



УДК 577.152.312\*14'14

© 1994 Н. Н. Соколов, О. Т. Самко, Н. В. Аникейчева,  
А. А. Калугин, Э. Б. Хорошутина, О. В. Плуталов\*, К. Р. Бирих\*,  
Ю. А. Берлин\*

## НОВЫЕ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ ИЗ ШТАММОВ *Bacillus*

Институт биомедицинской химии РАМН, Москва;

\* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Ключевые слова: эндонуклеазы рестрикции, штаммы *Bacillus*, синтетические олигонуклеотиды, сайты рестрикции.

В ходе поиска новых рестриктаз типа II среди 40 бактериальных штаммов рода *Bacillus* обнаружены два штамма, продуцирующие ферменты с сайт-специфической эндонуклеазной активностью. Выделены и охарактеризованы эндонуклеазы *BbvAIII* (из *B. brevis* ВКМ В-677) и *BspFI* (из *B. species* F). Установлено, что эндонуклеаза *BbvAIII* является истинным изошизомером эндонуклеазы рестрикции *BspMII* (*Kpn2I*), а *BspFI*, способная расщеплять *dam*-метилованные ДНК, представляет собой истинный изошизомер *Sau3AI*.

Интерес к поиску новых рестриктаз типа II (КФ 3.1.21.4), сохраняющийся на протяжении более чем 20 лет, связан с их широким использованием в структурных и молекулярно-генетических исследованиях ДНК и нуклеиново-белковых взаимодействий [1, 2]. Ранее мы сообщили об обнаружении и выделении новых рестриктаз из ряда штаммов *Bacillus* [3, 4]. Цель настоящей работы состояла в выделении и идентификации эндонуклеаз из *B. brevis* и *B. species*.

Наличие специфической эндонуклеазной активности у изученных нами 40 штаммов *Bacillus* выяснялось путем электрофоретического разделения в агарозном геле продуктов расщепления ДНК фага  $\lambda$  толуольными экстрактами из клеток соответствующих микроорганизмов с использованием ранее разработанного нами метода [5]. В результате у двух штаммов были обнаружены эндонуклеазы, полностью гидролизующие ДНК-субстрат и требующие для проявления активности лишь ионы магния. Эти ферменты были отнесены к рестриктазам типа II и обозначены в соответствии с принятой номенклатурой [6].

Присутствие в клетках *B. brevis* ВКМ В-677 нескольких рестриктазных активностей было выявлено при хроматографии на DEAE-целлюлозе клеточных экстрактов, предварительно освобожденных от нуклеиновых кислот путем осаждения полиэтиленимином и затем фракционированных с помощью сернокислого аммония (таблица). Первая порция эндонуклеазной активности, присутствовавшая

Адрес для переписки: Москва, 119121, Погодинская ул., 10, Институт биомедицинской химии РАМН, Н. Н. Соколову.

Рестриктаза	Последовательные стадии хроматографии *	
	I	II
<i>BbvAI</i>	DEAE-целлюлоза (1,5 × 30 см), буфер Б, активность в несорбированном материале	ГПС (1,0 × 15 см), буфер Б, 0—1 М КСl, 150 мл, 0,5—0,7 М КСl
<i>BbvAII</i>	DEAE-целлюлоза (1,5 × 30 см), буфер Б, 0—0,6 М КСl, 500 мл, 0,15—0,3 М КСl	** ГС (1 × 9 см), буфер Б, 0—1 М КСl, 100 мл, 0,5—0,7 М КСl ГС (0,9 × 15 см), буфер Б, 0—1 М КСl, 150 мл, 0,25—0,4 М КСl
<i>BbvAIII</i> <i>BspFI</i>	Аналогично <i>BbvAII</i> , 0,15—0,3 М КСl DEAE-сефароза (1,5 × 25 см), буфер Б, 0—0,8 М КСl, 450 мл, 0,3—0,5 М КСl	Аналогично <i>BbvAII</i> , 0,55—0,7 М КСl ФЦ (0,9 × 15 см), буфер Б, 0—1 М КСl, 100 мл, 0,4—0,6 М КСl

\* ГС — голубая сефароза, ГПС — гепарин-сефароза, ФЦ — фосфоцеллюлоза. Последовательно указаны сорбент, размер колонки, интервал концентраций соли в элюенте (линейный градиент), объем градиента, интервал концентраций соли, в котором элюируется рестриктаза.

