

Н. В. Цимбал, В. А. Самойленко, Ф. І. Товкач

**Сайтспецифічна ендонуклеазна активність нитчастої
ціанобактерії *Plectonema boryanum****(Представлено членом-кореспондентом НАН України І. Г. Скрипалем)*

*З нитчастої ціанобактерії *Plectonema boryanum* CALU 465 виділено сайтспецифічну ендонуклеазу PboI. Фермент отримано послідовною хроматографією на колонках з DEAE-Toyorearl, фосфоцеллозою і блакитною сефарозою. Дана ендонуклеаза рестрикції, подібно до Bam HI, впізнає та розщеплює паліндромну послідовність GGATCC. Фермент належить до II типу ендонуклеаз рестрикції. Оптимальна активність ферменту спостерігається при температурі 45 °С, рН 7,5, іонній силі 100 мМ.*

Система рестрикції–модифікації ДНК є однією з характерних ознак прокаріотичних мікроорганізмів. Її призначення полягає в захисті господаря від вторгнення чужорідної ДНК [1]. Відомо чотири типи систем рестрикції–модифікації [2]. Найпоширеніший другий тип складається з двох ферментів — рестриктази і метилази, які діють незалежно один від одного. Рестриктази другого типу здатні розпізнавати паліндромні послідовності ДНК і створювати розриви всередині цих послідовностей або на невеликій відстані від них з утворенням ДНК-фрагментів певної довжини. Така властивість рестриктаз та пов'язана з нею простота їх ідентифікації дала можливість виявити близько 3,5 тисяч ферментів, переважна більшість яких має бактеріальне походження. Близько 200 таких ензимів виявлено у ціанобактерій [3].

Метою наших досліджень було виділення та ідентифікація ендонуклеази рестрикції нитчастої негетероцистної ціанобактерії *Plectonema boryanum*. В експериментах використовували культуру *P. boryanum* CALU 465, отриману з колекції Біологічного науково-дослідного інституту Санкт-Петербурзького університету [4]. Виділення ферменту проводили з клітин культури, вирощеної в стерильних умовах на середовищі Фітцджеральда при температурі 25–27 °С і освітленні 1200–1800 лк.

Відомо, що з клітинною мембраною *P. boryanum* асоційована ендонуклеаза з неспецифічним характером дії [5], яка ускладнює виділення та ідентифікацію сайтспецифічних нуклеаз. Тому перед лізисом клітини тричі відмивали в буфері А (20 мМ трис-НСІ, рН 8,0, 100 мМ NaCl, 10 мМ Na₂ЕДТА, 0,1% Тритон Х-100), що дозволило зменшити рівень загальної нуклеазної активності не менш ніж на 75%. Вологі клітини (1 г) ресуспендували в буфері В (20 мМ трис-НСІ, рН 8,0, 10 мМ Na₂ЕДТА, 7 мМ 2-меркаптоетанолу, 1 мМ фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ)) і руйнували з використанням ультразвукового дезінтегратора УЗДН-27. Лізат клітин освітлювали шляхом центрифугування протягом 30 хв з прискоренням 10000 g. Надосад використовували як джерело ендонуклеази рестрикції.

Хроматографічне очищення ферменту передбачало послідовне використання трьох сорбентів: DEAE-Toyorearl-М, фосфоцеллози Р23 та блакитної сефарози СL-6В. Кожен із сорбентів урівноважували буфером С (10 мМ трис-НСІ, 1 мМ Na₂ЕДТА, 7 мМ 2-меркаптоетанолу, 1 мМ ФМСФ, 10 мМ MgCl₂). Хроматографічне розділення в DEAE-Toyorearl проводили при рН 7,7, у фосфоцеллозі — при рН 7,5, у блакитній сефарозі — при рН 8,0.

