

Новая сайт-специфическая метилзависимая ДНК эндонуклеаза PkrI узнаёт и расщепляет метилированную последовательность 5'-GCN[↑]GC-3'/3'-CG[↓]NCG-5', содержащую не менее 3-х 5-метилцитозинов



Категория: Новые ферменты

Просмотров: 11136

В.А. Чернухин, Наякшина Т.Н, Гончар Д.А., Томилова Ю.Э., Тарасова М.В., Дедков В.С., Михненко Н.А., Дегтярёв С.Х.

Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова. – 2011. – Т. 7 – № 3 – С. 35 - 42

*Из штамма бактерии *Planomicrobium koreense* 78k выделена новая сайт-специфическая метилзависимая ДНК эндонуклеаза PkrI, узнающая и расщепляющая как указано стрелкой метилированную последовательность ДНК 5'-GCN[↑]GC-3'/3'-CG[↓]NCG-5' при наличии в ней не менее трёх 5-метилцитозинов и не расщепляющая неметилированную ДНК. Благодаря своей способности расщеплять только метилированную ДНК фермент PkrI может найти практическое применение в молекулярно-биологических работах, в частности, для определения статуса метилирования ДНК зукариот.*

Наиболее изученными сайт-специфическими эндонуклеазами являются эндонуклеазы рестрикции типа II (рестриктазы), которые входят в так называемые бактериальной системы рестрикции-модификации, содержащие еще ДНК-метилтрансферазы. Рестриктаза расщепляет чужую ДНК по определенному сайту, а ДНК-метилтрансфераза метилирует эту же последовательность в бактериальной ДНК, предотвращая, таким образом, ее гидролиз собственной эндонуклеазой рестрикции.

К эндонуклеазам рестрикции близки по свойствам метилзависимые сайт-специфические эндонуклеазы, которые расщепляют только метилированную ДНК. Сравнительно недавно обнаруженные сайт-специфические 5-метилцитозинзависимые ДНК эндонуклеазы узнают и расщепляют определенные последовательности ДНК, содержащие 5-метилцитозин, не требуют кофакторов помимо ионов Mg²⁺ и гидролизуют субстрат полностью и в тех же условиях, что и эндонуклеазы рестрикции [1].

Наиболее разнообразной оказалась группа метилзависимых эндонуклеаз, которая узнаёт различные варианты метилированной последовательности 5'-GCNCGC-3'/3'-CGNCG-5'. К этой группе относятся описанные ранее ферменты BlnI [2], BlnI [3], и GluI [4], которые отличаются друг от друга как местом расщепления ДНК, так и узором метилирования, необходимым для эффективного гидролиза.

В данной работе изучена субстратная специфичность новой сайт-специфической метилзависимой ДНК эндонуклеазы PkrI, узнающей и расщепляющей как указано стрелкой метилированную последовательность ДНК 5'-GCN[↑]GC-3'/3'-CG[↓]NCG-5' при наличии в ней не менее трёх 5-метилцитозинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

В работе использовали следующие реактивы и компоненты питательных сред: Tris («Promega», США); акриламид, бис-акриламид, K₂HPO₄, NaHCO₃, ампициллин («Helicon», Россия); ЭДТА («Fluka AG» Швейцария), агароза («Hybaid-AGS», Германия), тритон X-100 («ICN», США), лизоцим («Serva», Германия), дифенилметилсульфонилфторид (PSMF) («Sigma», США), фосфоцеллюлоза P-11 («Whatman», Англия), гепаринсефароза («BioRad», США), триптон, дрожжевой экстракт («Organotechnie», Франция), ферменты и препараты ДНК (НПО «Сибэнзим»). Остальные реагенты – отечественного производства квалификации х.ч.

Для проведения реакции гидролиза эндонуклеазой PkrI использовали SE-буфер «В» («СибЭнзим», Россия) следующего состава: 10 мМ Трис-НСl, рН 7,6; 10 мМ MgCl₂; 1 мМ дитиотрейтол.

