

В. С. Дедков

НОВАЯ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗА M.BstC8I, ОБРАЗУЮЩАЯ 5'-G(m5C)NNGC-3'. ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭНДОНУКЛЕАЗ РЕСТРИКЦИИ К M.BstC8I-МЕТИЛИРОВАНИЮ

НПО "СибЭнзим", Новосибирск

Новая ДНК-метилаза M.BstC8I была определена в клеточном лизате *Bacillus stearothermophilus* C8, выращенной на агаре Лурия при 37°C. Метилирование ДНК бактериофагов λ и T7 в сегменте 5'-G(m5C)NNGC-3' блокировало активность рестриктазы BstC8I. Специфичность M.BstC8I определяли, используя метилированную ею λ ДНК, компьютерное моделирование и данные о чувствительности рестриктаз BstC8I, BsuRI, AjiI и PvuII к метилированию. Была показана чувствительность ряда рестриктаз к перекрыванию их сайтов узнавания новым видом метилирования ДНК.

Ключевые слова: ДНК-метилтрансфераза, компьютерное моделирование, определение специфичности, чувствительность к метилированию

ДНК-метилтрансферазы (ДНК-метилазы) переносят метильную группу с S-аденозилметионина (SAM) на основания ДНК. К этим ферментам относятся цитозин (C5)-ДНК-метилтрансферазы (эукариотические – КФ 2.1.1.37 и прокариотические – КФ 2.1.1.73), цитозин (N4)-ДНК-метилтрансферазы (КФ 2.1.1.113) и аденин (N6)-ДНК-метилтрансферазы (КФ 2.1.1.72) [15]. Метилированные основания обозначают соответственно (m5C), (m4C) и (m6A). ДНК-метилазы

отличаются специфичностью к нуклеотидной последовательности, в которой находится метилируемое основание, а также и к атому самого основания. В системах рестрикции – модификации (PM) бактериальных ДНК-метилазы, метилируя узнаваемую последовательность ДНК, защищают ее от сопряженных эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз) [6].

Термофильная рестриктаза BstC8I из *B. stearothermophilus* C8 узнает последовательность 5'-GCN⁺NGC-3'. Прототипом фермента является Cac8I из *Clostridium acetobutylicum* ABKn8 [7]. Рестриктазы BstC8I и Cac8I производятся для продажи. По данным REBASE (<http://www.rebase.neb.com>), PM-система Cac8I клонирована. Указано, что ДНК-метилаза M.Cac8I образует (m5C) в последовательности 5'-GCNNGC-3'. Однако место метилирования не определено, и данные не опубликованы. Поэтому вполне актуально изучение специфичности ДНК-метилазы, сопряженной с рестриктазой BstC8I.

Для определения специфичности ДНК-метилазы M.BstC8I мы использовали принцип изменения видимой специфичности рестриктаз при метилировании ДНК [10], дополнив его компьютерным моделированием метилирования ДНК [1, 2]. Актуальным является также изучение чувствительности рестриктаз к перекрыванию их сайтов узнавания новым видом метилирования.

Материалы и методы

Материалы. В работе использовали рестриктазы производства НПО "СибЭнзим" (Новосибирск): AccI6I (гидролизует ДНК по 5'-TGC⁺GCA-3'), AccB1I (5'-G⁺GYRCC-3'), AccB7I (5'-CCANNNN⁺NTGG-3'), AccBSI (5'-CCGCTC(-3/-3)-3'), AjiI (5'-⁺CCWGG-3'), AluBI (5'-AG⁺CT-3'), AluI (5'-AG⁺CT-3'), ApaI (5'-GGGCC⁺C-3'), AspLEI (5'-GCG⁺C-3'), AspS9I (5'-G⁺GNC-3'), AsuNHI (5'-G⁺CTAGC-3'), BmtI (5'-GCTAG⁺C-3'), Bpu10I (5'-CCTNAGC(-5/-2)-3'), Bsc4I (5'-CCNNNNN⁺NNGG-3'), Bse3DI (5'-GCAATG(2/0)-3'), Bsp172OI (5'-GC⁺TNAGC-3'), BspFNI (5'-CG⁺CG-3'), BstC8I (5'-GCN⁺NGC-3'), BstH2I (5'-RGCGC⁺Y-3'), BstHHI (5'-GCG⁺C-3'), BstMWI (5'-GCNNNNN⁺NNGC-3'), BstSLI (5'-GKGCM⁺C-3'), BstV1I (5'-GCAGC(8/12)-3'), BstXI (5'-CCANNNNN⁺NTGG-3'), BsuRI (5'-GG⁺CC-3'), FauI (5'-CCCGC(4/6)-3'), HindIII (5'-A⁺AGCTT-3'), HspAI (5'-G⁺CGC-3'), Mh1I (5'-GDGCH⁺C-3'), M1uI (5'-A⁺CGCGT-3'), Msp20I (5'-TGG⁺CCA-3'), MspA1I (5'-CMG⁺CKG-3'), NruI (5'-TCG⁺CGA-3'), PciI (5'-AGG⁺CCT-3'), PciI (5'-GAATGC(1/-1)-3'), PspOMI (5'-G⁺GGCCC-3'), PvuII (5'-CAG⁺CTG-3'), SbfI (5'-CCTGCA⁺GG-3'), SphI (5'-GCATG⁺C-3') и Zsp2I (5'-ATGCA⁺T-3'); ДНК бактериофага λ (dam⁺, dcm⁺) и ДНК бактериофага T7 того же НПО; ацелированный бычий сывороточный альбумин (BSA-Ac) "Biotechnic GmbH" (Германия); лизоцим "Helicon" (Россия); триптон и дрожжевой экстракт "Organotechnie" (Франция); агарозу LE "Se-genetic" (Германия); S-аденозилметионин (SAM) – ГЕПТРАЛ для инъекций "Hospira" (Италия); соли и химикаты отечественного производства квалификации "х. ч."