\*\* Дополнительная стадия очистки *BbvAI*.

в не сорбированном на DEAE-целлюлозе материале, была далее очищена хроматографией на гепарин-сефарозе и голубой сефарозе. В результате была выделена эндонуклеаза, обозначенная *BbvAI*. Вторая порция активности элюировалась с анионита при концентрации КСl 0,15—0,30 М. При ее рехроматографии на голубой сефарозе были выделены две эндонуклеазы, элюировавшиеся при концентрациях КСl 0,20—0,40 и 0,55—0,70 М и различающиеся по картине фрагментации ДНК фага λ (рис. 1); эти ферменты были обозначены соответственно *BbvAII* и *BbvAIII*. В данной работе охарактеризована одна из трех сайт-специфических эндонуклеаз *B. brevis* — *BbvAIII*. Она была получена с выходом около 300 ед. акт./г биомассы. Удельная активность составила около 4000 ед. акт./мл. Фермент проявляет максимальную активность при 30—37° С и рН 7,3—7,8 в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl, 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит и 100 мкг/мл BSA, и сохраняет ее при хранении в течение года при —20° С. О степени функциональной чистоты фермента судили по идентичности фрагментации λ ДНК (1 мкг), инкубированной в стандартных условиях в течение 1 ч с 1 ед. акт. фермента или в течение 16 ч с его 40—50-кратным избытком (отсутствие примесей неспецифических эндонуклеаз), а также по приводимым ниже результатам расщепления 5'-<sup>32</sup>P-меченых олигонуклотидов (отсутствие примесей экзонуклеаз и фосфатаз).

Сравнение картины фрагментации ДНК фага λ рестриктазой *BbvAIII* с набором подобных электрофореграмм, смоделированных с помощью компьютера для различных эндонуклеаз рестрикции [7], показало, что *BbvAIII* сходна с эндонуклеазой *BspMII*. Действительно, картины распределения фрагментов ДНК фага λ при комбинированном и параллельном гидролизе *BbvAIII* и *Kpn2I* (изошизомером *BspMII* [13]) оказались практически неразличимыми (рис. 2).

Единственный *BbvAIII*-сайт на плазмиде pBR322 был локализован между нуклеотидными звеньями 1650 и 1700 (нумерация по часовой стрелке от *EcoRI*-сайта) с помощью комбинированного гидролиза этой ДНК исследуемым ферментом и одной из эндонуклеаз рестрикции (*EcoRI*, *BamHI*, *PaeI* (*SpaI*), *PvuII*), вносящих в pBR322 один разрыв, положение которого в каждом случае известно [7]. Оказалось, что в этом сегменте расположена гексануклеотидная палиндромная последовательность TCCGGA (звенья 1663—1668), являющаяся *BspMII*-сайтом. Еще один довод в пользу изошизомерии рестриктаз *BspMII* и *BbvAIII* был получен в результате совместного расщепления плазмиды pBR322 эндонуклеазами *BbvAIII*

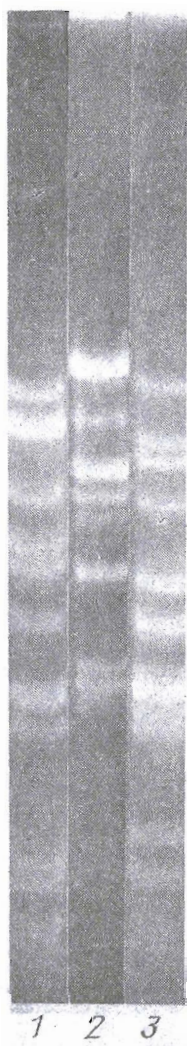


Рис. 1. Расщепление ДНК фага  $\lambda$  рестриктазами *B. brevis* *Bbv*AI (1), *Bbv*AII (2), *Bbv*AIII (3) после заключительного этапа очистки на голубой сепарозе (электрофорез в 1% агарозном геле)

