



УДК 577.152.314.04

© 1990 г.

Л. Г. Лазаревичюте, Э. П. Манялене, А. М. Падегимене,
Л. Ю. Кюдулене, В. С. Даучис, Ю. Б. Витинайте, И. М. Грубер*,
В. М. Поляченко*, В. В. Буткус, А. А. Янулайтис

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ЭНДОНУКЛЕАЗ РЕСТРИКЦИИ ИЗ *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной энзимологии, Вильнюс;

* Центральный научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
им. И. И. Мечникова АМН СССР, Москва

Проверено наличие специфической эндонуклеазной активности в различных штаммах *Haemophilus influenzae*. Из семи штаммов данного вида выделено и частично очищено 11 эндонуклеаз рестрикции. Для всех 11 рестриктаз определены узнаваемые последовательности нуклеотидов, а для трех из них — также место расщепления субстрата. Обнаруженные ферменты оказались изоизомерами известных рестриктаз: *Hin1 I* и *Hin8 I* — изоизомеры *Acy I*; *Hin1 II* и *Hin8 II* — *Nla III*; *Hin2 I* и *Hin5 I* — *Hpa II*; *Hin3 I* — *Cau II*; *Hin5 II* — *Asu I*; *Hin5 III* — *Hind III*; *Hin6 I* и *Hin7 I* — *Hha I*. Установлено, что рестриктазы *Hin1 I*, *Hin1 II* и *Hin6 I* расщепляют узнаваемые последовательности нуклеотидов следующим образом: (5')GRCGYC, (5')CATG, (5')GCCG соответственно.

В настоящее время известно более 1100 специфических эндонуклеаз, узнающих 144 уникальные последовательности нуклеотидов [1]. Тем не менее в различных лабораториях мира поиску этих ферментов все еще уделяется большое внимание. Стимулом для таких исследований в первую очередь является стремление пополнить имеющийся арсенал новыми рестриктазами, обладающими ранее неизвестной субстратной специфичностью. С другой стороны, систематический поиск и исследование специфических эндонуклеаз в пределах отдельных видов микроорганизмов способствует изучению количественных и качественных закономерностей распространения этих ферментов.

В ходе выполнения настоящей работы проверено наличие специфической эндонуклеазной активности в различных штаммах *Haemophilus influenzae* независимого происхождения. Целью работы было выделение и исследование новых рестриктаз, обнаруженных в семи штаммах этого вида.

Обнаруженные ферменты были частично очищены путем хроматографии с использованием небольшого набора сорбентов: фосфоцеллюлозы, гепарин-сефарозы, DEAE-целлюлозы. Результаты фракционирования показали, что некоторые исследуемые культуры содержат по несколько рестриктаз. Так, в штаммах *H. influenzae* RFL1 и RFL8 обнаружено по две различные эндонуклеазы, а в штамме *H. influenzae* RFL5 — три. Все обнаруженные ферменты были разделены и очищены согласно методикам, приведенным в табл. 1. Таким образом, из семи штаммов *H. influenzae* выделено 11 эндонуклеаз рестрикции. Обнаруженные эндонуклеазы были названы в соответствии с общепринятой номенклатурой ферментов рестрикции-модификации [2].

Анализ результатов тестирования активности рестриктаз в ходе их хроматографической очистки показал, что некоторые обнаруженные ферменты одинаково фрагментируют субстратную ДНК. Всего было обнаружено три пары таких ферментов: *Hin1 I* и *Hin8 I*, *Hin1 II* и *Hin8 II*, *Hin6 I* и *Hin7 I*. Путем совместного гидролиза субстратной ДНК обоими срав-

