

5. Фермент проявляет высокую активность в буфере следующего состава: 33 мМ Трис-ацетат (рН 7,9 при 25°C), 10 мМ магния ацетат, 66 мМ калия ацетат, 1 мМ ДТТ.

10 Определяющим отличием предлагаемого штамма от всех известных в настоящее время штаммов-продуцентов сайт-специфических эндонуклеаз является то, что он позволяет получать коммерчески доступный препарат, не имеющей аналогов рестриктазы VruN4I, которая узнает и расщепляет обе цепи последовательности 5'-G[^]GGNNCC-3' после первого гуанина.

15 Новая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза VruN4I является неоизомером рестриктазы NlaIV, то есть узнает ту же последовательность ДНК, но расщепляет ее в другой позиции. Все описанные до последнего времени изоизомеры NlaIV, расщепляют узнаваемый сайт 5'-GGN[^]NCC-3' посередине (между центральными нуклеотидами), давая «тупые» концы.

20 Поскольку предлагаемый штамм получен впервые и для выделения сайт-специфической эндонуклеазы, узнающей и расщепляющей вышеназванную последовательность нуклеотидов, в указанной позиции никогда не использовался, можно сделать вывод о соответствии предлагаемого штамма критериям изобретения «новизна» и «изобретательский уровень».

25 Изобретение иллюстрируется примерами конкретного выполнения.

Пример 1. Конструирование рекомбинантной плазмиды pVruN4/MR N4I

Получение библиотеки клонов E.coli.

30 Хромосомную ДНК *Bacillus pumilus* N4 гидролизовали отдельно рестриктазами MfeI (5'-C[^]AATTG-3') и EcoRI (5'-G[^]AATTC-3'). Гидролиз проводили в пробирках типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл. Объем реакционной смеси составлял 200 мкл, из них 20 мкл - десятикратный реакционный буфер для эндонуклеазы рестрикции, 30 мкл - раствор ДНК *Bacillus pumilus* N4, 150 мкл бидистиллированной воды, а также 2 мкл препарата соответствующей эндонуклеазы рестрикции. Смесь инкубировали в термостате при +37°C в течение 1 часа. Затем гидролизаты ДНК очищали экстракцией фенолом-
35 хлороформом, переосаждали этанолом согласно методике [3] и растворяли в 25 мкл воды. Параллельно готовили гидролизат вектора: ДНК плазмиды pUC19 [4] линеаризовали эндонуклеазой рестрикции EcoRI (подходит для сшивки с EcoRI- и MfeI- гидролизатами ДНК *Bacillus pumilus* N4, поскольку в результате расщепления этими ферментами образуются одинаковые 5'-выступающие концы 5'-[^]AATT-3').

40 Гидролиз векторной плазмиды проводили в 400 мкл реакционной смеси, содержащей по 40 мкл реакционного буфера, 20 мкл препарата плазмиды pUC19 с концентрацией 0,5 мг/мл, 340 мкл воды, а также 5 мкл препарата рестриктазы EcoRI. Смесь инкубировали в термостате при +37°C в течение 1,5 часов. После чего в смесь добавляли по 2 мкл препарата щелочной фосфатазы из кишечника теленка и инкубировали еще
45 30 мин при той же температуре. Обработка концов вектора фосфатазой вела к удалению 5'-концевых фосфатных групп, что позволяло избежать самолигирования концов вектора и существенно повышало эффективность сшивки вектора с фрагментами хромосомной ДНК штамма *Bacillus pumilus* N4. Далее гидролизованную плазмиду очищали

экстракцией фенолом-хлороформом, переосаждали этанолом и растворяли в 20 мкл буфера TE (10 mM Трис-НСl, (рН 8,0), 1 mM ЭДТА).

На следующем этапе осуществляли лигирование вектора pUC19/EcoRI со смесью гидролизатов ДНК *Bacillus pumilus* N4 ферментами EcoRI и MfeI. Процедуры лигазной сшивки, а также дальнейшей трансформации клеток *E. coli* осуществляли на основе методик из [3].

