



УДК 577.155.07

ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ
ЭНДОНУКЛЕАЗ РЕСТРИКЦИИ*Нетесов С. В., Грачев С. А.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии
Главного управления микробиологической промышленности
при Совете Министров СССР, Новосибирск*

К настоящему времени описано более 100 различных рестрикционных эндонуклеаз [1], являющихся незаменимыми инструментами в молекулярно-биологических исследованиях. Естественно, что при создании коллекции этих ферментов желательнее использовать универсальный, простой и эффективный метод выделения. Наиболее удачный с этой точки зрения метод описан в работе [2]. Он был использован авторами для выделения 15 рестриктаз и заключается в последовательном разрушении клеток ультразвуком, отделении дебриса центрифугированием, хроматографии на фосфоцеллюлозе, затем на гидроксиллапате и концентрировании фермента диализом. Недостатком метода, на наш взгляд, является невысокая степень извлечения фермента из клеток.

Нами в эту методику внесены следующие изменения: в 4–5 раз уменьшено количество используемых хроматографических сорбентов (что не отразилось тем не менее на качестве выделяемых ферментов) и, кроме того, во все использованные буферные растворы был добавлен неионный детергент тритон X-100 (Serva, ФРГ) до концентрации 0,1%. В зависимости от использованного штамма-продукента количество извлеченных этим способом рестриктаз возрастало от 2 до 12 раз по сравнению с данными работы [2]. Наиболее существенным присутствием детергента оказалось на стадии разрушения клеток.

В работе [3] было продемонстрировано, что значительную долю рестриктаз можно извлечь из грамотрицательных бактерий, либо подвергая клетки осмотическому шоку, либо экстрагируя их буферным раствором, содержащим тритон X-100. Это свидетельствует о локализации данных ферментов в периплазматическом пространстве и/или на клеточной мембране. Очевидно, что добавление детергента в процессе разрушения клеток приводит к более полной экстракции эндонуклеаз рестрикции.

При выделении эндонуклеазы *Pst*I из *Providencia stuartii* [4] также были использованы растворы, содержащие тритон X-100, однако в работе не проведено сравнения методик с применением и без применения детергента.

В таблице даны результаты, полученные нами при выделении 6 рестриктаз в присутствии детергента и без него (по данным работы [2]). Определение активности ферментов проводили в условиях, указанных в работе [2], используя в качестве субстрата ДНК плазмиды pBR 322.

Фермент	Молярность NaCl при элюции фермента с фосфоселлюлозы	Молярность K ₃ PO ₄ при элюции фермента с гидроксил-апатита	Выход фермента, ед. акт. (на 5 г биомассы)	
			наши данные	данные [2]
<i>AluI</i>	0,4	0,18	720	400
<i>EcoRI</i>	0,6	0,2	425 000	100 000
<i>HindbIII</i>	0,45	0,3	200 000	Не выделяли
<i>MspI</i>	0,45	0,1	35 000	То же
<i>PstI</i>	0,4	0,22	41 500	3000
<i>TaqI</i>	0,4	0,1	42 600	800

Все полученные нами препараты рестриктаз оказались свободными от неспецифических эндо- и экзонуклеазных, а также фосфатазной активностей при тестировании как на 5'-, так и на 3'-[³²P]-меченных фрагментах ДНК.

Авторы выражают благодарность В. Б. Погребняку за предоставление биомассы *TaqI* и И. Х. Урманову за данные по выделению рестриктазы *EcoRI*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts R. J. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences.— Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 63–80.
2. Greene P. G., Heyneker H. L., Bolivar F., Rodriques R. L., Betlach M. C., Covarrubias A. A., Backman K., Russel D. J., Tait R., Boyer H. W. A general method for the purification of restriction endonucleases.— Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, p. 343–353.
3. Mayer H., Reichenbach H. Restriction endonucleases: general survey procedure and survey of gliding bacteria.— J. Bacteriol., 1978, v. 136, p. 708–713.
4. Smith D. L., Blattner F. R., Davies J. The isolation and partial characterization of a new restriction endonuclease from *Providencia stuartii*.— Nucl. Acids Res., 1976, v. 3, p. 343–353.

Поступила в редакцию
7.I.1981

AN EFFECTIVE METHOD FOR ISOLATION OF RESTRICTION ENDONUCLEASES

NETESOV S. V., GRACHEV S. A.

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Novosibirsk

A modification of the published method for isolating the restriction endonucleases is proposed. The modification involves the use of Triton X-100 containing buffers at all steps of the isolation procedure which results in a 2–12-fold increase in the yield of enzymes depending on the strain of bacteria.