

НОВАЯ МЕТИЛ-ЗАВИСИМАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА KfoI УЗНАЕТ И РАСЩЕПЛЯЕТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК 5'-G[^]C(5mC)GGC-3'

В.А. ЧЕРНУХИН*, Е.В. КИЛЕВА, Ю.Э. ТОМИЛОВА, А.А. БОЛТЕНГАГЕН, В.С. ДЕДКОВ, Н.А. МИХНЕНКОВА, Д.А. ГОНЧАР, Л.Н. ГОЛИКОВА, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Выделена новая метил-зависимая сайт-специфическая эндонуклеаза KfoI из *Kosciuska rosea* 307, узнающая и расщепляющая метилированную последовательность ДНК 5'-G[^]C(5mC)GGC-3'/3'-CGG(5mC)C[^]G-5' и не гидролизующая неметилированную ДНК. Новый фермент расщепляет обе цепи ДНК в последовательности узнавания в случае метилирования одного или двух центральных остатков цитозина. KfoI является первой сайт-специфической метил-зависимой эндонуклеазой, узнающей невырожденную шестинуклеотидную последовательность. Благодаря своей способности расщеплять только метилированную ДНК фермент KfoI может найти практическое применение в молекулярно-биологических работах, в частности, для определения статуса метилирования ДНК эукариот.

Ключевые слова: метилзависимые сайт-специфические эндонуклеазы, метилированная ДНК.

Наиболее изученными сайт-специфическими эндонуклеазами являются эндонуклеазы рестрикции типа II (рестриктазы), которые, как правило, являются частью бактериальной системы рестрикции-модификации, содержащей еще ДНК-метилтрансферазу. 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 рестриктазам близки по свойствам метилзависимые сайт-специфические эндонуклеазы, которые гидролизуют только метилированную ДНК. Первыми были обнаружены и описаны ферменты, узнающие и расщепляющие последовательность ДНК 5'-G(m6A)TC-3' [8]. Эндонуклеазы, расщепляющие 5-метилцитозин-содержащие последовательности ДНК, описаны сравнительно недавно [2–5]. Эти ферменты узнают определенные последовательности ДНК, содержащие 5-метилцитозин, не требуют кофакторов помимо ионов Mg²⁺, гидролизуют субстрат полностью и в тех же усло-

виях, что и эндонуклеазы рестрикции [10]. Вследствие этого, данные ферменты были названы метилзависимыми сайт-специфическими ДНК эндонуклеазами. К таким ферментам относится эндонуклеаза GlaI, которая узнает и расщепляет нуклеотидную последовательность 5'-Pu(5mC)[^]GPy-3'/3'-PyG[^](5mC)Pu-5' [2]. Описаны также сайт-специфические эндонуклеазы BlnI [3], BsiI [5], и GluI [4], которые способны узнавать и расщеплять C5-метилированную нуклеотидную последовательность 5'-GCNGC-3'.

В данной работе представлена новая метилзависимая сайт-специфическая эндонуклеаза KfoI, узнающая и расщепляющая последовательность ДНК 5'-G[^]CCGGC-3'/3'-CGGCC[^]G-5', в которой метилированы один или два центральных цитозина.

Материалы и методы

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы и компоненты питательных сред: Tris («Promega», США); акриламид, бис-акриламид, KH₂PO₄, NaHCO₃, ампициллин («Helicon», Россия); ЭДТА («Fluka AG», Швейцария), агароза («Hybaid-AGS», Германия), тритон X-100 («ICN», США), лизоцим («Serva», Германия), фенилметилсульфонил-фторид (PMSF) («Sigma», США), фосфоцеллюлоза P-11 («Whatman», Великобритания), гепаринсефароза («BioRad», США), триптон, дрожжевой экстракт

© 2011 г. Чернухин В.А., Килева Е.В., Томилова Ю.Э., Болтенгаген А.А., Дедков В.С., Михненко Н.А., Гончар Д.А., Голикова Л.Н., Дегтярев С.Х.

* Автор для переписки:

Чернухин Валерий Алексеевич,
630117 Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2/12
E-mail: valera@sibenzyme.ru

(«Organotechnie», Франция), ферменты и препараты ДНК (НПО «СибЭнзим»). Остальные реагенты — отечественного производства квалификации х.ч. Для проведения реакции гидролиза эндонуклеазой KgoI использовали SE-буфер «G» («СибЭнзим», Россия) следующего состава: 10 мМ Трис-НСl, рН 7,6; 10 мМ MgCl₂; 50 мМ NaCl; 1 мМ дитиотрейтол.

