

1. ДНК-подобные дуплексы, содержащие повторы. VIII. Синтез и свойства фрагментов ДНК-субстратов эндонуклеазы рестрикции *EcoRII* / Е. С. Громова, М. Н. Виноградова, А. А. Елов и др. // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 2.— С. 370—381.
2. Interaction of *EcoRII* restriction and modification enzymes with synthetic DNA fragments. V. Study of single-strand cleavages / A. A. Yolov, E. S. Gromova, E. A. Kubareva et al. // Nucl. Acids Res.— 1985.— 13, N 24.— P. 8969—8981.
3. Interaction of *EcoRII* restriction and modification enzymes with synthetic DNA fragments. VI. The binding and cleavage of substrates containing nucleotide analogs / A. A. Yolov, M. N. Vinogradova, E. S. Gromova et al. // Ibid.— P. 8983—8998.
4. Синтез и изучение термической устойчивости олигодезоксирибонуклеотидных дуплексов со структурными аномалиями / О. И. Грязнова, Н. Г. Долиная, М. Г. Исагулянц и др. // Биоорг. химия.— 1986.— 12, № 1.— С. 124—131.
5. Narang S. A. DNA-synthesis // Tetrahedron.— 1983.— 39, N 1.— P. 3—22.
6. Chemische Synthese von Nonadeoxyribonucleotiden mit den Abgewandelten Basen Uracil, 5-Bromuracil und 5-Methylcytosin nach dem Triester Verfahren / A. Rozenthal, D. Cech, V. P. Veiko et al. // Tetrahedron Lett.— 1984.— 25, N 39.— P. 4353—4356.
7. Химические реакции в двуспиральных нуклеиновых кислотах. III. Синтез концевых инвертированных повторов IS1-элемента / З. А. Шабарова, В. П. Вейко, Н. Г. Долиная и др. // Биоорг. химия.— 1987.— 13, № 5.— С. 628—642.
8. Синтез олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 3'-концевую фосфатную группу / В. П. Вейко, Т. С. Орецкая, Е. М. Волков и др. // Химия природ. соединений.— 1984.— № 5.— С. 637—641.
9. Изменения в регламенте синтеза олигодезоксирибонуклеотидов на автоматах-синтезаторах «Виктория-2» и «Виктория-4М» / Т. С. Орецкая, Е. А. Кубарева, С. М. Грязнов и др. // Химия природ. соединений.— 1987.— № 1.— С. 153—155.
10. Chemische Synthese, Isolierung und Sequenzierung von Tetradekadesoxyribonucleotiden mit den Abgewandelten Basen 5-Fluoruracil und 5-Methylcytosin / A. Rozenthal, F. Shubert, D. Cech et al. // Biomed. Biochim. Acta.— 1985.— 44, N 10.— S. 75—83.
11. Maxam A., Gilbert W. A new method for sequencing DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1977.— 74, N 2.— P. 560—564.
12. Cremer A. B., Mikita T., Beardsley G. P. Chemical consequences of incorporation of 5-fluorouracil into DNA as studied by NMR // Biochemistry.— 1987.— 26, N 2.— P. 391—397.
13. Molecular structure of (m⁵dC-dG)₃: the role of the methyl group in 5-methyl cytosine in stabilizing ZDNA / S. Fujii, A. H.-J. Wang, G. A. van der Marel et al. // Nucl. Acids Res.— 1982.— 10, N 23.— P. 7879—7892.
14. March C., Guschlbauer W. A simple method for the computation of first neighbour frequencies of DNAs from CD spectra // Ibid.— 1978.— 5, N 6.— P. 2013—2031.
15. Shakked Z., Rabinovich D. Sequence-dependent conformation of an A-DNA double helix. The crystal structure of the octamer d(G-G-T-A-T-A-C-C) // J. Mol. Biol.— 1983.— 166, N 2.— P. 183—201.
16. Raman spectra of single crystals of r(GCG)d(CGC) and d(CCCCGGGG) as models to A DNA, their structure transitions in aqueous solution and comparison with double-helical poly(dG)-poly(dC) / L. M. Benevides, A. H.-J. Wang, A. Rich et al. // Biochemistry.— 1986.— 25, N 1.— P. 41—50.

