

МЕТИЛЗАВИСИМАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДНК-ЭНДОНУКЛЕАЗА BslI УЗНАЕТ И РАСЩЕПЛЯЕТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК 5'-RYNRY-3' ПРИ НАЛИЧИИ В НЕЙ НЕ МЕНЕЕ ДВУХ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНОВ

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

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Изучена субстратная специфичность метилзависимой сайт-специфической ДНК-эндонуклеазы BslI. Показано, что BslI гидролизует вырожденную последовательность ДНК 5'-RYNRY-3' (где R — А или G, а Y — Т или C) при наличии в ней двух или более 5-метилцитозинов. Эффективность гидролиза ДНК ферментом зависит от числа 5-метилцитозинов и их положения в узнаваемой последовательности. Поскольку эндонуклеаза BslI расщепляет только C5-метилованную ДНК, она может быть использована в молекулярно-биологических и эпигенетических исследованиях для оценки метилирования геномной ДНК эукариот.

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

Введение

5-Метилцитозин-зависимые сайт-специфические ДНК эндонуклеазы (MD-эндонуклеазы, от англ. «methyl-directed») были обнаружены сравнительно недавно [3, 7]. Эти ферменты узнают и специфически расщепляют определенные последовательности ДНК только при наличии в них 5-метилцитозина. По своим биохимическим свойствам MD-эндонуклеазы аналогичны хорошо изученным эндонуклеазам рестрикции типа II.

Однако, если эндонуклеазы рестрикции узнают и гидролизуют немодифицированную ДНК и не расщепляют метилированную, то MD-эндонуклеазы, наоборот, гидролизуют метилированную ДНК и совершенно не расщепляют нативную немодифицированную ДНК [1–7].

Ранее нами было показано, что MD-эндонуклеаза BslI гидролизует последовательность ДНК 5'-G(5mC)NGC-3'/3'-CGN(5mC)G-5' [5]. В настоящей работе мы предприняли детальное изучение субстратной специфичности BslI.

Материалы и методы

Препараты ферментов и субстраты для них.

Для экспериментов использовали препарат фермента BslI с активностью 16 ед./мкл, T4 полинуклеотидкиназу, препараты ДНК и буферные растворы производства НПО «СибЭнзим» (Россия), а также ДНК-метилтрансферазу CviPI производства «New England Biolabs» (США). Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в НПО «СибЭнзим» (Россия). Их первичная структура приведена в таблице 1.

В качестве маркера молекулярных масс ДНК использовали ДНК-маркер 1 kb и pUC19/MspI («СибЭнзим», Россия).

Метилирование субстратных ДНК ферментом M.CviPI. Метилирование pUC19 и других плазмидных ДНК проводили при 37 °C в течение 1 часа в 20 мкл реакционной смеси, содержащей ДНК в количестве 0,2 мкг, SE-буфер «Y» (33 mM Трис-ацетат pH 7,9 — при 25 °C, 66 mM калия ацетат, 10 mM магния ацетат, 1 mM DTT), SAM — 100 мкм, препарат фермента M.CviPI (4 ед./мкл) — 1 мкл.

Гидролиз плазмидной ДНК эндонуклеазой BslI и анализ продуктов реакции. Гидролиз плазмидной ДНК проводили при 37 °C в 20 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «W» (10 mM Трис-HCl pH 8,5 — при 25 °C, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT), ДНК в количестве 0,5 мкг и 1 мкл препарата фермента BslI (16 ед./мкл) в течение 2 часов.

© 2013 г. Чернухин В.А., Гончар Д.А., Томилова Ю.Э., Болтенгаген А.А., Голикова Л.Н., Дегтярев С.Х.

* Автор для переписки:

Чернухин Валерий Алексеевич

ООО «СибЭнзим»

630117 Новосибирск-117, ул. Академика Тимакова, 2/12

Тел./факс: +7 (383) 209-27-40

E-mail: valera@sibenzyme.ru

**Структура олигонуклеотидов, использованных в данной работе.
Нуклеотиды, входящие в состав изучаемого участка, подчеркнуты**

N1: 5'-CCCTTTCCTCTTTTGTAG(5mC)TTTTCCC-3'
 N2: 5'-GGGAAAAG(5mC)TACAAAAGAGGAAAGGG-3'
 N3: 5'-CCCTTTCCTCTTTTACAG(5mC)TTTTCCC-3'
 N4: 5'-GGGAAAAG(5mC)TGTAAGAGGAAAGGG-3'
 N5: 5'-CCCTTTCCTCTTTTATAG(5mC)TTTTCCC-3'
 N6: 5'-GGGAAAAG(5mC)TATAAGAGGAAAGGG-3'
 N7: 5'-GGGAAAAG(5mC)TA(5mC)AAAAGAGGAAAGGG-3'
 N8: 5'-CCCTTTCCTCTTTTA(5mC)AG(5mC)TTTTCCC-3'
 N9: 5'-GGGAAAAGCTA(5mC)AAAAGAGGAAAGGG-3'
 N10: 5'-GCTTGTACTTTGA(5mC)GGTATTGATTCTCACCACG-3'
 N11: 5'-CGTGGTGAGAATCAATA(5mC)CGTCAAAGTACAAGC-3'
 N12: 5'-CCCTTTCCTCTTTTA(5mC)AGCTTTTCCC-3'
 N13: 5'-GCTTGTACTTTGA(5mC)AGTATTGATTCTCACCACG-3'
 N14: 5'-CGTGGTGAGAATCAATA(5mC)TGTCAAAGTACAAGC-3'
 N15: 5'-GCTTGTACTTTAGCGGCATTGATTCTCACCACG-3'
 N16: 5'-CGTGGTGAGAATCAATGCCGCTAAAGTACAAGC-3'
 N17: 5'-GCTTGTACTTTAG(5mC)GGCATTGATTCTCACCACG-3'
 N18: 5'-CGTGGTGAGAATCAATG(5mC)CGCTAAAGTACAAGC-3'
 N19: 5'-GCTTGTACTTTAGCGG(5mC)ATTGATTCTCACCACG-3'
 N20: 5'-CGTGGTGAGAATCAATGCCG(5mC)TAAAGTACAAGC-3'
 N21: 5'-GCTTGTACTTTAG(5mC)GG(5mC)ATTGATTCTCACCACG-3'
 N22: 5'-CGTGGTGAGAATCAATG(5mC)CG(5mC)TAAAGTACAAGC-3'
 N23: 5'-GCTTGTACTTTAA(5mC)GA(5mC)ATTGATTCTCACCACG-3'
 N24: 5'-CGTGGTGAGAATCAATGTCGTAAAGTACAAGC-3'

