

Э. Г. ЗАХАРЯН, Р. А. ЗАХАРЯН, А. А. ЧАРЧОГЛЯН,
К. А. КАРАГЕЗЯН, Э. К. АФРИКЯН

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА ИЗ BAC. THURINGIENSIS

Из *Bac. thuringiensis* выделена (хроматографией на DE-целлюлозе и фосфоцеллюлозе) и частично очищена специфическая эндонуклеаза Bth. II, которая атакует циркулярные ДНК, преимущественно суперспиральные формы—ДНК SV 40, ColE I, митохондрии печени крыс, кролика—и переводит их в линейные формы. В сайте рестрикции предполагается наличие ГЦ последовательности.

Предполагается также, что фермент гидролизует специфическую в единственном числе последовательность в ДНК, универсальную для изученных циркулярных типов ее.

Высокоспецифические эндонуклеазы рестрикции и модификации нашли широкое применение при изучении структуры и функции ДНК вирусов и фагов—при физическом картировании ДНК [1], изоляции отдельных сегментов генома [2], картировании в сочетании с ферментом мутационных изменений-делений и вставок [3], выявлении ранних и поздних генов [4]. Они незаменимы при конструировании рекомбинантных молекул ДНК на основе рестрицированных фрагментов ДНК с когезивными концами [5, 6].

В настоящее время идентифицирован целый ряд ферментов рестрикции, специфичных к разным лимитированным в составе ДНК сайтам узнавания определенной нуклеотидной последовательности с осью симметрии второго порядка [7]. Метилированные основания в составе сайта рестрикции защищают ДНК от специфической фрагментации [7, 8]. Резистентность ДНК к гидролизу может быть связана также с глюкозилированием 5-оксиметилцитозина в составе сайта рестрикции [9]. Поиск новых эндонуклеаз рестрикции и модификации интенсивно расширяется ввиду их абсолютной специфичности к определенной последовательности оснований в ДНК, широкого применения в структурных исследованиях, а также для получения новых ферментных систем в целях генной инженерии.

В настоящей работе приводятся результаты опытов по выделению, очистке и характеристике новой специфической эндонуклеазы из *Bac. thuringiensis*—продуцента энтомоцидного токсина.

Материал и методика. В работе использован штамм 837 разновидности *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus*, выделенной и описанной сотрудниками Института микробиологии АН АрмССР [10]. Культура бактерий выращивалась 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 час. Конечный титр вегетативных клеток—1—1,5 млрд/мл; биомасса отделялась центрифугированием и хранилась при —15°.

ДНК фага λ v_2 получали по методу Мак-Хетъе и др. [11].

Бактериальную пасту (10 г) смешивали с кварцевым песком (20 г) и суспендировали в 10 мл буфера, содержащего 0,01 М трис-HCl (pH 7,4), 0,1 М дитиотрейтола 50 г/л глицерина (буфер А), к которому добавляли KCl до 2 М. Все операции проводились при 0—4°. Клетки разрушались в центрифужном гомогенизаторе. После разрушения суспензию центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин, осадок удаляли и супернатант доводили до 20 мл буфером А, содержащим 2 М KCl. К супернатанту медленно помешивая, добавляли раствор, содержащий 300 г/л полиэтиленгликоль 6000 и 2 М KCl, с таким расчетом, чтобы конечная концентрация полиэтиленгликоля в супернатанте составляла 60 г/л. После 30-минутного перемешивания супернатант центрифугировали при 10000 g 15 мин. Осадок отбрасывали, а супернатант подвергали диализу в течение 5 час. против 10 л буфера А. Диализат центрифугировали при 15000 g 15 мин, легкий осадок отбрасывали, а в надосадочную жидкость добавляли равный объем буфера А и наносили на колонку с ДЕ-целлюлозой (DE-32, Whatman) размером 40 см $\times$ 2,6 см, заранее уравновешенную буфером А. После посадки матриала колонку промывали экстракционным буфером до тех пор, пока в вытекающем растворе поглощение на СФ не достигало нуля. После этого проводили хроматографию в линейном градиенте 0—1,0 М NaCl в буфере А. Общий объем—600 мл. (рис. 1)

Эндонуклеазную активность с хроматографической колонки элюировали при 0,45—0,5 NaCl и тестировали электрофорезом рестрицированных ДНК в 1% агарозном геле. Реакционную смесь (50 мкл), содержащую 2 мкг ДНК, 2—5 мкл фермента, 8 мМ трис-HCl (pH 7,4), 8 мМ MgCl₂, 8 мМ 2-меркаптоэтанол и 60 мМ NaCl, инкубировали 60 мин при 37° и наносили на гели. Электрофорез проводили при комнатной температуре в течение 4 час. при 50 вольт. Гели окрашивали этидиум бромидом, полосы ДНК и фрагменты выявляли в ультрафиолете. Фермент в эфлюенте с колонки ДЕ-целлюлозы устойчив около 4 месяцев при 0°.

