



УДК 577.152.314'14

УСТАНОВЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ  
РЕСТРИКЦИИ *Vne I*

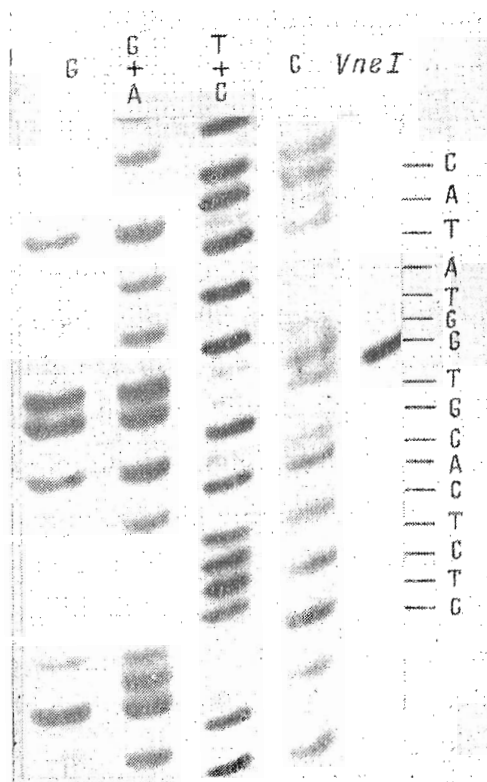
Дегтярев С. Х., Речкунова Н. И., Нетесова Н. А.,  
Чижиков В. Е., Малыгин Э. Г., Кочкин А. В.,  
Михайлов В. В.\*, Рассказов В. А.\*

Всесоюзный 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 nereis* и выделили из него по методу Green et al. [1] эндонуклеазу рестрикции *VneI*, названную согласно общепринятой номенклатуре [2].

При определении специфичности фермента было установлено, что данная рестриктаза расщепляет ДНК рВВ322 в трех местах, ДНК фага  $\lambda$  в четырех местах и не имеет сайта узнавания на ДНК SV40. Сравнение



Анализ последовательности фрагмента ДНК рВВ322. 4%  
ПААГ, 7 М мочевины, 50 мМ трис-боратный буфер (pH 8,2)  
1 мМ EDTA

этих данных с табличными [3] показало, что существует единственная последовательность, имеющая такую частоту встречаемости: GTGCAC.

Для подтверждения последовательности сайта узнавания и определения места гидролиза мы проводили анализ ДНК с помощью метода Максама — Гилберта [4]. 20 мкг ДНК рBR322 гидролизовали рестриктазой *MspI*, продукты реакции разделяли электрофорезом в 4% ПААГ. Гель окрашивали бромистым этидием, фрагмент ДНК длиной 527 п. о. сначала переносили из геля на DEAE-бумагу DE-81, а затем элюировали раствором, содержащим 10 mM трис-HCl (pH 7,8), 1 mM EDTA и 1,5 M NaCl. Далее ДНК осаждали спиртом и метили с помощью большого фрагмента ДНК-полимеразы I из *E. coli* (фрагмент Кленова) и [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP. Меченую [ $^{32}$ P] ДНК отделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 и подвергали гидролизу рестриктазой *BspI*. Фрагмент длиной 335 п. о. отделяли с помощью электрофореза, элюировали как описано выше и далее определяли его структуру (дорожки 1—4 на рисунке), а также гидролизовали его рестриктазой *VneI* (дорожка 5).

Из фотографии полученного радиоавтографа геля видно, что полоса *VneI/BspI*-фрагмента соответствует по длине фрагменту с кажущейся 5'-концевой последовательностью GTGCAC. Поскольку расщепление ДНК при химической модификации приводит к элиминированию концевой звена G меченого фрагмента, обнаруживаемый на геле фрагмент в действительности на один нуклеотид короче. Следовательно, фрагмент, полученный ферментативным гидролизом, имеет 5'-концевую последовательность TGACAC. Таким образом, рестриктаза *VneI* узнает последовательность G<sup>+</sup>TGCAC и расщепляет ее в месте, указанном стрелкой.

Рестриктаза *VneI* не является изошизомером известных ферментов и поэтому может найти широкое применение в структурных исследованиях ДНК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Greene P. G., Heyneker H. L., Bolivar P., Rodrigues R. L., Betlach M. C., Covarrubias A. A., Backman K., Russel D. J., Tait R., Boyer H. M. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 2, p. 343—353.
2. Smith H. C., 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 *VneI*

DEGTYAREV S. Kh., RECHKUNOVA N. I., NETESOVA N. A., TCHIGIKOV V. E.,  
MALYGIN E. G., KOCHKIN A. V., 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 *VneI* have been determined as 5'-G<sup>+</sup>TGCAC. This enzyme is not isoschizomer of any known restriction endonucleases and therefore may be widely used in investigation of DNA structure.