



УДК 577.152.314'14

© 1991 г.

И. Н. Соколов, М. А. Эльдаров*, Н. В. Анжейцева,
И. В. Карнычев*, О. Т. Самю, А. Б. Фицнер,
А. А. Калугин, Э. В. Хорошутина, Е. Г. Скрыбин*

VcoAI* — НОВАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА ИЗ *BACILLUS COAGULANS

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва;
* Инженерный центр «Биоинженерия» Института молекулярной биологии
им. В. А. Энгельгардта АН СССР, Москва

В толуольных лизатах из клеток *Bacillus coagulans* ВКМ В-732 обнаружена активность новой сайт-специфической эндонуклеазы — *VcoAI*. Рестриктаза *VcoAI*, не содержащая примесей неспецифических эндонуклеаз, экзонуклеаз и фосфатаз, была получена путем фракционирования бесклеточного экстракта в двухфазной системе полиэтиленгликоль — декстран и хроматографии на DEAE-сефарозе и фосфоцеллюлозе. Фермент имеет три участка узнавания на ДНК фага λ , но не гидролизует ДНК вируса SV40, плазмиды pBR322 и pUC19. Установлено, что рестриктаза *VcoAI* узнает на двунитевой ДНК нуклеотидную последовательность 5'САС↓GTG и расщепляет ее как указано стрелкой с образованием тупых концов. Такой результат свидетельствует об истинной изоизомерии рестриктаз *VcoAI* и *PmaCI* из *Pseudomonas maltophilia* С.

В настоящее время известно более 1100 сайт-специфических эндонуклеаз (рестриктазы II класса; КФ 3.1.23.X), около 150 из них прототипы [1]. Рестриктазы широко используются в структурных исследованиях ДНК, молекулярном клонировании, являются прекрасной моделью для изучения механизмов ДНК-белковых взаимодействий. Этим определяется неослабевающий интерес к поиску рестриктаз, особенно ферментов с новой специфичностью, обнаружению более продуктивных штаммов, образующих рестриктазы-изоизомеры, созданию эффективных способов выделения эндонуклеаз рестрикции. Проводимые в этом направлении исследования позволили нам выявить и охарактеризовать ряд рестриктаз, продуцируемых штаммами *Pseudomonas* и *Bacillus* [2—4].

Цель данной работы состояла в выделении очищенного препарата рестриктазы *VcoAI* и выяснении характера специфичности ее действия.

При электрофоретическом разделении в агарозном геле продуктов расщепления ДНК фага λ толуольными экстрактами из клеток *B. coagulans* было обнаружено образование дискретных фрагментов ДНК. Эндонуклеаза гидролизовала ДНК в присутствии лишь $MgCl_2$ и не требовала для активности S-аденозил-L-метионина и АТР. На основании этого эндонуклеаза *B. coagulans* была отнесена к рестриктазам II класса [5] и согласно номенклатуре ферментов рестрикции [6] обозначена как *VcoAI*.

Для выделения рестриктазы *VcoAI* была использована широко применяющаяся при очистке многих сайт-специфических эндонуклеаз схема, основанная на фракционировании бесклеточного экстракта в двухфазной системе полиэтиленгликоль — декстран [7]. В результате двух последующих этапов колоночной хроматографии на DEAE-сефарозе и фосфоцеллюлозе был получен препарат фермента, свободный от примесей фосфатаз, экзонуклеаз и неспецифических эндонуклеаз. Рестриктаза *VcoAI* стабильна при $-20^\circ C$ в течение не менее 6 мес. Фермент проявляет максимальную активность в диапазоне pH 7,5—8,0 и температуры 30—37° C в 50 mM трис-HCl-буфере с высокой ионной силой (100 mM NaCl) в присутствии 10 mM $MgCl_2$ и 10 mM 2-меркаптоэтанола.

