



УДК 577.152.312'14

© 1993 г. Н. П. Ковалевская, Н. В. Зелинская, Л. А. Железная*,
Н. И. Матвиенко

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ
ЭНДУКЛЕАЗЫ *BspTS514I* ИЗ ТЕРМОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ
Bacillus species TS514

Институт белка РАН, Пущино Московской обл.;

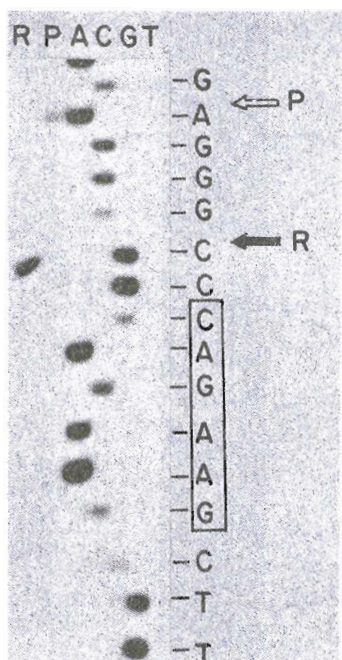
* Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пущино Московской обл.

Из пяти термофильных почвенных бактерий, *Bacillus* sp. BS31, *B. stearothermophilus* BS32, *Bacillus* sp. IS4, *B. stearothermophilus* TS5 и *Bacillus* sp. TS514, были выделены новые сайт-специфические эндонуклеазы *BspBS31I*, *BstBS32I*, *BspIS4I*, *BstTS5I* и *BspTS514I*. Ферменты являются изошизомерами рестриктазы *BbvII*. Эндонуклеаза *BspTS514I*, не содержащая примесей неспецифических нуклеаз, была получена с помощью двух последовательных хроматографий на голубой агарозе и гидроксипатите. Фермент проявляет максимальную активность в 10 мМ трис-НСl-буфере (рН 9,2) в присутствии 10 мМ MgCl₂ и 50 мМ NaCl при 55° С.

Ферменты рестрикции-модификации класса II (КФ 3.1.21.4) благодаря своей способности узнавать строго определенные последовательности нуклеотидов нашли широкое применение при анализе первичной структуры ДНК и в работах по генетической инженерии. Несмотря на уже имеющийся большой набор сайт-специфических эндонуклеаз [1, 2], их поиск не теряет актуальности. Основным стимулом таких работ по-прежнему служит стремление пополнить существующий набор рестриктаз новыми ферментами, обладающими ранее неизвестной субстратной специфичностью, а также открыть аналоги известных эндонуклеаз, отличающиеся большей активностью или стабильностью.

Первоначально в основу отнесения эндонуклеаз к классу II было положено правило, согласно которому ферменты этого класса должны узнавать специфические последовательности длиной в 4—8 пар нуклеотидов, обладающие вращательной симметрией второго порядка (палиндромы), при этом расщепление ДНК происходит в пределах узнаваемой последовательности. Позднее были обнаружены сайт-специфические эндонуклеазы, отнесенные к подклассу IIS. Эти ферменты, так же как и эндонуклеазы класса III, имеют непалиндромные сайты узнавания и расщепляют ДНК в стороне от узнаваемой последовательности, но отличаются от эндонуклеаз класса III тем, что они не стимулируются АТФ и S-аденозил-L-метионином и обладают строгой специфичностью расщепления.

В процессе изучения распространенности ферментов рестрикции-модификации у термофильных бактерий нами было обнаружено, что пять природных изолятов (*Bacillus* sp. BS31, *B. stearothermophilus* BS32, *Bacillus* sp. IS4, *B. stearothermophilus* TS5 и *Bacillus* sp. TS514) — продуценты сайт-специфических эндонуклеаз. Эти



Радиоавтограф 4% денатурирующего ПААГ, полученного при определении сайта рестриктазы *BspTS514I* по методу Брауна—Смита [5]. А, С, G, Т — «секвенирующие» дорожки; R — продукт элонгации праймера, расщепленный эндонуклеазой *BspTS514I*; P — тот же продукт после обработки фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*; черная стрелка R — разрыв в меченой цепи; светлая стрелка P — разрыв в комплементарной цепи; рамкой выделен сайт узнавания эндонуклеазы *BspTS514I*

ферменты были названы, согласно общепринятой номенклатуре [3], *BspBS31I*, *BstBS32I*, *BspIS4I*, *BstTS5I* и *BspTS514I*.

