

Метод определения эндонуклеаз рестрикции в колониях бактерий

Категория: Методы исследования

Просмотров: 3409

Белавин П. А., Дедков В. С., Дегтярев С. Х.

Прикладная биохимия и микробиология- 1988.- Т. 24, № 1. С. 121-124

Предложен метод тестирования бактериальных штаммов на наличие эндонуклеаз рестрикции. Анализ проводится непосредственно в клетках из колоний с чашки Петри. Собранные клетки обрабатывают лизоцимом и тритоном X-100 и после центрифугирования супернатант анализируют на наличие специфической эндонуклеазной активности. Метод позволяет за 3—4 ч провести анализ до 100 колоний.

Широкое использование рестриктаз в генно-инженерных работах обуславливает все возрастающий интерес исследователей к свойствам этих ферментов, способам их получения и обнаружения [1]. Выявление эндонуклеазных активностей в тех или иных бактериальных штаммах - необходимый шаг при поиске штаммов-продуцентов рестриктаз. Однако решение этой задачи биологическими методами часто не является корректным из-за множественности причин рестрикции [2]. Видимо, наиболее подходящим методом обнаружения эндонуклеазных активностей в бактериальной клетке следует признать разрушение клеток и прямой анализ способности осветленного клеточного экстракта гидролизовать ДНК [3].

В ряде случаев в ходе разрушения клеток или очистки фермента используются детергенты и лизоцим. Так, при очистке фермента PstI были использованы лизоцим и тритон X-100 [4]. Несколько позднее в работах Грачева и Нетесова, а также Журавлевой и Орешкина [5, 6] было показано, что использование тритона X-100 повышает выход рестриктаз от 2 до 10 раз. Правда, из экспериментальных данных не ясно, с чем связан этот эффект.

Наиболее близким к описываемому ниже методическому приему является, видимо, способ, описанный Вайтхедом и Брауном [7]. Эти авторы культивировали бактерии в 4 мл жидкой питательной среды, полученную биомассу обрабатывали лизоцимом и детергентом Бридж-58 и полученный таким образом клеточный экстракт исследовали на наличие специфической ДНКазной активности. Есть и другие способы обнаружения рестриктазных активностей у бактерий, но и они включают в себя культивирование бактерий в жидкой питательной среде [4, 8], что существенно увеличивает трудоемкость.

Здесь описан простой метод тестирования бактериальных штаммов на наличие сайт-специфической ДНКазной активности без предварительного культивирования бактерий в жидкой

питательной среде, что значительно упрощает процедуру скрининга. Весь анализ занимает 3-4 ч и позволяет протестировать до 100 отдельных колоний бактерий в одном опыте.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика

Штаммы *Bacillus amyloliquefaciens* H (B1664), *B. megaterium* 1884 de Bery (B2506), *Rhodopseudomonas sphaeroides* (B2013), *Flavobacterium okeanokoites* (B2835) получены из коллекции Центрального музея

промышленных микроорганизмов ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва). (*B. amyloliquefaciens* H - продуцент рестриктазы BamHI; *B. megaterium* 1884 de Bery - продуцент рестриктазы Bme181, изошизомера Avall; *R. sphaeroides* - продуцент рестриктазы RsaI; *F. okeanokoites* - продуцент рестриктазы FokI.)

В работе использовали лизоцим А (НПО "Биолар", Олайне) ДНК фага лямбда производства НПО "Фермент", тритон X-100 фирмы "Serva" (ФРГ), бромистый этидий фирмы "Sigma" (США), агарозу тип I фирмы "Sigma" (США). Остальные реактивы-отечественного производства х.ч. или о.с.ч.

Анализируемые штаммы высевали на 1,5%-ную агаризованную среду, содержащую 35 г/л гидролизата кильки, и выращивали до образования колоний не менее 2 мм в диаметре. *B. amyloliquefaciens* и *B. megaterium* выращивали при 37°C, а *R. sphaeroides* и *F. okeanokoites* при 30°C. Из чашек Петри клетки отбирали на кончике микробиологической петли и переносили в 250 мкл инкубационной смеси, содержащей 100 мМ трис-НСl, рН 8.0, 50 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, а также лизирующие компоненты - 0.1%-ный тритон X-100 и свежеприготовленный лизоцим в концентрации 0.1 г/л. Смесь инкубировали 15 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая. Затем клеточный экстракт осветляли центрифугированием на центрифуге "Эппендорф" в течение 1 мин (10000 g). Наличие сайт-специфической ДНКазной активности определяли методом разделения продуктов гидролиза ДНК с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Для этого использовали следующую инкубационную смесь: 20 мМ трис-НСl, рН 7.5, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ 2-меркаптоэтанол. В пробы, содержащие по 0.5 мкг ДНК фага λ в 20 мкл инкубационной смеси, вносили 1-4 мкл осветленного клеточного лизата и инкубировали 1-2 ч при 37°C. Продукты реакции подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле. Электродный буфер содержал 40 мМ трис, 20 мМ CH₃COOH, 1 мМ ЭДТА, рН 8.3. Электрофорез проводили при 10 В/см в течение 1 ч. По окончании гель окрашивали в растворе бромистого этидия - 5 мг/л, 30 мин. ДНК видна при освещении геля ультрафиолетом. Наличие отчетливых полосок ДНК в дорожке указывает на присутствие сайт-специфической ДНКазной активности, а размазанный шлейф - на наличие неспецифических ДНКазных активностей. Фотографировали гели через красный светофильтр фотоаппаратом "Зенит".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведены данные анализа рестриктазной активности в штаммах *B. megaterium* и *R. sphaeroides* при различной обработке клеток. На рис. 1 видно, что инкубация *R. sphaeroides* с лизоцимом не приводила к заметному появлению рестриктазной активности, тогда как присутствие тритона X-100 позволяло отчетливо увидеть картину фрагментации ДНК. В случае *B. megaterium* ситуация обратная. Инкубация с тритоном X-100 не дала существенного выхода рестриктазы в раствор, в то время как воздействие лизоцима приводило к этому.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 1 Влияние лизоцима и тритона X-100 на экстракцию рестриктаз в раствор. 1-3 - штаммы *B. megaterium*; 4-6 - *R. sphaeroides*. Тестирование рестриктаз проводили, как описано в методике. Обработка клеток: 1, 4 - лизоцимом без тритона X-100; 2, 5 - тритоном X-100 без лизоцима; 3, 6 - тритоном X-100 и лизоцимом

