



УДК 577.155.2:547.963.32

**ОГРАНИЧЕНИЕ РЕСТРИКЦИИ ДНК ЭНДУКЛЕАЗАМИ
В ПРИСУТСТВИИ АКТИНОМИЦИНА D, ДИСТАМИЦИНА A
И ИХ АНАЛОГОВ***Сизова И. А., Глибин Е. Н., Гинзбург О. Ф.,
Терещин И. М.**Ленинградский технологический институт им. Ленсовета*

Исследовано расщепление ДНК фага λ c1857s7 рестрикционными эндонуклеазами *EcoRI* и *SmaI* в присутствии актиномицина D, дистамицина A, его аналога дистамина, а также полифункциональных лигандов — дистакцинов. Дистамин подавляет расщепление ДНК фага λ эндонуклеазой *EcoRI* таким же образом, что и дистамицин A. Актиномицин D избирательно блокирует действие эндонуклеаз *SmaI* и *EcoRI*, причем в последнем случае подавляется расщепление только одного участка узнавания. При ограничении действия эндонуклеазы *EcoRI* одновременно двумя лигандами, актиномицином D и дистамицином A или актиномицином D и дистамином, обнаружена «аддитивность» их действия на участке узнавания, находящемся на стыке *EcoRI*-фрагментов E и F. При расщеплении ДНК эндонуклеазой *SmaI* в присутствии этих лигандов «аддитивности» не выявлено. В этом случае наблюдается возрастание степени расщепления ДНК на стыках *SmaI*-фрагментов A и B, D и C по сравнению с действием только актиномицина D. Дистакцины являются неспецифичными ингибиторами расщепления ДНК под влиянием ферментов *EcoRI* и *SmaI*; дистакцин-0 защищает участки узнавания эндонуклеазы *SmaI* и не блокирует действие эндонуклеазы *EcoRI*.

В последнее время лиганды, образующие обратимые комплексы с ДНК, находят применение в качестве ингибиторов действия эндонуклеаз при изучении структуры и функции ДНК, построении карт рестрикции ДНК, конструировании гибридного генома. При этом используется способность лигандов в зависимости от их строения проявлять сродство к участкам ДНК, обогащенным А·Т- или G·C-парами, и тем самым избирательно защищать участки узнавания рестрикционных эндонуклеаз на ДНК [1–7]. Для подобной регуляции действия рестрикционных эндонуклеаз применяют А·Т-специфичный антибиотик дистамицин A [8] и G·C-специфичный антибиотик актиномицин D [9]. Ранее было показано, что актиномицин D и дистамицин A способны образовывать тройной комплекс актиномицин D—дистамицин A—ДНК, располагаясь на ДНК в непосредственной близости друг от друга [10]. Это позволило предположить, что можно совместно использовать данные антибиотики или лиганды, содержащие фрагменты, специфичные к А·Т- и G·C-парам ДНК; избирательность защиты участков узнавания рестрикционных эндонуклеаз, в этих случаях должна отличаться от избирательности, присущей А·Т- или G·C-специфичным комплексам.

Исследование по проверке данного предположения проводили с использованием двух эндонуклеаз. Участок узнавания одной из них, *EcoRI*, содержит как А·Т-, так и G·C-пары (GAATTC) [11], а участок другой, *SmaI*, включает только G·C-пары (CCCGGG) [12]. Нами изучено расщепление ДНК фага λ c1857s7 под действием данных ферментов при одновременном присутствии двух лигандов — актиномицина D и дистамицина A или его синтетического аналога — дистамина, а также в присутствии дистакцинов — полифункциональных комплексонов ДНК, содержащих хромофор актиномицина D и фрагменты олигометилпирролкарбоксамидной цепи дистамина [13, 14]. Возможность использования дистамина и дистакцинов основывалась, в частности, на том, что эти соединения образуют достаточно прочные комплексы с ДНК ($K_{св} \infty 10^{-5} - 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ [15], сравнимые с константой связывания актиномицина D [9]). Интересно, что дистамин и дистакцин-3 связываются только неинтеркаляционным путем,

