



УДК 577.152.31'214'14

© 1994 О. Т. Самко, А. А. Калугин, М. А. Эльдаров*,
И. В. Карнычев*, Н. В. Аникейчева, Э. Б. Хорошутина, К. Г. Скрыбин*,
Г. И. Либрик, Н. Н. Соколов

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ РЕСТРИКТАЗ *VciVI* И *VciVII*, ПРОДУЦИРУЕМЫХ *Bacillus circulans*

Институт биомедицинской химии РАН, Москва;

*Инженерный центр «Биоинженерия» Института молекулярной биологии
им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

Ключевые слова: рестриктазы, специфичность.

В клетках *Bacillus circulans* обнаружена активность двух новых сайт-специфических эндонуклеаз, обозначенных как *VciVI* и *VciVII*. Для выделения рестриктаз бесклеточный экстракт обрабатывали полиэтиленимином, проводили фракционирование сернокислым аммонием (40—80% насыщения), хроматографию на DEAE-сефарозе, голубой сефарозе и фосфоцеллюлозе. Рестриктазы удалось разделить лишь на последнем этапе очистки — хроматографии на фосфоцеллюлозе (зоны элюции ферментов соответственно 0,4—0,5 и 0,7—0,9 М KCl).

Выход рестриктаз составил соответственно 600 и 10 000 ед. акт. на 1 г микробной массы. Установлено, что эндонуклеазы рестрикции *VciVI* и *VciVII* являются изошизомерами соответственно рестриктаз *ClaI* и *BstNI*.

Несмотря на внушительное количество обнаруженных и охарактеризованных за последние годы сайт-специфических эндонуклеаз (рестриктазы II класса; КФ 3.1.21.4) [1], поиск новых ферментов рестрикции продолжается, что имеет целью прежде всего получение новых инструментов исследования для генетической инженерии и молекулярной биологии.

Ранее нами был выявлен ряд продуцентов новых рестриктаз среди микроорганизмов родов *Pseudomonas* [2, 3], *Bacillus* [4—7], *Lactobacillus*, *Achromobacter* [8] и др., получены очищенные препараты ферментов, проведена биохимическая характеристика и установлена специфичность их действия.

В настоящей работе описаны обнаружение, выделение, некоторые свойства и идентификация двух новых рестриктаз *B. circulans*. Предварительное сообщение об одном из этих ферментов опубликовано ранее [9].

С помощью толуольного экспресс-метода [10], используемого нами для поиска сайт-специфических эндонуклеаз у микроорганизмов, было обнаружено, что толуольные экстракты из клеток *B. circulans* расщепляют ДНК фага λ на большое число дискретных фрагментов. Для выделения рестриктазы была использована следующая последовательность стадий очистки: разрушение клеток ультразвуком,

