

ДНК-УЗНАЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ

Новая сайт-специфическая 5mC-зависимая ДНК-эндонуклеаза MoxI эффективно гидролизует ДНК последовательность 5'-R(5mC)GY-3'

В.А. Чернухин, В.С. Дедков, Д.А. Гончар, В.Н. Баймак, О.А. Беличенко, С.Х. Дегтярев

ООО «СибЭнзайм», Новосибирск

* автор для переписки: С.Х. Дегтярев, ООО «СибЭнзайм», ул. Тимакова, д. 2/12, Новосибирск, 630117, Россия; E-mail: degt@sibenzyme.com

РЕЗЮМЕ

Обнаружен штамм бактерии *Microbacterium oxydans* являющийся продуцентом 5-метилцитозин-зависимой сайт-специфической ДНК-эндонуклеазы MoxI, которая узнает и расщепляет в ДНК последовательность 5'-R(5mC)↓GY-3'/3'YG↓(5mC)R-5'. Ген *moxI* клонирован в составе вектора *E.coli*, получен препарат рекомбинантного фермента и изучены его свойства. Показано, что сайт узнавания ДНК-эндонуклеазы MoxI совпадает с сайтом узнавания 5mC-зависимой сайт-специфической ДНК-эндонуклеазы Glal. Однако новый фермент, в отличие от Glal, проявляет максимальную активность при 37°C и с большей эффективностью расщепляет последовательность узнавания с двумя 5-метилцитозинами.

Список сокращений: 5mC – 5-метилцитозин, R – пурин, Y – пиримидин, MD-эндонуклеаза – метилзависимая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза, BSA – бычий сывороточный альбумин, IPTG – Изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид, ДМСО – диметилсульфоксид, ДТТ – дитиотрейтол, ПААГ – полиакриламидный гель, п.н. – пары нуклеотидов, Трис – трис-(оксиметил)-аминометан, ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота.

Ключевые слова: штамм-продуцент, метилзависимая ДНК эндонуклеаза, эпигенетика

DOI: 10.26213/3034-4301.2025.6.3.001

ВВЕДЕНИЕ

Метилзависимыми сайт-специфическими ДНК-эндонуклеазами, или MD-эндонуклеазами (MD – *methyl dependent* (англ.)) являются ферменты, которые узнают и расщепляют определенные метилированные последовательности ДНК и не гидролизуют немодифицированную ДНК [1]. По своим свойствам эти ферменты похожи на хорошо изученные эндонуклеазы рестрикции, поскольку подобно им они не требуют кофакторов, помимо ионов Mg^{2+} , для проявления активности. Ранее открытый нами фермент Glal, выделенный из бактериального штамма *Glacial ice bacterium*, является MD-эндонуклеазой, которая узнает в природной ДНК последовательность 5'-R(5mC)GY-3'/3'YG(5mC)R-5' и гидролизует обе цепи ДНК посередине сайта с образованием «тупых» концов [2]. ДНК-метилтрансфераза DNMT3 млекопитающих и человека метилирует ДНК *de novo* с образованием последовательности 5'-R(5mC)GY-3'/3'YG(5mC)R-5' [3], которая является сайтом узнавания Glal. Вследствие этого фермент Glal нашел применение в эпигенетической ДНК-диагностике и используется для определения статуса метилирования отдельных сайтов или фрагментов ДНК [4,5], а также для установления эпигенома человека [6]. В данной работе описано получение новой MD-эндонуклеазы MoxI и установлены оптимальные условия гидролиза ДНК данным ферментом, а также и проведено сравнение свойств MoxI и Glal.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались реактивы производства “Sigma-Aldrich” (США), “Thermo Fisher” (США), “Panreac” (Испания), “Диа-М” и “Хеликон” (Россия). Для хроматографической очистки фермента применялись следующие носители: фосфоцеллюлоза P-11 («Whatman», Англия), фенил-сефароза и гепарин-сефароза («Sigma-Aldrich», США). Для выращивания бактериальных клеток использовались компоненты питательной среды фирмы “Organotechnie” (Франция). Для экспериментов брали эндонуклеазы рестрикции, полинуклеотидкиназу фага T4, реакционные SE-буферы «B100», «B», «G», «O», «W», «Y», «ROSE» производства ООО “СибЭнзайм” (Россия). В качестве маркёров молекулярных весов ДНК при получении электрофореграмм в агарозном и полиакриламидном гелях использовали ДНК-маркёры 1 kb, 100 bp, pUC19/MspI («СибЭнзайм», Россия). Для разбавления препаратов рекомбинатных Glal и MoxI при измерении их активности использовался SE-буфер для хранения и разбавления ферментов «B100» (10 mM Трис-HCl (pH 7,6), 50 mM KCl, 0,1 mM ЭДТА, 200 мкг/мл BSA, 1 mM ДТТ, 50% глицерин). В работе использовали плазмидные ДНК pMTL22 [7], pUC19 [8] и pHspA12 [9].

Эксперименты по анализу активности и субстратной специфичности рекомбинантного MoxI проводили в 20 или 50 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер Y (33 mM Трис-ацетат (pH 7,9), 10 mM магния ацетат, 66 mM калия ацетат, 1 mM ДТТ) и 1 мкг субстратной ДНК при температуре 37°C в течение 1 часа, после чего проводили электрофорез в ПААГ. При тестировании активности MoxI в хроматографическом профиле аликвоты по 1 мкл из фракций добавляли к 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг ДНК pHspAl2/GsaI в SE-буфере Y, инкубировали смесь в течение 15 мин при 37°C и проводили электрофорез в агарозном геле. При тестировании активности очищенного препарата MoxI брали 1 мкл неразбавленного фермента или 0,5, 1 и 2 мкл препарата MoxI, разбавленного в 10 раз SE-буфером «B100». Фермент добавляли к 50 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг ДНК pHspAl2/GsaI и один из шести реакционных буферов для эндонуклеаз рестрикции (B, G, O, W, Y, ROSE). Смесь инкубировали в течение 1 ч при 25, 30, 37 или 55°C, после чего реакцию останавливали стоп-буфером (40% сахара, 0,1 M ЭДТА, 0,05% бромфеноловый синий) и проводили электрофорез в агарозном геле.

Морфологические и физико-биохимические свойства исходной бактерии-продуцента определяли с использованием методик [10]. Определение рода микроорганизма проводили и по результатам секвенирования ПЦР-фрагмента гена 16S рРНК и по определителю Берджи [11].

