



УДК 577.155.2.021

НОВАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА РЕСТРИКЦИИ *CfrI*
ИЗ *CITROBACTER FREUNDII*

Янулайтис А. А., Стакенас П. С., Яскелявичене Б. П.,

ВНИИ прикладной энзимологии, Вильнюс

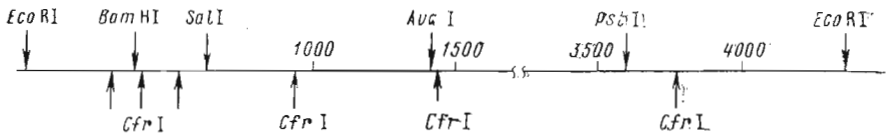
Лебеденко Е. П., Берлин Ю. А.

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

В настоящее время известно большое число эндонуклеаз рестрикции, различающихся по субстратной специфичности [1]. Тем не менее в связи с решающей ролью, которую эти ферменты играют в молекулярно-генетических и структурных исследованиях ДНК, проблема поиска и изучения новых рестриктаз сохраняет свою актуальность. В ходе систематических исследований в этой области мы обнаружили в культуре *Citrobacter freundii* RFL2 новую рестриктазу, названную, согласно принятой номенклатуре [2], *CfrI*.

Нуклеотидная последовательность, узнаваемая этой рестриктазой, была определена с помощью физического картирования [3]. Для этого ДНК плазмиды рBR322 расщепляли рестриктазами *CfrI* и *EcoRI* в комбинациях с одной из рестриктаз *BamHI*, *SalI*, *AvaI* и *PstI* (все расщепления проводили при 37° С в буфере, содержащем 6 мМ трис-НСl (рН 7,5), 6 мМ MgCl₂, 6 мМ β-меркаптоэтанол и 50 мМ NaCl) и величину фрагментов ДНК определяли посредством электрофореза в 5% полиакриламидном геле, используя в качестве стандартов *BspI*-рестрикты той же ДНК. Полученные результаты показали, что рестриктаза *CfrI* расщепляет ДНК рBR322 с образованием 6 фрагментов размером около 105, 130, 400, 480, 890 и 2360 п. о., и позволили картировать *CfrI*-сайты относительно сайтов перечисленных выше рестриктаз (рисунок). При сопоставлении известной первичной структуры ДНК рBR322 [4] вблизи *CfrI*-сайтов была обнаружена общая последовательность 5' Py-G-G-C-C-Py. Полученный результат согласуется с тем, что ДНК SV40 [5] оказалась устойчивой к *CfrI*, а ДНК ØX174 при действии этой рестриктазы расщепилась на два фрагмента, меньший из которых содержит около 550 п. о. (расчет исходя из известной первичной структуры [6] приводит к величине 552 п. о.).

Структура *CfrI*-сайта была подтверждена, а место его расщепления установлено следующим образом. Смесь *CfrI*-рестриктных фрагментов ДНК фага λ дефосфорилировали бактериальной щелочной фосфатазой,



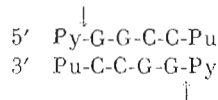
Расположение *CfrI*-сайтов на ДНК pBR322

затем, после фенольной экстракции и осаждения, 5'-³²P-фосфорилировали действием [γ -³²P]АТР и Т4-полинуклеотидкиназы, избыток АТР отделили гель-фильтрацией и меченые полинуклеотиды исчерпывающе гидролизировали фосфодиэстеразой змеиного яда. 5'-Концевое звено было идентифицировано в виде d³²pG с помощью электрофореза на бумаге при рН 3,5.

Далее частичный гидролиз 5'-меченых *CfrI*-рестриктов панкреатической ДНКазой и фосфодиэстеразой змеиного яда с последующим двухмерным разделением гидролизата (электрофорез на ацетилцеллюлозе при рН 3,5 и гомохроматография) привел к нуклеотидной карте, которая демонстрирует наличие общей для всех фрагментов последовательности 5' G-G-C-C-(A, G).

Наконец, 5'-выступающие концы продуктов рестрикции были выровнены с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* и двух дезоксирибонуклеозидтрифосфатов dCTP и dGTP, один из которых был α -³²P-меченым; после отделения трифосфатов гель-фильтрацией смесь полинуклеотидов анализировали методом определения ближайших соседей. Оказалось, что если меченым предшественником служит [α -³²P]dCTP, то после гидролиза микрорНКазой и фосфодиэстеразой селезенки в гидролизате идентифицируются dC³²p и dG³²p в эквимоллярном соотношении, а метка из [α -³²P]dGTP обнаруживается в составе dG³²p, dC³²p и dT³²p (2:1:1).

Совокупность полученных данных доказывает, что эндонуклеаза рестрикции *CfrI* обладает уникальной субстратной специфичностью, узнавая в составе ДНК шестизвенный дуплекс



и расщепляя в нем фосфодиэфирные связи между остатками пиримидинового нуклеозида и дезоксигуанозина с образованием выступающих тетра-нуклеотидных 5'-концов G-G-C-C.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts R. J. (1980) *Nucleic Acids Res.*, 8, 63-80.
2. Smith H. O., Nathans D. J. (1973) *J. Mol. Biol.*, 81, 419-423.
3. Fuchs C. (1978) *Gene*, 4, 1-23.
4. Sutcliff J. G. (1979) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 43, 77-90.
5. Fiers W., Contreras R., Haegeman R., Rogiers R., van de Voorde A., van Heuverswyn H., van Herreweghe J., Volckaert G., Ysebaert M. (1978) *Nature*, 273, 113-120.
6. Sanger F., Coulson A. R., Friedmann T., Air G. M., Barrell B. G., Brown N. L., Fiddes J. C., Hutchison C. A., Slocombe P. M., Smith M. (1978) *J. Mol. Biol.*, 125, 225-246.

Поступило в редакцию
8.VII.1980.