



УДК 577.152.314'1

***BbvII* — НОВАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА
ИЗ *BACILLUS BREVIS* 80*****Бунина З.Ф., Крамаров В.М., Мазанов А.Л.,
Пачкунов Д.М., Смолянинов В.В.****Всесоюзный научно-исследовательский институт
прикладной микробиологии, г. Серпухов****Матвиенко Н.Н.****Институт белка Академии наук СССР, г. Пушкино Московской обл.*

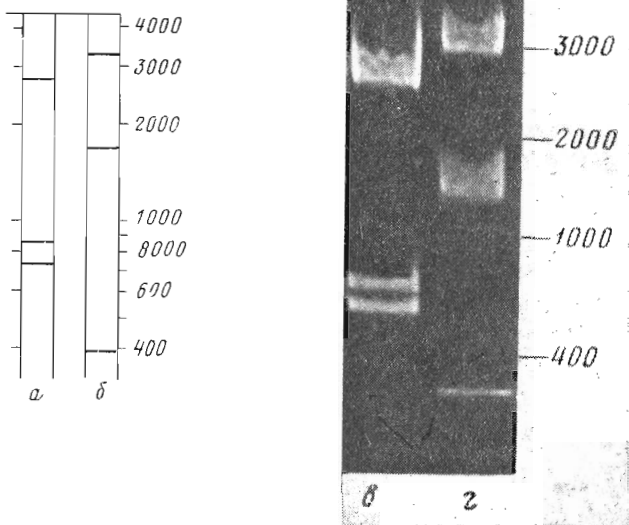
Из *Bacillus brevis* 80 выделена новая сайт-специфическая эндонуклеаза *BbvII*. Эндонуклеаза узнает на двухнитевой ДНК последовательность нуклеотидов 5'-GTCTTC-3' и производит двухнитевой разрыв вне пределов узнаваемой последовательности.

Сайт-специфические эндонуклеазы типа II узнают на двухнитевой ДНК специфические для каждой из них участки (сайт), состоящий из 4–6 нуклеотидов [1]. Таких различных участков известно в настоящее время около 80 [2]. Большинство сайтов обладают осью симметрии 2-го порядка, наибольшая их длина — 6 пар нуклеотидов (более длинные сайты являются вырожденными). Известно также небольшое число эндонуклеаз типа II, узнающих несимметричные сайты, состоящие из 4 и 5 пар нуклеотидов. Это эндонуклеазы *FokI*, *HphI*, *HgaI*, *MboII*, *MnII*, *SfaNI* [2]. Выделенная нами эндонуклеаза, названная в соответствии с номенклатурой, предложенной в работе [3], *BbvII*, — первый фермент, узнающий несимметричный сайт, состоящий из 6 нуклеотидов.

Микроорганизм *B. brevis* 80, являющийся источником эндонуклеазы *BbvII*, был выделен нами как постороннее заражение при культивировании и идентифицирован по признакам, описанным в определителе [4].

Эндонуклеаза *BbvII* была очищена хроматографией на ультрагеле АсА-34 (ЛКВ, Швеция) и гепарин-сефарозе. 1,3 г *B. brevis* 80 суспендировали в 3 мл буфера А (0,01 М К-фосфат, pH 7,0; 2 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA), содержащего 0,15 М NaCl, и разрушали ультразвуком. Клеточные стенки отделяли центрифугированием, супернатант наносили на колонку (2,6×28 см) с ультрагелем АсА-34, уравновешенным буфером А, содержащим 0,15 М NaCl, и элюировали тем же раствором со скоростью 13 мл/ч, собирая фракции по 3 мл. Эндонуклеазную активность тестировали, внося аликвоты из фракций (3 мкл) в реакционную смесь, содержащую 90 мМ трис-HCl (pH 7,5), 9 мМ MgCl₂, 0,8 мкг ДНК фага λ 857S7. После инкубации в течение 30 мин при 37° С продукты реакции анализировали в 0,8% агарозном геле, как описано ранее [5]. Эндонуклеаза элюировалась в объеме 117–130 мл, эти фракции объединяли, наносили на гепарин-сефарозу (колонка объемом 5 мл) и затем белки элюировали линейным градиентом 0,17–0,8 М NaCl в буфере А. Объем градиента 50 мл, скорость элюции 4 мл/ч, фракции по 1 мл. Эндонуклеаза элюировалась при концентрации NaCl около 0,3 М. Выход фермента — 1500 ед. акт. Фермент не содержал заметного количества нуклеаз и был стабилен при хранении при –15° С несколько месяцев.