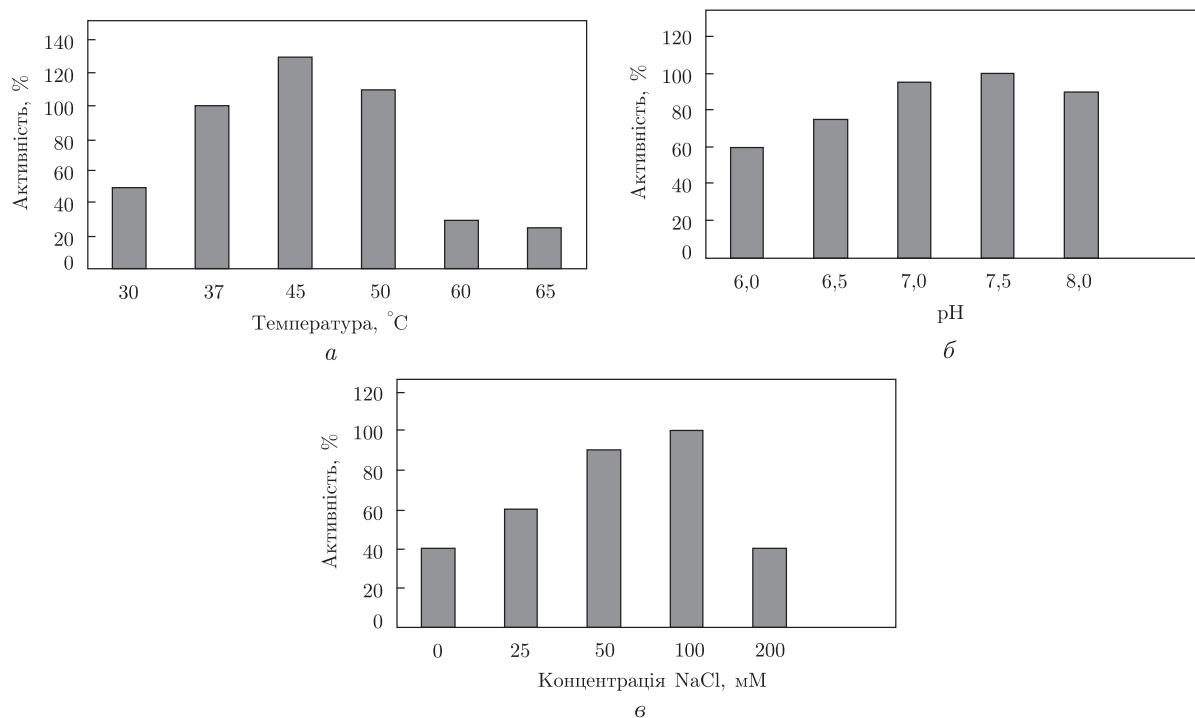


Рис. 1. Оптимуми активностей *PboI*: температурний (а), рН (б), концентрації NaCl (в)

Елюцію білків здійснювали за допомогою лінійного градієнта концентрації NaCl: для DEAE-Toyorearl — від 0,02 до 0,5 М, для фосфоцелюлози — від 0,13 до 1,0 М та для блакитної сефарози — від 0,1 до 2,0 М. З блакитної сефарози першою елюювалася неспецифічна нуклеаза, слідом за нею — ендонуклеаза із сайтспецифічною активністю. Фракції із сайтспецифічною активністю, загальний об'єм яких становив 2,5 мл, об'єднували, додавали альбумін бичачої сироватки до концентрації 50 мкг/мл та діалізували проти буфера для зберігання ферментів (50%-й гліцерин, 10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂). Зразок зберігали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Згідно з правилами класифікації сайтспецифічних ендонуклеаз [6], виділений нами фермент отримав назву *PboI*. Виявлено, що на його активність не впливають такі коферменти, як АТФ та SAM. Максимальну активність фермент проявляє в реакційній суміші такого складу: 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂ та при температурі 45 °С (рис. 1). В разі заміни в реакційній суміші Mg²⁺ на інші двовалентні катіони металів, зокрема Ca²⁺, Co²⁺, Zn²⁺ та Mn²⁺, спостерігалось повне пригнічення активності ферменту (рис. 2). За результатами оптимізації умов гідролізу встановлено, що з 1 г клітин *P. boyanum* може бути виділено близько 2500 Од рестриктази *PboI* в об'ємі 2,5 мл. За одиницю активності приймали мінімальну кількість ферменту, необхідного для повного гідролізу 1 мкг ДНК фага λ протягом 1 год в оптимальних умовах.

Для визначення сайтспецифічності ферменту як субстрат використовували ДНК фага λ . 20 мкл реакційної суміші, яка містила 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мкг ДНК та 1 мкл рестриктази *PboI*, інкубували протягом 1 год при 45 °С. Продукти гідролізу розділяли методом горизонтального електрофорезу в 0,7%-му агарозному гелі в трис-боратній буферній системі. Аналіз електрофореграми (рис. 3) показав, що піс-

