



УДК 577.152.31*23'14

© 1992 г.

Н. Н. Соколов, М. А. Эльдаров*, Н. В. Аникейчева,
И. В. Карпычев*, О. Т. Самюк, А. Б. Фицнер,
А. А. Калугин, Э. В. Хорошутина, К. Г. Скрыбин*

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА *Bbv*VI из *Bacillus brevis*

Институт биологической медицинской химии АМН РАН, Москва;

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

Из клеток *Bacillus brevis* выделена свободная от примесей неспецифических эндонуклеаз, экзонуклеаз и фосфатаз новая рестриктаза *Bbv*VI. Очистка фермента включала в себя разрушение микробных клеток ультразвуком, фракционирование в двухфазной системе полиэтиленгликоль – декстран и хроматографию на DEAE-сефарозе, голубой сефарозе и генарин-сефарозе. Рестриктаза *Bbv*VI максимально активна при 45°С, рН 8–8,5 и концентрации $MgCl_2$ 5–10 мМ в условиях вязкой ионной силы. Показано, что фермент узнает последовательность нуклеотидов C'GYRC'S, причем сайты GGTACC и GGCACC предпочтительно по сравнению с GGTGCC и GCCGCC, являясь истинным изошизомером эндонуклеазы рестрикции *Ban* I.

Интенсивно проводимые в последние годы исследования по поиску, выделению и характеристике рестриктаз II класса (КФ 3.1.23.X) позволили расширить список этих ферментов примерно до 1400, из которых более 180 являются прототипами [1]. Интерес к сайт-специфическим эндонуклеазам связан как с их широким использованием в молекулярно-генетических работах (физическое картирование геномов прокариот и эукариот, секвенирование ДНК и т. п.), так и с тем обстоятельством, что эндонуклеазы рестрикции представляют собой прекрасный объект для изучения проблемы белково-нуклеинового узнавания.

В течение ряда лет нами проводится поиск и изучение новых рестриктаз, продуцируемых микроорганизмами различных таксономических групп. Результатом этой работы явилось обнаружение более 40 продуцентов эндонуклеаз рестрикции, ряд ферментов выделен и охарактеризован [2–6].

В настоящей работе сообщается об обнаружении, очистке и свойствах новой рестриктазы *Bbv*VI, продуцируемой в *Bacillus brevis*.

С помощью разработанного нами толуольного экспресс-метода тестирования рестриктазной активности у микроорганизмов [7] установлено, что в толуольных экстрактах из клеток *B. brevis* присутствует эндонуклеаза, расщепляющая ДНК фага λ в присутствии $MgCl_2$ на ряд дискретных фрагментов. Активность фермента проявлялась в отсутствие АТР и S-аденозил-L-метионина. В соответствии с номенклатурой ферментов рестрикции [8] эндонуклеаза *B. brevis* была отнесена к рестриктазам II класса и обозначена как *Bbv*VI.

Процедура выделения рестриктазы *Bbv*VI включает в себя ультразвуковую дезинтеграцию микробных клеток, ультрацентрифугирование суспензии разрушенных клеток, фракционирование бесклеточного экстракта в полимерной двухфазной системе полиэтиленгликоль – декстран [9] и последовательную хроматографию на колонках с DEAE-сефаро-

зой, голубой сефарозой и гепарин-сефарозой. После проведения первых двух этапов хроматографии препарат фермента был пригоден для физического картирования ДНК, однако содержал некоторую примесь экзонуклеаз, которая удалалась при хроматографии на гепарин-сефарозе.

Выход очищенного препарата рестриктазы *Bbv*VI составил около 1800 ед./г микробной массы. Фермент сохранял активность при хранении в течение 6–9 мес при -20°C .

