

НОВАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА РЕСТРИКЦИИ PspXI УЗНАЕТ НЕОБЫЧНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК 5'-VCTCGAGB-3'

Д.А. ГОНЧАР*, М.А. АБДУРАШИТОВ, О.А. БЕЛИЧЕНКО, В.С. ДЕДКОВ, Н.В. МЕЗЕНЦЕВА, Ю.Э. ТОМИЛОВА, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Нами обнаружен бактериальный штамм *Pseudomonas species X11*, который является продуцентом новой эндонуклеазы рестрикции, названной PspXI. Этот фермент узнает восьминуклеотидную последовательность ДНК с необычным, V-B типом вырожденности: 5'-VCTCGAGB-3', где V означает А, С или G, а B означает Т, С или G. Препарат эндонуклеазы рестрикции PspXI с концентрацией 10000 ед/мл был получен путем очистки в четыре хроматографические стадии. Показано, что PspXI гидролизует сайт узнавания между С и Т, с образованием 5'-выступающих «липких» концов, совместимых с концами, образующимися при гидролизе ДНК эндонуклеазами рестрикции XhoI (5'-C[^]TCGAG-3') и SalI (5'-G[^]TCGAC-3').

Ключевые слова: рестриктазы, эндонуклеаза, ДНК.

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы, ЭР) входят в состав бактериальных систем рестрикции-модификации. Наиболее изученными являются рестриктазы второго типа, так как эти ферменты повсеместно распространены и нашли широкое применение в исследованиях в области биотехнологии и молекулярной биологии, таких как клонирование генов, сайт-направленный мутагенез, рестрикционное картирование, ДНК-диагностика и так далее. Эндонуклеазы рестрикции второго типа узнают короткие, обычно от четырех до восьми пар нуклеотидов, последовательности в двуцепочечной ДНК и специфически гидролизуют ее либо внутри сайта узнавания, либо на фиксированном расстоянии недалеко от этого сайта. К настоящему времени показано существование более 250 различных сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции, но только 27 из них представляют собой нуклеотидную последовательность, состоящую из более чем шести пар нуклеотидов [1].

Данная работа посвящена изучению новой эндонуклеазы рестрикции PspXI, выделенной из бактериального штамма *Pseudomonas species X11*. Рестриктаза PspXI узнает восьминуклеотидную последовательность ДНК с необычным, V-B типом вырожденности сайта узнавания.

* Автор для переписки:

Гончар Д.А.,

сотрудник НПО «СибЭнзим»

Адрес: 630117 Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2

E-mail: gonchar@sibenzyme.ru

Материалы и методы

В работе использовались реактивы производства «Sigma» (США), «Serva» (Германия), «ICN» (США) и «Хеликон» (Россия). Для хроматографической очистки фермента применялись следующие носители: фосфоцеллюлоза P11 и ДЭАЭ-целлюлоза DE52 («Whatman», Великобритания), гепарин-сефароза («Sigma», США), гидроксипатит (BioRad, США). Для выращивания бактериальных клеток использовались компоненты питательной среды фирмы «Organotechnie» (Франция).

Для экспериментов брали эндонуклеазы рестрикции, полинуклеотидкиназу фага Т4 и препараты фаговых ДНК производства НПО «СибЭнзим» (Россия).

Морфологические и физико-биохимические свойства штамма изучали с использованием методик [2]. Определение вида микроорганизма проводили по определителю Берджи [3].

Выделение плазмидных ДНК pBluescriptSK(+) [4], pMTL22 [5], pSse9/1 [6], pMT440 [7] и pCPV13 [8] осуществляли с использованием наборов «QIAGEN GmbH» (Германия) согласно протоколам производителя.

Для определения места гидролиза межнуклеотидных связей использовали [гамма-³²P]-меченные ДНК-дуплексы. Исходные олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в НПО «СибЭнзим» (Россия)

и метились с помощью Т4-полинуклеотидкиназы. Для разделения продуктов ферментативного гидролиза меченых олигонуклеотидов применяли электрофорез в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

Определение нуклеотидной последовательности ДНК осуществляли методом Сенгера на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США) согласно протоколам производителя.