Выращивание штамма-продуцента. Выращивание штамма проводили в ферментере 1601-013 (LKB, Швеция) при температуре 30 °С в 10 л питательной среды, содержащей 1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 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 °С. В результате получали 100 г биомассы, которую хранили при -20 °С.

Выделение фермента. Все процедуры выделения фермента проводили при температуре 4 °С. 20 г замороженной биомассы суспендировали в 80 мл буфера А (10 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол), содержащего 0,05 М NaCl, 0,3 мг/мл лизоцим, 0,1 мМ RMSF, и инкубировали в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Далее клетки разрушали ультразвуком и центрифугировали в течение 30 мин. в роторе JA-20 на центрифуге «Beckman» J2-21 при 15000 об./мин.

Супернатант наносили на колонку с фосфоцеллюлозой P-11 объемом 40 мл, предварительно уравновешенную буфером А, содержащим 0,05 М NaCl. Белок элюировали линейным градиентом NaCl (0,05–1,0 М) в буфере А объемом 400 мл, собирая фракции по 10 мл. Фракции, содержащие эндонуклеазу, объединяли и наносили на колонку с гидроксиапатитом объемом 4 мл, предварительно уравновешенную буфером В (0,01 М K₂HPO₄, рН 7,2, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол).

Колонку промывали 10 мл буфера В и проводили элюцию линейным градиентом K₂HPO₄ (0,01–0,2 М), собирая фракции объемом по 4 мл. Активные фракции объединяли и наносили на колонку с гепаринсефарозой объемом 4 мл. Элюцию проводили линейным градиентом NaCl (0,05–0,5 М) в буфере А объемом 120 мл, собирая фракции по 3 мл.

Активные фракции объединяли и диализовали против 20 объемов концентрирующего буфера (10 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол, 0,05 М NaCl, 50% глицерин). Препарат хранили при -20 °С.

Конструирование плазмид. Плазида рМНраII-1 была получена путем клонирования ПЦР-фрагмента геномной ДНК *Haemophilus parainfluenzae*, длиной 1156 п.о., содержащего ген ДНК-метилтрансферазы М.НраII, в вектор рМТL22 по сайтам эндонуклеаз рестрикции PstI (перед стартовым кодоном) и XbaI (после стоп-кодона).

Для получения ПЦР-фрагмента использовали следующие праймеры:

- М.НраII_up (Pst): 5'-agagatacagactgcagtttatgaaa gatgtg-3';
- М.НраII_low (XbaI): 5'-gccataatctagaccggcgta aggtcactccac-3'.

Второй праймер содержит последовательность 5'-GCCGGC-3' рядом с сайтом узнавания рестриктазы XbaI. В плазмиде рМНраII-1 присутствуют три сайта 5'-GCCGGC-3'.

Плазида рММspI-1 была получена путем клонирования ПЦР-фрагмента геномной ДНК *Moraxella species*, длиной 1341 п.о., содержащего ген М.МspI, в вектор рМТL22 по сайтам эндонуклеаз рестрикции BamHI (перед стартовым кодоном) и PstI (после стоп-кодона).

Для получения ПЦР-фрагмента использовали следующие праймеры:

- М.МspI_up (BamHI): 5'-agatttggatcccaaatgaaacc tgaatattg-3';
- М.МspI_low (PstI): 5'-gtcggactgcaggccggctaactg aatttcgtatatga-3'.

Второй праймер содержит последовательность 5'-GCCGGC-3' рядом с сайтом узнавания рестриктазы PstI. В плазмиде рММspI-1 присутствуют два сайта 5'-GCCGGC-3'.

Гидролиз плазмидной и фаговой ДНК эндонуклеазой KgoI и электрофорез продуктов гидролиза. Гидролиз ДНК проводили при 37 °С в течение 2 часов в 20 мкл реакционной смеси, содержащей буфер следующего состава: 10 мМ Трис-НСl (рН 8,5 при 25 °С); 20 мМ NaCl, 3 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотрейтол и ДНК в количестве 0,5 мкг. Для разделения продуктов гидролиза плазмидной ДНК применяли электрофорез в 1% агарозном геле в буфере ТАЕ. В качестве маркера молекулярных масс ДНК в электрофореграммах использовали 1 kb ДНК-маркеры (от 250 п.о. до 10000 п.о.) («СибЭнзим», Россия).

