



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011150595/10, 12.12.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.12.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 12.12.2011

(45) Опубликовано: 20.02.2013 Бюл. № 5

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: GB 2164043 A, 12.03.1986. DE 3840358 A1, 31.05.1990. MARIKO TAKEUCHI and KAZUNORI HATANO "Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*", International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48, p.739-747. ЧЕРНУХИН В.А. и др. Новая 5-метилцитозин-зависимая сайт-специфическая (см. прод.)

Адрес для переписки:

630117, г.Новосибирск, а/я 5, Л.Я. Кучумовой

(72) Автор(ы):

Чернухин Валерий Алексеевич (RU),
Килёва Елена Валерьевна (RU),
Голикова Лариса Николаевна (RU),
Болтенгаген Анастасия Андреевна (RU),
Тарасова Галина Владимировна (RU),
Дедков Владимир Сергеевич (RU),
Михненко Наталья Александровна (RU),
Дегтярев Сергей Харитонович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной
ответственностью "СиБЭнзайм" (RU)

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ *Microbacterium testaceum* 17В - ПРОДУЦЕНТ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ MteI

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой штамм бактерии *Microbacterium testaceum* 17В, депонированный под №ВКПМ В-10628 во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов ФГУП ГосНИИгенетика, являющийся продуцентом сайт-специфической эндонуклеазы MteI. Изобретение позволяет получить сайт-специфическую эндонуклеазу,

которая узнает и расщепляет обе цепи нуклеотидной последовательности ДНК 5'-G(m5C)G(m5C)[^]NG(m5C)G(m5C)-3'/3'-(m5C)G(m5C)GN[^](m5C)G(m5C)G-5', где m5C - 5-метилцитозин, с образованием однонуклеотидного 5'-выступающего конца и не расщепляет метилированную последовательность ДНК 5'-G(m5C)NG(m5C)-3'/3'-(m5C)GN(m5C)G-5'. 2 ил., 1 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

эндонуклеаза GluI узнает 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. RU 2057806 C1, 10.04.1996.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 475 533** (13) **C1**

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2011150595/10, 12.12.2011

(24) Effective date for property rights:
12.12.2011

Priority:

(22) Date of filing: 12.12.2011

(45) Date of publication: 20.02.2013 Bull. 5

Mail address:

630117, g.Novosibirsk, a/ja 5, L.Ja. Kuchumovoj

(72) Inventor(s):

**Chernukhin Valerij Alekseevich (RU),
Kileva Elena Valer'evna (RU),
Golikova Larisa Nikolaevna (RU),
Boltengagen Anastasija Andreevna (RU),
Tarasova Galina Vladimirovna (RU),
Dedkov Vladimir Sergeevich (RU),
Mikhnenkova Natal'ja Aleksandrovna (RU),
Degtjarev Sergej Kharitonovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"SibEhnzajm" (RU)**

(54) BACTERIA STRAIN *Microbacterium testaceum* 17B-PRODUCENT OF SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE MteI

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention represents a bacteria strain *Microbacterium testaceum* 17B, deposited under the number RNCIM B-10628 in the Russian National Collection of Industrial Microorganisms FGUP GosNIIgenetika, being the producent of the site-specific endonuclease MteI. The invention makes it possible to produce the site-specific endonuclease, which recognises and splits both chains

of the nucleotide DNA sequence 5'-G(m5C)G(m5C)[^]NG(m5C)G(m5C)-3'/3'-(m5C)G(m5C)GN[^](m5C)G(m5C)G-5', where m5C-5-methylcytosine, with production of the single-nucleotide 5'-protruding end, and does not split the methylated DNA sequence 5'-G(m5C)NG(m5C)-3'/3'-(m5C)GN(m5C)G-5'.

EFFECT: method improvement.

2 dwg, 1 tbl, 3 ex

RU 2 475 533 C1

RU 2 475 533 C1

Изобретение относится к биотехнологии и касается получения нового штамма, используемого для выделения новой сайт-специфической эндонуклеазы, узнающей и расщепляющей ДНК, только при наличии в сайте узнавания 5-метилцитозина.

