

4. *Morphologic and biochemical changes in autolyzing dog heart muscle* / L. C. Armiger, R. N. Seelye, V. M. Carnell et al. // *Lab. Invest.*—1976.—34, N 4.— P. 357—362.
5. *Changes in ultrastructure and Ca²⁺ distribution in the isolated working rabbit heart after ischemia* / M. Borgers, L. G. Shu, R. Xhonneux et al. // *Amer. J. Pathol.*—1987.—126, N 1.— P. 92—102.
6. *Jennings R. B., Ganole C. E. Structural changes in myocardium during acute ischemia* // *Circ. Res.*—1974.—34, Suppl. 1.— P. 156—172.
7. *Изучение молекулярных механизмов гипоальбуминемии на модели экспериментального инфаркта миокарда* / А. В. Лекис, Л. Ю. Лукошьявичюс, М. И. Коваленко, О. В. Булдакова // *Биополимеры и клетка.*—1985.—1, № 6.— С. 322—327.
8. *Явич М. П., Лерман М. И. Бесклеточная система белкового синтеза из сердечной мышцы кролика* // *Вопр. мед. химии.*—1976.— № 3.— С. 307—311.
9. *Лейтин В. Л., Лерман М. И. Методы определения времени синтеза средней полипептидной цепи* // *Соврем. методы в биохимии.*— М.: Медицина, 1977.— С. 277—285.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
Каунас. мед. ин-т МЗ ЛитССР

Получено 23.03.88

УДК 577.213:579.852.11

НЕКОТОРЫЕ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ *VamHI*- И *VnaI* -РЕСТРИКТАЗАМИ С ОДИНАКОВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Э. Л. Ким, О. П. Махович, С. С. Малюта

Введение В настоящее время список обнаруженных эндонуклеаз рестрикции II класса насчитывает более 500 наименований, из которых прототипами, т. е. рестриктазами с уже определенной специфичностью, является только 1/5 часть. Остальные представляют собой изоизомеры уже известных эндонуклеаз [1]. Явление изоизомерии известно давно, с начала поиска рестриктаз у разных микроорганизмов, ведущегося активно до настоящего времени, и представляет большой интерес. Однако вследствие того, что изучение рестриктаз часто ограничивается лишь определением специфичности этих ферментов, явление рестрикции-модификации вообще и изоизомерии в частности остается малоизученным до сих пор.

Для эндонуклеазы *VamHI*, обнаруженной в клетках *Bacillus amyloliquefaciens* в 1975 году [2], в настоящее время известно 14 изоизомеров, одним из которых является *VnaI*, обнаруженный нами в штамме *Bac. natto* B3364 [3]. Оба фермента специфически расщепляют последовательность GGATCC между гуаниновыми остатками.

Ввиду вышесказанного для нас представляло интерес сравнительное исследование некоторых физико-химических свойств двух изоизомеров — рестриктаз *VamHI* и *VnaI*.

Материалы и методы. В работе использовали бактериальные штаммы из музея отдела генетической инженерии Ин-та молекуляр. биологии и генетики АН УССР; ДНК фага λ, эндонуклеаза *VamHI* (НПО «Фермент», Вильнюс); лизоцим («Ampersham», Англия); эндонуклеаза *VamHI* («Pharmacia», Швеция); ДЭАЭ-целлюлоза («Whatman», Англия), бромистый этидий, агароза («Sigma», США); акриламид, метиленабисакриламид («Bio-Rad», США).

Клетки штаммов *Bac. natto* или *Bac. amyloliquefaciens* выращивали на аминокислотной среде до середины логарифмической фазы роста. Для получения бесклеточного экстракта клетки суспендировали в буфере А (20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 5 мМ ЭДТА, 2 мМ 2-меркаптоэтанол), содержащем лизоцим в концентрации 1 мг/мл, инкубировали в течение 20 мин при 0°C и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора в режиме 6—12 Гц 10 раз по 30 с с перерывами по 1 мин между озвучиваниями. Клеточную суспензию центрифугировали при 48000 g в течение 60 мин. Полученный бесклеточный экстракт наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (1×45 см) со скоростью 0,5 мл/мин. После отмывки колонки до нулевой оптической плотности связавшийся материал элюировали 1 л градиента NaCl (0—0,05 M) в буфере А. Фракции, содержащие активность *VnaI* или *VamHI*, высаливали 65% насыщения сернистого аммония. Суспензию хранили при -5°C в течение месяца без потери активности.

