

НОВАЯ МЕТИЛЗАВИСИМАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДНК-ЭНДОНУКЛЕАЗА MteI РАСЩЕПЛЯЕТ ДЕВЯТИНУКЛЕОТИДНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ 5'-G(5MC)G(5MC)NG(5MC)GC-3'/3'-CG(5MC)GN(5MC)G(5MC)G-5'

В.А. ЧЕРНУХИН*, Д.А. ГОНЧАР, Е.В. КИЛЕВА, В.А. СОКОЛОВА, Л.Н. ГОЛИКОВА,
В.С. ДЕДКОВ, Н.А. МИХНЕНКОВА, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Новая метилзависимая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза MteI выделена из штамма бактерии *Microbacterium testaceum* 17В. Фермент узнает С5-метилованную последовательность ДНК и не гидролизует неметилованную ДНК. MteI является первой из метилзависимых сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз, узнающих протяженный сайт; при этом активность фермента зависит от числа 5-метилцитозинов и их положения в узнаваемой последовательности. MteI расщепляет сайт 5'-G(5mC)G(5mC)[^]NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN[^](5mC)G(5mC)G-5' как указано стрелками, и эта последовательность является минимальным сайтом узнавания. Активность фермента существенно возрастает при замене в минимальном сайте узнавания 5'-GC-3' динуклеотидов на 5'-G(5mC)-3' динуклеотиды и появлении дополнительных 5'-G(5mC)-3' динуклеотидов на 5'-концах нонануклеотида в обеих цепях ДНК. Благодаря своей способности расщеплять только протяженные метилированные последовательности ДНК фермент MteI может найти практическое применение в молекулярно-биологических и эпигенетических работах.

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

Введение

Метилзависимыми сайт-специфическими ДНК-эндонуклеазами (МСС ДНК-эндонуклеазами) называют ферменты, которые узнают и расщепляют определенные метилированные последовательности ДНК и не гидролизуют немодифицированную ДНК. По своим свойствам эти ферменты похожи на хорошо изученные эндонуклеазы рестрикции и так же, как рестриктазы, они не требуют кофакторов помимо ионов Mg²⁺.

В настоящее время известно несколько МСС ДНК-эндонуклеаз, узнающих и расщепляющих ДНК по последовательностям, содержащим 5-метилцитозин. В частности, к ним относится ДНК-эндонуклеаза GlaI, которая гидролизует метилированную последовательность ДНК 5'-R(5mC)GY-3', где R — пурин, Y — пиримидин [3].

Различные МСС ДНК-эндонуклеазы могут узнавать сходные последовательности ДНК, отличающиеся только узором метилирования. Так, ферменты BlnI, BsiI, PkrI и GluI узнают и расщепляют С5-метилованную нуклеотидную последовательность 5'-GCNGC-3', однако первые два из них способны расщеплять эту последовательность при наличии в ней хотя бы двух 5-метилцитозинов, тогда как в случае PkrI и GluI для эффективного гидролиза требуется 3 и 4 метилированных основания, соответственно [4–7].

В данной работе описана новая МСС ДНК-эндонуклеаза MteI, узнающая и расщепляющая девятинуклеотидную метилированную последовательность ДНК.

Материалы и методы

Препараты ферментов и субстраты для них.

Для экспериментов использовали препараты ДНК фагов λ, T7 и различных С5-метилованных плазмид, которые были сконструированы ранее [3, 6, 7], или в данной работе, как описано ниже. Кроме того, использовали эндонуклеазы рестрикции, T4 ДНК-лигазу, T4 полинуклеотидкиназу, ДНК-метилтрансферазы HspAI

© 2012 г. Чернухин В.А., Гончар Д.А., Килева Е.В.,
Соколова В.А., Голикова Л.Н., Дедков В.С.,
Михненко Н.А., Дегтярев С.Х.

* Автор для переписки:

Чернухин Валерий Алексеевич

630117 Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2/12

E-mail: valera@sibenzyme.ru

и Fsp4HI и буферные растворы для них производства НПО «СибЭнзим» (Россия).

В качестве маркера молекулярных масс ДНК при получении электрофореграмм в агарозных гелях использовали ДНК-маркер 1 kb («СибЭнзим», Россия).

Выращивание штамма-продуцента. Для получения биомассы клетки штамма-продуцента подрачивали в чашке Петри на агаризованной среде LB (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl, pH 7,5, 0,5% агар-агар) в течение ночи при 30 °С. Свежевыращенные колонии переносили стерильной бактериологической петлей в колбы, содержащие жидкую питательную среду LB и культивировали на качалках при 30 °С при перемешивании — 150 об./мин. до достижения стационарной фазы роста. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 об./мин. при 4 °С на центрифуге «Beckman» (США) в роторе JA-10.

Выделение фермента. Условия проведения выделения и используемые буферы. Выделение проводили при 4 °С с использованием растворов:

- буфер А — 10 mM Трис-HCl pH 7,6; 0,1 mM ЭДТА и 7 mM 2-меркаптоэтанол;
- буфер Б — 10 mM К-фосфат pH 7,2; 0,1 mM ЭДТА и 7 mM 2-меркаптоэтанол.

Экстрагирование. 20 г биомассы суспендировали в 60 мл буфера А с добавлением 0,2 M NaCl, 1 mM фенилметилсульфонилфторида, 0,1 мг/мл лизоцимома. Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Soniprep 150 («MSE», Англия) с диаметром адаптера 2 см. Обработку проводили при амплитуде 20 мкм 8 раз по 1 мин. с интервалами на охлаждение в ледяной бане по 1 мин. Экстракт осветляли центрифугированием при 15000 об./мин. в течение 30 мин в роторе JA-20 на центрифуге J2-21 («Beckman», США).

Хроматография на фосфоцеллюлозе. Экстракт наносили на колонку объемом 30 мл, уравновешенную буфером А с 0,2 M NaCl, и промывали двумя колоночными объемами буфера А с 0,2 M NaCl. Сорбированный материал вымывали градиентом NaCl от 0,2 до 1 M объемом 300 мл. В итоге получили 50 фракций, из которых отобрали и объединили фракции с 20-й по 30-ю, содержащие целевую активность.

Хроматография на гидроксипатите. Объединенные фракции наносили на колонку с гидроксипатитом объемом 4 мл, уравновешенную буфером Б, и промывали восемью мл буфера Б. Сорбированный материал вымывали линейным градиентом буфера Б от 0,01 M до 0,2 M К-фосфата объемом 150 мл. Было получено 150

фракций, из которых объединяли фракции с 10 по 18, содержащие целевую активность.