Для разделения продуктов гидролиза плазмидной ДНК применяли электрофорез в 1% агарозном или 15% полиакриламидном гелях в буфере ТАЕ.

Приготовление олигонуклеотидного дуплекса. Одну из цепей изучаемого олигонуклеотидного дуплекса модифицировали по 5'-концу с помощью T4 полинуклеотидкиназы и γ [^{32}P]-АТР. После очистки олигонуклеотида от побочных продуктов реакции к нему добавляли эквимольное количество комплементарного немеченного олигонуклеотида и пробирку прогревали 5 минут при 95 °С с последующим охлаждением до комнатной температуры на рабочем столе.

Гидролиз олигонуклеотидных дуплексов эндонуклеазой BslI. Реакцию гидролиза проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «W», олигонуклеотидный дуплекс в концентрации 40 нМ и 1 мкл препарата фермента BslI при температуре 37 °С в течение 1 часа. Электрофорез продуктов гидролиза проводили в денатурирующем 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной в трис-боратном буфере. Радио-

автографию геля проводили с помощью прибора Personal Molecular Imager («BioRad», США) и программы Quantity One V.4.6.7 («BioRad», США).

Определение степени гидролиза олигонуклеотидных дуплексов. Для установления степени расщепления на радиоавтографе электрофореграммы продуктов гидролиза олигонуклеотида 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 программы OptiQuant V. 0.3.00 (Packard Instrument Co., USA).

Результаты и обсуждение

Гидролиз метилированной последовательности 5'-GCNGC-3' эндонуклеазой BslI. Ранее нами было показано, что MD-эндонуклеаза BslI расщепляет ДНК

плазмиды $\rho\text{Fsp4HI1}$ [5]. Эта плазида содержит ген ДНК-метилтрансферазы M.Fsp4HI [8], модифицирующей сайты $5'-\text{GCNGC}-3'$ с образованием последовательностей $5'-\text{G}(5\text{mC})\text{NGC}-3'/3'-\text{CGN}(5\text{mC})\text{G}-5'$, по которым и осуществляется гидролиз ферментом BlsI . На рисунке 1 приведена фотография агарозного геля, на которой видно, что BlsI специфически расщепляет плазмиду $\rho\text{Fsp4HI1}$, образуя характерный набор фрагментов (дорожка 8). При этом фермент не гидролизует такие субстраты, как, например, ДНК фага λ ($\text{dcm}+$) (дорожка 2), фага T7 (дорожка 4) и ДНК плазмиды ρHspAI [3], в которой метилированы сайты $5'-\text{GCGC}-3'$ с образованием последовательности $5'-\text{G}(5\text{mC})\text{GC}-3'/3'-\text{CG}(5\text{mC})\text{G}-5'$ (дорожка 6).

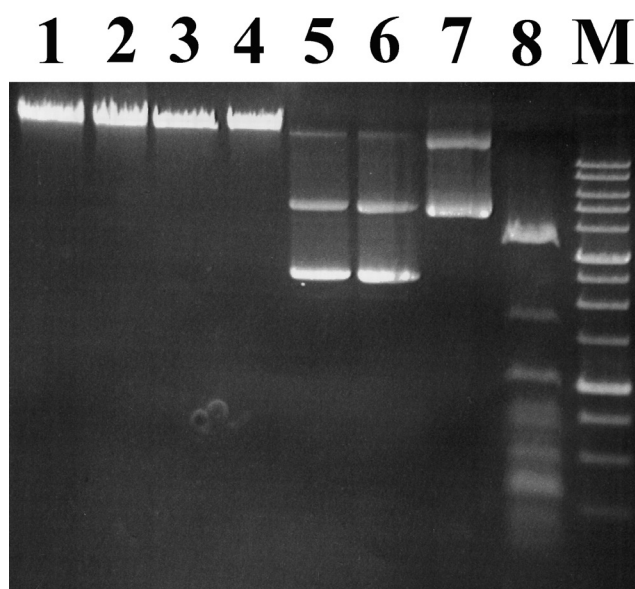


Рис. 1. Расщепление эндонуклеазой BlsI ДНК плазмиды $\rho\text{Fsp4HI1}$, содержащей метилированные последовательности $5'-\text{GCNGC}-3'$. Электрофорез в 1% агарозном геле. Дорожки: 1 – ДНК фага λ ; 2 – ДНК фага λ + BlsI ; 3 – ДНК фага T7; 4 – ДНК фага T7 + BlsI ; 5 – ДНК ρHspAI ; 6 – ДНК ρHspAI + BlsI ; 7 – ДНК $\rho\text{Fsp4HI1}$; 8 – ДНК $\rho\text{Fsp4HI1}$ + BlsI ; М – ДНК-маркер 1kb

