

РГАСНТИ 34.15.27

ISSN 0208—2330



ИТОГИ НАУКИ И ТЕХНИКИ

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Том 17



Москва 1989

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО НАУКЕ И ТЕХНИКЕ

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ВСЕСОЮЗНЫЙ ИНСТИТУТ НАУЧНОЙ И ТЕХНИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ
(ВИНИТИ)

ИТОГИ НАУКИ И ТЕХНИКИ

СЕРИЯ
БИОТЕХНОЛОГИЯ

Том 17

д. б. н. А. А. Янулайтис

ФЕРМЕНТЫ РЕСТРИКЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Под редакцией д. б. н. В. Г. Дебабова

Серия издается с 1983 г.



МОСКВА 1989

1—5933

СОДЕРЖАНИЕ

Главный редактор информационных изданий ВИНТИ
профессор *П. В. Нестеров*

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

информационных изданий

по физико-химической биологии и биотехнологии

Главный редактор — акад. *Р. В. Петров*

Члены редакционной коллегии: акад. *А. А. Баев,*

чл.-корр. АН СССР *А. А. Богданов,* проф. *Э. И. Будовский,*

проф. *Ю. М. Васильев,* к. б. н. *Л. Г. Виноградова,*

акад. АМН СССР *Ю. А. Владимиров,* чл.-корр. АН СССР *В. Г. Дебабов,*

Л. А. Денисова, чл.-корр. АН СССР *Р. П. Евстигнеева,*

к. б. н. *Г. Т. Жангельдина* (ученый секретарь редколлегии),

чл.-корр. АН СССР *С. Г. Инге-Вечтомов,* чл.-корр. АМН СССР *К. П. Кашкин,*

проф. *Л. Л. Киселев,* проф. *А. А. Клесов,* акад. *П. Г. Костюк,*

акад. *Н. К. Кочетков,* акад. *А. А. Красновский,*

чл.-корр. АН СССР *В. Л. Кретович,* к. б. н. *В. А. Игнатова,*

акад. *А. Д. Мирзабеков,* акад. *С. Е. Северин,* проф. *Е. С. Северин,*

акад. *Г. К. Скрябин,* чл.-корр. АН СССР *В. П. Скулачев,*

акад. ВАСХНИЛ СССР *А. А. Созинов,* акад. *А. С. Спирин,*

проф. *Р. М. Хаитов,* акад. *Е. И. Чазов,*

чл.-корр. АН СССР *Ю. А. Чизмаджев,* д. б. н. *В. Р. Шатилов*

Научный редактор: д. б. н. *В. Г. Дебабов*

ОТ РЕДАКТОРА

Представляемый читателям обзор А. Янулайтиса содержит исчерпывающую информацию относительно важного класса ферментов — специфических эндонуклеаз рестрикции II класса. Именно эти ферменты служат одним из главных орудий генных инженеров, лежат в основе методов физического картирования геномов, анализа последовательности нуклеотидов в ДНК. Обзор охватывает литературу до 1988 г. включительно и может служить полезным справочным материалом для широкого круга исследователей, применяющих рестриктазы II класса в своей работе.

Сегодня исследование рестриктаз II класса, поиск новых ферментов, изучение способов их взаимодействия с ДНК, их каталитическая активность стали предметом самостоятельной области энзимологии. Все эти вопросы нашли полное изложение и критическое осмысливание в обзоре. Ценность обзора, его выводов, особенно высока в силу того, что автор — А. Янулайтис сам внес очень высокий вклад в изучение рестриктаз II класса, открыл ряд новых ферментов, руководил освоением промышленного выпуска этих ферментов в СССР. С этой точки зрения обзор необходим любому исследователю, который захотел бы приложить свои силы в этой перспективной области науки.

Наконец, в обзоре затронуты не только прагматические вопросы, связанные с использованием рестриктаз II класса, как аналитических реагентов в генной инженерии, но и поднят ряд общебиологических проблем.

Одна из таких проблем — узнавание белками специфических последовательностей нуклеиновых кислот. Кажется, что рестриктазы II класса могут быть одной из лучших моделей для таких исследований.

Другая общебиологическая проблема — это распространенность рестриктаз среди различных видов или среди штаммов одного вида прокариотических организмов. Ответ на эти вопросы может уточнить биологическую роль систем рестрикации — модификации, а также дать полезные ориентиры в поиске новых рестриктаз.

В. Г. Дебабов

ВВЕДЕНИЕ

Изучение энзиматических основ феномена рестрикции-модификации прокариотических микроорганизмов реализовалось в открытии специфических эндонуклеаз, известных под названием рестриктаз, широко применяемых в качестве аналитических реагентов. Объясняется это тем, что рестриктазы явились ферментами, использование которых впервые дало возможность специфически расщеплять ДНК на строго определенные фрагменты с размерами, доступными для препаративного выделения, анализа и соединения в рекомбинантные молекулы *in vitro*.

Исключительное значение специфических эндонуклеаз обусловлено в первую очередь той ролью; которую эти ферменты сыграли и продолжают играть в молекулярно-генетических исследованиях вообще и генетической инженерии в частности. Дальнейшее развитие этих ведущих направлений современной биологической науки и их прикладных приложений, имеющих самое непосредственное отношение к решению биотехнологических проблем, во многом зависит от доступности широкого ассортимента рестриктаз различной субстратной специфичности. Все это стимулировало интенсивный поиск продуцентов новых специфических эндонуклеаз и организацию их промышленного выпуска.

Исключительная значимость рестриктаз как аналитических реагентов на долгое время определило развитие исследований в этой области в основном в сторону решения прикладных задач, которые реализовывались путем поиска новых продуцентов, очистки и характеристики субстратной специфичности открытых ферментов. В ходе этих экспериментов, вне зависимости от поставленных целей, были накоплены данные касающиеся вопросов распространения рестриктаз и вариабильности характеристик проявления их специфичности. Со временем все больше внимания стало уделяться углубленному и целенаправленному изучению вышеупомянутых, а также некоторых других вопросов, имеющих фундаментальное общепознавательное значение. Среди последних можно упомянуть исследование структуры генов кодирующих рестриктазы, физико-химических и энзиматических характеристик рестриктаз, изучение молекулярных механизмов белок-нуклеинового узнавания. Указанные направления исследований далеки от завершения и находятся на разных стадиях развития. Можно прогнозировать, что они, а также

белковая инженерия ферментов рестрикции-модификации с целью изменения их специфичности, в ближайшем десятилетии будут магистральными направлениями фундаментальных исследований в обсуждаемой области науки. В настоящем обзоре основное внимание будет уделено рассмотрению вышеперечисленных вопросов. Значительная часть исследований в области изучения рестриктаз посвящена экспериментам, имеющим более выраженное прикладное значение (поиск продуцентов, выделение и характеристика открытых ферментов). Поэтому считаем уместным в обзоре уделить внимание и этим вопросам (в том числе и их методическим аспектам), что должно способствовать приобщению начинающих исследователей к актуальному направлению науки.

Ферментам рестрикции в клетке всегда сопутствуют идентичные по субстратной специфичности модифицирующие метилазы, защищающие внутриклеточную ДНК от действия сопряженной рестриктазы. Учитывая близкую функциональную взаимосвязанность ферментов рестрикции-модификации следовало бы их рассматривать совместно. Однако, метилтрансферазы этого типа подробно рассмотрены в обзоре, опубликованном в 23 томе серии «Молекулярная биология. Итоги науки и техники». [9]. В настоящей работе сведения об модифицирующих метилазах, являющихся компонентами систем рестрикции-модификации, будут представлены только в той мере, в которой это будет необходимо для характеристики рестриктаз.

Часть I. ФЕРМЕНТЫ РЕСТРИКЦИИ II ТИПА

1. ФЕРМЕНТЫ РЕСТРИКЦИИ, ИХ НОМЕНКЛАТУРА И КЛАССИФИКАЦИЯ

История открытия ферментов рестрикции, детальная характеристика их биологической роли, энзиматических и структурных особенностей детально рассмотрена в большом количестве обзоров [49, 58, 59, 62, 263, 309, 417]. Учитывая направленность настоящего обзора на рассмотрение одного из известных типов рестриктаз, в этом его разделе ограничимся лишь описанием некоторых общих вопросов, призванных в первую очередь определить место специфических эндонуклеаз (рестриктаз II типа) среди других обсуждаемых ферментов.

Открытие рестриктаз уходит корнями в исследование молекулярных основ феномена хозяйской специфичности, обнаруженного в начале пятидесятых годов, в ходе изучения эффективности посева фагов при смене хозяина [76, 234, 235]. Последующие исследования этого явления, выполненные в основном Арбером с сотр. [60, 61, 62, 126, 232], привели к раскрытию состава и особенностей функционирования штаммоспецифической системы рестрикции и модификации ДНК. В эту систему входят два специфичных для определенного штамма фермента — ДНК модифицирующий (метилаза цитозиновых или адениновых остатков ДНК) и ДНК расщепляющий (эндодезоксирибонуклеаза-рестриктаза). Эти ферменты узнают в ДНК идентичные короткие последовательности нуклеотидов. Метилаза, модифицируя определенные основания в пределах узнаваемого участка, защищает внутриклеточную ДНК от действия рестриктазы. Проникшая в микробную клетку, обладающую системой хозяйской специфичности, немодифицированная соответствующим образом ДНК подвергается расщеплению внутриклеточной специфической эндонуклеазой. В подавляющем большинстве случаев это приводит к инактивации этой ДНК.

Первые рестриktionные эндонуклеазы были выделены в 1968 г. из штаммов *E. coli* В и К [232, 266]. Оказалось, что системы рестрикции-модификации довольно широко распространены у бактерий. Из различных штаммов микроорганизмов были выделены ферменты рестрикции-модификации, различающиеся между собой по структурной организации, потребностям к кофакторам и особенностям субстратной специфичности.

Стремительный рост числа обнаруженных ферментов рестрикции и накопление данных об их структурных и функциональных особенностях вызвал необходимость ввести единую номенклатуру и классификацию этих энзимов.

Перед тем, как приступить к изложению вышеуказанных вопросов, следует отметить, что за прошедший период выделено

и идентифицировано особенно много специфических эндодезоксирибонуклеаз [319], для которых не исследовано ни их участие в феномене рестрикции, ни наличие в этих же клетках соответствующей по специфичности метилазы. Тем не менее, для обозначения этих нуклеаз по традиции используется название рестриктаз (рестрикционных эндонуклеаз).

В настоящем обзоре термины специфические эндонуклеазы и рестриктазы будут использоваться как синонимы, имея в виду только их энзиматические свойства, а не биологическую функцию.

Номенклатуру для систем рестрикции-модификации и их ферментов предложили Смит и Натанс [353]. Она включает следующие правила.

1. Название рода и вида микроорганизма обозначается тремя латинскими буквами — первой буквой названия рода и первыми двумя буквами названия вида, например, *Escherichia coli* — Eсo, *Bacillus amyloliquefaciens* — Вam.

2. За родо-видовым обозначением следует обозначение штамма, например: EсoВ, EсoК. В том случае, если система рестрикции-модификации контролируется генами вируса или плазмиды, указывается символ нехромосомного элемента, например, EсoR. Если необходимо указать и штамм, и нехромосомный элемент, обозначение штамма приводится в скобках, например, Eсo(В)R.

3. Если один штамм содержит несколько различных систем рестрикции-модификации, они обозначаются римскими цифрами Hind I, Hind II, Hind III и т. д.

Для сокращенного обозначения рестриктаз предлагается их обозначать буквой R, а модифицирующие метилазы — буквой M, которые предшествуют названию системы рестрикции-модификации, например, эндонуклеаза R·EсoВ и метилаза M·EсoВ. Названия этих ферментов могут быть сокращены до endo R·EсoВ и meth M·EсoВ.

Согласно вышеизложенной номенклатуре, трехбуквенные названия ферментов, выделенных из различных штаммов одного и того же вида, совпадают. Именно во избежание путаницы в названиях рестриктаз было введено буквенное обозначение штамма-источника фермента (EсoК, EсoВ). В дальнейшем такую же функцию стал выполнять музейный номер культуры, например: Bsul076, Bsul114, Bsul247 [342].

Робертс [314] для обозначения рестриктаз, выделяемых из штаммов одного и того же вида, предложил в сокращенном названии сохранить первые две буквы (первые буквы из названия рода и вида), а вторую букву из названия вида заменить на следующую. Согласно этой номенклатуре ферменты, обнаруженные в различных штаммах микроорганизмов вида *Mogaxella nonliquefaciens*, следует называть MnoI, MnpI и т. д.

В настоящее время названия рестриктаз, выделенных из штаммов одного вида, образуются как по правилам Смита и

Натанса [353], так и Робертса [314]. Следует указать, что предложения Робертса применимы и в другом случае, а именно в том, когда при образовании названия новой рестриктазы по правилам Смита и Натанса [353] обнаруживается, что оно совпадает с уже существующим для описанной рестриктазы, но выделенной из другого вида микроорганизма. Например, рестриктаза, обнаруженная у *Haemophilus haemoglobinophilus*, должна была быть названа Hha I, но это название уже имела рестриктаза из *Haemophilus haemolyticus*, поэтому новая рестриктаза была названа Hhg [314].

На основании субъединичной структуры и потребности в кофакторах рестриктазы сначала были разделены на два типа [89]. В результате дальнейших исследований появились дополнительные критерии для классификации ферментов рестрикции. Был идентифицирован третий тип специфических эндонуклеаз [201, 307]. Основные свойства ферментов всех трех типов приведены в табл. 1, позаимствованной из обзора Юана [417]. Эта таблица представлена с незначительными дополнениями, касающимися новых сведений о субстратной специфичности сравниваемых ферментов рестрикции, отнесенных к разным типам [212, 292, 293, 319]. Включение в нее данных о модифицирующих метилазах является неизбежным, так как ферменты I и III типов представляют собой бифункциональные сложные белки, проявляющие как рестриктазную, так и метилазную активность [157, 201, 307, 325, 418]. Кроме того, ферменты I типа обладают ярко выраженной АТФазной активностью [134, 418].

В табл. 1 даны исчерпывающие характеристики сравниваемых типов ферментов. Поэтому подробно они не будут обсуждаться.

В работах, посвященных изучению наиболее многочисленной группы эндонуклеаз, которые по своей субстратной специфичности могли бы быть отнесены к рестриктазам II типа, в основном их характеристика ограничивается определением узнаваемого участка, места расщепления субстрата и определением потребности в ионах магния. По мере накопления информации о типах построения узнаваемых участков выявилась определенная гетерогенность этой группы ферментов. Так рестриктазы, узнающие ассимметрическую последовательность нуклеотидов и расщепляющие ДНК в стороне от нее, обозначены IIS [364]. Закономерно вставал вопрос о том, что еще большая гетерогенность могла бы быть обнаружена при изучении других дифференцирующих признаков, например, структурной организации и реакции на другие кроме ионов магния кофакторы (АТФ, Адо-мет).

В последнее время были проведены эксперименты, давшие положительный ответ на поставленные вопросы и позволившие выявить ферменты нового типа [43, 288, 289]. Эти ферменты —

№№ п/п	Признак	I	Тип II	III
1.	Активности рестриктазы и метилазы	Один многофункциональный фермент	Отдельные ферменты (эндонуклеаза и метилаза)	Один бифункциональный фермент, обладающий рестриктазной и метилазной активностями
2.	Структура белка	3 различные субъединицы	Простая (одна или несколько идентичных субъединиц)	2 различные субъединицы
3.	Кофакторы, необходимые для рестрикции	Адо-мет, АТФ, Mg^{2+}	Mg^{2+}	АТФ, Mg^{2+} , (Адо-мет)*
4.	Кофакторы, необходимые для метилирования	Адо-мет, (АТФ, Mg^{2+})*	Адо-мет	Адо-мет, (АТФ, Mg^{2+})*
5.	Соотношение реакций расщепления и метилирования	Взаимоисключающие	Отдельные активности	Возможно одновременное проявление рестриктазной и метилазной активностей
6.	Узнаваемая последовательность нуклеотидов	Прерывистая нуклеотидная последовательность; не имеет вращательной симметрии второго порядка	Короткие последовательности, состоящие из 4—8 нуклеотидов, в основном с вращательной симметрией второго порядка	Нуклеотидная последовательность либо вообще не имеет вращательной симметрии второго порядка, либо имеет некоторые ее элементы
7.	Место расщепления	Предположительно случайное, по меньшей мере 1000 нуклеотидных пар в сторону от узнаваемой последовательности нуклеотидов	В основном внутри узнаваемой последовательности нуклеотидов	24—26 нуклеотидный пар в стороне от узнаваемой последовательности нуклеотидов
8.	Место метилирования	Узнаваемая последовательность нуклеотидов	Узнаваемая последовательность нуклеотидов	Узнаваемая последовательность нуклеотидов
9.	Энзиматическая обратимость рестриктазной реакции	Нет	Да	Да
10.	Транслокация ДНК перед расщеплением	Да	Нет	Нет

*—не является абсолютно необходимым, стимулирует энзиматическую реакцию.

Есо57 I и Gsu I по своей структурной организации и (или) энзиматическим свойствам не могут быть отнесены ни к одному из известных трех типов ферментов рестрикции модификации. Оба фермента узнают гексануклеотидные последовательности с некоторыми элементами вращательной симметрии второго порядка: Gsu I—5'CTGGAG и Есо57 I—5'CTGAAG. Обсуждаемой симметрией обладает последовательность 5'CT—AG, характерная для участков, узнаваемых обоими ферментами. Gsu I и Есо57 I расщепляют ДНК за пределами узнаваемых гексануклеотидов сходным образом через 14 и 16 нуклеотидов в разных цепях ДНК. По этим признакам рассматриваемые ферменты не являются уникальными среди других рестриктаз. Их отличия от остальных рестриктаз были обнаружены в ходе исследования кофакторных потребностей и структурной организации белков. Оказалось, что наряду с абсолютной потребностью в ионах магния для проявления действия Gsu I и Есо57 I, что является характерным для рестриктаз всех известных типов, эти ферменты активируются S-аденозил-L-метионином (Адо-мет) и никак не реагируют на присутствие в реакционной смеси АТФ. Повышение активности Gsu I за счет добавления Адо-мет было ощутимым и давало двухкратный ее прирост. В отношении Есо57 I этот эффект проявлялся в примерно 100-кратном увеличении активности фермента. Для Gsu I характерен полный гидролиз ДНК по всем узнаваемым участкам вне зависимости от присутствия Адо-мет. В случае Есо57 I исчерпывающего специфического фрагментирования не наблюдалось. Это, возможно, объясняется тем фактом, что даже в электрофоретически гомогенном препарате фермента содержится Есо57 I метилазная активность, чего не наблюдается даже в невысоко очищенных препаратах RGsu I.

Молекулярный вес Есо57 I, определенный методом гель-фильтрации и электрофорезом в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (в присутствии додецилсульфата натрия), равняется 104 000 и 108 000 D соответственно. Совпадение молекулярной массы нативной и денатурированной формы Есо57 I указывало на то, что фермент состоит из одной полипептидной цепи. Отсутствие четвертичной структуры описано только для рестриктаз II типа [31, 54, 174, 210, 229, 290]. Согласно этому критерию к II типу следовало бы отнести Есо57 I. Однако, как уже отмечалось, разделить эндонуклеазную и метилазную активности не удалось, что указывало на объединение этих активностей в одну полипептидную цепь.

Рассмотренные структурные характеристики рестриктазы Есо57 I делают ее отличной от всех известных изученных в этом отношении рестриктаз. По другим признакам, таким как расщепление ДНК за пределами узнаваемого участка, неполное фрагментирование субстрата, стимулирующий эффект Адо-мет,

Есо57 I напоминает ферменты рестрикции III типа, но отличается от них отсутствием потребности в АТФ.

Рестриктаза Gsu I еще больше отличается от ферментов III типа. В первую очередь это выражается в том, что она дает исчерпывающий гидролиз субстрата, чем напоминает рестриктазы II типа, однако от последних ее отличает стимулирующий эффект Адо-мет.

Из вышеизложенных данных также следует, что Есо57 I и Gsu I, несмотря на сходство их субстратной специфичности, тоже отличаются друг от друга.

На основе проведенных исследований было предложено рассматривать Gsu I и Есо57 I как представителей новых классификационных типов ферментов рестрикции и отнести их к IV — Есо57 I и V — Gsu I типам [43, 289]. На данный момент эти типы по глубине характеристики уступают остальным (I—III), что указывает на необходимость проведения дополнительных исследований. Особенно это замечание относится к Gsu I.

Рассмотренные выше публикации представляют собой первые примеры более углубленного подхода к изучению кофакторной потребности рестриктаз, что позволило выявить ферменты нового типа. Расширение аналогичных исследований позволило бы ответить на вопрос о распространении обнаруженных типов рестриктаз или наличии новых. Изучение этих вопросов имеет не только теоретический, но и практический интерес, так как таким путем могут быть найдены, например, способы активации специфических эндонуклеаз, что в конечном счете можно рассматривать как увеличение выхода целевого фермента, предназначенного для применения в качестве аналитического реагента.

В контексте настоящего обзора отдельного обсуждения заслуживает субстратная специфичность и характер расщепления ДНК сравниваемыми типами рестриктаз — показатель, имеющий наибольшее практическое значение, если задаться целью их использовать в качестве аналитических реагентов. Рестриктирующие эндонуклеазы всех типов отличаются исключительно высокой субстратной специфичностью — каждая узнает последовательность нуклеотидов строго определенной длины и состава. Основное различие между ними заключается в характере расщепления субстрата. В случае рестриктаз I типа это происходит в стороне от узнаваемого участка на большом расстоянии (более 1000 пар нуклеотидов) и случайным образом (179, 269), что исключает возможность использования этих ферментов для специфического фрагментирования ДНК.

Рестриктазы III и IV типов разрыв фосфодиэфирной связи ДНК производят на строго фиксированном расстоянии (24—26 и 14—16 нуклеотидных пар) в стороне от узнаваемого участка [69, 158, 292]. В результате образуется набор гомогенных фраг-

ментов субстрата. Однако использование этих ферментов в качестве аналитических реагентов не нашло распространения. Это объясняется тем, что никогда не наблюдается исчерпывающего гидролиза ДНК по всем участкам узнаваемыми рестриктазами III—IV типов. Поэтому получается набор фрагментов (хотя и ярко выраженных), характерный для неполного расщепления субстрата, который трудно поддается интерпретации. Аналогично субстрат фрагментируют немногочисленные эндонуклеазы, обнаруженные в эукариотических клетках — у хламидомоны [100] и дрожжей [343, 388].

Вышеуказанными недостатками не обладают рестриктазы II типа. Нуклеотидные последовательности, узнаваемые этими ферментами, состоят из 4—8 нуклеотидных пар и отличаются вращательной симметрией второго порядка. Эти ферменты расщепляют ДНК полностью по всем узнаваемым участкам. Некоторые специфические эндонуклеазы способны узнавать ассиметричную последовательность нуклеотидов и расщеплять ДНК на расстоянии 5—13 пар оснований в сторону от узнаваемого участка. В других случаях узнаваемая последовательность нуклеотидов является прерванной — симметричные участки разделены любыми нуклеотидными парами. Однако, во всех случаях, вне зависимости от структурных особенностей узнаваемого участка, наблюдается исчерпывающий гидролиз ДНК. Способность рестриктаз II типа высокоспецифично и исчерпывающе расщеплять ДНК на фрагменты, соответствующие по длине расстояниям между узнаваемыми участками, предопределило широкое использование этих ферментов в качестве аналитических реагентов в исследованиях, в той или иной мере связанных с изучением и характеристикой структуры ДНК и в опытах по генетической инженерии. Именно рассмотрению этих ферментов посвящен настоящий обзор.

2. РАСПРОСТРАНЕНИЕ РЕСТРИКТАЗ

Первые рестриктазы были выявлены у представителей прокариотических микроорганизмов [312, 354, 412]. Попытка обнаружить специфические эндонуклеазы в низших эукариотах *Tetrahymena*, *Oxytricha*, *Sacch. cerevisiae*, предпринятая в начале развития работ по поиску продуцентов рестриктаз, дала отрицательный результат [312]. В последующем японскими исследователями было проведено более тщательное исследование в этом отношении 42 штаммов дрожжей *Saccharomyces* и *Pichia*, в результате которого было выявлено несколько культур, содержащих эндонуклеазы, специфически фрагментирующие ДНК [388]. Однако, глубина гидролиза субстрата этими ферментами не является исчерпывающей, чем они напоминают рестриктазы III типа [343]. Аналогичными свойствами облада-

ла эндонуклеаза, обнаруженная в клетках Хламидомонад [100].

Таким образом долгое время бытовало мнение, что ферменты рестрикции — модификации II типа являются характерными только для прокариотических микроорганизмов. Совершенно недавно этот вывод потребовал ревизии. Имеются в виду исследования, проведенные Ван Эттенем и др. [403—405], в результате которых такие ферменты были выявлены в эукариотических клетках — хлорелоподобных зеленых водорослях. Другим неожиданным следствием этих работ явился тот факт, что метилазы и рестриктазы кодируются генами вирусов, инфицирующими вышеуказанные клетки, что является нехарактерным для локализации прокариотических генов рестриктаз (например, в бактериофагах). Известна только одна система, а именно III типа, которая локализована в фаге P I — это RMEcoP I [69, 79]. Больше примеров фаговой локализации генов метилаз, не являющихся составными компонентами систем рестрикции — модификации [214].

В 1985 году появилась публикация китайских авторов о наличии рестриктазной активности II типа со специфичностью EcoR I в клетках эмбриона человека [390]. Ферменту дано название Hsa I (от *Homo sapiens*). Ничего в этой работе не говорится о наличии или отсутствии в этих клетках сопряженной метилазы. Учитывая нетривиальность этого открытия и большое его общебиологическое значение некоторое удивление вызывает отсутствие за прошедший период попыток углубить и расширить исследования в этом направлении (в доступной литературе публикаций, касающихся этого вопроса не было обнаружено). Следует предположить, что определенную роль в этом могло сыграть сообщение данных в малораспространенном журнале [390], а также возможное скептическое отношение некоторых исследователей к самому результату. Действительно публикация со столь нетривиальным результатом могла бы быть сопровождается более углубленными исследованиями (контрольными экспериментами), доказывающими однозначную истинность полученного результата — наличие рестриктазы в человеческих клетках, а не, например, в экзо- или эндоклеточной прокариотической микрофлоре, заразившей исследуемый материал.

Ничто не препятствует проведению таких экспериментов. Поэтому следует ожидать либо подтверждения, либо опровержения данных о наличии специфических эндодезоксирибонуклеаз (а, возможно, и метилаз) II типа в человеческих (и других животных) тканях.

Уже первые опыты по поиску продуцентов специфических эндонуклеаз, последовавшие за открытием первой рестриктазы II типа — Hind II в *H. influenzae* Rd [354], продемонстрировали как их широкое распространение в этом роде микроорганиз-

мов [750, 339], так и их наличие у представителей других таксонов — *Escherichia* [412], *Moraxella* [312] и *Bacillus* [342]. Открытие рестриктаз у бацил, относящихся в отличие от первых, к грамположительным микроорганизмам, указывало на возможное широкое распространение этих ферментов.

Таксономические границы потенциальных продуцентов рестриктаз были еще более расширены после их обнаружения в штаммах *Апабаена* [312], относящихся к другому большому разделу царства прокариотических микроорганизмов — цианобактериям. Эти результаты указывали на возможность наличия специфических эндонуклеаз у представителей самых различных таксономических групп прокариотических микроорганизмов, что и было подтверждено последующими исследованиями. Довольно наглядно динамика роста таксонов и штаммов, в которых были обнаружены рестриктазы, прослеживается в публикуемых, начиная с 1976 г., списках этих ферментов, составляемых Робертсом [31²—319]. Из таблицы 2, обобщающей сведения, имеющиеся в указанных списках, (а также дополнительные данные, не вошедшие в них) видно, что за 12 последних лет число видов и родов, в которых найдены рестриктазы, возросло в 7 и 5,3 раза соответственно, штаммов — в 17,3 раз, а количество открытых за этот период рестриктаз, в том числе и ферментов с новой субстратной специфичностью, в 15,7 и 6,5 раз соответственно. Абсолютные цифры тоже внушительны: всего выявлено 1107 штаммов, содержащих специфические эндодезоксирибонуклеазы, а в отношении узнаваемой последовательности нуклеотидов охарактеризовано 1106 рестриктаз. Среди них обнаружено 143 прототипа — ферменты, различающиеся в отношении узнаваемой последовательности нуклеотидов. Таким образом, темпы роста сведений о все новых продуцентах рестриктаз и самих этих ферментах являются впечатляющими и пока не видно признаков их снижения. Все это позволяет предположить значительное расширение списка специфических эндонуклеаз в будущем, что, в частности, будет способствовать изучению закономерностей распространения рестриктаз, имеющих как теоретическое, так и практическое значение. В этом отношении представляет интерес распространение продуцентов в царстве прокариотических микроорганизмов, частота их встречаемости в различных таксонах и качественная сторона этого явления, а именно, наличие или отсутствие специфичности в отношении набора последовательностей нуклеотидов, узнаваемых рестриктазами, выявленных в отдельных таксонах (вопрос о таксоноспецифичности рестриктаз).

Упомянутые выше таблицы Робертса [312—319] содержат сводные данные об известных рестриктазах, их субстратной специфичности и штаммовой принадлежности. Они систематизированы в виде алфавитного списка названий продуцентов

Динамика роста числа продуцентов и рестриктаз

Год	Число открытых продуцентов рестриктаз			Число рестриктаз			Литература
	Роды	Виды	Шагмы	всего изв-вестно	Охарактеризовано	Прототипов	
1976	22	48	64	84	47	22	[312]
1978	41	87	154	197	123	47	[2, 249, 314]
1980	46	100	173	229	156	54	[2, 35, 249, 315]
1982	68	157	290	376	274	82	[2, 35, 39, 40, 52, 249, 316]
1984	74	201	382	505	406	103	[2, 7, 8, 35, 36, 39, 40, 52, 249, 313, 414]
1985	81	220	432	572	458	111	[5, 7, 8, 35, 36, 39, 52, 56, 177, 178, 203, 226, 249, 317, 334]
1987	—	—	—	—	695	125	[17, 18, 24, 26, 32, 35, 44, 48, 52, 53, 204, 249, 318]
1987*	(97)	(299)	(738)	(891)	(778)	(129)	[17, 18, 24, 26, 32, 35, 44, 48, 52, 53, 204, 249]
1988	—	—	—	—	851	135	[1, 16, 24, 27, 32, 33, 35, 41, 44, 47, 48, 52, 204, 249, 310, 319]
1988*	(117)	(335)	(1107)	(1317)	(1106)	(143)	[1, 16, 24, 27, 35, 41, 44, 47, 48, 52, 189, 249]

*—В скобках приведены цифры, взятые из неопубликованных списков Р. Робертса, представленных автору.

рестриктаз, что является удобным в качестве подручного справочного материала для повседневного использования. Однако, такая форма является малопривлекательной для обсуждения вопроса о количественных и качественных закономерностях распространения рестриктаз, если задаться целью выявить возможные связи между ними и таксономической принадлежностью продуцентов специфических эндонуклеаз. Представляется, что в этом случае подходящей формой систематизации имеющихся сведений является их расположение согласно таксономической принадлежности штаммов — продуцентов. Впервые такая форма была использована Робертсом [312] в статье обзорного характера, вышедшей в 1976 г., в которую также были включены некоторые неопубликованные ранее автором

и другими исследовательскими группами данные о проверке представителей различных таксонов на наличие рестриктаз. Всего в то время Робертс [312] располагал сведениями о проверке 142 штаммов, относящихся к 39 родам прокариотических микроорганизмов. Продуценты рестриктаз были обнаружены у представителей 22-ух родов. Данные об их отсутствии в остальных 17-ти таксонах этого ранга следовало бы оценивать исключительно как предварительные. Отличительной чертой экспериментов, проведенных Робертсом [312], явилось то, что они охватывали широкий круг таксонов, но проверке во многих случаях подвергались только по 1—2 штамма из каждого рода. Это было характерным для всех таксонов, где обсуждаемые продуценты не были обнаружены. На основе данных, приведенных в обсуждаемой статье, делать какие-то выводы о количественных закономерностях распространения рестриктаз — частоте встречаемости их продуцентов в различных таксонах, не представилось возможным, хотя и напрашивалось предположение об ее неравномерности.

Относительно качественной стороны распространения рестриктаз выявления каких-то генетических связей между спектром вариантов последовательностей нуклеотидов, узнаваемых рестриктазами, и их таксономической принадлежностью, Робертсом [312] никакие обобщения не были предприняты. Это вполне объяснимо, так как в то время была охарактеризована субстратная специфичность только 47 рестриктаз. Однако, было обращено внимание на тот факт, что имеются ферменты, узнающие одинаковые последовательности нуклеотидов (изошизомеры), содержащиеся у представителей различных, иногда очень отдаленных таксонов. Обнаружение явления изошизомерии указывало на то, что если имеется таксоноспецифичность рестриктаз, то она не выражена в явной форме.

Из-за скудности данных, имевшихся в 1976 г., никаких закономерностей в отношении количественной и качественной стороны распространения рестриктаз проследить не удалось. За прошедший период, несмотря на значительно возросший объем информации (см. табл. 2), попытка их обобщить с обсуждаемой точки зрения никем не предпринималась. Следует сразу отметить, что такое обобщение и сейчас сталкивается с определенными трудностями.

В первую очередь эти трудности связаны с тем, что для экспериментов по поиску рестриктаз характерна целенаправленность в стремлении выявить новые по специфичности ферменты или высокопродуктивные штаммы изошизомеров, сопровождающаяся определенной стихийностью в отношении выбора объекта работ. Сложившаяся ситуация находит объяснение в превалировании в этих исследованиях прикладного аспекта над теоретическим. Вопросы, связанные с целенаправленным изучением закономерностей распространения рестриктаз, прак-

тически остаются без внимания. Интуитивное предположение (правда никем не высказанное в явной форме) о таксоноспецифичности рестриктаз выразится в тенденции проверять представителей все новых видов и родов микроорганизмов (табл. 2). В ходе таких исследований, наряду с выявлением новых рестриктаз, расширяется список таксонов, представленных среди продуцентов рестриктаз, что несомненно вносит вклад в изученность вопроса о предполагаемом повсеместном их распространении. Однако, число исследуемых в отдельных опытах штаммов является относительно немногочисленным, что затрудняет обобщения, касающиеся количественных и качественных аспектов распространения этих ферментов. Поэтому на данном этапе приходится ограничиться только попыткой выявления некоторых тенденций обсуждаемых закономерностей.

Сводные данные о распространении продуцентов рестриктаз в различных таксонах, известные на конец 1988 г., представлены в табл. 3. Наличие рестриктаз выявлено всего в 1107 штаммах, относящихся к 117 родам и 335 видам. Общее число известных специфических эндонуклеаз (1317) значительно превышает число продуцентов. Это наблюдение находит объяснение в том, что некоторые культуры содержат более чем по одной рестриктазе. Определенный рекорд в этом отношении принадлежит штамму *Nostoc* sp. PCC7524, содержащему 5 различных по специфичности эндонуклеаз [305].

Рассмотрение данных, представленных в таблице 3, убеждает в наличии продуцентов рестриктаз во многих таксонах. С другой стороны, таксоны, представленные в ней, составляют лишь незначительную часть от общего числа известных представителей царства прокариотических микроорганизмов. Совершенно не имеет сведений о наличии этих ферментов у бактерий, относящихся к 5, 11 и 18 частям определителя Берги [28]. Далеко не все роды и виды, относящиеся к частям определителя, представленным в обсуждаемой таблице, исследованы. Имеющиеся сведения о широком распространении продуцентов рестриктаз (табл. 3) и постоянное пополнение этого списка новыми микроорганизмами (табл. 2) позволяет предположить, что специфические эндонуклеазы со временем будут обнаружены в большинстве или всех таксонах прокариотических микроорганизмов.

Число обнаруженных в различных таксонах продуцентов рестриктаз сильно варьирует (табл. 3). Наряду с родами, представленными единичными штаммами (*Chromatium*, *Cystobacter*, *Nurothomas*, *Hafnia* и др.), имеются примеры особо выделяющихся в этом отношении таксонов. В первую очередь это замечание относится к роду *Escherichia*, в котором обнаружено 236 штаммов, содержащих рестриктазы. Род *Bacillus* представлен 185 продуцентами, *Citrobacter* — 43, *Streptomyces* — 42,

**Распространение продуцентов рестриктаз
в царстве прокариотических микроорганизмов а)**

№ части и ее название согласно определителю Берги	Род	Вид	Число проду- центов	Всего обнару- жено рест- ктаз	Охарак- теризо- вано	Источник информа- ции
Отдел I Цианобактерии б)						
	<i>Agmnellum</i>	1	1	1	1	
	<i>Anabaena</i>	7	15	36	35	
	<i>Anacystis</i>	1	1	1	—	
	<i>Calothrix</i>	1	1	1	1	
	<i>Eucapsis</i>	1	1	2	1	
	<i>Fischerella</i>	1	2	3	3	
	<i>Fremyella</i>	1	1	2	2	
	<i>Nostoc</i>	2	15	32	29	
	<i>Pseudoanabaena</i>	1	2	2	2	
	<i>Tolypothrix</i>	1	2	2	2	
Отдел II Бактерии в)						
1. Фототрофные бактерии	<i>Aphanotheca</i>	1	1	3	3	
	<i>Rhodospirillum</i>	1	1	1	—	
	<i>Rhodopseudomonas</i>	1	5	7	7	[24]
	<i>Rhodococcus</i>	2	9	11	9	
	<i>Chromatium</i>	1	1	1	1	
	<i>Chloroflexus</i>	1	2	4	4	[26]
2. Скользящие бактерии	<i>Spirulina</i>	1	1	3	3	
	<i>Myxococcus</i>	4	15	17	1	[249]
	<i>Cystobacter</i>	1	1	1	—	[249]
	<i>Archangium</i>	1	2	2	—	[249]
	<i>Podangium</i>	1	1	1	—	[249]
	<i>Cytophaga</i>	1	2	2	—	[249]
	<i>Flexibacter</i>	1	1	1	—	[249]
	<i>Herpetosiphon</i>	1	12	19	16	[249]
3. Хламидо-бакте- рии	<i>Sphaerotilus</i>	1	4	4	4	
4. Почкующиеся и/или стебелько- вые бактерии	<i>Hyphomonas</i>	1	1	1	1	
	<i>Caulobacter</i>	3	3	3	2	
6. Спиральные и изогнутые бакте- рии	<i>Aquaspirillum</i>	4	5	8	8	
	<i>Azospirillum</i>	2	2	2	1	
7. Грамотрицатель- ные аэробные па- лочки и кокки	<i>Pseudomonas</i>	12	27	30	26	[48]
	<i>Xanthomonas</i>	13	15	19	19	
	<i>Gluconobacter</i>	7	9	10	9	
	<i>Rhizobium</i>	3	3	3	1	
	<i>Agrobacterium</i>	1	7	7	4	
	<i>Halococcus</i>	2	2	2	1	
	<i>Halobacterium</i>	3	3	3	—	
	<i>Alcaligenes</i>	1	5	5	5	
	<i>Achromobacter</i>	2	13	13	12	
	<i>Acetobacter</i>	4	12	13	13	
	<i>Bordetella</i>	2	2	2	2	

№ части и ее название согласно определителю Берги	Род	Вид	Число продуцентов	Всего обнаружено рест-ктаз	Охарактеризовано	Источник информации
8. Грамотрицательные факультативно анаэробные палочки	Thermus	1	4	12	15	[190]
	Escherichia	1	236	243	144	
	Citrobacter	2	43	44	44	[190]
	Salmonella	10	34	34	29	
	Shigella	2	2	3	3	
	Klebsiella	2	11	12	12	
	Erwinia	2	19	20	20	
	Enterobacter	3	20	24	23	
	Hafnia	1	1	1	1	
	Serratia	2	4	4	3	
	Proteus	2	4	5	5	[24, 44]
	Providencia	2	2	2	2	
	Vibrio	4	6	6	6	
	Aeromonas	1	1	1	1	
	Chromobacterium	1	1	1	—	
	Flavobacterium	7	9	10	9	
Haemophilus	9	30	45	42		
Zymomonas	1	1	1	1		
Yersinia	1	6	6	6		
9. Грамотрицательные анаэробные бактерии	Fusobacterium	1	6	9	8	
	Desulfovibrio	1	2	3	3	
10. Грамотрицательные кокки и кокобацилы	Neisseria	14	37	54	46	
	Moraxella	6	13	21	16	
	Acinetobacter	2	8	10	10	
	Branhamella	1	1	1	1	
12. Грамотрицательные хемолюто-трофные бактерии	Sulfolobus	1	2	2	2	
13. Метанообразующие бактерии	Methanococcus	3	3	6	6	
	Methanobrevibacter	1	1	1	1	
	Methanobacterium	3	4	4	4	
14. Грамположительные кокки	Micrococcus	8	13	13	13	
	Staphylococcus	3	7	8	6	
	Streptococcus	4	7	7	7	[16]
	Diplococcus	1	1	2	2	
15. Палочки и кокки, образующие эндоспоры	Bacillus	20	185	204	190	[1, 24, 27, 41]
	Clostridium	8	9	10	9	
16. Грамположительные аспорогенные палочки	Caryophanon	1	5	6	4	
	Caseobacter	1	1	1	1	
	Lactobacillus	1	1	1	1	
17. Актиномицеты и родственные организмы	Corynebacterium	4	8	9	9	
	Arthrobacter	3	5	5	5	
	Brevibacterium	4	4	5	4	
	Microbacterium	2	2	2	2	
	Micromonospora	4	4	4	4	
	Actinomadura	1	1	1	1	
Cellulomonas	1	1	1	1		

№ части и ее название согласно определителю Берги	Род	Вид	Число процентов	Всего обнаружено рестриктаз	Охарактеризовано	Источник информации
19. Микоплазмы	<i>Thermopolyspora</i>	1	1	1	1	[47]
	<i>Bifidobacterium</i>	7	12	19	14	
	<i>Nocardia</i>	15	23	26	24	
	<i>Streptomyces</i>	27	42	51	43	
	<i>Streptoverticillium</i>	2	2	2	2	
	<i>Thermoplasma</i>	1	1	1	1	
	<i>Mycoplasma</i>	1	1	1	1	
	<i>Spiroplasma</i> <i>Ureaplasma</i>	1	1	1	1	
А. Неидентифицированные бактерии		2	2	2	2	г)
Б. Роды бактерий невошедшие в определитель Берги	<i>Alteromonas</i>	1	1	1	1	
	<i>Coccochloris</i>	1	1	2	2	
	<i>Cylindrospermum</i>	1	2	5	4	
	<i>Deinococcus</i>	2	9	13	13	
	<i>Dactylococcopsis</i>	1	1	2	2	
	<i>Actinosynnema</i>	1	1	1	1	
	<i>Anabaenopsis</i>	1	1	2	2	
	<i>Gloeocapsa</i>	1	1	3	3	
	<i>Gloeotheca</i>	1	1	1	1	
	<i>Gleotricia</i>	1	1	3	2	
	<i>Desulfococcus</i>	1	1	1	—	
	<i>Legionella</i>	1	2	2	—	
	<i>Kluyvera</i>	1	1	1	1	
	<i>Oerskovia</i>	2	4	5	4	
	<i>Mastigocladus</i>	1	1	1	1	
	<i>Methylophilus</i>	1	1	1	2	
	<i>Microcoleus</i>	1	1	2	2	
	<i>Synechococcus</i>	1	2	3	3	
	<i>Synechocystic</i>	1	2	5	5	
	<i>Tuberoïdobacter</i>	1	1	1	1	
	<i>Tatlockia</i>	1	1	1	—	
	<i>Thermococcus</i>	1	1	1	1	
В. Хлорелло-подобные зеленые водоросли	<i>Chlorella</i>	1	16	17	15	
Всего:	117	335	1107	1317	1106	

а) Литературным источником сведений, приведенных в таблице, служит список Робертса [319]. Дополнительно указываются ссылки на сведения, не включенные в данный список.

б) — в таблице оставлены названия родов цианобактерий в том виде, в каком они приводятся в первоисточниках. Они не всегда соответствуют названиям, принятым в новых вариантах классификации [311] указанных микроорганизмов.

в) классификация бактерий приводится согласно определителю Берги [28].

г) ниже приводятся данные о процентах рестриктаз: А. — неидентифицированной таксономической принадлежности; Б. — не вошедших в определитель Берги; В. — эукариотических.

Neisseria — 37, *Salmonella* — 34, *Haemophilus* — 30, *Nocardia* — 23 и *Enterobacter* — 20. Однако, эти сведения сами по себе не могут быть приняты как свидетельство о неравномерной встречаемости рестриктаз в различных родах прокариотических микроорганизмов, так как они являются всего лишь перечнем известных их продуцентов. Неравномерная изученность различных таксонов вполне может найти отражение в неодинаковой представленности штаммов, содержащих специфические эндонуклеазы, в сравниваемых группах микроорганизмов.

Для обобщений, касающихся вопроса о частоте встречаемости продуцентов рестриктаз в различных таксонах, необходимы сведения о доле штаммов, давших положительный результат, среди проверенных. Однако, обращение к литературным источникам убеждает в относительной скудности таких сведений. В первую очередь значительная часть данных, представленных в списке рестриктаз Робертса [319], основана на неопубликованных результатах, полученных многими авторами, что исключает возможность обратиться к первоисточникам для поиска необходимой информации. Среди опубликованных работ, лишь в относительно незначительной их части приводятся указания о числе проверенных штаммов и количестве выявленных продуцентов. Эти сведения суммированы в табл. 4, в которой приводятся только результаты экспериментов, где одновременной проверке подвергалось не менее 5-ти штаммов одного таксона. Такая группа для обобщений, касающихся частоты встречаемости продуцентов рестриктаз, конечно, является очень маленькой, но скудность документированных данных о систематическом их поиске вынуждает рассматривать и такие нерепрезентативные с количественной точки зрения выборки. Однако, имеется один показатель распространения рестриктаз, который как раз хорошо иллюстрируется данными, полученными при исследовании именно малочисленных групп микроорганизмов, относящихся к различным таксонам. Имеется в виду их повсеместное распространение. Среди 21-го перечисленного в табл. 4 рода, только в случае *Lactobacillus* ни в одном из проверенных 6-ти штаммов не удалось обнаружить рестриктазную активность. В остальных случаях, большинство которых тоже представлены немногочисленными выборками, было обнаружено хотя бы по одному продуценту специфических эндонуклеаз. Вполне вероятно, что они имеются и в штаммах *Lactobacillus*, но для их выявления необходимо было проверить большее число штаммов. Это предположение недавно было подтверждено экспериментально [319].

Как видно из данных, приведенных в табл. 4, доля продуцентов рестриктаз в группе таксонов в ранге рода, представленных числом проверенных штаммов меньше 10, находится в интервале 14% (*Flexibacter*) -- 71% (*Herpetosiphon*). В менее

Частота встречаемости продуцентов растриктаз

№ части и ее название согласно определителю Берги	Род (вид)*	Проведено штаммов	Обнаружено продуцентов всего %		Литература
2. Скользящие бактерии	Mucococcus	46	14	30	[249]
	В том числе в видах:				
	M. fulvus	29	10	34	[249]
	M. virescens	9	1	11	[249]
	M. xanthus	6	1	16	[249]
	Cytophaga	45	2	4	[249]
	Flexibacter	7	1	14	[249]
	Herpetosiphon	7	5	71	[249]
	В том числе:				
	H. giganteus	7	5	71	[249]
7. Грамотрицательные аэробные палочки и кокки	Pseudomonas	33	4	12	[360]
	Pseudomonas	10	1	10	[312]
	Xanthomonas	5	3	60	[312]
	Gluconobacter	6	2	33	[188]
	Gluconobacter	6	2	33	[360]
	Acetobacter	5	1	20	[360]
	8. Грамотрицательные факультативно-анаэробные палочки	Escherichia	675	158	23
В том числе:					
E. coli		675	158	23	[190]
Escherichia		5	1	20	[360]
В том числе:					
E. coli		5	1	20	[360]
Citrobacter		152	40	26	[190]
В том числе:					
C. freundii		152	40	158	[190]
Proteus		6	1	16	[144]
В том числе:					
P. vulgaris		5	1	20	[144]
Flavobacterium		6	1	16	[360]
Haemophilus	39	13	33	[33]	
В том числе:					
H. influenzae	39	13	33	[33]	
10. Грамотрицательные кокки и кокобациллы	Neisseria	7	4	57	[111]
	В том числе:				
N. gonorrhoea	7	4	57	[111]	
14. Грамположительные кокки	Micrococcus	11	2	18	[401]
	Streptococcus	15	4	26	[342]
15. Палочки и кокки, образующие эндоспоры	Bacillus	7	1	14	[360]
	Bacillus	66	10	15	[406]
	Bacillus	62	20	32	[342]
	В том числе:				
	B. subtilis	34	10	29	[342]
	B. cereus	5	4	80	[342]
	B. megaterium	7	2	28	[342]
B. pumilus	7	1	14	[342]	

№ части и ее название согласно определителю Берги	Род (вид)*	Проверено штаммов	Обнаружено продуцентов всего %		Литература
16. Грамположительные аспорогенные палочковидные бактерии	Lactobacillus	6	—	—	[360]
17. Актиномицеты и родственные микроорганизмы	Brevibacterium	6	1	16	[360]
	Bifidobacterium	15	8	53	[205]
	Streptomyces	55	12	22	[344]
	Streptomyces	18	1	5,5	[360]

* — В тех случаях, когда одновременной проверке подвергалось более 5-ти штаммов одного вида данного рода, полученные данные приводятся отдельно.

многочисленной группе более глубоко изученных родов микроорганизмов (величина выборки >10) этот показатель находится в интервале 4% (Cytospha) — 53% (Bifidobacterium). Этот же показатель, если его рассматривать по отношению к таксонам в ранге вида в малочисленных исследованных группах штаммов, характеризуются следующими замечаниями: 11% (M. virescens) — 80% (B. cereus), а в группах, где одновременной проверке подвергалось более десяти штаммов одного вида — 23% (E. coli) — 34% (M. fulvus). Встает вопрос, в какой мере эти данные отражают истинную частоту встречаемости штаммов, содержащих эти ферменты. Этот вопрос имеет два аспекта. Один относится к репрезентативности проверенных выборок, а второй к выявляемости активности эндонуклеаз использованными с этой целью методами. Ответ на первый вопрос более менее очевиден — в большинстве случаев «систематического» поиска продуцентов рестриктаз (табл. 4) число проверенных штаммов не представляет репрезентативным. Поэтому наблюдаемая доля продуцентов от общего числа проверенных культур вряд ли отражает это соотношение в генеральной для данного таксона выборке. Хорошей иллюстрацией этого предположения служат данные по исследованию стрептомицетов двумя независимыми группами ученых. В одном случае среди 55 проверенных штаммов было обнаружено 12 продуцентов рестриктаз [344], а в другом среди 18-ти — всего лишь 1 [360]. В связи с неодинаковым видовым составом исследованных групп штаммов и разницей в методах, использованных для их проверки, возможные причины наблюдаемого явления в данном конкретном случае остаются неясными. Однако, вышеизложенные сведения убеждают в том, что даже в случае относительно глубоко исследованных на данный момент таксонов необходимо проведение дополнительных экспериментов для более менее достоверного определения частоты встречаемости

продуцентов рестриктаз. Но даже в случае реализации таких экспериментов останется вопрос о том, в какой мере установленная доля продуцентов рестриктаз отражает истинную частоту встречаемости штаммов, несущих эти ферменты.

Методы, используемые для проверки исследуемых культур (см. разд. 2, часть II), не дают полной гарантии выявления специфических эндонуклеаз во всех штаммах, содержащих их. Одной из очевидных причин этому явлению в случае применения биохимического метода может быть маскирование рестриктазной активности неспецифическими нуклеазами. Именно неблагоприятное соотношение этих ферментов по мнению Майера и Райхенбаха [249] послужило причиной того, что среди 45 проверенных штаммов *Sutophaga* только в двух случаях удалось выявить специфическое фрагментирование субстратов, проинкубированных с бесклеточными экстрактами исследуемых культур. Таким образом, применение традиционного метода тестирования наличия рестриктаз в исследуемых культурах дало в обсуждаемом случае исключительно низкую частоту встречаемости продуцентов. Для того, чтобы выяснить, насколько полученные данные отражают истину, необходимо применить другие методические подходы.

Если оставить в стороне вопрос об истинной частоте встречаемости продуцентов рестриктаз и ограничиться обсуждением количественных закономерностей распространения продуцентов рестриктаз, основанных на данных, полученных с применением традиционных методических подходов, то можно прийти к следующим выводам:

1) Продуценты рестриктаз с большой долей вероятности можно надеяться обнаружить во всех таксонах прокариотических микроорганизмов. В пользу этого предположения говорит их повсеместное распространение (табл. 3) и постоянное пополнение списка продуцентов новыми микроорганизмами (табл. 2).

2) Различия в частоте встречаемости продуцентов, согласно имеющимся сведениям (табл. 4), являются не настолько значительными, чтобы могли стать решающим фактором при выборе объекта исследований. В таком случае с практической точки зрения более значительным показателем становится технологичность объекта, выражающаяся как в его биологических свойствах (проблемы культивирования), так и в особенностях состава бесклеточных экстрактов (проблемы очистки ферментов).

Логичным следствием, вытекающим из вышеизложенных обобщений, явился бы выбор в качестве объекта исследования в опытах по поиску продуцентов рестриктаз штаммов «технологичных» видов микроорганизмов. Однако, с практической точки зрения результативность таких экспериментов оценивается не только в отношении количества выявляемых продуцентов, но и качественного состава субстратных специфичностей

обнаруженных ферментов. В случае его монотонности, реализация обсуждаемого подхода была бы неперспективной.

Самым прямым путем решения обсуждаемого вопроса является систематическое изучение штаммов отдельно взятых видов микроорганизмов как в отношении частоты встречаемости продуцентов рестриктаз, так и спектра субстратных специфичностей обнаруженных ферментов. Рассмотрение данных, представленных в табл. 4, убеждает, что систематическое исследование даже первого вопроса является малохарактерным для опытов по поиску продуцентов рестриктаз. Представляется, что именно такие исследования призваны пролить свет на качественные закономерности распространения рестриктаз (в том числе и на вопрос о таксоноспецифичности рестриктаз), имеющие непосредственное отношение к вопросу о прогнозировании результативности экспериментов по поиску рестриктаз в случае реализации обсуждаемого подхода.

3. ТАКСОНОСПЕЦИФИЧНОСТЬ РЕСТРИКТАЗ

В научной литературе только в последнее время появились данные о целенаправленном систематическом исследовании большой группы штаммов нескольких видов микроорганизмов в отношении варибельности их субстратной специфичности [189]. Исследование этого вопроса преследовало цель получить данные для выяснения качественных закономерностей распространения специфических эндонуклеаз. Под качественными закономерностями в данном случае подразумевается вопрос о наличии каких-то связей между спектром вариантов последовательностей нуклеотидов, узнаваемых рестриктазами, и таксономической принадлежностью их продуцентов, т. е. ставился вопрос о таксоноспецифичности рестриктаз.

Имевшиеся к началу рассматриваемых исследований литературные сведения о распространенности рестриктаз [312], как уже отмечалось, мало что давали для обобщений, касающихся качественных ее аспектов. Однако, уже в то время было отмечено наличие ферментов, обладающих идентичной субстратной специфичностью (изошизомеры), у представителей различных, иногда отдаленных таксонов прокариотических микроорганизмов. Обнаружение явления изошизомерии было принято как указание на отсутствие строгой таксоноспецифичности рестриктаз [312]. Под этим термином подразумевается такой вариант таксоноспецифичности, когда рестриктаза определенной субстратной специфичности имеется только в штаммах одного вида.

Отсутствие строгой таксоноспецифичности рестриктаз не исключает других вариантов ее проявления. Например, она могла бы выражаться в ограниченной варибельности субст-

ратной специфичности этих ферментов, содержащихся в штаммах отдельно взятых таксонов. Если вопрос о таксоноспецифичности формулировать в таком виде, то изошизомерия не исключает ее существования, так как она будет проявляться, несмотря даже на полное перекрывание спектра специфичностей рестриктаз, характерного для отдельного вида (рода) с частью всех существующих в царстве прокариотических микроорганизмов. Более того, она может проявляться и на фоне строгой таксоноспецифичности некоторых рестриктаз.

Одним из подходов к выявлению обсуждаемых закономерностей является изучение этого вопроса на примере штаммов одного вида, что и имело место в случае исследования большой группы культур, относящихся к трем видам семейства энтеробактерий *E. coli*, *S. freundii* и *K. pneumoniae* [189]. Результаты опытов, касающиеся *E. coli*, представленные в цитированной работе приведены в табл. 5.

Таблица 5

Распространение рестриктаз и вариабильность их специфичности в *E. coli*

1.	Число проверенных штаммов	864
2.	Число обнаруженных рестриктаз	219
3.	Число рестриктаз, охарактеризованных в отношении субстратной специфичности	123
4.	Число рестриктаз, различающихся по субстратной специфичности	28

При планировании рассматриваемых экспериментов предполагалось, что если таксоноспецифичность рестриктаз существует, то с определенного момента должна «истощиться» вариабельность участков, узнаваемых этими ферментами, обнаруживаемыми в изучаемом виде микроорганизмов. Если же такая закономерность является нехарактерной, то следовал бы вывод об ее отсутствии.

Из данных, представленных в обсуждаемой публикации [189], следует, что с определенного момента наблюдается отклонение от практически линейной зависимости между числом охарактеризованных *Eco* (*E. coli*) рестриктаз и появлением среди них новых по специфичности ферментов. Затем последние появляются все реже и начиная с 70-той охарактеризованной рестриктазы среди оставшихся 50-ти не удалось выявить ни одного нового по специфичности *Eco* фермента. Эти данные, конечно, не следовало бы интерпретировать таким образом, что новые *Eco* прототипы не будут обнаружены, но вероятность их выявления, а тем более в значительном количестве, является низкой.

Проведенные на примере штаммов *E. coli* эксперименты дали подтверждение предположению о наличии таксоноспецифичности рестриктаз в том виде, как этот вопрос был сформу-

лирован — ограничение варибельности специфичностей рестриктаз в штаммах одного вида. Следовательно можно говорить о том, что в каждом таксоне реализуется только часть возможных для царства прокариотических микроорганизмов специфичностей рестриктаз. Предлагается это явление назвать таксоноспецифичностью ферментов рестрикции [189].

Рестриктазам в клетках сопутствуют ДНК модифицирующие метилазы. Оба фермента узнают идентичные нуклеотидные последовательности. Таким образом таксоноспецифичность характерна не только для рестриктаз, но и для метилаз, являющихся составным компонентом любой системы рестрикции-модификации.

Углубленное рассмотрение литературных данных позволило выявить конкретную форму проявления таксоноспецифичности рестриктаз [189] — на этот раз не только в *E. coli*, но и в семействе *Enterobacteriaceae*, к которому этот вид относится в целом (табл. 6). Имеется в виду тот факт, что среди 144 изу-

Таблица 6

Распределение рестриктаз, узнающих последовательности нуклеотидов различной длины, в некоторых родах микроорганизмов

Род	Число рестриктаз, узнающих последовательность нуклеотидов определенной длины							источник информации
	тетрануклеотидные УПН*	пентануклеотидные УПН	гексануклеотидные УПН	более длинные УПН	общее число УПН	доля тетрануклеотидов от общей суммы УПН		
Acetobacter	—	1	11	1	13	—	[319]	
Achromobacter	2	2	7	1	12	16,6%	[319]	
Аnabaena	2	5	27	1	35	5,7	[319]	
Bacillus	68	22	90	10	190	36%	[1, 24, 41, 52, 319]	
Bifidobacterium	—	3	11	—	14	—	[47, 319]	
Chlorella	9	6	—	—	15	60%	[319]	
Escherichia	—	29	106	9	144	—	[189, 319]	
Enterobacteriaceae**	1	81	190	13	285	0,35%	[24, 44, 48, 319]	
Haemophilus	16	7	19	—	42	38,1%	[319]	
Herpetosiphon	—	6	9	1	16	—	[319]	
Micrococcus	3	2	8	—	13	23%	[319]	
Moraxella	11	3	2	—	16	63,8%	[319]	
Neisseria	20	9	17	—	46	43%	[319]	
Nocardia	1	—	21	2	24	4,2%	[319]	
Nostoc	—	8	20	1	29	—	[319]	
Pseudomonas	4	2	17	3	26	15,4%	[48, 319]	
Streptomyces	2	2	37	2	43	4,7%	[319]	
Thermus	6	3	2	4	15	40%	[319]	
Xanthomonas	—	—	17	2	19	—	[319]	

* — УПН-узнаваемая последовательность нуклеотидов.

** — В группу «Enterobacteriaceae» включены рестриктазы, обнаруженные в штаммах родов *Escherichia (coli)*, *Erwinia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*.

ченных Eсо рестриктаз не обнаружено ни одного фермента, узнающего тетра nukлеотидный участок. В то же время можно отметить, что среди всех известных специфических эндонуклеаз доля последних составляет 18% (см. гл. 4). Отсутствие Eсо рестриктазы, субстратом которой явилась бы тетра nukлеотидная последовательность, вряд ли является случайным и может быть принято как аргумент в пользу существования их таксоноспецифичности, выраженной для данного вида в такой форме. Более того, среди 285 охарактеризованных специфических эндонуклеаз, обнаруженных у представителей семейства Enterobacteriaceae (*Escherichia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*) [369], имеется только одна, а именно, рестриктаза Pаl 1, узнающая тетра nukлеотидный палиндром [319] (см. табл. 6). Это семейство является одним из наиболее изученных с помощью методов геносистематики. Сведения о гомологичности ДНК вышеуказанных таксонов свидетельствуют об их генетической родственности [6, 92, 331]. Примечательно, что согласно этому критерию род *Providencia*, в котором обнаружена RPal I (продуцент *Providencia alcalifaciens*), является наиболее далеким от остальных энтеробактерий [6, 92]. Как показывают данные по молекулярной гибридизации, уровень гомологии ДНК штаммов этого таксона с таковой представителей остальных вышеперечисленных родов Enterobacteriaceae редко достигает (и еще реже превышает) 10% [92]. Для сравнения можно указать, что значения этого показателя для остальных родов значительно выше и доходят до 24%—60% [331]. Можно предположить, что геномная отдаленность *Providencia* нашла выражение в появлении фермента с нетипичной для энтеробактерий специфичностью. Вышесказанное говорит в пользу предположения о наличии ограниченной вариабильности спектра субстратных специфичностей рестриктаз не только у *E. coli*, но и у близкородственных к ней таксонов Enterobacteriaceae.

Встает вопрос о причинах таксоноспецифичности рестриктаз в той форме, как она проявляется в *E. coli* — отсутствием ферментов, узнающих тетра nukлеотид. Согласно мнению авторов рассматриваемой публикации [189], определенную роль в установлении этого явления в ходе эволюции могла сыграть совместимость структурно-функциональных особенностей генома микроорганизмов с определенным типом его метилирования. Иначе говоря постулируется, что давлению отрицательно отбора подвергается специфичность метилаз, а не рестриктаз. Типы метилирования несовместимые со структурной стабильностью и функционированием генома данного таксона в ходе эволюционного процесса элиминируются. Эти предположения основываются на известных фактах неиндеферентности метилирования ДНК в отношении ее структурной стабильности

и функционирования: 1) оно влияет на экспрессию генов не только у эукариот, но и у прокариот [394]; 2) наличие 5-метилцитозина в ДНК увеличивает скорость специфического варианта спонтанного мутагенеза [113]; 3) во многих случаях документирована индукция системы SOS репарации у *E. coli* в случае клонирования в клетки генов метилтрансфераз со специфичностью, нехарактерной для этого вида микроорганизмов [171]; 4) в *E. coli* имеются гены (*msc A*, *msc B* и *mmg*), ограничивающие метилированную ДНК [171, 303]. Каким образом вышеперечисленные факторы могут обуславливать отбор в сторону исключения наличия метилтрансфераз, узнающих тетра-нуклеотидные последовательности, в *E. coli*? При прочих равных условиях ферменты такой специфичности в ДНК образуют большее количество минорных оснований, чем метилазы, узнающие более протяженные нуклеотидные последовательности. Не исключено, что интенсивность отрицательного отбора, обусловленного всеми или некоторыми из вышеупомянутых факторов, в отношении метилаз коррелирует с относительным числом минорных оснований, появляющихся в ДНК в результате действия этих ферментов на субстрат. Против этого предположения мог бы говорить тот факт, что у представителей семейства *Enterobacteriaceae* наблюдается повсеместное наличие *dam* метилазы [142], узнающей тетра-нуклеотид GATC [165]. Показано, что этот фермент играет в *E. coli* исключительно важную роль в определении точности репарации ошибок репликации [223]. Поэтому можно допустить что ДНК этого микроорганизма эволюционировала таким образом, чтобы исключить отрицательное влияние метилирования GATC сайтов. Действительно анализ известных последовательностей ДНК *E. coli* показал статистически достоверную элиминацию части этих сайтов [29], что может быть принято как указание на один из возможных вариантов обсуждаемой адаптации к наличию *dam* метилазы в клетках.

Однако частота метилирования не может быть принята в качестве единственного селекционируемого признака. Часть ферментов, обнаруженных в штаммах *Enterobacteriaceae* узнают пятичленные последовательности, в которых в среднем положении может находиться любой из четырех нуклеотидов (например, 5'CCNGG). С статистической точки зрения, частота появления таких последовательностей в ДНК должна быть идентичной таковой для тетра-нуклеотидов. Поэтому приходится допускать, что отбором каким-то образом дифференцируются метилированные тетра-нуклеотиды и пента-нуклеотиды обсуждаемой структуры или что такие сайты тоже подвергаются частичной элиминации.

Среди таксонов, представленных относительно многочисленными группами продуцентов, выделяется род *Bacillus*, в котором, как и в случае *E. coli* охарактеризовано большое число —

190 рестриктаз (табл. 6). Среди них 68 (36%) являются ферментами, узнающими тетра nukлеотидные последовательности. У *Mogaxella* таких ферментов имеется 11 из 16, (68,8%), у *Haemophilus* — 16 из 42 (38,1%). Вместе с тем, встречаются роды, у которых, как и у энтеробактерий, таких рестриктаз не обнаружено. Имеется в виду *Acetobacter* — охарактеризовано 13 рестриктаз, *Bifidobacterium* — 14, *Herpetosiphon* — 16, *Nostoc* — 29 и *Xanthomonas* — 19.

