



УДК 577.152.31*23'14

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА *VcuAI* ИЗ *Bacillus cereus* A

© 1996 г. С. В. Королев, О. Т. Самко, М. А. Эльдаров*, А. А. Калугин, Э. Б. Хорошутина, Н. М. Омелянюк, Н. Н. Соколов#, К. Г. Скрябин*

Институт биомедицинской химии РАН, 119832, Москва, Погодинская ул., 10;

* Центр "Биоинженерия" РАН, Москва

Поступила в редакцию 21.11.95 г.

Из клеток *Bacillus cereus* ВКМ В-814 выделена новая эндонуклеаза рестрикции – *VcuAI*. Очистка фермента включала разрушение микробных клеток ультразвуком, фракционирование бесклеточного экстракта сернокислым аммонием и хроматографию на DEAE-сефарозе. Выход очищенного препарата рестриктазы *VcuAI* составил около 1400 ед. акт. на 1 г микробной массы. Фермент проявлял максимальную активность при 30–37°C, pH 7.6–8.2, концентрации $MgCl_2$ 5–10 мМ в условиях высокой ионной силы (50 мМ трис-HCl, 100 мМ NaCl). Установлено, что сайт-специфическая эндонуклеаза *VcuAI* узнает на двунизовой ДНК нуклеотидную последовательность 5' G↓G(A/T)CC и расщепляет ее как указано, являясь истинным изошизомером рестриктазы *AvuII*.

Ключевые слова: рестрикционные эндонуклеазы II типа, рестриктаза *VcuAI*, изошизомер *AvuII*, *Bacillus cereus* A.

Получившие в последние годы значительное развитие работы в области генетической инженерии, биотехнологии, изучения структуры и функции нуклеиновых кислот предполагают использование в качестве одного из инструментов исследования рестриктаз II класса (КФ 3.1.21.4). Эти ферменты представляют также большой интерес как объекты для изучения важной общебиологической проблемы белково-нуклеинового узнавания. Этими обстоятельствами и объясняется осуществляемый во многих лабораториях поиск как рестриктаз с новой специфичностью, так и изошизомеров известных эндонуклеаз, общее число которых в настоящее время составляет около 2500 [1]. В результате проводимых нами в этом направлении исследований удалось обнаружить целый ряд продуцентов рестриктаз, в том числе продуцент *VcuAI*, многие из новых рестриктаз были выделены и идентифицированы [2–8].

Цель настоящей работы – выделение, очистка и характеристика продуцируемой *Bacillus cereus* рестриктазы *VcuAI*.

Эндонуклеазная активность у этого штамма была обнаружена при электрофоретическом разделении продуктов расщепления ДНК фага λ толуольными экстрактами бактериальных клеток [9] (рис. 1). Фермент полностью гидролизует ДНК-субстрат и требовал в качестве кофактора лишь ионы Mg^{2+} . Согласно классификации ферментов рестрикции-модификации [10], эндонуклеаза *B. cereus* была отнесена к рестриктазам II класса

и в соответствии с их номенклатурой [11] обозначена как *VcuAI*.

Как видно из рис. 1, активность неспецифических нуклеаз в экстрактах из клеток *B. cereus* относительно низка, чем и объясняется простота

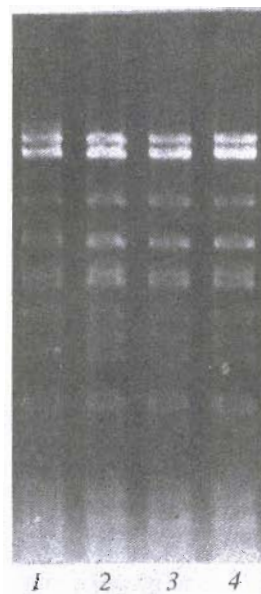


Рис. 1. Электрофоретическое разделение в 1% агарозном геле продуктов гидролиза ДНК фага λ толуольными экстрактами из клеток *B. cereus*. Пробы объемом 50 мкл содержали ДНК фага λ (1 мкг), инкубационный буфер для *VcuAI* и толуольный экстракт: 2.5 (1), 5 (2), 7.5 (3) и 10 мкл (4). Инкубация при 37°C в течение 15 мин.

