



УДК 577.152.314

© 1993 В. Е. Репин*, В. Е. Чижиков,
Т. А. Терещенко, Л. Р. Лебедев

*Bco*116 I — НОВЫЙ ИЗОШИЗОМЕР ЭНДОНУКЛЕАЗЫ
РЕСТРИКЦИИ *Ksp*632 I

НИКТИ биологически активных веществ ИПО «Вектор», Бердск Новосибирской обл.,
Акционерное общество «ВАЛПЭК, Лтд», Новосибирск

Обнаружен термофильный штамм-продуцент *Bacillus coagulans* 116, синтезирующий Эндонуклеазу рестрикции *Bco*116 I, узнающую и расщепляющую последовательность нуклеотидов (5')СТСТТС (1/4).

Эндонуклеазы рестрикции II типа благодаря их способности специфически фрагментировать различные последовательности ДНК широко используются при решении как научных, так и прикладных задач. В настоящее время известно около 2000 этих ферментов, из которых по крайней мере 179 эндонуклеаз — прототипы [1]. Внутри эндонуклеаз рестрикции II типа принято выделять в отдельную группу субтип IIS (субкласс IIS). Ферменты этой группы взаимодействуют с двумя дискретными сайтами (протяженностью 4—7 п. о.), расщепляя ДНК, как правило, на расстоянии 1—20 п. о. от узнаваемой последовательности, которая имеет частичную или полную асимметрию [2]. По мере заполнения таблицы возможных палиндромных последовательностей новые найденные прототипы будут, по-видимому, относиться к субтипу IIS или же к другим, но близким по свойствам субтипам.

Уникальные свойства эндонуклеаз рестрикции субтипа IIS, детально описанные в обзоре [2], объясняют интерес к поиску продуцентов этих ферментов.

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

В результате поиска был выделен и идентифицирован штамм *Bacillus coagulans* 116, продуцирующий эндонуклеазу рестрикции *Bco*116 I, названную согласно общепринятой номенклатуре [3].

При определении специфичности фермента установили, что данная рестриктаза расщепляет ДНК фага лямбда и T7 более чем в 30 местах, ДНК плазмиды pBR322 — в 2 местах, ДНК Y1p 5 [4] — в 6 местах, а ДНК pUC 19 — в 3 местах. Сравнение этих данных с табличными [5] показало, что такую частоту встречаемости имеет последовательность (5')-СТСТТС- и длины фрагментов продуктов гидролиза ДНК фага лямбда эндонуклеазой рестрикции *Bco*116 I (рис. 1) совпадают с теоретически рассчитанными.

Подтверждение последовательности сайта узнавания и определение места расщепления проводили по ранее описанному нами методу [6]. Для этого 10 мкг ДНК pUC 18 расщепляли эндонуклеазами рестрикции *Eco*RI и *Bme*18 I [7], вводили 3'-концевую метку с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) в присутствии [α -³²P]dATP. Меченые фрагменты длиной 1387 и 922

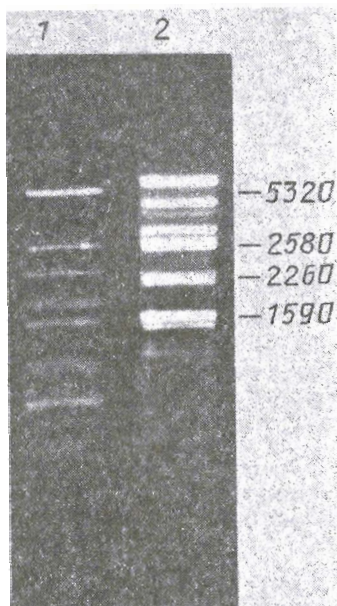


Рис. 1. Гидролиз ДНК фага лямбда рестриктазами *Bsf*NI (дорожка 1) и *Bco*116 I (дорожка 2)

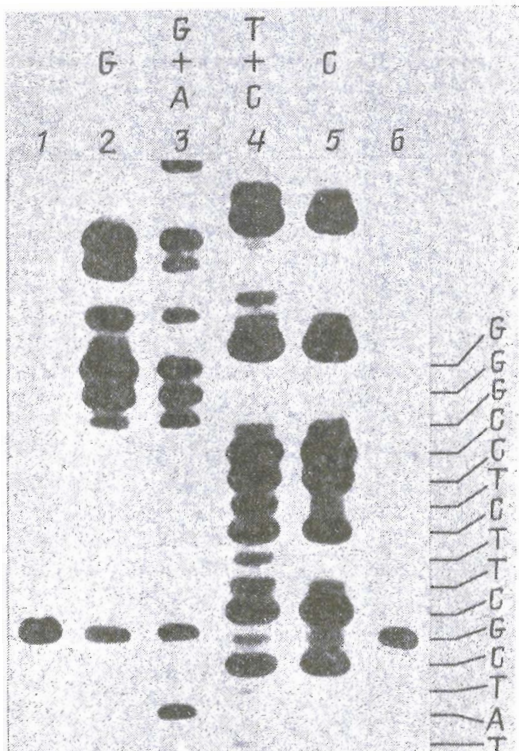


Рис. 2. Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов ферментативного (дорожки 1, 6) и химического (дорожки 2—5) расщепления фрагмента ДНК рUC 18 в 4% ПААГ

п. о. разделяли в 4% ПААГ, переносили на DEAE-бумагу DE-81. После элюции и осаждения фрагменты ДНК расщепляли по методу Максама — Гилберта [8]. Отдельную аликвоту фрагментов расщепляли рестриктазой *Bco*116 I и продукты гидролиза после денатурации формамидом наносили на 4% денатурирующий ПААГ совместно с продуктами химической дегградации.