Рассмотренные данные говорят в пользу возможного существования таксоноспецифичности рестриктаз, выражающейся если и не в абсолютной ограниченности распространения в определенных таксонах ферментов, узнающих тетра nukлеотидные последовательности, то хотя бы относительной. Следовательно, если в штаммах *E. coli* и содержатся такие рестриктазы, то они встречаются исключительно редко. Строго говоря, этот вывод справедлив по отношению к специфическим эндонуклеазам, содержание которых в клетках является достаточным для их выявления и последующего изучения. Но пока только они и имеют практическое значение. Что же касается теоретической стороны вопроса распространения рестриктаз, то вполне вероятно, что часть имеющихся продуцентов этим свойством не обладает и поэтому выпадает из дальнейших исследований. Формально не исключено, что среди таких «теневых» рестриктаз имеются и тетра nukлеотидузнающие.

Если вернуться к вопросу о строгой таксоноспецифичности некоторых рестриктаз, представляющей другой аспект обсуждаемой проблемы, то следует отметить, что он еще более трудно доказуем, чем вопрос об ограниченной вариабильности субстратной специфичности. В 1976 г. были охарактеризованы 22 рестриктазы с различной субстратной специфичностью [312]. Среди них 14 прототипов встречались только в одном штамме. К концу 1988 г. из прототипов, обнаруженных в 1976 г., только один (*Haе I*) не имел изошизомера [319]. Таким образом, существующая тенденция появления рано или поздно изошизомеров прототипов говорит в пользу предположения об отсутствии (или по меньшей мере ограниченности) строгой таксоноспецифичности рестриктаз и скорее всего можно говорить о разной распространенности изошизомеров определенных типов специфичности.

В литературе имеется публикация МакКлелланда [252], посвященная изучению взаимосвязи между G+C составом ДНК продуцентов рестриктаз и участков узнаваемых этими ферментами (присущим данным клеткам). В результате компьютерного анализа были установлены интересные закономерности: 1) почти все рестриктационные системы, характеризующиеся G+C богатыми тетра nukлеотидными узнаваемыми участками обнаруживаются в A+T богатых видах микроорганизмов; 2) G+C богатые гексануклеотидные узнаваемые последовательности прак-

тически исключительно сосредоточены в G+C богатых геномах; 3) большинство A+T богатых гексануклеотидных узнаваемых участков сконцентрировано в A+T богатых микроорганизмах. Такое распределение в значительной мере выравнивает частоту встречаемости сайтов рестриктаз в геноме клеток хозяинов. Оставляя в стороне причины этого явления, можно рассматривать открытую закономерность как одно из проявлений таксоноспецифичности рестриктаз.

Традиционным подходом в опытах по поиску продуцентов рестриктаз является изучение с этой целью немногочисленных групп штаммов (даже отдельных штаммов) различной таксономической принадлежности. Исключением является рассмотренная в данном разделе работа [189], заключающаяся в систематическом изучении групп штаммов одного вида, которое было выполнено на примере *E. coli*, *S. freundii* и *K. pneumoniae*. Такое одновременное исследование больших групп (864, 152 и 86 соответственно) штаммов одного вида в практике поиска продуцентов рестриктаз было выполнено впервые. Довольно неожиданным следует считать обнаружение в отдельных видах столь большой вариабильности субстратной специфичности рестриктаз, равняющейся 11 разным вариантам из 40 охарактеризованных у *S. freundii* и 28 из 123 у *E. coli*. Обнаруженными типами субстратной специфичности ограничивается известная изменчивость этого признака в виде *S. freundii*. В *E. coli*, кроме ферментов, представленных в рассматриваемой публикации [189], были выявлены еще 6 ферментов с отличающейся специфичностью — EcoICR I (изошизомер Sac I) [360], Eci I [319], EcoN I [319], EcoO 109 (изошизомер Dra II) [261], EciE I (изошизомер Ara I) [319], EcoT22 I (изошизомер Ava III) [262]. Хотя данных о вариабильности обсуждаемого признака в других видах микроорганизмов мало (табл. 7), они не противоречат предположению, что она является характерной не только для *E. coli* и *S. freundii*.

Проведенные исследования фундаментального характера, касающиеся закономерностей распространения рестриктаз в царстве прокариотических микроорганизмов [189], и их выводы имеют непосредственное отношение к решению прикладных задач.

На основе полученных данных напрашивается вывод о том, что стратегически правильным было бы при планировании опытов по поиску рестриктаз вовлекать в круг проверяемых штаммов представителей разных таксонов, но изучать их на примере значительно более многочисленных групп, чем это принято сейчас в мировой практике. В пользу выдвигаемой рекомендации говорят нижеизложенные аргументы.

Данные, полученные при изучении *E. coli*, демонстрируют определенную ограниченность вариантов субстратной специфичности — в этом виде выявлена только незначительная часть спе-

цифичностей рестриктаз (всего 34) из общего числа известных (всего 143) и вообще не обнаружено ферментов, узнающих тетра-нуклеотидные последовательности. Если в дальнейшем изучать только этот вид, то не исключено, что такая «монотонность» сохранится. Возможно, какая-то ограниченность характерна и для других вариантов специфичности (внутри пента-гекса-гептануклеотидных последовательностей). Ее наличие еще более (не считая отсутствия или редкой встречаемости узнающих тетра-нуклеотиды рестриктаз) сузило бы вариабильность субстратной специфичности обнаруживаемых рестриктаз, что в опытах по их поиску является нежелательным. С другой стороны, данные, полученные на примере многочисленных штаммов *E. coli*, а также сведения представленные в табл. 7, свидетельствуют об относительно большой вариабильности специфичности рестриктаз в отдельных таксонах, которая оправдывает проведение таких исследований. Поэтому рекомендуется вовлекать в поиск штаммы разных видов (уменьшение вероятности «монотонности»), но для более полного использования их потенциальных возможностей изучать многочисленные группы культур. Очевидно, необходимы дополнительные систематические исследования представителей разных видов для проверки правильности этого предположения в отношении достижения конечной цели — выявления продуцентов новых по специфичности рестриктаз или конкурентноспособных изошизомеров, обладающих преимуществами перед известными аналогами в связи с

Таблица 7

Вариабильность субстратной специфичности рестриктаз в некоторых видах микроорганизмов

№ п/п	Вид	Число охарактеризованных рестриктаз	Число рестриктаз с различной субстратной специфичностью	Доля рестриктаз с различной субстратной специфичностью %	Источник информации
1.	<i>Bacillus sphaericus</i>	24	6	25	[319]
2.	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	48	26	54	[319]
3.	<i>Bacillus subtilis</i>	17	9	53	[41, 52, 319]
4.	<i>Citrobacter freundii</i>	43	12	28	[319]
5.	<i>Enterobacter cloacae</i>	16	6	37,5	[319]
6.	<i>Escherichia coli</i>	144	34	23,6	[189, 319]
7.	<i>Haemophilus influenzae</i>	30	12	40	[319]
8.	<i>Herpetosiphon giganteus</i>	16	8	50	[319]
9.	<i>Salmonella infantis</i>	10	1	10	[319]
10.	<i>Salmonella thompson</i>	14	1	7	[319]

Примечание: в таблицу включены только те виды микроорганизмов, в которых выявлено и охарактеризовано не менее десяти рестриктаз.

большей продуктивностью штаммов или по технологическим причинам. Следуя по этому пути можно надеяться, что будут изучены закономерности распространения рестриктаз, сведения о которых необходимы для развития как теоретических, так и прикладных аспектов исследования ферментов рестрикции.

Использование в качестве продуцентов в препаративной биохимии рестриктаз ограниченного круга видов микроорганизмов позволило бы во многом унифицировать этапы их получения. Выгоды от реализации такого подхода очевидны. Однако, его результативность во многом зависит от удачного выбора объекта исследования в опытах по поиску продуцентов. Он должен решаться на основе технологических соображений и учитывать целый комплекс показателей: особенности культивирования продуцента, его патогенность, фоновое содержание нежелательных примесей в бесклеточных экстрактах и т. д.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ РЕСТРИКТАЗ

Основными проявлениями специфичности, характерными для всех рестриктаз, являются: 1) узнаваемая последовательность нуклеотидов, 2) место расщепления и 3) зависимость действия рестриктаз от характера метилирования оснований в пределах узнаваемой последовательности. Некоторые другие функциональные проявления этих ферментов, а именно, способность надрезать одну нить гемиметилированной ДНК, расщеплять одонитевую ДНК и способность менять субстратную специфичность в сторону более низкой в зависимости от условий проведения реакции являются менее изученными и возможно присущи не всем рестриктазам.

4.1. Узнаваемая последовательность нуклеотидов

В настоящее время охарактеризована субстратная специфичность более чем тысячи рестриктаз (табл. 8). Среди них имеются 143 фермента, узнающих различающиеся нуклеотидные последовательности (прототипы). Остальные специфические эндонуклеазы, узнающие участки ДНК, идентичные таковому одного из прототипов, входят в группу так называемых изошизомеров [312].

Последовательности нуклеотидов, служащие субстратом для рестриктаз, отличаются большим разнообразием в отношении первичной структуры. В то же время для них характерны некоторые общие черты. Согласно классификации, предложенной в 1982 г. Модричом и Робертсом [264], эти последовательности были разделены на 21 отличающийся по построению тип. За время, прошедшее после указанной публикации, было выявлено и охарактеризовано много новых прототипов. Это нашло отра-

Последовательности нуклеотидов, узнаваемые рестриктазами II типа

№ п/п	Тип построения	Прототипы				
		число теоретически возможных вариантов	число обнаруженных вариантов	последовательность узнаваемая прототипами	название прототипов	число известных изомеров

I. Последовательности с элементами симметрии

Ia. Палиндромные последовательности

1.	XY ^Y X'	16	13	—	прототипы перечислены в таблице 9	200
2.	XYZZ ^Z X'	64	51	—	»	455
3.	XYZQQ ^Q Z ^Y X'	256	1	GCGGCCGC	Not I	1

Iб. Разорванные последовательности

4.	XY(A/T)Y ^X X'	16	3	GG(A/T)CC GC(A/T)GC CC(A/T)GG	Ava II Bbv I EcoR II	45 2 59
5.	XY(C/G)Y ^X X'	16	3	CC(C/G)GG GA(C/G)TC GT(C/G)AC	Cau II Ple I Tsp45 I	19 2 1
6.	XYZ(A/T)Z ^Y X'	64	1	CGG(A/T) CCG	Rsr II	2
7.	XYGGY ^X X'	16	1	CTGGAG	Gsu I	4
8.	XYGAY ^X X'	16	1	CTGAAG	Fsf I	4
9.	XYNY ^X X'	16	6	G3NCC CTNAG GCNGC GANTC GTNAC CCNGG	Asu I Dde I Fnu4H I Hinf I Mae III ScrF I	32 1 4 12 1 12
10.	XY(N) ₂ Y ^X X'	16	2	GG(N) ₂ CC CC(N) ₂ GG	Nla IV Sec I	5 1
11.	XYZNZ ^Y X'	64	3	GGTNA ^{CC} GCTNAGC CCTNAG ^G	BstE II Esp I Sau I	14 2 13
12.	XYZ(N) ₃ Z ^Y X'	64	3	CAG(N) ₃ ^{CTG} CAC(N) ₃ ^{GTG} GAC(N) ₃ ^{GTC}	AlwN I Dra III Tth111	1 1 17
13.	XYZ(N) ₄ Z ^Y X'	64	1	GAA(N) ₄ ^{TTC}	Xmn I	2
14.	XYZ(N) ₅ Z ^Y X'	64	3	GCC(N) ₅ ^{GGC} CCT(N) ₅ ^{AGG}	Bgl I EcoN I	2 2

№ п/п	Тип построения	Прототипы				
		число теоретически возможных вариантов	число обнаруженных вариантов	последовательность узнаваемая прототипами	название прототипов	число известных изомеров
15.	XYZ(N) ₆ Z'Y'X'	64	3	CCA(N) ₅ -TGG CCA(N) ₆ [†] TGG GAC(N) ₆ GTC ACC(N) ₆ GGT	PfIM I BstX I Drd I HgiE II	1 3 1 1
16.	XYZ(N) ₉ Z'Y'X.	64	1	CCA(N) ₉ TGG	Xcm I	1
17.	XYZQ(N) ₅ Q'Z'Y'X'	256	1	GGCC(N) ₅ GGCC	Sfi I	1

Ив. Вырожденные последовательности

18.	PuXX'Py	4	1	PuGCPy	CviJ I	6
19.	XPuPuY'X'	16	3	ACPuPyGT CCPuPyGG CTPuPyAG	Afl III Dsa I Sfe I	1 1 1
20.	XYPyPuY'X'	16	2	GGPyPuCC GTPyPuAC	HgiC I Hind II	20 7
21.	XPuYY'PyX'	16	2	GPuCGPyC GPuGCPyC	Acy I HgiJ II	12 22
22.	XPyYY'PuX'	16	1	CPyCGPuG	Ava I	15
23.	PuXXY'X'Py	16	4	PuCCGPy PuGCGCPy PuCATGPy PuGATCPy	Cfr10 I Hae II Nsp I Xho II	2 4 2 5
24.	PyXYY'X'Pu	16	2	PyACGTPu PyGGCCPu	BsaA I Cfr I	1 10
25.	PyXYY'X'G	16	1	PyGGCCG	Gdi I	1
26.	XY(A/C)(G/T)Y'X'	16	1	GT(A/C)-(G/T)AC	Acc I	1
27.	XY(A/T)(A/T)Y'X'	16	1	CC(A/T)-(A/T)GG	Sty I	8
28.	X(A/C)YY'(G/T)X'	16	1	C(A/C)GC-(G/T)G	NspB II	1
29.	X(A/T)YY'(A/T)X'	16	1	G(A/T)GC-(A/T)C	HgiA I	3
30.	(A/T)XYY'X'(A/T)	16	1	(A/T)GGCC-(A/T)	Hae I	1
31.	X(G/A/T)YY'-(C/A/T)X'	16	1	G(G/A/T)-GC(C/A/T)C	Sdu I	4

Иг. Разорванные—вырожденные последовательности

32.	PuXY(A/T)Y'X'Py	16	1	PuGG(A/T)-CCPy	PpuM I	2
33.	PuXNY'X'Py	16	1	PuGGNCC-Py	Dra II	4

№ п/п	Тип построения	Прототипы				
		число теоретически возможных вариантов	число обнаруженных вариантов	последовательность узкая нависшая прототипами	название прототипов	число известных изомеров

II. Несимметрические последовательности

34.	XXXX	120	1	CCTC	Mlp I	1
35.	XXXXX	480	10	ACGGC	VceF I	1
				GGATC	Bin I	3
				GTCTC	BsmA I	2
				ACTGC	Bsr I	1
				GTCCC	Fin I	1
				GGATG	Fok I	2
				GACGC	Hga I	1
				GGTGA	Hph I	2
				GAAGA	Mbo II	3
				GCATC	SfaN I	1
36.	XXXXPuXX	480	2	TCCPuAC	Mme I	1
				CAAPuCA	Tth11 II	1
37.	XXXXXX	2016	9	GAAGAC	Bbv II	1
				GAATGC	Bsm I	1
				ACCTGC	BspM I	1
				GAACCA	Drd II	1
				TCCGCC	Eci I	1
				GGICTC	Eco3I I	29
				GAGACG	Esp3 I	1
				CTCTTC	Ksp632 I	2
				GACCGA}	Taq II	1
				CACCCA}		
Всего:			143			1106

Примечания: Для краткости в таблице приводится только одна цепь двухнитевой ДНК. Слева 5'-конец, справа — 3'. X и Y-нуклеотиды определенной природы. X и X'; Y и Y' и т. д. — комплементарные нуклеотиды; N — любой нуклеотид; Pu, Pi — пиримидиновые и пуриновые нуклеотиды. Указание нуклеотидов в скобках означает, что любой из них может занять указанное положение в последовательности.

Литературным источником сведений, приведенных в таблице, служит список Робертса [319], дополненный не вошедшими в него данными [1, 16, 24, 33, 41, 44, 47, 48, 52, 189].

жение и в том, что значительно расширился список типов участков, узнаваемых рестриктазами, который сейчас равняется 37 (см. табл. 8).

Больше половины (655) известных рестриктаз узнают короткие тетра- и гексануклеотидные последовательности, которым характерна вращательная симметрия второго порядка, т. е.

они являются палиндромами (обращенными повторами). Однако среди всех идентифицированных вариантов построения узнаваемых участков истинные палиндромы представлены только первыми тремя типами (табл. 8). Теоретически может существовать 16 различающихся по своему составу тетра- и гексануклеотидных, 64 гексануклеотидных и 256 октануклеотидных палиндромов. Возможные варианты построения симметричных тетра- и гексануклеотидных палиндромов, в том числе все, уже выявленные в качестве участков узнаваемых рестриктазами, приведены в табл. 9. Как видно из представленных данных обнаружено 200 рестриктаз (т. е. 18% от всех охарактеризованных), узнающих 13 различных тетра- и гексануклеотидных последовательностей. Число известных ферментов, узнающих гексануклеотидные палиндромы, равняется 455, т. е. составляет больше 40% от всех охарактеризованных в этом отношении рестриктаз. Субстратом этих ферментов является 51 из 64-х теоретически возможных симметричных гексануклеотидов. Среди обнаруженных палиндромов преобладают последовательности, богатые СG нуклеотидными парами. Долгое время вопрос о возможности обнаружения рестриктаз, узнаваемые участки которых состоят только из А и Т оснований, оставался открытым. Однако, в последнее время в качестве участков, узнаваемых рестриктазами уже реализованы 5 таких последовательностей: 2 тетра- и гексануклеотида — 5'-ТТАА и 5'-ААТТ, являющиеся субстратом для рестриктаз Mse I [267] и TspE I [319], и 3 гексануклеотида — 5'-ТТТААА, 5'-ААТАТТ, 5'-АТТААТ, являющиеся субстратом для рестриктаз — прототипов Aha III [391], Ssp I [319] и Vsp I [17] соответственно.

Третий тип симметричных последовательностей представляет собой октануклеотидный палиндром. Известна только одна рестриктаза (Not I), обладающая свойством узнавать такой субстрат [319].

Узнаваемые последовательности некоторых рестриктаз включают в себя нечетное число нуклеотидов (5 или 7 нуклеотидных пар). За исключением центрального нуклеотида, взаимное расположение остальных оснований в таких участках удовлетворяют требованиям вращательной симметрии второго порядка. Эти последовательности в табл. 8 представлены 4—6 типами. Их можно рассматривать как «разорванные» тетра- или гексануклеотидные палиндромы, симметричные части которых разделены одной нуклеотидной парой. Появление в центральной части палиндромных последовательностей одной нуклеотидной пары не меняет число теоретически возможных вариантов пента- и гептануклеотидных последовательностей, по сравнению с тетра- и гексануклеотидными. Как видно из данных, представленных в табл. 8, до настоящего времени в качестве участков узнаваемых рестриктазами идентифицированы всего 6 таких пентануклеотидных и 1 гептануклеотидная

Палиндромные тетра- и гексануклеотидные последовательности
и рестриктазы, узнающие их

№№ п/п	XYU'X'	NXYY'X'N		AXYY'X'T		CXYY'X'G		GXYY'X'C		TXYY'X'A	
		прототип	число изошизо- меров	прототип	число изошизо- меров	прототип	число изоши- зомеров	прототип	число изоши- зомеров	прототип	число изоши- зомеров
1.	AATT	TspEI	1	—	—	Mfe I	1	EcoR I	8	—	—
2.	ACGT	Mae II	1	—	—	PmaC I	4	Aat II	1	SnaB I	4
3.	AGCT	Alu I	5	Hind III	20	Pvu II	7	Sac I	7	—	—
4.	ATAT	—	—	Ssp I	1	Nde I	1	EcoR V	10	—	—
5.	CATG	Nla III	3	—	—	Nco I	2	Sph I	4	BspH I	2
6.	CCGG	Hpa II	17	—	—	Sma I	6	Nae I	25	BspM II	7
7.	CGCG	FnuD II	23	Mlu I	3	Sac II	50	BseP I	8	Nru I	5
8.	CTAG	Mae I	2	Spe I	1	Avr II	1	Nhe I	1	Xba I	1
9.	GATC	Mbo I	76	Bgl II	2	Pvu I	15	BamH I	30	Bcl I	11
10.	GCGC	Hha I	12	Eco47 III	2	—	—	Nar I	10	Mst I	12
11.	GGCC	Hae III	52	Stu I	7	Xma III	4	Apa I	3	Bal I	2
12.	GTAC	Rsa I	3	Sca I	3	Spl I	2	Kpn I	21	—	—
13.	TAГА	—	—	—	—	—	—	Sna I	2	—	—
14.	TCGA	Taq I	4	Cla I	13	Xho I	37	Sal I	10	Asu II	15
15.	TGCA	—	—	Ava III	3	Pst I	57	ApaL I	5	—	—
16.	TТАА	Mse I	1	Vsp I	3	Afl II	2	Hpa I	2	Aha III	2
Всего:		13	200	11	58	14	189	16	147	10	61

Примечание: Для краткости в таблице приводится только одна цепь двуцепиевой ДНК. Слева 5'-конец, справа — 3'. Литературным источником сведений, приведенных в таблице, служит список Робертса [319], дополненный не вошедшими в него данными [1, 24, 33, 41, 44, 47, 48, 52, 319]

последовательности (из 32 и 128 теоретически возможных соответственно).

Довольно необычный тип разорванных палиндромных последовательностей (табл. 8, типы 7—8) характерен для участков узнаваемых Gsu I: 5'-CTGGAG [188] и Fsf I: 5'-CTGAAG [319]. Эти гексануклеотиды можно рассматривать как палиндромный тетрануклеотид 5'-СТАГ, разделенный двумя расположенными в центральной части основаниями фиксированной природы GG/CC или ГА/ТС.

Другой вариант разорванных пента- и гептануклеотидных палиндромов представляют последовательности, характеризующиеся менее строгим порядком построения (табл. 8, типы 9 и 11). В центре этих последовательностей допускается присутствие любой нуклеотидной пары, как А/Т, так и С/Г. Поэтому субстратом для каждой рестриктазы этой группы является не одна, а две последовательности, различающиеся средней парой нуклеотидов. Как видно из данных, представленных в табл. 8, всего известно 62 рестриктазы, узнающие 6 из 16 возможных пентануклеотидов и 29 ферментов, субстратом для которых является 3 различных гептануклеотида обсуждаемого типа.

Разнообразие разорванных палиндромных последовательностей узнаваемых рестриктазами, не ограничивается вышеуказанными вариантами. Недавно обнаружены эндонуклеазы Nla IV [300] и Sca I [107], узнаваемые последовательности которых можно характеризовать как тетрануклеотидные палиндромы, разделенные двумя любыми основаниями: 5'-GG(N)₂CC и 5'-CC(N)₂GG (табл. 8, тип 10). Открыты также рестриктазы, узнающие разорванные гексануклеотидные палиндромы (табл. 8, типы 12—16). Как видно, число любых нуклеотидов, разделяющих симметричные части узнаваемой последовательности, варьирует от 3 до 9. Однако, их число в каждом конкретном случае является строго фиксированным, т. е. рестриктазы не узнают последовательностей палиндромные части которых разделены меньшим или большим числом несимметричных оснований. К настоящему времени известно 22 фермента, узнающие 11 различающихся по структуре уникальной части разорванных гексануклеотидов.

Среди рестриктаз обсуждаемой группы особенно выделяется последовательность нуклеотидов, узнаваемая рестриктазой Sfi I [301] (табл. 8, тип 17). Она представляет собой октануклеотид, разделенный 5-тью любыми основаниями: 5'-GGCC(N)₅GGCC. Это самая протяженная последовательность среди всех идентифицированных участков, узнаваемых специфическими эндонуклеазами.

Разнообразие типов построения участков, узнаваемых рестриктазами, дополняют так называемые «вырожденные» палиндромы, в определенных позициях которых допускается присут-

ствие нескольких альтернативных оснований. В настоящее время идентифицирован пока единственный вырожденный тетра nukлеотид (5'-PuGCPy), являющийся субстратом для 6 ферментов (табл. 8, тип 18). Остальные 13 таких типов представлены гексануклеотидными последовательностями, узнаваемыми 122 ферментами (табл. 8, типы 19—31). Еще два варианта типов построения узнаваемых участков занимает промежуточное положение между разорванными и вырожденными последовательностями, поэтому выделены в отдельную I г группу. Представители этой группы PpuM I [319] и Dra II [122] узнают гептануклеотидные последовательности: 5'-PuGG(A/T)CCPy и 5'-PuGGNCCPy соответственно. Рестриктазы, представленные типами 18—25 и 32—33, в местах «вырожденности» способны отличить пурины от пиримидинов, но не G от A, или C от T. Поэтому субстратом для ферментов этой группы служит не одна, а несколько близких по структуре последовательностей нуклеотидов, в том числе и истинные палиндромы. Например, на основе общей структуры участка 5'-GPyCGPyC, узнаваемого рестриктазой Acs I [121], могут быть написаны 4 различные последовательности: 5'-GGCGCC, 5'-GACGCC, 5'-GGCGTC и 5'-GACGTC. В действительности этот фермент узнает только три последовательности, так как 2-ая и 3-ья из них являются комплементарными.

Другие варианты вырожденных гексануклеотидных палиндромов в табл. 8 представлены 26—31 типами построения. Для них характерна возможность наличия в определенных местах как пурина, так и пиримидина, природа которых для каждого конкретного узнаваемого участка является фиксированной. Так, например, в последовательности 5'-(A/T)GGCC(A/T), узнаваемой рестриктазой Hae I [319], в первой и последней позиции может находиться аденин или тимин в любом сочетании. Таким образом эта рестриктаза узнает три, различающиеся по структуре участка: 5'-TGGCCA, 5'-AGGCCA и 5'-AGGCCT.

Среди всех рестриктаз, узнающих «вырожденные» гексануклеотидные палиндромы, особенно выделяется Sdu I (тип 31), в двух местах узнаваемого сайта селективно дискриминирующая только один из четырех возможных нуклеотидов: 5'-G(G/A/T)GC(C/A/T)C [192]. Таким образом этот фермент способен расщеплять субстрат в 6-ти различающихся по структуре участках.

Среди охарактеризованных специфических эндонуклеаз рестрикции также имеется группа ферментов, узнающих несимметричные последовательности нуклеотидов (табл. 8, типы 34—37). Эти участки по своей структуре напоминают последовательности, узнаваемые рестриктазами III типа (см. табл. 1). Всего идентифицировано 58 таких ферментов, узнающих 22 различных последовательностей.

Уже сейчас разнообразие нуклеотидных последовательностей, узнаваемых специфическими нуклеазами, представлено большим числом вариантов. Работа по поиску рестриктаз далеко не завершена. С каждым годом появляются ферменты с новой субстратной специфичностью и пока не видно признаков снижения темпов роста их числа (см. табл. 2). Вариабельность структуры узнаваемых последовательностей в настоящее время уже такова, что кажется вполне вероятным со временем обнаружить рестриктазу для любой последовательности нуклеотидов, по меньшей мере являющейся производным типов, представленных в табл. 8. Интенсивное развитие работ по поиску новых ферментов рестрикции позволяет надеяться, что со временем будет получен ответ и на этот вопрос.

4.2. Релаксированная специфичность рестриктаз

Еще одним проявлением специфичности рестриктаз, имеющим непосредственное отношение к структуре узнаваемых участков, является свойство снижать субстратную специфичность, т. е. производить рщепление ДНК в участках, отличающихся по структуре от канонической последовательности, узнаваемой ферментом. Это явление было зарегистрировано в случае рестриктаз EcoRI [236, 297, 373], BamHI [140, 236], BsuI [170], HhaI [236], HindIII [181], Tth111I [346] и некоторых других ферментов [112, 236]. Пониженная субстратная специфичность (релаксированная, «звездочная» — обозначается, например, EcoRI*) проявляется при определенных условиях проведения ферментативной реакции. В первую очередь они заключаются в использовании избытков рестриктаз. Ряд факторов — изменение pH и ионной силы инкубационной среды, замена ионов магния на некоторые другие ионы двухвалентных металлов, добавление органических растворителей (глицерин, диметилсульфоксид, этанол и т. д.) способны стимулировать проявление пониженной субстратной специфичности рестриктаз [140, 170, 181, 236, 248, 297, 373]. Они никогда не реализуется в исчерпывающем фрагментировании ДНК (не наблюдается эквимольности между продуктами реакции).

Исследования субстратной специфичности рестриктаз в условиях, обеспечивающих ее изменение, позволили определить, что в этом случае ферменты узнают наборы близких по структуре участков ДНК, являющихся производными канонической узнаваемой последовательности нуклеотидов [112, 141, 170, 297, 346, 397]. Примеры таких «наборов» представлены в табл. 10. Последовательности, производные канонических, расщепляются с неодинаковой скоростью. В случае EcoRI* активности наблюдается следующая градация скоростей расщепления: 5'GAATTC (каноническая) > GGATTT > AAATTT > AAATTC, TAATTC [397].

**Структура узнаваемых участков, служащих субстратом в случае
релаксированной специфичности**

Фермент	Каноническая узнаваемая последовательность	Релаксированная узнаваемая последовательность					Источник информации
	XYZZ'Y'X'	NYZZ'-Y'X' ^{a)}	XNZZ'Y'X'	XYNZ'Y'X'	XNZZ'Y'N	NYZZ'-Y'N	
Hind III	A AGCTT	GAGCTC	AGGCTT	AATCTT			[273]
Pvu II	CAG CTG		ATGCTT CCGCTG	CATCTG			[272]
EcoR V	GAT ATC	AATATC TATATC CATATC	GGTATC GCTATC GTTATC	GACATC GAAATC GAGATC ^{b)}			[163]
BamH I	G GATCC	CGATCC AGATCC TGATCC	GAATCC				[209]
BamH I	G GATCC		GAATCC	GGCTCC GGGTCC GGTCC			[141]
EcoR I	G AATTC	AAATTC TAATTC CAATTC			GGATTT	AAA- TTT	[397]

а) — типы построения узнаваемых участков; X и Y — нуклеотиды определенной структуры; X и X', Y и Y' и т. д. — комплементарные нуклеотиды; N — любой нуклеотид;

б) — EcoR V* расщепляет данную последовательность, только в случае отсутствия *dam* специфического метилирования (5'-G^{m6}ATC)

Повсеместно распространено мнение, что обсуждаемое явление обусловлено действием факторов инкубационной среды, влияющих на точность узнавания субстрата рестриктазами, а не наличием в исследуемых препаратах разных по специфичности ферментов. В пользу этого вывода говорят данные, полученные с использованием гомогенных препаратов рестриктаз [112, 140, 170], совместное хроматографическое фракционирование «строгой» и «ослабленной» активностей [373] и аналогичное действие различных факторов (глицерин, органические растворители, ионы марганца и т. д.) на эндонуклеазы, обладающие различной субстратной специфичностью [112, 140, 170, 181, 236, 297, 397].

Способность рестриктаз проявить пониженную субстратную специфичность изучена на небольшом числе примеров. Не исключено, что эта особенность характерна для многих (если не всех) специфических эндонуклеаз.

4.3. Место расщепления субстрата

Важным функциональным проявлением рестриктаз является место расщепления ДНК в отношении узнаваемого участка. Это свойство также характеризуется большим разнообразием вариантов. Большинство специфических эндонуклеаз расщепляют ДНК внутри участка узнавания. Возможные варианты расщепления можно рассмотреть на примере гексануклеотидных палиндромов:

Рестриктаза	Узнаваемая последовательность	Структура концов	Источник информации
Xma I	5'—C CCGGG	5' — выступающий тетрануклеотидный	[132]
Asu II	5'—TT CGAA	5' — выступающий динуклеотидный	[120]
Sma I	5'—CCC GGG	Полностью спаренный	[319]
Pvu I	5'CGAT CG	3' — выступающий динуклеотидный	[144]
Kpn I	5'—GGTAG C	3' — выступающий тетрануклеотидный	[374]

Таким образом, при расщеплении двухнитевой ДНК могут образоваться концы трех структурных типов. Если разрыв происходит посередине узнаваемой последовательности, то образуются фрагменты с полностью спаренными («тупыми») концами. В тех случаях, когда расщепление ДНК происходит в стороне от оси симметрии, образуются выступающие одонитевые концы, получившие название «липких», т. е. способных спариваться с комплементарным концом, образующимся в противоположной цепи в результате ее разрыва. При расщеплении одними рестриктазами образуются фрагменты с 5'-выступающими липкими концами. Другие рестриктазы дают фрагменты с 3'-избыточностью. Число нуклеотидов в одонитевом конце может варьировать от 5-ти — EcoR II [82], до одного ScaI I [135].

Вариация характера расщепления участков узнавания внесла некоторые поправки и в понятие изошизомерии. Были выявлены рестриктазы, узнающие идентичные последовательности, но различающиеся по месту их расщепления. Например, рестриктазы Sma I и Xma I узнают одинаковые последовательности нуклеотидов, но первая из них при разрыве ДНК образует фрагменты с тупыми концами [319], а вторая расщепляет узнаваемый участок с образованием 5'-выступающих тетрануклеотидных концов [132]. Такие изошизомеры было предложено называть ложными [49].

Думается, что для обозначения рестриктаз, узнающих одинаковые последовательности нуклеотидов, но расщепляющих их в разных местах, вполне приемлемым является термин альтернативные прототипы (*alter* — один из двух) [102]. Он позволяет подчеркнуть «прототипность» таких ферментов как в отношении функционального проявления, так и следующих из этого различных возможностей в случае их применения в качестве аналитических реагентов. Наличие в термине ложный изошизомер (изос — равный, схизос — расщепляю) [49] последнего слова как бы ступшевывает эту разницу.

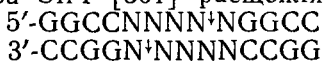
Рассмотрение литературных данных убеждает, что истинные изошизомеры встречаются чаще, чем альтернативные прототипы. Последние перечислены в табл. 11.

Таблица 11

Альтернативные прототипы рестриктаз

Узнаваемая последовательность	Варианты расщепления	Название Фермента	Источник информации
5'—GATC	5'— ⁺ GATC	Mbo I	[139]
	5'—GmA ⁺ TC	Dpn I	[138]
5'—GCGC	5'—GCG ⁺ C	Hha I	[320]
	5'—G ⁺ CGC	HinP I	[340]
5'—CCCGGG	5'—CCC ⁺ GGG	Sma I	[132, 319]
	5'—C ⁺ CCGGG	Xma I	[132]
5'—GGCGCC	5'—GG ⁺ GGCC	Nar I	[319]
	5'—GGCG ⁺ CC	Bbe I	[205]
	5'—GGC ⁺ GCC	Eco78 I	[21]
5'—CC(A/T)GG	5'— ⁺ CC(A/T)GG	EcoR II	[82]
	5'—CC ⁺ (A/T)GG	BstN I	[319]
5'—PuGGNCC-Py	5'—PuG ⁺ GNCCPy	Dra II	[122]
	5'—PuGGNC ⁺ CPy	Pss I	[319]
5'—GGTACC	5'—GGTAC ⁺ C	Kpn I	[374]
	5'—G ⁺ GTACC	Asp718 I	[87]
5'—GAGCTC	5'—GAGCT ⁺ C	Sac I	[319]
	5'—GAG ⁺ CTC	Ecl136 II	[319]
5'—CCNGG	5'—CC ⁺ NGG	ScrF I	[135]
	5'— ⁺ CCNGG	Sso II	[36, 50]
5'CTCGAG	5'—C ⁺ TCGAG	Xho I	[145]
	5'—CTC ⁺ GAG	Sci I	[319]

Расщепление ДНК некоторыми рестриктазами, узнающими разорванные палиндромные последовательности (см. табл. 8, типы 15—16), происходит в области, разделяющей симметричные части узнаваемой последовательности. Например, рестриктаза Sfi I [301] расщепляет ДНК следующим образом:



В настоящее время также известны 43 рестриктазы, которые расщепляют ДНК за пределами узнаваемых участков. Все они.

(за исключением Gsu I, Fsf I, Gdi II, Ple I, Bbv I и его изоизомера AlwXI) узнают несимметричные последовательности нуклеотидов (табл. 8, типы 33—36). Расстояние точки разрыва от узнаваемого участка, а также ее ориентация являются строго определенными для каждой рестриктазы. Например, рестриктаза Fok I [359] расщепляет ДНК с одной стороны узнаваемой последовательности на расстоянии в разных цепях, равном 9 и 13 нуклеотидов:

5'-GGATGNNNNNNNNNN⁺

3'-CCTATNNNNNNNNNN⁺

Как в отношении типа построения узнаваемого участка, так и характера расщепления субстрата, обсуждаемые ферменты напоминают рестриктазы III типа (см. табл. 1). Только в отличие от последних, специфические эндонуклеазы дают исчерпывающее фрагментирование субстрата по всем узнаваемым участкам.

4.4. Специфичность рестриктаз в отношении природных модификаций основания

Метилирование оснований в узнаваемой последовательности нуклеотидов способно предотвратить ее расщепление рестриктазой. Такая модификация субстрата осуществляется метилазами и лежит в основе механизма защиты клеточной ДНК от сопряженной специфической эндонуклеазы.

Долгое время было общепринятым мнение, что модификации в составе ДНК подвергаются только аденин и цитозин с образованием 6-метиладенина (^m6A) и 5-метилцитозина (^m5C) [126, 129, 252]. В последнее время появились данные о существовании специфических метилаз, способных метилировать гуаниновые остатки по 7-му положению [278, 279] и цитозин по N⁴-положению (^m4C) [56, 103, 191], и продемонстрировано их участие в защите ДНК от действия рестриктаз. Последующие исследования раскрыли широкую таксономическую распространенность ДНК-[N⁴-цитозин]-метилтрансфераз [56, 103, 191], а также ^m4C [128, 130] среди бактерий, что позволяет считать ^m4C наряду с упомянутыми ^m5C и ^m6A обычным минорным компонентом бактериальной ДНК. В настоящее время чувствительность рестриктаз рассматривается в отношении упомянутых трех типов метилирования ДНК [258]. Кроме того представляют интерес и другие природные модификации ДНК. Имеются в виду «необычные» основания, которые включаются в состав ДНК в ходе репликации. К таким относится 5-гидроксиметилцитозин, замещающий все цитозиновые остатки в геноме T-четных и некоторых других фагов [37, 230, 402]. Эти 5-гидроксиметилцитозиновые остатки кроме того подвергаются гликозилированию. ДНК, содержащая 5-гидроксиметилцитозин, является устойчивой к действию большинства рестриктаз. В последнее время данные о

чувствительности специфических эндонуклеаз к 5-гидроксиметилцитозину также стали приводиться в сводных таблицах, характеризующих влияние различных природных модификаций субстрата на его подверженность расщеплению ферментами рестрикции (см. разд. 4.4.2). Влияние других необычных природных модификаций фаговых ДНК (замещение тимина на 5-гидроксиметилурацил — фаги *B. subtilis* SPO1, SP8 и др., на урацил — фаги PBS1 и PBS2, на 5-дигидроксипентилурацил, который подвергается пострепликативному глюкозилированию, фосфоглюконированию и т. д.) [198, 214, 366] на способность рестриктаз расщеплять такие субстраты мало изучено. На основе проведенных исследований делаются выводы о резистентности обсуждаемых субстратов к действию подавляющего большинства исследованных рестриктаз [182].

Особое место среди всех исследованных рестриктаз занимает Dpn I, которая расщепляет ДНК только при наличии 6-метиладенина в обоих цепях узнаваемой последовательности 5'G^{m6}ATC [218, 219]. Немодифицированная или гемиметилированная (содержащая одну метилированную, другую неметилированную нить) ДНК устойчива к действию этого фермента [380]. В настоящее время обнаружены еще 6 рестриктаз, характеризующиеся идентичной с Dpn I субстратной специфичностью как в отношении узнаваемой последовательности, так и ее модификации — Cfu I, NmuE I, NsuD I, Nan II, Ngo III, NmuD I [319].

В литературе имеются данные, что Aru I преимущественно расщепляет ДНК в том случае, когда в ее узнаваемой последовательности 5'CC(A/T)GG цитозинового остаток, расположенный рядом со средним основанием является метилированным [304]. «Преимущественно» означает тот факт, что и неметилированная последовательность подвергается (хотя и очень слабо) расщеплению этим ферментом.

Вполне вероятно, что существует и больше аналогичных эндонуклеаз, но отличающихся от рассмотренных структурой узнаваемого участка. Их обнаружению может препятствовать использование в качестве субстратов ДНК вирусов и плазмид, размноженных в штаммах *E. coli*, характеризующихся содержанием ограниченного круга метилаз (dam — узнает 5'GATC и dcm — 5'CC(A/T)GG). Поэтому для поиска таких ферментов следовало бы разработать специальные методические подходы.

Возможно совершенно новый вариант специфичности скрывается за феноменом рестрикции фагов у микоплазмы *Acholeplasma landlawii* JA1 [349]. Этот штамм ограничивал фаги, содержащие 5-метилцитозин в любом окружении. Таким образом эта система рестрикции проявляет специфичность к ^{m5}C, а не к какой-то определенной последовательности нуклеотидов, содержащей это минорное основание. Вопрос о том, имеется ли в клетках эндонуклеаза специфически расщепляющая ДНК, со-

держашую ^{m5}C пока не исследован. Обсуждаемое явление в какой то мере феноменологически напоминает элиминацию из клеток некоторых штаммов *E. coli* ДНК, содержащей метилированные основания [303]. Однако, в последнем случае идентифицированные системы рестрикции (*McrA*, *McrB* и *Mrr*) проявляют специфичность к ближайшему соседу минорного основания, чего не наблюдается у *A. landlawii*. Пока для *E. coli* также не продемонстрировано, что наблюдаемый феномен обусловлен наличием в клетках специфических эндонуклеаз.

4.4.1. Специфичность рестриктаз по отношению к местоположению модифицированного основания

Рестриктазы проявляют специфичность и по отношению к местоположению модифицированных оснований в узнаваемой последовательности нуклеотидов. Во всех исследованных случаях было обнаружено, что метилирование, осуществляемое штаммо-специфической метилазой, защищает ДНК от расщепления сопряженной рестриктазой [98, 252, 319]. Этот тип модификации Макклеландом [252] был назван «врожденным» («cognate»). В настоящем обзоре для его обозначения будет принято название — каноническое метилирование. Оно проявляется в метилировании симметрично расположенных строго определенных оснований в каждой цепи узнаваемой последовательности нуклеотидов. Например, специфическая метилаза *Hpa II* метилирует внутренний цитозин в последовательности $5' C^m C GG$ в $3' G G^m CC$

результате чего ДНК становится устойчивой к действию рестриктазы *Hpa II* [238, 302].

Показано, что для защиты субстрата достаточным является наличие минорного основания только в одной из цепей в узнаваемой последовательности нуклеотидов [329, 380], т. е. в этих случаях не наблюдалось фрагментирования ДНК. Вместе с тем имеются данные о том, что некоторые рестриктазы в случае гибридного дуплекса ДНК, содержащего одну метилированную, другую неметилированную нить, способны надрезать немодифицированную цепь [94, 105, 210, 358]. Скорость расщепления немодифицированной нити в гемиметилированной ДНК является ниже, чем при расщеплении двухнитевого немодифицированного субстрата [358]. Исключением во всех отношениях является *RMsp I*, расщепляющая канонически гемиметилированную узнаваемую последовательность $5' ^m C C G G$ [105]. Кроме того метили-

рованная цепь расщеплялась быстрее, чем немодифицированная.

Защита ДНК от действия рестриктаз может происходить вследствие ее модификации другими метилазами, узнаваемые последовательности которых полностью или частично перекрываются с субстратным участком исследуемых рестриктаз. Инте-

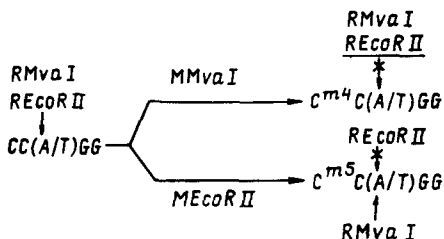
рес представляют те случаи, когда такое метилирование затрагивает другие нуклеотиды, немодифицируемые канонической метилазой. Рестриктазы различаются по чувствительности к такому типу модификации субстрата. Защита ДНК от действия некоторых рестриктаз может происходить вследствие метилирования только определенного нуклеотида в узнаваемой последовательности. Например, BamH I расщепляет последовательности 5'GGAT^mC [238, 274] и 5'GG^mATCC [98, 125], но не действует на 5'GGAT^mCC [169]. Последний вариант метилирования узнаваемого участка соответствует каноническому. В отличие от приведенного примера существуют также рестриктазы, ингибируемые метилированием нескольких различных оснований в узнаваемой последовательности нуклеотидов. Например, рестриктазы Xho I и SalG I, узнающие последовательности 5'CTCGAG [145] и 5'GTCGAC [66] соответственно, не расщепляют субстрат, содержащий в вышеуказанных последовательностях метилированный аденин или внутренний цитозин [129, 254].

Обсуждая влияние сайт-специфического метилирования в неканонических положениях узнаваемого участка следует иметь в виду, что ингибирующее действие на рестриктазы не всегда проявляется по принципу «да» или «нет» [105, 258]. Иногда наблюдается только снижение активности фермента в 5—20 раз [152, 274]. В таких случаях конечный результат может зависеть от условий проведения реакции, времени ее протекания, концентрации фермента. Возможно этим следует объяснить, например, противоречивые данные о том, что R_Xma I расщепляла 5'CC^{m5}CGGG последовательность в эукариотической ДНК, но не в ДНК *H. parainfluenzae* [98, 415, 416].

4.4.2. Чувствительность рестриктаз к природе минорного основания

До недавнего времени специфичность рестриктаз к модификации субстрата изучалась только в отношении местоположения модифицированного основания в узнаваемой последовательности нуклеотидов. Открытие N⁴-метилцитозина (^{m4}C) [56, 103, 191] поставило вопрос о способности рестриктаз дифференцировать два по-разному модифицированные цитозина (N⁴- и 5-метилцитозин), локализованные в идентичных местах узнаваемой последовательности нуклеотидов. Такие исследования впервые были проведены на примере рестриктаз Mva I и EcoR II, узнающих 5'CC(A/T)GG последовательность. Метилирование внутреннего цитозина в указанном участке по 5-тому положению (образуется 5-метилцитозин) защитило субстрат от действия EcoR II, но не от Mva I [103]. В случае появления в этом же месте N⁴-метилцитозина ДНК становилась устойчивой к дей-

ствию обеих исследуемых рестриктаз. Сказанное иллюстрируется схемой, которая приводится ниже.



(перечеркнутой стрелкой обозначено отсутствие действия фермента).

Оказалось, что аналогичным свойством в отношении некоторых положений участка узнавания обладают также рестриктазы Xma I, Cfr9 I, Sma I, Hpa II [105], Vsp [191] и предположительно BstN I [258]. Эти данные указывают на большой блокирующий эффект ^{m4}C по сравнению с ^{m5}C, так как известна лишь одна рестриктаза, способная расщеплять сайт при наличии ^{m4}C — Msp I [105]. Целая группа ферментов блокируется при наличии метилированных цитозинов любой природы в идентичных положениях узнаваемого участка [102, 103, 105]. Таким образом эти ферменты оказались неспособными дифференцировать ^{m5}C и ^{m4}C.

Выше были рассмотрены общие вопросы, касающиеся проявлений специфичности рестриктаз по отношению к природным модификациям субстрата. Ниже излагаются сводные данные и некоторые следующие из них частные обобщения.

4.4.3. Сводные данные о чувствительности рестриктаз к модификациям субстрата

Чувствительность рестриктаз к различным модификациям субстрата представляет собой важное проявление их специфичности. Поэтому такие данные регулярно обобщаются и публикуются. Выполняется эта работа в основном Макклелландом [252, 253, 258]. В табл. 12 представлены сводные данные, касающиеся характеристики ферментов рестрикции II типа [258]. Они обобщают совокупность известных данных о чувствительности рестриктаз к метилированию субстрата. Ниже приводятся некоторые частные обобщения, составленные на основе данных, приведенных в табл. 12.

Чувствительность эндонуклеаз рестрикции к метилированию субстрата

Рестриктаза	Узнаваемая последовательность	Расщепляемые последовательности	Нерасщепляемые последовательности
AacI	CCWGG	C ^{m5} CWGG	?
AatI	AGGCCT	?	AGG ^{m5} CCT AGGC ^{m5} CT
AccI	GTMKAC	?	GTMK ^{m6} AC# GTMKA ^{m5} C ^{m5} CGCG
AccII	CGCG	?	TCCGG ^{m6} A
AccIII	TCCGGA	T ^{m5} CCGGA TC ^{m5} CGGA	TCCGG ^{m6} A
AflI	GGWCC	GGWC ^{m5} C	?
AhaII	GRCGYC ⁶	?	GR ^{m5} CGYC GRCGY ^{m5} C ^{m6} AGCT
AluI	AGCT	?	AG ^{m4} CT AG ^{m5} CT# AG ^{hm5} CT GG ^{m6} ATC GGAT ^{m4} C
AlwI	GGATC	?	GG ^{m6} ATC GGAT ^{m4} C
AmaI	TCGCGA	TCGCG ^{m6} A	?
AosII	GRCGYC	?	GR ^{m5} CGYC
ApaI	GGGCC	?	GGG ^{m5} CCC# GGGCC ^{m5} C
ApaLI	GTGCAC	GTGC ^{m6} AC	?
ApyI	CCWGG	C ^{m5} CWGG ⁶	^{m5} CCWGG
AquI	CYCGRG	?	^{m5} CYCGRG#
Asp718I	GGTACC	GGT ^{m6} ACC ⁶	GGTAC ^{m5} C GGTA ^{m5} C ^{m5} C ⁶
AsuII	TTCGAA	TT ^{m5} CGAA	?
AtuCI	TGATCA	?	TG ^{m6} ATCA ^{m5} CYCGRG
AvaI	CYCGRG	C ^{m5} CCGGG	CY ^{m5} CGRG CTCC ^{m6} AG ⁶ GGW ^{m5} CC GGWC ^{m5} C GGW ^{hm5} C ^{hm5} C
AvaII	GGWCC	?	GGW ^{m5} CC GGWC ^{m5} C GGW ^{hm5} C ^{hm5} C
BalI	TGGCCA	?	TGG ^{m5} CCA# TGGC ^{m5} CA ⁶
BamHI	GGATCC	GGATC ^{m5} C GG ^{m6} ATCC GG ^{m6} ATC ^{m5} C	GGAT ^{m4} CC# GGAT ^{m5} CC GGAT ^{hm5} C ^{hm5} C
BamFI	GGATCC	GG ^{m6} ATCC	?
BamKI	GGATCC	GG ^{m6} ATCC	?
BanI	GGYRCC ⁶	GG ^{m5} CGCC	?
BanII	GRGCYC	?	GRG ^{m5} CYC
BanIII	ATCGAT	?	ATCG ^{m6} AT
BbvI	GCWGC	?	G ^{m5} CWGC#
BclI	TGATCA ⁶	TGAT ^{m5} CA	TG ^{m6} ATCA TGAT ^{hm5} CA
BcnI	CCSGG	^{m5} CCSGG	C ^{m4} CSGG#
BepI	CGCG	?	^{m5} CGCG
BglI	GCCN ₅ GGC	GC ^{m5} CN ₅ GGC	G ^{m5} CCN ₅ GGC

Рестриктаза	Узнаваемая последовательность	Расщепляемые последовательности	Нерасщепляемые последовательности
BglII	AGATCT ⁶	AG ^{m6} ATCT	GCCN ₅ GG ^{m5} C ⁶ AGAT ^{m5} CT AGAT ^{hm5} CT
BinI	GGATC	?	GG ^{m6} ATC
Bme216I	GGWCC	?	GGWC ^{m5} C
Bsp1286I	GDGCHC	?	GDG ^{m5} CHC
BspHI	TCATGA	?	TCATG ^{m6} A
BspMI	ACCTGC	?	ACCTG ^{m5} C
BspMII	TCCGGA	TCCGG ^{m6} A	T ^{m5} CCGGA TC ^{m5} CGGA
BspNI	CCWGG	^{m5} CCWGG C ^{m5} CWGG	?
BstYI	RGATCY	RG ^{m6} ATCY	RGAT ^{m4} CY
BspXI	ATCGAT	?	ATCG ^{m6} AT
BspXII	TGATCA	?	TG ^{m6} ATCA
BssHII	GCGCGC ⁶	?	G ^{m5} CG ^{m5} CGC
BstI	GGATCC	GG ^{m6} ATCC GGATC ^{m5} C	GGAT ^{m4} CC GGAT ^{m5} CC
BstBI	TTCGAA	?	TTCG ^{m6} AA
BstEII	GGTNACC	GGTNA ^{m5} C ^{m5} C ⁶	GGTNA ^{hm5} C ^{hm5} C
BstEIII	GATC ⁶	?	G ^{m6} ATC
BstGI	TGATCA	?	TG ^{m5} ATCA
BstNI	CCWGG ⁶	^{m5} CCWGG ⁶ C ^{m5} CWGG ^{m5} C ^{m5} CWGG ⁶	^{hm5} C ^{hm5} CWGG
BstUI	CGCG	?	^{m5} CG ^{m5} CG
BstXI	CCAN ₆ TGG	?	^{m5} CCAN ₆ TGG CC ^{m6} AN ₆ TGG
BsuEI	CGCG	?	^{m5} CGCG#
BsuFI	CCGG	?	^{m5} CCGG#
BsuMI	CTCGAG	?	CT ^{m5} CGAG#
BsuQI	CCGG	?	^m CCGG
BsuRI	GGCC	?	GG ^{m5} CC# ⁶
BsuRII	CTCGAG	?	CT ^m CGAG#
CfoI	GCGC	?	G ^{m5} CGC
CfrI	YGGCCR	?	G ^{hm5} CG ^{hm5} C
Cfr6I	CAGCTG	?	YGG ^{m5} CCR# CAG ^{m4} CTG#
Cfr9I	CCCCGGG ⁶	C ^{m5} CCGGG CC ^{m5} CCGGG	CAG ^{m5} CTG m ⁴ CCCCGGG ^{m5} CCCCGGG C ^{m4} CCCCGGG# CC ^{m4} CCGGG
Cfr10I	RCCGGY	?	R ^{m5} CCGGY#
Cfr13I	GGNCC	?	GGN ^{m5} CC#
ClaI	ATCGAT	?	^{m6} ATCGAT AT ^{m5} CGAT ATCG ^{m6} AT#
CpeI	TGATCA	?	TG ^{m6} ATCA
CspI	CGGWCCG	?	CGGW ^{m5} CCG
Csp45I	TTCGAA	?	^{m5} CGGW ^{m5} CG TTCG ^{m6} AA

Рестриктаза	Узнаваемая последовательность	Расщепляемые последовательности	Нерасщепляемые последовательности
CviAI	GATC	?	G ^{m6} ATC
CviBI	GANTC	?	G ^{m6} ANTC#
CviJI	RGCY	?	RG ^{m5} CY#
CviNYI	CC	C ^{m5} C	m ⁵ CC#
CviQI	GTAC	GTA ^{m5} C	GT ^{m6} AC#
DdeI	CTNAG	?	m ⁵ CTNAG# hm ⁵ CTNAG
DpnI	G ^{m6} ATC ⁶	G ^{m6} ATC G ^{m6} AT ^{m5} C ⁶ G ^{m6} AT ^{m4} C	GATC GAT ^{m4} C GAT ^{m5} C G ^{m6} ATC#
DpnII	GATC	?	G ^{m6} ATC#
Dra II	RGGNCCY	?	RGGNC ^{m5} GY
EaeI	YGGCCR	?	YGG ^{m5} CCR# YGGC ^{m5} CR
EagI	CGGCCG	?	CGG ^{m5} CCG m ⁵ CGGC ^{m5} CG
EarI	GAAGAG	?	GAAG ^{m6} AG
Eco47I	GGWCC	?	GGWC ^{m5} C
Eco47III	AGCGCT	?	AG ^{m5} CGCT
EcoRI	GAATTC	GAATT ^{hm5} C	G ^{m6} AATTC ⁶ GA ^{m6} ATTC# GAATT ^{m5} C m ⁴ CCWGG C ^{m4} CWGG C ^{m5} CWGG# CC ^{m6} AGG hm ⁵ C ^{hm5} CWGG
EcoRII	CCWGG ⁶	m ⁵ CCWGG	C ^{m4} CWGG C ^{m5} CWGG# CC ^{m6} AGG hm ⁵ C ^{hm5} CWGG
EcoRV	GATATC	GATAT ^{m5} C ⁶	G ^{m6} AATATC#
EspI	GCTNAGC	GCTNAG ^{m5} C	G ^{m5} CTNAGC
Fnu4HI	GCNGC	?	G ^{m5} CNGC GCNG ^{m5} C m ⁵ CGCG CG ^{m5} CG
FnuDII	CGCG	?	CG ^{m5} CG
FnuEI	GATC	G ^{m6} ATC ⁶	?
FokI	CATCC	CAT ^{m5} CC CATC ^{m5} C ⁶	GG ^{m6} ATG C ^{m6} ATCC
FspI	TGCGCA	?	TG ^{m5} CGCA
HaeI	RGCGCY ⁶	?	RG ^{m5} CGCY RG ^{hm5} CC ^{hm5} CY
HaeIII	GGCC	GGC ^{m5} C	GG ^{m5} CC# ⁶ GG ^{hm5} C ^{hm5} C C ^{m5} CGG# GACG ^{m5} C GRG ^{m5} CYC GGYRC ^{m5} C G ^{m5} CGC# GCC ^{m5} C G ^{hm5} CG ^{hm5} C
HapII	CCGG	?	C ^{m5} CGG#
HgaI	GACGC	?	GACG ^{m5} C
HgiAI	GRGCYC	?	GRG ^{m5} CYC
HgiIII	GGYRCC	?	GGYRC ^{m5} C
HhaI	GCGC	?	G ^{m5} CGC# GCC ^{m5} C G ^{hm5} CG ^{hm5} C
HhaII	GANTC	?	G ^{m6} ANTC#
HincII	GTYRAC	GTYRA ^{m5} C	GTYR ^{m6} AC
HindII	GTYRAC	?	GTYRA ^{hm5} C
HinfI	GANTC	GANT ^{m5} C ⁶	GTYR ^{m6} AC# G ^{m6} ANTC GANT ^{hm5} C

Рестриктаза	Узнаваемая последовательность	Расщепляемые последовательности	Нерасщепляемые последовательности
HindIII	AAGCTT	?	^{m6} AAGCTT# AAG ^{m5} CTT AAG ^{hm5} CTT
HinPI HpaI	GCGC GTTAAC	? GTTAA ^{m5} C	G ^{m5} CGC GTTA ^{m6} AC# GTTAA ^{hm5} C
HpaII	CCGG	?	^{m4} CCGG ^{m5} CCGG ⁶ C ^{m4} CGG ⁶ C ^{m5} CGG# ^{hm5} C ^{hm5} CGG
HphI	TCACC	?	T ^{m5} CACC# GGTG ^{m6} A ?
KpnI	GGTACC ⁶	GGT ^{m6} ACC GGTA ^{m5} CC GGTAC ^{m5} C GGTA ^{m5} C ^{m5} C ⁶	?
MaeII MboI	ACGT ⁶ GATC ⁶	? GAT ^{m4} C GAT ^{m5} C ⁶	A ^{m5} CGT ⁶ G ^{m6} ATC# GAT ^{hm5} C
MboII MfiI	GAAGA RGATCY ⁶	T ^{m5} CTT ^{m5} C ⁶ ?	GAAG ^{m6} A# RG ^{m6} ATCY RGAT ^{m4} CY RGAT ^{m5} CY
MluI MmeII MnlI	ACGCGT GATC CCTC ⁶	^{m6} ACGCGT ? ?	A ^{5m} CGCGT G ^{m6} ATC ^{m5} CCTC ^{m5} C ^{m5} CT ^{m5} C
MphI MroI MspI	CCWGG ⁶ TCCGGA CCGG ⁶	? TCCGG ^{m6} A ^{m4} CCGG C ^{m4} CGG C ^{m5} CGG	C ^{m5} CWGG ? ^{m5} CCGG# ^{hm5} C ^{hm5} CGG
MstII MvaI	CCTNAGG CCWGG	^{m5} CCTNAGG C ^{m5} CWGG ⁶ ^{m5} CCWGG	? C ^{m4} CWGC# CC ^{m6} AGG ^{m4} CCWGG ⁶ G ^{m5} CCGGC GC ^{m5} CGGC GCCGG ^{m5} C
NaeI	GCCGGC ⁶	?	GATC GAT ^{m5} C GG ^{m5} CGCC C ^{m4} CSGG C ^{m5} CSGG ⁶ ^{m4} CCATGG ⁶
NanII	G ^{m6} ATC ⁶	G ^{m6} ATC G ^{m6} AT ^{m5} C ⁶	GATC GAT ^{m5} C
NarI NciI	GGCGCC CCSGG	GGCGC ^{m5} C ^{m5} CCSGG	GG ^{m5} CGCC C ^{m4} CSGG C ^{m5} CSGG ⁶ ^{m4} CCATGG ⁶
NcoI NcrI NcuI NdeI NdeII NgoI NgoII NgoBI	CCATGG AGATCT GAAGA CATATG GATC RGC GCY GGCC TCACC	? AG ^{m6} ATCT ⁶ GAAG ^{m6} A ^{m5} CATATG ⁶ GAT ^{m5} C ⁶ ? ? ?	? ? ? ^{m6} A G ^{m6} ATC RG ^{m5} CGCY GG ^{m5} CC# T ^{m5} CACC

Рестриктаза	Узнаваемая последовательность	Расщепляемые последовательности	Нерасщепляемые последовательности
NheI	GCTAGC	?	GCTAG ^{m5} C
NmuDI	G ^{m6} ATC ⁶	G ^{m6} ATC	GATC
NmuEI	G ^{m6} ATC ⁶	G ^{m6} ATC	GATC
NotI	GCGGCCGC	GCGGCCG ^{m5} C	GCGG ^{m5} CCGC GCGGC ^{m5} CGC
NruI	TCGCGA	?	TCGCG ^{m6} A
NsiI	ATGCAT	?	ATCG ^{m6} AT
PfaI	GATC	G ^{m6} ATC ⁶	?
PaeR7I	CTCGAG	?	CTCG ^{m6} AG ⁺
PstI	CTGCAG	?	^{m5} CTGCAG CTGC ^{m6} AG ⁺
PvuI	CGATCG ⁶	CG ^{m6} ATC	CGAT ^{m4} CG CGAT ^{m5} CG
PvuII	CAGCTG	?	CAG ^{m4} CTG ⁺ CAG ^{m5} CTG
RsaI	GTAC ⁶	GTA ^{m5} C ⁶	GT ^{m6} AC
RshI	CGATCG	CG ^{m6} ATCG	?
RspXI	TCATGA	?	TCATG ^{m6} A
RsrI	GAATTC	?	G ^{m6} AATTC GA ^{m6} ATTC ⁶
RsrII	CGGWCCG	?	CGGW ^{m5} CCG ^{m5} CGGW ^{m5} C ^{m5} CG
SacI	GAGCTC	G ^{m6} AGCTC	GAG ^{m5} CTC
SacII	CCGCGG	?	^{m5} CCGCGG
SalI	GTGCAG	?	GT ^{m5} CGAC GTGC ^{m6} AC ⁺
SalDI	TCGCGA	TCGCG ^{m6} A	?
Sau3AI	GATC ⁶	G ^{m6} ATC	GAT ^{m5} C ⁶ GAT ^{m4} C GAT ^{hm5} C
Sau96I	GGNCC	?	GGN ^{m5} CC GGN ^{m5} C GGN ^{hm5} C ^{hm5} C
Sbol3I	TCGCGA	TCGCG ^{m6} A	?
ScrFI	CCNGG	^{m5} CCNGG	C ^{m5} CNGG
SfaNI	GATGC	GATG ^{m5} G	G ^{m6} ATGC
Sfil	GGCCN ₅ GGCC	GC ^{m5} CCN ₅ GG ^{m5} CC ⁶	GGCCN ₅ GGC ^{m5} C
SfII	CTGCAG	?	CTGC ^{m6} AG
SinI	GGWCC	?	GGW ^{m5} CC
SmaI	CCCGGG	C ^{m5} CCGGG	^{m4} CCCGGG ^{m5} CCCGGG ⁶ C ^{m4} CCCGGG ⁶ CC ^{m4} CCGGG CC ^{m5} CCGGG ⁶
SpeI	ACTAGT	?	^{m6} ACTAGT
SphI	GCATGC	GCATG ^{m5} C G ^{hm5} CATG ^{hm5} C	?
SpII	CGTACG	CGT ^{m6} ACG	?
Spol	TCGCGA	TCGCG ^{m6} A	?
SsoII	CCNGG	?	C ^{m5} CNGG ^{m5} CCNGG
Sso47I	GAATTC	?	G ^{m6} AATTC ⁺

Рестриктаза	Узнаваемая последовательность	Расщепляемые последовательности	Нерасщепляемые последовательности
SstI	GAGCTC	?	AGG ^{m5} CCT AGGC ^{m5} CT ⁶
StuI	AGGCCT	T ^{m5} CGA ⁶ T ^{hm5} CGA ⁶	TCG ^{m6} A# GAG ^{hm5} CT ^{hm5} C
TaqI	TCGA		
TaqII	GACCGA CACCCA	?	G ^{m6} ACCGA
TaqXI	CCWGG	^{m5} CCWGG C ^{m5} CWGG	?
TfiI	TCGA	?	TCG ^{m6} A ^{m5} CCGG
ThaI	CGCG	?	^{hm5} CG ^{hm5} CG TCG ^{m6} A#
TthHBI	TCGA	T ^{m5} CGA	TCTAG ^{m6} A# T ^{m5} CTAGA T ^{hm5} CTAGA
XbaI	TCTAGA	?	CT ^{m5} CGAG CTCG ^{m6} AG ^{m5} CTCGAG
XhoI	CTCGAG ⁶	?	RGAT ^{m5} CY ⁶ ^{m4} CCC ^{m5} GGG ^{m5} CCC ^{m5} GGG C ^{m4} CCC ^{m5} GGG CC ^{m4} CGGG
XhoII	RGATCY	RG ^{m6} ATCY	CGG ^{m5} CCG G ^{m6} AA ₄ TTC
XmaI	CCC ^{m5} GGG	CC ^{m5} CGGG ⁶	GAAN ₄ TT ^{m5} C ⁶ CGAT ^{m5} CG ^{hm5} CGAT ^{hm5} CG
XmaIII	CGGCCG	?	
XmnI	GAAN ₄ TTC	GA ^{m6} AN ₄ TTC	
XorII	CGATCG	CG ^{m6} ATCG	

Примечания:

а. # — метилирование, осуществляемое штаммо-специфической метилазой (каноническое метилирование). M=A или C; K=G или T; N=A, C, G, или T; R=A или G; Y=C или T; W=A или T; S=G или C; D=A, G, или T; H=A, C или T. Последовательности приведены в 5' → 3' направлении. ^{m4}C = N⁴-метилцитозин; ^{m5}C = C5-метилцитозин; ^{hm5}C = гидроксиметилцитозин; ^{m6}A = N6-метиладенин; ^mC = неопределена природа метилированного цитозина. Номенклатура ферментов согласно [115, 353].

