

В. С. Сафарян, Я. Тимко, В. В. Носиков

Картирование участков узнавания рестриктазы Sal I на ДНК плазмиды RP4 и фага λ .

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунатяном 11/VII 1977)

Рестриктаза Sal I из *Streptomyces albus* G. относится к числу высокоспецифичных эндонуклеаз рестрикции. Эта рестриктаза имеет небольшое число участков узнавания на ДНК фага T5 (¹) и поэтому может быть очень полезна при исследовании структуры крупных молекул ДНК, некоторых фагов, вирусов и плазмид.

В настоящей работе определено положение участков узнавания рестриктазы Sal I на ДНК плазмиды RP4 и ДНК фага λ . Кроме того, приводится быстрый и удобный метод очистки этого фермента.

Клетки *Streptomyces albus* (штамм предоставлен Дж. Робертсом) выращивали на среде M9 с 1% бактотриптона до поздней логарифмической фазы и собирали центрифугированием. К 20 г клеток добавляли 40 мл 0,01 М трис-HCl буфера, pH 7,9, содержащего 0,01 М 2-меркаптоэтанола, и после тщательного перемешивания клетки разрушали ультразвуком на MSE дезинтеграторе (20 периодов по 30 секунд) при постоянном охлаждении льдом. Осадок удаляли центрифугированием на Spinco L-50 (30 ротор) при 25000 об/мин в течение 2 часов при 4°C. Все дальнейшие операции при 4°C. К надосадочной жидкости добавили 20 мл 5%-ного раствора стрептомицина сульфата для осаждения ДНК. После удаления осадка к раствору добавили сухой сульфат аммония до насыщения 50%. Добавление сульфата аммония проводили в течение 4—5 часов и затем смесь оставили на мешалке на ночь. После центрифугирования осадок растворили в буфере А (0,01 КРО₄, 0,01 М 2-меркаптоэтанол, 0,0001 М ЭДТА, 1 М NaCl, pH 7,6). Определение активности показало, что рестриктаза Sal I полностью осаждается при 50% насыщении сульфатом аммония.

Данную фракцию хроматографировали на колонке (2,6×80 см) с BiO-Gel A-0,5 m в буфере А. При хроматографии на биогеле удается отделить остатки ДНК и низкомолекулярные примеси. Фракции, содержащие Sal I активность, были собраны. Практически полного отделения экзонуклеазной активности удалось добиться ультрафильтрации-

ей через фильтр UM-10, причем рестриктаза Sal I проходит через фильтр, а экзонуклеазная активность задерживается. И последней стадией очистки рестриктазы Sal I является хроматография на колонке (1,0×15 см) с целлюлозой P-11 (Whatman) в буфере В (0,01 М КРО₄, 0,01 М 2-меркаптоэтанол, 0,0001 М ЭДТА, 10% глицерин, рН 7,6).

Элюцию проводили линейным градиентом NaCl на буфере В. Фракции, содержащие активность Sal I, были собраны и сконцентрированы диализом против 50%-ного раствора глицерина на буфере В. Очистку рестриктазы EcoRI проводили по методу Пошимори (2).

