

Э. А. БРАГА, В. В. НОСИКОВ, В. И. ТАНИШИН,
А. Л. ЖУЗЕ, О. Л. ПОЛЯНОВСКИЙ

ОГРАНИЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ РЕСТРИКЦИОННЫХ ЭНДОНУКЛЕАЗ АНТИБИОТИКАМИ, СВЯЗЫВАЮЩИМИСЯ С ДНК

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 9 VII 1975)

Рестриктазы II типа, впервые описанные в 1970 году ⁽¹⁾, нашли широкое применение в исследовании структуры и функции ДНК. Эти ферменты, расщепляя двунитчатую ДНК, узнают участок, который охватывает от 4 до 6 пар нуклеотидов (в зависимости от фермента) со строго определенной последовательностью, что и определяет высокую специфичность этих ферментов.

В настоящей работе мы попытались установить локализацию рестриктаз II типа на двойной спирали ДНК в месте узнавания, а также найти способы регуляции действия рестриктаз с целью ограничения мест узнавания, по которым проходит расщепление ДНК этими ферментами.

Рестриктазы EcoRI и EcoRII * выделяли из штамма *E. coli* K12 1100-NM182 и *E. coli* K12 1100-R245 (К. Муррей) ** по методу Р. Йошимори ⁽³⁾. Рестриктазу Hra II выделяли из штамма *Haemophilus parainfluenzae* (Ф. Шарп) по методу Ф. Шарпа ⁽⁴⁾. Ферменты не содержали примеси неспецифических нуклеазных активностей. ДНК получали из бактериофагов λ с1857s7 и λ b2 фенольной экстракцией по методу А. Д. Кайзера и Д. С. Хогнесса ⁽⁵⁾.

Расщепление ДНК ферментами проводили в следующих условиях: к 10 мкл раствора ДНК фага λ (160–340 мкг/мл) в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 7,4, содержащем 0,01 М MgCl₂, 0,01 М меркаптоэтанол и 0,06 М NaCl добавляли 2 мкл раствора антибиотиков дистамицина А («Reanal») или актиномицина D («Calbiochem») в требуемой концентрации и затем 2 мкл фермента. Смесь инкубировали в течение 1–2 час. при 37° и затем останавливали реакцию добавлением 5 мкл 0,2 М раствора ЭДТА. Образцы прогревали при 65° в течение 5 мин. и затем резко охлаждали в бане со льдом. Эта процедура была необходима для того, чтобы избежать образования более крупных фрагментов за счет соединения фрагментов по «липким» концам. Электрофорез проводили в 1-процентном агарозном геле (агароза фирмы «Serva») в 0,04 М трис-HCl-буфере, pH 7,9, содержавшем 0,02 М ацетат натрия и 0,5 мкг/мл этидиумбромид. Трубочки над гелем заполняли тем же буфером и реакционную смесь после добавления к ней 10 мкл 50% глицерина настилавали (в объеме 20 мкл) на верхнюю часть геля под буфер. Электрофорез проводили при напряжении 4,5 в/см в течение 3 час. и при напряжении 2,2 в/см в течение 17–20 час.

Как показано ⁽⁶⁾, дистамицин А имеет преимущественное сродство к тиминбогатым участкам ДНК, причем связывание антибиотика происходит по узкой бороздке ДНК. Актиномицин также блокирует узкую бороздку ДНК, но образует водородные связи в основном с остатками гуанина ⁽⁷⁾. Таким образом, можно было ожидать, что антибиотики, связываясь

* Обозначения приводятся в соответствии с предложенной Х. О. Смитом и Д. Натаном классификацией ⁽²⁾.

** В скобках приведены фамилии исследователей, любезно предоставивших нам перечисленные штаммы.

с ДНК, могут экранировать места узнавания, конкурируя с ферментами. Последовательности нуклеотидов в участках узнавания трех рестриктаз, использованных в данной работе, установлены (⁸⁻¹⁰) и приводятся в табл. 1.

В настоящей работе исследовано влияние антибиотиков дистамицина А и актиномицина D на расщепление ДНК рестриктазами. Из табл. 1 видно, что действие всех трех рестриктаз можно эффективно блокировать тем или

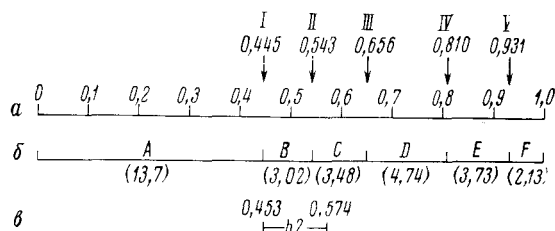


Рис. 1. Карта ДНК фага λ , на которой стрелками указаны участки узнавания рестриктазы *EcoRI* (¹¹); они обозначены римскими цифрами. а — физическая карта для ДНК фага λ . I—V — участки узнавания рестриктаза. б — фрагменты ДНК фага λ c1857s7 (латинские буквы) по порядку их расположения вдоль цепи ДНК. В скобках — величины молекулярных весов фрагментов в миллионах дальтон. в — делеция в фаге λ b2