Для получения библиотеки клонов, несущих рекомбинантные плазмиды, проводили сшивку фрагментов вектора и хромосомной ДНК в 30 мкл реакционной смеси. Лигазная смесь содержала 3 мкл десятикратного буфера для лигирования, 3 мкл вектора pUC19/EcoRI, 15 мкл гидролизата ДНК *Bacillus pumilus* N4 ферментом EcoRI и 9 мкл гидролизата ДНК *Bacillus pumilus* N4 ферментом MfeI. К смеси добавляли 1 мкл высокоактивной Т4-ДНК-лигазы и смесь инкубировали в течение ночи при +4°C. Затем ДНК осаждали этанолом и растворяли в 12 мкл воды.

Полученной таким образом лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* штамма ER2267 путем электропорации на приборе «Easyject Prima» («EquiBio», UK) по инструкции производителя. После обработки импульсом к суспензии клеток добавляли по 1 мл нагретого до +37°C бульона LB и подращивали клетки в термостате при +37°C в течение 1 часа. После чего отбирали 1/100 часть культуры и высевали на чашку Петри с агаризованной средой LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Чашку выдерживали в термостате при +37°C, после чего подсчитывали количество выросших клонов с целью определения титра клонов *E. coli* в библиотеке, который составил 30 тысяч колоний на 1 мкг ДНК. Основную часть культуры помещали во флакон со 100 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и выращивали в течение ночи на термостатированной воздушной качалке при +37°C и 140 об/мин. В результате была получена библиотека клонов *E. coli*, содержащих рекомбинантные плазмиды, включающие статистический набор различных фрагментов ДНК *Bacillus pumilus*: *E. coli* Σ pBruN4/MR (общее количество клонов - 20 тыс.).

Селекция клонов с целью выявления продуцента рекомбинантной рестриктазы BruN4I.

Селекцию целевых клонов, содержащих активность рестриктазы BruN4I, проводили путем последовательного деления (разведения) геномной библиотеки. Для этого все 20 тысяч клонов *E. coli*, содержащих геномную библиотеку *B. pumilus* N4, подращивали во флаконе со 100 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина в течение ночи при 37°C со встряхиванием 140 об/мин. Культура достигала оптической плотности 2,5 единицы при 540 нм и имела титр 3×10^8 к.о.е./мл (колоний образующих единиц в 1 мл). Культуру разбавляли до 105 к.о.е./мл в ТМ-буфере (10 mM Трис-НСl (рН 7,5), 10 mM MgSO₄, 0,2 мг/мл желатин) и раскапывали в чашки Петри по 10 мкл на 30 секторов LB-агара с ампициллином так, чтобы из 10 мкл выросло примерно 1000 клеток. Чашки инкубировали 2 дня при 22°C. Каждую смесь колоний из сектора переносили петлей в ячейку планшета со 100 мкл буфера для музея, содержащего 25% глицерин, 40 mM NaCl и 10 mM Трис-НСl (рН 7,6), и хранили при -18°C. Из полученных суспензий отбирали по 2 мкл в лизирующий буфер (10 mM Трис-НСl (рН 7,6), 50 mM NaCl, 1 mM ЭДТА с добавлением 0,2 мг/мл лизоцима и 0,1% Тритона X-100) и тестировали активность рестриктазы в лизате на ДНК фага λ в SE-буфере «Y» (33 mM Трис-ацетат (рН 7,9 при 25°C), 10 mM магния ацетат, 66 mM калия ацетат, 1 mM ДТТ) согласно методу, описанному ранее [5]. Смесь клонов из $2-3 \times 10^8$ к.о.е./100 мкл, в которой выявлялась активность рестриктазы, снова разводили в ТМ-буфере и раскапывали по 100 к.о.е./10

мкл на 30 секторов LB-агара с ампициллином. Выращивали, переносили в музей и тестировали. Таким же образом сотню делили на десятки. Смесь клеток из 10 клонов, содержащую целевую активность, рассеивали до отдельных колоний. Из них 30 колоний пересевали на чашку и выращивали при 37°C в течение 20 часов. После чего

5 анализировали активность рестриктазы BpuN4I в лизатах индивидуальных клонов.