Выращивание штамма-продуцента

Выращивание штамма проводили в ферментёре 1601-013 (LKB, Швеция) при температуре 30°C в 20 л питательной среды, содержащей 1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% NaCl и 0,05% MgCl₂, при рН 7,5 с аэрацией 10 л/мин и перемешиванием 200 об/мин. При достижении культурой поздней логарифмической стадии роста клетки осаждали с помощью центрифугирования при 5000 об/мин при 4°C. В результате получили 100 г биомассы, которую хранили при -20°C.

Выделение фермента. Условия проведения выделения и используемые буферы

Выделение проводилось при 4°C с использованием растворов:

буфер А - 10 мМ Трис-НСl рН 7,6, 0,1 мМ ЭДТА и 7 мМ 2-меркаптоэтанол

буфер Б - 10 мМ К-фосфат рН 7,2, 0,1 мМ ЭДТА и 7 мМ 2-меркаптоэтанол

буфер С- 60 мМ Трис-НСl рН 7,6, 0,1 мМ ЭДТА и 7 мМ 2-меркаптоэтанол

Тестирование активности фермента

При очистке проводилось в 20 мкл реакционной смеси в SE-буфере «В» при 37°C, содержащем 0,5 мкг ДНК рFsp4HI2/Dril [4].

Предварительный подбор оптимальных для PkrI условий (SE-буфер «В» при 37°C) установили на основе сравнения глубины гидролиза в различных SE-буферах и температурах на ДНК рFsp4HI2/Dril.

Экстрагирование

15 г биомассы суспендировали в 45 мл буфера А с 0,3 М NaCl, 1мМ фенилметилсульфонилфторида, 0,1 мг/мл лизоцима, 0,1% Тритоном X-100. Клетки разрушали ультразвуком на Soniprep 150 ("MSE", Англия) с диаметром адаптера 2 см. Обработка проводилась при амплитуде 20 мкм 7 раз по 1 мин с интервалами по 1 мин с охлаждением суспензии в ледяной бане. Экстракт осветляли центрифугированием при 15000 об/мин 30 мин в роторе JA-20 на центрифуге J-2-21 ("Beckman", США).

Хроматография на фосфоцеллюлозе

Экстракт наносили на колонку объемом 45 мл, уравновешенную в буфере А с 0,2 М NaCl и промывали двумя колоночными объемами буфера А с 0,2 М NaCl. Белок, несвязавшийся со смолой и содержащий целевую активность, осаждали 70% сульфатом аммония, центрифугировали при 12000 об/мин 30 мин в роторе JA-14 на центрифуге J-2-21.

Гель-фильтрация

Осадок растворяли в буфере А, наслаивали на колонку с биогелем А-0,5м объемом 500 мл и промывали буфером А с 0,8М NaCl, 0,1% Тритоном X-100 со скоростью 40 мл/ч. Фракции, содержащие целевую активность, объединяли.

Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе

Объединенные фракции диализовали против 4л буфера А в течение 3 ч, наносили на колонку ДЭАЭ-целлюлозы объемом 50 мл, уравновешенную в буфере А с 0,05 М NaCl, и промывали 2-мя объемами буфера А с 0,05 М NaCl. Белок элюировали линейным градиентом NaCl от 0,075М до 0,45 М объемом 400 мл. Фракции, содержащие целевую активность, объединяли.

Хроматография на фенил-сефарозе

К объединенным фракциям добавляли Tris-НСl рН 7,6 до концентрации 60 мМ, сульфат аммония до концентрации 1,7 М, наносили на колонку фенил-сефарозы объемом 4 мл, уравновешенную в буфере С с 1,7 М сульфата аммония, и промывали двумя объемами 1,7 М сульфата аммония в буфере С. Белок элюировали линейным градиентом сульфата аммония от 1,7 до 0 М в буфере С объемом 240 мл. Фракции, содержащие целевую активность, объединяли.

Хроматография на гидроксилпатите (ГАП)

Объединенные фракции диализовали против 2,5л буфера А в течение 16ч, наносили на колонку ГАП объемом 4 мл, уравновешенную в буфере Б, и промывали двумя объемами буфера Б. Белок элюировали линейным градиентом К-фосфатного буфера рН 7,2 от 0,01 до 0,2 М объемом 160 мл. Фракции, содержащие целевую активность, объединяли.