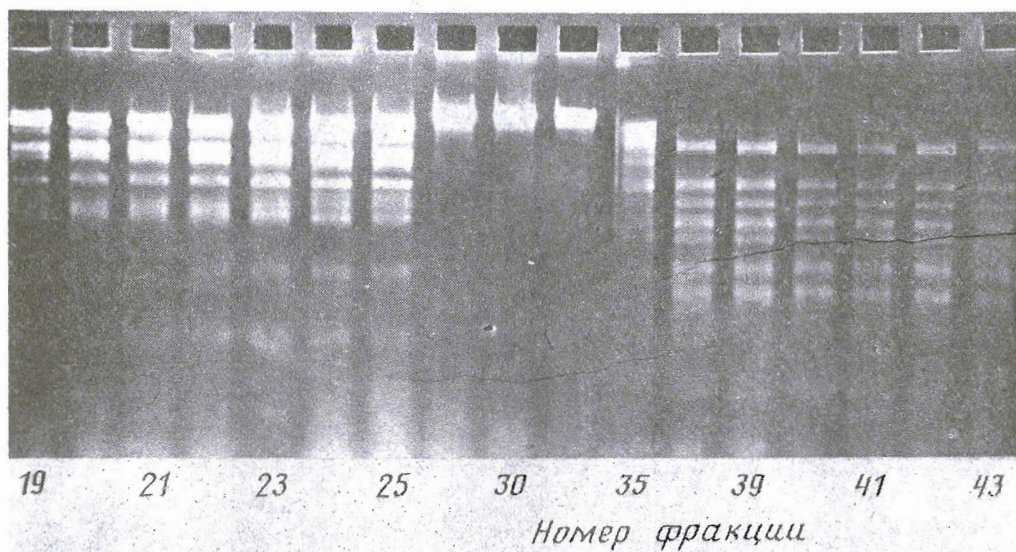


Рис. 1. Расщепление ДНК фага λ фракциями, полученными при хроматографии на фосфоцеллюлозе. Аликвоты фракций (5 мкл) инкубировали с ДНК фага λ (1,5 мкг; 37° С, 60 мин) и продукты гидролиза ДНК анализировали в 1,2% агарозном геле

осаждение нуклеиновых кислот полиэтиленимином, фракционирование сернокислым аммонием, хроматография на DEAE-сефарозе и голубой сефарозе. После проведения второго этапа колоночной хроматографии в препарате фермента присутствовала незначительная примесь неспецифических нуклеаз, для удаления которой мы применили хроматографию на фосфоцеллюлозе. Оказалось, что во фракциях линейного градиента KCl с фосфоцеллюлозы присутствуют два четко разделяющихся пика рестриктазной активности (зоны элюции ферментов 0,4—0,5 и 0,7—0,9 M KCl), различающихся по картине специфической фрагментации ДНК фага λ (рис. 1). Оба фермента были свободны от примесей экзонуклеаз и неспецифических эндонуклеаз. Рестриктазы требовали в качестве кофактора лишь $MgCl_2$, расщепление ДНК протекало в отсутствие АТФ и S-аденозил-L-метионина. В соответствии с классификацией ферментов рестрикции [11] специфические эндонуклеазы были отнесены к рестриктазам II класса и обозначены по общепринятой номенклатуре [12] соответственно как *VciVI* и *VciVII*.

Эндонуклеазы рестрикции *VciVI* и *VciVII* проявляют максимальную активность при температуре соответственно 30—37° и 25—30° С в интервале pH среды 7—8 и 7,4—7,8; концентрации $MgCl_2$, 2,5—5 и 8—12 мМ. Другие условия, оптимальные для определения активности обоих ферментов: 50 мМ трис-HCl-буфер, 100 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреит и 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина. Рестриктаза *VciVII* неактивна при замене ионов Mg^{2+} на Mn^{2+} , гидролизует ДНК фага λ при использовании в качестве кофактора ионов Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} (0,01—1 мМ), Ca^{2+} (0,1 мМ), однако в присутствии этих катионов полного расщепления ДНК не происходит.

Электрофоретический анализ картины гидролиза рестриктазой *VciVI* некоторых ДНК с известной первичной структурой показал, что фермент имеет один участок узнавания на плазмиде pBR322, не гидролизует плазмиду pUC19 и расщепляет ДНК фага λ более чем по 14 сайтам, причем размер и распределение образуемых на этой ДНК фрагментов были близки к таковому для эндонуклеазы рестрикции *ClaI*. Результаты опытов по совместному гидролизу плазмиды pBR322 рестриктазой *VciVI* и ферментами, имеющими единственный участок узнавания на плазмиде