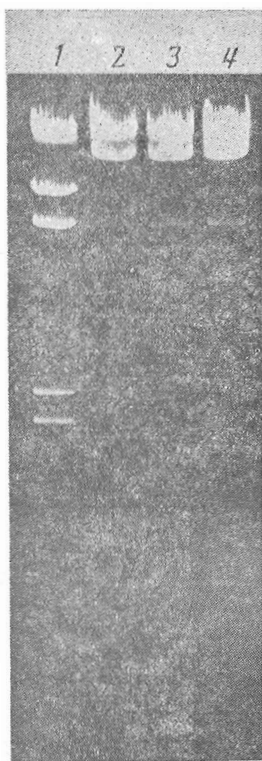


Рис. 1. Электрофоретическое разделение в 0,8% агарозном геле продуктов расщепления ДНК фага λ рестриктазами *Vco*AI (1), *Pma*CI (2), *Vco*AI + *Pma*CI (3), *Hind*III (4)

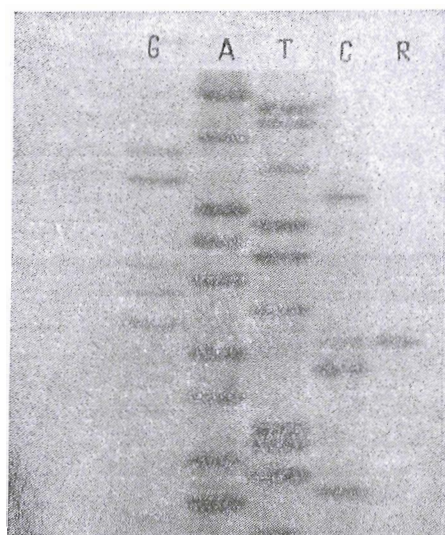


Рис. 2. Радиоавтограф 5% денатурирующего ПААГ, полученного при определении сайта рестриктазы *Vco*AI по методу Брауна — Смита [11]. G, A, T, C — треки реакций секвенирования, R — перевар продукта элонгации *Vco*AI

Электрофорез в агарозном геле продуктов гидролиза ДНК фага λ рестриктазой *Vco*AI позволил выявить четыре фрагмента ДНК с размерами порядка 26 500, 15 000, 6000 и 900 п. о. в сумме (48 400 п. о.) отвечающих размерам фаговой ДНК (48 502 п.о.) [8]. Фермент не имеет участков узнавания на ДНК вируса SV40, плазмид pBR322 и pUC19. Анализ табличных данных о числе сайтов узнавания известных рестриктаз на тестерных ДНК и размерах образующихся фрагментов на ДНК фага λ [1, 9] позволил предположить возможность изошизомерии рестриктаз *Vco*AI и *Pma*CI из *P. maltophilia* C [10]. Это согласуется с результатами комбинированного расщепления ДНК фага λ смесью рестриктаз *Vco*AI + *Pae*II, *Vco*AI + *Eco*RI и *Vco*AI + *Bam*HI. Число и размер фрагментов ДНК довольно точно совпадают с величинами, рассчитанными для рестриктазы *Pma*CI (таблица). Более того, при параллельном и комбинированном гидролизе ДНК фага λ рестриктазами *Vco*AI и *Pma*CI картина фрагментации ДНК была идентичной (рис. 1).

Рестриктаза *Pma*CI имеет участок узнавания SAC↓GTG и образует фрагменты с тупыми концами. Для подтверждения идентичности участков узнавания рестриктазами *Pma*CI и *Vco*AI и определения места расщепления субстрата эндонуклеазой *Vco*AI был использован метод Брауна и Смита [11], основанный на расщеплении продуктов элонгации, полученных на матрице, содержащей сайт эндонуклеазы, с помощью соответствующего праймера и Кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I. В качестве матрицы была использована двухцепочечная плазмидная ДНК, содержащая вставку с сайтом *Pma*CI в векторе pUC19 на расстоянии 80 п. о. от 3'-конца обратного праймера. Продукт элонгации после экстракции фенол-хлороформом и переосаждения этанолом (для удаления фрагмента Кленова) был расщеплен рестриктазой *Vco*AI и проанализирован в 5% денатурирующей

Сопоставление расчетных (Р) и экспериментальных (Э) данных о числе и размерах фрагментов ДНК (в п. о.), образующихся при комбинированном расщеплении ДНК фага λ рестриктазами *

