



УДК 577.152.314'14

© 1990 г.

Ю. П. Зернов, Л. Р. Лебедев, И. В. Бабкин, В. Е. Чижиков

УСТАНОВЛЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ
ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ *Kpn378I*

Научно-исследовательский конструкторско-технологический
институт биологически активных веществ, НПО «Вектор»,
Бердск, Новосибирская обл.

Показано, что эндонуклеаза рестрикции *Kpn378I* узнает последовательность CCGC↓GG и расщепляет ее в месте, указанном стрелкой.

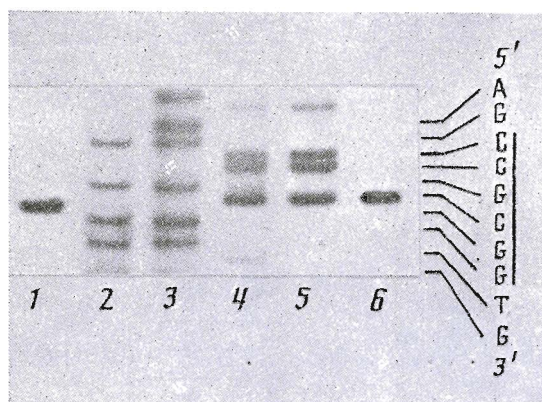
Эндонуклеазы рестрикции широко применяются в молекулярно-биологических исследованиях. Наибольший интерес в качестве эффективного инструмента исследования представляют эндонуклеазы рестрикции II класса, специфически расщепляющие молекулы ДНК по определенным последовательностям, что позволяет создавать рекомбинантные молекулы с заданными свойствами. Прогресс в решении этих задач требует расширения набора препаратов эндонуклеаз рестрикции, источником которых являются микроорганизмы [1].

При изучении бактериальных штаммов, находящихся в воздушной среде, был обнаружен штамм *Klebsiella pneumonia*, из которого по методу [2] выделена эндонуклеаза рестрикции *Kpn 378I*, названная согласно общепринятой номенклатуре [3].

При определении специфичности фермента было установлено, что он расщепляет ДНК фага λ в четырех местах и не имеет участка узнавания в составе ДНК рBR322. Сопоставление этих данных с электрофоретической подвижностью *Kpn 378I*-фрагментов ДНК фага λ показало, что наиболее вероятным участком узнавания этого фермента является последовательность CCGCGG.

Определение последовательности *Kpn 378I*-сайта и места его гидролиза проводили по ранее опубликованному методу [4] с использованием плазмидной ДНК рUCL, содержащей клонированный фрагмент ДНК с сайтом CCGCGG.

Как видно из рисунка, разрыв цепи ДНК эндонуклеазой рестрикции *Kpn 378I* происходит между основаниями C и G в положениях 6 и 7 последовательности 5'...A¹CCC⁵GCGGTC¹⁰...3'. Поскольку любая полоса на радиоавтографе продуктов химического расщепления соответствует олигонуклеотидному фрагменту, остающемуся после удаления указанного основания из цепи и ее разрыва, совпадение полос в химическом и ферментативном гидролизатах говорит о том, что расщепление цепи ферментом происходит между данным основанием и следующим за ним в 3'-направлении (в случае 3'-концевой метки). Таким образом, рестриктаза *Kpn 378I* узнает последовательность CCGC↓GG и расщепляет ее в месте, указанном стрелкой. Это означает, что она является истинным изошизомером ферментов *SacII* и *SstII* и может заменить их в структурных исследованиях ДНК.



Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов ферментативного и химического расщепления фрагмента ДНК рUCL [4] в 8% денатурирующем ПААГ. 1, 6 — расщепление эндонуклеазой рестрикции *Kpn378I*, 2—5 — расщепление соответственно по G, A + G, T + C, C

Экспериментальная часть

В работе использовали [α - 32 P]dATP; ДНК фага λ и ферменты *HindIII*, *EcoRI* (НПО «Фермент», Вильнюс); фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, ДНК рBR322 и рUCL (НПО «Вектор», Бердск).

Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, введение 3'-концевой радиоактивной метки, очистку фрагментов ДНК, секвенирование и электрофорез в ПААГ проводили в основном как описано ранее [5, 6]. Для работы использовали 0,1—0,5 пмоль 3'-меченого фрагмента ДНК. Аликвоту (5% этого количества) гидролизовали ферментом в реакционной смеси, содержащей 10 мМ трис-HCl (pH 7,6), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl и 10 мМ 2-меркаптоэтанол, при 37° С в течение 10—30 мин. Реакцию останавливали добавлением формамида до 80% и нагреванием в течение 2 мин на кипящей водяной бане с последующим быстрым охлаждением до 0° С. Для электрофореза использовали $1/4_0$ часть полученной смеси.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roberts R. J. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. Suppl. P. r271—r313.
2. Bickle T. A., Pirrotta V., Imber R. // Nucl. Acids. Res. 1977. V. 4. № 8. P. 2561—2572.
3. Smith H. O., Nathans D. // J. Mol. Biol. V. 81. № 3. P. 419—423.
4. Приходько Г. Г., Петров Н. А., Чижиков В. Е., Дегтярев С. X. // Биотехнология. 1988. Т. 4. № 5. С. 618—620.
5. Maxam A. M., Gilbert W. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560—564.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984.

Поступила в редакцию
1.VI.1989
После доработки
9.X.1989

Yu. P. ZERNOV, L. R. LEBEDEV, I. V. BARKIN, V. E. SHIZHIKOV

DETERMINATION OF SUBSTRATE SPECIFICITY OF RESTRICTION ENDONUCLEASE *Kpn378I*

Scientific Research and Technology Institute of Biologically
Active Substances, Berdsk, Novosibirsk Region

The recognition sequence and cleavage site CCGC↓GG of a new restriction endonuclease *Kpn378I* have been determined.