



УДК 577.151.45+577.113.6:547.963.32

## ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ КАК АФФИННЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ ЭНДОНУКЛЕАЗ РЕСТРИКЦИИ

Дегтярев С. Х.\*, Белагин П. А.\*, Шишкина И. Г.,  
Зарытова В. Ф., Гаврюченкова Л. П., Морозов С. М.

Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР;

\*Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,  
пос. Кольцово Новосибирской обл.

Предложен метод аффинной хроматографии эндонуклеаз рестрикции IIS-типа. Показано, что рестриктазы *HgaI*, *FokI*, *SfaNI* избирательно связываются на носителе с иммобилизованным дуплексом (один из олигонуклеотидов которого ковалентно связан с полимерным носителем), содержащим сайты узнавания этих ферментов, но неспособным гидролизываться ими.

Изучение свойств эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз) — одно из важных направлений исследования взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами. Это связано с тем, что указанные ферменты узнают и специфически гидролизуют ДНК в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  по разнообразным, но в каждом случае определенным, коротким последовательностям длиной 4–8 пар оснований (так называемые эндонуклеазы рестрикции типа II) [1, 2]. Среди них есть небольшая группа ферментов (их называют ферментами IIS-типа), которые гидролизуют ДНК также строго однозначно, но в стороне от сайта узнавания [3, 4]. Например, рестриктаза *FokI*, выделяемая из микроорганизма *Flavobacterium okeanoikoites*, узнает дуплекс GGATG CCTAC (далее вторая цепь сайта узнавания не приводится) и расщепляет двухцепочечную последовательность ДНК в местах, указанных стрелкой, т. е. после 9-го нуклеотида от места узнавания в верхней и 13-го в нижней нуклеотидной цепи дуплекса (или сокращенно GGATG 9/13) [3, 4]:



Содержание ферментов IIS-типа в клетках соответствующих бактерий невелико, и выделение их — трудная задача. На наш взгляд, одним из перспективных подходов при получении таких ферментов стала бы хроматография на носителе, содержащем ковалентно фиксированный олигонуклеотид, способный образовывать с комплементарным (не иммобилизованным) олигонуклеотидом дуплекс. В состав такого дуплекса должны входить сайты узнавания рестриктаз и не должно быть участка, по которому происходит расщепление. Такой сорбент должен обладать аффинными свойствами и быть устойчивым к действию самих рестриктаз.

Актуальность такой работы обусловлена и возросшим интересом генной инженерии к высокоочищенным препаратам рестриктаз IIS-типа [3, 5] при их высокой стоимости [6].

Цель настоящего исследования — изучение взаимодействия сорбента, содержащего сайты узнавания для рестриктаз *FokI*, *HgaI*, *SfaNI*, с этими и другими ферментами.

Префикс d в обозначениях олигонуклеотидов везде опущен.

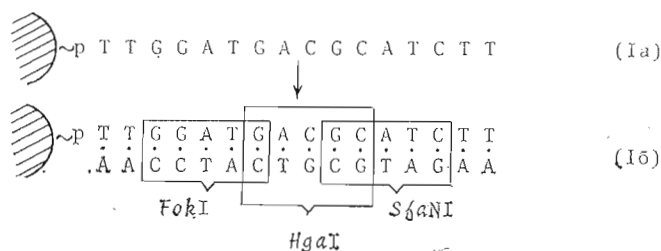


Рис. 1. (1а) — сорбент с ковалентно присоединенным олигонуклеотидом; (1б) — сорбент с иммобилизованным олигонуклеотидным дуплексом, содержащим сайты узнавания рестриктаз

Как известно, рестриктазы *FokI*, *HgaI*, *SfaNI* имеют следующие сайты узнавания и места разрезания: GGATG 9/13, GACGC 5/10, GCATC 5/9 соответственно [6]. Нами был синтезирован дуплекс, включающий в себя сайты узнавания этих ферментов, но не содержащий участка, по которому происходит гидролиз ДНК. На рис. 1 приведена структура полученного дуплекса, где скобками обозначены соответствующие сайты узнавания. Один из нуклеотидов дуплекса, а именно рТТGGATGACGCATCTТ, был ковалентно присоединен к полимерному носителю через 5'-концевую фосфатную группу (сорбент (1а)). Для получения аффинного сорбента (1б) к полимеру (1а) добавляли комплементарный иммобилизованному олигонуклеотид ААGATGCGTCATCСАА. Количество комплементарного олигонуклеотида, связанного с сорбентом (1а), определенное спектрофотометрически промывкой сорбента (1б) 3 М раствором мочевины при 60° С, составило 3 мг (0,6 мкмоль) на 1 г сорбента.

