



УДК 577.152.314'14

© 1990 г.

Н. Н. Соколов, Э. П. Манялен\*, В. В. Буткус\*,  
А. Б. Фицнер, Э. Б. Хорошутина, А. А. Калугин,  
А. А. Янулайтис\*

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ *LpII* и *AagI*

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва;

\*ВНИИ прикладной энзимологии, Вильнюс

Из клеток *Achromobacter agile* и *Lactobacillus plantarum* выделены новые сайт-специфические эндонуклеазы *AagI* и *LpII*. Очистка ферментов включала в себя обработку бесклеточного экстракта полиэтиленгликолем, фракционирование в двухфазной системе по Альбертсону, хроматографию на голубой сефарозе и ДЕАЕ-целлюлозе. Результаты расщепления меченого  $^{32}\text{P}$  по 5'-концу синтетического олигодезоксинуклеотида свидетельствуют о том, что рестриктазы *LpII* и *AagI* узнают и расщепляют последовательность 5'-AT<sup>1</sup>CGAT-3' и являются истинными изошизомерами эндонуклеазы рестрикции *ClaI*. Штамм *L. plantarum*, обладающий в 400 раз более высокой рестриктазной активностью по сравнению с продуцентом *ClaI*, перспективен для препаративного получения фермента.

Большие успехи, достигнутые за последние 10—15 лет в области рекомбинантных ДНК, во многом обусловлены практическим использованием сайт-специфических эндонуклеаз (рестриктазы II класса, КФ 3.1.23.X). Интерес к рестриктазам как инструментам исследования объясняется, с одной стороны, их уникальными свойствами — образование липких концов в составе фрагментов ДНК, разнообразие узнаваемых нуклеотидных последовательностей и точек расщепления участков узнавания. С другой стороны, эндонуклеазы рестрикции, обладающие крайне высокой специфичностью в отношении узнаваемой и расщепляемой ими последовательности ДНК, представляют собой удобную модель для изучения важной общепроцессуальной проблемы нуклеиново-белкового узнавания. Этими обстоятельствами и объясняются широко проводимые как в СССР, так и за рубежом работы, направленные на поиск продуцентов новых рестриктаз, их выделение, идентификацию, биохимическую характеристику, практическое использование ферментов рестрикции в молекулярно-генетических исследованиях.

В результате проводимых в нашей лаборатории исследований было обнаружено 23 штамма-продуцента, синтезирующих по меньшей мере 27 эндонуклеаз рестрикции [1]. Ранее мы выделили и детально охарактеризовали рестриктазы *PaeI* и *PaeII*, оказавшиеся истинными изошизомерами соответственно рестриктаз *SphI* и *SmaI* [2, 3]. В данной работе описаны обнаружение, выделение и характеристики двух новых эндонуклеаз рестрикции *LpII* и *AagI*, продуцируемых соответственно штаммами *L. plantarum* и *A. agile*.

Методологической основой для поиска продуцентов новых рестриктаз являлся разработанный нами ранее высокочувствительный толуольный экспресс-метод тестирования рестриктазной активности у микроорганизмов [4]. При инкубации толуольных экстрактов из клеток *L. plantarum* и *A. agile* с ДНК фага  $\lambda$  наблюдается образование ряда дискретных фрагментов ДНК (рис. 1), при этом для обоих штаммов картина распределения фрагментов ДНК при электрофорезе в агарозном геле была сходной.



Рис. 1

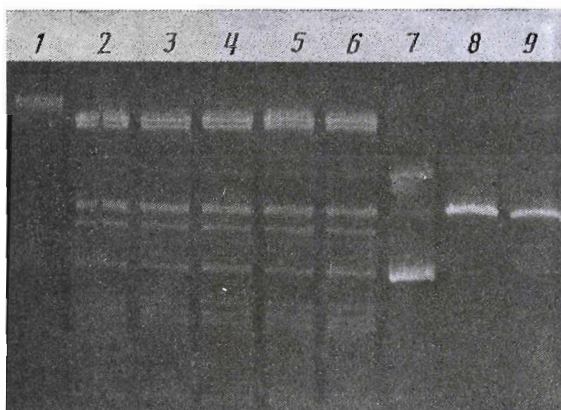


Рис. 2

Рис. 1. Электрофоретическое разделение в 1% агарозном геле продуктов расщепления ДНК фага  $\lambda$  толуольными экстрактами из клеток *A. agile* (1, 2) и *L. plantarum* (3, 4). Пробы объемом 30 мкл содержали ДНК фага  $\lambda$  (1 мкг), соответствующий буфер и толуольный экстракт (в мкл): 1 — 10; 2 — 20; 3 — 1; 4 — 2. Инкубация (37° С) в течение 20 мин (1-я и 2-я пробы) и 5 мин (3-я и 4-я пробы)