К настоящему времени известны несколько сайт-специфических эндонуклеаз, узнающих и расщепляющих ДНК, только при наличии в сайте узнавания 5-метилцитозина.

Известен штамм *Glacial ice bacterium* I, продуцирующий эндонуклеазу *GlaI*, которая узнает и расщепляет метилированную нуклеотидную последовательность 5'-G(m5C)[^]GC-3', где m5C - C5-метилцитозин [1].

Известны штаммы *Bacillus simplex* 23 [2] и *Bacillus subtilis* T30 [3], продуцирующие сайт-специфические эндонуклеазы, которые узнают и расщепляют метилированную нуклеотидную последовательность 5'-GCNGC-3', при наличии в сайте узнавания C5-метилцитозинового основания.

Однако в настоящее время не описаны штаммы бактерий, являющиеся продуцентами сайт-специфических эндонуклеаз, узнающих и расщепляющих метилированную последовательность ДНК 5'-G(m5C)G(m5C)NG(m5C)G(m5C)-3'/3'-(m5C)G(m5C)GN(m5C)G(m5C)G-5' и не расщепляющих метилированную последовательность ДНК 5'-G(m5C)[^]NG(m5C)-3'/3'-(m5C)GN[^](m5C)G-5'.

Наиболее близким к заявляемому штамму - прототипом, является штамм *Glacial ice bacterium* 24, продуцирующий эндонуклеазу рестрикции *GluI*, которая узнает последовательность нуклеотидов 5'-GCNGC-3' и расщепляет ее перед центральным нуклеотидом (N) с образованием однонуклеотидного 5'-выступающего конца, если все цитозиновые основания узнаваемой последовательности метилированы в положении 5 (C5-метилцитозин) [4].

Недостатком известного штамма является то, что продуцируемая им сайт-специфическая эндонуклеаза расщепляет короткую метилированную последовательность 5'-G(m5C)[^]NG(m5C)-3'/3'-(m5C)GN(m5C)G-5', что в ряде случаев не позволяет использовать ее для получения крупных фрагментов при сайт-специфическом расщеплении ДНК, содержащей C5-метилцитозиновые основания.

Технической задачей изобретения является получение бактериального штамма, продуцирующего сайт-специфическую эндонуклеазу, которая узнает и расщепляет обе цепи нуклеотидной последовательности ДНК 5'-G(m5C)G(m5C)[^]NG(m5C)G(m5C)-3'.

Поставленная техническая задача достигается получением штамма *Microbacterium testaceum* 17B - продуцента сайт-специфической эндонуклеазы, узнающей и расщепляющей метилированную последовательность нуклеотидов:

5'-G(m5C)G(m5C)[^]G(m5C)G(m5C)-3',

3'-(m5C)G(m5C)GN[^](m5C)G(m5C)G-5',

где m5C - C5-метилцитозин. (Символом "[^]" указаны позиции расщепления ДНК.)

Предлагаемый штамм выделен из природного материала (почвы) в результате целенаправленного систематического поиска.

Полученный штамм *Microbacterium testaceum* 17B депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ Генетика под регистрационным номером ВКПМ В-10628, а продуцируемая им сайт-специфическая эндонуклеаза названа *MteI*.

Штамм *Microbacterium testaceum* 17B характеризуется следующими признаками.

Культурально-морфологические признаки. На агаризованной среде Лурия-Бертрани (ЛБ) образует гладкие, блестящие, бледно-оранжевые колонии. Клетки палочковидные размером 0,8×(1,5-2) мкм, неподвижные. Грамположительные.

Физиолого-биохимические признаки. Облигатно аэробные. Каталазоположительные. Оксидоза не обнаружена. Растут при температуре от 10 до 40°C, при pH от 6 до 9.

Штамм идентифицирован на основе анализа морфологических и биохимических свойств по определителю [5]. Продуцируемая заявляемым штаммом сайт-специфическая эндонуклеаза MteI названа по номенклатуре [6].