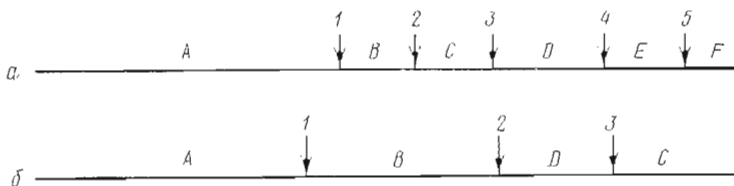
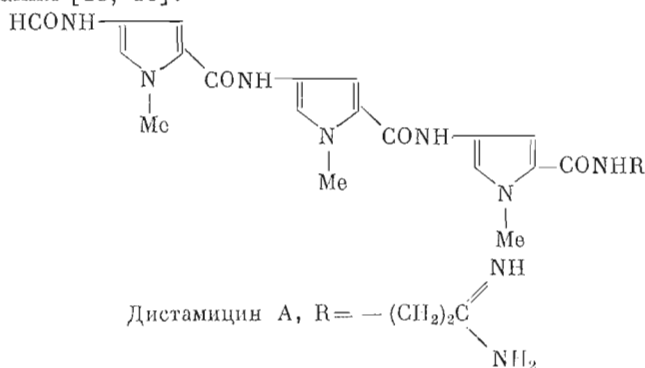
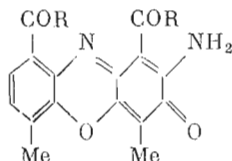


Рис. 1. Карта расщепления ДНК фага λ c1857s7 рестрикционными эндонуклеазами *EcoRI* (а), *SmaI* (б). Цифрами обозначены номера участков узнавания

а дистакцины образуют комплексы двух типов, интеркаляционного и внешнего связывания [15, 16].



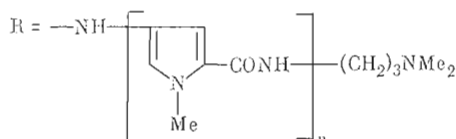
Дистамин, $R = -(\text{CH}_2)_3\text{NMe}_2$



Актиномицин D, $R = -L\text{-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal-}$

Актиомиин, $R = -(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$

Дистакцины,



Дистакцин-0, $n = 0$

Дистакцин-1, $n = 1$

Дистакцин-2, $n = 2$

Дистакцин-3, $n = 3$

Следует отметить, что избыток лиганда, превышающий насыщающий уровень для ДНК, требуемый для ингибирования расщепления [3, 4], свидетельствует о конкурентных отношениях между лигандом и ферментом. При этом очевидно, что концентрация лиганда, необходимая для ингибирования расщепления ДНК, зависит от активности фермента.

ДНК фага λ c1857s7, выбранная нами в качестве модельной, расщепляется под действием ферментов *EcoRI* и *SmaI* на 6 [11] и 4 [12] фрагмента соответственно (рис. 1). В согласии с литературными данными [17, 18] мы нашли, что участки узнавания эндонуклеазы *EcoRI*, находящиеся в центре молекулы, и участок узнавания 2 эндонуклеазы *SmaI* расщепляются с наименьшими скоростями.

Подавление актиномицином D, дистамицином A и их аналогами расщепления ДНК фага λ эндонуклеазами *EcoRI* и *SmaI*

Соединение	Величина 2D/P, при которой наблюдается полное ингибирование расщепления данного участка узнавания *							
	Номер участка узнавания <i>EcoRI</i>					Номер участка узнавания <i>SmaI</i>		
	1	2	3	4	5	1	2	3
Актиномицин D	—	—	—	—	5,0	1,0	0,4	0,4
Дистамицин A	2,0	0,1	0,2	2,0	0,3	—	—	—
Актиномицин D ^{2*} + дистамицин A	>2,0	0,15	0,5	>2,0	0,05	—	—	—
Дистамин	8,0	0,5	1,5	8,0	2,0	—	—	—
Актиномицин D ^{3*} + дистамин	>8,0	1,0	3,0	>8,0	0,5	—	—	—
Дистакцин-0	—	—	—	—	—	2,5	1,5	2,5
Дистакцин-0 ^{4*} + дистамин	8,0	0,5	1,5	8,0	2,0	—	—	—
Дистакцин-1	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,5	0,5	0,5
Дистакцин-2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—	—	—
Дистакцин-3	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,8	1,8	1,8

* D — молярная концентрация лиганда, P/2 — концентрация ДНК, выраженная в молярной концентрации пар оснований. Прочерком обозначено отсутствие полного подавления расщепления при всех изученных концентрациях лиганда.

