

## РЕКОМБИНАНТНАЯ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗА M1.BspACI ИЗ *Bacillus psychrodurans* AC: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

© 2010 г. М.В. Тарасова<sup>1,2\*</sup>, В.В. Кузнецов<sup>3</sup>,  
Н.А. Нетесова<sup>3</sup>, Д.А. Гончар<sup>1</sup>, С.Х. Дегтярев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-производственное объединение «СибЭнзим»,  
630117 Новосибирск, ул. Ак. Тимакова, 2/12; факс: (383) 333-6853,  
электронная почта: tarasovamv@sibenzyme.ru

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск,  
ул. Пирогова, 2; электронная почта: tarasovamv@sibenzyme.ru

<sup>3</sup> ФГУН государственный научный центр вирусологии  
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559 пос. Кольцово,  
Новосибирской обл.

Поступила в редакцию 20.05.10

После доработки 22.06.10

Система рестрикции-модификации *Bacillus psychrodurans* AC (сайт узнавания 5'-CCGC-3') содержит две ДНК-метилтрансферазы: M1.BspACI и M2.BspACI. Ген *bspACIM1* клонировали в составе вектора pJW2 и экспрессировали в клетках *Escherichia coli*. Высокоочищенный препарат фермента M1.BspACI получили путем очистки в пять хроматографических стадий. M1.BspACI проявляет максимальную активность при 30°, pH 8. Фермент модифицирует первый остаток цитозина в последовательности узнавания 5'-CCGC-3'. Каталитическая константа реакции метилирования ДНК ферментом M1.BspACI равна 0,095 мин<sup>-1</sup>,  $K_m$  для ДНК фага  $\lambda$  – 0,053 мкМ,  $K_m$  для S-аденозил-L-метионина – 5,1 мкМ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ДНК-метилтрансфераза, *Bacillus psychrodurans*, ферментативная кинетика.

Сайт-специфичные ДНК-метилтрансферазы (метилазы) широко распространены среди прокариот. Эти ферменты катализируют перенос метильной группы от донора, S-аденозил-L-метионина (SAM), на адениновое или цитозиновое основание в определенной нуклеотидной последовательности. Как правило, метилазы вместе с эндонуклеазами рестрикции образуют системы рестрикции-модификации (RM-системы), в которых эндонуклеаза рестрикции защищает бактериальную клетку от проникновения чужеродной ДНК, а метилаза, модифицируя хозяйскую ДНК, защищает ее от гидролиза собственной рестриктазой. RM-системы с непалиндромным сайтом узнавания (тип IIS) содержат как минимум две ДНК-метилтрансферазы, каждая из которых мо-

дифицирует лишь одну из цепей ДНК [1]. Константы Михаэлиса для ДНК, установленные для такого типа метилаз, как правило, существенно отличаются от  $K_m$  для метилтрансфераз, узнающих симметричные нуклеотидные последовательности [2]. По-видимому, это связано с различными механизмами реакции метилирования, катализируемой ферментами этих двух типов.

Ранее нами был обнаружен штамм *Bacillus psychrodurans* AC, продуцирующий эндонуклеазу рестрикции *BspACI*, которая узнает непалиндромную последовательность нуклеотидов 5'-CCGC-3' [3]. В настоящей работе описано выделение, биохимические и субстратные свойства рекомбинантной ДНК-метилтрансферазы M1BspACI.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Выделение ДНК.** Плазмидные ДНК pUC19 [4], pJW2 [5], а также рекомбинантные плазмидные ДНК из *E. coli* выделяли с использованием наборов «QIAGEN» согласно инструкциям производителя. Хромосомную ДНК *B. psychrodurans* AC выделяли по методу, описанному ранее [6].

Принятые сокращения: М – сайт-специфическая ДНК-метилтрансфераза, метилаза; RM-система – система рестрикции-модификации; R – эндонуклеаза рестрикции, рестриктаза; SAM – S-аденозил-L-метионин; ПЦР – полимеразная цепная реакция; PMSF – фенолметилсульфонилфторид; ДТТ – дитиотреитол; ГАП – гидроксиапатит; ОРТ – открытая рамка трансляции.

\* Адресат для корреспонденции.

**Клонирование генов метилтрансфераз РМ системы BspACI.** Для приготовления хромосомной «библиотеки» фрагменты хромосомной ДНК, полученные при гидролизе рестриктазами *Pst*I и *Zsp*2I (НПО «СибЭнзим», Россия), лигировали с плазмидным вектором pUC19, линеаризованным рестриктазой *Pst*I. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* ER 2267 (F' proA + B + lacIq Δ(lacZ)M15 zcf::mini-Tn10 (Kanr)/Δ(argF-lacZ)U169 glnV44 e14- (McrA-) rfbD1? recA1 relA1? endA1 spoT1? Thi-1 Δ(mcrC-mrr) 114::IS10) («New England Biolabs», США). После инкубации на селективной среде с ампициллином из полученных клонов выделяли суммарную плазмидную ДНК. Выделенную ДНК обрабатывали рестриктазой *Bsp*ACI и снова трансформировали в клетки *E. coli* ER 2267. Все процедуры в процессе клонирования (приготовление компетентных клеток, трансформация клеток плазмидными ДНК) выполняли согласно стандартным методам [7]. Электропорацию осуществляли на приборе Easyject Prima («EquiBio», Германия) согласно протоколу производителя. Определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК осуществляли методом Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США) согласно протоколам производителя.