Для определения места гидролиза межнуклеотидных связей ферментом MoxI использовали два [³²P]-меченых ДНК-дуплекса (G3/G4 и G3/G2), содержащих сайт узнавания целевого фермента и сайты узнавания контрольных рестриктаз. Одну из цепей дуплексов (G3) модифицировали по 5'-концу с помощью T4-полинуклеотидкиназы и γ[³²P]АТР. После очистки олигонуклеотида от побочных продуктов реакции к нему добавляли комплементарный немеченый олигонуклеотид G4 (для Glal и MoxI) или G2 (для рестриктаз HspAI и AspLEI). Пробирки прогревали 5 минут при 95°C с последующим охлаждением до комнатной температуры на рабочем столе. Реакцию гидролиза проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер Y (+20% ДМСО в случае Glal) или O, олигонуклеотидный дуплекс в концентрации 62.5 нМ и 1 мкл одного из ферментов. Инкубировали смесь течение 1 часа. Гидролиз Glal проводили при температуре 25°C, а MoxI при температуре 37°C в SE-буфере Y. В контрольную реакцию смесь к дуплексу добавляли SE-буфер Y и 1 мкл рестриктазы HspAI, либо SE-буфер O и 1 мкл рестриктазы AspLEI, инкубацию проводили при 37°C. Продукты гидролиза наносили на 20% ПААГ с 8 M мочевиной и проводили электрофорез в Трис-боратном буфере. Для разделения продуктов ферментативного гидролиза меченых олигонуклеотидов применяли электрофорез в 20% ПААГ, содержавшем 8 M мочевины.

Рекомбинантный штамм *E.coli* ER2267(pMTL-MoxI), несущий плазмиду pMTL22 с клонированным геном *moxI*, нами был получен с использованием стандартных генно-инженерных методик [12]. Штамм *Escherichia coli* ER2267, использованный для клонирования гена изучаемого фермента, получен из "New England Biolabs" (США).

Наработка биомассы рекомбинантного штамма *E.coli* ER2267(pMTL22-MoxI), несущего плазмиду с геном *MoxI*

Для получения биомассы одиночную колонию штамма *E.coli* ER2267(pMTL22-MoxI) засекали во флакон со 100 мл питательной среды LB (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl, pH 7,5) с ампициллином (50 мкг/мл). Культуру подращивали в течение ночи в термостате при 37°C. Затем полученный инокулят засекали по 5 мл в 12 флаконов со 100 мл среды LB с ампициллином. Культуру подращивали в течение 5 часов в термостатированной качалке при 30°C с перемешиванием при 140 об/мин. Затем в культуру добавляли IPTG до концентрации 1 mM и растили еще в течение 20 часов. Затем 1 мл культуральной жидкости отбирали для анализа, а остальную культуру откручивали на центрифуге J2-21 («Beckman», США) при 6000 об/мин в течение 30 мин. Полученную биомассу клеток замораживали при -20°C.

Выделение рекомбинантной MD—эндонуклеазы *MoxI*

Условия проведения выделения и используемые буферы. Выделение проводили при +4°C с использованием растворов:

- буфер А – 10 mM Трис-HCl, pH 7,5; 0,1 mM ЭДТА и 7 mM β-меркаптоэтанол;
- буфер Б – 60 mM Трис-HCl, pH 7,5; 0,1 mM ЭДТА и 7 mM β-меркаптоэтанол.

Экстрагирование. 2,3 г биомассы *E.coli* ER2267(pMTL-MoxI) суспендировали в 25 мл буфера А, содержащего 0,1 M KCl, 1 мг/мл лизоцима, 0,1 mM PMSF (фенилметилсульфонилфторид – ингибитор протеаз). После 60 мин перемешивания на магнитной мешалке суспензию в стеклянном стакане на 50 мл термостатировали в ледяной бане и затем клетки разрушали ультразвуком при максимальной мощности с амплитудой 22–24 мкм на приборе Soniprep 150 («MSE», Англия) с насадкой диаметром 2 см шестью импульсами по 30 сек с интервалом 2 мин. Экстракт осветляли на центрифуге J2-M1 («Beckman», США) в течение 40 мин в роторе JA-20 при 15000 об/мин.

Хроматография на фосфоцеллюлозе P-11. Осветленный экстракт наносили на колонку с фосфоцеллюлозой P-11 объемом 50 мл, предварительно

уравновешенной буфером А с 0,05 М KCl. Колонку промывали 100 мл буфера А с 0,05 М KCl. Сорбированный материал элюировали линейным градиентом концентрации KCl 0,1–0,4 М в буфере А объемом 700 мл. Собирали 70 фракций по 10 мл. Объединяли фракции (29-35), содержащие максимум активности MoxI.

Хроматография на фенил-сефарозе. К 70 мл активной фракции добавляли 1 М Трис-HCl, pH 7,5 до концентрации 60 мМ (4,2 мл), сульфат аммония до концентрации 1,7 М (15,7 г) и наносили на колонку с 5 мл фенил-сефарозы, уравновешенной буфером Б с 1,7 М сульфата аммония. Колонку промывали 10 мл буфера Б с 1,7 М сульфата аммония. Фермент элюировали линейным градиентом 1,7–0 М сульфата аммония объемом 600 мл. Собирали 60 фракций по 10 мл. Объединяли фракции (37-43) с максимальной активностью фермента.

Хроматография на гепарин-сефарозе. 70 мл полученной фракции диализовали против 3 л буфера А в течение 16 часов и наносили на колонку с 5 мл гепарин-сефарозы, уравновешенной буфером А. После нанесения колонку промывали 10 мл буфера А. Фермент элюировали линейным градиентом концентрации KCl 0–0,15 М в буфере А, объемом 400 мл. Собирали 50 фракций по 8 мл. Фракции (18-28), содержащие максимальную активность MoxI, объединяли.

Концентрирование и хранение препарата

Полученные фракции с активностью MoxI диализовали против 900 мл концентрирующего буфера (10 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанол, 0,2 М KCl, 50% глицерин) с BSA в концентрации 200 мкг/мл, при перемешивании на магнитной мешалке в течение 16 ч. Препарат хранили при -20°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика штамма-продуцента

Исследуемый бактериальный штамм был нами выделен из пробы пресной воды в ходе поиска микроорганизмов – продуцентов эндонуклеаз рестрикции и MD-эндонуклеаз. На основании морфолого-биохимических данных и анализа последовательности 16S рРНК (данные не приводятся) штамм идентифицировали как *Microbacterium oxydans*. Обнаруженный фермент был назван MoxI согласно общепринятой номенклатуре. Рекombинантный штамм *E.coli* ER2267(pMTL-MoxI), несущий плазмиду с геном *moxI*, нами был получен путем клонирования ПЦР-фрагмента в вектор pMTL22.

Получение препарата фермента MoxI и изучение его СВОЙСТВ

В результате наработки культуры клеток рекомбинантного штамма *E.coli* ER2267(pMTL22-MoxI) выход биомассы составил $2,0 \pm 0,5$ г/л. После хроматографической очистки из 2,3 г биомассы было получено 15 мл препарата MD-эндонуклеазы MoxI с концентрацией 5000 ед/мл. За одну единицу активности принимали минимальное количество фермента, способное полностью гидролизовать 1 мкг ДНК плазмиды pHspAI2/GsaI по сайту 5'-GCGC-3' в 50 мкл реакционной смеси в оптимальном буфере при 37°C за 1 час.