В результате был отобран клон E.coli N41 (pBpuN4/MR), который проявлял активность рестриктазы BpuN4I в лизате. Для плазмиды из этого клона, названной pBpuN4/MR N41 была определена нуклеотидная последовательность встроенного фрагмента по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 («Applied Biosystems»,
10 США). Было показано, что pBpuN4/MR N41 содержит MfeI-фрагмент ДНК Bacillus subtilis N4, встроенный в вектор pUC19/EcoRI. Длина фрагмента составила 3495 пар нуклеотидов. Встроенный фрагмент включает гены ДНК-метилтрансферазы и эндонуклеазы рестрикции BpuN4I. Позиции открытых рамок считывания (направлены по комплементу): 624-1646 - ген bpuN4IR, 1695-3023 - ген bpuN4IM. Нуклеотидная
15 последовательность встроенного фрагмента была депонирована в базе данных Международного банка данных последовательностей GenBank (.gov/genbank/): BpuN4I_RM.sqn BpuN4I_RM KF150199.

Пример 2. Выращивание штамма и выделение рекомбинантной рестриктазы BpuN4I.

Получение биомассы клеток штамма-продуцента.

20 Для получения биомассы клетки штамма-продуцента E.coli N41 (pBpuN4/MR) переносили на агаризованную среду LB с ампициллином в чашку Петри и инкубировали в течение ночи при 37°C. Свежевыращенные колонии переносили в две колбы объемом 500 мл, содержащих по 300 мл бульона (1% триптон («Organotechnie», Франция), 0,5% дрожжевой экстракт («Organotechnie», Франция), 0,5% NaCl, 0,05% MgCl₂ и 0,001%
25 тиамин, (рН 7,0), и 50 мкг/мл ампициллина) и подрачивали при +30°C в течение 18 часов без встряхивания. Затем культура рассеивалась по 10 мл по 20 колбам, содержащим по 300 мл бульона. Колбы встряхивали при 130 об/мин в инкубаторе («New Brunswick»)
(США) при +30°C в течение 18 часов. Для измерения в клетках активности BpuN4I из культуры отбирались по две пробы по 1 мл в пробирки «Eppendorf», клетки осаждали
30 в настольной центрифуге «5416 Eppendorf» («Eppendorf GmbH», Германия) при 12000 об/мин 3 минуты, супернатанты убирали, а клетки замораживали при -18°C. Биомассы культур осаждали на центрифуге J2-21 («Весктап», США) в течение 30 минут в роторе JA-10 при 8000 об/мин, замораживали и хранили при -20°C. Получали 12 г замороженных клеток, что составляло 2 г/л бульона. Содержание рекомбинантной рестриктазы BpuN4I
35 составляло 25000 е.а./г влажной биомассы

Выделение фермента и используемые буферы.

Выделение проводили при +4°C с использованием следующих растворов:

Буфер А - 10 мМ Трис-НСl, (рН 7,5), 0,1 мМ ЭДТА и 7 мМ β-меркаптоэтанол;

40 Буфер Б - 20 мМ Трис-НСl, (рН 7,5), 1,5 М сульфат аммония, 0,1 мМ ЭДТА и 7 мМ β-меркаптоэтанол.

Экстрагирование. 12 г биомассы суспендировали в 50 мл буфера А с 0,2 М NaCl, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторида, 0,3 мг/мл лизоцима, 0,1% Тритона X-100 и инкубировали в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Клетки разрушали ультразвуком на «Soniprep 150» («MSE», Англия) с диаметром адаптера 2 см. Обработка
45 проводилась при амплитуде 20 мкм 6 раз по 0,5 мин с интервалами по 1,5 мин с охлаждением суспензии в ледяной бане. Экстракт осветляли центрифугированием при 15000 об/мин в течение 45 мин в роторе JA-20 на центрифуге «J-2-21» («Весктап», США). Супернатант разбавляли в 2 раза буфером А.

Хроматография на фосфоцеллюлозе.