Хроматография на гепарин-сефарозе. Объединенные фракции наносили на колонку с 4 мл гепарин-сефарозы, уравновешенную буфером А с 0,1 M NaCl, и промывали восемью мл 0,1 M NaCl в буфере А. Сорбированный материал вымывали буфером А с линейным градиентом NaCl от 0,1 M до 0,6 M объемом 150 мл. Всего было получено 40 фракций, из которых объединяли фракции с 15 по 23, содержащие целевую активность.

Концентрирование и хранение препарата. Полученную объединенную фракцию, содержащую целевую активность, диализовали в течение 20 ч против 300 мл буфера А с 55% глицерином, 0,25 M NaCl и хранили при -20 °С.

Конструирование плазмид, содержащих C5-метилованную ДНК. С целью определения субстратной специфичности и активности MteI мы сконструировали ряд плазмид, содержащих в своем составе гены ДНК-метилтрансфераз HspAI и Fsp4HI.

Конструирование C5-метилованных плазмид, содержащих ген ДНК-метилтрансферазы HspAI. Все новые плазмиды, содержащие метилазу HspAI, были созданы на основе плазмиды pHspAI (4118 п.н.), которая была ранее получена путем лигирования вектора pUC19/EcoRI и фрагмента геномной ДНК бактериального штамма *Haemophilus species* AI, включающего ген ДНК-метилтрансферазы HspAI [1=3]. Штамм *E. coli*, несущий эту плазмиду, содержит активную метилазу HspAI, метилирующую первый цитозин в положении C5 на обеих цепях последовательности 5'-GCCG-3' с образованием метилированной двуцепочечной последовательности 5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5'.

В ходе данной работы мы встраивали в ДНК плазмиды pHspAI путем лигирования различные олигонуклеотидные дуплексы по сайтам рестрикции PstI и Psp124BI.

В результате были получены четыре новые плазмиды, несущие дополнительные метилированные участки, образованные в результате модификации последовательностей встроенных олигонуклеотидных дуплексов метилазой HspAI.

1) pHspAI2 была получена путем встраивания фрагмента ДНК, образованного из следующих синтетических олигонуклеотидов:

- Gl-1: 5'-c ggt agc gcg cgc tcc tct aga gtc gac ctg ca-3'
- Gl-2: 5'-ggtc gac tct aga gga gcg cgc gct acc gag ct-3'

В результате встраивания данного дуплекса в плазмиде рHspAI2 появился новый метилированный сайт:

5'-CGGTAG (5mC) G (5mC) G (5mC) G CTCCTCTAGAGTCGACCTGCA-3'
3'-GCCATC G (5mC) G (5mC) G (5mC) GAGGAGATCTCAGCTGGACGT-5'

2) рHspAI4 была получена путем встраивания фрагмента ДНК, образованного из следующих синтетических олигонуклеотидов:

Gl-3: 5'-c ggt agc gcag cgc tcc tct aga gtc gac ctg ca-3'

Gl-4: 5'-ggtc gac tct aga gga gcg ctgc gct acc gag ct-3'

В результате встраивания данного дуплекса в плазмиде рHspAI4 появился новый метилированный сайт:

5'-CGGTAG (5mC) G CAG (5mC) G CTCCTCTAGAGTCGACCTGCA-3'
3'-GCCATC G (5mC) GTC G (5mC) GAGGAGATCTCAGCTGGACGT-5'

3) рHspAI10 была получена путем встраивания фрагмента ДНК, образованного из следующих синтетических олигонуклеотидов:

Gl-9: 5'-t ggt agcgc gcag cgcgc tcc tct aga gtc gac ctg ca-3'

Gl-10: 5'-ggtc gac tct aga gga gcgcgc ctgc gcgct acc aag ct-3'

В результате встраивания данного дуплекса в плазмиде рHspAI10 появился новый метилированный сайт:

5'-TGGTAG (5mC) G (5mC) G CAG (5mC) G (5mC) G CTCCTCTAGAGTCGACCTGCA-3'
3'-ACCATC G (5mC) G (5mC) GTC G (5mC) G (5mC) GAGGAGATCTCAGCTGGACGT-5'

4) рHspAI12 была получена путем встраивания фрагмента ДНК, образованного из следующих синтетических олигонуклеотидов:

Gl-11: 5'-t ggt agcgc gcag cgc tcc tct aga gtc gac ctg ca-3'

Gl-12: 5'-ggtc gac tct aga gga gcg ctgc gcgct acc aag ct-3'

В результате встраивания данного дуплекса в плазмиде рHspAI12 появился новый метилированный сайт:

5'-TGGTAG (5mC) G (5mC) G CAG (5mC) G CTCCTCTAGAGTCGACCTGCA-3'
3'-ACCATC G (5mC) G (5mC) GTC G (5mC) GAGGAGATCTCAGCTGGACGT-5'

Конструирование C5-метилированных плазмид, содержащих ген ДНК-метилтрансферазы Fsp4HI. При конструировании новых субстратов мы также использовали плазмиды рFsp4HI2 и рFsp4HI3 [6], которые содержат ген метилтрансферазы Fsp4HI, метилирующей первый цитозин в последовательности 5'-GCNGC-3' с образованием последовательности 5'-G(5mC)NGC-3'/3'-CCN(5mC)G-5'. Для получения новых субстратов мы встраивали в плазмиду рFsp4HI2 путем лигирования олигонуклеотидные дуплексы по сайтам рестрикции Bsp19I и HindIII. В результате были сконструированы три плазмиды, несущие дополнительные метилированные участки, образованные

в результате метилирования встроенных олигонуклеотидных дуплексов метилазой Fsp4HI.

1) Плазмиды рFsp4HI4 была получена путем встраивания фрагмента ДНК, образованного из синтетических олигонуклеотидов:

Fsp3: 5'-cat gtg ccg ccg ccgctcgaa ttc taga-3'

Fsp4: 5'-agct tct aga att cga gcg gcg gca-3'

В результате встраивания данного дуплекса в рFsp4HI4 появился новый метилированный сайт:

5'-CATGTG (5mC) C G (5mC) C G (5mC) C G CTCGAATTCTAGA-3'
3'-GTACAC G G (5mC) G G (5mC) G G (5mC) GAGCTTAAGATCT-5'

2) рFsp4HI6 была получена путем встраивания фрагмента ДНК, образованного из синтетических олигонуклеотидов:

Fsp5: 5'-cat gtg ccg cag ccg ctcgaa ttc taga-3'

Fsp6: 5'-agct tct aga att cga gcg gct gcg gca-3'

В результате встраивания данного дуплекса в рFsp4HI6 появился новый метилированный сайт:

5'-CATGTG (5mC) C G (5mC) A G (5mC) C G CTCGAATTCTAGA-3'
3'-GTACAC G G (5mC) G T (5mC) G G (5mC) GAGCTTAAGATCT-5'

3) рFsp4HI8 была получена путем встраивания фрагмента ДНК, образованного из синтетических олигонуклеотидов:

Fsp7: 5'-cat gtg ctg cag cag ctcgaa ttc taga-3'

Fsp8: 5'-agct tct aga att cga gct gct gca-3'

В результате встраивания данного дуплекса в рFsp4HI8 появился новый метилированный сайт:

5'-CATGTG (5mC) T G (5mC) A G (5mC) A G CTCGAATTCTAGA-3'
3'-GTACAC G A (5mC) G T (5mC) G T (5mC) GAGCTTAAGATCT-5'

Сайт-специфический гидролиз ДНК эндонуклеазой MteI проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг ДНК в SE-буфере «Y» (33 mM Трис-ацетат рН 7,9; 10 mM Mg-ацетат; 66 mM K-ацетат; 1 mM дитиотреитол) при 48 °С. Продукты реакции гидролиза разделяли путем электрофореза в буфере ТАЕ в 20% полиакриламидном геле, содержащем 7M мочевины, или в 1% агарозном геле.