Штамм *B. stearothermophilus* C8, продуцент рестриктазы BstC8I, получен из коллекции культур микроорганизмов НПО

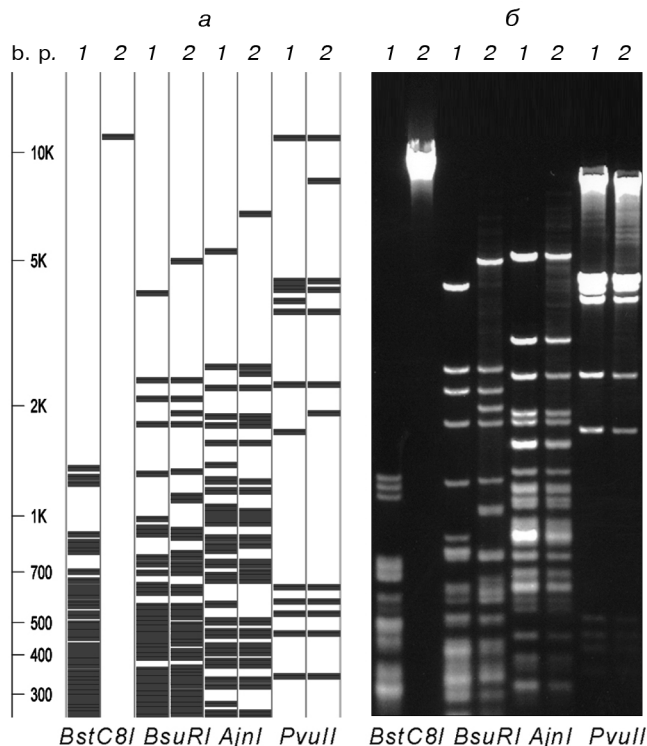


Рис. 1. Электрофореграмма расчетного (а) и экспериментального (б) расщепления исходной и M.BstC8I-метилированной λ ДНК рестриктазами BstC8I (узнает 5'-GCN⁺NGG-3'), BsuRI (5'-GG⁺CC-3'), AjiI (5'-⁺CCWGG-3') и PvuII (5'-CAG⁺CTG-3').

1 (а, б) – исходная ДНК; 2 (а) – ДНК с заменами G(⇒N)NN(G⇒N) C для расщепления BstC8I, BsuRI, PvuII и с заменами (G⇒N) CNNG(C⇒N) для AjiI; 2 (б) – ДНК + M.BstC8I.

“СибЭнзим”, где хранится под номером 5M09. Культивирование штамма проводили в течение 20 ч при 37°C в чашке Петри на среде, содержащей 1,2% агара, 1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% NaCl, 0,05% MgCl₂ и 0,001% тиамин, pH 7,5.

Клеточный лизат для изучения ДНК-метилазы получали по методу [8] с некоторыми модификациями. 3–5 мг клеток подвергали лизису в течение 30 мин при 22°C под действием 0,1 мл смеси, содержащей 10 мМ трис-HCl (pH 8), 1 мМ ЭДТА, 1 мг/мл тритона X-100 и 0,1 мг/мл лизоцима.

М.BstC8I-метилирование субстратных ДНК проводили в реакционных смесях объемом 1 мл, содержащих 50 мкг/мл ДНК (фага λ либо T7), 10 мМ SAM, 33 мМ трис-ацетат (pH 7,9), 1 мМ ЭДТА, 66 мМ калия ацетат, 1 мМ ДТТ, 0,1 мг/мл BSA-Ас и 0,1 мл лизата клеток при 55°C в течение 6 ч. Для определения метилирования отбирали пробы по 50 мкл, добавляли в них до 10 мМ ацетата магния, по 2,5 единицы активности BstC8I (10-кратный избыток) и инкубировали в течение 1 ч при 55°C. Затем добавляли по 10 мкл стоп-буфера, содержащего 0,25 М Na-ЭДТА (pH 8,5), 50% сахарозы, 0,01% бромфенолового синего и 0,01% рибонуклеазы. Пробы анализировали электрофорезом в 0,8% агарозе в трис-ацетатном буфере с 0,5 мг/л этидия бромид при напряжении 5 В/см в течение 70 мин по методике [4]. При отсутствии фрагментации ДНК добавляли (в смеси по 1 мл) по 0,05 мл 10% SDS и по 0,2 мл 3 М KCl. Инкубировали их в течение 10 мин при 65°C для получения прозрачного раствора, затем инкубировали их в течение 1 ч при 0°C. Осадки белка отделяли центрифугированием при 12 000 об/мин в течение 3 мин. Надосадочные растворы отбирали и добавляли в них по 0,7 мл изопропанола. Полученные осадки ДНК промывали в этаноле, подсушивали и растворяли в 0,7 мл 10 мМ трис-HCl (pH 7,6), 1 мМ ЭДТА.

Блокирование рестриктаз при М.BstC8I-метилировании выявляли путем гидролиза ДНК при 10-кратном избытке рестриктаз в условиях, рекомендованных производителями. Для опыта использовали метилированную ДНК, а для контроля – исходную. В ячейки планшета, содержащие по 50 мкл смеси 50 мкг/мл ДНК в рестрикционном буфере с 0,1 мг/мл BSA-Ас, добавляли 12 единиц рестриктазы и инкубировали в течение 2 ч при оптимальной температуре. Затем добавляли по 10 мкл стоп-буфера и

проводили электрофорез в 0,8% агарозе при 5 В/см в течение 2,5 ч по методике [4].

