



УДК 577.152.314'14

© 1993 В. Е. Репин, И. В. Бабкин,
Т. А. Терещенко***Bse118 I* — НОВЫЙ ИЗОШИЗОМЕР ЭНДУКУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ
Cfr10 I, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ ТЕРМОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ
*Bacillus coagulans***НИКТИ биологически активных веществ НПО «Вектор», г. Бердск, Новосибирской обл.;
Акционерное общество «ВАЛПЭК, Лтд», Новосибирск

Обнаружен термофильный штамм-продуцент *Bacillus coagulans* 118, синтезирующий эндонуклеазу рестрикции *Bse118 I*, узнающую и расщепляющую последовательность нуклеотидов (5')R↓CCGGY (R = A или G, Y = C или T).

Эндонуклеазы рестрикции типа II благодаря способности специфически фрагментировать различные последовательности ДНК широко используются при решении как научных, так и прикладных задач. В настоящее время известно приблизительно 1,5 тыс. этих ферментов, среди которых по крайней мере 178 эндонуклеаз являются прототипами [1]. Тем не менее в различных лабораториях мира поиску продуцентов ферментов этого типа по-прежнему уделяют большое внимание. Систематический поиск штаммов в пределах отдельных таксономических групп или же ареалов обитания способствует не только обнаружению нового прототипа, но и изучению эволюционной роли, закономерностей функционирования этих ферментных систем и их распространенности среди микроорганизмов.

В ходе выполнения настоящей работы велся скрининг термофильных почвенных бактерий на наличие специфической эндонуклеазной активности. Целью работы являлось выделение и исследование новых рестриктаз.

В результате поиска был изолирован и идентифицирован штамм *Bacillus coagulans* 118.

При определении субстратной специфичности фермента, выделенного из штамма, установили, что рестриктаза, названная нами *Bse118 I*, расщепляет ДНК фага лямбда более чем в 22 местах, ДНК фага T7 — 3 местах, ДНК плазмиды pBR 322 — 7 местах и не имеет мест расщепления на ДНК φX174. Сравнение этих данных с табличными [2] показало, что такую частоту встречаемости имеет единственная последовательность (5')RCCGGY.

Для подтверждения последовательности узнавания и определения точки гидролиза ДНК ферментом *Bse118 I* использовали метод Максама — Гилберта [3]. 15 мкг ДНК плазмиды pUC 18 гидролизовали рестриктазой *Vsp I* [4], метили по 3'-концу [α -³²P]dATP с помощью ДНК-полимеразы (фрагмент Кленова) и после дополнительного гидролиза рестриктазой *Eco64 I* [5] выделяли меченый фрагмент ДНК и секвенировали его. Аликвоту меченого фрагмента расщепляли рестриктазой *Bse118 I* в буфере, содержащем 0,02 М трис-НС1 (рН 8,0), 0,01 М MgCl₂, 0,1 М KCl, при 37°C. Продукты химического и ферментативного расщепления ДНК разделяли электрофорезом в денатурирующем геле. На радиоавтографе (рис. 1) подвижность продукта гидролиза фрагмента ДНК рестрик-

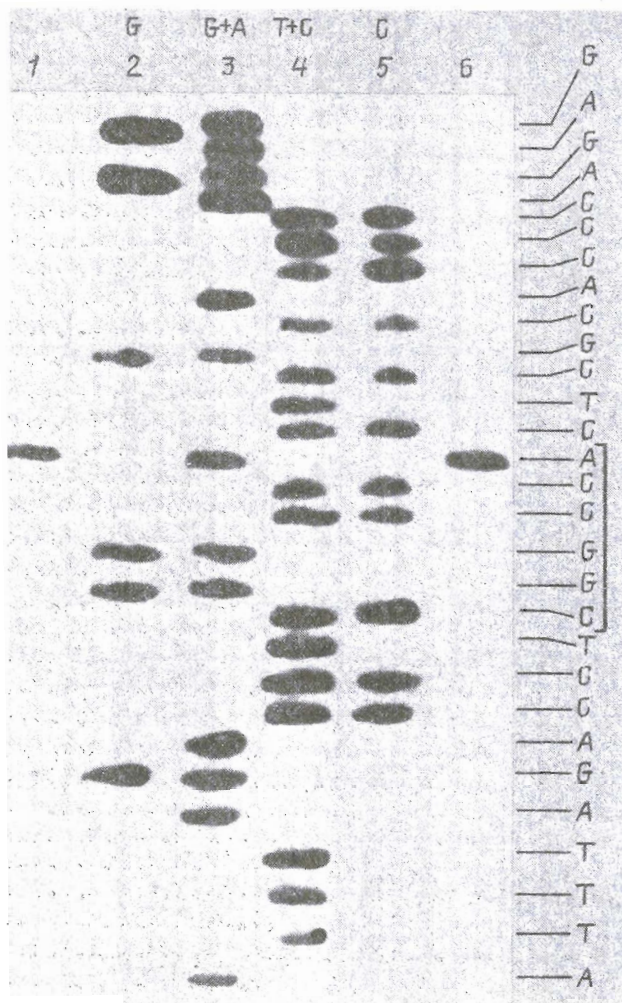


Рис. 1. Радиоавтограф разделения в 4% денатурирующем геле продуктов ферментативного (1, 6) и химического (2—5) расщепления *Vsp* I — *Eco*64 I фрагмента ДНК плазмиды pUC18. 2—5 — продукты химического расщепления фрагмента ДНК по методу Максама — Гилберта. 1, 6 — ферментативное расщепление фрагмента эндонуклеазой рестрикции *Bse*118 I (пояснение в тексте)

тазой *Bse*118 I совпадает с подвижностью продукта химического расщепления по остатку А. Удаление крайнего нуклеозида из последовательности ДНК при расщеплении ДНК по методу Максама — Гилберта свидетельствует о том, что рестриктаза *Bse*118 I расщепляет ДНК в последовательности ACCGGC между остатками А и С. Следовательно, эндонуклеаза рестрикции *Bse*118 I имеет сайт узнавания (5')R↓CCGGY и гидролизует ДНК в месте, указанном стрелкой.