Определение позиции гидролиза ДНК на олигонуклеотидных дуплексах. Позиции гидролиза ДНК сайт-специфической эндонуклеазой KgoI были установлены путем сравнения длин фрагментов, образующихся при расщеплении ³²P-меченных синтетических олигону-

клеотидных дуплексов эндонуклеазами KroI и MroNI. В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой III из *E. coli*. Расщепление ДНК проводили в оптимальных условиях в течение 1 часа. Фрагменты ДНК, образующиеся в результате расщепления олиго-

нуклеотидных дуплексов, разделяли электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ с 7 М мочевиной.

В работе использовались олигонуклеотидные дуплексы, полученные гибридизацией из следующих синтетических олигонуклеотидов, синтезированных в НПО «Сибэнзим» (Россия):

17	5'-CCATAGGATGCCTCTATGGCCGGCCACGGACCGTATC-3'
18	5'-GATACGGTCCGTGGCCGGCCATAGAGGCATCCTATGG-3'
19	5'-CCA55'-AGGATGCCTCTATGGC(5mC)GGCCACGGACCGTATC-3'
20	5'-GATACGGTCCGTGGC(5mC)GGCCATAGAGGCATCCTATGG-3'
21	5'-GCTAG TTGGA AGGCC GGCGA AGAAT GATG-3'
22	5'-CATC ATTCTTCGCC GGCCT TCCAA CTAGC-3'
23	5'-GCTAG TTGGA AGGC(5mC) GGCGA AGAAT GATG-3'
24	5'-CATC ATTCTTCGC(5mC) GGCCT TCCAA CTAGC-3'

Результаты и обсуждение

Микробиологическое описание штамма-продукта. Бактериальный штамм-продуцент фермента KroI был выделен из образца почвы. Штамм *Kocuria rosea* 307 характеризуется следующими признаками. Клетки кокковидные, размером 1–2 мкм в диаметре. Спор не образуют. Грамположительные. Облигатно аэробные. Каталазоположительные. Растут при температуре от 10 до 40 °С, при pH от 6 до 9.

На основании анализа морфологических и биохимических свойств по определителю [1], а также с помощью анализа первичной структуры фрагмента гена 16S РНК [9] штамм идентифицировали как вид бактерии *Kocuria rosea* (старое видовое название *Micrococcus roseus*).

Получение препарата фермента. Фермент выделяли из клеточного экстракта путем последовательных хроматографических процедур, как описано в разделе «Материалы и методы». Выход фермента составил 1,5 мл препарата с концентрацией 1000 ед./мл.

Определение субстратной специфичности KroI. В качестве субстратов для определения специфичности нового фермента использовали метилированные и неметилированные ДНК фагов λ (предварительно расщепленную рестриктазой AspA2I по единственному сайту узнавания, для облегчения визуализации на электрофореze продуктов гидролиза эндонуклеазами MroNI и KroI) и T7, а также ДНК плазмиды pBR322. Отдельно с помощью метилазы M.SssI проводили метилирование всех 5'-CG-3'-динуклеотидов в ДНК фага λ и плазмиде pBR322, а затем гидролизовали такую метилированную ДНК ферментом KroI. В качестве контроля использовали

гидролиз субстратов эндонуклеазой рестрикции MroNI (неоизомер NaeI), которая расщепляет немодифицированную последовательность 5'-G[^]CCGGC-3'. При анализе специфичности проверяли также способность KroI расщеплять ДНК фага λ , в которой с помощью M.CviPI предварительно были метилированы цитозины во всех динуклеотидах 5'-GC-3'.

На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов расщепления ДНК фагов λ и T7, а также плазмиды pBR322 эндонуклеазой KroI.

