СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1761804 A1

(51)5 C 12 N 9/16, 1/20

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4896776/13
(22) 27.12.90
(46) 15.09.92. Бюл. № 34
(71) Институт биологической и медицинской химии АМН СССР и Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельрардта
(72) Н.Н.Соколов, Н.В.Аникейчева, М.А.Эльдаров, А.Б.Фицнер, И.В.Карпычев, А.А.Калугин, О.Т.Самко, Э.Б.Хорошутина и Г.И.Либрик
(56) Walker J.N.B., Dean P.D.G., Saunders J.R., Nucleic Acids Research, 1986, v. 14. p. 1293–1301.

Roberts R.J., Nucleis Acids Research, 1988, v. 16, p. r. 271–313.

Авторское свидетельство СССР № 1170777, кл. С 12 N 9/14, 1983.

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ BACILLUS COAGULANS – ПРОДУЦЕНТ РЕСТРИКТАЗЫ BCO AI

(57) Использование: биотехнология и в практике молекулярно-генетических и генноинженерных работ. Сущность изобретения: продуцент B.coagulans BKM B-732 выращивают при аэрации в питательной среде, содержащей источники углерода, азота и минеральные соли, до поздней логарифмической фазы роста, целевой продукт выделяют из полученной биомассы известными методами. Биомасса B.coagulans BKM B-732 содержит новую сайт-специфическую эндонуклеазу BcoAI, узнающую и расщепляющую последовательность ДНК 5' C-A-C↓ G-T-G 3', в количествах, достаточных для получения рестриктазы в препаративных количествах, содержание рестриктазы BcoAI в биомассе 6000–8000 ед/г сырой биомассы. Для изошизомера BcoAI, рестриктазы PmaCI, выход очищенного фермента 20 ед на 1 г сырого веса биомассы. Выход очищенного препарата эндонуклеазы рестрикции BcoAI составляет 700-1 200 ед. активности на 1 г сырой биомассы, что в 35–60 раз превышает известные цифры для рестриктазы PmaCI. Эндонуклеаза рестрикции BcoAI не содержит примесей фосфатаз, экзонуклеаз и неспецифических эндонуклеаз.

Изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано в молекулярно-генетических и генноинженерных работах.

Сайт-специфические эндонуклеазы (синонимы: рестриктазы II класса, эндонуклеазы рестрикции) нашли широкое применение в качестве уникального инструмента исследования в молекулярном клонировании, структурных исследованиях ДНК, разработке подходов к диагностике наследственных заболеваний у человека, являются удобной моделью для изучения механизмов ДНК-белковых взаимодействий.

К настоящему времени обнаружено и охарактеризовано более 1300 рестриктаз, одна из которых PmaCI выделена из Pseudomonas maltophila CB50P /1/. Фермент гидролизует ДНК фага λ в 3 участках, аденовируса Ad2 в 10 и не расщепляет ДНК обезьяннего вируса SV40, ДНК фага ϕX174 и плазмиду pBR322 /2/.

Содержание рестриктазы PmaCI в биомассе не указано, а выход очищенного препарата фермента составляет около 20 ед активности на 1 г биомассы.

Целью изобретения является получение штамма бактерий, продуцирующего новую

(19) SU (11) 1761804 A1

рестриктазу BcoAI со специфичностью 5' ... C-A-C↓G-T-G ... 3' с высоким выходом фермента.

Поставленная задача достигается тем, что биомассу B.coagulans BKM B-732 выращивают при аэрации в питательной среде, содержащей источники углерода, азота и минеральные соли, до поздней логарифмической фазы роста, целевой продукт выделяют из полученной биомассы известными методами.

Рестриктаза BcoAI – изошизомер PmaCI, узнает и расщепляет участок нуклеотидной последовательности ДНК 5' ... C-A-C↓G-T-G ... 3'. Фермент гидролизует ДНК фага λ по 3 участкам, ДНК аденовируса Ad2 по 10 и не имеет сайтов узнавания на ДНК обезьяннего вируса SV40, ДНК фагаϕ X174 и плазмиде pBR322.

Поиск штамма продуцента проводили с использованием толуольного экспресс-метода тестирования рестриктазной активности в клетках микроорганизмов с последующим электрофоретическим разделением продуктов гидролиза ДНК в геле агарозы. Всего обследовано 48 штаммов, относящихся к родам Bacillus.

Штамм B.coagulans BKM B-732 получен из Всесоюзной Коллекции Микроорганизмов АН СССР, где хранится под № BKM B-732 ← CCM 101=IFO0 3557.

Характеристика штамма.

Морфологические особенности. Клетки палочковидные, прямые или почти прямые, подвижны, образуют споры. Грамположительные.

Культурально-биохимические свойства. На скошенном агаре рост по штриху обильный. На чашках Петри с мясо-пептонным агаром колонии крупные, матовые. На мясо-пептонном бульоне и бульоне Хоттингера равномерное помутнение, осадок.

отношение к кислороду – строгий аэроб.

Каталаза +,

Индол -,

На глюкозе – кислота +, газ -,

Желатина уколом – разжижение.

Оптимальные условия выращивания и хранения культуры.

Культура Bacillus coagulans BKM B-732 хорошо растет на твердых и жидких полноценных питательных средах: мясо-пептонном бульоне, среде LB, бульоне Хоттингера.

Оптимальные значения температуры и pH роста культуры находятся при 37° C и pH 7,2–7,4.

Наибольший выход биомассы, содержащей рестриктазу BcoAI, достигается при выращивании штамма-продуцента в ферментере при 37° C в аэробных условиях на питательной среде Хоттингера, которая содержит в 1 л: 250 мл основного перевара Хоттингера; 5 г NaCl; 1 г K_2HPO_4 и до 1 л воды. Выращивание прекращают в конце логарифмической фазы роста, когда рост достигает A_{650}=1,5–1,7. Выход биомассы 7–8 г/л.