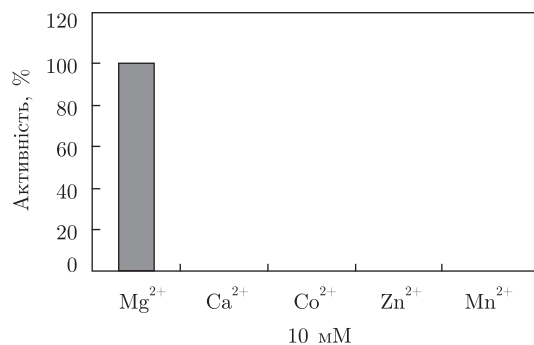


Рис. 2. Активність *PboI* у присутності різних двовалентних катіонів металів

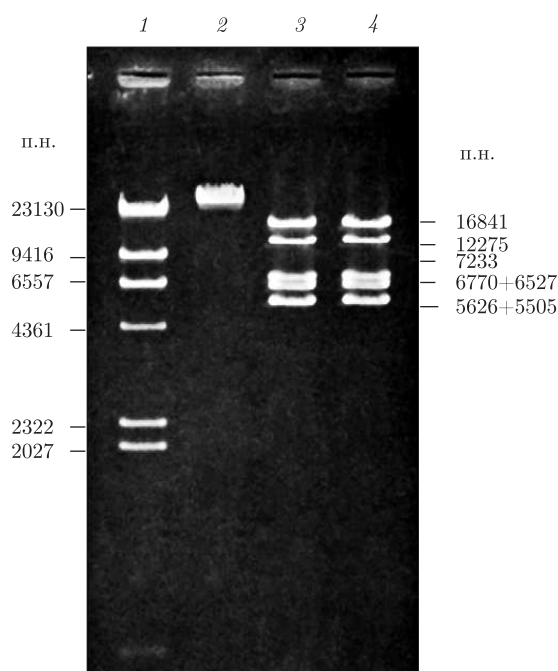


Рис. 3. Електрофореграма розподілу фрагментів ДНК фага λ , отриманих рестрикцією *Bam*HI (доріжка 4) та *Pbo*I (доріжка 3). Доріжка 1 — маркер (λ /*Hind*III); доріжка 2 — нативна ДНК фага λ

ля рестрикції ДНК фага λ ферментами *Bam*HI та *Pbo*I утворюються ідентичні продукти гідролізу. Так, *Bam*HI гідролізує ДНК фага λ , що призводить до появи трьох фрагментів завдовжки 16841, 12275 та 7233 п. н., які візуалізуються на електрофореграмі у вигляді трьох дискретних смуг. Четверта смуга складається з двох близьких за розмірами фрагментів завдовжки 6770 та 6527 п. н., п'ята також є дуплетною і містить два фрагменти завдовжки 5626 та 5505 п. н. Як видно з рис. 3, продукти гідролізу такої ж довжини утворюються при розщепленні ДНК фага λ рестриктазою *Pbo*I. Отже, *Pbo*I та *Bam*HI впізнають однакову послідовність — GGATCC.

На сьогодні відомо декілька ферментів рестрикції ціанобактеріального походження, що впізнають таку ж послідовність, як і *Pbo*I. Зокрема, *Aca*II (*Anabaena catenula* ССАР 1403/1), *Ain*II (*Anabaena inaequalis* ССАР 1446/1a), *Asp*III (*Anabaena species* ТА 1), *Nsp*29132II (*Nostoc species* АТСС 29132), *Nsp*SAIV (*Nostoc species* SA), виділені з нитчастих ціанобактерій,

та *GseIII* (*Gloeocapsa species* ATCC 29159), виділений з одноклітинної ціанобактерії. Всього відомо 94 різних ферментів, які розщеплюють вищезгадану послідовність.

Підсумовуючи результати проведеної роботи, звернемо увагу на те, що специфічність ферментів системи рестрикції–модифікації позначається на структурних особливостях ДНК як бактеріофагів, так і їх господарів — бактерій. Наприклад, відомо, що ціанобактерія *Plectonema boryanum* CALU 465 має *dam*-систему рестрикції–модифікації, про що свідчить вміст метильованого аденіну в ціанобактеріальній ДНК у кількості 4,5% та контр-селекція послідовності GGATCC в ДНК ціанофага LPP-3, вірулентного для ціанобактерії *P. boryanum* [7]. Отже, можна вважати, що виявлена сайтспецифічна ендонуклеаза *PboI* є компонентом системи рестрикції–модифікації *dam*-типу ціанобактерії *P. boryanum*.

1. Linn S., Arber W. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli* X. In vitro restriction of phage FD replication // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1968. – **59**. – P. 1300–1309.
2. Roberts R. J., Belford M., Bestor T. et al. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes // Nucl. Acids Res. – 2003. – **31**. – P. 1805–1812.
3. Roberts R. J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. REBASE – a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes // Ibid. – 2010. – **38**. – P. 234–236.
4. Громов Б. В., Титова Н. Н. Коллекция культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института Ленинградского университета // Культивирование коллекционных штаммов водорослей. – Ленинград: Межвузовская типография, 1983. – С. 4–27.
5. Сырчин С. А., Цымбал Н. В., Самойленко В. А., Менджул М. И. Локализация нуклеазной активности в клетках цианобактерии *Plectonema boryanum* CALU 465 // Микробиол. журн. – 2004. – **65**. – С. 31–35.
6. Smith H. O., Nathans D. A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes // J. Mol. Biol. – 1973. – **81**. – P. 419–423.
7. Сырчин С. О. Структурний аналіз ДНК ціанофага LPP-3 та ціанобактерії *Plectonema boryanum*: Дис. ... канд. біол. наук: 03.00.06. – Київ, 1996. – 137 с.

Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

Надійшло до редакції 26.11.2010

N. V. Tsymbal, V. A. Samoilenko, F. I. Tovkach

Site-specific endonuclease activity of filamentous cyanobacterium *Plectonema boryanum*

The site-specific endonuclease PboI was isolated from the filamentous cyanobacterium Plectonema boryanum. The purification included successive column chromatographies on DEAE-Toyopearl, phosphocellulose, and blue sepharose. Purified enzyme recognizes and cleaves GGATCC -palindrome sequence is analogously to Bam HI. The enzyme belongs to type II restriction endonucleases. The enzyme activity is optimal at a temperature 45 °C, pH 7.5, and ionic strength 100 mM.