



УДК 577.243.7 : 577.152.277

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК-МЕТИЛАЗЫ  
ИЗ *FLAVOBACTERIUM OKEANOKOITES*

Матвеевко Н. И., Крамаров В. М.\*, Ирисметов А. А.\*

Институт белка Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.;

\* Всесоюзный научно-исследовательский институт  
прикладной микробиологии, Оболенск Московской обл.;

\*\* Институт экспериментальной биологии растений Академии наук УзССР, Ташкент

Из клеточного экстракта *Flavobacterium oceanokoites* гель-фильтрацией и последующей хроматографией на оксиапатите выделена ДНК-метилаза *FokI*. Очищенный фермент метилировал ДНК плазмиды рВР322, делая ее устойчивой к последующему действию сайт-специфической эндонуклеазы *FokI*. Показано, что метилируются цитозиновые остатки. Эта модификация не защищает ДНК от гидролиза эндонуклеазами *BbvI*, *BmcI*, *EcoRII*, в составе сайта узнавания которых имеется цитозин, что указывает на специфический характер метилирования ДНК метилазой *FokI*.

В настоящее время известно большое число сайт-специфических эндонуклеаз [1]. Многие из них успешно применяются при физическом картировании геномов и создании рекомбинантных ДНК. Считается, что клеточная ДНК микроорганизмов, содержащих эти эндонуклеазы, защищена от их действия путем метилирования в сайтах узнавания аденина или цитозина соответствующими сайт-специфическими метилазами. Большинство сайт-специфических эндонуклеаз типа II узнают последовательности, обладающие осью симметрии второго порядка [2]. Для некоторых из них выделены соответствующие метилазы [3-5]. Метилазы, соответствующие эндонуклеазам с симметричными сайтами, метилируют ДНК в сайте узнавания в обеих нитях также симметрично относительно оси второго порядка.

Кроме эндонуклеаз рестрикции с симметричным сайтом узнавания известно небольшое число эндонуклеаз рестрикции второго типа, сайт узнавания которых асимметричен, причем все они производят разрыв на некотором удалении от сайта узнавания [4]. Некоторые эндонуклеазы, такие, как *MboII* и *FokI*, узнающие несимметричные сайты, содержат аденин или цитозин только в одной из нитей [6, 7], поэтому метилирование этих сайтов соответствующими метилазами должно происходить либо в одной цепи (только цитозин или только аденин), либо в обеих одновременно по цитозину и аденину. Таким образом, по характеру действия на ДНК эти метилазы должны принципиально отличаться от выделенных ранее метилаз, узнающих симметричные сайты. Чтобы дискриминировать две указанные выше возможности, мы исследовали характер метилирования ДНК сайт-специфической метилазой из *Flavobacterium oceanokoites*.

Клетки *F. oceanokoites* содержат сайт-специфическую метилазу *FokI*, узнающую последовательность нуклеотидов на двунитевой ДНК 5'...GGATG...3' (приведена последовательность одной цепи). Нами была выделена соответствующая метилаза и исследованы некоторые ее свойства. Процесс очистки метилазы *FokI* осуществляли в два этапа: 1) клеточный экстракт после осаждения обломков клеток фракционировали гель-фильтрацией (рис. 1); 2) проводили хроматографию на оксиапатите. При гель-фильтрации метилаза и эндонуклеаза *FokI* элюируются совместно, но на оксиапатите разделяются, причем метилаза элюируется двумя пиками: при концентрациях  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,14-0,15 М (пик А) и