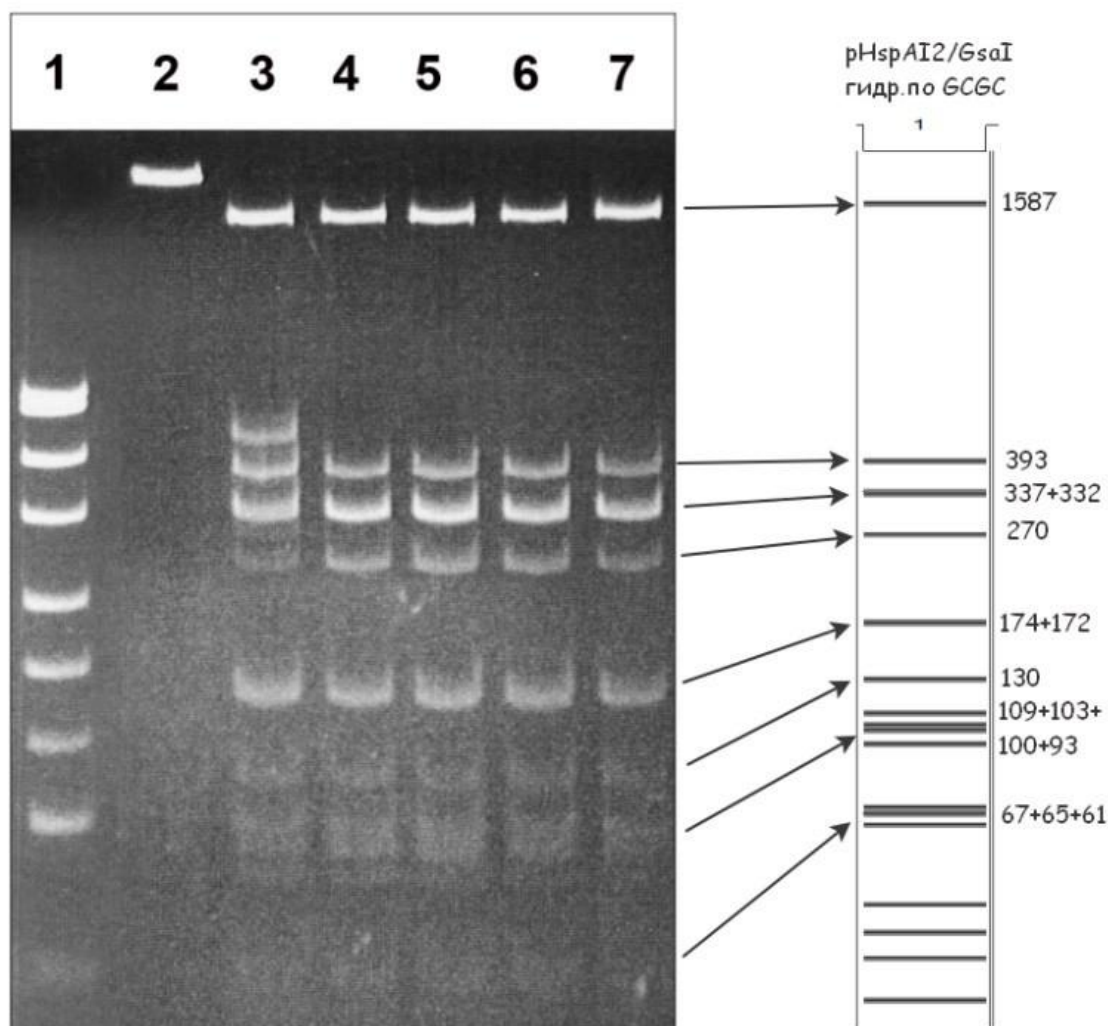
Анализ субстратной специфичности рекомбинантного MoxI

Активность и субстратную специфичность препарата MD-эндонуклеазы MoxI определяли, взяв в качестве субстрата ДНК плазмиды с С5-метилованными цитозинами – pHspAI2 [9], которая содержит метилированные сайты 5'-G(5mC)GC-3' и один сайт 5'-G(5mC)G(5mC)-3', линеаризованной рестриктазой GsaI (pHspAI2/GsaI).

На рисунке 1А приведена электрофореграмма разделения продуктов гидролиза ДНК плазмиды pHspAI2/GsaI в SE-буфере Y при 37°C ферментами GsaI и MoxI, по отдельности и совместно. На рисунке 1Б в качестве контроля специфичности приведены результаты тестирования препарата MoxI на ДНК фагов Лямбда и T7, в которых отсутствуют метилированные сайты 5'-G(5mC)GC-3'.

Рисунок 1а

Электрофореграмма разделения продуктов гидролиза ДНК pHspAI2/GsaI препаратами ферментов Glal и MoxI и расчетная картина распределения фрагментов расщепления этой ДНК по сайтам 5'-GCGC-3'

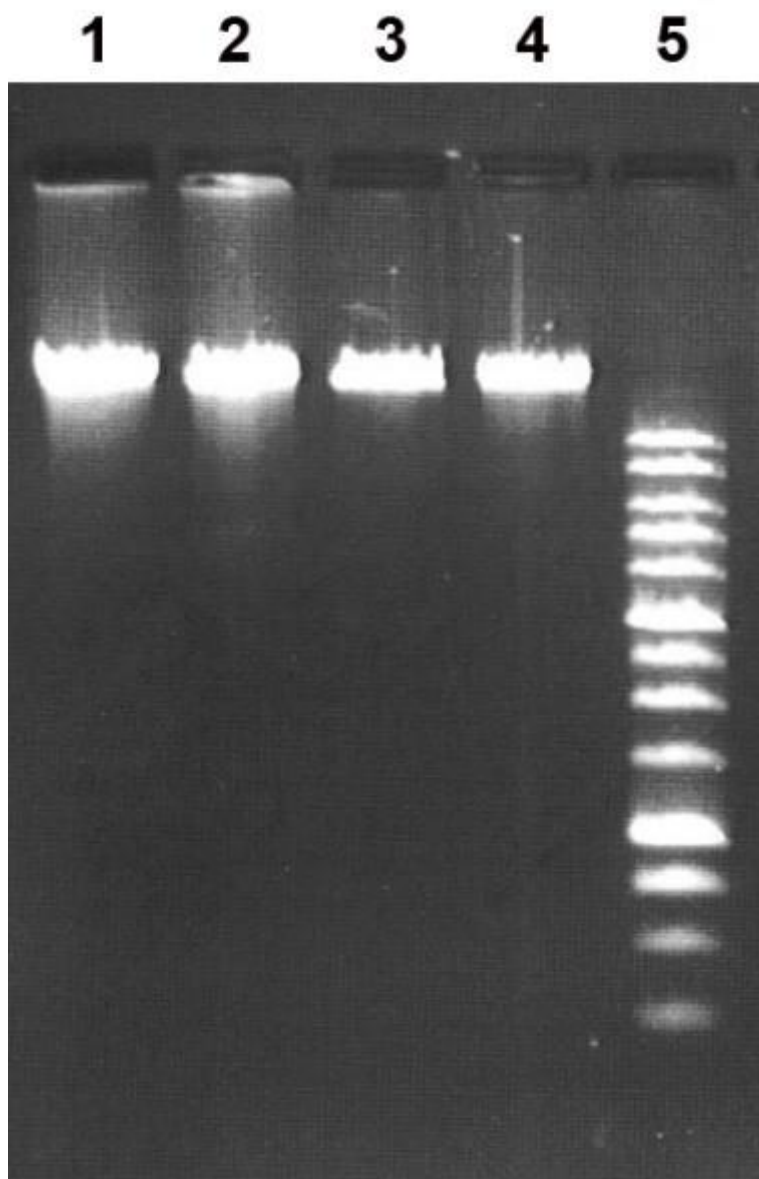


Дорожки:

1. ДНК-маркер pUC19/MspI (от 26 до 501 п.н.);
 2. Исходная ДНК pHspAI2/GsaI;
 3. ДНК pHspAI2/GsaI + 1 мкл препарата Glal;
 4. ДНК pHspAI2/GsaI + 1 мкл препарата Glal + 20% ДМСО;
 5. ДНК pHspAI2/GsaI + 1 мкл препарата MoxI;
 6. ДНК pHspAI2/GsaI + 1 мкл препарата Glal и 1 мкл препарата MoxI;
 7. ДНК pHspAI2/GsaI + 1 мкл препарата Glal и 1 мкл препарата MoxI + 20% ДМСО.
- Продукты расщепления разделены в 5 % ПААГ в ТАЕ-буфере. Справа приведена теоретически рассчитанная картина гидролиза плазмиды pHspAI2/GsaI по сайтам 5'-GCGC-3' с указанием длин получаемых фрагментов (п.н.).

Рисунок 16

Электрофореграмма, полученная после обработки ДНК фагов Лямбда и T7 препаратом фермента MoxI в SE-буфере Y при 37°C.



Дорожки:

1. Исходная ДНК фага Лямбда;
2. ДНК фага Лямбда + 1 мкл препарата MoxI;
3. Исходная ДНК фага T7;
4. ДНК фага T7 + 1 мкл препарата MoxI;
5. 1 kb ДНК-маркеры молекулярного веса (от 0,25 до 10 т.п.н.).

Продукты расщепления разделены в 1% агарозном геле в TAE-буфере.

Как видно на рисунке 1А, при гидролизе ДНК pHspAI2/GsaI MD-эндонуклеазой Glal с 20% ДМСО, гидролизе MoxI и совместном гидролизе двумя ферментами (дор.4, 5, 6 и 7) никаких изменений в картине распределения фрагментов не возникает.

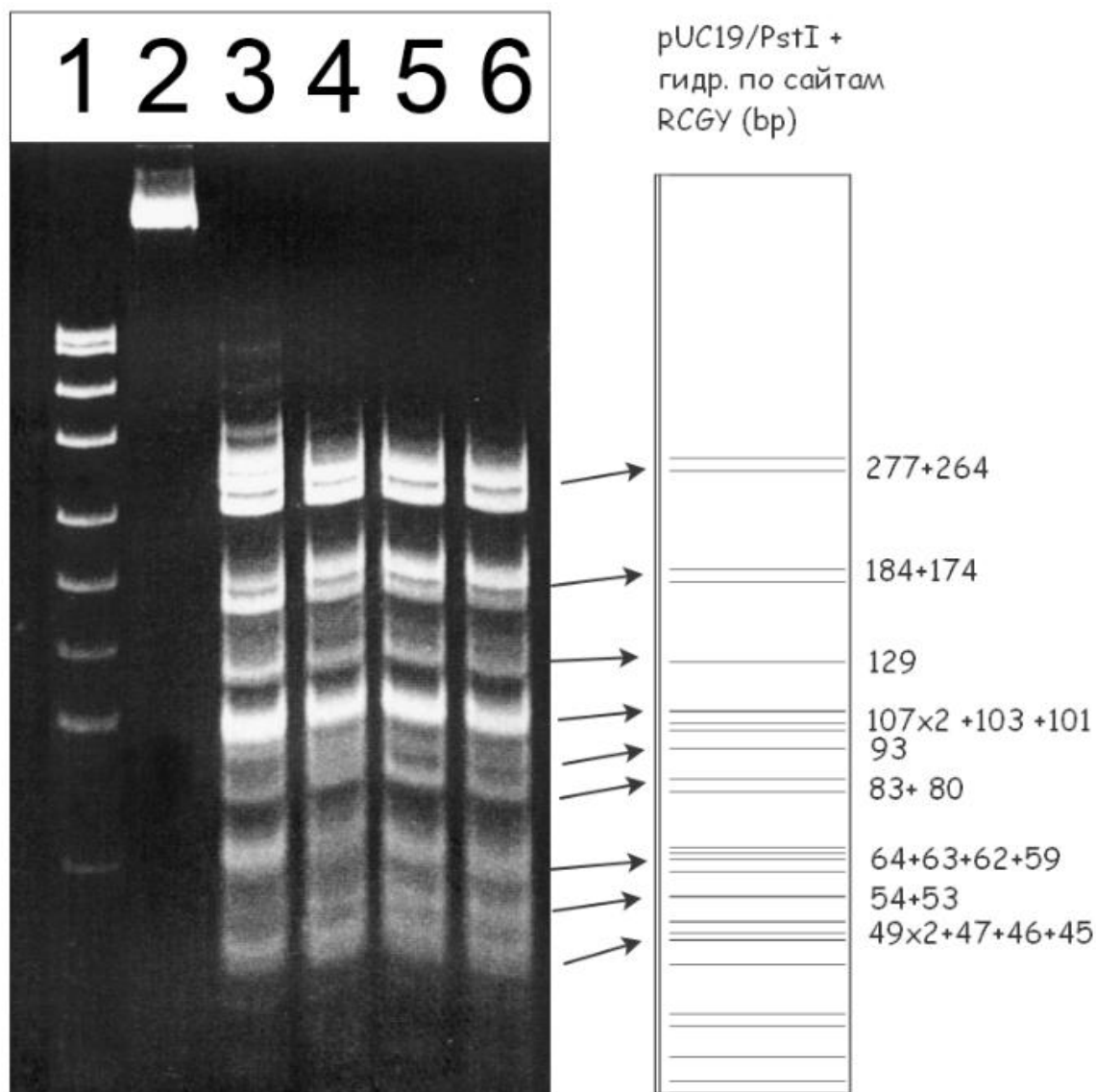
Отсюда можно сделать однозначный вывод о том, что оба фермента расщепляют данную метилированную плазмиду по сайту 5'-G(5mC)GC-3'. При этом, в случае Glal степень гидролиза субстрата без добавления ДМСО (дор. 3) меньше по сравнению с гидролизом MoxI (дор. 5), т.е. новый фермент эффективнее гидролизует узнаваемую последовательность в случае метилирования только двух внутренних 5-метилцитозинов. А для Glal, как было показано ранее [13], для получения полного гидролиза субстрата с двумя 5-метилцитозинами требуется добавление 20% ДМСО или присутствие в сайте 3-х либо 4-х 5-метилцитозинов. Активность же MoxI не зависит от присутствия ДМСО (дор. 5 и 7), и он одинаково эффективно расщепляет ДНК с двумя, тремя и четырьмя 5-метилцитозинами.

