



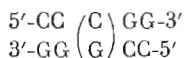
УДК 577.156.2.54.05

ВТОРАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА  
ИЗ *RHODOPSEUDOMONAS SPHAEROIDES*Брамаров В. М., Мазанов А. Л., Пачкунов Д. М.,  
Смолянинов В. В.Всероссийский научно-исследовательский институт  
прикладной микробиологии, г. Серпухов

Матвиенко Н. И.

Институт белка Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.

Сайт-специфическая эндонуклеаза *RshII* очищена путем хроматографии на ультрогеле АСА-44, аминогексилсефарозе 4В и гепаринсефарозе 6В. Полученный препарат свободен от примесей неспецифических нуклеаз и эндонуклеазы *RshI*. Показано, что эндонуклеаза *RshII* узнает в составе двунитовой ДНК последовательность



Ранее было показано [1], что *Rhodopseudomonas sphaeroides* 2.4.1 содержит сайт-специфическую эндонуклеазу, обозначенную в соответствии с принятой номенклатурой [2] *RshI*. Из того же штамма нами была выделена и охарактеризована вторая сайт-специфическая эндонуклеаза *RshII*.

Процесс очистки *RshII* включает в себя длительное центрифугирование суспензии разрушенных клеток, осаждение белков сульфатом аммония и последующее растворение осадка в минимальном объеме буфера, хроматографию белков последовательно на ультрогеле АСА-44, аминогексилсефарозе и гепаринсефарозе. Центрифугирование суспензии разрушенных клеток (3–4 ч при 100 000g) необходимо для осаждения большей части темнокрасного пигмента, содержащегося в оболочке клеток. Гель-фильтрация на ультрогеле АСА-44 позволяет отделить *RshII* от *RshI*, но препарат *RshII* на этой стадии все еще содержит неспецифическую нуклеазу, которую удаляют хроматографией на аминогексилсефарозе и гепаринсефарозе. В результате получают препарат *RshII*, свободный от неспецифических нуклеаз и эндонуклеазы *RshI*.

Значительно меньшее содержание в клетках *RshII* по сравнению с *RshI*, возможно, является одной из причин того, что в упомянутой работе [1] отсутствуют сведения о *RshII*. Кроме того, обнаружению *RshII* могла препятствовать методика очистки клеточного экстракта на DEAE-целлюлозе [1]: в этих условиях *RshII* элюируется вместе с неспецифической эндонуклеазой, которая сильно маскирует на электрофореграмме действие *RshII* на ДНК.

Следующим этапом работы было определение узнаваемой *RshII* нуклеотидной последовательности в составе двунитовой ДНК. Описан целый ряд биохимических методов определения таких последовательностей [3], причем выбор метода зависит от того, образуются ли при действии изучаемого фермента фрагменты ДНК с выступающими (5'- или 3'-) или равными концами. В этих методах радиоактивно меченные фрагменты ДНК расщепляют химическим или ферментативным путем и полученные продукты реакции анализируют с помощью хроматографии или электрофореза.

Успехи, достигнутые в расшифровке первичной структуры ряда небольших молекул ДНК, позволяют применить значительно более быстрый и удобный метод. Он заключается в том, что в память ЭВМ вводят данные об известной структуре молекулы ДНК и с помощью комплекса программ