Рестриктаза Sma I была любезно предоставлена Р. Беляевой. Рестриктаза Hpa I была выделена по неопубликованному методу Дж. Робертса. Реакционные смеси для расщепления ДНК фага λ и плазмиды RP4 рестриктазами содержали: для Sal I—10 мМ трис-HCl, 10 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl, рН 7,5; для EcoRI—100 мМ трис-HCl, 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, рН 7,2. Реакционные смеси содержали 0,2—0,4 мкг ДНК, ферменты добавляли в количестве 0,5—2 мкл и реакции проводили в течение 1—3 часов при 37°C. Электрофоретическое разделение фрагментов проводили в 0,7—1,0%-ной агарозе (Sigma). Определение эндонуклеазной активности во фракциях при очистке рестриктазы Sal I проводили по тому же методу. Совместное расщепление ДНК рестриктазами EcoRI и Sal I проводили следующим образом. Вначале ДНК расщепляли рестриктазой EcoRI, затем концентрацию NaCl доводили до концентрации оптимальной для действия рестриктазы Sal I и проводили расщепление этой рестриктазой. Определение размеров фрагментов проводили по их подвижности в агарозном геле при электрофорезе, причем в качестве стандартов использовали фрагменты, образующиеся при расщеплении ДНК фага λ рестриктазами EcoRI (3), Hind III (4), Hpa I и Sma I (5). ДНК фага λ c1 857s 7 была любезно предоставлена В. М. Крюковым. ДНК плазмиды RP4 была любезно предоставлена А. И. Степановым (6). Приводимый нами в этой работе метод очистки рестриктазы Sal I интересен тем, что нам удалось использовать метод ультрафильтрации для быстрого и практически полного разделения двух ферментов: рестриктазы Sal I и сопутствующей ей экзонуклеазной активности. Возможно, что экзонуклеазная активность определяется несколькими ферментами, но как бы то ни было, ультрафильтрация на фильтре UM-10 (Amicon) позволяет добиться эффективной очистки рестриктазы Sal I от сопутствующей экзонуклеазной активности. Фильтр UM-10 рассчитан на концентрацию белков с молекулярным весом больше 10000. Таким образом, можно с достаточной степенью достоверности предположить, что размеры молекулы рестриктазы Sal I не велики и не превышают 10—15 тысяч дальтон, то есть близки к размерам такой рестриктазы, как Hpa I (7).

Недавно было показано (8), что рестриктаза Sal I обладает лип-

кими концами и, таким образом, может быть использована для получения рекомбинантных молекул. Поэтому нами было проведено картирование участков узнавания рестриктазы *Sal*I на ДНК фага λ , чтобы выяснить возможность использования фага λ как вектора для этой рестриктазы. При расщеплении ДНК фага λ рестриктазой *Sal*I образуется три фрагмента (рис. 1), размеры которых приведены в табл. 1.

