



УДК 577.152.314'1

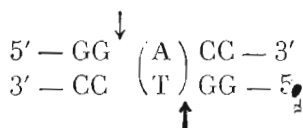
## САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА *BmeI* ИЗ *BACILLUS MEGATERIUM* 216

Пачкунов Д. М., Грамаров В. М., Добрица А. П.,  
Матвиенко Н. И.

Институт белка Академии наук СССР, г. Пущино, Московской обл.

Сайт-специфические эндонуклеазы стали в настоящее время незаменимым инструментом при исследовании структуры ДНК и создании рекомбинантных молекул ДНК *in vitro*. Известно большое число таких ферментов, узнающих на двухцепочечной ДНК последовательности из 4–6 нуклеотидов [1], тем не менее интенсивный поиск новых ферментов этого класса продолжается, так как выделение фермента, узнающего новую последовательность, расширяет возможности в работе по получению интересных генов и изучению первичной структуры ДНК. Кроме того, среди новых штаммов бактерий обнаруживаются более активные продуценты эндонуклеаз рестрикции с уже известной специфичностью.

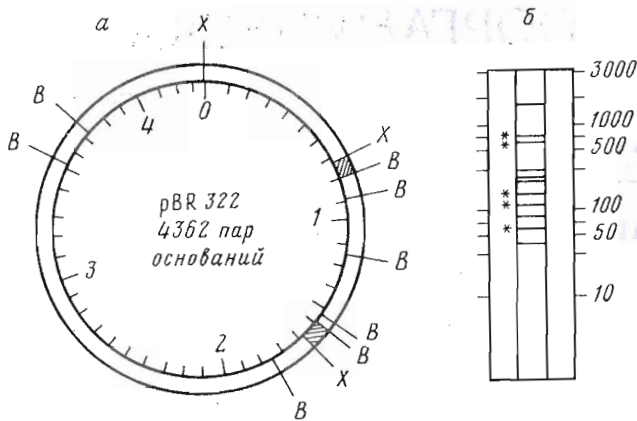
Нами выделена новая сайт-специфическая эндонуклеаза *BmeI* из штамма *Bacillus megaterium* 216. Название фермента дано в соответствии с номенклатурой, предложенной в работе [2]. Штамм *B. megaterium* 216 получен от проф. Л. Альфёльди. Установлено, что рестриктаза *BmeI* узнает на двухцепочечной ДНК последовательность



и гидролизует эту последовательность по межнуклеотидным связям, обозначенным стрелками. Центральная пара оснований, заключенная в скобки, может быть в любой ориентации.

Клетки *B. megaterium* выращивали с интенсивной аэрацией при 37°С в среде РУЕ, содержащей (г/л): пептон — 10, NaCl — 5, дрожжевой экстракт — 1.

3 г биомассы суспендировали в 4 мл буфера, содержащего 0,15 М NaCl, 10 мМ KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> (рН 7,0), 1 мМ EDTA, 2 мМ дитиотреит (буфер А), и клетки разрушали ультразвуком на ледяной бане в течение 7 мин. После 24 с озвучивания следовала 36-с пауза (амплитуда 12 мкм, дезинтегратор MSE). Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 40 000 *g*. Супернатант наносили на колонку (2,5×60 см) с ультрагелем AcA-44 (ЛКВ, Швеция), уравновешенную буфером А, и фермент элюировали тем же буфером. Скорость хроматографии 15 мл/ч, объем фракций 3 мл. Эндонуклеазную активность во фракциях тестировали по расщеплению ДНК бактериофага  $\lambda$ cI857S am7 в реакционной смеси, содержащей в 40 мкл 0,7 мкг ДНК фага, 20 мМ трис-HCl (рН 7,9), 4 мМ MgCl<sub>2</sub>. Эндонуклеаза элюировалась в объеме, соответствующем мол. массе 60 000. Активные фракции (общая активность 70 000 ед.) наносили на колонку гепарин-сефарозы 6В (5 мл), приготовленной как описано в работе [3]. Колонку предварительно уравновешивали буфером А. Эндонуклеазу элюировали линейным градиентом 0,15–1 М NaCl в 10 мМ KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>-буфере, рН 7,0, содержащем 1 мМ EDTA, 2 мМ дитиотреит. Объем градиента 100 мл, скорость хроматографии 5 мл/ч, объем фракций 1,6 мл. Фермент элюировался с колонки широким пиком с максимумом активности в обла-