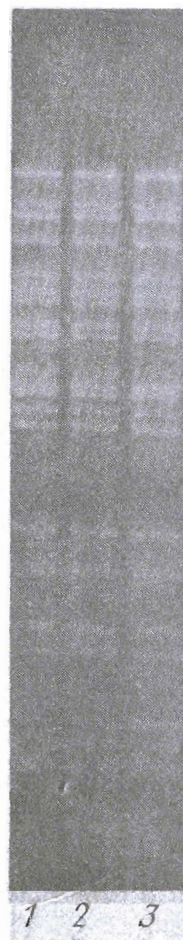


Рис. 2. Раздельное и совместное расщепление ДНК фага  $\lambda$  рестриктазами *Bbv*AIII (1), *Kpn*2I (2), *Bbv*AIII + *Kpn*2I (3) (электрофорез в 2% агарозном геле)

и *Alu*I: оказалось, что *Alu*I-фрагмент длиной 911 п. о. (координаты 1089—1999) расщепляется *Bbv*AIII с образованием двух субфрагментов размером около 600 и 300 п. о., причем последовательность TCCGGA находится как раз на стыке этих субфрагментов.

Еще один исследованный нами штамм *Bacillus* — *B. species* F продуцирует единственную эндонуклеазу рестрикции, обозначенную *Bsp*FI, которая была выделена фракционированием клеточного экстракта в двухфазной системе полиэтилсгликоль — декстран [8] и затем хроматографией на DEAE-целлюлозе и фосфоцеллюлозе. Выход составил около 3000 ед. акт./г биомассы, удельная активность около 6000 ед. акт./мл. Картина фрагментации ДНК фага  $\lambda$  рестриктазой *Bsp*FI после хроматографии на фосфоцеллюлозе представлена на рис. 3. Фермент стабилен при хранении в течение 6 мес при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Оптимальные



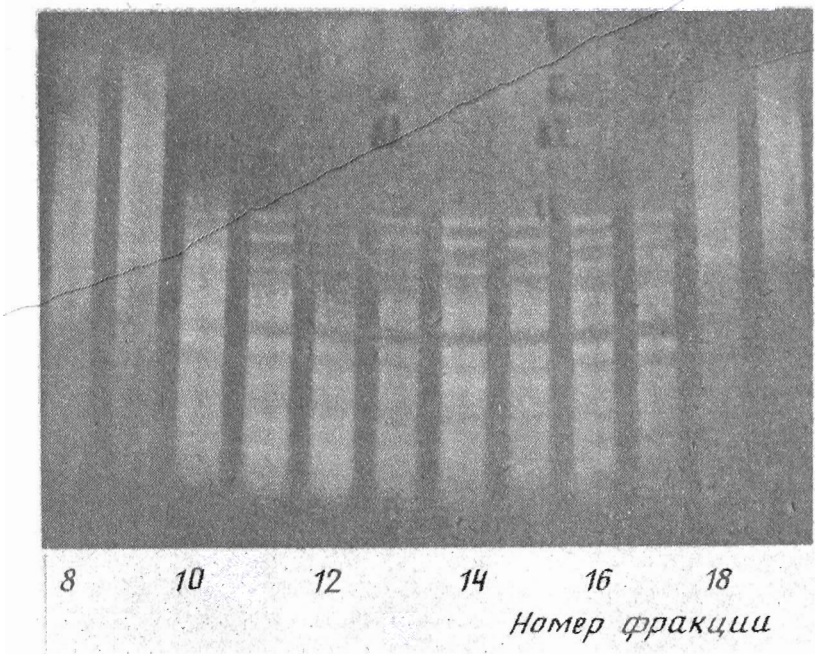


Рис. 3

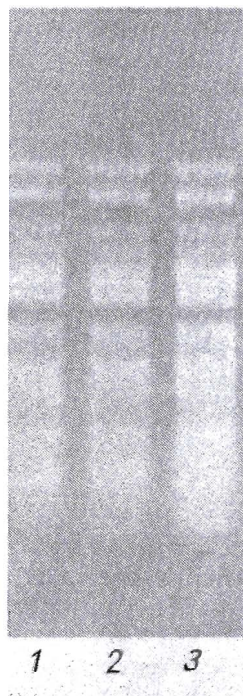


Рис. 4

Рис. 3. Расщепление ДНК фага  $\lambda$  фракциями, полученными при хроматографии рестриктазы *BspFI* на фосфоцеллюлозе (фракции по 3 мл, алкivotы по 1 мкл, ДНК по 2 мкг) (электрофорез в 2% агарозном геле)