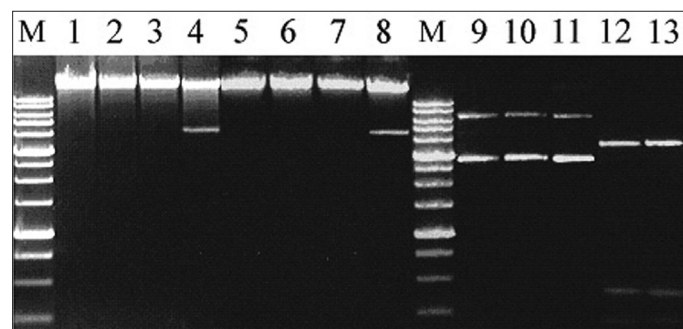


Рис.1. Электрофореграмма продуктов расщепления субстратных ДНК эндонуклеазами KroI и MroNI. Дорожки: 1 – ДНК фага λ , обработанная рестриктазой AspA2I (λ /AspA2I); 2 – ДНК λ /AspA2I + M.SssI; 3 – ДНК λ /AspA2I + M.CviPI; 4 – ДНК λ /AspA2I + MroNI; 5 – ДНК λ /AspA2I + M.SssI + MroNI; 6 – ДНК λ /AspA2I + KroI; 7 – ДНК λ /AspA2I + M.CviPI + KroI; 8 – ДНК λ /AspA2I + M.SssI + KroI; 9 – ДНК pBR322; 10 – ДНК pBR322 + M.SssI; 11 – ДНК pBR322 + KroI; 12 – ДНК pBR322 + MroNI; 13 – ДНК pBR322 + M.SssI + KroI; M – 1 kb маркеры молекулярной массы ДНК.

Как видно на рисунке 1, KroI не расщепляет неметилированную ДНК фага λ (дор. 6), ДНК фага λ , метилированную по последовательности 5'-GC-3' метилазой M.CviPI (дор. 7), и неметилированную ДНК плазмиды pBR322 (дор. 11). Однако после обработки ДНК фага λ и плазмиды pBR322 метилазой SssI, метилирующей последовательность 5'-CG-3', эндонуклеаза KroI расщепляет такую метилированную ДНК (дор. 8 и 13). Картина расщепления ДНК λ /AspA2I рестриктазой MroNI (дор. 4) совпадает с картиной гидролиза эндонуклеазой KroI ДНК λ /AspA2I, метилированной ферментом SssI (дор. 8). Аналогично картина гидролиза плазмиды pBR322 рестриктазой MroNI (дор. 12) совпадает с картиной гидролиза эндонуклеазой KroI ДНК pBR322, метилированной SssI (дор. 13).

Совпадение картин гидролиза метилированной и неметилированной ДНК эндонуклеазами KroI и MroNI, соответственно, подтверждают, что эти два фермента узнают одну и ту же последовательность ДНК 5'-GCCGGC-3'/3'-CGGCCG-5', однако MroNI расщепляет эту последовательность только если она не метилирована, а KroI, наоборот, только если она метилирована, то есть, сайтом узнавания KroI является последовательность 5'-GC(5mC)GGC-3'/3'-CGG(5mC)CG-5'. При этом не наблюдается гидролиза последовательности 5'-G(5mC)CGG(5mC)-3'/3'-(5mC)GGC(5mC)G-5', в которой центральные цитозины неметилированы (дор. 7).

Для подтверждения сайта узнавания и определения активности фермента KroI мы сконструировали плазмиду pMHPaII-1 (см. «Материалы и методы»), которая содержит метилазу M.HpaII. Метилаза M.HpaII метилирует сайт 5'-CCGG-3' с образованием 5'-C(5mC)GG-3'/3'-GG(5mC)C-5', вследствие чего все три сайта 5'-GCCGGC-3', имеющиеся в плазмиде pMHPaII-1 (один находится внутри гена метилазы M.HpaII, а еще два — в составе вектора), метилированы по центральным цитозинам.

Кроме того, мы сконструировали плазмиду pMMspI-1 (см. «Материалы и методы»), которая содержит метилазу M.MspI. Метилаза M.MspI также модифицирует сайт CCGG, однако метилированию подвергаются крайние цитозины с образованием последовательности 5'-(5mC)CGG-3'/3'-GGC(5mC)-5', вследствие чего в плазмиде pMMspI-1 присутствуют два сайта 5'-G(5mC)CGGC-3'/3'-CGGC(5mC)G-5'.