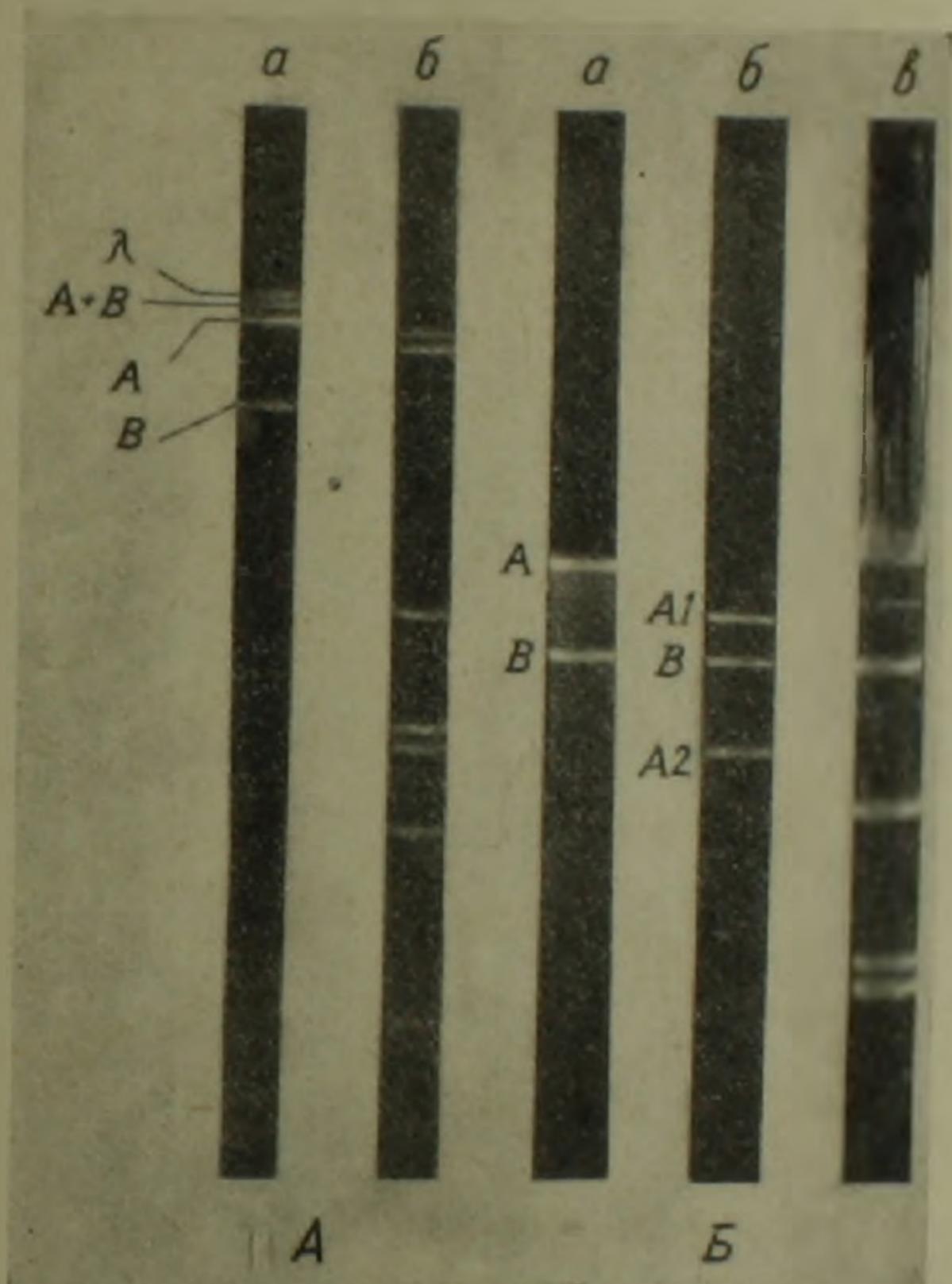


Рис. 1. А. Электрофоретическое разделение *Sal*I и *Eco*RI фрагментов фага λ . 0,8% агарозный гель Sigma 18 часов, 26 см. а—*Sal*I фрагменты фага λ ; добавлена ДНК фага λ после окончания реакции; б—*Sal*I + *Eco*RI фрагменты ДНК фага λ .

Б. Электрофоретическое разделение *Sal*I фрагментов плазмиды RP4. 0,8% гель, 17 часов, 3,5 в.с.м. Фрагменты ДНК плазмиды RP4: а—*Sal*I; б—*Sal*I + *Eco*RI; в—*Sma*I фрагменты ДНК фага λ .

Наибольший из всех фрагментов, фрагмент АВ, исчезает при прогревании, что легко может быть объяснено тем, что он образуется за счет липких концов фага λ (°) и отсюда следует что фрагменты А и В находятся по краям молекулы ДНК фага λ , а маленький фрагмент