Рестриктаза *Bbv*VI проявляет максимальную активность при 45°C , хотя активна в интервале $25\text{--}37^{\circ}\text{C}$, при 50 и 56°C . Оптимум pH действия фермента находится в диапазоне $6,5\text{--}9,5$ (максимум при pH $8\text{--}8,5$). Оптимальная концентрация MgCl_2 составляет $5\text{--}10$ мМ. Ионы Mn^{2+} , Ni^{2+} ($0,1$; $1,0$ мМ), Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ($0,01$; $0,1$; $1,0$ мМ) заменяют Mg^{2+} в реакции гидролиза ДНК рестриктазой *Bbv*VI, однако в присутствии этих катионов не происходит полного расщепления ДНК-субстрата. Фермент активен при низкой ионной силе инкубационной среды: NaCl в концентрации выше 50 мМ подавляет активность рестриктазы *Bbv*VI, добавление KCl ($25\text{--}100$ мМ) не влияет на активность фермента.

При электрофорезе в агарозном геле продуктов гидролиза ДНК фага λ , плазмид *pBR322*, *pUC19* рестриктазой *Bbv*VI выявлено сходство картины фрагментации ДНК-субстратов с распределением продуктов расщепления этих ДНК рестриктазой *Ban*I [10], продуцируемой *B. aneurinolyticus*. В результате обработки плазмид *pBR322* и *pUC19* рестриктазами *Bbv*VI и *Ban*I обнаружено совпадение размеров наиболее крупных ДНК-фрагментов: *pUC19+Ban*I или *Bbv*VI соответственно 1274 и 1300 , 1097 и 1084 п. о., *pBR322+Ban*I или *Bbv*VI — соответственно 2027 и 2089 , 1123 и 1084 , 439 и 447 п. о. Величину меньших по размеру фрагментов ДНК достаточно точно оценить не удалось. При совместном и независимом гидролизе ДНК фага λ рестриктазами *Bbv*VI и *Ban*I выявлена идентичность картины фрагментации ДНК (рис. 1). Эти данные позволили предположить изошизомерию эндонуклеаз рестрикции *Bbv*VI и *Ban*I.

Для определения возможного присутствия сайтов узнавания для рестриктазы *Bbv*VI в составе полилинкера фага *M13mp19* был использован метод Брауна и Смита [11]. На одноцепочечной ДНК *M13mp19* с использованием «универсального» праймера и процедуры «квазитерминального» мечения [12] с помощью фрагмента Кленова ДНК полимеразы I был получен продукт элонгации, который после депротенинизации был расщеплен рестриктазой *Bbv*VI. Часть инкубационной смеси была затем использована для достройки лишних концов в присутствии фрагментов Кленова и смеси dNTP. Электрофоретическое сопоставление продуктов *Bbv*VI-гидролиза со стандартными образцами реакций секвенирования по методу Сенгера, полученными в той же процедуре квазитерминального мечения на *M13mp19* с «универсальным» праймером (рис. 2), показало, что рестриктаза *Bbv*VI расщепляет полилинкер *M13mp19* по *Kpn*I-сайту, образуя фрагменты с выступающими 5'-концами. Был сделан вывод, что рестриктаза *Bbv*VI, возможно, является изошизомером рестриктазы *Ban*I, узнающей последовательность G'GYRC'S. Для проверки предположения был проведен раздельный гидролиз ДНК плазмиды *pBR322* рестриктазами *Ban*I и *Bbv*VI. В *Bbv*VI-гидролизате обнаруживались фрагменты ДНК, как совпадающие с *Ban*I-фрагментами *pBR322*, так и соответствующие продуктам неполного расщепления, которые присутствовали даже при добавлении значительного избытка фермента. По-видимому, рестриктаза *Bbv*VI с различной эффективностью гидролизует участки узнавания, различающиеся вырожденными нуклеотидами в сайте G'GYRC'S. Для выявления минорных про-