Рехроматография на фенил-сефарозе

К объединенным фракциям добавляли Трис-НСl рН 7,6 до концентрации 60 мМ и сульфат аммония до концентрации 1,7М, затем наносили на колонку фенил-сефарозы объемом 4 мл, уравновешенную в буфере С с 1,7 М сульфата аммония, и промывали двумя объемами 1,7 М сульфата аммония в буфере С. Белок элюировали линейным градиентом сульфата аммония от 1,7 до 0 М в буфере С объемом 200 мл. Фракции, содержащие целевую активность, объединяли.

Хроматография на гепарин-сефарозе

Объединенные фракции диализовали против 1,5 л буфера А в течение 16 ч, наносили на колонку гепарин-сефарозы объемом 4 мл, уравновешенную в буфере А с 0,1 М NaCl и промывали двумя объемами 0,1 М NaCl в буфере А. Белок элюировали линейным градиентом NaCl от 0,1 до 0,7 М объемом 160 мл. Фракции, содержащие целевую активность, объединяли.

Концентрирование и хранение препарата

Объединенные фракции диализовали в течение 20 ч против 300 мл буфера А с 55% глицерином, 0,25 М NaCl и хранили при -20°C.

Определение активности фермента

Для определения активности фермента PkgI использовалась плаزمида pFsp4HI2, предварительно линеаризованная рестриктазой DriI. За одну единицу активности сайт-специфической эндонуклеазы PkgI принималось минимальное количество фермента, при котором происходит полный гидролиз 1 мкг ДНК плазмиды pFsp4HI2, предварительно линеаризованной рестриктазой DriI, в 50 мкл реакционной смеси в оптимальных условиях: при 37°C в SE-буфере «В».

Определение места гидролиза ДНК и сайта узнавания на олигонуклеотидных дуплексах

Позиции гидролиза ДНК сайт-специфической эндонуклеазой PkgI были установлены путем сравнения длин фрагментов, образующихся при расщеплении [³²P]-меченного олигонуклеотидного дуплекса эндонуклеазами PkgI и BslI. В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этого же дуплекса экзонуклеазой III из *E.coli* (ExoIII). Расщепление ДНК проводили в оптимальных условиях в течение 1 часа. Фрагменты ДНК, образующиеся в результате расщепления олигонуклеотидного дуплекса, разделяли электрофорезом в денатурирующем 20% полиакриламидном геле (ПААГ) с 7 М мочевиной.

Определение субстратной специфичности проводили путем расщепления олигонуклеотидных дуплексов, полученные из следующих олигонуклеотидов, синтезированных в НПО «Сибэнзим» (Россия):

D1: 5'-GAGTTTAG(m5C)GG(m5C)TATCGATCC-3'
 D2: 5'-GGATCGATAG(m5C)CG(m5)CTAAACTC-3'.
 NN01 5'-GCTTGACTTTAGCGGCATTGATTCTCACCACG-3'
 NN02 5'- GCTTGACTTTAGCGGCATTGATTCTCACCACG-3'
 NN1 5'-GCTTGACTTTAG(m5C)GGCATTGATTCTCACCACG-3'
 NN2 5'-CGTGGTGAGAATCAATG(m5C)CGCTAAAGTACAAGC
 DD1 5'-GCTTGACTTTAG(m5C)GG(m5C)ATTGATTCTCACCACG-3'
 DD2 5'-CGTGGTGAGAATCAATG(m5C)CG(m5C)TAAAGTACAAGC-3'
 NN11 5'-GCTTGACTTTAGCGG(m5C)ATTGATTCTCACCACG-3'
 NN22 5'-CGTGGTGAGAATCAATGCCG(m5C)TAAAGTACAAGC-3'

Все олигонуклеотиды с чётными номерами комплементарны олигонуклеотидам с нечётными номерами.

