



УДК 577.152.314'14

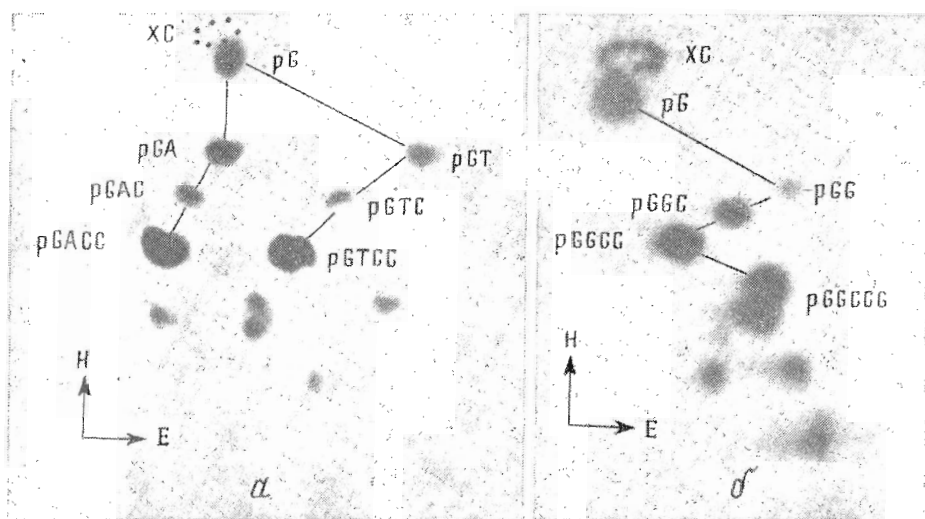
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ
ЭНДОНУКЛЕАЗ РЕСТРИКЦИИ *Eco471* и *Eco521*

Буткус В. В., Иятруштите М. П., Янулайтис А. А.

Научно-производственное объединение «Фермент», Вильнюс

Ранее в ходе систематического поиска сайт-специфических эндонуклеаз в штаммах *E. coli* мы обнаружили рестриктазы *Eco471* и *Eco521* и методом физического картирования молекул ДНК с известной первичной структурой установили, что эти ферменты узнают соответственно последовательности 5'GG(A/T)CC [1] и 5'CGGCCG [2]. В настоящей работе прямыми методами подтверждена субстратная специфичность и определены места расщепления сайтов обеих рестриктаз.

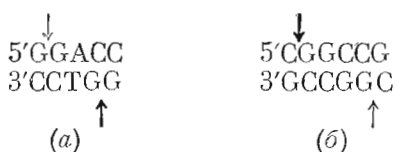
Структуру *Eco471*- и *Eco521*-сайтов подтвердили, а места их расщепления установили путем анализа 5'-концевых последовательностей участков расщепления. ДНК рВВ322 расщепляли рестриктазой, проводили дефосфорилирование щелочной фосфатазой *E. coli* и фосфатазу инактивировали протеиназой К. После фенольной экстракции и осаждения этанолом полученные фрагменты ДНК 5'-³²P-фосфорилировали при помощи [γ -³²P]АТР и Т4-полинуклеотидкиназы, избыток АТР отделяли гель-фильтрацией на сефадексе и 5'-меченые фрагменты исчерпывающе гидролизовали фосфодиэстеразой змеиного ядра. Электрофорезом на бумаге при pH 3,5 в смеси со стандартами 5'-концевое звено в случае обеих рестриктаз было идентифицировано как d³²pG. Далее, частичный гидролиз меченых фрагментов панкреатической ДНКазой и фосфодиэстеразой змеиного ядра с последующим разделением гидролизата в двух взаимно перпендикулярных направлениях (электрофорез на ацетилцеллюлозе и гомохроматография [3]) привели к нуклеотидным картам (рисунок), которые демонстрируют 5'-кон-



Двумерное разделение продуктов частичного экзонуклеазного гидролиза 5'-³²P-фосфорилированных фрагментов ДНК рВВ322 эндонуклеазами *Eco471* (а) и *Eco521* (б). Е – электрофорез на ацетилцеллюлозе, pH 3,5; Н – гомохроматография в гомосмеси VI [3], ХС – лятно красителя ксиленцианола FF

цевые последовательности $5'G\left(\frac{A}{T}\right)CC$, общие для всех *Eco47I*-рестрикто-
тов, и $5'GGCCG$ для *Eco52I*-рестрикто-

Совокупность полученных результатов привела к заключению, что в
составе ДНК рестриктаза *Eco47I* узнает пятизвенные дуплексы (а),



а рестриктаза *Eco52I* — шестизвенные дуплексы (б), расщепляя их в ме-
стах, указанных стрелками.

Таким образом, рестриктазы *Eco47I* и *Eco52I* соответственно являются
истинными изоизомерами уже известных рестриктаз *AvaII* [4] и
XmaIII [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Janulaitis A., Petrušytė M., Butkus V. FEBS Lett., 1983, v. 161, № 1, p. 213–216.
2. Янулайтис А. А., Станкенис П. С., Пятрушките М. П., Витикайте Ю. Б., Климашаус-
кас С. Й., Вугнус В. В. Молекулярн. биология, 1984, т. 18, № 1, с. 115–129.
3. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. Nucleic Acids Res., 1974, v. 1, № 3,
p. 331–353.
4. Sutcliffe J. G., Church G. M. Nucleic Acids Res., 1978, v. 5, № 7, p. 2313–2319.
5. Kunkel L. M., Silberklang M., McCarthy B. J. J. Mol. Biol., 1979, v. 132, p. 133–139.

Поступило в редакцию
31.1.1985

DETERMINATION OF SUBSTRATE SPECIFICITY OF *Eco47I* AND *Eco52I* RESTRICTION ENDONUCLEASES

BUTKUS V. V., PETRUŠYTĖ M. P., JANULAITIS A. A.

ESP «Fermentas», Vilnius

Cleavage sites for *Eco47I* and *Eco52I* restriction endonucleases, which are isoschizo-
mers of *Ava II* and *Xma III*, respectively, have been structurally elucidated.