МГУ им. М. В. Ломоносова
Гумбольдт. ун-т, Берлин

Получено 20.06.86

УДК 577.151.45

ИЗБИРАТЕЛЬНОСТЬ РЕСТРИКТАЗЫ *BspRI* В ОТНОШЕНИИ СОБСТВЕННЫХ САЙТОВ НА ДНК *

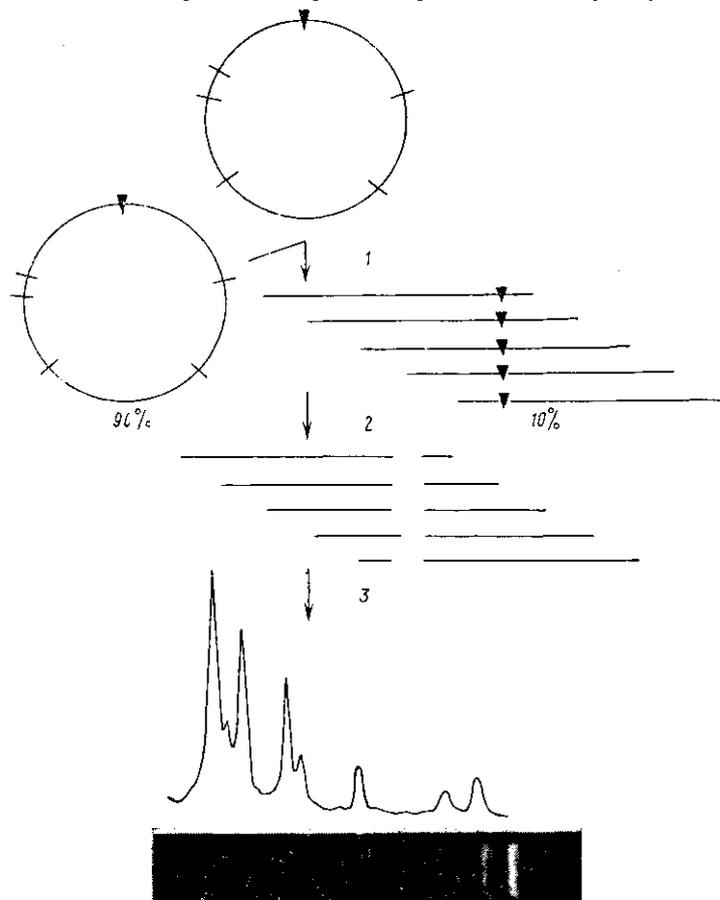
В. Р. Сагитов, А. З. Метлицкая, А. А. Александров

Введение. Для ряда рестриктаз (*HaeIII*, *HhaI* [1], *EcoRI* [2, 3], *PstI* [4], *Hinfi* [5], *HindIII* и *BamHI* [6]) показано, что скорость гидролиза ДНК в различных сайтах существенно отличается. В предельных случаях некоторые сайты полностью устойчивы к действию фермента, хотя и обладают канонической последовательностью для данной рестриктазы [7]. Причина этого явления неизвестна. Предполагают, что эффективность гидролиза ДНК определяется ближайшим окружением сайта [2]. Действительно, на олигонуклеотидах было показано, что скорость гидролиза ДНК для рестриктаз *HaeIII*, *BspRI* и *BsuRI* зависит от того,

* Представлена членом редколлегии М. Д. Франк-Каменецким.

какое основание находится около сайта [8]. Высказываются предположения о влиянии на эффективность работы рестриктазы концов ДНК [5, 6], локальной температуры плавления ДНК [8], шпильчатых структур вблизи сайта [5].

Для того чтобы изучить влияние окружающих последовательностей на эффективность разрезания ДНК, в настоящей работе были измерены относительные скорости гидролиза ряда сайтов рестрикционной эн-



Метод определения относительной скорости гидролиза сайтов *BspRI* на кольцевой ДНК: 1 — ограниченный гидролиз плазмидной ДНК рестриктазой *BspRI* — получение набора линейных пермутированных молекул; 2 — разрезание фракции линейных молекул рестриктазой, имеющей на плазмиде уникальный сайт; 3 — электрофорез полученных фрагментов ДНК на примере плазмиды *pUC19*, расщепляемой на этапе 2 рестриктазой *EcoRI*. Поперечными черточками обозначены сайты *BspRI*, треугольником — уникальный сайт какой-либо рестриктазы на этой плазмиде

Measurement of relative hydrolysis rate (k_{cat}/K_m) of *BspRI* sites on circular DNA: 1 — the limited hydrolysis of plasmid DNA by *BspRI* restrictase for obtaining a set of linear permuted molecules; 2 — cleavage of linear molecules by the restrictase with a unique site on this DNA; 3 — electrophoresis of the obtained DNA fragments through the example of *pUC19* plasmid cleaved by *EcoRI* at stage 2. Cross bars and triangle denote *BspRI* sites and unique site, respectively.