Выращивание клеток штамма *P. species X11*. Клетки штамма *Pseudomonas species X11* выращивались при 30 °С в 20-литровом ферментере («New Brunswick Scientific», США) в питательной среде LB (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl, (рН 7,6)) с добавлением 0,1% MgSO₄ и 0,001% тиамина (В1). Культура росла в течение 5 часов с аэрацией воздухом 10 л/мин и перемешиванием при 200 об/мин до оптической плотности A550=4. Клетки собирались центрифугированием при 3000 g в течение 30 мин на центрифуге «Beckman» (США). Биомасса хранилась при -20 °С.

Тестирование рестриктазной активности *PspXI*. Для тестирования активности рестриктазы *PspXI* в клетках 1 мл выросшей культуры переносили в 1,5 мл пробирки «Eppendorf» и центрифугировали при 5000 g в течение 2 мин на микроцентрифуге «Eppendorf 5804» (Германия). Осадок суспендировали в 180 мкл воды, и готовили грубый лизат клеток по методу, описанному ранее [9]. Затем аликвоту грубого лизата 5 мкл добавляли к 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг субстрата в реакционном буфере, и ставили серию разведений в 4 и 16 раз. Смесь инкубировали в термостате на 37 °С в течение 1 ч. Продукты реакции наносили на 0,8% агарозный гель и проводили электрофорез в Трис-ацетатном буфере (50 mM Трис-ацетат (рН 8,0), 20 mM Na-ацетат, 2 mM ЭДТА) при напряжении 120 V. После окрашивания бромистым этидием гель фотографировали в УФ-свете. В качестве субстрата для анализа рестриктазной активности использовали ДНК фага лямбда, гидролизованную эндонуклеазой рестрикции HindIII. При тестировании активности ЭР *PspXI* в хроматографическом профиле аликвоты по 1 мкл из фракций добавляли к 20 мкл реакционной смеси, инкубировали 10 мин при 37 °С и проводили электрофорез.

Очистка препарата фермента ЭР *PspXI*. Все стадии очистки фермента проводили при 4 °С или на льду. Замороженную биомассу суспендировали в 400 мл буфера «А» (10 mM Трис-HCl (рН 7,5), 0,1 mM ЭДТА, 7 mM 2-меркаптоэтанол). Клетки разрушали ультразвуком на дезинтеграторе Soniprep 150 («MSE»,

Великобритания) двадцатью 1 минутными импульсами с 1 минутными интервалами. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 12000 g в течение 30 мин на центрифуге «Beckman». Препарат фермента ЭР *PspXI* получали из супернатанта с использованием четырех хроматографических стадий: 100 мл фосфоцеллюлозы (колонка 4,5 x 15 см); 30 мл ДЭАЭ-целлюлозы (колонка 2,5x9 см); 7 мл гепарин-сефарозы (колонка 1,6x8,5 см) и 5 мл гидроксиапатита (колонка 1,6x8,5 см). На первых трех стадиях элюцию фермента проводили линейным градиентом концентрации KCl (0,2–1 М) в буфере «А». При очистке на гидроксиапатите использовали К-фосфатный буфер «Б» (10 mM К-фосфат (рН 7,5), 0,1 mM ЭДТА, 7 mM 2-меркаптоэтанол) с добавлением 0,2 М KCl. Фермент вымывали линейным градиентом концентрации К-фосфата (0,01–0,1 М) в буфере «Б» с 0,2 М KCl.

Затем эндонуклеазу рестрикции концентрировали диализом против буфера «А», содержащего 0,2 М KCl и 50% глицерин. Препарат ЭР *PspXI* хранили при -20 °С. За одну единицу активности принимали количество фермента, необходимое для исчерпывающего расщепления 1 мкг ДНК фага лямбда, обработанной ЭР HindIII в 50 мкл реакционной смеси за 1 ч при 37 °С.

Результаты и обсуждение

Штамм, определенный нами как *Pseudomonas species X11*, был выделен из пробы пресной воды в ходе поиска микроорганизмов — продуцентов эндонуклеаз рестрикции. Обнаруженный фермент был назван *PspXI* согласно общепринятой номенклатуре.

