



УДК 577.152.314'14

© 1992 г. Н. П. Ковалевская, Л. А. Железняк*,
Н. И. Матвиенко***Bsp*LS2I — НОВАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ
ЭНДОНУКЛЕАЗА ИЗ ТЕРМОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ
BACILLUS SPECIES LS2**

Институт белка РАН, Пушкино Московской обл.;

*Институт теоретической и прикладной биофизики РАН, Пушкино
Московской обл.

Из термофильной почвенной бактерии *Bacillus species* LS2 выделена новая сайт-специфическая эндонуклеаза рестрикции, названная *Bsp*LS2I. Фермент является изоизомером рестриктазы *Sdu*I. Он узнает и расщепляет гексануклеотидную последовательность G(G/A/T)GC(C/T/A) \downarrow C. Рестриктаза *Bsp*LS2I, не содержащая примесей неспецифических нуклеаз, была получена путем двух последующих хроматографий на голубой сефарозе и гидрокснапатите. Фермент проявляет максимальную активность в 10 мМ трис-HCl-буфере (pH 7,9) в присутствии 15–30 мМ MgCl₂ при 50°С. *Bsp*LS2I не расщепляет гликозилированную ДНК фага T4.

Сайт-специфические эндонуклеазы рестрикции широко используются для получения рекомбинантных ДНК и структурно-функционального исследования нуклеиновых кислот. Это обуславливает расширение поиска как ферментов с новыми специфичностями, так и изоизомеров уже известных рестриктаз в новых родовых группах микроорганизмов.

В настоящее время известно более 1360 рестриктаз, способных в общей сложности расщеплять ДНК по 163 различающимся последовательностям [1, 2]. Из бактерий рода *Bacillus* выделено около 20% известных рестриктаз, расщепляющих ДНК по 70 различным последовательностям. Выросло число работ по изучению ферментов у термофильных бактерий. Многие рестриктазы, выделенные из термофильных бацилл, способны расщеплять ДНК при высоких температурах (50–60°С), когда многие белки уже частично денатурируют.

В ходе исследования распространенности ферментов рестрикции-модификации в различных таксономических группах микроорганизмов нами было обнаружено несколько термофильных штаммов-продуцентов сайт-специфических эндонуклеаз из рода *Bacillus*. В настоящей работе приводятся данные о выделении и характеристике эндонуклеазы из почвенного изолята *Bacillus species* LS2, названной, согласно общепринятой номенклатуре [3], *Bsp*LS2I.

Расщепление различных ДНК с известной нуклеотидной последовательностью рестриктазой *Bsp*LS2I позволило установить, что этот фермент расщепляет ДНК плазмиды pUC19 и фага M13mp18 в 5, ДНК плазмиды pBR322 в более чем 7 сайтах и ДНК фагов T7 и λ более чем в 25. Для определения субстратной специфичности *Bsp*LS2I проводили комбинированные расщепления с рестриктазами *Vco*KI (изоизомер *Ksp*632I), *Bgl*I, *Bgl*II ДНК фага M13mp18. Электрофорез в агарозном геле продуктов таких совместных расщеплений (рис. 1) позволил выявить фрагменты ДНК с размерами приблизительно 3100, 2660, 720, 600, 180 п. о. при расщеплении только *Bsp*LS2I, 3000, 2000, 720, 670, 600, 180 п. о. для