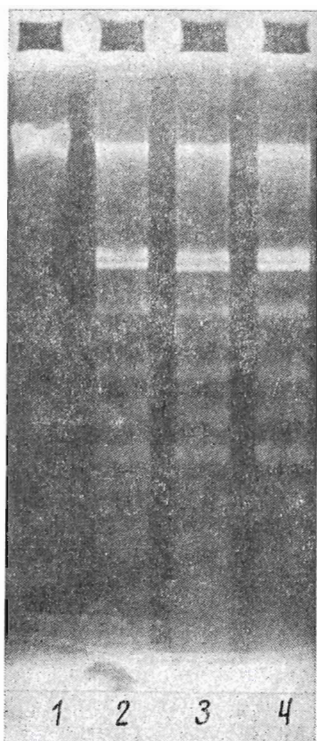


Рис. 1

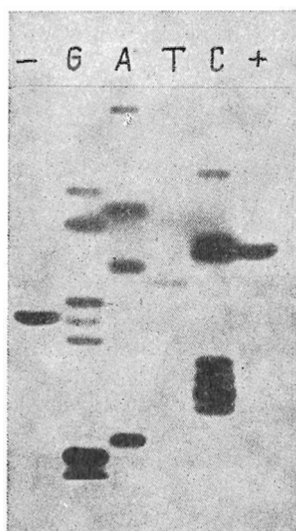


Рис. 2

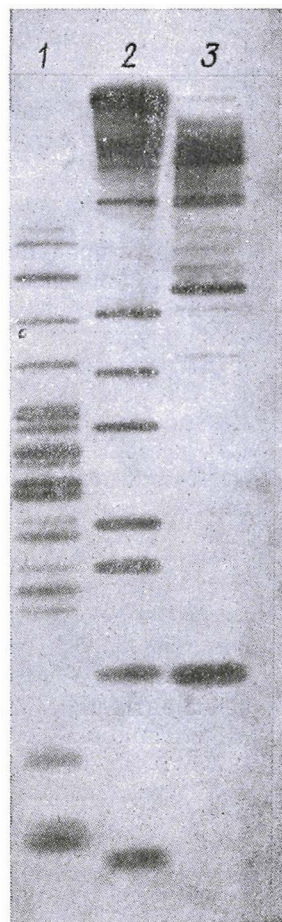


Рис. 3

Рис. 1. Электрофоретическое разделение в 1,2% агарозном геле продуктов расщепления ДНК фага λ рестриктазами: 1 – ДНК фага λ ; 2 – *Bbv*VI; 3 – *Ban*I; 4 – *Bbv*VI + *Ban*I

Рис. 2. Радиоавтограф 5% денатурирующего ПААГ, полученного при определении сайта рестриктазы *Bbv*VI. G, A, T, C – треки реакций секвенирования, «-» – перевар продукта элонгации *Bbv*VI, «+» – то же самое, но после достройки фрагментом Кленова

Рис. 3. Радиоавтограф 10% неденатурирующего ПААГ, полученный при определении картины гидролиза плазмиды pBR322 рестриктазой *Bbv*VI после мечения рестриционных фрагментов с помощью фрагмента Кленова и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$: 1 – pBR322 + *Hpa*II (стандарты, мол. массы), 2 – pBR322 + *Ban*I, 3 – pBR322 + *Bbv*VI

дуктов расщепления гидролизаты ДНК pBR322, полученные с помощью рестриктаз *Ban*I и *Bbv*VI, метили с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I в присутствии $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$ и анализировали электрофорезом в неденатурирующем 10% ПААГ (рис. 3). В *Bbv*VI-гидролизате присутствовали фрагменты, соответствующие по подвижности *Ban*I-фрагментам и отличающиеся по интенсивности сигнала на автордиограмме от основных *Ban*I- и *Bbv*VI-фрагментов примерно в 30 раз. Минорные сайты расщепления были локализованы на известной последовательности pBR322 с помощью компьютерного анализа, в результате чего был

сделан вывод о явном предпочтительном узнавании рестриктазой *Bbv*VI-сайтов GGTACC, GGCACC по сравнению с сайтами GGTGCC, GGCGCC. Таким образом, рестриктаза *Bbv*VI является изоизомером рестриктазы *Ban*I с предпочтительным узнаванием одних участков расщепления по сравнению с другими.

Экспериментальная часть

Штамм-продуцент *B. brevis* ВКМ В-679 получен из ВКМ АН СССР. Культуру выращивали в аэробных условиях при 37°С до конца логарифмической фазы роста. Биомассу собирали сепарированием, отмывали от культуральной жидкости и хранили при -20°С.

Использовали рестриктазы *Alu*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Lp*I (*Cl*AI), *Pae*I (*Sph*I), ДНК фага λ CI1857S7, выделенные как описано ранее [2-6]. Плазмиды pBR322 и pUC19 любезно предоставлены А. Г. Баснакьяном (ИБМХ АМН СССР). Рестриктаза *Eco*641 (*Ban*I), фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I — производства НПО «Фермент» (Вильнюс). Одноцепочечную ДНК фага M13mp19 выделяли по стандартной методике [13].

Голубая сефароза CL-6B, DEAE-сефароза CL-6B и гепарин-сефароза CL-6B — препараты фирмы Pharmacia (Швеция).

Электрофорез ДНК в агарозных и акриламидных гелях проводили согласно [14]. При определении размеров фрагментов ДНК стандартами служили *Pae*I, *Eco*RI, *Eco*RV и *Lp*I-фрагменты ДНК фага λ , *Hpa*II-фрагменты pBR322.

Активность рестриктаз определяли в оптимальных условиях инкубации [15]. За 1 ед. акт. рестриктаз принимали количество фермента, полностью гидролизующее 1 мкг ДНК фага λ за 1 ч в оптимальных условиях.

Выделение рестриктазы *Bbv*VI. 10 г биомассы *B. brevis* суспендировали в 20 мл буфера, pH 7,4, содержащего 10 мМ калий-фосфат, 0,1 мМ EDTA, 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ NaN₃ и 100 мкг/мл фенолметилсульфонилфторида, и обрабатывали (8×15 см) на ультразвуковом дезинтеграторе мощностью 150 Вт (MSE, Англия) при 2-4°С. Суспензию клеток центрифугировали (105 000g, 60 мин), к супернатанту добавляли NaCl до конечной концентрации 0,5 М и полимерную систему полиэтиленгликоль-6000 — декстран Т500 [9]. Смесь встряхивали и центрифугировали (10 000g, 20 мин). Верхнюю фазу (80% супернатанта) диализовали в течение ночи против буфера, pH 7,4, содержащего 10 мМ калий-фосфат, 0,1 мМ EDTA, 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 10% глицерин (буфер А), после чего наносили на колонку (1,6×25 см) с DEAE-сефарозой, уравновешенной буфером А. Не сорбированный на DEAE-сефарозе материал, содержащий активность рестриктазы *Bbv*VI, наносили на колонку с голубой сефарозой (0,9×15 см), уравновешенную буфером А. Белки элюировали линейным градиентом концентрации KCl (0-0,8 М). Объем градиента и фракций соответственно 150 и 5 мл. Фракции с рестриктазной активностью (0,2-0,3 М KCl) объединяли, диализовали против буфера А и наносили на колонку (0,9×10 см) с гепарин-сефарозой. Элюцию белков проводили линейным градиентом KCl (0-1,0 М), собирая фракции по 3 мл. Фермент элюировался при концентрации KCl в рабочем буфере 0,3-0,6 М. Фракции с активностью рестриктазы *Bbv*VI диализовали в течение ночи против буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 8,0), 0,1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина и 50% глицерин (об./об.).

Определение строения участка узнавания *Bbv*VI. В качестве матрицы использовали 1 пмоль одноцепочечной ДНК M13mp19. После отжи-

га матрицы с праймером использовали процедуру «квазитерминального» мечения [12]. $1/10$ часть инкубационной смеси применяли для получения продукта элонгации в присутствии раствора «чейз» (каждый dNTP 0,125 мМ) и фрагмента Кленова, а оставшиеся $9/10$ — для постановки реакций дидезоксисеквенирования. После удаления фрагмента Кленова экстракцией смесью фенол — хлороформ продукт элонгации пересаждали спиртом и расщепляли рестриктазой *Bbv*VI. Половину полученной инкубационной смеси использовали в реакции с 1 ед. фрагмента Кленова и раствора «чейз». На 5% денатурирующий ПААГ наносили $1/2$ из секвенирующих смесей и по $1/10$ из образцов, полученных после перевара продукта элонгации рестриктазой *Bbv*VI и последующей достройки выступающих 5'-концов фрагментом Кленова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roberts R. J. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. Suppl. P. 2331–2365.
2. Sokolov N. N., Fitzner A. B., Anikeitcheva N. V., Choroshoutina E. B., Samko O. T., Kolosha V. O., Fodor I., Votrin I. // Molec. Biol. Rep. 1985. V. 10. № 1. P. 159–161.
3. Соколов Н. Н., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В., Самко О. Т., Хорошугина Э. Б., Колоша В. О., Фодор И. // Биотехнология. 1987. Т. 3. № 5. С. 578–584.
4. Соколов Н. Н., Аникейчева Н. В., Фицнер А. Б., Самко О. Т., Хорошугина Э. Б., Калугин А. А. // Журн. микробиол. 1988. № 9. С. 86–89.
5. 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.
6. Соколов Н. Н., Колоша В. О., Фицнер А. Б., Аникейчева Н. В., Хорошугина Э. Б., Самко О. Т., Фодор И. И., Вотрин И. И. // Молекул. генетика. 1986. № 5. С. 24–26.
7. Соколов Н. Н., Фицнер А. Б., Хорошугина Э. Б., Хейслере М. Я. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1984. Т. 97. № 2. С. 163–165.
8. Boyer H. W. // Ann. Rev. Microbiol. 1971. V. 25. P. 153–176.
9. Schleif R. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 19–23.
10. Sugisaki H., Maekawa Y., Kanazawa S., Takanami M. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 19. P. 5747–5752.
11. Brown N. L., Smith M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 391–404.
12. Краев А. С., Миронов В. Н. // Молекулярн. биология. 1990. Т. 24. № 4. С. 1095–1099.
13. Messing J. // Meth. Enzymol. 1983. V. 101. P. 20–78.
14. Мануатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 479.
15. New England Biolabs. Catalog 1988/89.

Поступила в редакцию
26.IV.1991

N. N. SOKOLOV, M. A. EL DAROV*, N. V. ANIKEITCHEVA, I. V. KARFYCHEV*,
O. T. SAMKO, A. B. FITZNER, A. A. KALUGIN, E. B. CHOROSHOUTINA,
K. G. SKRYABIN*

SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE *Bbv*VI FROM *BACILLUS BREVIS*

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

A new restriction endonuclease *Bbv*VI free from contaminating nonspecific nucleases and phosphatases was isolated from the *Bacillus brevis* cells. The enzyme was purified by fractionating the sonicated cell-free extract in a two-phase PEG/dextran system and subsequent chromatographies on DEAE-sepharose, blue sepharose and heparin sepharose. The endonuclease *Bbv*VI displayed the maximal activity at 45°C, pH between 8.0 and 8.5, MgCl₂ concentration in the range of 5–10 mM and at the low ionic strength. It is shown that the enzyme cleaves the sequence G'GYPC'C, with the preferential cleavage of GGTACC and GGCACC sites as compared with GGTGCC and GGCGCC. Thus, the restriction endonuclease *Bbv*VI is a true isoschizomer of nuclease *Ban*I.