В результате наработки культуры клеток штамма *P. species X11* было получено 114 г биомассы с эндонуклеазной активностью 5000 ед/г. После хроматографической очистки из данного количества биомассы было получено 12 мл препарата эндонуклеазы рестрикции *PspXI* с концентрацией 10000 ед/мл.

Оптимальными условиями для работы фермента оказались SE-буфер 5 (Y) (33 mM Трис-ацетат (рН 7,9), 10 mM Mg-ацетат, 66 mM К-ацетат, 1 mM ДТТ) и температура 37 °С (данные не приведены). Полная инактивация ЭР *PspXI* в реакционной смеси происходила при нагревании до 80 °С за 20 мин.

Определение специфичности рестриктазы *PspXI* проводили, используя в качестве субстрата ДНК фага лямбда и плазмиды pBluescriptSK(+) (pBS). На рисунке 1а приведены картины гидролиза этих ДНК эндонуклеазами рестрикции Sfr274I [10] и *PspXI* по

отдельности и совместно. Так как фермент Sfr274I имеет на ДНК лямбда всего один сайт узнавания (в позиции 33498) и образует при гидролизе высокомолекулярные фрагменты, трудно разделяемые электрофорезом в агарозном геле, то мы использовали в качестве субстрата гидролизат ДНК фага лямбда рестриктазой HindIII (вторая дорожка после маркера). При этом после обработки этого субстрата рестриктазой Sfr274I образуется один дополнительный фрагмент 3397 п.н. (дорожка 3), который хорошо заметен на геле. ЭР PspXI при обработке этого же самого субстрата дает абсолютно такой же набор фрагментов ДНК, что и Sfr274I (дорожка 4). А при совместном гидролизе ДНК лямбда/HindIII этими двумя рестриктазами картина никак не меняется (дорожка 5). То же самое можно сказать о плазмиде рBS. Ее обработка эндонуклеазой рестрикции Sfr274I приводит к образованию линейной формы (дорожка 7), поскольку фермент имеет один сайт узнавания на этой плазмиде (в позиции 667). Рестриктаза PspXI дает точно такую же картину гидролиза (дорожка 8),

а совместный гидролиз рестриктазами Sfr274I и PspXI не приводит к появлению каких-либо дополнительных фрагментов (дорожка 9).

В то же время на рисунке 16 представлены результаты гидролиза этими эндонуклеазами рестрикции таких субстратов, как ДНК аденовируса типа 2 (Ad2, GenBank асс. по. AC_000007) и плазмиды рMTL22 [5]. ЭР Sfr274I имеет на ДНК Ad2 шесть сайтов узнавания (в позициях 5777, 8243, 9688, 19330, 23923, 29787) и дает в результате ее расщепления характерную специфическую картину (дорожка 2). В то время как рестриктаза PspXI имеет только три сайта узнавания на этой ДНК (в позициях 5777, 8243 и 29787) и дает соответственно набор более крупных фрагментов (дорожка 3). А при совместном гидролизе картина, характерная для Sfr274I, восстанавливается (дорожка 4). При гидролизе ЭР Sfr274I плазмиды рMTL22 (имеет один сайт узнавания XhoI в позиции 176) происходит образование линейной формы (дорожка 6), а эндонуклеаза рестрикции PspXI не расщепляет данный субстрат (дорожка 7).

