



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГКНТ СССР

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

- (21) 4896775/13  
(22) 27.12.90  
(46) 15.09.92. Бюл. № 34  
(71) Институт биологической и медицинской химии АМН СССР  
(72) Н.Н.Соколов, Н.В.Аникейчева, А.Б.Фицнер, О.Т.Самко, Э.Б.Хорошутина, А.А.Калугин и Г.И.Либрик  
(56) Roberts R.J., Nucl. Acids Res., 1989, v.16, pp 271-r 313  
Hughes S.G., Bruce T., Murray K., Biochemical J., 1980 v. 185, p. 59-63.  
Авторское свидетельство СССР № 1170777, кл. С 21 N 9/14, 1983.  
(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ *BACILLUS ALVEI* - ПРОДУЦЕНТ РЕСТРИКТАЗЫ BAV B II  
(57) Использование: биотехнология и в молекулярно-генетических работах и генноинженерных исследованиях. Сущность изобретения: биомассу *B. alvei* ВКМ В-674 выращивают в аэробных условиях в питательной среде, содержащей источники угле-

2

рода, азота и минеральные соли до поздней логарифмической фазы роста, целевой продукт выделяют из полученной биомассы известными методами. Биомасса штамма бактерий *B. alvei* ВКМ В-674 содержит новую эндонуклеазу рестрикции BAV B II, узнающую и расщепляющую нуклеотидную последовательность ДНК 5' ... G<sup>+</sup> CNCC ... 3', в количествах, достаточных для получения рестриктазы в препаративных масштабах: содержание рестриктазы BAV B II в биомассе 3-4 x 10<sup>4</sup> ед/г сырой микробной массы. Для рестриктазы Asu I, изоизомера эндонуклеазы рестрикции BAV B II, содержание фермента в биомассе и выход очищенного препарата фермента не указаны. Выход очищенного препарата рестриктазы BAV B II составляет 8-12 x 10<sup>3</sup> ед на 1 г сырой биомассы. Рестриктазы BAV B II не содержит примесей фосфатаз, неспецифических эндонуклеаз и экзонуклеаз.

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

Рестриктазы II класса (синонимы: эндонуклеазы рестрикции, сайт-специфические эндонуклеазы), осуществляющие расщепление фосфодиэфирных связей ДНК по специфическим нуклеотидным последовательностям (сайтам), являются незаменимым инструментом исследования в практике молекулярно-генетических и генно-инженерных работ, представляют собой уникальный объект для изучения природы и механизмов белково-нуклеиновых взаимодействий. Этими обстоятельствами и объясняется огромный интерес

исследователей в области биохимии, молекулярной биологии, микробиологии, вирусологии к выявлению продуцентов новых рестриктаз, разработке способов их очистки, изучению свойств, использованию в молекулярно-генетических экспериментах.

Рестриктазы выделены и частично или полностью охарактеризованы из более чем 1100 микроорганизмов самых различных таксонов /1/. Одна из рестриктаз, AsuI, выделена из штамма *Anabaena subcylindrica* ССАР 1403/4В /2/.

Эндонуклеаза рестрикции AsuI расщепляет ДНК фага  $\lambda$  в 74 участках, ДНК аденовируса Ad 2 в 164, ДНК обезьяньего вируса SV 40 в II, ДНК фага  $\phi$ X174 в 2 и плазмиду

pBR322 в 15. Фермент гидролизует участок нуклеотидной последовательности ДНК 5' ... G<sup>+</sup>GNCC ... 3'.

Содержание рестриктазы AsuI в биомассе *Anabaena subcylindrica* ССАР 1403/4В и выход очищенного от примесей неспецифических нуклеаз фермента не приводятся.

Целью изобретения является получение штамма бактерий, продуцирующих с высоким выходом новую рестриктазу Bav BII, узнающую и расщепляющую последовательность нуклеотидов 5' ... G<sup>+</sup> CNCC ... 3'.

Поставленная задача достигается тем, что биомассу *B.alvei* ВКМ В-674 выращивают в аэробных условиях в питательной среде, содержащей источники углерода, азота и минеральные соли до поздней логарифмической фазы роста, целевой продукт выделяют из полученной биомассы известными методами.

Рестриктаза Bav BII, изошизомер AsuI, узнает и гидролизует участок нуклеотидной последовательности ДНК 5' ... G<sup>+</sup> GNCC ... 3'. Эндонуклеаза рестрикции Bav BII расщепляет ДНК фага  $\lambda$  по 74 участкам, ДНК аденовируса Ad2 по 164, ДНК обезьяньего вируса SV40 по 11, ДНК фага  $\phi$ X174 по 2 и плазмиду pBR322 по 15.

Поиск штамма-продуцента проводили с использованием экспресс-метода определения сайт-специфической эндонуклеазной активности в толуольных элизатах микробных клеток с последующим электрофоретическим разделением в агарозном геле продуктов расщепления ДНК фага  $\lambda$ . Всего обследовано 18 штаммов *Bacillus alvei*.

Штамм *B.alvei* ВКМ В-674 получен из Всесоюзной коллекции микроорганизмов АН СССР, где хранится под № ВКМ В-674 NCI В8199 NRRL В-384

Характеристика штамма

Морфологические особенности. Палочковидные клетки, прямые или почти прямые, размером 0,5–0,8 x 2–5 мкм, подвижные (признак варьирует). Расположены поодиночке и парами, образуют споры. Грамположительны (признак непостоянный, варьирует Gr<sup>+</sup> → Gr).

Культурально-биохимические свойства

На скошенном агаре – слабый, нежный налет. Колонии на МПА очень мелкие, блестящие, выпуклые с ровными краями.

