



УДК 577.155.07

ВЫДЕЛЕНИЕ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ *EcoRI**
ПРИ ПОМОЩИ ИММУНОСОРБЕНТА*Ерусланов В. В., Крамаров В. М., Смолянинов В. В.,
Боровик Р. В.**Главное управление микробиологической промышленности
при Совете Министров СССР, Москва*

Описан простой и хорошо воспроизводимый метод выделения сайт-специфической эндонуклеазы *EcoRI*, основанный на хроматографии фермента на колонке, заполненной антителами, иммобилизованными на сефарозе 4В. Связывание фермента с антителами производится непосредственно из клеточного экстракта, и после отмывки носителя от несвязанного белка фермент элюируется. Выделение гомогенного фермента (20 000 ед. акт. из 1 г биомассы) происходит в одну стадию и занимает 3 ч. Полученный препарат стабилен при хранении в 50% глицерине при -15°C более 6 месяцев. В работе также описан метод очистки эндонуклеазы *EcoRI* до гомогенного состояния в две хроматографические стадии: на колонках с фосфоцеллюлозой и сефадексом G-150. Фермент, полученный этим методом, не содержит неспецифических нуклеаз и обладает удельной активностью 750 000 ед. акт./мг белка (3750 ед. акт. из 1 г биомассы).

Сайт-специфические эндонуклеазы стали в настоящее время незаменимым инструментом в исследованиях нуклеиновых кислот. Для успешной работы в этой области необходимы ферменты, свободные от примесей неспецифических эндо- и экзонуклеаз. Совершенствованию методов очистки посвящено большое количество работ. Наряду с традиционными ионообменными носителями (DEAE-целлюлозой, фосфоцеллюлозой) используется хроматография на ДНК-целлюлозе [2], гепарин-агарозе [3], ω -аминоалкилагарозе [4], осаждение полиэтиленимином [5]. При этом, как правило, очистка ферментов от неспецифических нуклеаз достигается после 3–4 хроматографических ступеней [4, 5], а получение гомогенного фермента требует 5–7 стадий очистки [2, 6, 7].

В настоящей работе предложены два метода выделения гомогенного препарата специфической эндонуклеазы *EcoRI*, существенно упрощающих общую процедуру очистки. Первый метод основан на применении двух хроматографических ступеней очистки клеточного экстракта, второй использует для выделения эндонуклеазы антитела, иммобилизованные на сефарозе 4В, и позволяет выделить фермент, свободный от неспецифических нуклеаз, в одну стадию.

Двухстадийная схема выделения эндонуклеазы *EcoRI* включает в себя в качестве первого этапа ионообменную хроматографию экстракта клеток *E. coli* на колонке с фосфоцеллюлозой и затем фракционирование гелефильтрацией на сефадексе G-150. В таблице представлены результаты очистки эндонуклеазы *EcoRI* двухстадийной процедурой.

* Название фермента соответствует номенклатуре, предложенной в работе [1].

Очистка эндонуклеазы *EcoRI*

Стадии очистки	Содержание белка, мг	Активность	
		общая, ед. акт.	удельная, ед. акт./мг белка
Экстракт после осаждения дебриса	73 000	—	—
Фосфоцеллюлоза	225	1·10 ⁷	44 000
Сефадекс G-150	5,1	3,8·10 ⁶	750 000

Анализ профиля элюции клеточного экстракта при разделении его на фосфоцеллюлозе в градиенте концентрации KCl (см. «Экспериментальную часть») показал, что эндонуклеазную активность проявляли все фракции, начиная от 0,4 M KCl и до конца градиента, причем основная масса фермента выходит в пределах концентрации KCl от 0,56 до 0,66 M. Согласно данным электрофореза (рис. 1), стадия хроматографии клеточного экстракта на фосфоцеллюлозе приводит к очистке от высокомолекулярных белковых компонентов, и фракции, содержащие эндонуклеазу *EcoRI*, включают в себя в основном низкомолекулярные белки ($M \leq 35\ 000$).