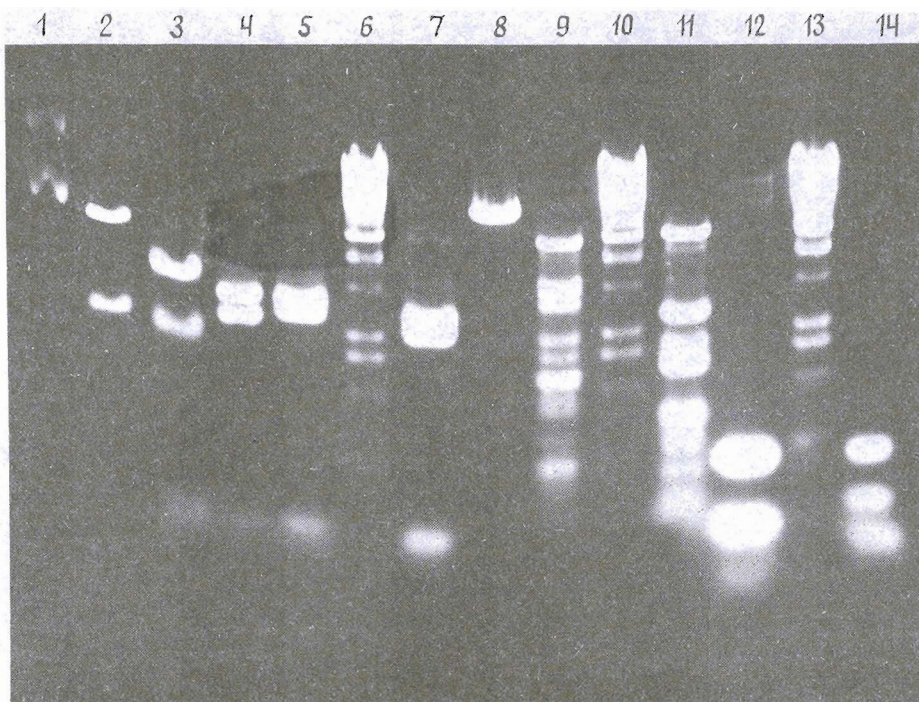


Рис. 1. Электрофоретическое разделение в 1% агарозном геле продуктов расщепления различных ДНК рестриктазой *BspLS2I*. 1 - M13mp18; 2 - M13mp18+BcoKI; 3 - M13mp18+BspLS2I+BcoKI; 4 - M13mp18+BspLS2I; 5 - M13mp18+BspLS2I+BglII; 7 - M13mp18+BspLS2I+BglII; 8 - M13mp18+BglII; 9 - λ +BspLS2I; 11 - T7+BspLS2I; 12 - pUC19+BspLS2I; 14 - pBR322+BspLS2I. 6, 10, 13 - SP6+HindIII - маркерные фрагменты: 8770, 7330, 6240, 5340, 4250, 2370, 2110, 1950, 1700, 1210, 1010, 550, 380, 290 п. о. [4]

BspLS2I+BcoKI, 2900, 2660, 720, 600, 200, 180 п. о. для *BspLS2I*+BglI, 2660, 2400, 720, 700, 600, 180 п. о. при *BspLS2I*+BglII. С использованием этих результатов была составлена рестрикционная карта ДНК фага M13mp18 и с помощью программы «Microgene» удалось установить, что сайты узнавания *BspLS2I* расположены в позициях 2088, 4743, 5465, 5643, 6237 п. о. физической карты. Эти сайты совпали с сайтами узнавания для рестриктазы *SduI* из *Streptococcus durans* [1, 2]. Размеры видимых при электрофорезе фрагментов ДНК плазмиды pBR322, расщепленной *BspLS2I*, также соответствуют этому сайту узнавания. Рестриктаза *SduI* узнает и расщепляет участок ДНК с последовательностью G(G/A/T)GC(C/T/A)↓C. Для определения места расщепления субстрата эндонуклеазой *BspLS2I* был использован метод Брауна и Смита [5], основанный на расщеплении продуктов элонгации, полученных на матрице, содержащей сайт эндонуклеазы, с помощью соответствующего праймера и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. В качестве матрицы была использована одноцепочечная ДНК фага M13mp18. При секвенировании одноцепочечной ДНК фага M13mp18 с меченым универсальным праймером (рис. 2) показано, что одна из точек разрыва находится в *SacI*-сайте между T и C, после обработки рестриктированного препарата фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I происходит отщепление выступающего 3'-конца. Таким образом, *BspLS2I* является изошизомером *SduI*.

