



УДК 577.152.314.14

## УСТАНОВЛЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ *FauI*

Дегтярев С. Х., Кольхалов А. А., Режикова Н. Н.,  
Дедков В. С.

ВНИИ молекулярной биологии НПО «Вектор», пос. Кольцово Новосибирской обл.

При изучении бактериальных штаммов водного происхождения мы обнаружили штамм *Flavobacterium aquatili* и выделили из него по методу [1] эндонуклеазу рестрикции *FauI*, названную согласно общепринятой номенклатуре [2].

При определении специфичности фермента было установлено, что данная рестриктаза расщепляет ДНК рBR322 в 10 местах. Сравнение полученной картины гидролиза ДНК с теоретически рассчитанными для различных тетра-, пента- и гексануклеотидных последовательностей показало, что наиболее вероятным сайтом узнавания фермента *FauI* является последовательность CCCGC.

Для подтверждения последовательности сайта узнавания и установления точного места гидролиза мы проводили анализ первичной структуры ДНК по методу Максама — Гилберта [3]. 5 мкг ДНК плазмиды рJRD184 [4] расщепляли рестриктазами *NcoI* и *PvuII*, продукты реакции метили с помощью большого фрагмента ДНК-полимеразы I из *E. coli* (фрагмент Кленова) и [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP. Меченую смесь разделяли электрофорезом в 6% ПААГ, фрагмент ДНК длиной 210 п.о. извлекали из геля и определяли его первичную структуру, а также место гидролиза ферментом, как описано ранее [5, 6] (рисунок, а).

При анализе структуры второй цепи ту же плазмиду гидролизовали рестриктазой *BmeI8I*, фрагменты достраивали с помощью dCTP и [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP и после выделения из 6%-ного геля анализировали фрагмент длиной 509 п.о. (рисунок, б).

Так как рестриктаза *FauI* имеет непалиндромный участок узнавания, мы провели дополнительное определение места расщепления ДНК по одной из цепей. Для этого плазмиду рBR322 гидролизовали рестриктазой *Sfr13I*, полученные фрагменты ДНК достраивали с помощью dGTP и [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP и анализировали выделенный из геля олигонуклеотид длиной 122 п.о. (рисунок, в).

Полученные данные показывают, что рестриктаза *FauI* узнает и расщепляет в ДНК последовательности



как указано стрелками и относится к так называемым рестриктазам II — S-типа, гидролизующим ДНК в стороне от сайта узнавания [7].

Эндонуклеаза рестрикции *FauI* не является изошизомером известных ферментов и может найти применение в генно-инженерных работах.



ЛИТЕРАТУРА

1. Greene P. J., Heyneker H. L., Bolivar F., Rodriguez R. L., Betlach M. S., Covarrubias A. A., Backman K., Russel D. J., Tait R., Boyer H. W. // Nucl. Acids Res. 1978. V. 5. № 4. P. 2373—2380.
2. Smith H. O., Nathans D. // J. Mol. Biol. 1973. V. 81. № 3. P. 419—423.
3. Maxam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.
4. Heusterspreute M., Ha Thi V., Emeri S., Tournis-Gamble S., Kennedy N., Davison J. // Gene. 1985. V. 35. № 2. P. 299—304.
5. Дегтярев С. X., Рецкунова Н. И., Нетесова Н. А., Чижиков В. Е., Малыгин Э. Г., Кочкин А. В., Михайлов В. В., Рассказов В. А. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 3. С. 422—423.
6. Дегтярев С. X., Репин В. Е., Рецкунова Н. И., Чижиков В. Е., Малыгин Э. Г., Михайлов В. В., Рассказов В. А. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 3. С. 420—421.
7. Szybalski W. // Gene. 1985. V. 40. № 2—3. P. 169—173.

Поступила в редакцию

5.VII.1988

После доработки

20.IX.1988

DETERMINATION OF SUBSTRATE SPECIFICITY  
OF RESTRICTION ENDONUCLEASE *FauI*

DEGTYAREV S. Kh., KOLYKHALOV A. A., RECHKUNOVA N. I., DEDKOV V. S.

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

The recognition sequence and cleavage point of restriction endonuclease *FauI* have been determined as 5'-CCCGC(4/6). Not being isoschisomer of any known restriction endonuclease, this enzyme may be used in genetic engineering.