Последующее проведение гель-фильтрации на сефадексе G-150 (рис. 2) позволяет разделить смесь белков, различающихся по молекулярным массам. Анализ элюата электрофорезом в полиакриламидном геле показал, что часть фракций, обладающих эндонуклеазной активностью (24–32), содержит гомогенный белковый препарат. В 11% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия подвижность выделенного белка относительно бромфенолового синего составляла $\sim 0,63$. Сравнение с реперными белками свидетельствует о соответствии данной подвижности молекулярной массе $\sim 29\ 000$, что совпадает с молекулярной массой эндонуклеазы *EcoRI*, установленной ранее [2, 5]. Следует отметить, что при гель-фильтрации на сефадексе G-150 фермент элюируется с объемом, соответствующим молекулярной массе около 60 000, т. е., по-видимому, в нативных условиях эндонуклеаза существует в виде димера.

Для доказательства того, что полоса белка в геле соответствует эндонуклеазе *EcoRI*, проведена элюция белка из геля. Суммарная активность фермента, элюированного из геля, составляла 20% активности, нанесенной на гель. Наличие характерных фрагментов после гидролиза ДНК фага λ элюированным белком подтверждает соответствие выделенного препарата белка эндонуклеазе *EcoRI*.

Описанный метод получения эндонуклеазы *EcoRI* прост и позволяет избежать таких стадий, как осаждение сульфатом аммония и сульфатом стрептомицина, вызывающих неудобства при работе с большими объемами. Выход фермента по описанной методике — 5,1 мг на 1 кг биомассы, тогда как по литературным данным [6] (6 стадий очистки) — 0,6 мг на 1 кг биомассы, а по методу [2] — 8 мг на 1 кг биомассы (5 стадий очистки). Сравнить активность выделенного нами фермента с ферментом, полученным в других работах [2, 6], не удалось из-за использования разных субстратов.

Выделение эндонуклеазы EcoRI при помощи иммуносорбента. Процедура выделения гомогенной эндонуклеазы по данному методу включала в себя получение моноклональной антисыворотки к очищенному препарату фермента, приготовление иммуносорбента и стадию иммуносорбционной хроматографии.

Иммунизация кроликов очищенной по двухстадийной методике эндонуклеазой *EcoRI* позволяет получить достаточно активные и специфичные антисыворотки (см. «Экспериментальную часть»). Одним из основных вопросов, возникающих при получении такой сыворотки, является вопрос о минимальных количествах фермента, которые могут быть использованы для иммунизации с максимальным эффектом. Выбранная схема иммуни-

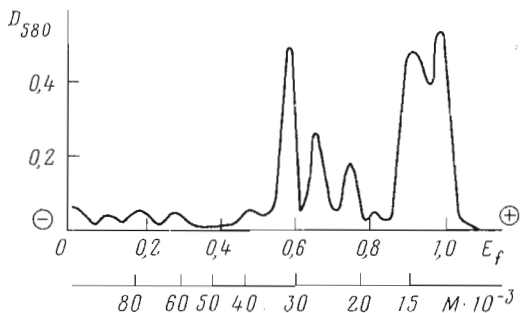


Рис. 1. Денситометрический профиль электрофорезграммы белков (11% полиакриламидный гель, 0,1% додецилсульфат натрия [8]) из объединенных фракций (0,56—0,66 М КСl) после разделения на фосфоцеллюлозе (см. «Экспериментальную часть»). Значения электрофоретической подвижности (относительно бромфенолового синего) соотношены с молекулярным весом реперных белков

