



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011150597/10, 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: В.А. ЧЕРНУХИН и др. Новая 5-метилцитозин-зависимая сайт-специфическая эндонуклеаза GluI узнает последовательность ДНК 5'-G(5mC)↓NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN↓(5mC)G-5'. YOON JH et al. *Planomicrobium koreense* gen. nov., sp. nov., a bacterium isolated from the Korean traditional fermented seafood jeotgal, and transfer of (см. прод.)

Адрес для переписки:

630117, г.Новосибирск, а/я №5, Л.Я. Кучумовой

(72) Автор(ы):

Чернухин Валерий Алексеевич (RU),
Наякшина Татьяна 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 *Planomicrobium koreense* 78K - ПРОДУЦЕНТ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ PkrI

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и генной инженерии и касается штамма бактерий *Planomicrobium koreense* 78k. Предложенный штамм бактерий *Planomicrobium koreense* 78k выделен из почвы и обеспечивает получение сайт-специфической эндонуклеазы PkrI, узнающей и расщепляющей обе цепи нуклеотидной последовательности ДНК, которая содержит три или четыре C5-метилцитозиновых оснований в сайте

узнавания 5'-GCNAGC-3' с образованием однонуклеотидного 3'-выступающего конца. Штамм депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИгенетика под номером В-10627. Представленный штамм может быть использован для выделения новой сайт-специфической эндонуклеазы PkrI, которая может применяться при выявлении и расщеплении метилированных участков ДНК. 3 ил., 3 пр.

(56) (продолжение):

Planococcus okeanokoites (Nakagawa et al. 1996) and *Planococcus mcmeekinii* (Junge et al. 1998) to the genus *Planomicrobium*, Int. J.Syst. Evol. Microbiol, 2001 Jul, v.51, Pt.4, p.1511-1520.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 475 534** (13) **C1**

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2011150597/10, 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),
Najakshina Tat'jana 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 Planomicrobium koreense 78K-PRODUCENT OF SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE PkrI

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: bacteria strain Planomicrobium koreense 78k, is extracted from soils and provides for production of site-specific endonuclease PkrI, which recognises and splits both chains of nucleotide sequence of DNA, which contains three or four C5-methylcytosine bases in recognition site 5'-GCNAGC-3' with formation of a single-nucleotide 3'-protruding end. The strain is deposited in the

Russian National Collection of Industrial Microorganisms FGUP GosNIIgenetika under the number B-10627. The provided strain may be used for extraction of the new site-specific endonuclease PkrI, which may be applied in detection and splitting of methylated DNA sections.

EFFECT: production of site-specific endonuclease PkrI.

3 dwg, 3 ex

RU 2 475 534 C1

RU 2 475 534 C1

Изобретение относится к биотехнологии и касается получения нового штамма, используемого для выделения новой сайт-специфической эндонуклеазы, узнающей и расщепляющей обе цепи метилированной нуклеотидной последовательности ДНК 5'-GCN↓GC-3'/3'-CG↓NCG-5' при наличии в ней трех или четырех 5-метилцитозинов.

Эндонуклеаза, обладающая данной специфичностью, может быть использована для сайт-специфического гидролиза ДНК, содержащей C5-метилцитозиновые основания.

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].

Известен штамм бактерии *Bacillus simplex 23*, продуцирующий сайт-специфическую эндонуклеазу *BlsI*, расщепляющую метилированную нуклеотидную последовательность 5'-GCNGC-3' после центрального нуклеотида при наличии в этой последовательности двух 5-метилцитозинов нуклеотидную [2].

Недостатком данного штамма является то, что продуцируемая им сайт-специфическая эндонуклеаза расщепляет все последовательности 5'-GCNGC-3' даже при наличии в ней хотя бы двух 5-метилцитозинов, что не позволяет ее использовать для сайт-специфического расщепления в ДНК только гиперметилированных узнаваемых последовательностей 5'-GCNGC-3', в которых содержится только три или четыре 5-метилцитозина.