Как видно из радиоавтографа геля (рис. 2), продукт ферментативного гидролиза меченого фрагмента *Eco*RI-*Bme*18 I (922 п. о.) совпадает по подвижности с фрагментом химического гидролиза ДНК по остатку гуанозина в положении 156 от 3'-конца. Следовательно, расщепление ДНК в этой цепи происходит через одно основание от сайта узнавания CTCTTCN↓N.

Аналогичные исследования были проведены для установления места расщепления комплементарной цепи на фрагменте *Eco*RI-*Bme*18 I (1387 п. о.) (данные не приводятся).

Таким образом, установлено, что рестриктаза *Bco*116 I узнает последовательность (5')-CTCTTCN↓NNNN - и расщепляет ДНК в местах, отмеченных стрелками.

Фермент проявляет максимальную функциональную активность при 60° С и концентрации (мМ): трис-НСl (рН 7,9) — 10, NaCl — 100, MgCl₂ — 10, дитиотреит — 1.

Фермент является термостабильным изошизомером рестриктазы *Ksp*632 I.

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие реактивы: трис, EDTA, дитиотреит (Sigma, США); 2-меркаптоэтанол (Serva, Германия); фосфоцеллюлозу (Whatman, Англия); гидроксилпатит (Bio-Rad, США); рестриктазы *EcoRI*, *BmeI*8 I, ДНК фагов лямбда и T7, плазмид pUC 19, pBR 322, YIp 5, фрагмент Кленова, лигазу, декстран-500 (НИКТИ БАВ НПО «Вектор», Бердск), полиэтиленгликоль (M, 4000, Казань).

Бактериальные культуры выделяли из почвы традиционными методами [9]. 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. Биомассу (10 г) суспендировали в 30 мл буфера для экстракции (10 мМ трис-HCl, pH 7,9, 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ EDTA) и подвергали дезинтеграции ультразвуком на аппарате УЗДН-2Т (10×30 с). Полученные гомогенаты прогревали 10 мин при 60° С. Затем проводили фракционирование в двухфазной системе полиэтиленгликоль (ПЭГ) — декстран. Для этого к разрушенной суспензии клеток добавляли 3,84 г ПЭГ, 0,96 г декстрана в 9 мл воды и 6,6 мл 4 М NaCl. Полученную смесь перемешивали и центрифугировали 20 мин со скоростью 16 000 об/мин при 4° С на центрифуге G-21В. Далее проводили хроматографическую очистку на фосфоцеллюлозе P-11. Клеточный экстракт сливали из центрифужных пробирок, замеряли объем и разбавляли в 2 раза буфером (10 мМ калий-фосфат, pH 7,0, 1 мМ EDTA, 7 мМ меркаптоэтанол) до концентрации NaCl 0,2 М. Разбавленный экстракт наносили на колонку с сорбентом со скоростью 20 мл/ч, промывали аналогичным буфером с 0,2 М NaCl и элюировали фермент линейным градиентом концентрации NaCl от 0,2 до 1,0 М. Фермент элюируется в диапазоне 0,45—0,6 М NaCl. После фосфоцеллюлозы фермент наносили на колонку гидроксилпатита (V 4 мл) со скоростью 10 мл/ч, промывали тем же буфером, контролируя промывку по поглощению при 280 нм. Энзим элюировали линейным градиентом концентрации калий-фосфата от 0,01 до 0,6 М. Эндонуклеаза элюируется при концентрации 0,4 М. В дальнейшем фермент диализовали против буфера: 50 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4, 1 мМ дитиотреит, 50% глицерин. Выход фермента 30 000 ед. акт.

Специфическую эндонуклеазную активность в исследуемых растворах тестировали по их способности специфически фрагментировать ДНК фага лямбда, продукты реакции анализировали электрофорезом в 0,7—1,0% гелях агарозы [10].

Определение точки расщепления проводили как описано в тексте.

Авторы благодарят Т. А. Ушакову за очистку фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roberts R. J., Macelis D.//Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. Suppl. P. 2167—2180.
2. Szybalski W., Kim S. C., Hasan N., Podhajski A. J.//Gene. 1991. V. 100. P. 15—26.
3. Smith H. O., Nathans D. J.//J. Mol. Biol. 1973. V. 81. N3. P. 419—423.
4. Struhl K., Stinchcomb D. T., Scherer S., Davis R. W.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 1035—1039.
5. Каталог фирмы New England BioLabs (1992).
6. Приходько Г. Г., Петров Н. А., Чижиков В. Е., Дегтярев С. Х.//Биотехнология. 1988. Т. 4. № 5. С. 618—620.
7. Дедков В. С., Дегтярев С. Х., Малыгин Э. Г., Петров Н. А., Репин В. Е., Тарасова О. Д. Штамм *Bacillus megaterium* — продуцент эндонуклеазы рестрикции *BmeI*8 I: А. с. 1413952 СССР. Пол. решение 28.05.87.

8. Махат А. М., Gilbert W.//Meth. Enzymol. 1980. V. 65. Pt. 1. P. 499—560.
9. 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.
10. Sharp P. A., Sugden B., Sambrook J.//Biochemistry. 1973. V. 12. № 16. P. 3055—3063.

Поступила в редакцию
26.VIII.1992

После доработки
6.X.1992

V. E. Repin*, V. E. Chizhikov, T. A. Tereshchenko, L. R. Lebedev

*Bco116 I, AN ISOSCHIZOMER OF Ksp632 I FROM
Bacillus coagulans*

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

The recognition sequence and cleavage point of restriction endonuclease *Bco116 I* have been determined as (5')-CTCTTCN[↓] NNNN
(3')-GAGAAGN NNNN[↓].