Последовательность нуклеотидов, узнаваемая эндонуклеазой *BbvII*, была определена с использованием ЭВМ. Путем совместного гидролиза эндонуклеазы *BbvII* с другими эндонуклеазами было установлено, что исследуемая эндонуклеаза расщепляет ДНК плазмиды pBR322 в районе



Фрагментация ДНК рВR322 (а) и ϕ X174 (б) при гидролизе по последовательности 5'-GTCTTC-3'. Рассчитано на ЭВМ с использованием известной первичной структуры. в, г — электрофореграмма фрагментов ДНК, полученная при гидролизе ДНК рВR322 (в) и ϕ X174 (г) эндонуклеазой *Bbv*II. Цифры справа указывают размер фрагментов ДНК (пар оснований)

(с точностью до 100 нуклеотидов) 750, 1550 и 4300-й пары нуклеотидов. (Полная последовательность ДНК рВR322 опубликована в работе [6].) Три найденные области расщепления от 700 до 800, от 1500 до 1650, а также от 4250 до 50-й пары нуклеотидов сравнивали между собой при помощи ЭВМ по встречаемости в них общих последовательностей нуклеотидов максимальной длины. Дополнительно требовалось, чтобы найденные общие последовательности не встречались вне границ указанных областей (по крайней мере не ближе чем на 100 нуклеотидов от этих участков). Оказалось, что всем этим требованиям отвечала единственная последовательность 5'-GTCTTC-3' (приведена одна нить ДНК, которая находится в точках с координатами 736, 1599 и 4352. Чтобы окончательно доказать, что эндонуклеаза *Bbv*II узнает последовательность GTCTTC, мы провели расщепление репликативной формы ДНК фага ϕ X174 (полная последовательность ДНК ϕ X174 известна [7]) и сравнили результаты эксперимента и расчета на ЭВМ. Расчетные данные (рисунок, а, б) полностью совпали с экспериментальными (рисунок, в, г), что доказывает правильность предположения о строении сайта узнавания *Bbv*II.

Все известные до настоящего времени сайт-специфические эндонуклеазы, узнающие несимметричную последовательность нуклеотидов, гидролизуют ДНК вне пределов узнаваемой последовательности. Предварительные данные, полученные при анализе по методу Максама — Гилберта продуктов расщепления ДНК эндонуклеазой *Bbv*II, свидетельствуют о том, что расщепление происходит на некотором расстоянии от сайта узнавания, при этом образуется выступающая 5'-последовательность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts R. J. CRC Crit. Rev. Biochem., 1976, v. 4, p. 123—164.
2. Roberts R. J. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 5, p. r117 — r143.
3. Smith H. O., Nathans D. J. Mol. Biol., 1973, v. 81, № 3, p. 419—423.
4. Краткий определитель бактерий Берги / Ред. Хоулт Дж. М.: Мир, 1980.

5. Sugden B., DeTroy B., Roberts R. J., Sambrook J. *Anal. Biochem.*, 1975, v. 68, № 1, p. 36-38.
6. Sutcliffe J. G. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1979, v. 43, p. 77-90.
7. Sanger F., Air G. M., Barrel B. G., Brown N. L., Coulson A. R., Fiddes J. C., Hutchinson III C. A., Slocombe P. M., Smith M. J. *Mol. Biol.*, 1978, v. 125, № 2, p. 225-246.

Поступило в редакцию
3.V.1983

***Bbv*II: A NEW SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE FROM
BACILLUS BREVIS 80**

BUNINA Z. F., KRAMAROV V. M., MAZANOV A. L.,
PACHKUNOV D. M., SMOLIANINOV V. V., MATVIENKO N. N.

*All-Union Research Institute of Applied Microbiology, Serpukhov;
Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

*Bbv*II, a new site-specific endonuclease, has been isolated from *Bacillus brevis* 80 by gel-filtration and chromatography on heparin-Sepharose. The endonuclease recognizes a non-symmetrical sequence 5'-GTCTTC-3' in double-stranded DNA and cleaves DNA 3'-CAGAAG-5' in both strands outside the recognition sequence.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 19.08 83 Подписано к печати 04.10 83 Т-15166 Формат бумаги 70×108¹/₁₆
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6 Усл. кр.-отт. 11,2 тыс. Уч.-изд. л. 13,9 Бум. л. 4,5
Тираж 869 экз. Зак. 3089

Издательство «Наука», 103717, ГСП, Москва, К-62, Подосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 10