Рис. 4. Раздельное и совместное расщепление ДНК фага  $\lambda$  рестриктазами *Sau3AI* (1), *BspFI* (2), *Sau3AI* + *BspFI* (3) (электрофорез в 2% агарозном геле)

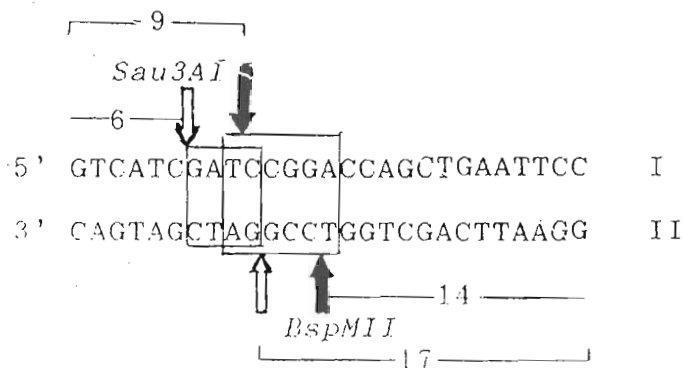


Рис. 5. Синтетический дуплекс (I-II), содержащий участки узнавания эндонуклеаз рестрикции *BspMI* (*Kpn2I*, *BbvIII*; темные стрелки) и *Sau3AI* (*BspFI*; светлые стрелки). Указаны размеры (в нуклеотидных звеньях) 5'-концевых продуктов расщепления каждой из цепей соответствующей эндонуклеазой

условия его функционирования: буфер, содержащий 10 мМ трис-HCl, pH 7,3—7,8, 25—50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит и 100 мкг/мл BSA, при 37° С.

При электрофорезе в 2% агарозном геле ДНК фага λ, обработанной эндонуклеазой *BspFI*, наблюдается не менее 26 фрагментов ДНК различной интенсивности, суммарный размер которых составляет около 21 000 п. о., т. е. менее половины фагового генома (48 502 п. о. [9]). Это означает, что фермент имеет короткий (вероятнее всего, тетрануклеотидный) или вырожденный участок узнавания. По характеру фрагментации плазмиды pBR322 фермент очень близок к эндонуклеазам рестрикции *MboI* и *Sau3AI* [7, 10]; совпадающие картины фрагментации ДНК фага λ наблюдались при ее параллельном и совместном расщеплении рестриктазами *BspFI* и *Sau3AI* (рис. 4). На возможную изоизомерию этих рестриктаз указывают также результаты комбинированного расщепления плазмиды pBR322 эндонуклеазами *BspFI* и *PvuII* (расщепление *BspFI*-фрагмента длиной 1400 п. о. с образованием субфрагментов 1000 и 400 п. о.).

Известно, что рестриктазы *MboI* и *Sau3AI* узнают в составе двунилевой ДНК одинаковую последовательность 5'-GATC, но различаются по чувствительности к характеру метилирования этого сайта: *MboI* не расщепляет *dam*-метилированную ДНК, т. е. последовательность GA<sup>m</sup>TC, но гидролизует альтернативно модифицированный участок GATC<sup>m</sup>, тогда как в случае *Sau3AI* дело обстоит противоположным образом [11]. Использованные в настоящей работе ДНК-субстраты (λ, pBR322) были выделены из штаммов *E. coli*, обладающих *dam*-метилязой активной, откуда следует, что *BspFI* не только является изоизомером *Sau3AI*, но также, подобно последней, нечувствительна к метилированию остатка аденина в ДНК-субстрате.

Чтобы выяснить точное положение межнуклеотидных связей, расщепляемых эндонуклеазами *BbvIII* и *BspFI*, мы синтезировали два комплементарных 23-звенных олигонуклеотида (I) и (II) (рис. 5), продукт гибридизации которых, дуплекс (I-II), содержит серию рестриктных сайтов, в том числе сайтов, узнаваемых этими эндонуклеазами. Оба олигонуклеотида были по отдельности 5'-<sup>32</sup>P-фосфорилированы действием [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP в присутствии полинуклеотидкиназы фага T4 [12], и каждая из меченных таким образом цепей гибридизована с комплементарной немеченой цепью с образованием дуплексов (pI-II) и (I-pII). При действии рестриктазы на каждый из этих дуплексов, как и в случае природной ДНК, должны расщепляться обе цепи, но из четырех образующихся фрагментов детектироваться будет лишь тот, который несет радиоактивную метку. Длина получаемого таким образом фрагмента показывает положение разрыва олигонуклеотидной цепи. Проще всего определить эту длину прямым электрофоретическим сравнением с заведомым олигонуклеотидом.