Автор для переписки.

разработанного нами способа выделения рестриктазы *VcuAI*. Процедура очистки эндонуклеазы рестрикции включала разрушение микробных клеток ультразвуком, фракционирование сернокислым аммонием (30–60% насыщения) и хроматографию на DEAE-сефарозе. Препарат фермента не содержал примесей неспецифических эндонуклеаз, экзонуклеаз и фосфатаз, был стабилен в течение по меньшей мере 5 мес при -20°C . Выход очищенной рестриктазы *VcuAI* составил примерно 1400 ед. акт. на 1 г биомассы. Оптимальные условия для определения активности *VcuAI*: $30\text{--}37^{\circ}\text{C}$, 50 мМ трис-НСl (рН 7.6–8.2), 100 мМ NaCl, 5–10 мМ MgCl_2 , 1 мМ дитиотреит и 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина.

Рестриктаза *VcuAI* имеет не менее 2 и 6 участков узнавания на плаزمидах рUC19 и рBR322 соответственно (данные не приведены) и более 15 сайтов на ДНК фага λ . Результаты опытов по одновременному расщеплению плазмид рUC19 и рBR322 рестриктазой *VcuAI* и рестрикционными эндонуклеазами, имеющими единственный участок узнавания на этих ДНК (*Bam*HI, *Bsp*MPI, *Pvu*II, *Pae*I (*Sph*I), *Paе*VI (*Sma*I) и др.), определение числа и размеров фрагментов ДНК, образующихся в результате расщепления плазмид рUC19 и рBR322 рестриктазой *VcuAI* (таблица), указывали на возможную изошизомерию рестриктаз *VcuAI* и *Ava*II. В опытах по параллельному и комбинированному гидролизу ДНК фага λ рестриктазами *VcuAI* и *Eco*47I (изошизомер *Ava*II) картины фрагментации ДНК фага λ не различались (рис. 2), что также свидетельствует об изошизомерии этих ферментов.

Для доказательства идентичности участков узнавания рестриктаз *VcuAI* и *Ava*II был использован метод Брауна и Смита [12], основанный на расщеплении продуктов ДНК-полимеразной реакции, осуществленной на матрице ДНК, содержащей сайт узнавания исследуемой рестриктазы, с помощью соответствующего праймера. Вместо кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I была использована ДНК-полимераза фага T7 (секвенаса) [13].

Сравнение расчетных (Р) и экспериментальных (Э) данных о числе и размерах фрагментов ДНК (в п. о.), образующихся при расщеплении плазмид рUC19 и рBR322 рестриктазами

Номер фрагмента	рUC19		рBR322		Номер фрагмента	рUC19		рBR322	
	<i>Ava</i> II	<i>Vcu</i> AI	<i>Ava</i> II	<i>Vcu</i> AI		<i>Ava</i> II	<i>Vcu</i> AI	<i>Ava</i> II	<i>Vcu</i> AI
	Р	Э	Р	Э		Р	Э	Р	Э
1	2464	2430	1746	1720	5			249	270
2	222	260	1433	1365	6			222	240
3			303	330	7			88	*
4			279	300	8			42	*

* Фрагменты не выявляются при электрофорезе в агарозном геле.