Хроматографические стадии очистки исследованных рестриктаз

Название рестриктазы	Количество биомассы, г	Хроматографические стадии очистки *	
		I (III) **	II
<i>Hin1 I</i>	6	P11 (1,5×6 см), буфер А, 0,1 М NaCl, 0,1–1,0 М NaCl, 100 мл, 0,45–0,55 М NaCl DE-52 (1×4 см), буфер А, 0–0,5 М NaCl, 50 мл, 0,1–0,23 М NaCl	HS (1×6 см), буфер А, 0,2 М NaCl, 0,2–1,0 М NaCl, 50 мл, 0,36–0,48 М NaCl
<i>Hin1 II</i>	10	P11 (1,5×12 см), буфер А, 0,1 М NaCl, 0,1–0,8 М NaCl, 200 мл, 0,57–0,62 М NaCl	DE-52 (1,5×6 см), буфер А, 0–0,5 М NaCl, 80 мл, 0,05–0,18 М NaCl
<i>Hin2 I</i>	10	P11 (1,5×10 см), буфер А, 0,1 М NaCl, 0,1–1,0 М NaCl, 160 мл, 0,59–0,7 М NaCl	HS (1,5×6 см), буфер А, 0,2 М NaCl, 0,2–1,0 М NaCl, 100 мл, 0,5–0,58 М NaCl
<i>Hin3 I</i>	5	P11 (1,5×5 см), буфер А, 0,1 М NaCl, 0,1–1,0 М NaCl, 100 мл, 0,55–0,65 М NaCl	HS (1×5 см), буфер А, 0,2 М NaCl, 0,2–1,0 М NaCl, 50 мл, 0,68–0,8 М NaCl
<i>Hin5 I</i>	10	P11 (2,5×6 см), буфер А, 0,1 М NaCl, 0,1–1,0 М NaCl, 200 мл, 0,53–0,62 М NaCl	HS (1×5 см), буфер А, 0,2 М NaCl, 0,2–1,0 М NaCl, 50 мл, 0,52–0,6 М NaCl
<i>Hin5 II</i>	10	I стадия, аналогичная <i>Hin5 I</i> 0,87–0,95 М NaCl	DE-52 (1,5×8 см), буфер А, 0–0,5 М NaCl, 100 мл, 0,18–0,22 М NaCl
<i>Hin5 III</i>	10	I стадия, аналогичная <i>Hin5 I</i> 0,87–0,95 М NaCl	II стадия, аналогичная <i>Hin5 II</i> 0,42–0,46 М NaCl
<i>Hin6 I</i>	2	P11 (1,5×4 см), буфер А, 0,1 М NaCl, 0,1–1,0 М NaCl, 50 мл, 0,6–0,76 М NaCl	HS (1,5×6 см), буфер А, 0,1 М NaCl, 0,1–1,0 М NaCl, 50 мл, 0,75–0,9 М NaCl
<i>Hin7 I</i>	4	P11 (1,5×6 см), буфер А, 0,1 М NaCl, 0,1–1,0 М NaCl, 60 мл, 0,64–0,78 М NaCl	HS (1×5 см), буфер А, 0,2 М NaCl, 0,2–1,0 М NaCl, 50 мл, 0,7–0,84 М NaCl
<i>Hin8 I</i>	2	P11 (1,5×5 см), буфер А, 0,1 М NaCl, 0,1–1,0 М NaCl, 50 мл, 0,37–0,55 М NaCl	
<i>Hin8 II</i>	2	I стадия, аналогичная <i>Hin8 I</i> 0,78–1,0 М NaCl	

* P11 — фосфоцеллюлоза P11; HS — гепарин-сефароза; DE-52 — DEAE-целлюлоза DE-52. Указаны размер колонки (в скобках рядом с названием сорбента), границы концентраций соли при элюции линейным градиентом, общий объем элюирующего раствора и интервал концентраций соли, при которой элюируется основная часть фермента.

** В случае использования трех стадий очистки в первом столбце приводится описание стадий I и III.

ниваемыми ферментами было подтверждено, что указанные пары рестриктаз обладают идентичной субстратной специфичностью.