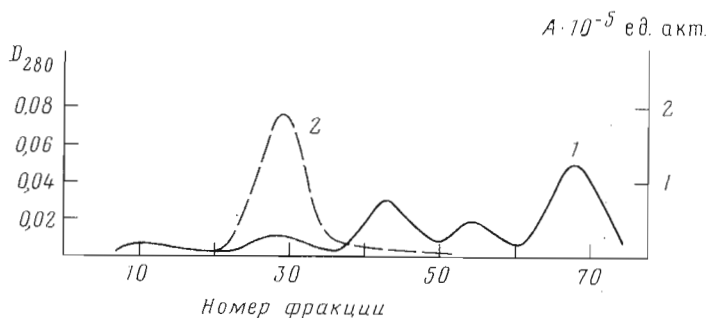


Рис. 2. Гель-фильтрация на сефадексе G-150 концентрированных фракций (0,56—0,66 М КСl), выделенных при разделении на фосфоцеллюлозе. Колонка 5×100 см, объем фракций 20 мл (см. «Экспериментальную часть»): 1 — поглощение, 2 — эндонуклеазная активность

зации (в лимфоузле, а затем подкожно по 50 мкг фермента), как показали исследования, позволяет ограничиться для всего цикла иммунизации 250 мкг фермента, т. е. концентрация используемого для иммунизации белка была значительно ниже минимальных количеств, описанных в литературе. Такие количества антигена обеспечивают нарастание уровня антител в ответ на каждую иммунизацию, и после пятой иммунизации кролика была получена антисыворотка с титром 1 : 32.

На рис. 3 изображена реакция кольцепреципитации с очищенной эндонуклеазой в центральной лунке и антисывороткой в периферических лунках. Видны две линии преципитации после третьей иммунизации (рис. 3а) и только одна линия после восьмой иммунизации (рис. 3б).

Две линии преципитации, выявленные в экспериментах с преципитацией в агаре после третьей иммунизации кроликов, по-видимому, свидетельствуют о наличии макроглобулина М. Известно, что гипериммунизация может сопровождаться переключением синтеза макроглобулина на синтез иммуноглобулинов, причем 0,2 М 2-меркаптоэтанол избирательно разрушает макроглобулин М. Действительно, анализ продуктов реакцией кольцепреципитации после обработки 2-меркаптоэтанолом показал (рис. 4), что 2-я линия преципитации исчезла, т. е. она обусловлена присутствием макроглобулина М.

Для определения ингибирующих свойств полученных антисывороток пробы с возрастающими концентрациями нормальной и иммунной сывороток инкубировали с очищенной эндонуклеазой EcoRI. Полученные ре-

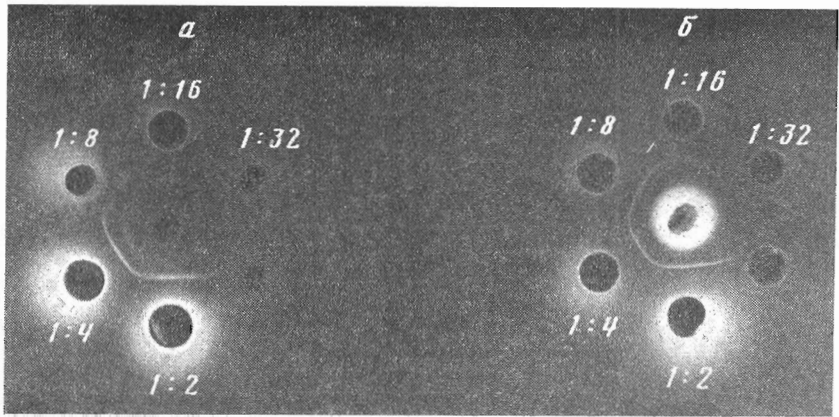


Рис. 3. Реакция кольцепреципитации в геле агаре. Центральные лунки – эндонуклеаза *EcoRI*. Периферические лунки – антисыворотка: а – после третьей иммунизации, б – после восьмой иммунизации. Цифрами указано разведение