Электрофорез белков в денатурирующем 12,5%-ном и градиентном 5—25%-ном нативном полиакриламидном геле (ПААГ) проводили по методу [4]. Элюцию белков из нативного ПААГ после электрофореза осуществляли методом замораживания в жидком азоте и последующим размораживанием нарезанных участков геля, измельченных в буфере А. Элюат, содержащий *VnaI*-активность, анализировали методом элект-

рофореза в денатурирующем и нативном ПААГ с последующей окраской AgNO_3 в соответствии с [5]. Чистота препарата *BnaI* составляла не менее 95 % по данным электрофореза.

Результаты и обсуждение. Рестриктаза *BnaI*, обнаруженная нами в штамме *Vac. natto* B3364, является истинным изоизомером эндонуклеазы рестрикции II клас-

Рис. 1. Влияние ионной силы на рестрикционную активность эндонуклеаз: ДНК фага λ , расщепленная *BamHI* (1-4) и *BnaI* (5-9) при разных концентрациях NaCl: 1-20; 2-50; 3-100; 4-150; 5-350; 6-300; 7-50; 8-100; 9-200 мМ

Fig. 1. The influence of ionic strength on the restriction activity of *BamHI* and *BnaI* endonucleases: DNA of phage λ digested by *BamHI* (1-4) and *BnaI* (5-9) at various NaCl concentrations: 1-20; 2-50; 3-100; 4-150; 5-350; 6-300; 7-50; 8-100; 9-200 mM

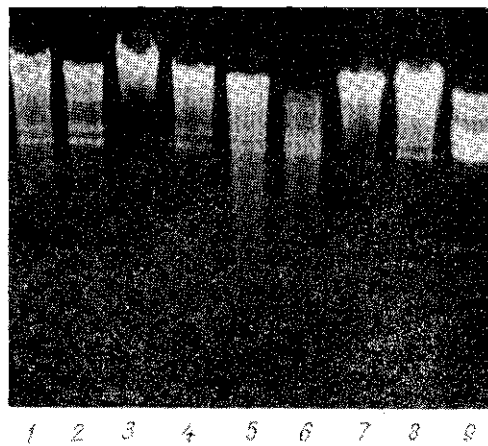
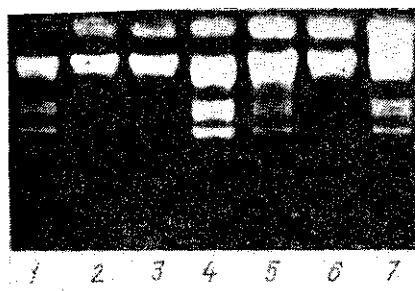
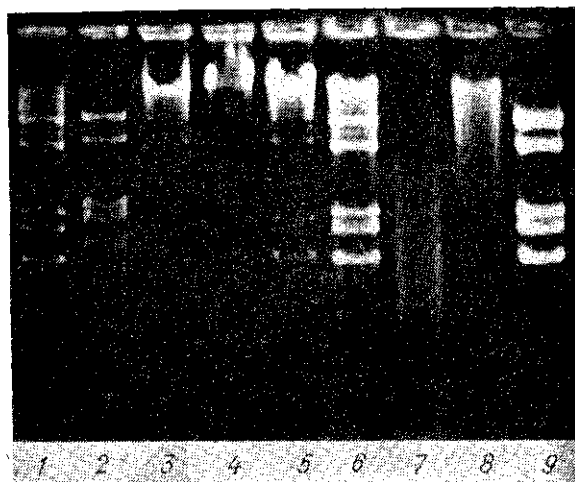


Рис. 2. Влияние глицерина на ферментативную активность эндонуклеаз: ДНК фага λ , гидролизованная *BamHI* до замораживания (1); однократно замороженным ферментом *BamHI* (2); замороженным дважды (3); *BnaI* до замораживания (4); *BnaI*+5 % глицерина (5); *BnaI*+25 % глицерина (6); 10-кратно замороженным *BnaI*

Fig. 2. The influence of glycerol on the enzymatic activity of endonucleases: phage λ DNA hydrolyzed by *BamHI* before freezing (1); freezed *BamHI* (2); twice freezed *BamHI* (3); *BnaI* before freezing (4); *BnaI* + 5 % glycerol (5); *BnaI* + 25 % glycerol (6); ten-fold freezed *BnaI*

Рис. 3. Электрофореграмма ДНК фага λ , расщепленной ферментом *BnaI*, элюированной из ПААГ: *BnaI* + глицерин (1-4); *BnaI* + сахароза (5-8); *BnaI* до элюции (9)
Fig. 3. Electrophoregramme of phage λ DNA digested by *BnaI*, eluted from PAAG: *BnaI* + glycerol (1-4); *BnaI* + sucrose (5-8); *BnaI* before elution (9)

са *BamHI*. Однако, несмотря на то, что оба фермента обладают одинаковой специфичностью в отношении узнаваемой последовательности ДНК, они отличаются друг от друга по ряду свойств.