В настоящей работе мы исследовали способность MD-эндонуклеазы BlsI расщеплять другие субстраты. Последовательность $5'-\text{GCNGC}-3'/3'-\text{CGNCG}-5'$ может включать от одного до четырех метилированных цитозинов (не считая центрального основания N). Необходимо было определить активность фермента BlsI при расщеплении сайта $5'-\text{GCNGC}-3'/3'-\text{CGNCG}-5'$, содержащего различное количество 5-метилцитозинов. Кроме того, как мы установили ранее, MD-эндонуклеаза GlaI расщепляет не только по-

следовательность $5'-\text{G}(5\text{mC})\text{GC}-3'$, но и вырожденные варианты данной последовательности с общей формулой $5'-\text{R}(5\text{mC})\text{GY}-3'$ [10]. В связи с этим мы определяли способность MD-эндонуклеазы BlsI гидролизовать вырожденные варианты последовательности $5'-\text{GCNGC}-3'/3'-\text{CGNCG}-5'$.

Гидролиз ДНК, содержащей метилированные G(5mC)-динуклеотиды. Способность BlsI расщеплять последовательность $5'-\text{GCNGC}-3'/3'-\text{CGNCG}-5'$ с различным количеством 5-метилцитозинов определялась в экспериментах на специально подобранных плазмидных ДНК. Для получения таких субстратов мы использовали ДНК-метилтрансферазу M.CviPI , которая метилирует динуклеотид $5'-\text{GC}-3'$ с образованием $5'-\text{G}(5\text{mC})-3'/3'(5\text{mC})\text{G}-5'$ [9]. ДНК ρUC19 была обработана ферментом M.CviPI , как описано в разделе «Материалы и методы», и далее подвергалась гидролизу MD-эндонуклеазой BlsI . Стоит отметить, что плазида $\rho\text{UC19}/\text{M.CviPI}$ содержит метилированные цитозины не только в последовательностях $5'-\text{GCNGC}-3'/3'-\text{CGNCG}-5'$, но и в последовательностях вида $5'-\text{RYNGC}-3'/3'-\text{YRNCG}-5'$, которые также могут служить мишенью для BlsI .

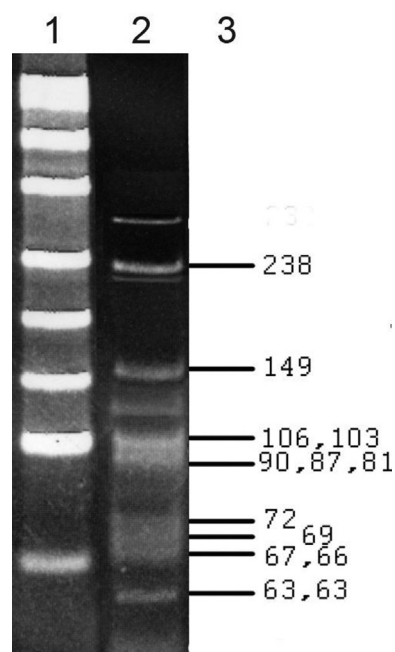
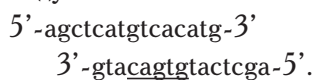


Рис. 2. Электрофореграмма ДНК-фрагментов, образованных в результате сайт-специфического гидролиза плазмиды $\rho\text{UC19}/\text{M.CviPI}$ эндонуклеазой BlsI . Электрофорез в 15% ПААГ. Дорожки: 1 – маркер $\rho\text{UC19}/\text{M.CviPI}$; 2 – ДНК $\rho\text{UC19}/\text{M.CviPI}$ + BlsI ; 3 – теоретически рассчитанные длины фрагментов ДНК, образующихся при расщеплении ρUC19 по последовательностям $5'-\text{GCNRY}-3'$ и $5'-\text{RYNGC}-3'$

Результаты эксперимента приведены на рисунке 2. Справа от фотографии геля на рисунке представлена полученная расчетным путем теоретическая картина расщепления ρ UC19 по последовательности 5'-GCNRY-3' и комплементарной ей последовательности 5'-RYNGC-3' с указанием длин получаемых фрагментов. Как видно из рисунка 2, длины фрагментов ДНК, образованных при гидролизе ρ UC19/M.CviPI ферментом BlnI, близки к расчетным длинам, полученным при расщеплении плазмиды ρ UC19 по последовательностям 5'-GCNRY-3' и 5'-RYNGC-3'. Несколько дополнительных фрагментов, видимых на электрофореграмме и имеющих меньшую интенсивность, являются, видимо, результатом неполного гидролиза плазмидной ДНК. То есть, помимо последовательности 5'-G(5mC)NGC-3'/3'-CGN(5mC)G-5' [3], BlnI способен узнавать и расщеплять последовательность 5'-G(5mC)NRY-3'/3'-(5mC)GNYR-5'.