Аналогичным образом был получен сорбент (IIа) с иммобилизованным олигонуклеотидом р(АС)<sub>6</sub>, способным образовывать дуплекс с (GT)<sub>6</sub> (сорбент (IIб)). Следует подчеркнуть, что специальными экспериментами было показано, что полимеры с иммобилизованными олигонуклеотидами образовывали прочные комплексы лишь с олигонуклеотидами, имеющими комплементарные последовательности.

На первом этапе с помощью колоночной хроматографии изучали взаимодействие рестриктазы *FokI* с сорбентами (1а) и (1б) в присутствии ионов Mg<sup>2+</sup> и без них. В каждом случае устанавливали концентрацию NaCl, при которой фермент элюируется с колонки. Чем раньше фермент вымывается с сорбента, тем слабее он с ним взаимодействует, т. е. тем меньше у него сродство к олигонуклеотиду в данных условиях. Оказалось, что рестриктаза *FokI* связывается и с одноцепочечным (сорбент (1а)), и с двухцепочечным (сорбент (1б)) олигонуклеотидом, причем связывание в последнем случае лучше (табл. 1). Ионы Mg<sup>2+</sup> практически не влияют на сродство фермента к олигонуклеотиду, что согласуется с имеющимися в литературе данными [7–9].

Важно было выяснить, какие различия по связыванию имеются у синтезированных сорбентов с другими ферментами типа II, не имеющих сайта узнавания в олигонуклеотидах сорбента. Для этого мы исследовали связывание *RsaI* (сайт узнавания GTAC), *NotI* (GCGGCCGC), *BmeI* (GG<sub>T</sub>ACC), *PvuII* (CAGCTG), а также *HgaI*, *FokI*, *SfaNI*. Хроматографию проводили на сорбенте (1б) и на контрольном сорбенте (IIб) в отсутствие ионов Mg<sup>2+</sup>. Для этого ферменты в количестве 200–500 ед. акт. диализовали против буфера (0,02 М К-фосфат (рН 7,5) 5·10<sup>-4</sup> М EDTA, 10<sup>-3</sup> М 2-меркаптоэтанол), наносили на сорбент и элюировали как описано в «Экспериментальной части». Тестирование активности ферментов проводили в рекомендуемых условиях [6].

В табл. 2 представлены значения концентрации NaCl, при которой происходит элюирование ферментов. Из приведенных данных видно, что все испытанные ферменты при нейтральных значениях рН и в отсутствие ионов Mg<sup>2+</sup> связываются с обоими сорбентами. Однако специфическое связывание (ферменты *FokI*, *SfaNI*, *HgaI*) четко отличается от неспецифи-

Концентрация NaCl, необходимая для элюции рестриктазы *Fok I* с сорбентов типа (I)

Условия хроматографии		[NaCl], М
Сорбент	[MgCl <sub>2</sub> ] · 10 <sup>-3</sup> , М	
(Ia)	0	0,16±0,03
(Ia)	5	0,16±0,03
(Iб)	0	0,28±0,03
(Iб)	5	0,29±0,03

Таблица 2

Концентрация NaCl (М), необходимая для элюции рестриктаз

Фермент	Сорбент (Iб)	Сорбент (IIб)	Фермент	Сорбент (Iб)	Сорбент (IIб)
<i>FokI</i>	0,28	0,14	<i>BmeI</i> 8I	0,16	0,15
<i>SfaNI</i>	0,28	0,13	<i>PvuII</i>	0,14	0,14
<i>HgaI</i>	0,32	0,19	<i>NotI</i>		0,12
<i>RsaI</i>	0,11	0,14			

ческого. В самом деле, ферменты, чей сайт узнавания отсутствует в олигонуклеотиде сорбентов, в обоих случаях элюируется при  $0,15 \pm 0,04$  М NaCl независимо от размеров сайта (табл. 2). В то же время фермент *FokI* на сорбенте (IIб) вымывается при 0,14 М NaCl, а на сорбенте (Iб) — при 0,28 М NaCl. Это позволяет говорить, что предлагаемый нами сорбент является аффинным для рестриктаз IIS-типа.

