



УДК 577.152.312.01

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДУКЛЕАЗА *Sau*V31
ИЗ *CHLOROFLEXUS AURANTIACUS* V3*Грамаров В. М., Фоменков А. И., Матвиенко Н. И.*,
Убиета Р. Х.*, Смолянинов В. В., Горленко В. М.****Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной микробиологии,
Оболensk Московский обл.;*** Институт белка Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.;**** Институт микробиологии Академии наук СССР, Москва*

Сайт-специфическая эндонуклеаза *Sau*V31 выделена из клеточного экстракта *C. aurantiacus* V3 путем хроматографии на гепарин-сефарозе. Полученный препарат был свободен от примесей неспецифических нуклеаз и фосфатаз. Эндонуклеаза узнает на двунитевой ДНК последовательность нуклеотидов 5'T[↓]CCGGA 3' и гидролизует ее в точке, указанной стрелкой. Выход фермента составил 3000 ед. акт. из 1 г биомассы. Узнаваемая последовательность нуклеотидов устойчива к гидролизу эндонуклеазой *Sau*V31, если содержит метилированный аденин.

В настоящее время известно более 400 сайт-специфических эндонуклеаз, узнающих около 100 различных последовательностей нуклеотидов [1]. Поиски новых сайт-специфических эндонуклеаз тем не менее продолжают с целью нахождения ферментов с новой специфичностью для последующего их использования при изучении первичной структуры ДНК и клонировании генов.

Ряд термофильных микроорганизмов был проверен нами на присутствие в их клетках сайт-специфических эндонуклеаз, в том числе и клетки зеленой бактерии *Chloroflexus aurantiacus* V3 [2], которые, как было показано, содержат сайт-специфическую эндонуклеазу, узнающую последовательность 5'TCCGGA 3'. В настоящем сообщении описаны процедура очистки и свойства эндонуклеазы *Sau*V31 (название в соответствии с номенклатурой [3]).

Биомассу *C. aurantiacus* V3 получали фототрофным культивированием при 50° С. Клетки биомассы, полученные таким путем, практически не содержат неспецифических эндонуклеаз, что подтверждается длительным инкубированием аликвоты из бесклеточного экстракта с ДНК фага λ без образования характерного шлейфа (данные не приведены). Вследствие этого препарат эндонуклеазы *Sau*V31, пригодный для структурных исследований ДНК, оказалось возможным получить путем одностадийной очистки на колонке с гепарин-сефарозой, хроматография на которой приводит также к очистке от большого количества оранжевого пигмента, присутствующего в клеточном экстракте *C. aurantiacus* V3. Следует отметить, что хроматография на фосфоцеллюлозе — носителе, обычно используемом для очистки подобных ферментов, не приводит к полному освобождению от пигмента.

Выход эндонуклеазы *Sau*V31 составил 3000 ед. акт. из 1 г биомассы, фермент стабилен при хранении в растворе 50% глицерина при -20° С более 1,5 лет.

Эндонуклеаза *Sau*V31 имеет на плазмиде pBR322 единственный сайт узнавания в районе 1664 п.о. 5'TCCGGATC 3', который частично перекрывается с сайтом GATC, метилируемым по аденину *dam*-метилазой *E. coli* [4, 5]. Указанная последовательность нуклеотидов не гидролизует эндонуклеазой *Sau*V31, если ДНК плазмиды pBR322 выделены из клеток *E. coli dam*⁺ (рис. 1), вследствие чего для определения точки расщепления

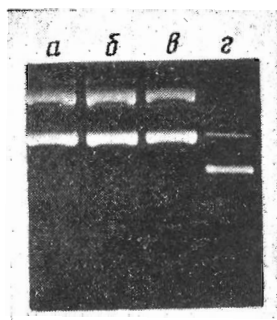


Рис. 1

Рис. 1. Электрофореграмма в 0,8% агарозном геле ДНК плазмиды рBR322dam⁺ (а) и рBR322dam⁻ (б) и тех же ДНК после инкубации с эндонуклеазой *Cau*V31 (соответственно в, г). Нативные формы ДНК рBR322 (а—б) присутствуют в виде димера, г — линейная форма — результат гидролиза эндонуклеазой *Cau*V31

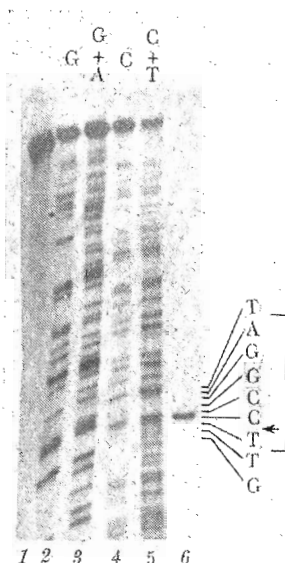


Рис. 2

Рис. 2. Радиоавтограф электрофореграммы ³²P-меченого фрагмента ДНК рBR322 (1), этого же фрагмента, модифицированного по Максаму — Гилберту (2—5; вверху геля указаны расщепляемые нуклеотидные звенья) и гидролизованного эндонуклеазой *Cau*V31 (6). Скобкой обозначен сайт узнавания эндонуклеазы, стрелкой — точка гидролиза ДНК

ДНК в составе узнаваемой последовательности использовали ДНК, выделенную из клеток *E. coli* dam⁻.