другим антибиотиком. Действие «ингибитора» в этом случае осуществляется путем образования комплекса с субстратом, ДНК, а не с ферментом. Как уже указывалось, антибиотики блокируют узкую бороздку ДНК. Таким образом, из наших данных следует, что взаимодействие рестриктаз с узкой бороздкой ДНК является обязательным условием для проявления их действия. Из табл. 1 также видно, что антибиотики являются весьма

Таблица 1

Действие антибиотиков на расщепление ДНК фага λ c1857s7 рестриктазами (концентрация антибиотика, М)

Рестриктаза	Участок узнавания	Дистамицин А		Актиномицин D	
		частичное блокирование	полное блокирование	частичное блокирование	полное блокирование
<i>EcoRI</i>	5'GAATTC 3'CTTAAG	$(0,2-1,2) \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$>0,9 \cdot 10^{-3}$	—
<i>EcoRII</i>	5'CCTGG 3'GGACC	$(0,3-1,4) \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$(0,2-0,5) \cdot 10^{-4}$	$0,6 \cdot 10^{-4}$
<i>HpaII</i>	5'CCGG 3'GGCC	$10^{-3}-10^{-2}$	$>1,5 \cdot 10^{-2}$	—	$\leq 0,4 \cdot 10^{-4}$

избирательными «ингибиторами» действия рестриктаз. Эффективность действия антибиотика коррелирует с нуклеотидным составом участка узнавания рестриктазы. Так, для полного блокирования действия рестриктаз *EcoRI* и *EcoRII* достаточно концентрации дистамицина на два порядка ниже, чем для рестриктазы *HpaII*, в состав участка узнавания которой совсем не входит тимин. Напротив, актиномицин эффективно блокирует участки узнавания рестриктаз *HpaII* и *EcoRII*, которые содержат два остатка гуанина на 3'-конце.

В последующих опытах мы пытались найти условия избирательного ограничения числа участков, атакуемых рестриктазами. Как показано Г. В. Гурским и соавторами (Институт молекулярной биологии АН СССР), дистамицин А при взаимодействии с ДНК закрывает участок, соответ-

вующий по длине пяти парам нуклеотидов. Логично предположить, что нуклеотидные последовательности, соседние с участком, узнаваемым ферментом, также могут оказывать влияние на сродство антибиотика к ДНК в области этого участка. Если это так, то можно попытаться избирательно блокировать участки, обладающие наибольшим сродством к антибиотiku, и, таким образом, ограничить число участков, узнаваемых ферментом. Для выяснения этой возможности было подробно изучено расщепление рестрик-

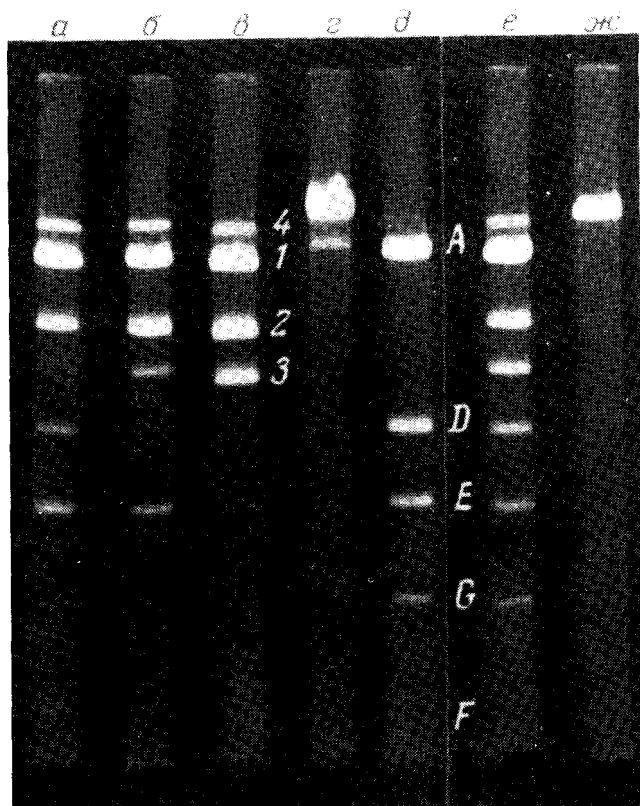


Рис. 2. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК фага $\lambda b2$, образуемых рестриктазой $EcoRI$ в присутствии различных концентраций дистамицина А. а — $0,2 \cdot 10^{-4} M$; б — $0,43 \cdot 10^{-4} M$; в — $0,74 \cdot 10^{-4} M$; г — $1,8 \cdot 10^{-4} M$; д — в отсутствие дистамицина А; е — смесь образцов в и г; ж — ДНК фага $\lambda b2$. А, D, E, G, F — фрагменты, образующиеся в отсутствие дистамицина А; фрагмент G соответствует участку ДНК в фаге $\lambda b2$ между I и III участками узнавания рестриктазы $EcoRI$. 1—4 — укрупненные фрагменты ДНК фага $\lambda b2$, образующиеся в присутствии дистамицина А

тазой $EcoRI$ ДНК фага $\lambda b2$, имеющей делецию в области фрагментов В и С (рис. 1) в присутствии различных концентраций дистамицина А.

