



УДК 577.152.314'14
© 1991 г.

Л. Р. Лебедев, Г. Н. Афиногенова, И. С. Андреева,
Н. М. Пустошилова, С. Г. Поздняков, В. Е. Чижиков

УСТАНОВЛЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЫ *RtrI*

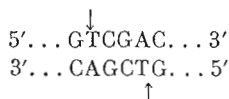
Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт биологически активных веществ, НПО «Вектор», г. Бердск Новосибирской обл.

С целью расширения возможностей в исследовании ДНК и совершенствования технологий производства сайт-специфических дезоксирибонуклеаз нами был проведен поиск рестриктаз у ряда штаммов мало изученных в этом отношении клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*. Был обнаружен штамм *Rhizobium trifolii*, из которого традиционными методами была выделена эндонуклеаза рестрикции *RtrI*, названная согласно общепринятой номенклатуре [1]. Выход высокоочищенного фермента составлял $\sim 40\ 000 \pm 10\ 000$ ед. акт./г клеток.

При определении специфичности фермента было установлено, что данная рестриктаза расщепляет ДНК фага λ в двух местах и ДНК плазмиды pBR322 в одном месте. Путем гидролиза ДНК плазмиды pBR322 исследуемой рестриктазой совместно с рестриктазами *BglI* и *RsaI* место расщепления картировано в районе 650 ± 20 п. о. Сопоставление этих данных, электрофоретической подвижности *Rtr*-рестриктов ДНК фага λ и известных данных о специфичности рестриктаз [2] показало, что наиболее вероятный сайт узнавания фермента *RtrI* — последовательность нуклеотидов 5'... GTCGAC...3'.

Для подтверждения сайта узнавания и определения места расщепления выделяли полилинкерную область ДНК pUC18, содержащую последовательность 5'... GTCGAC...3' (фрагмент длиной 51 п. о.), меченную ^{32}P с 3'-конца как описано в «Экспериментальной части», и секвенировали участок в районе расщепления рестриктазой *RtrI*. Как видно из радиоавтограммы геля (рисунок), при расщеплении ДНК эндонуклеазой рестрикции *RtrI* появляется радиоактивный фрагмент, совпадающий по длине с фрагментом, получаемым при расщеплении гуанозина в положении 36 от 3'-меченого конца при секвенировании ДНК.

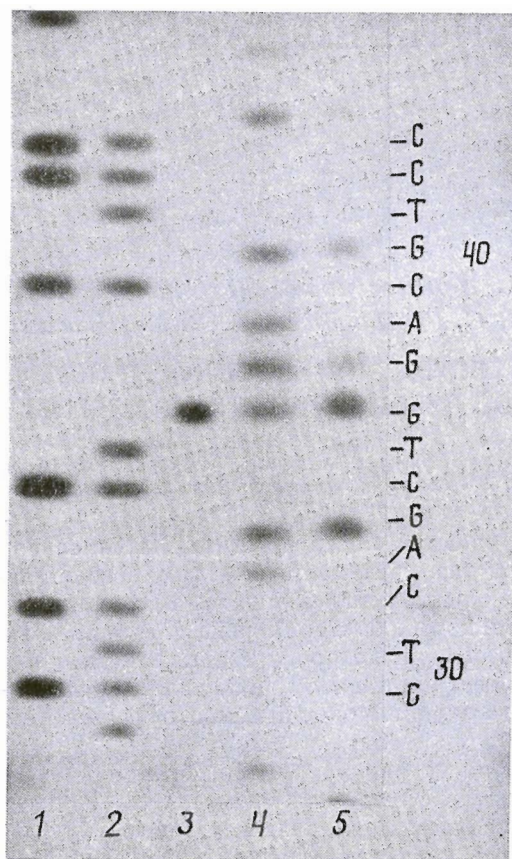
Полученные данные свидетельствуют, что рестриктаза *RtrI* узнает последовательность нуклеотидов



и расщепляет ДНК в местах, обозначенных стрелками, являясь, таким образом, истинным изоизомером рестриктазы *SalGI* [3]. Высокая продуктивность нового штамма-продуцента и наличие в нем единственной сайт-специфической эндонуклеазной активности обеспечивают несомненные преимущества последней по сравнению с прототипом.