Результаты и обсуждение. Эндонуклеазная активность фермента охарактеризована действием ДНК фага λ v_2 , SV 40, плазмиды ColE I и митохондрий печени крысы и кролика (рис. 2).

Фермент гидролизует линейную ДНК фага λ на сливающиеся в агарозном геле высокомолекулярные фрагменты. Суперспирализованные и открытые кольцевые ДНК SV 40, ColE I и митохондрий расщепляются ферментом в одном месте, переходя в линейную структуру. При гелевом электрофорезе суперспирализованная ДНК имеет большую подвижность относительно открытой формы, линейные формы ДНК занимают в геле промежуточное между суперспиральной и открытой кольцевой формами положение. Фермент преимущественно атакует суперспиральные формы ДНК.

Фермент Bth II для оптимальной работы нуждается в ионах Mg (5—15 мМ). Исследование нуклеотидного состава узнавания ДНК рестрикцией ферментом Bth II в присутствии актиномина Д (1—10 мкг актиномина Д на инкубационную пробу) выявило ингибирование в присутствии его 0,5—1 мкг, что указывает на наличие в нуклеотидном составе сайта рестрикции двух антипараллельных ГЦ последовательностей.

Полученные данные позволяют предположить, что фермент гидролизует в ДНК специфическую в единственном числе последователь-

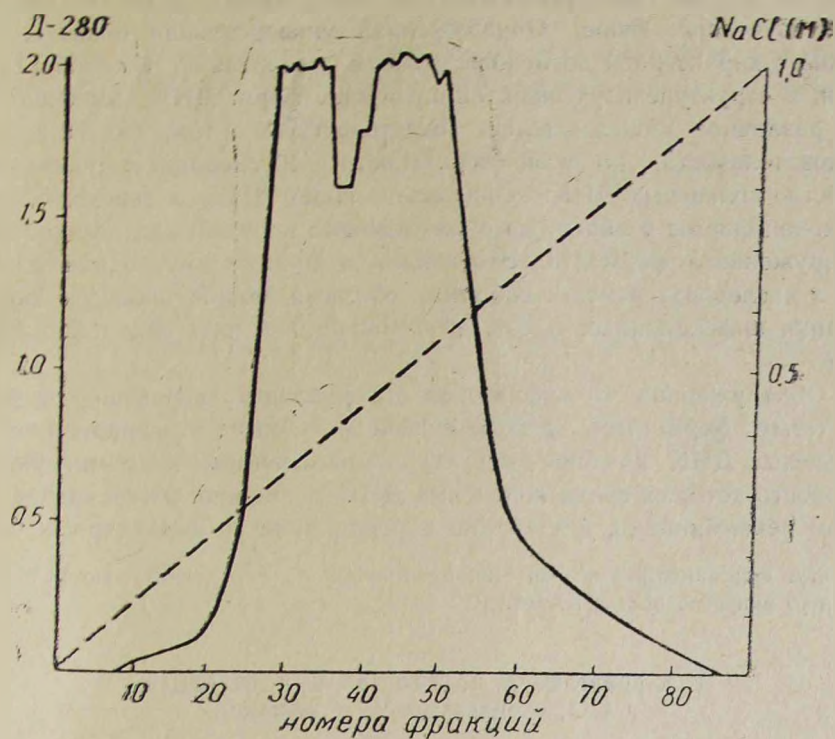


Рис. 1. Хроматография фермента на ДЕ-целлюлозе.

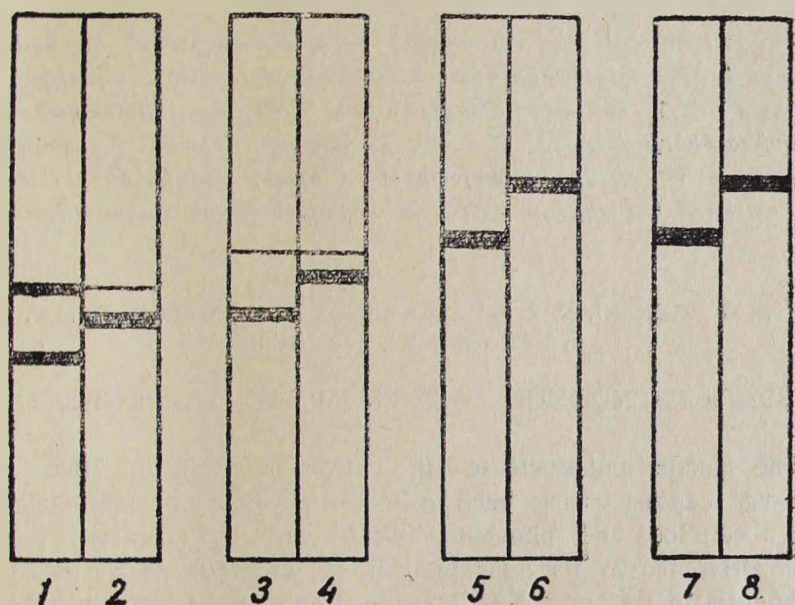


Рис. 2. Электрофорез разных видов ДНК, обработанных эндонуклеазой. 1—ДНК SV 40 (контроль); 2—то же+эндонуклеаза; 3—ДНК плазмиды ColE I (контроль); 4—то же+эндонуклеаза; 5—ДНК митохондрий печени кролика (контроль); 6—то же+эндонуклеаза; 7—ДНК митохондрий печени крысы (контроль); 8—то же+эндонуклеаза.