С этой целью каждый из двух альтернативно меченных дуплексов, (pI-II)

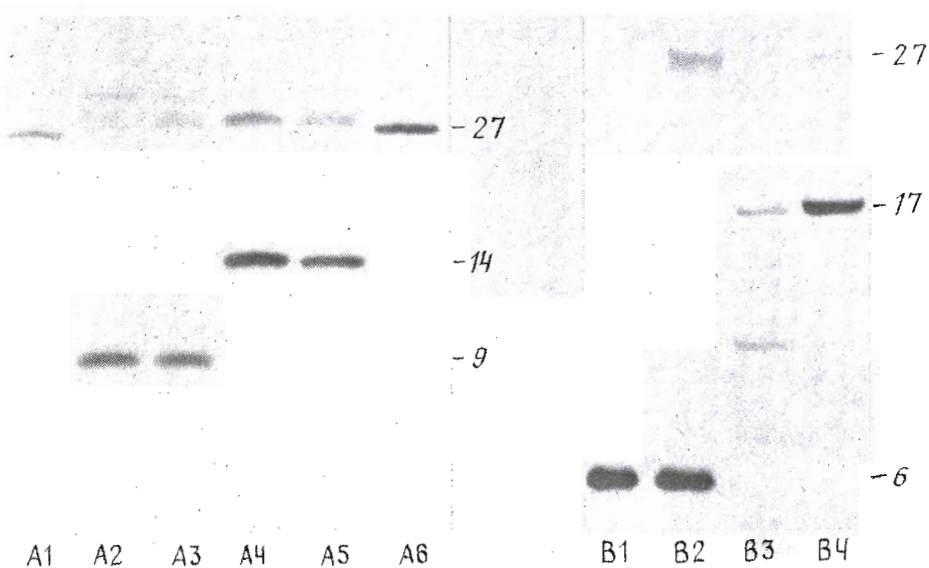


Рис. 6. Сравнение продуктов расщепления синтетического дуплекса (рI·II) или (I·pII) («р» означает 5'-<sup>32</sup>P-фосфат) рестриктазами, выделенными в настоящей работе, и их изошизомерами: рI (A1, контроль), рI·II + *Kpn*2I (A2), рI·II + *Bbv*III (A3), I·pII + *Kpn*2I (A4), I·pII + *Bbv*III (A5), pII (A6, контроль), рI·II + *Sau*3AI (B1), рI·II + *Bsp*FI (B2), I·pII + *Sau*3AI (B3; дополнительная полоса в районе 10—11 нуклеотидов является артефактом, не сказывающимся на выводе и далее не исследовавшимся), I·pII + *Bsp*FI (B4). Электрофорез в 20% ПААГ с 7 М мочевиной в 50 мМ трис-боратном буфере (рН 8,3) с 1 мМ EDTA. Цифры справа — число нуклеотидов в олигонуклеотидных звеньях

и (I·pII), был обработан одним из двух охарактеризованных в настоящей работе ферментов, *Bbv*III и *Bsp*FI, и, параллельно, их изошизомерами *Kpn*2I и *Sau*3AI, структурная специфичность которых была выяснена ранее [13]. Попарное сравнение электрофоретических подвижностей всех полученных в результате этого восемь 5'-меченых олигонуклеотидов (рис. 6) показало, что *Bbv*III расщепляет ДНК точно так же, как *Kpn*2I (5'T<sup>4</sup>CCGGA), а *Bsp*FI — точно так же, как *Sau*3AI (5'<sup>4</sup>GATC), и, следовательно, являются их истинными изошизомерами.

### Экспериментальная часть

Бактериальные культуры получены из Коллекции непатогенных микроорганизмов РАН. Культивирование проводили при 37° С в аэробных условиях до поздней логарифмической фазы ( $A_{600}^{cm}$  3—4) на среде, содержащей 250 мл бульона Хоттингера, 5 г NaCl и 1 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> в 1 л. Микробную массу (выход 6—9 г/л) отделяли с помощью проточной центрифуги СЕРА (Австрия) при 20 000 об/мин и хранили при —20° С.