Известен штамм *Bacillus subtilis T30* [3], продуцирующий сайт-специфическую эндонуклеазу *BisI*, которая узнает и расщепляет метилированную нуклеотидную последовательность 5'-GCNGC-3', при наличии в сайте узнавания C5-метилцитозиновых оснований.

Недостатком известного штамма является то, что продуцируемая им эндонуклеаза рестрикции *BisI* не способна узнавать и расщеплять обе цепи метилированной нуклеотидной последовательности ДНК 5'-GC(m5C)GGC-3'/3'-CGG(m5C)CG-5', где m5C - 5-метилцитозин.

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 *GluI* не может расщеплять узнаваемую последовательность 5'-GCNGC-3' после центрального нуклеотида, а также не расщепляет эту последовательность при наличии в ней трех 5-метилцитозинов.

Технической задачей изобретения является получение бактериального штамма, продуцирующего сайт-специфическую эндонуклеазу, которая узнает и расщепляет обе цепи нуклеотидной последовательности ДНК 5'-GCNGC-3' при наличии в ней трех или четырех 5-метилцитозинов с образованием однонуклеотидного 3'-выступающего конца.

Поставленная техническая задача достигается получением штамма *Planomicrobium koreense 78k* - продуцента сайт-специфической эндонуклеазы, узнающей и расщепляющей метилированную последовательность нуклеотидов:

5'-G(m5C) N↓G(m5C)-3'

3'-(m5C)G↓N(m5C)G-5'

где m5C - C5-метилцитозин. (Стрелками указаны позиции расщепления ДНК.)

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

Полученный штамм *Planomicrobium koreense* 78k депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИгенетика, а продуцируемая им сайт-специфическая эндонуклеаза названа PkrI.

Штамм *Planomicrobium koreense* 78k характеризуется следующими признаками.

Культурально-морфологические признаки. Клетки - грамположительные кокки, 1 мкм в диаметре, располагаются одиночно, в парах, тетрадах, неподвижные. При встряхивании в бульоне Лурия образуют однородную муть. На питательном агаре через 4 суток при 24°C образуют колонии около 1 мм, гладкие, блестящие, непрозрачные, розоватого оттенка.

Физиолого-биохимические признаки. Факультативные анаэробы.

Каталазоположительные. Растут при температуре от 4 до 40°C.

Содержание Г+Ц в ДНК, равное 55%, определили по методу [5].

Штамм идентифицирован на основе анализа морфологических и биохимических свойств по определителю [6], продуцируемая заявляемым штаммом сайт-специфическая эндонуклеаза PkrI названа согласно номенклатуре [7].

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 4000 ед/мл.

Полученная сайт-специфическая эндонуклеаза PkrI характеризуется следующими свойствами:

1. Узнает и расщепляет метилированную последовательность нуклеотидов 5'-GCN↓GC-3'/3'-CG↓NCG-5' при наличии в этой последовательности трех или четырех 5-метилцитозинов.
2. Не расщепляет вышеприведенную последовательность, не содержащую C5-метилцитозиновых оснований (неметилированную) или меньше трех 5-метилцитозинов.
3. Расщепляет связи после центрального нуклеотида в обеих цепях узнаваемой последовательности.
4. Оптимальная температура действия фермента 30-37°C.
5. Оптимальное значение pH для действия фермента 8,0-8,5.
6. Оптимальная концентрация соли при расщеплении ДНК 0-10 mM NaCl.
7. Для проявления активности RotI требуются ионы Mg²⁺, оптимальная концентрация - 2-10 mM.

Определяющим отличием предлагаемого штамма от штаммов-продуцентов сайт-специфических эндонуклеаз BslI и GluI является то, что первый продуцирует сайт-специфическую эндонуклеазу, которая узнает и расщепляет обе цепи метилированной нуклеотидной последовательности ДНК 5'-GC[^]NGC-3' только при условии метилирования в узнаваемой последовательности больше трех цитозинов. Данное отличие от BslI позволяет использовать эндонуклеазу PkrI для более крупноблочной фрагментации C5-метилированной ДНК, а отличие от GluI - для менее крупноблочной

фрагментации C5-метилованной ДНК.