Моделирование метилирования ДНК, блокирующего узнавание рестриктазами метилированных сайтов, проводили так, как детально описано ранее [1, 2]. Для моделирования образования 5'-G(m5C)NNGC-3' при М.BstC8I-метилировании ДНК мы редактировали записи нуклеотидных последовательностей, заменяя в них все GCNNGC на GNNNNC. Т. е. для моделирования метилирования обеих цепей ДНК заменяли как метилируемое, так и комплементарное ему основание. Эту редакцию в дальнейшем обозначали G(C=>N)NN(G=>N)C. В сайтах, узнаваемых некоторыми рестриктазами, М.BstC8I могла метилировать разные цитозины. В этих случаях моделировали метилирование конкретного цитозина. Например, в сайтах, узнаваемых BstMWI (5'-GCNNNNNNNNGC-3'), М.BstC8I могла метилировать как внутренний, так и внешний цитозин. Однако моделирование G(C=>N)NN(G=>N)C не различало это. Поэтому блокирование BstMWI при метилировании, например, внутреннего цитозина в ее сайте узнавания моделировали как G(C=>N)NNGCNNNGC + GCNNNGCNN(G=>N)C. При необходимости моделировали метилирование конкретных сайтов в последовательности ДНК.

Результаты и обсуждение

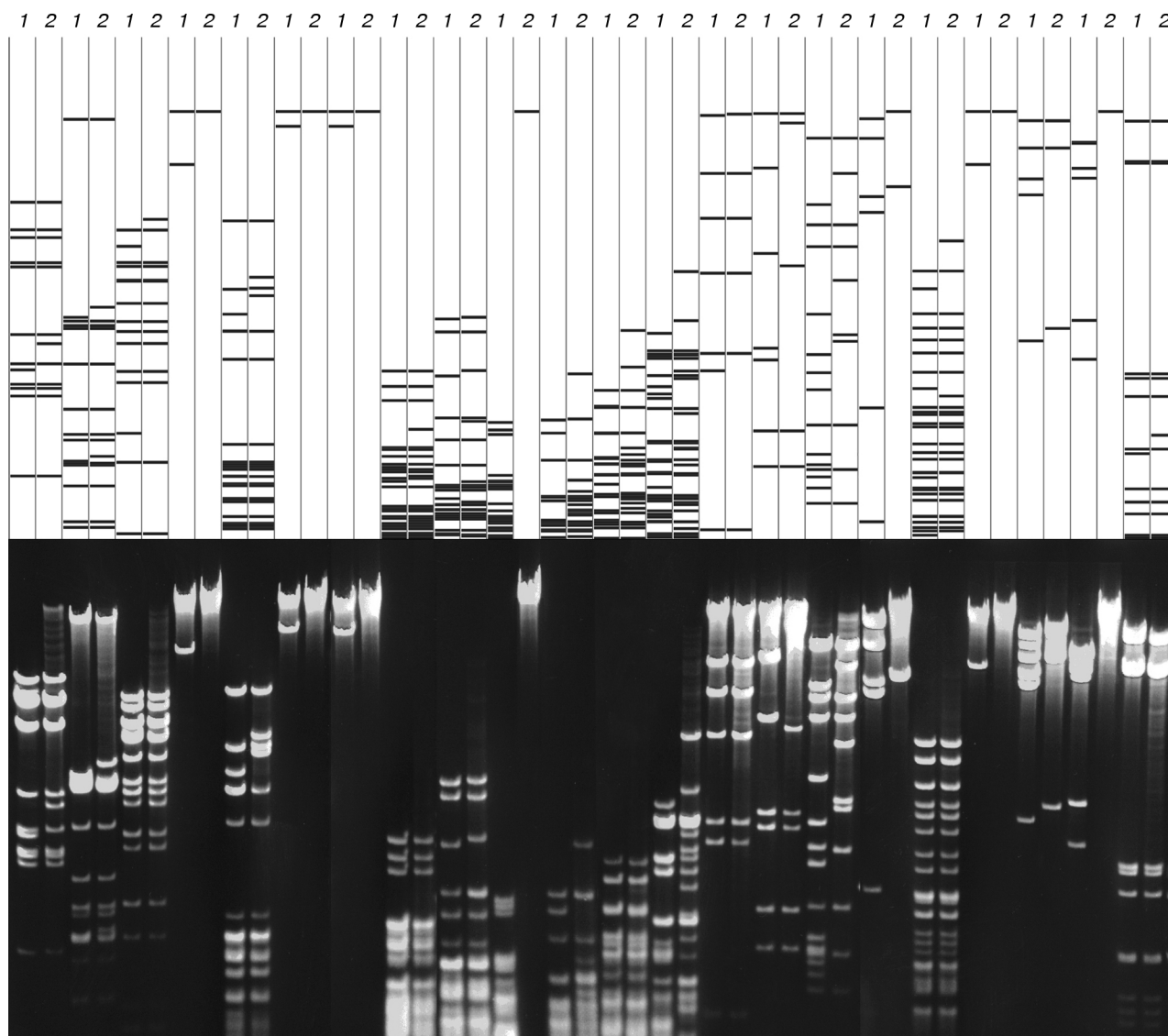
B. stearothermophilus C8 – продуцент рестриктазы BstC8I, вырастает достаточно быстро на питательном агаре при 55°C. Мы, однако, культивировали этот штамм при 37°C. Оказалось, что в клеточном лизате такой культуры повышена активность сопряженной ДНК-метилазы. Вероятно, при 37°C вегетативные клетки бациллы не успевали спорулировать. Оптимальные условия активности ДНК-метилазы определяли по блокированию расщепления рестриктазой BstC8I метилированной ДНК по методике [1, 2]. Затем, как описано в “Материалах и методах”, метилировали ДНК фага λ, на которой и определяли специфичность ДНК-метилазы. Для этого использовали рестриктазы, у которых изучена чувствительность к метилирова-

