

## Виділення сайт-специфічної ендонуклеази *Streptomyces* sp. 48

В. В. Лук'янчук, С. М. Суханов, Л. В. Поліщук, Б. П. Мацелюх

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

*Розроблено метод виділення і очищення сайт-специфічної ендонуклеази рестрикції II типу Streptomyces sp. 48. Було встановлено, що в лізаті міцелію штаму Streptomyces sp. 48 міститься тільки один фермент, який має сайт-специфічну ендонуклеазну активність. Максимальну елюцію ферменту зареєстровано при значенні іонної сили 350 мМ NaCl. Представлений метод забезпечує достатнє очищення і концентрування ферменту із збереженням специфічної активності.*

**Вступ.** Отримання очищених препаратів рестриктаз необхідно як для їхнього вивчення, так і для подальшого використання як інструменту в генноінженерних дослідженнях. Виділення очищених рестриктаз дає змогу досягти функціональної чистоти, що необхідно для запобігання небажаної мінорної активності, та фізичної чистоти, яка потрібна для максимальної активності ферменту. Завдяки методам очищення питома активність рестриктази підвищується на одиницю об'єму.

Мета роботи полягала в очищенні сайт-специфічної ендонуклеази з лізату міцелію *Streptomyces* sp. 48, в якому раніше було виявлено рестриктазну активність [1].

**Матеріали і методи.** В роботі досліджували штам *S. sp. 48*, виділений в 1995 р. із зразка ґрунту Київської області України. В досліді використано ДНК фага  $\lambda$ .

**Виділення сайт-специфічної ендонуклеази.** Культуру *S. sp. 48* вирощували в середовищі S [2] протягом 48 год при температурі 28 °С в умовах перемішування на качалці при 240 об/хв. Міцелій збирали центрифугуванням і промивали дистильованою водою. Для руйнування міцелію біомасу ресуспендували в 6 мл буфера А (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 0,5 мМ ЕДТА, 10 мМ  $\beta$ -меркаптоетанол) [3]. Клітини руйнували в льодяній бані ультразвуковим дезинтегратором УЗДН-2 протягом 5 хв (30 с — імпульс, 30 с — пауза). Лізат центрифугу-

вали протягом 60 хв при 25000 об/хв в роторі Ti50 (центрифуга типу «Beckman», США). Освітлений супернатант (6,5 мл) наносили із швидкістю 0,4 мл/хв на колонку з «Sevacel» DE-52 («Serva», Німеччина), попередньо зрівноважену буфером А. Об'єм сорбенту становив 6 мл. Після промивання колонки буфером А білки елюювали лінійним градієнтом концентрації NaCl (0,1—1,2 М) у буфері А із швидкістю 0,4 мл/хв. Сумарний об'єм фракцій — 43,2 мл, час їхнього збирання — 90 хв. Об'єм кожної окремої фракції становив 2,4 мл. Білок визначали за методом Бредфорда [4] та на спектрофотометрі СФ-16 при  $A_{280}$ . Після цього колонки промивали 4 М NaCl у буфері А.

Нуклеазну активність фракцій виділеного ферменту визначали в 40 мкл буфера MRB (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>), що містив 0,3 мкг ДНК фага  $\lambda$  та 2 мкл отриманого елюату фракції. Інкубацію здійснювали протягом 1 год при температурі 37 °С, далі продукти реакції аналізували електрофорезом в 0,7 %-му агарозному гелі [5].

За одиницю активності приймали кількість ферменту, яка здійснює повний гідроліз 1 мкг ДНК фага  $\lambda$  за 1 год при температурі 37 °С.

**Результати і обговорення.** В лізатах міцелію штаму *S. sp. 48* було знайдено сайт-специфічну ендонуклеазу рестрикції *S. sp. 48*, яка є ізошизомером рестриктази *AsuII* [1, 6]. Первинний скринінг рестриктазної активності проводили за методом Белавіна [7].