б). AccI медленно расщепляет неметилированную цепь в гемиметилированной последовательности GTMK^{m5}C. Aha II (GRG^{m5}YC) последовательность GRG^{m5}CC расщепляет эффективнее при наличии метилирования: GRG^{m5}CC [258], но не расщепляет последовательности GRG^{m5}Y^{m5}C [258, 274]. Asp718I расщепляет ДНК вируса NY2A хлореллы, модифицированную метилазой CviQI (GT^{m6}AC). Asp718I не расщепляет последовательностей, перекрывающихся с участком, узнаваемым *dst* метилазой GGTAC^{m5}CWGG [268], а также ^{m5}C-замещенную ДНК фага XP12, в то время как KpnI расщепляет эту ДНК [258]. AvaI медленно расщепляет неметилированную цепь в гемиметилированной последовательности STCG^{m6}AG/CTCGAG [258]. Ball в 50 раз медленнее расщепляет последовательности, перекрывающиеся с участками модифицированными *dst* метилазой (TGGC^{m5}CAGG) по сравнению с неметилированными. BanI с различной скоростью расщепляет узнаваемую последовательность в различных позициях которой включен ^{m5}C [211, 287]. BglI с раз-

личной скоростью расщепляет определенные m^5C гемиметилированные участки (например перекрывающиеся участки $MmspI-BglI$ и $MHpaII-BglI$). Однако m^5C диметилированный участок $MHaeIII-BglI$ полностью устойчив к действию $BglI$ [211, 274]. $BssHII$ не расщепляет ДНК, модифицированную $MHhaI$, в различных цепях которой гемиметилированы цитозины, находящиеся в различных позициях $G^{m^5C}CGCG/GCG^{m^5C}CGC$ [258]. $MBstI$ модифицирует внутренних цитозин в последовательности $GGAT^{m^5C}CC$, но пока неизвестно является ли модифицированный продукт m^5C или m^4C [231]. $BstEII$ расщепляет полностью m^5C -замещенную ДНК фага $XP12$ [258]. $BstNI$ расщепляет $C^{m^5C}CWGG$, m^5CCWGG и $m^5C^{m^5C}CWGG$ [258]. $AorI$, $ApyI$, $BspNI$, $MvaI$ и $TaqXI$ — изоизомеры $BstNI$ также не чувствительны к $C^{m^5C}CWGG$ [255]. $BsuRI$ расщепляет неметилированную цепь в гемиметилированной последовательности $GG^{m^5C}CC/GGCC$ [96, 393]. $Cfr9I$, эффекты скорости расщепления приведены в ссылке [106]. $DpnI$ расщепляет только dam метилированную ДНК. Его изоизомерами являются $CfuI$ [55], $NanII$, $NmuEI$, $NmuDI$ и $NsuDI$ [258]. $DpnI$ расщепляет ДНК $XP12$, модифицированную dam метилазой [276] $EcoRI$ не расщепляет гемиметилированной последовательности $G^{m^6}AATTC/GAATTC$. Ни $EcoRI$, ни $RsgI$ не расщепляет диметилированной последовательности $GA^{m^6}ATTC/GA^{m^6}ATTC$ [258]. $EcoRI$ расщепляет гемиметилированную последовательность $GAATT^{m^5C}$ с пониженной скоростью и не расщепляет олигонуклеотида, в обеих цепях содержащего 5-метилцитозин ($GAATT^{m^5C}$) [91]. $EcoRII$ изоизомерами, чувствительными к метилированию $C^{m^5C}CWGG$, являются $AtuBI$, $AtuII$, $BstGII$, $BinSI$, $Cfr5I$, $Cfr1II$, $EclII$, $EcaII$, $Eco27I$, $Eco38I$ и $MphI$ [319]. $EcoRII$ ограниченно расщепляет гемиметилированную последовательность $m^5CCWGG/CCWGG$ [410]. $EcoRV$ расщепляет полностью m^5C -замещенную ДНК фага $XP12$ [258]. $FokI$ приблизительно 2—4 раза медленнее расщепляет $CATC^{m^5C}$ по сравнению с немодифицированными участками [258]. $HaeII$ медленно расщепляет метилированную последовательность $RGCG^{m^5C}CY$ [211, 287]. $HaeIII$ расщепляет неметилированную цепь в гемиметилированной последовательности $GG^{m^5C}CC/GGCC$ [169]. $HinI$ расщепляет $GANT^{m^5C}$, однако скорости расщепления неметилированной, гемиметилированной ($GANT^{m^5C}/GANTC$) и диметилированной ($GANT^{m^5C}/GANT^{m^5C}$) последовательностей различаются. $HinI$ не расщепляет ДНК фага $XP12$ [152, 258]. Неметилированную последовательность $GANTC$ $HinI$ расщепляет эффективнее, чем гемиметилированную $GANT^{m^5C}/GANTC$, а последнюю эффективнее, чем $GANT^{m^5C}/GANT^{m^5C}$. Однако, разница в скорости расщепления неметилированных и полностью метилированных $HinI$ участков не превышает 10 раз [182, 258, 287]. $HpaII$ расщепляет неметилированную цепь в гемиметилированной последовательности $m^5CCGG/CCGG$. Скорости расщепления приведены в ссылке [106]. $KpnI$ согласно ссылке [299A], чувствительна к гемиметилированию участков $GGTA^{m^5C}CC$ и $GGTAC^{m^5C}$. Однако, $KpnI$ хорошо расщепляет m^5C -замещенную ДНК фага $XP12$ и $GT^{m^6}AC$ -модифицированную ДНК вируса $NY2A$ хлореллы [258]. Вероятно, что $MKpnI$ присуща m^4C модифицирующая способность. $MaeII$ медленно расщепляет неметилированную цепь в гемиметилированной последовательности $A^{m^5C}CGT/ACGT$ [258]. $MboI$ изоизомерами, чувствительными к $G^{m^6}ATC$ метилированию, являются $BssGII$, $BsaPI$, $BstXII$, $BstEIII$, $CpaI$, $DpnII$, $FnuAII$, $FnuCI$, $MmeII$, $MpoII$, $MosI$, $NdeII$, $NfiII$, $NlaII$, $NsuI$, $SinMI$ [319]. $MboII$ расщепляет полностью m^5C -замещенную ДНК фага $XP12$ [258], однако отмечено [152], что некоторые m^5C -содержащие гемиметилированные субстраты не расщепляются этой рестриктазой. $MilI$ медленно расщепляет участки $m^6AGAFCY$ [284]. $MspI$ расщепляет как неметилированную, так и метилированную цепи в дуплексах $C^{m^5C}CGG/CCGG$ [169, 384] и $C^{m^4C}CGG/CCGG$ [106]. $GGC^{m^5C}CGG$ $MspI$ расщепляет очень медленно [99, 202]. Клонированная $MmspI$ метилирует крайний цитозин (m^5CCGG) [383, 384]. Однако, отмечено что хромосомная *Mogaxella* sp. ДНК модифицирована в участках $m^5C^{m^5C}CGG$ [195]. $MvaII$ расщепляет неметилированную цепь в гемиметилированной последовательности $C^{m^4C}CWGG/CCWGG$ [258]. $NanII$ расщепляет только dam -метилированную ДНК [258]. $NanII$ расщепляет $MEcodam$ модифицированную ДНК фага $XP12$ [258] $NciI$ расщепляет $m^5C^{m^5C}CGG$ метилированную ДНК [98, 195]. Вероятно,

второе метилирование элиминирует $C^{m5}CGG$ эффект. $NcoI$ блокируется $MSeCI$ (CCNG) [258]. $NcrI$, выделяемая из *Nocardia cagnia* Beijing, является изошизомером $BglII$ [258]. $NdeI$ расщепляет полностью m^5C -замещенную ДНК фага XP12 [258]. $NdeII$ расщепляет полностью m^5C -замещенную ДНК фага XP12 [258]. $NmuDI$ расщепляет только dam метилированную ДНК [258]. $NmuEI$ расщепляет только dam метилированную ДНК [258]. $RsaI$ расщепляет полностью m^5C -замещенную ДНК-фага XP12 [258], но не расщепляет ДНК вируса NY2A хлореллы, модифицированную в участках $GT^{m6}AC$ [258, 404]. ДНК, выделенная из *Rhodospseudomonas sphaeroides* species Karlan, расщепляется $Asp718I$, но не $RsaI$ или $KpnI$ [258]. Так как $Asp718I$ и $KpnI$ расщепляет ДНК NY2A ($GT^{m6}AC$), специфичность $MRsaI$ скорее всего $GTA^{m4}C$. В ДНК *R. sphaeroides* содержится высокий уровень m^4C [130]. $RsrI$ не расщепляет гемметилированную последовательность $G^{m6}AAATTC/GAATTC$. $Sau3AI$ расщепляет неметилированную цепь в гемметилированной последовательности $GAT^{m5}C/GATC$ [70, 358]. $Sau3AI$ расщепляет m^6AGATC с пониженной скоростью [284]. Изошизомерами $Sau3AI$, нечувствительными к метилированию $G^{m6}ATC$, являются $Vce243I$, $Bsp671I$, $BspAI$, $BspPII$, $BspPII$, $CpeI$, $FnuEI$, $MthI$, $NsiAI$, $PfaI$ [319]. $SfiI$ не расщепляет $MVgII$ модифицированную ДНК [378]. $SfiI$ расщепляет M $HaeIII$ модифицированную ($GG^{m5}CC$) ДНК вируса $\lambda d2$ или фага λ , но не расщепляет полностью m^5C -модифицированную ДНК фага XP12 [258]. $SmaI$ расщепляет неметилированную цепь в гемметилированной последовательности $CC^{m5}CGGG/CCCGGG$ [106, 384]. $SmaI$ может расщеплять $C^{m5}C^{m5}CGGG$ метилированную ДНК [98, 195]. Вероятно, второе метилирование элиминирует эффект $CC^{m5}CGGG$. В отношении $SmaI$, имеются противоречивые результаты: метилирование $m^5CCCGGG$, осуществляемое $MAquI$ [200] или $MHaeIII$ в перекрывающихся $MHaeIII-SmaI$ участках ($GG^{m5}CCCGGG$) [258] блокирует расщепление рестриктазой $SmaI$. Другими исследователями сообщается, что $SmaI$ ограниченно расщепляет гемметилированную последовательность $m^5CCCGGG$ [106]. $SplI$ расщепляет $GT^{m6}AC$ -модифицированную ДНК вируса NY2A хлореллы [258]. $TaqI$ очень медленно расщепляет $T^{hm5}CGA$ [182]. $TaqI$ расщепляет полностью m^5C -замещенную ДНК фага XP12 [258]. $XbaI$ расщепляет гемметилированную последовательность $T^{m5}CTAGA/CTAGA$ при использовании высоких избытков фермента (>100 ед $XbaI/mкг$ ДНК), но не расщепляет этой последовательности при использовании 20—40-кратных функциональных избытков. $XhoII$ медленно расщепляет неметилированную цепь в гемметилированной последовательности $RGAT^{m5}CY/RGATCY$. $XmaI$, согласно одной ссылке, [98], не расщепляет $CC^{m5}CGGG$. В ссылке [106] приведены данные о пониженной скорости расщепления этой последовательности. $XmnI$ расщепляет полностью m^5C -замещенную ДНК фага XP12 [258]. $XmnI$ с пониженной скоростью расщепляет ДНК, в обеих цепях которой метилирована последовательность $GAAN_4TT^{m5}C$, [258].

4.4.4. Чувствительность изошизомеров к местоположению метилированного основания

Изошизомеры могут отличаться по чувствительности в отношении местоположения метилированного основания в узнаваемой последовательности нуклеотидов. Среди исследованных в этом аспекте ферментов удалось выявить 15 пар ферментов по разному реагирующих на метилирование одного и того же основания в узнаваемом участке (табл. 13; в таблице не приведены ферменты-изошизомеры, обладающие такой же чувствительностью к модификациям субстрата). Кроме того рестриктазы $Sau3A I$, $Mbo I$ и $Dpn I$ различаются не только по чувствительности к модификации аденина в узнаваемом участке $5'G^{m6}ATC$, но в случае $Dpn I$ именно только такой (модифицированный) субстрат и расщепляется этим ферментом.

Изошизомеры, отличающиеся по чувствительности к идентичной модификации субстрата

№	Метилированный сайт ^а	Расщепляет ^б	Не расщепляет ^б
1.	C ^{m5} CGG	Msp I	Hpa II
2.	C ^{m4} CGG	Msp I	Hpa II
3.	CC ^{m5} CGGG	Xma I	Sma I
4.	C ^{m5} CWGG	BstN I	EcoR II
5.	G ^{m6} ATC	Sau3A I (Dpn I)*	Mbo I
6.	GAT ^{m5} C	Mbo I	Sau3A I
7.	GAT ^{m4} C	Mbo I	Sau3A I
8.	GGTAC ^{m5} C	Kpn I	Asp718 I
9.	GGTA ^{m5} C ^{m5} C	Kpn I	Asp718 I
10.	GGWC ^{m5} C	Ail I	Ava II
11.	RG ^{m6} ATCY	Xho II	Mfl I
12.	T ^{m5} CCGGA	Acc III	BspM II
13.	TC ^{m5} CGGA	Acc III	BspM II
14.	TCCCGG ^{m6} A	BspM II	Acc III
15.	TCGGG ^{m6} A	Sbo13 I	Nru I

а — см. пункт «а» примечаний к табл. 12. б — фермент классифицируется нечувствительным к метилированию, если скорость расщепления метилированного сайта снижается не более, чем в 10 раз по сравнению со скоростью расщепления неметилированной последовательности. Если метилирование вызывает более чем 20-ти кратную ингибицию фермента по сравнению с неметилированным субстратом, то фермент считается чувствительным к метилированию.

* Dpn I расщепляет только метилированный субстрат.

4.4.5. Чувствительность рестриктаз к m^5CG и m^5CNG метилированию субстрата

Эукариотическая ДНК животного и растительного происхождения содержит m^5C в основном в составе CG динуклеотида. Кроме того значительная его часть в растительной ДНК может находиться в CNG последовательностях. Поэтому сведения о чувствительности рестриктаз, узнаваемые участки которых содержат эти элементы, к их метилированию представляют большой интерес. Эти данные представлены в табл. 14 и 15.

4.4.6. Чувствительность рестриктаз к *dam* и *dcm* зависимому метилированию

Немаловажное практическое значение имеет сведения о чувствительности рестриктаз к метилированию, осуществляемому в *E. coli* *dam* и *dcm* метилазами [101, 168, 243, 247]. Эти метилазы содержатся в большинстве штаммов *E. coli*, используемых для получения различных как природных, так и рекомбинантных молекул ДНК (фаги, плазмиды). Поэтому они оказываются частично или полностью метилированными в следующих участках: 5'G^{m6}ATC [168] (*dam* — зависимое метилирование) и 5'C^{m5}C(A/T)GG [101, 247] (*dcm* — зависимое метилирование).

Таблица 14

Рестриктазы, нечувствительные к метилированию CG и CNG, находящихся в составе узнаваемого участка или частично перекрывающихся с ним^а

^{m5} CG входит в сайт узнавания ^б	^{m5} CG может частично перекрываться с узнаваемым сайтом ^б	^{m5} CNG входит в сайт узнавания ^а	^{m5} CNG может частично перекрываться с узнаваемым сайтом ^а
Acc III (TCCGAA) Asu II (TTCGAA) Ban I (GGCGCC) Cfr9 I (CCCGGG) Msp I (CCGG) Taq I (TCGA) TthNB I (TCGA) Xma I (CCCGGG)	Afl I (GGWCC) BamH I (GGATCC) Bst I (GGATCC) BstE I (GGTNACC) EcoR V (GATATC) Fok I (CATCC) Hae III (GGCC) Hinc II (GAYRAC) Hinf I (CANTC) Hpa I (GTTAAC) Kpn I (GGTACC) Mbo II (TCTTC)	Aac II (CCWGG) Acc III (TCCGGA) Apy I (CCWGG) Ava I (CCCGGG) BspN I (CCWGG) BstN I (CCWGG) Cfr9 I (CCCGGG) Xma I (CCCGGG) Mva I (CCWGG) TaqX I (CCWGG)	Afl I (GGWCC) BstE II (GGTNACC) EcoR V (GATATC) Fok I (CATCC) Hinc II (GTYRAC) Hinf I (GANTC) Hpa I (GTTAAC) Mbo II (TCTTC) Kpn I (GGTACC)

а — см. пункт «а» примечаний к табл. 12. б — в скобках приведена последовательность нуклеотидов, узнаваемая данной рестриктазой. Цитозини, входящие в состав CG или CNG, метилирование которых не препятствует действию данной рестриктазы, выделены полужирным шрифтом.

Таблица 15

Рестриктазы, чувствительные к метилированию CG и CNG, находящихся в составе узнаваемого участка или частично перекрывающихся с ним^а

^{m5} CG входит в сайт узнавания ^б	^{m5} CG может частично перекрываться с узнаваемым сайтом ^б	^{m5} CNG входит в сайт узнавания ^б	^{m5} CNG может частично перекрываться с узнаваемым сайтом ^б
1	2	3	4
Acc II (CGCG) Aha II (GRCGYC) Aos II (GRCGYC) Ava I (CYCGRG) Bep I (CGCG) Bsp MII (TCCGGA) BssH II (GCGCC) BstU I (CGCG) BsuE I (CGCG) BsuM I (CTCGAG)	Apa I (GGGCCC) Asp718 I (GGTACC) Ava II (GGWCC) Bme216 I (GWCC) BspM I (ACCTGC) EcoR I (GAATTC) Hga I (GACGC) Nhe I (GCTAGC) Sau3A I (GATC) Sau96 I (GGNCC)	Bbv I (GCNGC) BspM II (TCCGGA) BsuF I (CCGG) BsuQ I (CCGG) Cfl6 I (CAGGTG) Cfr10 I (RCCGGY) Csp I (CGGWCCG) Eag I (CGGCCG) EcoR II (CCWGG) Fnu4 I (GCNGC)	Alu I (AGCT) Apa I (GGGCCC) Asp718 I (GGTACC) Ava II (GGWCC) BamH I (GGATCC) Bgl II (AGATCT) Bme216 I (GGNCC) BspM I (ACCTGC) Bst I (GGATCC) BsuR I (GGCC)

⁵ CG входит в сайт узнавания ^б	^{m5} CG может частично перекрываться с узнаваемым сайтом ^б	^{m5} CNG входит в сайт узнавания ^б	^{m5} CNG может частично перекрываться с узнаваемым сайтом ^б
1	2	3	4
BsuR II (CTCGAG) Cfo I (GCGC) Cla I (ATCGAT) Csp I (CGGWCCG) Eaq I (CGGCCG) Eco47 III (AGCGCT) FnuD II (CGCG) Fsp I (TGCGCA) Hae II (RGCY) Hap II (CCGG) Hha I (GCGC) HinP I (GCGC) Hpa II (CCGG) Mae II (ACGT) Mlu I (ACGCGT) Nae I (GCCGGC) Nar I (GGCGCC) Ngo I RGCY) Not I (GCGGCGC) Pvu I (CGATCG) Rsr II (CGGWCCG) Sal I (GTCGAC) Sma I (CCCGGG) Tha I (CGCG) Xho I (CTCGAG) Xor II (CGATCG)	Sfi I (GGCCNGGCC)	Hap II (CCGG) Hpa II (CCGG) Mph I (CCWGG) Msp I (CCGG) Nae I (GCCGGG) Nci I (CCWGG) Not I (GCGGCCGC) Pst I (CTGCAG) Pvu II (CAGCTG) Rsr II (CGGWCCG) Sac II (CCGCGG) ScrF I (CCNGG) Sma I (CCGGG) Sso II (CCNGG) Xma III (CGGCCG)	Cfr13 I (GGNCC) Dra II RGGCCY) EcoR I (GAATTC) Hae III (GGCC) Hga I (GACGC) Mfi I (RGATCY) Ngo II (GGCC) Nhe I (GCTAGC) Sau 36 I (GATC) Sau96 I (GGNCC) Sfi I (GGCCN ₅ GGCC) Sin I (GCWCC) Xho II (RGATCY) Xor II (CGATCG)

а — см. пункт «а» примечаний к табл. 12. б — в скобках приведена последовательность нуклеотидов, узнаваемая данной рестриктазой. Цитозины, входящие в состав CG или CNG, метилирование которых препятствует действию данной рестриктазы, выделены полужирным шрифтом.

В настоящее время для ряда рестриктаз, участки узнавания которых полностью или частично перекрываются с dcm и dam сайтами, определено влияние обсуждаемого метилирования на их способность расщеплять субстрат. Эти данные представлены в табл. 16 и 17.

Чувствительность рестриктаз к dcm метилированию

Рестриктазы, чувствительные к dcm метилированию		Рестриктазы, не чувствительные к dcm метилированию	
Название фермента (изоизомеры) ^б	Специфичность ^а	Название фермента (изоизомеры) ^б	Специфичность ^а
Ava II (Bme216 I, Eco47 I) Apa I Asp718 I Dra II (Eco0109 I) Eae I EcoR II (Mph I) Sau 96 I ScrF I (Sso II) Stu I (Aat I)	GGWCC GGGCCC GGTACC RGGNCCY YGGCCR CCWGG GGNCC CCNGG AGGCCT	BamH I (Bst I) Afl I Bgl I BstE II BstN I (Aac I, Apy I, BspN I, Mva I, TaqX I) CviNY I Fok I Hae III Kpn I Nar I Sfi I	GGATCC GGWCC GCCN ₅ GGCT GGTNACC CCWGG CC CATCC GGCC GGTACC GGCGCC GGCCN ₅ GGCC

а — см. пункт «а» примечаний к табл. 12. б — в скобках приведены названия изоизомеров аналогично реагирующих на dcm метилирование.

Таблица 17

Чувствительность рестриктаз к dam метилированию

Рестриктазы, чувствительные к dam метилированию		Рестриктазы, не чувствительные к dam метилированию	
Название фермента (изоизомеры) ^б	Специфичность ^а	Название фермента (изоизомеры) ^б	Специфичность ^а
Bcl I (AtuC I, BspX II, BstG I, Spe I) Cla I (Ban III, BspX I) Hph I Mbo I (BstE II, CviA I, Dpn II, Mme II, Nde II) Mbo II (Ncu I) Nru I (Ama I) Taq I (Tfl I, TthHB I) Xba I Acc III Bin I (Alw I) BspH I Mfl I	TGATCA ATCGAT GGTGA GATC GAAGA TCGCGA TCGA ICTAGA TCCGGA GGATC TCATGA RGATCY	BamH I (BamF I, BamK I, Bst I) Bgl II (Ncr I) BspM II (Mro I) Pvu I (Rsh I, Xor I) Sau3A I (FnuE I, Pfa I, Dpn I*, Cfu I*, Nan II*, NmuD I*, NmuE I*) Spo I Xho I (BstYI)	GGATCC AGATCT TCCGGA CGATCG GATC TCGCGA RGATCY

а — см. пункт «а» примечаний к табл. 12. б — в скобках приведены названия изоизомеров, аналогично реагирующих на dam метилирование.

* — расщепляет только при наличии ^{m6} в обеих цепях узнаваемой последовательности.

4.4.7. Чувствительность метилаз к модификациям субстрата

Чувствительностью к сайт-специфическому метилированию отличаются не только рестриктазы, но и другие белки, взаимодействующие с ДНК [357, 387]. Метилазы не являются в этом отношении исключением. Сайт-специфические модификации типа m^5C , m^6A , m^4C и hm^5C (5-гидроксиметилцитозин) в неканонических положениях иногда ингибирует действие некоторых метилаз. Сводные данные представлены в табл. 18.

Таблица 18

Чувствительность метилаз к модификациям субстрата

Метилаза (специфичность) ^а	Не блокируется предварительной модификацией	Блокируется предварительной модификацией
MAlu I (AG m^5 CT)		AG m^4 CT
MbamH I (GGAT m^4 CC)	GG m^6 ATCC	GGATC m^5 C
MBst I (GGAT m^6 CC)	GG m^6 ATCC	
MCfr6 I (CAG m^4 CTG)		CAG m^5 CTG
MClal I (ATCG m^6 AT)	m^6 ATCGAT	
	AT m^5 CGAT	
	T m^5 CGA	
MCviB III (TCG m^6 A)	GAATT m^5 C	G m^6 AATTC
MEcoR I (GA m^6 AATC)		C m^4 CWGG
MEcoR II (C m^5 CWGG)		
MEco dam (G m^6 ATC)	GAT m^5 C	
	GAT hm^5 C	
	GAT m^4 C	
MFok IA (GG m^6 ATG)	CATC m^5 C	CAT m^5 CC
MHha I (G m^5 CGC)	GCG m^5 C	
MHha II (G m^6 ANTC)	GANT m^5 C	m^5 CCGG
MHpa II (C m^5 CGC)		
MHph I (T m^5 CACC)	GGTG m^6 A	
MMbo I (G m^6 ATC)	GAT m^5 C	
MMbo II (GAAG m^6 A)	T m^5 CTT m^5 C	
MMsp I (m^5 CCGG)		C m^5 CCGG
MMva I (C m^4 CWGG)	C m^5 CWGG	
MPvu II (CAG m^4 CTG)		CAG m^5 CTG
MEcoT2 dam (G m^6 ATY)	GAT hm^5 C	
MEcoT4 dam (G m^6 ATC)	GAT hm^5 C	
MTaq I (TCG m^6 A)	T m^5 CGA	

а — см пункт «а» примечаний к табл. 12., б — см. пункт «б» примечаний к табл. 13.

Интересно отметить, что имеется пример отсутствия ингибции реакции метилирования даже в случае действия на субстрат метилаз, узнающих одинаковые последовательности нуклеотидов, и модифицирующих одно и то же основание в разных метакх. Речь идет о MEcoR II и MMva I, которые узнают последовательность 5'CC(A/T)GG и модифицируют цитозин, расположенный рядом с осью симметрии, образуя m^5C и m^4C соответ-

ственно. Последовательная обработка *in vitro* субстрата МЕСоR II и ММvа I приводит к образованию N⁴,5-диметилцитозина [103]. Таким образом ММvа I оказалась нечувствительной к метилированию цитозинового остатка по 5-тому положению. Модификация по N⁴-положению, наоборот ингибирует МЕСоR II. В другом аналогичном исследованном случае, касающемся ферментов МАIu I, МРvи II (и ее изометимера МСfг6 I), узнающих соответственно 5'AGCT (образуется ^{m5}C) и 5'СAGCTG (образуется ^{m4}C) имела место ингибция последующего альтернативного метилирования по этому же цитозиново-му остатку [102].

Как следует из данных представленных в табл 18, аналогично реагирует на модификацию субстрата МВamН I.

4.5. Практическое применение сведений о различных проявлениях субстратной специфичности рестриктаз

Сведения о различных проявлениях субстратной специфичности рестриктаз, наряду с их теоретической значимостью, имеют большое практическое значение — являются предпосылкой для целенаправленного использования этих ферментов в различных отраслях их применения в качестве аналитических реагентов. В первую очередь это замечание относится к изучению специфики метилирования эукариотической ДНК. В этой ДНК в качестве минорного основания присутствует 5-метилцитозин [46, 129]. Подавляющее его большинство содержится в составе СG-динуклеотида [46, 129]. Именно использование рестриктаз, чувствительных к метилированию цитозина, впервые открыло возможность изучать вышеуказанный вопрос [124, 129, 379, 416].

Интересным практическим приложением чувствительности рестриктаз к метилированию является создание при его помощи новых вариантов фрагментирования субстрата [274]. Этот метод заключается в модификации ДНК сайт-специфической метилазой, узнаваемый участок которой частично перекрывается с таковым рестриктазы, при помощи которой предполагается расщеплять субстрат. Таким приемом можно изменить частоту расщепления субстратной ДНК. Например, рестриктаза Nhe I способна расщеплять ДНК аденовируса-2 в четырех местах, содержащих последовательность 5'GCTAGC. Метилирование этой ДНК при помощи метилазы Alu I, модифицирующей цитозиновый остаток в последовательности 5'AG^mCT [25], в перекрывающихся участках (5'AG^mCTAGC) делает устойчивой к действию Nhe I последовательность 5'GCTAGC [274]. Вследствие этого Nhe I расщепляет ДНК аденовируса-2 только в одном участке [274]. Таким образом *in vitro* можно достичь совершенно нового варианта фрагментирования ДНК, неосуществимого ни одной известной рестриктазой.

Набор имеющихся рестриктаз и метилаз в настоящее время позволяет получать десятки вариантов фрагментации ДНК [22, 274]. Особенно следует выделить работы, направленные на разработку методов мегабазового картирования ДНК, так как ассортимент прототипов с более чем семичленными узнаваемыми участками пока ограничен несколькими наименованиями. Для увеличения специфичности предлагается комбинация метилазы, образующей m^6A в участках, перекрывающихся с последовательностью узнаваемой RDrp I — G^mATC . Так, совместное применение этого фермента с Mtaq I, узнающей тетрануклеотид $5'TCG^m6A$ и метилирующей в нем аденин дает расщепление 8-ми звенных участков $5'TCG^mATCGA$ а комбинация

с MMbo II ($GAAG^m6A$) к декануклеотидному сайту $5'GAAG^mA TCTTC$
 $3'CTTC T^mAGAAG$ [256].

Недавно предложен подход получения 10—14-тинуклеотидного «узнавания» при помощи двух метилаз и рестриктазы [257]. Он основан на чувствительности метилаз к определенным вариантам неканонического метилирования. Например, в случае наличия последовательности $5'CCGGATCCGG$, представляющей собой участок узнаваемый RMBamH I ($5'GGATCC$), перекрытый с обеих сторон сайтами MНra II ($5'CCGG$), метилирование ДНК метилазой Нra II приводит к модификации крайних цитозинов сайта BamH I:

$5'C^mC GGATC^mC GG$
 $3'G G^mCCTAG G^mCC$

Такая модификация защищает узнаваемый участок от действия MBamH I, в то время как все другие участки ДНК $5'GGATCC$ метилируются этой метилазой по внутреннему цитозину и защищаются от действия RBamH I. Последующая обработка ДНК препаратом RBamH I приводит к расщеплению по указанным 10-ти звенным сайтам, так как рестриктаза нечувствительна к модификации внешних цитозиновых остатков [257].

Место расщепления субстрата не играет роли при физическом картировании ДНК. Но существует ряд задач, для которых структура концов имеет вполне определенное значение. Фрагменты с выступающим 3'-концом могут быть удлинены с помощью терминальной трансферазы [326]. Это находит применение в опытах по клонированию ДНК [187]. Наличие липких концов облегчает получение рекомбинантных ДНК *in vitro*. Однако рекомбинанты можно получать только с фрагментами, образованными действием на субстрат одной и той же рестриктазы или рестриктаз, узнающих различающиеся последовательности, но образующих идентичные липкие концы. Примером может быть пара рестриктаз BamH I и Sau3A I, узнающих соот-

ветственно 5'G⁺GATCC [374] и 5'⁺GATC [362] и расщепляющих их в местах указанных стрелками.

С практической точки зрения представляют интерес альтернативные прототипы, различающиеся по месту расщепления субстрата, расширяющие потенциальные возможности проведения экспериментов. Например, при получении рекомбинантных молекул ДНК использование рестриктазы, дающей тупые концы вместо липких, позволяет клонировать по этому сайту вектора любые тупоконечные фрагменты.

Интересные возможности представляют рестриктазы, узнающие определенную последовательность нуклеотидов, но дающие разрыв в стороне с образованием выступающих концов. Эти ферменты были отнесены к IIS типу [364]. Если таким ферментом разрезать ДНК, то при действии лигазы *in vitro* она соберется в первоначальную структуру. Таким образом, можно рестриктизировать в пробирке небольшой геном или его отдельные части [49].

Благодаря работам Подхайской и Шибальского [296, 364], способность рестриктаз IIS типа расщеплять в стороне от узнаваемого участка нашла оригинальное применение для расщепления одонитевой ДНК в любом предетерминированном сайте. Впервые это было продемонстрировано на примере RFok I [296]. Это подход реализуется таким образом, что синтезируется олигонуклеотид, содержащий в одном конце самокомплементарные последовательности, которые после спаривания образуют участок узнаваемый RFok I. Структура другого конца подбирается таким образом, чтобы она была комплементарной к участку исследуемой одонитевой ДНК в том месте, где планируется провести ее расщепление. После гибридизации синтетического олигонуклеотида с ДНК образуется двухнитевая структура, содержащая сайт узнаваемый RFok I и следующий за ним участок исследуемой ДНК. Обработка такого комплекса ферментом дает расщепление субстрата в выбранном месте.

В настоящее время, как уже отмечалось, известны 143 прототипа рестриктаз. Таким образом, имеется возможность расщеплять ДНК по 143 различающимся по структуре участкам. В конкретных экспериментах весь этот набор конечно не используется. Вместе с тем успешное решение таких задач, как физическое картирование различных ДНК, выделение их фрагментов, определение нуклеотидной последовательности, разрыв ДНК в желаемом месте (например, сразу за структурной частью гена) во многом зависит от возможностей, представленных существующими вариантами субстратной специфичности рестриктаз. Учитывая большое структурное разнообразие ДНК очевидно, что имеющийся набор этих ферментов еще далек от удовлетворения всех нужд научных исследований. Поэтому поиск рестриктаз, обладающих способностью специфически расщеплять ДНК в ранее недоступных для этого местах, не теряет

актуальности. Актуальным является и выявление альтернативных прототипов — ферментов, узнающих одинаковые последовательности нуклеотидов, но расщепляющих их в разных местах или рестриктаз по разному чувствительных к характеру метилирования субстрат. За их счет число «прототипностей», характерных для известных рестриктаз, достигает 166. В это число входит 143 прототипов по узнаваемой последовательности нуклеотидов, 10 альтернативных по месту расщепления и 13 — по чувствительности к метилированию. С практической точки зрения это означает, что имеется 166 возможностей различного исхода воздействия рестриктаз на субстрат.

5. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕСТРИКЦИОННЫХ ЭНДОНУКЛЕАЗ

Основным требованием при использовании рестриктаз в генно-инженерных и других молекулярно-генетических экспериментах является функциональная чистота, а именно, отсутствие примесей неспецифических нуклеаз и фосфатаз. Поэтому, основные усилия при выделении и очистке рестрикционных эндонуклеаз направлены на получение функционально чистых их препаратов. Однако, для структурно-кинетических исследований эндонуклеаз рестрикции требуются относительно большие количества гомогенных препаратов ферментов. Несмотря на то, что как уже отмечалось, в настоящее время охарактеризовано (и в большинстве случаев выделено) более 1000 рестриктаз, лишь небольшая их часть получена в гомогенном состоянии.

Физико-химические свойства гомогенных препаратов рестриктаз в настоящее время изучены недостаточно (исключение составляет только рестриктаза EcoR I) и в большинстве случаев ограничены определением молекулярной массы методами гель-фильтрации и электрофореза. В таблице 19 приведены некоторые физико-химические свойства гомогенных препаратов рестриктаз.

Как видно из таблицы 19, большинство эндонуклеаз рестрикции II-го типа представляют собой белки, построенные из одной или нескольких идентичных полипептидных цепей, с относительно небольшой молекулярной массой, что, конечно, является определенным достоинством при структурных исследованиях. Отдельного рассмотрения заслуживает вопрос о четвертичной структуре эндонуклеаз рестрикции. Как видно из данных, представленных в табл. 19, некоторые рестриктазы, такие как Bgl I, Bsp I, Bcn I, EcoR V и др., существуют в растворе в форме мономера, а для некоторых рестриктаз, таких как BamH I, EcoR I, EcoR II и ряда других, установлена субъединичная организация фермента. Так для рестриктазы EcoR I было показано [266], что обычно в растворе активной формой являет-

Некоторые физико-химические свойства
гомогенных препаратов эндонуклеаз рестрикции

Рестриктаза	Узнаваемая последовательность	Мол. масса*, дальтоны	Активная Форма Фермента	pI	Литература
BamH I	GGATCC	22 000±500	димер (тетрамер)	5,3	[355]
Bcl I	TGATCA	25 000	димер		[83]
Bgl I	GCCNNNN- NGGC	31 000	мономер		[80]
		61 000	димер		[196]
Bgl II	AGATCT	127 000	димер		[81, 185, 294]
		35 000	мономер		[207, 210]
Bsp I	GGCC	35 000	мономер		[290]
Bcn I	CCGG	28 000±1500	мономер	6,2	[93, 95]
Bsu I	GGCC	68 000	мономер		[112]
Bst I	GGATCC	26 000	мономер		[220]
			димер		[219]
Dpn I	GATC	20 000**			[266]
Dpn II	GATC	70 000**	димер		[82]
EcoR I	GAATTC	28 500±500	тетрамер димер	6,3	[23]
			тетрамер		[31]
EcoR II	CC(A/T)GG	40 000 44 000±1000	димер		[354]
			димер		[239]
EcoR V	GATATC	25 000	мономер		[173]
Hind II	GTPyPuAC	70 000			[174]
Hha II	GANTC	24 000	димер		
Hpa I	GTTAAC	29 000	мономер		
		34 000			
Hpa II	CCGG	40 000	мономер (димер)		
Mva I	CC(A/T)GG	31 300±400	мономер	4,6	[38]
Hgo II	GGCC	11 000 65 000*	гексамер		[110]
Pal I	GGCC	31 000±1000	димер	5,3	[71]
SalG I	GTCGAC	29 000	димер		[244]
Taq I	TCGA	22 500	мономер		[335]
Xho I	CTCGAG	21 000	димер		[145]

* — по данным SDS электрофореза в полиакриламидном геле

** — по данным гель фильтрации

ся димерная форма фермента, однако, при более высоких концентрациях белка, возможно образование тетрамеров. Субъединичное строение комплекса рестриктазы EcoR I с ДНК было подтверждено методом рентгено-структурного анализа [250].

Следует отметить относительно высокую склонность к агрегации в растворе некоторых эндонуклеаз рестрикции. Так, эндонуклеаза рестрикции BamH I в растворе обычно существует в форме димера или тетрамера [355], однако, при низких ион-

ных силах, отмечено существование ряда мультимерных форм, вплоть до гексадодекамера [172]. Таким образом, по-видимому, ряд рестриктаз в растворе, в зависимости от условий (концентрации белка, ионная сила, рН и др.) могут существовать в различной структурной форме, не исключая и мономерную форму фермента. Следует подчеркнуть, что в случае *RMva I*, для которой не удалось показать существования четвертичной структуры при разных условиях, была обнаружена [38] димеризация фермента при образовании комплекса с ДНК, что может быть справедливо и для других рестриктаз, для которых было определено наличие только мономерной формы.

Как можно судить по немногочисленным данным относительно изоэлектрической точки эндонуклеаз рестрикции (см. табл. 19), рестриктазы являются слабокислыми белками (значения *pI* находятся в области 4,6—6,3). Этот факт, на первый взгляд, вызывает некоторое изумление, так как наличие отрицательного заряда на белковой глобуле должно препятствовать образованию комплекса с отрицательно заряженной молекулой ДНК, однако, не следует забывать, что изоэлектрическая точка отражает электростатическое состояние всей белковой глобулы и поэтому не исключает существования положительно заряженных участков.

6. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА РЕСТРИКТАЗ

Рестрикционные эндонуклеазы II-го типа являются гидролазами, специфически взаимодействующими с определенными короткими нуклеотидными последовательностями двухцепочечной ДНК и расщепляющими фосфодиэфирную связь в определенном месте относительно участка узнавания. Несмотря на то, что в настоящее время известно более 1000 рестриктаз, и более ста среди них широко используются в качестве аналитических реагентов, кинетика и механизм реакций катализируемых этими ферментами изучены недостаточно. С чем это связано? Во-первых, в большинстве экспериментов обычно используется избыток эндонуклеазы рестрикции, чтобы обеспечить полное расщепление ДНК, поэтому не требуется знания определенных кинетических параметров фермента. Во-вторых, для изучения кинетики реакций ДНК с эндонуклеазами рестрикции, используются довольно сложные и относительно длительные количественные методы регистрации каталитической активности рестриктаз, например, разделение рестрикционных фрагментов ДНК электрофорезом в агарозном или полиакриламидном геле с последующим определением относительного количества продуктов УФ-сканированием геля, «окрашенного» бромистым этидием (или фотонегатива этого геля) или подсчетом радиоактивности фрагментов при использовании меченой ДНК (разд. 1, часть II).

Следует отметить, что методы, предложенные для количественной регистрации активности рестриктаз являются методами с отбором проб в течение реакции и только в одной работе [159] был предложен непрерывный количественный метод регистрации скорости гидролиза ДНК, основанный на измерении флуоресценции при гидролизе кольцевой ДНК с интеркалированным бромистым этидием. В-третьих, для структурно-кинетических исследований рестриктаз требуются довольно большие количества, желательно, гомогенного белкового препарата фермента, что стало реальным лишь в последние годы в результате работ по клонированию генов целого ряда рестриктаз и созданию суперпродуктивных штаммов (см. разд. 5, часть II). В последние годы интерес к структурно-кинетическому изучению рестриктаз стал возрастать в связи с развитием исследований, направленных на установление механизма специфического узнавания ДНК белками, так как в этом ключе эндонуклеазы рестрикции являются исключительно интересными объектами.

6.1. Каталитические свойства рестрикционных эндонуклеаз

6.1.1. Эффективные кинетические параметры

В большинстве работ по изучению кинетических свойств эндонуклеаз рестрикции, обычно, ограничиваются лишь определением кажущихся значений кинетических параметров: константы Михаэлиса K_m и каталитической константы $K_{кат}$ и максимальной скорости V_m . В таблице 20 приведены кинетические параметры реакции гидролиза ДНК для ряда рестрикционных эндонуклеаз.

Несмотря на то, что кажущиеся значения K_m являются мало информативными в кинетическом смысле (так как не позволяют прогнозировать механизм каталитического превращения субстрата), анализ данных, приведенных в табл. 20 позволяет сделать несколько заключений общего характера:

1) взаимодействие эндонуклеаз рестрикции с ДНК характеризуется очень низкими значениями константы Михаэлиса (в большинстве случаев порядка 10^{-9} — 10^{-10} М). Несмотря на то, что константа Михаэлиса в большинстве случаев является эффективной величиной и не является истинной мерой связывания субстрата с ферментом, низкие значения этой константы отражают высокое сродство рестрикционных эндонуклеаз с ДНК;

2) максимальная скорость реакции гидролиза ДНК эндонуклеазами рестрикции является сравнительно низкой. Так значения каталитической константы $K_{кат}$, являющейся мерой числа оборотов или каталитических актов в определенный интервал времени, находятся в интервале $0,12$ — 8 мин $^{-1}$. Таким образом

**Кинетические параметры
некоторых рестрикционных эндонуклеаз**

Фермент	$K_M, M \times 10^{-7}$	$K_{кат} \text{ мин}^{-1}$	Субстратная ДНК	Литература
EcoR I	8	3,8	ColE I	[266]
EcoR I	3	8	ColE I	[398]
EcoR I	3	—	ColE I	[399]
EcoR I	0,4	1	ColE I	[398]
EcoR I	5	1,8	pBR322	[225]
EcoR I	10	1,3	λ	[75]
EcoR I	30	1,5	SV 40	[149]
BamH I	0,3	2,2	pJC80	[176]
BamH I	0,36	—	pJC80	[176]
BamH I	0,9	—	pJC80	[175]
Hpa II	—	0,18	SV 40	[51]
Bgl II	—	1,75	p2H1	[185]
SalG I	0,5	0,12	pMB9	[245]

видно, что рестрикционные эндонуклеазы являются «медленными» ферментами.

Причины этого явления можно раскрыть, анализируя отношение $K_{кат}/K_M$, представляющие собой кажущуюся константу скорости второго порядка для реакции между свободным ферментом и свободным субстратом. Как можно легко подсчитать из данных, приведенных в табл. 20, для ферментов EcoR I и BamH I величина значения параметра $K_{кат}/K_M$ лежит в области значений 10^7 — 10^8 M/c^{-1} и приближаются к лимитируемой диффузией частоте столкновения между субстратом и ферментом [327]. Таким образом, низкие значения каталитической константы скорости реакции при гидролизе ДНК, являются следствием высокоспецифичного связывания ДНК с эндонуклеазой рестрикции. С другой стороны, значения параметра $K_{кат}/K_M$, приближающегося к диффузионно-лимитируемому значению указывают на то, что рестрикционные эндонуклеазы являются эволюционно совершенными ферментами, т. е. биокатализаторами, приблизившимся к пределу ускорения данной химической реакции. Следует еще раз подчеркнуть, что низкая скорость каталитического превращения ДНК эндонуклеазой рестрикции является своего рода платой за очень высокое сродство фермента к специфическим последовательностям ДНК.

6.1.2. Механизм реакции гидролиза кольцевых форм ДНК эндонуклеазами рестрикции

Изучение механизма реакции гидролиза субстрата эндонуклеазами рестрикции является одним из основных этапов исследования природы взаимодействия ДНК с этими ферментами.

Механизм реакции гидролиза ДНК эндонуклеазами рестрикции II-типа наиболее подробно изучен для рестриктазы EcoR I. Так уже в первой работе [266], посвященной изучению физико-химических и каталитических свойств эндонуклеазы рестрикции EcoR I, было показано, что при гидролизе кольцевой суперспиральной формы ДНК ColE I, содержащей уникальный участок узнавания рестриктазы EcoR I, в определенных условиях наблюдается накопление промежуточного соединения реакции гидролиза плазмидной ДНК, а именно, кольцевой формы ДНК, содержащей одонитевый разрыв. Это позволило авторам [266] предположить, что расщепление отдельных цепей двухспиральной ДНК ColE I рестриктазой EcoR I происходит не одновременно, а последовательно, и при определенных условиях возможна диссоциация фермент-субстратного комплекса — промежуточного продукта гидролиза ДНК. Количество кольцевой формы ДНК, содержащей одонитевый разрыв, зависело от температуры: при температуре 0° С кольцевая форма ДНК, содержащая одонитевый разрыв составляла >90%, а при температуре 30° С, накопления в растворе такой ДНК не наблюдалось. Однако, проведение реакции гидролиза ДНК ColE I при температуре 30° С при более низкой концентрации субстрата, позволило выявить образование кольцевой формы ДНК и в этих условиях [327]. Таким образом было показано [266, 327], что расщепление ДНК ColE I рестриктазой EcoR I осуществляется при определенных условиях по несогласованному механизму, т. е. сначала происходит гидролиз одной цепи ДНК с образованием промежуточной формы, содержащей одонитевый разрыв, а затем расщепляется вторая цепь. Однако в зависимости от температуры, расщепление второй цепи может происходить и в составе одного и того же фермент-субстратного комплекса.

Дальнейшее детальное изучение [328] кинетики реакции гидролиза ряда кольцевых форм ДНК, таких как ДНК вируса SV 40, ДНК репликативной формы бактериофага G4 и ДНК ColE I, эндонуклеазой рестрикции EcoR I в условиях избытка субстрата при температуре 37° С, показало, что в случае ДНК фага G4 и ДНК ColE I не наблюдается накопления промежуточной формы ДНК, содержащей одонитевый разрыв. При гидролизе ДНК вируса SV 40 в этих же условиях в растворе накапливается около 25% ДНК в такой форме. В результате этих исследований [328] была предложена следующая общая кинетическая схема гидролиза двухцепочечной плазмидной ДНК эндонуклеазой рестрикции EcoR I:



где I — суперспирализованная кольцевая форма ДНК;

II — кольцевая форма ДНК, содержащая однонитевый разрыв;

III — линейная форма ДНК.

Согласно предложенной схеме на первой стадии процесса происходит образование фермент-субстратного комплекса E·I эндонуклеазы рестрикции EcoR I и двухцепочечной плазмидной ДНК. Ключевым моментом схемы является образование комплекса E·II эндонуклеазы рестрикции EcoR I с кольцевой формой ДНК, содержащей однонитевый разрыв, полученной в результате гидролиза фосфодиэфирной связи в одной из цепей ДНК. В дальнейшем в зависимости от условий (природы субстрата, температуры и т. д.) может происходить или расщепление второй цепи ДНК в составе того же комплекса E·II с образованием комплекса E·III-фермента с линейной формой ДНК или диссоциация комплекса E·II с образованием свободного фермента и кольцевой ДНК, содержащей однонитевый разрыв, что и приводит к накоплению формы II в растворе. Эта схема позволила объяснить различия в механизмах гидролиза ДНК вируса SV 40 с одной стороны и ДНК ColE I и бактериофага G4 с другой. В случае ДНК вируса SV 40 происходит диссоциация фермент-субстратного комплекса E·II, приводящая к накоплению кольцевой формы ДНК в растворе. Было высказано предположение, что различия в механизме гидролиза этих ДНК молекул (вируса SV 40; ДНК ColE I и бактериофага G4) являются результатом взаимодействия рестриктазы EcoR I с различными нуклеотидными последовательностями, фланкирующими участок узнавания рестриктазы EcoR I. Однако, такое предположение не позволяет объяснить различия в механизме гидролиза кольцевой ДНК ColE I в зависимости от температуры (см. выше).

Детальное изучение [34] влияния температуры на гидролиз ДНК ColE I рестрикционной эндонуклеазой EcoR I выявило довольно сложную зависимость механизма реакции от температуры. Так, в области температур 0—10° С, наблюдается накопление в растворе формы ДНК, содержащей однонитевый разрыв, что подтверждает данные работы [266]. В области температур 25—37° С накопление кольцевой формы ДНК в растворе не наблюдается, так как расщепление обеих цепей ДНК происходит, по-видимому, в составе одного из того же фермент-субстратного комплекса, с образованием линейной формы ДНК. Однако, в области температур 40—55° С, наряду с образованием линейной формы ДНК, наблюдается накопление кольцевой формы ДНК.

Можно предположить что изменение механизма реакции в зависимости от температуры, связано с различным ее влиянием на отдельные кинетические константы элементарных стадий реакции гидролиза и смене лимитирующей стадии реакции гидро-

лиза при изменении температуры. Так, если предположить, что при низких температурах ($0-10^{\circ}\text{C}$) $k_5 > k_3$, то промежуточная форма ДНК, содержащая однонитевый разрыв (форма II), будет накапливаться в растворе. При повышении температуры (в области температур $25-37^{\circ}\text{C}$) из-за предполагаемой разницы в энергиях активации процессов может реализоваться обратное соотношение констант скоростей элементарных стадий, а именно, $k_3 > k_5$. Это должно привести к тому, что не будет наблюдаться накопления формы ДНК, содержащей однонитевый разрыв в растворе.

Следуя логике вышеизложенных рассуждений аналогично можно объяснить и влияние фланкирующих участков узнавания последовательностей, что имеет место в случае ДНК SV 40, ColE I и G4. Это влияние может проявиться именно на «кинетических» стадиях реакции, приводя к изменению ее энергии активации, в результате дополнительных взаимодействий определенных нуклеотидных последовательностей с ферментом в переходном состоянии реакции и, тем самым, оказывать влияние на лимитирующую стадию процесса.

Дальнейшее развитие исследования по изучению механизма гидролиза плазмидной ДНК эндонуклеазами рестрикции получили в работах Халфорда с сотр. [159—162, 164, 245, 246]. В результате кинетических исследований процесса гидролиза плазмиды рМВ9, содержащей один участок узнавания рестриктазы EcoR I, было установлено, что происходит накопление в растворе формы ДНК, содержащей однонитевый разрыв. Таким образом механизм реакции является аналогичным таковому, предложенному для гидролиза ДНК вируса SV 40 рестриктазой EcoR I [328].

Изучение этой реакции, в условиях избытка фермента относительно субстрата, при использовании непрерывного метода регистрации активности эндонуклеазы EcoR I методом флуоресценции [159] позволило выявить дополнительные детали в механизме гидролиза ДНК.

Было показано, что вариант гидролиза плазмидной ДНК рМВ9 эндонуклеазой рестрикции EcoR I зависит от начального состояния реакции: в том случае, когда реакция начиналась смешиванием раствора фермента с раствором ДНК, содержащим ионы Mg^{2+} , реакция шла по пути образования свободной формы ДНК II (содержащей однонитевый разрыв). Однако, в том случае, когда на первой стадии реакции происходило смешивание раствора фермента с ДНК с последующим добавлением ионов Mg^{2+} , реализовался механизм гидролиза ДНК, приводящий к одновременному расщеплению обеих цепей ДНК в составе одного и того же фермент-субстратного комплекса.

Для объяснения этих фактов было выдвинуто предположение, что лимитирующей стадией гидролиза являются конформа-

ционные превращения рестриктазы, протекающие при связывании с ДНК. В первом случае, при образовании комплекса ДНК с рестриктазой EcoR I, происходят конформационные изменения в одной субъединице фермента, в результате которых эта субъединица фермента активируется и осуществляется расщепление фосфодиэфирной связи в одной цепи ДНК. Однако, так как конформационные изменения протекают медленнее всех других стадий, фермент успеваеет диссоциировать с ДНК до активации следующей субъединицы. Во втором случае, когда на первой стадии реакции образуется комплекс фермента с ДНК и реакция начинается добавлением ионов Mg^{2+} , проходит время, достаточное для активации в результате конформационных изменений обеих субъединиц, что и приводит к реализации согласованного механизма расщепления субстрата при добавлении ионов Mg^{2+} . На первый взгляд эта гипотеза опровергала предположение, что различия в механизме гидролиза ряда ДНК зависят от нуклеотидных последовательностей, окружающих участок узнавания. Это противоречие могло бы быть исключено в том случае, если фланкирующие нуклеотидные последовательности оказывают влияние, именно, на скорость конформационного перехода, приводящего к активации фермента в комплексе с ДНК, что позволило бы согласовать обе гипотезы. Гипотеза о конформационных изменениях в рестриктазе EcoR I, протекающих в комплексе с ДНК, еще ждет экспериментальной проверки.

Несмотря на то, что кинетика гидролиза кольцевых молекул ДНК другими эндонуклеазами рестрикции II-го типа, исследована в настоящее время для узкого круга рестриктаз, имеющиеся данные подтверждают общность механизма, предложенного для рестриктазы EcoR I и детально обсужденного выше. Так было показано [159], что при гидролизе плазмидных ДНК рестриктазами Sal I и BamH I, не наблюдается накопления промежуточного продукта в виде кольцевой ДНК, содержащей односторонний разрыв и расщепление обеих цепей ДНК происходит, по-видимому, в составе одного и того же промежуточного фермент-субстратного комплекса. Однако, в случае гидролиза плазмиды рMB9 рестриктазой BamH I, при температуре 1° С, показано [355] накопление промежуточной формы ДНК, содержащей односторонний разрыв. Механизм гидролиза плазмидных ДНК, приводящий к накоплению промежуточного продукта в виде кольцевой ДНК был также установлен для Hra II [327] и Hha II [197].

6.1.3. Исследование процесса гидролиза линейных форм ДНК эндонуклеазами рестрикции

В предыдущем разделе, посвященном обсуждению механизмов гидролиза двухспиральной ДНК, речь в основном шла о

взаимодействии с кольцевыми формами ДНК. Использование этих субстратов имеет некоторые преимущества перед линейными. Во-первых исследование кинетики гидролиза таких ДНК молекул затруднено, так как в случае применения метода электрофореза необходимо использовать специальные приемы для идентификации однонитевого разрыва. Во-вторых, длинные линейные двухспиральные молекулы, например, ДНК фага λ , содержат обычно несколько участков узнавания, которые как было показано в классической работе [371], расщепляются рестриктазой EcoR I с различной скоростью. Это затрудняет кинетический анализ. Более подробно этот вопрос был изучен [162] на делеционных вариантах ДНК фага λ , содержащих уникальные участки узнавания рестриктазы EcoR I в различном окружении. Было установлено, что при низких ионных силах (порядка 50 мМ NaCl) не наблюдается различий в реакционной способности разных участков узнаваемых рестриктазой EcoR I, что определенным образом противоречило данным другой публикации [371]. Однако неодинаковая скорость расщепления различных участков узнавания в последнем случае была обнаружена при более высокой (порядка 150 мМ NaCl) ионной силе. Было выдвинуто предположение [162], что разница в скорости гидролиза различных участков узнавания имеет кинетическую природу, т. е. обусловлена неодинаковым взаимодействием нуклеотидных последовательностей, окружающих различные участки узнавания, с ферментом в переходном состоянии реакции. Это предположение было частично подтверждено тем, что, как было установлено [160], константы связывания EcoR I с различными участками ДНК были одинаковыми.

Исследование кинетики расщепления линейных молекул ДНК, содержащих уникальный сайт узнавания рестриктазы EcoR I, показало [186], что скорость реакции гидролиза зависит от длины ДНК. Так, скорость расщепления рестриктазой EcoR I ДНК длиной 1361 нп в 9 раз превышала скорость гидролиза фрагмента ДНК длиной 34 нп. Эти экспериментальные результаты позволили авторам [186] выдвинуть предположение, что процесс локализации специфической нуклеотидной последовательности, расположенной на линейной молекуле ДНК происходит не в результате случайных столкновений фермента с ДНК, а путем его одномерной диффузии вдоль молекулы ДНК, т. е. рестриктаза на первой стадии, по-видимому, связывается с неспецифической нуклеотидной последовательностью, а локализация специфической последовательности происходит в результате одномерной диффузии. Также показано [368], что после расщепления сайта узнавания рестриктазой EcoR I, фермент может передвигаться по ДНК в результате одномерной диффузии до следующего сайта, что может приводить к процессивному распределению узнаваемых участков, если они

расположены на определенном расстоянии. Следует отметить, что имеются экспериментальные данные [162], свидетельствующие об отсутствии влияния одномерной диффузии на скорость гидролиза ДНК фага λ эндонуклеазной рестрикции EcoR I. Эти кажущиеся различия также могут быть объяснены относительно высокой ионной силой (порядка 100 мМ NaCl), использованной в последнем случае, так как имеются данные, что при увеличении концентрации NaCl в реакционной смеси до 150 мМ, различий в скорости гидролиза двух рядом расположенных EcoR I сайтов практически не наблюдалось [162].

Интересные результаты в отношении гидролиза длинных линейных молекул ДНК рестриктазой EcoR II были получены Крюгером с сотр. [213]. Ими установлено, что ДНК фагов T3 и T7, содержащие немодифицированные участки узнавания REcoR II, не расщепляются этим ферментом. Однако добавление в реакционную среду ДНК, содержащей легко расщепляемые сайты EcoR II, приводило к гидролизу и резистентных сайтов ДНК фагов T3 и T7 ферментом. Молекулярный механизм этого эффекта пока не установлен, но, по-видимому, может быть связан с аллостерической активацией рестриктазы EcoR II.

6.1.4. Гидролиз синтетических олигонуклеотидов эндонуклеазами рестрикции

Развитие методов синтеза олигонуклеотидов открывает широкие возможности для исследования механизмов взаимодействия ДНК с эндонуклеазами рестрикции. Так, еще в 1975 году было показано [149], что рестриктаза EcoR I расщепляет синтетический комплементарный олигонуклеотид 5'-TGAATTCA. Исследование кинетики гидролиза этого дуплекса показало, что каталитическая константа его гидролиза составляет 4 мин^{-1} [149] и практически не отличается от аналогичной константы гидролиза ДНК вируса SV 40 [149]. Однако, большие различия были обнаружены при сравнении констант Михаэлиса. K_m реакции EcoR I с ДНК вируса SV 40 составляла $3 \times 10^{-8} \text{ М}$ и была примерно в 200 раз ниже аналогичной константы в случае использования в качестве субстрата синтетического олигонуклеотида. Более детально кинетика гидролиза олигонуклеотидов была исследована в случае эндонуклеазы Sca I [208]. При исследовании скорости гидролиза синтетических олигонуклеотидов, представляющих окта-, дека-, додека- и гексадекаолигонуклеотидные дуплексы, содержащие участки узнаваемые обсуждаемым ферментом, было установлено, что максимальная скорость гидролиза этих субстратов практически не отличалась от V_m гидролиза линейаризованной формы плаз-

миды рBR322, содержащей уникальнй участок узнавания Sca I, однако наблюдались довольно большие различия для констант Михаэлиса.

6.1.5. Расщепление однонитевой ДНК эндонуклеазами рестрикции

Все ранее изложенные экспериментальные результаты, касались гидролиза двухспиральных ДНК. Однако, в середине 70-х годов появились сообщения [85, 86], что некоторые рестриктазы (Hae III, Sfa I и Hha I) специфически расщепляют однонитевую ДНК бактериофагов M13 и ФХ174. С целью объяснения этих экспериментальных результатов, авторы [85] предположили, что вирусная ДНК находится в конформации, в которой ее нити частично перекрываются, образуя дуплексы как раз в районе участка расщепляемого этими ферментами.

Рассмотренные выше работы проводились с применением в качестве субстратов одноцепочечных ДНК из природных источников, что не исключает возможности существования дуплексных структур, образующихся в результате конформационной подвижности ДНК. Использование с этой целью олигонуклеотидных субстратов определенной структуры, позволяет исключить возможность образования внутримолекулярных дуплексов. Например, для рестриктазы Msp I синтезирован субстрат 5'-GAACCGGAGA, где появлению упомянутого дуплекса препятствует не только пространственное расположение фланкирующих пуриновых оснований, но и их природа, дестабилизирующая любое спаривание оснований в сайте узнавания [411]. Тем не менее этот олигонуклеотид расщепляется исследуемым ферментом. В аналогичных экспериментах было показано, что рестриктаза Mpo I [73], как и большинство рестриктаз, расщепляет только двухспиральные субстраты, а EcoR II [407, 410] и EcoR I [84, 114] гидролизуют как однонитевые, так и двухцепочечные фрагменты ДНК. Для рестриктазы Hra II существуют противоречивые данные. Одни авторы считают [73], что она гидролизует только двухспиральные фрагменты ДНК, а другие [411] высказывают предположения о расщеплении ею однонитевого субстрата.

Следует отметить, что расщепление однонитевого субстрата проходит значительно медленнее (в 10—30 раз), чем ДНК-дуплекса, к тому же требуется увеличение концентраций фермента и субстрата [411].

Исследование проблемы гидролиза однонитевой ДНК с использованием олигонуклеотидных субстратов не способных образовывать дуплексную структуру в растворе в отсутствие рестриктазы, не исключает возможности ее формирования в результате взаимодействия двух фермент-субстратных комплексов [411].

7. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕСТРИКТАЗ II ТИПА С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ СУБСТРАТАМИ

Нуклеиновые кислоты — полифункциональные соединения, содержащие большое число реакционноспособных групп, которые могут модифицироваться под действием различных химических реагентов. Модификациям подвержены все компоненты — гетероциклические основания, углеводные остатки, а также остатки фосфорной кислоты. Направленные модификации различных функциональных групп ДНК широко применяются при исследовании первичной и пространственной структуры, а также для изучения взаимодействия ферментов и других белков с ДНК.

При полноценном взаимодействии фермента с узнаваемой последовательностью образуются определенные связи: водородные [90], гидрофобные, «стэкинг» и ионное взаимодействие. Важную роль играют стерические факторы и, конечно, конформация ДНК [127, 233].

Введение или удаление каких-либо функциональных групп позволяет изучить определенные элементы и стадии взаимодействия, однако, выбирая тип модификации, желательно стремиться к максимальной изостеричности модифицированных дуплексов с канонической ДНК, так как, в зависимости от природы конкретной модификации, возможно локальное искажение структуры всего участка узнавания или затруднение конформационных переходов ДНК и фермента, необходимых для узнавания и взаимодействия. Упомянутое обстоятельство является самым слабым местом настоящего метода, значительно затрудняющее интерпретацию результатов, однако, считается, что создавая большое число разнообразных модификаций субстратов, можно, компенсируя недостатки каждого, получить достоверную картину взаимодействия в целом.

Возможны два способа получения модифицированных ДНК-субстратов — химическая модификация канонического субстрата и введение модифицированного основания в ходе его синтеза. Субстраты синтезированные химическим методом имеют некоторые преимущества перед макромолекулярными ДНК. В первую очередь в олигонуклеотиды легче ввести задуманную модификацию при его конструировании, чем модифицировать природную ДНК, а затем убедиться в полноте ее модификации. Применяя синтетические олигонуклеотиды, можно оценить расщепление сайта с различным нуклеотидным окружением в отсутствии других эффектов, например, сверхскрученности ДНК, неканонических вторичных структур (например, Z-ДНК или крестообразные структуры остова), а также неспецифического взаимодействия ферментов с другими сайтами. Для выяснения картины взаимодействия рестриктаз с ДНК, создаются синтетические ДНК-фрагменты имеющие

модификации как в участке узнавания, так и в прилегающих областях.

В рамках настоящего обзора сделана попытка обобщить имеющиеся в литературе данные о взаимодействии рестриктаз с синтетическими ДНК-фрагментами, содержащими как канонические, так и модифицированные участки узнавания. Существующие физико-химические и энзимологические методы позволяют охарактеризовать разные аспекты этого взаимодействия: (а) локализовать важные точки контакта или сближения с ДНК; (б) выяснить общие закономерности и индивидуальные особенности механизма действия этих сайт-специфических ферментов.