Аналогичные результаты получены с соответствующими метилазами, для которых данный сорбент также оказался аффинным (данные не приводятся).

Для определения величины аффинной емкости сорбента (Iб) в пять пробирок объемом 1,5 мл помещали 0,07; 0,15; 0,3; 0,6; 1,2 мг сорбента и добавляли по 100 ед. акт. фермента *FokI*. Образцы инкубировали 10 мин при 0° С, затем центрифугировали и в супернатанте определяли активность

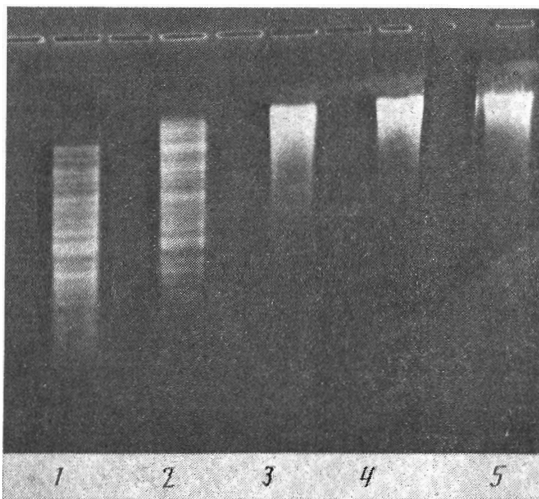


Рис. 2. Электрофореграмма специфического расщепления ДНК фага  $\lambda$ cI 857 рестриктазой *FokI* после предварительной инкубации 100 ед. акт. фермента с 0,07 (1), 0,15 (2), 0,3 (3), 0,6 (4), 1,2 мг (5) сорбента (Iб)

фермента (см. «Экспериментальную часть»). По специфическому расщеплению ДНК фага  $\lambda$ с1 857 видно, что ферментативная активность проявляется в супернатанте двух первых пробирок (рис. 2, дорожки 1 и 2). Таким образом, 0,3 мг сорбента (Iб) (рис. 2, дорожка 3) достаточно для полного связывания 100 ед. акт. *FokI*, а емкость полимера (Iб) составляет не менее 300 000 ед. акт. на 1 г сорбента.

Для оценки стабильности сорбента (Iб) после проведения 10–12 хроматографий его промывали 3 М мочевиной при 60° С. Это приводило к превращению полимера (Iб) в (Iа) и появлению в растворе олигонуклеотида ААGATGCGTCATССАА. Было определено, что количества первоначально связавшегося в дуплекс и десорбируемого олигонуклеотида практически совпадают. Полученные данные свидетельствуют, что данный сорбент достаточно стабилен и может применяться для выделения рестриктаз типа II.

### Экспериментальная часть

В работе использовали полимерный носитель солоза-Н $\gamma$ -65 отечественного производства [10], олигонуклеотиды синтезировали: рТТGGATGACGCATСТТ, р(AC)<sub>6</sub> – фосфотриэфирным методом из защищенных динуклеотидов [11]; ААGATGCGTCATССАА, (GT)<sub>6</sub> – фосфитамидным методом в автоматическом варианте на установке «Виктория-4М» [12]. Все олигонуклеотиды выделяли ВЭЖХ с помощью хроматографа Altex-332 (США) на колонках размером 10×250 мм. В качестве носителя для ионообменной хроматографии использовали Partisil 10 SAX (Whatman, Англия), для обращенно-фазовой – Lichrosorb RP-18 (Merck, ФРГ).

В работе также использовали дипиридилдисульфид (Fluka, Швейцария), трифенилфосфин (Chemapol, Чехословакия), N-метилимидазол (Ega, ФРГ), а также ферменты *RsaI* (сайт узнавания GTAC), *BmeI* (GGATCC), *PvuII* (CAGCTG), *NciI* (GCGGCCGC), *FokI* (GGATG), *HgaI* (GACGC), *SfaNI* (GCATC) (КФ 3.1.23, НПО «Вектор», пос. Кольцово Новосибирской обл.).

*Сорбент (Iа)* получали, используя реакцию аминогрупп полимера с активированной 5'-фосфатной группой олигонуклеотида рТТGGATGACGCATСТТ. Активацию фосфата осуществляли смесью 2,2'-дипиридилдисульфида и трифенилфосфина в присутствии N-метилимидазола [13] и вводили в реакцию с аминогруппами полимерного носителя. Спектрофотометрический анализ кислотного гидролизата аликвоты полученного сорбента показал, что 1 г полимера содержит 5,2 мг (1 мкмоль) иммобилизованного олигонуклеотида.