Таблица 1

Сравнение известных и новых данных о чувствительности рестриктаз к метилированию сайтов узнавания для определения специфичности ДНК-метилазы М.BstC8I

Рестриктаза	Метилирование сайта узнавания*	Способ метилирования	Расщепление сайта	Ссылка
BstC8I	5'-G(m5C)NNGC-3'	Сопряженная ДНК-метилаза	Нет	Данная статья
	3'-CGNN(m5C)G-5'			
BsuRI	5'-GG(m5C)C-3'	Сопряженная ДНК-метилаза	"	[9]
	3'-C(m5C)GG-5'			
BsuRI	5'-GG(m5C)Cngc-3'	М.BstC8I ДНК-метилаза	"	Данная статья
	3'-CCGgn(m5C)g-5'			
Ajnl	5'-(m5C)CWGG-3'	Сопряженная ДНК-метилаза	"	[3]
	3'-GGWC(m5C)-5'			
Ajnl	5'-ggn(m5C)CWGG-3'	М.Asp9I ДНК-метилаза	"	[2]
	3'-c(m5c)nGGWCC-5'			
Ajnl	5'-g(m5c)nngCCWGG-3'	М.BstC8I ДНК-метилаза	Да	Данная статья
	3'-cggn(m5c)GGWCC-5'			
PvuII	5'-CAG(m4C)TG-3'	Сопряженная ДНК-метилаза	Нет	[16]
	3'-GT(m4C)GAC-5'			
PvuII	5'-CAG(m4C)TG-3'	Синтез	"	[13]
	3'-GTTCGAC-5'			
PvuII	5'-CAG(m5C)TG-3'	М.AluI ДНК-метилаза	Да	[12]
	3'-GT(m5C)GAC-5'			
PvuII	5'-CAG(m5C)TG-3'	Синтез	"	[12]
	3'-GTTCGAC-5'			
PvuII	5'-CAG(m5C)TGgc-3'	М.BstC8I ДНК-метилаза	"	Данная статья
	3'-GTTCGAC(m5c)g-5'			

Примечание. * – выделен прописными буквами.



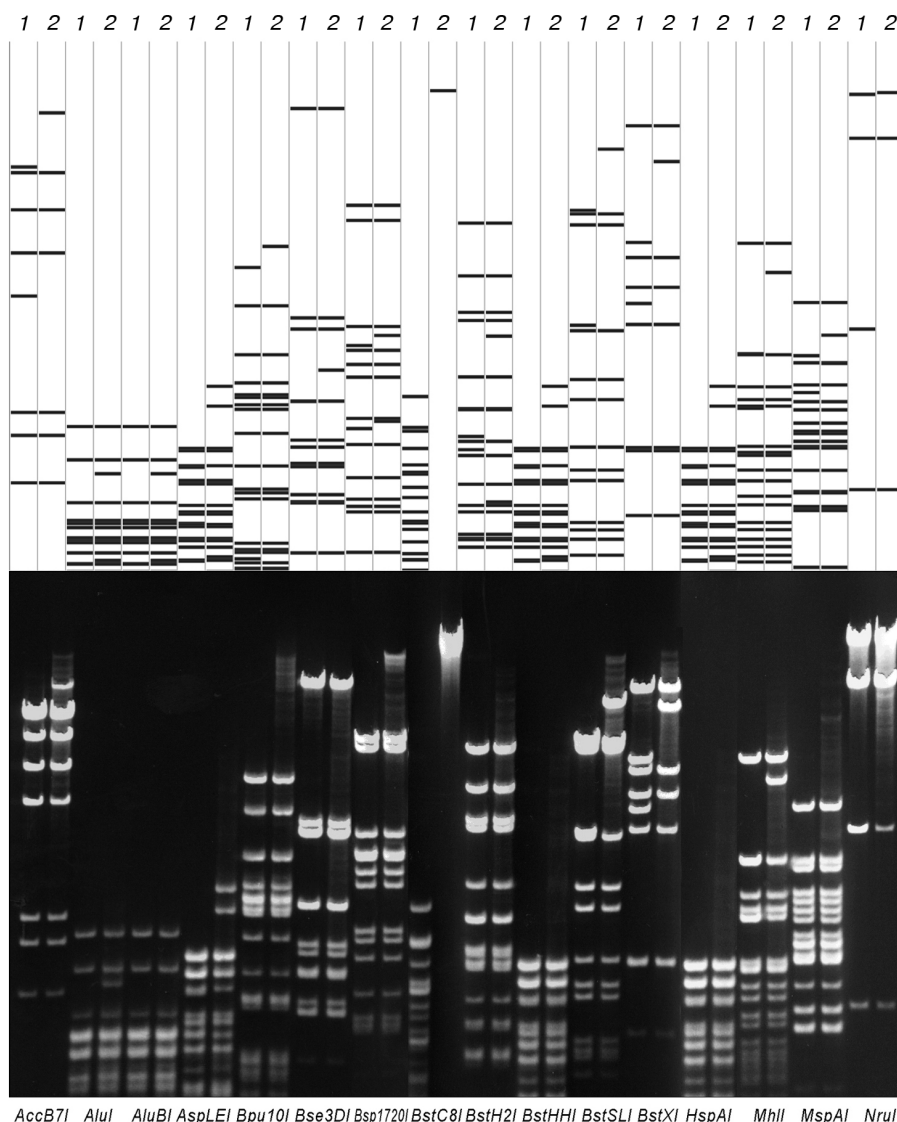
Acc16I AccB1I AccBSI ApaI AspS9I AsuNHI BmtI Bsc4I BspFNI BstC8I BstMWI BstV1I FaulI HindIII MluI Msp20I PceI PctI PspOMI SbfI SphI Zsp2I

Рис. 2. Расчетный и экспериментальный электрофорез продуктов гидролиза ДНК фага λ рестриктазами до и после метилирования этой ДНК по 5'-G(m5C)NNGC-3'.