Определение активности препарата фермента. За одну единицу активности MteI мы принимали такое минимальное количество фермента, которое необходимо для полного гидролиза единственного сайта узнавания в 1 мкг ДНК плазмиды рHspAI10/DriI+M.Fsp4HI в 20 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфере «Y» при 48 °С за 60 минут.

Для определения первичной структуры фрагмента гена 16S РНК проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с помощью следующих праймеров:

16S-direct 5'-AGAGTTTGATC(5mC)TGGCTCA-3'
16S-reverse 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'

Первичная структура полученного ПЦР-продукта определялась с помощью секвенатора Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Mte3: 5'-CCGTACTTTG(5mC)G(5mC)AG(5mC)G(5mC)TTGATTCCC-3'
Mte4: 5'-GGGAATCAAG(5mC)G(5mC)TG(5mC)G(5mC)AAAGTACGG-3'
Glu7: 5'-CCGTACTTTG(5mC)G(5mC)GG(5mC)G(5mC)TTGATTCCC-3'
Glu8: 5'-GGGAATCAAG(5mC)G(5mC)CG(5mC)G(5mC)AAAGTACGG-3'

Одну из цепей дуплекса метили по 5'-концу радиоактивным фосфором ^{32}P и добавляли эквимольное количество комплементарного олигонуклеотида, пробирку прогревали при 95 °С в течение 5 мин. и оставляли остывать на столе. Реакцию гидролиза проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «G» (10 mM Трис-НCl, pH 7,6; 10 mM MgCl_2 ; 50 mM NaCl; 1 mM дитиотреитол) и олигонуклеотидный дуплекс в концентрации 74 нМ при температуре 55 °С в течение 1 часа. Электрофорез продуктов гидролиза проводили в денатурирующем 20%-ном растворе ПААГ с 7 М мочевиной в трис-боратном буфере. Радиоавтографию геля проводили с помощью прибора Cyclone Storage System («Packard Instrument Co.» USA). Для каждого меченого продукта определялась величина DLU (Digital Light Units), которая пропорциональна интенсивности излучения изотопом ^{32}P , за вычетом фона. Процент гидролиза определяли как отношение DLU, для полученного продукта реакции, к сумме DLU, приходящихся на оставшуюся исходную ДНК и полученный фрагмент ДНК. Обработку данных осуществляли с помощью

Определение места гидролиза ДНК на олигонуклеотидном дуплексе. Позиция гидролиза ДНК ферментом MteI была установлена путем сравнения длин фрагментов, образующихся при расщеплении олигонуклеотидных дуплексов, содержащих предполагаемый сайт узнавания MteI.

Дуплексы были образованы из следующих синтетических олигонуклеотидов:

программы OptiQuant V. 0.3.00 («Packard Instrument Co.» USA) [2].

Результаты и обсуждение

Микробиологическое описание штамма-продуцента MteI

Культурально-морфологические признаки. В ходе скрининга почвенных микроорганизмов нами был обнаружен бактериальный штамм-продуцент новой ДНК-эндонуклеазы. На агаризованной среде Луриа — Бертрани (LB) штамм-продуцент образует гладкие блестящие, бледно-оранжевые колонии. Клетки палочковидные размером $0,8 \times (1,5-2)$ мкм, неподвижные. Грамположительные.

Физиолого-биохимические признаки штамма-продуцента. Облигатный аэроб. Каталазоположительный. Оксидаза не обнаружена. Клетки растут при температуре от +10 до +40 °С, при pH от 6 до 9.

Полученная нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S РНК, на основании которой определили таксономическую специфичность изучаемого штамма:

```
1 actggcggcg tgcttacaca tgcaagtcga acggtgaagc agagcttgct ctgtggatca
61 gtggcgaacg ggtgagtaac acgtgagcaa cctgccctgg actctgggat aagcgtgga
121 aacggcgtct aatactggat atgagacgtg atcgcatggt caacgtttgg aaagattttt
181 cggctctggga tgggctcgcg gcctatcagc ttgttggtga ggtaatggct caccaaggcg
241 tcgacgggta gccggcctga gagggtgacc ggccacactg ggactgagac acggcccgga
301 ctctacggg aggcagcagt ggggaatatt gcacaatggg cgaaagcctg atgcagcaac
361 gccgcgtgag ggatgacggc ctctgggttg taaacctctt ttagcaggga agaagcgaaa
421 gtgacggtag ctgcagaaaa agcgccggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt
481 agggcgcaag cgttatccgg aattattggg cgtaaagagc tcgtaggcgg ttgtcgcgt
541 ctgctgtgaa atcccaggc tcaacctcgg gcctgcagtg ggtacgggca gactagagt
601 cggtagggga gattggaatt cctggtgtag cggtggaatg cgcagatac aggaggaaca
661 ccgatggcga aggcagatct ctgggccgta actgacgtg aggagcgaaa ggggtggggag
```


721 caaacaggct tagataccct ggtagtcac cccgtaaagc ttgggaacta gttgtggga
 781 ccattccacg gtttccgtga cgcagctaac gcattaagtt ccccgctgg ggagtacggc
 841 cgcaaggcta aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggcgga gcatgcggat
 901 taattcgatg caacgcgaag aacctacca aggcctgaca tacaccagaa cgggccagaa
 961 atgggtcaact ctttgacac tgggaacag gtgggtgatg gttgtcgtca gtcgtgtcg
 1021 tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctcg ttctatgttg ccagcacgta
 1081 atgggtggga ctcattggat actgccgggg tcaactcgga ggaaggtggg gatgacgtca
 1141 aatcatcatg ccccttatgt ctgggcttc acgatgcta caatggccgg tacaaggggc

По определителю [1], а также с помощью анализа первичной структуры фрагмента 16S РНК по программе BLAST [9] штамм-продуцент был определен как *Microbacterium testaceum* 17В. Продуцируемая этим штаммом сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза названа MteI согласно номенклатуре [11].