Для определения нуклеотидной последовательности, узнаваемой рестриктазами *Hin1 I*, *Hin2 I*, *Hin3 I*, *Hin5 I*, *Hin5 II*, *Hin5 III* и *Hin6 I*, сравнивали характер электрофоретического распределения фрагментов, полученных при действии исследуемых и известных рестриктаз на ДНК фага λ (см. рис. 1 и табл. 2). Установлено, что рестриктазы *Hin1 I* и *Hin8 I* являются изошизомерами рестриктазы *Acy I* (перекрестное расщепление проводили с *Aha II*, являющейся изошизомером *Acy I*), рестриктазы *Hin2 I* и *Hin5 I* — изошизомерами *Hpa II* (перекрестное расщепление с *Msp I*), рестриктаза *Hin3 I* — изошизомером *Cau II* (перекрестное расщепление с *Vcn I*), рестриктаза *Hin5 II* — изошизомером *Asu I* (перекрестное расщепление с *Cfr13 I*), рестриктаза *Hin5 III* — изошизомером *Hind III*, рестриктазы *Hin6 I* и *Hin7 I* — изошизомерами *Hha I*.

Последовательность нуклеотидов, узнаваемую рестриктазой *Hin1 II*, выясняли путем определения частоты расщепления субстратных ДНК фагов фХ174, fd и плазмиды pBR322. Полученные экспериментальные данные о числе и длине фрагментов сравнивали с аналогичными табличными данными для ДНК фХ174 [3, 4], fd и pBR322 (таблицы, аналогич-

Субстратная специфичность исследованных рестриктаз

Штамм-производитель <i>H. influenzae</i>	Название рестриктазы	Субстратная специфичность *	Прототип
RFL1	<i>Hin1</i> I	5'GRCGYC ↓	<i>Acy</i> I
RFL2	<i>Hin1</i> II	CATG ↓	<i>Nla</i> III
RFL3	<i>Hin2</i> I	CCGG	<i>Hpa</i> II
RFL5	<i>Hin3</i> I	CC(C/G)GG	<i>Cau</i> II
	<i>Hin5</i> I	CCGG	<i>Hpa</i> II
	<i>Hin5</i> II	GCNCC	<i>Asu</i> I
	<i>Hin5</i> III	AAAGCTT ↓	<i>Hind</i> III
RFL6	<i>Hin6</i> I	GCGC	<i>HinP</i> I
RFL7	<i>Hin7</i> I	GCGC	<i>Hha</i> I (<i>HinP</i> I)
RFL8	<i>Hin8</i> I	GRCCYC	<i>Acy</i> I
	<i>Hin8</i> II	CATG	<i>Nla</i> III

* Стрелка указывает место расщепления субстрата.

Таблица 3

Сравнение расчетных и экспериментальных данных о расщеплении ДНК фX174, рBR322 и fd рестриктазой *Hin1* II (величины фрагментов приведены в п. о.) *

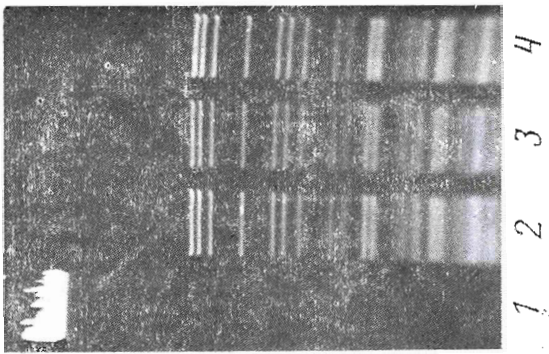
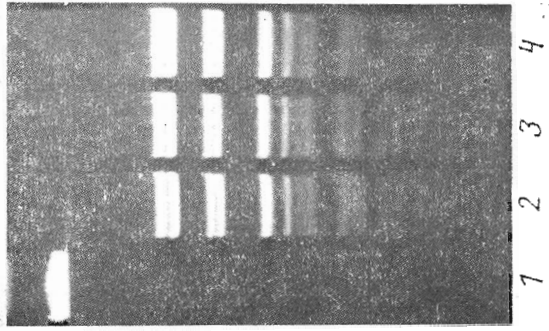
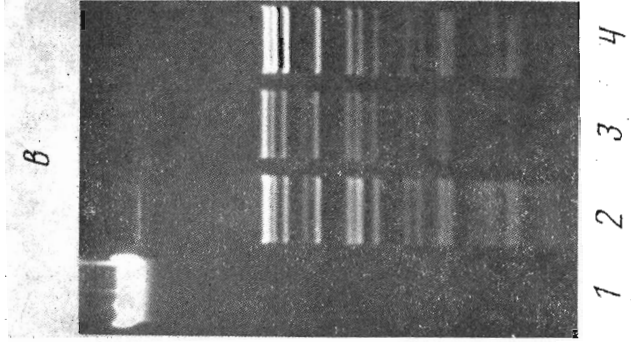
фX174		рBR322		fd	
Р	Э	Р	Э	Р	Э
757	760	720	720	2296	2300
629	620	491	470	698	720
604	580	393	370	634	640
357, 346	340	347	335	499	500
324, 320	310	260	250	456, 455, 434	440
291, 285	280	225	220	235	230
249, 248	245	207	200	193, 186	190
155	145	186	180	132	120
128, 127, 122	125	165	160	108	115
(107, 88, 87, 86, 65, 64, 13) **		146, 138, 134	135	(47, 44) **	
		128, 117	120		
		105, 105	100		
		(78, 72, 65, 64, 59, 57, 39, 36, 15, 10) **			