*Аффинный сорбент (Iб)*. 20 мг сорбента (Iа) промывали 1 мл воды, 2 мл водного буфера 0,5 М КСl и 0,01 М трис-НСl (рН 7,5) и наносили 0,06 мг (12 нмоль) олигонуклеотида ААGATGCGTCATССАА в том же буфере. Полученный аффинный сорбент промывали буфером 0,5 М КСl, 0,01 М трис-НСl (рН 7,5), а затем буфером 0,02 М К-фосфат (рН 7,5), 5·10<sup>-4</sup> М ЕDТА, 10<sup>-3</sup> М 2-меркаптоэтанол до отсутствия оптического поглощения при 260 нм.

*Аффинную хроматографию* проводили на колонке с 0,3 мл (120 мг) сорбентов (Iа), (Iб), (IIа), (IIб). На колонку, уравновешенную буфером 0,02 М К-фосфат (рН 7,5), 5·10<sup>-4</sup> М ЕDТА, 10<sup>-3</sup> М 2-меркаптоэтанол при 4° С, наносили 500 ед. акт. фермента, диализованного против этого буфера. Колонку промывали указанным выше буфером, связавшийся белок элюировали, используя градиент концентрации NaCl от 0 до 1 М в этом же буфере, собирая фракции по 250 мкл.

*Ферментативную активность* во фракциях определяли стандартным образом по гидролизу 1 мкг ДНК фага  $\lambda$ с1 857 с последующим электрофорезом продуктов реакции в 1% агарозе [1]. Условия проведения реакции гидролиза ДНК соответствовали рекомендуемому [14]. За единицу активности принимали минимальное количество фермента, необходимое для проведения полного специфического расщепления 1 мкг ДНК фага  $\lambda$ с1 857 за 1 ч при 37° С.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts R. J. // Nucl. Acids. Res. 1987. V. 15. P. 189-217.
2. Modrich P. // Crit. Rev. Biochem. 1982. V. 13. P. 287-323.
3. Szybalski W. // Gene. 1985. V. 40. № 2-3. P. 169-173.
4. Podhajska A., Szybalski W. // Gene. 1985. V. 40. № 2-3. P. 175-182.
5. Vermersch P. S., Bennett B. N. // Gene. 1987. V. 54. № 2-3. P. 229-238.
6. Biolabs // catalog. 1986-1987.
7. Halford S. E., Johnson N. P. // Biochem. J. 1980. V. 191. P. 593-604.
8. Jack W. E., Terry B. J., Modrich P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 4010-4014.
9. Terry B. J., Jack W. E., Rubin R., Modrich P. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 9820-9825.
10. Гаврюченкова Л. П., Морозов С. М., Болдырев А. Г., Цуканова Л. Н., Константинов В. В., Белая С. Ф., Пасечник В. А. Способ получения полимерных гидрофильных носителей для хроматографии: А.с. 1398902 СССР // В. И. 1988. № 20. С. 27.
11. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кутявин И. В. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. № 2. С. 224-230.
12. Грязнов С. М., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Кумарев В. П., Левина А. С., Полищук А. С. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1987. Вып. 1. № 2. С. 119-123.
13. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 475-481.
14. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. // Molecular Cloning: a laboratory manual/N. Y.: Cold Spring Harbor, 1982.

Поступила в редакцию  
15.VII.1988

### IMMOBILIZED OLIGONUCLEOTIDES AS AFFINITY LIGANDS FOR RESTRICTION ENDONUCLEASES

DEGTYAREV S. Kh.\*, BELAVIN P. A.\*, SHISHKINA I. G., ZARYTOVA V. F.,  
GAVRYUCHENKOVA L. P., MOROZOV S. M.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry,  
Siberian Division of the Academy of Sciences of the USSR;*

*\* All-Union Research Institute of Molecular Biology,  
Kol'tsovo, Novosibirsk Region*

Affinity chromatography of HIS type restriction endonucleases is proposed. It is shown that endonucleases *Hga*I, *Fok*I, and *Sfa*NI have affinity to the matrix with immobilized oligonucleotides which contain the endonucleases's recognition sites resistant to the hydrolysis.