Получение препарата фермента. Выход биомассы составил 5 г/л. Из 130 г биомассы было получено 3,5 мл препарата фермента.

Гидролиз ДНК эндонуклеазой MteI

Предварительный анализ субстратной специфичности MteI на неметилированных и различных С5-метилированных субстратах. В качестве субстратов для определения субстратной специфичности на первом этапе мы использовали ДНК фагов λ и T7, ДНК плазмид pFsp4HI3 [6], pHspAI2 [3] и pHspAI10 (см. «Материалы и методы»). На рисунке 1 приведены результаты обработки описанных выше субстратов эндонуклеазой MteI.

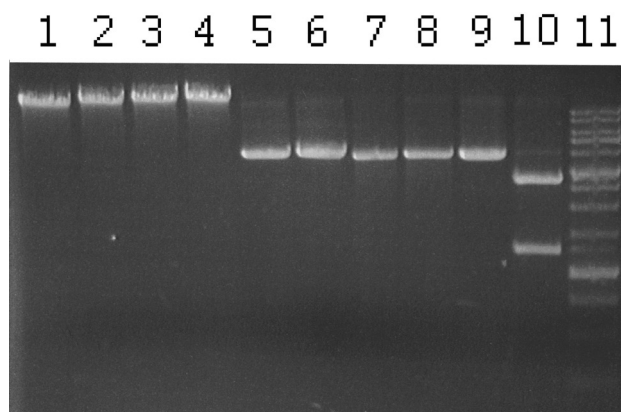


Рис. 1. Гидролиз препаратов ДНК ферментом MteI. Время реакции – 1 ч. MteI добавляли по 1 мкл на 20 мкл реакционной смеси. Дорожки: 1 – ДНК фага λ ; 2 – ДНК фага λ + MteI; 3 – ДНК фага T7; 4 – ДНК фага T7 + MteI; 5 – pFsp4HI3/DriI; 6 – pFsp4HI3/DriI + MteI; 7 – pHspAI2/DriI; 8 – pHspAI2/DriI + MteI; 9 – pHspAI10/DriI; 10 – pHspAI10/DriI + MteI; 11 – маркер молекулярной массы ДНК 1 kb.

Как видно из рисунка 1, MteI не расщепляет ДНК фагов λ (дорожка 2) и T7 (дорожка 4); ДНК плазмиды pFsp4HI3, которая метилирована по последовательности 5'-GCNGC-3' и содержит метилированный сайт 5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5' (дорожка 6), а также не расщепляет ДНК плазмиды pHspAI2, содержащей сайт 5'-G(5mC)G(5mC)G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)G(5mC)G-5' (дорожка 8). При этом MteI расщепляет линейаризованную плазмиду pHspAI10 (дорожка 10), которая содержит последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)GCAG(5mC)G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)GTCCG(5mC)G(5mC)G-5'.

Гидролиз субстратных ДНК, содержащих ген метилазы M.HspAI. Помимо плазмиды pHspAI10, являющейся субстратом MteI (рис. 1, дорожка 10), мы проверили возможность гидролиза эндонуклеазой MteI плазмид pHspAI4 и pHspAI12, также содержащих ген метилазы HspAI (см. раздел «Материалы и методы»), но имеющих несколько другую структуру и узор метилирования сайта узнавания.

Как отмечалось в «Материалах и методах», все эти субстраты содержат последовательность 5'-GCGCAGCGC-3' с разным окружением и отличающимся узором метилирования. В частности, в pHspAI4 эта последовательность представляет собой сайт 5'-G(5mC)GCAG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GTCCG(5mC)G-5', в pHspAI12 – 5'-G(5mC)G(5mC)GCAG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)GTCCG(5mC)G-5', а в pHspAI10 – 5'-G(5mC)G(5mC)GCAG(5mC)G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)GTCCG(5mC)G(5mC)G-5'.

Кроме того, для анализа субстратной специфичности MteI мы использовали эти же три плазмиды, дополнительно модифицированные метилазой Fsp4HI [8]. При их обработке метилазой Fsp4HI происходит метилирование цитозинов, прилегающих к центральному нуклеотиду А или Т в обеих цепях в последовательности 5'-GCGCAGCGC-3'/3'-CGCGTCCGCG-5'.

На рисунке 2 приведены результаты гидролиза ферментом MteI линейной формы плазмид pHspAI4,

ρHspAI10 и ρHspAI12, а также продуктов их модификации метилазой M.Fsp4HI. В качестве фермента сравнения нами использовалась МСС ДНК-эндонуклеаза PkrI, которая узнает и расщепляет последовательность 5'-GCNCG-3' при наличии в обеих цепях сайта узнавания как минимум трех 5-метилцитозинов [4].

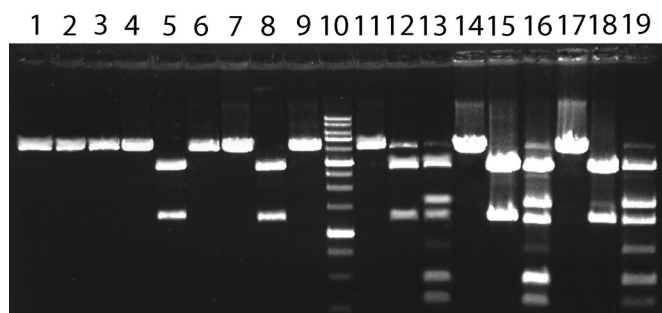


Рис. 2. Гидролиз плазмидных ДНК ферментами MteI и PkrI. Время реакции — 8 ч. Добавлено по 1 мкл препарата фермента на 20 мкл реакционной смеси. Дорожки: 1 — ρHspAI4/DriI; 2 — ρHspAI4/DriI+MteI; 3 — ρHspAI4/DriI+PkrI; 4 — ρHspAI10/DriI; 5 — ρHspAI10/DriI+MteI; 6 — ρHspAI10/DriI+PkrI; 7 — ρHspAI12/DriI; 8 — ρHspAI12/DriI+MteI; 9 — ρHspAI12/DriI+PkrI; 10 — маркер молекулярной массы ДНК 1 kb; 11 — ρHspAI4/DriI+M.Fsp4HI; 12 — ρHspAI4/DriI+M.Fsp4HI+MteI; 13 — ρHspAI4/DriI+M.Fsp4HI+PkrI; 14 — ρHspAI10/DriI+M.Fsp4HI; 15 — ρHspAI10/DriI+M.Fsp4HI+MteI; 16 — ρHspAI10/DriI+M.Fsp4HI+PkrI; 17 — ρHspAI12/DriI+M.Fsp4HI; 18 — ρHspAI12/DriI+M.Fsp4HI+MteI; 19 — ρHspAI12/DriI+M.Fsp4HI+PkrI

Как видно из рисунка 2, MteI не гидролизует ρHspAI4 (дорожка 2), но расщепляет ρHspAI10 и ρHspAI12 (дорожки 5 и 8, соответственно), а также продукты метилирования этих плазмид ферментом M.Fsp4HI (дорожки 12, 15 и 18, соответственно). При этом только на 12-й дорожке не наблюдается полного гидролиза исходной ДНК, что позволяет рассматривать последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)AG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GT(5mC)G(5mC)G-5' как минимальный сайт узнавания, тогда как сайт 5'-G(5mC)GCAG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GTCG(5mC)G-5' (дорожка 2) не является субстратом фермента MteI.