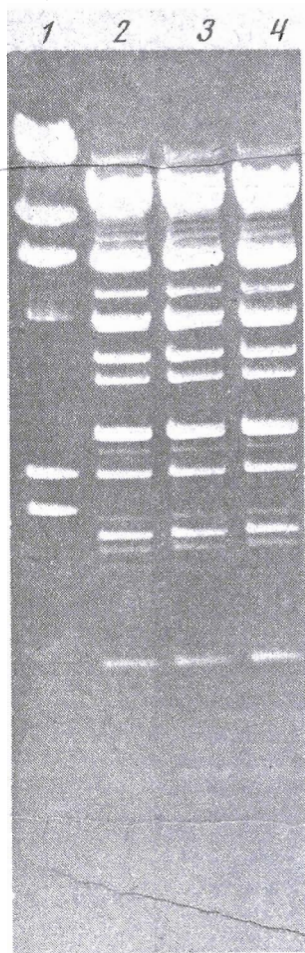


Рис. 2. Электрофоретическое разделение в 1% агарозном геле продуктов расщепления ДНК фага λ рестриктазами: *HindIII* (1), *BciVI* (2), *ClaI* (3), *BciVI* + *ClaI* (4)

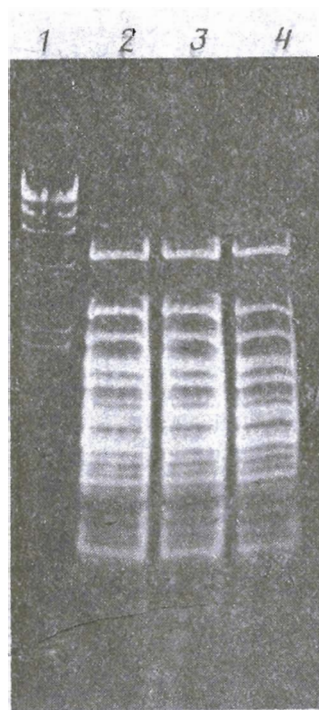


Рис. 3. Электрофоретическое разделение в 1% агарозном геле продуктов расщепления ДНК фага λ рестриктазами: *HindIII* (1), *BstNI* (2), *BsaBI* (3), *BstNI* + *BciVII* (4)

(*BamHI*, *PaeI*, *PvuII*, *PstI*), экспериментов по независимому и параллельному гидролизу ДНК фага λ рестриктазами *BciVI* и *ClaI* (рис. 2) однозначно указывают на то, что эндонуклеаза рестрикции *BciVI* представляет собой изоизомер рестриктазы *ClaI* [13].

Ранее нами был обнаружен, выделен и идентифицирован ряд рестриктаз со специфичностью *ClaI* (*LplI*, *LagI*, *BbvAPI*, *BspJII* [8]). Учитывая это, нам представлялось целесообразным прежде всего изучить специфичность, включая секвенирование участка узнавания, именно второй эндонуклеазы рестрикции *B. circulans*.

Рестриктаза *BciVII* расщепляет ДНК фага λ более чем по 30 участкам и имеет не менее четырех и пяти сайтов узнавания на плаزمидях соответственно рUC19 и рBR322. Анализ табличных данных относительно размеров и числа фрагментов, образуемых на плазмидях рUC19 и рBR322 известными рестриктазами, с одной стороны, и *BciVII* — с другой, показал, что эндонуклеаза *BciVII* может представлять собой изоизомер рестриктазы *BstNI*. Об изоизомерии

Сопоставление расчетных (Р) и экспериментальных (Э) данных о числе и размерах фрагментов ДНК (в п. о.), образующихся при расщеплении плазмид рUC19 и рBR322 рестриктазами

Номер фрагмента	рUC19		рBR322	
	<i>Bst</i> NI	<i>Bci</i> II	<i>Bst</i> NI	<i>Bci</i> II
	Р	Э	Р	Э
1	2073	2042	1856	1788
2	288	276	1060	1047
3	191	205	929	933
4	121	128	383	402
5	13	— *	121	131
6			13	— *

* Фрагмент не выявляется при электрофорезе в 2% агарозном геле.

эндонуклеаз *Bci*II и *Bst*NI свидетельствует и идентичность картины расщепления ДНК фага λ при независимом и совместном гидролизе рестриктазами *Bci*II и *Bst*NI (рис. 3).