1 – исходная ДНК; 2 – ДНК с заменами G(C $\Rightarrow$ N)NN(G $\Rightarrow$ N)C при моделировании или ДНК + M.BstC8I в эксперименте. Рестриктазы: Acc16I (узнает 5'-TGC $\wedge$ GCA3'), AccB1I (5'-G $\wedge$ GYRCC-3'), AccBSI (5'-CCGCTC(-3/-3)-3'), ApaI (5'-GGGCC $\wedge$ C-3'), AspS9I (5'-G $\wedge$ GNCC-3'), AsuNHI (5'-G $\wedge$ CTAGC-3'), BmtI (5'-GCTAG $\wedge$ C-3'), Bsc4I (5'-CCNNNN $\wedge$ NNGG-3'), BspFNI (5'-CG $\wedge$ CG-3'), BstC8I (5'-GCN $\wedge$ NGC-3'), BstMWI (5'-GCNNNN $\wedge$ NNGC-3'), BstV1I (5'-GCAGC(8/12)-3'), FaulI (5'-CCCGC(4/6)-3'), HindIII (5'-A $\wedge$ AGCTT-3'), MluI (5'-A $\wedge$ CGCGT-3'), Msp20I (5'-TGG $\wedge$ CCA-3'), PceI (5'-AGG $\wedge$ CCT-3'), PctI (5'-GAATGC(1/-1)-3'), PspOMI (5'-G $\wedge$ GGCCC-3'), SbfI (5'-CCTGCA $\wedge$ GG-3'), SphI (5'-GCATG $\wedge$ C-3'), Zsp2I (5'-ATGCA $\wedge$ T-3').

нию. Путем моделирования определили, что M.BstC8I может метилировать некоторые сайты узнавания этих рестриктаз на ДНК фага λ , что затем проверяли экспериментально. На рис. 1, а видно, что при моделировании BstC8I расщепляла исходную последовательность λ ДНК по сайтам GCNNGC, но не расщепляла последовательность, в которой эти сайты редактированы G(C $\Rightarrow$ N)NN(G $\Rightarrow$ N)C (для BstC8I дорожки 1 и 2 соответственно). В эксперименте (рис. 1, б) BstC8I также не расщепляла метилированную ДНК. Сопряженную ДНК-метилазу назвали M.BstC8I в соответствии с номенклатурой [14]. M.BstC8I метилировала последовательность 5'-GCNNGC-3'. На λ ДНК эта последовательность перекрывала некоторые сайты, узнаваемые рестриктазой BsuRI (узнает 5'-GG $\wedge$ CC-3'). В результате при моделировании и в эксперименте BsuRI не расщепляла метилированную последовательность 5'-

GGCCNGC-3' (см. рис. 1, дорожки 1 и 2 для BsuRI). Известно, что BsuRI не расщепляет сайт 5'-GG(m5C)C-3', метилированный сопряженной ДНК-метилазой [9]. В сайте 5'-GGCC-3', узнаваемом BsuRI, M.BstC8I могла метилировать только внутренний цитозин вне зависимости от того, какой цитозин она метилировала в своем сайте узнавания 5'-GCNNGC-3'. С помощью рестриктазы AjiI (узнает 5'- $\wedge$ CCWGG-3', прототип – EcoRII) показали, что M.BstC8I, однако, не образовывала 5'-GCNNG(m5C)-3' (см. рис. 1, дорожки 1 и 2 для AjiI). Сайты узнавания M.BstC8I и AjiI могут перекрываться только внешними цитозинами. Известно, что AjiI не расщепляет сайт 5'-(m5C)CWGG-3', метилированный по одной или обоим цепям [2, 3]. При моделировании AjiI не расщепляла сайты (G $\Rightarrow$ N)CNNG(C $\Rightarrow$ N)CWGG, но в эксперименте расщепляла сайты 5'-GCNNGCCWGG-3' в метилированной



AccB7I AluI AluBI AspLEI Bpu10I Bse3DI Bsp1720I BstC8I BstH2I BstHII BstSLI BstXI HspAI MhlI MspAI NruI

Рис. 3. Расчетный и экспериментальный электрофорез продуктов гидролиза ДНК фага Т7 рестриктазами до и после метилирования этой ДНК по 5'-G(m5C)NNGC-3'.

1 – исходная ДНК; 2 – ДНК с заменами G(C=>N)NN(G=>N)C при моделировании или ДНК + M.BstC8I в эксперименте. Рестриктазы: AccB7I (5'-CCANNNN^NTGG-3'), AluI (5'-AG^CT-3'), AluBI (5'-AG^CT-3'), AspLEI (5'-GCG^C-3'), Bpu10I (5'-CCTNAGC(-5/-2)-3'), Bse3DI (5'-GCAATG(2/0)-3'), Bsp1720I (5'-GC^TNAGC-3'), BstC8I (5'-GCN^NGC-3'), BstH2I (5'-RGCGC^Y-3'), BstHII (5'-GCG^C-3'), BstSLI (5'-GKGCM^C-3'), BstXI (5'-CCANNNN^NTGG-3'), HspAI (5'-G^CGC-3'), MhlI (5'-GDGCH^C-3'), MspAII (5'-CMG^CKG-3'), NruI (5'-TCG^CGA-3').