Экспериментальная часть

В работе использовали препараты ДНК фага λ , плазмид pBR322 и pUC18, сайт-специфические дезоксирибонуклеазы II типа (КФ 3.1.21.4) *EcoRI*, *BglII*, *HindIII* и *RsaI*, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I из



Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов ферментативного и химического расщепления *EcoRI-HindIII*-фрагмента ДНК плазмиды pUC18 в 12%-ном денатурирующем ПААГ. Дорожки: 1, 2, 4, 5 — расщепление соответственно по C, C + T, A + G, G; 3 — расщепление эндонуклеазой рестрикции *RtrI*

E. coli (КФ 2.7.7.7) производства НИКТИ БАВ НПО «Вектор» (Бердск), [α - 32 P]dATP (Amersham, Англия).

Сайт-специфическую дезоксирибонуклеазу *RtrI* выделяли из биомассы *Rhizobium trifolii*, используя традиционные процедуры выделения и очистки внутриклеточных белков [4]. Хранили препарат фермента в 50%-ном растворе глицерина в буфере при -20°C .

Активность фермента определяли в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ трис-HCl (pH 8,0), 10 мМ MgCl_2 , 100 мМ NaCl, 7 мМ 2-меркаптоэтанол и 1 мкг ДНК фага λ , инкубируя 1 ч при 37°C . Продукты реакции анализировали электрофорезом в 1%-ном геле агарозы. За единицу активности принимали минимальное количество фермента, необходимое для полного специфического расщепления 1 мкг ДНК фага λ в течение 1 ч в указанных условиях.

Для определения сайта узнавания и места расщепления использовали 5 мкг плазмидной ДНК pUC18 [5], которую линеаризовали 1 ч при 37°C в 25 мкл буфера, содержащего 20 мМ трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl_2 , 150 мМ NaCl и 10 мМ 2-меркаптоэтанол, в присутствии 5 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции *EcoRI*. Введение 3'-концевой радиоактивной метки осуществляли в этом же буфере в присутствии 10 мКи [α - 32 P]dATP (уд. акт. 1000 Ки/ммоль) с помощью 0,5 ед. акт. фрагмента Кленова. После дополнительного расщепления ДНК эндонуклеазой рестрикции *HindIII* продукты гидролиза разделяли гель-электрофорезом в 4% ПААГ. Фрагмент длиной 51 п. о. элюировали, аликвоту фрагмента ($\sim 1/50$) гидролизировали эндонуклеазой *RtrI*, остальную часть секвенировали по методу Максама — Гилберта [6]. Сайт расщепления последовательности ДНК эндонуклеазой рестрикции *RtrI* определяли по ранее описанному методу [7].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith H. O., Nathans D. // J. Mol. Biol. 1973. V. 81. № 3. P. 419—423.
2. Kessler C., Haltke H.-J. // Gene. 1986. V. 47. № 1. P. 1—153.
3. Arrand J. R., Myers P. A., Roberts R. J. // J. Mol. Biol. 1978. V. 118. № 1. P. 127—135.
4. Pirrotta V., Bickle T. A. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 89—95.
5. Yanish-Perron C., Viera J., Messing J. // Gene. 1985. V. 33. № 1. P. 103—119.
6. Maxam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.
7. Приходько Г. Г., Петров Н. А., Дегтярев С. Х., Чижиков В. Е. // Биотехнология. 1988. Т. 4. № 5. С. 618—620.

Поступило в редакцию
17.IV.1990

После доработки
26.VII.1990

L. R. LEBEDEV, G. N. AFINOGENOVA, I. S. ANDREEVA, N. M. PUSTOSHILOVA,
S. G. POZDNYAKOV, V. E. CHIZHIKOV

DETERMINATION OF SUBSTRATE SPECIFICITY OF A SITE-SPECIFIC DEOXYRIBONUCLEASE *Rtr* I

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

A new site-specific deoxyribonuclease *Rtr*I from *Rhizobium trifolii* has been shown to recognize the sequence 5'-GTTCGAC-3' in double-stranded DNA and to cleave it at the point indicated by an arrow. Therefore the enzyme is a true isoshizomer restriction of the endonuclease *Sal*GI.