Точку расщепления ДНК эндонуклеазой *Cau*V31 определяли с использованием подхода, описанного ранее [6]. Сайт узнавания *Cau*V31 (1664 п.о.) входит в состав ³²P-меченого фрагмента ДНК плазмиды рBR322 с координатами 1602—1762 п.о., полученного последовательным гидролизом эндонуклеазами *Bbv*II и *Bme*216I (см. «Экспериментальную часть»). Этот фрагмент секвенировали по методу Максама — Гилберта (маркер для определения точки расщепления) и параллельно гидролизовали эндонуклеазой *Cau*V31. Анализ полученных данных (рис. 2) показал, что последовательность 5'T³²CCGGA 3' гидролизуется эндонуклеазой *Cau*V31 между Т и С (указано стрелкой). «Липкие» концы, продуцируемые эндонуклеазой *Cau*V31, аналогичны концам, образующимся при гидролизе ДНК эндонуклеазой *Xma*I. Это свойство *Cau*V31-фрагментов может быть использовано для их встраивания в сайты, имеющиеся в полилинкерах различных широко используемых векторных молекул [7].

Оптимальные условия эндонуклеазной реакции *Cau*V31: 30 мМ трис-НСl (рН 8,0), 5 мМ MgCl₂, 68° С. Эндонуклеазная активность ингибируется NaCl в концентрации более 100 мМ и РНК при соотношении РНК — субстрат свыше, чем 10 : 1.

Изошизомер *Cau*V31 — эндонуклеаза *Acc*III, выделенная недавно из *Acinetobacter calcoaceticus* [8], содержится в клетках в незначительном количестве. Для ее очистки требуется провести несколько хроматографических стадий для удаления неспецифических нуклеаз и присутствующих в клетках той же культуры эндонуклеаз *Acc*I и *Acc*II [8]. Поэтому относительно высокий выход, стабильность и легкость выделения *Cau*V31 делают перспективным использование этого фермента в молекулярно-биологических исследованиях.

Экспериментальная часть

Бактериальная культура *Chloroflexus aurantiacus* ВЗ выделена В. М. Горленко из горячих источников в районе оз. Байкал. Биомассу получали культивированием в анаэробных условиях при освещении лампой дневного света при 50° С на среде, содержащей (г/л): нитрилтриуксусную кислоту — 0,1; MgSO₄ — 0,1; KNO₃ — 0,1; NaNO₃ — 0,7; CaSO₄·2H₂O — 0,06; Na₂HPO₄ — 0,11; NH₄Cl — 0,2; NaCl — 0,08; диглицин — 0,8; CH₃COONa — 1; дрожжевой экстракт (Difco) — 1; триптон (Difco) — 1; FeCl₃ — 0,0006; раствор микроэлементов (см. ниже) — 0,5 мл/л; pH 7,5. Раствор микроэлементов содержал (г/л): ZnCl₂ — 0,04; MgCl₂·4H₂O — 0,2; CuCl₂·6H₂O — 0,016; CoCl₂·6H₂O — 0,05; (CH₃COO)₂Mg — 2; CaCl₂ — 0,2. Клетки выращивали до стационарной фазы и затем собирали центрифугированием.

Плазмиду pBR322 выделяли из *E. coli* RRI (dam⁺) и *E. coli* W321 (dam⁻) центрифугированием в градиенте хлористого цезия и последующей гель-фильтрацией на Toyopearl-NW-75 (Toyo Soda).

Гепарин-сефарозу получали как описано ранее [9].

Эндонуклеазы *Bbv*II, *Bme*216I выделяли согласно [10, 11], T4-полинуклеотидкиназа получена из НПО «Фермент» (Вильнюс).