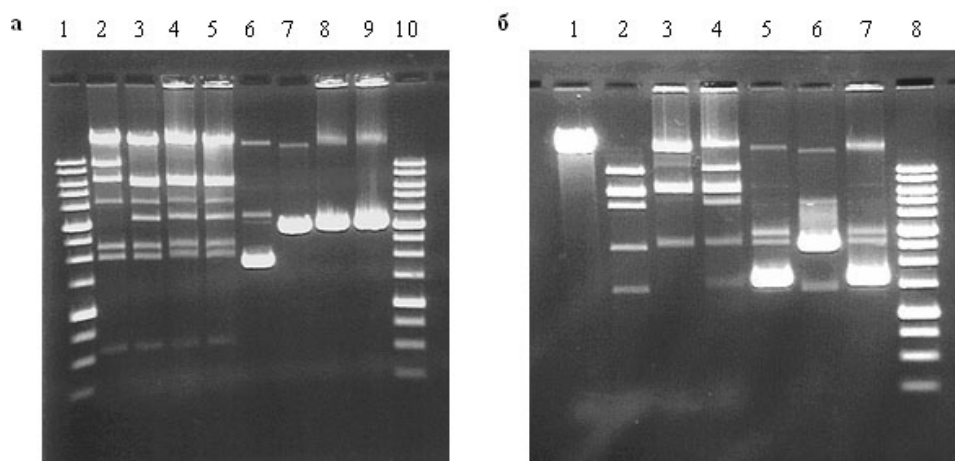


Рис. 1. Расщепление различных ДНК эндонуклеазами рестрикции PspXI и Sfr274I

- а. Гидролиз ДНК фага лямбда и рBS. ДНК лямбда/HindIII (дор. 2); лямбда/HindIII, обработанная Sfr274I (дор. 3); лямбда/HindIII, обработанная PspXI (дор. 4); лямбда/HindIII, обработанная Sfr274I и PspXI (дор. 5). ДНК плазмиды рBS (дор. 6); рBS, обработанная Sfr274I (дор. 7); рBS, обработанная PspXI (дор. 8); рBS, обработанная Sfr274I и PspXI (дор. 9); 0,25-10 kb ДНК-маркеры молекулярного веса (дор. 1 и 10). Продукты расщепления разделены в 0,8% агарозном геле.
- б. Гидролиз ДНК Ad2 и рMTL22. ДНК Ad2 (дор. 1); Ad2, обработанная Sfr274I (дор. 2); Ad2, обработанная PspXI (дор. 3); Ad2, обработанная Sfr274I и PspXI (дор. 4). ДНК рMTL22 (дор. 5); рMTL22, обработанная Sfr274I (дор. 6); рMTL22, обработанная PspXI (дор. 7); 0,25-10 kb ДНК-маркеры молекулярной массы (дор. 8). Продукты расщепления разделены в 0,8% агарозном геле.

Таким образом, можно предположить, что сайт узнавания ЭР PspXI перекрывается с последовательностью узнавания рестриктазы Sfr274I - 5'-CTCGAG-3'. Однако при этом не все сайты узнавания ЭР Sfr274I расщепляются новым ферментом, то есть гидролиз, по-

видимому, зависит от того, какие нуклеотиды окружают последовательность 5'-CTCGAG-3'.

Анализ полученных картин расщепления позволяет заключить, что, по-видимому, сайт CTCGAG не узнается рестриктазой PspXI в том случае, если перед ним с 5'-

**Последовательности ДНК, которые расщепляются
или не расщепляются эндонуклеазой рестрикции PspXI**

Расщепляются	Не расщепляются
5'- GCTCGAGT -3' 3'-CGAGCTCA-5' (pSse9/1-1651)	5'-GCTCGAGA-3' 3'-CGAGCTCT-5' (Ad2-19330)
5'- CCTCGAGT -3' 3'-GGAGCTCA-5' (Ad2-29787; λ-33497)	5'-CCTCGAGA-3' 3'-GGAGCTCT-5' (pCPV13-433)
5'- CCTCGAGC -3' 3'-GGAGCTCG-5' (Ad2-5777 и 8243)	5'-ACTCGAGA-3' 3'-TGAGCTCT-5' (Ad2-23923)
5'- ACTCGAGT -3' 3'-TGAGCTCA-5' (pCPV13-5831)	5'-TCTCGAGA-3' 3'-AGAGCTCT-5' (Ad2-9688)
5'- CCTCGAGG -3' 3'-GGAGCTCC-5' (pBS-667)	
5'- GCTCGAGC -3' 3'-CGAGCTCG-5' (pMT440-13)	

Примечание. Нуклеотиды, окружающие внутренний сайт CTCTGAG, выделены жирным шрифтом. Названия ДНК-субстратов и позиции сайтов показаны в скобках

конца находится тимин, либо после него с 3'-конца стоит аденин. Для проверки этого предположения нами были использованы несколько дополнительных субстратов, содержащих недостающие варианты последовательности. В таблице 1 приведены все возможные варианты такого окружения (соответствующие нуклеотиды выделены жирным шрифтом), причем в правой части таблицы приведены те последовательности, которые не должны гидролизоваться эндонуклеазой рестрикции PspXI, а в левом столбце перечислены те последовательности, которые могут расщепляться данным ферментом. Так как не все последовательности являются палиндромными, то в таблице приведены обе цепи ДНК.