Рестриктазы *Eco*RI, *Bam*HI, *Alu*I, *Pae*I (*Sph*I), *Lp*II (*Clal*), ДНК фага  $\lambda$ I857s7 выделяли как описано ранее [14—17]. Использовали плазмиду рBR322, рестриктазы *Pvu*II, *Eco*RV, *Kpn*2I, *Sau*3AI производства НПО «Фермент» (Вильнюс), голубую сефарозу CL-6В, DEAE-сефарозу CL-6В и гепарин-сефарозу CL-6В (Pharmacia), DEAE-целлюлозу DE-52 и фосфоцеллюлозу P11 (Whatman), агарозу (Сhemarol), акриламид и метилен-бис-акриламид (Merck).

Электрофорез ДНК в агарозном и полиакриламидном гелях проводили по описанным методикам [12]. Активность рестриктаз определяли в оптимальных условиях инкубации [7]; за единицу активности принимали количество фермента, необходимое для полного расщепления 1 мкг  $\lambda$  ДНК за 1 ч инкубации при 37° С.



При определении размеров фрагментов ДНК стандартами служили *PaeI*-, *EcoRI*-, *EcoRV*- и *LpI*-фрагменты ДНК фага  $\lambda$ , а также *AluI*-фрагменты pBR322.

**Выделение рестриктаз.** Биомассу (15 г) суспендировали в 30 мл буфера А (10 мМ К-фосфат, рН 7,4, 1 мМ дитиотреит, 1 мМ  $\text{NaN}_3$ , 0,1 мМ EDTA), содержащего 100 мкг/мл фенолметилсульфонилфторида (PMSF). Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе мощностью 150 Вт (MSE) при 2—4° С (12 кГц, 10 × 30 с); все последующие операции по очистке ферментов проводили при той же температуре. Дсбрис отделяли центрифугированием (Beckman L8-60M; 105 000 g, 60 мин) и из супернатанта выделяли эндонуклеазы рестрикции.

*а) Рестриктазы V. brevis (BbvI, BbvII и BbvIII).* К супернатанту добавляли NaCl и полиэтиленимин (Polymix P, Serva) до конечной концентрации соответственно 0,6 М и 1%. После перемешивания (15—20 мин) осадок отделяли центрифугированием (15 000 g, 30 мин), к надосадочной жидкости добавляли сульфат аммония до концентрации 70% от насыщающей. После центрифугирования (10 000 g, 20 мин) и декантации выпавшие белки диализовали против буфера Б (буфер А, содержащий 10% глицерина, по объему) и хроматографировали как указано в таблице.

*б) Рестриктаза V. species (BbvFI).* К супернатанту после высокоскоростного центрифугирования добавляли NaCl до концентрации 0,5 М, затем 0,5 об. 15% водного раствора дксстрана Т-500, 0,5 объема 35% водного раствора полиэтиленгликоля 6000 и 0,5 объема воды, перемешивали 20—25 мин при 2—4° С и центрифугировали (10 000 g, 20 мин). Верхнюю фазу, составляющую 70—80% супернатанта, диализовали против буфера Б, и фермент выделяли хроматографией на DEAE-сефарозе и затем на фосфоцеллюлозе (см. таблицу).

На заключительном этапе очистки ферментов фракции с активностью соответствующих рестриктаз объединяли и диализовали против буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl (рН 7,4), 0,1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 100 мкг/мл BSA и 50% глицерина (по объему). Буферная смесь для рестриктазы *BspFI* дополнительно содержала 50 мМ KCl.

**Олигонуклеотиды (I) и (II)** синтезировали стандартным твердофазным фосфамидитным методом с  $\beta$ -цианэтильным остатком в качестве фосфатзащитной группы [18] на автоматическом синтезаторе System 1 Plus DNA Synthesizer (Beckman). После полного деблокирования олигонуклеотиды были выделены электрофорезом в 20% ПААГ. Полосы детектировали в УФ-свете на фоне экрана с флуоресцентным индикатором (Silica Gel 60 F<sub>254</sub>, Merck), вырезали, олигонуклеотиды экстрагировали раствором, содержащим 2 М LiClO<sub>4</sub>, 0,05 М трис-НСl (рН 8,0), 0,1 мМ EDTA (2 × 150 мл), осаждали 10-кратным объемом ацетона и в заключение проводили гель-фильтрацию на сефадексе G-50 в 0,5 мМ трис-НСl (рН 8,0), 0,01 мМ EDTA.