Определение первичной структуры фрагмента гена 16S РНК

Определение первичной структуры гена 16S РНК для штамма *Planomicrobium koreense* 78k проводили путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) на ДНК штамма со следующих праймеров:

16S-direct 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCA-3'
 16S-reverse 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'

Первичная структура фрагмента гена 16S РНК определялась с помощью секвенатора 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Описание штамма-продуцента и его таксономическая идентификация

В ходе скрининга нами был обнаружен бактериальный штамм-продуцент новой ДНК эндонуклеазы. Клетки штамма продуцента представляют собой – грамположительные кокки, 1 мкм в диаметре, располагаются одиночно, в парах, тетрадах, неподвижные. Факультативные анаэробы. Каталазоположительные. Растут при температуре от + 4 до + 40 °С. При встряхивании в питательном бульоне LB образуют гомогенную муть. На питательном агаре при +24 °С через 4 суток образуют колонии размером около 1 мм, гладкие, блестящие, непрозрачные, розоватого оттенка. Содержание G+C в ДНК равное 52-58% определили по методу [5].

Установленная структура фрагмента гена 16S РНК представлена ниже:

```

1  ccatcatctg tccaaccttc ggcggtctggc tccacaaggg ttacctcacc gacttcgggt
61  gttacaacct ctctgtgtgt gacgggctggt gtgtacaagg cccgggaacg tattaccggt
121 ggcatgctga tccacgatta ctacgcatc cggctcatg caggcgaggt gcagcctgca
181 atccgaactg agaacgggtt tctgggattg gctccccctc gcgggtttgc agccctttgt
241 accgtccatt gtagcactgt ttagccccag gtcataaggg gcatgatgat ttgacgcat
301 cccsaccttc ctccggttg tcaccggcag tcacctaga gtgcccact gaatgctggc
361 aactaagatc aagggttgcg ctctgtcggg gacttaacct aacatctcac gacacgagct
421 gacgacaacc atgcaccacc tgtcaccgct gtccccgaag ggaaagccta gtctcctagg
481 cgggcagcgg gatgtcaaga cctgtaagg ttctcgcgt tgcttcaat taaaccacat
541 gctccaccgc ttgtcgggc ccccgtaaat tctttgagt ttacgcttg cggccgtact
601 cccagggcgg agtgctaat gcgtagctg cagcactaag gggcggaac ccctaacac
661 ttagcactca tctttacgg cgtggactac cagggtatct aatcctgtt gctccccacg
721 cttcgcgcc tcagcgtcag ttacagacca gaaagtcgcc ttcgccactg gtgtcctcc
781 acatctctac gcatctacc gctacactgt gaattccact ttctcttct gactcaagt
841 cccccagttt ccaatgacc tccaggttga gccgtgggct ttacatcag acttaagga
901 ccgctcgcg gcgctttaca cccaataatt ccggacaacg ctggcacct
  
```

По определителю [6], а также с помощью анализа по программе BLAST полученной структуры фрагмента 16S РНК [7], штамм был определен как *Microbacterium testaceum* 17B. Продуцируемая данным штаммом новая ДНК эндонуклеаза названа PkrI согласно номенклатуре [8].

Получение препарата фермента PkrI и определение его субстратной специфичности

Фермент PkrI выделяли из клеточного экстракта путём последовательных хроматографических процедур, как описано в разделе "Материалы и методы". Выход фермента из 15 грамм биомассы составил 3 мл препарата.

Измерение активности фермента проводили в предварительно подобранном оптимальном SE-буфере «В» при установленной оптимальной температуре 37°С.

Определение активности фермента PkrI проводили, расщепляя плазмиду pFsp4HI2, линейризованную рестриктазой DriI, путем последовательного разведения препарата фермента в два раза. За единицу активности PkrI принимали количество фермента, необходимое для полного исчезновения линейной формы 1 мкг плазмиды pFsp4HI2/DriI за 1 час при 37°С в SE-буфере «В» в 50 мкл реакционной смеси.