Для установления субстратной специфичности этих эндонуклеаз проводили расщепление различных ДНК с известной нуклеотидной последовательностью (ДНК фагов λ , T7, M13mp18 и ДНК плазмид pUC19, pBR322). Визуальное сравнение электрофореграмм продуктов расщепления ДНК исследуемыми ферментами и сравнение полученных данных с табличными, а также картирование местоположения точек разрыва на субстратных ДНК и поиск общих последовательностей в их окружении позволили установить, что сайтом узнавания этих пяти эндонуклеаз является асимметричная последовательность 5'GAAGAC3'. Для установления точек расщепления эндонуклеазами *BspBS31I*, *BstBS32I*, *BspIS4I*, *BstTS5I* и *BspTS514I* в качестве матрицы была использована одноцепочечная ДНК сконструированного в лаборатории вектора на основе ДНК фаза M13tg131 с уникальным сайтом узнавания эндонуклеазы *BbvI* (GAAGAC). После отжига на этой матрице меченого праймера с последующим удлинением его фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* полученная двунитевая ДНК расщеплялась эндонуклеазой *BspTS514I*. Половину препарата использовали для определения точки расщепления в меченой цепи ДНК, другую половину, после последующей обработки ДНК фрагментом Кленова, — в комплементарной цепи. Размер фрагментов определяли, сравнивая полученные полосы в денатурирующем геле с соответствующими полосами в секвенирующих дорожках. На радиоавтографе денатурирующего геля для эндонуклеазы *BspTS514I* (рисунок) видно, что полоса, образованная в геле продуктом элонгации праймера после его расщепления эндонуклеазой, соответствует полосе С, расположенной на два нуклеотида выше сайта узнавания (5') GAAGAC. После дополнительной обработки фрагментом Кленова полоса поднимается на четыре нуклеотида выше. Из этого следует, что произошла достройка 3'-укороченного конца ДНК. Сопоставление на радиоавтографе денатурирующих гелей расположения полос, соответствующих фрагментам меченой ДНК, образующимся до и после обработки фрагментом Кленова,

позволило определить, что *BspTS514I* расщепляет ДНК в стороне от сайта узнавания, как показано стрелками:



Аналогичные картины были получены и для остальных рестриктаз (данные не представлены). Таким образом, термофильные эндонуклеазы *BspBS31I*, *BstBS32I*, *BspIS4I*, *BstTS5I* и *BspTS514I* гидролизуют ДНК в положении 2/6 в стороне от сайта узнавания GAAGAC, образуя 5'-выступающие тетра-нуклеотидные концы и являются изошизомерами сайт-специфической эндонуклеазы *BbvII*, выделенной из мезофильного штамма *B. brevis* 80 [4].

Для получения препарата рестриктазы *BspTS514I*, свободного от примеси неспецифических нуклеаз, последовательно были применены следующие стадии очистки: 1) осаждение белков из экстракта сульфатом аммония; 2) гель-фильтрация на сефадексе G-25M; 3) хроматография на голубой агарозе; 4) хроматография на гидроксипатите. Фермент *BspTS514I* проявляет максимальную каталитическую активность в 10 мМ трис-HCl-буфере (pH 9,2) в присутствии 10 мМ MgCl₂ и 50 мМ NaCl при 55° С. Активность *BspTS514I* не зависит от АТФ и S-аденозил-L-метионина. В оптимальных инкубационных условиях *BspTS514I* не расщепляет гликозилированную ДНК фага Т4. Выход выделенного фермента (12000 ед/г биомассы) на порядок выше выхода эндонуклеазы *BbvII*; *BspTS514I* более стабилен при хранении.

Экспериментальная часть

Бактериальный штамм *Bacillus* sp. TS514I был выделен из почвенного изолята и идентифицирован по определителю [6].

ДНК плазмид pBR322, pUC19 и фагов M13mp18, λ, Т7 выделяли как описано в [7]. Для установления точки расщепления использовали набор реактивов для секвенирования фирмы Amersham и ³²P-меченые дезоксирибонуклеозидтрифосфаты («Изотоп», Ташкент).

Культивирование *Bacillus* sp. TS514. Культуру *Bacillus* sp. TS514 выращивали на жидкой SOC-среде (2% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄, 20 мМ глюкоза, pH 6,0) в аэробных условиях при 55° С до поздней логарифмической фазы. Биомассу собирали центрифугированием, замораживали и хранили при -20° С.