Интересно отметить, что МСС ДНК-эндонуклеаза PkrI не расщепляет модифицированную последовательность 5'-GCGCAGCGC-3' в изучаемых субстратах только в двух случаях (дорожки 3 и 9), когда центральный пентануклеотид последовательности содержит только 2 метилированных цитозина, что соответ-

ствует ранее установленной субстратной специфичности PkrI [4]. При этом PkrI расщепляет плазмиды ρHspAI12 и ρHspAI10, модифицированные метилазой M.Fsp4HI, не только по центральному пентануклеотиду с четырьмя 5-метилцитозинами, но также и по четырем другим метилированным сайтам 5'-GCNCG-3', содержащим три 5-метилцитозина.

Таким образом, МСС ДНК-эндонуклеаза MteI узнает протяженную C5-метилированную последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)AG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GT(5mC)G(5mC)G-5' и существенно отличается по субстратной специфичности от ранее описанных МСС ДНК-эндонуклеаз BslI, BlnI, GluI и PkrI, которые узнают модифицированную последовательность 5'-GCNCG-3'/3'-CGNCG-5' при наличии в ней от двух до четырех 5-метилцитозинов.

На рисунке 3 представлены результаты более детального определения активности MteI при гидролизе линейной формы плазмид ρHspAI10 и ρHspAI12, а также плазмид ρHspAI4, ρHspAI10 и ρHspAI12, модифицированных метилазой Fsp4HI.

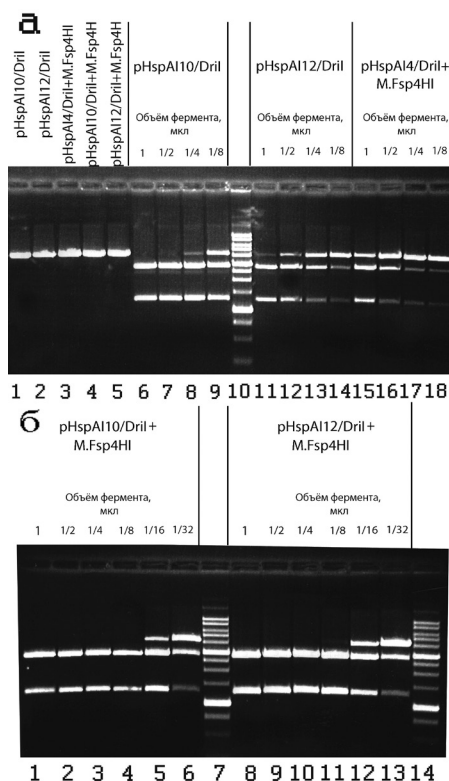


Рис. 3. Сравнение активности MteI при расщеплении различных плазмид. Определение активности фермента проводилось стандартным образом путем гидролиза препаратов ДНК несколькими разведениями фермента: реакционную смесь с 1 мкл препарата MteI последовательно разбавляли в два, четыре и восемь раз реакционной смесью без фермента. Время реакции — 1 ч.

Дорожки: а) 1 – ρHspAI10/DriI; 2 – ρHspAI12/DriI; 3 – ρHspAI4/DriI+M.Fsp4HI; 4 – ρHspAI10/DriI+M.Fsp4HI; 5 – ρHspAI12/DriI+M.Fsp4HI; 6 – ρHspAI10/DriI + 1 мкл MteI; 7 – ρHspAI10/DriI + 1/2 мкл MteI; 8 – ρHspAI10/DriI + 1/4 мкл MteI; 9 – ρHspAI10/DriI + 1/8 мкл MteI; 10 – маркер молекулярной массы ДНК; 11 – ρHspAI12/DriI + 1 мкл MteI; 12 – ρHspAI12/DriI + 1/2 мкл MteI; 13 – ρHspAI12/DriI + 1/4 мкл MteI; 14 – ρHspAI12/DriI + 1/8 мкл MteI; 15 – ρHspAI4/DriI + M.Fsp4HI + 1 мкл MteI; 16 – ρHspAI4/DriI + M.Fsp4HI + 1/2 мкл MteI; 17 – ρHspAI4/DriI + M.Fsp4HI + 1/4 мкл MteI; 18 – ρHspAI4/DriI + M.Fsp4HI + 1/8 мкл MteI; б) 1 – ρHspAI10/DriI + M.Fsp4HI + 1 мкл MteI; 2 – ρHspAI10/DriI + M.Fsp4HI + 1/2 мкл MteI; 3 – ρHspAI10/DriI + M.Fsp4HI + 1/4 мкл MteI; 4 – ρHspAI10/DriI + M.Fsp4HI + 1/8 мкл MteI; 5 – ρHspAI10/DriI + M.Fsp4HI + 1/16 мкл MteI; 6 – ρHspAI10/DriI + M.Fsp4HI + 1/32 мкл MteI; 7 – маркер молекулярной массы ДНК; 8 – ρHspAI12/DriI + M.Fsp4HI + 1 мкл MteI; 9 – ρHspAI12/DriI + M.Fsp4HI + 1/2 мкл MteI; 10 – ρHspAI12/DriI + M.Fsp4HI + 1/4 мкл MteI; 11 – ρHspAI12/DriI + M.Fsp4HI + 1/8 мкл MteI; 12 – ρHspAI12/DriI + M.Fsp4HI + 1/16 мкл MteI; 13 – ρHspAI12/DriI + M.Fsp4HI + 1/32 мкл MteI; 14 – маркер молекулярной массы ДНК

Как видно из рисунка 3, наименьшую активность MteI обнаруживает при гидролизе ρHspAI4, модифицированной метилазой M.Fsp4HI (рис. 3а, дорожки 15–18). Этот результат соответствует сделанному выше заключению, что последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)AG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GT(5mC)G(5mC)G-5' представляет собой минимальный сайт и хуже остальных субстратов расщепляется ферментом MteI. Немного лучшим субстратом является последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)GCAG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)GTCCG(5mC)G-5' в плазмиде ρHspAI12 (рис. 3а, дорожки 11–14). Фермент MteI не расщепляет полностью линейную форму обеих этих плазмидных ДНК (рис 3а, дорожки 11 и 15) и, таким образом, при их гидролизе проявляет активность меньше одной единицы в микролитре. Существенно большую активность (2 единицы в микролитре в пересчете на рассматриваемый субстрат) мы наблюдаем при расщеплении последовательности 5'-G(5mC)G(5mC)GCAG(5mC)G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)GTCCG(5mC)G(5mC)G-5' в плазмиде ρHspAI10 (рис. 3а, дорожки 6–9). И, наконец, MteI проявляет активность 8 единиц в микролитре при расщеплении субстратов с последо-

вательностями G(5mC)G(5mC)G(5mC)AG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)GT(5mC)G(5mC)G-5' и 5'-G(5mC)G(5mC)G(5mC)AG(5mC)G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)GT(5mC)G(5mC)G(5mC)G-5' в плаزمидах ρHspAI12 и ρHspAI10, соответственно, модифицированных метилазой M.Fsp4HI. Полученные результаты суммированы в таблице 1.