^{2*} Концентрация актиномицина 2D постоянна, соответствует 2D/P=2.

^{3*} Концентрация актиномицина D постоянна, соответствует 2D/P=1.

^{4*} Концентрация дистакцина-0 постоянна, соответствует 2D/P=1.

Мы изучили расщепление ДНК фага λ эндонуклеазой *EcoRI* в присутствии возрастающих концентраций дистамицина A. Обнаруженная последовательность защиты участков узнавания фермента (таблица) соответствует данным работы [1]. При идентичности самих участков узнавания эндонуклеазы избирательность их защиты лигандом, по-видимому, определяется нуклеотидными последовательностями, примыкающими к местам узнавания. Аналогичные заключения были сделаны в работах [2, 6, 7]. Последовательная защита участков 2, 3, 5, а затем 1 и 4 (таблица) свидетельствует о наличии предпочитаемых мест связывания дистамицина A вблизи тех участков узнавания, которые ингибируются в первую очередь. Поскольку дистамицин A и дистамин различаются только боковыми цепями, мы предположили, что синтетический комплексон будет A·T-специфичным. Это косвенно подтвердилось в наших экспериментах, так как расщепление участков узнавания фермента *EcoRI* оба лиганда блокировали в аналогичной последовательности (таблица, рис. 2, *u-o*). Полное ингибирование соответствующих участков узнавания фермента под влиянием дистаминна наблюдается (таблица, рис. 2) при более высоких соотношениях лиганд : ДНК, что, вероятно, объясняется более низким сродством препарата к ДНК. Последнее обусловлено скорее всего тем, что протонированная диметиламинопропильная группировка дистаминна связывается с фосфатной группой ДНК только электростатически, а положительно заряженная пропионамидиновая группировка дистамицина A способна не только к электростатическому взаимодействию, но и к образованию водородных связей [19].

Таким образом, замена в молекуле дистамицина A пропионамидиновой группы на алкиламинную уменьшает сродство препарата к ДНК, не влияя на специфичность комплексона.

Дистамицин A и дистамин, как и следовало ожидать, не оказали влияния на расщепление ДНК фага λ эндонуклеазой *SmaI*.

При изучении расщепления ДНК фага λ эндонуклеазой *EcoRI* в присутствии актиномицина D мы установили, что при концентрации антибиотика в среде $7,6 \cdot 10^{-5}$ M (что соответствует соотношению 2D/P=5, где D — молярная концентрация лиганда, P/2 — концентрация ДНК, выраженная в молярной концентрации пар оснований) наблюдается полное ингибирование расщепления ДНК по участку 5 (таблица и рис. 3).

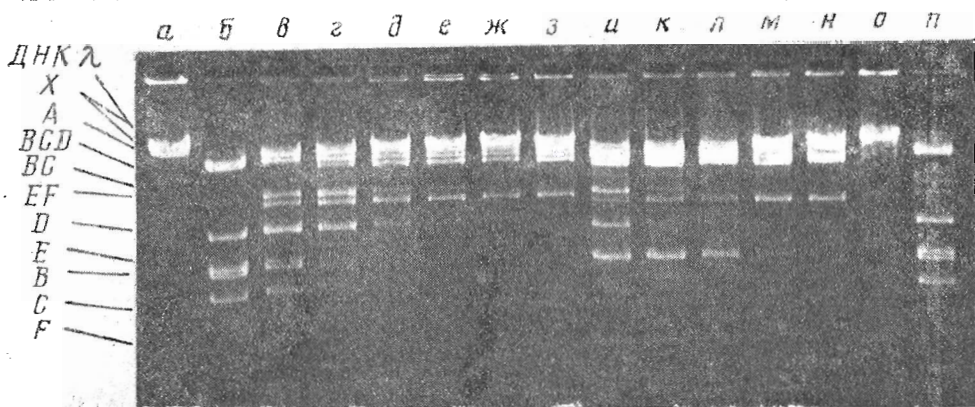


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов гидролиза ДНК фага λ эндонуклеазой *EcoRI* в присутствии дистамицина и актиномицина D одновременно (в-з), дистамицина (и-о), актиномицина D (н). Буквы слева — фрагменты ДНК, X — пептидифицированные продукты неполного гидролиза. а — негидролизованная ДНК, б — продукты гидролиза в отсутствие препаратов. Концентрация препаратов в реакционной среде соответствует соотношению 2D/P для дистамицина: в, и — 0,5, г, к — 1,0, д, л — 1,5, е, м — 2,0, ж, н — 3,0, з, о — 5,0; для актиномицина D: в-з, н — 1,0

