



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

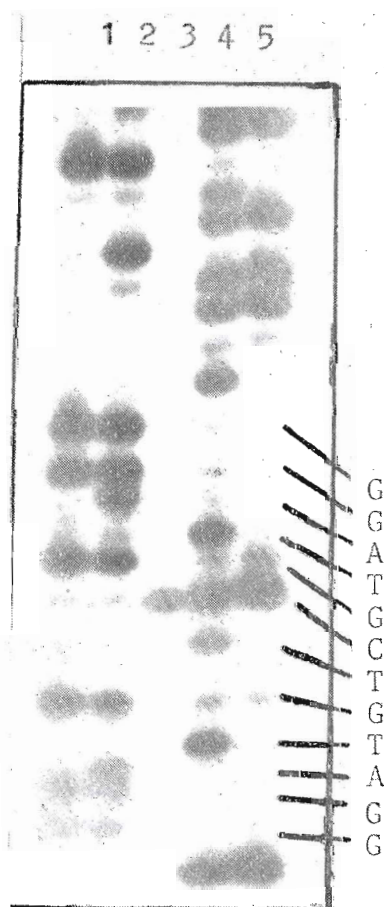
УДК 577.152.314'14

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ *SfeI*

Дегтярев С. Х., Приходько Г. Г., Речкунова Н. И.

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

Из штамма *Streptococcus faecalis*, хранящегося в коллекции института, мы выделили по методу [1] эндонуклеазу рестрикции, названную, согласно общепринятой номенклатуре [2], *SfeI*. Оказалось, что ДНК рВР 322



Радиоавтограф разделения продуктов ферментативного и химического расщепления *MspI*/*Bsu15I*-фрагмента ДНК рВР322 в 12% денатурирующем ПААГ. 1, 2, 4, 5 — расщепление соответственно по G, A + G, T, C + T. 3 — расщепление эндонуклеазой рестрикции *SfeI*.

содержит 4 *SfeI*-сайта, а ДНК фага  $\lambda c$  I857 — 38, причем фермент *SfeI* гидролизует ДНК по последовательности CTGCA G. Сравнение этих результатов с имеющимися расчетными и табличными данными [3] показало, что существует единственная последовательность, имеющая такую частоту встречаемости: CTRYAG (обозначение нуклеотидов [4]).

Для подтверждения узнаваемой последовательности и определения места расщепления субстрата этим ферментом мы использовали метод Максама — Гилберта [5]. Для этого ДНК рBR322 расщепляли рестриктазой *MspI*, фрагменты ДНК достраивали [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]dCTP с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и после дополнительного гидролиза рестриктазой *Bsu15I* (изошизомер *Clal*) фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 6% полиакриламидном геле (ПААГ). Меченый *MspI/Bsu15I*-фрагмент ДНК длиной 137 п.о. выделяли и секвенировали. Аликвоту меченого фрагмента ДНК расщепляли рестриктазой *SfeI* в условиях, оптимальных для данной рестриктазы (0,1 М NaCl, 0,02 М трис-HCl, pH 8,5, 0,01 М MgCl<sub>2</sub>). Продукты химического и ферментативного расщепления разделяли параллельно в 12% клиновидном денатурирующем ПААГ (рисунок). На радиоавтографе *MspI/SfeI*-фрагмент ДНК совпадает по подвижности с продуктом химической деградации 5'CTGTAGG...3'. Поскольку при расщеплении ДНК по методу Максама — Гилберта происходит удаление крайнего нуклеозида из цепи ДНК, получаемый в результате ферментативного гидролиза фрагмент ДНК соответствует нуклеотидной последовательности 5'TGTAGG...3'. Аналогичным образом было определено место ферментативного расщепления на комплементарной цепи (*Bsu15I/MspI*-фрагмент ДНК) — между пиримидиновыми основаниями в последовательности CTACAG.

Полученные данные свидетельствуют о том, что рестриктаза *SfeI* узнает последовательность с C<sup>↓</sup>TRYAG и расщепляет ДНК между C и T (обозначено стрелкой).

Выделенная нами рестриктаза *SfeI* не является изошизомером известных ферментов и может найти широкое применение в структурных исследованиях ДНК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Greene P. J., Heyneker H. L., Bolivar F., Rodriguez L. R., Betlach M. C., Covarrubias A. A., Backman K., Russel J. D., Tait R., Boyer H. W. // Nucl. Acids Res. 1978. V. 5. № 7. P. 2373—2380.
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. Cornish-Bowden A. // Nucl. Acids. Res. 1985. V. 13. № 9. P. 3021—3030.
5. Maxam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.

Поступило в редакцию  
7.I.1988

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

DEGTYAREV S. Kh., PRIKHOD'KO G. G., RECHKUNOVA N. I.

All-Union Research Institute of Molecular Biology,  
Koltsovo, Novosibirsk Region

The recognition sequence and cleavage site C<sup>↓</sup>TRYAG of a new restriction endonuclease *SfeI* have been determined.