На основе полученных данных в качестве канонического субстрата для MteI нами была выбрана ДНК плазмиды ρHspAI10, линейаризованная рестриктазой DriI и модифицированная метилазой M.Fsp4HI. Поэтому за одну единицу активности MteI мы принимаем такое минимальное количество фермента, которое необходимо для полного гидролиза единственного сайта узнавания в 1 мкг ДНК плазмиды ρHspAI10/DriI+M.Fsp4HI в 20 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «Y», при 48 °C за 60 минут. Активность исследуемого препарата MteI при гидролизе канонического субстрата составляет 8 единиц в микролитре.

Гидролиз субстратных ДНК, содержащих ген метилазы M.Fsp4HI. В качестве возможного субстрата MteI мы проверяли также ряд плазмид, содержащих ген метилазы Fsp4HI (см. Материалы и методы). На рисунке 4 приведены результаты гидролиза линейной формы этих плазмид и ρHspAI10 ферментом MteI. Как видно из рисунка 4, MteI не расщепляет ДНК плазмид ρFsp4HI4 (дорожка 4), ρFsp4HI6 (дорожка 6) и ρFsp4HI8 (дорожка 8).

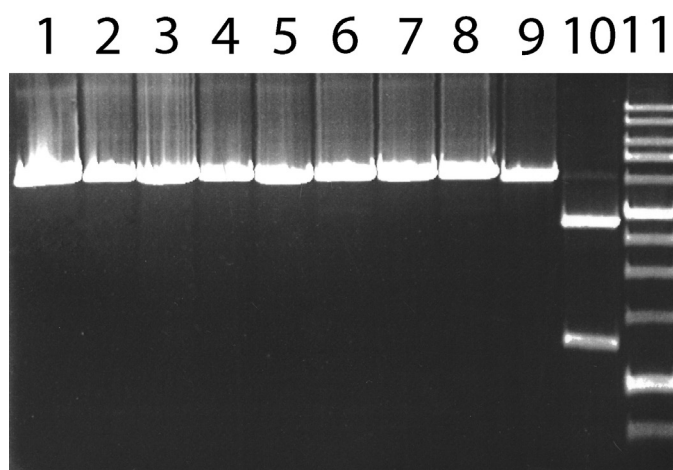


Рис. 4. Гидролиз MteI субстратных ДНК, содержащих ген метилазы M.Fsp4HI. *Дорожки:* 1 – ρFsp4HI3/DriI; 2 – ρFsp4HI3/DriI+MteI; 3 – ρFsp4HI4/DriI; 4 – ρFsp4HI4/DriI+MteI; 5 – ρFsp4HI6/DriI; 6 – ρFsp4HI6/DriI+MteI; 7 – ρFsp4HI8/DriI; 8 – ρFsp4HI8/DriI+MteI; 9 – ρHspAI10/DriI; 10 – ρHspAI10/DriI+MteI; 11 – маркер молекулярной массы ДНК

Итак, последовательность 5'-G(5mC)CG(5mC)AG(5mC)CGC-3'/3'-CGG(5mC)GT(5mC)GG(5mC)G-5', имеющаяся в составе pFsp4HI6, не является субстратом MteI (дорожка 6), хотя его центральная подчеркнутая часть совпадает с центральной частью гидролизуемого сайта в плазмиде pHspAI4, метилированной метилазой Fsp4HI.

Из полученных результатов и анализа данных в таблице 1 следует, что фермент MteI способен расщеплять последовательность 5'-G(5mC)AG(5mC)-3'/3'-(5mC)GT(5mC)G-5' при наличии дополнительного G(5mC)-динуклеотида на 5'-конце верхней и нижней цепи, что

и приводит к формуле минимального сайта 5'-G(5mC)G(5mC)AG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GT(5mC)G(5mC)G-5', являющегося наиболее плохим субстратом фермента. В то же время MteI обнаруживает существенно большую активность при замене в сайте узнавания 5'-GC-3' динуклеотидов на 5'-G(5mC)-3' динуклеотиды и появлении дополнительных 5'-G(5mC)-3' динуклеотидов на 5'-концах нонануклеотида в обеих цепях ДНК. Надо отметить, что метилирование метилазой Fsp4HI цитозинов, прилегающих к центральному нуклеотиду узнаваемой последовательности (А или Т), также приводит к значительному увеличению активности MteI.

Таблица 1

Активность MteI в реакции гидролиза субстратных ДНК, содержащих ген метилазы M.HspAI

Метилированная последовательность	Плазмида с сайтом узнавания MteI	Количество 5-метилцитозинов в метилированной последовательности	Активность MteI при гидролизе плазмидной ДНК
5'-G(5mC)G CAG(5mC)G C-3' 3'-C G(5mC)GTC G(5mC)G-5'	pHspAI4	4	—
5'-G(5mC)G(5mC)G CAG(5mC)G C-3' 3'-C G(5mC)G(5mC)GTC G(5mC)G-5'	pHspAI12	6	< 1 ед./мкл
5'-G(5mC)G(5mC)A G(5mC)G C-3' 3'-C G(5mC) G T(5mC)G(5mC)G-5'	pHspAI4/M.Fsp4HI	6	< 1 ед./мкл
5'-G(5mC)G(5mC)G CAG(5mC)G(5mC)G C-3' 3'-C G(5mC)G(5mC)GTC G(5mC)G(5mC)G-5'	pHspAI10	8	2 ед./мкл
5'-G(5mC)G(5mC)G(5mC)A G(5mC)G C-3' 3'-C G(5mC)G(5mC)G T(5mC)G(5mC)G-5'	pHspAI12/M.Fsp4HI	8	8 ед./мкл
5'-G(5mC)G(5mC)G(5mC)A G(5mC)G(5mC)G C-3' 3'-C G(5mC)G(5mC)G T(5mC)G(5mC)G(5mC)G-5'	pHspAI10/M.Fsp4HI	10	8 ед./мкл

Гидролиз ферментом MteI ДНК фага λ, метилированной метилазами HspAI и Fsp4HI. Дальнейшее определение субстратной специфичности MteI проводилось нами при использовании в качестве субстрата ДНК фага λ, последовательно метилированной метилазами HspAI и Fsp4HI. Результаты этого анализа представлены на рисунке 5.