Хранение штамма осуществляется в лиофильно высушенном состоянии или в растворе 30% глицерина при температуре -60°C.

Для культивирования штамма применяют среду следующего состава (г/л): пептон - 10, дрожжевой экстракт - 5, NaCl - 5. Культивирование проводят при 28°C с аэрацией до достижения стационарной стадии роста. Выход целевого фермента составляет 100 ед./г сырой биомассы с концентрацией 16000 ед./мл.

Полученная сайт-специфическая эндонуклеаза MteI характеризуется следующими свойствами:

1. Узнает и расщепляет метилированную последовательность нуклеотидов 5'-G(m5C)G(m5C)NG(m5C)G(m5C)-3'/3'-(m5C)G(m5C)GN(m5C)G(m5C)G-5', где m5C - 5-метилцитозин.

2. Не расщепляет вышеприведенную последовательность, не содержащую C5-метилцитозиновых оснований (неметилированную), а также короткую метилированную последовательность 5'-G(m5C)^NG(m5C)-3'/3'(m5C)GN(m5C)G-5'.

3. Расщепляет связи перед центральным нуклеотидом в обеих цепях узнаваемой последовательности.

4. Оптимальная температура действия 37-45°C.

5. Оптимальное значение pH для действия фермента 7,5-8,5.

6. Оптимальная концентрация соли при расщеплении ДНК 30-70 mM NaCl.

7. Для проявления активности MteI требуются ионы Mg^{2+} , оптимальная концентрация - 3-10 mM.

Определяющим отличием предлагаемого штамма от штамма-продуцента сайт-специфической эндонуклеазы GluI является то, что первый продуцирует сайт-специфическую эндонуклеазу, которая узнает и расщепляет обе цепи метилированной нуклеотидной последовательности ДНК 5'-GCGC^N GCGC-3' и не расщепляет метилированную последовательность ДНК 5'-G(m5C)^NG(m5C)-3'/3'(m5C)GN(m5C)G-5'. Сайт узнавания GluI 5'-GCNGC-3' является частью сайта узнавания MteI (5'-GCGCNGCGC-3'). Данное отличие от GluI позволяет использовать эндонуклеазу MteI для более крупноблочной фрагментации C5-метилированной ДНК. Таким образом, сайт-специфическая эндонуклеаза MteI представляет собой новый, не имеющий аналогов фермент.

Поскольку предлагаемый штамм получен впервые и для выделения сайт-специфической эндонуклеазы, узнающей и расщепляющей вышеназванную последовательность нуклеотидов в указанной позиции никогда не использовался, можно сделать вывод о соответствии предлагаемого штамма критериям изобретения «новизна» и «изобретательский уровень».

Изобретение иллюстрируется примерами конкретного выполнения.

Пример 1. Выращивание штамма и выделение фермента

Для получения биомассы клетки штамма-продуцента переносят на агаризованную среду ЛБ в чашку Петри и инкубируют в течение ночи при 28°C. Свежевыращенные колонии переносят стерильной бактериологической петлей в колбы, содержащие жидкую питательную среду ЛБ, и культивируют на качалках при 28°C при перемешивании - 150 об/мин, до достижения стационарной фазы роста. Клетки

осаждают центрифугированием при 5000 об/мин при 4°C. Выход биомассы составляет 5 г/л среды. Дезинтеграцию клеток, выделение и очистку фермента проводят по известной методике [7].

Пример 2. Сайт-специфический гидролиз C5-метилованной плазмидной ДНК эндонуклеазой MteI

Расщепление ДНК проводили в оптимальных условиях (45°C, реакционный буфер - 10 mM TrisHCl, pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT) в течение 60 мин. Продукты расщепления плазмидной ДНК разделяли путем электрофореза в 1% агарозном геле.

