

ГЦ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА
ИЗ *BAC. THURINGIENSIS*А. А. ЧАРЧОГЛЯН, Э. Г. ЗАХАРЯН, К. С. КАРАГЕЗЯН, А. С. САФАРЯН,
Н. Г. АЗАРЯН, Р. А. ЗАХАРЯН

В последние годы при изучении нуклеиновых кислот нашли широкое применение различные ферменты (эндонуклеазы, экзонуклеазы и т. д.), выделенные из разных видов бактерий. Многие из них играют незаменимую роль при изучении первичной структуры и картирования ДНК различного происхождения, создании рекомбинантных молекул биохимическим путем и т. д. Поэтому выделение ферментов с разнообразными функциональными характеристиками у разных видов микроорганизмов имеет важное значение.

В данном исследовании изучали штамм 1000 *Bac. thuringiensis* в аспекте выявления в нем эндонуклеазной активности.

Материал и методика. Бактерии штамма 1000 *Bac. thuringiensis* выращивались в условиях глубинной ферментации на питательной среде следующего состава (%): K_2HPO_4 —0,2; NaCl—0,5; глюкоза—0,7; пептон—2,0; дрожжевой автолизат—0,5. Ферментация осуществлялась в 20-литровых аппаратах при 30° в течение 12 часов. Конечный титр вегетативных клеток 1—1,5 млрд/мл. Биомасса отделялась центрифугированием и хранилась при —15°.

ДНК фага λB_2 выделяли по методу Мак-Хетче [4], фермент выделяли в основном по методу [2]. Гель-электрофорез производили по методу Шарпа [5].

После удаления нуклеиновых кислот полиэтиленгликолем и диализа гомогенат наносили на колонку с ДЕ-целлюлозой (ДЕ-32, Whatman) (1,6×35 см), предварительно уравновешенную буфером А (0,01 М трис-HCl, pH 7,4, 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 6% глицерин). После промывки проводили хроматографию в линейном градиенте 0—1,0 М NaCl со скоростью 60 мл/час и собирали фракции по 6 мл. Активные фракции выявляли электрофоретически. Для этого в реакционную смесь (50 мкл), содержащую 10 мМ трис-HCl (pH 7,4), 7 мМ $MgCl_2$, 7 мМ 2-меркаптоэтанол и 1—3 ДНК λB_2 , вносили по 2—5 мкл каждой фракции. Смесь инкубировали при 37° в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 15 мМ. Далее добавляли равный объем 30% сахарозы с бромфенол синим и эту смесь наливали на 0,6% агарозный гель.

Результаты и обсуждение. Установлено, что фракции, элюируемые при 0,3 М NaCl, обладают эндонуклеазной активностью. Фермент расщепляет ДНК λB_2 на большое количество высокомолекулярных фрагментов, сливающихся друг с другом в агарозном геле (рис. 1). Полу-

ченный после хроматографии на ДЕ-целлюлозе фермент относительно свободен от интерферирующих активностей и после диализа против буфера А+50% глицерин его можно хранить в течение 4 месяцев при -20° .

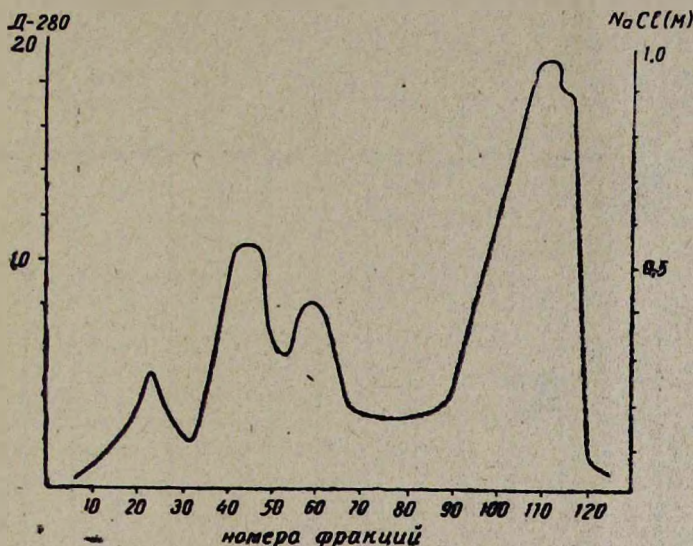


Рис. 1. Хроматография фермента на ДЕ-целлюлозе.

Эндонуклеаза активно работает в инкубационной смеси, содержащей 10 мМ трис-НСl (рН 7,4), 7—10 мМ $MgCl_2$. Ионы натрия и калия в концентрации до 10 мМ частично, а в более высоких—полностью ингибируют активность фермента. Активность его проявляется в реакционной смеси с рН 6,5—8,0, но оптимальная—при рН 7,4—7,5.

