

Определение эндонуклеаз рестрикции в колониях микроорганизмов *Streptomyces* и *Nocardia*

Категория: [Методы исследования](#)

Просмотров: 3568

[В. С. Дедков](#), [С.Х. Дегтярев](#)

Прикладная биохимия и микробиология Том 28, 1992, №. 2, 309- 313

Предложен метод тестирования различных штаммов актиномицетов Streptomyces и Nocardia на наличие эндонуклеаз рестрикции. Тестирование проводилось непосредственно в клетках из колоний с чашки Петри. Собранные клетки обрабатывали лизоцимом и тритоном X-100, после чего клеточный лизат анализировали на наличие специфической эндонуклеазной активности. Метод позволяет тестировать ферменты NcoI, NotI, NruI, SfiI, Sfr303I в лизатах соответствующих штаммов-продуцентов.

Широкое использование эндонуклеаз рестрикции в генно-инженерных работах обусловило все возрастающий интерес исследователей к свойствам этих ферментов, способам их получения и обнаружения [1]. Выявление новых рестриктаз позволяет расширить список ферментов, используемых в практической деятельности, заменить известные продуценты эндонуклеаз рестрикции на более технологичные. Обнаружение ферментативной системы рестрикции-модификации в тех или иных бактериальных штаммах - необходимый шаг при поиске штаммов-продуцентов рестриктаз. Однако решение этой задачи биологическими методами часто не позволяет выявить штаммы, несущие искомые ферменты [2].

В последнее время широкое применение нашли биохимические методы тестирования бактериальных штаммов на наличие сайт-специфической ДНКазной активности [3] [4-6]. Эти методы основаны на получении осветленных клеточных лизатов и прямого анализа их ферментативной активности. Они различаются в основном условиями обработки клеток при разрушении последних, и среди них можно выделить предложенный нами метод скрининга, который не требует предварительного культивирования бактерий в жидкой питательной среде, что значительно упрощает процедуру тестирования [3].

С помощью предложенного метода мы обнаружили ряд новых микроорганизмов - продуцентов рестриктаз, относящихся к родам *Bacillus*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Vibrio* и некоторым другим родам грамотрицательных и грамположительных бактерий [7], однако предлагаемый метод не позволял тестировать на наличие рестриктаз штаммы, относящиеся к актиномицетам [3]. Таким же недостатком обладают и другие предлагаемые биохимические

методы [4-6],

В данной работе предложен модифицированный и еще более упрощенный вариант метода тестирования штаммов - продуцентов рестриктаз, позволяющий выявить рестриктазную активность в культурах актиномицетов (*Nocardia* и *Streptomyces*), а также в *Staphylococcus*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы *Staphylococcus saprophyticus* B6 (B-4069), *Streptomyces fimbriatus* (S-750), *Streptomyces fradiae* (S-866), *Nocardia rubra* (B-3043), *Nocardia corallina* (B-613), *Nocardia otitidis-caviarum* (S-777) получены из Всесоюзной коллекции промышленных микроорганизмов ВНИИ генетики (Москва).

В работе использованы лизоцим марки А (НПО "Биолар", Олайне), ДНК фага λ производства НПО "Фермент" (Вильнюс), тритон X-100 фирмы "Serva" (ФРГ), бромистый этидий и агарозу тип I фирмы "Sigma" (США), ДНК pDKR 85 [8] выделяли, как описано [9]. 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 в течение 2 сут при 30°C. 1-3 мг клеток непосредственно с чашки Петри суспендировали пипетированием в 100 мкл смеси, содержащей 10 мМ трис-HCl, pH 8.0, 1 мМ ЭДТА, 0.1%-ный тритон X-100 и свежеприготовленный лизоцим в концентрации 1 г/л. Смесь инкубировали 3 ч при комнатной температуре, периодически суспендируя пипетированием. По окончании инкубации в пробы вносили по 10 мкл раствора, содержащего 1 М трис-HCl, pH 8.0, 0.5 М KCl, 0.1 М MgCl₂, и, тщательно перемешав, смесь делили пополам, добавив к одной половине инкубационной смеси 3 мкл ДНК фага λ или плазмиды (в концентрации 0.5 мг/мл). Далее готовили двукратные разведения полученной реакционной смеси буфером следующего состава: 0.1 М трис-HCl, pH 8.0, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 50 мкг/мл ДНК фага λ или плазмиды. Инкубацию проводили 3 ч при 37°C. Продукты реакции подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле. Электрофорезный буфер содержал 89 мМ трис, 89 мМ H₃BO₃, 2 мМ ЭДТА, pH 8.0 и бромистый этидий в концентрации 1 мг/л. Электрофорез проводили при 10 В/см в течение 1 ч. Гели фотографировали в ультрафиолете через красный светофильтр фотоаппаратом "Зенит".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами был предложен простой биохимический метод тестирования бактериальных штаммов на наличие сайт-специфических ДНКаз, включающий стадию осветления клеточного лизата центрифугированием [3]. Однако для некоторых родов микроорганизмов этим методом не удается тестировать рестриктазную активность в штаммах-продуцентах.

На рис. 1 приведены данные анализа рестриктазной активности в штамме *Staphylococcus saprophyticus* B6 при различной схеме обработки клеток. Как видно из рис. 1, осветление клеточного лизата центрифугированием с последующей инкубацией с ДНК фага λ в соответствии с ранее предложенной методикой [3] не позволяет зафиксировать наличие рестриктазной активности. В то же время исключение стадии центрифугирования и тестирование непосредственно неосветленного клеточного лизата дают отчетливую картину рестрикции при

одинаковом времени обработки клеток (20 мин при комнатной температуре). Это свидетельствует о том, что для микроорганизмов этого рода тестирование неосветленных клеточных лизатов при выявлении рестриктазных активностей в бактериальных штаммах предпочтительнее.



