



УДК 577.155.07

ВЫДЕЛЕНИЕ ВТОРОЙ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ ИЗ *XANTHOMONAS HOLCICOLA* И ЕЕ ХАРАКТЕРИСТИКА

Крамаров В. М., Мазанов А. Л., Смолянинов В. В.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
прикладной микробиологии, г. Серпухов

Предложен метод очистки сайт-специфической эндонуклеазы *XhoII* хроматографией на фосфоцеллюлозе и аминогексилсефарозе. Конечный препарат не содержит примесей неспецифических нуклеаз, а также эндонуклеазы *XhoI*. Показано, что эндонуклеаза узнает и гидролизует ДНК в последовательности нуклеотидов 5'-R-G-A-T-C-Y3'. Молекулярная масса эндонуклеазы, по данным гель-фильтрации, равна $40\ 000 \pm 2000$. В реакции гидролиза ДНК эндонуклеазой Mg^{2+} может быть заменен на Mn^{2+} .

Ранее было показано [1], что *Xanthomonas holcicola* содержит две сайт-специфические эндонуклеазы, обозначенные в соответствии с предложенной номенклатурой [2] как эндонуклеазы *XhoI* и *XhoII*. Эндонуклеаза *XhoI* очищена и частично охарактеризована [1]. В настоящей работе описана методика очистки второй сайт-специфической эндонуклеазы *XhoII* и определены некоторые ее свойства.

Процесс очистки эндонуклеазы *XhoII* включает три этапа: хроматографию и рехроматографию на фосфоцеллюлозе и затем хроматографию на аминогексилсефарозе. При хроматографии на фосфоцеллюлозе достигается отделение эндонуклеазы *XhoII* от присутствующей в экстракте в большом количестве эндонуклеазы *XhoI*. Эти ферменты элюируются при концентрации $NaCl$ около 0,55 и 0,25 М соответственно. Рехроматография на фосфоцеллюлозе позволяет получить *XhoII* полностью свободной от примесей *XhoI*, но искомый фермент при этом загрязнен неспецифической нуклеазой, которая элюируется при концентрации $NaCl$ 0,4–0,45 М. Последующая хроматография на аминогексилсефарозе позволяет получить препарат *XhoII*, свободный от примесей неспецифических нуклеаз.

Для определения сайта узнавания эндонуклеазы *XhoII* сравнили картины расположения фрагментов после электрофореза при совместном гидролизе ДНК рBR322 эндонуклеазой *XhoII* с эндонуклеазами *TaqI*, *PstI*, *SalI*, *EcoRI*, полученные экспериментально (рис. 1) и при моделировании на ЭВМ (рис. 2). (Полная последовательность нуклеотидов ДНК рBR322 опубликована в работе [3].) Картины полностью совпали; это подтвердило, что эндонуклеаза *XhoII* узнает последовательность нуклеотидов R-G-A-T-C-Y [4, 5].

Имея вырожденную последовательность узнавания, эндонуклеаза *XhoII* гидролизует не только последовательности, узнаваемые эндонуклеазами *BamI* (G-G-A-T-C-C) и *BglII* (A-G-A-T-C-T) [5], но и гибридную последовательность, полученную при действии полинуклеотидлигазы на смесь фрагментов ДНК после совместного гидролиза *BamIII* и *BglII*. Эта гибридная последовательность, как известно, устойчива к действию *BamIII* и *BglII*.

Для выделенной эндонуклеазы *XhoII* были определены оптимальные условия ферментативного действия: pH 7,8–8,3, концентрация $NaCl$ 40–60 мМ, Mg^{2+} 0,7–1 мМ. В реакционной смеси Mg^{2+} может быть заменен на Mn^{2+} без потери ферментативной активности. Оптимальная концентра-

Сокращения использованы в соответствии с рекомендациями комиссии по номенклатуре IUPAC-IUB: R и Y – неопределенный пуриновый и пиримидиновый нуклеозид соответственно.