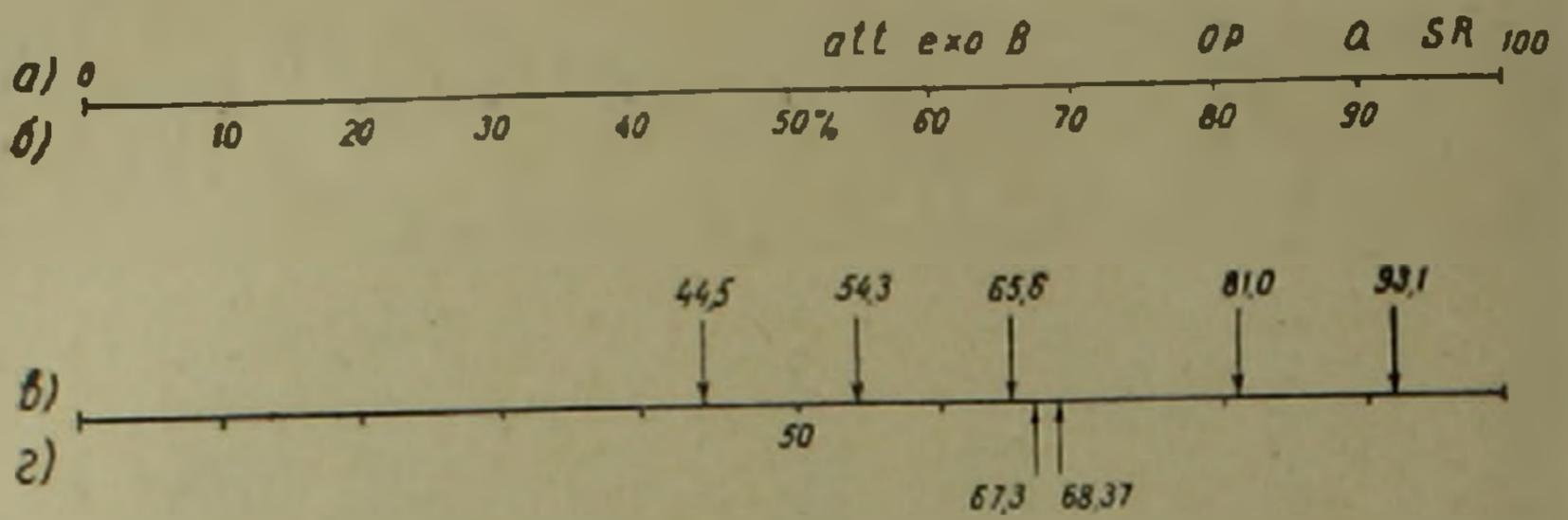


Рис. 2. Карта фага λ , а—гены; б—физическая карта ДНК фага λ ; в—участки узнавания рестриктазы EcoRI з—участки узнавания рестриктазы SalI