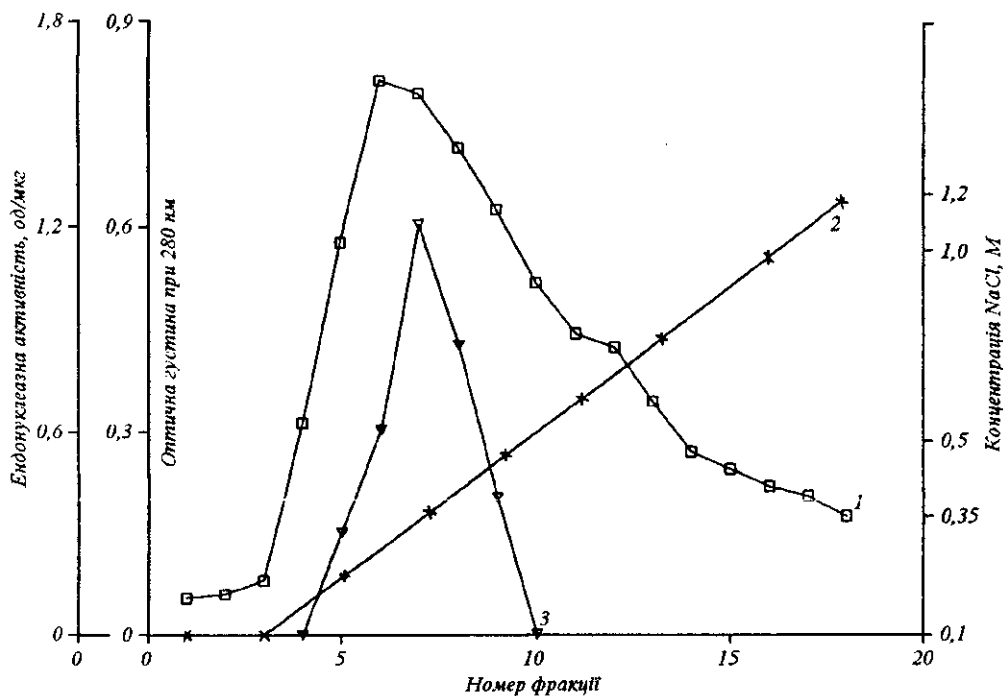


Рис. 1. Оптичний профіль елюції освітленого лізату *Streptomyces* sp. 48 з колонки «Servacel» DE-52: 1 — профіль елюції білка; 2 — концентрація NaCl; 3 — ендонуклеазна активність фракцій

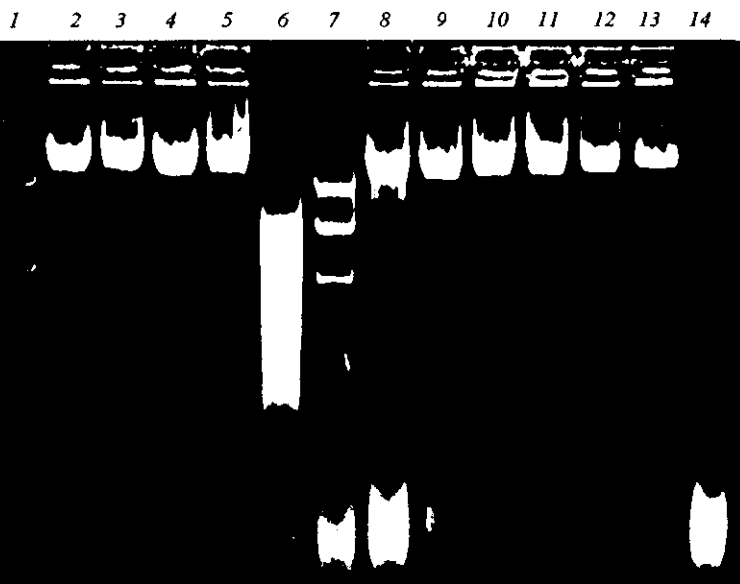


Рис. 2. Аналіз активності градієнта на наявність сайт-специфічної ендонуклеазної активності: 1 —  $\lambda$  + *PvuII*; 2 — 4-та фракція нанесення; 3 — 5 + 6-та фракції нанесення; 4 — фракція промивання; 5 — 3-тя фракція елюції; 6 — 5-та фракція елюції; 7 — 7-ма фракція елюції; 8 — 8-ма фракція елюції; 9 — 10-та фракція елюції; 10 — 12-та фракція елюції; 11 — 14-та фракція елюції; 12 — 16-та фракція елюції; 13 — високосольове промивання; 14 —  $\lambda$  + *AsuII* + 7-ма фракція елюції

Мицелій *S. sp. 48* збирали центрифугуванням та промивали буфером А. Отриману біомасу в кількості 1 г ресуспендували в буфері А та руйнували ультразвуком. Освітлений центрифугуванням

лізат наносили на колонку і білки елюювали лінійним градієнтом концентрації NaCl у діапазоні 0,1—1,2 М. Всього зібрано 18 фракцій (рис. 1).