**Экспрессия гена метилтрансферазы M1.BspACI.** Для проведения ПЦР использовали праймеры производства НПО «СибЭнзим» (сайты узнавания *Fau*NDI (CATATG) и *Bam*HI (GGATCC) подчеркнуты):

M1ACup 5'-GTGACTAAACATATGAAGAATTT-TAAATTTATTGATC-3',

M1AClow 5'-TGTTAAACGGATCCTCAATTCA-TATTATTCAAAC-3'.

Полученный ПЦР-продукт обрабатывали рестриктазами *Fau*NDI и *Bam*HI, очищали путем элюции из агарозного геля с помощью наборов «QIAGEN» в соответствии с инструкциями производителя и встраивали в экспрессирующий вектор pJW2 по тем же сайтам. После электропорации лигазной смесью клеток *E. coli* RRI (F-Δ(gpt-proA)62 leuB6 glnV44 ara-14 galK2 lacY1 Δ(mcrC-mrr) rpsL20 (Strr) xyl-5 mtl-1 RecA+) были отобраны клоны, несущие рекомбинантную плазмиду pM1.BspACI. Полученные клоны подвергали термоиндукции и наблюдали появление полосы, соответствующей целевому белку, в 10%-ном Ds-Na-ПААГ.

При наработке биомассы использовали 0,5-литровые флаконы со 100 мл питательной среды.

Инокулят культуры (5 мл), выросшей при 30° за ночь, засекали во флакон со 100 мл питательного бульона LB, содержащего 100 мкг/мл ампициллина. Клетки подращивали на термостатированной воздушной качалке при 30° и 130 об/мин в течение примерно 3 ч до средней логарифмической фазы. Затем проводили термоиндукцию в течение 4 ч при 42°. Клетки собирали центрифугированием при 6000 об/мин в течение 30 мин на центрифуге J2-21 («Beckman», США). Хранили биомассу при -20°.

**Выделение рекомбинантной M1.BspACI.** M1BspACI выделяли из клеток *E. coli* штамм RRI, несущих рекомбинантную плазмиду pM1.BspACI (получение этой плазмиды описано в разделе результаты и обсуждение). Все стадии процесса проводили при 4°. Биомассу (4,5 г) суспендировали в 15 мл буфера А (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,1 mM ЭДТА, 7 mM β-меркаптоэтанол, 5%-ный глицерин), содержащего 0,3 мг/мл лизоцима и 0,1 mM PMSF, в течение 40 мин. Клеточную суспензию обрабатывали ультразвуком в дезинтеграторе Soniprep 150 (MSE, Англия) в ледяной бане восемью импульсами длительностью по 30 с с интервалами в 30 с для охлаждения суспензии. Супернатант переносили в стакан, добавляли 15 мл фосфоцеллюлозы P-11, предварительно уравновешенной с буфером А, содержащим 50 mM NaCl. Смесью перемешивали в течение 1 ч, наносили на колонку и промывали 30 мл буфера А с 50 mM NaCl. Сорбированный материал элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0,05–1,3 М) в буфере А объемом 180 мл. Собирали 60 фракций по 3 мл.

Фракции с максимальной метилазной активностью объединяли и наносили на колонку с гидроксиапатитом (ГАП) («Bio-Rad», США) объемом 5 мл, предварительно уравновешенным с буфером Р (10 mM К-фосфат, pH 7,2, 0,1 mM ЭДТА, 7 mM β-меркаптоэтанол, 5%-ный глицерин, 50 mM NaCl). Колонку промывали двумя объемами буфера Р. Фермент элюировали 200 мл этого же буфера с линейно возрастающей концентрацией К-фосфата до 300 mM. Собирали 50 фракций по 4 мл. Фракции, обладавшие наибольшей метилазной активностью, объединяли, разбавляли в три раза буфером А. Препарат наносили на колонку с гепарин-сефарозой («Bio-Rad») объемом 4 мл, предварительно уравновешенной с буфером А, содержащим 50 mM NaCl. Колонку промывали двумя объемами буфера А с 50 mM NaCl. Элюцию фермента проводили линейным градиентом концентрации NaCl 0,05–1,3 М в буфере Р объемом 120 мл. Собирали 40 фракций по 3 мл. Фракции с максимальной метилазной активностью объединяли, добавляли БСА до концентрации 0,1 мг/мл и диа-