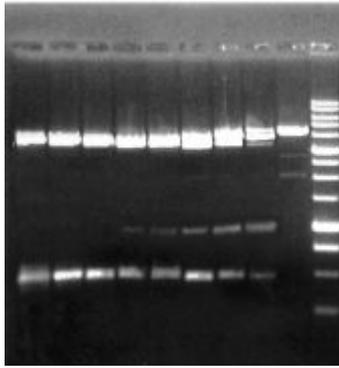
На рисунке 1 приведены результаты определения активности. Концентрация полученного препарата PkrI составляет 2000 ед/мл.

Рис. 1. Активность фермента PkrI на ДНК pFsp4HI2/DriI. Электрофорез в 1% агарозном геле. Время реакции 1 час. Объем реакционной смеси – 50 мкл.

Дорожки:

- 1 – 2 мкл препарата PkrI; 2 – 1 мкл препарата PkrI;
- 3 – 1/2 мкл препарата PkrI; 4 – 1/4 мкл препарата PkrI;
- 5 – 1/8 мкл препарата PkrI; 6 – 1/16 мкл препарата PkrI;
- 7 – 1/32 мкл препарата PkrI; 8 – 1/64 мкл препарата PkrI;

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



9 – ДНК, не обработанная ферментом; 10 – маркёр молекулярных весов ДНК 1 kb («СибЭнзайм», Россия).
подчеркиванием.

Определение субстратной специфичности фермента проводили с использованием различных плазмидных и фаговых ДНК: ДНК фагов λ и T7, плазмиды pHspA11 (содержит метилированные последовательности 5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5' [1]) и плазмиды pFsp4HI2, которая несет ген метилазы M.Fsp4HI, метилирующей первый цитозин в последовательности 5'-GCNGC-3' и содержит метилированные последовательности 5'-G(5mC)NGC-3'/3'-CGN(5mC)G-5' [4].

На рисунке 2 представлена электрофореграмма продуктов, образованных в результате обработки ДНК фагов λ и T7, а также плазмид pHspA1 и pFsp4HI2 эндонуклеазой PkrI.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

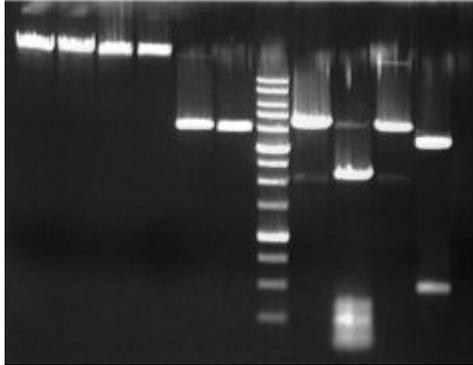


Рис. 2. Анализ специфичности эндонуклеазы PkrI на метилированной и неметилированной ДНК. Электрофорез в 1% агарозном геле.

Дорожки:

- 1 - ДНК фага лямбда; 2 - ДНК фага лямбда, обработанная PkrI;
- 3 - ДНК фага T7; 4 - ДНК фага T7, обработанная PkrI;
- 5 - ДНК pHspA1/GsaI; 6 - ДНК pHspA1/GsaI, обработанная PkrI;
- 7 - маркер молекулярного веса ДНК 1 kb («СибЭнзайм», Россия); 8 - pFsp4HI2/Dril;
- 9 - pFsp4HI2/Dril, обработанная BlnI; 10 - pFsp4HI2/Dril, обработанная GluI;
- 11 - pFsp4HI2/Dril, обработанная PkrI.

Как видно из рисунка 2, PkrI не расщепляет ДНК фагов λ и T7, а также ДНК pHspA1, содержащую метилированные последовательности 5'-GCNGC-3'. При этом PkrI расщепляет ДНК pFsp4HI2, давая хорошо видимый фрагмент в районе 450-500 п.н. (дорожка 11).

Анализ первичной структуры плазмиды показал, что в pFsp4HI2 имеются две последовательности 5'-GCNGCNGC-3', расположенные друг от друга на расстоянии 484 п.н. Последовательность 5'-GCNGCNGC-3' представляет собой два перекрывающихся сайта узнавания метилазы M.Fsp4HI. При этом, если метилированная последовательность 5'-GCNGC-3' содержит два 5-метилцитозина в обоих цепях сайта узнавания, то последовательность 5'-GCNGCNGC-3' метилируется с образованием сайта 5'-G(5mC)NG(5mC)NGC-3'/3'-CGN(5mC)GN(5mC)G-5'. Этот сайт содержит внутри метилированную последовательность 5'-GCNGC-3' с тремя 5-метилцитозинами.