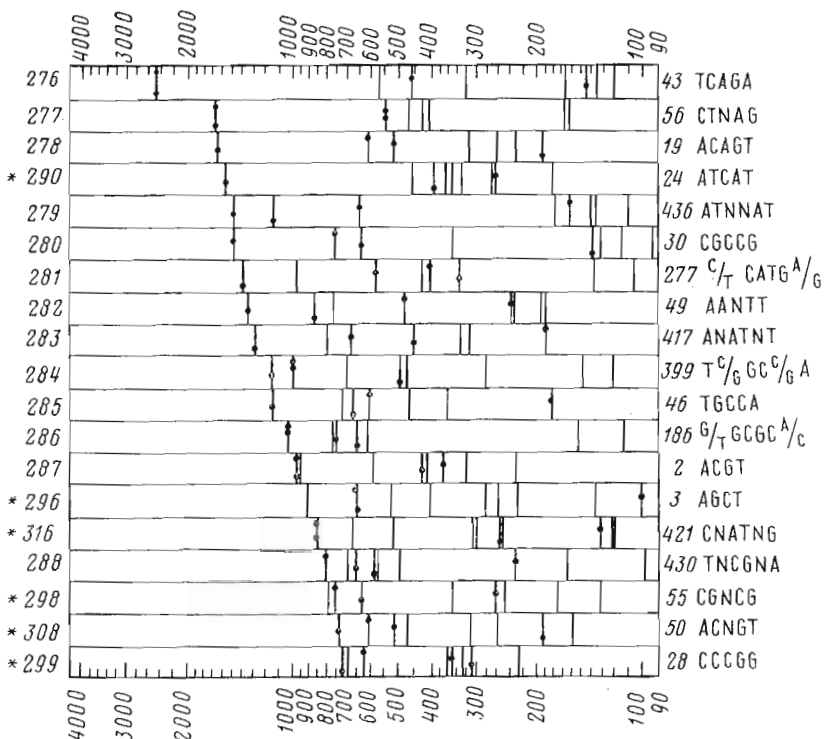


Рис. 1. Страница «Атласа» [9], использованная для идентификации УПН *RshII*. Цифры сверху — номер рисунка, звездочка означает, что колонка содержит совпадающие полосы. Цифры снизу — номер последовательности по прилагаемой к «Атласу» распечатке, содержащей точные размеры фрагментов в парах нуклеотидов. Штрихи в каждой колонке указывают, что данный фрагмент гидролизуетс одной из эндонуклеаз (см. текст) — в пределах колонки слева направо — *SalI*, *PvuII*, *PstI*, *EcoRI*

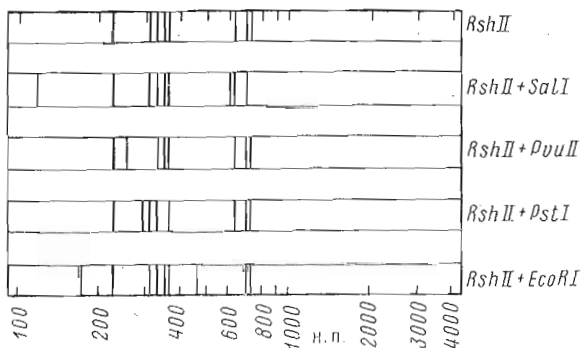


Рис. 2. Схематическое изображение электрофореграммы (в 3% акриламиде — 0,8% агарозе) ДНК рBR 322, гидролизованной эндонуклеазами, указанными на рисунке

моделируют действие на эту ДНК одной или нескольких сайт-специфических эндонуклеаз. Возможности этого метода были впервые показаны в работе [4], где авторы при помощи моделирования на ЭВМ с использованием длин фрагментов, продуцируемых при гидролизе ДНК плазмиды рBR 322, первичная структура которой известна [5], расшифровали последовательность нуклеотидов, узнаваемую эндонуклеазой *BbvI*. В последнее время были предприняты попытки решить задачу по расшифровке узнаваемых последовательностей с использованием таблиц, составленных ЭВМ [6—8]. Это вызвано тем, что опубликованные таблицы значительно более доступны для экспериментатора, чем ЭВМ и соответствующие программы. С помощью таблиц, представленных в работе [7], можно определить узна-

заемую эндонуклеазой последовательность, имея данные о гидролизе ею нескольких ДНК с известной первичной структурой. Недостатком этих таблиц, на наш взгляд, является то, что для этого необходимо точно установить размеры всех продуцируемых фрагментов; это требует применения радиоавтографии для обнаружения фрагментов с небольшой молекулярной массой (менее 100 н.п.).

С целью упрощения процедуры идентификации узнаваемой эндонуклеазой последовательности нуклеотидов (УПН) нами с помощью ЭВМ был создан «Атлас рисунков электрофореграмм сайт-специфического гидролиза ДНК рBR 322» [8, 9].