Таким образом, представленное на рисунке 1А сравнение полученной с помощью MoxI картины гидролиза ДНК плазмиды pHspA12/GsaI с теоретически рассчитанными данными расщепления ее последовательности по сайтам сайт-специфических эндонуклеаз позволяет сделать вывод, что фермент MoxI гидролизует данный субстрат по сайту 5'-G(5mC)GC-3', и является, таким образом, изошизомером MD-эндонуклеазы Glal, изученной нами ранее [2, 13]. При этом, новый фермент, так же как и Glal, не расщепляет ДНК, в которой отсутствуют метилированные последовательности 5'-G(5mC)GC-3' (Рисунок 1Б, дорожки 2 и 4).

Далее мы проверили способность MD-эндонуклеазы MoxI расщеплять не только сайт 5'-G(5mC)GC-3', но и все последовательности ДНК 5'-R(5mC)GY-3', которые узнаются ферментом Glal. Для этого мы использовали плазмиду pUC19, линеаризованную рестриктазой PstI и обработанную ДНК-метилтрансферазой SssI, образующей метилированные последовательности 5'-(5mC)G-3'. Данный субстрат обрабатывали ферментами Glal и MoxI, по-отдельности и совместно. На рисунке 2 представлена электрофореграмма разделения продуктов гидролиза после проведения электрофореза в 7% ПААГ.

Рисунок 2

Электрофореграмма разделения продуктов гидролиза ДНК pUC19/PstI+M.SssI препаратами ферментов Glal и MoxI и расчетная картина распределения фрагментов расщепления этой ДНК по сайтам 5'-RCGY-3'



Дорожки:

1. ДНК-маркер pUC19/Mspl (от 26 до 501 п.н.);
2. Исходная ДНК pUC19/PstI+M.SssI;
3. ДНК pUC19/PstI+M.SssI + 1 мкл препарата Glal;
4. ДНК pUC19/PstI+M.SssI + 1 мкл препарата Glal + 20% ДМСО;
5. ДНК pUC19/PstI+M.SssI + 1 мкл препарата MoxI;
6. ДНК pUC19/PstI+M.SssI + 1 мкл препарата Glal и 1 мкл препарата MoxI;

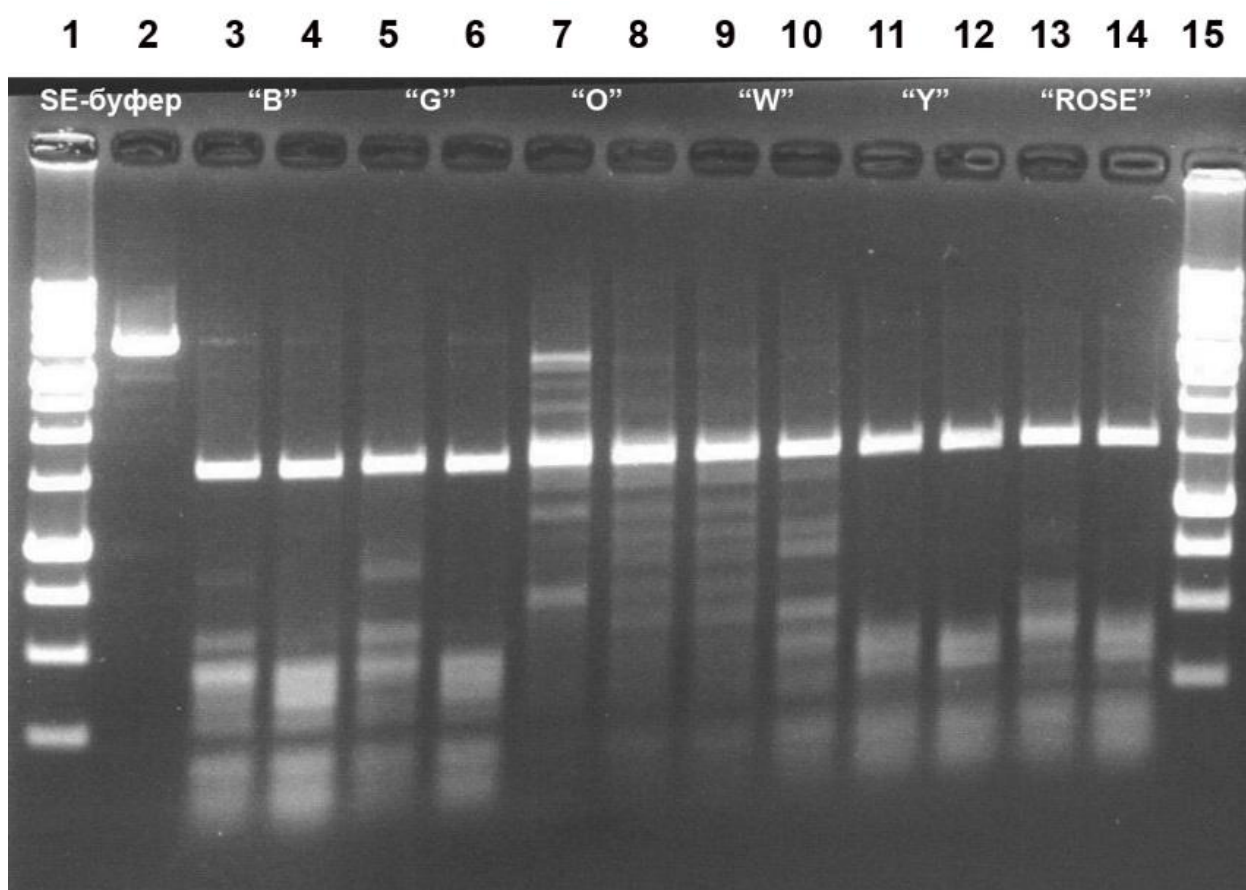
Продукты расщепления разделены в 7 % ПААГ. Справа приведена теоретически рассчитанная картина гидролиза плазмиды pUC19/PstI по сайтам 5'-RCGY-3'.

Из рисунка видно, что, как и в случае гидролиза плазмиды pHspAl2/GsaI, картины расщепления ДНК pUC19/PstI+M.SssI MD-эндонуклеазами Glal+ДМСО и MoxI одинаковы (дор. 4 и 5), а при совместном гидролизе субстрата двумя ферментами картина распределения фрагментов никак не меняется (дор. 6). Следовательно, можно сделать вывод, что новый фермент MoxI также узнает в ДНК последовательность 5'-R(5mC)GY-3'.