* Правильные сокращения: Р — величины фрагментов, рассчитанные исходя из предположения, что рестриктаза *Hin1* II узнает и расщепляет последовательность нуклеотидов (5') CATG; Э — величины фрагментов, установленные методом относительной электрофоретической подвижности. Электрофорез проводили в 2% геле агарозы.

** Фрагменты в геле отсутствовали.

ные фX174, представлены А. А. Мироновым), рассчитанными для любого 4—6-нуклеотидного палиндroma. Оказалось, что последовательность 5'CATG, узнаваемая рестриктазой *Nla* III [5], имеет такую же частоту встречаемости на использованных субстратных ДНК и генерирует фрагменты такой же величины, как и в случае *Hin1* II (табл. 3). Таким образом, можно было предположить, что рестриктаза *Hin1* II является изомером *Nla* III. Окончательное подтверждение характера специфичности рестриктазы *Hin1* II было получено после определения места расщепления субстрата прямыми биохимическими методами.

Некоторые из обнаруженных рестриктаз, а именно *Hin1* I, *Hin1* II и *Hin6* I, превышают по выходу очищенного фермента известные прототипы — соответственно *Acy* I [6], *Nla* III [5] и *Hha* I [7], что создало предпосылки для их практического применения наряду с известными прото-



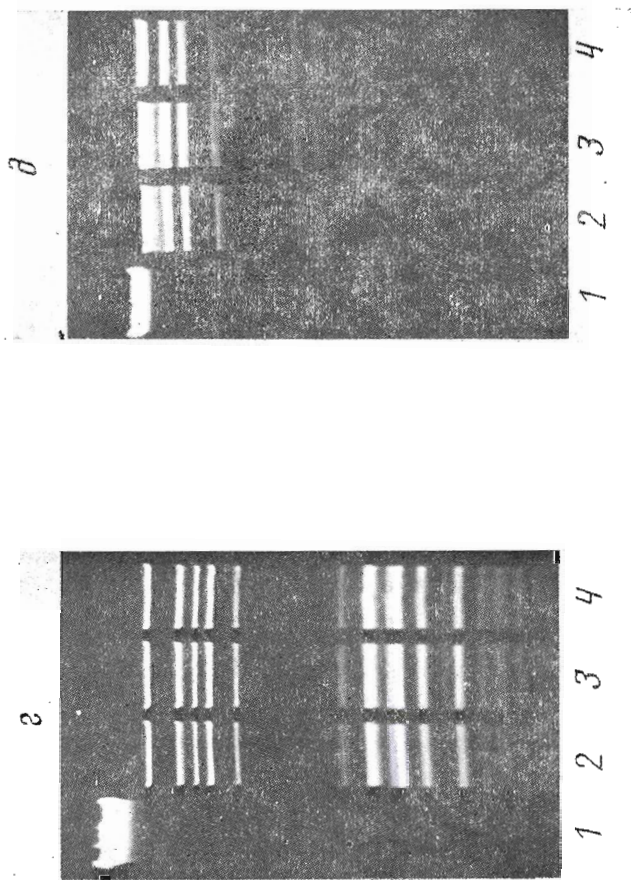