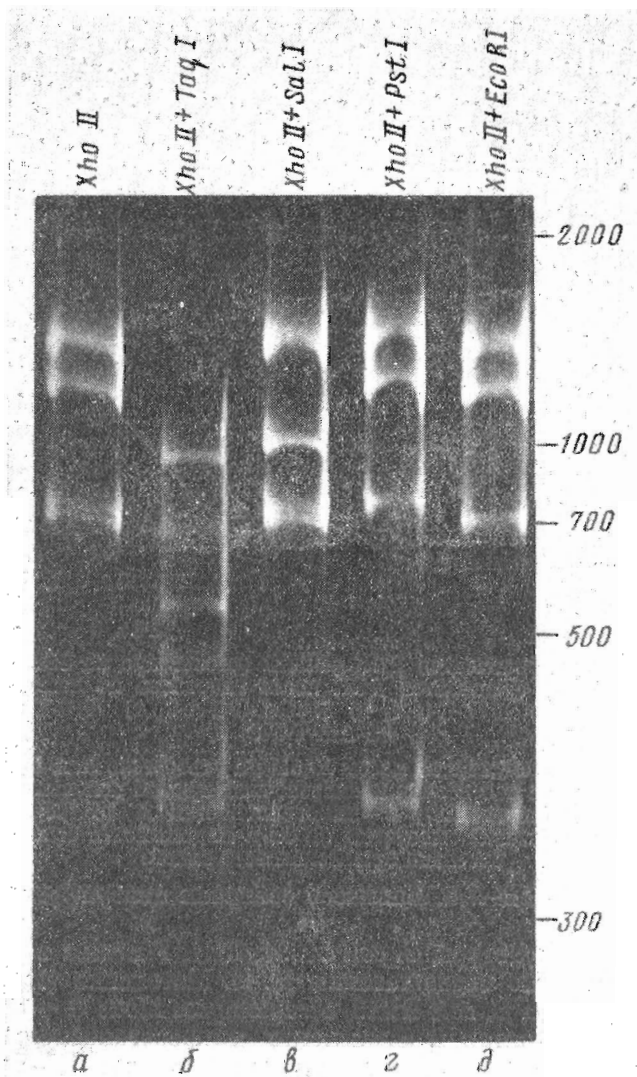


Рис. 1. Электрофорез фрагментов ДНК рВR322 в геле 3% акриламида — 0,7% агарозы. Представлены фрагменты, видимые после окрашивания бромидом этидия и последующем облучении УФ-светом. ДНК рВR322 гидролизована эндонуклеазами, указанными на рисунке. Цифры справа указывают число пар нуклеотидов

ция Mn^{2+} 0,4 мМ. Увеличение концентрации $NaCl$ до 100 мМ или Mg^{2+} до 7 мМ ингибирует эндонуклеазную активность на 60—70%.

Молекулярная масса *XhoII* определена гель-фильтрацией на колонке с ультрагелем АсА-44 (рис. 3). *XhoII* элюируется в объеме 185—190 мл, что соответствует молекулярной массе 40 000. Небольшая часть фермента элюируется с объемом около 110—120 мл. Это, по-видимому, говорит о том, что *XhoII* существует в растворе в виде комплекса субъединиц подобно другим сайт-специфическим эндонуклеазам типа II [6].

Экспериментальная часть

Бактериальная культура *X. holcicola* получена из Института биохимии и физиологии микроорганизмов. Культуру выращивали в ферментере емкостью 20 л при 37° С, аэрация воздуха 1 л/мин (насыщение воздухом 80%) до $2/3$ логарифмической фазы (30—36 ч). Среда содержала в 1 л: бактопептон (ЧССР) — 3 г, кукурузный экстракт (СССР) — 1 г, дрожжевой экстракт (СССР) — 5 г, глюкоза — 2 г, хлористый аммоний — 3 г, ме-

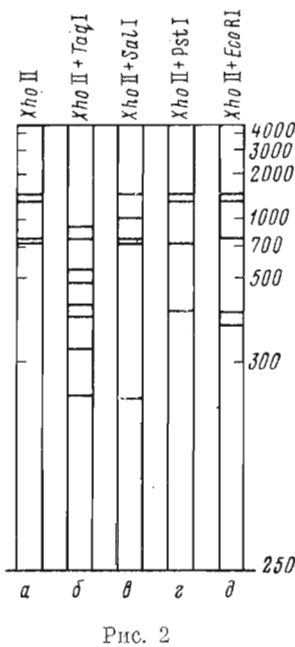


Рис. 2

Рис. 2. Распределение фрагментов ДНК pBR322 (рассчитано на ЭВМ). Представлена картина распределения фрагментов ДНК после гидролиза по последовательностям: а) R-G-A-T-C-Y (X), б) X+T-C-G-A, в) X+G-T-C-G-A-C, г) X+C-T-G-C-A-G, д) X+G-A-A-T-T-C