На рыбной среде культура растет плохо (при 18-часовой ферментации на качалке A_{650}=0,3).

Ферментацию культуры проводят после добавления в ферментер инокулята в соотношении 1:10 к объему среды.

Рабочие культуры пересевают на мясо-пептонный бульон или среду Хоттингера один раз в 8–10 дней.

Хранят культуру в полужидком мясо-пептонном агаре под вазелиновым маслом или в лиофилизированном виде в ампулах.

Выделение рестриктазы BcoAI проводят фракционированием бесклеточных экстрактов двухфазной системе полиэтиленгликоль/декстран и хроматографией на колонках с ионообменниками.

Инкубационная смесь для определения активности рестриктазы BcoAI объемом 30–50 мкл содержит: 0,01 М трис-HCl буфер, pH 7,5, 0,01 М $MgCl_2$, 0,1 М NaCl, 0001 М дитиотреитола, 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 1 мкг ДНК фага λ и 0,2–2 мкл фермента. Инкубацию проводят при 37° C в течение 60 мин. Продукты расщепления ДНК фага λ анализируют электрофоретически в 0,8–1% агарозном геле с последующим прокрашиванием геля в бромистом этидии. За единицу активности рестриктазы BcoAI принимают количество фермента (в мкл), которое за 1 ч инкубации полностью гидролизует 1 мкг ДНК фага λ при оптимальных условиях реакции.

Пример 1. Культуру B.coagulans BKM B-732 предварительно адаптируют в течение ночи при 37° C в условиях аэрации на основной питательной среде, содержащей в 1 л: 250 мл основного перевара Хоттингера: 5 г NaCl; 1 г K_2HPO_4; до 1 л H_2O. Инокулят для посева в ферментер готовят, пересевая адаптированную культуру на 1 л свежей среды из расчета 1:10 и размножают в условиях аэрации.

Ферментацию культуры проводят после добавления в среду инокулята в соотношении 1:10 к объему среды в условиях аэрации при температуре 37° C; pH среды 7,2–7,4.

Во время выращивания pH культуральной жидкости поддерживают в пределах 7,0–7,6.

Выращивание продолжают до достижения конца логарифмической фазы роста.

Выход сырой биомассы составляет 7–8 г/л культуральной жидкости.

Содержание рестриктазы BcoAI в биомассе составляет 6000–8000 ед/г микробной массы.

Выделение рестриктазы BcoAI

10 г биомассы B.coagulans BKM B-732 суспендируют в буферном растворе, клетки разрушают ультразвуком при температуре + 2–4° С и клеточную суспензию центрифугируют в течение 60 минут при 105 000 g. Осадок, содержащий клеточные оболочки и неразрушенные клетки, отбрасывают, а присутствующий в супернатанте фермент фракционируют в двухфазной системе полиэтиленгликоль/декстран. Обогащенную по рестриктазе BcoAI верхнюю фазу хроматографируют в калий-фосфатном буфере в градиенте концентрации KCl на колонках с ДЭАЭ-сефарозой CL-6B и с фосфоцеллюлозой PII.

Получают 12000 ед. активности фермента в 2 мл буфера с 50% глицерином. Выхрд очищенного препарата рестриктазы BcoAI составляет 1200 ед на 1 г сырого веса биомассы. Препарат фермента стабильно сохраняет активность в течение 9–12 месяцев при хранении при -20° С.

Фермент не содержит примесей фосфатаз, экзонуклеаз и неспецифических эндонуклеаз и пригоден для молекулярного клонирования и изучения структуры ДНК.

Пример 2. Культивирование штамма B.coagulans BKM B-732 проводят аналогично описанному в примере 1, за исключением того, что в качестве питательной среды используют среду LB, которая содержит в 1 л: 10 г триптона; 10 г дрожжевого экстракта; 10 г NaCl; до 1 л воды.

Выход биомассы 5–6 г/л культуральной жидкости.

После проведения очистки фермента, как описано выше, выход рестриктазы BcoAI составляет 700–900 ед. активности/г сырого веса биомассы.

Таким образом, по предлагаемому способу получают новую эндонуклеазу рестрикции BcoAI.

Биомасса штамма B.coagulans BKM B-732 содержит новую сайт-специфическую эндонуклеазу BcoAI, узнающую и расщепляющую нуклеотидную последовательность ДНК 5' ... C-A-C↓ G-T-G ... 3' в количествах, достаточных для получения рестриктазы в препаративных масштабах: содержание рестриктазы BcoAI в биомассе 6000–8000 ед/г.

Выход очищенной рестриктазы PmaCI, изошизомера BcoAI, 20 ед/г микробной массы.

Для рестриктазы BcoAI выход очищенного фермента составляет 700–1200 ед активности на 1 г сырой биомассы, что в 35–60 раз превышает указанные цифры для рестриктазы PmaCI (50 ед).

Эндонуклеаза рестрикции BcoAI не содержит примесей фосфатаз и неспецифических нуклеаз.

Учитывая особенности строения участка узнавания рестриктазы BcoAI и его локализации на векторных молекулах ДНК, новый фермент может быть использован в молекулярно-генетических и биотехнологических работах.

Формула изобретения

Штамм бактерий Bacillus coagulans BKM B-732 – продуцент рестриктазы Bco AI.

Составитель И.Привалова
Редактор В.Трубченко Техред М.Моргентал Корректор Л.Ливринц

Заказ 3235 Тираж Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул.Гагарина, 101