Рис. 1. Электрофоретическое сравнение продуктов расщепления ДНК фага λ последовательными и известными рестриктазами (всюду 1 — исходная ДНК): а — *Hin2* I (2), *Hin2* I + *Msp* I (3), *Msp* I (4); б — *Hin3* I (2), *Hin3* I + *Bcn* I (3), *Bcn* I (4); а — *Hin5* I (2), *Hin5* I + *Msp* I (3), *Msp* I (4); з — *Hin5* II (2), *Hin5* II + *Cir13* I (3), *Cir13* I (4); д — *Hin5* III (2), *Hin5* III + *Hind* III (3), *Hind* III (4)

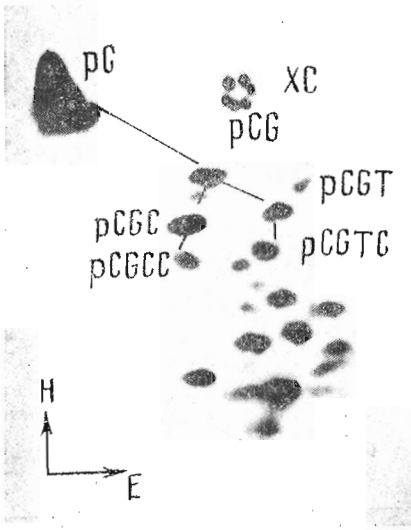


Рис. 2

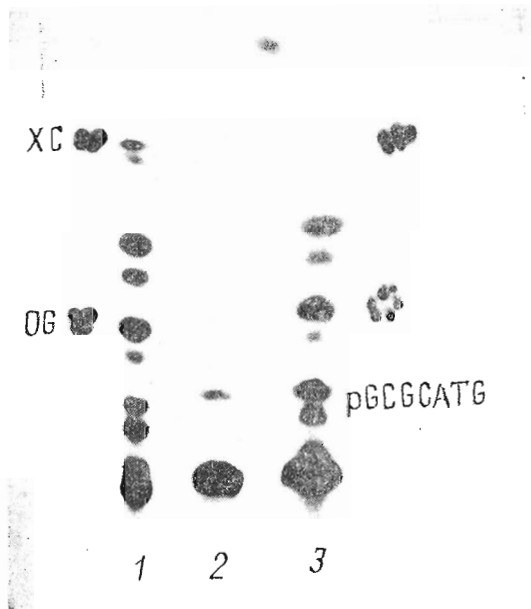


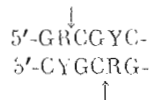
Рис. 3

Рис. 2. Двумерное разделение продуктов частичного экзонуклеазного гидролиза $5'$ - ^{32}P -меченых *HinI* I фрагментов ДНК рВR322: *E* — электрофорез на ацетилцеллюлозе; рН 3,5; *P* — гомохроматография в гомосмеси VI; *ХС* — краситель ксиленицианол *FF*

Рис. 3. Определение места расщепления декануклеотида $^{32}\text{pGCGCATGCGC}$ рестриктазой *HinI* II: 1 — частичный $3'$ -экзонуклеазный гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда, 2 — гидролиз рестриктазой *HinI* II, 3 — смесь продуктов частичного $3'$ -экзонуклеазного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда и гидролиза рестриктазой *HinI* II, *ХС* — краситель ксиленицианол *FF*, *OG* — краситель оранжевый G

типами или взамен них. С целью более полного изучения их субстратной специфичности были проведены эксперименты по определению места разрыва двухнитевой ДНК в составе узнаваемой последовательности нуклеотидов.