Зависимость рестрикционной активности от ионной силы раствора. Показано, что оптимальным значением концентрации NaCl для *BamHI* является 50 мМ, а для *BnaI* — 200 мМ. При концентрации NaCl 100 мМ и ниже *BnaI* теряет способность специфически расщеплять субстрат, что проявляется в образовании продуктов неспецифического гидролиза. Если ферментативная активность *BamHI* по-

давляется уже 150 мМ NaCl, то активность *BnaI* ингибируется при концентрации NaCl 300 мМ и выше (рис. 1).

Влияние глицерина на ферментативную активность. Для хранения и стабилизации рестрикционных эндонуклеаз используется глицерин, так как большинство этих ферментов теряет свою активность при замораживании. Не является исключением и *BamHI*. Уже однократное замораживание активного препарата этого фермента после ДЭАЭ-хроматографии вело к практически полной потере рестриктазной

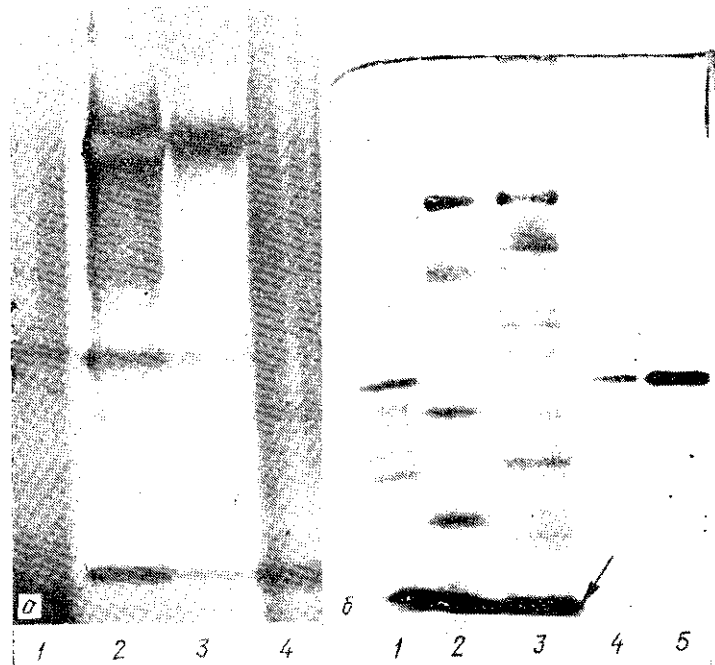


Рис. 4. Электрофореграммы ферментов *BamHI* и *BnaI* в 5—15%-ном градиентном ПААГ (а: 1—*BnaI*, элюированный из нативного ПААГ; 2, 3—маркерные белки—669000, 440000, 232000, 140000 и 67000; 4—*BamHI*) и в ПААГ в присутствии DS-Na и 2-меркаптоэтанола (б: 1—*BnaI* до элюции; 2—маркерные белки—97000, 64000, 43000, 20000, 14400; 3—*BamHI*, стрелкой указаны субъединицы *BamHI*; 4, 5—*BnaI*, элюированный из ПААГ)

Fig. 4. 5-15 % gradient PAAG electrophoresis of *BnaI* and *BamHI* (a: 1—*BnaI* eluted from native PAAG; 2, 3—molecular weight markers—669, 440, 232, 140, 67 kDa; 4—*BamHI*) and PAAG electrophoresis in the presence of DS-Na and 2-mercaptoethanol (b: 1—*BnaI* before elution; 2—molecular weight markers—97, 64, 43, 20, 14.4 kDa; 3—*BamHI*, arrow indicates *BamHI* subunits; 4, 5—*BnaI* after elution from PAAG)

активности. К такому же результату приводило замораживание *BamHI*, полученной из НПО «Фермент» и содержащейся в буфере с 50 % глицерина (рис. 2). Относительно эндонуклеазы *BnaI* оказалось, что глицерин сильно ингибирует ее активность—на 50 % при концентрации глицерина 5 %, а при концентрации 25 %—практически полностью (рис. 2). Напротив, замораживание этого фермента не приводило к снижению его активности. Препарат *BnaI* подвергали 10-кратному замораживанию—оттаиванию без уменьшения активности.