Выделение фермента. Все стадии выделения и очистки фермента проводили при 4° С. Клетки *Bacillus* sp. TS514 (5,7 г, влажный вес) суспендировали в 20 мл буфера А (20 мМ трис-HCl (pH 8,0), 15 мМ EDTA, 0,2% тритон X-100, 0,1 мг/мл лизоцим), озвучивали 30 мин при 22 кГц на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т и центрифугировали (35 000 g, 40 мин). К отобранному супернатанту медленно с перемешиванием добавляли твердый сульфат аммония до 70% насыщения. После растворения последней порции соли перемешивание продолжали в течение 30 мин до достижения полного равновесия между растворенными и агрегированными белками. Затем раствор центрифугировали при 30 000 g в течение 30 мин. Осадок растворяли в 25 мл буфера В (20 мМ трис-HCl, pH 7,4, 1 мМ EDTA, 7 мМ 2-меркаптоэтанол). Для удаления из раствора сульфата аммония проводили гель-фильтрацию на «обессоливающей» колонке PD-10 (Pharmacia) с сефадексом G-25M в буфере В. К полученному после гель-фильтрации раствору белков добавляли NaCl до конечной концентрации 50 мМ и наносили этот препарат со скоростью 14 мл/ч на колонку (0,8 × 10 см) с голубой агарозой (Опытный завод Института химии АН Эстонии), предварительно уравновешенную буфером В, содержащим 50 мМ NaCl. Колонку промывали 50 мл этого же буфера. Белки элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl (0,05—2,5 М NaCl, 100 мл) со скоростью 10 мл/ч, собирая фракции по

5 мл. Фермент элюировался при концентрации NaCl в буфере 1—2,2 М. Фракции, содержащие *BspTSS514I*, объединяли и наносили со скоростью 10 мл/ч на колонку (0,8 × 10 см) с гидроксипатитом (Bio-Rad, США), предварительно уравновешенную буфером С (10 mM KH_2PO_4 , pH 7,0, 7 mM 2-меркаптоэтанол). После нанесения препарата фермента колонку промывали 70 мл буфера С. Белки элюировали в линейном градиенте KH_2PO_4 (0,01—1,2 М, pH 7,0, 100 мл), собирая фракции по 0,5 мл. Фракции с максимальной активностью рестриктазы *BspTSS514I* (0,23—0,28 М KH_2PO_4) объединяли, добавляли бычий сывороточный альбумин с расчетом, чтобы его конечная концентрация составляла 100 мкг/мл, и диализовали против буфера D (10 mM трис-HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 7 mM 2-меркаптоэтанол, 0,15% Triton X-100, 50% глицерин (по объему)) в течение ночи. Выход выделенного фермента составлял 12 000 ед/г биомассы. Препараты хранили при -20°C .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kessler C., Manta V.//Gene. 1990. V. 92. P. 1—248.
2. Roberts R. J., Macelis D.//Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. Suppl. P. r2167—2180.
3. Smith H. O., Nathans D.//J. Mol. Biol. 1973. V. 81. № 3. P. 419—423.
4. Бунина Э. Ф., Крамаров В. М., Мазанов А. Л., Пачкунов Д. М., Смолянинов В. В., Матвиенко Н. И.//Биоорг. химия. 1983. № 11. С. 1578—1580.
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. Маннштис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984.

Поступила в редакцию
12.V.1993

N. P. Kovalevskaya, N. V. Zelinskaya, L. A. Zheleznaya,
N. I. Matvienko*

ISOLATION AND PROPERTIES OF THE SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE *BspTSS514I* FROM THERMOPHILIC BACTERIUM *Bacillus* species TS514

Institute of Protein Research,

** Institute of Theoretical and Experimental Biophysics,
Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region*

New site-specific endonucleases *BspBS31I*, *BstBS32I*, *BspIS4I*, *BstTS5I*, *BspTSS514I* were isolated from five thermophilic soil bacteria *Bacillus* sp. BS31, *B. stearothermophilus* BS32, *Bacillus* sp. IS4, *B. stearothermophilus* TS5, *Bacillus* sp. TS514. The enzymes are isoshizomers of the restriction endonuclease *BbvII*. Endonuclease *BspTSS514I* was obtained pure from interfering contaminations by two consecutive chromatographies on blue agarose and hydroxyapatite. The enzyme exhibits a maximal activity at 55°C in 10 mM tris-HCl (pH 9,2), 10 mM MgCl_2 and 50 mM NaCl.