Следует еще раз подчеркнуть, что интерпретация результатов взаимодействия модифицированных субстратов с рестриктазами весьма непростая задача. В случае отсутствия надежной физико-химической и структурной характеристики модифицированного субстрата, вопрос о значимости изучаемой модификации всегда остается открытым, так как изменение поведения фермента всегда можно отнести к изменению конформации самого субстрата вследствие модификации. С другой стороны, отсутствие расщепления модифицированного сайта может быть обусловлено как нарушением стадии узнавания, так и стадии расщепления. И в этом случае возможна неоднозначная интерпретация важности исследуемой точки контакта. Из этого следует, что для надежной интерпретации результатов взаимодействия рестриктаз с модифицированными субстратами требуются дополнительные исследования, которые, порой, являются более сложными, чем само исследование взаимодействия. В большинстве работ по этой теме такие данные отсутствуют, поэтому обобщения следует делать очень осторожно.

7.1. Роль отдельных групп атомов гетероциклических оснований участка узнавания

Как известно, эндонуклеазы рестрикции, при осуществлении процесса узнавания и расщепления, в большинстве случаев взаимодействуют с большим желобом двойной спирали ДНК [282, 338, 410]. Самым наглядным подтверждением этого является рентгеноструктурное изучение кокристалла рестриктазы EcoR I и сайт-содержащего олигонуклеотида [45, 137]. Однако, в литературе также обсуждается и не менее важная роль малого желоба ДНК во взаимодействии с некоторыми рестриктазами [90, 127, 233, 265, 285].

Обобщение результатов работ ряда авторов позволяет выявить значение отдельных химических групп и атомов оснований, расположенных в большом и малом желобах, при взаимодействии ферментов рестрикции с узнаваемой последовательностью. Так как во всех участках узнавания находятся одни

и те же основания (А, G, T, C), только в различных комбинациях целесообразным является рассмотрение роли каждого гетероциклического остатка в отдельности.

7.1.1. Аденин

Наиболее исследованы положения аденина (А) — экзоциклическая аминогруппа (6-NH₂) и атомы азота в положении 7 (7-N) (расположенный в большом желобе) и 3 (3-N) (малый желоб).

Для выяснения роли 6-NH₂ группы, аденин заменяют на N⁶-метиладенин (m⁶A), т. е. один водород в NH₂ группе заменяют на метильную группу, [29, 90, 284], или на 2-аминопурин (2AP), который лишен этой группы [90].

Большинство рестриктаз проявляют чувствительность к метилированию аденина в своих участках узнавания. Рестриктазы EcoR I (5'GAATTC) [90], Mbo I (5'GATC) [284] не расщепляют субстратов, содержащих метилированные основания аденина. Также ведет себя и рестриктаза Mva I (5'CC(T/A)GG) по отношению к метилированной цепи ДНК-дуплекса, а рестриктаза EcoR II (5'CC(T/A)GG) значительно труднее гидролизует обе цепи [29]. Такое поведение можно объяснить стерическими эффектами CH₃-группы, которые препятствуют образованию необходимых контактов фермента с большим желобом ДНК. С другой стороны, метилирование аминогруппы может препятствовать образованию водородных связей между свободным водородом группы 6-NH₂ и аминокислотным остатком белка. Хотя обсуждаемое метилирование не препятствует спариванию оснований [133], оно устраняет водород, который мог бы участвовать в формировании связи с ферментом. Структура кокристалла EcoR I — олигонуклеотид указывает на участие свободного водорода 6-NH₂ группы аденина в образовании связи с остатком глутаминовой кислоты белка [137].

Таким образом, можно сделать предварительный вывод, что 6-NH₂ группа важна для проявления активности рестриктаз EcoR I [90], EcoR II [29], Mbo I [284] и Mva I [29], но совсем не обязательна для рестриктазы Sau3A I (5'GATC) (введение N⁶-метиладенина не препятствует гидролизу) [284]. Упомянутые рестриктазы Sau3A I и Mbo I узнают одинаковую последовательность нуклеотидов, одинаково расщепляют тот же сайт, поэтому можно сделать вывод о разных механизмах их действия.

Нужно отметить, что для рестриктаз не безразлично, в каком положении узнаваемого участка находится N⁶-метилированное основание аденина. Рестриктаза Bgl II (5'A⁶GATCT) расщепляет олигонуклеотид, несмотря на введение CH₃-группы в среднее звено участка узнавания, но не расщепляет (хотя и хорошо связывается), если CH₃-группа находится в левом

крайнем аденине [284]. Рестриктаза Mfl I (5'Pu⁴GATCPy) ведет себя противоположным образом.

Для более глубокого исследования значимости N⁶-метилирования центрального аденина в участке узнавания рестриктазы EcoR I, исследовалась его замена на 2-аминопурин (2-AP) [90]. Эта замена устраняет N⁶-аминогруппу из большого желоба, но вводит NH₂-группу во второе положение, экспонированное в малом желобе, которая образует водородную связь с 2-оксигруппой тимина. Для контроля в то же самое положение сайта вводили 2,6-диаминопурин (2,6 AP). Эта замена возвращает 6-NH₂ группу в большой желоб с сохранением 2-NH₂ группы в малом желобе. Оба олигонуклеотида расщеплялись ферментом (хотя и незначительно), из чего следует, что отсутствие 6-NH₂ группы аденина в большом желобе (участвующей, как отмечалось, в образовании водородной связи с остатком глутаминовой кислоты в ферменте) не исключает специфического узнавания субстрата рестриктазой EcoR I и его расщепления. Видимо, отсутствие обычной водородной связи компенсируется благодаря взаимодействию фермента с другими группами участка узнавания [322]. Введение дополнительной метильной группы в любой аденин участка нежелательно, так как это препятствует взаимодействию и полностью блокирует катализ [90] — это обсуждалось выше и объяснялось стерическими эффектами этой группы.

Роль 7-N атома обоих аденинов в узнаваемом участке рестриктазы EcoR I (5'GAATTC), Сила и др. [337] определяли путем синтеза олигонуклеотидов, содержащих 2'-дезокситиберидин (отсутствует 7-N атом аденина) в разных положениях сайта узнавания. При замещении одного из нуклеотидов, образовались ожидаемые продукты реакции, хотя рестрикция была сильно замедлена. Замещение сразу обоих нуклеотидов приводило к ингибированию расщепления рестриктазой EcoR I.

Результаты рентгеноструктурного изучения кокристалла EcoR I — олигонуклеотид [137], указывают на участие 7-N атома обоих аденинов во взаимодействии в качестве акцепторов протонов соответствующего аминокислотного остатка фермента. Из этого авторы делают вывод о том, что фермент может приспособиться к отсутствию одной пурин-акцепторной связи, однако, если отсутствие двойное он становится неактивным по отношению к такому субстрату.

Важность 3-N атома среднего аденина в участке узнаваемом рестриктазой Bgl II (5'AGATCT) была установлена с помощью декануклеотида, в котором обсуждаемое основание заменено на 3-дезааденин (отсутствует 3-N атом) [285]. Рестриктаза Bgl II была неспособной расщепить такой субстрат, хотя связывание с исследуемым декамером не было нарушено [285].

Проведение эксперимента с этим же субстратом и рестриктазами Mbo I (5'GATC) и Sau3A I (5'GATC) показало, что

обе они слабо гидролизировали модифицированные субстраты [285]. Авторы обсуждаемой публикации делают вывод, что эти ферменты взаимодействуют с малым желобом ДНК, а замедление расщепления объясняется изменением способа их связывания с модифицированным субстратом.

7.1.2. Тимин

Наиболее хорошо исследовано образование гидрофобного контакта рестриктаз с 5-метильной (5-CH₃) группой тимина (Т), расположенной в большом желобе [12, 90, 127, 215, 377, 410]. Рестриктазы по разному реагируют на присутствие этой группы в своем сайте, например, для активности EcoR II [12, 19, 410], Hpa I [127] эта группа является необходимой, а для Mva I она не имеет значения [215].

Роль 5-CH₃ группы во взаимодействии эндонуклеаз рестрикции с ДНК исследуется при помощи олигонуклеотидов, содержащих участки узнавания соответствующих рестриктаз, в которых тимин заменен на урацил (U) [90, 215, 377], 5-бром урацил (5BrU) [90, 127, 377, 410] или 5-фторурацил (5fIU) [12, 215]. Замена тимина на урацил устраняет 5-CH₃ группу из большого желоба и замещает ее на атом водорода (5-H). В случае исследования взаимодействия с субстратом рестриктазы EcoR I (5'GAATTC), внутренний Т в сайте узнавания был заменен на U. Расщепление такого субстрата происходило наравне с каноническим, однако при замене внешнего Т, расщепления не наблюдалось [90]. Соответствующая замена Т на 5BrU приводило к ускорению гидролиза в первом случае и к незначительному расщеплению во втором случае [90]. Исходя из этих данных, делается вывод о том, что 5-CH₃ группа внутреннего Т не является важным контактом (хотя K_m этого субстрата указывает на ее участие в связывании с ферментом). Напротив эта же группа внешнего Т существенно влияет на взаимодействие с рестриктазой EcoR I.

Для объяснения отсутствия расщепления олигонуклеотида рестриктазой EcoR I, в котором вместо внешнего Т находится 5'G⁺AATU C привлекаются данные о возможном изменении 3'С UTAAG

конформации модифицированного субстрата. Результаты ЯМР анализа [123] самокомплементарного олигонуклеотида 5'CTACGUAG, содержащего А—U пары оснований свидетельствуют, что N-гликозидные связи этих пар и А—Т пар прилегающих с 3'-конца, являются искаженными [123]. Возможно, что такие искажения и влияют на взаимодействие рестриктазы EcoR I с вышеуказанным модифицированным субстратом. Обращает на себя внимание тот факт, что замена Т на U про-

ведена в таком положении сайта, где находится расщепляемая фосфодиэфирная связь.

В случае изучения рестриктазы Hpa I (5'GTT⁺AAC) замещен на U или на 5BrU подвергался T, находящийся около расщепляемой фосфодиэфирной связи, [127]. Первая замена блокировала гидролиз олигонуклеотида, а вторая — приводила к появлению незначительного количества продуктов рестрикции. Из этого был сделан вывод, что 5-CH₃ группа тимина участвует в образовании гидрофобного контакта с ферментом. Способность рестриктаз Hpa I и EcoR I расщеплять бромированный субстрат указывает, что атом брома может компенсировать потерю 5-CH₃ группы путем вступления в прямой контакт с ферментом, так как Ван-дер-вальсовый радиус атома брома близок радиусу метильной группы, только он является более электроотрицательным. Наличие атома Br в пиримидиновом кольце меняет распределение электронов и таким образом может влиять на взаимодействие пиримидина с соседними основаниями или белком [265].

Имеется публикация [377], авторы которой показали, что замещение обоих T на U в сайте REcoR I (5'GAATTC) не влияет на скорость его расщепления. Строго говоря нельзя утверждать, что полученные результаты противоречат рассмотренным выше, т. к. в этом случае T на U в сайте REcoR I замещались по одиночке [90]. Таким образом сравниваемые данные получены с разными субстратами. Однако, отсутствие эффекта замещения обоих T на U на расщепление субстрата ферментом как бы указывает, что 5-CH₃ группы T являются несущественными для контакта с REcoR I. Авторы все-таки на основе данных о том, что замещение наружного T на 5BrU дает ускорение реакции расщепления, делают вывод о том, что метильные группы контактируют с REcoR I [377].

Для рестриктазы EcoR II (5'CC(T/A)GG) тоже подтверждено наличие контакта с метильной группой центрального T (замена его на U [410] и 5flU [12] замедляет, а наличие 5BrU [19] — ускоряет гидролиз (по сравнению с каноническим олигонуклеотидом). Следует отметить, что модификация одной цепи влияет на расщепление обеих цепей.

По-видимому, в случае EcoR II, фермент вступает в контакт с атомом фтора, но этот контакт существенно отличается от контакта с метильной группой [308]. С другой стороны субстрат, содержащий 5flU [215], нарушает конформацию олигонуклеотида и оказывает дестабилизирующее влияние на 5flU—A пару оснований [116].

Рестриктаза Mva I (5'CC⁺(A/T)GG) не имеет контакта с 5-CH₃ группой центрального тимина. Замещение ее на H или F атомы [215] не влияет на расщепление. Замена на атом брома [29] снижает скорость расщепления ДНК-дуплекса в 1,5 раза, по сравнению с немодифицированным. Ингибирующий эф-

фект, по-видимому, является результатом стерических препятствий атома брома, расположенного рядом с местом расщепления.

7.1.3. Цитозин

С целью выявления возможных контактов эндонуклеаз рестрикции с атомом водорода в С5-положении цитозина (расположен в большом желобе ДНК) изучалось их взаимодействие с субстратами, содержащими метильную группу (m5C) [12, 19, 90, 136, 284, 377] или атом брома — $5BrC$ — [19] в участках узнавания.

Недавнее открытие нового варианта метилированного С — m4C (цитозин метилирован по 4-амино группе ($4-NH_2$)) [103, 128] стимулировало появление работ, посвященных выяснению роли $4-NH_2$ группы цитозина, находящейся как и m5C в большом желобе, на взаимодействие ферментов с ДНК.

Относительно рестриктазы EcoRI ($5'GAATTC$) имеются противоречивые данные о роли 5-Н атома во взаимодействии фермента с ДНК-дуплексами. Одни исследователи делают вывод о том, что он не играет никакой роли (скорость расщепления субстрата, содержащего m5C , не меняется, по сравнению с каноническим) [377]. Бренан и др. [90] получили противоположный результат (EcoRI не расщепляет олигонуклеотиды, в которых цитозин заменен на m5C или $5BrC$) и объясняют его тем, что фермент находится в непосредственной близости с С5 атомом углерода. Отсутствие расщепления таких субстратов объясняется интерференцией этих групп взаимодействию рестриктазы с группами и атомами соседних оснований, а также изменением конформации ДНК в участке узнавания. По поводу второго предположения имеются подтверждающие данные рентгеноструктурного исследования кристалла самокомплементарного додекануклеотида, содержащего m5C и $5BrC$ в участке узнавания EcoRI [136]. Возможно, что то же самое происходит и со структурой модифицированного субстрата в растворе.

Исследователи [12, 19] предполагают, что рестриктаза EcoRII ($5'CC(A/T)GG$) имеет контакты (или сближение) с 5-Н атомами обеих цитозинов в цепи содержащей Т, и внутреннего цитозина в цепи, содержащей А. Этот вывод является следствием результатов гидролиза замещенных по этим положениям 5-метил- и 5-бромцитозин субстратов. Полное ингибирование или резкое замедление расщепления этих ДНК-дуплексов объясняется, (в случае модификации внутренних цитозинов обеих цепей), исключительно стерическим эффектом метильной группы (ковалентный радиус в 2 раза превышает радиус водорода, а Ван-дер-ваальсовый радиус — в 1,7 раза), а в случае 5'-концевого цитозина цепи содержащей Т, — образованием непродуктивного комплекса [410]. Кинетические параметры показывают, что он

отличается большой прочностью и высоким значением $T_{0.5}$ (период полураспада комплекса). Как видно, это не является достаточным условием для успешного протекания ферментативной реакции.

Рестриктаза Mva I (5'CC(A/T)GG) нечувствительна к модификации C5 положения обоих цитозинов в своем сайте [19, 215]. Замена C в одной или в обеих цепях на m^5C не влияет на скорость расщепления модифицированного субстрата, а значения K_M для T- и A-цепей такого дуплекса почти не отличаются от K_M этих же цепей канонического дуплекса, что указывает на беспрепятственное формирование фермент-субстратного комплекса [215]. Все это свидетельствует об отсутствии непосредственных контактов рестриктазы Mva I с 5-N атомом обоих цитозинов в участке узнавания [29].

Получены данные, что как EcoR II, так и Mva I (изошизомеры узнающие 5'CC(A/T)GG) не расщепляют субстратов, в которых метилирована экзоциклическая NH_2 группа внутреннего цитозина [103]. Также установлено, что метилирование экзоциклической аминогруппы 5'-концевого цитозина препятствует расщеплению модифицированной цепи гемиметилированного ДНК-дуплекса рестриктазой Mva I (5'CC(A/T)GG), а немодифицированная цепь расщепляется достаточно эффективно [29]. Значит, для этого фермента наличие контакта с 4- NH_2 группой внешнего цитозина в одной из цепей субстрата необходимо для расщепления только этой цепи ДНК-дуплекса, а гидролиз другой цепи протекает независимо от наличия или отсутствия этого контакта.

В аналогичных экспериментах было показано, что эндонуклеаза EcoR II имеет контакты с экзоциклическими аминогруппами 5'-концевых цитозинов в обеих цепях, так как введение m^4C в одну из цепей блокировало расщепление обеих цепей [29].

В случае рестриктаз Alu I (5'AGCT), Pvu II (5'CAGCTG) и Cfr6I (5'CAGCTG) было установлено, что замена цитозина в составе 5'AGCT на m^5C или m^4C исключало расщепление субстратов указанными ферментами [102].

Рестриктазы Bgl II (5'AGATCT), Sau3A I (5'GATC), Mbo I (5'GATC), Mfl I (5'PuGATCpu) не расщепляют гомодуплексы, содержащие m^5C (в составе 5'GATC) в участках узнавания соответствующих ферментов [284]. Bgl II и Sau3A I также не гидролизуют ни одной цепи гетеродуплекса, содержащего это основание. Рестриктазы Mbo I и Mfl I расщепляли обе цепи, но с различной скоростью. Mbo I расщепляла быстрее немодифицированную, а Mfl I — модифицированную цепь. Это указывает на расщепление дуплекса способом, в котором рестриктаза связывается с одной цепью, а расщепляет другую. Как видно, рестриктазы Bgl I и Sau3A I имеют тесные контакты с 5N атомами

цитозинов своего участка узнавания, а для Mbo I и Mfl I эти контакты не являются необходимыми.

Расщепление субстратов рестриктазами Bgl II, Sau3AI, Mbo I, Mfl I блокировалось и при введении метильной группы в N⁴-положение (как и в случае C5-метилирования цитозина) [284]. Метилирование аминокетильной группы цитозина в одной цепи гетеродуплекса полностью ингибировало расщепление этой же цепи рестриктазами Bgl II, Sau3AI и обнаруживалось только следовое расщепление немодифицированной цепи. Рестриктазы Mbo I и Mfl I расщепляли обе цепи субстрата, только с различными скоростями (это указывает на способ расщепления, обсужденный выше).

Интересными свойствами обладает рестриктаза Msp I (5'CCGG). Ее действие блокируется введением метильной группы в C5 положение наружных цитозинов узнаваемого участка [105]. Однако она, хотя и замедленно, расщепляла субстраты содержащие в этом положении ^{m4}C. Изучение взаимодействия RMsp I с гемиметилированным субстратом показало, что в гетеродуплексе ^{m5}CCGG:CCGG модифицированная цепь расщепляется более эффективно. То же самое было отмечено и в случае гетеродуплекса ^{m4}CCGG:CCGG. В этом отношении RMsp I напоминает рассмотренные выше RMbo I и Mfl I.

С целью изучения чувствительности RM ферментов к разным вариантам модификации цитозина на примере рестриктаз Msp I (5'CCGG), Hpa II (5'CCGG), Sma I (5'CCCGG), Xma I (5'CCCGGG), Cfr9 I (5'CCCGGG) было проведено систематическое исследование влияния метилирования цитозинов, расположенных в разных местах узнаваемого участка, по C5 положению или 4NH₂ группе [105]. Было установлено, что ^{m4}C, как правило блокирует действие большинства исследованных ферментов. Ингибирующий эффект ^{m5}C выражен значительно слабее.

Обобщая полученные результаты чувствительности рестриктаз к ^{m4}C и ^{m5}C можно сказать, что ферменты могут дифференцировать оба положения и проявлять различную чувствительность к соответствующим основаниям. Объяснение этому можно искать, анализируя расположение этих метильных групп в двойной спирали ДНК. По этому признаку метилирование N⁴-положения существенно отличается от такого по C5. Хотя обе метильные группы находятся в большом желобе В-ДНК, N⁴-метильная группа находится в центральной, т. е. наиболее выступающей части желоба, а C5 — в боковой. В дополнение, метилирование цитозина по N⁴-положению создает не только стерические затруднения при взаимодействии с ферментами, что возможно имеет место и в случае C5-метилирования, но также блокирует NH₂-группу — важный контакт опознавания C : G пары, находящийся в большом желобе ДНК.

Следует отметить, что m4C в отличие от m5C в составе дуплексов дестабилизирует двойную спираль ДНК [104].

Вероятно, что рассмотренные выше различия в основном обуславливают более сильный ингибирующий эффект N^4 -метилцитозина в отношении действия ферментов.

Результаты рассмотренных экспериментов свидетельствуют что 4-NH₂ группа цитозина в участке узнавания соответствующих ферментов играет важную роль во взаимодействии. Наблюдаемое снижение скорости или отсутствие расщепления, если в это положение введена CH₃-группа, свидетельствует о потере способности 4-NH₂ участвовать в образовании водородной связи с белком, или о стерическом препятствовании CH₃-группы сближению модифицированного субстрата с ферментом или гидролизу олигонуклеотида.

7.1.4. Гуанин

Наиболее исследованными точками контакта гуанина [146] с ферментами являются 2-аминогруппа (2-NH₂) (малый желоб) и атом азота в положении 7 (7N) (большой желоб).

Значение 2-NH₂ группы гуанина исследовано путем ее метилирования [285] или ее удаления путем замены G на гипоксантин (I) [29, 90, 127, 285]. Последний путь применяется наиболее часто. Изучено взаимодействие рестриктаз EcoR I [90], EcoR II [29], Bgl II [285], Hpa I [127], Sau3A I [285], Mbo I [285], Mva I [29] с модифицированными таким образом синтетическими субстратами.

Установлено, что для активности рестриктаз EcoR I (5'GAATTC) [90], EcoR II (5'CC(A/T)GG) [29], Mbo I (5'GATC) [285], Mva I (5'CC(A/T)GG) [29] 2-NH₂ группа не является обязательной, так как скорость гидролиза модифицированного ДНК-фрагмента практически не снижается. В случае EcoR II и Mva I имеются данные о гуанине, соседнем с центральным тиминном. Данные о значимости правого крайнего гуанина участка узнавания этих рестриктаз отсутствуют. Исследование влияния модификаций по 7-N положению G, показали что все рассмотренные выше рестриктазы являются чувствительными к ним.

Ряд рестриктаз Hpa I (5'GTTAAC) [127], Bgl II (5'AGATCT) и Sau3A I (5'GATC) [285] требуют контакта (или сближения) с 2-NH₂ группой для акта связывания и (или) расщепления. Подтверждением этому служит отсутствие расщепления соответствующих модифицированных субстратов. Из этих данных следует вывод, что для этих ферментов контакты с малым желобом ДНК играют важную роль.

Спектры КД и кривые T_m додекануклеотидов, содержащих метильную группу в 2-NH₂ положении гуанина указывают на то, что CH₃-группа увеличивает T_m дуплекса, тем самым стабили-

зируя форму ДНК. Возможно, она усиливает «стэкинг» взаимодействие гуаниновых оснований [285]. Удаление 2-NH₂ группы из малого желоба вызывает изменения в конформации ДНК [90, 137]. Логично ожидать, что все эти замены, связанные с влиянием на конформацию ДНК, могут снижать или даже блокировать расщепление субстрата рестриктазами.

Акцептор протонов 7N положение гуанина (большой желоб) является точкой контакта для рестриктазы EcoR I [137], которая очень слабо гидролизует ДНК-фрагмент, если произведена замена гуанина узнаваемого участка на 7-деазагуанин [336].

Завершая обсуждение роли отдельных групп атомов гетероциклических оснований в специфическом взаимодействии рестриктаз с субстратом следует еще раз отметить, что обычно результаты об изменении их активности (или полном ее отсутствии) вследствие введения в основание дополнительных химических групп или при их удалении, интерпретируются как указание на близкое расположение или взаимодействие фермента с соответствующей группой во время реакции. Кроме того, для получения более достоверной картины, следует учитывать влияние модификаций субстрата на конформационные изменения ДНК, а также на превращения, которые могут быть необходимыми для прочного связывания ферментов и для катализа реакции расщепления.

7.2. Влияние нуклеотидных последовательностей, фланкирующих участок узнавания

Как уже отмечалось, рестриктазы взаимодействуют не только с сайтами узнавания, но и с прилегающими участками. Существуют определенные требования к фланкирующим последовательностям (длина и природа) для обеспечения эффективного взаимодействия. Надо отметить, что эти требования индивидуализированы для разных рестриктаз [3, 4, 12, 73, 224, 407, 408, 411]. С целью их выяснения синтезируются олигонуклеотиды, содержащие участок узнавания соответствующей рестриктазы, но с различным его окружением, т. е. различается длина или природа прилегающих нуклеотидных последовательностей. Это позволяет сравнительно легко оценить требования рестриктазы, предъявляемые к субстрату, выполнение которых необходимо для реализации полноценного взаимодействия.

В ранних работах отмечалась устойчивость синтетических олигонуклеотидов, содержащих изолированные участки узнаваемые рядом рестриктаз (EcoR I, Hind III, BamH I), к соответствующему ферменту [4, 146]. В случае рестриктазы EcoR I это было объяснено низкой устойчивостью АТ богатого дуплекса 5'GAATTC [146], однако, этому выводу противоречит способ-
3'CTTAAG

ность EcoR I расщеплять более длинные олигонуклеотиды, содержащие ту же последовательность и образующие еще менее устойчивые шестинуклеотидные дуплексы с «липкими» концами [4]. Вероятно рестриктазы способны стабилизировать, а затем расщеплять даже малоустойчивые дуплексы. Устойчивость к действию рестриктаз как изолированных сайтов узнавания, так и некоторых других олигонуклеотидов, содержащих участки узнавания, в первую очередь объясняются тем, что они не удовлетворяют определенным структурным требованиям [3].

Установлено, что для успешного гидролиза олигонуклеотида рестриктазой EcoR II недостаточно окружения из двух нуклеотидов с обеих сторон участка узнавания [407]. Для этого требуется ДНК фрагмент длиной 23—32 пар оснований [10, 409]. Введение в прилегающую последовательность некомплементарной пары АА или АС вместо пары АТ, приводит к ингибированию расщепления субстрата. Изучая структуру олигонуклеотидов, содержащих пару АА [372], методом ЯМР было установлено, что она находится внутри двойной спирали, хотя «стэкинг» — взаимодействие этой пары с соседними частично нарушено и конформация углеводфосфатного остова также изменена. Остатки гетероциклических оснований некомплементарной пары находятся в анти-ориентации относительно дезоксирибозных остатков, хотя имеют обычную таутомерную форму. Таким образом, ингибирование расщепления субстрата, содержащего АА пару, вызвано прежде всего конформационным фактором. Замена на АС пару вносит в ДНК еще более существенные искажения, чем АА пара. Хотя гетероциклические основания пары А имеют обычную конформацию и таутомерную форму, они, возможно, выходят за пределы двойной спирали. Соответственно, большее нарушение структуры ДНК (замена на АС пару) соответствует более сильному замедлению (60 раз) расщепления субстрата рестриктазой EcoR II по сравнению с нативным дуплексом (при замене на АА пару гидролиз замедляется в 10 раз) [372]. Как видно, для эффективного действия фермента необходимо наличие правильной структуры нуклеотидной пары, примыкающей к сайту узнавания. Наблюдаемая чувствительность рестриктазы EcoR II к структурным аномалиям во фланирующей последовательности может быть следствием как изменения самой этой последовательности, так и передачи структурного изменения в участок узнавания [12].

В случае рестриктазы EcoR I введение даже двух АС пар рядом с участком узнавания не приводит к столь сильному как в случае EcoR II замедлению гидролиза (только в 3 раза). Расщепление ускоряется, если у сайта расположены АТ пары оснований и ингибируется — если пары СG [224]. Эта рестриктаза удовлетворяется минимальным числом нуклеотидов (одним), примыкающим к участку узнавания, а для рест-

риктазы Hind III необходимы два витка спирали [4]. Kpn I требует фланкирования обеих цепей с 5'-конца и хотя бы одной цепи с 3'-конца [3].

Обнаружено, что рестриктаза Msp I расщепляет быстрее цепи богатые пуринами. Это объясняется предположением, что пуриновые нуклеотиды создают гидрофобное окружение, важное для полноценного взаимодействия с рестриктазой, или предопределяют молекулярную структуру участка узнавания через «стэкинг» взаимодействие оснований [411]. Рестриктаза Hra I расщепляет преимущественно цепи находящиеся в пиримидиновом окружении (в 3—4 раза быстрее, чем в пуриновом), а Mpo I не делает предпочтения ни для одного типа окружения цепей [73].

Обобщая можно сказать, что последовательности нуклеотидов, окружающие участки узнавания, через свою гидрофобность или гидрофильность или своим пространственным расположением может влиять на формирование фермент-субстратного комплекса, в котором происходит разрыв фосфодиэфирной связи.

7.3. Взаимодействие рестриктаз с углеводфосфатным остовом участка узнавания

Известно, что углеводфосфатный остов во многом определяет конформацию и физико-химические свойства нуклеиновых кислот. Естественно ожидать, что удаление или замена отдельных структурных элементов углеводного остова будет приводить к измененной конформационной подвижности его химических группировок и тем самым нарушать каноническую конформацию нуклеотидной последовательности. Таким образом, осуществляя модификации остова, можно оценить взаимосвязь между конформацией ДНК и функционированием рестриктаз. С целью выявления значимости отдельных структурных элементов углеводфосфатного остова участка узнавания были изучены субстратные свойства олигодуплексов с модифицированными фосфодиэфирными связями в виде разрыва фосфодиэфирных связей [30, 407]; 2) или отсутствия фосфатной группы [30, 408, 419] в олигонуклеотидной цепи, а также с модифицированным углеводным остатком [12, 282].

7.3.1. Фосфатные группы

Электростатические контакты рестриктаз BamHI, EcoRI и некоторых других ферментов с фосфатными группами участка узнавания играют существенную роль в фермент-субстратном взаимодействии [396]. Этот вывод подтверждается обнаружением в активных центрах ферментов положительно заряженных аминокислотных остатков лизина и аргинина.

В литературе довольно подробно исследовано взаимодействие рестриктаз EcoR II, Mva I, BamHI и Sso II с фосфатными группами участка узнавания. Их функция изучалась при помощи олигонуклеотидов в которых фосфодиэфирная связь разорвана, фосфатная группа отсутствует или она же заменена на негидролизуемые фосфоамидную [10, 19, 42, 407], пирофосфатную [29, 407, 419] и метилфосфатную группировку [45] или этилендиаминовый фрагмент [29].

Замена гидролизуемой фосфодиэфирной связи на фосфоамидную (в случае EcoR II) и пирофосфатную (в случае RMva I) приводит к полному блокированию расщепления модифицированной цепи гетеродуплекса указанными выше ферментами [29].

Фосфатная группа T цепи ($5'CCrTGG$) важна для формирования контакта с рестриктазами EcoR II и Sso II, на что указывает отсутствие расщепления обеих цепей субстрата с введенной в это положение пирофосфатной связи, а также этилендиаминовой вставки [29]. В случае рестриктазы Mva I блокируется расщепление только модифицированной цепи, что позволяет делать вывод о том, что для рестриктаз EcoR II и Sso II [29, 30, 407] эта фосфодиэфирная связь более важна, чем для RMva I.

Роль фосфатной группы A цепи ($5'CCrAGG$) во взаимодействии с EcoR II изучалась также путем сопоставления данных гидролиза субстрата, содержащего разорванную фосфодиэфирную связь в указанном положении и субстрата с удаленной фосфатной группой [30].

Реакция гидролиза первого олигодуплекса отличалась сильным замедлением скорости расщепления немодифицированной T-цепи и полным блокированием гидролиза A-цепи. Близкая картина наблюдалась и в том случае, когда фосфатная группа была удалена с места разрыва. Следует также отметить, что упомянутые модификации сопровождаются искажением вторичной структуры участка узнаваемого эндонуклеазой, (из-за увеличения конформационной подвижности групп атомов, находящихся вблизи разрыва), что вероятно и вызывает очень сильное ингибирование реакции расщепления цепей. Можно предположить, что дефект структуры в узле —T—G— приводит к нару-

шению специфических белок-нуклеиновых контактов с A-цепью. В итоге экспериментов с указанными выше двумя субстратами делается вывод о том, что рестриктаза EcoR II не имеет контакта с фосфатом ($5'CCrAGG$) A-цепи, а наблюдаемые эффекты объясняются конформационными изменениями субстрата [30].

Фредерих и др. [137] при исследовании комплекса рестриктазы EcoR I с олигонуклеотидом методом рентгеноструктурного анализа обнаружили отклонение от B-формы ДНК, а именно установили, что в области участка узнавания происходит рас-

ширение основного желоба ДНК, а в прилегающих к сайту последовательностях появляются А-подобные структуры двойной спирали. Предполагается, что фермент таким образом стабилизирует переходное состояние, в котором расщепляемая фосфодифирная связь имеет повышенную мобильность. В случае EcoR I обнаружен изгиб между GAA и TCC [137] участка узнавания (5'GAATTCC). Возможно тоже самое происходит и в случае BamH I (5'GGATCC), так как отсутствие в одной цепи фосфатной группы между А и Т, приводящее к разрыву остова, сильно ускоряет гидролиз нативной цепи [45]. Ускорение гидролиза также наблюдается и при отсутствии в одной цепи межнуклеотидного фосфата между А и G. Этот эффект, а также аналогичный ему в случае метилфосфатной модификации этого же фосфата, указывает на несущественность этой группы для взаимодействия субстрата с BamH I [419]. Увеличение скорости расщепления нативной цепи отражает участие нарушений структур ДНК, возникающих и при взаимодействии субстрата с рестриктазой, в обеспечении эффективного функционирования фермента [45].

Все представленные выше данные касаются фосфатов только сайта узнавания фермента, хотя имеются данные [127, 137, 233] о влиянии фосфатных групп и за его пределами на взаимодействие с рестриктазами. Это естественным образом вытекает из предыдущей части, где обсуждалась роль участков фланкирующих субстратные последовательности.

Следует отметить, что наличие негидролизуемых аналогов субстрата (с пирофосфатной, фосфоамидной связью и т. д.) позволяет не только исследовать требования к структурным элементам остова, но и изучить процесс образования фермент-субстратного комплекса в присутствии кофактора — ионов Mg^{2+} [10, 13]. Оказывается, что ионы Mg^{2+} требуются не только для гидролитического акта, но влияют и на процесс связывания субстрата.

7.3.2. Углеводный остаток

Вторичная структура ДНК играет важную роль в узнавании ферментами субстрата. Исследования коротких ДНК-дуплексов, содержащих участки узнавания ряда рестриктаз, методами ЯМР [333] и рентгеноструктурного анализа [137, 386] показали, что конформационные параметры отдельных нуклеотидных звеньев варьируют от значений, характерных для В-формы до значений, присущих А-форме двойной спирали. Известно, что некоторые ферменты взаимодействуют с ДНК в различных формах. Например, рестриктазы BssH II и BamH I не расщепляют субстраты в Z-форме [67].

На примере модификации углеводных остатков участка

узнавания, изменяющих вторичную структуру ДНК, была сделана попытка рассмотреть влияние этого фактора на взаимодействие с ферментами.

Согласно данным Виноградовой с соавт. [12], введение рибоуридина (rU) в участок узнавания рестриктаз-изоизомеров EcoR II и Mva I (5'CC(A/T)GG) и Sso II (5'CCNNGG) вместо dT, сопровождается локальным искажением В-формы двойной спирали, обусловленным появлением домена с конформацией подобной А-форме. Такая замена вызывает замедление ферментативной реакции катализируемой EcoR II. В случае Sso II [11] наблюдается обратный эффект — ускорение расщепления модифицированного субстрата. Возможно, в комплексе Sso II с нативным субстратом конформация вырожденной пары (A/T) участка узнавая соответствует А-форме двойной спирали.

Может возникнуть вопрос — не обусловлено ли замедление скорости гидролиза rU-субстрата рестриктазой EcoR II отсутствием 5-метильной группы тимина в нем. Это исключается, поскольку при замене dT на dU скорость реакции уменьшается только в 2 раза [410], а в обсуждаемом случае она снизилась в 10 раз.

Для рестриктазы Mva I эта модификация, а следовательно и искажение формы спирали узнаваемого участка, не влияет на расщепление Т цепи, а интактная — А цепь расщепляется лишь незначительно хуже, что объясняется важностью контактов для одной субъединицы фермента не только со своей, но и с противоположной цепью [29].

Отношение рестриктазы EcoR I (5'GAATTC) к модификациям углеводных остатков было исследовано путем введения вместо внешнего dA в участке узнавания 9-β-D-арабинозиладенина (aA), аденозина (gA), 2'-дезоксидезокси-2'-фтораденозин (fA), а вместо dG-2'-дезоксидезокси-2'-фторгуанозина (fG). Все перечисленные модификации за одним исключением ингибировали расщепление ферментом соответствующих дуплексов. Исключение относится к fG замене, которая дала увеличение скорости гидролиза [282]. Изменение скорости ферментативной реакции опять можно объяснить появлением доменов А-формы обусловленных наличием gA, fA, aA [283], fG [282], в которых углеводный остаток аденозина или гуанозина находится в 3'-эндо форме, в отличие от 2'-эндо формы, присущей дезоксиаденозину или дезоксигуанозину. Делается предположение, что замена G на fG благоприятствует фермент-субстратному взаимодействию [282].

Как видно, для активности большинства рестриктаз требуется правильная В-форма ДНК. Любое искажение ее структуры приводит к изменению активности ферментов, на что например, указывает отсутствие расщепления рестриктазой EcoR I рибооктамера 5'GGAAUCC, которому присуща А-форма [282].

7.4. Некоторые взаимодействия рестриктаз с отдельным нуклеотидом (или его звеном) участка узнавания

Каждый нуклеотид участка, узнаваемого соответствующей рестриктазой, играет свою и только ему присущую роль в обеспечении эффективного взаимодействия фермента с ДНК и ее расщепления. Были проведены эксперименты с целью установить функцию отдельного нуклеотида (dNp) или всего звена (pdNp) участка узнавания способом его удаления (с сохранением или отсутствием ковалентной непрерывности фосфодиэфирной связи) [20, 30, 45] или замены на другой нуклеотид, содержащий некомплементарное основание [233], в вышеуказанных процессах.

Например, замена центральной пары оснований участка узнавания рестриктаз EcoR II, Mva I и Sso II (5'CC(T/A)GG) AT на AA или TT вызывает замедление реакций катализируемой EcoR II [408] и Sso II [29] (особенно в случае замены на AA пару) и полное блокирование (при замене на AA) гидролиза измененного субстрата рестриктазой Mva I [29]. Изменение в скорости гидролиза возможно из-за локального искажения конфигурации двойной спирали участка узнавания, которое наблюдается с появлением некомплементарной пары оснований. Этот эффект выражен сильнее в случае контакта двух относительно больших остатков аденина. То же наблюдается и при замене внутренней пары CG на GG в участке узнаваемом Mva I [29] — модифицированная цепь не гидролизуется, а интактная — расщепляется с низкой эффективностью.

Модификация участка, узнаваемого этими же ферментами, состоящая в исключении dA или dT звена с нарушением или сохранением в цепи непрерывности фосфодиэфирных связей приводит к полному ингибированию расщепления обеих цепей рестриктазами Mva I и EcoR II [30]. Таким образом, наличие немодифицированного центрального нуклеотидного звена rdTr или rdAr в каждой из цепей участка, узнаваемого EcoR II, необходимо для продуктивного взаимодействия фермента с субстратом. Основываясь на данных предыдущего раздела о роли фосфатных групп узнаваемого участка рестриктазы Mva I, более точно определяется звено, имеющее существенное влияние при взаимодействии эндонуклеазы с ДНК — это не rdAr или rdTr, а dAr или dTr. Обе упомянутые рестриктазы имеют контакт с остатком dA участка узнавания, который реализуется для различных целей — RMva I его использует только для расщепления A цепи, а EcoR II — для гидролиза обеих цепей [29]. Этот вывод делается на основе данных о действии RMva I и EcoR II на субстраты, в которых звено dA заменено на триметиленовый мостик. В случае REcoR II гидролиз отсутствует, а в случае RMva I, немодифицированная T цепь расщеп-

ляется довольно эффективно, а модифицированная — лишь незначительно.

Для полноты характеристики этих рестриктаз надо отметить, что в отличие от EcoR II, Mva I отличает аденин от тимина в узнаваемой последовательности [29].

Удаление одного или нескольких нуклеотидов одной цепи в левой от центра симметрии половине узнаваемого участка рестриктазы BamH I (5'G⁺GATCC) значительно снижает эффективность расщепления нативной цепи, так как видимо нарушается целостность двухспиральной структуры гидролизуемой половины сайта [45]. Эта рестриктаза отличается интересным поведением, которое выявили результаты эксперимента с синтетическим олигонуклеотидом dTCCAGATCTGGA, содержащим на концах половинки узнаваемого участка (выделено). Оказывается, RBamH I способна взаимодействовать с двумя дуплексными субстратами, стягивая их в единый комплекс, близкий по структуре к ковалентно связанным полинуклеотидным цепям. Другим примером такого поведения служит ДНК-лигаза фага T4, способная к сшиванию двухцепочечных фрагментов ДНК с «тупыми» концами [131]. Молекула рестриктазы BbvH I состоит из двух одинаковых субъединиц, в каждой из которых имеются связывающий и гидролитический центры [355]. Можно предположить, что связывающие центры в каждой из субъединиц взаимодействуют с «разъединенным» участком узнавания и соединяют его в структуру, подобную нативной, после чего вступает в действие гидролитический центр. Специфичность действия последнего существенно ниже специфичности связывания, так как гидролиз идет не только в каноническом месте (5'G⁺GATCC), но и рядом с ним. Такое расщепление может быть объяснено своеобразным люфтом между концами обеих молекул олигонуклеотидов, жестко не связанных ковалентными связями, а удерживаемых друг относительно друга за счет взаимодействия с ферментом, в котором, область межсубъединичного контакта может в определенных пределах деформироваться благодаря конформационной гибкости, свойственной всем белковым молекулам [20].

В рамках этого предположения показана допустимость пробелов в участке узнаваемого рестриктазой RBamH I, а именно — отсутствие аденина в одной или в обеих цепях, не исключаящих его расщепления, [20].

Как следует из рассмотренной информации, в результате исследований взаимодействия рестриктаз с модифицированными субстратами накоплен большой экспериментальный материал, интерпретация которого зачастую отличается спекулятивностью и неоднозначностью.

Более прямым методом локализации специфических контактов аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии с ДНК, является фотохимическое сшивание белка с ана-

логами ДНК, содержащими 5-бромурацил [102, 103]. Этот метод был использован [103] для установления участка связывания рестриктаз EcoR I и EcoR V с синтетическими олигонуклеотидными субстратами, содержащими указанную модификацию. В последние годы метод фотохимического сшивания ДНК с белком получил развитие, так как было показано [104, 128], что при использовании лазерного излучения происходит сшивание белка с немодифицированными основаниями ДНК. Однако, этот метод находится на стадии апробации и пока не может конкурировать с таким методом определения специфических контактов ДНК с белком, каким является рентгеноструктурный анализ — на сегодняшний день, самый информативный метод исследования тонкостей белок-нуклеинового узнавания.

8. РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСА РЕСТРИКТАЗЫ EcoR I С СУБСТРАТОМ

Наиболее полное представление о природе взаимодействия рестрикционных эндонуклеаз со специфической нуклеотидной последовательностью было получено Розенбергом с сотр. [137, 250], которые впервые провели рентгеноструктурные исследования комплекса рестриктазы EcoR I с синтетическим 13-ти членным олигонуклеотидным дуплексом, содержащим последовательность 5'GAATTC, и имеющим следующее строение:

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

T r C r G r C r G r A r A r T r T r C r G r C r G

(показана только одна цепь, участок узнавания рестриктазы EcoR I подчеркнут). В результате этих исследований была установлена трехмерная структура комплекса рестриктазы EcoR I с синтетическим олигонуклеотидом с разрешением в 3 Å. Данные рентгеноструктурного анализа подтвердили модель симметричного узнавания [233] специфической нуклеотидной последовательности рестриктазой EcoR I, а также предположения, полученные при исследованиях на модифицированных субстратах (см. разд. 7), о доминирующей роли взаимодействий в главном желобе ДНК в процессе узнавания специфической нуклеотидной последовательности белком. В фермент-субстратном комплексе две субъединицы EcoR I образуют симметричную структуру, содержащую ДНК частично «погруженную» в белок с одной стороны между субъединицами, при этом главный желоб ДНК полностью контактирует с белком, а минорный желоб экспонирован в растворитель.

В результате рентгеноструктурных исследований были получены новые данные относительно структуры ДНК в комплексе с ферментом. Во-первых, было показано, что структура ДНК отклоняется от классической В-структуры ДНК. Установлено, что в комплексе с ферментом происходит частичное

расплетение спирали ДНК, относительно центральной пары оснований A^6T^7 в олигонуклеотиде. В результате такого расплетения спирали ДНК происходит расширение главного желоба, что, по-видимому, облегчает доступ определенным участком белка для взаимодействия с основаниями ДНК. В результате частичного расплетения ДНК происходят не только изменения в остане ДНК, приводящие к изменению размеров главного желоба, но и изменения расстояний между соседними нуклеотидными основаниями. Установлено, что уменьшается расстояние между соседними нуклеотидными основаниями A^5 и A^6 . Во-вторых, было показано, что наряду с частичным расплетением ДНК относительно центральной пары нуклеотидов A^6T^7 , происходит изгиб спирали в районе нуклеотида G^4 . Угол изгиба при этом составляет от 20° до 40° . Таким образом, было установлено, что при взаимодействии ДНК с *EcoR I*, происходят значительные изменения конформации ДНК.

В результате обсуждаемых исследований также была установлена трехмерная структура белка и выявлены структурные его детерминанты, взаимодействующие с ДНК. Каждая субъединица фермента представляет собой отдельный домен, состоящий из 5 β -структур, окруженных α -спиралями. Эти α -спирали ориентированы в пространстве таким образом, что их N-концы вклиниваются в главный желоб ДНК. Аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с нуклеотидными основаниями, расположены именно на N-конце α -спиралей или рядом с ним. Первые 14 N-концевых аминокислотных остатка белка образуют петлю, которая «охватывает» ДНК в комплексе с ферментом.

Исследование структуры комплекса ДНК с *EcoR I* позволило также выявить возможную каталитическую щель, однако, расположение функциональных групп в активном центре белка установить не удалось, так как исследованный комплекс ДНК с *EcoR I*, образовавшийся в отсутствии ионов Mg^{2+} , не является продуктивным. Расщепление фосфодиэфирной связи происходит лишь в присутствии Mg^{2+} и поэтому полная структура каталитического центра формируется в результате комплексообразования с этими ионами.

Несмотря на то, что проведенные исследования не позволили выявить структуру активного центра молекулы фермента, в результате все же был раскрыт механизм узнавания специфической нуклеотидной последовательности ДНК, обуславливающий уникальную специфичность рестрикционной эндонуклеазы. Установлено, что в основе процесса узнавания лежит взаимодействие между определенными группами белка и нуклеотидными основаниями, расположенными в главном желобе. Показано, что между аминокислотными остатками Glu^{144} , Arg^{145} , и Arg^{200} и пуриновыми основаниями гексануклеотида $5'GAATTC$ образуется ряд водородных связей, обеспечивающих специфическое

взаимодействие ДНК и фермента (см. рис. 1). Аминокислотные остатки, участвующие в образовании водородных связей с нуклеотидными основаниями, расположены на симметричных субъединицах рестриктазы EcoR I таким образом, что Arg²⁰⁰ локализован на внешней, а Arg¹⁴⁵ и Glu¹⁴⁴ на внутренних α -спиралях, проникающих в главный желоб ДНК. Аминокислотный остаток Arg²⁰⁰, расположенный на внешней α -спирали каждой

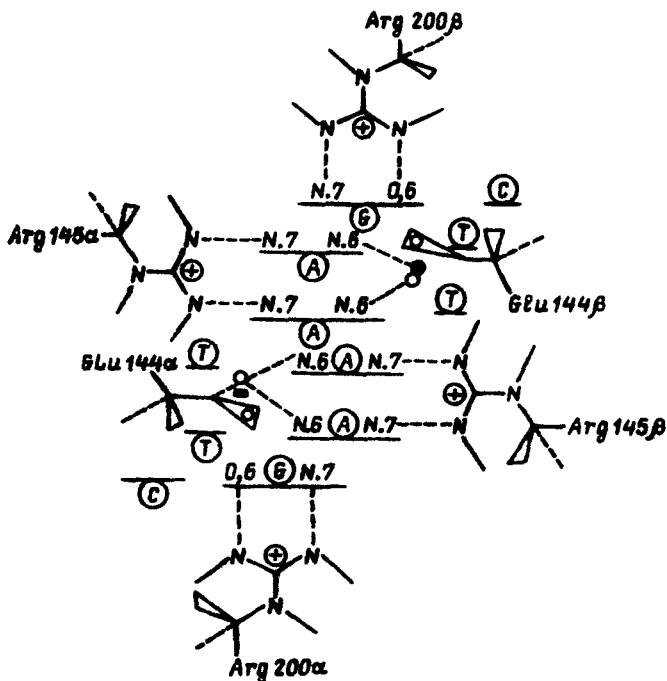
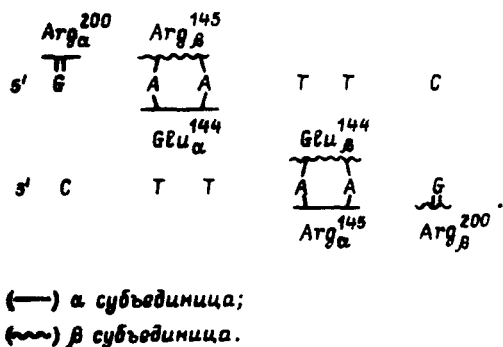


Рис. 1. Схематическое изображение водородных связей, образующихся при взаимодействии рестриктазы EcoR I с основаниями узнаваемой последовательности нуклеотидов

из субъединиц, взаимодействует с гуаниновым основанием, образуя 2 водородные связи, а аминокислотные остатки Arg¹⁴⁵ и Glu¹⁴⁴ этой же субъединицы образуют 4 водородные связи с адениновыми основаниями олигонуклеотида 5'-AATT-3'ТТАА

лоты Arg¹⁴⁵ и Glu¹⁴⁴ одной субъединицы взаимодействуют с парами соседних адениновых оснований локализованных на разных нитях ДНК (см. рис. 1). Следует отметить, что аминокислотные остатки Arg¹⁴⁵ и Glu¹⁴⁴ образуют поперечные водородные связи с соседними аденинами как бы «сшивая» их при помощи водородных связей.

Таким образом аминокислоты отдельно взятой субъединицы, участвующие в «узнавании», образуют водородные связи с основаниями согласно схеме представленной ниже (это упрощенный вариант схемы, рис. 1):



Таким образом между аминокислотными остатками Arg²⁰⁰, Arg¹⁴⁵ и Glu¹⁴⁴ одной субъединицы и 5-тью нуклеотидными основаниями участка узнавания, образуются 6 водородных связей. Аналогичные взаимодействия симметричной субъединицы с субстратом приводит к образованию еще 6 водородных связей. Реализация обсуждаемых водородных связей с ДНК в обычной В-конформации невозможно, однако, как уже отмечалось выше, в результате взаимодействия ДНК с белком, происходит частичное расплетение нитей ДНК, приводящее к сближению нуклеотидных оснований АА и ТТ, что и приводит к появлению возможности образования поперечных водородных связей с соседними аденинами. Таким образом, между аминокислотными остатками Arg²⁰⁰, Arg¹⁴⁵ и Glu¹⁴⁴, расположенных на обеих субъединицах рестриктазы, и гексануклеотидов 5'GAATTC образуется 12 водородных связей, которые обеспечивают специфичность связывания рестриктазы EcoR I с канонической нуклеотидной последовательностью. Следует отметить, что в этом случае наблюдается «насыщение по водородным связям» между олигонуклеотидом 5'GAATTC и аминокислотными остатками, участвующими в узнавании.

На основе механизма узнавания специфической последовательности ДНК рестриктазой EcoR I посредством водородных связей, удалось объяснить «релаксированную» специфичность рестриктазы EcoR I и иерархию «вырожденных» последовательностей, служащих узнаваемым участком, в отношении скорости их расщепления. Замещение любого из оснований в канонической EcoR I последовательности неизбежно приводит к уменьшению числа водородных связей с ферментом. В случае проявления релаксированной активности рестриктазы разные последовательности, являющиеся производными канонической,

расщепляются с неодинаковой скоростью [233]. Было установлено, что существует следующая градация (иерархия) скоростей гидролиза субстрата в зависимости от природы основания в первом положении последовательности 5'GAATTC: $G \gg A \gg T \gg C$ (5'GAATCC расщепляется быстрее чем 5'AAATTC и т. д.). Эта закономерность находит свое объяснение в зависимости между замещениями в канонической последовательности и снижением числа водородных связей с ферментом. Замещение аденина на гуанин приводит к исчезновению одной водородной связи. То же самое наблюдается в случае замены гуанина на тимин. Поэтому последовательности 5'AAATTC и 5'TAATTC смогут образовать с белком не более 11 водородных связей. Цитозин вообще не способен образовывать водородные связи. Поэтому последовательность 5'CAATTC образует с белком только 10 сайтспецифических водородных связей.

Учитывая быстрый прогресс в конструировании продуцентов рестриктаз методами генной инженерии, использование которых позволяет выделить необходимые количества целевого белка и установить его первичную структуру, а также большой интерес к исследованию механизмов специфического белок-нуклеинового взаимодействия, следует предположить, что в ближайшее время появятся новые работы, посвященные изучению обсуждаемого вопроса. В результате будет получен ответ на вопрос о существовании или отсутствии универсального специфического кода узнавания (взаимодействия) между белком и ДНК. Выявление такого кода способствовало бы конструированию рестриктаз заданной специфичности методами белковой инженерии.

9. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА ФЕРМЕНТОВ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ

Методом генетического анализа в исследованных немногочисленных случаях было установлено, что система хозяйской специфичности в случае ферментов II типа контролируется двумя (г и т) генами [64, 413]. Также в этих опытах была показана нежизнеспособность штаммов с генотипом g^+t^- [64, 413], что вполне понятно учитывая функцию метилазного компонента в системе двух сопряженных ферментов. На этом же этапе исследований было установлено, что гены ферментов рестрикции-модификации могут быть локализованы на плаزمиде [167, 389]. В настоящее время предполагается, что некоторые гены gt расположены в бактериальных хромосомах [180, 194, 306, 350, 363, 389], хотя строго говоря этот вывод экспериментально подтвержден только в случае *BsuR I* [375]. Имеется пример фаговой локализации генов, контролирующей структуру ферментов *RMEcoP I*, относящихся к III-ему типу [184, 351]. В от-

ношении ферментов II типа такие данные получены в случае ферментов, кодируемых ДНК вирусов, размножающихся в эукариотических клетках [271].

Бактериофаги SPR, Ф3Т, Q11 *Bacillus subtilis* содержат гены метилаз не входящих в системы R—M и модифицирующих одновременно два или три типа специфических нуклеотидных последовательностей ДНК. Показано, что MBsuSPR модифицирует цитозин в трех последовательностях — 5'GGCC; 5'CC^A_TGG; 5'CCGG, а MBsuФ3Т и MBsu Q11 в двух последовательностях — 5'GGLC; 5'GCNGC и 5'GGCC; 5'GAGCTC соответственно [74, 154, 155, 195, 280, 376]. Эти метилазы могут выполнять антирестрикционную функцию, так как последовательности, модифицируемые этими метилазами, входят в спектр последовательностей узнаваемых рестриктазами, выделенными из разных штаммов *Bacillus subtilis*.

В клетках *E. coli* также имеются две метилазы, не входящие в состав систем рестрикции — модификации. Метилаза *Eco dam* модифицирует аденин в последовательности 5'GATC. Ее ген локализован в хромосоме на 65 минуте, а ген метилазы *Eco dcm* (специфичность 5'CC(A/T)GG), локализован на 37 минуте [241]. Есть данные, что эти ферменты в бактериальной клетке выполняют полифункциональную роль [242, 330].

Следует отметить, что исследования систем RM II типа методами генанализа являются немногочисленными. Это вполне объяснимо, учитывая тот факт, что подавляющее большинство продуцентов рестриктаз относятся к таксонам, которые пока недоступны для применения генетических методов исследования. Поэтому в этом случае единственным выходом из создавшейся ситуации является применение молекулярно-генетического метода — метода геной инженерии. Учитывая большие потенциальные возможности этой методологии, в последнее время она стала основным подходом при исследовании таких вопросов как структура и структурная организация, а также регуляция экспрессии генов *gm*. Большой интерес представляют данные о первичной структуре, наличие которых способствует решению таких фундаментальных задач, как механизмы высокоспецифического белок-нуклеинового взаимодействия и эволюции генов рестрикции-модификации. В прикладном аспекте клонирование генов *gm* и исследование их структуры является базой для создания высокоэффективных продуцентов дефицитных ферментов.

9.1. Структура генов рестрикции-модификации

В настоящее время список клонированных систем RM (плюс RDp1 I) насчитывает 48 наименований (см. разд. 5, часть II). Первичная структура установлена для 10-ти «классических» систем RM: *EcoR I* [148, 277], *EcoR V* [88], *Hha II* [347], *Pst I*

[385], PaeR7 [370], BsuR I [206], Dde I [365], Taq I [350], Dpn II [119, 221], Sin I [199], рестриктазы Dpn I [221], узнающей и расщепляющей только метилированную ДНК, а также ряда метилаз [298, 356]. Большое число клонированных генов позволяет предположить, что в ближайшее время число охарактеризованных в структурном отношении генов гт значительно пополнится.

На рис. 2 приведены данные о величине, взаимном расположении и направлении транскрипции генов рестрикции-модификации.

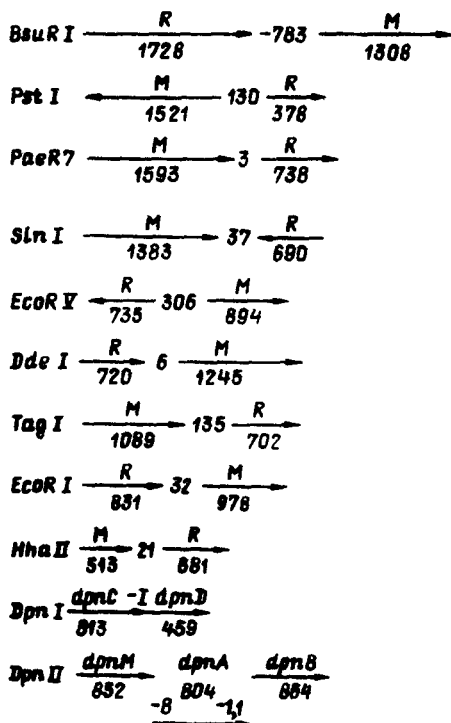


Рис. 2. Организация генов гт (цифрами обозначены величины генов и расстояние между ними в нп)

Величины генов и соответственно кодируемых ими продуктов значительно варьирует: от 681 нп (R_{Hha II}) до 1728 нп (R_{BsuR I}) для рестриктаз и от 513 нп (M_{Hha II}) до 1592 нп (M_{PaeR7}) для метилаз. Во всех случаях, за исключением R_{M_{BsuR I}} и R_{M_{Hha II}}, гены кодирующие рестриктазы, уступают по величине генам сопряженной метилазы.

Среди проанализированных систем РМ имеются все возмож-

ные варианты транскрипции генов: дивергентной, конвергентной и однонаправленной (тандемной).

Все рассматриваемые системы характеризуются тесным сцеплением генов, *gm* — межгенный участок в большинстве случаев исчисляется несколькими (*RMDde I*) или десятками (*RMecoR I*, *RMHha II*, *RMTag I*) нуклеотидных пар. Выделяются в этом отношении гены *RMBsuR I*, расстояние между которыми равняется 783 нп. Другой крайний случай характерен для *RMPaeR7*, гены которой практически не разделены — сразу за терминирующим кодоном метилазного гена стоит иницирующий кодон рестриктазы.

Общепринято, что системы *RM* контролируются двумя генами. В этом отношении выделяются *Dpn I* и *Dpn II*. Последнюю систему кодируют три гена: *dnp M* (метилаза), *dnp A* (метилаза) и *dnp B* (рестриктаза). Все три фермента узнают одну и ту же последовательность нуклеотидов 5'GATC. На основе имеющихся данных предполагается, что *dnp M* и *dnp B* соответствуют компонентам «классической» двухкомпонентной *RM* системы II типа [119, 221, 222]. Функция *dnp A* пока не установлена. В случае *Dpn I* в составе одного клонированного фрагмента находятся две рамки считывания отнесенные к генам *dnp C* и *dnp D* [221]. Первый из них кодирует ген рестриктазы *Dpn I*, функция второго неизвестна. Вывод о том, что гены *dnp C* и *dnp D* являются взаимосвязанными в систему поддерживается данными о наличии с обеих сторон ДНК последовательностей гомологичных таковым, окружающим как целое систему генов *dnp M*, *dnp A* и *dnp B* [221, 240]. Через эти последовательности путем рекомбинации происходит кассетное замещение одной группы генов на другую после трансформации реципиентных клеток *Streptococcus pneumoniae*, содержащих одну из рассматриваемых *Dpn* систем донорной ДНК, несущей альтернативную по специфичности группу *Dpn* генов [221]. Особенности организации *Dpn II* генов выражается кроме того и в перекрывании рамок считывания генов *dnpA* и *dnpB* (см. рис. 2) [119].

Возможно особенная организация системы *Dpn* не является единственным исключением. На это указывает тот факт, что и между генами *RMBamH I* также найден протяженный фрагмент с открытой рамкой считывания [97]. Функция гипотетического полипептида пока не определена.

Общепринято, что ферменты любой системы *RM* характеризуются идентичной специфичностью в отношении узнаваемой последовательности нуклеотидов. До последнего времени не имелось фактов противоречащих этому обобщению. Существуют гипотетические варианты метилазной специфичности, отличные от специфичности сопряженной рестриктазы, способные защищать клеточную ДНК. Возможно прообразом таких систем является *REco47 I* и *MEco47 II* узнающие перекрывающиеся

последовательности нуклеотидов — соответственно 5'GG(A/T)CC и 5'GGNCC. Как видно из специфичности этих ферментов все сайты REco47 I перекрываются с частью сайтов MEco47 II. О возможности отнесения этих ферментов к одной системе говорит тот факт, что согласно данным по клонированию соответствующие гены являются тесно сцепленными и ни в одном случае не удалось получить клонов несущих ген для MEco47 I [299].

9.2. Регуляция экспрессии генов рестрикции-модификации

Изучение регуляции экспрессии генов *gm* имеет свою специфику, выражающуюся в том, что, как уже отмечалось, исследуемая проблема в основном решается применением методов генной инженерии — клонирования соответствующих генов. Учитывая тот факт, что таксономическая принадлежность реципиентных штаммов (в подавляющем большинстве случаев штаммов *E. coli*) и штаммов — источников донорной (клонированной) ДНК зачастую отличается (см. разд. 5, часть II), экспрессия генов *gm* в таких случаях представляет вариант гетерологической экспрессии. Поэтому при интерпретации полученных результатов следует не упускать из виду, что формулируемые выводы относятся к регуляции экспрессии именно в новом для генов *gm* хозяине, а не к исходным клеткам (природном источнике клонированных генов). В связи с этим исследуемая проблема вынужденно во многом сводится к вопросам гетерологической, а учитывая специфику систем RM, и скоординированной экспрессии генов *gm*, что, понятно, не всегда отражает процессы происходящие в природном продуценте клонированных генов. Эти замечания, очевидно, не относятся к переносу генов *gm* между штаммами одного вида.

Вопросы регуляции экспрессии генов *gm* в первую очередь рассматриваются через призму того, каким образом обеспечивается скоординированный синтез рестриктазы и метилазы, исключающий возможность недометилирования ДНК. Опасность для выживания клетки могла бы возникнуть в случае отсутствия метилазной активности. Учитывая такие факты, как:

- 1) общепринятое мнение, что гены *gm* экспрессируются конститутивно;

- 2) для защиты ДНК от действия рестриктазы достаточно наличия модифицированного основания только в одной из цепей последовательности нуклеотидов узнаваемой рестриктазой (обычная ситуация наблюдаемая после репликации ДНК);

- 3) в клетках присутствуют системы, обеспечивающие репарацию двухнитевых и однонитевых разрывов, маловероятно возникновение случаев самоубийства клетки собствен-

ной рестриктазой (за исключением случаев инактивации гена метилазы вследствие мутации). Совершенно другая ситуация имеется в случае клонирования генов *gm* или их установления в новом штамме в природных условиях. Предполагается, что опережающая экспрессия гена метилазы является необходимым условием для успешного одновременного клонирования гена сопряженной рестриктазы. Относительно большое число примеров клонирования генов *gm* в *E. coli* служит указанием на то, что каким то образом это условие выполняется. Это тем более удивительно, так как большинство перенесенных в кишечную палочку генов *gm* являются чужеродными (гетерологичными) по таксономическому происхождению реципиентному штамму. Вопрос о том, отражает ли это эволюционно закрепленную специфику генов *gm* или определяется случайными причинами, пока остается открытым. Мало что для обсуждения дают сведения о многочисленных примерах другого характера — неудачных опытах по клонированию генов *gm*, так как в этих случаях отрицательный результат может быть обусловлен многими причинами не связанными со скоординированным синтезом метилазы и рестриктазы.

Общепринято, что для успешного клонирования генов *gm* необходимо, чтобы они экспрессировались и экспрессировались скоординированно в том смысле, как этот вопрос обсуждается в контексте настоящего обзора. Рассмотрим данные служащие основой для рассуждений о том каким образом выполняются эти требования.

*9.2.1. Структура регуляторных областей генов *gm**

Среди факторов способных влиять на уровень экспрессии генов *gm* рассматриваются — способ транскрипции (оперонный или для каждого из генов отдельный) структура последовательностей ДНК в 5' и 3' областях, окружающих структурные гены; GC-состав структурных генов; частота использования кодонов, пространственная структура иРНК; наличие посттрансляционного процессинга.