лизовали против 100 мл буфера, содержавшего 50%-ный глицерин, 10 мМ К-фосфат, pH 7,3, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,1 М NaCl. Препарат наносили на колонку с сефакрилом S-200 объемом 120 мл, предварительно уравновешенным с буфером А, содержавшим 0,6 М NaCl и 0,05%-ный тритона X-100. Элюировали фермент 120 мл буфера А, собирали 30 фракций по 4 мл. Фракции с максимальной метилазной активностью объединяли, добавляли 5 мл буфера Р и дезоксихолат натрия до 0,05%-ного и наносили на колонку с ГАП объемом 4 мл, предварительно уравновешанным с буфером Р. Фермент элюировали 200 мл буфера Р с линейно возрастающей концентрацией К-фосфата до 200 мМ. Собирали 40 фракций по 5 мл. Фракции с максимальной метилазной активностью объединяли, добавляли БСА до концентрации 0,1 мг/мл и диализовали против 100 мл буфера, содержавшего 50%-ный глицерин, 10 мМ К-фосфат, pH 7,3, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,1 М NaCl. Отсутствие примесных белков в конечном препарате контролировали с помощью электрофореза в 10%-ном Ds-Na-ПААГ.

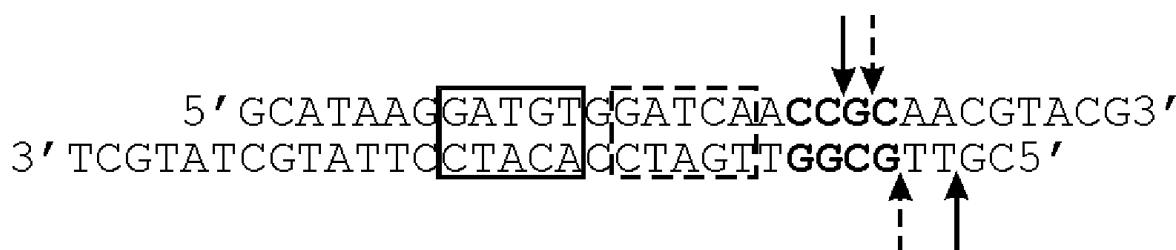
**Определение ДНК-метилтрансферазной активности в элюате.** Активность метилазы в хроматографическом элюате определяли по защите ДНК фага  $\lambda$  от гидролиза рестриктазой *BspACI*. Для этого отбирали из фракций аликвоты по 2 мкл и добавляли к 10 мкл реакционной смеси, содержавшей 0,5 мкг ДНК фага  $\lambda$  в SE-буфере No.5 (Y) (33 мМ Tris-ацетат, pH 7,9, 10 мМ ацетат магния, 66 мМ ацетат калия, 1 мМ ДТТ) и 160 мкМ SAM. Смесь инкубировали при 30° в течение 30 мин, затем добавляли по 1 мкл препарата *BspACI* и выдерживали еще 30 мин при 30°. Продукты реакции разделяли в 1%-ном агарозном геле, окрашивали раствором бромистого этидия и наблюдали в УФ-свете.

**Определение оптимальных условий для работы фермента.** Оптимальную температуру, pH и концентрацию ионов калия и натрия, обеспечиваю-

щих наибольшую активность работы фермента, определяли по интенсивности включения меченого SAM за 60 мин реакции. Реакционная смесь содержала 1 мкМ ДНК  $\lambda$  (в пересчете на сайты узнавания *BspACI*), 49 нМ *BspACI*, 10 мкМ [ $^3$ H]SAM, буфер М (100 мМ Tris-HCl, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА, 0,2 мг/мл БСА, 2%-ный глицерин). Реакцию метилирования останавливали нанесением аликвоты на фильтр DE81 («Whatman»), который затем трижды промывали в 0,02 М растворе гидрокарбоната аммония по 20 мин, затем водой и 70%-ным спиртом. После высушивания фильтра подсчет количества включенной тритиевой метки проводили на жидкостном сцинтилляционном счетчике Beckman Coulter LS 6500.

**Определение метилируемого основания в сайте узнавания M1.*BspACI*.** В качестве субстрата для определения метилируемого основания в сайте узнавания метилазы использовали олигонуклеотидный дуплекс M1AC («СибЭнзим») (рис. 1).

Дуплекс метилировали M1*BspACI* с использованием меченого тритием SAM. Для этого к 50 мкл реакционной смеси, содержавшей ДНК-дуплекс в SE-буфере No.5(Y) и 10 мкМ [ $^3$ H]SAM добавляли избыток препарата метилазы для исчерпывающего метилирования. Реакционную смесь инкубировали 3 ч при 30°. Метилазу инактивировали нагреванием до 70° в течение 10 мин. Меченый таким образом олигонуклеотидный дуплекс делили на две равные части и расщепляли рестриктазами *FokI* и *AlwI* в 50 мкл реакционной смеси с тем же реакционным буфером в течение 3 ч при 37°. Продукты расщепления разделяли в 40%-ном ПААГ с 7,5 М мочевиной. Для визуализации фрагментов гель окрашивали красителем Stains-all («Sigma», Германия), после чего полученные одноцепочечные продукты гидролиза элюировали из геля путем пассивной диффузии и переносили на фильтры DE-81. Количество включенной метки подсчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике Beckman Coulter LS 6500.