Результаты обработки ДНК плазмид pMHPaII-1 и pMMspI-1, предварительно линейаризованных эндонуклеазой рестрикции DriI, приведены на рисунке 2. Видно,

что ДНК pMHPaII-1/DriI расщепляется эндонуклеазой KroI с образованием трех фрагментов. Данная картина

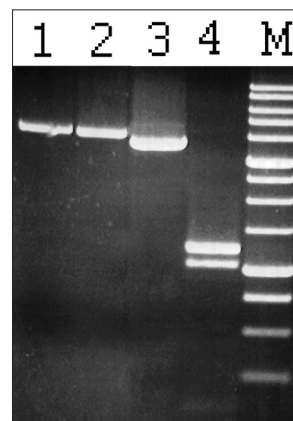


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов гидролиза ДНК плазмид pMHPaII-1 и pMMspI-1 эндонуклеазой KroI. Дорожки: 1 — ДНК pMMspI-1/DriI; 2 — ДНК pMMspI-1/DriI + KroI; 3 — ДНК pMHPaII-1/DriI; 4 — ДНК pMHPaII-1/DriI + KroI; M — 1 kb маркеры молекулярной массы ДНК

расщепления соответствует теоретически рассчитанной картине гидролиза ДНК этой плазмиды по сайту узнавания 5'-GCCGGC-3' (должны образовываться фрагменты длиной 1250, 1215, 1060 и 101 п.о.). Из рисунка 2 также следует, что ДНК pMMspI-1/DriI не расщепляется эндонуклеазой KroI (дор. 2), хотя в этой плазмиде содержатся два сайта 5'-G(5mC)CGGC-3'/3'-CGGC(5mC)G-5'.

Таким образом, метил-зависимая сайт-специфическая эндонуклеаза KroI не способна расщеплять метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)CGGC-3'/3'-CGGC(5mC)G-5', однако расщепляет последовательность GC(5mC)GGC-3'/3'-CGG(5mC)CG-5'.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что метилирование центральных остатков цитозина в последовательности 5'-GCCGGC-3'/3'-CGGCCG-5' является необходимым условием для проявления активности KroI.

Определение активности фермента. Для определения активности фермента KroI использовалась плазида pMHPaII-1. За одну единицу активности сайт-специфической эндонуклеазы KroI мы принимали такое минимальное количество фермента, при котором происходит полный гидролиз 1 мкг ДНК плазмиды pMHPaII-1, предварительно линейаризованной рестриктазой DriI, в 50 мкл реакционной смеси в оптимальных условиях: при 37 °C. На рисунке 3 приведена электро-

фореграмма агарозного геля после нанесения ДНК плазмиды рМНраII-1/DriI, обработанной 0,5, 1 и 2 мкл препарата KroI (дор. 2, 3 и 4, соответственно). Из данных на рисунке 3 следует, что активность фермента составляет 1 ед./мкл.

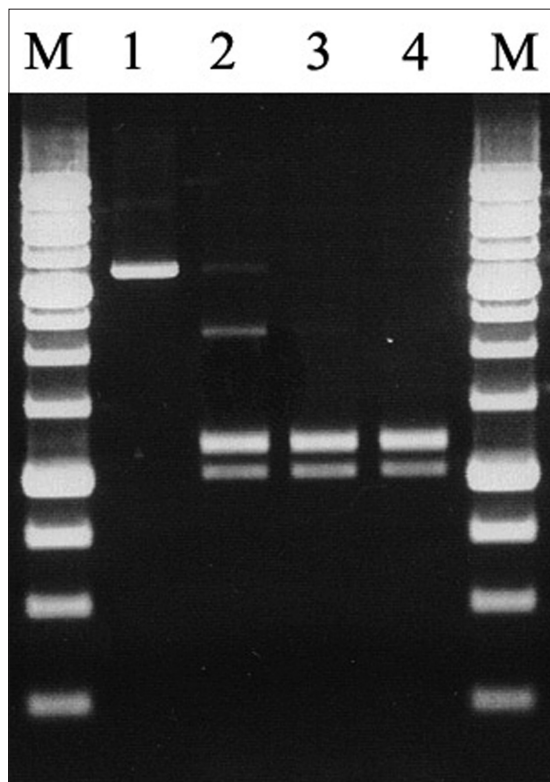


Рис. 3. Определение активности препарата KroI. Дорожки: 1 – ДНК рМНраII-1/DriI; 2 – ДНК рМНраII-1/DriI + 0,5 мкл препарата фермента KroI; 3 – ДНК рМНраII-1/DriI + 1 мкл препарата фермента KroI; 4 – ДНК рМНраII-1/DriI + 2 мкл препарата фермента KroI; М – 1 kb маркеры молекулярной массы ДНК

Определение позиции гидролиза ДНК эндонуклеазой KroI. Для подтверждения правильности установленной последовательности узнавания KroI и определения позиции расщепления ДНК мы проводили гидролиз синтетических олигонуклеотидных дуплексов, образованных из олигонуклеотидов 17, 18, 19, 20 (первичную структуру см. «Материалы и методы»).