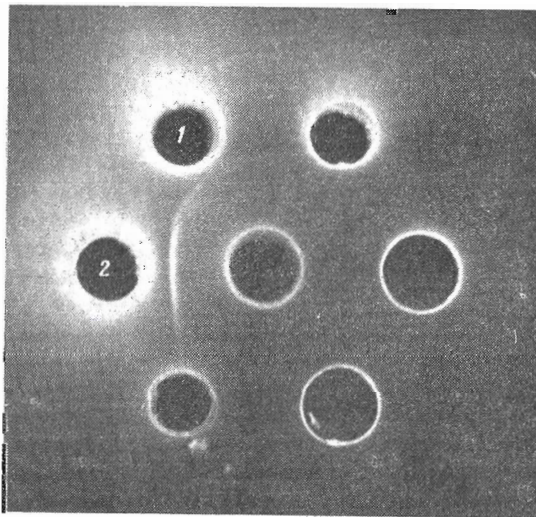


Рис. 4. Реакция кольцепреципитации в геле агаре. Центральная лунка – эндонуклеаза *EcoRI*. Периферическая лунка 1 – антисыворотка после 5 иммунизаций; периферическая лунка 2 – та же антисыворотка, обработанная меркаптоэтанолом

зультаты показывают (рис. 5), что падение общей активности фермента зависит от количества белка антисыворотки. Это говорит о наличии в ней специфических антител к *EcoRI*. Нормальная кроличья сыворотка не ингибировала активность эндонуклеазы даже в высоких концентрациях и в дальнейшем была использована как контроль (рис. 5). С увеличением концентрации белка антисыворотки процент ингибирования возрастает. Специфичность иммуноглобулинов к эндонуклеазе *EcoRI* была проверена при использовании эндонуклеаз *Sal I*, *Bam HI*. Антисыворотка к *EcoRI* не угнетала эндонуклеазной активности сайт-специфических эндонуклеаз *Sal I*, *Bam HI*, т. е. она была строго специфична по отношению к *EcoRI*.

Полученные иммуноглобулины были иммобилизованы на сефарозе 4В и использованы для выделения эндонуклеазы *EcoRI* (см. «Экспериментальную часть»). На колонку, заполненную иммуносорбентом, наносили клеточный экстракт из клеток, содержащих *EcoRI*, и инкубировали 1 ч

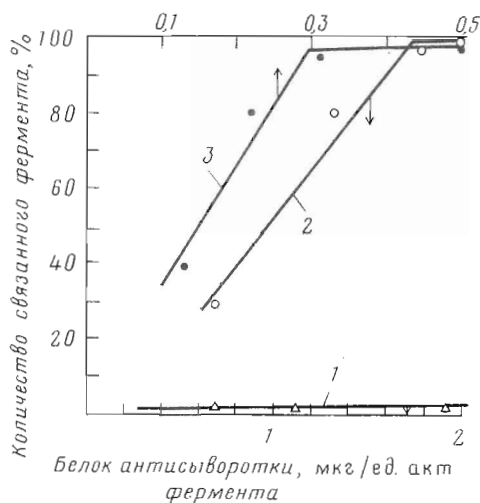


Рис. 5

Рис. 5. Ингибирование эндонуклеазной активности *EcoRI* сывороткой, не содержащей антител к *EcoRI* (1); сывороткой, содержащей антитела к *EcoRI* (2); иммуноглобулинами, выделенными из иммунной сыворотки (3)

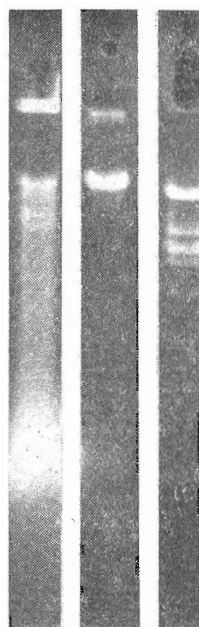


Рис. 6

Рис. 6. Анализ эндонуклеазной активности фракций, элюированных с иммуносорбента. Приведен электрофорез в геле агарозы (см. «Экспериментальную часть») продуктов гидролиза ДНК фάга λ аликвотами (5 мкл) проб из первых фракций промывки после инкубации клеточного экстракта с иммуносорбентом — 1; из фракций промывки непосредственно перед элюцией фермента — 2; из фракций, содержащих эндонуклеазу *EcoRI*, элюированную с иммуносорбента, — 3