Для определения места расщепления субстрата рестриктазой *HinI* I использовали методы нуклеотидных карт [8]. Анализ $5'$ -концевых последовательностей на местах расщепления ДНК рВR322 этой рестриктазой позволил идентифицировать $5'$ -концевое звено как рdC. Частичный гидролиз $5'$ -меченых фрагментов панкреатической ДНКазой и фосфодиэстеразой змеиного яда с последующим двумерным разделением привел к фингерпринту (рис. 2), из которого следует, что гомологичной последовательностью в участке расщепления является вырожденный тетра nukлеотид ($5'$)CGYC. На основе этих данных, а также результатов определения узнаваемой последовательности нуклеотидов установлено, что рестриктаза *HinI* I расщепляет узнаваемый участок между вторым и третьим звеньями, образуя фрагменты с $5'$ -выступающими динуклеотидными концами:



Для подтверждения субстратной специфичности рестриктазы *HinI* II и определения места расщепления $5'$ -меченый синтетический самокомплементарный декадезоксинуклеотид d(pGCGCATGCGC), содержащий предполагаемый сайт узнавания-CATG-, расщепляли исследуемым ферментом и продукты гидролиза разделяли гомохроматографией на DEAE-целлюлозе. Единственным меченым продуктом оказался гептануклеотид ($5'$) pGCGCATG (рис. 3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что рестриктаза *HinI* II расщепляет субстрат непосредственно за узнаваемым

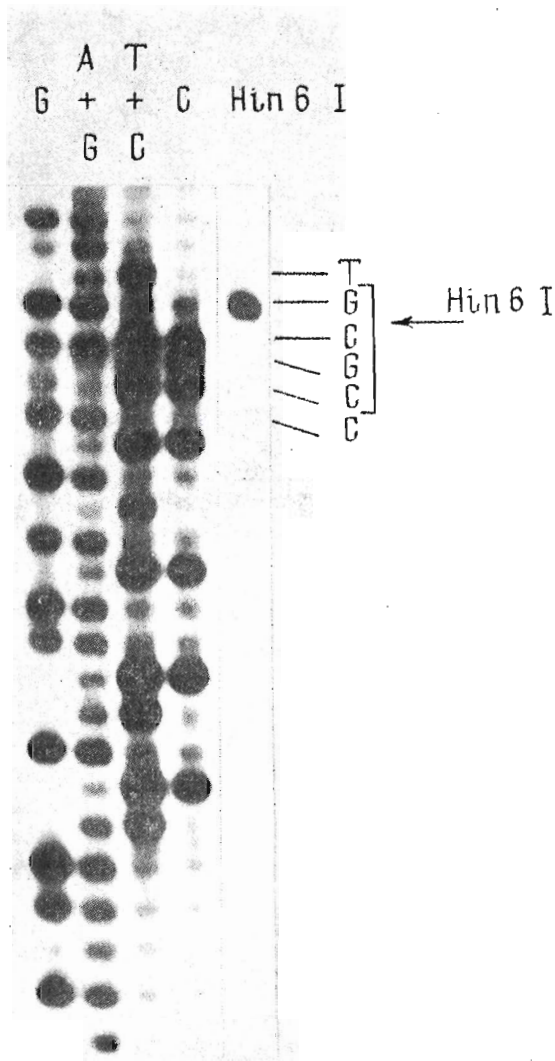
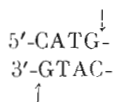


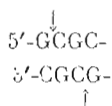
Рис. 4. Структурный гель, полученный при определении места расщепления рестриктазой *Hin*6 I

тетрануклеотидом:



Методом визуального сравнения было установлено, что рестриктаза *Hin*6 I узнает последовательность нуклеотидов (5') GCGC. В настоящее время известны две рестриктазы, *Hha* I и *Hin*P I, которые узнают ту же самую последовательность нуклеотидов, но различаются между собой по характеру расщепления: (5') GCG↓C (*Hha* I) и (5') G↓CGC (*Hin*P I). Для определения места расщепления субстрата рестриктазой *Hin*6 I проводили анализ ДНК методом Максама — Гилберта [9]. Для этого в качестве субстрата использовали ДНК плазмиды pBR322, предварительно расщепленную рестриктазой *Eco*130 I, фрагменты метили с помощью большого фрагмента ДНК-полимеразы из *E. coli* (фрагмента Кленова) в присутствии [α - 32 P]dCTP. Затем меченую ДНК pBR322 дополнительно обрабатывали рестриктазой *Pvu*II, полученные фрагменты разделяли электрофорезом в 8%-ном ПААГ и из геля элюировали меченый субфрагмент (697 п. о.). Его химически модифицировали по Максиму — Гилберту, продукты реакции разделяли в 6%-ном ПААГ, а в параллельной дорожке анализи-

ровали этот субфрагмент, предварительно обработанный рестриктазой *Hin*6 I. Сопоставление расположения соответствующего рестрикта относительно фрагментов структурной лесенки (рис. 4) с учетом правил интерпретаций позволило определить, что рестриктаза *Hin*6 I расщепляет узнаваемый сайт следующим образом:



Таким образом, рестриктаза *Hin*6 I является истинным изошизомером рестриктазы *Hin*P I.

В результате проведенных исследований из семи штаммов *H. influenzae* было выделено и охарактеризовано 11 эндонуклеаз рестрикции, узнающих семь различных последовательностей (табл. 2). Среди них идентифицированы 4 специфичности (*Acy* I, *Nla* III, *Cau* II, *Asu* I), ранее не обнаруженные в роде *Haemophilus*. Вслед за открытием первой рестриктазы типа II — *Hind* II в *H. influenzae* d [10] — многими исследователями было продемонстрировано широкое распространение ферментов данного типа в обсуждаемом таксоне микроорганизмов [1]. К настоящему времени из 24 штаммов рода *Haemophilus* выделены 33 рестриктазы, узнающие 13 различных последовательностей нуклеотидов [1]. С учетом результатов настоящей работы приведенные выше цифры будут выглядеть следующим образом: 31, 44 и 17 соответственно. Как литературные, так и полученные нами результаты позволяют утверждать, что род *Haemophilus* является продуктивным источником специфических эндонуклеаз, причем его истинный потенциал далеко еще не раскрыт.

Экспериментальная часть

Бактериальные культуры *H. influenzae* были получены из НИИ педиатрии АМН СССР (от Л. К. Котосовой). Культивирование штаммов проводили при 37° С в колбах на качалках или в лабораторном ферментере в средах следующего состава (г/л): экстракт мозга и сердца телят — 37 (Difco, США); NAD = 0,002; гемин — 0,01; рН 7,0—7,2. Культуры выращивали до поздней логарифмической стадии роста, клетки собирали центрифугированием и полученные биомассы хранили при —20° С.

В работе использовали рестриктазы *Hha* I (НПО «Вектор», Бердск) и *Aha* II (Biolabs, США), фосфодиэстеразу змеиного яда, панкреатическую ДНКазу (Merck, США). Другие использованные фрагменты и ДНК фага λ представлены сотрудниками ВНИИ прикладной энзимологии (Вильнюс), препараты ДНК рBR322, фХ174 и fd — лично К. Саснаускасом (ВНИИ ПЭ, Вильнюс).

Все операции по выделению ферментов проводили при 4° С. Клетки исследуемых штаммов суспендировали в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 10 мМ 2-меркаптоэтанол (буфер А) и 0,1 М NaCl, и разрушали ультразвуком на дезинтеграторе УЗДН-2Г. Полученные гомогенаты центрифугировали 1 ч при 48 000g. Условия хроматографической очистки представлены в табл. 1.

Специфическую эндонуклеазную активность в исследуемых растворах тестировали по их способности специфически фрагментировать ДНК фага λ . К 40 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ трис-HCl (рН 7,8), 20 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина добавляли 1—5 мкл исследуемого фермента, инкубировали 30 мин при 37° С, продукты реакции анализировали электрофорезом в 0,8—2,0% гелях агарозы [11].