Рис. 2. Электрофорез в 1% агарозном геле фрагментов, образующихся при действии рестриктаз на ДНК фага  $\lambda$  (2—6) и плазмиду pBR322 (8, 9): ДНК фага  $\lambda$  (1); +*Cla*I (2); +*Lp*II (3); +*Aag*I (4); +*Lp*II + +*Cla*I (5); +*Aag*I + *Cla*I (6); pBR322 (7); +*Lp*II (8) +*Aag*I (9)

Эндонуклеазы проявляли активность в присутствии лишь ионов  $Mg^{2+}$ , тогда как S-аденозил-L-метионин и АТФ не влияли на их ферментативную активность. В соответствии с классификацией рестриктаз [5] эндонуклеазы были отнесены к сайт-специфическим эндонуклеазам рестрикции II класса и, согласно общепринятой номенклатуре [6], обозначены соответственно как *Aag*I и *Lp*II.

Рестриктазы *Lp*II и *Aag*I были очищены путем осаждения нуклеиновых кислот из бесклеточного экстракта полиэтиленмином, фракционирования в двухфазной системе полиэтиленгликоль 6000 — декстран Т500 по Альбертсону [7] и последовательных этапов жидкостной колоночной хроматографии на голубой сефарозе и DEAE-целлюлозе. Выход рестриктаз *Lp*II и *Aag*I на заключительном этапе очистки составил соответственно  $2 \cdot 10^5$  и  $1,7 \cdot 10^3$  ед. акт./г биомассы. Препараты ферментов не содержали примесей фосфатаз, неспецифических эндонуклеаз и экзонуклеаз и были пригодны для определения первичной структуры участка узнавания и положения точки его расщепления.

Оптимальная концентрация  $MgCl_2$  для рестриктаз *Aag*I и *Lp*II составляла соответственно 2,5—5 и 0,25—5 мМ. Эндонуклеаза рестрикции *Lp*II проявляла максимальную активность при рН 7,5—7,9 и имела широкий температурный оптимум с максимумом при 37° С; для рестриктазы *Aag*I оптимальные значения составили: рН 7,2—8,0 и 37° С. Добавление в инкубационную смесь NaCl в концентрации 25—50 мМ стимулировало, а в концентрации выше 120—150 мМ ингибировало активность обоих ферментов.

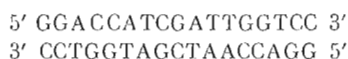
При электрофоретическом разделении в 1% агарозном геле продуктов

Размер рестриктных фрагментов ДНК фага  $\lambda$  (п. о.)

Фрагмент, №	Рестриктаза			Фрагмент, №	Рестриктаза		
	<i>Cla</i> I	<i>Lpl</i> I	<i>Aag</i> I		<i>Cla</i> I	<i>Lpl</i> I	<i>Aag</i> I
1	11 385	11 953	11 550	8	1915	1884	1853
2	10 496	9 886	10 003	9	1804	1748	1749
3	4 398	4 340	4 355	10	1701	1650	1644
4	4 199	4 027	4 186	11	1112	1084	1069
5	3 673	3 548	3 614	12	973	944	891
6	2 614	2 615	2 629	13	657	631	656
7	2 063	2 042	2 051				

расщепления ДНК фага  $\lambda$  рестриктазами *Lpl*I и *Aag*I обнаруживается не менее 13 дискретных фрагментов, по размерам близких к *Cla*I-фрагментам этой ДНК (рис. 2, таблица). Обе рестриктазы имеют единственный участок узнавания на плазмиде pBR322 (рис. 2). В опытах по комбинированному расщеплению плазмиды рестриктазами *Lpl*I (*Aag*I) + *Pae*I или *Lpl*I (*Aag*I) + *Pst*I размер образующихся фрагментов указывает на локализацию участка узнавания новых рестриктаз в области *Cla*I-сайта. Наконец, при инкубации ДНК фага  $\lambda$  с рестриктазами *Cla*I, *Aag*I и *Lpl*I по отдельности или в комбинациях картина фрагментации ДНК была идентичной (рис. 2). Таким образом, приведенные выше экспериментальные результаты указывают на изошизомерию исследуемых ферментов и рестриктазы *Cla*I.