«Атлас» представляет собой набор рисунков электрофореграмм (рис. 1), смоделированных на ЭВМ, при «гидролизе» ДНК плазмиды рBR 322 по различным вариантам последовательностей из 4–6 нуклеотидов с различной степенью вырождения, обладающих симметрией второго порядка. Таких вариантов существует 448, из них 409 (91%) имеются в составе ДНК рBR 322. Рисунки разбиты по числу полос, причем используются только хорошо видимые полосы, т. е. длиной  $\geq 100$  н.п. Полосы считаются совпадающими, если их размеры различаются менее чем на 2,5%. Для повышения надежности идентификации УПН на рисунках штрихами отмечены фрагменты, гидролизующиеся при совместной обработке ДНК рBR 322 изучаемой эндонуклеазой и «стандартными» эндонуклеазами *SalI*, *PvuII*, *PstI*, *EcoRI* (рис. 1). Сравнивая электрофореграммы, полученную экспериментально, с рисунками «Атласа», можно однозначно определить УПН. Экспериментальная электрофореграмма должна содержать ДНК рBR 322, гидролизованную изучаемой эндонуклеазой одной и совместно с одной из перечисленных выше, и маркеры молекулярной массы (рис. 2). Обычно достаточно совместного гидролиза с одной-двумя эндонуклеазами.

С использованием рисунков «Атласа» была определена УПН эндонуклеазы *RshII* и некоторых других [8]. При сопоставлении схематического изображения экспериментальной электрофореграммы (рис. 2) с рисунком, содержащим восемь «видимых» полос (рис. 1), видно, что распределению фрагментов, полученному экспериментально, соответствует колонка 299 (номер сверху, рис. 1), под которой обозначены номер и структура УПН CCCGG (указана одна нить ДНК 5' → 3'). В этой колонке совпадают также фрагменты, расщепляемые эндонуклеазами *SalI*, *PvuII*, *PstI* и *EcoRI* (см. подпись к рис. 1). Остальные электрофореграммы рис. 1 не совпадают с экспериментальной либо по размеру фрагментов, либо по характеру совместного расщепления.

По структуре УПН *RshII* является изоизомером эндонуклеаз *NciI* [6] и *BcnI* [10]. Эндонуклеаза *RshII* элюируется при гель-фильтрации в объеме, соответствующем молекулярной массе 30–35 кД. Оптимальные условия эндонуклеазной реакции *RshII*: pH 7,5, 10–20 mM NaCl, 6–10 mM Mg<sup>2+</sup>.

### Экспериментальная часть

Бактериальная культура *R. sphaeroides* 2.4.1 получена из Всесоюзного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Культуру выращивали в условиях, описанных в работе [1].

Сайт-специфические эндонуклеазы *SalI*, *PvuII*, *PstI* выделяли как описано в работе [11], *EcoRI* — как описано в работе [12]; приготовление гепарин-сефарозы см. [11].

*Очистка эндонуклеазы RshII.* 15 г биомассы *R. sphaeroides* суспендировали в 30 мл буфера, pH 7,0, содержащего 0,1 M NaCl, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM дитиотреит (буфер А), и озвучивали 15 мин (24-с озвучивание, 36-с пауза) при охлаждении льдом на ультразвуковом дезинтеграторе мощностью 150 Вт (MSE, Англия). Полученную суспензию центрифугировали 4 ч при 100 000g, к супернатанту добавляли (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до концентрации 2,2 M, осадок отделяли центрифугированием, растворяли в буфере А (6 мл) и наносили на колонку (2,5×60 см) с ультрагелем AcA-44 (ЛКВ, Швеция),

уравновешенную буфером А. Белки элюировали буфером А со скоростью 17 мл/ч, собирая фракции по 4 мл. Фракции, содержащие *RshII*, объединяли, диализовали против буфера с рН 7,0, содержащего 0,04 М NaCl, 2 мМ дитиотреит, 10 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (буфер Б), и наносили на колонку (0,9×15 см) с аминогексилсефарозой 4В (Pharmacia, Швеция), уравновешенной в том же буфере. Белки элюировали линейным градиентом NaCl (0,04–0,6 М, 70 мл), скорость элюции 4,4 мл/ч, фракции – 1,2 мл. Фракции, содержащие *RshII* (0,23–0,3 М NaCl), объединяли, диализовали против буфера Б и наносили на колонку (0,9×9 см) с гепаринсефарозой 6В. Белки элюировали линейным градиентом NaCl (0,05–1 М, 30 мл), скорость элюции 2,5 мл/ч, фракции – 0,7 мл. Фракции, содержащие *RshII* (0,33–0,38 М NaCl), объединяли, диализовали против буфера А, содержащего 50% глицерин, и хранили при –15° С. Из 15 г *R. sphaeroides* получено 2000 ед. *RshII*. Фермент не теряет активности при хранении ~6 мес.