Олигонуклеотиды 17 и 19 комплементарны олигонуклеотидам 18 и 20. Дуплексы 17/18 и 19/20 имеют сходную последовательность и отличаются друг от друга только наличием или отсутствием 5-метилцитозина в последовательности 5'-GCCGGC-3'/3'-CGGCCG-5'.

Определение места гидролиза ДНК KroI осуществляли путем сравнения длин фрагментов, образуемых при расщеплении эндонуклеазой рестрикции MroNI

неметилированного олигонуклеотидного дуплекса, образованного из олигонуклеотидов 17 и 18, и гидролиза эндонуклеазой KroI метилированного дуплекса, образованного из олигонуклеотидов 19 и 20. В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой EhoIII из *E. coli*.

На рисунке 4 приведен радиоавтограф разделения продуктов расщепления радиоактивно меченных дуплексов 17*/18 (знаком «*» указан меченый олигонуклеотид) и 19*/20 в 20% ПААГ, с 7 М мочевиной. Как видно на этом рисунке, фрагменты ДНК, образованные гидролизом MroNI и KroI соответствующих дуплексов, имеют одинаковую длину, что говорит об идентичности позиций гидролиза узнаваемой последовательности у этих ферментов.

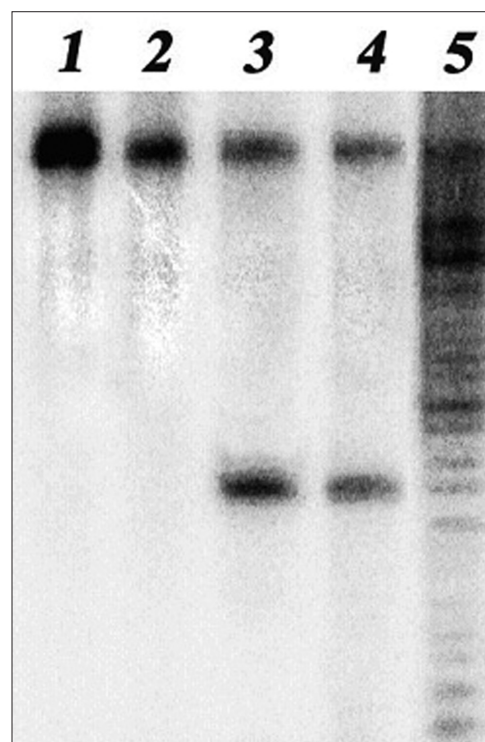


Рис. 4. Определение позиции расщепления ДНК эндонуклеазой KroI. Дорожки: 1 – дуплекс 17*/18; 2 – дуплекс 19*/20; 3 – дуплекс 18*/17, обработанный рестриктазой MroNI; 4 – дуплекс 19*/20, обработанный KroI; 5 – дуплекс 19*/20, обработанный экзонуклеазой EhoIII

На основе полученных результатов можно сделать вывод, что в палиндромной последовательности 5'-GC(5mC)GGC-3' эндонуклеаза KroI расщепляет ДНК перед первым остатком цитозина с образованием четырехнуклеотидных 5'-выступающих концов аналогично рестриктазе MroNI.