Гидролиз ДНК, содержащей A(5mC) динуклеотиды в сайте 5'-RYNRY-3'. Для проверки способности фермента BlnI расщеплять полностью вырожденный сайт 5'-RYNRY-3' с 5-метилцитозинами, но без G(5mC)-динуклеотидов, мы использовали плазмиду ρ Fat/Kz3(GTNAC), содержащую последовательности 5'-GTNA(5mC)-3'/3'-(5mC)ANTG-5'. Исходная плазмида ρ Fat/Kz3 была получена путем клонирования Kzo9I-фрагмента геномной ДНК бактериального штамма *Flavobacterium aquatile* NL3, содержащего ген ДНК-метилтрансферазы M.FatI, в вектор ρ UC19 по сайту эндонуклеазы рестрикции BamHI. ДНК-метилтрансфераза M.FatI метилирует цитозин в сайте 5'-CATG-3' с образованием последовательности 5'-(5mC)ATG-3'. Плазмида ρ Fat/Kz3(GTNAC) была получена путем встраивания в плазмиду ρ Fat/Kz3 по сайту эндонуклеазы рестрикции HindIII олигонуклеотидного дуплекса:



Ввиду наличия в олигонуклеотидном дуплексе двух сайтов метилирования 5'-CATG-3', в плазмиде ρ Fat/Kz3(GTNAC) возникает уникальная последовательность 5'-(5mC)ATGTCA(5mC)ATG-3'/3'-GTA(5mC)AGTGTA(5mC)-5', содержащая изучаемый сайт 5'-GTNA(5mC)-3'/3'-(5mC)ANTG-5' (подчеркнут).

На рисунке 3 приведена картина расщепления эндонуклеазой BlnI плазмид ρ Fat/Kz3 и ρ Fat/Kz3(GTNAC), предварительно линейаризованных рестриктазой DriI. Как видно из этого рисунка, ρ Fat/Kz3(GTNAC) расщепляется эндонуклеазой BlnI в

единственном месте, в то время как гидролиз плазмиды ρ Fat/Kz3 не происходит. Электрофоретическая подвижность продуктов гидролиза соответствует теоретически рассчитанным длинам фрагментов (3660 и 1260 п.н.), которые должны образоваться при расщеплении метилированной последовательности 5'-GTNA(5mC)-3'/3'-(5mC)ANTG-5'.

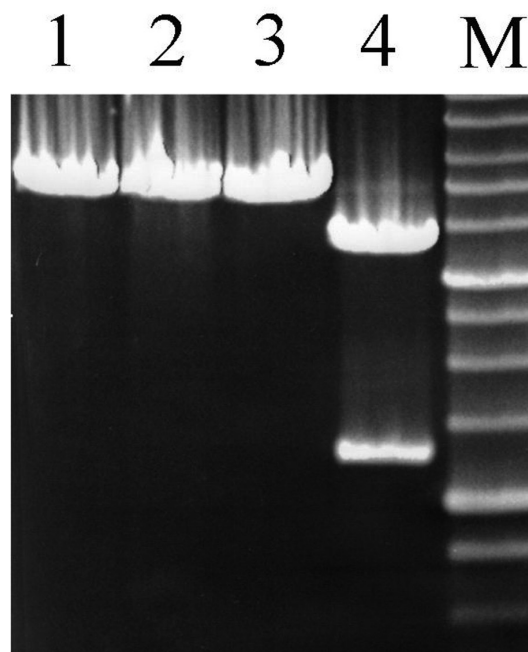


Рис. 3. Гидролиз плазмид ρ Fat/Kz3 и ρ Fat/Kz3(GTNAC) ДНК-эндонуклеазой BlnI. Дорожки: 1 – ДНК ρ Fat/Kz3 + DriI; 2 – ДНК ρ Fat/Kz3 + DriI + BlnI; 3 – ДНК ρ Fat/Kz3(GTNAC) + DriI; 4 – ДНК ρ Fat/Kz3(GTNAC) + DriI + BlnI; M – ДНК-маркер 1kb

Таким образом, BlnI гидролизует последовательность 5'-GTNA(5mC)-3'/3'-(5mC)ANTG-5' в плазмиде ρ Fat/Kz3(GTNAC). Выявленная нами способность MD-эндонуклеазы BlnI расщеплять метилированный сайт, не содержащий в своем составе GC-динуклеотидов, ставит вопрос о возможности расщепления других сайтов, содержащих 5-метилцитозин в последовательности 5'-RYNRY-3'.

Гидролиз олигонуклеотидов с различными вариантами метилированной последовательности 5'-RYNRY-3'. Для подтверждения возможности расщепления эндонуклеазой BlnI различных вариантов метилированной последовательности 5'-RYNRY-3' мы использовали синтетические олигонуклеотидные дуплексы, содержащие два и более 5-метилцитозина в последовательности 5'-RYNRY-3'. Результаты экспериментов приведены на рисунках 4–8.