Особенности промоторной области, прилегающей с 5' конца к структурным генам влияют на уровень экспрессии (транскрипции). У прокариотических микроорганизмов это так называемые —10 (Прибнов бокс) и —35 последовательности, определяющие силу взаимодействия с РНК полимеразой [324, 348]. На уровень трансляции влияет последовательность SD (Шайн-Делгарно) [345], транскриптит которой составляет часть иРНК и определяет ее взаимодействие с 3' концом 16S

РНК в рибосомах. В табл. 21 представлены данные о наличии и структуре этих последовательностей в промоторных областях клонированных генов *gm*. Как видно наличие таких последовательностей в той или иной мере приближенных по структуре к

каноническим для *E. coli* в ряде случаев наблюдается. Поэтому в этих случаях не возникает вопроса о механизмах экспрессии, которые могут быть реализованы соответствующими компонентами транскрипционного аппарата *E. coli*. В остальных случаях перед структурными генами обсуждаемые последовательности частично или вообще не представлены (см. табл. 21), но это не препятствует их экспрессии. Это говорит об участии в регуляции транскрипции и (или) трансляции, либо последовательностей других, чем обсуждаемые, структур, либо транскрипции генов с промоторов расположенных в векторных

Таблица 21

Структура регуляторных областей генов *gtr*

Ген	Область—35	Расстояние в парах нуклеотидов	Область—10	SD последовательность	Расстояние до АТГ в парах нуклеотидов	Литература
<i>E. coli</i> ^a	TTGACA	16—19	TATAAT	TAAGGAGGTG	3—11	[348, 324, 345]
MPst I	TTATTA	16	gATAcT			[385]
RPst I	TTAAaA	23	TAgAgT			[347]
MHpa II				GAGG	13	[347]
RHha II				GGAG	9	[347]
MEcoR I	TTGAac	17	TATttT	TAAGG	9	[148, 277]
REcoR I				GGAN ₅ GGA	3	[148, 277]
MPaeR7	TTGcCg	13	TgTcATG			[370]
RPaeR7				GGAG	5	[370]
MTaq I				TAAGGAGG	4	[350]
RTaq I				GGAG	9	[365]
MDde I				GGGG	5	[365]
RDde I	TTGAct	15	TATAAT	AGGAGG	10	[206]
MBsuR I			TActAT	GAGG	9	[206]
RBsuR I			TATttT	GGT	7	[88]
MecoR V	TTGAgA	17	TAcAcT	GGA	8	[88]
RecoR V	TTGcaA	19				
RMDpn II (M) dpnM	TTGAtA	17	TAAaAT	AATTTCN TATA	9	[119, 221]
(M) dpnA				AATTTCTN ₅ - TATA	10	[119]
(R) dpnB				GGAGG	6	[119, 221]
RDpn I				GGTG	11	[221]
(R) dpnC	TTGcC	20	TtaAAT	AGGAN ₄ ATC	7	[221]
(?) dpnD				GGAGG	4	[356]
MEcoR II	TTcAat	17	TAcAgT	AAGG	9	[298]
MBspR I	TTGtCA	17	TAAAcT	GGAGGT	4	[199]
RSin I	TTGACT	22	TATAcT	GGA	14	[199]
MSin I	TTGACT	17	cATAAT			

a — канонические структуры —35 и —10 областей, характерные для генов *E. coli*: приводятся по [324, 348], а SD последовательности по [345].

молекулах. Последнее было подтверждено в случае генов RMHha II, MTaq I и MBsp I [217, 347, 350], поэтому остается правомочным первое предположение.

Резюмируя рассмотренные данные напрашивается вывод о том, что уровень приближенности структуры промоторных областей генов *gm* к канонической для *E. coli* не является единственным фактором, однозначно определяющим возможность экспрессии (как скоординированной, так и по принципу «да» или «нет») гетерологичных по происхождению генов (и тем самым успех клонирования генов *gm*). Конечно, не исключены случаи, когда этот фактор может явиться решающим.

9.2.2. Возможные механизмы скоординированной экспрессии генов gm

Отсутствие молекулярно-генетических препятствий для экспрессии клонированных генов, как уже отмечалось, не гарантирует успеха в таких экспериментах. Необходимым условием является реализация определенных механизмов, обеспечивающих опережающее по сравнению с рестриктазой действие метилазы на ДНК реципиентного штамма. Самым простым способом достижения этой цели могла бы быть опережающая экспрессия метилазного гена. Это может реализовываться или путем его опережающей транскрипции и (или) трансляции или какими то другими механизмами. В литературе отсутствуют генетические данные о существовании регуляторных генов контролирующей экспрессию генов *gm* II типа. Для генов *gm* предполагается конститутивная экспрессия. Однако, конститутивная их экспрессия не исключает возможности наличия механизмов контролирующих ее уровень.

Данные представленные на рис. 2 убеждают в том, что гены системы *gm* значительно различаются по своей организации. Единственной общей чертой, выявленной среди охарактеризованных систем, оказалось тесное сцепление генов, которые могут располагаться во всех возможных вариантах, как в отношении их последовательности (*gm*, *mg*), так и во взаимной ориентации направления транскрипции (тандемная, конвергентная и дивергентная). Разнообразие организации генов *gm* могло бы указывать на разновариантность способа координации их экспрессии в разных системах *gm*. Наличие сведений о первичной структуре генов *gm* позволило приступить к анализу этого вопроса. Очевидно, что оперонная модель транскрипции блока генов *gm* может реализовываться только в случае их тандемного расположения. Таким образом организовано семь рассматриваемых систем (более половины среди исследованных) это гены PaeR7, Hha II, Taq I, EcoR I, Dde I, BsuR I и Dpn II (см. рис 2).

Оперонный вариант транскрипции предположительно имеет место в случае генов *gmPaeR7* [143, 370]. Этого и следовало ожидать, так как данные о первичной структуре свидетельствуют, что между генами метилазы и рестриктазы (расположенных в указанном порядке) не имеется никакого промежутка (сразу же за терминаторным кодоном ТАА в гене метилазы идет инициаторный кодон АТГ гена рестриктазы). Расположение *m* гена перед *g* геном предполагает опережающую экспрессию первого. Кроме того наличие аналогов канонических —35 и —10 последовательностей наблюдается только перед геном метилазы. Делеционный анализ показал, что ступенчатое удаление 34 нуклеотидов в районе —35 области, расположенной в 5' направлении от точки инициации *m* гена, реализуется в постепном скоординированном снижении экспрессии как проксимального (метилазного), так и дистального (рестриктазного) генов. Полное удаление —35 области приводит к полному прекращению синтеза метилазы и значительному (в 1000 раз) снижению уровня рестриктазы. Последний факт (наличие, хотя и слабого синтеза, рестриктазы) может быть объяснен выполнением очень слабой промоторной функции терминальной областью метилазного гена, хотя никаких аналогов —35 и —10 областей в ней не обнаружено. Здесь на расстоянии 5 нуклеотидов от инициаторного кодона гена-рестриктазы в частности выявлена последовательность 5'GGAG, частично перекрывающаяся с канонической для *E. coli* SD последовательностью.

Количество рестриктазы *PaeR7* в клетках значительно превышает таковое метилазы [370]. В связи с тем, что эти гены входят в состав оперона и предположительно котранскрибируются уровень их экспрессии вряд ли контролируется механизмами транскрипции. Поэтому причину наблюдаемого явления следует искать в разнице эффективности трансляции сравниваемых генов. Действительно перед геном *m* не имеется последовательности SD, которая наблюдается на расстоянии 3—9 нп от инициаторного кодона гена эндоуклеазы. Кроме того не исключено, что наличие в составе метилазного гена редко используемого инициаторного кодона GTG, вместо обычного АТГ, сказывается на эффективности трансляции соответствующей иРНК.

Анализ структуры генов *RM_{PaeR7}* указывает на возможность существования и других уровней контроля экспрессии, а именно на уровне использования кодонов. Согласно этому показателю гены *RM_{PaeR7}* близки к сильно экспрессируемым генам *E. coli*.

Гены *RM_{Hha II}*, относящиеся согласно принципу их организации к тандемно расположенным в порядке *M*→*R*→ разделены 21 нп [347]. Предположительно они могут образовать оперон. Элементы Прибнов бокса удалось обнаружить только перед метилазным геном ни перед одним из генов не имеется

элементов канонической для *E. coli* —35 области. Показана зависимость одновременной экспрессии обоих генов от ориентации клонированного фрагмента, содержащего гены *RMHha II*, относительно векторных промоторов. Вместе с тем эти данные не противоречат предположению о функционировании генов *RMHha II* в *E. coli* — в виде оперона. Реализуется ли в *H. haemolyticus* — источнике генов, вопрос остается открытым.

Относительно варианта реализации транскрипции генов *RMtaq I*, расположенных в порядке $M \rightarrow R \rightarrow$ на расстоянии 135 нп делать определенные выводы оказалось невозможным [350]. Перед ними не удается обнаружить последовательностей, характерных для промоторов *E. coli*. SD последовательность обнаружена только перед *g* геном. Показано, что ген метилазы экспрессируется с векторных последовательностей, а последовательности необходимые для транскрипции гена рестриктазы расположены в метилазном гене. Поэтому в данном случае экспрессия этих генов в *E. coli* скорее всего реализуется не с промоторов характерных для *T. aquaticus*, продуцента *RMtaq I*. Относительно большое расстояние между этими генами позволяет предположить, что они в клетках *T. aquaticus* транскрибируются раздельно.

В случае генов *RMtaq I* вопрос о скоординированной их экспрессии при клонировании в *E. coli*, в отличие от подавляющего большинства других исследованных систем рестрикции-модификации, неожиданно оказался неактуальным. Клетки, содержащие рестриктазу остаются жизнеспособными и в отсутствие модифицирующего фермента.

Интересной особенностью обсуждаемой системы рестрикции-модификации является неравномерное распределение *Taq I* сайтов между генами. В гене рестриктазы их имеется 7, а метилазы — ни одного, что является статистически достоверным отклонением от предсказуемого их распределения. Высказывается предположение, что такое расположение *Taq I* сайтов имеет какую-то регуляторную функцию. Возможный механизм такой регуляции мог бы заключаться во взаимодействии эндонуклеазы с незащищенными метилированием *Taq I* сайтами в гене рестриктазы, что исключило бы его транскрипцию. Тем самым был бы прекращен синтез фермента до тех пор пока клеточная ДНК *T. aquaticus* не подверглась бы модификации по всем незащищенным сайтам. Такой механизм мог бы играть определенную роль в ходе установления *RMtaq I* в новом хозяине и придал бы клеткам способность выживать в случае вариации степени метилирования ДНК.

Исследование других клонированных генов *gm* показало, что аналогичное распределение узнаваемых сайтов является нехарактерным. Поэтому ауторестрикция не может являться общим механизмом регуляции экспрессии генов рестриктазы.

Система RMDрп II отличается необычной для ферментов II типа генетической организацией [119, 221]. Она включает 3 гена. Гены транскрибируются тандемно в следующем порядке: дрпМ (метиلاзный), дрпА (метилазный) и дрпВ (эндонуклеазный) (см. рис. 2). Кодрующие области первого и второго генов перекрываются на 8 нп, второго и третьего — на 11 нп. Характерные для —35 и —10 областей последовательности удается обнаружить только перед дрпМ геном. SD последовательность, имеющая элементы гомологии с канонической для *E. coli* имеется перед дрпВ геном. Перед дрпМ и дрпА продемонстрировано наличие типичных последовательностей, которые отличаются от структуры SD [119]. Их структура приведена в табл. 21. Предполагается, что они выполняют функцию SD последовательностей как в грамположительных, так и в грамотрицательных микроорганизмах [119].

ДНК модифицирующую защитную функцию выполняет продукт гена дрпМ. Функция второй метилазы, кодируемой геном дрпА не выяснена. Учитывая его перекрывание с эндонуклеазным и метилазным генами, для дрпМ предполагается регуляторная роль на уровне трансляции или транскрипции [119].

Гены RMDрп II были успешно клонированы как в *S. рneштопае* (гомологичный реципиент) [221], так и в *E. coli* [119]. Таким образом, эта система имеет элементы регуляции, проявляющие себя активно в клетках различной таксономической принадлежности.

Рассмотренными чатерьяма системами исчерпывается список исследованных генов гт, организованных тандемно таким образом, что локус метилазы предшествует локусу рестриктазы ($M \rightarrow R \rightarrow$). Такая организация, как уже отмечалось, может явиться тем механизмом, который обеспечивает опережающую экспрессию метилазного гена. Наличие других вариантов организации обсуждаемых генов указывает на привлечение других способов контроля для обеспечения скоординированной их экспрессии. Особенная в этом необходимость должна обнаружиться в случае такого варианта тандемного расположения генов, когда г ген предшествует т гену, так как следуя вышеизложенной логике, экспрессия гена рестриктазы может опередить такую метилазу. Таких систем имеется три — RMEcoR I, Dde I и BsuR I (см. рис. 2).

Гены гт EcoRI [148, 277], разделены 32 нп. Перед обоими из них выявлены промоторные и SD последовательности в той или иной мере гомологичные таковым характерным для *E. coli* (см. табл. 21). Их взаимные расстояния и структура лучше соответствуют каноническим в случае промоторной области предшествующей метилазному гену. Эти данные указывают на возможность отдельной транскрипции рассматриваемых локусов, а в случае метилазы и на более сильную экспрессию этого

гена. Действительно для метилазы (ген *m* следует за рестриктазным) этот вывод был подтвержден при изучении экспрессии отдельно клонированных *g* и *m* генов [216, 281]. Следует отметить, что сохранение клетками *E. coli*, несущими экспрессирующийся ген *REcoR I*, жизнеспособности в отсутствие модификации ДНК [148, 216], явилось неожиданным открытием, противоречившим всем имевшимся представлениям о неминуемой гибели g^+m^- клеток.

Близкое взаимное расположение следующих друг за другом на расстоянии всего 6 нп и транскрибируемых в одну сторону генов *RMDde I* не исключает их котранскрипции с одного промотора [365]. Действительно характерные —35 и —10 структуры имеются только перед первым *g* геном. С другой стороны было показано, что делеционное удаление этих структур вместе с частью *g* гена не приводит к прекращению синтеза метилазы в клетках. Данные о том, что уровень экспрессии метилазного гена зависит от ориентации клонированного фрагмента ДНК (лишенного части *g* гена вместе с его промотором) могут быть приняты как указание на выполнение промоторной функции последовательностями векторной молекулы.

Гены *RMDde I*, несмотря на их тесное сцепление, не удалось проклонировать в один этап и пришлось это осуществлять в два приема — сначала перенести в реципиентные клетки ген метилазы, а затем на совместимой плазмиде — ген *RDde I*. Необходимость в этом была вызвана тем, что только определенным образом вырезанный метилазный ген, встроенный в векторную молекулу, смог обеспечить полную модификацию ДНК реципиентного штамма по *Dde I* сайтам. Неудача одноэтапного клонирования могла бы быть объяснена нескоординированной экспрессией, выражающейся в первоочередной транскрипции (и соответственно экспрессии) рестриктазного гена, расположенного в начале оперона и обеспеченного, в отличие от метилазного гена, собственным промотором. Однако ситуация выглядит намного сложнее. Полное специфическое метилирование ДНК реципиентного штамма было достигнуто только в случае клонирования гена *MDde I*, лишенного с 5' конца промотора *g* гена и обрезанного, с 3' конца. Таким образом синтезируемый белок метилазы был лишен 33 концевых аминокислот, которые кроме того были замещены 6-ью аминокислотами кодируемых непосредственно прилегающей нуклеотидной последовательностью векторной молекулы *pBR322*. Это по каким-то причинам придало большую стабильность белку *in vitro*. Возможно это имеет место и *in vivo*.

Резюмируя обсуждение системы *RMDde I* следует отметить, что в данном случае ее скоординированное функционирование в новом хозяине не реализовалась. Обсуждая это явление, авторами публикации [180, 365] выдвигается предположение, что причиной этому явлению может быть как дисрегуляция транс-

крипции генов *gm* или нестабильность иРНК, так и быстрая инактивация метилазы в клетках *E. coli* протеазами.

В случае тандемно расположенных ($R \rightarrow M \rightarrow$) генов *RMBsuR I* однозначно доказана их раздельная транскрипция [206]. Этого и следовало ожидать, учитывая большое расстояние между ними (783 нп) и наличие элементов Прибнов бокса в -10 области перед каждым из генов (см. табл. 21). Анализ РНК транскриптов методом S_1 -картирования подтвердил выдвинутое предположение о том, что гены *RMBsuR I* считываются с собственных промоторов.

Последовательность *SD* предшествующая инициаторному кодону гена метилазы *BsuR I* имеет большую гомологию с канонической по сравнению с таковой расположенной перед геном рестриктазы *BsuR I*. Расчеты показали, что сила взаимодействия *SD* участка с 3' концом 16S РНК в случае метилазы (расчетная свободная энергия $-18,8$ ккал/моль) значительно превышает этот показатель для нуклеазы ($-9,4$ ккал/моль). Возможно этот фактор оказался решающим в реализации опережающей экспрессии модифицирующего компонента при установлении клонированных генов *RMBsuR I* в *E. coli*.

Для генов *RMSin I* характерно конвергентное расположение [199]. В этом случае очевидно, что транскрипция составляющих компонентов должна происходить с отдельных промоторов. В соответствии с этим перед обоими генами были обнаружены типичные -35 и -10 последовательности. Перед обоими структурными генами также имеются элементы *SD* последовательностей.

Дивергентная организация генов обнаружена в случае *RMPst I* и *EcoR V* (см. рис. 2). Они разделены 130 и 306 нуклеотидными парами соответственно. В обоих случаях в общей области разделяющей составляющие гены наблюдаются типичные промоторные последовательности. Гены транскрибируются с разных промоторов и с разных цепей ДНК. В случае *RMPst I* было показано, что начало транскриптов разделяет всего лишь 70 нп. В связи с тем, что РНК полимеразы *E. coli* покрывает 40—50 нп начиная от точки инициации транскрипции [385], не исключено перекрывание ею обоих промоторов. Экспериментально доказано, что *in vitro* полимеразы имеет более сильное сродство к промотору метилазного гена. Сказанное предполагает преимущественную транскрипцию *m* гена и может объяснить тот факт, что, как установлено, этот ген экспрессируется более сильно, чем ген рестриктазы.

Резюмируя вышеизложенную информацию следует еще раз подчеркнуть, что ее интерпретация является однозначной в случае наличия или отсутствия сигналов инициации транскрипции и *SD* последовательностей гомологичных таковым *E. coli*. Вместе с тем очевидно, что экспрессия гетерологичных по таксономическому происхождению для этих клеток генов в не-

которых случаях происходит даже в отсутствии сигналов транскрипций характерных для *E. coli*. Такое же заключение правомочно и для SD последовательностей, структура которых имеет отношение к экспрессии генов на уровне трансляции [324, 348]. Эти выводы имеют прямое отношение к вопросу о влиянии барьера гетерологичной экспрессии на исход опытов по клонированию генов *gm*.

Влияние вторичной структуры иРНК генов *gm* на их экспрессию обсуждалось только в нескольких случаях [88, 206]. Наиболее подробно этот вопрос рассмотрен в случае иРНК рестриктазы *EcoRV* [88]. Оказалось, что за терминаторным кодоном в составе иРНК находится GC богатая область протяженностью в 110 нуклеотидов, содержащая несколько инвертированных повторов. Согласно расчетам их наличие позволяет образоваться нескольким стабильным двухспиральным структурам с одноцепочечной петлей, характерным для сигналов терминации транскрипции. Петля, входящая в состав одной из рассматриваемых структур, содержит последовательность из 7-ми нуклеотидов комплементарных с последовательностью, включающей и окружающей инициаторный кодон, что может привести к образованию дуплекса в этой области иРНК. Если предсказанная на основании расчетов структура действительно реализуется, то это могло бы привести к прекращению инициации трансляции сразу после синтеза полной последовательности иРНК. Таким образом трансляция могла бы осуществляться только в ходе транскрипции. Аналогичные структуры не выявлены в случае метилазной иРНК. Поэтому можно предположить, что в случае клонирования генов *RMEcoRV* этот механизм регуляции обеспечивает опережающую экспрессию метилазного гена.

В случае генов *RMPst I* отмечается наличие в составе иРНК, расположенных за терминаторным кодоном последовательностей, способных образовать шпилечные структуры [385]. Вопрос об их участии в регуляции экспрессии остается открытым.

В случае конвергентно ориентированных тесно сцепленных генов *RMSin I*, разделенных всего 31 нп, выдвинуто предположение о наличии в этой области общего терминатора транскрипции. Действительно такая последовательность, предположительно способная образовывать терминаторную шпилечную структуру с петлей, окруженная АТ богатыми участками, в межгенной области имеется. Последовательности, способные давать шпилечные структуры в иРНК, имеются и за геном *MBsuR I* [206].

Анализ многих генов *E. coli* показал, что они различаются по частоте использования синонимных кодонов [78, 381]. Кроме того была выявлена корреляция между этим показателем и силой экспрессии генов, регулируемой на уровне трансляции. Обсуждаемый механизм регуляции обеспечивается таким обра-

зом, что в сильно экспрессируемых генах кодонный состав коррелирует с наиболее представленными в количественном отношении в клетке изоакцепторными для отдельных аминокислот видами иРНК [78, 381]. Синонимные кодоны, содержащие в третьем положении G/C, характерны для сильно экспрессируемых генов, обратная закономерность характерна для кодонов, содержащих в этом положении A/T. АТ состав ДНК влияет на кодонный состав [151].

АТ состав ДНК *E. coli* равняется 49% [88, 148, 277]. Этот показатель для генов *RMecoRI* и *RDEcoRV* равняется 65% и 65,3% соответственно [88, 148, 277], что может быть связано или с особенностями организации этих локусов, определяющими уровень их экспрессии, или с их эволюционным происхождением из таксонов с таким АТ содержанием. Высокое АТ содержание характерно и для ряда других *RM* генов. Оно равняется 68,4% — *RBsuRI*, 61,9% — *MBsuRI* (АТ содержание ДНК *B. subtilis* равно 57%) [206], 63% — *RMDdeI* (43% — ДНК *Desulfovibrio desulfuricans*) [365], 62% — *RPstI* и 68% — *MPstI* [385]. Другие гены по АТ составу не так сильно отличаются от характерного для *E. coli*: 52% — *RTaqI*, 59% — *MTaqI* [350], 58% — *RMSinI* [199]. Гены *RMPaeR7* выделяются высоким GC содержанием, равным 60,8% (39,2% АТ) [370].

Согласно кодонному составу гены *RMecoRI* [148, 277], *EcoRV* [88], *PstRI* [385] и *BsuRI* [206] могут быть отнесены к слабо экспрессирующимся в *E. coli*. В случае *RTaqI* [350] он соответствует распределению, характерному для ДНК этого микроорганизма. Выделяется в этом отношении структура генов *RMPaeR7*, кодонный состав которых соответствует таковому сильно экспрессируемых генов кишечной палочки [370].

9.3. Гомология генов, кодирующих ферменты рестрикции-модификации

Исследования, посвященные определению первичной структуры генов рестрикции-модификации с самого начала не являлись самоцелью. Полученные данные послужили предпосылкой для поиска возможных гомологий структуры генов — наличия или отсутствия консервативных нуклеотидных (или выводимых из них аминокислотных) последовательностей. Эти сведения являются необходимыми для решения таких вопросов как эволюция генов *gp*, определение участков белковых молекул ответственных за специфическое взаимодействие с субстратом и участвующих в формировании каталитического центра.

Сравнение нуклеотидных или аминокислотных последовательностей производится с помощью компьютерной (см. обзоры [65, 118]) техники. В этом направлении в настоящее время работы проводятся во многих лабораториях.

Первой была секвенирована система EcoR I [148, 277]. Анализ последовательностей показал, что рестриктаза и метилаза существенно различаются на уровне первичной структуры, несмотря на то, что оба фермента взаимодействуют с одной и той же субстратной последовательностью. В дальнейшем оказалось, что это характерно и для остальных исследованных случаев [88, 109, 199, 350, 356, 382]. Возможно анализ на уровне вторичной или третичной структур позволит обнаружить общие структурные элементы, однако, все же более вероятно, что отсутствие гомологии указывает на различную природу механизмов взаимодействия сопряженных рестриктаз и метилаз с субстратом.

Другим, может быть и менее неожиданным, результатом сравнения является отсутствие заметной гомологии среди рестриктаз [109, 199, 382], даже между ферментами с близкими характеристиками субстратной специфичности как, например, R ρ aeR7 I (5'С⁺TCGAG) и RTaq I (5⁺TCGA) [350]. В то же время иммунологическими методами обнаружено сходство изоизомеров Rsg I и EcoR I на уровне третичной структуры [147]. К настоящему моменту также проведено определение 34 N-концевых аминокислот RRsg I и обнаружена значительная гомология с REcoR I. Данные по первичной структуре генов RMRsg I пока отсутствуют, что исключает возможность сравнения ее с этой характеристикой генов RMEcoR I.

В случае метилаз прослеживается иная картина. В результате систематических исследований бактериальных и фаговых метилаз, образующих ^m5С, разным авторам удалось выявить от трех до одиннадцати гомологичных районов, разделенных вариabильными участками [74, 109, 117, 147, 199, 217, 356]. Так, неотъемлемой частью этих ферментов являются аминокислотные фрагменты следующего состава: ENVK, Q—R—R, (D, N)— ———G—PC и др. Имеются экспериментальные и теоретические доводы, позволяющие предположить, что остаток цистеина фрагмента PC, как и в случае тимидилат синтетазы, активирует С5-атом цитозинового ядра путем ковалентного присоединения по С6-положению [286, 400].

Сравнение некоторых изометимеров (метилаз, узнающих идентичные нуклеотидные последовательности) позволило в вариabельных участках выделить схожие последовательности, которые, как предполагается, ответственны за узнавание субстрата [74, 361]. Методами сайт-специфического мутагенеза показано, что в мультиспецифических фаговых метилазах эти последовательности являются непрерывными участками длиной 40—50 аминокислот, расположенными тандемно [72, 74, 153, 395]. Таким образом, вариabельность специфичности метилаз обеспечивается комбинациями узнающих участков в главном остове, в котором сосредоточены узлы связывания Адо-мет и введения СН₃-группы в 5-ое положение цитозина.

В группе адениновых метилаз также прослеживается, хотя и менее явная, но вполне осязаемая общность в структурной организации. Все изучавшиеся адениновые метилазы имеют последовательность (D, N)PPY, причем для ферментов, обладающих сходной или близкой субстратной специфичностью, выявлены дополнительные районы гомологии [109, 156, 228, 270]. Констатируется также некоторое сходство этих ферментов с группой С5-цитозиновых метилаз [228]. Последовательность единственной пока секвенированной ¹⁴C метилазы Pvu II имеет больше элементов сходства с известными N6-адениновыми, чем с С5-цитозиновыми метилазами [367].

Детальное исследование интер- и интрамолекулярных гомологий в ряду метилаз позволило сделать предположение о возможном филогенетическом пути эволюции метилаз. По мнению Р. Лаустера [227], метилазы сформировались в результате одной или двух дупликаций гена белка-предшественника в 12—16 КД, с последующей дивергенцией, приведшей к наблюдаемому в настоящее время многообразию ДНК-метилирующих ферментов. Аналогичный, однако, независимый путь эволюции предлагается и для рестриктаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акулинин Г. Е., Гетко Г. А. и др. В сб.: Известия Сибирского отделения АН СССР, серия «Биологические науки», 1988, Вып. 2, 105—108.
2. Александрова С. С., Карамов Э. В. и др. «Докл. АН СССР», 1978, 243, 234—236.
3. Берлин Ю. А., Буткус В. В. «Биоорган. Хим.», 1981, 7, 1224—1232.
4. Берлин Ю. А., Звонок Н. М. и др. «Биоорган. Хим.», 1980, 6, 1522—1535.
5. Битинайте Ю. Б., Пятрушите М. П. и др. В сб.: Тезисы докладов конференции «Теоретические и практические аспекты познания биохимических процессов», Вильнюс, 1983, с. 10.
6. Блохина И. Н., Леванова Г. Ф. Геносистематика бактерий. М.: «Наука», 1976, 152 с.
7. Бунина З. Ф., Крамаров В. М. и др. «Биоорган. Хим.», 1983, 9, 1578—1580.
8. Бунина З. Ф., Крамаров В. М. и др. «Биоорган. Хим.», 1984, 10, 1333—1335.
9. Бурьянов Я. И., Кирьянов Г. И. «Итоги науки и техн. Сер. «Молекулярная биология», ВНИТИ, М.», 1987, 23, 5—220.
10. Виноградова М. Н., Громова Е. С. и др. «Мол. биол.», 1986, 20, 1329—1336.
11. Виноградова М. Н., Громова Е. С. и др. «Докл. АН СССР», 1987, 295, 732—736.
12. Виноградова М. Н., Громова Е. С. и др. «Биоорган. Хим.», 1987, 13, 1194—1203.
13. Громова Е. С., Виноградова М. Н. «Биоорган. Хим.», 1987, 13, 269—272.
14. Громова Е. С., Кубарева Е. А. и др. «Докл. АН СССР», 1987, 295, 1493—1497.
15. Дегтярев С. Х., Колыханов А. А. и др. «Биоорган. Хим.», 1989, 15, 130—132.
16. Дегтярев С. Х., Приходько Г. Г. и др. «Биоорган. химия», 1988, 14, 848—849.

17. Дегтярев С. Х., Репин В. Е. и др. «Биоорган. Хим.», 1987, 13, 420—421.
18. Дегтярев С. Х., Речкунова Н. И. и др. «Биоорган. Хим.», 1987, 13, 422—423.
19. Елов А. А. Автореф. дис. канд. хим. наук / Московский государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Москва, 1985, 1—20.
20. Зиновьев В. В., Колесников В. А. и др. «Мол. биол.», 1984, 18, 169—174.
21. Казлаускене Р., Манялене З. и др. «Биоорган. химия», 1986, 12, 836—838.
22. Климашаускас С., Буткус В. и др. «Молекуляр. биол.», 1987, 21, 87—92.
23. Косых В. Г., Пунтежис С. и др. «Биохимия», 1983, 47, 619—625.
24. Крамаров В. М., Скрынина Н. А. и др. В сб.: Тезисы докладов Всес. конференции «Методы получения и анализа биохимических реактивов», Рига, 1987, с. 56.
25. Крамаров В. М., Смолянинов В. В. «Биохимия», 1981, 46, 1526—1529.
26. Крамаров В. М., Фоменков А. И. и др. «Биоорган. Хим.», 1987, 13, 773—776.
27. Крамаров В. М., Фоменков А. И. и др. «Биоорган. Хим.», 1988, 14, 916—920.
28. Краткий определитель бактерий Берги (Перевод с англ. под ред. Г. А. Заварзина) М., «Мир», 1980, 495 с.
29. Кубарева Е. А. Автореф. дис. канд. хим. наук / Московский государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Москва, 1988, 1—22.
30. Кубарева Е. А., Громова Е. С. и др. «Биоорган. Хим.», 1987, 13, 1205—1211.
31. Кузьмин Н. П., Лосева С. П. и др. «Молек. биол.», 1984, 18, 197—204.
32. Кульба А. М., Аббель-Сабур М. С. и др. «Мол. биол.», 1987, 21, 250—254.
33. Лазарявичюте Л. Г., Манялене З. П. и др. В сб.: Тезисы докладов конференции «Достижения биохимии в Литовской ССР», Вильнюс, 1988, 30—31.
34. Любченко Ю. Л., Завальский Л. Ю. и др. «Молек. биол.», 1982, 16, 871—877.
35. Народицкий Б. С., Боровик А. С. и др. В сб.: Тезисы докладов Всес. конференции «Генетическая инженерия» Пущино, 1982, 13—14.
36. Никольская И. И., Карпец Л. З. и др. «Мол. генетика, микробиол. и вирусол.», 1983, 12, 5—10.
37. Никольская И. И., Сурков В. В. «Биохимия», 1975, 40, 875—877.
38. Овечкина Л. Г., Попова С. Р. и др. «Биополимеры и клетка», 1988, 4, 269—272.
39. Орехов А. В., Ребенгиш Б. А. и др. «Докл. АН СССР», 1982, 263, 217—220.
40. Пачкунов Д. М., Крамаров В. М. и др. «Биоорган. Хим.», 1983, 9, 127—129.
41. Приходько Г. Г., Петров Н. А. и др. В сб.: Известия Сибирского отделения АН СССР, серия «Биологические науки», 1988, Вып. 2, 108—109.
42. Пурмаль А. А., Виноградова М. Н. и др. «Докл. АН СССР», 1984, 276, 992—995.
43. Пятрушите М. П., Битинайте Ю. Б. и др. «Докл. АН СССР», 1987, 295, 1250—1253.
44. Репин В. Е., Дегтярев С. Х. и др. В сб.: Тезисы докладов Всес. конференции «Методы получения и анализа биохимических реактивов», Рига, 1987, с. 61.
45. Речкунова Н. И. Автореф. канд. хим. наук / Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР, Новосибирск, 1988, 1—20.
46. Романов Г. А., Ванюшин Б. Ф. «Биол. науки», 1980, 11, 5—20.
47. Скрынина Н. А., Крамаров В. М. и др. «Мол. генетика, микробиол. и вирусол.», 1988, 5, 15—16.
48. Соколов Н. Н., Колоша В. О. и др. «Мол. генетика, микробиол. и вирусол.», 1986, 5, 24—26.
49. Тяняшин В. И. В сб.: «Итоги науки и техники». Сер. «Молекулярная биология», ВНИТИ, М., 1979, 12, 36—98.

50. Упорова Т. М., Карташева И. М. и др. «Вопр. мед. химии», 1985, 31, 131—136.
51. Ферст Э. В кн.: Структура и действие ферментов, М. «Мир», 1980, 162 с.
52. Холмина Г. В., Ребенгиш Б. А. и др. В сб.: Тезисы докладов Всес. конференции «Рекомбинантные ДНК», Пушкино, 1982, 17—18.
53. Цветкова Н. В., Милейковская М. М. и др. «Молек. генет. микробиол. вирусол.», 1987, 4, 19—22.
54. Янулайтис А. А., Вайткявичюс Д. П. «Биотехнология», 1985, 1, 39—51.
55. Янулайтис А. А., Марцинкявичене Л. Ю. и др. «Докл. Акад. Наук СССР», 1982, 262, 241—244.
56. Янулайтис А. А., Стакенас П. С. и др. «Мол. биол.», 1984, 18, 115—129.
57. Ando T., Hayase E. et al. «Microbiology», 1982, 66—69.
58. Arber W. «Annu. Rev. Microbiol.», 1965, 19, 365—378.
59. Arber W. In: «The molecular biology of viruses, 18th Symp. Soc. Gen. Microbiol. (Crawford L. V., Stoker M. G. P., Eds), Cambridge University Press, London and New York, 1968, 295—314.
60. Arber W. «J. Mol. Biol.», 1966, 20, 483—496.
61. Arber W., Dussoix D. «J. Mol. Biol.», 1962, 51, 18—36.
62. Arber W., Hattman S., Dussoix D. «Virology», 1963, 21, 30—35.
63. Arber W., Linn S. «Annu. Rev. Biochem.», 1969, 38, 467—500.
64. Arber W., Morse M. L. «Genetics», 1965, 51, 137—148.
65. Argos P., McCaldon P. In: Genetic Engineering (Ed. Setlow J. K.), Plenum Publ. Corp., 1988, 10, 21—65.
66. Arrand J. R., Myers P. A. et al. «J. Mol. Biol.», 1978, 118, 127—135.
67. Azorin F., Hann R. «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1984, 81, 5714—5718.
68. Babeyron T., Kean K. et al. «J. Bacteriol.», 1984, 160, 586—590.
69. Bachi B., Reiser J. et al. «J. Mol. Biol.», 1979, 128, 143—163.
70. Backman K. «Gene», 1980, 11, 167—171.
71. Baksi K., Rushizky G. W. «Anal. Biochem.», 1979, 99, 207—212.
72. Balganesch T. S., Reiners L. et al. «EMBO J.» 1987, 6, 3543—3549.
73. Baumstark B. B., Roberts R. J. et al. «J. Biol. Chem.», 1979, 254, 8943—8950.
74. Behrens B., Noyer-Weidner M. et al. «EMBO J.», 1987, 6, 1137—1142.
75. Berkner K. L., Folk W. R. «J. Biol. Chem.», 1977, 252, 3185—3191.
76. Bertani G., Weigle J. J. «J. Bacteriol.», 1953, 65, 113—121.
77. Bestor T., Laudano A. et al. «J. Mol. Biol.», 1988, 203, 971—983.
78. Bibb N. J., Findlay P. R. et al. «Gene», 1984, 30, 157—166.
79. Bickle T. A. In: Nucleases, (Eds. Linn S. M. and Roberts R. J.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1982, 85—108.
80. Bickle T. A., Ineichen K. «Gene», 1980, 9, 205—209.
81. Bickle T. A., Pirrotta V. In: Methods in Enzymology (Eds. Grossman L., Moldave K.), 1980, 65, 132—138.
82. Bigger C. H., Murray K. et al. «Nature», 1973, 244, 7—10.
83. Bingham A. H. A., Atkinson T. et al. «Nucl. Acids Res.», 1978, 5, 3457—3467.
84. Bischofberger N., Ng P. G. et al. «Nucl. Acids Res.», 1987, 15, 209—216.
85. Blakesley R. W., Dogson J. B. et al. «J. Biol. Chem.», 1977, 252, 7300—7306.
86. Blakesley R. W., Wells R. D. «Nature», 1975, 257, 421—422.
87. Bolton B., Nesch G. et al. «FEBS Letters», 1985, 182, 130—134.
88. Bougueleret L., Schwarzstein M. et al. «Nucl. Acids Res.», 1984, 12, 3659—3677.
89. Boyer H. W. «Annu. Rev. Microbiol.», 1971, 25, 153—176.
90. Brennan C. A., van Cleave M. D. et al. «J. Biol. Chem.», 1986, 261, 7270—7278.
91. Brennan C. A., Van Cleave M. D. et al. «J. Biol. Chem.», 1986, 261, 7279—7286.
92. Brenner D. J., Farmer J. J. et al. «Int. J. Syst. Bacteriol.», 1978, 28, 269—282.

93. Bron S., Horz W. In: *Methods in Enzymology* (Eds. Grossman L., Moldave K.), 1980, 65, 112—132.
94. Bron S., Luxen E. et al. «Mol. Gen. Genet.», 1984, 195, 370—373.
95. Bron S., Murray K. «Mol. Gen. Genet.», 1975, 143, 25—32.
96. Bron S., Murray K. et al. «Mol. Gen. Genet.», 1975, 143, 13—23.
97. Brooks J., Benner J. et al. In: «Workshop on biological DNA modification», 1988, p. 3.
98. Brooks J. E., Roberts R. J. «Nucl. Acids Res.», 1982, 10, 913—934.
99. Buhk H. J., Behrens B. et al. «Gene», 1984, 29, 51—61.
100. Burton W. G., Roberts R. J. et al. «Fed. Proc.», 1976, 35, 1588.
101. Buryanov Ya. I., Bogdarina I. G. et al. «FEBS Letters», 1978, 88, 251—254.
102. Butkus V., Klimasauskas S. et al. «Biochim. Biophys. Acta», 1987, 909, 201—207.
103. Butkus V., Klimasauskas S. et al. «Nucl. Acids Res.», 1985, 13, 5727—5746.
104. Butkus V., Klimasauskas S. et al. «Nucl. Acids Res.», 1987, 15, 8767—8778.
105. Butkus V., Petrauskiene L. et al. «Nucl. Acids Res.», 1987, 15, 7091—7102.
106. Butkus V., Petrauskiene L. et al. «Biochim. Biophys. Acta», 1987, 909, 201—207.
107. Calleja F., Tandeau de Marsac N. et al. «Nucl. Acids Res.», 1985, 13, 6745—6750.
108. Catterall J. F., Welker N. E. «J. Bacteriol.», 1977, 129, 1110—1120.
109. Chandrasegaran S., Smith H. O. In: *Structure and Expression* (Eds: R. H. Sarma and M. H. Sarma), Academic Press, New York, 1988, 1, 149—156.
110. Clanton D. J., Riggsby W. et al. «J. Bacteriol.», 1979, 132, 1299—1307.
111. Clanton D. J., Woodward J. M. et al. «J. Bacteriol.», 1978, 135, 270—273.
112. Clarke C. M., Hartley B. S. «Biochem. J.», 1979, 177, 49—62.
113. Colondre C., Miller J. H. et al. «Nature», 1978, 274, 775—780.
114. Copelt M., Pingoud A. et al. «Eur. J. Biochem.», 1983, 211, 101—107.
115. Cornish-Bowden A. «Nucl. Acids Res.», 1985, 13, 3021—3030.
116. Cremer A. B., Mikita T. et al. «Biochemistry», 1987, 26, 391—397.
117. Croft R., Moran L. et al. In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, c. 19.
118. Dayhoff M. O., Barber W. C. et al. In: *Methods in Enzymology* (Eds., Hirs C. H. W. and Timasheff S. N.), Academic Press, 1983, 91, 524—545.
119. De la Campa A. D., Kale P. et al. «J. Mol. Biol.», 1987, 196, 457—469.
120. de Waard A., Duyvesteyn M. «Arch. Microbiol.», 1980, 128, 242—247.
121. de Waard A., Korsuize J. et al. «FEBS Letters», 1978, 96, 106—110.
122. de Wit C. M., Dekker B. M. M. et al. «FEBS Letters», 1985, 180, 219—223.
123. Delort A.-M., Neumann J. M. et al. «Nucl. Acids Res.», 1985, 13, 3343—3355.
124. Doerfler W. «J. Gen. Virol.», 1981, 57, 1—20.
125. Dreiseikelman B., Eichenlaub R. et al. «Biochim. Biophys. Acta», 1979, 562, 418—428.
126. Dussoix D., Arber W. «J. Mol. Biol.», 1962, 5, 37—49.
127. Dwyer-Hallquist P., Kezdy F. J. et al. «Biochemistry», 1982, 21, 4693—4700.
128. Ehrlich M., Gama-Sosa M. et al. «Nucl. Acids Res.», 1985, 13, 1399—1412.
129. Ehrlich M., Wang R. Y.-H. «Science», 1981, 212, 1350—1357.
130. Ehrlich M., Wilson G. G. et al. «J. Bacteriol.», 1987, 169, 939—943.
131. Ehrlich S., Sgaramella V. et al. In: *Nucleic acid-protein recognition*, P. and S. Biomed. Sci. Symp. Ed. Vogel H. J., New York: Acad. Press., 1977, 261—268.
132. Endow S. A., Roberts R. J. «J. Mol. Biol.», 1977, 112, 521—529.
133. Engel J. D., von Hippel P. H. «J. Biol. Chem.», 253, 927—934.
134. Eskin B., Linn S. «J. Biol. Chem.», 1972, 247, 6192—6196.
135. Fitzgerald G. F., Daly C. et al. «Nucl. Acids Res.», 1982, 10, 8171—8179.
136. Fratini A. V., Kopka M. L. et al. «J. Biol. Chem.», 1984, 257, 14686—14707.

137. Frederick C. A., Grable J. et al. «Nature», 1984, 309, 327—331.
138. Geier G. E., Modrich P. «J. Biol. Chem.», 1979, 254, 1408—1413.
139. Gelinis R. E., Myers P. A. et al. «J. Mol. Biol.», 1977, 114, 169—180.
140. George J., Blakesley W. et al. «J. Biol. Chem.», 1980, 255, 6521—6524.
141. George J., Chirikjian J. G. «Proc. Nat. Acad. Sci.», USA, 1982, 79, 2432—2436.
142. Gingeras T. R., Blumenthal R. M. et al. In: Methabolism and Enzymology of Nucleic Acids (Eds. Zelinka J., Balan J.) 4th Proc. Int. Symp., Slovak Acad Sci., Bratislava, Czechoslovakia, 1982, 329—340.
143. Gingeras T. R., Brooks J. E. «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 1983, 80, 402—406.
144. Gingeras T. R., Greenough L. et al. «Nucl. Acids Res.», 1981, 9, 4525—4536.
145. Gingeras T. R., Myers P. A. et al. «J. Mol. Biol.», 1978, 118, 113—122.
146. Goppelt M., Pingoud A. et al. «Eur. J. Biochem.», 1983, 211, 101—107.
147. Greene P. J., Ballard B. T. et al. «Gene», 1988, 68, 43—52.
148. Greene P. J., Gupta M. et al. «J. Biol. Chem.», 1981, 256, 2143—2153.
149. Greene P. J., Poonian M. S. et al. «J. Mol. Biol.», 1975, 99, 237—261.
150. Gromkova R., Goodgal S. H. «J. Bacteriol.», 1972, 109, 987—992.
151. Grosjean J., Fiers W. «Gene», 1982, 18, 199—209.
152. Gruenbaum Y., Cedar H. et al. «Nucl. Acids Res.», 1981, 9, 2509—2515.
153. Gunthert U., Lauster R. et al. «Eur. J. Biochem.», 1986, 159, 485—492.
154. Gunthert U., Pawlek B. et al. «J. Virol.», 1976, 20, 188—195.
155. Gunthert U., Reiners L. et al. «Gene», 1986, 60, 261—270.
156. Guschlbauer W. In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 45.
157. Haberman A. «J. Mol. Biol.», 1974, 89, 545—563.
158. Hadi S. M., Bachi B. et al. «J. Mol. Biol.», 1979, 134, 655—666.
159. Halford S. E., Johnson N. P. et al. «Biochem. J.», 1981, 199, 767—777.
160. Halford S. E., Johnson N. P. «Biochem. J.», 1980, 191, 593—604.
161. Halford S. E., Johnson N. P. et al. «Biochem. J.», 1979, 179, 353—365.
162. Halford S. E., Johnson N. P. et al. «Biochem. J.», 1980, 191, 581—592.
163. Halford S. E., Lovelady B. M. et al. «Gene», 1986, 41, 173—181.
164. Halford S. E., Johnson N. P. «Biochem. J.», 1983, 211, 405—415.
165. Hatman S., Brooks J. E. et al. «J. Mol. Biol.», 1978, 126, 367—380.
166. Hattman S. «J. Mol. Biol.», 1975, 98, 645—647.
167. Hattman S. «J. Virol.», 1972, 10, 356.
168. Hattman S., Brooks J. E. et al. «J. Mol. Biol.», 1978, 126, 367—380.
169. Hattman S., Keister T. et al. «J. Mol. Biol.», 1978, 124, 701—711.
170. Heininger K., Horz W. et al. «Gene», 1977, 5/6, 291—303.
171. Heitman J., Model P. «J. Bacteriol.», 1987, 169, 3243—3250.
172. Hinch B., Kula M.-R. «Nucl. Acids Res.», 1980, 8, 623—633.
173. Hines J. L., Agarwal K. L. «Fed. Proc.», 1979, 38, 294—295.
174. Hines J. L., Chauncey T. R., Agarwal K. L. In: «Methods in enzymology (Eds. L. Grossman, K. Moldave)», New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 65, 153—163.
175. Hirsch B., Kula M.-R. «Nucl. Acids Res.», 1981, 9, 3159—3174.
176. Hirsch B., Mayer H. et al. «Nucl. Acids Res.», 1980, 8, 2547—2559.
177. Hiraoka N., Kita K. «J. Ferment. Technol.» (Japan), 1984, 62, 583—588.
178. Hiraoka N., Kita K. et al. «J. Ferment. Technol.» (Japan), 1965, 63, 151—157.
179. Horiuchi K., Zinder N. D. «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 1972, 69, 3220—3224.
180. Howard K. A., Card C. et al. «Nucl. Acids Res.», 1986, 14, 7939—7951.
181. Hsu M., Berg P. «Biochemistry», 1978, 17, 131—138.
182. Huang L.-H., Farnet C. M. et al. «Nucl. Acids Res.», 1982, 10, 1579—1591.
183. Humbelin M., Suri B. et al. «J. Mol. Biol.», 1988, 200, 23—29.
184. Iida S., Meyer J. et al. «J. Mol. Biol.», 1983, 165, 1—18.
185. Imber K., Bickle T. A. «Eur. J. Biochem.», 1981, 117, 395—399.

186. Jack W. E., Terry B. J. et al. «Proc. Natl. Acad. Sci.» (USA), 1982, 79, 4010—4014.
187. Jackson D. A., Symons R. H. et al. «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1972, 69, 2904—2909.
188. Janulaitis A., Bitinaite J. et al. «FEBS Lett.», 1983, 151, 243—247.
189. Janulaitis A., Kazlauskienė R. et al. «Gene», 1988, 74, 229—232.
190. Janulaitis A., Kazlauskienė R. et al. In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 74.
191. Janulaitis A., Klimasauskas S. et al. «FEBS Letters», 1983, 161, 131—134.
192. Janulaitis A., Marcinkeviciene L. et al. «FEBS Letters», 1981, 134, 172—174.
193. Janulaitis A., Petrusyte M. et al. «FEBS Letters.», 1983, 161, 213—216.
194. Janulaitis A., Povilionis P. et al. «Gene», 1982, 20, 197—204.
195. Jentsch S., Gunthert U. et al. «Nucl. Acids Res.», 1981, 9, 2753—2759.
196. Johannessen, Shutte H. et al. «J. Mol. Biol.», 1979, 134, 707—726.
197. Kaddurah-Daouk R., Cho P. et al. «J. Biol. Chem.», 1985, 260, 15345—15351.
198. Kallen R. G., Simon M. et al. «J. Mol. Biol.», 1962, 5, 248—250.
199. Karreman C., de Waard A. «J. Bacteriol.», 1988, 170, 2527—2532.
200. Karreman C., Tandeau de Marsac N. et al. «Nucl. Acids Res.», 1986, 14, 5199—5205.
201. Kauc L., Piekarowicz A. «Eur. J. Biochem.», 1978, 92, 417—426.
202. Kelly S., Kaddurah D. R. et al. «J. Biol. Chem.», 1985, 260, 15339—15344.
203. Kessler C., Neumaier P. S. et al. «Gene», 1985, 33, 1—102.
204. Kholmına G. V., Rebentish B. A. et al. «Molek Genet. Mikrobiol. Virozol.», 1986, 11, 23—25.
205. Khosaka T., Sakurai T. et al. «Gene», 1982, 17, 117—122.
206. Kiss A., Posfai G. «Nucl. Acids Res.», 1985, 13, 6403—6420.
207. Kiss A. B., Sain E. et al. «Gene», 1977, 1, 323—327.
208. Kita K., Hiroaka N. et al. «Nucl. Acids Res.», 1985, 13, 7015—7024.
209. Kolesnikov V. A., Zinoviev V. V. et al. «FEBS Lett.», 1981, 132, 101—103.
210. Konc C., Kiss A. et al. «Eur. J. Biochem.», 1978, 89, 523—529.
211. Korch C., Hagblom P. et al. «Eur. J. Biochem.», 1986, 161, 519—524.
212. Kroger H., Hobom G. «Nucl. Acids Res.», 1984, 12, 887—899.
213. Kruger D. H., Bareak G. J. et al. «Nucl. Acids Res.», 1988, 16, 3997—4008.
214. Kruger D. H., Bickle T. A. «Microbiol. Rev.», 1983, 47, 345—360.
215. Kubareva E. A., Pein C.-D. et al. «Eur. J. Biochem.», 1988, 175, 615—618.
216. Kuhn J., Stephenson F. et al. «Gene», 1986, 44, 253—263.
217. Kupper D., Guang Z. J. et al. In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 21.
218. Lacks S., Greenberg B. «J. Biol. Chem.», 1975, 250, 4060—4066.
219. Lacks S., Greenberg B. «J. Mol. Biol.», 1977, 114, 153—168.
220. Lacks S. A. In: Methods in Enzymology (Eds. L. Grossman, K. Moldave), 1980, 65, 138—146.
221. Lacks S. A., Mannarelli B. M. et al. «Cell.», 1986, 46, 993—1000.
222. Laks S. A., Springhorn S. S. et al. «J. Bacteriol.», 1984, 157, 934—936.
223. Laengle-Ronault F., Maenhaut-Michel G. et al. «EMBO J.», 1986, 5, 2009—2013.
224. Langowski J., Alves J. et al. «Nucl. Acids Res.», 1983, 11, 501—513.
225. Langowski J., Pingoud A. et al. «Nucl. Acids Res.», 1980, 8, 4727—4736.
226. Lau R. H., Visentin L. P. et al. «FEBS Lett.», 1985, 179, 129—132.
227. Lauster R. In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 79.
228. Lauster R., Kriebardis A. et al. «FEBS Lett.», 1987, 220, 167—176.
229. Lee Y. H., Chirikjian J. G. «J. Biol. Chem.», 1979, 254, 6838—6841.
230. Lehman I. R., Pratt E. A. «J. Biol. Chem.», 1960, 235, 3254—3259.
231. Levy W. P., Welker N. E. «Biochemistry», 1981, 20, 1120—1127.
232. Linn S., Arber W. «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 1968, 59, 1300—1306.
233. Lu A.-L., Jack E. W. et al. «J. Biol. Chem.», 1981, 256, 13200—13206.
234. Luria S. E. «Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.», 1953, 18, 237—244.

235. Luria S. E., Human M. L. «J. Bacteriol.», 1952, 64, 557—569.
236. Malyquine E., Vannier P. et al. «Gene», 1980, 8, 163—177.
237. Mann M. B., Rao R. N. et al. «Gene», 1978, 3, 97—112.
238. Mann M. B., Smith H. O. «Nucl. Acids Res.», 1977, 4, 4211—4221.
239. Mann M. B., Smith H. O. «Fed. Proc.», 1979, 38, 293—294.
240. Mannarelli B. M., Balganesch T. S. et al. «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 1985, 82, 4468—4472.
241. Marinus M. G. Mol. «Gen. Genet», 1973, 127, 47—55.
242. Marinus M. G. «Ann. Rev. Genet.», 1987, 21, 113—131.
243. Marinus M. G., Morris N. R. «J. Bacteriol.», 1973, 114, 1143—1150.
244. Maxwell A., Halford S. E. «Biochem. J.», 1982, 203, 77—84.
245. Maxwell A., Halford S. E. «Eur. J. Biochem.», 1982, 203, 93—98.
246. Maxwell A., Halford S. E. «Biochem. J.», 1982, 203, 85—92.
247. May M. S., Hattman S. «J. Bacteriol.», 1975, 123, 768—770.
248. Mayer H. «FEBS Letters», 1978, 90, 341—344.
249. Mayer H., Reichenbach H. «J. Bacteriol.», 1978, 136, 708—713.
250. McClarin J. A., Frederick C. A. et al. «Science», 1986, 234, 1526—1541.
251. McClelland M. «Nucl. Acids Res.», 1988, 16, 2283—2294.
252. McClelland M. «Nucl. Acids Res.», 1981, 9, 5859—5866.
253. McClelland M. «Nucl. Acids Res.», 1983, 11, r169—r173.
254. McClelland M. «Nucl. Acids Res.», 1981, 9, 6795—6804.
255. McClelland M. «J. Mol. Evol.», 1983, 19, 346—354.
256. McClelland M., Nelson M. «Gene Amplification and Analysis», 1981, 5, 258—282.
257. McClelland M., Nelson M. «Gene», 1988, 74, 169—176.
258. McClelland M., Nelson M. «Gene», 1988, 74, 291—304.
259. McClelland M., Nelson M. «Nucl. Acids Res.», Suppl., 1985, 13, r201—r207.
260. Meselson M., Yuan R. «Nature», 1968, 217, 1110—1114.
261. Mise K., Nakajima K. «Gene», 1985, 36, 363—367.
262. Mise K., Nakajima K. «Gene», 1986, 44, 165—169.
263. Modrich P. «Quarterly Rev. Biophys.», 1979, 12, 315—369.
264. Modrich P., Roberts R. J. In: Nucleases meet., Cold Spring Harbour, 1982, 109—154.
265. Modrich P., Rubin R. A. «J. Biol. Chem.», 1977, 252, 7273—7279.
266. Modrich P., Zabel D. «J. Biol. Chem.», 1976, 251, 5866—5874.
267. Morgan R. D. «Nucl. Acids Res.», 1988, 16, p. 3104.
268. Mural R. J. «Nucl. Acids Res.», 1987, 15, p. 9085.
269. Murray N. E., Batten P. L. et al. «J. Mol. Biol.», 1973, 81, 395—407.
270. Narva K. E., Van Etten J. et al. In: «Workshop on biological DNA modifications», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 46.
271. Narva K. E., Wendell D. L. et al. «Nucl. Acids Res.», 1987, 15, 9807—9823.
272. Nasri M., Sayadi S. et al. «FEBS Lett.», 1985, 185, 101—104.
273. Nasri M., Thomas D. et al. «Nucl. Acids Res.», 1986, 14, 811—821.
274. Nelson M., Christ C. et al. «Nucl. Acids Res.», 1984, 12, 5165—5173.
275. Nelson M., McClelland M. «Nucl. Acids Res.», 1987, 15, r219—r230.
276. Nelson M., Schildkraut I. «Methods in Enzymology», 1987, 155, 31—48.
277. Newman A. K., Rubin R. A. et al. «J. Biol. Chem.», 1981, 256, 2131—2139.
278. Nikolskaya I. I., Lopatina N. G. et al. «Biochim. Biophys. Acta», 1976, 435, 206—210.
279. Nikolskaya I. I., Tediashvili M. I. et al. «Biochim. Biophys. Acta», 1979, 561, 232—239.
280. Noyer-Weidner M., Jentsch S. et al. «J. Virol.», 1983, 42, 446—453.
281. O'Connor C. D., Humphreys G. O. «Gene», 1982, 20, 219—229.
282. Ohtsuka E., Ishino Y. et al. «Biochemistry», 1984, 139, 447—450.
283. Ohtsuka E., Morisawa H. et al. «Chem. Pharm. Bull.», 1982, 30, 874—880.
284. Ono A., Ueda T. «Nucl. Acids Res.», 1987, 15, 219—231.
285. Ono A., Ueda T. «Nucl. Acids Res.», 1987, 15, 3095—3072.
286. Osterman D. G., DePillis G. D. et al. «Biochemistry», 1988, 27, 5204—5210.
287. Pech M., Streeck R. E. et al. «Cell», 1979, 18, 883—893.
288. Petrusyte M., Bitinaite J. et al. «Gene», 1988, 74, 89—91

289. *Petrusyte M., Bitinaite J. et al.* In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 74.
290. *Petrusyte M., Janulaitis A.* «Eur. J. Biochem.», 1982, *121*, 377—381.
291. *Philips G. J., Arnold J. et al.* «Nucl. Acids Res.», 1987, *15*, 2627—2638.
292. *Piekarowicz A.* «J. Mol. Biol.», 1981, *157*, 373—381.
293. *Piekarowicz A., Bickle T. A. et al.* «J. Mol. Biol.», 1981, *146*, 167—172.
294. *Pirrotta V.* «Nucl. Acids Res.», 1976, *3*, 1747—1760.
295. *Pirrotta V., Bickle T. A.* In: *Methods in Enzymology* (Eds. Grossman L., Moldave K.), 1980, *65*, 89—96.
296. *Podhajska A. J., Szybalski W.* «Gene», 1985, *40*, 175—182.
297. *Polisky B., Greene P. et al.* «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1975, *72*, 3310—3314.
298. *Posfai G., Kiss A. et al.* «J. Mol. Biol.», 1983, *170*, 597—610.
299. *Povilionis P., Vaisvila R. et al.* Workshop on biological DNA modification, 1988, p. 24.
- 299A. *Prere M. F., Fayet O.* «Ann. Inst. Pasteur Microbiol.», 1985, *136A*, 323—338.
300. *Qiang B.-Q., Schildkraut I.* «Nucl. Acids Res.», 1986, *14*, 1991—1999.
301. *Qiang B.-Q., Schildkraut I.* «Nucl. Acids Res.», 1984, *12*, 4507—4515.
302. *Quint A., Cedar H.* «Nucl. Acids Res.», 1981, *9*, 633—646.
303. *Raleigh E. A., Wilson G.* «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 1986, *83*, 9070—9074.
304. *Razin A., Urieli G. et al.* «Nucl. Acids Res.», 1980, *8*, 1783—1792.
305. *Reaston J., Duyvesteyn M. G. C. et al.* «Gene», 1982, *20*, 103—110.
306. *Rees P. A., Nwankwo D. A. et al.* Workshop on biological DNA modification, 1988, p. 25.
307. *Reiser J., Yuan R.* «J. Biol. Chem.», 1977, *252*, 451—456.
308. *Rekker R. F.* In: *The hydrophobic fragmental constant*. Amsterdam — Oxford — New York: Elsevier scientific publishing company, 1977, 256—312.
309. *Revel H. R., Luria S. E.* «Annu. Rev. Genet.», 1970, *4*, 177—192.
310. *Rexer B. U., Jarsch M. et al.* «FEBS Lett.», 1988, *235*, 241—246.
311. *Rippka R., Dernelles J. et al.* «J. Gen. Microbiol.», 1979, *3*, 1—61.
312. *Roberts R. J.* «CRC Crit. Rev. Biochem.», 1976, *4*, 123—164.
313. *Roberts R. J.* «Nucl. Acids Res.», 1984, *12*, r167—r203.
314. *Roberts R. J.* «Gene», 1978, *4*, 183—194.
315. *Roberts R. J.* «Nucl. Acids Res.», 1980, *8*, r63—r80.
316. *Roberts R. J.* «Nucl. Acids Res.», 1982, *10*, r117—r144.
317. *Roberts R. J.* «Nucl. Acids Res.», 1985, *13*, r165—r200.
318. *Roberts R. J.* «Nucl. Acids Res.», 1987, *15*, r189—r217.
319. *Roberts R. J.* «Nucl. Acids Res.», 1988, *16*, r271—r313.
320. *Roberts R. J., Myers P. A. et al.* «J. Mol. Biol.», 1976, *103*, 199—208.
321. *Roberts R. J., Wilson G. A. et al.* «Nature», 1977, *265*, 82—84.
322. *Rosenberg J. M., Greene P.* «DNA», 1982, *1*, 117—124.
323. *Rosenberg J. M., McClarin J. et al.* «J. Cell. Biochem. Suppl.», 1985, *9B*, 928—933.
324. *Rosenberg M., Court D.* «Annu. Rev. Genet.», 1979, *13*, 319—353.
325. *Roulland-Dussoix D., Boyer H. W.* «Biochim. Biophys. Acta», 1969, *195*, 219—229.
326. *Roychoudhury R., Wu R.* In: *Methods in enzymology* (Ed. L. Grossman, K. Moldave), 1980, *65*, part I, 43—62.
327. *Ruben G., Spielman P. et al.* «Nucl. Acids Res.», 1977, *4*, 1803—1813.
328. *Rubin A. R., Modrich P.* «Nucl. Acids Res.», 1978, *5*, 2991—2997.
329. *Rubin R. A., Modrich P.* «J. Biol. Chem.», 1977, *252*, 7265—7272.
330. *Russell D. W., Zinder N. D.* «Cell», 1987, *50*, 1071—1079.
331. *Sanderson K. E.* «Ann. Rev. Microbiol.», 1976, *30*, 327—349.
332. *Sano H., Sager R.* «Eur. J. Biochem.», 1980, *105*, 471—480.
333. *Sarma M. H., Dhingra M. M.* «Biochem. Biophys. Res. Com.», 1985, *131*, 269—276.
334. *Sasaki J., Yamada Y.* «Agr. Biol. Chem.», 1984, *48*, 3027—3034.

335. Sato., Hutchinson III S. A. et al. «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 1977, 74, 542—548.
336. Seela F., Driller H. «Nucl. Acids Res.», 1985, 14, 2319—2332.
337. Seela Fr., Kehne A. «Biochemistry», 1987, 26, 2232—2238.
338. Seeman N. C., Rosenberg J. M. et al. «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1976, 73, 804—808.
339. Sharp P. A., Sugden B. et al. «Biochemistry», 1973, 12, 3055—3063.
340. Shen S., Li Q. et al. «Sci. Sinica», 1980, 23, 1435—1442.
341. Shenoy S., Daigle K. «Nucl. Acids Res.», 1986, 14, 1284—1289.
342. Shibata T., Ikawa S. et al. «J. Bacteriol.», 1976, 128, 473—476.
343. Shibata T., Watabe H. et al. «J. Biol. Chem.», 1984, 259, 10499—10506.
344. Shimotsu H., Takahashi H. et al. «Gene», 1980, 11, 219—225.
345. Shine J., Dalgarno L. «Nature», 1975, 254, 34—38.
346. Shinomiya T., Kobayashi M. «J. Biochem.», 1982, 92, 1823—1832.
347. Shoner B., Kelly S. et al. «Gene», 1983, 24, 227—236.
348. Siebenlist U., Simpson et al. «Cell.», 1980, 20, 269—281.
349. Sladek T. L., Nowak J. A. et al. «J. Bacteriol.», 1986, 165, 219—225.
350. Slatko B. E., Benner J. S. et al. «Nucl. Acids Res.», 1987, 15, 9781—9796.
351. Slover S., Schell J. et al. «Genet. Res.», 1963, 4, 480—482.
352. Smith H. O. «Science», 1979, 205, 455—462.
353. Smith H. O., Nathans D. «J. Mol. Biol.», 1973, 81, 419—423.
354. Smith H. O., Wilcox K. W. «J. Mol. Biol.», 1970, 51, 379—391.
355. Smith L. A., Chirikjian J. G. «J. Biol. Chem.», 1979, 254, 1003—1006.
356. Som S., Bhagwat A. S. et al. «Nucl. Acids Res.», 1987, 15, 313—332.
357. Sternberg N. «J. Bacteriol.», 1985, 164, 490—493.
358. Streeck R. E. «Gene», 1980, 12, 267—275.
359. Sugisaki H., Kanazawa S. «Gene», 1981, 16, 73—78.
360. Sugisaki H., Maekawa Y. et al. «Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.», 1982, 60, 328—335.
361. Sullivan K. M., Saunders J. R. «Nucl. Acids Res.», 1988, 16, 4369—4387.
362. Sussenback J. S., Monfoort C. H. et al. «Nucl. Acids Res.», 1976, 3, 3193—3202.
363. Szomolanyi I., Kiss A. et al. «Gene», 1980, 10, 219—225.
364. Szybalski W. «Gene», 1985, 40, 169—173.
365. Szynter L. A., Slatko B. et al. «Nucl. Acids Res.», 1987, 15, 8249—8266.
366. Takahashi I., Marmur J. «Nature», 1963, 197, 794—795.
367. Tao T., Walter J. et al. «Nucl. Acids Res.», 1988, 16,
368. Terry B. J., Jack W. E. et al. «J. Biol. Chem.», 1985, 260, 13130—13137.
369. The prokaryotes. A handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. (Eds. M. P. Starr, H. Stolp et al.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1981, 11.— 753 p.
370. Theriault G., Roy P. H. et al. «Nucl. Acids Res.», 1985, 13, 8441—8461.
371. Thomas M., Davis A. W. «J. Mol. Biol.», 1975, 91, 315—328.
372. Tibanyenda N., De Bruin S. H. et al. «Eur. J. Biochem.», 1984, 139, 19—27.
373. Tikchonenko T. I., Karamov E. V. et al. «Gene», 1978, 4, 195—212.
374. Tomassini J., Roychoudhury R. et al. «Nucl. Acids Res.», 1978, 5, 4055—4064.
375. Trautner T. A., Pawlek B. et al. «Mol. Gen. Genet.», 1974, 131, 181—191.
376. Trautner T. A., Pawlek B. et al. «Mol. Gen. Genet.», 1980, 188, 361—367.
377. Urwin N., Rosenthal A. et al. «Biochem. Society Transact.», 1986, 1, 264.
378. Van Cott E. M., Wilson G. G. «Gene», 1988, p. 74.
379. Van der Ploeg L. H. T., Flavell R. A. «Cell», 1980, 19, 947—958.
380. Vovis G. F., Lacks S. «J. Mol. Biol.», 1977, 115, 525—538.
381. Wain-Hobson S., Nussinou R. et al. «Gene», 1981, 13, 355—364.
382. Walder R., Walder J. et al. «Fed. Proc.», 1981, 4, 1647.
383. Walder R. Y. «Fed. Proc.», 1982, 41, A5425.
384. Walder R. Y., Langtimm C. J. et al. «J. Biol. Chem.», 1983, 258, 1235—1241.
385. Walder R. Y., Walder J. A. et al. «J. Biol. Chem.», 1984, 259, 8015—8026.

