

Архивная копия публикации SibEnzyme

Источник: https://web.archive.org/web/20070124042944id_/http://sciencerussian.sibenzyme.com/article12_article_15_1.phtml

Сохранено из Wayback Machine для восстановления материалов принадлежавшего SibEnzyme сайта.

Выявление штаммов-продуцентов эндонуклеаз рестрикции среди водных микроорганизмов озера Байкал

В. С. Дедков*, В. Е. Репин, Н. И. Речкунова, С. Х. Дегтярев, В. А. Верхозина, Т. П. Виноградова
* - автор для переписки

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) находят широкое применение в генно-инженерных работах [1, 2], что обуславливает актуальность выявления новых штаммов-продуцентов этих ферментов, являющихся более технологичными, чем известные. Поиск новых штаммов-продуцентов рестриктаз проводится среди микроорганизмов, выделенных из различных природных изолятов. Водные микроорганизмы относительно плохо изучены как возможные продуценты рестриктаз, хотя среди них недавно были выявлены ферменты с новой специфичностью [3, 4]. Целью данной работы явились обнаружение и идентификация новых штаммов-продуцентов рестриктаз среди микроорганизмов уникальной экологической ниши — оз. Байкал. Изолированность экосистемы Байкала, установленная в настоящее время, обеспечивает благоприятные условия для образования новых видов организмов. Поскольку хорошо известно, что при прочих равных условиях скорость эволюции вида обратно пропорциональна продолжительности генерации [5], то очевидна целесообразность поиска эндемичных видов и, следовательно, продуцентов новых ферментов среди байкальских микроорганизмов, т. е. штаммов, выделенных из пелагиальной части водной толщи и донных отложений.

МЕТОДИКА

Пробы воды оз. Байкал отбирали с разных глубин водной толщи в разных районах озера, донные отложения - в литорали. Учитывая относительную бедность бактериальной жизни вод Байкала (типичное значение общей численности летом не более 10^3 см^{-3} , хемоорганотрофных бактерий около 10^2 см^{-3}), пробы засеивали по 1 мл методом глубинного посева. В качестве питательной среды использовали мясопептонный агар. Культивирование бактерий проводили при температуре 22 °С в течение 48 ч. Выросшие колонии очищали от сопутствующих видов и отсеивали в пробирки на поверхность питательного агара и инкубировали 20 ч при 25 °С.

Наличие рестриктаз в отдельных колониях определяли, как описано ранее [6], с некоторыми модификациями. Колонию клеток переносили бактериологической петлей в 100 мкл лизирующей смеси, содержащей (ОД М *трис*-HCl pH 8,0; 0,05 М NaCl 0,001 М ЭДТА; 0,1 % тритон X-100 (Serva, ФРГ) и 0,1 мг/мл лизоцима. Клетки суспендировали пипетированием и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. В полученный лизат добавляли MgCl_2 до концентрации 10 мМ, отбирали 50 мкл смеси и смешивали с 1 мкг ДНК фага λ CI 875. Обе смеси инкубировали 1 ч при 37 °С. Продукты гидролиза анализировали электрофорезом в 0,7 %-ной агарозе ("Sigma", США, тип 1) в трис-боратном буфере (10,8 г трис, 5,5 г борной кислоты, 0,93 г ЭДТА на 1 л, pH 8,3), содержащем 1 мкг/мл бромида этидия. Гель фотографировали в ультрафиолете через красный светофильтр. Микроорганизмы, лизаты которых специфически фрагментировали ДНК, рассевали

на питательном агаре и чистую культуру идентифицировали по Берги [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе скрининга штаммов было проверено около 150 бактерий из коллекции водных микроорганизмов оз. Байкал. Среди них выявлены микроорганизмы, дающие специфическую фрагментацию ДНК (см. рисунок). Как видно из рисунка, на восьмой дорожке нанесен лизат бактерии, продуцирующей фермент-изошизомер рестриктазы Cla I (сайт узнавания ATCGAT). Штамм-продуцент имеет следующую характеристику:

это подвижные аэробные грамотрицательные палочки размером 0,3-0,4 x 1,2-2,6 мкм после фиксирования жаром и окраски, имеющие три полярных жгутика. Каталазо- и оксидазоположительные. Нитрат не восстанавливают. Сероводород и индол не образуют. Гидролизуют желатину, твин-80, но не крахмал. Гемолизуют эритроциты лошади. Чувствительны к тетрациклину, канамицину, устойчивы к ампициллину, хлорамфениколу, стрептомицину (в концентрациях 100 мкг/мл). Глюкозу не сбраживают, в аэробных условиях из глюкозы образуют кислоту без газа. Также образуют кислоту из маннозы, арабинозы, но не из рамнозы, дульцита, маннита, лактозы, мальтозы, сорбита, сахарозы, инозита, глицерина, этанола. Растут на питательном агаре в присутствии 1 % SDS. Используют при росте на минеральной среде в качестве единственного источника углерода - глюкозу, маннит и ацетат калия. Хорошо растут на обычных агаризованных питательных средах, давая выпуклые, гладкие, блестящие колонии, белеющие при старении. Иногда замечен зеленоватый пигмент. В жидкой среде образуют поверхностную пленку. Растут при температуре от +5 до +37 °С. Оптимум 30 °С. Оптимум pH около 7. При pH 9 рост замедляется, а при pH 3 роста нет. Растут при концентрации NaCl от 0 до 7 %. Содержание ГЦ в ДНК равно 65 % (по плавучей плотности).

Из приведенных данных следует, что штамм относится к виду *Pseudomonas gladioli*, а фермент, продуцируемый им, называется Pga I согласно общепринятой номенклатуре [8]. Определение остальных микроорганизмов, лизаты которых расщепляют ДНК, позволило отнести их к видам *Flavobacterium aquatile* (дорожка 2), *Hafnia alvei* (дорожка 4), *Acinetobacter calcoaceticus* (дорожка 6). Ферменты названы соответственно Fau I, Hal I, Hal II, Aca I. Предварительный анализ субстратной специфичности этих рестриктаз с помощью сопоставления картин гидролиза ДНК фага λ CI 857 (см. рисунок) с теоретически рассчитанными для различных ферментов [9, 10] показал, что Hal I и Hal II являются, по-видимому, изошизомерами рестриктаз EcoR I и Pst I соответственно, а Aca I узнает и расщепляет последовательность CCA(N)5TGG, являясь изошизомером рестриктазы Pfl MI.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис 1. Фотография геля после электрофореза продуктов гидролиза ДНК лизатами различных микроорганизмов. Дорожки: 1,2 - лизат *Flavobacterium aquatile*, 3, 4 - лизат *Hcfnia alvei*, 5, 6 - лизат *Acinetobacter calcoaceticus*, 7, 8 - лизат *Pseudomonas gladioli*. В инкубационные смеси, соответствующие дорожкам 2, 4, 6, 8, 9, была добавлена ДНК фага Лямбда CI857. В пробе № 9 к ДНК было добавлено 2 ед. фермента Cla I.

Определенные нами штаммы ранее не были описаны как продуценты выявленных рестриктаз [9, 10]. В штаммах *Hafnia alvei* и *Flavobacterium aquatile* рестриктазы обнаружены впервые. Среди микроорганизмов рода *Pseudomonas* ранее не было обнаружено продуцентов ферментов, способных узнавать и расщеплять последовательность ATCGAT, хотя это один из наиболее "богатых" рестриктазами родов. Вид *Acinetobacter calcoaceticus* менее изучен, но продуцентов

ферментов, способных расщеплять ДНК по последовательности CCA(N)5TGG, в нем не обнаружено. Все это свидетельствует о том, что изолированность экосистемы оз. Байкал, вероятно, и сформировала отличную от других микрофлору этого озера.

Выявленные нами штаммы-продуценты легко культивируются и могут оказаться технологичными при производственном получении рестриктаз.

Авторы выражают благодарность д-ру биол. наук С. Н. Загребельному и чл.-кор. АН СССР М. А. Грачеву за помощь в работе и при подготовке рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Янулайтис А. А. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.- 1984.- Т. 29, № 2.-С. 133-138.
2. Маниатис Т., Фриг Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.- М.: Мир. 1984.
3. Дегтярев С. Х., Речкунова Н. И., Нетесова Н. А. и др. // Биоорган, химия.- 1987.- Т. 13, № 3.- С. 422-423.
4. Дегтярев С. Х., Репин В. Е., Речкунова Н. И. и др. // Там же.- С. 420-421.
5. Оно С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции/Пер, с англ. под ред. Б. Н. Сидорова.- М.: Мир, 1973.- С. 96.
6. Белавин П. А., Дедков В. С., Дегтярев С. Х. // Прикл. биохимия и микробиология.- 1988.- Т. 24, вып. 1.- С. 121-124. ([интернет-версия](#))
7. Bergey's manual of systematic Bacteriology.- Baltimore; London, 1984.- V. 1, 2.
8. Smith H. O., Nathans D.// J. Mol. Biol.- 1973.- V. 81, N 3.- P. 419-423.
9. Roberts J. R. // Nucl. Acids Res.- 1988.- V. 16, supplement.- P. 271-313. 10 New England Biolabs.- Catalog 1986/87.- P. 116-117.