В качестве субстратов для выявления специфичности расщепления использовали различные метилированные и неметилованные плазмидные и фаговые ДНК: фагов лямбда (λ) и T7, pHspAI (содержит метилированные последовательности 5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5' [1]) и pFsp4HI3 (содержит метилированные последовательности 5'-G(5mC)NGC-3'/3'-(5mC)GNCG-5' [4]) и предварительно полученные плазмиды pBstMW1 и pBstMW2 (последние две содержат метилированные последовательности 5'-G(5mC)NNNNNNNGC3'/3'-CGNNNNNNN(5mC)G-5').

Плазмида pBstMW1 была получена путем клонирования фрагментов геномной ДНК штамма бактерии *Bacillus stearothermophilus* MW, продуцирующего метилазу BstMW, которая метилирует первый цитозин в обеих цепях сайта узнавания с образованием метилированной последовательности 5'-G(5mC)NNNNNNNGC3'/3'-CGNNNNNNN(5mC)G-5'.

Клонлируемый фрагмент был получен путем гидролиза геномной ДНК эндонуклеазой рестрикции XmaI и последующим встраиванием в вектор pUC19 по сайту узнавания XmaI. Вставка имеет длину 4000 т.п.н. и содержит ген метилазы BstMWI.

Плазмида pBstMW2 была получена из плазмиды pBstMW1 путем встраивания по сайтам узнавания рестриктаз Sfr274 и SphI олигонуклеотидного дуплекса, образованного из следующих нуклеотидов:

B17-1: 5'-TCGAGCGCAGCGCGCGCAGCGCGCGCAGCGCCATG-3',

B17-2: 5'-GCGCTGCGCGCGCTGCGCGCGCTGCGC-3'.

Таким образом, плазмида pBstMW2 в отличие от плазмиды pBstMW1 имеет метилированную метилазой BstMWI последовательность, содержащую единственный сайт узнавания MteI (узнаваемая последовательность выделена рамочкой):

5'-TCGAG(m5C)G(m5C)A G(m5C)G(m5C) G(m5C)G(m5C)A G(m5C)G(m5C) G C G C A G C G C C A T G -3'
3'-A C G T C G C G T C G G C (m5C)G(m5C)G T(m5C)G(m5C)G(m5C) G(m5C)G T(m5C)G(m5C)G G T A C -5'

На фиг.1 представлена электрофореграмма продуктов, образованных в результате обработки ДНК плазмид pHspAI и pFsp4HI3 и pBstMW эндонуклеазой MteI.

Описание дорожек на электрофореграмме, изображенной на фиг.1:

1 - ДНК фага λ;

2 - ДНК фага λ, обработанная эндонуклеазой MteI;

3 - ДНК фага T7;

4 - ДНК фага T7, обработанная эндонуклеазой MteI;

5 - ДНК плазмиды pHspAI;

6 - ДНК плазмиды pHspAI, обработанная эндонуклеазой MteI;

7 - маркер молекулярного веса ДНК 1 kb (производство НПО СибЭнзим);

8 - ДНК плазмиды pFsp4HI3, линейаризованная эндонуклеазой рестрикции DriI;

9 - ДНК плазмиды pFsp4HI3, линейаризованная эндонуклеазой рестрикции DriI, обработанная эндонуклеазой GluI;

10 - ДНК плазмиды pFsp4HI3, линейаризованная эндонуклеазой рестрикции DriI, обработанная эндонуклеазой MteI;

11 - ДНК плазмиды pBstMW1, линейаризованная эндонуклеазой рестрикции DriI;

12 - ДНК плазмиды pBstMW1, линейаризованная эндонуклеазой рестрикции DriI, обработанная эндонуклеазой GluI;

13 - ДНК плазмиды pBstMW1, линейаризованная эндонуклеазой рестрикции DriI, обработанная эндонуклеазой MteI;

14 - ДНК плазмиды pBstMW2, линейаризованная эндонуклеазой рестрикции DriI;

15 - ДНК плазмиды pBstMW2, линейаризованная эндонуклеазой рестрикции DriI, обработанная эндонуклеазой GluI;

16 - ДНК плазмиды pBstMW2, линейаризованная эндонуклеазой рестрикции DriI, обработанная эндонуклеазой MteI.