Таким образом, сайт-специфическая эндонуклеаза PkrI 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 следующими 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 [8].

Пример 2. Сайт-специфический гидролиз C 5-метилованной плазмидной ДНК эндонуклеазой PkrI.

Расщепление ДНК проводят в оптимальных условиях (37°C, реакционный буфер - 10 mM TrisHCl, pH 8.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT) в течение 60 мин.

Продукты расщепления плазмидной ДНК разделяют путем электрофореза в 1% агарозном геле.

В качестве субстратов для выявления специфичности расщепления используют различные метилированные и неметилованные плазмидные и фаговые ДНК: фагов лямбда и T7, pHspAI (содержит метилированные последовательности 5'-G(5mC)GC-3'/5'-G(5mC)GC-3' [1]) и pFsp4HI2 (содержит метилированные последовательности 5'-G(5mC)NGC-3'/5'-G(5mC)NGC-3' [4]), а также ДНК pUC19, предварительно модифицированную метилазой CviPI. Метилаза CviPI метилирует цитозины в положении C5 в последовательности 5'-GC-3' [9].

На фигуре 1 представлена электрофореграмма продуктов, образованных в результате обработки ДНК фагов лямбда и T7, а также плазмид pHspAI и pFsp4HI2 эндонуклеазой PkrI.

Описание дорожек на электрофореграмме, изображенной на фиг.1:

- 1 - ДНК фага лямбда;
- 2 - ДНК фага лямбда, обработанная эндонуклеазой PkrI;
- 3 - ДНК фага T7;
- 4 - ДНК фага T7, обработанная эндонуклеазой PkrI;
- 5 - ДНК pHspAI,
- 6 - ДНК pHspAI, обработанная эндонуклеазой PkrI;
- 7 - маркер молекулярного веса ДНК 1 kb (производство НПО СибЭнзим);
- 8 - ДНК pFsp4HI2;
- 9 - ДНК pFsp4HI2, обработанная BlnI;
- 10 - ДНК pFsp4HI2, обработанная GluI;
- 11 - ДНК pFsp4HI2, обработанная PkrI.

Как видно из фиг.1, эндонуклеаза PkrI не расщепляет неметилованные ДНК фагов лямбда и T7, а также ДНК pHspAI, содержащую метилированные

последовательности 5'-GCGC-3'. При этом PcrI расщепляет ДНК pFsp4HI2, давая хорошо видимый фрагмент в районе 450-500 п.н. (дорожка 11). Теоретические расчеты показывают, что в ДНК pFsp4HI2 имеются две последовательности 5'-GCNGCNGC-3', расположенные друг от друга на расстоянии 484 п.н.. Последовательность

5'-GCNGCNGC-3' содержит два сайта узнавания метилазы M.Fsp4HI, метилирующей первый цитозин в последовательности 5'-GCNGC-3'. Поэтому последовательность 5'-GCNGC-3' в pFsp4HI2 должна содержать два 5-метилцитозина на обеих цепях сайта узнавания, а 5'-GCNGCNGC-3' должна содержать три 5-метилцитозина:

5'-G(5mC)NG(5mC)NGC-3'/3'-CGN(5mC)GN(5mC)G-5'. Эта последовательность включает две последовательности 5'-GCNGC-3' с тремя 5-метилцитозинами. Как показывают теоретические расчеты, в pFsp4HI2 имеются две последовательности с тремя 5-метилцитозинами (5'-G(5mC)NG(5mC)NGC-3'/3'-CGN(5mC)GN(5mC)G-5'), расположенные друг от друга на расстоянии 485 п.н., что соответствует электрофоретической подвижности фрагмента, образующегося при обработке pFsp4HI2 эндонуклеазой PcrI. Этот факт дает основание предположить, что эндонуклеаза PcrI узнает и расщепляет метилированную последовательность 5'-GCNGC-3', содержащую три 5-метилцитозина. Как видно на фигуре 1, в отличие от PcrI эндонуклеаза BlnI эффективно расщепляет все метилированные последовательности 5'-GCNGC-3', если в ней есть уже два 5-метилцитозина на обеих цепях (дорожка 6). В отличие от PcrI эндонуклеаза GluI не расщепляет последовательности 5'-GCNGC-3' как с двумя, так и с тремя 5-метилцитозинами.