№ фрагмента	<i>PmaCI</i>	<i>VcoAI</i>	<i>EcoRI+</i>		<i>PaeII+</i>		<i>BamHI+</i>	
			<i>PmaCI</i>	<i>VcoAI</i>	<i>PmaCI</i>	<i>VcoAI</i>	<i>PmaCI</i>	<i>VcoAI</i>
			Р	Э	Р	Э	Р	Э
1	26 529	26 450	21 226	21 150	19 397	19 200	16 841	16 600
2	14 953	15 100	7 421	7 499	8 271	8 320	6 983	7 079
3	6 140	6 085	5 218	5 248	7 132	7 079	6 527	6 607
4	880	891	4 878	4 860	6 140	6 178	6 140	6 096
5			3 530	3 549	5 088	5 070	5 505	5 495
6			2 610	2 630	1 594	1 586	4 183	4 205
7			2 314	2 349	880	872	1 443	1 448
8			880	890			630	616
9			425	—			250	—

* Размер самого крупного фрагмента (№ 1) определен вычитанием из длины молекулы ДНК фага λ (48 502 п. о.) суммарной длины всех этих фрагментов.

щем ПААГ параллельно с четырьмя стандартными реакциями секвенирования по Сэнгеру, полученными на той же матрице с помощью «обратного» праймера. Продукт гидролиза обладал той же подвижностью, что и продукт терминации по 3'-концевому С в последовательности САС ↓ GTG, указывая на то, что *VcoAI* образует фрагменты с тупыми концами (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что рестриктаза *VcoAI* является истинным изоизомером рестриктазы *PmaCI* и узнает последовательность САС ↓ GTG, расщепляя ее в месте, указанном стрелкой.

Экспериментальная часть

Бактериальная культура *B. coagulans* ВКМ В-732 была получена из Всесоюзной коллекции непатогенных микроорганизмов АН СССР. Культуру выращивали на среде Хоттингера в аэробных условиях при 37° С до поздней логарифмической фазы. Биомассу замораживали и хранили при -20° С.

ДНК фага λ CI1857S7 выделяли как описано ранее [12]. Рестриктазы *PaeII* (*SmaI*), *EcoRI*, *BamHI*, *AluI*, получали по разработанным методам [3, 13—15]. Плазмиды pBR322, pUC19, ДНК вируса SV40, рестриктазы *ClaI*, *PvuII*, *PmaCI* любезно предоставлены В. В. Буткусом (НПО «Фермент», Вильнюс). При определении размеров *VcoAI*-фрагментов различных ДНК в качестве стандартов использовали рестриктазные гидролизаты ДНК фага λ и плазмиды pBR322.

Активность рестриктаз определяли в оптимальных условиях инкубационной смеси [16]. Продукты гидролиза ДНК анализировали электрофорезом в агарозном геле, как описано в работах [2, 3, 15]. За 1 ед. акт. рестриктаз принимали количество, необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК фага λ за 1 ч при 37° С.

Выделение рестриктазы *VcoAI*. Биомассу *B. coagulans* (15 г) суспендировали в 30 мл буфера А (10 мМ калий-фосфат (рН 7,4), 0,1 мМ EDTA, 1 мМ NaN_3 и 100 мкг/мл фенолметилсульфонилфторида), озвучивали (8 × 15 с) на ультразвуковом дезинтеграторе мощностью 150 Вт (МЕ, Англия) при температуре от 2 до 4° С и центрифугировали (105 000 g, 1 ч). К надосадочной жидкости добавляли NaCl до конечной концентрации 0,5 М и полимерную систему полиэтиленгликоль-6000 — декстран Т500 [7]. Смесь встряхивали и центрифугировали (10 000 g, 20 мин). Верхнюю фазу (80% супернатанта) диализовали в течение ночи против буфера В (буфер А + 10% глицерина) и наносили со скоростью 50 мл/ч на колонку (1,5 × 30 см) с DEAE-сефарозой CL-6B (Pharmacia-LKB, Швеция), уравновешенной буфером Б. Белки элюировали в линейном градиенте концентрации KCl (0,1 — 1 М, 500 мл) со скоростью 50 мл/ч, собирая фракции по