В работе [2] не наблюдали полного блокирования расщепления какого-либо участка узнавания фермента *EcoRI*, что, вероятно, объясняется более низкими концентрациями препарата. Способность актиномицина D подавлять действие фермента *SmaI* ранее была показана на ДНК плазмиды RP4 [20]. При проведении гидролиза ДНК фага λ эндонуклеазой *SmaI* в присутствии актиномицина D мы обнаружили, что для защиты участка 1 требуется в 2,5 раза большие концентрации антибиотика, чем для блокирования участков 2 и 3 (рис. 4а, таблица).

Наблюдаемая избирательность действия актиномицина D позволила предположить наличие G·C-собогащенного локального окружения участка 5 эндонуклеазы *EcoRI* и участков 2 и 3 эндонуклеазы *SmaI* на ДНК фага λ .

Было изучено расщепление ДНК фага λ эндонуклеазой *EcoRI* в присутствии актиномицина D при постоянной концентрации и дистамицина А, взятого в возрастающих концентрациях. При этом была выбрана концентрация актиномицина D, обеспечивающая лишь частичное блокирование гидролиза ДНК по участку 5 (рис. 3, таблица). Из таблицы следует, что в данном случае в первую очередь блокируется расщепление участка 5, а затем 2 и 3, а не 2, 3, 5, как это наблюдалось в присутствии только дистамицина А. Для полного блокирования расщепления ДНК фага λ по участку 5 требуются более низкие концентрации и актиномицина D и дистамицина А, чем при проведении экспериментов в присутствии только одного из этих антибиотиков. Аналогичные результаты получены при совместном действии актиномицина D и дистамицина (рис. 2, таблица). Эти данные позволяют заключить, что на участке 5 наблюдается «аддитивность» действия А·Т- и G·C-специфичных лигандов, когда недостаток одного типа комплексона компенсируется наличием другого. В то же время, поскольку остальные участки узнавания фермента *EcoRI* на ДНК фага λ (1—4) в присутствии актиномицина D блокируются при более высоких концентрациях дистамицина А или дистамицина, можно говорить об отсутствии аддитивности действия этих комплексонов на процесс ферментативного гидролиза.

Эффект аддитивности не наблюдается и при расщеплении ДНК фага λ эндонуклеазой *SmaI*. Было обнаружено, что в присутствии актиномицина D и дистамицина А степень расщепления участков 1 и 3 выше по сравнению с действием одного актиномицина D (рис. 5). Это явление, возможно, объясняется тем, что дистамицин А частично вытесняет пептид-лактозные кольца актиномицина D из узкого желоба ДНК при связывании

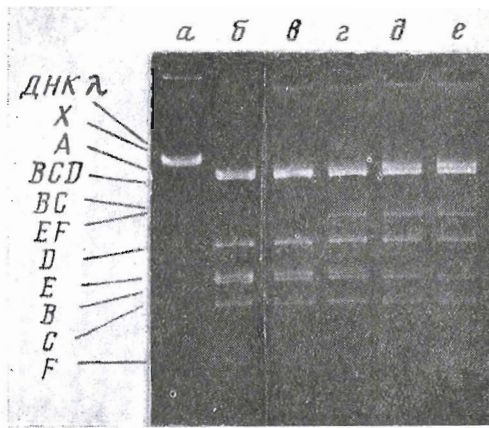


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов гидролиза ДНК фага λ эндонуклеазой *EcoRI* в присутствии актиномицина D. Буквы слева — фрагменты ДНК, X — неидентифицированные продукты недолгого гидролиза. а — негидролизованная ДНК, б — продукты гидролиза в отсутствие антибиотика. Концентрация актиномицина D в реакционной среде соответствует соотношению 2D/P: в — 1,0, г — 2,0, д — 4,0, е — 5,0

и делает участки ДНК, находящиеся в комплексе с актиномицином D, более доступными для действия фермента.