при 37° С для связывания *EcoRI* с антителами. Оставшийся несвязанным фермент удалялся при последующей промывке колонки вместе с остальными белками клеточного экстракта (рис. 6). При промывке для удаления загрязняющих примесей (следы постороннего белка, нуклеиновых кислот) использовали объем буфера, равный 3—4 объемам колонки, и затем проводили элюцию связанной антителами эндонуклеазы *EcoRI* 50 мМ трис-НСl-буфером, рН 7,8, содержащим 0,02 М NH_4OH , 0,4 М КСl и 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид. Фракции, содержащие *EcoRI*, объединяли и проверяли в них содержание неспецифических нуклеаз (см. «Экспериментальную часть»).

Выделение эндонуклеазы *EcoRI* при помощи иммуносорбента занимает 3 ч. В течение 6 месяцев иммуносорбент использовали 9 раз. Полученный фермент был высокой активности (20 000 ед. из 1 г биомассы. *E. coli* RY13) и не содержал неспецифических эндо- и экзонуклеаз. Удельную активность фермента определить не удалось из-за низкой концентрации его в растворе. Препарат фермента был подвергнут электрофокусировке. Контролем служила гомогенная эндонуклеаза *EcoRI*, полученная без использования иммуносорбента. Электрофокусировка показала, что препарат фермента, полученный иммуносорбцией, содержал только белковый компонент, соответствующий эндонуклеазе *EcoRI* в контроле.

Применение иммуносорбентов для выделения подобных ферментов представляет значительный интерес, так как этот метод быстр и прост

в использовании и позволяет получить в одну стадию высокоочищенный фермент.

Антисыворотки можно использовать не только для качественного тестирования ферментов, как показано в нашей работе, но и для количественного определения ферментов либо методом радиальной иммунодиффузии, либо «ракетным» иммуноэлектрофорезом. Эти методы важны при оценке эффективности способа выращивания биомассы.

Экспериментальная часть

Для выделения сайт-специфической эндонуклеазы *EcoRI* использовали биомассу клеток *E. coli* RY13. Культуру выращивали до поздней логарифмической фазы роста на среде, содержащей в 1 л: 5 г NaCl, 3 г дрожжевого экстракта (СССР), 3 г бакто-триптона (Difco, США), 5 г бакто-пептона (ЧССР), 200 мг стрептомицинасульфата, pH 7,0–7,3, и затем собирали центрифугированием. ДНК фага λ получали по методу, описанному ранее [6].

В работе использовали: EDTA (селектон Б), акриламид, бисакриламид, глицин, дитиотреит (Reanal, Венгрия), бромид этидия, агарозу, 2-меркаптоэтанол (Sigma, США), тригон X-100 (Ferak, ФРГ), фосфоцеллюлозу (P-11, Whatman, США), додецилсульфат натрия (Serva, ФРГ), бычий сывороточный альбумин (Sigma, США), ДНКазу I (Merck, ФРГ).

Электрофорез белков проводили в 11% полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия [8]. Столбики геля после электрофореза и окрашивания кумасси ярко-голубым R-250 сканировали на приборе фирмы «ISCO» (США) при 580 нм. Электрофокусировку в геле акриламида проводили на приборе «Multiphor» (ЛКВ, Швеция). Операции, связанные с дезинтеграцией клеток и хроматографией, выполняли при 3–5° С.

Ультрафильтрацию растворов белков проводили на приборе ФМ-01 с мембранами МВ1 (СКБ АП АН СССР, Ленинград). Белок в растворе определяли по методу Бредфорда [9].