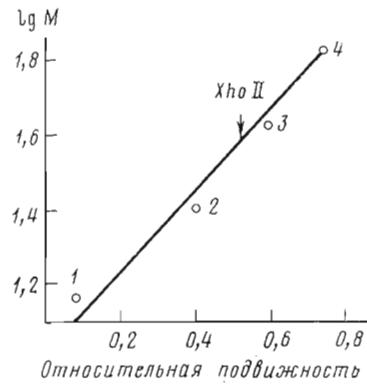


Рис. 3

Рис. 3. Определение молекулярной массы *XhoII* на ультрагеле АсА-44 (ЛКВ, Швеция; колонка 2,5×60 см). Для построения калибровочной прямой использовали следующие белки (*M*): 1 — лизоцим (14 300), 2 — химотрипсиноген А (25,700), 3 — овалбумин (43 000), 4 — альбумин бычьей сыворотки (67 000). Подвижность белков указана относительно бромфенолового синего

тионин — 40 мг, рН 7,0—7,5. Биомассу собирали центрифугированием при 5000g.

Бактериальные культуры *E. coli* J1001, RR1, *Thermus aquaticus*, *Providencia stuartii* любезно предоставлены Н. И. Матвиенко (Институт белка АН СССР); культуры *E. coli* RY13, *Streptomyces albus* G — Н. П. Кузьминым (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР); *E. coli* (K12)802 и бактериофаг φ80 (диккий тип) — Д. П. Ворожейкиной (Институт фотосинтеза АН СССР).

Для выделения фага λ использовали *E. coli* J1001, в хромосоме которой интегрирован в виде профага бактериофаг λc1857S₇. Для размножения фага φ80 использовали *E. coli* (K12)802. Фаги очищали центрифугированием в градиенте CsCl и затем выделяли ДНК фенольной депротеинизацией. Плазмиду pBR322 выделяли из *E. coli* RR1 согласно [7].

Сайт-специфические эндонуклеазы *SalI*, *PstI*, *TaqI* выделяли аналогично описанному в работе [8], *EcoRI* — в работе [9]. Полипуклеотидкиназа фага T4 любезно предоставлена М. И. Болезинным (ВНИИ прикладной микробиологии).

Очистка эндонуклеазы *XhoII*. 30 г биомассы *X. holcicola* суспендировали в 100 мл буфера, рН 7,0, содержащего 0,05 М NaCl, 10 мМ КН₂РO₄, 2 мМ дитиотреит, и озвучивали 20 мин (24 с озвучивания, 36 с паузы) при охлаждении льдом на ультразвуковом дезинтеграторе мощностью 150 Вт (MSE, Англия). Суспензию затем центрифугировали при 100 000g, супернатант наносили на фосфоцеллюлозу Р-II (Whatman, США; колонка 2,5×20 см), уравновешенную тем же буфером, и колонку промывали 200 мл того же буфера. Белки элюировали раствором NaCl в линейном градиенте концентрации (0,05—1 М). Объем градиента 1 л, скорость элюции 40 мл/ч, фракции по 10 мл. Фракции, содержащие эндонуклеазу *XhoII* (0,45—0,75 М NaCl), объединяли, разбавляли втрое водой и наносили опять на фосфоцеллюлозу (колонка 2,5×10 см), уравновешенную буфером, рН 7,0, содержащим 0,2 М NaCl, 10 мМ КН₂РO₄, 2 мМ дитиотреит. Колонку про-

мывали 100 мл того же буфера и элюировали белки раствором NaCl в градиенте концентрации 0,2–0,8 М. Объем градиента 400 мл, скорость элюции 25 мл/ч, фракции по 7 мл. Фракции, содержащие эндонуклеазу *XhoII* (0,5–0,7 М NaCl), объединяли, диализовали против буфера, pH 7,0, содержащего 0,1 М NaCl, 10 мМ КН₂РO₄, 2 мМ дитиотреит, и наносили на аминогексилсефарозу (LKB, Швеция; колонка 0,9×15 см), уравновешенную тем же буфером. Колонку промывали 20 мл того же буфера, белки элюировали в градиенте (0,1–0,4 М) концентрации NaCl. Объем градиента 100 мл, фракции по 3 мл. Фракции, содержащие эндонуклеазу *XhoII* (0,18–0,27 М NaCl), объединяли, концентрировали диализом против буфера, pH 7,0 (0,1 М NaCl, 10 мМ КН₂РO₄, 2 мМ дитиотреит, 50% глицерин). Из 30 г биомассы *X. holcicola* получено 4000 ед. акт. *XhoII*.