Для определения специфичности эндонуклеаз рестрикции *Lpl*I и *Aag*I синтезировали олигодезоксинуклеотидный дуплекс, содержащий участок узнавания (AT↓CGAT) предполагаемого изошизомера *Cla*I:



В один из олигонуклеотидов (dGGACCATCGATTGGTCC), входящих в состав дуплекса, при помощи Т<sub>4</sub>-полинуклеотидкиназы вводили 5'-<sup>32</sup>P-концевую метку. Единственным меченым продуктом расщепления дуплекса в случае обработки его обеими рестриктазами был гептануклеотид <sup>32</sup>pGGACCAT (дорожки 2 и 3 на рис. 3). Это свидетельствовало о том, что эндонуклеазы рестрикции *Lpl*I и *Aag*I расщепляют последовательность по схеме



т. е. являются истинными изошизомерами рестриктазы *Cla*I [8].

Выход рестриктазы *Lpl*I по активности примерно в 400 раз превышает выход *Cla*I. Несомненно, что продуцент *L. plantarum* — очень удобный объект для выделения рестриктазы *Lpl*I. По нашим расчетам, удельная активность гомогенного препарата *Lpl*I составляет около 200 000 ед. акт./мг белка. Учитывая высокий выход гомогенного препарата фермента (~1 мг/г микробной массы), очевидна перспективность получения препаративных количеств гомогенной рестриктазы *Lpl*I, необходимых для изучения его структуры и топографии активного центра, а также механизмов специфического взаимодействия с ДНК.

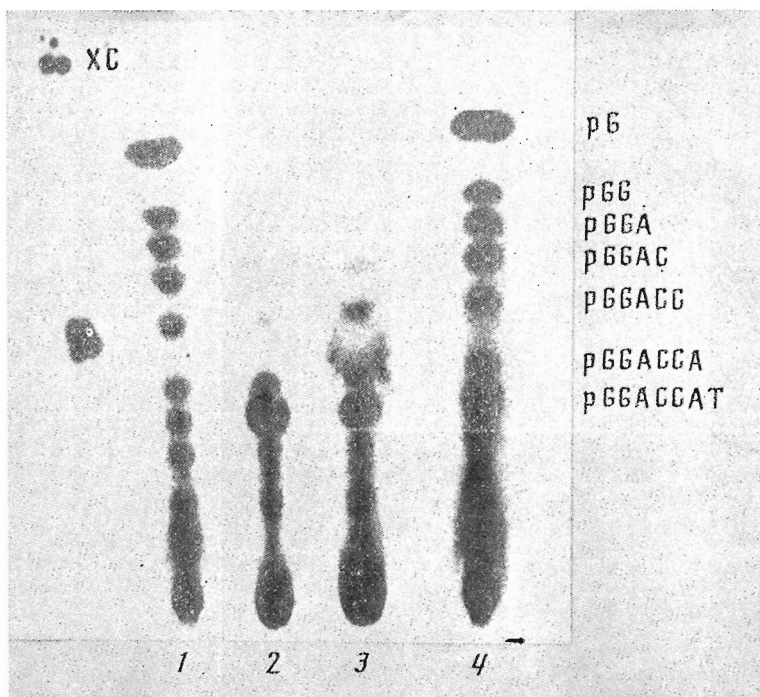


Рис. 3. Определение места расщепления участка узнавания рестриктазами *LpI* и *AagI* с использованием меченого субстрата  $^{32}\text{P}$ GGACCATCGATTGGTCC·CCTGGTAGCTAACCAGG: 1 — частичный экзонуклеазный гидролизат меченого субстрата, 2 — гидролиз *LpI*, 3 — гидролиз *AagI*, 4 — экзонуклеазный гидролизат + гидролизат *LpI* + гидролизат *AagI*

### Экспериментальная часть

Использовали рестриктазы *ClaI*, *EcoRV*, плазмиду pBR322, T4-поли-нуклеотидкиназу, T4-ДНК-лигазу (НПО «Фермент», Вильнюс). Рестриктазы *BamHI*, *PstI*, *EcoRI*, *AluI*, *PvuII*, *PaeI*, ДНК фага  $\lambda$  C1857s7 выделяли как описано ранее [2, 9—12]. Использовали голубую сефарозу (Pharmacia), DEAE-целлюлозу DE-52 (Whatman).

Штаммы-продуценты *A. agile* и *L. plantarum* получены из ВКМ АН СССР. Культуру *A. agile* выращивали на среде LB при 37° С в аэробных условиях до  $A_{650}^{1\text{CM}} = 1,2—1,35$ , а *L. plantarum* — в анаэробных условиях при 37° С на среде Хоттингера до конца логарифмической фазы. Отмытую от культуральной среды биомассу хранили при —20° С.

Активность рестриктаз в микробной массе определяли как описано ранее [4]. Ферментативные реакции проводили в условиях, рекомендованных в публикациях [13]. За 1 ед. акт. рестриктаз принимали количество фермента, полностью гидролизующее за 1 ч в оптимальных условиях 1 мкг ДНК фага  $\lambda$ .