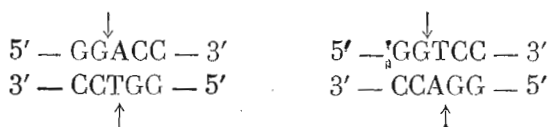
а — физическая карта рестрикции ДНК рВR322. Указаны сайты расщепления эндонуклеазой *BmeI* (В) и неидентифицированной эндонуклеазой (Х). Фрагменты, использованные для анализа первичной структуры, заштрихованы. б — Электрофограмма продуктов гидролиза ДНК рВR322 эндонуклеазой *BmeI* и неидентифицированной эндонуклеазой (см. текст). Звездочками указаны фрагменты, меченные  $^{32}\text{P}$

сти 0,3 М NaCl. Активные фракции объединяли, диализовали против буфера А, содержащего 50% глицерин, и хранили при  $-15^\circ\text{C}$ . Фермент проявляет максимальную активность в буферах следующего состава: 30 мМ трис-НСl (рН 7,5–7,9), 3–6 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20–40 мМ NaCl. Последовательность нуклеотидов, узнаваемую эндонуклеазой *BmeI*, определяли с помощью ЭВМ по методу, предложенному Гингерасом и др. [4], путем сравнения величин фрагментов, определенных в результате электрофоретического анализа *BmeI*-гидролизата плазмиды рВR322 с известной нуклеотидной последовательностью [5].

Таким образом, удалось установить [6], что *BmeI* узнает на двухцепочечной ДНК последовательность нуклеотидов  $5' - \text{GG} \begin{pmatrix} \text{A} \\ \text{T} \end{pmatrix} \text{CC} - 3'$ .

Место расщепления ДНК эндонуклеазой *BmeI* в составе узнаваемой ею последовательности определяли в результате анализа первичной структуры фрагментов по методу Максама — Гилберта [7]. ДНК плазмиды рВR322 расщепляли эндонуклеазой из неидентифицированного штамма, которая вносила разрывы в ДНК в точках, соответствующих положению 729, 1592, 4345 пар оснований (рисунок) и приводила к образованию фрагментов с выступающими 5'-концами. Эти фрагменты дефосфорилировали щелочной фосфатазой *E.coli* (Олайнский завод химреактивов) и затем фосфорилировали с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4 (г. Вильнюс, ВНИИ прикладной энзимологии) и  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (Амершам, Англия, 3000 Ки/моль). Меченые фрагменты гидролизовали *BmeI* и разделяли в 8% акриламидном геле. В результате этого, как и предполагалось, было получено 5 меченных по 5'-концам фрагментов. Два из них с наименьшей молекулярной массой элюировали из геля. Эти фрагменты имеют следующие координаты концов на физической карте рВR322: 729–799(А) и 1481–1592(В). В результате определения первичной структуры элюированных из геля фрагментов была установлена нуклеотидная последовательность их 3'-концов в точках расщепления *BmeI* (координаты пар оснований указаны цифрами):  $5' - \dots {}^{793}\text{GGCGAGG}^{799} - 3'$  (фрагмент А) и  $5' - {}^{1477}\text{AGCCGGG}^{1483} \dots 3'$  (фрагмент В).

Таким образом, эндонуклеаза *BmeI* при расщеплении специфической последовательности ДНК дает выступающий 5'-нуклеотид, либо А, либо Т:



Следовательно, она относится к типу изошизомеров *AvaII* и отличается от остальных ферментов этого типа тем, что при гидролизе ДНК на 5'-конце фрагментов выступает один нуклеотид, а не три [1].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts R. J. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 5, p. 117 - r. 144.
2. Smith H. O., Nathens D. J. Mol. Biol., 1973, v. 81, № 2, p. 419-423.
3. Bickle T. A., Pirota V., Imber R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 8, p. 2561-2574.
4. Gingeras T. R., Milazzo J. P., Roberts R. J. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 11, p. 4105-4127.
5. Sutcliffe J. G. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1979, v. 43, № 1, p. 77-90.
6. Крамаров В. М., Мазанов А. Л., Врезгунов В. Н. Материалы 4 Всес. конференции «Методы получения и анализа биохимических препаратов». Рига, 1982, ч. 1, с. 96.
7. Maxam A. M., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 3, p. 560-564.

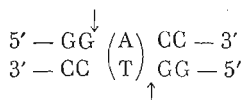
Поступило в редакцию  
29.VII.1982

#### SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE *BmeI* FROM *BACILLUS MEGATERIUM* 216

PASHKUNOV D. M., KRAMAROV V. M., DOBRITSYA A. P., MATVIENKO N. I.

*Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

A site-specific endonuclease *BmeI* has been isolated from *Bacillus megaterium* 216 by gel filtration on ultragel AcA-44 with a subsequent chromatography on heparin-sepharose 6B. On the double-stranded DNA the endonuclease recognizes the pentanucleotide sequence



and hydrolyzes it in the points shown by arrows. At gel filtration the endonuclease is eluted in the volume corresponding to a molecular mass of 60 000.