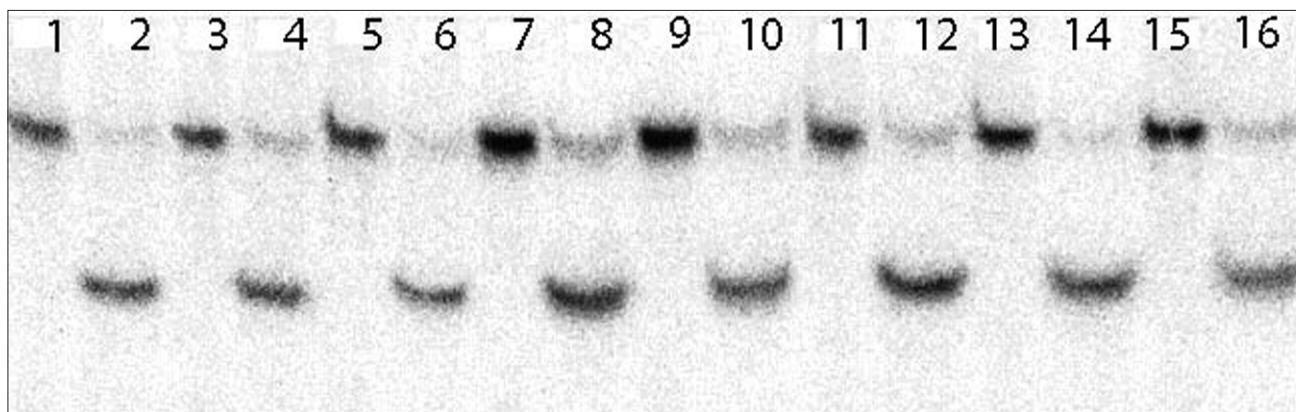


Рис. 4. Расщепление эндонуклеазой BlnI дуплексов, содержащих сайт 5'-GCNGC-3' с различным количеством и расположением 5-метилцитозинов.

Дорожки:

1, 2 — дуплекс N17*/N18 (последовательность 5'-G(5mC)GGC-3'/3'-CGC(5mC)G-5');

3, 4 — дуплекс N17*/N20 (5'-G(5mC)GGC-3'/3'-(5mC)GCCG-5');

5, 6 — дуплекс N17*/N22 (5'-G(5mC)GGC-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5');

7, 8 — дуплекс N19*/N20 (5'-GCCG(5mC)-3'/3'-(5mC)GCCG-5');

9, 10 — дуплекс N19*/N22 (5'-GCCG(5mC)-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5');

11, 12 — дуплекс N21*/N18 (5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-CGC(5mC)G-5');

13, 14 — дуплекс N21*/N20 (5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-(5mC)GCCG-5');

15, 16 — дуплекс N21*/N22 (5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5').

Нечетные номера — intactный дуплекс, четные номера — дуплекс, обработанный BlnI. Значком * выделена меченая олигонуклеотидная цепь. Электрофорез в 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной

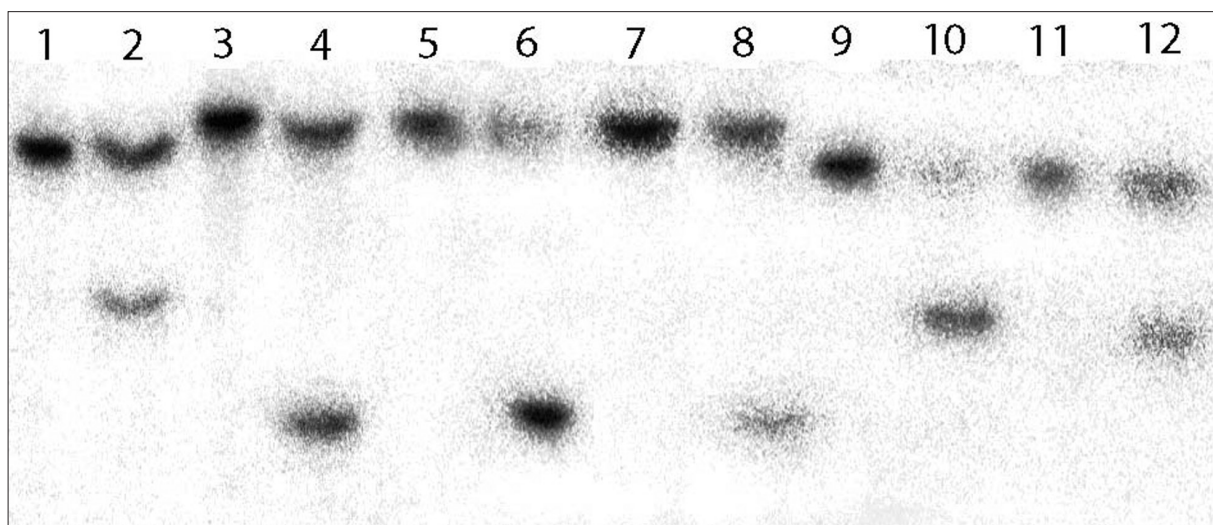


Рис. 5. Расщепление эндонуклеазой BlnI дуплексов, содержащих сайт 5'-ACNGC-3'/3'-TGNCG-5' с различными вариантами расположения метилированных цитозинов.

Дорожки:

1, 2 — дуплекс N3*/N4 (5'-ACAG(5mC)-3'/3'-TGT(5mC)G-5');

3, 4 — дуплекс N4*/N3 (5'-G(5mC)TGT-3'/3'-(5mC)GACA-5');

5, 6 — дуплекс N4*/N8 (5'-G(5mC)TGT-3'/3'-(5mC)GA(5mC)A-5');

7, 8 — дуплекс N4*/N12 (5'-G(5mC)TGT-3'/3'-CGA(5mC)A-5');

9, 10 — дуплекс N8*/N4 (5'-A(5mC)AG(5mC)-3'/3'-TGT(5mC)G-5');

11, 12 — дуплекс N12*/N4 (5'-A(5mC)AGC-3'/3'-TGT(5mC)G-5').