Для подтверждения идентичности участков узнавания рестриктаз *Bst*NI и *Bci*II и определения места расщепления субстрата эндонуклеазой *Bci*II был использован метод Брауна и Смита [14], основанный на расщеплении продуктов элонгации, полученных на матрице, содержащей сайт рестрикции, с помощью соответствующего праймера. Вместо кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I была использована ДНК-полимераза фага T7 («секвеназа») [15]. В качестве матрицы была использована одноцепочечная ДНК фага M13mp19, содержащая сайт *Bci*II на расстоянии 50 п. о. от 3'-конца «гибридизационного» праймера. Продукт элонгации после инактивации «секвеназы» расщепляли рестриктазой *Bci*II, часть полученной смеси обрабатывали ДНК-полимеразой T4 в присутствии всех четырех dNTP и оба образца анализировали в 5% денатурирующем ПААГ параллельно с четырьмя стандартными реакциями секвенирования по Сэнгеру, полученными на той же матрице с помощью «гибридизационного» праймера. Как видно из рис. 4, рестриктаза *Bci*II узнает последовательность $CC\downarrow(AT)GG$, расщепляя ее в месте, указанном стрелкой, и таким образом является истинным изошизомером эндонуклеазы рестрикции *Bst*NI [1].

Экспериментальная часть

Бактериальная культура *B. circulans* ВКМ В-1242 была получена из ВКМ РАН. Культивирование штамма проводили в бульоне Хоттингера при 37° С до поздней логарифмической фазы роста. Клетки собирали сепарированием, биомассу замораживали и хранили при -20° С.

В работе использовали рестриктазы *Pvu*II, *Mva*I (*Bst*NI), *Hind*III, *Eco*RY, T4-ДНК-полимеразу, секвеназу (НПО «Фермент», Вильнюс). Рестриктазы *Bam*HI, *Pae*I, *Cla*I, *Pst*I, *Ava*II, *Alu*I, ДНК фага λ CI 1857 з7 выделены как описано ранее [2, 16--18]. Плазмиды рUC19 и рBR322 любезно предоставлены А. Г. Баснакьяном (ИБМХ РАМН). Одноцепочечную ДНК фага M13mp19 выделяли по стандартной методике [19]. DEAE-сефароза CL-6B, голубая сефароза CL-6B — препараты фирмы Pharmacia (Швеция), фосфоцеллюлоза P11 — препарат фирмы Whatman (Англия).

Электрофорез ДНК в агарозных и акриламидных гелях проводили как описано



Рис. 4. Секвенирование сайта расщепления рестриктазы *VciVII*. Электрофореграмма (в 5% денатурирующем ПААГ) продуктов стандартных реакций секвенирования по Сэнгеру (A, G, C, T) ДНК M13mp19 от «гибридизационного» праймера; (-) — *VciVII*-фрагмент продукта достройки той же матрицы с тем же праймером; (+) — тот же продукт после достройки T4-ДНК-полимеразой в присутствии четырех dNTP

в работе [20]. При определении размеров фрагментов ДНК в качестве стандартов использовали рестриктазные гидролизаты ДНК фага λ и плазмиды pBR322.

Активность эндонуклеаз рестрикции определяли в оптимальных условиях инкубационной смеси [21]. За 1 ед. акт. рестриктаз принимали количество фермента, полностью гидролизующее 1 мкг ДНК фага λ за 1 ч при оптимальных условиях.