Фермент не терял эндонуклеазной активности при хранении в течение 6 мес. при –15° С. Из того же количества биомассы (30 г) на стадии хроматографии на аминогексилсефарозе было получено 200 000 ед. акт. эндонуклеазы *XhoI* (элюция при концентрации NaCl 0,1–0,3 М). Ее активность тестировали по расщеплению ДНК фага φ80 дикого типа, дающего при гидролизе 6 фрагментов.

Определение эндонуклеазной активности *XhoII*. Реакционная смесь содержала в 50 мкл 30 мМ трис-HCl (pH 7,9), 1 мМ MgCl₂, 2 мМ дитиотреит, 0,7 мкг ДНК фага λ. К ней добавляли по 1–5 мкл фермента из фракций, смесь инкубировали 30 мин при 37° С, затем подвергали электрофорезу в геле 0,8% агарозы, как описано в работе [10]. После электрофореза гель окрашивали бромидом этидия и детектировали фрагменты при облучении УФ-светом. Фотографировали гель через фильтр KC-10 на пленку КН-1, экспозиция 1–1,5 мин.

За единицу активности принимали количество *XhoII* (*XhoI*), полностью гидролизующее 1 мг ДНК фага λc1857S₇ (фага φ80) за 1 ч при 37° С. Присутствие неспецифических эндонуклеаз тестировали следующим образом: 1 мкг ДНК фага λ инкубировали 16–20 ч с 10-кратным избытком *XhoII* в условиях эндонуклеазной реакции, затем смесь подвергали электрофорезу. Отсутствие шлейфа на электрофореграмме (четкие полосы ДНК) говорило об отсутствии неспецифических эндонуклеаз. Присутствие неспецифических экзонуклеаз тестировали по отщеплению концевой [³²P]фосфата после инкубации ДНК, меченной ³²P по 5'-концу, полинуклеотидкиназой фага T4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gingeras T. R., Myers P. A., Olson J. A., Hanberg F. A., Roberts R. J. J. Mol. Biol., 1978, v. 118, № 1, p. 113–122.
2. Smith H. O., Nathans D. J. Mol. Biol., 1972, v. 81, № 3, p. 419–423.
3. Satchliffe J. G. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1978, v. 43, p. 77–90.
4. Крамаров В. М., Бунина З. Ф., Смолянинов В. В. Деп. ОНТИ ТЭИМикробиопром от 18.12.1980, № 7/05–1939. Реф. ж. «Микробиол. пром-сть», 1981, № 1.
5. Roberts R. J. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 1, p. r63–r80.
6. Bingham A. H. A., Atkinson T. Biochem. Soc. Trans., 1978, v. 6, № 1, p. 315–323.
7. Colman A., Byers M. J., Primrose S. B., Lions A. Eur. J. Biochem., 1978, v. 91, № 2, p. 303–310.
8. Bickle T. A., Pirota V., Imber R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 8, p. 2561–2572.
9. Ерусланов Б. В., Крамаров В. М., Смолянинов В. В., Боровик Р. В. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1361–1369.
10. Sugden B., DeTroy B., Roberts R. J., Sambrook J. Anal. Biochem., 1975, v. 68, № 1, p. 36–38.

Поступила в редакцию 24.VII.1981

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE SECOND SITE-SPECIFIC

ENDONUCLEASE FROM *XANTHOMONAS HOLCICOLA*

KRAMAROV V. M., MAZANOV A. L., SMOLYANINOV V. V.

All-Union Research Institute of Applied Microbiology, Serpukhov

A method is suggested for purification of the site-specific endonuclease *XhoII* by chromatography on phosphocellulose and aminohexylsepharose. The final preparation is free of admixtures of non-specific nucleases as well as of endonuclease *XhoI*. It is demonstrated that the endonuclease recognizes and hydrolyzes DNA at the 5'-G-A-T-C-Y3' sequence. According to gel filtration data, the molecular mass of endonuclease is 40 000±2000. It is shown that Mg²⁺ can be changed for Mn²⁺ in the *XhoII* hydrolysis of DNA.