Полученный в эксперименте фрагмент ДНК размерами 450-500 п.н. (рис.2, дорожка 11) соответствует фрагменту 485 п.н., получаемому при расщеплении pFsp4HI2 по метилированным последовательностям 5'-GCNGCNGC-3'. Этот результат даёт основание предположить, что PkrI узнаёт и расщепляет метилированную последовательность 5'-GCNGC-3', содержащую три 5-метилцитозина. Как видно из рис.2, BlnI, в отличие от PkrI, эффективно расщепляет все метилированные последовательности 5'-GCNGC-3 с двумя 5-метилцитозинами в обоих цепях (дорожка 9). В тоже время эндонуклеаза GluI не расщепляет последовательности 5'-GCNGC-3' как с двумя, так и с тремя 5-метилцитозинами (дорожка 10).

На рисунке 3 представлена электрофореграмма продуктов, образованных в результате гидролиза ДНК pUC19 эндонуклеазой рестрикции Fsp4HI, а также pUC19, предварительно метилированной метилазой CviPI и обработанной затем эндонуклеазой PkrI. ДНК-метилтрансфераза CviPI метилирует цитозин в динуклеотидной последовательности 5'-GC-3'[9].

1 2 3

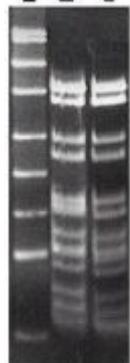


Рис. 3. Сайт-специфическое расщепление эндонуклеазой PkrI ДНК плазмиды pUC19, предварительно метилированной M.CviPI по динуклеотиду GC. Электрофорез в 15% полиакриламидном геле в буфере TAE.

Дорожки:

- 1 - pUC19, гидролизованная эндонуклеазой рестрикции MspI по сайту 5'-CCGG-3', использованная в качестве маркёра молекулярных весов;
- 2 - pUC19, гидролизованная эндонуклеазой рестрикции Fsp4HI по сайту 5'-GCNGC-3';
- 3 - pUC19, предварительно метилированная метилазой CviPI и обработанная эндонуклеазой PkrI.

Как видно из рисунка 3, электрофоретические подвижности фрагментов, образованных при гидролизе рUC19 рестриктазой Fsp4HI (сайт узнавания 5'-GCNGC-3') и при гидролизе эндонуклеазой PkrI плазмиды рUC19, предварительно метилированной по последовательности 5'-GC-3', совпадают. Поскольку при метилировании ферментом M.CviPI все сайты 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' превращаются в последовательности 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'(5mC)GN(5mC)G-5', то можно заключить, что PkrI расщепляет полностью метилированный сайт 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5', содержащий четыре 5-метилцитозина.

Таким образом, из результатов, представленных на рисунках 2 и 3, можно предположить, что сайт-специфическая эндонуклеаза ДНК PkrI узнаёт и расщепляет метилированную последовательность 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' при наличии в ней не менее трёх 5-метилцитозинов.

По субстратной специфичности ДНК эндонуклеаза PkrI наиболее близка к ранее описанным сайт-специфическим метилзависимым ДНК эндонуклеазам BlnI и GluI. Все три фермента расщепляют метилированную последовательность 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5', однако отличаются по узнаваемому узору метилирования. В отличие от GluI, расщепляющей полностью метилированный сайт, PkrI способна эффективно гидролизовать последовательность 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' при наличии в ней трёх 5-метилцитозинов. В тоже время PkrI, в отличие от BlnI, не способна расщеплять последовательность 5'-GCNGC-3' при наличии в ней двух 5-метилцитозинов.