Как видно из фиг.1, эндонуклеаза MteI не расщепляет плазмид pFsp4HI3, pBstMW1 и pHspAI, в которых отсутствует метилированная последовательность

5'-G(m5C)G(m5C)^NG(m5C)G(m5C)-3'/5'-(m5C)G(m5C)^GN(m5C)G(m5C)G-3'.

В отличие от MteI эндонуклеаза GluI расщепляет pFsp4HI3 по единственному сайту 5'-G(m5C)^NG(m5C)-3'/3'-(m5C)GN^(m5C)G-5'.

ДНК плазмиды pBstMW1 длиной 4969 п.н., линейаризованную рестриктазой DriI, данный фермент расщепляет в единственном месте. Электрофоретическая подвижность образуемых в результате данного расщепления фрагментов ДНК соответствует теоретически рассчитанным для гидролиза по последовательности 5'-W(5mC)GNNNNNNN(5mC)GW-3'/5'-W(5mC)GNNNNNNN(5mC)GW-3': 1260 п.н. и 3709 п.н.

Пример 3. Определение позиции гидролиза ДНК рестриктазой MteI на олигонуклеотидных дуплексах

Определение места гидролиза ДНК рестриктазой MteI осуществляли путем сравнения длин фрагментов, образуемых при расщеплении эндонуклеазами рестрикции MteI и GluI олигонуклеотидного дуплекса MteI/Mte2, образованного из олигонуклеотидов MteI и Mte2:

MteI: 5'GCGGGATATG(m5C)G(m5C)^N G(m5C)G(m5C)GCCAGTCA 3',

Mte2: 5'TGACTGGG(m5C)G(m5C)^N G(m5C)G(m5C)GATATCCCGC 3'.

В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой EhoIII. Последовательности олигонуклеотидов, использованных для определения позиции гидролиза MteI, приведены в таблице.

Название олигонуклеотида	Структура
Mte1:	5'-GCGGGATATG(m5C)G(m5C)AG(m5C)G(m5C)GCCAGTCA-3'
Mte2:	5'-TGACTGGG(m5C)G(m5C)TG(m5C)G(m5C)GATATCCCGC-3'

На фиг.2 изображен радиоавтограф электрофореграммы продуктов расщепления дезоксирибоолигонуклеотидного радиоактивно меченного дуплекса MteI/Mte2 в 20% полиакриламидном геле, содержащем 7-молярную мочевицу. Описание дорожек на электрофореграмме, изображенной на фиг.2:

1 - исходный дуплекс MteI*/Mte2;

2 - дуплекс MteI*/Mte2, обработанный эндонуклеазой GluI;

3 - дуплекс MteI*/Mte2, обработанный экзонуклеазой III из E.coli;

4 - дуплекс MteI*/Mte2, обработанный эндонуклеазой MteI;

5 - исходный дуплекс Mte2*/Mte;

- 6 - дуплекс Mte2*/Mte обработанный эндонуклеазой GluI;
- 7 - дуплекс Mte2*/Mte обработанный экзонуклеазой III из E.coli;
- 8 - дуплекс Mte2*/Mte, обработанный эндонуклеазой MteI.

Олигонуклеотиды, меченные радиоактивным фосфором ^{32}P по 5'-концу, обозначены знаком *.

Из фиг.2 видно, что продукты гидролиза ДНК дуплекса MteI*/Mte2 на дорожках 2 и 4, а также дуплекса Mte2*/MteI на дорожках 6 и 8 имеют одинаковые длины. Это означает, что позиции гидролиза ферментами GluI и MteI совпадают.

На основе полученных результатов можно сделать вывод, что в вырожденной палиндромной последовательности эндонуклеаза MteI расщепляет ДНК перед центральным нуклеотидом N: 5'-G(m5C)G(m5C)^NG(m5C)G(m5C)-3', где m5C - 5-метилцитозин.