Супернатант пропускали через колонку с фосфоцеллюлозой P-11 («Whatman», Англия) объемом 20 мл, предварительно уравновешенной буфером А, содержащим 0,1 М NaCl, затем белок элюировался линейным градиентом NaCl (0,1 М - 0,5 М) в буфере А объемом 500 мл. В результате собирали 50 фракций объемом по 10 мл. Активные фракции (№22-29) объединяли.

Хроматография на фенил-сефарозе.

В объединенные активные фракции (суммарный объем 80 мл) добавляли буфер Tris-HCl, pH 7,5 до концентрации 20 мМ и сульфат аммония до концентрации 1,5 М. Белок наносили на колонку с фенилсефарозой (объемом 3 мл), уравновешенной 15 мл буфера Б. Далее осуществляли элюцию фермента линейным градиентом сульфата аммония (1,5 М - 0,1 М) в буфере Б объемом 150 мл. В ходе хроматографии собирали 60 фракций объемом по 2,5 мл. Активные фракции (№28-35) объединяли.

Хроматография на гепарин-сефарозе.

Объединенные активные фракции диализовали против 1 л буфера А в течение 3 часов и наносили на колонку с гепарин-сефарозой объемом 3 мл, уравновешенной 15 мл буфера А с 50 мМ NaCl. Элюцию фермента проводили линейным градиентом NaCl (0,05 М - 0,5 М) в буфере А объемом 100 мл. Из полученных 40 фракций объемом 2,5 мл отбирали активные фракции (№21-26), в которые добавляли БСА до концентрации 50 мкг/мл.

Концентрирование и хранение препарата. Объединенные фракции диализовали в течение 16 часов против 200 мл буфера, содержащего 10 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол, 0,05 М NaCl, 50% глицерин. Препарат VruN4I хранили при -20°C.

Суммарный выход фермента в препарате составил ~6900 е.а./г сырой биомассы, что примерно в 50 раз выше по сравнению с соответствующим диким штаммом.

Пример 3. Сайт-специфический гидролиз субстратных ДНК рекомбинантной рестриктазой VruN4I

Расщепление ДНК рекомбинантной рестриктазой VruN4I проводили в оптимальных условиях (температура 37°C, реакционный буфер - SE-буфер «У» 33 мМ Трис-ацетат (pH 7.9 при 25°C), 10 мМ магния ацетат, 66 мМ калия ацетат, 1 мМ ДТТ) в течение 60 мин. Продукты расщепления ДНК разделяли путем электрофореза в 1% агарозном геле.

В качестве субстратов для выявления специфичности расщепления использовали ДНК фагов λ и T7. На фиг.2 представлена электрофореграмма продуктов расщепления ДНК фагов λ и T7 рестриктазой VruN4I, где дорожки:

- ДНК фага λ;
- ДНК фага λ, обработанная рестриктазой PspN4I;
- ДНК фага λ, обработанная рестриктазой VruN4I;
- ДНК фага T7;
- ДНК фага T7, обработанная рестриктазой PspN4I;
- ДНК фага T7, обработанная рестриктазой VruN4I;

7 - маркер молекулярного веса ДНК 1 kb (производства ООО «СибЭнзайм»).

Как видно из фиг.2, картины гидролиза ДНК фагов X и T7 рестриктазами PspN4I и VruN4I совпадают, что подтверждает идентичность последовательности (5'-GGNNCC-3'), узнаваемой этими ферментами.

Пример 4. Определение позиции гидролиза ДНК рестриктазой VruN4I.

Для подтверждения правильности установленной последовательности узнавания

VruN4I и определения позиции расщепления ДНК авторы проводили гидролиз синтетического олигонуклеотидного дуплекса, образованного из комплементарных олигонуклеотидов KpnI-1 и KpnI-2. Узнаваемая VruN4I последовательность выделена рамочкой.