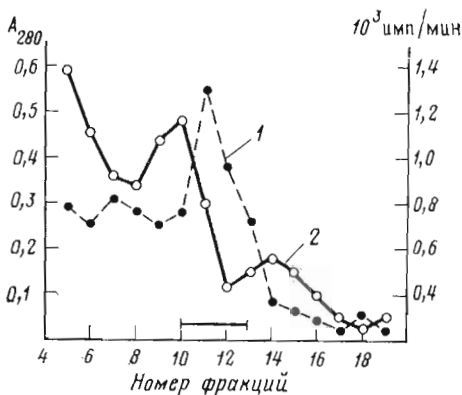


Рис. 1

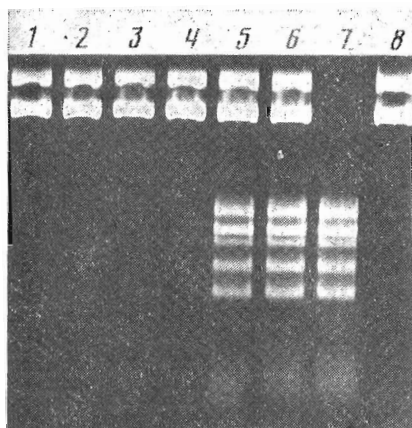


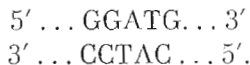
Рис. 2

Рис. 1. Профиль элюции белков с колонки при гель-фильтрации: 1 – активность метилазы по включению  $[^3\text{H}]$ метильных групп в ДНК (имп/мин); 2 – оптическое поглощение при 280 нм. Условия реакции и гель-фильтрации приведены в «Экспер. части»

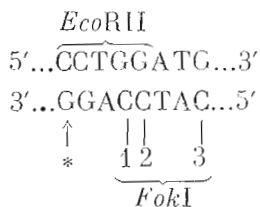
Рис. 2. Гидролиз ДНК pBR322, метилированной метилазой *FokI*: 1, 3, 5 – ДНК метилирована препаратом из пика А; 2, 4, 6 – из пика Б (см. текст). 1, 2 – ДНК pBR322 после метилирования; 3, 4 – та же ДНК, обработанная эндонуклеазой *FokI*; 5, 6 – к метилированной ДНК добавлено равное количество неметилированной плазмидной ДНК, затем проведена обработка эндонуклеазой *FokI*; 7 – неметилированная ДНК, обработанная эндонуклеазой *FokI*; 8 – исходная ДНК pBR322

0,17–0,22 М (пик Б). Эндонуклеаза *FokI* элюируется 0,23–0,25 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Метилаза из обоих пиков защищает ДНК от действия эндонуклеазы *FokI*. Пока не ясно, чем объяснить два пика активности при выделении *FokI*, но можно предположить существование двух ферментов одинаковой специфичности, как это имеет место для метилаз *HpaII* [3] и *BsuI* [4].

Используя методики, описанные в работах [8, 9], мы установили, что метилированным основанием является 5-метилцитозин. ДНК, метилированная метилазой *FokI* и полностью устойчивая к расщеплению эндонуклеазой *FokI* (рис. 2), гидролизовалась эндонуклеазами, чувствительными к модификации по цитозину, такими, как *PstI*, *PvuII*, *BbvI*, *EcoRII*, *XhoII* [10] и *BmeI* [11]. Это позволяет предположить, что метилирование цитозина происходит в строго определенных последовательностях, т. е. что выделенная метилаза является сайт-специфической и представляет собой компонент системы модификации-рестрикции *F. oceanokoites*, действующей на сайт



В последовательности, узнаваемой метилазой *FokI*, содержатся три цитозина, которые могут быть метилированы. Для определения положения метилируемого основания был применен подход, базирующийся на способности исследуемой метилазы защищать сайт узнавания от гидролиза другими эндонуклеазами, сайт узнавания которых частично перекрывается с сайтом для *FokI* в исследуемой последовательности. В ДНК плазмиды pBR322 сайт узнавания *FokI* в районе нуклеотида 130 перекрывается с сайтом узнавания эндонуклеазы *EcoRII* [12]



Метилирование ДНК фага  $\lambda$ C1857S7 метилазами *FokI* и *BbvII*

ДНК (10 мкг)	Метилаза	Радиоактивность, имп/мин
$\lambda$	<i>FokI</i>	56 632
$\lambda$ , гидролизованная эндонуклеазой		
<i>FokI</i>	»	52 781
<i>BcnI</i> *	»	58 433
$\lambda$	<i>BbvII</i>	106 014
$\lambda$ , гидролизованная эндонуклеазой		
<i>BbvII</i>	»	97 031
<i>ClaI</i> *	»	93 257

\* ДНК гидролизована для получения фрагментов, сравнимых по размеру с фрагментами, образующимися при действии эндонуклеаз *FokI* и *BbvII*.