донуклеазы *BspRI* (узнаваемая последовательность — GGCC) на плаزمидах с известной нуклеотидной последовательностью (*pBR322*, *pUC19* и *pAO3*) и сделана попытка выявить на ДНК особенности, определяющие различия в значении этих величин.

Материалы и методы. Относительные скорости гидролиза различных сайтов определяли методом, сходным с предложенным в [9] способом построения рестрикционных карт на кольцевой ДНК (рисунок). На первом этапе проводили ограниченное расщепление плазмидной ДНК рестриктазой *BspRI*. Реакцию останавливали в тот момент, когда около 10% ДНК перешло в линейную форму (рисунок, 1-й этап). Линсаризация

может происходить по любому из сайтов *BspRI*. Поскольку убыванием субстрата в ходе реакции можно пренебречь, доля молекул, линсаризованных по данному сайту, пропорциональна константе скорости гидролиза ДНК в этом месте. Различные сайты на одной молекуле ДНК можно рассматривать как конкурирующие субстраты ферментативной реакции, присутствующие в равных концентрациях, поэтому относительные константы скорости реакции для каждого сайта, выраженные в терминах ферментативной кинетики, равны k_{cat}/K_m [10]. Разрезав фракцию линсаризованной ДНК рестриктазой, имеющей в плазмиде уникальный сайт (рисунок, 2-й этап), и разделив полученные фрагменты электрофорезом (3-й этап), можно по интенсивности соответствующих полос определить вероятности линсаризации плазмиды по индивидуальным сайтам *BspRI*, а значит, и относительные скорости разрезания для этих сайтов. Аналогичным образом можно определить константы скорости гидролиза сайтов на линейной ДНК.

В работе использовали рестрикционные эндонуклеазы *EcoRI*, *PstI* и *SalGI* производства ИПО «Фермент» (Вильнюс). Гомогенный препарат рестриктазы *BspRI* выделяли по [11] с модификациями. Выделение плазмидной ДНК, обработку рестриктазами *SalGI*, *EcoRI* и *PstI*, а также электрофорез в агарозном геле проводили по общепринятым методикам [12]. Ограниченный гидролиз плазмидной ДНК рестриктазой *BspRI* проводили в условиях, описанных в [11]. Формы плазмидной ДНК разделяли электрофорезом в агарозе. Линейную форму выделяли из геля (рисунок, 1-й этап) фенольной экстракцией. После электрофоретического разделения продуктов вторичной рестрикции (2-й этап) гель фотографировали в УФ-свете на пленку «Микрат-300», которую затем денситометрировали на микроденситометре ИФО-451. Относительную молярную концентрацию продуктов вторичного гидролиза рассчитывали, разделив площадь соответствующего пика денситограммы на длину фрагмента.

Результаты и обсуждение. В таблице представлены величины $K = k_{cat}/K_m$, характеризующие относительную скорость гидролиза, и нуклеотидные последовательности окружения для 15 сайтов *BspRI* плазмид *pBR322* и *pUC19*. Значения констант вычисляли отдельно в опытах с использованием рестриктаз *EcoRI*, *PstI* и *SalGI* на 2-м этапе (рисунок). По условиям эксперимента можно определить только относительные значения k_{cat}/K_m в каждом опыте. Однако, поскольку для некоторых сайтов константы были измерены независимо с помощью разных рестриктаз, а плаزمида *pUC19* имеет область гомологии с *pBR322*, оказалось возможным пронормировать значения констант из разных опытов на максимально полученное значение K . Приведенные в таблице величины представляют собой среднее из трех или более измерений. Расхождение между результатами разных опытов не превышало 30 %.