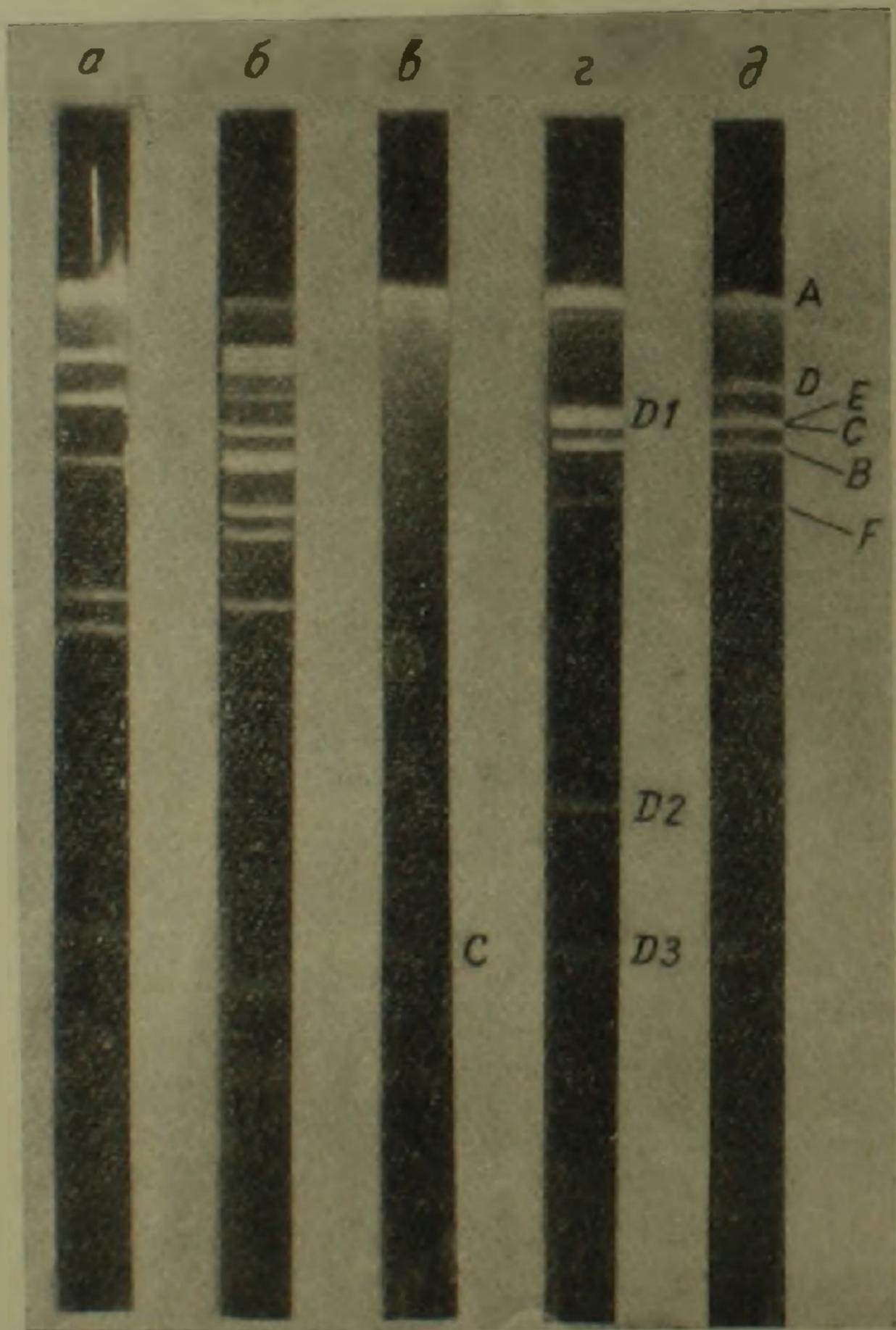


Рис. 3. Электрофоретическое разделение Hind III, Hra I, Sal I, EcoRI и Sal I+EcoRI фрагментов ДНК фага λ . 1% -ный агарозный гель (Sigma) 7 в/см. 2 час. Разщепление ДНК фага λ : а—Hind III; б—Hra I; в—Sal I; г—двойное Sal I-EcoRI; д—EcoRI

С между ними. Но эти данные не позволяют установить, где расположены участки узнавания рестриктазы на ДНК фага λ в левой, или правой части молекулы. Для того, чтобы установить положение участков узнавания, мы провели двойное расщепление ДНК фага λ рестриктазами EcoRI и SalI. Положение участков узнавания EcoRI на ДНК фага λ известно (рис. 2) (2) и анализ размеров фрагментов двойного расщепления позволил установить, что оба участка узнавания рестриктазы SalI расположены внутри фрагмента D, так как именно этот фрагмент исчезает при двойном расщеплении ДНК фага λ рестриктазами EcoRI и SalI и при этом образуются три новых фрагмента D1, D2 и D3, причем фрагмент D3 соответствует по размерам фрагменту С полного расщепления ДНК фага λ рестриктазой SalI (рис. 3). Размеры всех этих фрагментов приведены в табл. 1, а на рис. 2 показано положение участков узнавания рестриктазы SalI на ДНК фага λ . Как видно из табл. 1, результаты вычислений практически совпадают и на рис. 2 приведены усредненные значения. Из полученных нами данных легко видеть, что ДНК фага λ вполне может быть использована как вектор для рестриктазы SalI. Участки рас-

Таблица 1

Размеры фрагментов, образующихся при расщеплении ДНК фага λ рестриктазами SalI и SalI-EcoRI

Рестриктазы	SalI			SalI - EcoRI		
	A	B	C	D1	D2	D3
Размеры фрагментов в млн дальтон	20.70	9.60	0.33	3.90	0.52	0.33
Положение участков узнавания рестриктазы SalI (% генома)	67.0	69.00		67.3	68.37	