ДНК. Следовательно, M.BstC8I не образовывала 5'-GCNNG(m5C)-3'. Она не образовывала и (m4C), что показали при помощи рестриктазы PvuII (см. рис. 1, дорожки 1 и 2 для PvuII). PvuII не расщепляет сайт 5'-CAG(m4C)TG-3', метилированный сопряженной ДНК-метилазой [16], а также сайт, метилированный таким же образом по одной цепи [13]. Однако PvuII расщепляет сайт 5'-CAG(m5C)TG-3' [12]. В эксперименте PvuII расщепляла метилированные последовательности 5'-CAGmCTGGC-3', которые выявило моделирование. Таким образом, M.BstC8I не образовывала 5'-G(m4C)NNGC-3', 5'-GCNNG(m4C)-3', а также 5'-GCNNG(m5C)-3', но образовывала 5'-G(m5C)NNGC-3', что блокировало активность рестриктаз BstC8I и BsuRI. На рис. 1 видно также, что перекрывающее метилирование достаточно полно блокировало BsuRI, из чего следует, что M.BstC8I метилиро-

вала обе цепи ДНК в своем сайте узнавания. В табл. 1 суммированы известные и полученные данные о чувствительности рестриктаз к метилированию, которые позволили определить специфичность новой ДНК-метилазы. Из полученных данных однозначно следует, что M.BstC8I образует 5'-G(m5C)NNGC-3' и относится к цитозин (C5)-ДНК-метилтрансферазам (КФ 2.1.1.73) [15].

Существенной характеристикой специфичности рестриктаз является их чувствительность к метилированию сайтов узнавания. Это свойство рестриктаз используют для изучения метилирования ДНК.

Чувствительность, однако, может соблюдаться только до определенного избытка активности рестриктазы, необходимой для расщепления обычного, не метилированного сайта. Для работы с ДНК нередко затруднительно воспроизвести результаты, полученные с использованием синтетических олигонуклеотидов. Новая ДНК-метилаза позволяет по-новому метилировать в ДНК сайты узнавания рестриктаз. Поэтому ДНК фагов λ и Т7, метилированные M.BstC8I, использовали для изучения чувствительности рестриктаз к метилированию. Для рестриктаз, сайты узнавания которых перекрываются с 5'-G(m5C)NNGC-3', моделировали расщепление канонических и редактированных G(C=>N)NN(G=>N)C последовательностей ДНК. На рис. 2 и 3 показан расчетный и экспериментальный гидролиз рестриктазами исходной и метилированной ДНК. Моделирование G(C=>N)NN(G=>N)

С блокировало узнавание всех сайтов рестриктаз, в которых оно перекрывало цитозины. Однако в эксперименте рестриктазы могли быть и нечувствительны к чужеродному метилированию. Кроме того, M.BstC8I могла метилировать различные цитозины сайта, узнаваемого конкретной рестриктазой. Иногда сайт узнавания перекрывали сразу два сайта метилирования. В результате экспериментальные электрофореграммы отличались от расчетных. Поэтому для того чтобы определить чувствительность отдельной рестриктазы к метилированию конкретного цитозина в ее сайте узнавания, мы моделировали его перекрывание метилированием 5'-G(m5C)NNGC-3', как описано в "Материалах и методах". Этим методом изучали рестриктазы BspFNI (узнает 5'-CGCG-3'), BstMWI (5'-GCNNNNNNNGC-3'), BstVII (5'-GCTGC-3') и Bsp1720I (5'-GCTNAGC-3'). Модели-

Таблица 2

Гидролиз рестриктазами сайтов узнавания, перекрытых M.BstC8I-метилированием 5'-G(m5C)NNGC-3'

Рестриктаза	Метилирование сайта узнавания	Гидролиз, %	Рестриктаза	Метилирование сайта узнавания	Гидролиз, %
Acc16I	5'-TGCG(m5C)A-3'	0	BstSLI	5'-GKG(m5C)MC-3'	0
	3'-A(m5C)GCGT-5'			3'-CMCGKG-5'	
AccB1I	5'-GGYR(m5C)C-3'	0	BstV1I	5'-GCAG(m5C)-3'	100
	3'-CCRYGG-5'			3'-CGTCG-5'	
AccB7I	5'-(m5C)CANNNNNTGG-3'	80	BstV1I	5'-GCAGC-3'	100
	3'-GGTNNNNNACC-5'			3'-(m5C)GTCG-5'	
AccBSI	5'-CCG(m5C)TC-3'	100	BstXI	5'-(m5C)CANNNNNTGG-3'	0
	3'-GGCGAG-5'			3'-GGTNNNNNACC-5'	
AluBI	5'-AG(m5C)T-3'	100	BsuRI	5'-GG(m5C)C-3'	0
	3'-TCGA-5'			3'-CCGG-5'	
AluI	5'-AG(m5C)T-3'	0	FauI	5'-(m5C)CCGC-3'	0
	3'-TCGA-5'			3'-GGG(m5C)G-5'	
ApaI	5'-GGG(m5C)CC-3'	0	HindIII	5'-AAG(m5C)TT-3'	80
	3'-CCCGGG-5'			3'-TTCGAA-5'	
AspLEI	5'-GCG(m5C)-3'	0	HspAI	5'-GCG(m5C)-3'	100
	3'-CGCG-5'			3'-CGCG-5'	
AspS9I	5'-GGN(m5C)C-3'	0	MhII	5'-GDG(m5C)HC-3'	0
	3'-CCNGG-5'			3'-CHCGDG-5'	
AsuNHI	5'-G(m5C)TAGC-3'	0	MluI	5'-ACG(m5C)GT-3'	0
	3'-CGAT(m5C)G-5'			3'-TG(m5C)GCA-5'	
BmtI	5'-G(m5C)TAGC-3'	0	MluI	5'-ACG(m5C)GT-3'	50
	3'-CGAT(m5C)G-5'			3'-TGCGCA-5'	
Bpu10I	5'-CCTNAG(m5C)-3'	100	Msp20I	5'-TGG(m5C)CA-3'	0
	3'-GGANTCG-5'			3'-ACCGGT-5'	
Bsc4I	5'-(m5C)CNNNNNNNGG-3'	100	MspA1I	5'-CMG(m5C)KG-3'	100
	3'-GGNNNNNNNCC-5'			3'-GKCGMC-5'	
Bse3DI	5'-GCAATG-3'	100	NruI	5'-TCG(m5C)GA-3'	80
	3'-(m5C)GTTAC-5'			3'-AGCGCT-5'	
Bsp1720I	5'-GCTNAG(m5C)-3'	100	PceI	5'-AGG(m5C)CT-3'	0
	3'-(m5C)GANTCG-5'			3'-TCCGGA-5'	
Bsp1720I	5'-GCTNAG(m5C)-3'	100	PetI	5'-GAATG(m5C)-3'	100
	3'-CGANTCG-5'			3'-CTTACG-5'	
BspFNI	5'-(m5C)GCG-3'	0	PspOMI	5'-GGG(m5C)CC-3'	0
	3'-GCG(m5C)-5'			3'-CCCGGG-5'	
BspFNI	5'-CG(m5C)G-3'	0	PvuII	5'-CAG(m5C)TG-3'	100
	3'-GCGC-5'			3'-GTCGAC-5'	
BstC8I	5'-G(m5C)NNGC-3'	0	SbfI	5'-CCTG(m5C)AGG-3'	0
	3'-CGNN(m5C)G-5'			3'-GGACGTC(m5C)-5'	
BstH2I	5'-RGCG(m5C)Y-3'	100	SphI	5'-G(m5C)ATGC-3'	0
	3'-YCGCGR-5'			3'-CGTA(m5C)G-5'	
BstHHI	5'-GCG(m5C)-3'	100	Zsp2I	5'-ATG(m5C)AT-3'	100
	3'-CGCG-5'			3'-TACGTA-5'	
Bst	5'-G(m5C)NNNNNNNGC-3'	0	BstSLI	5'-GKG(m5C)MC-3'	0
MWI	3'-CGNNNNNNNCG-5'			3'-CMCGKG-5'	
Bst	5'-GCNNNNNNNG(m5C)-3'	50	BstV1I	5'-GCAG(m5C)-3'	100
MWI	3'-CGNNNNNNNCG-5'			3'-CGTCG-5'	