**Рис. 1.** Структура синтетического олигонуклеотидного дуплекса M1.AC, используемого при определении метилируемого нуклеотидного остатка. Жирным шрифтом выделен сайт узнавания M1.*BspACI*, в сплошной рамке — сайт узнавания *FokI*, в штриховой — сайт узнавания *AlwI*; места расщепления ДНК указанными ферментами обозначены, соответственно, сплошными и штриховыми стрелками

**Определение кинетических параметров реакции метилирования ДНК.** Определение кинетических параметров реакции метилирования ДНК  $\lambda$  проводили с 2,15 мкМ ДНК  $\lambda$  (в пересчете на сайты узнавания M1.BspACI, для определения зависимости скорости метилирования от SAM), 9,8 нМ M1.BspACI, 10 мкМ [ $^3\text{H}$ ]SAM (для определения зависимости скорости метилирования от ДНК  $\lambda$ ), в буфере M, pH 8,0. Реакцию проводили в течение 1 ч при оптимальной температуре работы фермента. Определение наличия неканонического метилирования производили в условиях реакции одного оборота. Реакционная смесь содержала 100 нМ ДНК  $\lambda$  (в пересчете на сайты), 100 нМ M1.BspACI, 10 мкМ [ $^3\text{H}$ ]SAM в буфере M, pH 8,0.

Для вычисления каталитической константы и констант Михаэлиса использовали регрессионный анализ с помощью программы Origin 5.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Клонирование генов метилаз PM системы BspACI.** Полученная хромосомная «библиотека» штамма *B. psychrodurans* AC содержала ~1200 клонов. После повторной трансформации было получено восемь клонов. Все они несли плазмиды, устойчивые к действию рестриктазы *BspACI*, а значит, содержащие ген функционально активной метилазы данной PM системы. Из одного из клонов была выделена плазида, названная pMBspACI, содержащая вставку длиной около 4 т.п.н.

**Генетическая организация PM системы BspACI и клонирование гена метилазы M1.BspACI.** Рекомбинантная плазида pMBspACI была использована для определения нуклеотидной последовательности встроенного фрагмента. После расшифровки последовательности нуклеотидов и анализа аминокислотной последовательности вставки выявлено две одинаково направленные открытые рамки трансляции (ОРТ), достаточно протяженные для того, чтобы кодировать гены PM-системы (ОРТ1, район 3139–4101, и ОРТ2,

район 1771–3138) (рис. 2). Соответствующие нуклеотидные и аминокислотные последовательности депонированы в базе данных GenBank (N).

Первая рамка кодирует полипептид из 320 а.о. с предсказанной молекулярной массой 36,57 кДа. Вторая ОРТ длиной 1367 п.н. кодирует полипептид из 455 а.о. с предсказанной молекулярной массой 50,58 кДа. Анализ аминокислотных последовательностей потенциальных белковых продуктов этих двух ОРТ показали их принадлежность к классу C5-метилтрансфераз. Плазида pMBspACI была использована для дальнейшего субклонирования. С помощью ПЦР с праймерами M1.ACup и M1.AClow был амплифицирован участок ДНК *B. psychrodurans* AC, содержащий ОРТ1 для последующего клонирования в составе экспрессирующего вектора pJW2 по сайтам *FauNDI* и *BamHI*. После трансформации лигазной смеси в штамм *E. coli* RRI и отбора выросших при 30° клонов была получена рекомбинантная плазида pM1.BspACI, несущая функционально активный ген *bspACIM1*.

**Выделение препарата ДНК-метилтрансферазы BspACI и определение оптимальных условий работы фермента.** M1.BspACI выделяли из клеточного экстракта *E. coli*, несущих рекомбинантную плазмиду pM1.BspACI с геном *bspACIM1*, путем колоночной хроматографии (рис. 3, а). Из 4,5 г сырой биомассы получено 4,5 мл раствора гомогенного препарата фермента с концентрацией 0,35 мкг/мкл (рис. 3, б).

На рис. 4 приведены зависимости активности M1BspACI от температуры, pH и концентраций ионов натрия и калия в реакционной среде. Видно, что максимальная активность фермента проявляется при 30°. При этой температуре наблюдаются также максимальные скорости гидролиза ДНК рестриктазой *BspACI* и роста штамма *B. psychrodurans* AC [3]. Все дальнейшие эксперименты проводили при 30°. Значение pH, соответствующее наибольшей активности фермента, равно 8, что соответствует обычному pH-оптимуму для ДНК-метилтрансфераз. Что касается зависимости активности фермента от концент-