Мы проверили возможность гидролиза всех недостающих комбинаций нуклеотидов, окружающих сайт узнавания ЭР Sfr274I, путем расщепления ЭР PspXI плазмид: pSse9/1, несущей ген ДНК-метилтрансферазы M.Sse9I, pMT440 и плазмиды pCPV13, которая содержит фрагмент 1999161-209975 ДНК вируса оспы коров (GenBank acc. no. X94355, [8]). Оказалось, что все эти субстраты расщепляются ЭР PspXI, и, следовательно, PspXI действительно не расщепляет те последовательности ДНК, в которых перед сайтом CTCTGAG стоит Т или после него соответственно А. Таким образом, можно сделать вывод, что сайт узнавания новой эндонуклеазы рестрикции PspXI является восьминуклеотидным, с вырождением по краям, то есть 5'-VCTCGAGB-3', где

«V» означает А, С или G, а «B» означает С, G или Т согласно общепринятой номенклатуре.

Чтобы определить место гидролиза ДНК новым ферментом, мы использовали два радиоактивно-меченных с 5'-конца олигонуклеотидных дуплекса C1 и C2. Верхняя цепь дуплекса C1 содержала последовательность ACTCGAGA, и он не должен был расщепляться рестриктазой PspXI. Верхняя цепь дуплекса C2 содержала последовательность CCTCGAGT, и поэтому данный дуплекс должен был гидролизоваться исследуемым ферментом. После инкубации ферментов PspXI и Sfr274I с олигонуклеотидами аликвоты реакционной смеси подвергались электрофорезу в 20% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. На рисунке 2 приведены полученные радиоавтографы гелей. Видно, что PspXI расщепляет дуплекс C2, но не C1, причем продукты гидролиза дуплекса C2 рестриктазами Sfr274I и PspXI идут на одном и том же уровне; следовательно, их позиции расщепления ДНК совпадают.

Таким образом, новый фермент расщепляет ДНК между цитозином и тиминном, образуя 5'-выступающие четырехнуклеотидные концы, которые аналогичны концам, образующимся при гидролизе ДНК рестриктазой Sfr274I или XhoI (5'-C[^]TCTGAG-3').

Место расщепления ДНК новой эндонуклеазой рестрикции было подтверждено еще одним способом. Как уже отмечалось, ДНК pBluescriptSK(+) имеет

один сайт узнавания ЭР PspXI. С помощью автоматического секвенатора нами была определена нуклеотидная последовательность участка pBS, содержащего этот сайт в исходной ДНК, и в ДНК, которая предварительно была обработана рестриктазой PspXI (рис. 3). На рисунке видно, что происходит обрыв цепи, причем, поскольку полимеразы достраивала верхнюю цепь, то точка обрыва последовательности

расщепляет последовательность 5'-TCTCGAG-3', независимо от нуклеотида, находящегося перед этой последовательностью. Кроме того, согласно базе данных по ферментам рестрикции-модификации, REBASE [1], эндонуклеаза рестрикции PspXI является единственной к настоящему моменту известной рестриктазой, которая узнает последовательность с тройным, V-B типом вырождения. Мы также полагаем, что ЭР PspXI может рассматриваться с эволюционной точки зрения как возможное промежуточное звено между ферментами, узнающими шести- и восьминуклеотидные последовательности ДНК. Новый фермент, несомненно, является перспективным для биотехнологии, так как может использоваться при клонировании совместно с широко известными ЭР XhoI и SalI, а также может найти применение для крупноблочной фрагментации ДНК.

Благодарности. Авторы благодарят Владимира Баймака за техническую помощь в экспериментальной работе, а также к.б.н. Алексея Гордадзе за помощь в написании статьи.