Как видно из таблицы, значения k_{cat}/K_m различаются для разных сайтов более чем в 10 раз. Такую избирательность нельзя в нашем случае объяснить влиянием концов ДНК или шпилечных структур, как предполагается некоторыми авторами [5, 6], поскольку эксперименты проводились на кольцевой суперскрученной ДНК, а потенциальных шпилек вблизи *BspRI* сайтов *pBR322* нами найдено не было. Наиболее правдоподобным кажется предположение о зависимости эффективности гидролиза сайта от ближайшего нуклеотидного окружения. Косвенным подтверждением этого является сходство нуклеотидных последовательностей вокруг двух самых «хороших» (с высокой скоростью гидролиза), а также двух самых «плохих» (с низкой скоростью гидролиза) сайтов (таблица). В обоих случаях идентичны шесть из 10 нуклеотидов.

Какие же особенности нуклеотидного окружения отличают «хорошие» сайты от «плохих»? Прежде всего, во всех случаях, когда $K > 0,3$, в 5'-положении рядом с сайтом хотя бы с одной стороны находится Т, причем если $K > 0,5$, перед сайтом стоит РuТ (обычно в составе мотива СРuТ), в то время как в сайтах с $K < 0,3$ в этом положении Т не встречается ни разу. Кроме того, пяти сайтам из шести с $K < 0,3$ хотя бы с одной стороны предшествует пара РuРu. В самом «плохом» сайте пуриновые блоки находятся с обеих сторон, а в случаях с $K > 0,5$ не встречаются ни разу. Наконец, в «хороших» сайтах ($K > 0,5$) ни разу не встречается аденин в —3-м положении относительно сайта, в то время

как в четырех из шести «плохих» он встречается пять раз. Таким образом, прослеживаются два типа особенностей нуклеотидного окружения сайта. Первый тип — это последовательность СРuТ (или РуТ) в 5'-положении, характерная для «хороших» сайтов ($K > 0,5$), и просто Т рядом с сайтом ($K > 0,3$). Второй тип — это пара РуРу с 5'-стороны и А в —3-м положении, характерные для «плохих» сайтов ($K < 0,3$), но

Значения констант скорости гидролиза сайтов *BspRI*
The values of relative hydrolysis rate constants for *BspRI* sites

Положение сайта на последовательности	Рестриктаза, которой проводился вторичный гидролиз	Относительная скорость гидролиза сайта, k_{cat}/K_m	Нуклеотидная последовательность в окрестности сайта
<i>pBR322</i>			
1949	<i>EcoRI</i>	1,00	AACAT GGCC CCGG GCGAA
1048	<i>EcoRI</i>	0,87	TGCA GGCC CCGG TACGA
1445	<i>EcoRI, PstI</i>	0,83	GTCCT GGCC CCGG TGCC
2952	<i>EcoRI, PstI, SalGI, EcoRI</i> на <i>pUC19</i>	0,57	GTGGT GGCC CCGG ATTGA
401	<i>PstI</i>	0,54	ATCGT GGCC CCGG CCGTA
991	<i>EcoRI</i>	0,39	TGGAT GGCC CCGG aaGGG
646(<i>pUC19</i>)	<i>EcoRI</i> на <i>pUC19</i>	0,37	CAaTC GGCC CCGG TTGGC
3757	<i>EcoRI</i> на <i>pUC19</i>	0,33	AAGTT GGCC CCGG CGTCA
3410	<i>SalGI, EcoRI</i> на <i>pUC19</i>	0,33	CATCT GGCC CCGG ggTCA
1261	<i>EcoRI, PstI</i>	0,30	AGCCG GGCC CCGG TGGAG
174	<i>PstI</i>	0,28	CTGCC GGCC CCGG gaGAA
830	<i>EcoRI, PstI</i>	0,28	TGaTC GGCC CCGG ACaGC
596	<i>PstI</i>	0,14	TCaAC GGCC CCGG agTTG
3490	<i>SalGI, EcoRI, EcoRI</i> на <i>pUC19</i>	0,11	GGaag GGCC CCGG CTCGC
4344	<i>PstI</i>	0,07	CACga GGCC CCGG gaaAG
<i>pAO3</i>			
838	<i>EcoRI</i>	1,00	GTaGT GGCC CCGG GCTGA
1251	<i>EcoRI</i>	0,86	TATTT GGCC CCGG ACaTG
402	<i>EcoRI</i>	0,65	AAGaa GGCC CCGG TGCA
359	<i>EcoRI</i>	0,28	GATaa GGCC CCGG CCTTT