Таким образом, в тройном комплексе актиномицин D—дистамицин A—ДНК, структура которого зависит от первичной последовательности ДНК, наблюдается взаимное влияние лигандов, которое может приводить к различной чувствительности ДНК в комплексе с лигандами к действию рестрикционных эндонуклеаз.

Результаты экспериментов показывают, что совместное действие А·Т- и G·C-специфичных комплексоноров приводит к избирательному блокированию расщепления ДНК рестрикционными эндонуклеазами, отличному от действия каждого из этих лигандов в отдельности. Учитывая это, мы исследовали расщепление ДНК фага λ эндонуклеазами *EcoRI* и *SmaI* в присутствии дистакцинов-1, -2, -3, молекулы которых объединяют фрагменты, входящие в состав актиномицина D и дистамицина, специфичных соответственно к G·C- и А·Т-парам.

В дистакцинах-1, -2, -3 пептидлактонные кольца актиномицина D замещены фрагментами дистамицина. Поэтому предварительно для выяснения значения пептидлактонных колец антибиотика при блокировании эндонуклеаз *EcoRI* и *SmaI* мы сравнили эффекты актиномицина D и его простого аналога — дистакцина-0. Судя по наличию в молекуле последнего феноксазопового хромофора, мы предполагали, что дистакцин-0 будет G·C-специфичным. Однако оказалось, что в отличие от актиномицина D дистакцин-0 не способен полностью защищать от расщепления какой-либо участок узнавания эндонуклеазы *EcoRI* при равных с актиномицином D концентрациях. В экспериментах с эндонуклеазой *SmaI* обнаружено, что увеличение концентрации дистакцина-0 в реакционном объеме эквивалентно сокращению времени инкубации реакционной смеси с ферментом. В первую очередь блокируется участок 2, расщепляемый эндонуклеазой *SmaI* с наименьшей скоростью и в отсутствие лиганда (рис. 4б, таблица). Наблюдаемые различия свойств комплексов актиномицина D и дистакцина-0 с ДНК, возможно, объясняются отсутствием у последнего избирательности при связывании. Как указывалось выше, ингибирование рестрикционных эндонуклеаз комплексонами ДНК носит конкурентный характер. Так, отсутствие избирательной защиты участков узнавания может быть результатом кинетических свойств комплекса лиганд—ДНК. Возрастание скорости диссоциации комплекса лиганд—ДНК на четыре порядка ранее наблюдалось при замене у феноксазопового хромофора пептидных колец актиномицина D на алкиламинные группы актиномина. При этом было показано, что актиломин аналогичен актиномицину D по способности взаимодействовать с G·C-обогатненными ДНК и константами равновесия образующихся комплексов [9]. Структурные различия между актиномином и дистакцином-0 заключаются только в длине алкиламинных группировок в положениях 1,9. Структурная аналогия данных соединений свидетельствует в пользу упомянутого выше предположения: для избирательного блокирования действия рестрикционных эндонуклеаз важны не толь-