Определение позиции гидролиза ДНК ферментом PkrI

Определение места гидролиза ДНК эндонуклеазой PkrI осуществляли путем сравнения длин фрагментов, образуемых при расщеплении эндонуклеазами PkrI и BlnI олигонуклеотидного дуплекса D1/D2 (см. структуру в разделе «Материалы и методы»):

В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой ExoIII из *E.coli*.

На рис. 4 представлен радиоавтограф электрофореграммы продуктов расщепления олигонуклеотидного радиоактивно меченного дуплекса D1/D2 в 20% полиакриламидном геле, содержащем 7М мочевины. Из рис. 4 видно, что продукты гидролиза ДНК дуплекса D1*/D2 на дорожках 2 и 4 имеют одинаковые длины. Это означает, что позиции гидролиза ДНК ферментами PkrI и BlnI совпадают.

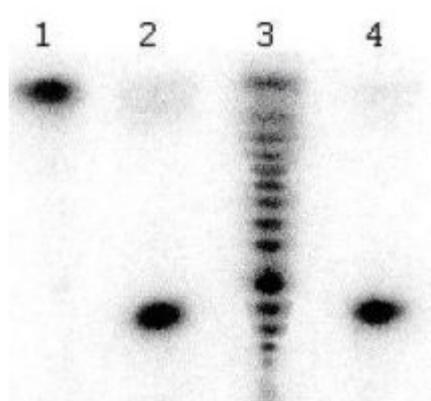


Рис. 4. Определение позиции гидролиза ДНК ферментом PkrI. Электрофорез в 20% ПААГ с 7 М мочевиной.

Дорожки:

- 1 – исходный дуплекс D1*/D2;
 - 2 - дуплекс D1*/D2, обработанный эндонуклеазой H78;
 - 3 - дуплекс D1*/D2, обработанный экзонуклеазой III из *E.coli*;
 - 4 - дуплекс D1*/D2, обработанный эндонуклеазой BlnI;
- Символом «*» отмечены олигонуклеотиды, меченные радиоактивным фосфором ^{32}P по 5'-концу.

На основе полученных результатов можно сделать вывод, что PkrI узнает и расщепляет метилированную последовательность ДНК 5'-GCNGC-3' после центрального нуклеотида, при наличии в этой последовательности не менее трёх 5-метилцитозинов.

Изучение субстратной специфичности PkrI

Для изучения субстратной специфичности PkrI мы гидролизовали олигонуклеотиды с метилированной последовательностью 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5', содержащей различные комбинации 5-метилцитозинов. На рис. 5 представлены полученные результаты.

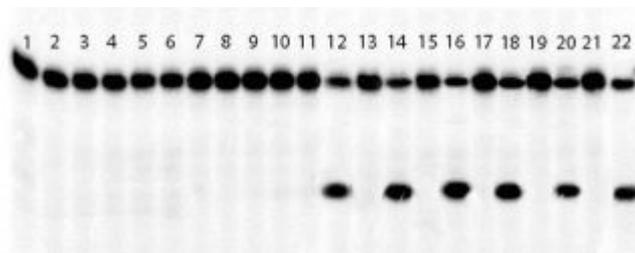


Рис. 5. Анализ специфичности фермента PkrI на меченых P^{32} синтетических олигонуклеотидных дуплексах.

Электрофорез в 20% ПААГ с 7М мочевиной.

Дорожки:

1. NN01*/NN02; 2. NN01*/NN02, обработанный PkrI; 3. NN1*/NN2; 4. NN1*/NN2, обработанный PkrI;
5. NN11*/NN22; 6. NN11*/NN22, обработанный PkrI; 7. NN1*/NN22; 8. NN1*/NN22, обработанный PkrI;
9. DD1*/NN02; 10. DD1*/NN02, обработанный PkrI; 11.

DD1*/DD2; 12. DD1*/DD2, обработанный PkrI;

13. DD2*/DD1; 14. DD2*/DD1, обработанный PkrI; 15. DD1*/NN1; 16. DD1*/NN1, обработанный PkrI;

17. NN1*/DD1; 18. NN1*/DD1, обработанный PkrI; 19. DD1*/NN22; 20. DD1*/NN22, обработанный PkrI; 21. NN22*/DD1; 22. NN22*/DD1, обработанный PkrI.

