



УДК 577.152.312.01

© 1992 г. Н. И. Шаповалова, Л. Ю. Иванов,
Н. И. МатвиенкоСАЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА *BstM6I* ИЗ
BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS M6

Институт белка РАН, Пущино Московской области

В лизате клеток штамма *Bacillus stearothermophilus* M6, выделенных из мелассы, обнаружена активность сайт-специфической эндонуклеазы *BstM6I*. Функционально чистый препарат рестриктазы был получен последовательной хроматографией бесклеточного экстракта на голубой сефарозе, оксиапатите и гепарин-сефарозе. Рестриктаза *BstM6I* узнает и расщепляет нуклеотидную последовательность $CC\downarrow(A/T)GG$ и, следовательно, является изоэнзимом *BstNI*.

При скрининге природных изолятов термофильных бацилл, выделенных из различных природных источников, в препарате мелассы был обнаружен штамм *Bacillus stearothermophilus* M6, продуцирующий сайт-специфическую эндонуклеазу.

Целью работы было получение функционально чистого препарата фермента и выяснение характера специфичности его действия.

Препарат фермента был получен путем последовательной хроматографии на голубой сефарозе, оксиапатите и гепарин-сефарозе.

Следует отметить, что фермент очень прочно связывается с голубой сефарозой и начинает элюироваться только при 2,1 М NaCl. После второй хроматографии — на гидроксиапатите — фермент все еще содержал неспецифические экзонуклеазы, что не позволяло определить точку расщепления сайта. Наконец, после третьей хроматографии — на колонке с гепаринсефарозой — был получен удовлетворительно чистый препарат, при длительной инкубации с которым не было обнаружено неспецифического гидролиза ДНК.

При электрофоретическом разделении в агарозном геле продуктов расщепления ДНК фагов λ , T7, M13mp18 и плазмид pBR322 и pUC18 (рис. 1) было обнаружено, что число и длины фрагментов соответствуют числу и длинам фрагментов, получаемых при расщеплении этих субстратов рестриктазой *EcoRII*. В семействе изоэнзимов *EcoRII* имеются ферменты, которые при расщеплении дают палиндромный 5'-выступающий конец (*EcoRII*) и одонуклеотидный 5'-выступающий конец (*BstNI*) [1, 2].

Определение точки расщепления ДНК по методу элонгированного меченого праймера [3] позволило установить, что эндонуклеаза *BstM6I* является изоэнзимом *BstNI*. Выход фермента ~20 000 ед. акт. на 1 г биомассы. Чистый препарат хранится более полугода при -20°C без заметной потери активности. Пятикратное замораживание в жидком азоте и оттаивание препарата не снижает его активности. Оптимальная температура при расщеплении ДНК составляет 65°C , оптимальный буфер HRB: 50 мМ трис-HCl, pH 8,4 (25°C), 10 мМ MgCl_2 , 100 мМ NaCl.

1 2 3 4 5 6 7

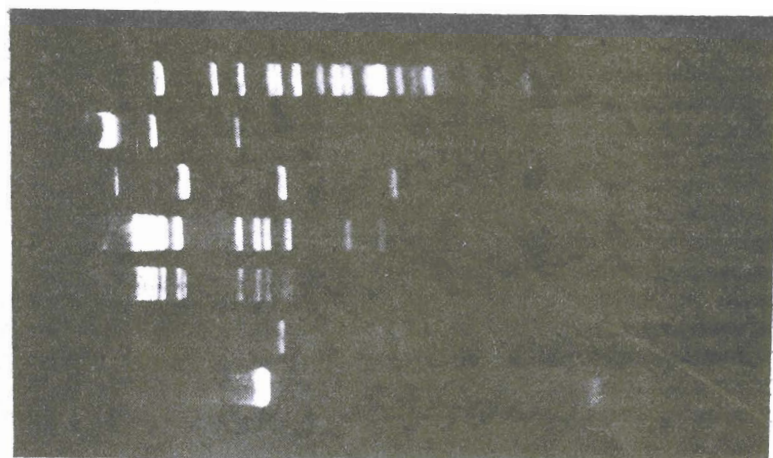


Рис. 4. Расщепление различных ДНК рестриктазой *Bst*M61: 1 - pUC18, 2 - pBR322, 5 - M13mp18, 6 - T7, 7 - λ ; 4 - маркеры молекулярных масс, ДНК фага SP6, расщепленная *Hind*III [5]; 3 - ДНК SP6: *Hind*III и M13mp18: *Bst*M61