Нечетные номера — intactный дуплекс, четные номера — дуплекс, обработанный BlnI. Значком * выделена меченая олигонуклеотидная цепь. Электрофорез в 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной

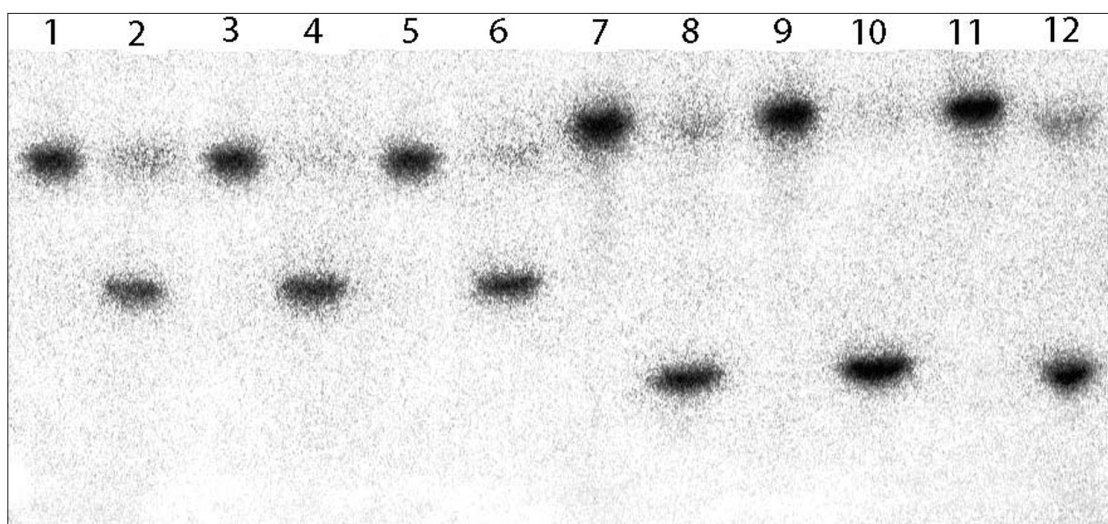


Рис. 6. Расщепление эндонуклеазой BlnI дуплексов, содержащих сайт 5'-GTNGC-3'/3'-CANCG-5' с различными вариантами расположения метилированных цитозинов.

Дорожки:

- 1, 2 — дуплекс N1*/N2 (5'-GTAG(5mC)-3'/3'-CAT(5mC)G-5');
- 3, 4 — дуплекс N1*/N7 (5'-GTAG(5mC)-3'/3'-(5mC)AT(5mC)G-5');
- 5, 6 — дуплекс N1*/N9 (5'-GTAG(5mC)-3'/3'-(5mC)ATCG-5');
- 7, 8 — дуплекс N2*/N1 (5'-G(5mC)TAC-3'/3'-(5mC)GATG-5');
- 9, 10 — дуплекс N7*/N1 (5'-G(5mC)TA(5mC)-3'/3'-(5mC)GATG-5');
- 11, 12 — дуплекс N9*/N1 (5'-GCTA(5mC)-3'/3'-(5mC)GATG-5').

Нечетные номера — интактный дуплекс, четные номера — дуплекс, обработанный BlnI. Значком * выделена меченая олигонуклеотидная цепь. Электрофорез в 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной

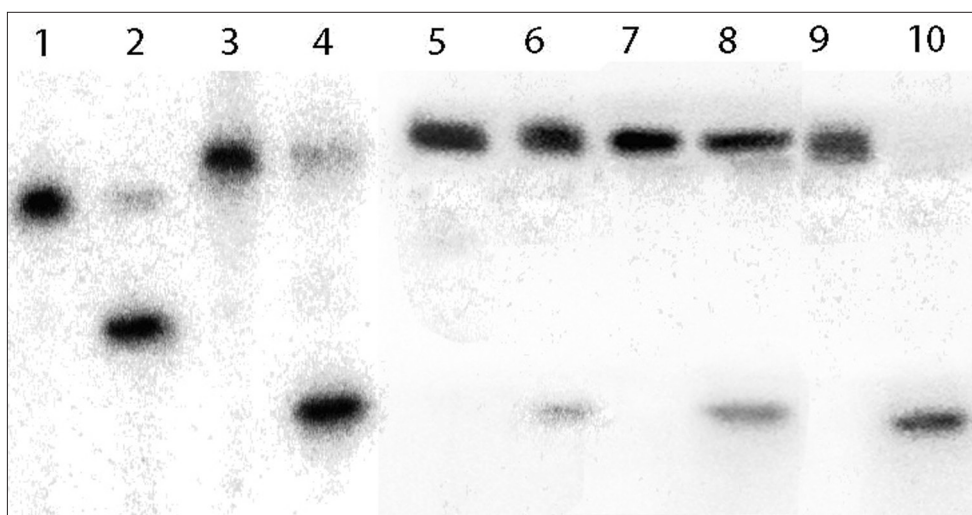


Рис. 7. Расщепление эндонуклеазой BlnI олигонуклеотидных дуплексов, содержащих сайты 5'-ATNGC-3' и 5'-ACNGT-3'.

Дорожки:

- 1, 2 — дуплекс N5*/N6 (5'-ATAG(5mC)-3'/3'-TAT(5mC)G-5');
- 3, 4 — дуплекс N6*/N5 (5'-G(5mC)TAT-3'/3'-(5mC)GATA-5');
- 5, 6 — дуплекс N10*/N11 (5'-A(5mC)GGT-3'/3'-TGC(5mC)A-5');
- 7, 8 — дуплекс N13*/N14 (5'-A(5mC)AGT-3'/3'-TGT(5mC)A-5');
- 9, 10 — дуплекс N17*/N18 (5'-G(5mC)GGC-3'/3'-CGC(5mC)G-5');

Нечетные номера — интактный дуплекс, четные номера — дуплекс, обработанный BlnI. Значком * выделена меченая олигонуклеотидная цепь. Электрофорез в 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной

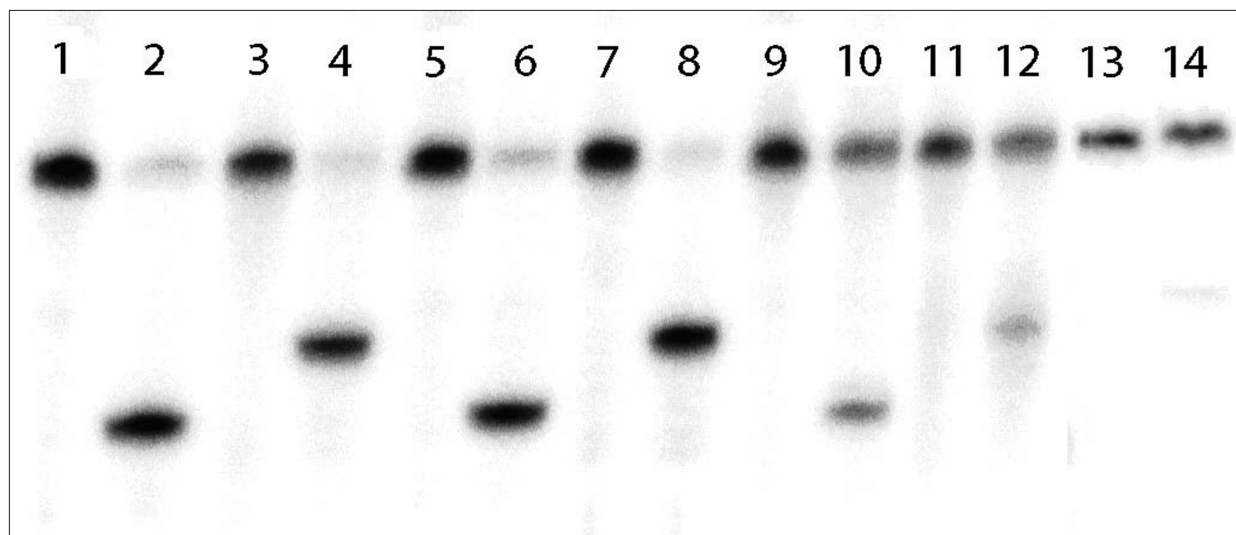


Рис. 8. Гидролиз BslI олигонуклеотидных дуплексов, содержащих 5-метилцитозин только в одной из цепей последовательности узнавания.

Дорожки:

- 1, 2 — дуплекс N21*/N18 (5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-CGC(5mC)G-5');
- 3, 4 — дуплекс N18*/N21 (5'-G(5mC)GGC-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5');
- 5, 6 — дуплекс N21*/N16 (5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-CGCCG-5');
- 7, 8 — дуплекс N16*/N21 (5'-GCGGC-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5');
- 9, 10 — дуплекс N23*/N24 (5'-A(5mC)GA(5mC)-3'/3'-TGCTG-5');
- 11, 12 — дуплекс N24*/N23 (5'-GTCTG-3'/3'-(5mC)AG(5mC)A-5');
- 13, 14 — дуплекс N17/N16 (5'-G(5mC)GGC-3'/3'-CGCCG-5').

Нечетные номера — интактный дуплекс, четные номера — дуплекс, обработанный BslI. Значком * выделена меченая олигонуклеотидная цепь. Электрофорез в 20%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной

На рисунке 4 представлена электрофореграмма продуктов гидролиза эндонуклеазой BslI олигонуклеотидов с различным количеством 5-метилцитозинов в сайте узнавания 5'-GCNGC-3'. Как видно из этого рисунка, BslI эффективно расщепляет последовательность GCNGC при наличии в ней двух (дорожки 2, 4, 8), трех (дорожки 6, 10, 12, 14) или четырех (дорожка 16) 5-метилцитозинов. Следовательно, MD-эндонуклеаза BslI способна расщеплять узнаваемую последовательность при наличии в ней двух или более 5-метилцитозинов, расположенных в любых возможных комбинациях в последовательности 5'-GCNGC-3'.

На рисунке 5 приведена электрофореграмма продуктов гидролиза эндонуклеазой BslI олигонуклеотидных дуплексов, содержащих сайт узнавания 5'-ACNGC-3'/3'-TGNCG-5' с двумя и тремя метильными группами. Как можно убедиться на данном рисунке, BslI эффективно расщепляет обе цепи этой последовательности, если в ней есть два (дорожки 2, 4, 8 и 12) или три (дорожки 6, 10) 5-метилцитозина.

На рисунке 6 приведена электрофореграмма продуктов гидролиза эндонуклеазой BslI олигонукле-

отидных дуплексов, содержащих последовательность 5'-GTNGC-3'/3'-CANCG-5' с двумя и тремя 5-метилцитозинами. Как видно из этого рисунка, BslI эффективно расщепляет обе цепи этой последовательности при наличии в ней двух (дорожки 2, 6, 8, 12) и трех (дорожки 4, 10) 5-метилцитозинов.

