



УДК 547.963.32+577.157.6

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ МЕТИЛАЗА ИЗ *BACILLUS*  
*CENTROSPORUS*

Пятрушине М. П., Янулайтис А. А.

ВНИИ прикладной энзимологии, Вильнюс

Хотя в настоящее время известно большое число специфических эндонуклеаз, лишь для немногих из них показано наличие в исследуемых штаммах также метилазы, соответствующей рестриктазе в отношении узнаваемой последовательности нуклеотидов, и определено положение модифицируемого основания, защищающего ДНК от действия эндонуклеазы [1]. Существует ряд областей применения рестриктаз, где эти сведения необходимы. В первую очередь это касается изучения метилирования ДНК у эукариот [2—4]. Особый интерес в этом отношении представляют рестриктазы, чувствительные к метилированию цитозина в динуклеотиде 5'CC, в составе которого находится основная часть модифицированного цитозина ДНК высших организмов [5].

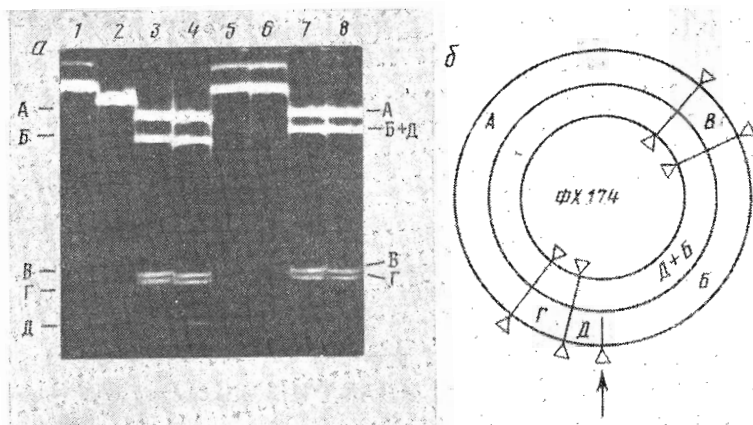
Нами в штамме *Bacillus centrosporus* RFL I была обнаружена рестриктаза *VcnI*, узнающая последовательность нуклеотидов: 5'CC(C/G)GG и расщепляющая ее в месте, указанном стрелкой [6]. В настоящей работе сообщается о выделении идентичной по специфичности метилазы и определении места метилирования внутри узнаваемой последовательности нуклеотидов.

В предварительных опытах было показано, что ДНК, выделенная из *B. centrosporus* RFL I, не расщепляется рестриктазой *VcnI*, что указывает на модификацию *in vivo* этой ДНК по участкам узнавания фермента. ДНК фага  $\lambda$ , инкубируемая с бесклеточным экстрактом в присутствии S-аденозил-L-метионина и в отсутствие  $Mg^{2+}$ , также приобретает устойчивость к действию рестриктазы *VcnI*. Отсюда вытекает, что в исследуемом штамме имеется метилаза со специфичностью, по меньшей мере частично перекрывающейся со специфичностью рестриктазы *VcnI*.

Очистку метилазы проводили путем хроматографии бесклеточного экстракта, полученного согласно работе [6], на гепаринагарозе. Фракции, элюирующиеся при концентрации NaCl 0,36—0,41 М и содержащие основную часть метилазной активности, объединяли и хранили при  $-20^{\circ}C$ .

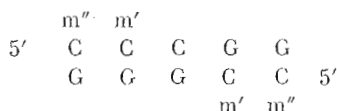
С использованием очищенного препарата фермента было показано, что ДНК фага  $\lambda$  и плазмиды pBR 322, предварительно расщепленные рестриктазой *VcnI*, не служат субстратами для исследуемой метилазы. Таким образом, метилаза узнает ту же последовательность нуклеотидов 5'CC(C/G)GG, что и рестриктаза *VcnI*.

Следующим этапом характеристики специфичности метилазы *VcnI* было определение положения модифицируемого основания внутри узнаваемой последовательности нуклеотидов.