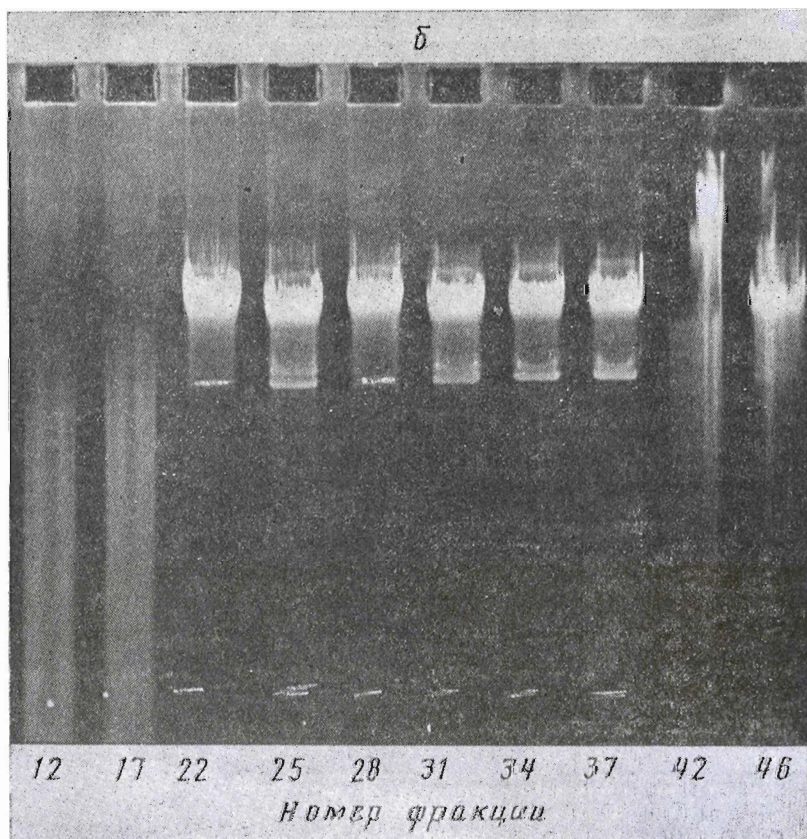
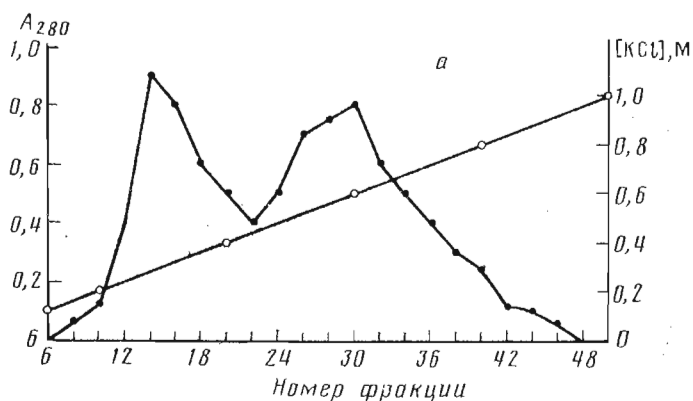


Рис. 3. Выделение рестриктазы *Vco*AI хроматографией на DEAE-сефарозе С 6В; контроль по поглощению (а) и по активности (б). Для определения ферментативной активности во фракциях аликвоту (10 мкл) соответствующей фракции инкубировали (37° С, 60 мин) с 1 мкг ДНК фага λ, продукты ферментализа анализировали электрофоретически по [16]

10 мл. Фермент элюировался при концентрации КСl в рабочем буфере 0,4—0,8 М (рис. 3). Фракции, содержащие *Vco*AI, объединяли, разбавляли в 4 раза буфером Б и наносили со скоростью 10 мл/ч на колонку (0,9 × 15 см) с фосфоцеллюлозой Р11 (Whatman, Англия), уравновешенной буфером Б. Элюцию белков проводили линейным градиентом КСl (0 — 1,0 М). Объем градиента и фракций составлял соответственно 120 и 4 мл. Фракции с активностью рестриктазы *Vco*AI (0,6—0,8 М КСl) объединяли и диализовали против буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 0,1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 50 мМ КСl, 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина

и 50% глицерина (по объему). Выход рестриктазы *BcoAI* составил около 1000 ед. акт. на 1 г микробной массы.