Выход сайт-специфической эндонуклеазы MteI определяют по электрофоретической картине расщепления ДНК олигонуклеотидов MteI*/Mte2. За единицу активности принимают минимальное количество фермента, необходимое для полного расщепления 1 пмоль олигонуклеотидного дуплекса MteI*/Mte2 за 1 час при температуре 37°C в объеме реакционной смеси 20 мкл. Выход фермента составляет 200 ед./г сырой биомассы, концентрация 16000 ед./мл.

Фермент хранится при -20°C в буфере, содержащем 50% глицерин, 0,08% тритон XI00, 0,2 М NaCl, 10 мМ трисHCl (pH 7,5), 7 мМ β-меркаптоэтанол, 0,1 мМ ЭДТА.

Таким образом, получен новый штамм, продуцирующий сайт-специфическую эндонуклеазу MteI, узнающую и расщепляющую обе цепи нуклеотидной последовательности ДНК 5'-G(m5C)G(m5C)^NG(m5C)G(m5C)-3'/3'-(m5C)G(m5C)GN^(m5C)G(m5C)G-5', где m5C - 5-метилцитозин, с образованием однонуклеотидного 5'-выступающего конца и не расщепляет короткую метилированную последовательность ДНК 5'-G(m5C)^NG(m5C)-3'/3'-(m5C)GN(m5C)G-5'.

Данная сайт-специфическая эндонуклеаза может быть использована для выявления и анализа метилированной ДНК.

Источники информации

1. Чернухин В.А., Наякшина 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.

2. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Сайт-специфическая эндонуклеаза BslI узнает последовательности ДНК 5'-G(5mC)NGC-3' и расщепляет ее с образованием 3'-выступающих концов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.Овчинникова. - 2007. - Т.3. - №1. - С.28-33.

3. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции BslI из Bacillus subtilis T30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(m5C)^NGC-3' // Биотехнология. - 2005. - №3. - С.22-26.

4. Чернухин В.А., Чмуж Е.В., Томилова Ю.Э., Наякшина Т.Н., Гончар Д.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая эндонуклеаза GluI 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.

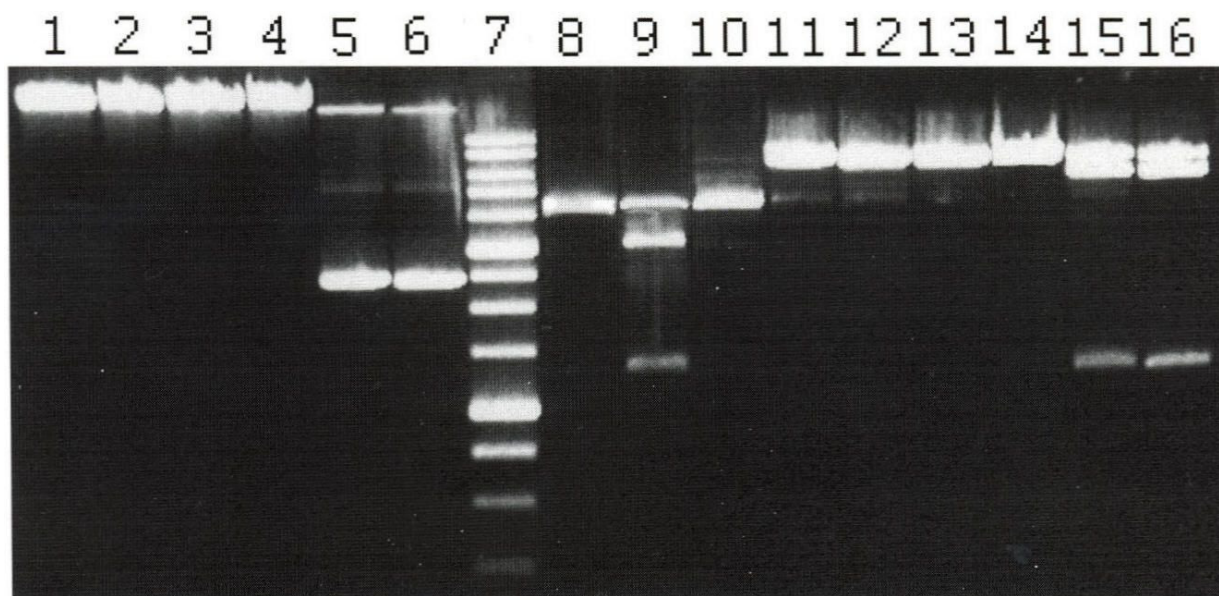
5. Определитель бактерий Берджи. / Под ред. Дж.Хоулта и др.: (9-е издание в 2
томах: пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А.Заварзина). - М., 1997.