Как видно из рисунка, PkrI не расщепляет неметилированную последовательность 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' (дорожка 2), метилированную последовательность 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' с двумя 5-метилцитозинами при любых возможных сочетаниях последних: двух внутренних - 5'-G(5mC)NGC-3'/3'-CGN(5mC)G-5' (дорожка 4); двух внешних - 5'-GCNG(5mC)-3'/3'-(5mC)GNGC-5' (дорожка 6); одного внутреннего, одного внешнего на разных цепях - 5'-G(5mC)NGC-3'/3'-(5mC)GNGC-5' (дорожка 8) и, наконец, одного внутреннего и одного внешнего на одной цепи 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'-CGNCG-5' (дорожка 10).

При этом PkrI расщепляет последовательность 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' при наличии трех 5-метилцитозинов в обоих вариантах: при наличии двух внутренних и одного внешнего 5-метилцитозина - 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'-CGN(5mC)G-5' (дорожки 16, 18), а также двух внешних и одного внутреннего - 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GNGC-5' (дорожки 20, 22). Кроме того, PkrI гидролизует полностью метилированный сайт 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' с 4-мя 5-метилцитозинами (дорожки 12, 14).

Таким образом, сайт-специфическая метилзависимая ДНК эндонуклеаза PkrI узнает и расщепляет перед вторым остатком гуанина метилированную последовательность 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' при наличии в ней не менее трёх 5-метилцитозинов.

Сравнение свойств известных на сегодня сайт-специфических ДНК эндонуклеаз показывает, что узнавая одну и ту же последовательность 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5', ферменты отличаются по месту гидролиза и минимальному количеству 5-метилцитозинов в узнаваемой последовательности. Fsp4NI гидролизует только неметилированный сайт перед N. BslI расщепляет сайт с одним и более 5-метицитозинами также перед N [9]. BslI [11] и PkrI гидролизуют сайт как минимум с двумя и тремя 5-метицитозинами, соответственно, после N. GluI расщепляет полностью метилированный сайт с четырьмя 5-метилцитозинами перед N [4]. Биологическая роль такого разнообразия метилированных сайтов узнавания ферментов на основе последовательности 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' остается неясной.

Фермент PkrI может быть использована в эпигенетических исследованиях для определения статуса метилирования ДНК, в частности, для анализа метилирования ДНК человека и млекопитающих.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по государственному контракту, заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2013 годы».

ЛИТЕРАТУРА

1. Pingoud A., and Jeltch A. Structure and function of type II restriction endonucleases. // *Nucleic Acid Res.* 2001. - Vol.29. - P.3705-3727
2. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Сайт-специфическая эндонуклеаза BslI узнаёт последовательности ДНК 5'-G(5mC)NGC-3' и расщепляет её с образованием 3'-выступающих концов // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.* – 2007. – Т.3. – №1. – С.28-33. ([интернет-версия](#))
3. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции BslI из *Bacillus subtilis* T30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)ⁿNGC-3' // *Биотехнология.* – 2005. - №3. – С.22-26. ([интернет-версия](#))
4. Чернухин В.А., Чмуж Е.В., Томилова Ю.Э., Наякшина Т.Н., Гончар Д.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая эндонуклеаза GluI узнаёт метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN(5mC)G-5' // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.* – 2007. – Т.3. – №2. – С.13-17. ([интернет-версия](#))
5. Дедков В.С. Определение содержания G+C в ДНК бактерий при помощи эндонуклеаз рестрикции // *Биотехнология.* – 2004. – № 4. – С. 77—82.
6. *Определитель бактерий Берджи.* / Под ред. Дж. Хоулта и др.: (9-е издание в 2 томах): Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. – М., 1997.
7. Madden, T.L., Tatusov, R.L. & Zhang, J. Applications of network BLAST server. // *Meth. Enzymol.* – 1996. - Vol. 266. – P. 131-141.
8. Smith, H.O., Nathans, D. A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. // *J. Mol. Biol.* - 1973. - Vol.81. - P.419-423.
9. [Rebase official site](#)