рование на рис. 4 показало, что в ДНК фага λ часть сайтов 5'-CGCG-3', узнаваемых BspFNI, может быть блокирована при M.BstC8I-метилировании в них обеих цепей 5'-g(m5C)GCGc-3'/3'-cGCG(m5C)g-5' (см. рис. 4, дорожка 2 для BspFNI – замены G(C=>N)GC(G=>N)C). В то же время M.BstC8I, перекрывая все возможные сайты узнавания BspFNI, может ме-

тилировать их и по одной цепи 5'-CG(m5C)Gngc-3' (см. рис. 4, дорожка 3 – замены G(C=>N)NN(G=>N)C). Последняя модель соответствовала эксперименту с BspFNI (см. рис. 2, дорожка 2), из чего следует, что оба метилирования блокировали активность BspFNI. Таким же методом определили, что BstMWI (узнает 5'-GCNNNNNNNNGC-3') не расщепляла сай-

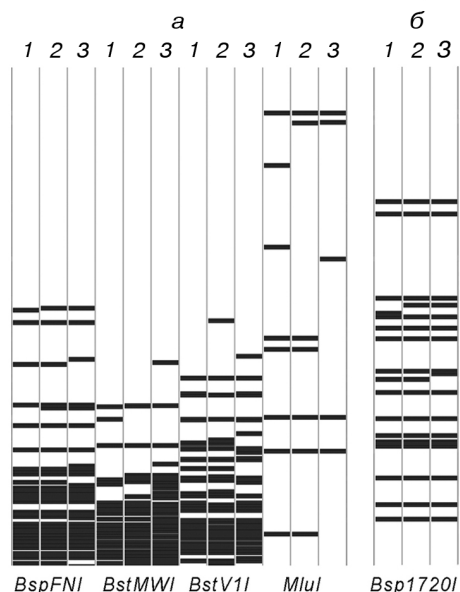


Рис. 4. Расчетный электрофорез ДНК фагов λ (а) и Т7 (б) фрагментированных рестриктазами при блокировании их сайтов узнавания в результате M.BstC8I-метилирования в них разных цитозинов.

Дорожка 1 – исходные последовательности ДНК; дорожка 2 для BspFNI (узнает 5'-CG⁺CG-3') – замены G(C $\Rightarrow$ N)GC(G $\Rightarrow$ N)C в ДНК и дорожка 3 – замены G(C $\Rightarrow$ N)NN(G $\Rightarrow$ N)C; дорожка 2 для BstMWI (5'-GCNNNNNN⁺NNGC-3') – замены G(C $\Rightarrow$ N)NNGCNNNGC + GCNNNGC(NN(G $\Rightarrow$ N)C) и дорожка 3 – замены G(C $\Rightarrow$ N)NN(G $\Rightarrow$ N)C; дорожка 2 для BstV1I (5'-GCAGC(8/12)-3') – замены GCNN(G $\Rightarrow$ N)CAGC + GCTG(C $\Rightarrow$ N)NNGC и дорожка 3 – замены GCAG(C $\Rightarrow$ N)NNGC + GCNN(G $\Rightarrow$ N)CTGC; дорожка 2 для MluI (5'-A⁺CGCGT-3') – замены GCAC(G $\Rightarrow$ N)(C $\Rightarrow$ N)GTGC и дорожка 3 – замены G(C $\Rightarrow$ N)NN(G $\Rightarrow$ N)C; дорожка 2 для Bsp1720I (5'-GC⁺TNAGC-3') – замены GCNN(G $\Rightarrow$ N)CTNAG(C $\Rightarrow$ N)NNGC и дорожка 3 – замены G(C $\Rightarrow$ N)NN(G $\Rightarrow$ N)C.