(звездочкой обозначено положение 130-й п.о. на карте pBR322, а цифрами — цитозины, которые могут быть метилированы метилазой *FokI*).

Эта последовательность нуклеотидов будет устойчива к гидролизу эндонуклеазой *EcoRII*, если метилирован цитозин в положении 1 [13]. ДНК, обработанная метилазой *FokI*, полностью гидролизовалась этой эндонуклеазой. Отсюда следует, что метилироваться могут цитозины 2 и (или) 3.

Таким образом, при сайт-специфическом метилировании метилазой *FokI* метилируется только одна цепь ДНК. По-видимому, это справедливо и для других подобных метилаз, узнающих несимметричные последовательности нуклеотидов. В пользу такого предположения свидетельствует установленный нами факт, что сайт-специфическая метилаза, парная эндонуклеазе *BbvII*, узнающей несимметричную последовательность 5'...GAAGAG...3' [14], метилирует аденин, содержащийся только в одной из цепей указанной последовательности. Подобная же ситуация наблюдается и для систем модификации типа III [1]. Интересно также, что упомянутые метилазы метилируют ДНК, полностью гидролизованную эндонуклеазами *FokI* и *BbvII* (таблица).

### Экспериментальная часть

Бактериальная культура *F. oceanokoites* любезно предоставлена Н. И. Зайцевым (Ленинградский политехнический институт). Биомассу *F. oceanokoites* получали как описано в работе [7].

**Выделение метилазы *FokI*.** 0,5 г биомассы *F. oceanokoites* суспендировали в 0,5 мл буфера А (0,2 М NaCl, 0,01 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 7,0), 2 мМ дитиотреит). Клеточные стенки разрушали с использованием ультразвукового дезинтегратора (MSE, Англия, 150 Вт) при амплитуде 10 мкм в течение 5 мин при 0° С. Суспензию разрушенных клеток центрифугировали при 40000g, супернатант наносили на колонку (1,5×30 см) с Toyopearl HW-55 (Soda, Япония) и элюировали буфером А со скоростью 20 мл/ч. Собирали фракции по 0,8 мл. Активные фракции с 10 по 13 объединяли, наносили на колонку (0,6×4 см) с оксидантитом (Bio Rad, США) и элюировали линейным градиентом  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,01–0,5 М, рН 7,0 (объем градиента 40 мл, фракции по 0,7 мл, скорость элюции 2,3 мл/ч). Фракции, содержащие метилазу *FokI*, объединяли, диализовали против буфера А, содержащего 50% глицерин, и хранили при -15° С. При определении активности метилазы *FokI* во фракциях реакционная смесь объемом 100 мкл содержала 25 мкг ДНК из эритроцитов цыплят (Reanal, Венгрия), 0,05 М трис-HCl (рН 8,0), 5 мМ EDTA, 0,44 мМ S-аденозил[<sup>3</sup>H-метил]метионин (SAM), 11 Ки/ммоль (Amersham, Англия) и 10–20 мкл аликвоты из фракций. Смесь инкубировали 3 ч при 37° С, ДНК осаждали добавлением 5 мл 5% трихлоруксусной кислоты. Осадок собирали на нитроцеллюлозных фильтрах и радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике в толуольном сцинтиляторе.

Определение положения метильной группы в метилированном опсонии любезно проведено С. Климашаускас (ВНИИ прикладной энзимологии, г. Вильнюс) методом ТСХ, как описано в работе [9].