1 3 5 7 9 11 13 15 17M 19 21 23

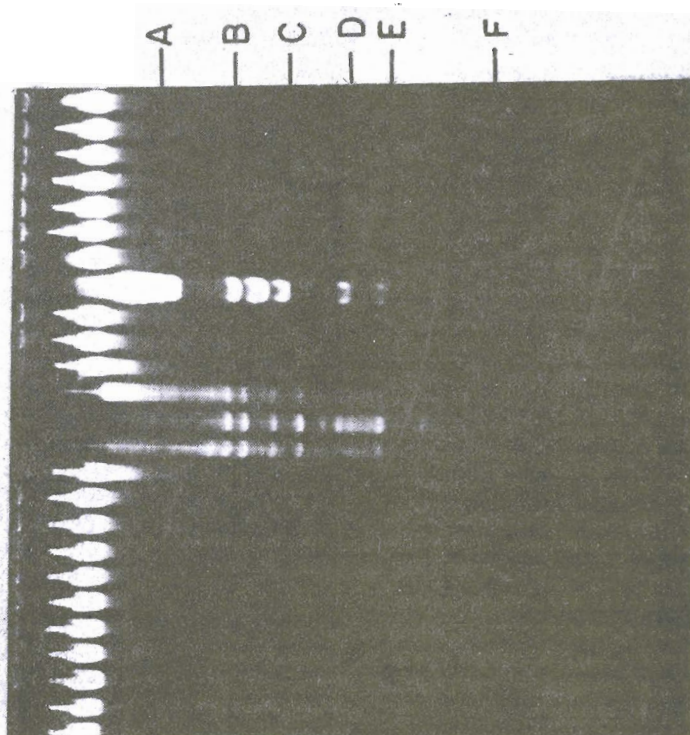


Рис. 2. Электрофоретический анализ фракций при хроматографической очистке рестриктазы *Bst*M61 на оксипагате. Цифры указывают номера фракций. М - маркеры молекулярных масс: ДНК SP6, расщепленная *Hind*III. Справа указаны фрагменты с молекулярными массами: А - 4250, В - 2370, С - 1700, D - 1210, E - 1010, F - 550

Штамм *B. stearothermophilus* M6 был выделен из мелассы и идентифицирован на основе обычных микробиологических критериев [4]. Культуру выращивали на среде, содержащей 16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта и 5 г/л NaCl, до поздней логарифмической фазы. Биомассу замораживали и хранили при -20°C .

Выделение рестриктазы BstM6I. Клетки *B. stearothermophilus* M6 (2 г) суспендировали в лизирующем растворе (4,2 мл 40 mM трис-HCl (pH 8,0), 4,2 мл 25 mM EDTA (pH 8,0), 300 мкл лизоцима (2,9 мг/мл), 180 мкл 10% тритона X-100) и оставляли на 45 мин при комнатной температуре, затем озвучивали в ледяной бане на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т при максимальной мощности в течение 30 мин 30-секундными импульсами с интервалами 30 с. Разрушенные клетки центрифугировали 30 мин при 85 000g. Надосадочную жидкость наносили со скоростью 25 мл/ч на колонку (1,5×16 см) с голубой сефарозой (агароза голубая 4%, марка А, производства опытного завода Института химии Академии наук Эстонии). Фермент элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl (0–4 М, 200 мл) со скоростью 20 мл/ч, собирая фракции по 5 мл. Начало элюции фермента — при 2,1 М NaCl. Фракции, содержащие фермент, объединяли и наносили на колонку (1,5×16 см) с гидроксипатитом (Bio-Rad, США) со скоростью 10 мл/ч. Элюцию фермента проводили линейным градиентом (200 мл) калий-фосфатного буфера, pH 7,0 (10 mM —