Авторы благодарны проф. Ф. Экштейну (Гёттинген) за плодотворное обсуждение. Работа частично финансировалась грантом UNESCO (Global Network for Molecular and Cell Biology).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roberts R. J., Macelis D. // Nucl. Acids. Res. 1993. V. 21. № 13. P. 3125—3137.
2. Wilson G. G. // Ann. Rev. Genet. 1991. V. 25. P. 585—627.
3. Соколов Н. П., Эльдаров М. А., Аникейчева Н. В., Карпычев И. В., Самко О. Т., Фицнер А. Б., Калугин А. А., Хорошутина Э. Б., Скрябин К. Г. // Биооргани. химия. 1991. Т. 17. № 9. С. 1188—1192.
4. Соколов Н. П., Эльдаров М. А., Аникейчева Н. В., Карпычев И. В., Самко О. Т., Фицнер А. Б., Калугин А. А., Хорошутина Э. Б., Скрябин К. Г. // Биооргани. химия. 1992. Т. 18. № 1. С. 47—51.
5. Соколов Н. П., Фицнер А. Б., Хорошутина Э. Б., Хейслере М. Я. // Булл. эксперим. биол. и мед. 1984. Т. 97. № 2. С. 163—165.
6. Smith H. O., Nathans D. // J. Mol. Biol. 1973. V. 81. № 3. P. 419—423.
7. New England Biolabs. Catalog 1988/89.

8. Альбертссон П.-О. Разделение клеточных частиц и макромолекул. М.: Мир, 1974.
9. Sanger F., Coulson A. R., Hong G. F., Hill D. E., Petersen G. B.//J. Mol. Biol. 1982. V. 162. № 4. P. 729—773.
10. Fuchs C., Rosenvold E. C., Honigman A., Szybalski W.//Gene. 1980. V. 10. № 4. P. 357—370.
11. McClelland M.//Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 1. P. r169—r173.
12. Мануатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
13. Roberts R. J.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. Supplement. P. 2331—2365.
14. Соколов Н. Н., Вотрин И. И., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В.//Биохимия. 1978. Т. 43. № 5. С. 865—871.
15. Соколов Н. Н., Вотрин И. И., Фицнер А. Б., Курсанова И. Д.//Вопр. мед. химии. 1980. Т. 26. № 4. С. 568—571.
16. Sokolov N. N., Fitzner A. B., Anikeicheva N. V., Khoroshutina E. B., Samko O. T., Kolosha V. O., Fodor I. I., Votrin I. I.//Molec. Biol. Rep. 1985. V. 10. № 3. P. 159—161.
17. Соколов Н. Н., Манялене З. П., Буткус В. В., Фицнер А. Б., Хорошутина Э. Б., Калугин А. А., Янулайтис А. А.//Биооргани. химия. 1990. Т. 16. № 8. С. 1040—1044.
18. Sinha N. D., Biernat J., McManus J., Köster H.//Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 11. P. 4539—4557.

Поступила в редакцию  
29.XII.1993

N. N. Sokolov, O. T. Samko, N. V. Anikeicheva, A. A. Kalugin,  
E. B. Khoroshutina, O. V. Plutalov\*, K. R. Birikh\*, Yu. A. Berlin\*

#### NEW SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASES FROM *Bacillus* STRAINS

*Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,  
Moscow; \* M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic  
Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Key words: restriction endonucleases, *Bacillus* strains, restriction sites, synthetic oligodeoxyribonucleotides.

In a search for new restriction endonucleases type II, among forty bacterial strains of the *Bacillus* genus two strains producing site-specific endonucleases have been found. Endonucleases *Bbv*AlII and *Bsp*FI, isolated from *B. brevis* BLM B-677 and *B. species* F, are shown to be true isoschisomers of *Bsp*MI (Kpn2I) and *Sau*3AI, respectively.

---

To whom the correspondence should be sent: N. N. Sokolov, Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya ul., 10, Moscow 119121, Russia.