Як встановлено, білок містився у «змиві» та в

5—9-й фракціях при високосольовому промиванні. Після визначення загальної кількості білка в кожній з цих проб було виявлено, що значна частина білків залишилася зв'язаною з носієм і потребує додаткового змивання більш концентрованим розчином солі.

При визначенні ендонуклеазної активності зібраних фракцій встановлено, що тільки 5—9-та фракції здатні фрагментувати ДНК фага  $\lambda$  (рис. 2). Як визначено, сумарна питома активність 6, 7 та 8-ї фракцій становить 1184,2 од/мг, у той час як питома активність вихідного препарату — 275 од/мг. За нашими підрахунками, з 1 г біомаси було отримано 6500 одиниць активності. Після очищення фракції 6, 7 та 8 містили 4500 одиниць активності. Таким чином, ступінь очищення ендонуклеази становила 4,3.

Виявлено, що в лізаті штама *S. sp. 48* міститься лише один фермент, який має сайт-специфічну ендонуклеазну активність (рис. 1, 2).

Максимальна елюція ферменту має місце при значенні іонної сили 350 мМ NaCl. При дослідженні активності рестриктази у фракціях було встановлено, що ендонуклеазна активність збігається з білковим піком.

Таким чином, з результатів проведеної роботи випливає, що штам *S. sp. 48* містить один фермент з ендонуклеазною активністю, пік рестриктазної активності отриманого ферменту збігається з піком елювання, основна частина білка з рестриктазною активністю елювалася при 350 мМ NaCl. Представлений метод забезпечує достатню очистку і концентрування активного ферменту.

*В. В. Лук'янчук, С. М. Суханов, Л. В. Полищук, Б. П. Мацелюх*

Выделение сайт-специфической эנדонуклеазы *Streptomyces sp. 48*

Резюме

Разработан метод выделения и очистки сайт-специфической эנדонуклеазы рестрикции II типа *Ssp48*. Установлено, что лизат мицелия штамма *S. sp. 48* содержит только один фермент, имеющий сайт-специфическую эנדонуклеазную ак-

тивность. Максимальная элюция эנדонуклеазы зарегистрирована при ионной силе буфера 350 мМ NaCl. Представленный метод обеспечивает достаточную очистку и концентрирование фермента с сохранением специфической активности.

*V. V. Lukyanchuk, S. M. Sukhanoff, L. V. Polishchuk, B. P. Matselyukh*

Isolation of site-specific endonuclease of *Streptomyces sp. 48*

Summary

A method of isolation and purification of site-specific endonuclease of the II type *S. sp. 48* has been worked out. It has been determined that the *S. sp. 48* lysate contains only one enzyme with site-specific activity. Maximum elution of the endonuclease was made by buffer with ionic strength of 350 mM NaCl. This method provides sufficient purification and concentration of this enzyme with preservation of its specific activity.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лук'янчук В. В., Полищук Л. В., Стрижкова Г. М., Консіюко О. П., Мацелюх Б. П. Визначення сайт-специфічності ендонуклеази рестрикції II типу у *Streptomyces sp. 48* // Мікробіол. журн.—1999.—61, № 1.—С. 80—83.
2. Okanishi M., Suzuki K., Umezawa H. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: cultural condition and morphological study // J. Gen. Microbiol.—1974.—80.—P. 389—400.
3. Azzeddoug H., Hubert J., Reyssat G. Characterization of a methyl-specific restriction system in *Clostridium acetobutylicum* strain N1-4081 // FEMS Microbiol. Lett.—1989.—65, N 3.—P. 323—326.
4. Bredford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem.—1976.—72.—P. 248—254.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии.—М.: Мир, 1984.—479 с.
6. Лук'янчук В. В., Стрижкова Г. М., Полищук Л. В., Консіюко О. П., Мацелюх Б. П. Пошук сайт-специфічних ендонуклеаз рестрикції II типу у штамів стрептоміцетів, виділених із ґрунтів Київської області // Мікробіол. журн.—1998.—60, № 4.—С. 33—35.
7. Белагин П. А., Дедков В. С., Дегтярев С. Х. Метод определения эנדонуклеаз рестрикции в колониях бактерий // Прикл. биохимия и микробиология.—1988.—1, № 1.—С. 121—124.

УДК 579.873.71+577.112+577.152.314  
Надійшла до редакції 01.11.99