Таблица 2

Размеры фрагментов, образующихся при расщеплении ДНК плазмиды RP4 рестриктазой SalI и при совместном расщеплении рестриктазами SalI и EcoRI

Рестриктазы	SalI		SalI + EcoRI	
	A	B	A1	A2
Размеры фрагментов в млн дальтон	25.7	13.2	16.7	9.0

щепления рестриктазы *Sal*I расположены в такой области ДНК фага λ , которая не является необходимой для нормального развития этого фага и таким образом становится возможным использовать фаг λ как вектор. Наиболее подходящим для этого следует признать фаг λ b221 и λ g1, имеющие делеции в несущественных областях генома (^{10,11}). Размер делеций: 21% для λ b221 и 16% для λ g1 позволяет включать фрагменты с молекулярными весами 3,0—7,0 млн, а комбинация левой части генома фага λ b221 и правой λ g1 позволяет увеличить размер делеции до 27%. В результате такой комбинации можно получить фаг λ , у которого делеция настолько велика, что без включения дополнительного фрагмента ДНК в центральную область генома, такой фаг нежизнеспособен. Это сильно облегчает отбор рекомбинантных молекул (¹¹).

Расщепление ДНК плазмиды RP4 рестриктазой *Sal*I приводит к образованию двух фрагментов (рис. 1). Размеры этих фрагментов были определены электронномикроскопически и по их подвижности при электрофорезе в агарозном геле. Эти два метода дали практически совпадающие результаты, которые и приведены в табл. 2. Так как плазида RP4 представляет собой кольцевую суперскрученную ДНК с молекулярным весом 38,2 млн дальтон (¹²), то образование двух фрагментов при действии рестриктазы *Sal*I указывает на наличие двух участков узнавания для рестриктазы *Sal*I. Недавно было показано (¹³), что рестриктаза *Eco*RI имеет единственный участок узнавания на ДНК плазмиды RP4. Это позволяет участок узнавания рестриктазы *Eco*RI использовать как точку отсчета, то есть определять положение участков узнавания других рестриктаз относительно участка узнавания рестриктазы *Eco*RI. Для картирования участков узнавания рестриктазы *Sal*I мы провели совместное расщепление ДНК плазмиды RP4 рестриктазами *Eco*RI и *Sal*I. Из рис. 1 легко видеть, что при совмест-