В ходе дальнейшей работы нами были определены оптимальные условия для работы MD-эндонуклеазы MoxI. Для этого использовали реакционную смесь, содержащую 1 мкг ДНК pHspAl2/GsaI, один из шести буферов для эндонуклеаз рестрикции (B, G, O, W, Y, ROSE), с добавлением 0,5, 1 или 2 мкл разбавленного в 10 раз SE-буфером «B100» препарата фермента MoxI, и четыре варианта температуры реакции – 25, 30, 37 и 55°C. Результаты приведены на рисунках 3, 4А и 4Б.

Рисунок 3

Электрофореграмма разделения продуктов гидролиза ДНК pHspAl2/GsaI препаратом MD-эндонуклеазы MoxI в шести SE-буферах при 37°C



Дорожки:

2 – исходная ДНК pHspAl2/GsaI;

3, 5, 7, 9, 11, 13 – ДНК pHspAl2/GsaI + 1 мкл разбавленного в 10 раз препарата

MoxI;

4, 6, 8, 10, 12, 14 – ДНК pHspAl2/GsaI + 2 мкл разбавленного в 10 раз препарата

MoxI;

3 и 4 – SE-буфер B;

5 и 6 – SE-буфер G;

7 и 8 – SE-буфер O;

9 и 10 – SE-буфер W;

11 и 12 – SE-буфер Y;

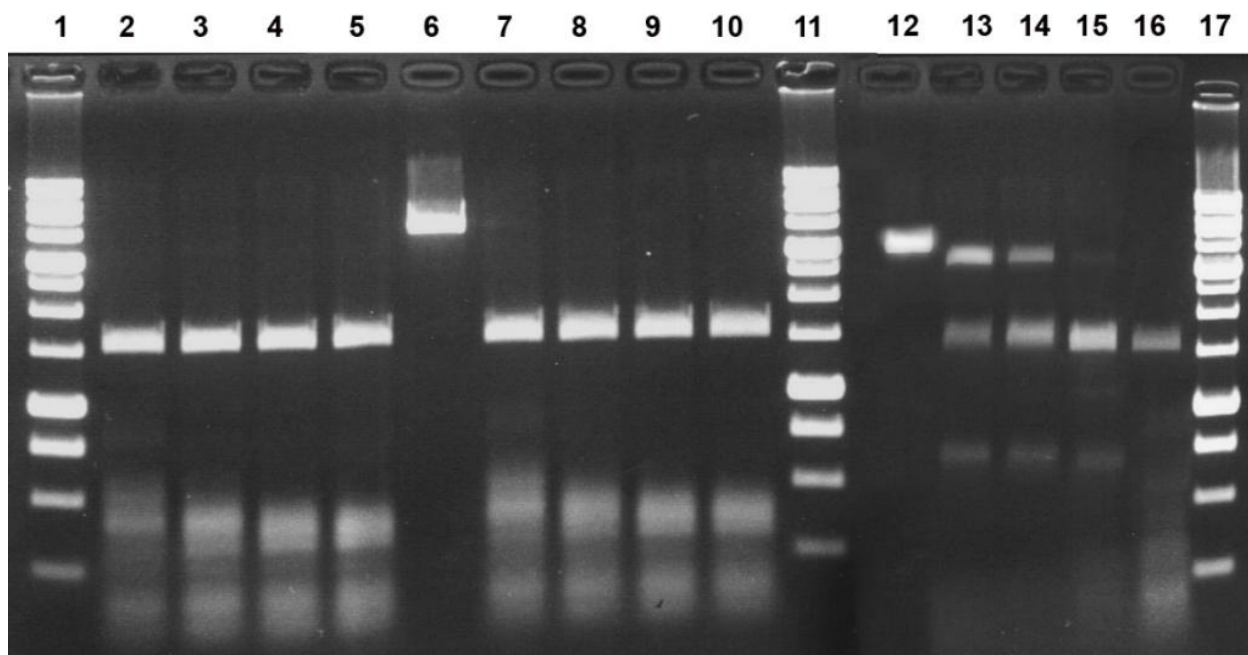
13 и 14 – SE-буфер ROSE;

1 и 15 – 1 kb ДНК-маркеры молекулярного веса (от 0,25 до 10 т.п.н.).

Продукты расщепления разделены в 1,2% агарозном геле в ТАЕ-буфере.

Рисунок 4а

Электрофореграмма разделения продуктов гидролиза ДНК pHspAl2/GsaI препаратом MD-эндонуклеазы MoxI при температурах 30, 37 и 55°C в SE-буфере Y.



Дорожки:

2-5 – инкубация при 30°C;

7-10 – инкубация при 37°C;

13-16 – инкубация при 55°C;

6 и 12 – исходная ДНК pHspAl2/GsaI;

2, 7, 13 – ДНК pHspAl2/GsaI + 0,5 мкл разбавленного в 10 раз препарата MoxI;

3, 8, 14 – ДНК pHspAl2/GsaI + 1 мкл разбавленного в 10 раз препарата MoxI;

4, 9, 15 – ДНК pHspAl2/GsaI + 2 мкл разбавленного в 10 раз препарата MoxI;

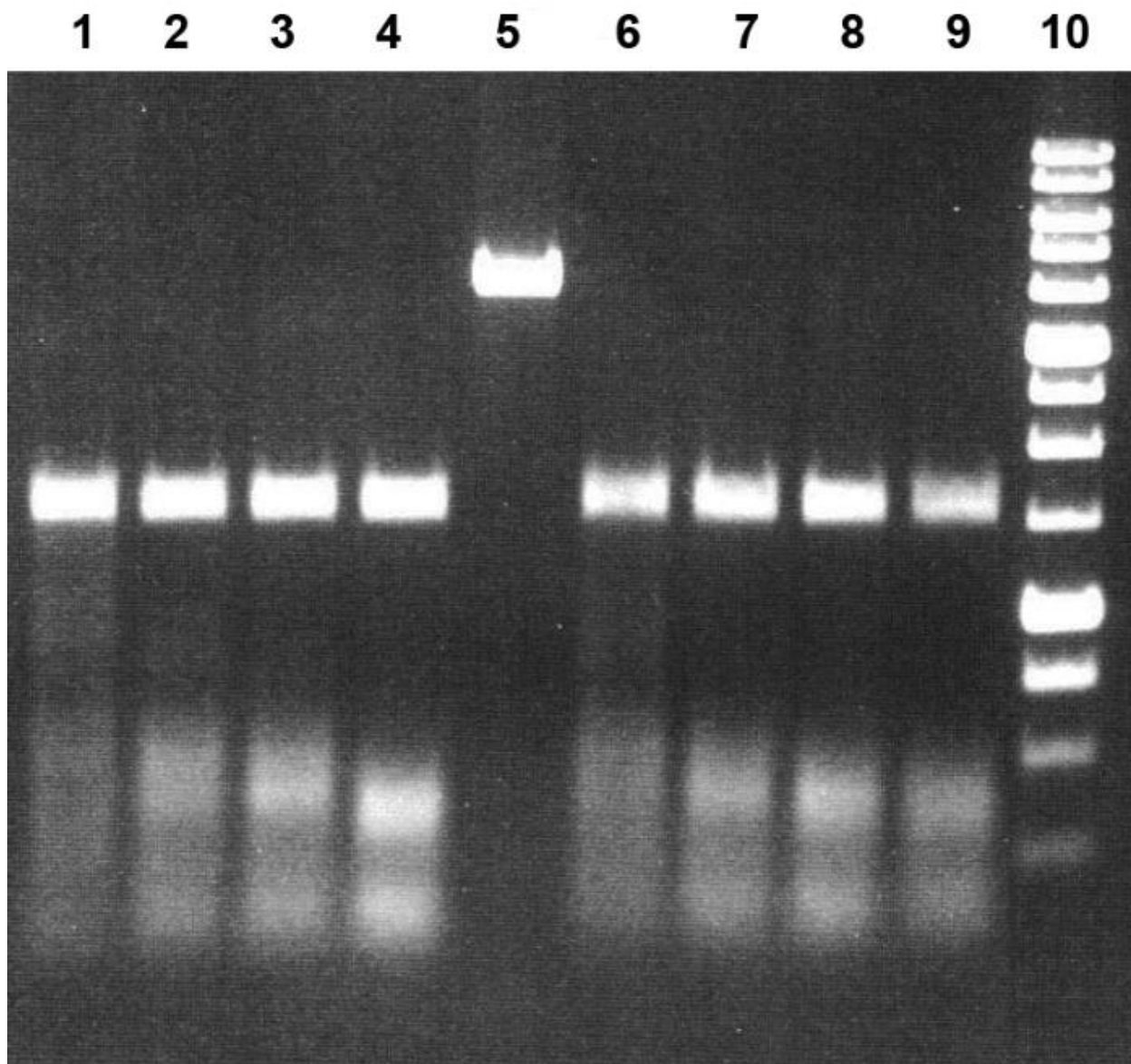
5, 10, 16 – ДНК pHspAl2/GsaI + 1 мкл неразбавленного препарата MoxI;