На фигуре 2 представлена электрофореграмма продуктов, образованных в результате обработки ДНК pUC19 эндонуклеазой рестрикции Fsp4HI, а также ДНК pUC19, предварительно метилированной метилазой CviPI и обработанной эндонуклеазой PcrI.

Описание дорожек на электрофореграмме, изображенной на фиг.2:

1 - ДНКpUC19, гидролизованная эндонуклеазой рестрикции MspI по сайту 5'-CCGG-3', использованная в качестве маркера молекулярных весов;

2 - ДНКpUC19, гидролизованная эндонуклеазой рестрикции Fsp4HI по сайту 5'-GCNGC-3';

3 - ДНК pUC19, предварительно метилированная метилазой CviPI и обработанная эндонуклеазой PcrI.

Как видно из фиг.2, электрофоретические подвижности фрагментов, образованных при гидролизе pUC19 по последовательности сайта узнавания рестриктазы Fsp4HI и при гидролизе эндонуклеазой PcrI плазмиды pUC19, предварительно метилированной по последовательности 5'-GC-3', совпадают.

Этот факт означает, что при C5-метилировании ДНК по последовательности 5'-GC-3' эндонуклеаза PcrI расщепляет метилированные последовательности 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN(5mC)G-5', содержащие четыре 5-метилцитозина в узнаваемой последовательности.

Таким образом, сайт-специфическая эндонуклеаза PcrI узнает и расщепляет последовательность 5'-GCNGC-3' только при наличии в ней трех или четырех 5-метилцитозинов.

Пример 3. Анализ сайт-специфичности и определение позиции гидролиза ДНК эндонуклеазой PcrI на олигонуклеотидных дуплексах.

Определение места гидролиза ДНК рестриктазой PcrI осуществляли путем сравнения длин фрагментов, образуемых при расщеплении эндонуклеазами рестрикции PcrI и BlnI олигонуклеотидного дуплекса D1/D2, образованного из

олигонуклеотидов D1 и D2:

D1: 5'-GAGTTTAG(m5C)GG(m5C)TATCGATCC-3'

D2: 5'-GGATCGATAG(m5C)CG(m5)CTAAACTC-3'.

В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой EhoIII.

На фигуре 3 изображен радиоавтограф электрофореграммы продуктов расщепления дезоксирибоолигонуклеотидного радиоактивно меченного дуплекса D1/D2 в 20% полиакриламидном геле, содержащем 7-молярную мочевику.

Описание дорожек на электрофореграмме, изображенной на фиг.3:

1 - исходный дуплекс D1*/D2;

2 - дуплекс D1*/D2, обработанный эндонуклеазой PkrI;

3 - дуплекс D1*/D2, обработанный экзонуклеазой III из E.coli;

4 - дуплекс D1*/D2, обработанный эндонуклеазой BslI.

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

Из фиг.3 видно, что продукты гидролиза ДНК дуплекса D1*/D2 на дорожках 2 и 4 имеют одинаковые длины. Это означает, что позиции гидролиза ферментами PkrI и BslI совпадают.

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

Выход сайт-специфической эндонуклеазы PkrI определяют по электрофоретической картине расщепления ДНК pFsp4HI2. За единицу активности принимают минимальное количество фермента, необходимое для полного расщепления 1 мкг ДНК pFsp4HI2 за 1 час при температуре 37°C в объеме реакционной смеси 50 мкл. Выход фермента составляет 3000 ед/г сырой биомассы, концентрация 4000 ед/мл.