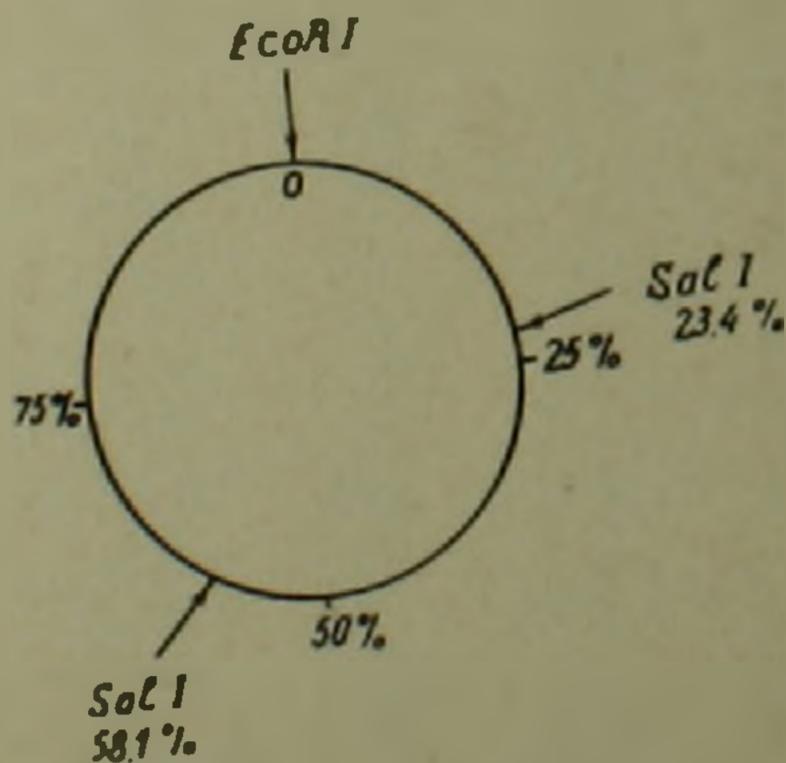


Рис. 4. Положение участков узнавания рестриктазы *Sal*I на физической карте плазмиды RP4. Участок узнавания рестриктазы *Eco*RI принят за точку отсчета

ном расщеплении этими двумя ферментами исчезает большой фрагмент А и образуются два новых фрагмента А1 и А2, размеры которых приведены в табл. 2. Полученные результаты показаны на рис. 4, где можно видеть взаимное положение участков узнавания рестриктаз EcoRI и SalI на ДНК плазмиды RP4. Как уже указывалось выше рестриктаза SalI также как и рестриктаза EcoRI обладает липкими концами, что делает возможным использовать отдельные фрагменты (А, В, А1, А2) для конструирования новых векторных молекул.

Таким образом, в данной работе нам удалось разработать удобный метод очистки рестриктазы SalI и также использовать эту рестриктазу для картирования ДНК фага λ и плазмиды RP4. Полученные данные показывают, что рестриктаза SalI может быть эффективно использована для картирования больших молекул ДНК и для конструирования новых векторных молекул.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР.

Վ. Ի. ԽԻՆԱԻՐԱՆ, Ի. ՏԻՄԿՈ, Վ. Վ. ՆՈՍԿՈՎ

RP4 պլազմիդի և λ ֆագի ԴՆԹ-ի վրա SalI ռեստրիկտազայի
ճանաչման հատվածների Գաուտեգավորումը

Ոչակված է հարմար և արագ մեթոդ SalI ռեստրիկտազայի անջատման համար, էնդոնուկլեազային ակտիվության անջատման համար օգտագործել ենք ուլտրաֆիլտրացիայի մեթոդը: Որոշված է SalI ռեստրիկտազայի ճանաչման հատվածների դիրքը λ ֆագի և RP4 պլազմիդի ԴՆԹ-ի վրա:

Ստացված տվյալները բացահայտում են SalI ռեստրիկտազայի օգտագործման հնարավորությունները ռեկոմբինացիոն մոլեկուլների ստեղծման մեջ:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ A von Gabain, G. S. Hayward, H. Bujard, Molec. gen. Genet., v. 143, 279—291 (1976). ² R. N. Yoshimori, Ph. D. Thesis, Univ. of Calif. Medical Centre, San Francisco, California, 1971. ³ M. Thomas, R. W. Davis, J. Mol. Biol., v. 91, 315—328 (1975). ⁴ K. Murray, N. E. Murray, J. Mol. Biol., v. 96, 551—564 (1975). ⁵ P. X. Беляева, А. П. Добрица, Л. Н. Лу, А. А. Баев, ДАН СССР, т. 230, 1218—1222 (1976). ⁶ С. И. Аликханян, О. И. Хлебалика и др. Генетика, т. XI № 11, 32—40 (1975). ⁷ P. A. Sharp, B. Sugden, J. Sambrook, Biochemistry, v. 12, 3055—3061 (1973). ⁸ D. H. Hamer, C. A. Thomas, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 73, 1537—1541 (1976). ⁹ В. М. Yarmolinsky, p. 97—111 in A. D. Hershey (ed.), The bacteriophage Lambda, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1971). ¹⁰ И. Дэвидсон, В. Цибадьский, Физические и химические свойства ДНК фага, «Фиг 4». Изд. «Мир», 1975. ¹¹ M. Thomas, J. P. Cameron, R. W. Davis, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 71, 4579—4583 (1974). ¹² A. E. Jacob, N. J. Grinter, Nature, v. 255, 504—506 (1975).