386. Wang A. H.-J., Fujii S. «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1982, 79, 3968—3972.
 387. Wang R. Y. H., Zhang X.-Y. et al. «Nucl. Acids Res.», 1987, 14, 9843—9860.
 388. Watabe H., Shibata T. et al. «J. Biochem.», 1981, 90, 1623—1632.
 389. Watanabe T., Nishida H. et al. «J. Bacteriol.», 1964, 88, p. 716.
 390. Weide L., Chen S. «Sci. Sinica», 1986, XXIX, 947—953.
 391. Whitehead P. R., Brown N. L. «FEBS Letters», 1982, 143, 296—300.
 392. Whitehead P. R., Brown N. L. «J. Gen. Microbiol.», 1985, 131, 951—958.
 393. Wiatr C. L., Witmer H. J. «J. Virol.», 1984, 52, 97—54.
 394. Wilcox B., Al-Zarban Sh. et al. In: Methabolism and Enzymology of Nucleic Acids (Eds. J. Zelinka, J. Balan), 4th Proc. Int. Symp., Slovak Acad. Sci., Bratislava, Czechoslovakia, 1982, 23—40.
 395. Wilke K., Rauhut E. et al. «EMBO J.», 1988, 7, 2601—2609.
 396. Wolfes H., Fliess A. «Eur. J. Biochem.», 1985, 105, 105—110.
 397. Woodbury C. P., Hagenbuchle O. et al. «J. Biol. Chem.», 1980, 255, 11534—11546.
 398. Woodhead J. L., Bhave N. et al. «Eur. J. Biochem.», 1981, 115, 293—296.
 399. Woodhead J. L., Malcolm D. B. «Nucl. Acids Res.», 1980, 8, 389—394.
 400. Wu J. C., Santi D. V. «J. Biol. Chem.», 1987, 262, 4778—4786.
 401. Wu R., King C. T. et al. «Genes», 1978, 4, 329—336.
 402. Wyatt G. R., Cohen S. S. «Nature» (London), 1952, 170, 1072—1073.
 403. Xia Y., Burbank D. et al. «Nucl. Acids Res.», 1986, 14, 6017—6030.
 404. Xia Y., Burbank D. E. et al. «Nucl. Acids Res.», 1987, 15, 6075—6090.
 405. Xia Y., Burbank D. E. et al. «Mol. Cell. Biol.», 1986, 6, 1430—1439.
 406. Yan P.-F., Ye S.-Y. et al. «Acta Biochim. Biophys. Sinica», 1982, 14, 151—158.
 407. Yolov A. A., Gromova E. S. et al. «Nucl. Acids Res.», 1985, 13, 8969—8981.
 408. Yolov A. A., Gromova E. S. et al. «FEBS», 1984, 167, 147—150.
 409. Yolov A. A., Gromova E. S. et al. «Molec. Biol. Rep.», 1985, 10, 173—176.
 410. Yolov A. A., Vinogradova M. N. et al. «Nucl. Acids Res.», 1985, 13, 8983—8998.
 411. Yoo O. J., Agarwal K. L. «J. Biol. Chem.», 1980, 255, 10559—10562.
 412. Yoshimori R. PhD Thesis, University of California, San Francisco, 1971.
 413. Yoshimori R., Roulland-Dussoix D. et al. «J. Bacteriol.», 1972, 112, 1275—1279.
 414. Yoshioka H., Nakamura H. et al. «Agr. Biol. Chem.», 1983, 47, 2871—2879.
 415. Youssoufian H., Hammer S. M. et al. «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 1982, 72, 2207—2210.
 416. Youssoufian M., Mulder C. «J. Mol. Biol.», 1981, 150, 133—136.
 417. Yuan R. «Annu. Rev. Biochem.», 1981, 50, 285—315.
 418. Yuan R., Bickle T. A. et al. «Nature», 1975, 256, 556—560.
 419. Zinoviev V. V., Gorbunov J. A. et al. «FEBS Lett.», 1983, 154, 282—284.
-

Часть II. МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕСТРИКТАЗ

Значительная часть исследований, в особенности на первом этапе изучения рестриктаз, была посвящена поиску, очистке и характеристике специфичности рестриктаз. Это направление исследований не потеряло своей актуальности и в настоящее время и стимулируется как желанием обнаружить новые по специфичности ферменты с целью их дальнейшего применения в качестве аналитических реагентов, так и необходимостью изучения таких фундаментальных вопросов как закономерность распространения рестриктаз и вариабильность их субстратной специфичности. В настоящем разделе будут рассмотрены некоторые методические аспекты решения обсуждаемых, а также ряда других задач (определение активности, клонирование генов рестрикции-модификации).

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ РЕСТРИКТАЗ

С задачей определения активности рестриктаз приходится сталкиваться в самых различных экспериментах: в опытах по поиску продуцентов, изучению влияния условий культивирования на содержание целевых ферментов в биомассе, их очистке и характеристике каталитических свойств. Специфической чертой области энзимологии, посвященной изучению рестриктаз, является тот факт, что в подавляющем большинстве вышеуказанных опытов проводится в основном только качественная оценка активности исследуемых ферментов. Если в случае поиска продуцентов рестриктаз это является оправданным, то в ходе их очистки вынужденным. Последнее обстоятельство объясняется отсутствием простых количественных методов определения активности специфических эндонуклеаз.

Ряд предложенных и апробированных для определения активности рестриктаз методов в настоящее время имеет только историческое значение. В первую очередь это замечание относится к биологическим методам, примеры применения которых имеются не только в случае рестриктаз I и III типов [93, 112, 140] но и II типа [158, 271]. Этим методом, основанным на определении снижения трансфекционной способности фаговых ДНК, обработанных *in vitro* исследуемыми ферментами, характерна трудоемкость, низкая точность и большая продолжительность, обусловленная в первую очередь временем, необходимым для проявления биологической активности фагов (лизис клеток). Ультрацентрифугирование и визкозиметрический метод, использованные для определения активности нескольких первых специфических эндонуклеаз [158, 182, 253], тоже отличают-

ся трудоемкостью, а в случае центрифугирования и большой продолжительностью.

Вышеуказанные методы не нашли широкого применения и потому, что был разработан более простой и более информативный способ определения активности рестриктаз, основанный на разделении продуктов реакции — фрагментов ДНК, различающихся по длине, электрофорезом в агарозных гелях. В первых вариантах применения этого метода визуализацию разделенных фрагментов ДНК проводили автордиографией [182] или путем окрашивания акридиновым оранжевым [271]. Апробация с этой целью этидиума бромистого, дающего при освещении гелей УФ светом флуоресцирующие зоны ДНК, Шарпом с сотр. [241] продемонстрировала высокую чувствительность обсуждаемого способа детекции ДНК и способствовала повсеместному применению электрофоретического метода для оценки активности рестриктаз.

Электрофоретический метод отличается простотой выполнения и избирательностью. Это единственный из известных методов оценки активности рестриктаз, в результате применения которого имеется возможность судить о характере расщепления субстрата — каждая специфическая эндонуклеаза генерирует уникальный набор фрагментов ДНК субстрата, который после проведения электрофоретического их разделения дает определенный, характерный для этого фермента набор зон в геле. Рассмотрение таких картин позволяет судить не только о наличии рестриктазы в исследуемом растворе, но отчасти и об ее активности и субстратной специфичности. Последнее свойство обсуждаемого метода оказывается очень важным в тех случаях, когда в фракционируемой смеси содержится более чем одна рестриктаза. Кроме того, снижение интенсивности и четкости зон ДНК позволяет судить о наличии в фракциях неспецифических нуклеаз. Однако, электрофоретический метод наряду с отмеченными достоинствами имеет существенный недостаток, выражающийся в том, что количественное определение активности исследуемых ферментов проводится путем оценки перехода: неполное расщепление — полное расщепление субстрата. Для того, чтобы идентифицировать этот переход, необходимо проводить обработку субстрата различными количествами фермента, что значительно увеличивает число анализируемых проб. Если учесть, что в ходе хроматографической очистки такой оценке подлежат многие десятки фракций, трудоемкость количественного определения активности рестриктаз электрофоретическим методом в таких опытах становится очевидной. Однако использование именно этого метода оправдывает себя в случае определения активности конечного препарата, предназначенного для применения в качестве аналитического реагента. В этом случае необходимо знать количество фермента, обеспечивающее исчерпывающее специфическое фрагментирование

субстрата на заданное время. Электрофоретическая единица активности (э.е.а.), оцениваемая именно по этому показателю, такую информацию дает.

Стремление создавать количественные методы, основанные на оценке кинетики рестриктазной реакции, реализовывалось апробацией нескольких альтернативных приемов. В частности, как дальнейшее развитие электрофоретического метода, было предложено анализировать кинетику накопления в реакционной смеси конечных и промежуточных продуктов гидролиза субстрата. В качестве субстратов, в зависимости от характера решаемых задач, были использованы линейные ДНК молекулы, содержащие ограниченное количество потенциальных точек разрыва [254], или кольцевые, содержащие один участок, узнаваемый исследуемым ферментом [106, 107]. Для оценки количества ДНК в зонах было применено прямое денситометрирование гелей [254], их фотонегативов [271, 254] или измерение радиоактивности [107]. Обсуждаемый подход оправдал себя в опытах по определению некоторых кинетических параметров реакций, катализируемых исследуемыми рестриктазами.

Рейсер и Юан [214] предложили использовать в качестве субстрата кольцевые ДНК молекулы фага λ (кольца Херши). Для разделения субстрата и продуктов рестриктазной реакции их раствор пропускали через нитроцеллюлозные фильтры. Свойство нитроцеллюлозы в определенных условиях связывать только кольцевые ДНК молекулы позволило отделить продукты реакции и субстрат. Последующее измерение количества связанной с фильтрами радиоактивной ДНК служило мерой рестриктазной активности. Аналогичный принцип определения активности исследуемых ферментов был апробирован Дефилли-песом [86]. В этом случае для разделения субстрата — плазмидной кольцевой ДНК и продуктов реакции был применен гидроксиапатит.

Другой вариант количественной оценки разрыва ДНК реализовали Модрич и Забела [184], использовавшие в качестве субстрата ДНК плазмиды ColE I. Указанные авторы ввели в реакционную смесь эндонуклеазу гесВС, которая действовала только на линейную ДНК (продукт рестриктазной реакции) и переводила ее в кислото-растворимую фракцию, содержание метки в которой отражало активность рестриктазы EcoR I.

Грин с соавт. [106] для определения активности этого же фермента, наряду с ДНК вируса ОВ40, в качестве субстрата использовали синтетический октануклеотид, меченный ^{32}P , содержащий участок, узнаваемый этим ферментом. Измерение содержания метки в продуктах реакции, разделенных методом электрофореза на бумаге, позволило количественно оценивать активность исследуемого фермента.

Определение активности рестриктаз, основанное на использовании кольцевых ДНК молекул [106, 107], применимо

только к некоторым ферментам, для которых удается подобрать сравнительно небольшого размера субстраты, содержащие ограниченное число точек расщепления. Иначе говоря, в каждом конкретном случае попытка использования вышеуказанных методов предполагает поиск доступного субстрата, удовлетворяющего вышеуказанным требованиям. Более общий подход к количественной оценке рестриктаз был предложен Беркнером и Фолком [40, 41]. С этой целью ими была использована способность полинуклеотидкиназы Т4 катализировать в определенных условиях обмен 5'-фосфата в молекулах ДНК на γ -фосфат АТФ [40]. Соответствующими опытами было продемонстрировано, что количество введенной в рестрикты метки из $\{\gamma\text{-}^{32}\text{P}\}$ -АТФ пропорционально содержанию ДНК концов, образовавшихся в результате действия рестриктаз на субстрат. Метод оказался приемлемым для определения активности ферментов рестрикции, образующих как 5' или 3' выступающие, так и полностью спаренные концы ДНК на месте ее расщепления.

Все рассмотренные количественные методы определения активности рестрикционных ферментов выполняются путем отбора проб в ходе реакции и их анализа. Халфордом и Джонсоном [114] был предложен и реализован на примере REcoRI непрерывный способ регистрации кинетики реакции. Он основан на разной способности связывать этидиум бромид сверхскрученной и никированной формами кольцевых молекул ДНК. Это приводит к изменению флуоресценции, что и регистрируется при помощи флуориметра.

Резюмируя рассмотрение количественных методов определения активности рестриктаз, следует отметить, что они являются адекватными приемами для изучения кинетических параметров катализируемых этими ферментами реакций. Несомненно, что в аналогичных опытах они найдут применение и в будущем. Однако, их использование в таких экспериментах, как, например, очистка рестриктаз и изучение влияния условий культивирования на содержание целевых предметов в биомассе, является малопривлекательным. Это, кроме отмеченных выше ограничений, выражающихся в необходимости подбора в каждом конкретном случае подходящих субстратов, обусловлено трудоемкостью приготовления таких субстратов (это замечание особенно касается радиоактивных субстратов) и анализа продуктов реакции. На всех этих этапах необходимо располагать уникальной аппаратурой и возможностью работать с изотопами. Хотя часть из обсуждаемых методов и была использована в единичных опытах по очистке рестриктаз [106, 163, 184, 254,], по вышеизложенным причинам они распространения не получили. Их трудоемкость является очевидной, а выигрыш в точности определения в таких опытах по сравнению с электрофоретическим методом не окупает затрат.

Вышеупомянутыми недостатками не обладает спектрофото-

метрический метод [134], нашедший применение в экспериментах по очистке рестриктаз [29, 196]. В качестве субстрата используется нативная ДНК иммобилизованная на целлюлозе. Под воздействием рестриктаз ДНК высвобождается с матрицы. Измерение оптической плотности растворов, содержащих продукты реакции, при длине волны равной 260 нм, позволяет количественно в условных единицах оценивать активность исследуемых ферментов. Продемонстрирована применимость обсуждаемого метода для количественного определения активности рестриктаз самой различной специфичности [29, 134, 196]. Этот метод отличается простотой и требует для своего использования несложной аппаратуры. Спектрофотометрический метод нашел применение в ходе разработки и реализации схем очистки ряда рестриктаз [29, 196].

Известен другой количественный метод определения активности рестриктаз, тоже основанный на применении иммобилизованной ДНК [229]. Однако в последнем случае используется радиоактивная ДНК заподимеризованная в полиакриламидном геле. Этот метод уступает спектрофотометрическому в универсальности, так как он применим только к частощепящим рестриктазам. Кроме того его применение связано с использованием радиоактивного субстрата.

Как уже отмечалось (и это имеет принципиальное значение), электрофоретический метод позволяет в одном опыте, путем рассматривания гелей, дифференцировать специфическую и неспецифическую нуклеазные активности и наличие нескольких рестриктаз. Конечно, рассмотренные выше количественные методы после соответствующих их модификаций можно адаптировать и для решения таких задач. Однако, это еще более усложнило бы их применение. Поэтому в опытах по поиску продуцентов рестриктаз и в значительной мере в экспериментах по их очистке электрофоретический метод не имеет себе равных.

2. ПОИСК ПРОДУЦЕНТОВ РЕСТРИКТАЗ

Основная масса известных специфических эндонуклеаз была обнаружена в результате целенаправленного применения для их поиска биохимических методов тестирования, основанных на определении способности грубых или частично очищенных бесклеточных экстрактов исследуемых культур специфически фрагментировать ДНК субстраты. Значительно меньшее число этих ферментов было выявлено благодаря изучению энзиматических основ систем хозяйской специфичности (СХС) прокариотических микроорганизмов, реализовавшихся в открытии рестриктаз II типа. В последнем случае таким опытам предшествовали генетические (биологические) эксперименты по определению наличия и изучению генетического контроля систем

рестрикции-модификации у прокариотических микроорганизмов классическими методами, основанными на определении эффективности посева тестерных фагов на исследуемых и контрольных штаммах.

2.1. Биологические подходы к поиску продуцентов рестриктаз

По ряду причин, которые будут рассмотрены ниже, биологический подход, в отличие от биохимического, для целенаправленного поиска продуцентов специфических эндонуклеаз за редкими исключениями не применялся и их выявление оказалось как бы «побочным» продуктом исследований, посвященных отдельным аспектам поиска и изучения СХС. Среди таких исследований, имевших различные первоначальные цели, предшествовавших открытию рестрикционных эндонуклеаз II типа, находим эксперименты, посвященные изучению распространению и характеристики СХС в различных таксономических группах микроорганизмов [24, 25, 186, 242], механизмов ограничения развития фагов R плазмидами [8, 129, 300] и факторов, влияющих на исход опытов по фаготинированию [258]. В некоторых случаях первопричиной таких опытов было стремление выбрать не обладающие СХС базовые штаммы некоторых новых объектов с целью их использования как реципиентов рекомбинантных молекул ДНК в опытах по генетической инженерии. Примером таких работ является изучение наличия и специфичности систем рестрикции—модификации в штаммах стрептомицетов [6] и цианобактерий [91].

Указанные выше исследования послужили предпосылкой для открытия рестриктаз II типа; EcoRI и EcoRII из штаммов *E. coli* RY13 и R245 соответственно [330, 301], EcoRV [28] — *E. coli* J62pLG74 [8], EcoCK [1] — *E. coli* CK [25], Sso47 и Sso47 II [18] — *Shigella Sonnei* 47 [25, 26], Pae37 I [119] — *Pseudomonas aeruginosa* [129], Sau3A I и Sau96 I в штаммах *Staphylococcus aureus* 3A [264] и 96 [265] соответственно, BsuM I [136] BsuR I [59] в штаммах *Bacillus subtilis* 168 [242] и R [275] соответственно, Bst I [70] из *Bacillus stereothermophilus* 1503—4R [69], BamN I [243] и BamH I [296] в штаммах *Bacillus amyloliquefaciens* N и H [242] соответственно, Shy I [287] — *Streptomyces hygrosopicus* 0477 [24], Sgr II [20] — *Streptomyces griseus* Kr20 [6], NspB I и NspB II, NspH I и NspH II из *Nostoc* sp. B и H соответственно [91], Avr I и Avr II [216] из *Arabaena variabilis* [79], ScrF I [95] — *Streptococcus craemoris* F [81], MviV2 I и MviV2 II из *Mixococcus virescens* V2 [186]. Этим списком, включающим 25 наименований, практически исчерпывается перечень ферментов, для которых удалось четко определить последовательный ход экспериментов, начавшихся с выявления систем рестрикции-модификации биологическими методами и

завершившихся идентификацией специфических эндонуклеаз биохимическими методами. Учитывая тот факт, что в настоящее время известно более 1000 рестриктазы, вклад биологических методов в пополнение списка этих ферментов следует признать незначительным. Причины этого явления скрываются в ограниченных возможностях обсуждаемого подхода в сфере целенаправленного широкомасштабного поиска специфических эндонуклеаз. Иллюстративной в этом отношении является работа В. Н. Крылова и А. Т. Карапетян [16], одна из немногих, где ставилась цель определить вероятность обнаружения новых вариантов рестрикции-модификации среди природных штаммов и оценить трудности и возможности таких исследований.

Поиск бактерий, обладающих СХС, был проведен среди 547 штаммов *E. coli*, выделенный из сточных вод. В этих опытах в качестве тестерных были использованы 23 лямбдоидных фага. В результате проведенных исследований, заключавшихся в определении эффективности посева этих фагов на исследуемых штаммах, не удалось выявить ни одной культуры, проявляющей феномен рестрикции-модификации, хотя при первичной проверке из огромного числа комбинаций фаг-бактерия (23 фага \times 547 штамма < 12000) литическое развитие наблюдалось только в 187 случаях. Однако, основной причиной ограничения роста фагов оказалось отсутствие их адсорбции на бактериальных клетках. Средняя вероятность как какого-либо лямбдоидного бактериофага из испытанной группы встретить адсорбирующий его микробный штамм в исследуемой выборке составила немногим более 2%.

Для продолжения опытов по поиску СХС была отобрана группа из 37 комбинаций фаг-бактерия (оставшихся после исключения из 284 давших адсорбцию 187 комбинаций, завершающихся литическим развитием фагов и 60, отличавшихся низким уровнем адсорбции). На отобранной группе проверялась возможность преодолеть ограничение роста при высоких множественностях инфекции. В результате этих исследований наблюдался лизис трех штаммов. Однако, как было показано, это было связано не с литическим развитием фагов, а с проявлением некоторых функций проникших в клетки молекул фаговой ДНК [16].

Таким образом, несмотря на то, что работа была проведена на многочисленной группе штаммов (всего 547) и тестерных фагов (всего 23), попытка поиска среди них культур, содержащих СХС, не увенчалась успехом. Авторами было выдвинуто предположение, что клетки обладают не одним механизмом подавления развития фагов, в том числе и отличающимися от рестрикции-модификации. Проявление этих механизмов не преодолевается множественной инфекцией и, таким образом, исключает возможность тестирования наличия СХС. Правиль-

ность этого предположения в одном случае была доказана. Для разделения гипотетических факторов ограничения развития тестерных фагов были получены рекомбинанты между 10-тью природными культурами и лабораторным Hfg штаммом *E. coli*. В двух рекомбинантах, отобранных при скрещивании одного природного штамма с лабораторным, удалось выявить наличие СХС, которая, согласно данным перекрестного тестирования λ фага на штаммах, содержащих известные системы рестрикции-модификации, функционирующие в *E. coli*. и исследуемым, оказалась новой.

Из данных рассмотренной работы [16] следует, что основным фактором, препятствующим тестированию наличия СХС в исследованных штаммах *E. coli*, оказалось отсутствие адсорбции тестерных фагов. Это явление распространено и в других группах микроорганизмов. Так, в аналогичной работе, проведенной И. И. Никольской-Санович с соавт. [19, 25] из 872 штаммов шигелл было отобрано 100 культур, не давших размножения бактериофагов серии ДД. Оказалось, что в 98 случаях низкая эффективность посева была обусловлена отсутствием адсорбции. Проверка двух оставшихся штаммов *Sh. sonnei* 311 и *Sh. sonnei* 47 методом перекрестного титрования позволило выявить наличие в них СХС. Последующее изучение энзиматических основ СХС *Sh. sonnei* 47 реализовалось в открытии двух рестриктаз II типа — Sso47 I и Sso47 II [18].

Отсутствие адсорбции не исчерпывает разнообразия вариантов взаимодействия бактериальных вирусов и микробных клеток. Они иллюстрируют лишь одну сторону этого явления, а именно проявление клеточных защитных механизмов, фенотипически (по критерию отсутствия роста) имитирующих рестрикцию. Однако, существует и другой вариант взаимодействия клетка—бактериофаг, который может имитировать отсутствие СХС. Примерами таких механизмов является синтез ингибиторов [170, 171] и метилаз [76, 137, 191, 192, 276] кодируемых фаговыми генами, защищающих вирусную ДНК от действия рестриктаз II типа.

Отсутствие СХС может имитироваться и в тех случаях, когда ДНК тестерных фагов не содержат сайтов, узнаваемых существующей в исследуемом штамме рестриктазой. Это явление представляет собой один из вариантов эволюционных адаптивных изменений бактериальных вирусов, призванных способствовать преодолению ими барьера СХС. Действие давления отбора в данном конкретном случае выражается в статистическом достоверном уменьшении числа или даже полной элиминации в фаговой ДНК последовательностей нуклеотидов, являющихся субстратом рестриктаз, характерных для клеток-хозяев бактериального вируса [19, 141].

Рассмотренными выше примерами далеко не исчерпываются возможные варианты взаимодействия фаг—клетка, имитирую-

шие как ограничение развития фагов, не связанное с наличием СХС, так и его отсутствие. Однако, даже этот выборочный материал убеждает в том, что выявление СХС в природных штаммах биологическими методами сопряжено с исследованием систем, в которых много неизвестных слагаемых (как в отношении клетки, так и в отношении фага), препятствующих достижению поставленной цели. Эту задачу можно попытаться упростить путем перевода (используя генетические методы) предполагаемых СХС из природных штаммов в лабораторные, хорошо изученные в отношении взаимодействия с тестерными фагами. Напомним, что использование именно этого приема позволило М. К. Крылову и А. Т. Карапетян [16] выявить СХС в рекомбинантах природного и лабораторного штаммов. Однако, из-за низкой частоты скрещивания таких пар культур указанный «обходный маневр» является малопримлемым для широкомасштабного поиска СХС.

Другой более простой вариант указанного подхода был использован Глатман с соавт. [8], задавшимися целью выявления и изучения систем рестрикции-модификации, детерминированных трансмиссильными плазмидами клинических изолятов *E. coli*. Для выявления СХС, контролируемых этими плазмидами, осуществляли их конъюгативный перенос в производные лабораторного штамма *E. coli* K12 и определяли эффективность посева λ vir на трансконъюгатах и изогенных безплазмидных штаммах. В случае снижения эффективности посева устанавливалось наличие модификации общепринятыми методами, заключающимися в попеременных пассажах λ vir на ограничивающих рост фага трансконъюгатах и контрольных штаммах. Всего было исследовано 450 клинических изолятов *E. coli*, среди которых 260 оказались антибиотикоустойчивыми. Из них 101 содержал трансмиссильные R плазмиды. 30 трансконъюгатов ограничивали развитие тестерного фага, но только в 10 случаях это было связано с проявлением систем рестрикции-модификации. 9 этих систем оказались идентичными известной СХС EcoR II [8]. Один трансконъюгат *E. coli* J62pLG74 обладал СХС, отличной от описанных ранее систем, контролируемых R плазмидами, которая была названа EcoRV. Применение биохимических методов дало возможность выделить специфическую эндодезоксирибонуклеазу, известную под этим же названием [28]. Обсуждаемая работа является частным случаем поиска СХС, а именно СХС, контролируемых трансмиссильными R плазмидами. Применение такого подхода облегчает решение ряда методических вопросов, так как эффективность посева изучается на трансконъюгатах, созданных на базе хорошо изученных лабораторных штаммов, охарактеризованных в отношении их взаимодействия с тестерными фагами. С методической точки зрения это является одним из самых простых вариантов поиска СХС биологическими методами. Однако, да-

же в этом случае видно, какое большое число штаммов по методическим причинам исключается из рассмотрения, а ее результативность во многом определяется вероятностью одновременной локализации генов лекарственной устойчивости и СХС в трансмиссибельных плазмидах.

Рассмотрение вышеуказанных частных примеров поиска СХС биологическими методами убеждает в том, что несмотря на их простоту, они отличаются громоздкостью и низкой результативностью.

С учетом вышеуказанного становится очевидным, что применение биологических методов, как предварительного этапа поиска специфических эндонуклеаз, особенно в отношении природных штаммов, имеет ограниченное значение. Тем не менее, этот подход внес определенный вклад в расширение списка специфических эндонуклеаз и можно прогнозировать, что и в будущем некоторое число указанных ферментов будет выявлено обсуждаемым способом.

В завершении обсуждения биологического подхода следовало бы подчеркнуть, что он в принципе неприемлем для целенаправленного поиска рестриктаз II типа. Этим способом отбираются СХС без учета их энзиматической основы. Как известно, в ограничении развития фагов участвуют и рестриционные эндонуклеазы I и III типов. Поэтому неизбежным этапом идентификации типа и субстратной специфичности рестриктирующего компонента обнаруженной новой СХС является его исследование биохимическими методами.

2.2. Биохимические методы поиска продуцентов специфических эндонуклеаз

Начало применения биохимических методов для поиска и идентификации специфических эндонуклеаз относится к опытам, завершившимся открытием первой рестриктазы II типа — Hind II [253]. В этих экспериментах было обнаружено, что ДНК салмонельного фага Р22, в отличие от хромосомной ДНК *N. influenzae* Rd, деградируется бесклеточным экстрактом указанного штамма. Это было продемонстрировано путем ультрацентрифугирования продуктов реакции в градиенте сахарозы и с использованием вискозиметрического метода.

Использование этих приемов, позаимствованных из методического арсенала определения активности рестриктаз I типа [181], способствовало открытию ряда других первых специфических эндонуклеаз [110, 182, 244]. Несмотря на успешное применение ультрацентрифугирования и вискозиметрического метода, сразу стало очевидным их принципиальное ограничение, выражающееся в том, что эти методы регистрируют любую эндонуклеазную активность и, таким образом не являются изби-

рательными по отношению к специфическим эндодезоксирибонуклеазам. Этими недостатками не обладал электрофоретический метод [241], первоначально предложенный для определения активности рестриктаз в ходе их очистки, который оказался очень удобным для тестирования наличия специфических эндонуклеаз в бесклеточных экстрактах исследуемых культур. Применение обсуждаемого метода впервые дало возможность вести целенаправленный широкомасштабный поиск этих ферментов и во многом способствовало развитию этих исследований. Подавляющее большинство известных в настоящее время специфических эндонуклеаз было открыто используя именно этот подход.

Большим достоинством обсуждаемого метода является возможность его использования для тестирования активности специфических эндонуклеаз, несмотря на присутствие некоторых количеств неспецифических эндонуклеаз. Эта особенность электрофоретического метода способствует быстрой проверке многих штаммов. Однако, в таких опытах наблюдаются и случаи относительно большого содержания неспецифических нуклеаз в бесклеточных экстрактах некоторых исследуемых культур, что может маскировать активность целевых ферментов и тем самым препятствовать их выявлению [179].

Первым этапом по поиску продуцентов специфических эндонуклеаз является получение бесклеточных экстрактов исследуемых культур. Для разрушения клеток в таких опытах обычно используется их обработка ультразвуком [104, 246, 261]. Иногда ультразвуковой дезинтеграции предшествует обработка клеток лизоцимом [245] или лизостафином [258]. В литературе имеются сведения и о некоторых реже используемых для разрушения клеток в обсуждаемых экспериментах, приемах. Так, Смит с соавт. [251] продемонстрировали, что рестриктазы, локализованные в периплазматическом пространстве клеток, могут быть переведены в раствор в результате осмотического шока, и успешно использовали этот прием в опытах по поиску продуцентов рестриктаз. Механическое разрушение клеток при помощи гомогенизатора Поттера было предложено Майером и Райхенбахом [179]. Эти исследователи сравнивали три различных метода разрушения клеток: ультразвуковую дезинтеграцию, осмотический шок и механический. Оказалось, что наиболее эффективным приемом в отношении выхода рестриктаз является обработка клеток ультразвуком. Осмотический шок и применение гомогенизатора Поттера дали выход соответственно на 40—60% и 20—40% ниже. Оказалось, что осмотический шок высвобождает рестриктазы только из граммотрицательных бактерий. По мнению авторов, механическое разрушение дает вполне приемлемые для опытов по поиску продуцентов рестриктаз результаты. Этот способ является менее трудоемким по сравнению с другими апробированными методами. Он успешно

применен в случае проверки 120 штаммов скользящих бактерий на наличие специфических эндонуклеаз [179].

Бесклеточные экстракты культур, полученные после отделения обломков клеток путем центрифугирования, используются для тестирования рестриктазной активности либо непосредственно [179, 251], либо после частичной их очистки [104, 246, 258, 261]. С этой целью обычно используется ряд простых приемов, пригодных для быстрой обработки грубых экстрактов многих исследуемых штаммов. В работах, посвященных систематическому поиску специфических эндонуклеаз в штаммах *Staphylococcus aureus* [258] и культурах рода *Bacillus* [245], частичная очистка заключалась в высаждении нуклеиновых кислот стрептомицинсульфатом. В некоторых случаях подготовка образцов для анализа включала (дополнительно к удалению нуклеиновых кислот) стадию высаливания белков серноокислым аммонием [246].

Наряду с вышеуказанными, относительно простыми методами первичной обработки бесклеточных экстрактов, имеются примеры использования с этой целью и более сложных приемов. Так, в экспериментах по поиску рестриктаз в штаммах рода *Proteus*, грубые экстракты пропускали через биогель А 0,5 м и тестировали активность целевых ферментов в собираемых фракциях [104]. В аналогичных экспериментах, заключавшихся в проверке 147 штаммов бактерий, их бесклеточные экстракты пропускали через фосфоцеллюлозу [261] и тестировали рестриктазную активность в фракции, содержащие несорбировавшие белки и элюате, полученном при помощи ступенчатой элюции связанных сробентом белков 1 М раствором КС1. Трудоемкость последних двух приемов является очевидной.

Рассматривая рассмотренные выше литературные данные, следует обратить внимание на тот факт, что использование в ряде работ по поиску рестриктаз первичной очистки бесклеточных экстрактов, предшествовавшей проверке наличия специфических эндонуклеаз в исследуемых штаммах, возможно, не было оправданным. В цитированных источниках [104, 246, 258, 261] не имеется указаний, чем руководствовались авторы, выбрав путь тестирования частично очищенных препаратов. Было ли это вызвано невозможностью определения рестриктазной активности непосредственно в бесклеточных экстрактах или частичная очистка была введена в эксперименты без предварительных опытов? Если такие эксперименты не проводились, то в общем случае в ходе такой «слепой очистки» (неконтролируемой по активности целевого фермента) не исключена потеря целевых ферментов. Удаление нуклеиновых кислот стрептомицинсульфатом может сопровождаться соосаждением значительных количеств рестриктаз. Поэтому «слепое» использование этого приема для первичной очистки бесклеточных эк-

рактот исследуемых культур может в некоторых случаях имитировать отсутствие рестриктаз в них. Особенно это вероятно в случае низкого содержания целевых ферментов. Поэтому частичную очистку, как этап, предшествующий тестированию наличия специфических эндонуклеаз в исследуемых культурах, следовало бы использовать как дополнительный прием только в отношении бесклеточных экстрактов, давших отрицательный результат в ходе первичной проверки. Если такой результат был получен вследствие маскирования рестриктаз какими то факторами, присутствующими в бесклеточных экстрактах (например, нуклеазами), не исключено, что в некоторых случаях «слепой» очисткой удастся от них освободиться и тем самым выявить искомую активность.

Пропускание бесклеточных экстрактов через фосфоцеллюлозу [261] можно рассматривать как способ, позволяющий совмещать в одном опыте проверку наличия рестриктазной активности в бесклеточных экстрактах (фракция, содержащая несорбировавшиеся белки) и частично очищенных препаратах (элюат). К сожалению, авторы цитированной работы, открывшие 15 продуцентов рестриктаз в 147 проверенных таким способом штаммах, не указывают, где (в проскоке или элюате) и в каком соотношении ими были обнаружены рестриктазные активности. Отсутствие этих данных не позволяет оценить потенциальные возможности обсуждаемого метода в отношении совмещения в одном опыте проверки активности целевых ферментов в бесклеточных экстрактах и частично очищенных их препаратах.

С расширением объема работ по поиску ферментов рестрикции возникла необходимость в максимально упрощенных методах, позволяющих провести массовое тестирование проверяемых штаммов. Первыми такой методический прием предложили и разработали Уайтхед и Браун [294]. Эти авторы культивировали исследуемые культуры в 4 мл жидкой среды и собранную центрифугированием биомассу суспендировали в буферном растворе, содержащем 25% сахарозы, лизоцим и ЭДТА. После непродолжительной (2 мин) инкубации при 0°С к суспензии добавляли детергент Brij-58, MgCl₂ и выдерживали ее 15 мин при комнатной температуре. После этого клетки удаляли центрифугированием, а полученную надосадочную жидкость использовали для исследования на наличие специфической эндонуклеазной активности электрофоретическим методом. Было показано, что предложенный метод оправдывает себя при тестировании представителей самых различных родов микроорганизмов: цианобактерий, грамотрицательных бактерий и бацилл. Вместе с тем он не является универсальным и дал отрицательные результаты в случае проверки *Herpetosiphon giganteus* и *Streptomyces*. Авторы обсуждаемой работы связывают возможность тестирования представителей различных

таксономических групп со способностью используемого приема вызывать образование сферопластов микроорганизмов. Некоторые среди них обладают таким строением клеточной стенки, которая исключает возможность ее пермеализации используемым приемом.

Самым простым известным в настоящее время методом массового скрининга штаммов следует признать способ разработанный Белавиным, Дедковым и Дегтяревым [3]. Предложенный прием представляет собой упрощенный и усовершенствованный метод Уайтхеда и Брауна [294]. Основным различием между ними, позволяющим значительно снизить трудоемкость, является использование в качестве исходного материала биомассы отдельных колоний, выращенных на агаризованной среде. Отличия между обсуждаемыми подходами имеются и на стадии пермеализации клеток. В последнем случае обработка является одноэтапной (15 мин при комнатной температуре) и клетки суспендируются в буферном растворе, содержащем в качестве пермеализующих агентов Тритон X-100, ЭДТА и лизоцим.

Метод отличается большой чувствительностью. Сказанное иллюстрирует тот факт, что в случае проверки в качестве модельного объекта продуцента рестриктазы Fok I F. океанокоитес, отличающегося низким содержанием целевого фермента в биомассе (250 ед./г сырой биомассы), на электрофореграмме наблюдается типичная картина проявления специфической эндонуклеазной активности. Отличительной чертой экспресс-метода является пока непревзойденная (а по отношению к многим другим подходам и просто не сравнимая) производительность, характеризующаяся возможностью в одном опыте, продолжительностью 3—4 часа проверить до 100 отдельных колоний бактерий [3].

Как и в случае метода Уайтхеда и Брауна [294], далеко не все штаммы, относящиеся к различным таксономическим группам микроорганизмов, оказались чувствительными к используемой обработке. Среди проверенных культур положительные результаты были получены со штаммами, принадлежащими к родам *Bacillus*, *Kurtzia*, *Paracoccus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Rhodospseudomonas*, *Providencia*, *Flavobacterium*; отрицательные со *Streptomyces* и *Nocardia*.

Хотя экспресс-методы скрининга штаммов микроорганизмов на наличие рестриктаз по вышеизложенным причинам не являются универсальными (как и все остальные методы) их максимальная простота позволяет предположить о возможностях широкого их применения в опытах по поиску продуцентов рестриктаз. На основе цитированных работ создается впечатление, что они пригодны для проверки широкого круга таксонов. Случаи отсутствия пермеализации могут быть идентифицированы визуально (например, по отсутствию в экстрактах клеточ-

ных нуклеиновых кислот или неспецифических нуклеаз) и клетки подвергнуты другим методам вскрытия.

Резюмируя рассмотрение методических аспектов поиска специфических эндонуклеаз хотелось бы обратить внимание на еще некоторые принципиальные возможности и недостатки биологического и биохимического подходов. Использование обоих методов не дает полной гарантии, что во всех случаях при наличии в исследуемой культуре целевого фермента он будет выявлен. Очевидно, что этими методами могут тестироваться только те специфические эндонуклеазы, для которых в используемых субстратах имеются узнаваемые ими последовательности нуклеотидов. В случае биологического метода набор субстратов ограничен фагами, способными размножаться и дать лизис на исследуемом штамме. Это ограничение значительно сужает возможности вариации субстратов, тем более, что, как указывалось, наблюдается тенденция отбора фагов с уменьшенным числом сайтов, узнаваемых ферментами СХС их хозяев [141]. В случае же применения биохимических методов теоретически не существует препятствий для использования различных по первичной структуре субстратов и, тем самым, при достаточно большом их наборе можно надеяться значительно уменьшить вероятность отрицательного результата в опытах по поиску продуцентов рестриктаз, обусловленного обсуждаемой причиной.

В случае использования биологических методов, как следует из приведенных выше примеров, огромное число штаммов исключается из круга исследуемых уже на первых стадиях проверки. Биохимической проверке доступны все штаммы. Однако, и в этом случае существует множество причин, по которым имеющиеся в клетках специфические эндонуклеазы могут быть не обнаружены. Вряд ли все их можно предусмотреть и перечислить. Среди очевидных причин видимого отсутствия искомой активности (кроме упомянутого выше отсутствия сайтов узнавания в субстрате) в опытах *in vitro* можно перечислить следующие: отсутствие сайтов узнавания может имитироваться природными модификациями субстратов как в виде метилирования, так и более сложными ее вариантами [19, 155]. Предположительно часть рестриктаз может инактивироваться в ходе получения бесклеточных экстрактов или маскироваться присутствием большой, относительно рестриктазной, активностью неспецифических нуклеаз. Несмотря на исключительно высокую чувствительность электрофоретического метода [241], из-за маскирующего действия нуклеаз она может только снизиться. Проявление последнего фактора особенно должно сказаться на обнаружении рестриктаз, содержащихся в клетках в незначительных количествах. Состав рестрикционных смесей, используемых для определения активности рестриктаз в опытах по их поиску, может оказаться далеко не оптимальным. В ка-

честве кофактора в реакционной смеси обычно добавляются только ионы магния. Не исключено существование в природе специфических эндонуклеаз, имеющих другие кофакторные потребности. Такие ферменты в общепринятых для поиска рестриктаз реакционных смесях заведомо не будут тестироваться.

В принципе существуют методические подходы, позволяющие хотя бы частично проверить возможное влияние некоторых из вышеперечисленных факторов на наблюдаемый отрицательный результат путем вариации условий экспериментов. Однако осуществление таких опытов в большинстве случаев связано с выполнением многочисленных и трудоемких экспериментов.

В поиске путей решения вышеперечисленных вопросов определенный вклад могут внести биологические методы поиска СХС. Известны случаи, когда достоверно биологическими методами доказано существование СХС, но определить эндонуклеазную активность *in vitro* не удастся [81, 150, 265]. Причины этого явления могут быть тривиальными (например, инактивация ферментов в бесклеточных экстрактах) или более сложными (потребность в неизвестном кофакторе (—ах)). Целенаправленное изучение причин этого явления могло бы способствовать поиску подходов в решении проблемы «тестируемости» хотя бы части рестриктаз биохимическими методами.

3. ОЧИСТКА РЕСТРИКТАЗ

Очищенные препараты рестриктаз необходимы как для их характеристики, так и для использования в качестве аналитических реагентов в различных сферах применения этих ферментов. Выделение рестриктаз, как и любых других ферментов, преследует две цели — получение ферментных препаратов, свободных от нежелательных примесных активностей (функциональная чистота), или получение гомогенных белков (физическая чистота). В случае специфических эндонуклеаз в качестве нежелательных примесей в первую очередь выступают неспецифические нуклеазы и фосфатазы, имеющиеся во всех клетках, а иногда и рестриктазы, присутствующие наряду с целевым ферментом в биомассе некоторых продуцентов.

Требования к уровню функциональной чистоты препаратов рестриктаз, используемых в опытах по определению их субстратной специфичности, далеко не одинаковы и диктуются заданной глубиной исследования этой характеристики. В случае применения рестриктаз в качестве аналитических реагентов качество препаратов, в зависимости от сферы применения, тоже может варьировать. В опытах по физическому картированию допустимо использование ферментов, содержащих в качестве примесей нелимитированное количество фосфатаз. Уровень присутствия неспецифических нуклеаз ограничивается та-

ким их содержанием в препаратах рестриктаз, который бы не искажал картины распределения фрагментов на электрофореграмме. Рестриктазы, используемые в опытах по генной инженерии и секвенированию ДНК, должны характеризоваться очень высокой функциональной чистотой. Для изучения ряда физико-химических и энзиматических свойств рестриктаз, а также исследования механизмов их взаимодействия с ДНК необходимы гомогенные препараты этих ферментов.

Преобладание прикладных аспектов в исследованиях, посвященных ферментам рестрикции, находит свое отражение и в том, что в опытах по препаративному получению специфических эндонуклеаз основные усилия направлены на выделение функционально очищенных их препаратов. Значительно меньше внимания уделяется получению этих ферментов в гомогенном состоянии.

Рассмотрение известных схем выделения рестриктаз сталкивается с определенными трудностями. Отличительной чертой препаративной биохимии специфических эндонуклеаз по сравнению с традиционной практикой выделения многих других ферментов, является скудность количественных данных, характеризующих степень очистки и выход целевого продукта как на отдельных стадиях, так и после реализации всего процесса выделения, т. е. отсутствие критериев, обычно используемых для эффективности схемы очистки. Не принято проводить и оценку степени функциональной очистки на всех стадиях выделения, а тем более в многочисленных фракциях, собираемых в результате проведения хроматографического процесса. Такому анализу обычно подвергается только конечный препарат.

Существует несколько объективных причин наблюдаемого явления. В первую очередь это связано с тем, что в начальных стадиях очистки наличие в исследуемых препаратах примесных неспецифических нуклеаз не позволяет, за редкими исключениями, проводить количественную оценку активности рестриктаз. Но даже в случае потенциальной возможности такой оценки, отсутствие простых методов для ее осуществления не способствует проведению обсуждаемого анализа. Количественная оценка примесных неспецифических нуклеаз (особенно эндонуклеаз) тоже встречается с методическими трудностями.

Наиболее широко в опытах по выделению рестриктаз применяется электрофоретический метод [241], использование которого позволяет идентифицировать фракции, содержащие основную массу целевого фермента, и визуально оценить наличие примесей неспецифических нуклеаз. Учитывая тот факт, что основным направлением препаративной биохимии рестриктаз является получение небольших количеств функционально очищенных их препаратов, применение качественного метода (электрофоретического) является вполне оправданным. Однако,

повсеместное применение такого методического подхода не позволяет на основе литературных данных, за редкими исключениями, оценить эффективность отдельных стадий очистки и тем более сравнить с этой точки зрения разные схемы выделения рестриктаз. Указанные исключения в основном относятся к опытам по получению гомогенных препаратов этих ферментов.

Источником специфических эндонуклеаз являются штаммы микроорганизмов, каждый из которых, учитывая исключительную пестроту таксономической их принадлежности (см. разд. 2, I-ая часть), в общем случае содержит уникальную композицию белков и других растворимых клеточных компонентов. Рестриктазы *а ргіогі* отличаются по физико-химическим свойствам. Это утверждение предположительно справедливо и в отношении многих изошизомеров. Поэтому очевидно, что в общем случае выделение и очистка каждого отдельно взятого фермента является индивидуальной задачей. Однако, рассмотрение литературных данных позволяет выделить некоторые общие используемые с этой целью методические приемы.

Основными этапами выделения любой рестриктазы является получение бесклеточных экстрактов и собственно очистка целевых ферментов, осуществляемая с применением традиционных приемов препаративной биохимии белковых соединений (высаливание, хроматографическое фракционирование и т. д.). Вместе с тем следует отметить, что процессам выделения рестриктаз, как и других ферментов нуклеинового обмена, характерен ряд специфических особенностей. В первую очередь это замечание относится к тому вниманию, которое уделяется разделению целевых ферментов и нуклеиновых кислот, в принципе способных влиять на перераспределение как рестриктаз, так и нуклеаз между фракциями, получаемыми в результате применения различных методов выделения целевых ферментов. Поэтому этот этап является одним из ключевых в схемах выделения рестриктаз, от результатов проведения которого во многом зависит успех дальнейшей их очистки.

Все этапы выделения рестриктаз (в том числе и центрифугирование гомогената разрушенных клеток), в зависимости от условий их проведения, могут дать в той или иной мере выраженную очистку целевых ферментов. Это замечание относится и к методам, применяемым для разделения нуклеиновых кислот и рестриктаз. Однако, в связи с отмеченной выше важностью этой процедуры для препаративной биохимии обсуждаемых ферментов по методологическим соображениям уместным является ее рассмотреть отдельно.

С учетом вышеуказанного в качестве основных этапов выделения рестриктаз будут рассмотрены следующие: получение бесклеточных экстрактов, разделение нуклеиновых кислот и целевых ферментов и хроматографическая очистка последних.

3.1. Получение бесклеточных экстрактов

В подавляющем большинстве случаев в опытах по выделению рестриктаз для разрушения клеток используется ультразвук [31, 100, 106, 126, 152, 186, 218, 219, 249, 288]. Иногда клетки перед этим обрабатывают лизоцимом [20, 28, 31, 123, 126, 146, 152] или лизостафином [264, 265]. Реже поставленная цель достигается при помощи Френч пресса [89, 169, 235, 289]. Имеются указания на использование в единичных случаях растирания клеток со смесью алюминия [113] и разрушение при помощи стеклянных шариков [88, 180].

В тех случаях, когда выделение рестриктаз ведется из сотен грамм или килограммовых количеств биомассы, для разрушения клеток применяются экструзионные механические дезинтеграторы [47, 74, 125, 138, 184, 188, 254].

Для экстракции рестриктаз, расположенных в периплазматическом пространстве грамотрицательных клеток, был апробирован их осмотический шок [179, 251], что нашло применение при разработке схемы очистки рестриктазы Pst I [251]. В дальнейшем этот метод в препаративных работах по выделению рестриктаз не получил распространения, что, учитывая ограниченный выход целевых ферментов в раствор [251] и относительную трудоемкость обсуждаемой процедуры, является вполне объяснимым.

Следующим этапом получения бесклеточных экстрактов является центрифугирование клеточных гомогенатов. Обычно с этой целью используется высокоскоростное центрифугирование (10 000—50 000 xg 15—60 мин) [10, 100, 123, 125, 188, 296], обеспечивающее удаление клеточных обломков или ультрацентрифугирование, при 100 000 xg в течение 1—2 часов [78, 101, 149, 156, 179, 202, 218, 219, 235, 241 и др.], позволяющее наряду с удалением клеточных обломков перевести в осадок и рибосомы [198]. В доступной литературе имеется несколько примеров ультрацентрифугирования бесклеточных экстрактов при 250 000 xg 17 часов, примененного в случае выделения рестриктаз Nci I и Nde I [292, 293]. Очевидно, что в последнем случае достигается большая очистка целевых ферментов по сравнению с центрифугированием гомогената разрушенных клеток в других вышеуказанных режимах. Ультрацентрифугирование в режиме, обеспечивающем удаление рибосом, применяется довольно часто, что находит объяснение в достижении некоторой очистки целевых ферментов.

3.2. Разделение нуклеиновых кислот и рестриктаз

Для отделения нуклеиновых кислот от рестриктаз применяется их высаживание стрептомицинсульфатом (СС) или полиэтиленимином (ПЭИ), двухфазные водные системы, гельфильт-

рация и фракционирование грубых экстрактов на различных сорбентах, т. е. применяются две группы методов — хроматографические и хроматографические.

3.2.1. Нехроматографические методы

Одним из самых простых классических методов удаления нуклеиновых кислот является их высаживание при помощи СС. Обычно в опытах по выделению рестриктаз с этой целью используется 1—2% конечные концентрации указанного антибиотика. Для применения этого способа практически не существует ограничений в рабочих объемах бесклеточных экстрактов, что может оказаться важным фактором в препаративных опытах. Вышеуказанные особенности обсуждаемого метода удаления нуклеиновых кислот способствовали его широкому использованию в опытах по выделению рестриктаз [20, 23, 28, 52, 73, 98, 107, 115, 122, 126, 142, 145, 146, 167, 186, 234, 264, 265, 296, 303 и др.].

К недостаткам стрептомицинсульфатного метода следует отнести возможную потерю целевых ферментов. Следует предположить, что в каждом конкретном случае распределение нуклеиновых кислот и белков (в том числе нуклеаз, фосфатаз и рестриктаз) между осадком и раствором зависит от индивидуальных свойств этих компонентов и их проявления в условиях конкретного эксперимента. Предположительно соосаждение с нуклеиновыми кислотами может привести как к ощутимым потерям целевых ферментов, так и к их определенной функциональной очистке (в случае избирательного перехода в осадок нежелательных примесей). К сожалению, в литературе, описывающей применение СС для удаления нуклеиновых кислот в опытах по выделению рестриктаз, отсутствуют конкретные данные, отражающие характер распределения компонентов бесклеточного экстракта между осадком и супернатантом. Поэтому приходится лишь ограничиться замечанием, что наличие сведений об использовании в обсуждаемых экспериментах различных концентраций СС (0,5—4%) [115, 184, 186, 273] может быть принято как указание на возможность при ее помощи влиять на судьбу целевых ферментов и нежелательных примесей. В этом плане представляют интерес данные об ощутимых различиях в выходе рестриктазы EcoR I, выделенной по двум схемам [184, 273], что во многом может быть объяснено неодинаковыми потерями целевого фермента на стадии удаления нуклеиновых кислот, проведенной с использованием различных концентраций СС.

Комплекс СС—ДНК является неустойчивым в условиях повышенной ионной силы [87, 187]. Это его свойство ограничивает возможности вариации условий экспериментов в отношении обсуждаемого фактора с целью регуляции распределения ком-

понентов бесклеточных экстрактов между надосадочной жидкостью и преципитатом и не допускает применения экстракции целевых ферментов из осадков растворами повышенной ионной силы.

Вышеуказанные ограничения стрептомицинсульфатного метода стимулировали поиск других способов удаления нуклеиновых кислот путем их высаждения, что учитывая простоту и возможность масштабирования, оставалось привлекательным приемом. Внимание было обращено на успешное использование полиэтиленimina (ПЭИ) для перевода нуклеиновых кислот в осадок в работах, посвященных выделению ферментов обмена нуклеиновых кислот [66]. Привлекательной стороной применения этого положительно заряженного полимера явилась устойчивость ДНК—ПЭИ комплекса в растворах высокой ионной силы, что снимает ограничения к вариации ее значений в довольно широком диапазоне.

В одной из первых работ [43], посвященных исследованию возможностей использования ПЭИ в опытах по выделению рестриктаз, было апробировано несколько вариантов его применения. Бикл с сотрудниками [43], с этой целью исследовали распределение 16-ти рестриктаз между осадком и супернатантом после добавления ПЭИ (1%) в бесклеточные экстракты при низкой ионной силе (в отсутствие соли) и содержащие 0,1 М NaCl. В последнем варианте во всех случаях в надосадочной жидкости была обнаружена рестриктазная активность. Высаждение нуклеиновых кислот из бесклеточных экстрактов при низкой ионной силе дало неоднозначные результаты. Только в некоторых случаях перехода рестриктаз в осадок их затем удавалось экстрагировать солевыми растворами. В случае рестриктазы Bgl I использование для экстракции даже 0,5 М забуференного раствора NaCl не дало положительного результата, что привело к полной потере фермента. Проблема была решена путем высаждения нуклеиновых кислот из бесклеточного экстракта *B. globigii*, содержащего 0,1 М NaCl. В этом варианте выполнения опыта Bgl I остался надосадочной жидкости. Бикл с соавт. [43], к сожалению, не привели данных о количественной стороне распределения целевых ферментов между осадком и жидкой фазой в разных вариантах использованного метода удаления нуклеиновых кислот, что не позволяет судить об эффективности этого приема в отношении выхода целевых ферментов. Такие исследования были проведены при разработке схемы очистки EcoR I [48, 263]. В частности Бингхам с соавт. [48] показали, что в присутствии 0,025 М NaCl в растворе остается 0,1% от суммарной активности EcoR I в бесклеточном экстракте. Повышение концентрации соли до 0,3 М позволяет обнаружить в надосадочной жидкости всю рестриктазную активность, а в случае 0,1 М — только 28%. При всех использованных концентрациях соли (0,025 М — 0,3 М) ДНК

практически полностью переходила в осадок, а около одной трети белков и одной пятой РНК оставались в растворе. Часть неспецифических нуклеаз при высаждении нуклеиновых кислот полиэтиленимином из растворов низкой ионной силы оставалась в растворе, что позволило на данной стадии добиться частичной функциональной очистки целевого фермента, полностью оказавшегося в осадке. На основе проведенных прелиминарных опытов была отработана методика сосаждения нуклеиновых кислот и рестриктазы EcoR I (0,1% ПЭИ, 0,025 NaCl) и последующей элюции фермента 0,3 М забуференным раствором NaCl, позволившая добиться двадцатикратной очистки целевого фермента с выходом, превышающим 70%.

В одновременно появившейся работе Сумеги с соавт. [263] подбор условий осаждения EcoR I и нуклеиновых кислот полиэтиленимином и последующей элюции целевого фермента тоже реализовался в аналогичных выходах и степени очистки указанной рестриктазы.

Не вызывает сомнений высокая эффективность полиэтилениминового метода в отношении высаждения нуклеиновых кислот. Однако, отмечены случаи, когда проведение такой процедуры не гарантирует последующей сорбции бесклеточного экстракта на ионитах из-за присутствия в них каких-то неидентифицированных интерферирующих этому процессу клеточных растворимых компонентов [43]. Выходом из создавшейся ситуации оказалось использование вместо ПЭИ стрептомицинсульфата или хроматографическое фракционирование грубых экстрактов на ДЭАЭц [43].

После проявления первых, цитированных выше работ, ПЭИ нашел применение в ходе очистки многих рестриктаз [13, 47, 68, 83, 85, 89, 90, 249, 262, 280, 290 и др.]. В этих опытах используются оба обсужденных выше, варианта осуществления эксперимента. При работе с большими объемами биомассы предпочтение отдается варианту, позволяющему разделить нуклеиновые кислоты и целевые ферменты уже на стадии высаждения первых [127, 198]. Это объясняется некоторыми трудностями экстракции сосажденных рестриктаз из объемистых осадков, трудно поддающихся суспендированию.

Эффективным, давно известным способом разделения нуклеиновых кислот и белков, является использование двухфазных водных систем [2]. Однако, примеры использования таких систем в работах, посвященных решению этой проблемы в случае выделения рестриктаз, немногочисленны [119, 179, 202, 298]. Предположительно это связано с необходимостью подбора условий проведения экспериментов, обеспечивающих избирательное распределение компонентов разделяемой смеси между фазами и некоторыми сложностями при переходе на последующую стадию очистки.

Вышеизложенные методы несомненно являются эффективными в отношении решения главной задачи этого этапа выделения ферментов рестрикции — разделения специфических эндонуклеаз и нуклеиновых кислот. Что же касается вопроса об эффективности этих процедур в отношении очистки целевого фермента, то обращение к литературным данным убеждает в практическом отсутствии соответствующих сведений.

Ранее обсуждался пример многократной очистки рестриктазы EcoR I после проведения стадии удаления нуклеиновых кислот при помощи ПЭИ [48, 263]. Скорее всего такая эффективность данной стадии в отношении очистки целевого фермента является исключением. Учитывая то, что фракционированию подвергается сложная смесь клеточных компонентов, содержащихся в грубых экстрактах, а используемые методы не являются избирательными, следует предположить, что в большинстве случаев достигается только эффективное удаление нуклеиновых кислот без сколько-нибудь значительной очистки рестриктаз. Поэтому те немногочисленные примеры работ, в которых приведены количественные данные относительно степени очистки рестриктаз обсуждаемыми способами [13, 127], не противоречащие выше указанному предположению, думается являются типичными.

Низкая эффективность вышеизложенных методов удаления нуклеиновых кислот в отношении очистки целевых ферментов и потенциальная возможность больших их потерь, а также некоторые методические трудности в подборе оптимальных условий проведения этих процедур послужили определенным стимулом для апробации возможности использования на этой стадии очистки рестриктаз хроматографических подходов.

3.2.2. Хроматографические методы разделения нуклеиновых кислот и рестриктаз

Применение хроматографических методов разделения нуклеиновых кислот и специфических эндонуклеаз основано на использовании с этой целью их разницы в молекулярных весах, значений и величин заряда. Учитывая определенную избирательность используемых с этой целью хроматографических материалов и то, что большая часть процессов по разделению нуклеиновых кислот и специфических эндонуклеаз осуществляется в одной стадии в колоночном режиме, следовало бы ожидать совмещения решения вышеуказанной задачи с определенной как функциональной, так и абсолютной очисткой рестриктаз от сопутствующих примесных нежелательных активностей и белков.

Наиболее простым хроматографическим приемом разделения нуклеиновых кислот и рестриктаз следует признать гель-фильтрацию бесклеточного экстракта. Эта процедура примени-

ма практически во всех случаях без предварительного подбора условий проведения эксперимента. Гельфильтрация обычно проводится на биогеле А — 0,5 м в растворах, содержащих 1 М NaCl [31, 62, 92, 104, 152, 166, 218—220, 224, 225, 267, 276, 289, 297 и др.]. В последнее время появились сообщения об использовании с этой целью сефакрила S—200 [47, 253], сефарозы 2В [180] или 6В [294, 295], а сам процесс иногда проводится при более низких концентрациях (0,2 М — 0,5 М) соли [46, 47, 180]. Обычно на колонки наносятся относительно большие объемы грубых экстрактов, составляющие 4—8% [151, 166, 180, 209, 219, 225 и др.] и даже больше 10% [92, 156, 253 и др.] от общего объема фракционирующего геля. Эти объемы превышают оптимальные (1—2%), обеспечивающие реализацию эффективной разделительной хроматографии [94]. Поэтому гельфильтрацию в указанном исполнении следует рассматривать как процедуру, направленную в первую очередь на разделение нуклеиновых кислот и рестриктаз. В связи с этим не следует ожидать высокой степени очистки целевых ферментов. В литературе практически отсутствуют количественные данные, документирующие обсуждаемые показатели в опытах по выделению рестриктаз. В случае Bsp I прирост удельной активности фермента после проведения гельфильтрации грубого экстракта *V. sphaericus* в типичных для таких опытов условиях составил 1,6 раза [152]. Более высокая степень очистки была достигнута после проведения разделительной хроматографии грубых экстрактов, содержащих рестриктазы Dpn I или Dpn II, которая равнялась 13-ти и 4-х кратной соответственно [159]. В последнем случае хроматография осуществлялась в условиях, оптимальных для фракционирования компонентов анализируемой смеси (объемы грубых экстрактов составили менее 0,5% от объема колонки, заполненной Биогелем А—0,5 м). Однако, такой вариант исполнения гельфильтрации в опытах по выделению рестриктаз является исключением. Поэтому в типичных условиях, принятых в опытах по разделению нуклеиновых кислот и специфических эндонуклеаз, не следует ожидать эффективности очистки последних, значительно отличающейся от таковой, наблюдавшейся в случае Bsp I [152].

Обсуждаемому способу удаления нуклеиновых кислот характерен ряд недостатков. Гельфильтрация практически применима при работе с небольшими количествами биомассы. Высокая ионная сила в этих опытах применяется с целью диссоциации комплекса нуклеиновых кислот и рестриктаз. Однако, в этих условиях диссоциируют и неспецифические нуклеазы, которые, учитывая специфику осуществления экспериментов по отделению нуклеиновых кислот методом гельфильтрации, ориентированных на грубое фракционирование, могут в значительной мере загрязнять целевые ферменты. О низком уровне очистки в таких опытах вообще говорилось выше.

Несмотря на вышеуказанные недостатки, разделительная хроматография как способ отделения нуклеиновых кислот от рестриктаз нашла довольно широкое применение, особенно на первых порах развития работ по очистке специфических эндонуклеаз [218, 219, 225, 253, 271 и др.].

Учитывая большую разницу в величине заряда белков (рестриктаз) и нуклеиновых кислот в общем случае и его знака в некоторых условиях, вполне понятным является привлечение для решения задачи разделения указанных компонентов ионов. В одной из первых работ применения с этой целью сорбентов, содержащих ионогенные группы, был использован ГАП [253], на который путем непродолжительного перемешивания с грубыми экстрактами ряда продуцентов из рода *Naemophilus* сорбировали рестриктазы и нуклеиновые кислоты. Фракционное промывание сорбента порциями элюирующих растворов повышающейся ионной силы позволило добиться отделения нуклеиновых кислот от целевых ферментов и достичь более чем десятикратной очистки последних. Однако, этот прием в дальнейшем не получил распространения, так как для решения обсуждаемых задач были подобраны более удобные в работе сорбенты. В качестве такого, хотя и редко, используется анионит ДЭАЭц.

Процедура разделения нуклеиновых кислот и рестриктаз с использованием ДЭАЭц проводится в двух вариантах: 1) при значениях ионной силы, исключающих задерживание на сорбенте целевого фермента и не препятствующих сорбции на нем нуклеиновых кислот — в условиях, обеспечивающих разделение целевых ферментов и нуклеиновых кислот уже во время контакта грубых экстрактов с анионитом; 2) в условиях, когда оба компонента связываются анионитом и их разделение осуществляется при последующей элюции с колонки.

Примеры применения ДЭАЭц для удаления нуклеиновых кислот в первом методическом варианте немногочисленны [58, 252, 288]. В случае рестриктазы *Bsu* I, грубые экстракты пропускали через колонку с указанным сорбентом при повышенной ионной силе (0,3 М KCl) [58]. Целевой фермент был обнаружен в несорбировавшейся фракции. Нуклеиновые кислоты в указанных условиях проведения эксперимента оказались связанными с сорбентом. Разделение нуклеиновых кислот и рестриктаз *Xog* I и *Xog* II при помощи ДЭАЭц осуществлялось в присутствии 0,25 М KCl [288]. После перемешивания суспензии ДЭАЭц в бесклеточном экстракте в течение 2,5 часов происходила полная сорбция ДНК. Целевые ферменты и незначительная часть РНК в этих условиях оставались в растворе.