Фермент проявляет максимальную функциональную активность при следующих условиях: 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 65°C. Фрагменты, полученные при расщеплении ДНК фага лямбда 5-кратным избытком *Bse*118 I, лигируются при помощи ДНК-лигазы T4 более чем на 90%. При повторном расщеплении лигированного материала сохраняется специфическая фрагментация (рис. 2).

Таким образом, фермент *Bse*118 I — термостабильный изоизомер эндонуклеазы рестрикции *Cfr*10 I [5].

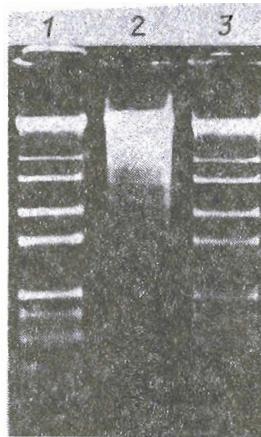


Рис.2. Тест «рестрикция — лигирование — рестрикция»: 1 — гидролиз ДНК фага лямбда 5-кратным избытком эндонуклеазы рестрикции *Bse*118 I; 2 — лигирование фрагментов ДНК лигазой T4; 3 — последующая после лигирования рестрикция

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие реактивы: лизоцим (Sigma, США); трис, 2-меркаптоэтанол (Serva, Германия); DE-52 (Whatman, Англия); гидроксиапатит (Bio-Rad, США); рестриктазу *Vsp* I, ДНК фагов лямбда и T7, плазмид pUC 18, pBR 322, φX174, фрагмент Кленова, ДНК-лигазу T4 (НИКТИ БАН НПО «Вектор», Бердск), рестриктазу *Eco*64 I (НПО «Ферментас», Вильнюс).

Бактериальные культуры выделяли из почвы традиционными методами [6]. Культивирование штамма проводили в колбах на термостатированных качалках или в лабораторном ферментере в среде следующего состава (г/л): пептон — 10, дрожжевой экстракт — 5, NaCl — 10. Культуру выращивали, интенсивно аэрируя, при 60° С до достижения фазы замедления роста. Клетки собирали центрифугированием и полученные биомассы хранили при —60°С.

Все операции по выделению фермента проводили при 4°С. Клетки суспендировали в 10 мМ трис-HCl, pH 7,9, содержащем 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ трилон Б (буфер А). После добавления лизоцима суспендированные клетки подвергали дезинтеграции ультразвуком на аппарате УЗДН-2Т. Полученные гомогенаты прогревали 10 мин при 65°С и центрифугировали 30 мин (16 000 об/мин, 4°С). Далее проводили хроматографическую очистку по следующей схеме:

1) хроматография на DE-52 (20 мл), элюция со скоростью 15 мл/ч линейным градиентом концентрации NaCl от 0 до 1 М (160 мл). Фермент элюируется при концентрации 0,2—0,25 М NaCl;

2) диализ в течение 2 ч против 500 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,0), содержащего 0,2 М NaCl, 1 мМ трилон Б, 7 мМ 2-меркаптоэтанол;

3) хроматография на гидроксиапатите (5 мл), элюция со скоростью 5 мл/ч в линейном градиенте концентрации калий-фосфатного буфера от 0,01 до 0,4 М (50 мл). Фермент элюируется при концентрации 0,25—0,3 М. Элюат концентрировали против буфера состава: 10 мМ трис-HCl (рН 7,5), 1 мМ трилон Б, 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 60% глицерин.

Специфическую активность эндонуклеаз в исследуемых растворах тестировали по их способности специфически фрагментировать ДНК фага лямбда. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 0,7—1,0% гелях агарозы [7]. Тест

«рестрикция — лигирование — рестрикция» проводили как описано в работе [5].
Определение точки расщепления описано в данной статье.

Авторы благодарят С. Синичкину за помощь при выделении фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roberts R. J., Macelis D. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. Suppl. P. 2077—2109.
2. Каталог фирмы New England BioLabs (1990—1991).
3. Махам А. М., Гилберт В. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. Pt. 1. P. 499—560.
4. Дегтярев С. Х., Репин В. Е., Речкунова Н. И., Чижиков В. Е., Малыгин Э. Г., Михайлов В. В., Рассказова В. А. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 3. С. 420—421.
5. Ферменты и реактивы для молекулярной биологии. Вильнюс, 1989. 28 с.
6. Звягинцев Д. Г., Асеева И. В., Бабьева И. П., Мирчинк Т. Г. // Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1980. 224 с.
7. Sharp P. A., Sugden B., Sambrook J. // Biochemistry. 1973. V. 12. № 16. P. 3055—3063.

Поступила в редакцию
17.VII. 1992

После доработки
26.XI. 1992

V. E. Repin, I. V. Babkin, T. A. Tereshchenko

Bse*118 I, AN ISOSCHIZOMER OF THE *Cfr*10 I RESTRICTION ENDONUCLEASE FROM *Bacillus coagulans

*Research and Technology Institute of Biologically Active Substances, NPO «Vektor», Berdsk;
Private Company «VALPEC Ltd», Novosibirsk*

The recognition sequence and its cleavage point for *Bse*118 I restriction endonuclease have been determined as (5')R↓CCGGY.