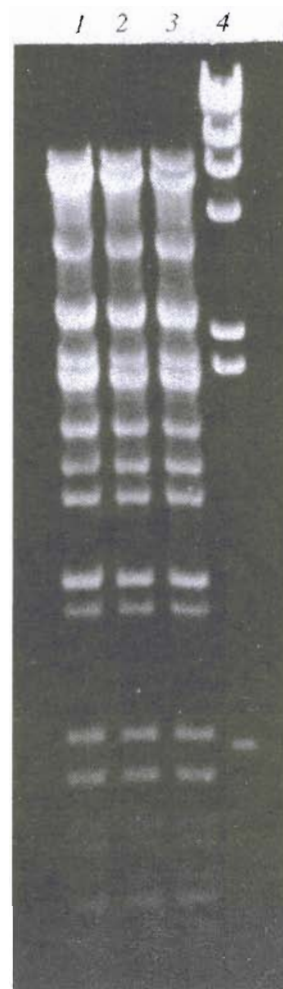


Рис. 2. Электрофоретическое разделение в 1% агарозном геле продуктов расщепления ДНК фага λ рестриктазами *VcuAI* (1), *Eco*47I (изошизомер *Ava*II) (2), *VcuAI* + *Eco*47I (3), *Hind*III (4).

В качестве матрицы служила двухцепочечная плазмидная ДНК (производное рUC19) со вставкой, содержащей предполагаемый сайт узнавания *VcuAI* на расстоянии 90 п.о. от 3'-конца последовательности, соответствующей "универсальному"

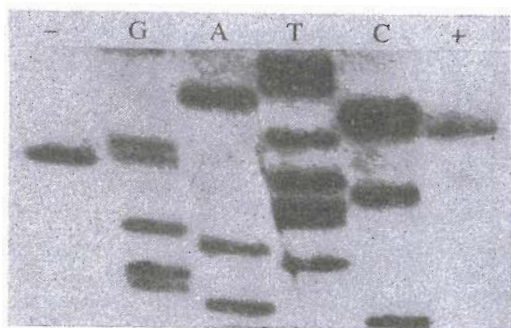


Рис. 3. Секвенирование сайта расщепления ДНК рестриктазой *VcuAI*. Электрофореграмма в 5% денатурирующем ПААГ. G, A, T, C – продукты стандартных реакций секвенирования по Сэнгеру с помощью универсального праймера плазмидной ДНК pUC19 со вставкой, содержащей сайт *AvaII*. (–) – продукт элонгации *VcuAI* “универсального” праймера на той же матрице после гидролиза рестриктазой *VcuAI*. (+) – то же самое, но после достройки ДНК-полимеразой фага T4 в присутствии четырех dNTP.

праймеру. Продукт элонгации “универсального” праймера после инактивации секвеназы расщепляли рестриктазой *VcuAI*, часть полученной смеси для достройки 5'-выступающих концов обрабатывали ДНК-полимеразой фага T4 в присутствии всех четырех dNTP и оба образца анализировали в 5% денатурирующем ПААГ параллельно с продуктами четырех стандартных реакций секвенирования по Сэнгеру той же плазмидной ДНК с помощью “универсального” праймера. Как видно из рис. 3, рестриктаза *VcuAI* узнает последовательность нуклеотидов G↓G(A/T)CC, расщепляя ее в месте, указанном стрелкой, и, таким образом, является истинным изошизомером рестриктазы *AvaII* [14].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штамм бактерий *B. cereus* ВКМ В-814 был получен из ВКМ Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН. Культуру выращивали в аэробных условиях при 37°C на среде Хоттингера до поздней логарифмической фазы роста. Клетки собирали сепарированием, отмывали от культуральной жидкости и хранили при –20°C.

Рестриктазы *AluI*, *BamHI*, *EcoRI*, *LpI* (*ClaI*), *PaeI* (*SphI*), *PaeBI* (*SmaI*), ДНК фага λ C1 857 S7 выделяли как описано ранее [2–4, 15–17]. Плазмиды pUC19 и pBR322 любезно предоставлены А.Г. Басакавном (ИБМХ РАМН). Эндонуклеазы рестрикции *HindIII*, *BspMI*, *PvuII*, *Eco47I* (*AvaII*), ДНК-полимераза фага T4 – производства фирмы MBI Fermentas (Литва), DEAE-сефароза CL-6B – препарат фирмы Pharmacia (Швеция).

