



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152.314'14

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ  
ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ *Eco78I*

Буткус В., Казлаускаене Р., Гилвонаускайте Р.,  
Пятрушките М., Янулайтис А.

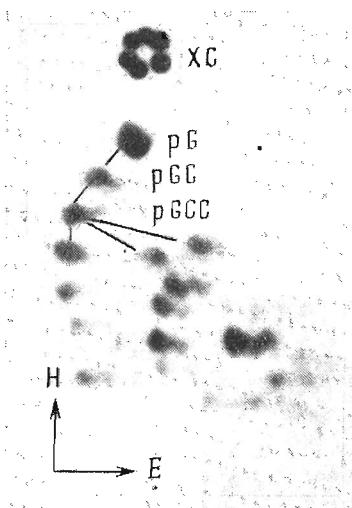
Научно-производственное объединение «Фермент», Вильнюс

При систематическом исследовании бактериальных штаммов *E. coli* мы обнаружили рестрикционную эндонуклеазу, которая, согласно общепринятой номенклатуре [1], была названа *Eco78I*. В ходе экспериментов по определению субстратной специфичности этой рестриктазы было установлено, что она расщепляет ДНК рBR322 в четырех, ФХ174 в двух и ДНК фага  $\lambda$  в одном месте.

Сравнение этих данных с табличными [2] позволило обнаружить единственную последовательность 5'-GGCGCC-, соответствующую установленной частоте расщепления перечисленных субстратов. Дальнейшее подтверждение субстратной специфичности рестриктазы *Eco78I* и определение места расщепления субстрата проводили прямыми методами на ДНК рBR322.

Для этого 5 мкг ДНК расщепляли рестриктазой *Eco78I*, дефосфорилировали бактериальной щелочной фосфатазой и затем 5'-<sup>32</sup>P-фосфорилировали действием [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ и Т4-полинуклеотидкиназы. Меченую ДНК выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50 и осаждали этаполом. Осадок растворяли в 5 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3 мкг панкреатической ДНКазы и инкубировали 30 мин при 37°С. Аликвоту ДНКазного гидролизата (1 мкл) расщепляли до мононуклеотидов с помощью 1 мкг фосфодиэстеразы змеиного яда в смеси (3 мкл), содержащей 5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 10 мМ трис-НСl, рН 9, в течение 30 мин при 37°С.

Часть раствора полного 3'-экзонуклеазного гидролизата (1 мкл) анализировали электрофорезом в 0,05 М формиат-аммонийном буфере, рН 3,5, на бумаге Ватман 3 ММ в смеси со стандартами. Пятна мононуклеотидов



Двумерное разделение продуктов частичного гидролиза 5'-меченых *Eco78I*-фрагментов; направление Е – электрофорез на ацетилцеллюлозе в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5), направление Н – гомохроматография в гомосмеси VI; ХС – пятно красителя ксиленцианола FF

локализировали под УФ-светом, вырезали и радиоактивность просчитывали в толуольном сцинтиляторе. В результате 97% радиоактивной метки было обнаружено в пятне мононуклеотида pдG.

Для дальнейшей идентификации 5'-концевой структуры рестрикционных *Eco78I*-фрагментов продукты ДНКазного и полного 3'-эксонуклеазного гидролиза объединяли, смешивали с 50 мкг тРНК и проводили двумерное разделение с помощью электрофореза на ацетицеллюлозе при pH 3,5 и затем гомохроматографии в гомосмеси VI [3].

Полученный фингерпринт показал наличие во всех *Eco78I*-фрагментах общей 5'-концевой последовательности GCC.

Совокупность полученных данных свидетельствует, что рестриктаза *Eco78I* узнает в составе ДНК шестизвенные последовательности

5'-GGCGCC-  
↓  
и расщепляет их в местах, обозначенных стрелкой.

Ранее было выделено несколько ферментов, узнающих ту же последовательность, однако среди них рестриктазы *NarI*, *NdaI* и *NunII* образуют фрагменты с 5'-выступающими, а *BbeI* — с 3'-выступающими концами [4]. Следовательно, рестриктаза *Eco78I*, образующая полностью спаренные концы, является новой разновидностью среди рестриктаз, узнающих последовательность 5'-GGCGCC-.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Smith H. O., Nathans D. J. Mol. Biol., 1973, v. 81, № 3, p. 419—423.
2. Fuchs C., Rosenfold E. C., Honigsmann A., Szybalski W. Gene, 1980, v. 10, № 4, p. 357—370.
3. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. Nucl. Acids Res., 1974, v. 1, № 3, p. 331—353.
4. Kessler C., Neumaier P. S., Wolf W. Gene, 1985, v. 33, № 1, p. 1—102.

Поступило в редакцию  
22.V.1985

#### DETERMINATION OF SUBSTRATE SPECIFICITY OF RESTRICTION ENDONUCLEASE *Eco78I*

BUTKUS V., KAZLAUSKIENÉ R., GILVONASKAITĖ R., PETRUŠYTĖ M.,  
JANULAITIS A.

*ESP «Fermentas», Vilnius*

The recognition sequence and cleavage point of restriction endonuclease *Eco78I*  
↓  
have been determined as 5'-GGCGCC-. There are several known enzymes recognizing the same sequence, although the prototype *NarI* and isoschizomers *NdaI* and *NunII* cleave the substrate to produce 5'-protruding ends, whereas cleavage with isoschizomer *BbeI* results in 3'-protruding ends. Therefore, restrictase *Eco78I*, generating flush ends, may be regarded as an enzyme with new specificity among the restriction endonucleases recognizing the 5'-GGCGCC-sequence.