Примечание. Поскольку измеряли относительные значения констант, сравнивать величины, полученные на *pBR322* и *pUC19* с величинами для *pAO3* нельзя. Положения сайтов на последовательности плазмид даны в соответствии с нумерацией, принятой в оригинальных работах [13—15], причем для сайтов из области гомологии между плазмидами *pBR322* и *pUC19* положения приведены для *pBR322*. Фланкирующие нуклеотидные последовательности приведены только с 5'-стороны от сайта. Особенности окружения, характерные для сайтов с высокими скоростями гидролиза, выделены, для сайтов с низкими скоростями — обозначены строчными буквами.

в сочетании с особенностями первого типа встречающиеся вплоть до $K=0,5$.

На основании выведенных закономерностей мы попытались, исходя из нуклеотидной последовательности, расположить четыре *BspRI*-сайта плазмиды *pAO3* в порядке убывания k_{cat}/K_m , а затем определили относительные значения констант экспериментально (таблица). На этой плазмиде лишь один сайт (359) не имеет особенностей первого типа, но он фланкирован с одной стороны парой PuPu и должен быть типичным «плохим» сайтом с низким значением K . Три оставшихся сайта, обладая особенностями обоих типов, должны иметь среднее значение K , причем сайт 838 должен быть «лучше», чем 1251, так как в первом случае в 5'-положении находится PuT, а во втором — T. Положение в этой иерархии сайта 402 неясно, он может занимать места от 1-го до 3-го. Как видно из таблицы, экспериментальные данные согласуются с нашими предположениями. Правда, различия между сайтами 838 и 1251 находятся в пределах ошибки эксперимента. Аналогичные результаты были получены на линейной ДНК плазмиды *pAO3*, что свидетельствует о независимости избирательности *BspRI* от сверхспирализации ДНК.

Найденные нами закономерности несколько расходятся с результатами работы [8], в которой на палиндромных олигонуклеотидах типа TTNGGCCNAA показано, что рестриктаза предпочитает рядом с сайтом А, а не Т. Это несоответствие можно объяснить тем, что по условиям эксперимента цитируемой статьи невозможно определить, чему равна измеряемая скорость реакции — k_{cat}/K_m , k_{cat} или промежуточному выражению из уравнения Михаэлиса — Ментен. Другие возможные причины расхождения — конкретная последовательность использованных в [8] олигонуклеотидов или различная избирательность рестриктазы на олигонуклеотидах и длиной ДНК.

Ближайшее окружение может влиять на эффективность сайта по крайней мере двумя способами — во-первых, путем непосредственных контактов фермента с функциональными группами оснований в окрестности сайта, во-вторых — за счет структурных изменений ДНК в комплексе с белком. В случае рестриктазы *EcoRI*, по-видимому, реализуется вторая возможность [16, 17]. Наши данные не позволяют однозначно сделать выбор между этими двумя альтернативами. Однако рядом с «плохим» сайтом расположен полипуриновый блок (вместе с двумя G сайта), а рядом с «хорошим» — последовательность чередующихся пуринов и пиримидинов. По современным представлениям, структурные параметры двойной спирали в последовательностях PuPu, PuPu и PuPu сильно различаются [18]. Поэтому мы считаем для *BspRI* более вероятной вторую возможность. Об этом свидетельствует и тот факт, что пурип в положении —2 характерен и для «плохих», и для «хороших» сайтов, что трудно объяснить прямыми контактами белка с этим основанием.

К сожалению, среди изученных нами сайтов не попались фланкированные мотивом CPuT с обеих сторон, а также не обладающие никакими из перечисленных особенностей. Далее мы планируем проверку обнаруженных закономерностей на синтетических олигонуклеотидах.

Авторы благодарят Л. С. Зарицкую за ценные советы и помощь в работе и А. С. Боровика за обсуждение результатов.