Выделение эндонуклеазы *Sau*В3I: 2 г биомассы *C. aurantiacus* суспендировали в 3 мл буфера А (10 мМ К-фосфат, pH 7,0; 1 мМ EDTA; 2 мМ дитиотреит), содержащего 0,2 М NaCl, разрушали 2 мин ультразвуком на дезинтеграторе MSE при 0° С и амплитуде 12 мкм. Обломки клеток осаждали центрифугированием при 40 000 g, супернатант наносили на колонку (1 × 5 см) с гепарин-сефарозой, уравновешенной тем же буфером. После промывки колонки 10 мл буфера А, содержащего 0,2 М NaCl, белки элюировали линейным градиентом 0,2—1 М NaCl в буфере А (объем градиента 50 мл, фракции 1 мл, скорость элюции 6 мл/ч). Фракции, содержащие эндонуклеазу (0,4—0,46 М NaCl), объединяли, концентрировали диализом против буфера А, содержащего 0,2 М NaCl и 50% глицерин, и хранили при —20° С. Из 2 г биомассы получено 6000 ед. акт. *Sau*В3I.

Присутствие неспецифических нуклеаз в препарате фермента тестировали инкубацией 5'-³²P-меченого фрагмента ДНК pBR322 (1481—1601 п.о.), не содержащего сайта *Sau*В3I, с последующим разделением продуктов реакции в геле 10% полиакриламида. Продуктов деградации фрагмента не обнаружено, что говорит о функциональной чистоте фермента.

Точку расщепления ДНК эндонуклеазой *Sau*В3I определяли по методу, описанному для эндонуклеазы *Rsr*II [6]. ДНК pBR322 гидролизовали эндонуклеазой *Bbv*II [10], полученные фрагменты метили с помощью [γ -³²P]АТР и T4-полинуклеотидкиназы, затем гидролизовали эндонуклеазой *Bme*216I (изошизомер *Ava*II [11]) и разделяли электрофорезом в геле 10% полиакриламида. 5'-³²P-Меченый фрагмент ДНК pBR322 (1602—1762 п.о.) элюировали из геля, гидролизовали эндонуклеазой *Sau*В3I (маркер) или химически модифицировали по Максаму—Гилберту [12], продукты реакции разделяли в 10% полиакриламидном геле.

За единицу активности эндонуклеазы *Sau*В3I принимали количество фермента, полностью гидролизующее 1 мкг ДНК фага λ в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 30 мМ трис-НСI (pH 8,0), 5 мМ MgCl₂, при 68° С. Оптимальные условия гидролиза ДНК фага λ эндонуклеазой *Sau*В3I определяли, варьируя поочередно либо концентрацию одного из компонентов реакционной смеси, либо температуру инкубации, с последующим анализом продуктов реакции в 0,8% геле агарозы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kessler C., Neumaier P. S., Wolf W. // Gene. 1985. V. 33. № 1. P. 1—102.
2. Крамаров В. М., Прохорова С. О., Скрипина Н. А., Смолянинов В. В. // Тезисы III Всес. конф. «Биосинтез ферментов микроорганизмами». 1986. 21—23 апреля, Кобулет. Пуцуню, ИЦБИ АН СССР. С. 93.
3. Smith H. O., Nathans D. // J. Mol. Biol. 1973. V. 81. № 3. P. 419—423.
4. Sutcliffe J. G. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1978. V. 43. P. 77—90.
5. Herman G. E., Modrich P. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 5. P. 2605—2612.

6. O'Connor C. D., Metcalf E., Wrington C. I., Harris T. J. R., Saunders J. R. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 17. P. 6701—6708.
7. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. // Gene. 1985. V. 33. № 1. P. 103—119.
8. Kita K., Hiraoka N., Oshima A., Kadonishi S., Obayashi A. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 24. P. 8685—8694.
9. Bickle T. A., Pirrotta V., Imber R. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 8. P. 2561—2572.
10. Matvienko N. I., Pachkunov D. M., Kramarov V. M. // FEBS Lett. 1980. V. 177. № 1. P. 23—25.
11. Пачкунов Д. М., Крамаров В. М., Добрица А. П., Матвиенко Н. И. // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. № 1. С. 127—129.
12. Maxam A. M., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1975. V. 74. № 2. P. 560—564.

Поступила в редакцию
8.IX.1986

После доработки
24.XI.1986

A NEW SEQUENCE-SPECIFIC ENDONUCLEASE *CauB3I* FROM *CHLOROFLEXUS AURANTIACUS* B3

KRAMAROV V. M., FOMENKOV A. I., MATVIENKO N. I.*,
UBIETA R. H.*, SMOULANINOV V. V., GORLENKO V. M.**

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

A sequence-specific endonuclease *CauB3I* has been isolated from cell extracts of *Chloroflexus aurantiacus* and partially purified by chromatography on heparin-sepharose; the yield was 3000 units per 1 g of cells. The final preparation is free of non-specific nucleases. It is shown that endonuclease *CauB3I* recognizes 5' T[↓]CCGGA 3' sequence in double-stranded DNA and cleaves it as shown by an arrow. Methylation of adenine in the recognition sequence makes it resistant to *CauB3I*.