Полнота метилирования ДНК фага λ метилазами HspAI и Fsp4HI проверялась по блокированию гидролиза рестриктазами HspAI (дорожка 2) и Fsp4HI (дорожка 3), соответственно. Из рисунка 5 видно, что при добавлении в реакционную смесь 4, 2, 1 и 0,5 единиц активности MteI (дорожки 4, 5, 6, 7, соответственно) на электрофореграмме наблюдается появление трех полос продуктов гидролиза. Анализ структуры ДНК показы-

вает, что в нуклеотидной последовательности ДНК фага λ в положении 2498-2506 находится последовательность 5'-GCCGTGCGC-3', а в позиции 5437-5445 лежит сайт 5'-GCCGCGCGC-3'. При обработке ДНК фага λ метилазами HspAI и Fsp4HI в первом случае образуется последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)AG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GT(5mC)G(5mC)G-5', тогда как во втором случае образуется последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)GG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GC(5mC)G(5mC)G-5'. Данные последовательности соответствуют минимальному сайту MteI, определенному выше. Как видно из рисунка 5, электрофоретическая подвижность образующихся фрагментов ДНК (≈2500 и ≈2940 п.н.) соответствует продуктам гидролиза субстратной ДНК по позициям 2498 и 5437. Наблюдаемая

менее яркая третья полоса длиной ≈ 5500 п.н. образуется, вероятно, из первых двух вследствие неполного гидролиза сайта в позиции 2498.

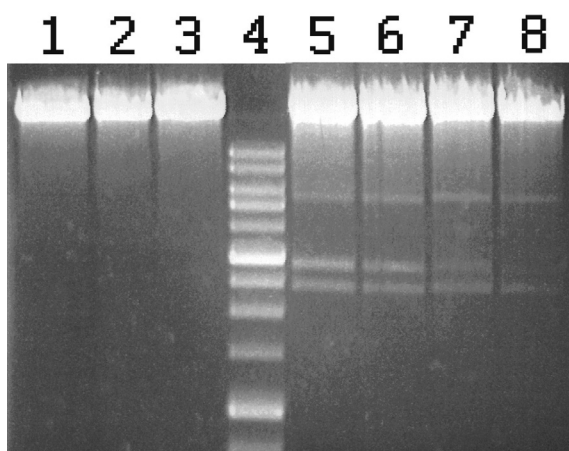


Рис. 5. Гидролиз ДНК фага λ , метилированной метилазами HspAI и Fsp4HI. Время реакции – 30 мин. Объем реакционной смеси – 20 мкл. Дорожки: 1 – ДНК фага λ /M.HspAI+M.Fsp4HI; 2 – ДНК фага λ /M.HspAI+M.Fsp4HI+HspAI; 3 – ДНК фага λ /M.HspAI+M.Fsp4HI+Fsp4HI; 4 – маркер молекулярной массы ДНК; 5 – ДНК фага λ /M.HspAI+M.Fsp4HI + 4 ед. активности MteI; 6 – ДНК фага λ /M.HspAI+M.Fsp4HI + 2 ед. активности MteI; 7 – ДНК фага λ /M.HspAI+M.Fsp4HI + 1 ед. активности MteI; 8 – ДНК фага λ /M.HspAI+M.Fsp4HI + 0,5 ед. активности MteI

Таким образом, из полученных данных по гидролизу метилированной ДНК фага λ и различных плазмидных ДНК можно сделать вывод о том, что MteI расщепляет минимальный сайт 5'-G(5mC)G(5mC)NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN(5mC)G(5mC)G-5'.

Определение позиции гидролиза ДНК эндонуклеазой MteI

Для подтверждения установленной последовательности узнавания и определения позиций расщепления ДНК в сайте узнавания мы проводили гидролиз ферментом MteI олигонуклеотидных дуплексов.

Определение места гидролиза ДНК-эндонуклеазой MteI осуществляли путем сравнения длин фрагментов, образуемых при расщеплении эндонуклеазами MteI и GluI олигонуклеотидных дуплексов Mte3/Mte4 (содержит А/Т пару в центре сайта MteI) и Glu7/Glu8 (содержит G/С пару в центре). В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой ExoIII.

На рисунке 6а изображен радиоавтограф электрофореграммы продуктов расщепления дезоксирибоолиго-

нуклеотидного радиоактивно меченного дуплекса Mte3/Mte4 в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины. На рисунке 6б приведен радиоавтограф электрофореграммы продуктов расщепления радиоактивно меченного дуплекса Glu7/Glu8 в тех же условиях.