*Метилирование и последующий гидролиз эндонуклеазы.* ДНК плазмиды pBR322 метилировали препаратом метилазы, добавляя в реакционную смесь, описанную выше, дополнительно 200 пмоль SAM. После инкубации (3 ч, 37° С) реакцию останавливали нагреванием (5 мин, 70° С) и аликвоты, содержащие 0,3 мкг ДНК, обрабатывали сайт-специфическими эндонуклеазами в смеси (30 мкл), содержащей 30 мМ трис-HCl (pH 8,0), 6 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ дитиотреит, 2 ед. акт. эндонуклеазы. Смесь инкубировали 2 ч при 37° С, продукты реакции анализировали в смешанном геле (2% акриламид—0,6% агароза) (Sigma, США). После электрофореза гель окрашивали бромидом этидия и фотографировали через красный фильтр при УФ-облучении.

*Сайт-специфические эндонуклеазы.* Эндонуклеаза *FokI* выделена согласно [7]. Из 0,5 г биомассы получено ~1000 ед. акт. фермента. *BbvI* выделена гель-фильтрацией и хроматографией на гепарин-сефарозе. Выделение *BmeI* описано в работе [11]. Эндонуклеазы *PstI*, *EcoRII*, *PvuII*, *XhoII* любезно предоставлены В. Т. Косых (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов). Рестриктаза *ClaI* выделена по методу [15], рестриктаза *VspI* — производства ВНИИ прикладной энзимологии (г. Вильнюс).

Авторы выражают благодарность Н. И. Зайцеву за предоставление штамма — продуцента *FokI*, В. Г. Косых за препараты рестриктаз, С. Климашаускасу за определение положения метильной группы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts R. J. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12 suppl., p. 167—204.
2. Roberts R. J. CRC Crit. Rev. Biochem., 1976, v. 4, p. 123—164.
3. Yoo O. J., Agarwal K. L. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 13, p. 6445—6449.
4. Gunthert U., Freund M., Traut J. A. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 17, p. 9340—9345.
5. McClelland M. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 24, p. 6795—6804.
6. Smith M., Hutchison C. A. J. Mol. Biol., 1980, v. 140, № 1, p. 143—148.
7. Sugisaki H., Kanazawa S. Gene, 1981, v. 16, p. 73—78.
8. Бурьянов Я. И., Веножинскис М. Т. Биохимия, 1982, т. 47, вып. 8, с. 1375—1377.
9. Janulaitis A., Klimasauskas S., Petruseyte M., Butkus V. FEBS Lett., 1983, v. 161, № 1, p. 131—134.
10. McClelland M. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 1, p. 169—173.
11. Пачкунов Д. М., Крамаров В. М., Добрица А. П., Матвиенко Н. И. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 1, с. 127—129.
12. Sutcliffe J. G. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 1978, v. 43, p. 77—90.
13. Boyer H. W., Chow L. T., Dugaiczuk A., Hedgpeth J., Goodman H. M. Nature New Biol., 1973, v. 244, № 132, p. 40—43.
14. Бунина З. Ф., Крамаров В. М., Пачкунов Д. М., Мазанов А. Л., Смолянинов В. В., Матвиенко Н. И. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 9, с. 1578—1580.
15. Mayer H., Grosschedl R., Schatle H., Hobom G. Nucl. Acids Res., 1981, v. 8, p. 4833—4845.

Поступила в редакцию  
21.XII.1984

#### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A DNA-METHYLASE FROM *FLAVOBACTERIUM OKEANOKOITES*

MATVIENKO N. I., KRAMAROV V. M. \*, IRISMETOV A. A. \*\*

*Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region; \*Institute of Applied Microbiology, Obolensk, Moscow Region; \*\*Institute of Experimental Biology of Plants, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent*

A DNA-methylase has been isolated from the cell extract of *F. okeanokoites* and partially purified by gel filtration and chromatography on hydroxylapatite. The purified enzyme methylates plasmid pBR322 DNA making it resistant to site-specific endonuclease *FokI*. Cytosine is shown to be the methylation target. This modification does not shield DNA from the action of site-specific endonucleases *BmeI*, *BbvI*, *EcoRII*, containing cytosine in their recognition sites. Methylation of DNA by methylase *FokI* appears to be site-specific.