Выделение рестриктаз VciVI и VciVII. 20 г биомассы *B. circulans* суспендировали в 40 мл буфера А (10 мМ калий-фосфат (рН 7,5), 0,1 мМ EDTA, 1 мМ азид Na, 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 100 мкг/мл фенолметилсульфонилфторида) и разрушали (10×15 с) ультразвуком на дезинтеграторе мощностью 150 Вт (MSE, Англия) при 2—4° С. Клеточные стенки и неразрушенные клетки удаляли центрифугированием (105 000 г, 60 мин), к супернатанту добавляли NaCl до конечной концентрации 0,2 М и 1% полиэтиленимина, раствор перемешивали на магнитной мешалке (10—15 мин) и осадок удаляли центрифугированием (15 000 г, 20 мин). К надосадочной жидкости добавляли сухой серноокислый аммоний, собирая фракцию, осаждающуюся при насыщении 40—80%. Осадок отделяли центрифугированием (30 000 г, 20 мин), растворяли в буфере А и диализовали в течение ночи против буфера Б (10 мМ калий-фосфат (рН 7,5), 0,1 мМ EDTA, 7 мМ 2-меркаптоэтанол и 10% глицерина). Диализат наносили на колонку (1,5×40 см) с DEAE-сефарозой, уравновешенную буфером Б. Элюцию белков проводили линейным градиентом 0—1 М KCl (объем градиента и фракций соответственно 500 и 10 мл). Фракции с рестриктазной активностью (0,4—0,6 М KCl) объединяли, разбавляли в 2 раза буфером Б и наносили на колонку (0,9×30 см) с голубой сефарозой. Белки элюировали линейным градиентом концентрации KCl в буфере Б (0—1 М; 200 мл), собирая фракции по 4 мл. Рестриктазная активность присутствовала во фракциях градиента с концентрацией KCl от 0,4 до 0,7 М. Материал, обладающий сайт-специфической эндонуклеазной активностью, наносили на колонку (0,9×20 см) с фосфоцеллюлозой и проводили элюцию белков линейным градиентом 0—1 М KCl (120 мл) в буфере Б, собирая фракции по 2,4 мл. Во фракциях 19—25 и 38—43 (0,4—0,5 и 0,7—0,9 М KCl) (рис. 1) определялись два пика рестриктазной активности (соответственно эндонуклеазы *VciVI* и *VciVII*). Активные фракции объединяли и диализовали в течение ночи против 10 мМ трис-HCl-буфера (рН 8,0), содержавшего 0,1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина и 50% глицерина (по объему). Выход

рестриктаз *VciVI* и *VciVII* составил соответственно 600 и 10 000 ед. акт. на 1 г микробной массы. Ферменты были стабильны при хранении в течение не менее 4—6 мес при -20°C .