1, 11, 17 – 1 kb ДНК-маркеры молекулярного веса (от 0,25 до 10 т.п.н.).

Продукты расщепления разделены в 1,2% агарозном геле.

Рисунок 4б

Электрофореграмма разделения продуктов гидролиза ДНК pHspAl2/GsaI препаратом MD-эндонуклеазы MoxI при температурах 25 и 30°C в SE-буфере Y



Дорожки:

1-4 – инкубация при 25°C;

6-9 – инкубация при 30°C;

5 – исходная ДНК pHspAl2/GsaI;

1 и 6 – ДНК pHspAl2/GsaI + 0,5 мкл разбавленного в 10 раз препарата MoxI;

2 и 7 – ДНК pHspAl2/GsaI + 1 мкл разбавленного в 10 раз препарата MoxI;

3 и 8 – ДНК pHspAl2/GsaI + 2 мкл разбавленного в 10 раз препарата MoxI;

4 и 9 – ДНК pHspAl2/GsaI + 1 мкл неразбавленного препарата MoxI;

10 – 1 kb ДНК-маркеры молекулярного веса (от 0,25 до 10 т.п.н.).

Продукты расщепления разделены в 1,2% агарозном геле.

Анализ полученных результатов позволил заключить, что MoxI проявляет максимальную активность в SE-буфере Y (33 mM Трис-ацетат (pH 7,9), 10 mM Mg-ацетат, 66 mM K-ацетат, 1 mM ДТТ) (рис. 3, дор. 11-12). Оптимальной температурой реакции является 37°C, хотя фермент не менее эффективно работает и при 30 °C (рис. 4А, дор. 2-5 и 7-10). При этих условиях активность фермента составляет не менее 5000 ед/мл. Активность MoxI при 55°C составляет не более 20% от оптимальной (рис. 4А, дор. 13-16). При 25°C активность фермента составляет не менее 50% от оптимальной (рис. 4Б, дор. 1-2). Необходимо отметить, что новый фермент оказался термостабильным, поскольку полной инактивации MoxI в реакционной смеси при нагревании до 65 или 80°C за 20 мин не происходит (данные не приведены).

В таблице 1 приведены данные по активности ферментов MoxI и Glal в шести основных SE-буферах для эндонуклеаз рестрикции.

Таблица 1

Активность препаратов эндонуклеаз рестрикции MoxI и Glal в шести основных SE-буферах для эндонуклеаз рестрикции (в % от максимальной).

SE буфер	B	G	O	W	Y	ROSE
MoxI	50–75	75–100	10–25	25–50	100	80
GlaI	75–100	75–100	25–50	25–50	100	100

Определение позиции гидролиза ДНК MD-эндонуклеазой MoxI

Чтобы определить место гидролиза ДНК новым ферментом мы использовали два двуцепочечных радиоактивно-меченых с 5'-конца олигонуклеотида (дуплекса) G3*/G4 и G3*/G2 (меченая цепь отмечена знаком *). Дуплекс G3*/G4 содержит два 5-метицитозина (по одному в каждой цепи) так, что образуется сайт узнавания Glal (подчеркнут). Дуплекс G3*/G2 использовали в качестве контрольного, т.к. он отличается от первого только тем, что цепь G2 содержит неметилованную последовательность 5'-GCGC-3', а сам дуплекс является полуметилованным и способен эффективно расщепляться рестриктазами HspAI [14] и AspLEI [15], узнающие и расщепляющие последовательность (5'-G(5mC)GC-3'/3'-CGCG-5'). Эти ферменты гидролизуют данный субстрат на расстоянии одного нуклеотида слева и справа, соответственно, от места гидролиза Glal (см. Рис. 5А). Электрофореграмма, полученная после разделения продуктов расщепления ферментами дуплексов G3*/G4 и G3*/G2 в 20% ПААГ с 8 М мочевиной, представлена на Рис. 5Б.

Рисунок 5а

Структура олигонуклеотидных дуплексов G3*/G4 и G3*/G2 для определения позиции гидролиза ДНК MD-энлонуклеазой MoxI. Последовательность, узнаваемая ферментами, подчеркнута и выделена жирным. Предсказанные позиции гидролиза контрольными ферментами показаны косыми стрелками. Реальные точки расщепления показаны вертикальными стрелками.

