



УДК 577.152.314.04

***XphI* — НОВАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА
ИЗ *XANTHOMONAS PHASEOLI*****Бунина З.Ф., Крамаров В.М., Смолянинов В.В.,
Толстова Л.А.**Всесоюзный научно-исследовательский институт
прикладной микробиологии, г. Серпухов Московской обл.

Сайт-специфическая эндонуклеаза *XphI* очищена хроматографией на ультрагеле АсА-44 и фосфоцеллюлозе. Конечный препарат не содержал примесей неспецифических нуклеаз. Эндонуклеаза *XphI* является, по всей вероятности, изошизомером эндонуклеазы *PstI*. ДНК, метилированная метилазами, обеспечивающими защиту от гидролиза эндонуклеазой *PstI*, устойчива и к действию эндонуклеазы *XphI*. Молекулярная масса эндонуклеазы, по данным гель-фильтрации, равна $47\ 000 \pm 2000$.

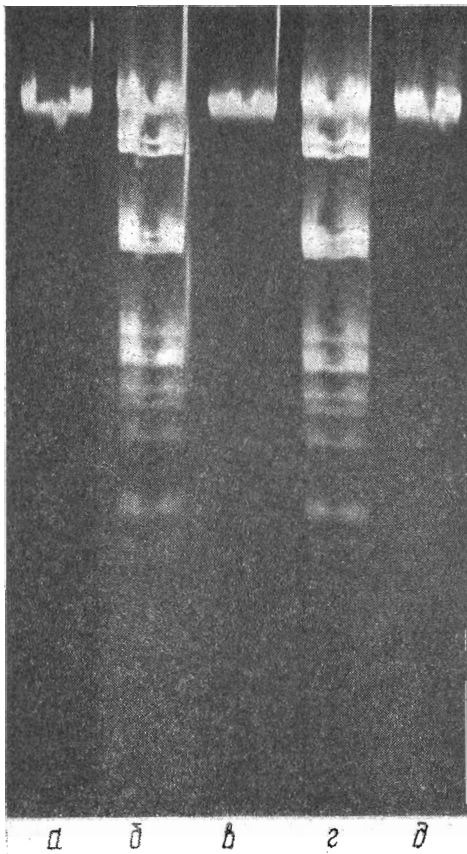
Сайт-специфические эндонуклеазы представляют собой в настоящее время незаменимый инструмент в молекулярной биологии и молекулярной генетике. Известно большое количество этих ферментов [1], но тем не менее интенсивный поиск таких эндонуклеаз продолжается с целью расширения возможностей их применения. Нами было проведено определение сайт-специфических эндонуклеаз у ряда штаммов микроорганизмов рода *Xanthomonas*. В клетках *X. phaseoli* 627 была обнаружена эндонуклеаза, обозначенная *XphI* в соответствии с предложенной ранее номенклатурой [2].

Эндонуклеаза *XphI* была очищена в две стадии гель-фильтрацией на ультрагеле АсА-44 и хроматографией на фосфоцеллюлозе. При гель-фильтрации эндонуклеаза элюировалась в объеме, соответствующем молекулярной массе $\sim 50\ 000$. Последующая очистка на фосфоцеллюлозе позволила получить препарат фермента, практически свободный от неспецифических нуклеаз.

Для выяснения сайта узнавания эндонуклеазы *XphI* мы сравнили ее действие с действием другой эндонуклеазы — *PstI*. Нуклеаза *XphI* является, по-видимому, изошизомером *PstI*, ряд изошизомеров которой был выделен ранее, в том числе и из микроорганизмов рода *Xanthomonas*, например *XmaII* [3]. Гидролиз эндонуклеазами *PstI* и *XphI* ДНК фага $\phi 80$ и последующее сравнение электрофореграмм в геле агарозы показали, что картины распределения фрагментов совпадают (рисунок). Следовательно, эндонуклеаза *XphI* узнает ту же последовательность нуклеотидов на двухнитевой ДНК, что и *PstI*, — 5'-CTGCAG-3'. Положение точки гидролиза для эндонуклеазы *XphI* относительно узнаваемой последовательности мы не устанавливали, однако вероятно, что *XphI* является истинным изошизомером *PstI*, судя по одинаковому действию обеих эндонуклеаз на ДНК с метилированным сайтом узнавания.