Секвенирование сайта расщепления VciVII. В качестве матрицы использовали 1 пмоль одноцепочечной ДНК фага M13mp19. После денатурации и отжига матрицы с праймером добавляли смесь для «квазитерминального» мечения и T7-полимеразу («секвеназу») как описано в работе [15]. Основную часть инкубационной смеси (8/10) применяли для постановки реакций дидезоксисеквенирования, а к оставшейся части добавляли раствор «чейз» (сумма dNTP, каждый 0,25 мМ) и инкубировали 5 мин при 20°C . Затем смесь прогревали до 80°C и медленно охлаждали (30 мин) до комнатной температуры. Объем смеси доводили до 10 мкл буфером для рестриктазы *VciVII*, гидролизovali 1 ед. акт. *VciVII* в течение 15 мин при 30°C , далее смесь (–) разделяли на две аликвоты по 5 мкл и в одну из аликвот добавляли T4-ДНК-полимеразу и четыре dNTP (+). На 5% денатурирующий ПААГ наносили $1/2$ из секвенирующих смесей и по $1/10$ из смесей (–) и (+) (см. рис. 4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roberts R. J. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. № 13. P. 3125—3137.
2. Sokolov N. N., Fitzner A. B., Anikeitcheva N. V., Khoroshoutina E. B., Samko O. T., Kolosha V. O., Fodor I., Votrin I. I. // Mol. Biol. Rep. 1985. V. 10. P. 159—161.
3. Соколов Н. Н., Колоша В. О., Фицнер А. Б., Анিকেичева Н. В., Хорошутина Э. Б., Самко О. Т., Фодор И. И., Вотрин И. И. // Молекулярн. генетика. 1986. № 5. С. 24—26.
4. Соколов Н. Н., Эльдаров М. А., Анিকেичева Н. В., Карпычев И. В., Самко О. Т., Фицнер А. Б., Калугин А. А., Хорошутина Э. Б., Скрябин К. Г. // Биоорг. химия. 1991. Т. 17. № 9. С. 1188—1192.
5. Соколов Н. Н., Эльдаров М. А., Анিকেичева Н. В., Карпычев И. В., Самко О. Т., Фицнер А. Б., Калугин А. А., Хорошутина Э. Б., Скрябин К. Г. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. № 1. С. 47—51.
6. Sokolov N. N., Fitzner A. B., Eldarov M. A., Anikeitcheva N. V., Kalugin A. A., Samko O. T., Khoroshoutina E. B., Fodor I. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 11. P. 2879.
7. Eldarov M. A., Karpichev I. V., Samko O. T., Anikeitcheva N. V., Kalugin A. A., Khoroshoutina E. B., Sokolov N. N. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 11. P. 2898.
8. Соколов Н. Н., Манялене З. П., Буткус В. В., Фицнер А. Б., Хорошутина Э. Б., Калугин А. А., Янудайтис А. А. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 8. С. 1040—1044.
9. Eldarov M. A., Karpichev I. V., Samko O. T., Anikeitcheva N. V., Kalugin A. A., Khoroshoutina E. B., Sokolov N. N. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 11. P. 2896.
10. Соколов Н. Н., Фицнер А. Б., Хорошутина Э. Б., Хейслере М. Я. // Биол. эксперим. биологии и медицины. 1984. Т. 97. № 2. С. 163—165.
11. Boyer H. W. // Ann. Rev. Microbiol. 1971. V. 25. № 1. P. 153—176.
12. Smith H. O., Nathans D. // J. Mol. Biol. 1973. V. 81. № 3. P. 419—423.
13. Mayer H., Grosschedel R., Shutte H., Hobom G. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 19. P. 4833—4855.
14. Brown N. L., Smith M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 391—404.
15. Tabor S., Richardson C. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 4076—4080.
16. Соколов Н. Н., Вотрин И. И., Фицнер А. Б., Анিকেичева Н. В. // Биохимия. 1978. Т. 43. № 5. С. 865—871.
17. Соколов Н. Н., Вотрин И. И., Фицнер А. Б., Кирсанова И. Д. // Вopr. мед. химии. 1980. Т. 26. № 4. С. 568—571.
18. Вотрин И. И., Ходарев Н. Н., Баснакьян А. Г., Соколов Н. Н., Фицнер А. Б., Александрова С. С. // Вестн. АМН СССР. 1981. № 2. С. 59—64.
19. Messing J. // Meth. Enzymol. 1983. V. 101. P. 20—78.
20. Маннатис Г., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 110.
21. New England Biolabs. Catalogue 1988/1989.

Поступила в редакцию
22.XII.1993

O. T. Samko, A. A. Kalugin, M. A. Eldarov*, I. V. Karpychev*,
N. V. Anikeitcheva, E. B. Khoroshutina, K. G. Skryabin*,
G. I. Librik, N. N. Sokolov

ISOLATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NEW
SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASES *Bci*BI AND *Bci*BII PRODUCED
BY *Bacillus circulans*

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;
* Centre «Bioengineering», V. A. Engelhardt Institute of
Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Key words: restriction endonucleases, specificity.

New site-specific endonucleases *Bci*BI and *Bci*BII have been detected in *Bacillus circulans*. The enzymes were purified by fractionation of cell-free extract with polyethylene imine and ammonium sulphate (40–80% of saturation) followed by chromatography on DEAE-sepharose, blue-sepharose and phosphocellulose. The endonucleases *Bci*BI and *Bci*BII were separated only at the final step of the purification — by chromatography on the phosphocellulose column. The yields of *Bci*BI and *Bci*BII were 600 and 10 000 U/g of cells. It was found that restriction endonucleases *Bci*BI and *Bci*BII are isoschizomers of *Cla*I and *Bst*NI, respectively.

Address for correspondence: N. N. Sokolov, Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaia, 10, Moscow, 119832.