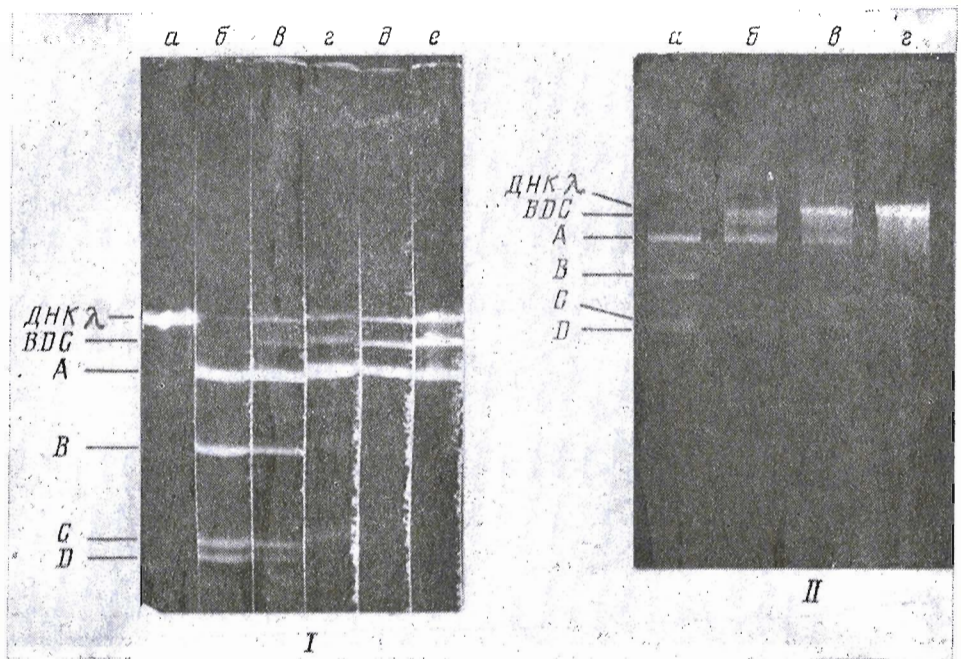


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов гидролиза ДНК фага λ эндонуклеазой *Sma*I в присутствии актиномицина D или дистакцина-0. Буквы слева – фрагменты ДНК. I, а – негидролизованная ДНК; I, б – продукты гидролиза в отсутствие препарата. Концентрация актиномицина D в реакционной среде соответствует соотношению 2D/P: I, а – 0,10; I, г – 0,2; I, д – 0,3; I, е – 0,4. Концентрация дистакцина-0 в реакционной среде соответствует соотношению 2D/P: II, а – 1,0; II, б – 1,5; II, в – 2,0; II, г – 2,5

ко равновесные, но и определенные кинетические свойства комплексов лиганд–ДНК. В случае актиномицина D эта избирательность является следствием медленных конформационных изменений пептидных колец при взаимодействии с ДНК [9].

Введение одно-, двух- и трехчленных метилпирролкарбоксамидных цепей в положения 1 и 9 феноксазонавого хромофора приводит к соединениям, которые неизбирательно блокируют расщепление как эндонуклеазы *Eco*RI, так и *Sma*I. При этом корреляции между длиной заместителя и ингибирующей концентрацией соединения не наблюдается. В настоящее время изучаются специфичность дистакцинов и кинетика образования и диссоциации их комплексов с ДНК, которые позволят выяснить причину наблюдаемых явлений.

Экспериментальная часть

В работе использовали ДНК фага λ c1857s7, выделенную из очищенных частиц фага фенольной экстракцией [21].

Рестрикционные эндонуклеазы *Eco*RI и *Sma*I получены по методикам [22, 23]. Составы инкубационных смесей для расщепления ДНК рестрикционными эндонуклеазами: *Eco*RI – 0,1 М трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl; *Sma*I – 6 мМ трис-НСl (рН 7,5), 6 мМ MgCl₂, 6 мМ 2-меркаптоэтанол.

В 20 мкл инкубационной смеси, содержащей 1 мкг ДНК, вносили 1 ед. акт. рестрикционной эндонуклеазы и инкубировали 1 ч при 37° С для полного расщепления. Реакцию останавливали добавлением 0,1 М Na₂-EDTA.

Для ограничения действия ферментов исследуемыми соединениями в инкубационную среду вводили их водные растворы в заданных концентрациях. Максимальная концентрация лигандов в реакционной среде составляла $(3-3,8) \cdot 10^{-4}$ М, что соответствует соотношению $(2D/P)_{\text{макс}}$ 4–5, за исключением дистамина и дистамицина А, для которых $(2D/P)_{\text{макс}}$ 7–8.