ты, в которых по одной цепи метилирован внутренний цитозин 5'-G(m5C)NNgcNNNGC-3' (см. рис. 4, дорожка 2 для BstMWI) и частично расщепляла сайты, в которых метилирован внешний цитозин 5'-GCNNNNNNNG(m5C)nngc-3' (см. рис. 4, дорожка 3 для BstMWI). Частичность расщепления видна в эксперименте по уменьшенной интенсивности дополнительного верхнего фрагмента (см. рис. 2, дорожка 2 для BstMWI). BstV1I (узнает 5'-GCTGC-3') расщепляла метилированные сайты 5'-GCTG(m5C)nngc-3' (см. рис. 4, дорожка 2 для BstV1I) и 5'-GCAG(m5C)nngc-3' (см. рис. 4, дорожка 3 для BstV1I). MluI не расщепляла сайт 5'-g(m5C)ACG(m5C)GTgc-3' (см. рис. 4, дорожка 2 для MluI), метилированный по обеим цепям, и частично расщепляла сайты 5'-ACG(m5C)GTgc-3' (см. рис. 4, дорожка 3 для MluI), метилированные по одной цепи. В ДНК фага Т7 (см. рис. 3) Bsp1720I (узнает 5'-GCTNAGC-3') расщепляла сайт 5'-g(m5C)nnGCTNAG(m5C)nngc-3' (см. рис. 4, дорожка 2 для Bsp1720I), метилированный по обеим цепям, а также расщепляла сайты 5'-GCTNAG(m5C)nngc-3' (см. рис. 4, дорожка 3 для Bsp1720I), метилированные по одной цепи.

Полученные результаты по чувствительности рестриктаз к M.BstC8I-метилированию ДНК суммированы в табл. 2. Новые данные получены для рестриктаз-прототипов ApaI, FauI и MluI, и подтверждены данные REBASE для Bpu10I, BstXI [10], HindIII [11], NruI, PvuII [12] и SphI. Также подтверждены данные для

прототипа AluI и его изошизомера AluBI, ранее полученные на синтетических олигонуклеотидах [5]. AluI и AluBI отличаются по чувствительности к метилированию. Подобные существенные различия в свойствах могут встречаться и у других изошизомеров, что делает изучение их чувствительности к метилированию достаточно актуальным. В данной работе получены новые данные для 29 известных изошизомеров. M.BstC8I метилировала сайты узнавания большинства рестриктаз по одной цепи из-за частичного перекрытия этих сайтов. Данные о чувствительности рестриктаз к такому виду метилирования вполне могут быть использованы при изучении метилирования ДНК.

Сведения об авторе

Дедков Владимир Сергеевич – ст. науч. сотр., канд. биол. наук. Научно-производственное объединение “СибЭнзим”, отдел микробиологии, e-mail:dedkov@sibenzyme.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедков В. С. // Молекул. генетика. – 2009. – № 3. – С. 3–8.
2. Дедков В. С. // Биотехнология. – 2009. – № 4. – С. 30–39.
3. Дедков В. С. // Биотехнология. – 2010. – № 2. – С. 36–40.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. – М., 1984.
5. Чернухин В. А., Болтенгаген А. А., Тарасова Г. В. и др. // Вестн. биотехнол. и физико-хим. биол. – 2007. – Т. 3, № 1. – С. 21–27.
6. Arber W., Dussoix D. // J. Mol. Biol. – 1962. – Vol. 5. – P. 18–36.
7. Azeddoug H., Reyssat G. // FEMS Microbiol. Lett. – 1991. – Vol. 78. – P. 153–156.
8. Godson G. N., Sinsheimer R. L. // Biochim. Biophys. Acta. – 1967. – Vol. 142. – P. 476–488.
9. Gunthert U., Storm K., Bald R. // Eur. J. Biochem. – 1978. – Vol. 90. – P. 581–583.
10. Nelson M., Christ C., Schildkraut I. // Nuct. Acids Res. – 1984. – Vol. 12. – P. 5165–5173.
11. Nelson P. S., Papas T. S., Schweinfest C. W. // Nucl. Acids Res. – 1993. – Vol. 21. – P. 681–686.
12. Rice M. R., Calvin-Koons M. D., Blumenthal R. M. // FASEB J. – 1995. – Vol. 9. – P. A1400.
13. Rice M. R., Blumenthal R. M. // Nucl. Acids Res. – 2000. – Vol. 28. – P. 3143–3150.
14. Roberts R. J., Belfort M., Bestor T. et al. // Nucl. Acids Res. – 2003. – Vol. 31. – P. 1805–1812.
15. S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions / Eds X. Cheng, R. M. Blumenthal et al. – Singapore, 1999.
16. Tao T., Walter J., Brennan K. J. et al. // Nucl. Acids Res. – 1989. – Vol. 17. – P. 4161–4175.

Поступила 08.02.11

A NEW DNA METHYLTRANSFERASE M.BstC8I FORMS 5'-G(M5C)NNGC-3'.

STUDYING OF RESTRICTION ENDONUCLEASE SENSITIVITY TO M.BstC8I-METHYLATION

V. S. Dedkov

SibEnzyme, Ltd., Novosibirsk, Russia

Bacillus stearothermophilus C8 was grown up on the Luria agar at 37°C. A new DNA-methylase was determined in cellular lysate. The methylation of the DNAs of bacteriophages λ and T7 in the region of 5'-G(m5C)NNGC-3' blocked the activity of BstC8I. Specificity of M.BstC8I was analyzed on methylated λ DNA. For this purpose, we used computer modeling and the data on the sensitivity of restrictases BstC8I, BsuRI, AjiI, and PvuII to methylation. The sensitivity of some restrictases to new methylation was studied. The results may be used for DNA methylation studying.

Key words: analysis of specificity, computer modeling, DNA-methyltransferase, methylation sensitivity