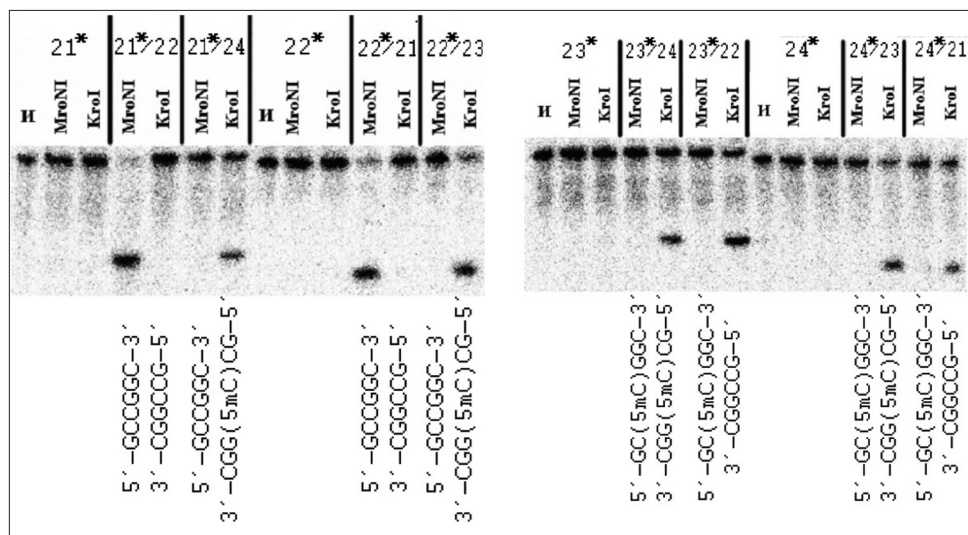


Рис. 5. Радиоавтограф продуктов гидролиза олигонуклеотидов ферментами MroNI и KfoI. Наверху над дорожками приведены номера используемых олигонуклеотидных дуплексов. Символом «*» обозначен меченый олигонуклеотид, буквой «И» обозначен исходный меченый олигонуклеотид или олигонуклеотидный дуплекс

Расщепление олигонуклеотидов ферментами MroNI и KfoI. Мы также проверили способность ферментов MroNI и KfoI расщеплять различные олигонуклеотиды и олигонуклеотидные дуплексы, содержащие метилированные цитозины. В качестве субстратов мы использовали олигонуклеотиды 21, 22, 23, 24, а также олигонуклеотидные дуплексы, образованные ими (см. структуру в «Материалах и методах»).

На рисунке 5 изображен радиоавтограф разделения электрофорезом в 20% ПААГ с 7 М мочевиной продуктов расщепления радиоактивно меченных неметилированных, полуметилированных и полностью метилированных олигонуклеотидных дуплексов, а также отдельных олигонуклеотидов.

Как продемонстрировано на рисунке 5, ферменты MroNI и KfoI не расщепляют одноцепочечные олигонуклеотиды, содержащие последовательность 5'-GCCGGC-3' и 5'-GC(5mC)GGC-3'. При этом неметилированные дуплексы 21*/22 и 22*/21 расщепляются рестриктазой MroNI, но не расщепляются эндонуклеазой KfoI.

Из данных, приведенных на рисунке 5, также следует, что KfoI расщепляет не только дуплексы, в которых в сайте узнавания метилированы оба центральных цитозина (дуплексы 23*/24 24*/23), но и полуметилированный субстрат (то есть содержащий последовательность 5'-GC(5mC)GGC-3'/3'-CGGCCG(5mC)-5' с одной метильной группой). На полуметилированном субстрате KfoI расщепляет как неметилированную цепь (дуплекс 22*/23, 21*/24), так и метилированную цепь (дуплекс

23*/22, 24*/21). В то же время рестриктаза MroNI не расщепляет олигонуклеотидные дуплексы с полуметилированным сайтом, что соответствует общим свойствам эндонуклеаз рестрикции.

Таким образом, эндонуклеаза KfoI узнает и эффективно расщепляет обе цепи последовательности 5'-G[^]CCGGC-3'/3'-CGGCCG[^]G-5' при наличии в ней 5-метилцитозина в третьем положении в одной или обеих цепях ДНК. Следовательно, новый фермент может использоваться для выявления сайтов 5'-GCCGGC-3'/3'-CGGCCG-5', метилированных ДНК-метилтрансферазой HpaII, причем та же последовательность, модифицированная M.MspI, будет устойчива к действию KfoI.

KfoI является первой описанной метил-зависимой сайт-специфической эндонуклеазой, узнающей невырожденную шестинуклеотидную последовательность. Примечательно, что узнаваемая последовательность (за исключением статуса метилирования) и место гидролиза ДНК ферментом KfoI совпадают с сайтом узнавания фермента MroNI. Более того, оба этих фермента были выделены из разных штаммов бактерий, но одного и того же вида *Micrococcus roseus* (новое название — *Kocuria rosea*).