*Определение субстратной специфичности рестриктазы Hin*1 I. 10 мкг ДНК плазмиды рBR322 расщепляли *Hin*1 I в описанных выше условиях и затем обрабатывали 20 ед. акт. щелочной фосфатазы *E. coli* (60° С, 1 ч). После фенольной экстракции и осаждения этанолом полученные фрагменты ДНК 5'-фосфорилировали при помощи [γ -³²P]АТР и Т4-полинуклеотид-

киназы, выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50 и исчерпывающе гидролизовали фосфодиэстеразой змеиного яда. Продукты гидролиза разделяли электрофорезом на бумаге Ватман ЗММ при рН 3,5, прямым сравнением с известными РдН идентифицируя концевой нуклеотид. Частичный гидролизат $5' \text{-}^{32}\text{P}$ -меченых фрагментов, полученный при помощи панкреатической ДНКазы и фосфодиэстеразы змеиного яда, разделяли в двух перпендикулярных направлениях электрофорезом на ацетилцеллюлозе с последующей гомохроматографией в тонком слое DEAE-целлюлозы [8]. Положение пятен локализовали радиоавтографией на рентгеновской пленке РТ-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roberts R. J. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 16. Suppl. P. r271—r313.
2. Smith H. O., Nathans D. // J. Mol. Biol. 1973. V. 81. № 3. P. 419—423.
3. Fuchs C., Rosenzold E. C., Honigman A., Szybalsky W. // Gene. 1978. V. 4. № 1. P. 1—23.
4. Fuchs C., Rosenzold E. C., Honigman A., Szybalsky W. // Gene. 1980. V. 10. № 4. P. 357—370.
5. Qiang B.-Q., Schildkraut I. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 5. P. 1991—1999.
6. de Waard A., Korsuize J., van Beveren C. P., Maat J. // FEBS Lett. 1978. V. 96. № 1. P. 105—110.
7. Shen S., Li Q., Yan P., Zhou B., Ye S., Lu Y., Wang D. // Sci. Sin. 1980. V. 23. № 11. P. 1435—1442.
8. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. // Nucl. Acids Res. 1974. V. 18. № 1. P. 115—129.
9. Mazam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.
10. Smith H. O., Wilcox K. W. // J. Mol. Biol. 1970. V. 51. № 3. P. 379—391.
11. Sharp P. A., Sugden B., Sambrook J. // Biochemistry. 1973. V. 12. № 16. P. 3055—3063.

Поступила в редакцию
25.V.1989

После доработки
19.XII.1989

L. LAZAREVIČIŪTĖ, Z. MANELIENĖ, A. PADEGIMIENĖ, L. KIUDULIENĖ,
V. LAUČYS, J. BITINAITĖ, I. M. GRÜBER*, V. M. POLYACHENKO*, V. BUTKUS,
A. JANULAITIS

ISOLATION AND CHARACTERISTICZ OF NEW RESTRICTION ENDONUCLEASES FROM *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

All-Union Research Institute of Applied Enzymology, Vilnius;
* I. I. Mechnikov Central Research Institute of Vaccines and Sera,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Various strains of *Haemophilus influenzae* have been examined for the presence of site-specific endonuclease activities, and eleven restriction endonucleases have been isolated from seven strains. For all the endonucleases recognition sequences were determined, for three of them cleavage sites being identified. The enzymes proved to be isoschizomers of known endonucleases, viz. *Hin*1 I, *Hin*8 I — *Acy* I; *Hin*1 II, *Hin*8 II — *Nla* III; *Hin*2 I, *Uin*5 I — *Hpa* II; *Hin*3 I — *Cau* II; *Hin*5 II — *Asu* I; *Hin*5 III — *Hind* III; *Hin*6 I, *Hin*7 I — *Hha* I. Restriction endonucleases *Hin*1 I, *Hin*1 II and *Hin*6 I recognize nucleotide sequences $5' \text{GRGCPYC}$, $5' \text{CATG}$, $5' \text{GCCG}$, respectively, and cleave them as indicated by arrows.