Фермент хранится при -20°C в буфере, содержащем 50% глицерин, 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 PkrI, узнающую и расщепляющую обе цепи нуклеотидной последовательности ДНК, которая содержит три или четыре C5-метилцитозиновых оснований в сайте узнавания 5'-GCNGC-3' с образованием однонуклеотидного 5'-выступающего конца.

Данная сайт-специфическая эндонуклеаза может быть использована в молекулярной биологии, биотехнологии и геномной инженерии для сайт-специфического расщепления метилированной ДНК, в частности для выявления и анализа метилированной хромосомной ДНК млекопитающих и человека.

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 Glal 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 имени 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 *BisI* 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 *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. Дедков В.С. Определение содержания G+C в ДНК бактерий при помощи эндонуклеаз рестрикции // Биотехнология. - 2004. - №4. - С.77-82.

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

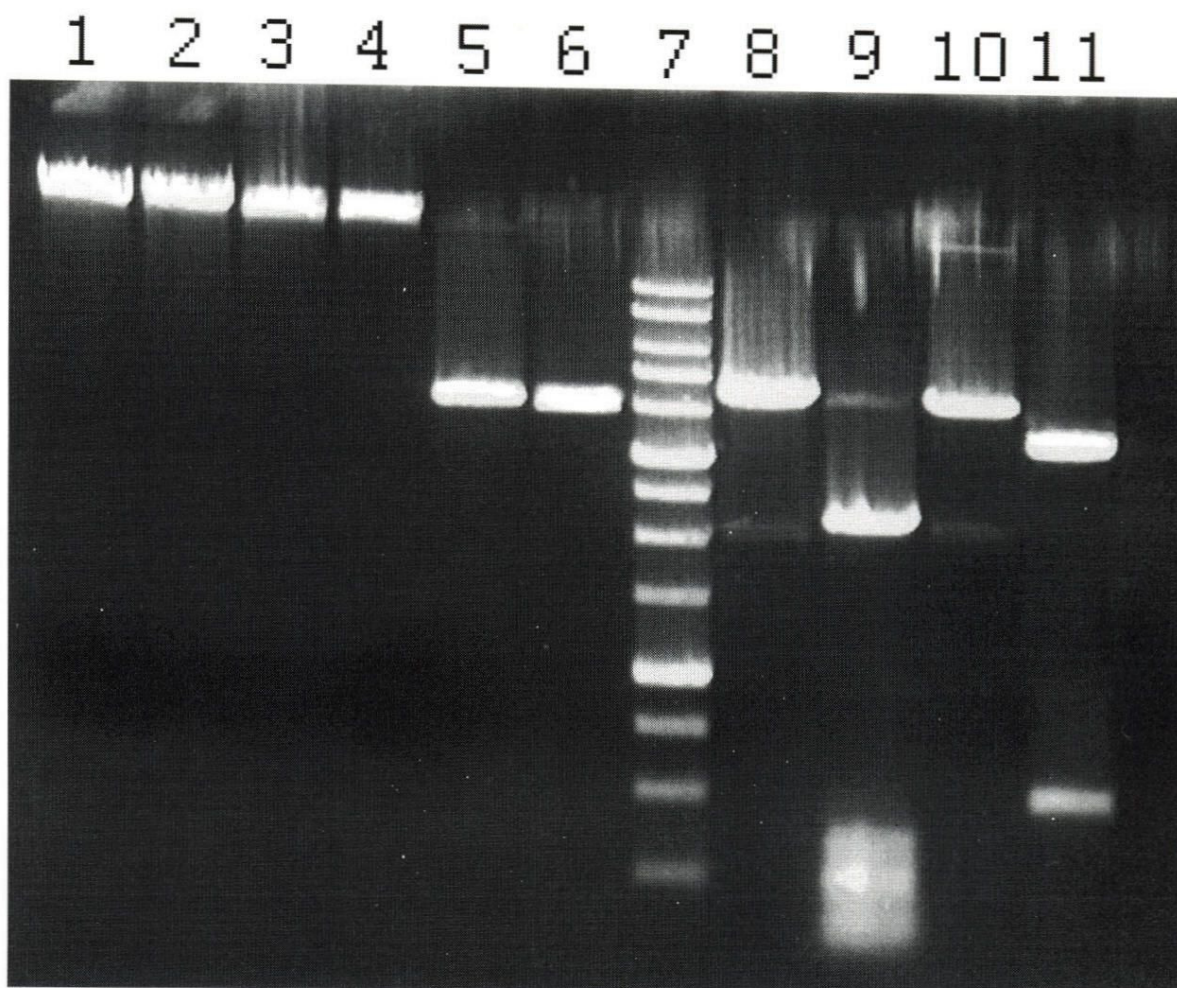
7. Smith H.O., Nathans D. A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. // J. Mol. Biol. - 1973. - Vol.81. - P.419-423.