Совместная обработка лизоцимом и тритоном X-100 позволяла заметить рестриктазную активность в обоих штаммах.

На рис. 2а показана зависимость увеличения рестриктазной активности от времени инкубации клеток *B. megaterium*. Наиболее полно гидролиз проходил, когда клетки инкубировали в течение 15 мин, причем отсутствие лизоцима сильно уменьшало экстракцию рестриктазы. Активность рестриктазы BamHI из *B. amyloliquefaciens* Н заметна только к 15-й мин инкубации клеток (рис. 2, б). При отсутствии тритона X-100 или лизоцима не удавалось заметить рестриктазную активность.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 2 Зависимость экстракции рестриктаз Bme181 (А) и BamHI (б) от времени инкубации клеток и состава инкубационной смеси. Тестирование рестриктазы проводили, как описано в Методике. Время инкубации, мин: 1 - 2, 2 - 5, 3 - 15, 4 - 15 (без лизоцима), 5 - 15 (без тритона X-100)

Таким образом, для расширения спектра тестируемых микроорганизмов инкубационная смесь должна содержать и тритон X-100 и лизоцим. Инкубация клеток должна проводиться не менее 15 мин при комнатной температуре.

Для оценки чувствительности метода мы взяли *F. okeanokoites* - продуцент рестриктазы FokI. Известно, что выход этого фермента составляет не более 250 ед. на 1 г влажных клеток [9], На рис. 3 показан результат тестирования рестриктазы FokI.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 3 Тестирование рестриктазы FokI. Тестирование проводили, как описано в методике

Отметим характерные особенности предлагаемой методики: тестирование штаммов проводится без специального культивирования в жидкой питательной среде; для расширения спектра тестируемых микроорганизмов проводится совместная инкубация клеток лизоцимом и тритоном X-100.

Использование данной методики позволяет заметить рестриктазную активность во многих штаммах микроорганизмов. Например, мы отмечали присутствие рестриктазной активности в следующих родах микроорганизмов, представляющих собой как природные изоляты, так и музейные культуры: *Bacillus*, *Kurtia*, *Paracoccus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Proteus*, *Providencia* и др.

В некоторых случаях мы не могли заметить наличие рестриктаз. Например, мы не обнаружили рестриктазной активности при анализе данным способом в клетках *Streptomyces* и *Nocardia*. По-видимому, это объясняется строением их клеточной оболочки, недоступной для вскрытия ее лизоцимом и тритоном X-100.

ЛИТЕРАТУРА

1. Янулайтис А. А. Рестрикционные эндонуклеазы // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1984. Т. 29. № 2. С. 133-138.
2. Arber W. Promotion and limitation of genetic exchange // Science. 1979. V. 205, P. 361 - 365.
3. Sharp P. A., Sugden B., Sambrook I. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-etidium bromide electrophoresis // Biochemistry. 1973. V. 12, P. 3055-3063.

4. Smith D. I., Blatner F. R., Davies J. The isolation and partial characterization of a new restriction endonuclease from *Providencia stuartii* // Nucl. Acids Res. 1976. V. 3. P. 343-353.
5. Нетесов С. В., Грачев С. А. Эффективный метод выделения эндонуклеаз рестрикции // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 5. С. 790-791.
6. Журавлева Л. И., Орешкин Е. Н. Влияние условия культивирования и ультразвукового разрушения биомассы *Aphanothece halophytica* на выход эндонуклеаз рестрикции // Прикл. биохимия и микробиология. 1985. Т. Вып. 3. С. 401-406.
7. Whitehead P. R., Nigel L., Brown. A simple and rapid method for screening bacteria for type II restriction endonucleases; enzymes in *Aphanothece halophytica* // Arch. Microbiol. 1985. V. 141. P. 70-74.
8. Mayer H., Reichenbach H. Restriction endonuclease: general survey procedure and survey of gliding bacteria // J. Bacteriol. 1978. V. 136. P. 708-713.
9. Sugisaki H., Kanazawa S. New restriction endonucleases from *Flavobacterium okeanokoites* (Fok I) and *Micrococcus luteus* (Mlu I) // Gene. 1981. V. 16. P. 73-78.