Нами было установлено, что в активных фракциях эндонуклеазы имеется ингибитор, который не удаляется при диализе. Прогревание фракций в течение 10 мин в водяной бане ($80-100^{\circ}$) не разрушало ингибитор, однако он быстро инактивировался в присутствии панкреатической рибонуклеазы, что указывает на его рибонуклеиновое происхождение. После обработки рибонуклеазой активность фермента возрастала в несколько раз. По-видимому, в данном случае мы имеем дело с транспортной РНК, ибо она обладает наиболее активным ингибирующим действием. Образую комплексы с эндонуклеазой, тРНК значительно снижает специфичность действия фермента [1, 3].

Как известно, для ферментов эндонуклеазного типа важнейшим свойством является специфичность узнавания определенной последовательности ДНК. Для предварительного изучения этого вопроса целесообразно использование некоторых химических агентов, имеющих сродство к различным основаниям ДНК.

Мы использовали актиномицин Д, ибо известно, что связь его с ДНК определяется не только сродством к остаткам гуанина, но и необходимостью чередования последнего с цитозином [6].

Предварительная обработка ДНК λB_2 актиномицином Д в различных концентрациях (1—10 γ) показала, что эндонуклеаза частично расщепляет ДНК при концентрации 1—2 γ , а в более высоких—действие фермента полностью ингибируется. Исходя из этого, можно предположить, что в участок узнавания эндонуклеазы входят в основном ГЦ-пары.

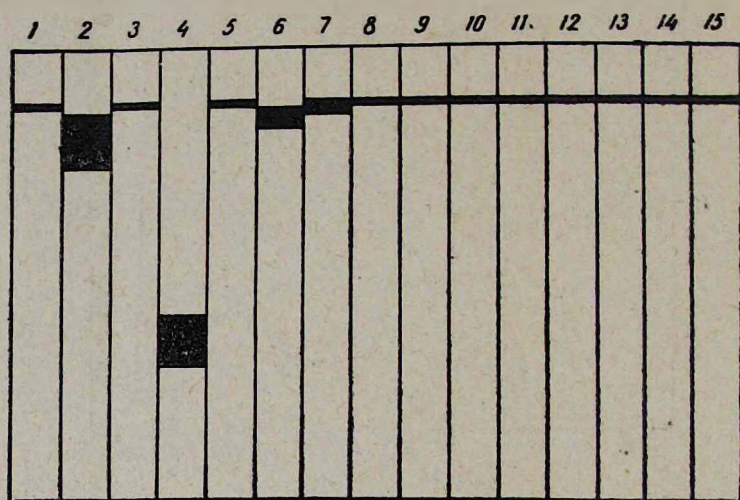


Рис. 2. Электрофоретический анализ ДНК λB_2 . 1, 3, 5—контроль ДНК; 2—ДНК+эндонуклеаза; 4—ДНК+эндонуклеаза+РНКаза; 6—15—ДНК+актиномицин Д (1—10 мкг)+эндонуклеаза.

При действии фермента на ковалентно-замкнутые формы митохондриальной ДНК печени кролика получают высокомолекулярные фрагменты, что указывает на эндонуклеазный характер действия его.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 13.VI 1977 г.

GC-ՍՊԵՑԻՖԻԿ ԷՆԴՈՆՈՒԿԼԵԱԶԱ. Bac. THURIENGIENSIS 837 ՇՏԱՄԻՅ

Ա. Ա. ԶԱՐԳՈՂՅԱՆ, Է. Գ. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Կ. Ա. ԿԱՐԱԳՅՈՋՅԱՆ,
Ա. Ս. ՍԱՆԱՐՅԱՆ, Ն. Հ. ԱԶԱՐՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ

Bac. thuriengiensis 837 շտամից անջատվել է և մասնակի ուսումնասիրվել էնդոնուկլեազային ակտիվությոն, որը հիմնականում ազդում է ԴՆԹ-ի GC զուգեքրի վրա:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Goebel W., Helinski D. R. Biochemistry, 9, 4793, 1970.
2. Humphries P. et al. Virology, 58, 1, 25, 1974.
3. Lehman I. R., Roussos G. G., Pratt E. A. J. Biol. Chem., 237, 819, 1962.
4. Mc Hetie et al. J. Mol. Biol., 23, 355, 1967.
5. Sharp P. A. et al. Biochemistry, 12, 16, 3055, 1973.
6. Wells R. D., Larson J. E. J. Mol. Biol., 49, 319, 1970.