**Определение эндонуклеазной активности.** К реакционной смеси (35 мкл), содержащей 30 мМ трис-HCl (рН 7,5), 6 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2 мМ дитиотреит, 0,7 мкг ДНК рBR 322, добавляли по 1–5 мкл фермента из фракций; смесь инкубировали 30 мин при 37° С, затем подвергали электрофорезу в геле 3% акриламида – 0,8% агарозы в буферной системе [13]. После электрофореза гель окрашивали бромидом этидия и детектировали фрагменты при облучении УФ-светом. Гель фотографировали через фильтр KC-10 на пленку КН-1, экспозиция 1–1,5 мин.

За единицу активности принимали количество *RshII*, полностью гидролизующее 1 мкг ДНК рBR 322 за 1 ч при 37° С. Присутствие неспецифических экзонуклеаз тестировали по отщеплению концевого [ $^{32}\text{P}$ ]фосфата после инкубации ДНК, меченной по 5'-концу, с помощью полинуклеотидкиназы фара Т4.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Linn S. P., Cohen L. K., Gardner J. F., Kaplan S. J. *Bacteriol.*, 1979, v. 138, № 2, p. 505–509.
2. Smith H. O., Nathans D. J. *Mol. Biol.*, 1973, v. 81, № 3, p. 419–423.
3. Roberts R. J. *Crit. Rev. Biochem.*, 1976, v. 4, p. 123–164.
4. Gingeras T. R., Milazzo G. P., Roberts R. J. *Nucl. Acids Res.*, 1978, v. 5, № 12, p. 4105–4127.
5. Sutcliff J. C. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1978, v. 43, p. 77–90.
6. Watson R., Zuker H., Martin S. M., Visentin L. P. *FEBS Lett.*, 1980, v. 118, № 1, p. 47–50.
7. Fuchs C., Rosenvold E. S., Honigman A., Szybalski W. *Gene*, 1980, v. 10, № 3, p. 357–370.
8. Крамаров В. М., Мазанов А. Л., Брезгунов В. Н. Матер. IV Всес. конф. «Методы получения и анализа биохимических препаратов». Рига, 1982, ч. I, с. 96–97.
9. Мазанов А. Л., Крамаров В. М., Брезгунов В. Н., Смолянинов В. В. ОНТИ ТЭИмикробиопром, 1982, депониров. рукопись № 110, реф. сб. «Микробиологич. промышленность», 1982, № 6.
10. Petrusite M., Janulaitis A. *Eur. J. Biochem.*, 1982, v. 121, № 2, p. 377–381.
11. Bickle T. A., Pirrotta V., Imber R. *Nucl. Acids Res.*, 1977, v. 4, № 8, p. 2561–2572.
12. Ерусланов Б. В., Крамаров В. М., Смолянинов В. В., Боровик Р. В. *Биоорганич. химия*, 1980, т. 6, № 9, с. 1361–1369.
13. Sugden B., DeTroy B., Roberts R. J., Sambrook J. *Anal. Biochem.*, 1975, v. 68, № 1, p. 36–38.

Поступила в редакцию  
15.VI.1983

#### ANOTHER SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE FROM *RHODOPSEUDOMONAS SPHAEROIDES*

KRAMAROV V. M., MAZANOV A. L., PASHKUNOV D. M.,  
SMOLYANINOV V. V., MATVIENKO N. I.

All-Union Research Institute of Applied Microbiology, Serpukhov;  
Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino

A site-specific endonuclease *RshII* has been purified by chromatography on Ultrogel AcA-44, aminohexyl-Sepharose 4B and heparin-Sepharose 6B. The final preparation did not contain nonspecific nucleases or endonuclease *RshI*. The *RshII* endonuclease has been shown to recognize in double-stranded DNA the following nucleotide sequence:

