



УДК 577.152.314'14

Bsp153AI* и *BspM39I* – НОВЫЕ ИЗОШИЗОМЕРЫ РЕСТРИКТАЗЫ *PvuII

© 1996 г. А. А. Калугин, М. Рина*, М. А. Эльдаров**, М. Маркаки*,
С. В. Королев**, О. Т. Самко, Э. Б. Хорошутина, Н. Н. Соколов, В. Боуриотис*

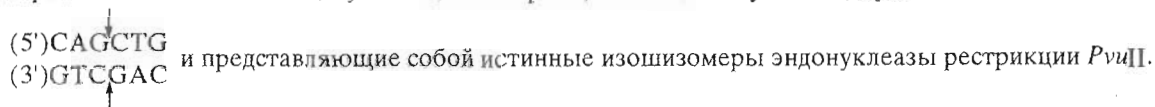
Институт биомедицинской химии РАН, 119832, Москва, Погодинская, 10;

* Институт молекулярной биологии и биотехнологии, 1515, Гераклион, 711 10 Крит, Греция;

** Центр "Биоинженерия" РАН, 117984, Москва, ул. Вавилова, 34/5

Поступила в редакцию 06.03.95 г. После доработки 26.10.95 г.

Из клеток двух штаммов *Bacillus species*, 153A и M39, выделены новые рестриктазы, *Bsp153AI* и *BspM39I* соответственно, узнающие и расщепляющие нуклеотидную последовательность



Ключевые слова: рестрикционные эндонуклеазы II типа, рестриктазы *Bsp153AI* и *BspM39I*, изошизомеры *PvuII*, *Bacillus species*.

Неослабевающий интерес исследователей к поиску новых эндонуклеаз рестрикции типа II связан как с их широким использованием в молекулярно-генетических и биотехнологических работах, так и с тем обстоятельством, что эти ферменты ввиду своей высокой специфичности к узнаваемому участку нуклеотидной последовательности ДНК являются удобной моделью для изучения белок-нуклеиновых взаимодействий [1]. В ходе предыдущих исследований нами было обнаружено более 80 продуцентов новых рестриктаз, около 30 ферментов рестрикции выделено и охарактеризовано [2 - 8].

Цель настоящей работы – очистка и идентификация двух новых сайт-специфических эндонуклеаз, продуцируемых штаммами *B. species* 153A и M39.

При скринировании ряда штаммов *Bacillus* на присутствие специфической эндонуклеазной активности мы обнаружили два продуцента эндонуклеаз рестрикции типа II, которые в соответствии с общепринятой номенклатурой [9] были обозначены как *Bsp153AI* и *BspM39I*. Оба фермента были выделены и очищены (см. "Экспер. часть").

Выход рестриктаз *Bsp153AI* и *BspM39I* составил соответственно около 3000 и 1000 ед. акт./г микробной массы, уд. акт. – 2000 ед./мл.

Рестриктаза *Bsp153AI* проявляет максимальную активность в следующих условиях: 10 мМ трис-НСI-буфер (рН 7.9), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит, 100 мкг/мл бычьего сывроточного альбумина, 37°C. Для рестриктазы

BspM39I оптимальные условия близки: 50 мМ трис-НСI-буфер (рН 7.9), 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит, 100 мкг/мл бычьего сывроточного альбумина, 37°C.

Изучение субстратной специфичности рестриктаз *B. species* показало, что эти ферменты не гидролизуют ДНК ФХ174, имеют по одному участку расщепления на плаزمидах рBR322 и рUC19, по три на ДНК фага T7 и обезьяньего вируса SV40 и более восьми сайтов расщепления на ДНК фага λ. Сооставление результатов расщепления, а также размеров фрагментов, образуемых рестриктазами *Bsp153AI* и *BspM39I* на ДНК фага λ, фага T7 и SV40, с соответствующими табличными данными [10] позволило предположить, что исследуемые эндонуклеазы рестрикции узнают

последовательность $\begin{array}{c} (5')\text{CAGCTG} \\ (3')\text{GTTCGAC} \end{array}$ являющуюся сайтом узнавания рестриктазы *PvuII*. [11]. Об этом свидетельствует также идентичность картины фрагментации ДНК фага λ в опытах по параллельному и комбинированному гидролизу рестриктазами *Bsp153AI* и *PvuII* (рис. 1). Аналогичная картина была получена и для рестриктазы *BspM39I* (данные не приводятся).

Для подтверждения первичной структуры участков узнавания обеих эндонуклеаз, а также для точного определения места расщепления ДНК провели анализ по методу Брауна и Смита [12]. Электрофоретическое сопоставление продуктов элонгации, полученных на ДНК фага M13mp18 с "гибридизационным" праймером и гидролизованных затем либо рестриктазой *Bsp153AI*, либо

BspM39I, со стандартными образцами реакции секвенирования той же ДНК по методу Сэнгера показало (рис. 2), что для обеих рестриктаз независимо от последующей обработки фрагментом Кленова основная полоса гидролизованного продукта элонгации комигрирует с фрагментом, соответствующим третьему звену (G) в узнаваемой последовательности (5')CAGCTG, что свидетельствует о расщеплении ДНК точно в середине участка узнавания с образованием фрагментов с "тупыми" концами. Таким образом, исходя из данных физического картирования ДНК и секвенирования участков узнавания, можно сделать вывод, что рестриктазы *Bsp153AI* и *BspM39I* являются изошизомерами рестриктазы *PvuII* со специфичностью:



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали фосфоцеллюлозу P11, DEAE-целлюлозу DE-52 (Whatman, Англия); трис, дитиотреит, бычий сывороточный альбумин, глицерин (Serva, Германия); агарозу (Bio-Rad, США); рестриктазу *PvuII*, плазмиды pBR322 и pUC19 – производства MBI Fermentas (Литва). ДНК фага λ C11857S7 выделяли как описано ранее [13]. ДНК Ad2, T7, SV40, ФХ174 – препараты фирмы New England Biolabs (США), "секвенза" фага T7 (версия 2.0) – производства New England Biolabs (США).

Штаммы *B. species* 153A и M39 были любезно предоставлены А. Шульгой (ИБФМ РАН).

Микроорганизмы выращивали в ферментере Marubishi MSYN 30 L (Япония) при 37°С до достижения поздней логарифмической фазы роста на среде, содержащей (г/л): триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 10. Биомассу хранили при –20°С.

Активность рестриктаз определяли в оптимальных условиях инкубационной смеси [10]. За 1 ед. акт. рестриктаз принимали количество фермента (в мкл), полностью гидролизующее 1 мкг ДНК фага λ за 1 ч при оптимальных условиях.

Все операции по выделению ферментов проводили при 4°С. Суспензию клеток в 20 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7.0), содержащем 7 мМ 2-меркаптоэтанол и 1 мМ EDTA, озвучивали (10 × 15 с) на ультразвуковом дезинтеграторе (MSE, Англия). После ультрацентрифугирования (60000g, 60 мин) проводили хроматографическую очистку ферментов из надосадочной жидкости, включавшую в себя:

1) хроматографию на колонке с фосфоцеллюлозой P11 (зона элюции рестриктаз *Bsp153AI* и

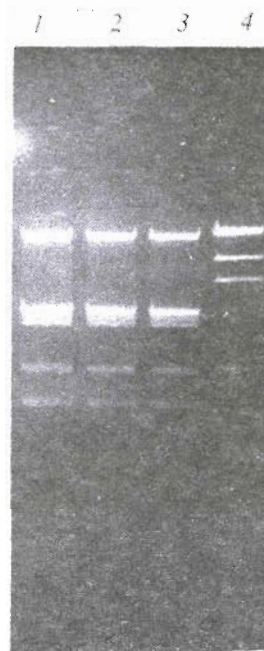


Рис. 1. Электрофоретическое разделение в 1% агарозном геле продуктов гидролиза ДНК фага λ , свидетельствующее об идентичности участков узнавания рестриктаз *PvuII* и *Bsp153AI*. 1 – ДНК фага λ + *Bsp153AI*; 2 – ДНК фага λ + *PvuII*; 3 – ДНК фага λ + *Bsp153AI* + *PvuII*; 4 – ДНК фага λ + *HindIII*.

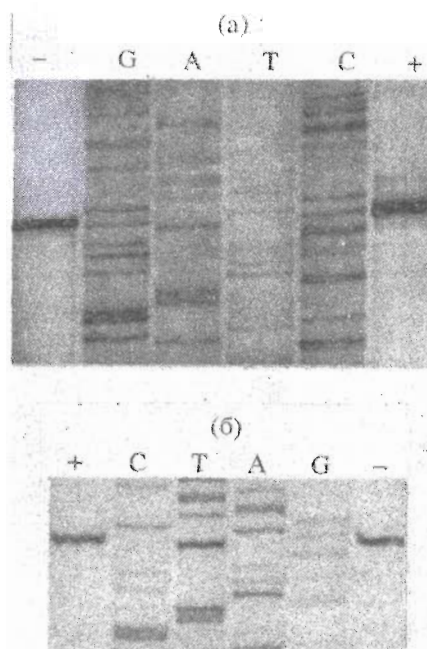


Рис. 2. Определение структуры участков узнавания рестриктаз *Bsp153AI* (а) и *BspM39I* (б). Гель-электрофорез в 5% денатурирующем ПААГ. G, A, T, C – треки реакции секвенирования ДНК фага M13mp19 с "гибридизационным праймером". «-» – продукт элонгации "гибридизационного праймера" на ДНК фага M13mp19, гидролизованной соответствующей рестриктазой; «+» – то же самое, но после достройки фрагментом Кленова.

BspM39I соответственно 0.5 - 0.6 и 0.58 - 0.64 М NaCl);

2) диализ фракций со специфической эндонуклеазной активностью с целью смены буферного раствора;

3) хроматографию на колонке с DEAE-целлюлозой (зона элюции рестриктаз *Bsp153AI* и *BspM39I* соответственно 0.3 - 0.4 и 0.2 - 0.3 М NaCl);

4) концентрирование активных фракций рестриктаз против буфера, содержавшего 10 мМ трис-НСl (рН 7.5), 0.1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит и 50% (об/об) глицерина.

Определение строения участка узнавания *Bsp153AI* и *BspM39I*. В качестве матрицы использовали 2 пмоль одонитевой ДНК фага M13mp19, содержащей единственный сайт рестриктазы *PvuII* в положении 6053. Для получения "секвенирующей лестницы" матрицу использовали в реакциях секвенирования по Сэнгеру с использованием "гибридизационного праймера" и секвенназы фага T7 [14]. В параллельной реакции (1/5 часть реакционной смеси после процедуры "квазитерминального мечения") меченый тяж достраивали в присутствии всех трех dNTP (каждый в концентрации 0.125 мМ) и вновь синтезированная двуниевая ДНК была использована как субстрат для гидролиза рестриктазами *Bsp153AI* и *BspM39I*. Для этого инкубационную смесь после инактивации секвенназы прогреванием разбавляли в однократном буфере для *Bsp153AI* или *BspM39I* до объема 20 мкл и гидролизовали 2 ед. акт. фермента в течение 30 мин. Половину инкубационной смеси после расщепления рестриктазой использовали для достройки липких концов в присутствии фрагмента Кленова и смеси dNTP.

Авторы признательны Г.И. Либрик за техническую помощь при получении бактериальной биомассы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McClarin J.A., Frederick C.A., Wang Bi-C., Greene P., Boyer H.W., Grable J., Rosenberg J.M. // Science. 1986. V. 234. P. 1526 - 1541.
2. Sokolov N.N., Fitzner A.B., Anikeitcheva N.V., Khoroshoutina E.B., Samko O.T., Kalosha V.O., Fodor I.I., Votrin I.I. // Molec. Biol. Rep. 1985. V. 10. P. 159 - 161.
3. Rina M., Karagouni A., Pagomenou M., Tsigos I., Bouriotis V. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 6341.
4. Rina M., Karagouni A., Pagomenou M., Bouriotis V. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 6342.
5. Соколов Н.Н., Эльдаров М.А., Аникейчева Н.В., Карпычев И.В., Самко О.Т., Фицнер А.Б., Калугин А.А., Хорошутина Э.Б., Скрибин К.Г. // Био-орган. химия. 1992. Т. 18. С. 47 - 51.
6. Eldarov M.A., Karpichev I.V., Samko O.T., Anikeitcheva N.V., Kalugin A.A., Khoroshoutina E.B., Sokolov N.N. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 2896.
7. Sokolov N.N., Fitzner A.B., Eldarov M.A., Anikeitcheva N.V., Kalugin A.A., Samko O.T., Khoroshoutina E.B., Fodor I.I. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 2897.
8. Eldarov M.A., Karpichev I.V., Samko O.T., Anikeitcheva N.V., Kalugin A.A., Khoroshoutina E.B., Sokolov N.N. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 2898.
9. Smith H.O., Nathans D. // J. Mol. Biol. 1973. V. 81. P. 153 - 176.
10. Каталог фирмы New England Biolabs (1992).
11. Gingeras T.R., Greenough L., Schildkraut I., Roberts R.J. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. P. 4525 - 4536.
12. Brown N.L., Smith M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 391 - 404.
13. Соколов Н.Н., Вотрин И.И., Фицнер А.Б., Аникейчева Н.В. // Биохимия. 1978. Т. 43. С. 865 - 871.
14. Tabor S., Richardson C.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 4767 - 4771.

Bsp153AI and *BspM39I*—New Isoschizomers of Restriction Endonuclease *PvuII*

A. A. Kalugin, M. Rina, M. A. El'darov, M. Markaki, S. V. Korolev, O. T. Samko, E. B. Khoroshutina, N. N. Sokolov, and V. Bouriotis

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya 10, Moscow, 119832 Russia
Institute of Molecular Biology and Biotechnology, 1515, Heraklion, 711 10 Crete, Greece
Bioinzheneriya Center, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 34/5, Moscow, 117984 Russia

Abstract—New restriction endonucleases, *Bsp153AI* and *BspM39I*, were isolated from *Bacillus species* strains 153A and M39, respectively. The enzymes recognize and cleave the nucleotide sequence

(5')CAGCTG
 ↓
 (3')GTCGAC and are true isoschizomers of restriction endonuclease *PvuII*.

Key words: restriction endonucleases class II, restriction endonucleases *Bsp153AI* and *BspM39I*, *PvuII* isoschizomers, *Bacillus species*.