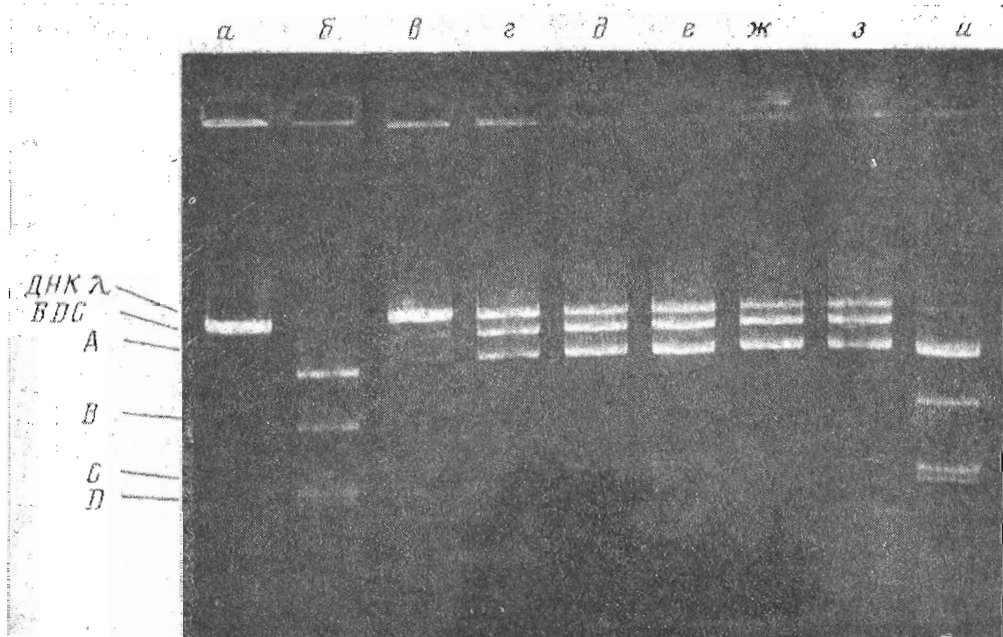


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов гидролиза ДНК фага λ эндонуклеазой *Sma*I в присутствии актиномицина D (e), актиномицина D и дистамицина A одновременно (e-a), дистамицина A (u). Буквы слева — фрагменты ДНК. a — негидролизованная ДНК, б — продукты гидролиза в отсутствие антибиотиков. Концентрация препаратов в реакционной среде соответствует соотношению 2D/P для актиномицина D: e-z — 0,8, для дистамицина A: z — 0,5; d — 1,0; e — 2,0; ж — 3,0; з — 4,0; u — 4,0

Полноту расщепления комплекса ДНК — лиганд рестрикционными эндонуклеазами контролировали методом электрофореза. Для этого после окончания реакции в инкубационную смесь добавляли додецилсульфат натрия до концентрации 2% для разложения комплекса ДНК — лиганд [9]. Разделение фрагментов ДНК проводили в 0,8–1% агарозном геле в трубках или горизонтальном слое при напряжении 4 В/см в течение 14 ч в буфере следующего состава: 0,04 М трис-HCl, 0,02 М CaCl_2 , 1 мМ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, pH 8,0. Фрагменты ДНК окрашивали в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в течение 30 мин и фотографировали в УФ-свете. Идентификацию фрагментов ДНК проводили по их электрофоретической подвижности в соответствии с ранее опубликованными данными [1, 17, 18]. О полном ингибировании какого-либо участка узнавания судили по полному исчезновению продуктов расщепления по данному участку ДНК на электрофоретической картине.

Спектральные характеристики использованных в работе веществ соответствовали литературным данным, λ_{max} , нм (e): актиномицин D (Reanal, Венгрия) — 445 (24 800) [24], дистамицин A (Serva, ФРГ) — 302 (30 000) [8], дистамин — 303 (31 000) [13], дистакцин-0 — 446 (24 000), дистакцин-1 — 438 (18 000), дистакцин-2 — 438 (16 000), дистакцин-3 — 438 (14 000) [14].