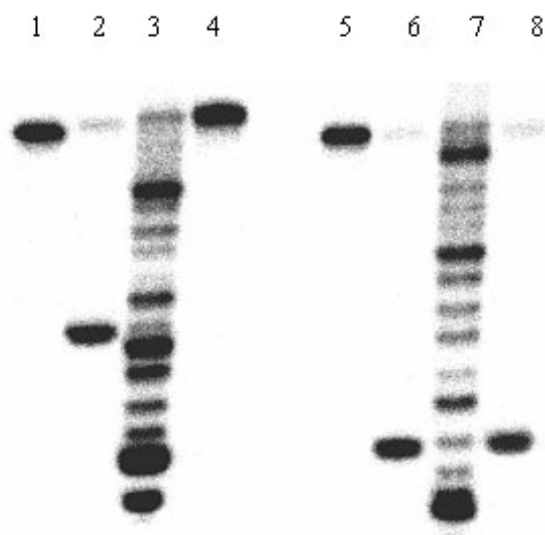


Рис. 2. Определение позиции расщепления ДНК эндонуклеазой рестрикции PspXI с использованием [гамма-³²P]-меченных олигонуклеотидных дуплексов.

Верхняя меченая цепь дуплекса C1 - 5'-CCAGGTGAAGACTCGAGACCACG -3' (дор. 1–4),

а верхняя цепь дуплекса C2 - 5'-

GCATGCCCTCGAGTGATCGCA -3' (дор. 5–8).

Дорожки 1 и 5: исходные дуплексы; дорожки 2 и 6: дуплексы, обработанные Sfr274I; дорожки 4 и 8: дуплексы, обработанные PspXI; дорожки 3 и 7: маркеры, полученные исчерпывающим гидролизом тех же олигонуклеотидных дуплексов экзонуклеазой III из *E. coli*

льности соответствует месту гидролиза ферментом нижней цепи. Этот результат подтвердил ранее полученные данные, и таким образом, можно сделать вывод, что новая эндонуклеаза рестрикции PspXI гидролизует ДНК с образованием 5'-выступающих концов, которые могут быть лигированы с концами, образующимися при гидролизе такими рестриктазами, как XhoI (5'-C[^]TCGAG-3') и SalI (5'-G[^]TCGAC-3').

В заключение следует отметить, что ранее был открыт еще один необычный изоизомер рестриктазы XhoI - PaeR7I [11]. Как было показано, PaeR7I гидролизует сайт 5'-CTCGAG-3', за исключением тех случаев, когда перед ним с 5'-конца стоит динуклеотидная последовательность СТ. В отличие от этого фермента, эндонуклеаза рестрикции PspXI не

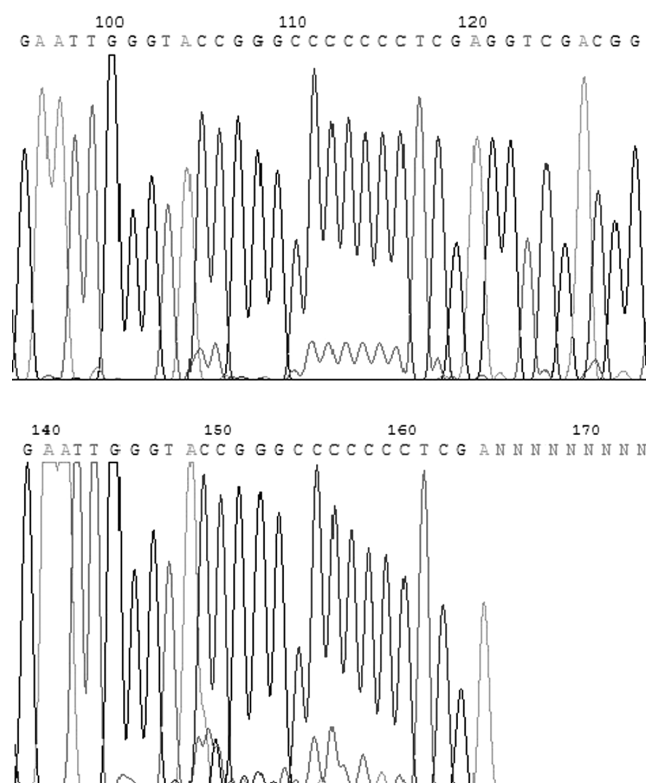


Рис. 3. Определение места расщепления ДНК эндонуклеазой рестрикции PspXI путем секвенирования участка плазмиды pBluescriptSK(+).