Продукты расщепления ДНК анализировали электрофорезом в агарозных и полиакриламидных гелях как описано [18]. В качестве стандар-

тов использовали *PaeI*, *LpI*, *EcoRI*, *HindIII* и *EcoRV*-фрагменты ДНК фага λ, *AluI*-фрагменты плазмиды pBR322.

Активность рестриктаз определяли в оптимальных условиях [19]. За единицу активности принимали количество фермента, полностью гидролизующее 1 мкг ДНК фага λ за 1 ч инкубации.

Выделение рестриктазы *VcuAI*. Микробную массу *B. cereus* (5 г) суспендировали в 10 мл буфера, содержащего 10 мМ калийфосфат (pH 7.4), 1 мМ дитиотреит, 0.1 мМ EDTA, 1 мМ азид натрия и 100 мкг/мл фенолметилсульфонилфторида. Клеточную суспензию обрабатывали (12 × 15 см) на ультразвуковом дезинтеграторе мощностью 150 Вт (MSE, Англия) при 2–4°C (все последующие процедуры по очистке фермента проводились при этой же температуре) и центрифугировали (105000g, 60 мин). К надосадочной жидкости добавляли кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до концентрации 30% от насыщающей. Раствор перемешивали 30 мин и осветляли центрифугированием (15000g, 20 мин). Концентрацию $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в супернатанте повышали до 60% и процедуру повторяли. Осадок после повторного центрифугирования растворяли в 10 мл буфера А (10 мМ калийфосфат (pH 7.4), 1 мМ дитиотреит, 0.1 мМ EDTA, 10% глицерина (по объему)) и диализовали в течение ночи против 2 л того же буфера. Диализат наносили со скоростью 40 мл/ч на колонку (1.5 × 10 см) с DEAE-сефарозой, уравновешенную буфером А. Белки элюировали линейным градиентом концентрации KCl (0.1–1 М, 200 мл) со скоростью 40 мл/ч, собирая фракции по 5 мл. Фермент элюировали при концентрации KCl в рабочем буфере 0.2–0.3 М. Фракции с активностью рестриктазы *VcuAI* объединяли и диализовали в течение ночи против буфера, содержащего 10 мМ трис-НСI (pH 7.5), 100 мМ NaCl, 0.1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит и 50% глицерина (об/об).

Определение строения участка узнавания *VcuAI*. В качестве матрицы использовали 1 пмоль двухцепочечной плазмидной ДНК (сконструированное нами произведенное pUC19 со вставкой, содержащей сайт *AvaII*). После денатурации и отжига матрицы с праймером к инкубационной смеси добавляли раствор для “квазиреминимального” мечения и ДНК-полимеразу фага T7 (секвеназу) как описано [13]. Основную часть инкубационной смеси (13 мкл, или 8/10) использовали для реакций секвенирования. К оставшейся части (1.5 мкл) добавляли 0.5 мкл раствора дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (каждый dNTP в концентрации 0.25 мМ) и инкубировали 5 мин при 20°C. Затем смесь прогревали 3 мин при 80°C и охлаждали (30 мин) до комнатной температуры. Объем смеси доводили до 10 мкл буфером для *VcuAI*, гидролизовали 1 ед. акт. *VcuAI* (15 мин, 30°C) (смесь (–)). Далее отбирали из смеси (–) аликвоту (5 мкл) и добавляли