Несколько больше примеров работ, по сравнению с вышеуказанными, в которых применение ДЭАЭц не ограничивалось удалением нуклеиновых кислот из бесклеточных экстрактов. Взаимодействие необработанных грубых экстрактов [38, 178]

или грубых экстрактов, частично очищенных высаливанием [95, 125, 188, 248], с анионитом в условиях низкой ионной силы реализовывалось в связывании на ДЭАЭц не только нуклеиновых кислот, но и рестриктаз. Последующая элюция колонки растворами повышающейся концентрации соли позволил совместить хроматографическую очистку целевых ферментов со стадией удаления нуклеиновых кислот. В какой мере достигалась последняя цель судить трудно, так как соответствующие данные в цитированных выше работах не приводятся. Опасность хотя бы частичного перекрывания профилей элюции рестриктаз и нуклеиновых кислот реально существует. Так, например, наблюдалась совместная десорбция с ДЭАЭц рестриктазы EcoR I и нуклеиновых кислот при 0,65 М концентрации NaCl [48]. Цитированная работа содержит данные о том, что рестриктаза EcoR I, сорбированная на ДЭАЭц из растворов, не содержащих нуклеиновых кислот, элюируется при 0,1 М концентрации NaCl. Таким образом, связанные с анионитом нуклеиновые кислоты могут влиять на ход хроматографического фракционирования рестриктаз. В общем случае это вряд ли является желательным, так как содержание нуклеиновых кислот и их распределение по молекулярным весам в грубых экстрактах или частично очищенных высаливанием препаратах являются трудно поддающимися стандартизации показателями. Вариация в содержании и полимерности нуклеиновых кислот от опыта к опыту может найти отражение в доле связываемого с ними целевого фермента, что может обусловить невоспроизводимость экспериментов. Наверно неслучайно в ряде случаев применению ДЭАЭц предшествовала очистка бесклеточных экстрактов путем их высаливания [95, 125, 188, 248 288], что было призвано способствовать улучшению хроматографического фракционирования целевых ферментов. Думается, что именно потенциально возможная невоспроизводимость и неоднозначность применения ДЭАЭц для разделения нуклеиновых кислот и рестриктаз сыграла определенную роль в довольно редком применении этого сорбента для достижения вышеуказанных целей.

ДЭАЭц связывает нуклеиновые кислоты за счет своих анионообменных групп. Как уже отмечалось, это приводит в некоторых вариантах выполнения опытов к одновременной сорбции на ионите как нуклеиновых кислот, так и целевых ферментов, что в принципе не исключает их взаимного загрязнения в ходе хроматографического фракционирования. Этим недостатком не обладают катиониты, в принципе неспособные связывать нуклеиновые кислоты за счет электростатических взаимодействий.

Одним из таких катионитов, используемых для совмещения стадии удаления нуклеиновых кислот и хроматографического фракционирования рестриктаз, является фосфоцеллюлоза

(ФРІІ), впервые апробированная с этой целью Грин с соавт. [109]. Ими на примере большой группы рестриктаз, выделяемых из 13 штаммов различной таксономической принадлежности, была продемонстрирована сорбция на ФРІІ всех исследованных ферментов их грубых экстрактов, содержащих 0,1 или 0,2 М NaCl. Применение повышенной ионной силы в этих опытах было призвано разрушить комплекс нуклеиновые кислоты—рестриктазы и тем самым способствовать сорбции последних на ФРІІ. Последующая отмывка колонки исходным раствором дала гарантированное удаление нуклеиновых кислот, а элюция градиентом концентрации соли—эффективную очистку связанных ионитом целевых ферментов. Казалось бы появление указанной работы, столь наглядно демонстрирующей высокую эффективность проведения стадии разделения нуклеиновых кислот и рестриктаз, совмещенной с последующим хроматографическим фракционированием последних, должно было вызвать ценную реакцию по широкому применению этого метода. Однако этого не произошло, хотя и имеется немало примеров успешного использования этого приема для очистки ряда рестриктаз: Rsr II [194], Cfr13 I [50], Fok I и Mlu I [260], Kpn I [17], EcoR V [80], Dde I [172], Cfr I [133], Cfr4 I и Cfr11 I [30] и Cfr10 I [132]. В случае пяти рестриктаз сорбция целевых ферментов из бесклеточных экстрактов осуществлялась из буферных растворов, не содержащих солей, а в случае получения рестриктаз Sna I [201] и Mne I [57], а также гомогенных препаратов BamH I [254] и Mva I [29]—растворы содержали пониженные или повышенные (0,04 М, 0,1 М и 0,08 М и 0,3 М соответственно) концентрации NaCl по сравнению с таковой (0,2 М), использованной в работе Грин с соавт. [109]. Причины, вызвавшие применение указанных модификаций метода Грин с соавт. [109], в цитированных статьях за одним исключением не обсуждаются. Однако, сам факт возможности (или необходимости) проведения этой стадии в растворах различной ионной силы обращает внимание на влияние значений обсуждаемого фактора на достижение поставленной цели. Упомянутое исключение относится к RMva I, для которой было определено, что оптимальная концентрация в отношении сорбции фермента из грубых экстрактов на РІІ находится в интервале 0,2—0,5 М NaCl и показано, что фермент не связывается с РІІ в отсутствии соли [29].

Имеются немногочисленные примеры применения для разделения нуклеиновых кислот и другого сорбента, содержащего катионообменные группы в составе лиганда цибакона синего F3GA—голубой сефарозы, впервые примененной с этой целью Бекси с соавт. [32], для очистки четырех рестриктаз: BamH I, Pst I, Xho I и Bgl I+II. В этих опытах грубые экстракты продуцентов указанных ферментов наносили на сорбент при низкой ионной силе. Нуклеиновые кислоты и значительная часть

неспецифических нуклеаз не задерживались голубой сефарозой, что позволило согласно утверждению авторов при последующей элюции градиентом концентрации соли получить довольно высокоочищенные препараты вышеуказанных ферментов, пригодных для специфического фрагментирования ДНК. Авторами цитированной работы было выдвинуто логичное предложение о приемлемости разработанной процедуры и в случае проведения первой стадии очистки других рестриктаз. Однако этот прогноз был подтвержден в единичных опытах [18] и обсуждаемый метод разделения нуклеиновых кислот и целевых ферментов распространения не получил. Возможно, что причиной этому является низкая емкость голубой сефарозы к рестриктазам, сорбируемым из грубых экстрактов [102], а также необходимость вести сам процесс из растворов низкой ионной силы [32]. Последнее условие вносит определенные ограничения на использование голубой сефарозы для обсуждаемых целей.

В завершение обсуждения методических приемов, используемых для разделения нуклеиновых кислот и рестриктаз, хотелось бы обратить внимание на некоторые вопросы. Взаимодействие рестриктаз и нуклеаз — основных интересующих исследователя компонентов грубого экстракта, с нуклеиновыми кислотами, вносит ощутимый вклад в результаты экспериментов. Использование высокой ионной силы позволяет исключить этот фактор в случае гельфильтрации и высаживания нуклеиновых кислот при помощи ПЭИ. Однако в этих условиях в общем случае должен наблюдаться переход во фракцию, содержащую рестриктазы, неспецифических нуклеаз. Поэтому, если цель эксперимента сводится не просто к разделению нуклеиновых кислот и рестриктаз, а к определенной функциональной очистке целевого фермента, более привлекательным является использование таких приемов, которые позволяют варьировать ионную силу. Перспективным в этом отношении является применение катионитов. При взаимодействии грубых экстрактов с катионитами нуклеиновые кислоты в общем случае должны оказаться в несорбированной фракции. Проведение процесса в условиях низкой или умеренной ионной силы призвано обеспечить удаление вместе с нуклеиновыми кислотами и определенной части неспецифических нуклеаз. Хотя это специально и не оговорено, данные об эффективной функциональной очистке более десяти рестриктаз по схеме, разработанной Грин с соавт. [109], прошедших, вслед за стадией фракционирования грубых экстрактов на ФРП, хроматографию на ГАП, косвенно подтверждает это предположение.

Одним из путей реализации потенциальных возможностей хроматографических способов, позволяющих совместить в одной стадии гарантированное отделение нуклеиновых кислот и высокоэффективную очистку целевых ферментов, видится во введе-

нии в практику препаративной биохимии рестриктаз новых избирательных в этом отношении сорбентов. В результате проведенных исследований была продемонстрирована эффективность и перспективность применения для обсуждаемых целей гепаринсефарозы [30, 111, 196].

Удаление нуклеиновых кислот в некоторых случаях сопровождается заметной функциональной очисткой целевых ферментов [32, 109, 263]. Однако, по вполне понятным причинам выделение рестриктаз на этом этапе не завершается и для получения препаратов заданного уровня чистоты необходимо использование дополнительных приемов. Они будут рассмотрены в следующем разделе.

3.3. Методы, используемые для очистки рестриктаз

Во многие схемы очистки рестриктаз вводится стадия высаливания белков сернокислым аммонием. С применением этой процедуры решаются многие задачи: очистка, концентрирование разбавленных растворов, отделение рестриктаз от СС и ПЭИ. Так Муррей с соавт. [188] подобрали условия эксперимента, позволяющие разделить на этой стадии рестриктазы Ava I и Ava II, выделяемые из одной биомассы, которые переходили в осадок при 20—40% и 50—70% насыщении бесклеточного экстракта *A. variabilis* сернокислым аммонием соответственно. Примером другого варианта фракционирования высаливанием является работа Модрича и Забелы [184], где была использована экстракция белкового осадка, полученного при 70% насыщении грубого экстракта *E. coli* RY13 солью, растворами со ступенчато понижающейся концентрацией сернокислого аммония. В результате проведения такой процедуры удалось повысить удельную активность целевого фермента в 2,7 раза. Фракционное высаливание белков нашло применение в схемах очистки многих рестриктаз [74, 98, 115, 118, 140, 142, 152, 173, 235, 247, 248, 296 и др.].

Высаливание часто применяется для концентрирования разбавленных растворов, содержащих рестриктазы, что может оказаться актуальным после проведения стадии удаления нуклеиновых кислот с использованием гельфильтрации [113, 152, 159, 218, 253 и др.]. В этих условиях обычно используются высокие концентрации сернокислого аммония, обеспечивающие полноту высаживания целевых ферментов, что, однако, исключает их очистку. Применение такого же варианта высаливания распространено в опытах, преследующих цель разделить рестриктазы и преципитирующие агенты [85, 89, 91, 142, 167, 186, 249, 262, 290, 291 и др.], которые могут интерферировать качественному проведению последующей хроматографической стадии (особенно на катионитах, связывающих СС и ПЭИ). Иногда удаление указанных агентов совмещается с очисткой

целевых ферментов. В таких случаях применяется фракционное высаливание [20, 23, 74, 243, 247, 299 и др.].

Во всех вариантах проведения высаливания (за исключением экстракции белковых осадков растворами серноокислого аммония) в разных экспериментах, преследующих различные цели, достигается концентрирование разбавленных растворов рестриктаз, что является удобным при переходе к хроматографическим стадиям очистки.

Наиболее эффективным и распространенным способом очистки является хроматографическое фракционирование. Характерной чертой использования этого приема для очистки рестриктаз является то, что решение задачи получения функционально очищенных препаратов этих ферментов достигается путем применения ограниченного круга сорбентов. Наряду с «традиционными» сорбентами — ДЭАЭц, ФРИ, ГАП, карбоксиметилцеллюлозой и носителями для гельфильтрации для очистки специфических эндонуклеаз в настоящее время используются и сорбенты, для которых предполагается участие в связывании рестриктаз не только ионных, но и гидрофобных и аффинных взаимодействий. В отношении последних двух типов взаимодействия следует отметить, что они во многих случаях только постулированы, но не доказаны соответствующими экспериментами. Тем не менее, апробация новых сорбентов для очистки рестриктаз дала положительные результаты.

По вполне понятным причинам при поиске аффинных сорбентов внимание в первую очередь было обращено на субстрат рестриктаз — ДНК. В ряде случаев для очистки этих ферментов была использована колонка с одонитовой ДНК-агарозой, приготовленной смешиванием расплавленной горячей агарозы с денатурированной дезоксирибонуклеиновой кислотой тимуса теленка по методу Шеллера с сотр. [236]. Предполагалось [217], что с сорбентом преимущественно будут связываться неспецифические нуклеазы, а рестриктазы, субстратом которых является нативная ДНК, окажутся во фракции несорбированных белков. Для некоторых рестриктаз это предположение, согласно утверждению Робертса [217], оправдалось и была получена хорошая их очистка. Наряду с этим было обнаружено, что некоторая часть исследованных специфических эндонуклеаз достаточно прочно связывалась с одонитовой иммобилизованной ДНК и элюировалась градиентом соли острыми пиками. В этом случае тоже наблюдалась значительная очистка этих ферментов от неспецифических нуклеаз. Хроматография на одонитовой ДНК, иммобилизованной на агарозе или целлюлозе, была применена на последней стадии очистки рестриктаз Hha I [174], Bsp I [152] и EcoR I [184]. В качестве сорбента для очистки специфических эндонуклеаз нашла применение и нативная ДНК, иммобилизованная на полиакриламидном геле или целлюлозе, которые были использованы в случае Bsu I [58] и Bbe I

[146] соответственно. В тех случаях, когда приводятся данные о степени очистки, достигаемой при хроматографическом фракционировании на ДНК сорбентах, они убеждают в высокой эффективности этой стадии в отношении очистки рестриктаз [158, 152].

Применение ДНК-сорбентов до сих пор носило эпизодический характер. Это было вполне объяснимо, учитывая необходимость их приготовления в лаборатории и нестабильность, что ограничивает повторное их использование. В последнее время фирмой «Фармация» налажен выпуск ДНК-сефарозы, которая согласно рекламе допускает многократное применение. Возможно этот факт сыграет определенную роль в более широком использовании ДНК-сорбента в препаративной биохимии рестриктаз.

Предпосылкой для использования гепарина в качестве лиганда для очистки специфических эндонуклеаз послужили сведения об его ингибирующем действии на ряд ферментов, взаимодействующих с ДНК [75, 257]. Первым в практику препаративной биохимии рестриктаз гепарин, связанный с сефарозой, ввели Бикл с соавт. [43], продемонстрировавшие его эффективность в ходе выделения 16-ти ферментов.

Гепаринсефароза (ГС), по мнению авторов, имеет ряд положительных характеристик. Сорбент стабилен, легко регенерируется, может быть использован многократно, обладает хорошими проточными свойствами и высокой емкостью, что позволяет использовать колонки небольшого объема. К положительным свойствам ГС следует отнести и то, что согласно наблюдениям указанных исследователей, часть не специфических эндонуклеаз из бесклеточных экстрактов, полученных после удаления нуклеиновых кислот, или не связывалась с гепаринсефарозой, или элюировались преимущественно при более низкой ионной силе чем рестриктазы.

ГС является одним из немногих «аффинных» сорбентов, для которого была исследована природа взаимодействия с рестриктазами. Данные Имбера и Бикла [128] и Гинша с сотр. [120], которые установили, что рестриктазы Bgl II и BamH I конкурентно ингибируются гепарином, не противоречат предположению о биоспецифической сорбции по меньшей мере некоторых специфических эндонуклеаз на ГС.

После появления статьи Бикла с соавт. [43] ГС нашла широкое применение в схемах очистки многих рестриктаз [30, 91, 118, 130, 140, 142, 145, 146, 173, 196, 248, 249, 262, 289, 293 и др.].

В качестве лигандов для связывания рестриктаз были апробированы краситель цибакрон F3GA [32, 102], содержащий три сульфо-группы и сополимер пирана [102], представляющий собой дивиниловый эфир малеинового ангидрида, который в водных растворах гидролизует с образованием соответствующей

поликарбоксылльной кислоты, иммобилизованные на агарозе. Имеются указания, что оба эти соединения ингибируют активность рестриктаз [102]. Их структура (ароматические кольца, отрицательно зараженные группы) в какой-то мере может быть принята как имитирующая ДНК. С использованием этих сорбентов была продемонстрирована эффективная очистка ряда рестриктаз, сорбируемых непосредственно из неочищенных грубых экстрактов на голубой сефарозе [32] или на обоих обсуждаемых сорбентах после проведения стадии удаления нуклеиновых кислот [102]. В первом случае удается совместить стадию удаления нуклеиновых кислот и последующую хроматографическую очистку целевых ферментов. К недостаткам голубой сефарозы и пирансефарозы следует отнести их низкую емкость по отношению к целевым ферментам, содержащихся в неочищенных препаратах [102].

Несмотря на довольно убедительные данные [102] об эффективности применения вышеуказанных сорбентов для очистки ряда рестриктаз, они практически не получили распространения в этой области препаративной биохимии ферментов. Хроматографическое фракционирование на голубой сефарозе было включено как одна из стадий очистки рестриктаз Mga I [289] Cfl I, Gal I и Gce I [121] и при получении гомогенных препаратов Pal I [33] и Mva I [29]. Пиран сефароза нашла применение в ходе выделения функционально очищенных Nsp рестриктаз из *Nostoc PCC7524* [211].

Хроматографическая очистка, основанная на истинной биоспецифической аффинности исключительно к выделяемому белку, достигается при использовании иммуносорбентов. В литературе описано применение такого сорбента для очистки рестриктазы EcoR I [9]. Авторы этой работы проводили сорбцию фермента на колонке с антителами к EcoR I, иммобилизованными на сефарозе 4B, непосредственно из бесклеточных экстрактов. В результате последующей элюции в одну стадию удалось получить гомогенный препарат фермента. Широкому применению иммуносорбентов препятствует то, что для иммунизации необходимо располагать гомогенными препаратами рестриктаз.

В завершении обсуждения применения для очистки рестриктаз сорбентов, для которых или предполагается, или действительно реализуется биоспецифическая сорбция, хотелось бы обратить внимание на ФР II. В общем случае она представляет собой катионит, содержащий присоединенные к глюкозным остаткам целлюлозы фосфогруппы. В этом отношении этот сорбент в какой-то мере имитирует углеводно-фосфатный остов ДНК. Вопрос о движущей силе взаимодействия рестриктаз с этим сорбентом не исследован. Однако известные факты о сильном связывании фосфоцеллюлозой рестриктаз, являющихся кислыми белками, при значениях pH, значительно превышающих их изоточку [74, 120, 184, 196, 254] склоняют к предположению

об определенной роли биоспецифического взаимодействия в связывании рестриктаз с этим сорбентом.

Примеры реализации истинной гидрофобной хроматографии в ходе очистки рестриктаз, выражающейся в десорбции ферментов, связанных при высокой ионной силе, в условиях понижения концентрации солей в элюирующих растворах, немногочисленны.

В качестве гидрофобного сорбента в случае получения гомогенного препарата Bgl I [163] и функционально очищенных препаратов EcoCK I [27] и Sso47 II [18] была использована фенолсефароза. Элюция проводилась линейно понижающейся концентрацией сернистого аммония. Использованная для очистки ряда рестриктаз [31, 100, 254, 303] w-аминопентилсефароза не может рассматриваться как гидрофобный сорбент, так как связывание целевых ферментов происходило только при пониженной ионной силе, а десорбция — при ее повышении. Дополнительным доводом в пользу этого утверждения являются сведения о характере взаимодействия Bgl I с фенолсефарозой [163] и w-аминопентилсефарозой [138], которое было гидрофобным в первом случае и ионообменным во втором.

Сведения о возможном участии гидрофобных взаимодействий с углеродной частью w-аминопентилсефарозы в хроматографическом фракционировании рестриктаз, описанном в цитированных выше работах, отсутствуют. Таким образом, аминопентилсефарозу можно рассматривать как второй (после ДЭАЭц) анионит, используемый для очистки ферментов рестрикции, что расширяет возможности варьирования процедур выделения целевых ферментов.

В большинстве случаев для получения функционально очищенных препаратов рестриктаз необходимо проведение 2—4 стадий очистки, в том числе 1—3 хроматографических. Некоторые схемы выделения оказались приемлемыми для выделения многих рестриктаз. Среди таких можно отметить схемы, включающие стадию удаления нуклеиновых кислот гельфильтрацией или путем их высаживания при помощи СС или ПЭИ, высаливание сернистым аммонием (не во всех случаях) и последовательную хроматографию на ФРП и ДЭАЭц в указанном или обратном порядке [28, 62, 89, 90, 92, 98, 104, 122, 156, 164, 166, 167, 180, 186, 218, 219, 220, 224, 225, 247, 262, 265, 271, 294, 296, 297 и др.]. Включение в схемы выделения наряду с указанными ионитами или вместо одного из них ГС [43, 44, 68, 85, 91, 130, 145, 173, 249, 262, 282, 293 и др.] или ГАП [17, 23, 38, 88, 105, 202, 203, 209, 288 и др.] еще более расширяет список рестриктаз, очищенных с использованием ограниченного набора сорбентов. Реже в схемы очистки включается карбоксиметилцеллюлоза [106], ДНК-агароза/целлюлоза [58, 146, 174], w-аминопентилсефароза [31, 100, 303], фенолсефароза [18, 27], голубая сефароза [18, 32, 102, 211, 289], гельфильтрация с использованием се-

фадексов [9, 46, 172] и других носителей, предназначенных для разделительной хроматографии [47, 52, 126, 238, 243, 290].

Несмотря на общность приведенных выше схем очистки многих рестриктаз, она является в большей степени кажущейся, чем действительной. Это связано с тем, что в каждом конкретном случае необходим индивидуальный подход, выражающийся в подборе условий проведения той или иной стадии и выборе последовательности их применения. Вместе с тем по ходу развития работ по очистке рестриктаз выявилась тенденция создания именно унифицированных (универсальных) схем, пригодных для выделения многих рестриктаз без предварительного подбора условий проведения отдельных стадий и их последовательности. Иначе говоря, по тем или иным соображениям выбирается схема и проверяется ее пригодность для очистки ряда рестриктаз. Первыми этот подход реализовали Бикл с соавт. [43]. Их схема включала обработку бесклеточного экстракта ПЭИ в присутствии 0,1 М NaCl, последующее высаливание белков 70% насыщением раствора серноокислым аммонием, диализ и хроматографическое фракционирование на ГС (градиентная элюция 0,0—1 М NaCl). Применение такой процедуры, согласно утверждению авторов, позволило получить препараты большинства из 16-ти исследованных рестриктаз, по уровню функциональной чистоты пригодные для опытов по физическому картированию, а в некоторых случаях и для секвенирования ДНК.

В 1978 г. Грин с соавт. [109] предложил методику очистки рестриктаз, включающую последовательное хроматографическое фракционирование на ФРП и ГАП. Бесклеточный экстракт на первый сорбент наносили без предварительного удаления нуклеиновых кислот. После проведения очистки по обсуждаемой схеме в 13-ти случаях из 16-ти испытанных были получены функционально очищенные препараты исследуемых ферментов, пригодных для использования в качестве аналитических реагентов.

Для получения аналогичных препаратов трех остальных ферментов оказалось необходимым ввести дополнительную стадию очистки, заключающуюся в хроматографии на катионите Биорекс 70.

К попыткам создания унифицированной схемы очистки рестриктаз можно отнести и работу Бекси [32], апробировавших с этой целью прямое фракционирование бесклеточных экстрактов четырех продуцентов рестриктаз различной таксономической принадлежности на голубой сефарозе. Однако, эффективность этого метода была продемонстрирована на небольшой группе рестриктаз и для определения его универсальности необходимы дополнительные исследования.

Все три обсуждаемые схемы выделения были апробированы в трех лабораториях, их разработавших. К сожалению, они не

нашли широкого распространения и поэтому трудно судить о границах их применения, которые несомненно существуют.

Рассмотрение литературных данных позволило выявить еще ряд схем очистки, которые применялись с незначительными вариациями условий проведения отдельных стадий очистки многих рестриктаз. Одной такой схемой является гельфильтрация грубого экстракта на Биогеле А—0,5 м и последовательная хроматография на ДЭАЭц и ФРП, эффективность которой документирована по меньшей мере в случае очистки 9 рестриктаз: *Atu I* [225], *Xma I* и *Xma II* [92], *Pvu II* [104], *Nha I* [220], *Xma III* [156], *Ara I* [240], *Atu B VI* [224] и *Sfa I* [297]. В аналогичной другой схеме был изменен порядок использования вышеуказанных ионитов. По этой схеме (гельфильтрация на Биогеле, последовательная хроматография на ФРП и ДЭАЭц) были очищены следующие ферменты: *Alu I* [219], *FnuD I*, *FnuD II* [166], *FnuH I* [164] и *HgiA I* [62]. Для очистки рестриктаз *Hinf I* [271], *Hind II* [253], *Hae III* [218], *BamH* [113] и *Hph I* [151] была применена схема: гельфильтрация на Биогеле А—0,5 м, высаливание сернокислым аммонием и хроматографическое фракционирование на ФРП.

При осуществлении некоторых стадий каждой из указанных схем условия проведения экспериментов незначительно варьировали. Если допустить, что эти вариации не являются существенными, то можно предположить их универсальный характер в том смысле, в каком этот термин принят в контексте настоящего обсуждения.

Очевидно, что создание истинно универсальных схем, пригодных для выделения многих рестриктаз, на данном методическом уровне препаративной биохимии белковых соединений является нереальной задачей. Однако, работы по апробации схем очистки, пригодных для выделения хотя бы групп рестриктаз, следует отнести к прогрессивным тенденциям препаративной биохимии этих ферментов. Их разработка и применение призвано способствовать выбору схем очистки новых рестриктаз, выявлению общностей и различий в хроматографическом поведении этих ферментов, что имеет не только теоретическое, но и практическое значение.

3.4. Возможные перспективные направления развития препаративной биохимии рестриктаз

3.4.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Учитывая большой и все нарастающий ассортимент ферментов рестрикции, перманентный поиск и выделение все новых рестриктаз, является очевидным, что усовершенствованию методов их выделения постоянно уделяется внимание. Появление методов высокоэффективной жидкостной хроматографии

(ВЭЖХ) и сорбентов, адаптированных к очистке нативных белков, тоже не осталось без внимания. Общеизвестно, что для ВЭЖХ характерна непревзойденная разделяющая способность и быстрота проведения хроматографического цикла. Препаративная биохимия ферментов рестрикции в большинстве случаев (особенно в случае выделения препаратов новых ферментов для определения их специфичности) характеризуется мелкомасштабностью. Вышеизложенное, казалось бы указывало на исключительную перспективность применения ВЭЖХ для очистки рестриктаз. Однако, примеров этому пока немного. Три рестриктазы (Bap II, Sac I и Sph I) были очищены в двухстадийной схеме, где на втором этапе была использована Моно Q колонка в режиме ВЭЖХ [56]. На первой стадии, согласно предложенной методике, ферменты подвергались хроматографическому фракционированию в режиме обычной жидкостной хроматографии, на разных для различных ферментов сорбентах. Разработанные схемы очистки были более простыми по сравнению с существовавшими для исследованных ферментов. Вместе с тем следует отметить, что к сожалению, в рассматриваемой публикации [56] не приводятся данные об относительных выходах рестриктаз на стадии ВЭЖХ, т. е. отсутствуют данные о потерях, что является немаловажной информацией, необходимой для оценки перспективности широкого применения тех или иных приемов выделения и очистки ферментов.

В последнее время в литературе появилось еще несколько примеров применения ВЭЖХ для очистки рестриктаз [204, 205]. Колонки Моно Q, Моно S, Polyagion SI фирмы «Фармация» использовались на последних стадиях очистки. Количественные данные характеризующие эффективность этих стадий в рассматриваемых публикациях отсутствуют.

Несмотря на немногочисленность публикаций документирующих применение ВЭЖХ для выделения рестриктаз, думается, что этот вариант хроматографии со временем займет подобающее ему место в этой области препаративной биохимии. Во многом это будет зависеть от разработки новых сорбентов. Вместе с тем уже сейчас имеющиеся данные о возможности за 20 мин хроматографии на колонке Моно Q получить 1—10 тыс. ед. высокоочищенного фермента [56] должно было бы привлечь внимание исследователей, особенно занятых опытами по выделению и характеристике новых ферментов, где важно кратчайшим путем получить несколько сот единиц рестриктазы, пригодной по качеству для определения ее субстратной специфичности.

3.4.2. Новые методические подходы к разработке схем очистки

В тексте в основном шла речь о компоновке схем очистки рестриктаз, т. е. о том какие стадии и сорбенты и в какой последовательности применяются в конкретных случаях. Актуаль-

ным является вопрос о путях подбора схем очистки (особенно в части, касающейся хроматографических стадий), которые в общем случае должны быть идентифицированы для каждого фермента. Несмотря на довольно большой объем публикаций посвященных вопросам выделения и очистки рестриктаз, часть из которой была рассмотрена в настоящем разделе, данные о том как были подобраны схемы очистки в них практически отсутствуют. Поэтому приходится предполагать, что разработчики следуют общепринятой практике препаративной биохимии белков — т. е. путем эмпирического подбора находят сорбенты, последовательность их использования и условия проведения процесса. Для этого необходимо в режиме колоночной хроматографии апробировать пригодность выбранных сорбентов в различных условиях сорбции и элюции. Эти процедуры продолжительны, а разработанные схемы очистки часто включают этапы в той последовательности в какой они были испытаны, без рассмотрения других возможных вариантов ее решения.

Другой подход, заключающийся в изучении взаимодействия ферментов с сорбентами в статических условиях (в пробирке), иногда используемый при отработке схем очистки ферментов, не должен обладать перечисленными недостатками. В литературе имеется публикация, посвященная апробации этого подхода в случае разработки схем очистки рестриктаз [29]. Полученные результаты свидетельствуют, что предварительные исследования в статических условиях занимают по сравнению с колоночной хроматографией значительно меньше времени. Кроме того применение статического метода позволяет установить диапазон и характер влияния различных факторов (например, ионной силы) на связывание, что дает возможность предсказать условия проведения колоночной хроматографии. В результате за краткое время удается апробировать ряд сорбентов, выбрать среди них наилучшие в отношении очистки и выхода целевого фермента и прогнозировать условия элюции в режиме колоночной хроматографии. Принципиальным различием между схемами разработанными путем их конструирования на основе предварительных опытов проведенных в колоночном режиме и в статических условиях является то, что в последнем случае, благодаря нетрудоемкости предварительных опытов, реальным является разработка именно оптимальных схем очистки — оптимальных в отношении спектра выбранных сорбентов, их числа и последовательности применения.

3.5. Выделение гомогенных препаратов рестриктаз

Гомогенные препараты рестриктаз в первую очередь необходимы для исследований, посвященных изучению их энзиматических и физико-химических свойств, а также структурных особенностей. Исключительно перспективным является использо-

вание специфических эндонуклеаз — относительно просто организованных белков, отличающихся высокой избирательностью взаимодействия с субстратом, для изучения одной из кардинальных проблем современной молекулярной биологии — механизмов белок-нуклеинового узнавания. Несмотря на очевидную актуальность вышеуказанных исследований, выделению гомогенных препаратов рестриктаз долгое время уделялось значительно меньше внимания, чем вопросам получения функционально очищенных препаратов. Это наглядно иллюстрируется следующим соотношением: из более чем 1000 охарактеризованных рестриктаз, в литературе удалось обнаружить сведения только о 22 ферментах, выделенных в гомогенном состоянии.

С технологической точки зрения процедура выделения гомогенных препаратов в общем случае является более сложной задачей, чем задача получения функционально очищенных ферментов. Для достижения поставленной цели вынужденным является расширение арсенала методических приемов, используемых как в процессе очистки, так и для количественной оценки стадий выделения. Поэтому развитие исследований по выделению гомогенных препаратов рестриктаз следует рассматривать и как «полигон», где отрабатываются новые методические подходы к очистке указанных ферментов, что, несомненно, вносит вклад и в развитие работ по получению функционально очищенных препаратов рестриктаз.

В области препаративной биохимии рестриктаз практически только в случае выделения гомогенных препаратов этих ферментов описание схем очистки сопровождается количественными данными, позволяющими оценить эффективность отдельных стадий и выход целевого продукта. Приложение усилий для получения таких сведений в определенной степени диктуется и необходимостью подбора эффективных стадий, обеспечивающих получение необходимых количеств гомогенных препаратов рестриктаз. Однако, при оценке схем их получения в целом следует отметить, что в связи с присутствием в бесклеточных экстрактах неспецифических нуклеаз количественное определение активности целевых ферментов во многих случаях оказалось возможным проводить только после частичной их очистки. Это исключает возможность оценки эффективности первых стадий и всей схемы в целом. Тем не менее наличие количественных данных последующих стадиях очистки является полезной информацией, позволяющей оценивать эффективность сорбентов.

Сводные данные о количестве использованной биомассы, абсолютном и относительном выходе ферментов по белку, степени очистки и относительном выходе по активности очищенных до гомогенного состояния рестриктаз представлены в табл. 22.

В таблицу не включена и дальше не рассматривается схема выделения рестриктазы Bst1503, разработанная Катереллом и Уилкером [70]. При оценке этой работы приходится согласиться

Сводные данные о выходе и степени очистки рестриктаз, очищенных до гомогенного состояния

№ п/п	Рестриктаза	Количество сырой биомассы, из которой проводилось выделение, (г)	Количество гомогенизованного белка		Степень очистки	Выход, %	Литература
			общее (мг)	из 1 г биомассы (мкг)			
1.	Axy I	260	0,858	3,3	3 500	27	[302]
2.	Ahi I	150	0,84	0,6	4 000	43,8	[299]
3.	BamH I	500	2,0	4,0	1 750	19 ^{a)}	[254]
4.	Bgl I	740	4,0	5,4	—	—	[163]
		1 000	3,0	3,0	3 806	15,6 ^{a)}	[138]
5.	Bcn I	20	0,8	14,0	1 816	21 ^{a)}	[196]
6.	Bgl II	250	1,7	6,8	—	—	[127]
7.	BspR I	80	0,4	5,0	2 200	13 ^{a)}	[152]
		50	0,4	8,0	1 600	18 ^{a)}	[283]
8.	Bst I	70 000	38,0	0,54	1 797	17	[74]
9.	Bsu I	70	0,077	1,1	7 100	18,5 ^{a)}	[58]
10.	GceGL I	170	1,55	9	645	41,7	[234]
11.	EcoR I	350	0,2	0,6	1 500	3,5	[107]
		3 200	27,0	8,5	1 180	21	[184]
		4 730	53,7	11,4	1 750	28	[228]
		1 000	5,1	5,1	—	—	[15]
12.	EcoR V	20	60,0	30 000	—	—	[80]
13.	EcoR II	300	3,4	11,3	256	10 ^{a)}	[13]
14.	Hha II	25	0,75	30,0	327	13 ^{a)}	[140]
15.	Hpa I	100	0,06	0,6	17 000	34	[118]
16.	Mva I	15	0,22	14,6	860	32 ^{a)}	[29]
17.	Ngo II	—	0,34	—	38,8	12	[72]
18.	Paer7 I	41	12,0	293	11	10	[272]
19.	Pal I	400	0,21	0,52	1 650	33	[33]
20.	SalG I	—	0,15	—	105	0,8	[177]
21.	Taq I	2,4	26	10 833	—	43	[34]
20.	Xho I	600	0,5	0,83	—	—	[15]

^{a)} — данные о степени очистки и выходе рассчитаны, начиная с первой стадии выделения.

(—) — сведения отсутствуют

с мнением Кларк и Гартлея [74], что был получен не гомогенный препарат рестриктазы Bst1503, а препарат какого-то другого белка, содержащего примесь исследуемого фермента. Поэтому в сводной таблице содержатся только данные об очистке Bst1503, полученные последними авторами.

Как следует из данных, представленных в табл. 22, относительные выходы, рассматриваемые для тех случаев, когда оказалось возможным их рассчитать начиная с определения содер-

жания целевого фермента в грубых экстрактах, находятся в интервале 10% (EcoR II) — 32% (Mva I). Такой в общем большой выход рестриктаз, учитывая необходимую для достижения их гомогенности многократность очистки (см. табл. 22), свидетельствует об эффективности разработанных схем.

Обращает на себя внимание тот факт, что масштабность процессов выделения рестриктаз (за исключением Bst I) является небольшой, а количество получаемых в конечном счете препаратов измеряется несколькими миллиграммами или даже долями миллиграммов.

Учитывая высокую чувствительность современных аналитических методов, используемых для изучения структурно-функциональных особенностей этих ферментов и механизмов их взаимодействия с ДНК, этих количеств достаточно для проведения таких опытов.

Количественных данных о содержании целевых ферментов при пересчете на гомогенный белок в биомассе продуцентов рестриктаз мало [13, 29, 58, 138, 140, 152, 196, 254]. В исследованных немногочисленных случаях эти значения приблизительно равны (мкг/г сырой биомассы продуцента): 6 — Bsu I [58], 44 — Bsp I [283], 45 — Mva I [29] и 68 — Bcn I [196]. По этому показателю их превосходит только EcoR II, Hha II, PaeR7, EcoR V и Taq I. Сверхсинтез этих ферментов был достигнут благодаря успешному применению для конструирования продуцента методов генной инженерии [13, 34, 80, 140, 154, 272].

Высокая продуктивность штамма по отношению к целевому белку является важной предпосылкой для его получения в гомогенном состоянии. Однако, для ее реализации необходимо создать эффективную схему очистки. С учетом данных об абсолютных выходах рестриктаз (мкг/г биомассы), приведенных в табл. 22, можно рассчитать, что для получения 1 мг гомогенной Pae I (самый низкий выход — 0,52 мкг/г биомассы) необходимо было бы обрабатывать около 2 кг биомассы соответствующих продуцентов. Для получения по 1 мг большинства остальных, перечисленных в табл. 22 рестриктаз, понадобилось бы вести выделение из нескольких сотен грамм биомассы. Исключениями являются рестриктазы EcoR V, PaeR7 I и Taq I, выделяемые из генноинженерных продуцентов в количествах 3, 0,29 и 10,8 мг/г биомассы соответственно. Учитывая вышеописанное, использование в опытах по выделению гомогенных препаратов рестриктаз не столь уж и больших объемов биомассы, равняющихся десяткам [29, 58, 152, 196], сотням [13, 15, 33, 118, 127, 163, 254, 299, 302] граммов и реже одному — нескольким килограммам [15, 74, 138, 184, 228], позволяет получать необходимые количества целевых ферментов. Тем не менее, в подавляющем большинстве случаев эти объемы биомассы превышают на порядок таковые, обрабатываемые в ходе выделения функционально очищенных препаратов рестриктаз. Эти

различия находят отражение и в методических подходах, направленных на создание схем выделения гомогенных препаратов рестриктаз и их реализацию.

Кроме масштабности определен вклад в специфику этих схем вносит необходимость достижения физической чистоты белка, что является более сложной задачей, чем очистка от функциональных нежелательных примесей. Указанные факторы находят выражение в схемах выделения гомогенных рестриктаз как в отношении способов осуществления отдельных стадий, так и их количества и качественного набора.

В препаративных опытах для разрушения клеток наряду с ультразвуком [29, 80, 106, 127, 152, 234, 299] относительно часто используются механические экструзионные дезинтеграторы [13, 74, 138, 163, 184, 254], позволяющие обрабатывать большие объемы биомассы. Получаемые объемы гомогената в большинстве случаев не исключают возможности проведения стадии центрифугирования в режимах, аналогичных таковым в случае аналитических опытов. Только в случае выделения Bst1503, проводившегося из 70 кг биомассы *V. stereothermophilus* 1503, с этой целью было использовано проточное центрифугирование [74].

Увеличение объемов рабочих растворов находит отражение и в методических приемах, используемых на стадии удаления нуклеиновых кислот. Гельфилтрация, довольно часто применяемая в опытах по получению функционально очищенных препаратов рестриктаз, в масштабированных схемах очистки практически не встречается. Единственное исключение в этом плане составляет первоначальная схема выделения гомогенной рестриктазы Bsp I [152]. Однако, в ходе усовершенствования схемы очистки этого фермента, этот прием был заменен на высаживание нуклеиновых кислот полиэтиленимином [283]. Отказ от применения гельфилтрации в обсуждаемых опытах следует отнести не только за счет малопривлекательности масштабирования этой процедуры, но и за счет низкой ее эффективности на первой стадии в отношении очистки целевых ферментов.

В большинстве случаев выделения гомогенных препаратов рестриктаз для удаления нуклеиновых кислот используется их высаживание при помощи СС или ПЭИ [13, 72, 106, 107, 127, 138, 184, 299, 234], что, учитывая простоту масштабируемости этого приема, является вполне понятным. Имеются примеры использования для разделения нуклеиновых кислот и целевых ферментов на первой стадии препаративных опытов сорбентов, в том числе ФРП [29, 34, 80, 254], гепаринсефарозы [196] голубой сефарозы [33] и ДЭАЭц [74]. В цитированных случаях только в случае выделения Bgl I [163] грубые экстракты перед нанесением на сорбенты подвергались высаливанию.

Высаливание белков нашло применение во многих схемах выделения гомогенных препаратов рестриктаз и за несколькими исключениями [34, 72, 80, 127, 138] проводилось в подобран-

ном ступенчатом режиме [74, 140, 152, 184, 299, 302], позволяющем добиться наряду с концентрированием исследуемых препаратов и их освобождением от ПЭИ [13, 127, 140] или СС [72, 106, 107, 184, 234] и частичной очистки целевых ферментов.

Характерной чертой схем выделения гомогенных препаратов рестриктаз в части, касающейся хроматографических стадий очистки, является увеличение по сравнению с аналитическими опытами среднего их числа и набора используемых средств. Типичными для этих схем является наличие трех [72, 74, 106, 152, 184, 196] — четырех [13, 33, 34, 163, 234, 254] хроматографических стадий. Значительно реже встречаются схемы, включающие две [29, 127] — пять [138, 140] таких стадий. С количественной точки зрения (число хроматографических стадий) разница между препаративными и аналитическими опытами не является принципиальной, что свидетельствует о подборе эффективных схем очистки целевых ферментов. Сравнение качественных параметров (набор используемых сорбентов) технологии получения препаратов рестриктаз, различающихся по уровню очистки, убеждает, что для опытов по получению гомогенных препаратов рестриктаз характерным является увеличение ассортимента используемых средств. Наряду с широким применением в этих экспериментах сорбентов, традиционно используемых для функциональной очистки специфических эндонуклеаз: ФРП [29, 72, 74, 80, 106, 138, 152, 163, 177, 184, 254, 298] и ДЭАЭц [13, 74, 107, 127, 138, 140, 177, 234, 299], относительно чаще встречается ГАП [72, 74, 107, 138, 152, 163, 177, 184, 196, 234, 254] и ГС [33, 127, 140, 177, 234, 299]. На сложность получения гомогенных препаратов указывает и частое использование в препаративных схемах гельфильтрации [13, 33, 74, 106, 107, 138, 299], хроматографии на ДНК-целлюлозе [163, 184, 196, 302] или ДНК-агарозе [152], СП-сефадексе, фенилсефарозе, w-аминопентилсефарозе [118, 138, 163, 254], голубой сефарозе [29, 234], карбоксиметилцеллюлозе [106] или ее аналоге Биорексе [254], т. е. частое использование таких сорбентов, которые в схемах выделения функционально очищенных препаратов рестриктаз встречаются значительно реже. Это явление следует рассматривать как выражение тенденции решить поставленную задачу путем поиска стадий, дающих эффективную очистку, т. е. путем включения в схемы выделения сорбентов, различающихся в отношении характера фракционирования исследуемой смеси растворимых клеточных компонентов.

О целесообразности использования более широкого ассортимента сорбентов свидетельствуют некоторые экспериментальные данные. Так, применение на первой хроматографической стадии выделения рестриктазы Нра I СП-сефадекса, позволило достигнуть исключительно высокой (850-кратной) ее очистки [118]. Введение гельфильтрации на сефадексе Г-100 на последней стадии выделения рестриктазы EcoR I дало 12-кратную

очистку [107]. Эффективным в отношении достигаемой степени очистки оказалось и использование ДНК-агарозы и ДНК, иммобилизованной в полиакриламиде, а также голубой сефарозы на последней стадии выделения рестриктаз Bsp I [152, 283], GseGL I [234] и Mva I [29] соответственно. Представленная в цитированных публикациях информация убеждает о высокой разделяющей способности вышеуказанных сорбентов и говорит о целесообразности их более широкого применения в опытах по получению функционально очищенных препаратов рестриктаз.

Рассмотренные выше примеры требуют некоторого пояснения. Анализируя данные, иллюстрирующие степень очистки целевого белка, следует иметь в виду, что ее абсолютное значение зависит не только от эффективности сорбента, но и от того на какой стадии очистки он был включен в схему выделения. Особенно это замечание следует иметь в виду, оценивая результаты предпоследних и последних стадий очистки, когда целевой фермент составляет значительную часть в исследуемом белковом препарате. В таком случае использование даже высокоэффективного сорбента не может дать большей степени очистки, чем кратная доля выделяемого фермента в поступившем на него белковом препарате.

В опытах по получению гомогенных препаратов рестриктаз, как уже отмечалось, широко используется ФР II и ДЭАЭц — сорбенты, нашедшие применение в большинстве схем выделения функционально очищенных препаратов этих ферментов. Наличие количественных данных о выходах и степени очистки, достигаемой с использованием этих ионитов в препаративных опытах, убеждает в высокой эффективности хроматографии на ФР II, в основном использованной на первых стадиях очистки. Сказанное подтверждают данные о достижении при хроматографии на ФР II 10-ти кратной [74, 152], 40-кратной [107, 184, 228], 50-ти кратной [154], 100-кратной [29] и даже 226-ти кратной [58] очистки. Потери целевых ферментов во всех случаях не превышали половины, а в некоторых составили менее 20% [184, 283]. Для применения ДЭАЭц, включаемой в схемы очистки гомогенных рестриктаз в основном на предпоследних стадиях, характерна степень очистки, равная 1,3—6-кратной [13, 58, 118, 138, 302]. Только в нескольких случаях достигаемая степень очистки была близкой к 10-ти кратной [72, 177], а в случае рестриктазы Ali I равнялась 23-кратной [299]. За исключением последнего случая, высокоэффективная очистка (более чем десятикратная) сопровождалась большими (60—90%) потерями целевых ферментов [72, 177]. Аналогичные, как и в случае ДЭАЭц, показатели в отношении достигаемой степени очистки характерны и для применения (в основном на предпоследних стадиях очистки) хроматографии на ГАП [72, 107, 118,

152, 177, 184, 228]. Однако, потери целевых ферментов в последнем случае в среднем были меньшими.

Высокую эффективность ФР II скорее всего следует отнести за счет возможного участия аффинных взаимодействий рестриктаз с этим сорбентом. В этом отношении больший интерес представляют данные, полученные с применением другого аффинного катионита — ГС. Ее использование на первых хроматографических стадиях выделения, последовавших после удаления нуклеиновых кислот, дало 20-ти кратную [118, 302], 75-ти кратную [299] и 100-кратную [33] очистку. Выходы целевых ферментов во всех цитированных случаях превышали 80%. Только в случае выделения рестриктазы SalG I очистка и выход равнялись соответственно 3-кратной и 30% [177]. Однако в этом случае хроматография на ГС осуществлялась на предпоследней стадии и дала препарат, в котором больше чем половина белка приходилась на рестриктазу SalG I. Поэтому эти данные нельзя рассматривать, как свидетельствующие о низкой эффективности ГС в случае очистки указанного фермента.

В случае выделения гомогенного препарата рестриктазы Vsp I ГС была использована для хроматографического фракционирования грубого экстракта продуцента этого фермента. В результате было достигнуто 150-ти кратное увеличение удельной активности целевого фермента, выход которого составил более 50% [196]. ГС в опытах по выделению функционально очищенных препаратов рестриктаз применяется не так уж и часто. Приведенные выше данные, иллюстрирующие высокую эффективность этого сорбента в отношении очистки рестриктаз, убеждают о перспективности ГС для получения функционально очищенных препаратов специфических эндонуклеаз.

Оригинальностью подхода к получению гомогенных препаратов рестриктаз выделяется работа, выполненная Еруслановым Б. с соавт. [9]. Авторами этой работы были разработаны два метода выделения гомогенной EcoR I. Первый из них явился традиционным в отношении использованных средств — был основан на применении двухстадийной схемы очистки (хроматография на ФР II и гельфильтрация на сефадексе Г—150). Фракции, полученные после гельфильтрации, содержащие целевой фермент, подвергали электрофоретическому анализу в денатурирующих условиях и отбирали те из них, которые содержали только один белок. Отбор небольшой части фракций, удовлетворяющих установленному требованию (гомогенность белка), привел к низкому выходу на данной стадии, который равнялся 20%. Однако, в целом выход гомогенного препарата составил 5,1 мг/г биомассы, который ненамного уступал этому показателю, наблюдаемому в случае использования для выделения гомогенной EcoR I многостадийных схем [184, 228]. Это, учитывая неизбежные потери целевого фермента на каждом этапе реализации последних схем, вполне объяс-

нимо. Выбранные Еруслановым Б. с соавт. [9] путь — идти на большие потери сразу, уже на второй стадии очистки в данном случае вполне себя оправдал и позволил отказаться от проведения дополнительных этапов выделения. Другой подход к получению гомогенного препарата, апробированный цитируемыми выше авторами, был основан на использовании иммуносорбента, содержащего иммобилизованные антитела к EcoRI. В аналитических экспериментах были продемонстрированы большие потенциальные возможности этого метода. Расчеты показывают, что в случае его реализации в препаративном варианте из 1 кг биомассы удалось бы получить около 27 мг рестриктазы в гомогенном состоянии. Использование иммуносорбентов в препаративной биохимии рестриктаз пока представляет только теоретический интерес. Однако со временем могут возникнуть задачи, для решения которых привлечение этого подхода может оказаться полезным.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ РЕСТРИКТАЗ

Основной характеристикой специфичности эндонуклеаз является узнаваемая последовательность нуклеотидов. Ее определение позволяет каталогизировать новый фермент по отношению к известным, т. е. установить является ли он изошизомером или прототипом. Наличие этих сведений является отправной точкой для дальнейшей характеристики исследуемого фермента (место расщепления субстрата, специфичность по отношению к модификациям субстрата и т. д.) и служит одной из предпосылок для принятия решения об его перспективности для использования в качестве аналитического реагента.

4.1. Косвенные методы определения узнаваемого участка

При определении субстратной специфичности первых обнаруженных рестриктаз в начале в основном применялись только прямые биохимические методы анализа. Задача определения специфичности и места расщепления сайта тогда практически сводилась в один эксперимент — определение первичной структуры концевых участков по месту расщепления субстрата [49, 116, 144, 195]. С момента открытия первых рестриктаз методы определения специфичности перетерпели большую эволюцию, характерной чертой которой явилось всевозможное использование более быстрых и более простых как прямых так и косвенных методов. Привлечение косвенных методов, в основном коснулось только изучения сайтовой специфичности рестриктаз; задача определения места расщепления субстрата и по сей день решается прямыми биохимическими методами.

В развитии косвенных методов определения сайтовой специфичности основную роль сыграло: (1) появление большого числа охарактеризованных рестриктаз и накопление данных об основных типах построения узнаваемых участков, (2) установление первичной структуры ДНК ряда небольших вирусов и плазмид, (3) использование вычислительной техники.

Стремительный рост числа новых рестриктаз и определение основных типов их субстратной специфичности [183] привел к появлению самого простого из косвенных методов, так называемого метода визуального сравнения, сущность которого заключается в сопоставлении результатов расщепления одного и того же субстрата известной и исследуемой рестриктазами. Так как при действии какой-либо рестриктазы на индивидуальную ДНК образуется характерный набор рестриктов, то в случае совпадения картин их электрофоретического разделения (рестриктограмм), делается вывод об идентичной специфичности этих ферментов. Иногда применение этого метода сводится к сравнению полученной рестриктограммы с таковыми, представленными в каталожных изданиях [189]. Очевидно, что настоящий метод пригоден только для характеристики аналогов уже известных рестриктаз (изошизомеров). Следует однако отметить, что такая оговорка недействительна в случае впервые обнаруженных рестриктаз с палиндромной сайтовой специфичностью, так как все варианты предполагаемого электрофоретического распределения фрагментов в этом случае рассчитаны на ЭВМ и в графическом виде представлены в справочной литературе [190].

Параллельно и в дополнение к методу визуального сравнения широко используется метод картирования ДНК. Метод, широко используемый в молекулярной генетике, нашел свое применение в исследованиях специфичности рестриктаз благодаря определению первичной структуры ряда ДНК-стандартов — небольших фагов и плазмид [39, 212, 231, 232, 266]. Визуальное сравнение нуклеотидных последовательностей в картированных районах в большинстве случаев позволяет обнаружить гомологические последовательности и тем самым определить узнаваемые участки. Если на этапе сравнения экспериментально полученной рестриктограммы с каталожными или расчетными иллюстрациями, сделано предположение о сайтовой специфичности исследуемого фермента, то для его подтверждения может быть также использован метод картирования. В этом случае предполагаемые координаты расщепления субстрата исследуемой рестриктазой бывают известны и поэтому величины и число фрагментов совместного расщепления с какой-либо известной рестриктазой можно получить расчетным путем. Совпадение расчетных и экспериментальных данных будет указывать на правильность предварительного вывода.

Другой важной вехой в области исследования специфично-

сти рестриктаз были разработанные Фуксом с соавт. [96, 97] таблицы частоты встречаемости палиндромных тетра- и гексануклеотидных последовательностей в ДНК некоторых вирусов, фагов и плазмид. Для этих стандартных ДНК было определено число каждого из палиндромных сайтов а также расстояния между ними. Таким образом, экспериментально определяется только частота расщепления исследуемым ферментом нескольких стандартных ДНК и, в случае необходимости, их величины. В дальнейшем эти данные сравниваются с таковыми представленными в таблицах [96, 97]. В большинстве случаев этих данных бывает достаточно, чтобы предсказать сайт-овую специфичность исследуемого фермента.

В настоящее время разработаны программы для микро-ЭВМ, позволяющие быстро картировать любые нуклеотидные последовательности в различных ДНК-субстратах. Для этой цели используются как централизованные банки ДНК, так и собственные нуклеотидные последовательности. Такие программы позволяют не только картировать определенные точки, но и определить в картированных районах гомологические участки, что оказывается крайне полезным в случае более сложных вариантов сайт-овой специфичности.

Резюмируя накопленный опыт можно рекомендовать следующую тактику применения косвенных методов (они даются в порядке методического усложнения) для предсказания структуры участка узнаваемого исследуемым ферментом: 1) визуальное сравнение электрофореграмм продуктов расщепления ДНК фага λ исследуемым ферментом с аналогичными литературными данными относительно известных рестриктаз; 2) определение частоты расщепления и величин генерируемых фрагментов нескольких стандартных субстратов (ДНК рBR322, ФХ174, fd, SV40) с установленной первичной структурой [39, 212, 232, 266] и сравнение полученных данных с табличными [96, 97]. После того, как была установлена первичная структура ДНК фага λ [231], большим подспорьем в таких экспериментах явились аналогичные таблицы, составленные для этого субстрата А. Мироновым (ВНИИ Генетика); 3) картирование местоположения сайтов расщепления на вышеуказанных ДНК и поиск общих последовательностей в их окружении.

Очевидно, что для предсказания специфичности конкретного исследуемого фермента зачастую нет необходимости в использовании все вышеперечисленных приемов. Иногда для достижения поставленной цели оказывается достаточным применить один или два из них.

Для подтверждения предполагаемой субстратной специфичности предлагается применять: 1) совместную обработку субстрата исследуемым ферментом и предполагаемым прототипом (в случае доступности), 2) определение числа и величин фрагментов, образующихся в результате действия исследуемого фер-

мента на стандартные ДНК и сравнение полученных данных с рассчитанными на основе известной последовательности нуклеотидов этих ДНК и структуры предполагаемого сайта узнавания, 3) два варианта метода картирования — точное и относительное.

Относительное картирование заключается в обработке субстратов с известной первичной структурой исследуемым ферментом в смеси с некоторыми известными рестриктазами и сравнение величин полученных фрагментов с расчетными. Относительное картирование с методической точки зрения ничем не отличается от точного. И в этом и в другом случае проводится обработка субстрата смесью исследуемого фермента с известными (попарно) и определение величин получаемых фрагментов. Путем логических рассуждений с учетом координат участков, узнаваемых использованными в опытах рестриктазами с известной субстратной специфичностью, можно определить местоположение точек, расщепляемых исследуемым ферментом. Однако, в тех случаях, когда проверяется субстратная специфичность новой рестриктазы, предсказанная на основе других опытов, в этом нет необходимости, так как координаты ее предполагаемого участка узнавания относительно сайтов расщепления известных рестриктаз могут быть рассчитаны на основе данных о первичной структуре используемых субстратов. Сравнение расчетных данных с экспериментальными сразу без дополнительных рассуждений дает ответ, является ли предполагаемая последовательность нуклеотидов субстратом исследуемого фермента. Кроме того, в этом случае допустима обработка субстрата не всеми комбинациями: известные рестриктазы — исследуемая, необходимыми для точной локализации точек расщепления последней. Это тоже снижает трудоемкость экспериментов. Учитывая тот факт, что таким способом проверяется относительное расположение многих сайтов узнавания, надежность определения субстратной специфичности исследуемой рестриктазы методом относительного картирования является высокой.

4.2. Методы определения места расщепления субстрата

С применением косвенных методов удается определить только первичную структуру узнаваемой последовательности. Для того чтобы установить место расщепления фосфодиэфирной связи, необходимо использовать прямые методы структурного анализа ДНК. Очевидно, что задача определения места разрыва, когда известны структурные особенности узнаваемой последовательности, значительно упрощается.

Для определения субстратной специфичности первой открытой рестриктазы II типа — Hind II [144] было использовано введение метки в 5'-концы фрагментов ДНК, генерируемых ис-

следуемым ферментом, при помощи полинуклеотидкиназы фага Т4 в присутствии [γ - ^{32}P] АТФ с последующим анализом их структуры. С этой целью меченые фрагменты обрабатывали ферментами в условиях, обеспечивающих их гидролиз до мононуклеотидов (фосфодиэстеразой змеиного яда) или позволяющих получать набор ди-, три-, тетра- и т. д. олигонуклеотидов (обработка панкреатической ДНК-азой). Продукты частичного гидролиза выделяли и осуществляли анализ первичной структуры каждого индивидуального меченого олигонуклеотида. Анализ 3'-концевого динуклеозидмонофосфата, полученного гидролизом равномерно меченых ДНК-рестриктов микрококковой нуклеазой, позволил установить 3'-концевую структуру Hind II фрагментов. На основе совокупности полученных данных оказалось возможным определить последовательность нуклеотидов, узнаваемую исследуемым ферментом, и также способ расщепления субстрата. Аналогично была определена специфичность рестриктазы EcoR I [265], Hind III [195], EcoR II [45] и ряда других эндонуклеаз. Рассмотренные выше аналитические приемы отличались громоздкостью и трудоемкостью. В настоящее время они представляют только исторический интерес.

Со времени открытия первых представителей рестриктаз II типа, как и в случае исследования сайтовой специфичности, методы определения места расщепления постоянно совершенствовались. Происходило это в основном благодаря бурному развитию методов анализа первичной структуры олигонуклеотидов и полинуклеотидов, а также появлению возможности быстро синтезировать олигонуклеотиды любой длины и последовательности. Все новейшие достижения в области синтеза и анализа нуклеиновых кислот быстро адаптировались для определения специфичности рестриктаз.

Метод фингерпринтирования. Разработке метода «отпечатков пальцев» («fingerprint») известного также под названием метода «блуждающего пятна» («wondering spot»), способствовало появление и накопление данных о поведении коротких олигонуклеотидов в различных условиях тонкослойной хроматографии и электрофореза, а также определение закономерностей подвижности олигонуклеотидов в зависимости от состава оснований. Суть его заключается в последовательном двухмерном разделении продуктов статистического экзонуклеазного гидролиза исследуемого олигонуклеотида, содержащего концевую изотопную метку, при помощи сначала электрофореза, потом анионообменной хроматографии в тонком слое ДЭАЭ-целлюлозы. Разделение по первому направлению проводится в кислом буфере, что позволяет проявиться нуклеотидному составу каждого из продуктов статистического гидролиза. Разделение по второму направлению происходит только в зависимости от длины продуктов гидролиза. После автордиографии, по относительному расположению радиоактивных пятен и с учетом

правил интерпретации сдвигов продуктов гидролиза относительно более короткого сегмента в зависимости от природы дробленного звена, разработанных Ту и Ву [278], определяется первичная структура исследуемого олигонуклеотида. Природа первого звена — 5'-моонуклеотида определяется независимым методом. Применение рассмотренного способа определения специфичности рестриктаз основывается на том, что большинство рестриктаз расщепляют палиндромный сайт симметрично и в пределах узнаваемого участка. Таким образом после расщепления все ДНК-фрагменты имеют гомологичные концевые участки. Протяженность этих участков в 3'- и 5'-направлениях будет зависеть от размеров узнаваемого участка и от способа его расщепления. Например, шестизвенный Hind III сайт (5'A⁺AGCTT) после расщепления образует пятизвенную 5'-концевую гомологичную последовательность, а всем 3'-концевым последовательностям единственным гомологичным звеном будет адениновый нуклеотид, т. е. во втором случае размеры общего участка будут минимальными. В случае рестриктазы Kpn I, узнающей и расщепляющей 5'GGTAC⁺C последовательность, будет наблюдаться противоположная картина, то есть образуется пятизвенный 3'-концевой гомологичный участок и минимальный 5'-концевой. Величина гомологичной части при использовании метода фингерпринтирования имеет важное значение, так как пометить можно любой из концов ДНК-фрагментов. Однако, введение 5'-концевой метки при помощи T4-полинуклеотидкиназы в рестриктационные фрагменты Kpn I (5'GGTAC⁺C) или, в 3' конец фрагментов полученных под действием Hind III (5'A⁺AGCTT) при помощи обычно с этой целью используемой терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы [135], представляется нецелесообразным, так как фингерпринт не дает нужной информации. В общем случае, когда отсутствует информация о структуре липких концов, что обычно имеет место при исследовании нового фермента, выбор того или иного способа введения метки несет определенную степень риска. С другой стороны существует ряд обстоятельств, позволяющих свести такой риск до минимума. Во-первых, количество рестриктаз образующих 3'-выступающие фрагменты значительно меньше тех, которые образуют 5'-выступающие или спаренные концы, что указывает на предпочтительное использование 5'-киназной метки. Во-вторых, на предварительном этапе работы иногда можно получить информацию о предполагаемом месте расщепления. Для этого перед фингерпринтированием можно проанализировать концевой моонуклеотид, акцептирующий радиоактивную метку. Косвенным указанием на ожидаемое место расщепления также может служить специфичность известного прототипа.

Благодаря простоте исполнения и информативности метод фингерпринтирования широко применяется для анализа специфичности рестриктаз. В качестве примера можно перечислить

целый ряд рестриктаз, специфичность которых была определена этим методом: *Alu I* [219] *BamH I* [221], *Mbo I* [101], *Sau3A I* [264], *Pvu II* [63] и др. [46, 100, 265, 277].

В тех случаях, когда продукты рестриктазной реакции имеют полностью спаренные концы, анализ 5'-концевой последовательности дает информацию лишь о структуре половины сайта. В отсутствие сведений об узнаваемом участке, полученных независимыми методами (например, косвенными), для большей достоверности анализ 3'-концов является необходимым. Чаще всего для этой цели используется метод анализа ближайших соседей. В таких случаях применение ДНК полимеразы T4, благодаря присущих ей полимеразной и 3'→5' экзонуклеазной активностей, позволяет в присутствии меченных нуклеозидтрифосфатов ввести ³²P-меченый 3'-концевой нуклеотид. После гидролиза рестриктов соответствующими фосфодиэстеразами и анализа продуктов реакции определяется ближайший сосед включенного меченого предшественника [99, 166]. В результате такого анализа устанавливается структура 3'-концевого динуклеотида рестрикционного фрагмента. Обсуждаемый методический подход нашел применение в экспериментах по определению субстратной специфичности рестриктаз *Xma I* [92] и *Hind III* [195].

Метод матричного копирования ДНК при помощи полимеразы иногда используется и для анализа рестрикционных фрагментов с 5'-выступающими концами. С этой целью проводится серия опытов, где 3'-конец фрагмента достраивается полимеразой в присутствии одного меченого и остальных немеченых предшественников. Анализ ближайших соседей позволяет установить не только включаемый нуклеотид, но и последовательность их включения. Этим методом была подтверждена структура узнаваемого участка и определено место расщепления для рестриктаз *SalG I* [31], *Xba I* [303] и *BamH I* [221].

В тех случаях, когда рестриктаза расщепляет ДНК с образованием 3'-выступающих концов, 5'-киназная метка фрагментов позволяет определить лишь меньшую часть узнаваемой последовательности. Для полной идентификации сайта необходимо провести анализ 3'-концевой структуры рестриктов. Робертсом [217] было предложено в таких случаях для введения 3'-концевой метки использовать терминальную трансферазу. Практически этот подход впервые был реализован в опытах по определению специфичности рестриктазы *Kpn I* [274]. Анализ 3'-меченой ДНК проводится как и в случае 5'-концевой метки, с той лишь разницей, что для получения продуктов частичного гидролиза используются микрококковая нуклеаза и фосфодиэстераза селезенки, т. е. нуклеазы, расщепляющие ДНК с образованием 3'-фосфатов.

Метод нуклеотидных карт, в случае его применения для анализа смеси фрагментов, образуемых исследуемой рестриктазой

при расщеплении субстрата, позволяет выявить гомологичные концевые их участки. Границы его применения во многом определяются структурой участка, узнаваемого исследуемым ферментом, местом расщепления субстрата и его природой. В последнем случае имеется в виду тот факт, что при использовании линейного субстрата, имеющего небольшое число участков, узнаваемых исследуемым ферментом, его концевые последовательности (негомологичные с сайтом рестриктазы) проявляются на фингерпринте. Это может затруднить однозначную интерпретацию получаемых результатов.

Обсуждаемый метод наиболее эффективен в самых простых случаях проявления специфичности рестриктаз, т. е. когда фермент узнает палиндромную последовательность нуклеотидов и разрыв фосфодиэфирных связей производит в ее пределах. Он успешно используется и в тех случаях, когда в узнаваемом участке наблюдается вырожденность. Рестриктазы Sau96 I [202], Sin I [167], Aos II [85], Fdi I [280] и Acs I [84], узнающие такие последовательности, были охарактеризованы с использованием метода нуклеотидных карт. Однако в общем случае он мало пригоден для определения структуры более вырожденных узнаваемых участков. В этих случаях, а также когда расщепление происходит за пределами субстратного участка, задача определения его структуры, а также места разрыва, осложняется. Однако это не исключает возможности применения обсуждаемого метода с этой целью. В таких случаях анализу подвергаются выделенные индивидуальные ДНК-рестрикты, содержащие метку только в одном из концов анализируемого фрагмента. Такой прием был использован в опытах по определению субстратной специфичности рестриктазы NspB II [91], узнающей 5'-C(A/C)GC(T/G)G последовательность.