Авторы выражают благодарность директору Всесоюзного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов проф. В. Г. Дебатову за предоставленную возможность проведения настоящего исследования, старшим научным сотрудникам С. В. Машко, Ю. И. Козлову, В. А. Ребенцишу за помощь при проведении и обсуждении работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Поляновский О. Л., Карлышев А. В., Брага Э. А., Носиков В. В. Докл. АН СССР, 1976, т. 229, № 2, с. 500-503.
2. Носиков В. В., Брага Э. А., Поляновский О. Л. Молекулярн. биология, 1977, т. 11, № 5, с. 1079-1089.
3. Parker R. C., Watson R. M., Vinograd J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 3, p. 851-855.
4. Blakesley R. W., Dodgson J. D., Nes J. F., Wells R. D. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 20, p. 7300-7306.
5. Cannon F. C., Riedel G. E., Ausubel F. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 7, p. 2963-2967.
6. Jurgend K. A., Fanning T. G. Eur. J. Biochem., 1976, v. 67, № 2, p. 367-371.
7. Polyakovskiy O. L., Nosikov V. V., Zhuze A. L., Braga E. A., Karlyshev A. V. In: Advances Enzyme Regulat. Oxford: 1978, v. 17, p. 307-321.
8. Zimmer Ch., Reinert K. E., Luck G., Wärttert U., Löber G., Thrut H. J. Mol. Biol., 1971, v. 58, № 1, p. 329-348.
9. Müller E., Crothers D. M. J. Mol. Biol., 1968, v. 35, № 2, p. 251-290.
10. Колчинский А. М., Мурабеков А. Д., Заседаев А. С., Гурский Г. В., Гроховский С. Л., Жузе А. Л., Готтх Б. П. Молекулярн. биология, 1975, т. 9, № 1, с. 19-27.
11. Hedgpeth J., Goodman H. M., Boyer H. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 11, p. 3448-3452.
12. Endow S. A., Roberts R. J. J. Mol. Biol., 1977, v. 112, № 3, p. 521-529.
13. Глибин Е. Н., Цукерман Б. В., Гинзбург О. Ф. Ж. орган. химии, 1977, т. 13, № 10, с. 2231-2232.
14. Глибин Е. Н., Цукерман Б. В., Гинзбург О. Ф. Ж. орган. химии, 1981 т. 17, № 3, с. 657-663.
15. Глибин Е. Н., Гинзбург О. Ф., Цукерман Б. В., Кривцова М. А., Соломина З. П., Морошкина Е. В., Коробицын Л. П. Актуальные проблемы химиотерапии опухолей. Матер. Всес. совещания. Черногоровка, 1980, с. 196-199.
16. Frishman E. V., Krivtsova M. A., Moroshkina E. B. In: Symposium on Biophysics of Nucleic Acids and Nucleoproteins, Abstract. Tallin, 1981, p. 151.
17. Thomas M., Davis R. W. J. Mol. Biol., 1975, v. 91, № 3, p. 315-328.
18. Marchionni M. A., Rouja D. J. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 24, p. 9075-9081.
19. Заседаев А. С., Жузе А. Л., Циммер Х., Гроховский С. Л., Готтх Б. П. Докл. АН СССР, 1976, т. 231, № 4, с. 1006-1009.
20. Сафарян В. С., Носиков В. В., Поляновский О. Л., Макишин В. В., Степанов А. И. Докл. АН СССР, 1978, т. 238, № 3, с. 740-743.
21. Kaiser A. D., Hogness D. S. J. Mol. Biol., 1960, v. 2, № 6, p. 392-415.
22. Bour H. W., Greene P. J., Betlach M. C. In: Methods in Molecular Biology, vol. 7. DNA Replication. New York - London: Acad. Press, 1974, p. 87-111.
23. Tanaka T., Weislum B. J. Bacteriol., 1979, v. 124, № 1, p. 354-362.
24. Hollstein U. Chem. Revs, 1974, v. 74, № 6, p. 625-652.

Поступила в редакцию
25.XI.1981

INHIBITION OF THE DNA RESTRICTION BY ENDONUCLEASES IN THE PRESENCE OF ACTINOMYCIN D, DISTOMYCIN A AND ITS ANALOGS

SIZOVA I. A., GLIBIN E. N., GINZBURG O. F., TERESHIN I. M.

Lensoviet Institute of Technology, Leningrad

The digestion of bacteriophage λ cI857s7 DNA with restriction endonucleases *EcoRI* and *SmaI* in the presence of actinomycin D, distamycin A, its analogs - distamin and polyfunctional ligands-distakcins has been studied. Distamin, similarly to distamycin A, prevents the cleavage of phage λ DNA by endonuclease *EcoRI*. Actinomycin D selectively blocks the action of endonucleases *SmaI* and *EcoRI*, for the latter the cleavage is suppressed at only one site. When the *EcoRI* action is limited simultaneously by two ligands, actinomycin D and distamycin A or actinomycin D and distamin, the additivity of their action is observed for one recognition site situated at the junction of *EcoRI* fragments E and F. No additivity was found for these ligands in the DNA cleavage with endonuclease *SmaI*. In this case the extent of cleavage is decreased at the junctions of *SmaI* fragments A and B, D and C, as compared to the action of actinomycin D alone. Distakcins are nonspecific inhibitors of DNA cleavage by *EcoRI* and *SmaI*. Distakcin-0 protects the *SmaI* recognition sites and shows no blocking activity towards endonuclease *EcoRI*.