8. Bickle T.A., Pirrotta V. and Imber R. A simple, general procedure for purifying restriction endonucleases. // Nucleic Acids Res. - 1977. - V.4 - P.561-572.

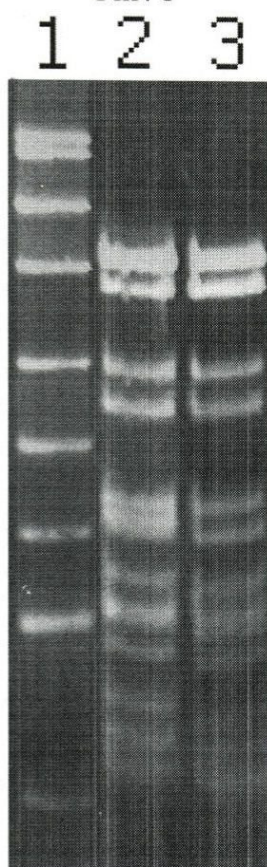
9. Rebase official site <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>

Формула изобретения

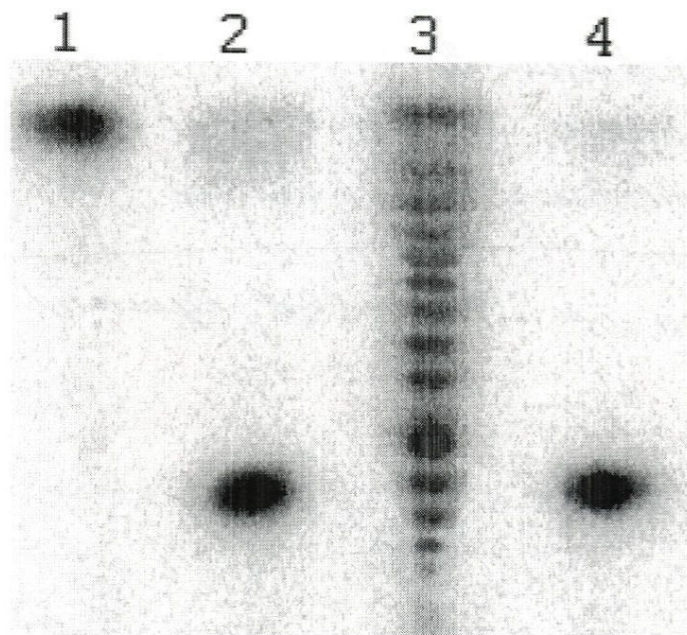
Штамм бактерий *Planomicrobium koreense* 78k, депонированный под №ВКПМ В-10627 во Всероссийской Коллекции Промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИгенетика - продуцент сайт-специфической эндонуклеазы *RklI*, узнающей и расщепляющей обе цепи нуклеотидной последовательности ДНК, которая содержит три или четыре С5-метилцитозиновых основания в сайте узнавания 5'-GCN[^]GC-3' с образованием однонуклеотидного 3'-выступающего конца.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3