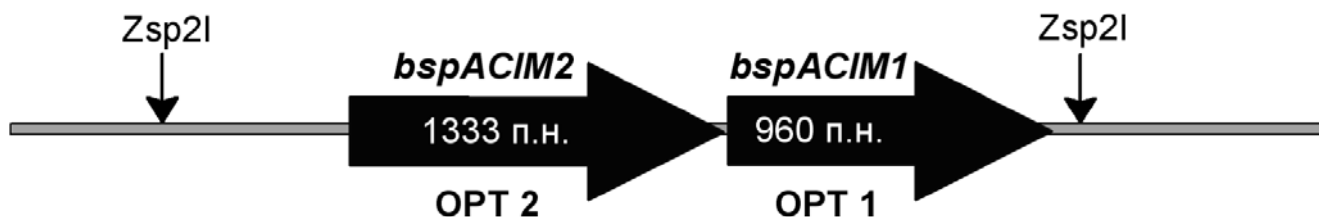
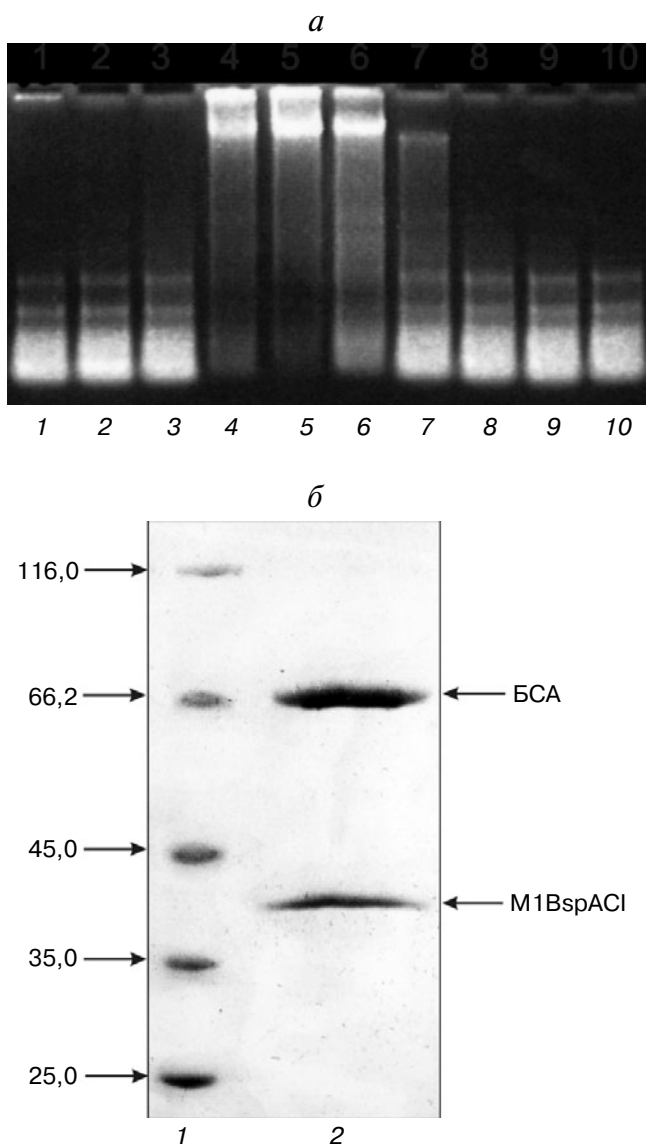


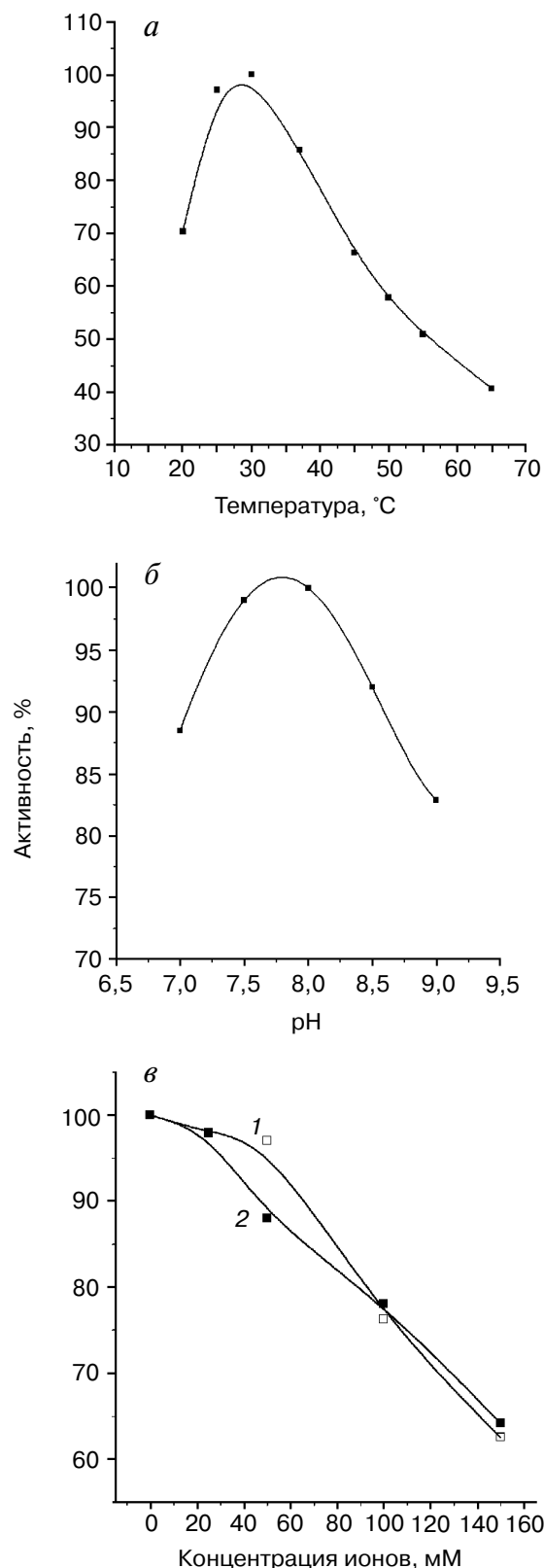
Рис. 2. Схема расположения генов ДНК-метилтрансфераз из системы рестрикции-модификации BspACI

рации ионов натрия и калия в реакционной среде, максимальная активность M1.BspACI проявляется при полном их отсутствии.