Известно, что некоторые сайт-специфические эндонуклеазы, узнающие одинаковые последовательности нуклеотидов, могут различаться по способности гидролизовать ДНК в зависимости от положения метилированного нуклеотида в сайте узнавания. Так, эндонуклеазы *EcoRII* и *TaqXI* узнают пентануклеотидную последовательность 5'-CC_T^AGG-3'[1], но *EcoRII* в отличие от *TaqXI* не способна гидролизовать ДНК, если в сайте узнавания метилирован внутренний цитозин [4, 5].

Эндонуклеаза *XphI* не гидролизовала ДНК из клеток, содержащих метилазу *PstI* (рисунок, а, в); аналогично ДНК из *X. phaseoli* была устой-



Электрофореграмма клеточных и фаговых ф80 ДНК, обработанных эндонуклеазами *XphI* и *PstI*. Электрофорез в пластине (14×7×0,2 см) геля 0,8% агарозы в буфере 90 мМ трис-борат - 3 мМ EDTA, pH 8,3, до прохождения маркерным красителем (бромфеноловый синий) 7 см. Фотография флуоресцирующих полос после прокрашивания раствором бромистого этидия (1 мкг/мл). *a* - ДНК из клеток *E. coli* - продуцента *PstI* [10]; *б* - та же ДНК+ДНК фага ф80, обработанные эндонуклеазой *XphI*; *в* - та же ДНК, обработанная *XphI*; *г* - ДНК из *X. phaseoli*+ДНК ф80, обработанные эндонуклеазой *PstI*; *д* - ДНК из *X. phaseoli*+*PstI*

чива к действию эндонуклеазы *PstI* (рисунок, *д*). Очевидно, оба штамма продуцентов содержат метилазы, защищающие их от гидролиза как собственной эндонуклеазой, так и ее изоэнзимом. Кроме того, ДНК плазмиды pBR322, метилированная метилазой *BbvI*, один из сайтов узнавания которой (5'-GCAGC-3') [6] частично совпадает с сайтом эндонуклеазы *PstI*, не гидролизуется ни *PstI* [7], ни выделенной нами *XphI*. На основании этих данных можно сделать вывод, что, вероятнее всего, метилируемые нуклеотиды в сайтах узнавания этих эндонуклеаз также совпадают.

Молекулярную массу *XphI* определяли гель-фильтрацией на колонке с ультрагелем AcA-44. *XphI* элюируется в объеме, который соответствует молекулярной массе $47\ 000 \pm 2000$.

Экспериментальная часть

Бактериальные культуры рода *Xanthomonas* были получены из музея Института микробиологии АН СССР. Культуры выращивали в условиях, описанных ранее для *X. holcicola* [8]. Метилазу *BbvI* выделяли как описано ранее [7] из культуры *Bacillus brevis* var. GB., любезно предоставленной А. П. Добрицей (ВНИИ прикладной микробиологии).

Клеточную ДНК выделяли фенольной депротенинизацией по методу [9].

В качестве ДНК, несущей модификацию *PstI*, использовали ДНК из штамма *E. coli* HB101, который содержит плазмиду, кодирующую полипептидные цепи метилазы и эндонуклеазы *PstI* [10] (получен от В. В. Сова *). Из этого же штамма выделяли эндонуклеазу *PstI* хроматографией на фосфоцеллюлозе и гепарин-сефарозе [10].

Очистка эндонуклеазы XphI. 5 г биомассы *X. phaseoli* суспендировали в 5 мл буфера, pH 7,0, содержащего 0,15 М NaCl, 10 мМ KH_2PO_4 , 2 мМ дитиотреит (буфер А), и разрушали с помощью генератора ультразвука

* Институт биологии моря ДВНЦ АН СССР, Камчатский отдел.

