



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.155.2.02

РЕСТРИКЦИОННАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА *Taq*XI ИЗ *THERMUS AQUATICUS*

Грачев С. А., Мамлев С. В.

Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
Новосибирск

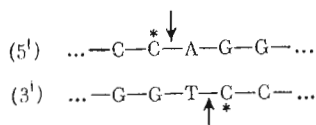
Гуревич А. Н., Игошин А. В., Колосов М. Н.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Слюсаренко А. Г.

Институт общей генетики Академии наук СССР, Москва

Рестрикционные эндонуклеазы, узнающие тетра- и пентануклеотидные последовательности, имеют важное значение для структурного анализа ДНК. Среди них особый интерес представляют ферменты из термофильных микроорганизмов в связи с их высокой термостабильностью. Мы выделили новую эндонуклеазу этого типа, которую назвали *Taq*XI, и установили, что она узнает и расщепляет изображенную ниже пентануклеотидную последовательность,



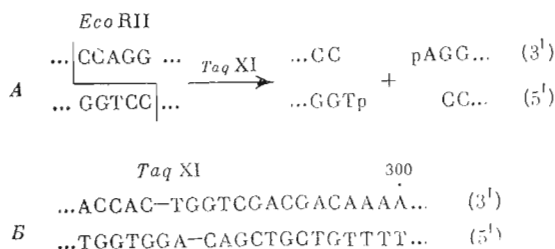
где ^{*} представляет собой остаток модифицированного или немодифицированного дезоксицитидина, а место расщепления нуклеотидной цепи обозначено стрелкой.

Эндонуклеаза *Taq*XI была нами обнаружена в неидентифицированном штамме *Thermus aquaticus*, который был нами выделен из горячей водопроводной воды и обозначен как штамм X. Микроорганизм выращивали в условиях, рекомендованных для *T. aquaticus* УТИ [1], а выделение фермента проводили по схеме, предложенной ранее для рестриктаз *Taq*I и *Taq*II [2]. Бактериальные клетки разрушали ультразвуком при 10° С в буфере, содержащем 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ и MgCl₂ и 7 мМ 2-меркаптоэтанол, центрифугировали 2 ч при 40 000 g и супернатант фракционно высаливали сульфатом аммония. Осадок, выпавший в интервале 1,5–3,2 М (NH₄)₂SO₄, растворяли в буфере ТЕМ (20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 0,5 мМ EDTA и 7 мМ 2-меркаптоэтанол) и хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой DE-52 в том же буфере, содержащем NaCl (линейный градиент от 0 до 0,4 М). При концентрации соли 0,15–0,17 М элюировалась фракция, обладающая специфической эндонуклеазной актив-

ностью при тестировании на ДНК λ . Ее диализовали против буфера ТЕМ и затем хроматографировали на колонке с гепарин-агарозой (получена по методу [2] из гепарина и сефарозы 4В, активированной ВrCN) в буфере ТЕМ, содержащем NaCl (градиент концентрации от 0 до 0,75 М). Активную фракцию, элюирующуюся в интервале 0,45–0,55 М NaCl, диализовали против 50% глицерина в буфере ТЕМ до концентрации 10 ед. акт./мл и хранили при -20°C . Выход составлял 5000–6000 ед. акт. из 1 г биомассы (за единицу активности принято количество фермента, полностью гидролизующее 1 мкг ДНК λ за 1 ч при 70°C). Активность фермента не изменялась при хранении в течение года при -20°C .

Гидролиз ДНК эндонуклеазой *Taq*XI, по аналогии с другими рестриктазами из *T. aquaticus* [2], проводили при 70°C в буфере, содержащем 10 мМ трис-HCl (рН 8,5), 6 мМ MgCl₂ и 10 мМ 2-меркаптоэтанол; образовавшиеся рестрикты метили с помощью [γ -³²P]rATP и T4-полинуклеотидкиназы или достройки 3'-концов с помощью [α -³²P]NdTP и ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова) и анализировали электрофорезом в 1,2% агарозном и 5% полиакриламидном гелях. Оказалось, что эндонуклеаза *Taq*XI расщепляет плазмиду pBR322 на шесть, а ДНК вируса SV40 — на 16 фрагментов, которые точно соответствуют (по их числу и электрофоретической подвижности) *Eco*RII-рестриктам тех же ДНК, использованным в качестве свидетелей при гель-электрофорезе. Поэтому можно было предположить, что *Taq*XI является изоэнзимом рестриктазы *Eco*RII.