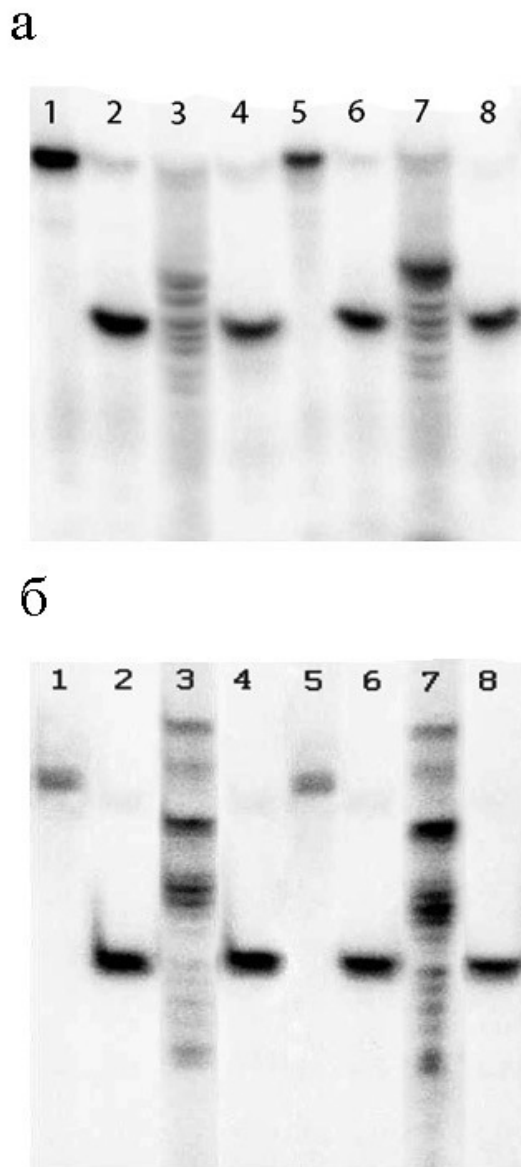


Рис. 6. Определение позиции гидролиза ДНК ферментом MteI на дуплексах Mte3/Mte4 (а) и Glu7/Glu8 (б). Электрофорез в 20% ПААГ с 7 М мочевиной. Олигонуклеотиды, меченные ^{32}P по 5'-концу, обозначены знаком *. Дорожки: а) 1 – Mte3*/Mte4; 2 – Mte3*/Mte4 + MteI; 3 – Mte3*/Mte4 + ExoIII; 4 – Mte3*/Mte4 + GluI; 5 – Mte4*/Mte3; 6 – Mte4*/Mte3 + MteI; 7 – Mte4*/Mte3 + ExoIII; 8 – Mte4*/Mte3 + GluI; б) 1 – Glu7*/Glu8; 2 – Glu7*/Glu8 + MteI; 3 – Glu7*/Glu8 + ExoIII; 4 – Glu7*/Glu8 + GluI; 5 – Glu8*/Glu7; 6 – Glu8*/Glu7 + MteI; 7 – Glu8*/Glu7 + ExoIII; 8 – Glu8*/Glu7 + GluI

Из рисунка 6а видно, что продукты гидролиза ДНК дуплекса Mte3*/Mte4 на дорожках 2 и 4, а также дуплекса Mte4*/Mte3 на дорожках 6 и 8 имеют одинаковые длины. То же можно сказать про полосы на рисунке 6б (дорожки 2 и 5 для дуплекса Glu7*/Glu8 и дор. 7 и 10 для дуплекса Glu8*/Glu7). Из данных, приведенных на рисунке 6, следует, что MteI расщепляет ДНК перед центральным нуклеотидом N в последовательности: 5'-G(5mC)G(5mC)^NG(5mC)G(5mC)-3' и позиции гидролиза ДНК ферментами GluI и MteI совпадают.

Заключение

Представленная в данной работе новая метил-зависимая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза MteI имеет минимальный сайт узнавания 5'-G(5mC)G(5mC)^NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN^(5mC)G(5mC)G-5' и расщепляет ДНК как указано стрелками. Замена в сайте узнавания 5'-GC-3' динуклеотидов на 5'-G(5mC)-3' динуклеотиды и появление дополнительных 5'-G(5mC)-3' динуклеотидов на 5'-концах нонануклеотида в обеих цепях ДНК приводят к значительному возрастанию активности фермента.

Ранее для ряда МСС ДНК-эндонуклеаз нами было показано существенное увеличение их активности при замене цитозина на 5-метилцитозин в сайте узнавания, который является совершенно определенным по размерам [2, 5]. Однако в случае MteI мы наблюдаем значительное увеличение активности фермента при расширении сайта узнавания и появлении в обеих цепях дополнительных 5-метилцитозина. Такой феномен значительного возрастания активности фермента с увеличением размеров его сайта узнавания представляется новым для МСС ДНК-эндонуклеаз, и мы планируем его детальное исследование в последующих работах.

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. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта и др. 9-е изд. в 2 томах: Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. — М., 1997. — Т.1 (432 с.). — Т.2 (678 с.).

2. Томилова Ю.Э., Чернухин В.А., Дегтярев С.Х. Зависимость активности сайт-специфической эндонуклеазы GluI от количества и положения метилированных цитозина в узнаваемой последовательности 5'-GCGC-3' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2006. — Т. 2. — № 1. — С. 30–39.
3. 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 GluI узнает метилированную последовательность 5'-GCGC-3' // Биотехнология. — 2006. — № 4. — С. 31–35.
4. Чернухин В.А., Наякина Т.Н., Гончар Д.А., Томилова Ю.Э., Тарасова М.В., Михненко Н.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая метилзависимая ДНК-эндонуклеаза PklI узнает и расщепляет метилированную последовательность ДНК 5'-GCN^GC-3'/3'-CG^NCG-5', содержащую не менее трех 5-метилцитозина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7. — № 3. — С. 35–41.
5. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуз Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Сайтспецифическая эндонуклеаза BslI 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.
6. 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 GluI 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.
7. 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 BslI из *Bacillus subtilis* T30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)^NGC-3' // Биотехнология. — 2005. — № 3. — С. 22–26.
8. Чмуз Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Чернухин В.А., Охупкина С.С., Гончар Д.А., Дедков В.С., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Клонирование генов, сравнительный анализ структуры белков системы рестрикции-модификации Fsp4HI и биохимическая характеристика рекомбинантной ДНК-метилтрансферазы M.Fsp4HI // Молекулярная биология. — 2007. — Т. 41. — № 1. — С. 43–50.
9. Madden T.L., Tatusov R.L., Zhang J. Applications of network BLAST server // Meth. Enzymol. — 1996. — Vol. 266. — P. 131–141.

10. Roberts R.J., Vineze T., Posfai J., Macelis D. REBASE — restriction enzymes and methylases // Nucl. Acids Res. — 2003. — Vol. 31. — P. 418–420.
11. 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.

Список сокращений:

ЕхoIII — экзонуклеаза III из *E. coli*,
 ПААГ — полиакриламидный гель,
 ед. — единица активности,
 п.н. — пары нуклеотидов ДНК,
 5mC — 5-метилцитозин,
 ДНК-метилтрансфераза — метилаза

A NEW METHYL-DIRECTED SITE-SPECIFIC DNA ENDONUCLEASE MteI CLEAVES NINE NUCLEOTIDES SEQUENCE 5'-G(5MC)G(5MC)^NG(5MC)GC-3'/3'-CG(5MC)GN^(5MC)G(5MC)G-5'

V.A. CHERNUKHIN, E.V. KILEVA, V.A. SOKOLOVA, D.A. GONCHAR, L.N. GOLIKOVA,
 V.S. DEDKOV, N.A. MIKHENKOVA, S.KH. DEGTAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

We have discovered and purified a new methyl-directed site-specific DNA endonuclease MteI from bacterial strain *Microbacterium testaceum* 17B. The enzyme recognizes methylated DNA sequence and doesn't cleave unmethylated DNA. MteI is a first methyl-directed site-specific DNA endonuclease recognizing a prolonged DNA sequence and the enzyme activity depends on a number of 5-methylcytosines in a recognition site and a pattern of methylation. MteI cleaves DNA sequence 5'-G(5mC)G(5mC)^NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN^(5mC)G(5mC)G-5' as indicated by arrows and this nonanucleotide is a minimal recognition site. The enzyme activity is significantly higher if 5'-GC-3' dinucleotides in this site are replaced by 5'-G(5mC)-3' dinucleotides and additional 5'-G(5mC)-3' dinucleotides are present at 5'-ends in both DNA strands. Due to an ability to cleave only prolonged methylated DNA sequences MteI may find a practical application in the molecular biology and epigenetics studies.

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