Активность эндонуклеазы *EcoRI* определяли по расщеплению ДНК фага λ . Реакционная смесь содержала в 50 мкл: 0,1 М трис-HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ EDTA и 1 мкг ДНК фага λ . К этому раствору прибавляли фермент и смесь инкубировали 1 ч при 37° С. Продукты реакции анализировали электрофорезом в геле 0,8% агарозы. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое полностью гидролизует в этих условиях 1 мкг ДНК фага λ за 1 ч при 37° С. Электрофорез ДНК проводили в аппарате, аналогичном описанному в работе Стадиера [10], в трис-боратной системе [6]. После электрофореза (2 ч при 70 В) гель окрашивали в растворе бромид аэтидия (1 мкг/мл) в течение 30 мин, после чего фрагменты ДНК детектировали при облучении УФ-лампой.

Присутствие неспецифических эндонуклеаз в препарате эндонуклеазы *EcoRI* проверяли электрофорезом продуктов 24-часового гидролиза 1 мкг ДНК фага λ препаратом *EcoRI*, содержащим 30 ед. акт. Четкость полос в геле агарозы после электрофореза указывала на отсутствие неспецифических эндонуклеаз. Присутствие неспецифических экзонуклеаз проверяли по «сшивке» ДНК лигазой фага T₄ фрагментов ДНК фага λ [11], полученных при гидролизе эндонуклеазой *EcoRI*.

Очистка эндонуклеазы EcoRI двустадийным методом: биомассу клеток *E. coli* RY13 (1 кг) суспендировали в 2,5 л буфера А, содержащего 20 мМ КН₂РO₄ (pH 7,0), 5 мМ 2-меркаптоэтанол и 1 мМ EDTA, затем клетки дезинтегрировали на гомогенизаторе Монтон — Гаулин методом экструзии при давлении 500–600 атм. К суспензии разрушенных клеток прибавляли раствор MgCl₂ до конечной концентрации 10 мМ и 0,13 мг ДНКазы I. После перемешивания в течение 40 мин смесь центрифугировали 1 ч при

17 000g. Супернатант собирали, осадок промывали буфером А, после центрифугирования при тех же условиях оба супернатанта объединяли (общий объем 2,5 л) и добавляли раствор 2 М КСl до концентрации 0,1 М. Этот раствор наносили на колонку (5×40 см) с фосфоцеллюлозой, уравновешенной буфером А+0,1 М КСl. Колонку промывали 1 л буфера А+0,25 М КСl, затем элюировали белки в линейном градиенте КСl (от 0,25 до 0,8 М) в буфере А со скоростью 250 мл/ч. Общий объем градиента 6 л.

Фракции 0,56–0,66 М КСl объединяли (900 мл) и концентрировали ультрафильтрацией через мембрану МВl-II до 160 мл (концентрация белка 1,5 мг/мл). Затем порциями по 50 мл этот концентрат наносили на колонку (5×100 см) с сефадексом G-150, уравновешенным буфером А, содержащим 0,5 М NaCl, 0,07% тритон X-100 и 10% глицерин. Элюцию проводили тем же буфером со скоростью 24 мл/ч, объем фракций 20 мл. Фракции 24–32, содержащие, согласно данным аналитического электрофореза в полиакриламидном геле, один белковый компонент, объединяли, концентрировали ультрафильтрацией через мембрану МВl-II и промывали буфером с 20 мМ КН₂РO₄ (рН 7,0), 5 мМ дитиотрептоном, 1 мМ EDTA и 0,3 М NaCl. Концентрация белка после трех разделений при этом составила 0,2 мг/мл, общий объем 25 мл. К концентрированному раствору прибавляли глицерин до конечной концентрации 50%, этот раствор хранили при –15° С. В этих условиях ферментативная активность эндонуклеазы *EcoRI* сохранялась неизменной более 6 месяцев.