Определение места гидролиза ДНК VruN4I осуществляли путем сравнения длин фрагментов, образуемых при расщеплении эндонуклеазой рестрикции VruN4I с
 10 позициями гидролиза эндонуклеазы PspN4I, расщепляющей сайт узнавания 5'-GGNNCC-3' между центральными нуклеотидами N, и Acc65I, расщепляющей сайт узнавания 5'-CCTACC-3' после первого гуанина. В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этого же дуплекса экзонуклеазой EhoIII из E.coli. На фиг.3 приведен радиоавтограф электрофореграммы продуктов расщепления
 15 радиоактивно меченного дуплекса KpnI-1*/KpnI-2 в 20% ПААГ с 7М мочевиной, где дорожки:

- 1 - дуплекс KpnI-1*/KpnI-2;
- 2 - дуплекс KpnI-1*/KpnI-2, обработанный рестриктазой PspN4I;
- 3 - дуплекс KpnI-1*/KpnI-2, обработанный рестриктазой VruN4I;
- 20 4 - дуплекс KpnI-1*/KpnI-2, обработанный EhoIII;
- 5 - дуплекс KpnI-1*/KpnI-2, обработанный рестриктазой Acc65I.

Как видно из фиг.3, фрагменты ДНК, образованные в результате гидролиза ферментами VruN4I и Acc65I дуплекса KpnI-1*/KpnI-2, имеют одинаковую длину, что говорит об идентичности позиций гидролиза узнаваемой последовательности этих
 25 рестриктаз. В то же время длина P32-меченого фрагмента, образованного после гидролиза рестриктазой PspN4I, на два нуклеотида больше. Таким образом, VruN4I узнает последовательность ДНК 5'-GGNNCC-3' и расщепляет ее после первого гуанина на обеих цепях ДНК, образуя 5'-выступающие четырехнуклеотидные липкие концы.

Использование предлагаемого изобретения позволит расширить ассортимент
 30 высокопродуктивных штаммов-продуцентов, позволяющих получать высокоактивный препарат рестриктазы VruN4I с активностью не менее 16000 е.а./мл. Продуцируемая новым рекомбинантным штаммом рестриктаза VruN4I узнает и расщепляет последовательность ДНК 5'-GGNNCC-3' между двумя гуанинами, давая в результате 5'-выступающий липкий конец: 5'-G[^]GGNNCC-3'

35 Источники информации

1. Qiang B.Q. et al. Two unique restriction endonucleases from Neisseria lactamica. // Nucleic Acids Res. - 1986. - V.14. - P. 373-375.
2. Roberts R.J., Vineze T., Posfai J., Macelis D. REBASE - restriction enzymes and methylases. // Nucl. Acids Res. - 2003. - V.31. - P. 418-420.
- 40 3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. / Мир, 1984. - 479 с.
4. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. // Gene - 1985. - V.33. - P. 103-119.
- 45 5. Дедков В.С, Дегтярев С.Х. Определение эндонуклеаз рестрикции в колониях микроорганизмов Streptomyces и Nocardia. // Прикладная биохимия и микробиология. - 1992. - Т.28. - С.309-313.

Формула изобретения

Рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli* N41 (pVruN4/MR) - продуцент сайт-специфической эндонуклеазы рестрикции VruN4I, узнающей последовательность ДНК 5'-G[^]GNNCC-3'/3'-CCNNG[^]G-5' и расщепляющей обе её цепи после первого гуанина с образованием 5'-выступающих четырёхнуклеотидных липких концов, который получен путем трансформации штамма *Escherichia coli* ER2267 плазмидой pVruN4/MR N41, полученной на основе плазмиды pUC19 и содержащей ген, кодирующий ДНК-метилтрансферазу M.VruN4I, метилирующую один из цитозинов в положении C5 в последовательности 5'-GGNNCC-3', и ген рестриктазы VruN4I.