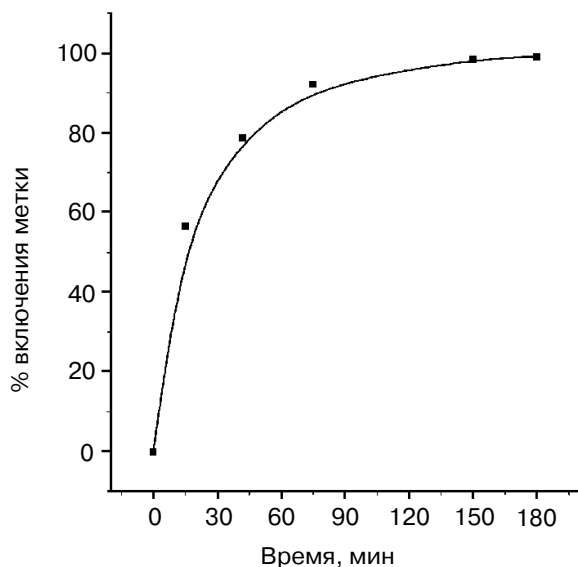
**Определение метилируемого основания.** После расщепления  $^3\text{H}$ -меченого дуплекса отдельно рестриктазами *FokI* и *AclWI* было получено восемь одноцепочечных фрагментов ДНК. Резуль-



**Рис. 3.** *a* – Электрофореграмма профиля активности M1BspACI после последней стадии хроматографии на ГАП. Тестирование активности фермента проводили по защите ДНК фага  $\lambda$  от гидролиза *BspACI*. Дорожки: 1–10 – каждая вторая фракция, начиная с 13-й; 4–6 – фракции со значительной ДНК-метилтрансферазной активностью; *б* – электрофореграмма высокоочищенного препарата фермента M1.BspACI. Дорожки: 1 – маркеры молекулярных масс (цифры слева указывают их молекулярные массы, кДа), 2 – 20 мкл препарата M1.BspACI



**Рис. 4.** Зависимость скорости метилирования ДНК фага ферментом M1.BspACI (концентрации: фермента – 49 нМ, ДНК фага  $\lambda$  в пересчете на сайты 5'-CCGC-3' – 1 мкМ,  $^3\text{H}$ SAM – 10 мкМ) от температуры (*a*), pH (*б*) и (*в*) – от концентраций ионов натрия (1) и калия (2)



**Рис. 5.** Зависимость концентрации метилированных сайтов ДНК фага  $\lambda$  от времени (концентрация сайтов 5'-CCGC-3' фага  $\lambda$  – 100 нМ, фермента M1.BspACI – 100 нМ и  $[^3\text{H}]\text{SAM}$  – 10 мкМ)

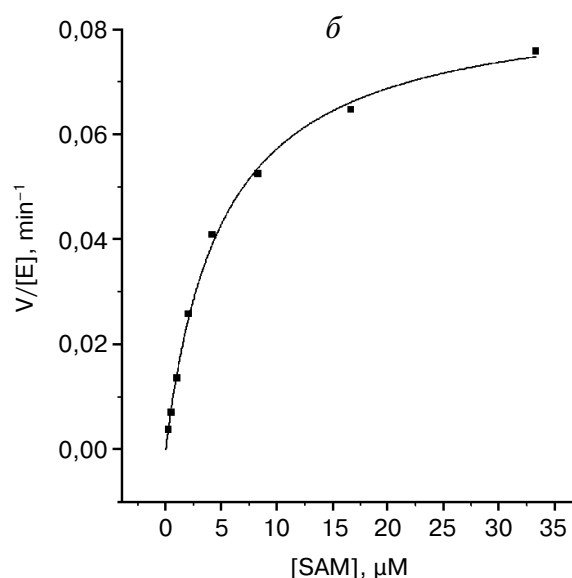
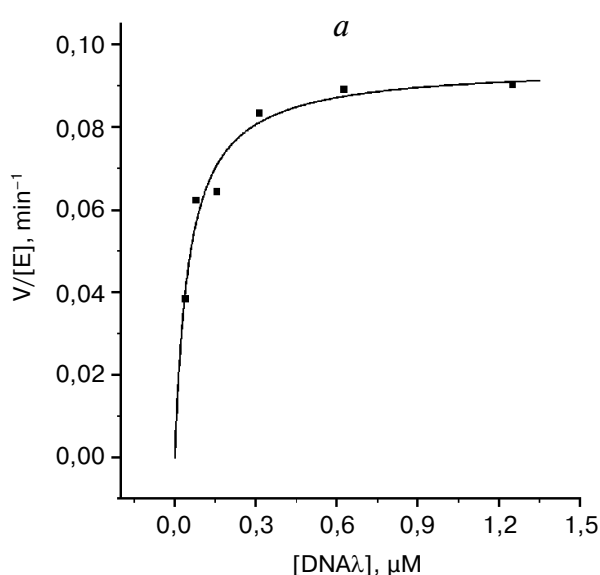
таты определения количества радиоактивной метки в каждом фрагменте приведены в табл. 1. Видно, что метка включается преимущественно во фрагменты длиной 21 и 20 нуклеотидов. Такая картина может наблюдаться только в том