Молекулярные массы *BamHI* и *BnaI*. Учитывая необычную стабильность *BnaI*, нами было осуществлено элюирование активного фермента из нативного ПААГ. Принимая во внимание ингибирующее действие глицерина на рестрикционную активность, для нанесения на гель образцов использовали как глицерин, так и сахарозу в концентрации 5 %. Как видно из рис. 3, *BnaI* сохраняет активность после элюции в обоих случаях. Фракции, содержащие активный фермент, были анализированы электрофорезом в ПААГ в денатурирующих и нативных условиях градиентного геля (рис. 4), из чего следовало, что *BnaI* представляет собой белок с молекулярной массой 140000, состоящий из четырех субъединиц с молекулярной массой 35000 каждая. По данным гель-фильтрации и электрофоретического анализа коммерческого препарата *BamHI*

(«Phagmascia») фермент *BamHI* имеет молекулярную массу 66000 и состоит из четырех субъединиц с молекулярной массой 16500 каждая.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что рестрикционные эндонуклеазы *BamHI* и *BnaI*, обладающие одинаковой специфичностью, отличаются друг от друга по ряду физико-химических свойств. Эти белки имеют разные молекулярные массы, отличны по стабильности и требуют различной ионной силы для гидролиза субстрата. Дальнейшее сравнительное изучение рестриктаз с одинаковой субстратной специфичностью позволит расширить наши представления о явлении изоэномери.

SOME DIFFERENCES BETWEEN *BAMHI* AND *BNAI*, THE RESTRICTASES WITH THE SAME SPECIFICITY

E. L. Kim, O. P. Makhovich, S. S. Maliuta

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

S u m m a r y

The restriction endonuclease *BnaI*, being *BamHI* true isoshisomer, is isolated from *Bac. natto* B3364 strain. Its molecular weight, stability and optimal reaction conditions are studied. Comparative investigations have shown that according to these physicochemical characteristics the *BamHI* and *BnaI* enzymes differ from each other in spite of their analogous specificity.

1. Kessler Ch., Neumaier P. S., Wolf W. Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases — a review // *Gene*.— 1986.—33, N 1.— P. 1—101.
2. Wilson G. A., Young F. E. Isolation of a sequence-specific endonuclease (*BamHI*) from *Bacillus amyloliquefaciens* H. // *J. Mol. Biol.*— 1975.—97, N 1— P. 123—125.
3. Ким Э. Л., Малиута С. С. *BnaI* — новый изоэномер рестриктазы *BamHI* // *Биотехнология*.— 1986.— № 4.— С. 24—27.
4. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*.— 1970.—227, N 5259.— P. 680—685.
5. Gooderman K., Clifton N. J. High-sensitivity silver staining of proteins following PAAG electrophoresis // *Meth. Mol. Biol.*— 1984.—1.— P. 113—118.

Ин-т молекуляр биологии
и генетики АН УССР, Киев

Получено 07.08.87

УДК 577 15/17

МОЖНО ЛИ «ПРИВИТЬ» К БЕЛКОВОЙ ГЛОБУЛЕ «ЧУЖОЙ» АКТИВНЫЙ ЦЕНТР?

А. В. Финкельштейн

Известно, что белки с совсем разной первичной структурой и различной пространственной организацией могут иметь одинаковые или сходные биохимические функции [1]. Классическим примером являются сериновые протеазы— белки с различающейся архитектурой (рис. 1), но одинаковой конфигурацией ключевых боковых групп в каталитическом центре (рис. 2).

Можно ли белковую молекулу уподобить каркасу с закрепленным на нем активным центром [5] или в катализе активно участвует вся белковая глобула [6]? Ответ на этот вопрос имел бы большое значение не только для искусственного «конструирования» белковых молекул, но и для проблемы возникновения функционирующих белков в природе.

С появлением белковой инженерии [7] наметилась возможность экспериментального подхода к таким, прежде сугубо теоретическим, вопросам [8].