



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

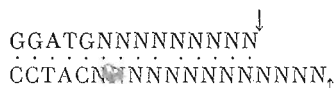
УДК 577.152.211.14

ИЗУЧЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ДНК-МЕТИЛАЗЫ ИЗ *FLAVOBACTERIUM OCEANOKOITES*

Белавин П. А., Горбунов Ю. А., Малыгин Э. Г.,
Речкунова Н. И., Дегтярев С. Х.

ВНИИ молекулярной биологии НПО «Вектор»,
пос. Кольцово Новосибирской обл.

Ферменты рестрикции-модификации *Flavobacterium oceanokoites* относятся к системам IIS-типа [1]. Их отличительная особенность заключается в том, что сайт узнавания в ДНК не обладает симметричной структурой, в результате место гидролиза ДНК лежит за пределами сайта узнавания. Например, эндонуклеаза рестрикции *FokI* имеет следующую специфичность:



где GGATG — сайт узнавания, N — любой нуклеотид, стрелками показаны места расщепления ДНК.

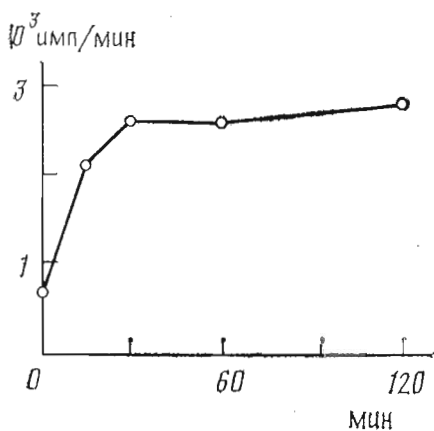
Хотя из *F. oceanokoites* была выделена и соответствующая ДНК-метилаза — *M. FokI*, остаток метилируемого нуклеозида и его положение остаются невыясненными [2, 3]. Данная работа посвящена решению именно этого вопроса.

Процедура выделения метилазы включала в себя две последовательные хроматографии на фосфоцеллюлозе P-11, бензил-DEAE-целлюлозе и гель-фильтрацию на сефакриле S200. В качестве субстрата для метилазы нами был синтезирован ДНК-дуплекс, в состав которого входят 18- и 22-звенные олигонуклеотиды d(GATCGGATG — TGAAGACGG) и d(AATCCGTCTTCACATCCGATC) (подчеркнут сайт узнавания). Метилирование дуплекса проводили с помощью S-аденозил-L-[³H-метил]метионина ([³H]SAM), меченного тритием.

Как видно из рисунка, после 30 мин инкубации не происходит дальнейшего увеличения переноса метки от [³H]SAM в дуплекс, что отвечает, по-видимому, полному метилированию субстрата. После 2 ч инкубации реакционную смесь подвергали электрофорезу в денатурирующих условиях

Включение [³H]метильных групп в 18- и 22-звенные олигонуклеотиды дуплекса с помощью метилазы *M. FokI*
Состав смеси — см. рисунок, время инкубации 2 ч при 25° С.
Приведены данные трех экспериментов

Олигонуклеотид	Имп/мин
18	1892±242
22	45±6



Кинетика включения ^3H -меченых метильных групп в дуплекс с помощью метилазы *M. FokI*. Инкубационная смесь объемом 50 мкл содержала 2 нмоль/мкл дуплекса, 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 8 мМ EDTA, 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 5% глицерин, 0,44 мкМ S-(аденозил-L-[^3H -метил]метионин (1,5 Ки/ммоль) и 10 ед. акт. метилазы *M. FokI*. Инкубацию проводили при 25°С, отбирая аликвоты по 10 мкл, которые наносили на диски из DEAE-бумаги, отмывали трижды 50 мМ трис-НСl, рН 8,7, водой, этанолом, высушивали и измеряли радиоактивность в толуольном сцинтилляторе. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для защиты от гидролиза рестриктазой *FokI* 1 мкг ДНК фага λ после обработки ее метилазой в течение 1 ч при 37°С

(20% ПААГ, 7 М мочевины). Поделив таким образом цепи дуплекса, элюировали их на DEAE-бумагу (DE-81) и измеряли радиоактивность, используя толуольный сцинтиллятор.

Из данных, приведенных в таблице, видно, что метка включается лишь в одну цепь ДНК, содержащую последовательность GGATG. Аналогичный результат был получен нами на олигонуклеотиде другого строения, также содержащего сайт узнавания (данные не приведены).

В настоящее время известны ДНК-метилазы, способные модифицировать лишь остатки цитозина или аденина и только в пределах сайта узнавания [4]. Поскольку в метилируемой цепи дуплекса в сайте узнавания нет цитозинов, можно было предположить, что модифицируется единственный аденин последовательности GGATG.

Это предположение было подтверждено прямым методом: после метилирования дуплекса с помощью [^3H]SAM и метилазы *M. FokI* и метилирования другого дуплекса, содержащего последовательность GATC, метилазой *Eco dam* (метилирует ДНК по аденинам [4]) был проведен гидролиз ДНК хлорной кислотой. Тонкослойной хроматографией на силикагеле (ацетонитрил — этилацетат — триэтиламин — этанол — вода, 15 : 5 : 5 : 5 : 1) в присутствии маркеров (N-4-метилцитозин, 5-метилцитозин, N-6-метиладенин) было показано, что в обоих случаях подвижность радиоактивного основания одинакова и соответствует подвижности N-6-метиладенина [5].

Таким образом, ДНК-метилаза *M. FokI* метилирует по остаткам аденина только одну цепь ДНК (что показано впервые для ДНК-метилаз), содержащую последовательность GGATG.

ЛИТЕРАТУРА

1. Szybalski W. // Gene. 1985. V. 40. № 2-3. P. 169-173.
2. McClelland M., Nelson M. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13, supplement. P. r201-r209.
3. Маргоенко Н. И., Крамаров В. М., Ирисметов А. А. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 7. С. 953-956.
4. Kessler C., Neumaier P. S., Wolf W. // Gene. 1985. V. 33. № 1. P. 1-102.
5. Butkus V. V., Klimasauskas S. J., Janulaitis A. A. // Anal. Biochem. 1985. V. 148. № 1. P. 194-198.

Поступила в редакцию

12.II.1988

После доработки

15.VIII.1988

SUBSTRATE SPECIFICITY OF DNA METHYLASE FROM *FLAVOBACTERIUM OKEANOKOITES*

BELAVIN P. A., GORBUNOV Yu. A., MALYGIN E. G., RECHKUNOVA N. I.,
DEGTYAREV S. Kh.

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Kol'tsovo,
Novosibirsk Region

The specificity of DNA methylase *M. FokI* towards oligonucleotides containing sequence 5'...GGATG... was investigated, and N6-methyladenine in the GGATG chain was shown to be the only product of the modification.