Ранее была описана подобная пара ферментов. Метил-зависимая сайт-специфическая эндонуклеаза DpnI имеет сайт узнавания 5'-G(m6A)TC-3'/3'-CT(m6A)G-5', тогда как рестриктаза DpnII узнает неметилированную последовательность 5'-GATC-3'/3'-CTAG-5'. Однако, в отличие от пары MroNI-KfoI, DpnI

расщепляет ДНК с образованием тупых концов, тогда как DpnII образует 5'-выступающие четырехнуклеотидные липкие концы [7]. Таким образом, нами подтверждено существование пар бактерий, относящихся к одному и тому же виду и продуцирующих эндонуклеазы с одинаковой последовательностью узнавания, но с разным статусом метилирования.

Эндонуклеаза KroI может быть полезна для выявления и анализа метилированных участков ДНК. В частности, пара KroI/MroNI(NaeI) может применяться в эпигенетических работах аналогично паре ферментов HpaII и MspI, уже давно используемых в таких экспериментах [6].

Литература

1. 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.
2. Чернухин В.А., Наякина Т.Н., Абдурашитов М.А., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Михненко Н.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции Glal узнает метилированную последовательность 5'-GCCG-3' // Биотехнология. — 2006. — № 4. — С. 31–35.
3. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуз Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Сайт-специфическая эндонуклеаза BIsI узнает последовательности ДНК 5'-G(5mC)NGC-3' и расщепляет ее с образованием 3'-выступающих концов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 1. — С. 28–33.
4. Чернухин В.А., Чмуз Е.В., Томилова Ю.Э., Наякина Т.Н., Гончар Д.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая эндонуклеаза Glul узнает 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.
5. Чмуз 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 BIsI из *Bacillus subtilis* T30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)^NGC-3' // Биотехнология. — 2005. — № 3. — С. 22–26.
6. Bird A.P., Southern E.M. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis* // J. Mol. Biol. — 1978. — Vol. 118 — P. 27–47.
7. Campa A.G., Springhorn S.S., Kale P., Lacks S.A. Proteins encoded by the DpnI restriction gene cassette. Hyperproduction and characterization of the DpnI endonuclease // Biol. Chem. — 1988. — Vol. 63. — P. 14696–14702. (ТАК?!)
8. Lacks S. and Greenberg B.J. A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA // Biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. — P. 4060–4066.
9. Madden T.L., Tatusov R.L. and Zhang J. Applications of network BLAST server // Meth. Enzymol. — 1996. — Vol. 266. — P. 131–141.
10. Pingoud A., and Jeltch A. Structure and function of type II restriction endonucleases // Nucleic Acid Res. — 2001. — Vol. 29. — P. 3705–3727.

Список сокращений:

5mC — 5-метилцитозин,
 М. — ДНК-метилтрансфераза,
 п.о. — пар оснований в ДНК,
 ед. — единица активности,
 RMSF — фенилметилсульфонилфторид,
 EhoIII — экзонуклеаза III из *E. coli*,
 ПААГ — полиакриламидный гель.

A NEW METHYL-DIRECTED SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE KroI RECOGNIZES AND CUTS DNA SEQUENCE 5'-G^C(5mC)GGC-3'

V.A. CHERNUKHIN, E.V. KILEVA, Ju.E. TOMILOVA, A.A. BOLTENGAGEN, V.S. DEDKOV,
 N.A. MIKHENKOVA, D.A. GONCHAR, L.N. GOLIKOVA, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

We have discovered and purified a new methyl-directed site-specific DNA endonuclease KroI from bacterial strain *Kocuria rosea* 307. KroI recognizes and cuts DNA sequence 5'-G^C(5mC)GGC-3'/3'-CGG(5mC)C^G-5' and doesn't cleave unmethylated DNA. A new enzyme cleaves both strands of the recognition sequence if one or two central cytosines are methylated. KroI is a first methyl-directed site-specific DNA endonuclease that recognizes the non-degenerate hexanucleotide sequence. Due to its ability to cleave only modified DNA KroI may find a practical application in genetic engineering experiments as well as in determination of DNA methylation status.

Keywords: methyl-directed site-specific DNA endonuclease, DNA methylation.