Для проверки этого предположения мы проанализировали концы нескольких *Taq*XI-фрагментов плазмиды pBR322 и ДНК трансдуцирующего фага λ rif^r47, структура которых была нами исследована ранее [3]. Было найдено, что 5'-концевыми нуклеотидами во всех этих фрагментах являются либо А, либо Т (идентифицированы электрофорезом на бумаге после полного гидролиза смесью панкреатической дезоксирибонуклеазы и фосфодиэстеразы змеиного яда), а следующие два нуклеотида представляют собой G (определены по методу Максама — Гилберта с разделением продуктов химической деградации электрофорезом в 20% полиакриламидном геле [4] или на ацетицеллюлозе, а затем гомохроматографией на DEAE-целлюлозе [5]). Отсюда следовало, что эндонуклеаза *Taq*XI узнает ту же пентануклеотидную последовательность, что и *Eco*RII [6, 7], но расщепляет ее иначе, как показано в уравнении А.



Этот вывод был подтвержден результатами, полученными при достройке 3'-концов *Taq*XI-фрагментов α -³²P-мечеными dNTP в присутствии ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова). Было найдено, что с «горячим» dGTP включения метки не происходит, а с dATP и TTP метка включается в ДНК примерно в равной степени как в присутствии, так и в отсутствие «холодного» dCTP. Правда, с [α -³²P]dCTP тоже наблюдалось включение метки, но, очевидно, оно происходило не путем присоединения (³²P)pdC, а вследствие замещения 3'-концевого нуклеотида (pdC), возможно, из-за того, что он является модифицированным.

Действительно, при определении по Максиму — Гилберту нуклеотидной последовательности одного из *Eco*RI-фрагментов ДНК λ rif^r47, нами было найдено [3], что в участке, расщепляемом эндонуклеазой *Taq*XI, две цепи ДНК имеют строение В. Известно, что в большинстве штаммов *E. coli*

EcoRII-сайты ДНК λ подвергаются частичной *мес*-модификации, защищающей их от действия этой рестриктазы [8], и что при анализе нуклеотидной последовательности ДНК по методу Максама — Гилберта 5-метилцитидиновые звенья не определяются, так как слишком медленно реагируют с гидразином [9]. Поэтому очевидно, что в приведенной выше нуклеотидной последовательности пропущенные нуклеотиды в обеих цепях представляют собой m^5C .

Таким образом, эндонуклеаза *TaqXI* является ложным изоэнзимом рестриктазы *EcoRII* и истинным изоэнзимом эндонуклеаз *ApuI* и *BstNI*, упоминаемых в обзоре [8].

Авторы выражают благодарность чл.-кор. АМН СССР И. В. Домарадскому за образец рестриктазы *EcoRII*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Greene P. J., Heyneker H. L., Bolivar F., Rodriguez R. L., Bellach M. C., Covarrubias A. A., Backman K., Russel D. J., Tait R., Boyer H. W. A general method for the purification of restriction enzymes.— Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, p. 2373–2380.
2. Bickle T. A., Pirrotta V., Imber R. A simple, general procedure for purifying restriction endonucleases.— Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, p. 2561–2572.
3. Гуревич А. И., Игошин А. В., Колосов М. Н. Структура центральной части оперона *groBC E. coli*. Нуклеотидная последовательность гена β -субъединицы РНК-полимеразы.— Биоорг. химия, 1980, т. 6, с. 1580–1584.
4. Maxam A. M., Gilbert W. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages.— In: Methods in Enzymology. Vol. 65. Nucleic Acids. Part I. N. Y.: Academic Press, 1980, p. 499–560.
5. Tu Ch.-P. D., Wu. R. Sequence analysis of short DNA fragments.— In: Methods in Enzymology. Vol. 65. Nucleic Acids. Part I. N. Y.: Academic Press, 1980, p. 620–638.
6. Bigger C. H., Murrey K., Murrey N. E. Recognition sequence of a restriction enzyme.— Nature New Biol., 1973, v. 244, p. 7–10.
7. Boyer H. W., Chow L. T., Dugaiczky A., Hedgpeth J., Goodman H. M. DNA substrate site for the *EcoRII* restriction endonuclease and modification methylase.— Nature New Biol., 1973, v. 244, p. 40–43.
8. Roberts R. J. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences.— Nucl. Acids Res., 1980, v. 9, p. r63–r80.
9. Ohmori H., Tomizawa J., Maxam A. M. Detection of 5-methylcytosine in DNA sequences.— Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, p. 1479–1489.

Поступила в редакцию
15.IX.1980

RESTRICTION ENDONUCLEASE *TaqXI* FROM *THERMUS AQUATICUS*

GRACHEV S. A., MAMAEV S. V., GUREVICH A. I.,
IGOSHIN A. V., KOLOSOV M. N., SLYUSARENKO A. G.

All-Union Scientific-Research Institute of Molecular Biology, Novosibirsk;
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry and Institute
of General Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A new restriction endonuclease *TaqXI* has been isolated from an unidentified strain of *Thermus aquaticus*. The enzyme recognizes the pentanucleotide sequence CC(A/T)GG and cleaves it between C and A or T, the methylation of the C residue is not protecting the sequence from the cleavage.