Одностадийное выделение эндонуклеазы EcoRI. Для получения антител к эндонуклеазе *EcoRI* проведена иммунизация кроликов гомогенным препаратом эндонуклеазы *EcoRI*. Антиген вводили в бедренный лимфатический узел, используя 0,25 мл раствора, содержащего 50 мг белка, 0,14 М NaCl и 0,125 мл адьюванта Фрейнда. Через 14 сут проводили повторную иммунизацию (внутрикожно) таким же раствором. С интервалом в 14 сут проводили еще 3 иммунизации подкожно таким же раствором. На 8-е сутки после последней иммунизации брали у кролика кровь из ушной краевой вены. Титр сыворотки составлял 1 : 32 по реакции кольцепреципитации. Глобулиновую фракцию высаливали сульфатом аммония (50% насыщения). Осадок после центрифугирования растворяли в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 8,0, содержащем 0,14 М NaCl, и диализовали против того же буфера. Иммуноглобулины наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (2,5×20 см), уравновешанную тем же буфером, и элюировали 0,4 М трис-НСl-буфером, рН 8,0, со скоростью 30 мл/ч. Фракции иммуноглобулинов (30–50 мг) объединяли, диализовали против 0,1 М NaНСO₃, рН 8,3, содержащего 0,5 М NaCl, и затем использовали для получения иммуносорбента.

Иммуносорбент получали присоединением антител к сефарозе 4 В, активированной бромцианом [12]. 30 мг иммуноглобулинов в 5 мл 0,1 М NaНСO₃, рН 8,3, содержащих 0,5 М NaCl, прибавляли к 3 мл активированной сефарозы 4 В, суспендированной в 3 мл того же буфера, и оставляли при 4° С на 20 ч. Связывание составляло 91% от взятого в реакцию белка (8,2 мг белка на 1 мл сефарозы 4 В). Колонку с иммуносорбентом (~5 мл) уравновешивали 50 мМ трис-НСl-буфером, рН 7,8, содержащим 2% тритон X-100.

2 г клеток *E. coli* RY13 суспендировали в 2 мл 50 мМ трис-НСl-буфера, рН 7,8, и разрушали ультразвуком. Суспензию центрифугировали при 50 000g, супернатант (2,5 мл) смешивали с равным объемом 50 мМ трис-НСl-буфера, рН 7,8, содержащего 2% тритон X-100, и наносили на колонку с иммуносорбентом.

Колонку инкубировали 1 ч при 37° С, затем промывали со скоростью 15 мл/ч 50 мМ трис-НСl-буфером, рН 7,8, содержащим 0,3 М КСl, до исчезновения поглощения (λ_{280}) элюата (~15 мл раствора), собирая фракции по 2 мл. Фермент элюировали 50 мМ трис-НСl-буфером, рН 7,8, содержащим 0,02 М NH₂OH, 0,4 М КСl и 0,1 мМ фенолметилсульфонилфто-

рид, со скоростью 15 мл/ч, собирая фракции по 1 мл, которые анализировали на содержание эндонуклеазной активности. Фракции, содержащие *EcoRI*, объединяли (4 мл), концентрировали диализом против 50 мМ трис-НСl-буфера, рН 7,8, содержащего 0,2 М NaCl, 40% глицерин и 5 мМ дитиотреит, и хранили при -15°C .

Ингибирование эндонуклеазной активности EcoRI (рис. 5): 0,1 мкг эндонуклеазы *EcoRI* инкубировали 1 ч при 37°C в объеме 25 мкл с возрастающими количествами неиммунной, иммунной сыворотки и иммуноглобулинов, выделенных из иммунной сыворотки. После этого из каждой смеси брали по 1, 2, 3, 5 и 10 мкл и прибавляли к аликвотам по 50 мкл реакционной смеси, содержащим 0,1 М трис-НСl-буфера (рН 7,5), 0,01 М MgCl_2 , 7 мМ 2-меркаптоэтанол и 1 мкг ДНК фага λ . Этот раствор инкубировали 1 ч при 37°C , затем реакцию останавливали нагреванием до 70°C и продукты реакции анализировали электрофорезом, как описано выше.

