



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152.314'14

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ
РЕСТРИКЦИОННОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ *VspI*

Дегтярев С. Х., Репин В. Е., Речкунова Н. И.,
Чижиков В. Е., Малыгин Э. Г., Михайлов В. В.*,
Рассказов В. А.*

Всероссийский научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской обл.;

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ
Академии наук СССР, Владивосток

При исследовании бактериальных штаммов морского происхождения мы обнаружили штамм *Vibrio species* и выделили из него по методу Green et al. [1] эндонуклеазу рестрикции *VspI*, названную согласно общепринятой номенклатуре [2].

При определении специфичности фермента было установлено, что данная рестриктаза линейризует ДНК рBR322 и имеет 17 сайтов узнавания на ДНК фага λ . Сравнение этих данных с табличными [3] показало, что существует единственная последовательность, имеющая такую частоту встречаемости: АТГААТ.

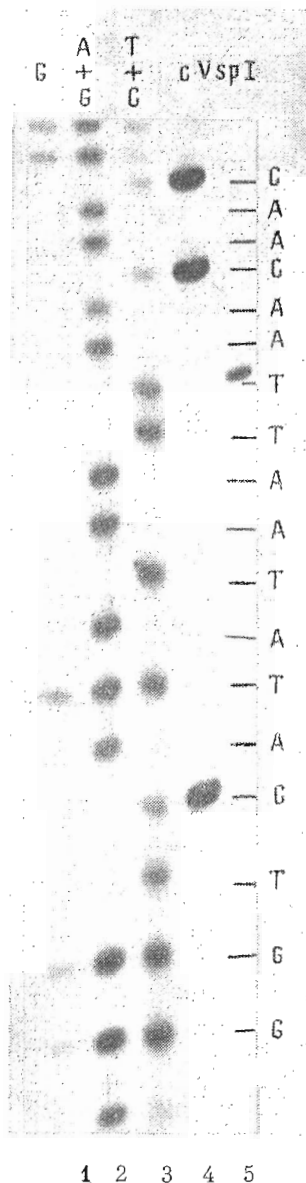
Для подтверждения последовательности сайта узнавания и определения места гидролиза субстрата мы использовали метод Максама — Гилберта [4]. Для этого 20 мкг ДНК рBR322 расщепляли рестриктазой *AvaII*, фрагменты метили с помощью большого фрагмента ДНК-полимеразы I из *E. coli* (фрагмент Кленова) в присутствии dGTP и [α - 32 P]dATP и разделяли электрофорезом в 6% ПААГ. После завершения электрофореза гель окрашивали бромистым этидием, зону с фрагментом длиной 222 п. о. вырезали, и ДНК из геля переносили на DEAE-бумагу DE-81. Далее меченый фрагмент элюировали, переосаждали спиртом в присутствии 20 мкг РНК-носителя и проводили анализ последовательности ДНК методом Максама — Гилберта (дорожки 1—4 на рисунке); отдельно аликвоту расщепляли рестриктазой *VspI*. Из фотографии полученного радиоавтографа геля видно, что полоса *VspI/AvaII*-фрагмента (дорожка 5) соответствует по длине фрагменту с кажущейся 5'-концевой последовательностью ТТААТ-. Поскольку расщепление ДНК при химической модификации приводит к элиминированию концевого звена (Т) меченого фрагмента, обнаруживаемый в геле фрагмент в действительности на один нуклеотид короче. Следовательно, фрагмент, полученный ферментативным гидролизом, имеет 5'-концевую последовательность ТААТ-.

Полученные данные свидетельствуют, что рестриктаза *VspI* узнает последовательность АТГААТ и расщепляет ДНК в месте, обозначенном стрелкой.

Выделенная нами рестриктаза не является изоизомером известных ферментов и имеет всего одно место узнавания на ДНК рBR322 в гене β -лактамазы, что позволяет использовать ее для клонирования фрагментов ДНК по признаку потери устойчивости к ампициллину.

ЛИТЕРАТУРА

1. Greene P. G., Heyneker H. L., Bolivar F., Rodrigues R. L., Bellach M. C., Covarrubias A. A., Backman N., Russel D. J., Tait R., Boyer H. W. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 2, p. 343—353.



Анализ последовательности фрагмента ДНК pBR322. 12% ПААГ, 7 М мочеви́на, 50 мМ трис-боратный буфер (рН 8,2), 1мМ EDTA

2. Smith H. O., Nathans D. J. Mol. Biol., 1973, v. 81, № 3, p. 419-423.
3. Kissier C., Neumaier T. S., Wolf W. Gene, 1985, v. 33, № 1, p. 1-102.
4. Maxam A. M., Gilbert W. Meth. Enzymol., 1980, v. 65, p. 499-560.

Поступило в редакцию 26.VIII.1986

DETERMINATION OF SUBSTRATE SPECIFICITY OF RESTRICTION ENDONUCLEASE *VspI*

DEGTYAREV S. Kh., REPIN V. F., RECHKUNOVA N. I., TCHIGIKOV V. E.,
MALYGIN E. G., MIKHAILOV V. V., RASSKAZOV V. A.

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo,
Novosibirsk Region; Pacific Institute of Bioorganic Chemistry,
Far-Eastern Science Centre, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok

The recognition sequence and cleavage point of restriction endonuclease *VspI* have been determined as 5'-AT⁺TAAT. This enzyme is not isoschizomer of any known restriction endonucleases. DNA pBR322 contains a single *VspI* recognition sequence in position 3539. Therefore this enzyme may be used for cloning DNA in the *VspI* site in Amp^R-gene of pBR322.