мощностью 150 Вт (MSE, Англия) при охлаждении льдом (амплитуда 12 мкм). Суспензию затем центрифугировали при 40 000g, супернатант наносили на колонку (2,5×60 см) с ультрогелем AcA-44 (ЛКВ, Швеция), уравновешенным буфером А. Белки элюировали тем же буфером со скоростью 20 мл/ч (фракции 3,5 мл). Фракции, содержащие эндонуклеазу *XphI*, объединяли и наносили на колонку (0,8×4,5 см) с фосфцеллюлозой P11 (Whatman, США), уравновешенную тем же буфером. После промывки колонки белки элюировали раствором NaCl в том же буфере (линейный градиент концентрации 0,15–0,8 М NaCl, скорость элюции 8 мл/ч, фракции 2,2 мл). Фракции, содержащие эндонуклеазу (0,24–0,3 М NaCl), объединяли, диализовали против буфера А, содержащего 50% глицерин, и хранили при –15° С. Из 5 г биомассы выделено 2,5 тыс. акт. *XphI*.

Фермент не терял эндонуклеазной активности при хранении при –15° С в течение 4 мес.

Молекулярную массу *XphI* определяли с помощью гель-фильтрации на колонке (2,5×60 см) с ультрогелем AcA-44, для калибровки которой использовали следующие белки (в скобках приведена их молекулярная масса): лизоцим (14 300), химотрипсиноген А (25 700), овальбумин (43 000), альбумин бычьей сыворотки (67 000); свободный объем колонки определяли по выходу голубого декстрана (2 000 000).

Определение эндонуклеазной активности *XphI*. Реакционная смесь содержала в 30 мкл 100 мМ трис-НСl (рН 7,8), 9 мМ MgCl₂, 0,7 мкг ДНК ф 80. К ней добавляли по 1–3 мкл фермента из фракции, смесь инкубировали 30 мин при 37° С, затем продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в геле 0,8% агарозы.

За единицу активности *XphI* принимали количество фермента, полностью гидролизующее 1 мкг ДНК фага λ c1857s7 при 37° С за 1 ч. Присутствие неспецифических нуклеаз тестировали следующим образом: 1 мкг ДНК λ (или ф 80) инкубировали 8–10 ч с 5–10-кратным избытком *XphI* в условиях эндонуклеазной реакции, затем продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в геле 0,8% агарозы. Отсутствие шлейфа на электрофореграмме (четкие полосы) говорило об отсутствии значительного количества неспецифических эндонуклеаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts R. J. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 1, p. 135–167.
2. Smith H. O., Nathans D. J. Mol. Biol., 1973, v. 81, № 3, p. 419–423.
3. Endow S. A., Roberts R. J. J. Mol. Biol., 1977, v. 112, № 3, p. 521–529.
4. Boyer H. W., Chow L. F., Dugaiczuk A., Hedgpeth J., Goodman H. M. Nature New Biol., 1973, v. 244, № 132, p. 40–43.
5. Грачев С. А., Мамеев С. В., Гуревич А. И., Игошин А. В., Колосов М. Н., Слюсаренко А. Г. Биоорган. химия, 1983, т. 7, № 4, с. 628.
6. Gingeras T. R., Milazzo G. P., Roberts R. J. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 11, p. 4105–4127.
7. Dobritsa A. P., Dobritsa S. V. Gene, 1980, v. 10, № 2, p. 105–112.
8. Крамаров В. М., Мазанов А. Л., Смолянинов В. В. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 220–223.
9. Miura K. J. In: Methods in Enzymol., v. 12, part A. N. Y.: Acad. Press, 1967, p. 543–545.
10. Walder R. J., Hartley J. L., Donelson J. E., Walder J. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 3, p. 1503–1507.

Поступила в редакцию
10.I.1984

После доработки
13.III.1984

XphI — A NEW SEQUENCE-SPECIFIC ENDONUCLEASE FROM *XANTHOMONAS PHASEOLI*

BUNINA Z. F., KRAMAROV V. M., SMOLYANINOV V. V., TOLSTOVA L. A.

All-Union Research Institute of Applied Microbiology, Serpukhov

A sequence-specific endonuclease *XphI* was purified by chromatography on Ultrogel AcA-44 and phosphocellulose. The final preparation is free of admixtures of non-specific nucleases. It is demonstrated that endonuclease *XphI* recognized 5'-CTGCAG-3' sequence like endonuclease *PstI*. According to gel filtration data, the molecular mass of endonuclease is 47 000+2000. DNA methylated by methylases which block its hydrolysis by endonuclease *PstI*, is also resistant to the cleavage by endonuclease *XphI*.