Элюция эндонуклеазы из акриламидного геля. Столбик акриламидного геля после электрофореза белкового препарата, обладающего эндонуклеазной активностью, был разрезан вдоль на две части. Одна половинка была фиксирована и окрашена, вторая помещена в пробирку с буфером (0,3 М NaCl, 0,07% тритон X-100, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 мМ KH_2PO_4 , рН 7,5) на 2 сут при 4°C для удаления додецилсульфата натрия. В течение 2 сут произведено 4 смены буфера. Затем обе половины были вновь составлены и из неокрашенной половины вырезан сегмент геля, соответствующий белковой полосе окрашенной половины столбика. Этот сегмент растирали в пробирке со 100 мкл этого же буфера, суспензию оставляли на 2 ч при 4°C , затем из гомогената отбирали аликвоту (5 мкл) для определения ферментативной активности. Наличие характерных фрагментов ДНК после электрофореза доказывало присутствие эндонуклеазы *EcoRI*.

Аналогичной процедуре подвергнуты оставшиеся сегменты геля, не содержавшие окрашиваемого в этих условиях белка. Анализ ферментативной активности экстрактов при этом показал отсутствие гидролиза ДНК.

Обработка антисыворотки меркаптоэтанолом: к 0,5 мл антисыворотки, полученной после 5 иммунизаций, добавляли 0,5 мл водного раствора 0,2 М 2-меркаптоэтанола и после наслоения сверху вазелина инкубировали при 37°C 15 ч. Обработанную антисыворотку использовали в реакции коагпреципитации эндонуклеазы *EcoRI* в геле агара.

Авторы выражают благодарность З. Ф. Буниной и Н. М. Кузьминой за квалифицированную помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith H. O., Nathans D. (1973) *J. Mol. Biol.*, **81**, 419–423.
2. Modrich P., Zabel D. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 5866–5874.
3. Bickle T. A., Pirota V., Imber R. (1977) *Nucl. Acids Res.*, **4**, 2561–2571.
4. Arrand I. R., Myers P. A., Roberts R. J. (1978) *J. Mol. Biol.*, **118**, 127–132.
5. Bingham A. H. A., Sharman A. P., Atkinson T. (1977) *FEBS Lett.*, **76**, 250–256.
6. Greene P. J., Betlach M. C., Goodman H. M., Boyer H. W. (1974) *Methods Mol. Biol.*, **7**, 87–111.
7. Konz C., Kiss A., Venetianer P. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **89**, 523–531.
8. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406–4412.
9. Bradford M. M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
10. Studier F. W. (1973) *J. Mol. Biol.*, **79**, 237–248.
11. Moore S. K., Games E. (1976) *Anal. Biochem.*, **75**, 545–554.
12. Axen R., Porath J., Ernback S. (1967) *Nature*, **214**, 1302–1304.

Поступила в редакцию
29.I.1980

ISOLATION OF SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE *EcoRI* USING IMMUNOSORBENT

ERUSLANOV B. V., KRAMAROV V. M., SMOLYANINOV V. V., BOROVIK R. V.

*Central Board of Microbiological Industry under Council
of Ministers of the USSR, Moscow*

A method for the preparation of site-specific endonuclease *EcoRI* is described, which is based on chromatography of the enzyme on a column packed with antibodies immobilized on Sepharose 4B. Binding of the enzyme with antibodies proceeds directly from the cell extract, then follows washing of the column from the non-bound protein, and elution of the enzyme. Isolation of the homogeneous enzyme proceeds in one stage and lasts 3 hours. The method is simple and well reproducible. The yield of the enzyme is 20 000 units per 1g of biomass. A method for purifying endonuclease *EcoRI* to a homogeneous state in two chromatographic stages using phosphocellulose and Sephadex G-150 columns is also described. The enzyme obtained by this method is free of non-specific nucleases and has specific activity of 750 000 units/mg of protein, 3750 units per 1g of biomass. The homogeneity of the enzyme was tested by gel electrophoresis in acrylamide. The enzyme is stable under storage in 50% glycerol at -15°C for more than 6 months.