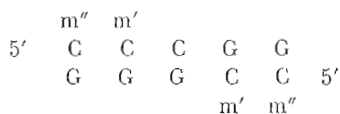


Определение положения модифицированных оснований в последовательности нуклеотидов, узнаваемой метилазой *BcnI*: а - электрофоретическое разделение фрагментов, полученных действием рестриктаз *BsnI* (2, 6), *HpaII* (3, 7) и *MspI* (4, 8) на ДНК фX 174, не модифицированную (1-5) и модифицированную метилазой *BsnI* (6-8); 1, 5 - контрольная ДНК фX, не подвергнутая действию рестриктаз; б - схема расположения сайтов узнавания рестриктаз *BcnI*, *MspI* и *HpaII* на ДНК фX 174. Указаны места расщепления:  $\nabla$  - *MspI* и *HpaII*,  $\downarrow$  - *BcnI*. Наружное кольцо - немодифицированная ДНК, внутреннее - ДНК, модифицированная метилазой *BcnI*. Длина фрагментов выражена числом пар оснований: А - 2748; Б - 1697, В - 374, Г - 348, Д - 219

Для всех известных в настоящее время метилаз II класса показано, что метилируемые основания (С или А) всегда располагаются симметрично относительно оси симметрии узнаваемого палиндroma [1]. Исходя из этого в случае метилазы *BcnI* можно было предположить два варианта метилирования ( $m'$  или  $m''$ ) в узнаваемой последовательности нуклеотидов

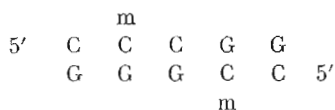


Этот палиндром содержит последовательность 5'CCGG, узнаваемую рестриктазами *MspI* и *HpaII* [1, 7]. Указанные рестриктазы различаются по чувствительности к положению модифицированного основания в 5'CCGG-последовательности: *HpaII* не расщепляет ДНК в случае метилирования внутреннего цитозина [8], а *MspI* не чувствителен к такой модификации [3]. Обратная закономерность наблюдается в случае метилирования наружного цитозина [8, 9]. Специфическое метилирование в одной из цепей палиндромов, узнаваемых рестриктазами, является достаточным условием для защиты двухспиральной ДНК от расщепления соответствующей специфической эндонуклеазой [10]. Этот факт, а также вышеуказанные свойства рестриктаз *MspI* и *HpaII* позволили предсказать характер их действия на сайт, модифицированный метилазой *BcnI*. В случае метилирования в палиндроме



цитозинов, помеченных  $m'$ , эта последовательность будет устойчивой к действию обеих рестриктаз. Палиндром, содержащий метилированные цитозины, помеченные  $m''$ , останется устойчивым к действию *MspI*, но будет расщепляться рестриктазой *HpaII*.

Экспериментальное определение положения метилированного цитозинового остатка проводили с использованием в качестве субстрата репликативной формы бактериофага фХ 174 [3], первичная последовательность ДНК которого установлена [11]. Эта ДНК содержит один сайт *BcnI* и пять сайтов, узнаваемых рестриктазами *MspI* и *HpaII*. Из электрофограммы и схемы, приведенных на рисунке, видно, что модификация ДНК фХ 174 метилазой *BcnI* приводит к устойчивости сайта 5'CCCGG к действию рестриктаз *MspI* и *HpaII*. Следовательно, метилаза *BcnI*, выделенная из *B. centrosporus* RFL I, метилирует в узнаваемом палиндроме-цитозины, расположенные рядом с его осью симметрии:



#### ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts R. J. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, p. 75–95.
2. Bird A. P., Southern E. J. Mol. Biol., 1978, v. 118, p. 27–47.
3. Waalwijk C., Flavell R. A. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, p. 3231–3236.
4. Van der Ploeg L. H. T., Flavell R. A. Cell, 1980, v. 19, p. 947–958.
5. Doškocil J., Sorm F. Biochim. et biophys. acta, 1962, v. 55, p. 953–959.
6. Янулайтис А. А., Пярушуре М. П., Яскелявичене Б. П., Краев А. С., Скрыбин К. Г., Баев А. А. Докл. АН СССР, 1981, т. 257, с. 749–750.
7. Garfin D. E., Goodman H. M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 59, p. 108–116.
8. Mann M. B., Smith H. O. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, p. 4211–4221.
9. Sneider T. W. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 3829–3839.
10. Arber W. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 1974, v. 14, p. 1–37.
11. Sanger F., Air G. M., Barrell B. G., Brown N. L., Coulson A. R., Fiddes J. C., Hutchinson III C. A., Clcombe P. M., Smith M. Nature, 1977, v. 265, p. 687–695.

Поступила в редакцию  
9.VII.1981

### SPECIFIC METHYLASE FROM *BACILLUS CENTROSPORUS*

PETRUŠYTE M. P., JANULAITIS A. A.

*Institute of Applied Enzymology, Vilnius*

A new site-specific methylase, *BcnI*, has been isolated from the *Bacillus centrosporus* strain. The enzyme recognizes the sequence 5'CC<sup>+</sup>(C/G)GG in double-stranded DNA cleaving it as indicated by an arrow and methylating the underlined cytosine residue.