На мясо-пептонном бульоне и бульоне Хоттингера – заметное равномерное помутнение, сероватая нежная пленка.

Отношение к кислороду – аэроб.

Каталаза – образует.

Утилизация углеводов – на глюкозе, лактозе, сахарозе образуют кислоту; на арабинозе, ксилозе и манните кислоту не образуют.

5 Крахмал – гидролизуют.

Лакмусовое молоко – свертывание, пептонизация.

Индол и диоксиацетон – образуют.

Казеин – расщепляют.

10 Тирозин – не расщепляют.

Фенилаланин – не дезаминируют.

Оптимальные условия выращивания и хранения культуры.

15 Культура *B.alvei* ВКМ В-674 хорошо растет на жидких и твердых полноценных питательных средах – бульоне Хоттингера, среде LB, мясопептонном бульоне.

20 Максимальная и минимальная температура роста культуры соответственно 35–45° С и 15–20° С, а оптимальная температура – 37° С. Оптимум роста pH 7,0–7,2. При pH 10 культура не растет.

25 Наибольший выход биомассы, содержащей рестриктазу Bav BII, получают в том случае, когда штамм-продуцент выращивают при 37° С в аэробных условиях в ферментере на питательной среде Хоттингера, которая содержит в 1 л: 250 мл основного перевара Хоттингера; 10 г NaCl; 1 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; H<sub>2</sub>O до 1 л. Выращивание прекращают через 3–4 в конце логарифмической фазы роста, когда рост достигает A<sub>650</sub>=1,3–1,5. Выход биомассы 6,5–8,5 г/л. На среде "рыбный экстракт" (на основе гидролизата кильки) культура растет медленно, а накопление активности рестриктазы в 3–4 раза ниже, чем при культивировании на средах LB или Хоттингера.

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

Рабочие культуры пересевают на мясопептонный бульон или бульон Хоттингера один раз в 7–10 дней.

45 Хранят культуру в полужидком мясопептонном агаре под вазелиновым маслом в лиофилизированном виде в ампулах.

Культура непатогенна для мышей.

50 Выделение рестриктазы Bav BII проводят фракционированием бесклеточных экстрактов изопропанолом и хроматографией на ионообменнике и аффинном сорбенте.

Инкубационная смесь для определения активности рестриктазы Bav BII, объемом 30–50 мкл, содержит: 0,01 М трис-НСI буфер, pH 7,5, 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, 0,001 М дитиотрейтола (или 0,007 М 2-меркаптоэтанол), 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 1 мкг ДНК фага  $\lambda$  и 0,1–1,0 мкл фермента. Инкубацию проводят при 37° С в

течение 60 мин. Продукты расщепления ДНК фага<sup>λ</sup> анализируют электрофоретически в 0,8–1% агарозном геле с последующим прокрашиванием геля в бромистом этидии. За единицу активности рестриктазы Bav VII принимают количество фермента (в мкл), которое за 1 ч инкубации полностью гидролизует 1 мкг ДНК фага при оптимальных условиях реакции.

**Пример 1.** Культура *B. alvei* ВКМ В-674 предварительно адаптируют на основной питательной среде, содержащей в 1 л: 250 мл перевара Хоттингера; 10 г NaCl; 1 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; до 1 л воды.

Инокулят для ферментера готовят, пересевая адаптированную культуру на 1 л свежей среды из расчета 1:10 и размножают в условиях аэрации.

Выращивание культуры проводят после добавления в ферментер инокулята в соотношении 1:10 к объему при температуре 37° С в аэробных условиях (1 л воздуха на 1 л питательной среды), рН среды 7,0. Во время выращивания рН культуральной жидкости поддерживают в интервале рН 7,2–7,5.

Выращивание продолжают до достижения конца логарифмической фазы роста.

Выход сырой биомассы составляет 6,5–8,5 г/л культуральной жидкости.

Содержание рестриктазы Bav VII – 4 × 10<sup>4</sup> ед/г биомассы.

Выделение рестриктазы Bav VII

10 г биомассы *Bacillus alvei* ВКМ В-674 суспендируют в буферном растворе и клетки разрушают ультразвуком при +2–4° С. Остатки клеточных оболочек и неразрушенные клетки удаляют ультрацентрифугированием, а бесклеточный экстракт

фракционируют изопропанолом. Обогащенный рестриктазой материал хроматографируют в калий-фосфатном буфере в градиенте KCl на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой DE-52, а затем на колонке с голубой сефарозой CL-6B.

Получают 12 × 10<sup>4</sup> ед активности рестриктазы BaviI в 10 мл буфера с 50% глицерином. Выход очищенного препарата фермента 12 × 10<sup>3</sup> ед активности на 1 г сырого веса биомассы. Препарат рестриктазы Bav VII стабилен при хранении в течение 8–10 месяцев при температуре – 20° С.

Препарат фермента не содержит примесей фосфатаз, неспецифических эндонуклеаз и экзонуклеаз и пригоден для структурных исследований ДНК и генно-инженерных работ.

**Пример 2.** Культивирование штамма *Bacillus alvei* ВКМ В-674 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; 5 г дрожжевого экстракта; 5 г NaCl; до 1 л воды.

Выход биомассы 6–7 г/л культуральной жидкости.

Содержание рестриктазы Bav VII 3 × 10<sup>4</sup> ед/г микробной массы.

После проведения очистки, как описано выше, выход рестриктазы Bav VII составляет 8 × 10<sup>3</sup> ед активности/г сырого веса биомассы.

Таким образом, по предложенному способу получают новую рестриктазу.

**Формула изобретения**

Штамм бактерий *Bacillus alvei* ВКМ В-674 – продуцент рестриктазы Bav VII.

Редактор В.Трубченко

Составитель И.Привалова  
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