Верхняя хроматограмма — секвенирование района полилинкера pBS, содержащего последовательность узнавания PspXI, в исходной плазмиде. Нижняя хроматограмма — секвенирование того же района плазмиды, обработанной PspXI. Точка разрыва соответствует позиции расщепления нижней цепи

Литература

1. Roberts R.J., Vincze T., Posfai J. and Macelis D. REBASE: restriction enzymes and methyltransferases // Nucleic Acids Res. — 2003. — Vol. 31. — P. 418–420.
2. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. — М., 1995.
3. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта и др.: 9-е издание в 2-х томах. Пер. с англ. под ред. Г.А. Заварзина. — М., 1997.
4. Short J.M., Fernandez J.M., Sorge J.A. and Huse W.D. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties // Nucleic Acids Res. 1988. — Vol. 16. — P. 7583–7600.
5. Chambers S.P., Prior S.E., Barstow D.A. and Minton N.P. The pMTL nic-cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing // Gene. — 1988. — Vol. 68. — P. 139–149.
6. Gonchar D.A., Wolf Y.I. and Degtyarev S.Kh. Cloning and characterization of Sse9I DNA-methyltransferase recognizing 5'-AATT-3' // Nucleic Acids Res. — 1996. — Vol. 24. — P. 2790–2792.
7. Deyev S.M., Yazynin S.A., Kuznetsov D.A., Jukovich M. and Hartley R.W. Ribonuclease-charged vector for facile direct cloning with positive selection // Mol. Gen. Genet. — 1998. — Vol. 259. — P. 379–382.
8. Shchelkunov S.N., Safronov P.F., Totmenin A.V., Petrov N.A., Ryazankina O.I., Gutorov V.V. and Kotwal G.J. The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins // Virology. — 1998. — Vol. 243. — P. 432–460.
9. Белафин П.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Метод определения эндонуклеаз рестрикции в колониях бактерий // Прикл. биохим. микробиол. — 1988. — Т. 24. — С. 121–124.
10. Пучкова Л.И., Кривопалова Г.Н., Андреева И.С., Селина А.В., Серов Г.Д., Речкунова Н.И., Дегтярев С.Х. Streptomyces fradiae — продуцент эндонуклеазы рестрикции Sfr274I // Изв. Сиб. отд. АН СССР. — 1990. — 1. — С. 32–34.
11. Gingeras T.R. and Brooks J.E. Cloned restriction/modification system from Pseudomonas aeruginosa // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1983. — Vol. 80. — P. 402–406.

Принятые сокращения: система РМ — система рестрикции-модификации; ЭР — эндонуклеаза рестрикции, Трис — трис-(оксиметил)-аминометан; ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота; ДТТ — дитиот-реитол; п.н. — пары нуклеотидов.

PSPXI, A NOVEL RESTRICTION ENDONUCLEASE THAT RECOGNIZES THE UNUSUAL DNA SEQUENCE 5'-VC[^]TCGAGB-3'

D.A. GONCHAR, M.A. ABDURASHITOV, O.A. BELICHENKO, V.S. DEDKOV, N.V. MEZENTSEVA, J.E. TOMILOVA, S.KH. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

We have discovered a bacterial strain *Pseudomonas species X11* that produces the novel restriction endonuclease PspXI. This enzyme recognizes an unusual degenerate octanucleotide sequence 5'-VCTCGAGB-3', where V stands for A, C or G and B stands for T, C or G. The PspXI restriction endonuclease preparation with concentration of 10000 units/ml was isolated using four chromatographic steps. PspXI cuts its recognition sequence between C and T producing cohesive ends compatible with those of produced by XhoI (5'-C[^]TCGAG-3') and SalI (5'-G[^]TCGAC-3') restriction endonucleases.

Keywords: restrictases, endonuclease, DNA