6. Bickle, T.A., Pirrotta, V. and Imber, R. A simple, general procedure for purifying
restriction endonucleases. // Nucleic Acids Res. - 1977. - V.4 - P.561-2572.

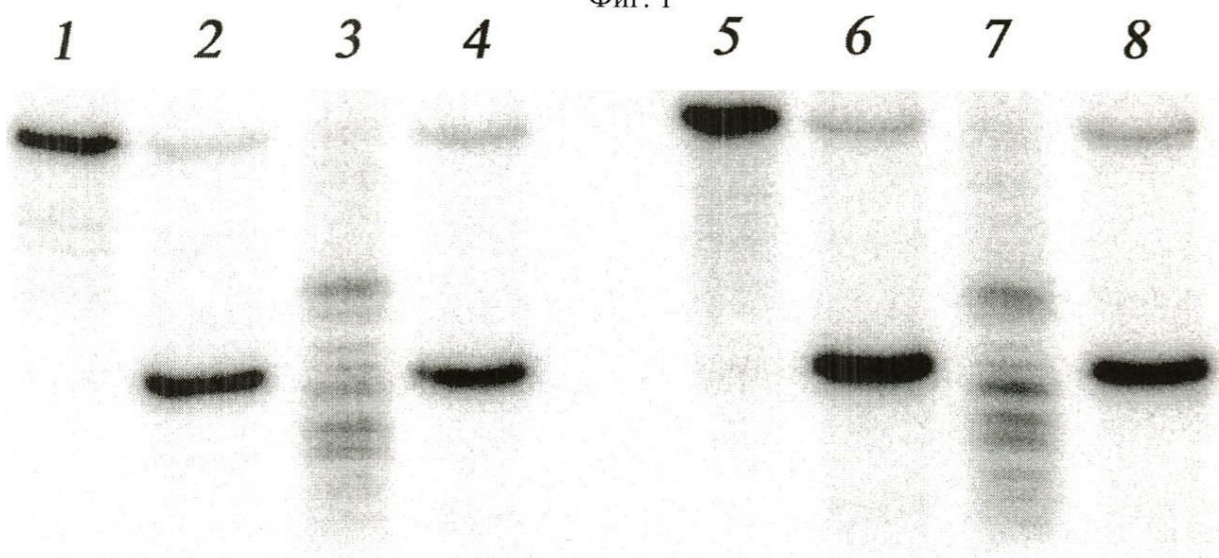
7. Sugisaki, H., Yamamoto, K., Takanami M. The HgaI restriction-modification system
contains two cytosine methylase genes responsible for modification of different DNA strands. //
1991. - J. Biol. Chem. - V.266 - P.13952-13957.

Формула изобретения

Штамм бактерий *Microbacterium testaceum* 17В, депонированный под №ВКПМ
В-10628 во Всероссийской Коллекции Промышленных микроорганизмов ФГУП
ГосНИИгенетика - продуцент сайт-специфической эндонуклеазы MteI, узнающей и
расщепляющей обе цепи нуклеотидной последовательности ДНК 5'-
G(m5C)G(m5C)[^]NG(m5C)G(m5C)-3'/3'-(m5C)G(m5C)GN[^](m5C)G(m5C)G-5', где m5C-5-
метилцитозин, с образованием однонуклеотидного 5'-выступающего конца и не
расщепляющей метилированную последовательность ДНК 5'-G(m5C)NG(m5C)-
3'/3'-(m5C)GN(m5C)G-5'.



Фиг. 1



Фиг. 2