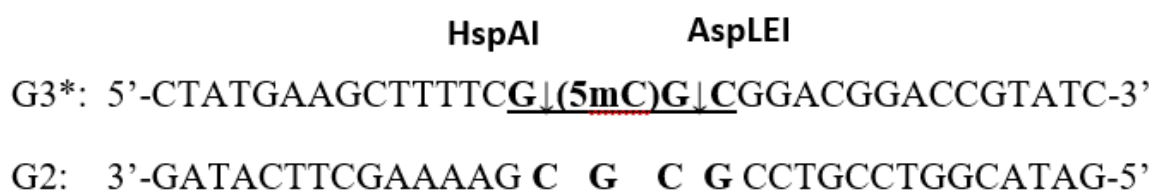
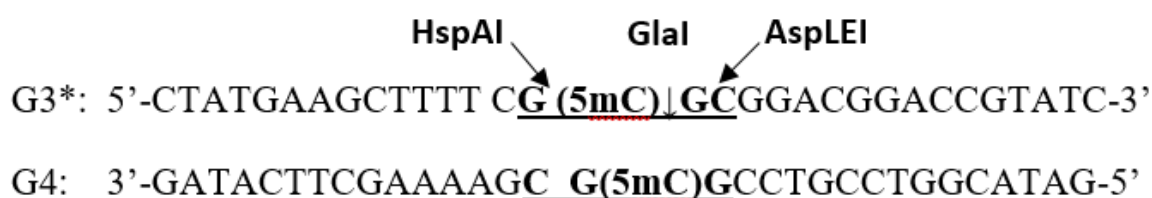
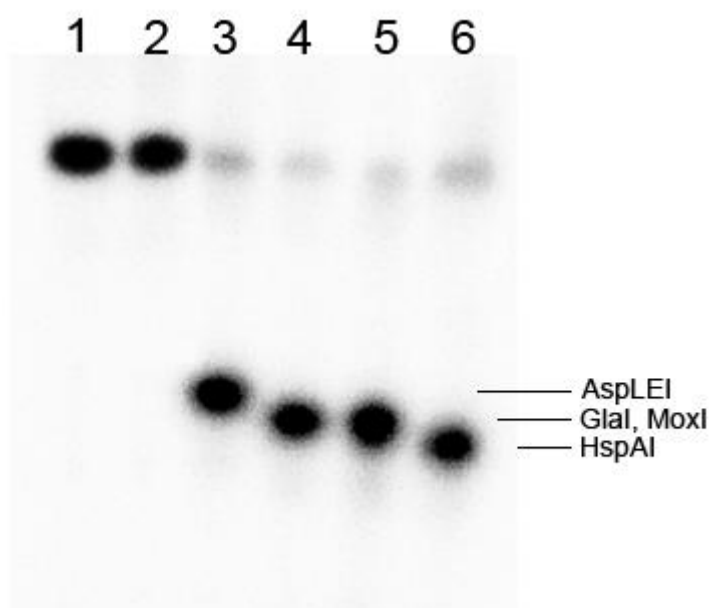


Рисунок 5б

Определение позиции гидролиза MoxI на олигонуклеотидном дуплексе G3*/G4. Электрофореграмма получена в 20% ПААГ с 8 М мочевиной после разделения продуктов расщепления ферментами GlaI или MoxI дуплекса G3*/G4, а также HspAI или AspLEI – дуплекса G3*/G2.



Дорожки:

1. исходный дуплекс G3*/G4;
2. исходный дуплекс G3*/G2;
3. дуплекс G3*/G2 + 1 мкл AspLEI;
4. дуплекс G3*/G4 + 20% ДМСО + 1 мкл Glal;
5. дуплекс G3*/G4 + 1 мкл MoxI;
6. дуплекс G3*/G2 + 1 мкл HspAI.

Из рисунка видно, что позиция гидролиза MoxI совпадает с позицией гидролиза Glal (отмечена стрелкой): 5'-G(5mC)↓GC-3'. Таким образом, MoxI образует в результате гидролиза ДНК «тупые» концы и является истинным изошизомером Glal. Эта же автораддиограмма геля подтверждает результат, полученный ранее на плазмидных ДНК: MD-эндонуклеаза MoxI способна эффективно расщеплять ДНК-субстрат с двумя внутренними 5-метилцитозинами (дор. 5), тогда как в случае Glal эффективный гидролиз такого субстрата происходит только в присутствии в реакционной смеси ДМСО (дор. 4).

Новая MD-эндонуклеаза MoxI, являясь изошизомером Glal, используется в эпигенетических исследованиях, в частности при проведении Glal- и GLAD-ПЦР анализа [14, 15], поскольку в отличие от ранее используемого для этих целей Glal, одинаково хорошо работает при температурах 30 и 37°C и эффективно расщепляет сайт 5'-R(5mC)GY-3' с двумя внутренними 5-метилцитозинами. Это позволяет добиться более полного гидролиза анализируемых образцов ДНК в отсутствие ДМСО, который необходим для полного расщепления ДНК ферментом Glal, но при этом ингибирует ПЦР.

Список литературы

1. Метилзависимые ДНК эндонуклеазы // <https://sibenzyme.com/product-category/md/>
2. Tarasova G. V., Nayakshina T. N., Degtyarev S. Kh. 2008. Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease Glal. *BMC Molecular Biology*, 9:7.
3. Handa V., Jeltsch A. 2005. Profound flanking sequence preference of Dnmt3a and Dnmt3b mammalian DNA methyltransferases shape the human epigenome. *J. Mol. Biol.*, 348 (5): 1103-1112.
4. Гончар Д.А., Акишев А.Г., Дегтярев С.Х. 2010. BslI- и Glal- ПЦР анализ – новый метод исследования метилированных участков ДНК. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова*, Т.6, № 1, 5-12.
5. Кузнецов В.В., Абдурашитов М.А., Акишев А.Г., Дегтярев С.Х. 2014. Способ определения нуклеотидной последовательности Pu(5mC)GPy в заданном положении протяженной ДНК. Патент на изобретение RU 2525710 C1.
6. Abdurashitov M.A., Tomilov V.N., Gonchar D.A., Kuznetsov V.V., Degtyarev S.Kh. 2015. Mapping of R(5mC)GY Sites in the Genome of Human Malignant Cell Line Raji. *Biol. Med. (Aligarh)*, V.7, Is.4. BM-135-15.
7. Chambers S.P., Prior S.E., Barstow D.A., Minton N.P. 1998. The pMTLnic⁻ cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing. *Gene*, 68. 139-149.
8. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33. 103-119.
9. Чернухин В.А., Гончар Д.А., Килева Е.В., Соколова В.А., Голикова Л.Н., Дедков В.С., Михненко Н.А., Дегтярёв С.Х. 2012. Новая метилзависимая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза MteI расщепляет девятинуклеотидную последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN(5mC)G(5mC)G-5'. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова*, Т.8, №1. 16-26.
10. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под ред. Н.С. Егорова. М., 1995.
11. Определитель бактерий Берджи. Под ред. Дж. Хоулта и др.: 9-е издание в 2-х томах. Пер. с англ. под ред. Г.А. Заварзина. М., 1997.
12. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1987. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
13. Abdurashitov M.A., Chernukhin V.A., Gonchar D.A., Dedkov V.S., Mikhnenkova N.A. and Degtyarev S.Kh. 2016. Dimethyl Sulfoxide Changes the Recognition Site Preference of Methyl-directed Site-specific DNA Endonuclease Glal. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(1). 1733-1739.
14. Набор для Glal-ПЦР анализа // <https://sibenzyme.com/product/glai-pcr/>
15. Набор для GLAD-ПЦР анализа // <https://sibenzyme.com/product/glad-hybrid/>