Секвенирование сайта расщепления BcoAI. В качестве матрицы использовали 1 пмоль плазмидной ДНК, выделенной по методу [17]. После денатурации и отжига матрицы с праймером применяли методику «квазiterминального» мечения [18]. Аликвоту (1/10) инкубационной смеси использовали для получения продукта элонгации в присутствии раствора «чейз» (0,125 мМ каждый dNTP) и ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова), а оставшиеся $9/10$ — для реакций дидезоксисеквенирования. На 5% денатурирующий ПААГ наносили $1/2$ секвенирующих смесей и $1/10$ перевара продукта элонгации (после удаления фрагмента Кленова) рестриктазой *BcoAI*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roberts R. J. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. Suppl. P. r 271—r313.
2. Sokolov N. N., Fitzner A. B., Anikeitcheva N. V., Choroshoutina E. B., Samko O. T., Kolosha V. O., Fodor I., Votrin I. // Молек. Biol. Rep. 1985. V. 10. P. 159—161.
3. Соколов Н. Н., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В., Самко О. Т., Хорошутина Э. Б., Колоша В. О., Фодор И. // Биотехнология. 1987. Т. 3. № 5. С. 578—584.
4. Соколов Н. Н., Аникейчева Н. В., Фицнер А. Б., Самко О. Т., Хорошутина Э. Б., Калугин А. А. // Журн. микробиол. 1988. № 9. С. 86—89.
5. Boyer H. W. // Ann. Rev. Microbiol. 1971. V. 25. № 1. P. 153—176.
6. Smith H. O., Nathans D. // J. Mol. Biol. 1973. V. 81. № 3. P. 419—423.
7. Schleif R. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. Part 1. P. 19—23.
8. Daniels D., Sanger F., Coulson A. R. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1983. V. 47. P. 1009—1024.
9. Kessler C., Holtke H.-J. // Gene. 1986. V. 47. P. 1—153.
10. Walker J. N. B., Dean P. D. C., Saunders J. R. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 3. P. 1293—1301.
11. Brown N. L., Smith M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 391—404.
12. Соколов Н. Н., Вотрин И. И., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В. // Биохимия. 1978. Т. 43. № 5. С. 865—871.
13. Соколов Н. Н., Вотрин И. И., Фицнер А. Б., Кирсанова И. Д. // Вопр. мед. химия. 1980. Т. 26. № 4. С. 568—571.
14. Вотрин И. И., Ходарев Н. Н., Баслакьян А. Г., Соколов Н. Н., Фицнер А. Б., Александрова С. С. // Вестн. АМН СССР. 1981. № 2. С. 59—64.
15. Соколов Н. Н., Колоша В. О., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В., Хорошутина Э. Б., Самко О. Т., Фодор И. И., Вотрин И. И. // Молек. генетика. 1986. № 5. С. 24—26.
16. New England Biolabs. Catalog 1988/1989.
17. Hattori M., Sakaki Y. // Anal. Biochem. 1986. V. 152. № 2. P. 232—238.
18. Красе А. С., Миронов В. Н. // Молекуляр. биология. 1990. Т. 24. № 4. С. 1095—1099.

Поступила в редакцию
21.XI.1990

N. N. SOKOLOV, M. A. EL DAROV *, N. V. ANIKEITCHOVA, I. V. KARPUSHEV *,
O. T. SAMKO, A. B. FITZNER, A. A. KALUGIN, E. B. CHOROSHOUTINA,
K. G. SKRYABIN *

BcoAI, A NEW SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE FROM *BACILLUS COAGULANS*

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR,
Moscow;

* Centre «Bioengineering», V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow

A new site-specific endonuclease was detected in toluene lysates of *Bacillus coagulans* AUCM B-732 and designated as *BcoAI*. The enzyme was purified by fractionation of the cell-free extract in the two-phase PEG/dextran system followed by chromatography on DEAE-sepharose and phosphocellulose and shown to be free of nonspecific nucleases and phosphatases. *BcoAI* has three cleavage sites on λ DNA, but does not cleave SV40, pBR322 and pUC19 DNA. *BcoAI* recognizes the sequence 5' CAC ↓ GTG 3' on double-stranded DNA and cleaves it as indicated by the arrow to yield blunt-ended DNA fragments. Thus, *BcoAI* is a true isoschizomer of *PmaCI* from *Pseudomonas maltophilia* C.