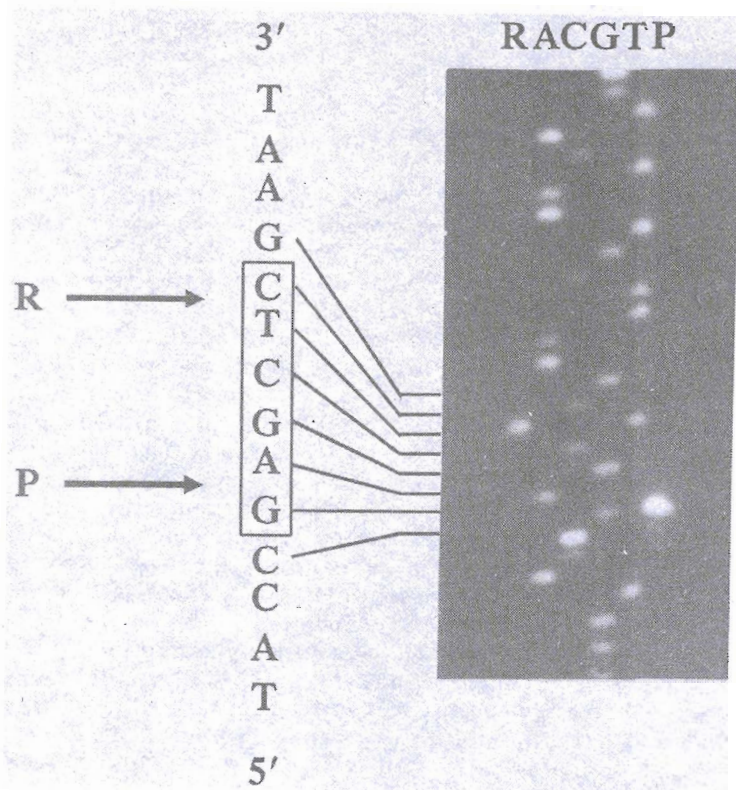


Рис. 2. Радиоавтограф 4% денатурирующего ПААГ, полученного при определении сайта рестриктазы *BspLS2I* на одноцепочечной ДНК фага M13mp18 по методу Брауна - Смита [5]. А, G, C, Т - треки реакций секвенирования, R - обработка продукта элонгации эндонуклеазой *BspLS2I*; P - рестриктированный препарат (R), обработанный фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I

Для выделения рестриктазы *BspLS2I* была использована широко применяющаяся схема очистки, состоящая из двух последовательных этапов колоночной хроматографии на голубой сефарозе и гидроксипатите. В результате очистки на указанных сорбентах был получен препарат фермента, свободный от примесей неспецифических нуклеаз. Фермент проявляет максимальную каталитическую активность в 10 мМ трис-НСI-буфере (рН 7,9) в присутствии 15-30 мМ $MgCl_2$. Рестриктаза хорошо работает без ионов K^+ и Na^+ ; наличие этих ионов в концентрации более 50 мМ в реакционной смеси приводит к снижению активности фермента. *BspLS2I* активна в диапазоне температур от 37 до 65° С; максимум активности проявляется при 50° С. Активность *BspLS2I* не зависит от АТФ и S-аденозил-L-метионина. В оптимальных инкубационных условиях *BspLS2I* не расщепляет гликозилированную ДНК фага Т4.

Экспериментальная часть

Бактериальный штамм *B. species* LS2 был выделен из почвенного изолята и идентифицирован по определителю [6].

ДНК плазмид рBR322, рUC19 и фагов M13mp18, Т7, SP6 выделяли как описано [7]. В работе использовались ДНК фага λ производства НПО «Фермент» (Вильнюс) и рестриктазы *BglII*, *BglIII* (Amersham, Анг-

лия), *ВсоKI* (выделена в лаборатории), набор реактивов для секвенирования фирмы Amersham и ^{32}P -меченые дезоксирибонуклеозидтрифосфаты («Изотоп», Ташкент).

Культивирование *B. species* LS2. Культуру *B. species* LS2 выращивали на жидкой SOC-среде (2% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM глюкоза, pH 6,0) в аэробных условиях при 55°C до поздней логарифмической фазы. Отделенную центрифугированием биомассу замораживали и хранили при -20°C.