ность оснований, универсальную для циркулярных ДНК, по крайней мере изученных типов. Обнаруженная универсальная область, возможно с характерной последовательностью оснований, богатой ГЦ-парами, в структуре изученных циркулярных форм ДНК, имеющих самое различное происхождение, свидетельствует о том, что данная последовательность, по всей вероятности, обуславливает уникальное свойство кольцевых ДНК: образование колец ДНК и переход из циркулярной формы в линейную с когезивными концами под воздействием обнаруженного фермента. Это является, по-видимому, одним из этапов в последовательности событий, обеспечивающих процессы формирования инфекционных фагов, рекомбинации и интеграции кольцевых ДНК.

Обнаруженная специфическая эндонуклеаза, вероятно, является ключевым ферментом, обеспечивающим процесс генерирования из кольцевых ДНК линейных структур с когезивными концами, универсальность которых среди кольцевых ДНК, возможно, обеспечивает процессы рекомбинации, интеграции и репликации ее циркулярных форм.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР,
Институт микробиологии АН АрмССР

Поступило 13.V 1977 г.

Է. Գ. ՋԱԲԱՐՅԱՆ, Ռ. Ա. ՋԱԲԱՐՅԱՆ, Ա. Ա. ՉԱՐՉՈՂՅԱՆ,
Կ. Ա. ԿԱՐԱԳՅՈՋՅԱՆ, Է. Գ. ԱՖՐԻԿՅԱՆ

ՍՊԵՑԻՖԻԿ ԷՆԴՈՆՈՒԿԼԵԱԶԱԸ BAC. THURINGIENSIS-ԻՅ

Bac. thuringiensis-ից անջատված է (քրոմատոգրաֆիկ եղանակով ԴԵ ցելյուլոզի և ֆոսֆոցելյուլոզի վրա) և մասնակի մաքրված է սպեցիֆիկ էնդոնուկլեազա Bth II, որն ազդում է ցիրկուլյար ԴՆԹ-ի վրա, հիմնականում գերպարուրված ձևերի վրա, SV 40, ColE I, ճազարի, մեծամուկի լյարդի միտոքոնդրիաների ԴՆԹ-ի վրա և փոխադրում է նրանց գծային ձևերի: Ռեստրիկցիայի սայտում ենթադրվում է ԳԱ հաջորդականությունը առկայություն:

E. G. ZACKARIAN, R. A. ZACKARIAN, A. A. CHARCHOGLIAN,
K. A. KARAGEZIAN, E. K. AFRIKIAN

SPECIFIC ENDONUCLEASE FROM BAC. THURINGIENSIS

The specific endonuclease Bth II from the strain of *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* has been isolated, purified (by chromatography on DE — cellulose and phosphocellulose) and characterized. It attacks circular DNA, mostly its superspiral forms of DNA of SV 40, ColE I, mitochondria of rat and rabbit liver, by transforming them into the linear forms. Into the restriction site the presence of GC consistency has been assumed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Беляева Р. Х., Добрица А. П., Ли Л. И., Баев А. А. ДАН СССР, 230, 5, 1218, 1976.
2. Baczko K., Trlessen K., Doerfler W. X International Congress of Biochemistry, (Abstracts), Hamburg, 1976.
3. Berg P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3, 989, 1975.
4. Bade E. G., Richter I., Schumann W., Mager F. X Internat. Congress of Biochem., (Abstracts), Hamburg, 1976.
5. Timmls K., Cohen St. N. J. Mol. Biol., 75, 235, 1973.
6. Cohen St. N., Chang C. Y., Boyer H. W., Helling R. B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 11, 3240, 1973.
7. Nathans D., Smith Hamilton O. Ann. Rev. Biochem., 44, 273, 1975.
8. Green P. J., Poonjan H. S., Nussbaum A. L., Tobias L., Garfin D. E., Boger H. W., Goodman H. M. J. Molec. Biol., 99, 2, 237, 1975.
9. Ли Л. И., Баев А. А. ДАН СССР, 223, 5, 1262, 1975.
10. Африкян Э. К., Чил-Акопян Л. А. ДАН АрмССР, 47, 4, 227, 1968.
11. McChetija H. et al., J. Mol. Biol., 23, 355, 1967.