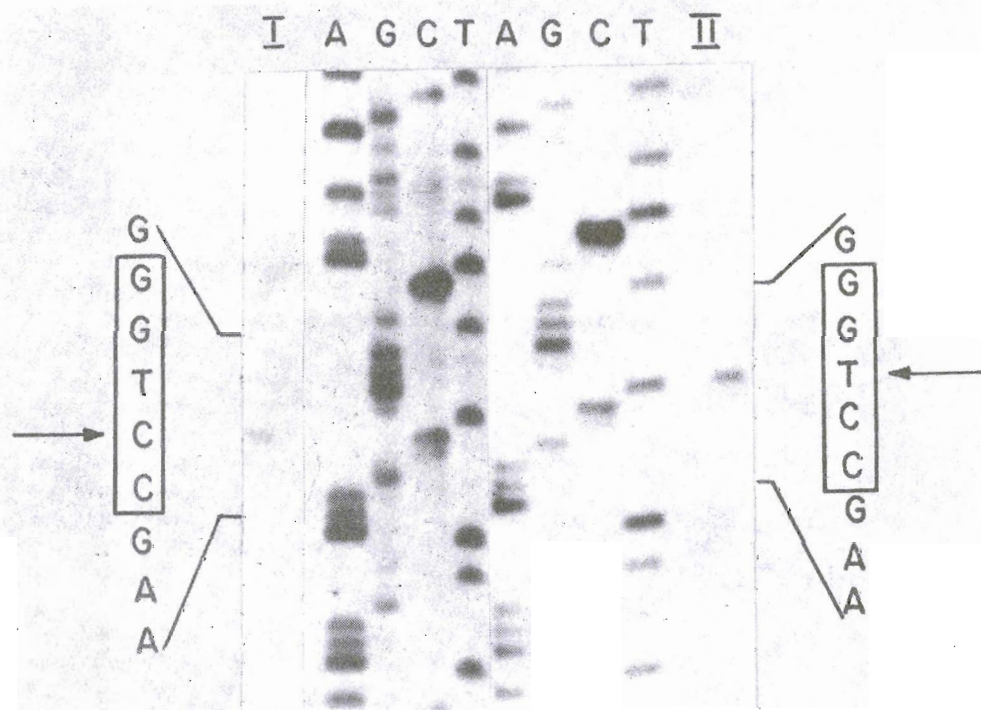


Рис. 3. Определение точек расщепления в сайте *BstM6I*. Автограф секвенирующего геля. А, G, C, Т — дорожки с соответствующей терминацией синтезированных фрагментов. I — наименьший фрагмент после расщепления продукта полимеризации рестриктазой *BstM6I*. II — тот же фрагмент, но после достройки 5'-одинитового конца фрагментом Кленова ДНК-полимераза в присутствии трифосфатов. Стрелки показывают концевые нуклеотиды меченых фрагментов ДНК после обработки рестриктазой (слева) и после дополнительной обработки фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I (справа)

1,2 М), собирая фракции по 4 мл. Активные фракции (12, 13, 14 — см. рис. 2) объединяли и диализовали против буфера, содержащего 50 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl (pH 7,4), 0,1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит и 50% глицерина. Затем добавляли бычий сывороточный альбумин (Олайне, для молекулярной биологии) до конечной концентрации 100 мкг/мл.

Полученный после хроматографии на гидроксипатите препарат, содержащий примеси экзонуклеаз, разбавляли в 20 раз буфером C₀ (20 мМ трис-HCl (pH 7,4), 0,5 мМ EDTA, 7 мМ меркаптоэтанол) и наносили на колонку (1,5×16 см) с гепарин-сефарозой (Pharmacia) со скоростью 20 мл/ч для дополнительной очистки. Элюцию проводили линейным градиентом (200 мл) концентрации NaCl (0—5 М) в буфере C₀, собирая фракции по 5 мл; активные фракции объединяли и подвергали диализу, как после хроматографии на гидроксипатите.

Выход рестриктазы *Bst*M6I составил ~20 000 ед. акт. на 1 г микробной массы.

Секвенирование сайта расщепления *Bst*M6I. Для определения точек расщепления нитей ДНК рестриктазой *Bst*M6I методом элонгированного меченого праймера [3] использовали одноцепочечный фэг M13mp18. Координата ближайшего к универсальному праймеру сайта — 6136. Наряду с обычными реакциями секвенирования с добавлением терминаторов проводили еще дополнительную реакцию полимеризации без терминаторов. Синтезированную в этой реакции ДНК расщепляли рестриктазой *Bst*M6I и одну аликвоту наносили на гель без последующих обработок (дорожка I, рис. 3), а вторую — после инкубации с фрагментом Кленова в присутствии всех четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дорожка II, рис. 3). Полоса на дорожке I непосредственно указывает положение одного из разрывов в сайте узнавания, а полоса на дорожке II — расположение разрыва в комплементарной цепи. Поскольку инкубация с фрагментом Кленова приводит к удлинению фрагмента на один нуклеотид (Т на рис. 3), следовательно, в процессе расщепления образуются фрагменты, на 5'-конце которых выступает один нуклеотид. Таким образом, рестриктаза *Bst*M6I является изошизомером *Bst*NI.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kessler C., Manta V. // *Gene*. 1990. V. 92. P. 1—248.
2. Roberts R. J. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. Suppl. P. 2331—2365.
3. Brown N. L., Smith M. // *Meth. Enzymol.* 1980. V. 65. P. 391—404.
4. Методы общей бактериологии: Пер. с англ./Ред. Герхардт Ф. и др. М.: Мир, 1983.
5. Kassavetis G. A., Buttler E. T., Roulland D., Chamberlin M. J. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 5779—5788.

Поступила в редакцию
12.II.1992

После доработки
26.V.1992

N. I. SHAPOVALOVA, L. Yu. IVANOV, N. I. MATVIENKO

SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE *Bst*M6I FROM THE NATURAL ISOLATE *Bacillus stearothermophilus* M6

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

A site-specific endonuclease activity was found in extract of *Bacillus stearothermophilus* M6 isolated from molasses. The functionally pure enzyme designated as *Bst*M6I was obtained by consecutive chromatographies on blue sepharose, hydroxyapatite, and heparin-sepharose. The endonuclease recognizes the nucleotide sequence CC↓WGG in double-stranded DNA and cleaves it as indicated by the arrow to give one-nucleotide 5'-protruding ends. Consequently, the site-specific endonuclease *Bst*M6I is an isoshizomer of *Bst*NI.