PREFERENCE OF *BspRI* RESTRICTASE AS TO THE PROPER SITES ON DNA

V. R. Sagitov, A. Z. Mellitskaya, A. A. Aleksandrov

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

Relative hydrolysis rates are measured for 15 *BspRI* sites (GGCC) on *pBR322* and *pUC19* plasmids and for 4 sites on *pAO3* plasmid. Some features of nucleotide sequences in 5'-direction from the site have been found: the sequence CPuT or its part PuT adjacent

to the site with high hydrolysis rate; PuPu pair in —1-2 position and/or A in —3 position relative to the boundary of sites with low hydrolysis rate; some combinations of these features, but T always in —1 position for sites with intermediate rates. Relative hydrolysis rates of sites are the same for supercoiled and linear DNAs. An attempt is made to explain these results in terms of peculiarities of local DNA structure near the restriction site.

1. Drew H. R., Travers A. A. Structural functions in DNA: the influence of flanking sequence on nuclease digestion specificities // Nucl. Acids Res.—1985.—13, N 12.— P. 4445—4467.
2. Thomas M., Davis R. W. Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with *EcoRI* restriction endonuclease // J. Mol. Biol.—1975.—91, N 3.— P. 315—328.
3. Kinetic studies on the cleavage of adenovirus DNA by restriction endonuclease *EcoRI* / S. Forsblom, R. Rigler, M. Ehrenberg et al. // Nucl. Acids Res.—1976.—3, N 12.— P. 3255—3269.
4. Armstrong K., Bauer W. R. Preferential site-dependent cleavage by restriction endonuclease *PstI* // Ibid.—1982.—10, N 3.— P. 993—1007.
5. Armstrong K., Bauer W. R. Site-dependent cleavage of *pBR322* DNA by restriction endonuclease *HinfI* // Ibid.—1983.—11, N 12.— P. 4109—4126.
6. Nath K., Azzolina B. A. Cleavage properties of site-specific restriction endonucleases // Gene amplification and analysis / Ed. J. G. Chirikjan.—Amsterdam: Elsevier, 1981.— Vol. 1.— P. 113—130.
7. Gingeras T. R., Brooks J. E. Cloned restriction / modification system from *Pseudomonas aeruginosa* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80, N 1.— P. 402—406.
8. Wolfes H., Fliess A., Pingond A. A comparison of the structural requirements for DNA cleavage by the isoschizomers *HaeIII*, *BspRI* and *BsuRI* // Eur. J. Biochem.—1985.—150, N 1.— P. 105—110.
9. Parker R. C., Watson R. M., Vinograd J. Mapping of closed circular DNAs by cleavage with restriction endonucleases and calibration by agarose gel electrophoresis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74, N 3.— P. 851—855.
10. Фершт А. Структура и механизм действия ферментов.— М.: Мир, 1980.— 432 с.
11. Konec S., Kiss A., Venetianer P. Biochemical characterization of the restriction-modification system of *Bacillus sphaericus* // Eur. J. Biochem.—1978.—89, N 2.— P. 523—529.
12. Маниатис Т., Фриш Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1980.— 479 с.
13. Sutcliffe J. G. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid *pBR322* // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1979.—43.— P. 77—90.
14. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved *M13* phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the *M13mp18* and *pUC19* vectors // Gene.—1985.—33, N 1.— P. 103—109.
15. Nucleotide sequence of small *ColEI* derivatives: structure of the regions essential for autonomous replication and colicin EI immunity / A. Oka, N. Nomura, M. Morita et al. // Mol. and Gen. Genet.—1979.—172, N 2.— P. 151—159.
16. Lu A.-L., Jack W. E., Modrich P. DNA determinants important in sequence recognition by *EcoRI* endonuclease // J. Biol. Chem.—1981.—256, N 24.— P. 13200—13206.
17. Kinked DNA in crystalline complex with *EcoRI* endonuclease / C. A. Frederick, J. Grable, M. Melia et al. // Nature.—1984.—309, N 5966.— P. 327—331.
18. Kalladine C. R. Mechanics of sequence-dependent stacking of bases in B-DNA // J. Mol. Biol.—1982.—161, N 2.— P. 343—352.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 14.01.87

УДК 577.2

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛИЦИНА И ЕГО МЕТИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ С ОСНОВАНИЯМИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПО ДАННЫМ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

В. И. Брусков, В. И. Кутышенко

Введение. Исследование взаимодействия мономерных компонентов белков и нуклеиновых кислот представляет интерес как один из подходов, позволяющих вычлениить и оценить роль отдельных элементарных взаимодействий, лежащих в основе образования специфических белково-нуклеиновых комплексов. Результаты, полученные в таких модельных исследованиях, обобщены в обзорах [1, 2].