Электрофорез ДНК в агарозном и полиакриламидном гелях проводили как описано ранее [3, 12]. В качестве стандартов при определении размеров фрагментов ДНК использовали *AluI*-фрагменты pBR322, *EcoRI*/*HindIII*-, *PaeI*-, *EcoRV*-, *PvuII*-, *ClaI*- и *XmnI*-фрагменты ДНК фага  $\lambda$ .

Синтез 17-звенного ДНК-дуплекса проводили на синтезаторе Gene Assembler (Pharmacia).

Для определения места расщепления сайта узнавания в 40 мкл рабочего буфера смешивали по 10 пмоль каждого из олигонуклеотидов, после чего проводили отжиг и обработку соответствующими рестриктазами. Пробу с рестриктазой инкубировали (5 мин при 12° С с *LpI*, 1 ч при 37° С с *AagI*). Продукты реакции анализировали гомохроматографией на DEAE-целлюлозе [14]. В качестве маркера служил частичный экзонуклеазный гидролизат 5'-меченого олигонуклеотида.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соколов Н. Н., Аникейчева Н. В., Фицнер А. Б., Самко О. Т., Хорошутина Э. Б., Калугин А. А. // Журн. микробиол. 1988. № 9. С. 86—89.
2. Sokolov N. N., Fitzner A. B., Anikeitcheva N. V., Choroshutina E. B., Samko O. T., Kolosha V. O., Fodor I., Votrin I. // Molec. Biol. Rep. 1985. V. 10. № 1. P. 159—161.
3. Соколов Н. Н., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В., Самко О. Т., Хорошутина Э. Б., Колоша В. О., Фодор И. И. // Биотехнология. 1987. Т. 3. № 5. С. 578—584.
4. Соколов Н. Н., Фицнер А. Б., Хорошутина Э. Б., Хейслере М. Я. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1984. Т. 97. № 2. С. 163—165.
5. Boyer H. W. // Ann. Rev. Microbiol. 1971. V. 25. № 1. P. 153—176.
6. Smith H. O., Nathans D. // J. Mol. Biol. 1973. V. 81. № 3. P. 419—423.
7. Альбертссон П.-О. Разделение клеточных частиц и макромолекул. М., 1974. С. 24—25.
8. Mayer H., Grosschedl R., Schütte H., Puvion C. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 19. P. 4833—4855.
9. Соколов Н. Н., Вотрин И. И., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В. // Биохимия. 1978. Т. 43. № 5. С. 865—871.
10. Соколов Н. Н., Вотрин И. И., Фицнер А. Б., Кирсанова И. Д. // Вопр. мед. химии. 1980. Т. 26. № 4. С. 568—571.
11. Вотрин И. И., Ходарев Н. Н., Баснакьян А. Г., Соколов Н. Н., Фицнер А. Б., Александрова С. С. // Вестн. АМН СССР. 1981. № 2. С. 59—64.
12. Соколов Н. Н., Колоша В. О., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В., Хорошутина Э. Б., Самко О. Т., Фодор И. И., Вотрин И. И. // Молекул. генетика. 1986. № 5. С. 24—26.
13. New England Biolabs. Catalog. 1986/1987.
14. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. // Nucl. Acids Res. 1974. V. 1. № 3. P. 331—353.

Поступила в редакцию  
9.XI.1989

N. N. SOKOLOV, Z. P. MANALENE\*, V. V. BUTKUS\*, A. B. FITZNER,  
E. B. KHOROSHUTINA, A. A. KALUGIN, A. A. JANULAITIS\*

### SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASES *LplI* AND *AagI*

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences  
of the USSR, Moscow:*

\*All-Union Institute of Applied Enzymology, Vilnius

New site-specific endonucleases *LplI* and *AagI* have been isolated from the *Lactobacillus plantarum* and *Achromobacter agile* cells, respectively. The enzymes' purification stages included treatment of cell-free extracts with polyethylenimine, fractionation in two-phase system by Albertsson's method, chromatography on blue Sepharose and DEAE-cellulose. The results of cleavage of a 5'-<sup>32</sup>P-labelled oligodeoxynucleotide duplex by restriction endonucleases *LplI* and *AagI* indicate that these enzymes recognize and cut the sequence AT<sup>↓</sup>CGAT, being therefore true isoschizomers of the *ClaI* restriction endonuclease from *Caryophanon latium*. The *L. plantarum* strain has 400 fold endonuclease productivity as compared with the *ClaI* producent and is perspective for preparative isolation of *LplI*.