1 ед. акт. ДНК-полимеразы фага T4 и 4 dNTP до концентрации каждого 0.25 мМ, после чего инкубировали при комнатной температуре 20 мин (смесь (+)). На 5% денатурирующий ПААГ нанесли 1/2 секвенирующих смесей и по 1/10 из смесей (-) и (+).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roberts R.J., Macelis D. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 3125–3137.
2. Sokolov N.N., Fitzner A.B., Anikeitcheva N.V., Khoroshutina E.B., Samko O.T., Kalosha V.O., Fodor I., Votrin I. // Molec. Biol. Rep. 1985. V. 10. P. 159–161.
3. Соколов Н.Н., Аникейчева Н.В., Фицнер А.Б., Самко О.Т., Хорошутина Э.Б., Калугин А.А. // Журн. микробиол. 1988. С. 86–89.
4. Соколов Н.Н., Манялене З.П., Буткус В.В., Фицнер А.Б., Хорошутина Э.Б., Калугин А.А., Янулайтис А.А. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. С. 1040–1044.
5. Соколов Н.Н., Эльдаров М.А., Аникейчева Н.В., Карпичев И.В., Самко О.Т., Фицнер А.Б., Калугин А.А., Хорошутина Э.Б., Скрябин К.Г. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. С. 47–51.
6. Соколов Н.Н., Самко О.Т., Аникейчева Н.В., Калугин А.А., Хорошутина Э.Б., Плуталов О.В., Берих К.Р., Берлин Ю.А. // Биоорг. химия. 1994. Т. 20. С. 1334–1341.
7. Sokolov N.N., Fitzner A.B., Eldarov M.A., Anikeitcheva N.V., Kalugin A.A., Samko O.T., Khoroshutina E.B., Fodor I. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 2897.
8. Eldarov M.A., Karpichev I.V., Samko O.T., Anikeitcheva N.V., Kalugin A.A., Khoroshutina E.B., Sokolov N.N. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 2898.
9. Соколов Н.Н., Фицнер А.Б., Хорошутина Э.Б., Хейслере М.Я. // Бюл. эксп. биол. и мед. 1984. Т. 97. С. 163–165.
10. Boyer H.V. // Ann. Rev. Microbiol. 1971. V. 25. P. 153–176.
11. Smith H.O., Nathans D. // J. Mol. Biol. 1973. V. 81. P. 419–423.
12. Brown N.L., Smith M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 391–404.
13. Tabor S., Richardson S.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 4076–4080.
14. Marray K., Hughes S.G., Brown J.S., Bruce S.A. // Biochem. J. 1976. V. 159. P. 317–322.
15. Соколов Н.Н., Вотрин И.И., Фицнер А.Б., Аникейчева Н.В. // Биохимия. 1978. Т. 43. С. 865–871.
16. Соколов Н.Н., Вотрин И.И., Фицнер А.Б., Кирсанова И.Д. // Вопр. мед. химия. 1980. Т. 26. С. 568–571.
17. Вотрин И.И., Ходарев Н.Н., Баснакьян А.Г., Соколов Н.Н., Фицнер А.Б., Александрова С.С. // Вестн. АМН СССР. 1981. С. 59–64.
18. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 110.
19. New England Biolabs. Catalog 1993.

Site-specific Endonuclease *BcuAI* from *Bacillus cereus* A

S. V. Korolev*, O. T. Samko*, M. A. Eldarov**, A. A. Kalugin*, E. B. Khoroshutina*, N. M. Omel'yanyuk*, N. N. Sokolov*, and K. G. Skryabin**

*Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya 10, Moscow, 119832 Russia

**Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow

Abstract—A new restriction endonuclease was isolated from the *Bacillus cereus* BKM B-814 by means of the cell disruption with ultrasonication, ammonium sulfate fractionation of the cell-free extract, and chromatography on DEAE-Sephadex to give about 1400 U of the enzyme per gram of cells. The enzyme revealed the maximum activity at 30–37°C, pH 7.6–8.2, and 5–10 mM MgCl₂ under a high ionic strength (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl). The site-specific endonuclease *BcuAI* was found to recognize the 5' $\overline{C}A\overline{C}(A/T)CC$ sequence in double-stranded DNA and cleave it as shown with the arrow, thus being a true isoschisomer of the *AvaII* restriction endonuclease.

Key words: restriction endonucleases type II, restriction endonuclease *BcuAI*, *AvaII* isoschisomer, *Bacillus cereus* A.