Выделение фермента. Все стадии выделения и очистки фермента проводили при 4°C. Клетки *B. species* LS2 (5 г, влажный вес) суспендировали в 10 мл буфера А (20 mM трис-HCl (pH 8,0), 15 mM EDTA, 0,2% тритон X-100, 0,1 мг/мл лизоцим), озвучивали 40 мин (30 с — озвучивание, 30 с — пауза) при 22 кГц на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т и центрифугировали (35 000g, 30 мин). Отобранный супернатант наносили со скоростью 10 мл/ч на колонку (0,8×10 см) с голубой сефарозой (Опытный завод Института химии АН Эстонии), предварительно уравновешенную буфером В (20 mM трис-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 7 mM 2-меркаптоэтанол). Затем колонку промывали 70 мл этого же буфера. Белки элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl (0–2,5 M NaCl, 100 мл) со скоростью 10 мл/ч, собирая фракции по 5 мл. Фермент элюировался при концентрации NaCl в буфере 0,4–0,6 M. Фракции, содержащие *BspLS2I*, объединяли и наносили со скоростью 10 мл/ч на колонку с гидроксипатитом (Bio-Rad, США), предварительно уравновешенную буфером С (10 mM KН₂Р₀₄ (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, 7 mM 2-меркаптоэтанол). После нанесения фермента колонку промывали 70 мл буфера Э. Элюцию белков проводили в линейном градиенте KН₂Р₀₄ (0,01–1,2 M, pH 7,0, 100 мл) со скоростью 10 мл/ч, собирая фракции по 5 мл. Фракции с максимальной активностью рестриктазы *BspLS2I* (0,41–0,48 M KН₂Р₀₄) объединяли, добавляли бычий сывороточный альбумин с таким расчетом, чтобы его концентрация после диализа соответствовала примерно 100 мкг/мл (препарат концентрируется при диализе примерно в 3 раза), и диализовали против буфера D (10 mM трис-HCl, pH 7,5, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 50% глицерин (по объему)) в течение ночи. Выход выделенного фермента составлял 1200 ед/г биомассы. Препараты хранили при -20°C.

Отсутствие неспецифических нуклеаз в полученных препаратах фермента определяли с помощью 16-часовой инкубации в оптимальном буфере 10-кратного избытка фермента с 1 мкг ДНК фага λ при 50°C. При электрофоретическом анализе не было обнаружено дополнительного фрагментирования субстрата, что позволило констатировать факт отсутствия неспецифических нуклеаз в препарате.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roberts R. J. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. Suppl. P. r2331–2365.
2. Kessler C., Manta V. // Gene. 1990. V. 92. P. 1–248.
3. Smith H. O., Nathans D. // J. Mol. Biol. 1973. V. 81. № 3. P. 419–423.
4. Kassavelis G. A., Butler E. T., Roulland D., Chamberlin M. J. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 5779–5788.
5. Brown N. L., Smith M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 391–404.
6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. L., 1984. V. 1; 1986. V. 2.
7. Маньягис Г., Фрич Э., Самбрук Дж. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984.

Поступила в редакцию
12.II.1992

N. P. KOVALEVSKAYA, L. A. ZHELEZNAYA*, N. I. MATVIENKO
BSP LS2I, A NEW SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE FROM
THERMOPHILIC BACTERIUM *BACILLUS SPECIES* LS2

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow Region;*

* *Institute of Theoretical and Applied Biophysics, Pushchino, Moscow Region*

A new restriction endonuclease *BspLS2I* was isolated from the thermophilic bacterium *Bacillus species* LS2 and purified by blue sepharose and hydroxyapatite chromatographies. The enzyme is an isoshizomer of *SduI* from *Streptococcus durans*. *BspLS2I* recognizes the sequence 5' G(G/A/T)GC(C/T/A)⁺C 3' on double-stranded DNA and cleaves it as indicated by the arrow to yield sticky-ended DNA fragments. Maximum catalytic activity of endonuclease was found in 10 mM tris-HCl (pH 7,9) in the presence of 15-30 mM MgCl₂ at 50°C. The phage T4 glucosylated DNA is not cleaved by the enzyme.