15

20

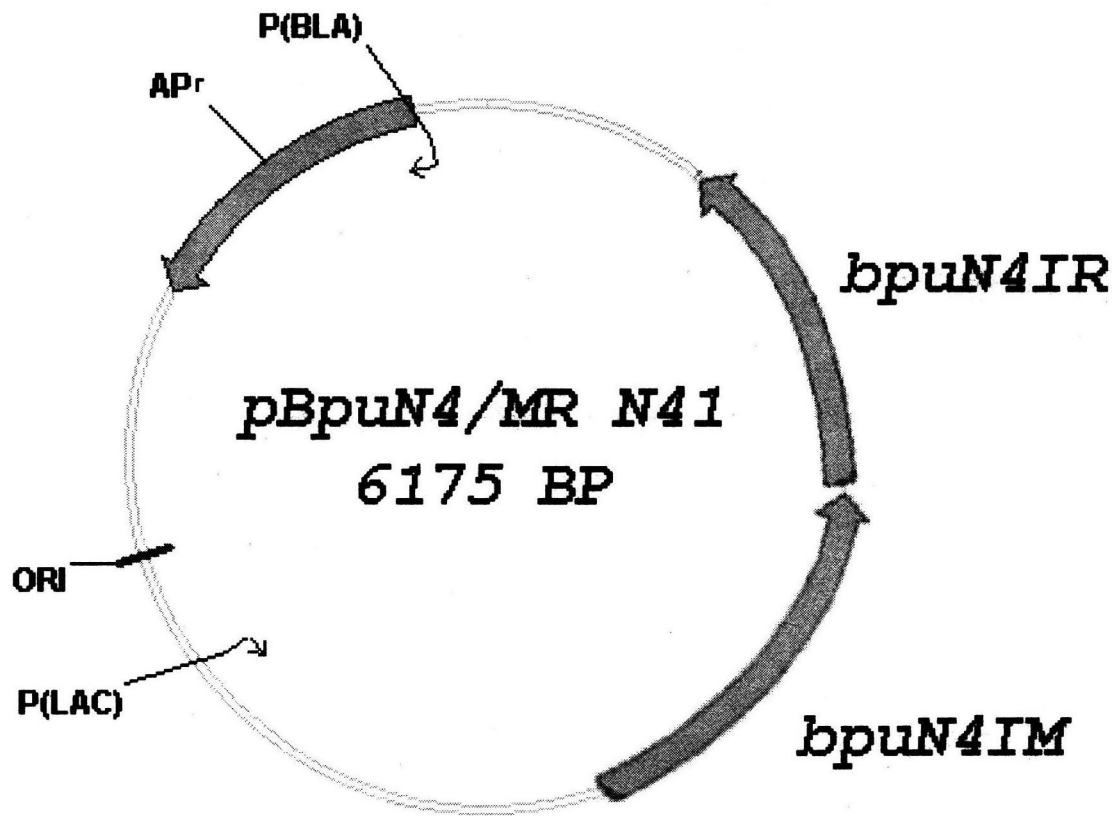
25

30

35

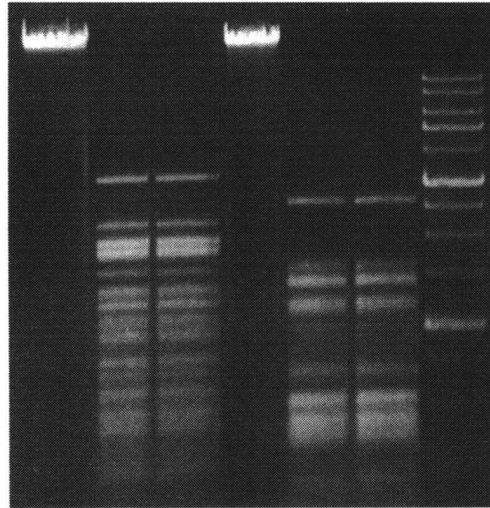
40

45



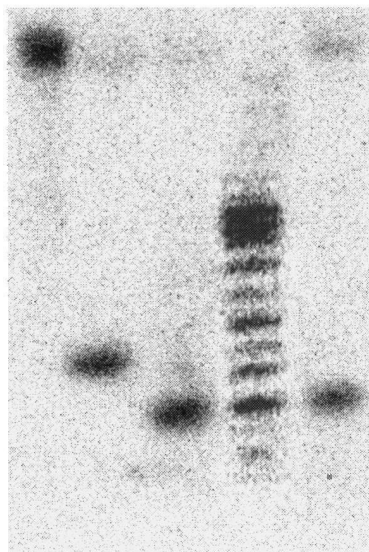
Фиг.1

1 2 3 4 5 6 7



Фиг.2

1 2 3 4 5



Фиг.3