На рисунке 7 приведены результаты гидролиза ферментом BslI дуплексов, содержащих сайты 5'-ATNGC-3' (дорожки 2, 4) и 5'-ACNGT-3' (дорожки 6, 8). В качестве положительного контроля на данном рисунке приведен пример полного расщепления дуплекса с последовательностью 5'-G(5mC)GGC-3'/3'-CGC(5mC)G-5' (дорожка 10). Как следует из этого рисунка, последовательность 5'-ATAG(5mC)-3'/3'-TAT(5mC)G-5' эффективно расщепляется эндонуклеазой BslI по обеим цепям ДНК. В случае же последовательности 5'-ACNGT-3' эффективность гидролиза существенно ниже, причем в случае, когда центральным нуклеотидом N сайта узнавания является комплементарная пара G-C, глубина гидролиза дуплекса наименьшая, не более 1,5% (дорожка 6). Тогда как в случае, если центральный нуклеотид представлен комплементарной

парой А-Т, эффективность гидролиза BslI составляет около 10% (дорожка 8).

На рисунке 8 представлены данные по гидролизу BslI олигонуклеотидных дуплексов, в которых 5-метилцитозин расположен только в одной из цепей узнаваемой последовательности. В качестве контроля активности фермента мы использовали дуплекс N21/N18 с метилированной последовательностью 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'-CGN(5mC)G-5' (дорожки 1, 2). Как становится ясным из данного рисунка, BslI способен эффективно расщеплять последовательность 5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-CGCCG-5', если на одной из цепей узнаваемой последовательности присутствует два 5-метилцитозина (дорожки 6, 8). Однако, если такая последовательность содержит только один 5-метилцитозин, то не наблюдается сколь-либо значительного гидролиза олигонуклеотидного дуплекса (дорожка 14).

На рисунке 8 также продемонстрированы данные по расщеплению BslI олигонуклеотидного дуплекса, содержащего последовательность 5'-A(5mC)GA(5mC)-3'/3'-TGCTG-5'. Как следует из рисунка, BslI расщепляет обе цепи такого дуплекса (дорожки 10, 12), однако с меньшей эффективностью по сравнению с контролем (дорожки 2, 4).

Заключение

Таким образом, на основании данных, полученных в представленной работе, можно сделать вывод, что BslI расщепляет обе цепи последовательности узнавания 5'-RYNRY-3' при наличии в ней хотя бы двух 5-метилцитозинов. При этом активность фермента зависит от количества и расположения модифицированных цитозинов в сайте узнавания. Наихудшим субстратом MD-эндонуклеазы BslI является последовательность 5'-A(5mC)NGT-3'/3'-TGN(5mC)A-5'.

Литература

1. Чернухин В.А., Журавлева Р.О., Тарасова Г.В., Болтенгаген А.А., Акишев А.Г., Михненко Н.А., Дегтярев С.Х. Штамм бактерии *Cosuria rosea* — продуцент сайт-специфической эндонуклеазы Krol // Патент на изобретение RU 2394099 C1. — 2010.
2. Чернухин В.А., Наякишина Т.Н., Гончар Д.А., Томилова Ю.Э., Тарасова М.В., Дедков В.С., Михненко Н.А., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая метилзависимая ДНК эндонуклеаза PklI узнает и расщепляет метилированную последовательность 5'-GCN[^]GC-3'/3'-CG[^]NCG-5', содержащую не менее трех 5-метилцитозинов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7. — № 3. — С. 35–42.
3. Чернухин В.А., Наякишина 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'-G(5mC)[^]GC-3' // Биотехнология. — 2006. — № 4. — С. 31–35.
4. Чернухин В.А., Наякишина Т.Н., Тарасова Г.В., Голикова Л.Н., Акишев А.Г., Дедков В.С., Михненко Н.А., Дегтярев С.Х. Штамм бактерии *Paracoccus carotinifaciens* 3K — продуцент сайт-специфической эндонуклеазы Pcs I // Патент на изобретение RU 2377294 C1. — 2009.
5. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Сайтспецифическая эндонуклеаза BslI узнает последовательность ДНК 5'-G(5mC)N[^]GC-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., Чмуж Е.В., Томилова Ю.Э., Наякишина Т.Н., Гончар Д.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайтспецифическая 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.
7. 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 Bis I из *Bacillus subtilis* T30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(m5C)[^]NGC-3' // Биотехнология. — 2005. — № 3. — С. 22–26.
8. Чмуж 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. Rebase official site <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>.
10. Tarasova G.V., Nayakshina T.N., Degtyarev S.Kh. Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease Glal // BMC Molecular Biology. — 2008. — Vol. 9. — No. 7. doi:10.1186/1471-2199-9-7.

Список сокращений:

R — нуклеотид с пуриновым основанием (А или G);
 Y — нуклеотид с пиримидиновым основанием (С или Т);
 п.н. — пары нуклеотидов;
 5mC — 5-метилцитозин;
 SAM — S-аденозил-L-метионин.

METHYL-DIRECTED SITE-SPECIFIC ENDONUCLEASE BslI RECOGNIZES AND CLEAVES THE DNA SEQUENCE 5'-RYNRY-3' IN THE PRESENCE OF AT LEAST TWO 5-METHYLCYTOSINES

V.A. CHERNUKHIN, D.A. GONCHAR, J.E. TOMILOVA, A.A. BOLTENGAGEN,
L.N. GOLIKOVA, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

A substrate specificity of methyl-directed site-specific DNA endonuclease BslI has been studied. BslI cleaves a degenerate DNA sequence 5'-RYNRY-3' (where R – A or G, and Y – T or C) in the presence of two or more 5-methylcytosines in the recognition site. The efficiency of DNA hydrolysis depends on a number of 5-methylcytosines in the recognition site and their positions. Due to an ability to cleave only methylated sequences BslI may find a practical application in the molecular biology and epigenetic studies for the evaluation of eucaryotic DNA methylation.

Keywords: methyl-directed site-specific DNA endonucleases, degenerate sequence, methylated DNA.