случае, если M1.BspACI модифицирует первый цитозин последовательности 5'-CCGC-3'.

**Определение наличия неканонического метилирования.** Учитывая тот факт, что среди метилтрансфераз нередко встречаются ферменты с вырожденным сайтом узнавания [8, 9], мы решили проверить наличие неканонического метилирования у M1.BspACI. На рис. 5 представлен результат такого эксперимента. Видно, что фермент полностью метилирует ДНК  $\lambda$  и с течением времени нет тенденции к метилированию других сайтов, кроме 5'-CCGC-3'.

**Определение кинетических параметров реакции метилирования ДНК.** Измерение зависимости скорости метилирования от концентрации одного из субстратов проводили при насыщении другим субстратом. На рис. 6, а изображена зависимость скорости метилирования от концентрации ДНК фага  $\lambda$ . Значение константы Михаэлиса составило  $0,053 \pm 0,007$  мкМ. Значение каталитической константы составило  $0,095 \pm 0,002$  мин<sup>-1</sup>. Для анализа зависимости скорости метилирования ДНК от концентрации второго субстрата (SAM) использовали концентрацию сайтов метилирования, равную 2,15 мкМ. Зависимость скорости метилирования от концентрации SAM приведена на рис. 6, б. На основании полученных данных, значение константы Михаэлиса составило  $5,1 \pm 0,3$  мкМ.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что  $K_m$  ДНК у PIS-метилтрансфераз, модифици-



**Рис. 6.** Зависимость скорости метилирования ДНК фага  $\lambda$  ферментом M1.BspACI (время реакции 60 мин, концентрация фермента – 9,8 нМ). а – От концентрации ДНК (концентрация  $[^3\text{H}]\text{SAM}$  – 10 мкМ); б – от концентрации SAM (концентрация ДНК фага  $\lambda$  в пересчете на сайты 5'-CCGC-3' – 2,15 мкМ)

**Таблица 1.** Включение тритиевой метки в рестрикционные фрагменты, полученные после расщепления олигонуклеотидного дуплекса *FokI* и *AclWI*

| Рестриктазы, используемые для гидролиза | Рестрикционные фрагменты*            | Длина, н. | Радиоактивность, cpm |
|-----------------------------------------|--------------------------------------|-----------|----------------------|
| <i>AclWI</i>                            | Верхняя цепь                         |           |                      |
|                                         | 5'-GCATAAGGATGTGGATCAACC-3'          | 21        | 1184                 |
|                                         | 5'-GCAACGTACG-3'                     | 10        | 75                   |
|                                         | Нижняя цепь                          |           |                      |
|                                         | 5'-CGGTTGATCCACATCCTTATGCTATCGT-3'   | 28        | 90                   |
|                                         | 5'-CGTTG -3'                         | 5         | 56                   |
| <i>FokI</i>                             | Верхняя цепь                         |           |                      |
|                                         | 5'-GCATAAGGATGTGGATCAAC-3'           | 20        | 784                  |
|                                         | 5'-CGCAACGTACG-3'                    | 11        | 157                  |
|                                         | Нижняя цепь                          |           |                      |
|                                         | 5'-TGCGGTTGATCCACATCCTTATGCTATCGT-3' | 30        | 223                  |
|                                         | 5'-CGT-3'                            | 3         | 143                  |

\* Жирным шрифтом выделены основания, входящие в сайт узнавания M1.BspACI.

**Таблица 2.** Значения каталитических параметров для некоторых ДНК-метилтрансфераз IIS-типа

| Фермент, сайт узнавания* | Субстрат           | $k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup> | $K_m$ ДНК, нМ | $K_m$ SAM, мкМ | Ссылка        |
|--------------------------|--------------------|-------------------------------|---------------|----------------|---------------|
| <i>EcoRII</i> CCWGG      | ДНК фага $\lambda$ | 2,52                          | 0,22          | —              | [11]          |
| <i>EcoHK3II</i> YGGCCR   | плазмида pWM2372   | 3,0                           | 2             | 0,58           | [12]          |
| <i>MspI</i> CCGG         | ДНК фага $\lambda$ | 10,2                          | 1,8           | 0,013          | [13]          |
| M1.BspACI CCGC           | ДНК фага $\lambda$ | 0,095                         | 53            | 5,1            | Данная работа |

\* Жирным шрифтом выделены основания, модифицируемые данными метилазами.