Рис. 1. Определение рестриктазной активности в штамме *Staphylococcus saprophyticus* B6. 1, 3, 5 - добавлена ДНК фага λ ; 2, 3 - неосветленный клеточный лизат; 4, 5 - осветленный центрифугированием клеточный лизат

Возможно, это связано с внутриклеточной локализацией эндонуклеаз рестрикции. Кроме того, следует иметь в виду, что в предлагаемом варианте метода резко увеличивается концентрация тестируемой рестриктазы по сравнению с ранее предложенным методом. Наконец, необходимо учитывать и тот факт, что в ходе инкубации с ДНК фактически продолжается лизис клеток, что также сказывается на глубине гидролиза субстратной ДНК.

Однако использование неосветленных клеточных лизатов все же не позволяет зарегистрировать рестриктазную активность для случая актиномицетов. В частности, тестирование штамма *Nocardia rubra* - продуцента рестриктазы NruI в неосветленных лизатах с помощью предложенного метода не позволило зарегистрировать активность фермента (данные не приводятся).

Для создания биохимического метода тестирования культур актиномицетов на наличие эндонуклеаз рестрикции мы изменили условия лизиса бактериальных клеток, увеличив, как описано в методике, концентрацию лизоцима до 1 г/л, а время лизиса и инкубации с ДНК - до 3 ч. Кроме того, мы использовали метод разведения лизата для более достоверного тестирования рестриктазной активности.

На рис. 2 приведены результаты тестирования рестриктаз SsrB6I, NruI, NcoI, Sfr303I в грубых лизатах штаммов *Staphylococcus saprophyticus* B6, *Nocardia rubra*, *Nocardia corallina* и *Streptomyces fradiae* 303 соответственно. В предложенных условиях отчетливо видна характерная картина рестрикции для всех четырех ферментов, причем для трех последних рестрикция значительно лучше при разведении лизатов бактериальных штаммов.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 2. Тестирование рестриктаз SsrB6I (а), NruI (б), NcoI (в), Sfr303I (г) из штаммов бактерий *Staphylococcus saprophyticus* B6, *Nocardia rubra*, *Nocardia corallina* и *Streptomyces fradiae* 303 соответственно. 1 - неосветленный лизат, 2 - 6 - добавление ДНК фага λ. Разведения: 3 - 1/2, 4 - 1/4; 5 - 1/8; 6 - 1/16

Поиск и выявление эндонуклеаз рестрикции среди антиномицетов представляются особенно актуальными в связи с необходимостью крупноблочной фрагментации ДНК. На сегодня все известные эндонуклеазы рестрикции, способные узнавать восьминуклеотидные последовательности (и в силу этого имеющие редко встречающиеся сайты узнавания на протяженных молекулах ДНК), обнаружены в микроорганизмах родов *Nocardia*, *Streptomyces*, *Frankia* [7].

На рис. 3 приведены данные по тестированию рестриктаз SfiI и NotI в штаммах бактерий *Streptomyces fimbriatus* и *Nocardia otitidis-caviarum* соответственно предложенным методом. Как субстрат использовали линейаризованную плазмидную ДНК pDKR 85, содержащую сайты узнавания рестриктаз NotI и SfiI.

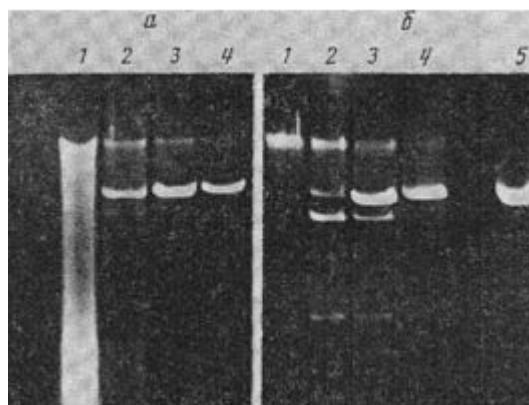


Рис. 3. Тестирование крупнощепящих рестриктаз SfiI (а) и NotI (б) на pDKR 85 линейаризованной рестриктазой VspI. 1 - неосветленный лизат, 2 - 5 - добавление ДНК pDKR 85. Разведения: 3 - 1/2; 4 - 1/4. 5 - субстратная ДНК без лизата

Как видно из рис. 3, предложенный метод позволяет зафиксировать рестриктазную активность в этих штаммах, и, на наш взгляд, данный способ тестирования рестриктаз может быть использован в работе по выявлению новых эндонуклеаз рестрикции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Янулайтис А.А. Ферменты рестрикции и их применение. Итоги науки и техники. Серия Биотехнология / Под ред. Дебабова В.Г. Т. 17. М.: ВИНТИ, 1989. С. 1-203.
2. Arber W. // Science. 1979. V. 205. P. 361-365.
3. Белавин П.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. // Прикл. биохимия и микробиология. 1988. Т. 24. С. 121-124. . ([интернет-версия](#))
4. Whitehead P.R., Brown N.L. // Arch. Microbiol. 1985. V. 141. P. 70-74.
5. Соколов И.Н. / Молекулярная генетика, микробиология и вирусология 1989. № 5. С. 1-7.
6. Mijahara M., Mise K. // Anal. Chim. Acta. 1988. V. 213. P. 273-277.
7. Roberts R.J. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18 Suppl. P. 271-313.
8. Репин В.Е., Карбышев И. И., Дегтярев С.Х. // Тез. докл. Всесоюз. конф. по программе "Плазмида". Пущино, 1985. С. 66
9. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y., 1982. P. 519.