Картины электрофоретического разделения образующихся при этом фрагментов ДНК приведены на рис. 2. Из рисунка видно, что по мере повышения концентрации дистамицина постепенно исчезают все мелкие фрагменты и появляются более крупные, причем один из них, фрагмент 1, совпадает по подвижности с фрагментом А, образуемым рестриктазой $EcoRI$ в отсутствие дистамицина. Молекулярные веса укрупненных фрагментов были определены по электрофоретической подвижности, причем в качестве маркеров использованы фрагменты, образующиеся в отсутствие дистамицина (¹⁴). Молекулярные веса укрупненных фрагментов, определенные таким образом, приведены в табл. 2. При сопоставлении этих данных с картой распределения фрагментов по длине ДНК фага $\lambda b2$ (¹⁴)

(рис. 1) можно установить, из каких участков ДНК состоят крупные фрагменты, образующиеся в присутствии дистамицина.

Последовательность исчезновения мелких и появления укрупненных фрагментов по мере повышения концентрации дистамицина позволяет заключить, что вначале блокируется III участок узнавания (рис. 2, а, б, в; исчезновение фрагментов D и G и появление фрагмента 2), а затем блокируется V участок (рис. 2, а, б, в; исчезновение фрагментов E и F и появление фрагмента 3). При высоких концентрациях дистамицина оба эти участка полностью блокированы и расщепление ДНК фага λ b2 происходит только по двум другим участкам — I и IV.

Таблица 2

Молекулярные веса (в млн. дальтон) и состав фрагментов, образующихся при расщеплении ДНК фага λ рестриктазой EcoRI в присутствии дистамицина А ($0,7-1,0 \cdot 10^{-4}$ М)

λ b2			λ cI857s7		
укрупненные фрагменты	мол. вес	фрагменты	укрупненные фрагменты	мол. вес	фрагменты
1	$13,7 \pm 0,5$	A	1	$13,7 \pm 0,5$	A
2	$7,5 \pm 0,4$	G, D	2a	$11,4 \pm 0,5$	B, C, D
3	$5,9 \pm 0,3$	E, F	3	$6,0 \pm 0,3$	E, F
4	$20,6 \pm 1,0$	A, G, D	5	$18,0 \pm 1,0$	B, C, D, E, F

Аналогичные результаты получены при расщеплении ДНК фага λ cI857s7 рестриктазой EcoRI в присутствии дистамицина А. Молекулярные веса и состав образующихся в этом случае укрупненных фрагментов приведены в табл. 2. В присутствии достаточно высоких концентраций дистамицина А расщепление рестриктазой ДНК фага λ cI857s7 также происходит только по двум участкам узнавания I и IV, в то время как другие участки (II, III и V) полностью блокированы антибиотиком.

Из результатов работы следует, что антибиотики, связывающиеся с ДНК, могут конкурировать с соответствующими рестриктазами, причем их избирательность определяется нуклеотидной последовательностью участка узнавания данного фермента, а также ближайшим окружением этих участков ДНК. На примере дистамицина А, EcoRI и ДНК фага λ удалось показать, что с помощью антибиотиков можно ограничивать число участков ДНК, расщепляемых рестриктазой. Мы полагаем, что примененный нами подход с использованием антибиотиков может быть полезен для получения укрупненных фрагментов при составлении физических карт ДНК.

Авторы приносят благодарность Г. В. Гурскому и А. С. Заседателеву за участие в обсуждении результатов работы.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пушино Московской обл.

Поступило
17 VI 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. O. Smith, K. W. Wilcox, J. Mol. Biol., v. 51, 379 (1970).
- ² H. O. Smith, D. Nathans, J. Mol. Biol., v. 81, 419 (1973).
- ³ R. N. Yoshimori, Ph. D. Thesis, Univ. of Calif. Medical Centre, San Francisco, California, 1971.
- ⁴ P. A. Sharp, B. Sugden, J. Sambrook, Biochemistry, v. 12, 3055 (1973).
- ⁵ A. D. Kaiser, D. S. Hogness, J. Mol. Biol., v. 2, 392 (1960).
- ⁶ Ch. Zimmer, K. E. Reinert et al., J. Mol. Biol., v. 58, 329 (1971).
- ⁷ A. Cerami, E. Reich et al., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., v. 57, 1036 (1967).
- ⁸ J. Hedgpeth, H. M. Goodman, H. W. Boyer, ibid., v. 69, 3448 (1972).
- ⁹ C. H. Bigger, K. Murray, N. E. Murray, Nature New Biol., v. 244, 7 (1973).
- ¹⁰ H. W. Boyer, L. T. Chow et al., Nature New Biol., v. 244, 40 (1973).
- ¹¹ M. Thomas, R. W. Davis, J. Mol. Biol., v. 91, 315 (1975).