рующих субстрат с образованием N6-метиладена или C5-метилцитозина, более чем на порядок выше, чем  $K_m$  ДНК у ферментов, узнающих симметричные последовательности [2, 9]. Полученное нами значение  $K_m$  ДНК M1.BspACI согласуется с данной закономерностью,  $K_m$  ДНК изучаемой метилазы более чем в 20 раз выше, чем максимальное из представленных в табл. 2 значений для C5-метилаз (M.EcoHK3II).

Интересным представляется сравнение каталитических констант ДНК-метилтрансфераз, узнающих палиндромные и непалиндромные последовательности ДНК. В целом значения этих констант для ферментов с симметричными сайтами узнавания выше, чем для ДНК-метилаз

IIS типа, модифицирующих как аденин [10], так и цитозин [9]. C5-метилтрансферазы IIS типа M1.BspACI и M. FauIA имеют значения  $k_{cat}$ , равные 0,095 и 0,052 мин<sup>-1</sup> [9] соответственно, что более чем в 25 раз ниже минимального значения этого параметра для представленных в табл. 2 C5-метилтрансфераз с палиндромными сайтами узнавания (2,52 мин<sup>-1</sup> у *EcoRII*).

Таким образом, в случае как N6-, так и C5-метилтрансфераз ферменты, узнающие палиндромные сайты узнавания, проявляют большую активность и эффективнее связываются с ДНК, чем метилтрансферазы, модифицирующие непалиндромные последовательности ДНК.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pingoud, A., and Jeltch, A. (2001) *Nucl. Acids Res.*, **29**, 3705–3727.
2. Чернухин В.А., Seggewiss, J., Каширина Ю.Г., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. (2009) *Мол. биол.*, **43**, 10–18.
3. Тарасова М.В., Джанобилова З.К., Томилова Ю.Э., Чернухин В.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. (2010) *Вестн. биотехнол. физ.-хим. биол.*, **5**, 16–24.
4. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) *Gene*, **33**, 103–119.
5. Wang, H., McConnell, D.J., and O'Mahony, D.J. (1990) *Nucl. Acids Res.*, **18**, 1070.
6. Smith, C.L., Klotz, S.R., and Cantor, C.R. (1987) in *Genome Analysis: A Practical Approach* (Davies, K., ed.), IRL Press, Oxford. UK.
7. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) 2<sup>nd</sup> ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
8. Malygin, E.G., Petrov, N.A., Gorbunov, T.A., Kossykh, V.G., and Hattman, S.M. (1997) *Nucl. Acids Res.*, **30**, 3880–3885.
9. Чернухин В.А., Каширина Ю.Г., Суханова К.С., Абдурашитов М.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. (2005) *Биохимия*, **70**, 829–837.
10. Чернухин В.А., Кузнецов В.В., Гончар Д.А., Каширина Ю.Г., Нетесова Н.А., Дегтярев С.Х. (2010) *Биохимия*, **75**, 78–87.
11. Kossykh, V.G., Schlagman, S.L., and Hattman, S. (1995) *FEBS Lett.*, **370**, 75–77.
12. Lee, K.F., Liaw Y., and Shaw, P.C. (1996) *Biochem. J.*, **314**, 321–326.
13. Bhattacharya, S.K., and Dubey, A.K. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 14743–14749.

**RECOMBINANT DNA-METHYLTRANSFERASE  
M1.BspACI FROM *Bacillus psychrodurans* AC:  
PURIFICATION AND PROPERTIES**

**M. V. Tarasova<sup>1,2\*</sup>, V. V. Kuznetsov<sup>3</sup>, N. A. Netesova<sup>3</sup>,  
D. A. Gonchar<sup>1</sup>, S. Kh. Degtyarev<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> SibEnzyme Novosibirsk, 630117 Russia;  
E-mail: tarasovamv@sibenzyme.ru

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>3</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector",  
Kol'tsovo, Novosibirsk region, 630559 Russia

Received May 20, 2010

Revision received June 22, 2010

A restriction–modification system from *Bacillus psychrodurans* AC (recognition sequence 5'-CCGC-3') comprises two DNA-methyltransferases: M1.BspACI and M2.BspACI. Gene *bspACIM1* was cloned in pJW2 vector and expressed in *E. coli* cells. High purity enzyme M1.BspACI preparation was obtained by chromatography on different carriers. Study of the properties of M1.BspACI revealed that the enzyme has temperature optimum 30°C and maximum activity at pH 8.0. M1.BspACI modifies the first cytosine in the sequence 5'-CCGC-3'. Kinetic parameters of the M1.BspACI DNA methylation reaction have been determined as follows:  $K_m$  for Lambda DNA is 0.053  $\mu\text{M}$ ,  $K_m$  for S-adenosyl-L-methionine is 5.1  $\mu\text{M}$ . The catalytic constant ( $k_{cat}$ ) is 0.095  $\text{min}^{-1}$ .

**Keywords:** DNA-methyltransferase, *Bacillus psychrodurans*, enzyme kinetics