Достоинством метода фингерпринтирования является то, что для его применения не обязательно иметь сведения о сайтовой специфичности исследуемых рестриктаз.

Методы секвенирования ДНК. Среди приемов, которые успешно применяются при исследовании специфичности рестриктаз, следует отметить метод секвенирования ДНК. Одной из первых рестриктаз, для определения места расщепления которой был применен этот подход, следует считать рестриктазу Pst I [63]. Тогда был использован так называемый «плюс — минус» метод, разработанный Сенгером и Каулсоном [230]. Стратегия его применения в отношении определения места расщепления рестриктаз была разработана Брауном и Смитом [63]. В методичном плане она относительно громоздка и подробно изложена в пособии «Методах энзимологии» [65], а также в «Итогах науки и техники» [7], поэтому здесь рассмотрим лишь основные этапы этого подхода. В основе самого метода секвенирования заложена стратегия, позволяющая получить меченые продукты матричного копирования исследуемого ДНК-фрагмен-

та в лимитирующих условиях (плюс — минус реакции). В результате получается набор реакционных смесей в каждом из которых реакция копирования статистически завершалась у какого то определенного нуклеотида. Разделение этих реакционных смесей в параллельных дорожках высокоразрешающего электрофореза в полиакриламидном геле позволяет получить так называемую «структурную лесенку», из которой по наличию или отсутствию радиоактивного фрагмента определенной длины в каждой из дорожек можно определить первичную последовательность исследуемого фрагмента. В экспериментах по определению места расщепления по результатам картирования подбирается фрагмент ДНК, содержащий участок разрываемый исследуемой рестриктазой, и устанавливается его первичная структура. Для определения места расщепления субстрата используются две дополнительные пробы, содержащие набор продуктов лимитированного копирования матрицы. Обе пробы подвергаются полной достройке матрицы и затем расщепляются исследуемой рестриктазой. Затем в одну из проб добавляют ДНК полимеразу Т4 и все четыре предшественника дезоксирибонуклеотидов. Пробы анализируют параллельно с продуктами «плюс — минус» реакций и по положению продукта из первой пробы определяют место расщепления меченой цепи. Во второй пробе, в зависимости от типа построения концов рестриктов, полимеразы благодаря присущей ей 3'→5'-экзонуклеазной и 5'→3' полимеразной активностям или дотраивает меченую цепь (в случае 5'-выступающих концов) или ее укорачивает (в случае 3'-выступающих концов). Таким образом по изменению подвижности продукта второй пробы определяется место расщепления комплементарной цепи. Совпадение подвижности продуктов обеих проб будет означать, что рестриктаза расщепляет субстрат с образованием полностью спаренных концов. С использованием метода секвенирования в вышеизложенном варианте была определена специфичность расщепления субстрата для рестриктаз Mbo II (5'GAAGA) [61], Hga I (5'GACGC), [64], Taq I (5'TCGA) [235].

Следует отметить, что «плюс — минус» метод в настоящее время утратил свое значение и уступил свои позиции более простым и эффективным методам секвенирования. Как естественное продолжение его развития был разработан метод «терминирующих аналогов трифосфатов» (метод Сенгера) [233]. Другой метод секвенирования, основывающийся на химической модификации ДНК, был разработан, в основном, благодаря усилиям Максама и Гильберта [176]. Оба эти метода незамедлительно стали применяться и для изучения специфичности рестриктаз. Принципиально они отличаются только способами получения статистического набора меченых фрагментов, последующее разделение которых в полиакриламидном геле в конечном итоге приводит к «структурной лесенке». Стратегия опреде-

ления места расщепления рестриктаз на основе «плюс — минус» системы, предложенная Брауном и Смитом [63], практически без изменения может быть использована и в этом случае. В практике определения специфичности рестриктаз оба метода применялись одинаково успешно. В итоге можно перечислить целый ряд работ, где специфичность рестриктаз была определена при помощи этих методов [62, 67, 89, 90, 104, 161, 164, 169, 281].

Следует отметить, что метод секвенирования для определения места расщепления используется не только в упомянутом варианте (сравнение подвижности исследуемого рестрикта с фрагментами «структурной лесенки»). Он наряду с методом фингерпринтирования, применяется для определения структуры концевых последовательностей фрагментов, генерируемых исследуемыми рестриктазами [84, 85, 90, 167, 185, 281].

Использование синтетических олигонуклеотидов. Другой методический подход, применяемый для определения места расщепления рестриктаз, стал доступен благодаря созданию эффективных методов химического синтеза олигодезоксирибонуклеотидов. Основной прогресс в этой области был связан с разработкой более совершенного фосфотриэфирино-го [256] и фосфоамидитного методов [175] и перехода от синтеза в растворе на синтез с использованием полимерных носителей [71, 175].

Процедура определения места расщепления с использованием синтетического субстрата выглядит очень просто. Для этого олигонуклеотид, содержащий сайт исследуемой рестриктазы, метится по 5'-концу при помощи T4-полинуклеотидкиназы и [γ - ^{32}P]АТФ, и обрабатывается исследуемым ферментом. Затем реакционную смесь анализируют при помощи ионообменной хроматографии в тонком слое ДЭАЭ-целлюлозы. В качестве маркеров параллельно разделяют продукты лимитированного гидролиза этого же меченого олигонуклеотида. Место расщепления сайта определяется путем сравнения подвижности продуктов рестрикционной реакции и лимитированного гидролиза субстрата. Очевидно, что применение этого метода возможно лишь в тех случаях, когда узнаваемая последовательность рестриктазы уже определена другими методами.

Требования, предъявляемые к длине субстрата, вероятно, могут значительно варьировать для различных рестриктаз. Для большинства ферментов достаточно синтезировать самокомплементарный олигонуклеотид, в котором узнаваемый сайт фланкирован одним-двумя нуклеотидными парами. Субстраты такой длины, как правило, хорошо расщепляются большинством рестриктаз. Вместе с тем имеются также сведения, что рестриктаза Hind III не расщепляет олигонуклеотид в котором узнаваемый сайт с обеих сторон фланкирован шестизвенными последовательностями [4].

В принципе, синтетические субстраты могут применяться и в случае вырожденных узнаваемых последовательностей, а также в тех случаях, когда расщепление субстрата происходит за пределами узнаваемого участка. В первом случае место расщепления можно определить на одной из узнаваемых последовательностей, предполагая, что все остальные будут расщепляться одинаково, или можно к синтезу привлечь все варианты вырожденного субстрата. Примечательно, что для этого нет необходимости проводить много синтезов; для этого существует стратегия, позволяющая получить любой набор разных вариантов частично гомологичных последовательностей одним приемом. В тех случаях, когда имеется предварительная информация, что расщепление происходит за пределами узнаваемого участка, необходимо синтезировать олигонуклеотид с более длинными фланкирующими участками. Так как известны рестриктазы, расщепляющие субстрат на расстоянии 9, 13 и даже 16-ти нуклеотидных пар от узнаваемого участка, то длина требуемой последовательности приближается к 20—25 нуклеотидным парам. Если еще учесть, что ориентация расщепления неизвестна, то величина олигонуклеотидного субстрата удваивается. Таким образом становится ясным, что даже при наличии возможностей синтезировать олигонуклеотид такой длины может оказаться целесообразным обратиться к другим методам.

Несмотря на свою привлекательность, метод, основанный на использовании синтетических субстратов для определения места расщепления рестриктазы используется относительно редко. Можно привести не так уж много примеров его применения [5, 11]. Вероятно, одной из причин являются ограниченные возможности быстрого синтеза требуемых олигонуклеотидов в лабораториях, занимающихся выделением рестриктаз. Вследствии этого большинство исследователей традиционно применяют какой либо другой метод, имеющийся в арсенале лаборатории.

В заключение можно сказать, что современные методы анализа нуклеиновых кислот позволяют определить место расщепления субстрата для рестриктазы любой специфичности. Выбор стратегии и метода определения зависит от особенностей узнаваемого участка и методов, которыми владеет экспериментатор.

5. КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ

В настоящее время из огромного числа известных рестриктаз и метилаз, клонированы гены всего лишь 48 систем рестрикции—модификации и 26 метилаз, относящихся к системам RM (табл. 23 и 24). Развитие этого направления исследований условно можно разделить на два этапа. На первом этапе в течение довольно продолжительного времени (1978 г.)

Клонированные системы рестрикции-модификации II типа

№	Система RM	Узнаваемая последователь- ность	Вектор	Штамм-ре- ципиент	Метод от- бора R ⁺ M ⁺	Продуцент рестрикта- зые)	Лите- ратура
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Acc I	GT(A/C)- (T/G)	?	?	?	Acinetobac- ter calcoacet- ticus	[36]
2	Afl II	CTTAAG	pJRD 184	E. coli ⁶⁾	?	Anabaena flosaquae	[190]
3	Ase I	ATTAAT	pUC 19	E. coli	?	Aquaspiril- lum serpens	[190]
4	Ava I	CPYCGP _u G	pUC 19	E. coli	?	Anabaena variabilis	[190]
5	Ava II	GG(A/T)- CC	pUC 19	E. coli	?	Anabaena variabilis	[190]
6	BamH I	GGATCC	?	E. coli	D	Bacillus amylolique- faciens	[60]
7	Ban I	GGPyPuCC	?	E. coli	?	Bacillus aneurinolyt- ticus	[190]
8	Bcn I	CC(C/G)- GG	pBR 327	E. coli RR1	C	Bacillus centrosporus	[22, 200]
9	Bsp6 I	GCNGC	M-pACYC 184 RM-PIC 19H	E. coli RR1 E. coli RR1	D	Bacillus species	[200]
10	BsuR I	GGCC	pBR 322	E. coli RR1	D	Bacillus subtilis R	[147, 148]
11	Cfr I	PyGGCCPu	pACYC 177	E. coli RR1	C	Citrobacter freundii	[200]
12	Cfr9 I	CCCGGG	pACYC 177	E. coli RR1	C	Citrobacter freundii	[200]
13	Cfr10 I	PuCCGGPy	pBR 327	E. coli RR1	C	Citrobacter freundii	[200]
14	Dde I	CTNAG	M-pBR 322 R-pACYC 184	E. coli RR1 E. coli ER 1467	D	Desulfovib- rio desulfu- ricans	[124, 269]
15	Dpn II	GATC	pLS 101	Streptococ- cus pneu- moniae 762 E. coli	B	Streptococ- cus pneu- moniae (Diplo- coccus pneu- moniae)	[160]
16	Eag I	CGGCCG	?	E. coli	B	Enterobacter agglomerans	[268]
17	EcoR I	GAATTC	pCS 101	E. coli HB101	A	Escherichia coli	[42]
18	EcoR II	CC(A/T)GG	GG RSF 2124	E. coli C600	A	Escherichia coli	[12]
19	EcoR V	GATATC	pBR 322	E. coli K514	A	Escherichia coli	[54]

1	2	3	4	5	6	7	8
20	Eco47 II	GGNCC	pUC 19	E. coli RR1	C	Escherichia coli	[200]
21	Eco57 I	CTGAAG	pJRD 184	E. coli RR1	A	Escherichia coli	[200]
22	Eco64 I	GGPyPuCC	pACYC 184	E. coli RR1	A	Escherichia coli	[200]
23	Eco72 I	CACGTG	pJRD 184	E. coli RR1	A	Escherichia coli	[200]
24	Eco98 I	AAGCTT	pBR 322	E. coli RR1	A	Escherichia coli	[200]
25	Eco105 I	TACGTA	pBR 322	E. coli RR1	A	Escherichia coli	[200]
26	FnuD I	GGCC	pBR 322	E. coli	B	Fusobacterium nucleatum D	[279]
27	Fok I	GGATG	?	?	?	Flavobacterium okeanoikoites	[36]
28	Hae II	PuGCGCPy	pBR 322	E. coli	B	Haemophilus aegyptius	[77]
29	HgiA I	G(A/T)GC-(A/T)	?	?	?	Herpesosiphon giganteus	[36]
30	Hha I	GCGC	pBR 322	E. coli	B	Haemophilus haemolyticus	[37]
31	Hha II	GANTC	pBR 322	E. coli HB101	A	Haemophilus haemolyticus	[174]
32	Hind III	AAGCTT	?	?	?	Haemophilus influenzae Rd	[36]
33	Hinf I	GANTC	pUC 19	E. coli	?	Haemophilus influenzae Rf	[190]
34	HinP I	GCGC	pBR 322	E. coli	B	Haemophilus influenzae P1	[37]
35	Kpn2 I	TCCGGA	pBR 329	E. coli RR1	C	Klebsiella pneumoniae	[200]
36	Msp I	CCGG	?	E. coli	?	Moraxella species	[36, 190]
37	Nde I	CATATG	pBR 322	E. coli	?	Neisseria denitrificans	[36, 190]
38	Not I	GCGGCCGC	?	E. coli	B	Nocardia otitidis-caviarum	[268]
39	Paer7	CTCGAG	pBR 322	E. coli MM294	A	Pseudomonas aeruginosa	[103]
40	Pst I	CTGCAG	pBR 322	E. coli HB101	A	Providencia stuartii	[162, 284]

1	2	3	4	5	6	7	8
41	Pvu II	CAGCTG	?	?	?	Proteus vulgaris	[190]
42	Sal I	GTCGAC	pIJ 486	Streptomyces lividans 66	A	Streptomyces albus G	[190, 223]
43	Sin I	GG(A/T)CC	pUC 19	E. coli MC1061	B	Salmonella infantis	[139]
44	Sma I	CCCGGG	pACYC 177	E. coli RR1	C	Serratia marcescens	[200]
45	Taq I	TCGA	pBR 322	E. coli RR1	B	Thermus aquaticus	[250]
46	Xba I	TCTAGA	pUC 19	E. coli	B	Xanthomonas badrii	[279]
47	REco47 I ^d MEco47 II	GG(A/T)CC GGNCC Met I	pBR 322	E. coli RR1	C	Escherichia coli	[200]
48	RDpn I ^e	GATC	pLS 101 +RMDpn II	Streptococcus ^e pneumoniae (RDpn I+)	E	Streptococcus pneumoniae (Diplococcus pneumoniae)	[160]

? — данные отсутствуют; а) — коллекционный номер продуцента имеется [90]; б) — точное название штамма-реципиента не указано; с) — методы отбора клонов r⁺m⁺; д) — клонированы два тесно сцепленные гена REco47 I+MEco47 II с неидентичной, но перекрывающейся субстратной специфичностью; е) — в соответствии со специфичной рестриктазой Dpn I, она имеется и функционирует в клетках в отсутствие сопряженной метилазы;

A — по ограничению фагов;

B — по устойчивости рекомбинантных плазмид к действию клонируемой рестриктазы (после ретрансформации идет проверка бесклеточных экстрактов на наличие рестриктазы);

C — как и в случае (B), только последующая проверка на наличие рестриктазы ведется путем проверки ограничения фагов;

D — двухступенчатое клонирование для отбора клонов (использовались варианты A, B, C методов отбора и метод молекулярной гибридизации);

E — клонирование путем генетической рекомбинации. д) — продуценты RDpn I и RMDpn II первоначально имели таксономическое название Diplococcus pneumoniae; в настоящее время они переименованы в Streptococcus pneumoniae; е) — реципиентным штаммом служил продуцент рестриктазы Dpn I — (Streptococcus pneumoniae).

удалось клонировать гены gm только нескольких систем, в основном локализованных на плаزمидах — EcoR I [42], EcoR II [12], Pvu II [51] и PaeR7 [103], что методически явилось более простой задачей, чем клонирование хромосомных генов. Таких на первом этапе было клонировано всего две системы RM—Hha II [174] и Pst I [162, 284]. В последнее время наблюдается прорыв в обсуждаемой области исследований, о чем свидетельствует тот факт, что основная масса генов gm и метилаз

Клонированные гены М, принадлежащие к системам
рестрикции-модификации II типа

№	Ген М	Узнаваемая последовательность	Вектор	Штамм-реципиент	Продукт рестриктазы ^{a)}	Литература
1	2	3	4	5	6	7
1	Aat II	GACGTC	uUC 19	E. coli RRI	Acetobacter aceti	[165]
2	Alu I	AGCT	?	?	Arthrobacter luteus	[36, 190]
3	Bal I	TGGCCA	?	?	Brevibacterium albidum	[36, 190]
4	Ban II	GPuGCPyC	?	?	Bacillus aneurinolyticus	[36, 190]
5	Bgl I	GCCN ₅ GGC	?	?	Bacillus globigii	[36, 190]
6	Bep I	CGCG	?	?	Brevibacterium epidermidis	[157]
7	BspR I	GGCC	pBR 322	E. coli HB101	Bacillus sphaericus	[270]
8	Eco47 III	AGCGCT	pBR 327	E. coli RRI	Escherichia coli	[200]
9	Eco88 I	CPyCGPuG	pACYC 177	E. coli RRI	Escherichia coli	[200]
10	Eco56 I	GCCGGC	pJRD 184	E. coli K802	Escherichia coli	[200]
11	FnuD II	CGCG	?	?	Fusobacterium nucleatum D	[36, 190]
12	FnuD III	GCGC	?	?	Fusobacterium nucleatum D	[36, 190]
13	Hae III	GGCC	pBR 322	E. coli ^{a)}	Haemophilus aegyptius	[77]
14	Hga I	GACGC	pBR 322	E. coli RRI	Haemophilus gallinarum	[193]
15	Hinc II	GTPyPuAC	pBR 322	E. coli	Haemophilus influenzae R _c	[213]
16	Hind II	GTPyPuAC	pUC 19	E. coli	Haemophilus influenzae R _d	[213]
17	Hpa II	CCGG	pUC 19	E. coli	Haemophilus parainfluenzae	[36, 190]
18	Mva I	CC(A/T)GG	pBR 329	E. coli GM31	Micrococcus varians	[200]
19	Mwo I	?	?	?		[36]
20	Nae I	GCCGGC	pBR 322	E. coli	Nocardia aerocolonigenes	[279]
21	Nco I	CCATGG	pBR 328	E. coli	Nocardia corallina	[279]

№	Ген M	Узнаваемая последовательность	Вектор	Штамм-реципиент	Продуцент рестриктазы а)	Литература
1	2	3	4	5	6	7
22	Nla III	CATG	?	?	Neisseria lactamica	[36, 190]
23	Nla IV	GGNNCC	?	?	Neisseria lactamica	[36, 190]
24	Sau96 I	GGNCC	pBR 322	E. coli RRI	Staphylococcus aureus	[165]
25	Sph I	GCATGC	?	?	Streptomyces phaeochromogenes	[36, 190]
26	Uba26 I	GTCTG	pBR 327	E. coli RRI	Unidentified bacteria	[200]

? — данные отсутствуют; а) — коллекционный номер продуцента имеется в [190]; б) — точное название штамма-реципиента в литературном источнике не указано.

были клонированы в течение нескольких последних лет. Этому способствовала разработка специальных подходов для осуществления экспериментов, а также накопление данных о специфических требованиях к реципиентам рекомбинантных ДНК молекул, несущих гены рестрикции-модификации. В настоящее время является очевидным, что клонирование этих генов в общем случае не является тривиальной задачей, что довольно часто выражается в отрицательных результатах опытов. Поэтому ниже будут рассмотрены не только используемые с этой целью методические приемы, но и возможные потенциальные барьеры ее достижения. Ряд аспектов последней проблемы был рассмотрен в первой части книги (см. 9).

5.1. Методические аспекты клонирования генов gm

Клонирование генов, расположенных в плазидах по очевидным причинам не представляет сколь-нибудь значительных методических трудностей. В свете сказанного понятен тот факт, что на первых порах клонированию подвергались в основном гены с плазмидной локализацией. Сложнее обстоит дело в случае хромосомных генов. Для конструирования банка рекомбинантных плазмид применяется типичный арсенал известных методов генной инженерии, который в случае клонирования генов gm не имеет какой-то специфики. Специфика заключается в методах отбора искомым клонов, выборе реципиентных штаммов и векторов для клонирования.

Для отбора клонов с фенотипом r^+m^+ применяется несколько подходов (см. табл. 23). Самым распространенным в по-

следнее время стал метод биохимической селекции рекомбинантных плазмид, несущих экспрессирующийся ген метилазы, впервые предложенный Манном и др. [174], но реализованный другими исследователями [160, 200, 268, 279]. С этой целью из клонотеки выделяют суммарную плазмидную ДНК и обрабатывают ее рестриктазой из той же системы RM, которая подвергается клонированию. Очевидно, что устойчивыми к расщеплению окажутся только те плазмиды, которые содержат экспрессирующийся ген метилазы. Обработанной таким образом ДНК ретрансформируют реципиентный штамм. После проведения одного или нескольких таких циклов в полученных клонах проверяют эндонуклеазную активность *in vitro* [37, 77, 160, 250, 268, 279] или наличие рестриктазы по способности клеток ограничивать фаги [22, 139, 200]. Обсужденный метод позволяет обогащать клонотеку рекомбинантными плазмидами, содержащими ген метилазы. В отношении рестриктазы никакого отбора не проводится. Тем не менее, учитывая возможность тесного сцепления обоих генов, довольно часто удается в отобранном клоне наряду с метилазой обнаружить и рестриктазу [77, 279].

Применение биохимической селекции оправдано только в случае наличия на векторе сайтов узнаваемых клонируемыми ферментами. В противном случае возникает вопрос либо поиска таких векторов, либо их конструирования.

Наряду или вместо биохимической применяется и биологическая селекция, основанная на ограничении различных фагов клонами, несущими рестриктазу. Согласно литературным данным, клоны *E. coli* с RM системами, за несколькими исключениями, ограничивают фаг λ vir в 10^1 — 10^7 раз [35, 54, 103, 148]. К исключениям следует отнести те случаи, когда несмотря на наличие в клетках рестриктазы (проявляющей активность *in vitro*), ограничение фагов вообще не наблюдается. Это отмечено во всех случаях, когда клетки содержащие только рестриктазу не гибнут. Обсуждаемое явление, впервые отмеченное в случае RPaeR7 [103], оказалось не ограничивается только этим примером. Таким же свойством обладают еще ряд рестриктаз: EcoRI [108], HaeII, HgiAI, HinfI, PstI и XbaI [250]. Клоны, содержащие указанные рестриктазы, отличаются в разной степени сниженной жизнеспособностью. Высказываются мнения, что наблюдаемое явление объясняется наличием: а) в *E. coli* высокоэффективной системы репараций повреждений, вызываемых специфическими эндонуклеазами [35, 250]; б) каких-то механизмов, ограничивающих действие некоторых рестриктаз *in vivo* на немодифицированную ДНК [103]; в) необходимостью наличия обоих партнеров системы RM для эффективной рестрикции фагов [103].

В случае генов *gtn* Taq I, клонированных в *E. coli*, рестрикции фагов не наблюдалось и в присутствии в клетках ак-

тивной метилазы (и рестриктазы) [250]. Возможно, это связано с тем, что эта эндонуклеаза синтезируемая термофильным микроорганизмом функционирует при 65°С. *E. coli*, как известно, выращивается при значительно более низкой температуре.

Вопрос о том, насколько широко распространено рассматриваемое явление (тем более учитывая многочисленные факты о нежизнеспособности g^+m^- клеток), остается открытым. Вместе с тем очевидно, что неспособность некоторых g^+ клонов рестриктировать фаги, снижает потенциальные возможности биологического метода для отбора клеток, несущих клонированные гены gm . Применим ли обсуждаемый метод отбора к RM системам, отличающимся низкой эффективностью рестрикции — вопрос остается открытым. Резюмируя следует предположить, что биологический метод отбора может оказаться не всегда адекватным для решения поставленной задачи.

Оба обсуждаемых метода часто используются комбинировано, т. е. для обогащения клонотеки генами метилазы используют биохимический метод селекции, а на следующем этапе отбирают клоны, устойчивые к фагу [22, 139, 200].

Иногда для достижения поставленной цели применяется метод поэтапного клонирования. На первом этапе клонируется ген метилазы. Для определения предположительной локализации рестриктазного гена проводится физическое картирование последовательностей донорной ДНК, окружающих ген метилазы. В качестве зонда для блот-гибридизации используется ген метилазы [147, 148] или синтетические олигонуклеотиды [124]. Донорная ДНК перед лигированием обрабатывается отобранными таким образом рестриктазами с целью вырезания фрагмента предположительно содержащего не только ген метилазы, но и рестриктазы. Однако не всегда реализация такого подхода дает положительный результат. Поучителен в этом отношении пример по клонированию генов gm Dde I [124]. В этом случае на первом этапе удалось клонировать только ген метилазы. Впоследствии это нашло объяснение в том, что при получении банка генов провели исчерпывающий гидролиз донорной ДНК рестриктазой *Hind* III, которая как потом оказалось имеет сайт в гене рестриктазы. Для картирования генов gm Dde I методом блот-гибридизации в качестве молекулярных зондов применили метилазный ген и смесь синтетических олигонуклеотидов, имеющих гомологию с геном рестриктазы. Структура олигонуклеотидов была предсказана на основе анализа аминокислотной последовательности N конца рестриктазы, выделенной в гомогенном состоянии из природного продуцента. В результате проведенных исследований было определено, что гены gm Dde I расположены на *Pst* I фрагменте хромосомной ДНК величиной 4,8 кб. Однако попытки клонировать этот фрагмент не дали

положительного результата. Он был достигнут только путем поэтапного клонирования генов метилазы и рестриктазы на совместимых плаزمидях. Вынужденность использования именно такого подхода авторы, на основе полученных ими данных, объясняют тем, что в случае клонирования Pst I фрагмента, содержащего гены *gm Dde I*, уровень синтеза метилазы был недостаточным для защиты ДНК от действия рестриктазы. Необходимый уровень экспрессии был достигнут только в случае раздельного клонирования гена метилазы в составе фрагмента величиной 1,6 кб, вырезанного из донорной ДНК рестриктазами Hind III и Cla I, что привело к частичному удалению гена рестриктазы вместе с промотором и части *m* гена, кодирующей 33 С-концевых аминокислот. В случае Hind III фрагмента величиной 3 кб, содержащего интактный ген метилазы, уровень его экспрессии, как и в случае Pst I фрагмента, по неустановленным причинам был недостаточным для защиты внутриклеточной ДНК от рестриктазы. Этот пример наглядно демонстрирует, как влияние способа вырезания, так и на необходимость определенного уровня экспрессии гена метилазы для получения положительного результата в отношении клонирования рестриктазного гена.

Завершая обсуждение методов клонирования следует обратить внимание на один необычный вариант, имевший место в случае RDpn I [160]. В этом случае можно говорить о генной инженерии *in vivo*, реализовавшейся благодаря наличию гомологии между последовательностями фланкирующими гены *gm Dpn II* и *g Dpn I*. При трансформации *Streptococcus pneumoniae* — продуцента RDpn I рекомбинантной плазмидой, несущей гены *gmDpn II in vivo*, произошла рекомбинация с хромосомой и в результате в плазмиду перешли гены *dpnC* и *dpnD* (кассета генов *Dpn I*), которые заменили таким образом гены *gm Dpn II* (*dpnM*, *dpnA*, *dpnB*).

5.2. Факторы, влияющие на успешное клонирование генов *gm*

5.2.1. Скоординированная экспрессия

Как видно из данных, представленных в табл. 24, получено довольно большое число клонов, содержащих только ген метилазы. Объясняется это тем, что как известно система *RM* состоит из двух ферментов — рестриктазы и метилазы. Метилаза защищает клеточную ДНК от воздействия сопряженной рестриктазы. Поэтому в общем случае отдельно можно клонировать только ген метилазы, а в случае рестриктазы необходимо клонировать оба гена одновременно или осуществлять перенос гена рестриктазы в клетки, имеющие соответствующий модифицирующий фермент. Обычная практика осуществления экспериментов направлена на реализацию именно первого подхода. Следует отметить, что во всех исследованных случаях наб-

людалось тесное сцепление генов рестрикции-модификации. Однако, на основе имеющихся данных, было бы преждевременно утверждать, что это является общим правилом, так как используемые методы клонирования позволяют надеяться получить положительный результат только в случае удовлетворения этого условия.

Представляется, что совместное клонирование генов *gm* является условием необходимым, но недостаточным для положительного исхода эксперимента. После их попадания в реципиентную клетку встает вопрос как об экспрессии этих генов вообще, так и (в случае удовлетворения этого условия) о первоочередном проявлении защитной функции метилазы в отношении ДНК до воздействия на нее рестриктазы. Предположительно последнее реализуется путем опережающей экспрессии гена метилазы. Возможные механизмы, обеспечивающие выполнение этого условия рассмотрены в главе 9 (часть I). Формально, в случае одновременной экспрессии обоих генов *gm*, возможен и другой путь предотвращения гибели клетки. Для этого необходимо, чтобы метилаза опередила действие рестриктазы на субстрат. В качестве одного из возможных факторов играющего роль в опережающем проявлении активности метилазы приводятся данные о том, что рестриктазы в отличие от первого фермента являются гомомультимерными белками. Предполагается, что время необходимое для сборки субъединиц в активную форму белка в некоторых случаях может оказаться достаточным для модификации ДНК ферментом, который не обладает четвертичной структурой и сразу после его синтеза может взаимодействовать с субстратом [286].

Неудача клонирования может быть связана и с отсутствием экспрессии клонированных генов *gm*. Гены рестрикции-модификации выявлены в самых различных таксонах (см. разд. 2, часть I). Клонирование их осуществляется практически исключительно в кишечную палочку. Имеющиеся сведения свидетельствуют, что в *E. coli* удается клонировать гены *gm* из представителей таксонов генетически довольно отдаленных от кишечной палочки. Однако, вопрос о том все ли эти гены экспрессируются с собственных промоторов пока до конца не исследован. Методическое решение проблемы экспрессии видится в реализации нескольких подходов. В первую очередь следует обратить внимание на то, что большее число рестриктаз выявлено в штаммах, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae* (см. гл. 2, часть I) в которое входит и *E. coli*. Учитывая большое генетическое родство между представителями энтеробактерий, следует предположить и меньшую вероятность получения отрицательных результатов по клонированию в кишечную палочку за счет барьера гетерологической экспрессии.

В общем случае при выдвижении предположения о том, что возможной причиной неудачи является обсуждаемый барьер

или нескоординированная экспрессия генов *gm*, решение проблемы видится в клонировании генов метилазы и рестриктазы (вместе или поэтапно) в векторе экспрессии, содержащем перед местом вставки клонируемых фрагментов донорной ДНК промоторные участки функционирующие в кишечной палочке.

При рассмотрении литературных данных обращает на себя внимание тот факт, что в некоторых случаях поставленная цель была достигнута путем получения с первого взгляда неоправданно больших клонотек [22, 124, 139]. Авторами публикаций этот факт никак не обсуждается. Исключение составляет работа, посвященная клонированию генов *gm* *Vsp I* [22], где получение большой клонотеки обосновывается предположением о необходимости неслучайного их вырезания из хромосомы.

Первые опыты по клонированию рестриктазы *Vsp I* в *E. coli* не дали положительного результата. В ходе их выполнения удалось выделить только ген метилазы *Vsp I* [131]. В этих экспериментах число трансформантов, учитывая величину клонируемых фрагментов и допуская тесное сцепление генов *gm* *Vsp I*, было достаточным для клонирования последних в *E. coli*. Отсутствие клонов, несущих оба гена, могло быть обусловлено рядом причин, в том числе и существованием определенных ограничений к способу вырезания генов *gm* *Vsp I* из хромосомы, т. е. предполагалось, что совместное клонирование, экспрессирующихся в *E. coli* генов рестриктазы и метилазы *Vsp I*, не вызывающее гибели реципиентных клеток, может реализоваться только в случае их вырезания из хромосомы определенным образом. Такое событие, очевидно, должно происходить реже, чем случайное вырезание исследуемых генов в любом окружении. Это предположение поддавалось проверке при увеличении числа трансформантов в клонотеке. В случае *V. centrosporus* была получена клонотека, состоящая из 80 000 независимых гибридных клонов (против $2-12 \times 10^3$ в первых опытах), несущих рекомбинантные плазмиды, которые в сумме примерно в 50 раз перекрывали геном донорного штамма. Из такой большой выборки было выделено всего два клон, несущие функционирующие гены *gm* *Vsp I*. Физическое картирование этих двух рекомбинантных плазмид позволило обнаружить интересный факт, заключающийся в том, что в обоих клонах точка вырезания из хромосомы *V. centrosporus* (продукта *gmVsp I*) оказалась расположенной очень близко к гену метилазы (чего не наблюдалось со стороны гена рестриктазы, где имелись области хромосомной ДНК разной протяженности). Если это совпадение не является случайным, то можно предположить, что совместное клонирование генов рестриктазы и метилазы *Vsp I* в *E. coli* на фрагменте, содержащем прилегающие в хромосоме *V. centrosporus* к гену метилазы определенные ДНК-последовательности, по каким-то причинам является невозможным. Это может быть обусловлено, например, неста-

бильностью рекомбинантных плазмид или несогласованной экспрессией рестриктазы и метилазы, опосредованных обсуждаемыми, прилегающими к гену метилазы *Vsp I* последовательностями ДНК, проявляющими эту свою «функцию» в новом для них окружении — в клетках *E. coli* в составе рекомбинантной молекулы. В случае MDde I необходимый уровень экспрессии был достигнут тоже только в случае ее клонирования в определенном образом вырезанном фрагменте ДНК [124].

Таким образом, не исключено, что для клонирования генов рестрикции-модификации, по меньшей мере в некоторых случаях, необходимо их вырезание из исходной ДНК в соответствующем окружении. Необходимость выполнения этого требования несомненно должна значительно снизить вероятность успешного клонирования таких генов и связана с необходимостью получения больших клонотек, желательна на основе фрагментов клонируемой ДНК, полученных путем ее расщепления наиболее случайным образом.

5.2.2. Ограничение модифицированной ДНК

Довольно неожиданным было недавнее открытие еще одного барьера для клонирования генов *gm*, связанного с наличием у *E. coli* штаммо-специфических метилцитозин и метиладенин-специфических систем рестрикции. Имеется в виду системы, влияющие на перенос в клетки ДНК, содержащей 5-метилцитозин и 6-метиладенин в специфических последовательностях [117, 208]. Давно было известно, что *E. coli* ограничивает ДНК, содержащую необычно модифицированный цитозин — 5-гидроксиметилцитозин. Этот феномен контролируется генами *rglA* и *rglB* [168, 215]. Оказалось, что рестрикция 5-метилцитозин, содержащей ДНК, обусловлена этими же генами, получившими в последнем случае название *mcgA* (*rglA*) и *mcgB* (*rglB*) [206, 208, 226].

Рестрикция проявляется при трансформации или трансфекции штаммов, содержащих *mcgA* или *mcgB* гены дикого типа плазмидами или фагами, в составе ДНК которых имеется 5-метилцитозин в специфических последовательностях [208, 227]. Такой же эффект наблюдается и в отношении рекомбинантных ДНК молекул, имеющих в своем составе экспрессирующиеся клонированные гены метилаз определенной специфичности [21, 208].

Ген *mcgB* локализован на 98,5 мин генетической карты *E. coli*, рядом с генами *hsdR*, *hsdM*, *hsdS*, обеспечивающими рестрикцию-модификацию I типа у *E. coli* K-12 [210]. В той же области картирован и ген *mgg*, кодирующий метиладенин специфическую рестрикцию [117]. Анализ последовательностей, узнаваемых метилазами, указывает на то, что необходимым компонентом сайта, узнаваемого системой рестрикции *Mcg B*, являются последовательности G^mC или Pu^mC [21, 208]. *Mcg A*

McrA и McrB фенотипы некоторых штаммов *E. coli*^{a)}

Штамм	Фенотип		Штамм	Фенотип	
	Mcr A	Mcr B		Mcr A	Mcr B
1100	+	+	Hfr4000	+	+
AB266	+	+	Hfr Cavalli	+	—
AB1157	+	H	HfrH thi	—	+
AT2459	—	+	HfrP4X6	+	+
BNN93	—	—	JH132	—	—
(C600R ⁻) ^{b)}	—	—	JK268	—	H
BNN102	—	—	JM83	H	+
(C600 Hfl)	—	—	JM101	+	+
C235	—	+	JM107	—	+
C600	—	+	JM107MA2	—	—
CES200	—	+	5K	—	+
CH734	+	H	K12	+	+
CH1332	—	H	K802	—	—
CH1371	—	H	K803	—	—
CPB1293	—	+	K10	+	—
CPB1321	—	—	KMBL1164	—	H
CR63	—	+	LE392	—	+
CRS603	H	+	MC1061	—	—
2813	—	—	MM294	+	+
DH1	+	+	NM477	—	—
DH3	—	H	NM494	—	—
DH5	+	+	NM514	—	+
DM800	—	+	NM538	—	+
ED8641	—	+	NM554	—	—
ED8654	—	+	NM621	—	—
ED8739	—	—	PA309	+	+
ED8767	—	—	PCO950	H	+
ER1370	+	+	Q358	—	+
ER1381	+	+	RL88	—	—
ER1378	+	—	RR1	+	—
ER1398	+	—	SK5022	—	+
ER1414	H	+	W6	+	+
ER1451	—	—	W3110	+	+
ER1458	—	—	W4597	+	+
ER1562	—	—	WW3352	—	+
ER1563	—	+	X149	—	+
ER1564	—	+	Y10	+	+
ER1565	—	—	Y53	+	+
ES1585	—	+	Y70	—	+
GM161	H	+	Y1084	—	+
GM272	H	+	Y1088	—	+
GM2163	—	—	Другие (не K-12)		
GW1002	—	H	штаммы <i>E. coli</i>		
H680	—	H	<i>E. coli</i> B	+	+
HB101	+	—	<i>E. coli</i> B/r	H	+
Hfr3000 YA149	—	+	<i>E. coli</i> C	—	H

H — нетестировано а) — таблица подготовлена на основе данных, приведенных в публикации [207]. б) — подчеркнуты штаммы, часто используемые в качестве реципиента в экспериментах по генной инженерии.

ограничивает ДНК, модифицированную метилазой Hra II, узнающей последовательность 5'CCGG и модифицирующей внутренний цитозин [208]. Установлено, что необходимым компонентом сайта, узнаваемого системой рестрикции mgt является последовательность G^mAC или C^mAG [117]. Рассмотренные системы рестрикции следует принимать во внимание в экспериментах по клонированию генов рестрикции-модификации. В таблице 25 указаны Msp A и Msp B фенотипы штаммов *E. coli*. Штаммы *E. coli* менее исследованы в отношении Mgt фенотипа. Однозначно его наличие определено в случае штамма HB101 [117].

Не исключено, что описанные системы ограничения метилированной ДНК не исчерпывают возможных вариантов специфичности [207, 208]. Поэтому обсуждаемый фактор всегда следует иметь в виду при поиске причин неудачного клонирования метилаз со специфичностью, отличающейся от исследованных в отношении ограничения вариантов.

5.3. Конструирование продуцентов рестриктаз и метилаз

Клонирование генов рестрикции-модификации применяется и для получения повышения продукции этих ферментов клетками. Учитывая тот факт, что клонирование проводится в многокопийные векторные плазмиды, следовало бы ожидать достижения поставленной цели за счет эффекта дозы гена. В ряде случаев это действительно наблюдалось, например, содержание рестриктаз Xba I и FnuD I в результате клонирования соответствующих генов в *E. coli* в составе плазмиды равнялась 3×10^5 и 10^6 ед./г биомассы соответственно [279], что значительно превысило аналогичные показатели, характерные для исходных продуцентов *X. badri* и *F. nucleatum*. Отмечено увеличение продукции и ряда метилаз: BspR I в 3 раза [270], Msp I в 3—4 раза [285], Dpn II в 5 раз [82]. В случае клонирования в *E. coli* генов gm Pst I выход рестриктазы был близок к ее уровню в исходном штамме *P. stuartii* [284]. Однако, перенос рекомбинантной плазмиды, содержащей эти гены, в гомологичный хозяин (*P. stuartii* 164) дал 10-кратное увеличение синтеза рестриктазы Pst I, по сравнению с природным продуцентом. Отсутствие влияния дозы гена в случае его экспрессии в гетерологичном хозяине может быть обусловлено рядом факторов: структурой промоторных последовательностей, кодонным составом, стабильностью иРНК и белка и т. д. (см. 9, часть I).

В ряде случаев для создания высокоэффективных продуцентов были использованы специальные приемы их конструирования. С этой целью соответствующие гены ставятся под контролем сильных промоторов. Учитывая возможное отрицательное влияние сверхсинтеза рестриктаз на жизнеспособность

клеток широко применяются индуцибельные промоторы, такие как P_L фага λ , P_{lacUV5} , P_{tac} , P_{phoA} . С использованием методов целенаправленного конструирования рекомбинантных плазмид, созданы высокоэффективные продуценты рестриктаз $PaeR7$ [108], $Hha II$ [143], $Dpn II$ [82], $EcoR I$ [53], $EcoR V$ [55], $Taq I$ [34], а также метилаз $Dpn II$ [82], $EcoR V$ [55] и $RspR I$ [199].

Продуцент рестриктазы $PaeR7$ конструировали путем субклонирования tandemно расположенных генов g и m под фаговым промотором P_L [108]. Выход рестриктазы после индукции составил 2×10^7 ед./г биомассы. Интересно отметить, что белка метилазы было получено в 30 раз меньше по сравнению с эндонуклеазой. Авторы это наблюдение объясняют отсутствием канонической (или производной) SD последовательностью предшествующей метилазному гену [272]. Конструирование продуцента рестриктазы $EcoR I$ проводили путем отдельного клонирования генов gm . Было установлено, что расстояние от промотора P_L до инициаторного кодона гена рестриктазы не имеет существенного влияния на уровень синтеза фермента. Доля рестриктазы после индукции составила 30% от суммарного белка [53]. В случае $R EcoR V$, наоборот, на уровень синтеза рестриктазы влияло расстояние P_L промотора от инициаторного кодона гена. Выход рестриктазы в оптимальном варианте составил 5% от суммарного клеточного белка. При конструировании продуцента метилазы $EcoR V$ это расстояние не имело значения. Выход метилазы составил 5—10% от суммарного клеточного белка [55]. Tandemно расположенные гены $gm Dpn II$ были поставлены под контроль промотора из фага T7 [259]. Выход рестриктазы и метилазы повысился в 100 раз по сравнению с исходным штаммом и составил 20% от суммарного клеточного белка [82].

Транскрипция гена метилазы $EcoR II$, осуществляемая от промотора P_L обеспечивает синтез метилазы в 20—40 раз превышающий ее уровень в исходном штамме [14, 255]. Продуцент рестриктазы $Hha II$ конструировали путем клонирования гена g под контролем промотора P_{lacUV5} [239]. После индукции выход рестриктазы составил 7500 ед./мл культуральной жидкости или 0,3% от суммарного клеточного белка. Промотор P_{tac} обеспечил эффективный синтез метилазы $BspR I$. Выход метилазы составил 2—4% от суммарного клеточного белка. Интересно отметить, что после индукции прекращается рост клеток [199]. Причины этого явления неизвестны.

Кропотливая и интересная работа была проведена в случае конструирования продуцента $R Taq I$ [34]. Синтез рестриктазы под контролем промотора P_{phoA} позволил получить ее выход, равный 5% от суммарного клеточного белка. Он был одинаков в клетках как g^+m^- , так и g^+m^+ , т. е. присутствия в клетках сопряженной метилазы $Taq I$ не влияло на содержание эндонуклеазы. Попытки увеличить выход фермента путем при-

менения других промотров (T7, tac) не дали положительного результата. Рассмотрение структуры иРНК рестриктазы, позволило выявить в кодирующей части инвертированный повтор общей длиной в 31 нуклеотид, потенциально способный образовать шпильчатую структуру. Путем генноинженерных манипуляций, часть этой последовательности была модифицирована таким образом, чтобы исключить образование комплементарных связей, что должно было бы реализоваться в виде структуры «шпилька с петлей». В клетках генотипа g^+m^- это не дало повышение синтеза рестриктазы. Однако, после включения в рекомбинантную плазмиду гена метилазы было получено резкое увеличение содержания эндонуклеазы в клетках, которое равнялось 30% от суммарного клеточного белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова С. С., Карамов Э. В. и др. «Биохимия», 1978, 243, 234—236.
2. Альбертсон П. О. В кн.: Разделение клеточных частиц и макромолекул (перевод с англ. под ред. Варшавского Я. М.), М., «Мир», 1974, 381 с.
3. Белагин П. А., Дедков В. С. и др. «Прикл. биохим. и микробиол.», 1988, ЧЧШМ, 121—124.
4. Берлин Ю. А., Звонок Н. М. и др. «Биоорганич. хим.», 1980, 6, 1182—1195.
5. Буткус В., Казлаускаене Р. и др. «Биоорганич. хим.», 1985, 11, 1572—1573.
6. Воейкова Т. А., Славинская Е. В. и др. «Генетика», 1979, 15, 1746—1755.
7. Генетическая инженерия (методы). Итоги науки и техники, Серия «Молекулярная биология» (под ред. Баева А. А.), ВИНТИ, М., 1980, 12, 169—171.
8. Глатман Л. И., Мороз А. Ф. и др. «Докл. Акад. Наук СССР», 1980, 252, 993—995.
9. Ерусланов Б. В., Крамаров В. М. и др. «Биоорганич. хим.», 1980, 6, 1361—1369.
10. Захарян Э. Г., Захарян Р. А. и др. «Биологический журнал Армении», 1978, 31, 3—7.
11. Казлаускаене Р., Манялене З. и др. «Биоорганич. химия», 1986, 12, 836—838.
12. Косых В. Г., Бурьянов Я. И. и др. «Докл. Акад. наук СССР», 1979, 247, 1269—1271.
13. Косых В. Г., Пунтежис С. А. и др. «Биохимия», 1982, 47, 619—624.
14. Косых В. Г., Солонин А. С. и др. «Докл. Акад. наук СССР», 1980, 252, 995—998.
15. Крамаров В. М. Автореф. дис. канд. биол. наук, Москва, 1981, 20 с.
16. Крылов В. Н., Карапетян А. Т. «Генетика», 1977, 13, 1079—1088.
17. Кузьмин Н. П., Фодор И. и др. «Докл. Акад. Наук СССР», 1977, 236, 477—480.
18. Никольская И. И., Карпец Л. З. и др. «Молек. генетика, микробиол. и вирусол.», 1983, 12, 5—10.
19. Никольская-Санович И. И. Диссертация д-ра биол. наук, М., 1981, 459 с.
20. Орехов А. В., Ребенциш Б. А. и др. «Докл. Акад. Наук СССР», 1982, 263, 217—220.
21. Повиленис П. И., Лубис А. А. и др. «Генетика», 1989, 25, 753—755.
22. Повиленис П. И., Лубис А. А. и др. «Генетика», 1988, 24, 210—215.
23. Соколов Н. Н., Вотрин И. И. и др. «Биохимия», 1978, 43, 865—871.
24. Соловьева Н. Я., Раугенштейн Я. И. «Микробиология», 1978, 47, 956—958.
25. Тедиашвили М. И., Никольская И. И. и др. «ЖМЭИ», 1979, 5, 78—83.

26. Тедиашвили М. И., Упорова Т. М. и др. «Бюлл. exper. биол. медицины», 1980, 90, 324—325.
27. Упорова Т. М., Хилько С. Н. и др. «Вопр. мед. химии», 1982, 28, 78—81.
28. Холмина Г. В., Ребенкиш Б. А. и др. «Докл. Акад. Наук СССР», 1980, 253, 495—497.
29. Янулайтис А. А., Вайткявичюс Д. П. «Биотехнология», 1985, 1, 39—51.
30. Янулайтис А. А., Стакенас П. С. и др. «Мол. биол.», 1984, 18, 115—129.
31. Arrand J. R., Myers P. A. et al. «J. Mol. Biol.», 1978, 118, 127—135.
32. Baksi K., Rogerson D. L. et al. «Biochemistry», 1978, 17, 4136—4139.
33. Baksi K., Rushizky G. W. «Appl. Biochem.», 1979, 99, 207—212.
34. Barany F. «Gene», 1987, 56, 13—27.
35. Barany F. «Gene», 1988, 65, 167—177.
36. Barsomian J., Camp R. et al. In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 1.
37. Barsomian J., Card C. et al. In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 18.
38. Beaty J. S., McLean-Bowen C. A. et al. «Gene», 1982, 18, 61—67.
39. Beck E., Sommer R. et al. «Nucl. Acids Res.», 1978, 5, 4495—4503.
40. Berkner K. L., Folk W. R. «J. Biol. Chem.», 1977, 252, 3176—3184.
41. Berkner K. L., Folk W. R. «J. Biol. Chem.», 1979, 254, 2561—2564.
42. Betlach M., Hershfield V. et al. «Fed. Proc.», 1976, 35, 2037—2043.
43. Bickle T. A., Pirrotta V. et al. «Nucl. Acids Res.», 1977, 4, 2561—2572.
44. Bickle T. A., Pirrotta V. et al. In: Methods in Enzymology (Eds. L. Grossman, K. Moldave), New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 65, 132—138.
45. Bigger C. H., Murray K. et al. «Nature», 1973, 244, 7—10.
46. Bingham A. H. A., Atkinson T. et al. «Nucl. Acids Res.», 1978, 5, 3457—3467.
47. Bingham A. H. A., Darbyshire J. «Gene», 1982, 18, 87—91.
48. Bingham A. H. A., Sharman A. F. et al. «FEBS Lett.», 1977, 76, 250—256.
49. Birger C. H., Murray K. et al. «Nature», 1973, 244, 7—10.
50. Bitinaite J., Klimasauskas S. et al. «FEBS Lett.», 1985, 182, 509—513.
51. Blumenthal R. M., Gregory S. A. et al. «J. Bacteriol.», 1985, 164, 501—509.
52. Bolton B., Nesch G. et al. «FEBS Lett.», 1985, 182, 130—134.
53. Botterman J., Zabeau M. «Gene», 1985, 2, 229—239.
54. Bougueleret L., Schwarzstein M. «Nucl. Acids Res.», 1984, 12, 3659—3677.
55. Bougueleret L., Tenchini M. L. et al. «Nucl. Acids Res.», 1985, 13, 3823—3839.
56. Bouriotis V., Zafeiropoulas A. et al. «Anal. Biochem.», 1987, 160, 127—134.
57. Boyd A., Charles J. et al. «Nucl. Acids Res.», 1986, 14, 5255—5274.
58. Bron S., Horz W. In: Methods in Enzymology (Eds. Grossman L., Moldave K.), New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 65, 112—132.
59. Bron S., Murray K. et al. «Mol. Gen. Genet.», 1975, 143, 13—23.
60. Brooks J., Benner J. et al. In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 3.
61. Brown N. L., Hutchison C. A. et al. «J. Mol. Biol.», 1980, 140, 143—148.
62. Brown N. L., McClelland M. et al. «Gene», 1980, 9, 49—68.
63. Brown N. L., Smith M. «FEBS Lett.», 1976, 65, 284—287.
64. Brown N. L., Smith M. «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 1977, 74, 3213—3216.
65. Brown N. L., Smith M. In: Methods in Enzymology (Eds. Grossman L., Moldave K.), New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 65, 391—404.
66. Burgess R. R., Jendrisak J. J. «Biochemistry», 1975, 14, 4634—4638.
67. Calleja F., Dekker B. M. M. et al. «FEBS Lett.», 1984, 178, 69—72.
68. Carter I. A., Charter K. F. et al. «Nucl. Acids Res.», 1980, 8, 4943—4954.
69. Catterall J. F., Lees N. D. et al. In: Microbiology (Ed. Schlessinger D.), Washington, 1976, 7, 358—366.

70. Catterall J. F., Welker N. E. «J. Bacteriol.», 1977, 129, 1110—1120.
71. Chow F., Kempe T. et al. «Nucl. Acids Res.», 1981, 9, 2807—2817.
72. Clanton D. J., Riggsby S. W. et al. J. Bacteriol. 1979, 137, 1299—1307.
73. Clanton D. J., Woodward J. M. et al. «J. Bacteriol.», 1978, 135, 270—273.
74. Clarke C. M., Hartley B. S. «Biochem. J.», 1979, 177, 49—62.
75. Cox R. F. «Eur. J. Biochem.», 1973, 39, 49—61.
76. Cregg J. M., Nguyen A. H. et al. «Gene», 1980, 12, 17—24.
77. Croft R., Moran L. et al. In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 19.
78. Cruz A. K., Kidane G. et al. «FEBS Lett.», 1984, 173, 99—102.
79. Currier T. C., Wolk C. P. «J. Bacteriol.», 1979, 139, 88—92.
80. D'Arcy A., Brown R. S. et al. «J. Biol. Chem.», 1985, 260, 1987—1990.
81. Daly C., Fitzgerald G. F. In: Microbiology, Washington, 1982, 12, 213—216.
82. De la Campa A. D., Kale P. «J. Mol. Biol.», 1987, 196, 457—469.
83. de Waard A., Duyvesteyn M. «Arch. Microbiol.», 1980, 128, 242—247.
84. de Waard A., Korsuize J. et al. «FEBS Lett.», 1978, 96, 106—110.
85. de Waard A., van Beveren C. P. et al. «FEBS Lett.», 1979, 101, 71—76.
86. Defilippes F. M. «Anal. Biochem.», 1973, 52, 637—641.
87. Donovick R., Bayan A. P. et al. «J. Bacteriol.», 1948, 56, 125—137.
88. Duncan C. H., Wilson G. A. et al. «J. Bacteriol.», 1978, 134, 338—344.
89. Duyvesteyn M., de Waard A. «FEBS Lett.», 1980, 111, 423—426.
90. Duyvesteyn M. G. C., Korsuize J. et al. «Arch. Microbiol.», 1983, 134, 276—281.
91. Duyvesteyn M. G. C., Korsuize J. et al. «Plant. Mol. Biol.», 1981, 1, 75—79.
92. Endow S. A., Roberts R. J. «J. Mol. Biol.», 1977, 112, 521—529.
93. Eskin B., Linn S. «J. Biol. Chem.», 1972, 247, 6192—6196.
94. Fischer L. «Gel Filtration Chromatography», Amsterdam, New York, Oxford, 1980, 269 p.
95. Fitzgerald G. F., Daly C. et al. «Nucl. Acids Res.», 1982, 10, 8171—8179.
96. Fuchs C., Rosenfold E. C. et al. «Gene», 1978, 4, 1—23.
97. Fuchs C., Rosenfold E. C. et al. «Gene», 1980, 10, 357—370.
98. Fuchs L. Y., Covarrubias L. et al. «Gene», 1980, 10, 39—46.
99. Geier G. E., Modrich P. «J. Biol. Chem.», 1979, 254, 1408—1413.
100. Gelinis R. E., Myers P. A. et al. «J. Mol. Biol.», 1977, 114, 433—440.
101. Gelinis R. E., Myers P. A. et al. «J. Mol. Biol.», 1977, 114, 169—180.
102. George J., Chirikjian J. G. «Nucl. Acids Res.», 1978, 5, 2223—2232.
103. Gingeras T. R., Brooks J. E. «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 1983, 80, 402—406.
104. Gingeras T. R., Greenough L. et al. «Nucl. Acids Res.», 1981, 9, 4525—4536.
105. Goff S. P., Rambach A. «Gene», 1978, 3, 347—352.
106. Greene P. J., Bettlach M. C. et al. In: Methods in Molecular Biology (Ed. Wicner R. B.), 1974, 7, 87—111.
107. Greene P. J., Gupta M. et al. «J. Biol. Chem.», 1981, 256, 2143—2153.
108. Greene P. J., Heyneker H. L. et al. «Nucl. Acids Res.», 1978, 5, 2373—2380.
109. Greene P. J., Poonian M. S. et al. «J. Mol. Biol.», 1975, 99, 237—261.
110. Gromkova R., Goodgal S. H. «J. Bacteriol.», 1972, 109, 987—992.
111. Grosskopf R., Wolf W. et al. «Nucl. Acids Res.», 1985, 13, 1517—1528.
112. Haberman A. «J. Mol. Biol.», 1974, 89, 545—563.
113. Haggerty D. M., Schleif R. F. «J. Virol.», 1976, 18, 659—663.
114. Halford S. E., Johnson N. P. «Biochem. J.», 1981, 199, 767—777.
115. Hartmann H., Goebel W. «FEBS Lett.», 1977, 80, 285—287.
116. Hedgpeth J., Goodman H. M. et al. «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 1972, 69, 3448—3452.
117. Heitman J., Model P. «J. Bacteriol.», 1987, 169, 3243—3250.
118. Hines J. L., Chauncey T. et al. In: Methods in Enzymology (Eds. Gross-

- man L., Moldave K.), New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 65, 153—163.
119. Hinkle N. F., Miller R. V. «Plasmid», 1979, 2, 387—393.
 120. Hinsh B., Kula R.-M. «Nucl. Acids Res.», 1980, 8, 623—633.
 121. Hiraoka N., Kita K. et al. «J. Ferment. Technol.», 1985, 63, 151—157.
 122. Hobom G., Schwarz E. et al. «Nucl. Acids Res.», 1981, 9, 4823—4832.
 123. Hoshino T., Uozumi T. et al. «Biochim. Biophys. Acta», 1977, 479, 367—368.
 124. Howard K. A., Card C. et al. «Nucl. Acids Res.», 1986, 14, 7939—7951.
 125. Hughes S. G., Bruce T. et al. «Biochem. J.», 1980, 185, 59—63.
 126. Ikawa S., Shibata T. et al. «J. Biochem.», 1976, 80, 1457—1460.
 127. Imber R., Bickle T. A. «Eur. J. Biochem.», 1981, 117, 395—399.
 128. Imber R., Bickle T. «Experientia», 1979, 35, 968.
 129. Jacoby G. A., Sutton L. «Plasmid», 1977, 1, 115—116.
 130. Janulaitis A., Bitinaite J. et al. «FEBS Lett.», 1983, 151, 243—247.
 131. Janulaitis A., Povilonis P. et al. «Gene», 1982, 20, 197—204.
 132. Janulaitis A., Stakenas P. et al. «FEBS Lett.», 1983, 161, 210—212.
 133. Janulaitis A. A., Stakenas P. S. et al. «Nucl. Acids Res.», 1982, 10, 6521—6530.
 134. Janulaitis A. A., Vaitkevicius D. P. «Anal. Biochem.», 1981, 116, 116—122.
 135. Jay E., Wu R. «Biochemistry», 1976, 15, 3612—3620.
 136. Jentsch S. «J. Bacteriol.», 1983, 156, 800—808.
 137. Jentsch S., Pawlek B. et al. In: Transformation (Eds. Polsinelli, Mazra G.), Cotswold Press, Oxford, 1980, 363—369.
 138. Johannessen W., Schutte H. et al. «J. Mol. Biol.», 1979, 134, 707—726.
 139. Karreman C., de Waard A. «J. Bacteriol.», 1988, 170, 2527—2532.
 140. Kauc L., Piekarowicz A. «Eur. J. Biochem.», 1978, 92, 417—426.
 141. Kawamura F., Mizukami T. et al. «J. Virol.», 1981, 37, 1099—1102.
 142. Kawamura M., Sakakibara M. et al. «Nucl. Acids Res.», 1986, 14, 1985—1989.
 143. Kelly S., Kaddurah-Daouk R. et al. «J. Biol. Chem.», 1985, 260, 15339—15344.
 144. Kelly T. J., Smith H. O. «J. Mol. Biol.», 1970, 51, 393—409.
 145. Khosaka T., Kitwaki M. et al. «FEBS Lett.», 1983, 196, 170—174.
 146. Khosaka T., Sakurai T. et al. «Gene», 1982, 17, 117—122.
 147. Kiss A., Baldauf F. «Gene», 1983, 21, 111—119.
 148. Kiss A., Posfai G. et al. «Nucl. Acids Res.», 1985, 13, 6403—6420.
 149. Kiss A., Sain B. et al. «Gene» 1977, 1, 323—329.
 150. Klaus S., Hartmann M. et al. «Mol. Gen. Genet.», 1981, 184, 286—288.
 151. Kleid D. G. In: Methods in Enzymology (Eds. Grossman L., Moldave K.), New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 65, 163—166.
 152. Kocnc C., Kiss A. et al. «Eur. J. Biochem.», 1978, 89, 523—529.
 153. Kopecka H. «Biochim. Biophys. Acta», 1975, 391, 109—120.
 154. Kosyh V. G., Solonin A. S. et al. «Biochim. Biophys. Acta», 1981, 655, 102—106.
 155. Kruger D. H., Bickle T. A. «Microbiol. Rev.», 1983, 47, 345—360.
 156. Kunkel L. M., Silberklang M. et al. «J. Mol. Biol.», 1979, 132, 133—139.
 157. Kupper D., Guang Z. J. In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, 2.
 158. Lacks S., Greenberg B. «J. Biol. Chem.», 1975, 250, 4060—4066.
 159. Lacks S. A. In: Methods in Enzymology (Eds. Grossman L., Moldave K.), New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 65, 138—146.
 160. Lacks S. A., Mannarelli B. M. et al. «Cell.», 1986, 46, 993—1000.
 161. Lautenberger J. A., Edgell M. H. et al. «Gene», 1980, 12, 171—174.
 162. Lee K. S., Seo S. Y. et al. «Korean. Biochem. J.», 1982, 15, 315—329.
 163. Lee Y. H., Chirikjian J. G. «J. Biol. Chem.», 1979, 254, 6838—6841.
 164. Leung D. W., Lui A. C. P. et al. «Nucl. Acids Res.», 1979, 6, 17—25.
 165. Looney M. C., Landry D. et al. In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 22.
 166. Lui A. C. P., McBride B. C. et al. «Nucl. Acids Res.», 1979, 6, 1—16.

167. *Lupker H. S. C., Dekker B. M. M.* «Biochim. Biophys. Acta», 1981, 654, 297—299.
168. *Luria S. E., Human M. L.* «J. Bacteriol.», 1952, 64, 557—569.
169. *Lynn S. P., Cohen L. K. et al.* «J. Bacteriol.», 1979, 138, 505—509.
170. *Makino O., Kawamura F. et al.* «Nature» (London), 1979, 277, 64—66.
171. *Makino O., Saito H. et al.* «Mol. Gen. Genet.», 1980, 179, 463—468.
172. *Makula R. A., Meagher R. B.* «Nucl. Acids Res.», 1980, 8, 3125—3132.
173. *Manachini P., Parini C. et al.* «FEBS Lett.», 1987, 214, 305—307.
174. *Mann M. B., Rao R. N. et al.* «Gene», 1978, 3, 97—112.
175. *Matteucci M. D., Caruthers M. H.* «J. Am. Chem. Soc.», 1981, 103, 3185—3191.
176. *Maxam E. M., Gilbert W.* In: *Methods in Enzymology* (Eds. Grossman L., Moldave K.), New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 65, 499—560.
177. *Maxwell A., Halford S. E.* «Biochem. J.», 1982, 203, 77—84.
178. *Mayer H., Grosschedl R. et al.* «Nucl. Acids Res.», 1981, 9, 4833—4845.
179. *Mayer H., Reichenbach H.* «J. Bacteriol.», 1978, 136, 708—713.
180. *McConnell D. J., Searcy D. G. et al.* «Nucl. Acids Res.», 1978, 5, 1729—1739.
181. *Meselson M., Yuan R.* «Nature», 1968, 217, 1110—1114.
182. *Middleton J. H., Edgell M. H. et al.* «J. Virol.», 1972, 10, 42—50.
183. *Modrich P., Roberts R. J.* In: *Nucleases Meet.*, Cold Spring Harbour, 1982, 109—154.
184. *Modrich P., Zabel D.* «J. Biol. Chem.», 1976, 251, 5866—5874.
185. *Molemans F., van Emmelo J. et al.* «Gene», 1982, 18, 93—96.
186. *Morris D. W., Parish J. H.* «Arch. Microbiol.», 1976, 108, 227—230.
187. *Moskowitz M.* «Nature», 1963, 200, 335—337.
188. *Murray K., Hughes S. G. et al.* «Biochem. J.», 1976, 159, 317—322.
189. *New England Biolabs Catalog, 1985/1986, 7—13.*
190. *New England Biolabs Catalog, 1988/1989, 7—129.*
191. *Noyer-Weidner M., Pawlek B. et al.* «J. Virol.», 1981, 38, 1077—1080.
192. *Noyer-Weidner M. S., Jentsch S. et al.* «J. Virol.», 1983, 46, 446—453.
193. *Nwankwo D., Wilson G.* «Mol. Gen. Genet.», 1987, 209, 570—574.
194. *O'Connor C. D., Metcalf E. et al.* «Nucl. Acids Res.», 1984, 12, 6701—6708.
195. *Old R., Murray K. et al.* «J. Mol. Biol.», 1975, 92, 331—339.
196. *Petrusyte M., Janulaitis A.* «Eur. J. Biochem.», 1982, 121, 377—381.
197. *Piekarczyk A.* «J. Mol. Biol.», 1981, 157, 373—381.
198. *Pirrotta V., Bickle T. A.* In: *Methods in Enzymology* (Eds. Grossman L., Moldave K.), New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 65, 89—95.
199. *Posfai G., Kiss A. et al.* «Gene», 1986, 50, 63—67.
200. *Povilionis P., Vaisvila R. et al.* In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 24.
201. *Prangishvili D., Vachakidze R. et al.* «FEBS Lett.», 1985, 192, 57—60.
202. *Purvis I. J., Moseley B. E. B.* «Nucl. Acids Res.», 1983, 11, 5467—5474.
203. *Qiang B., Schildkraut I.* «Nucl. Acids Res.», 1986, 14, 1991—1999.
204. *Qiang B. Q., Schildkraut I. N.* «Nucl. Acids Res.», 1984, 12, 4507—4516.
205. *Qiang B. Q., Schildkraut I. N.* «Nucl. Acids Res.», 1986, 14, 1991—1999.
206. *Raleigh E. A.* «Methods Enzymol.», 1987, 152, 130—141.
207. *Raleigh E. A., Murray N. E. et al.* «Nucl. Acids Res.», 1988, 16, 1563—1575.
208. *Raleigh E. A., Wilson G.* «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 1986, 83, 9070—9074.
209. *Rambach A.* In: *Methods in Enzymology* (Eds. Grossman L., Moldave K.), New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 65, 170—173.
210. *Ravi R. S., Sozhamannan S. et al.* «Mol. Gen. Genet.», 1985, 390—392.
211. *Reaston J., Duyvesteyn M. G. S. et al.* «Gene», 1982, 20, 103—110.
212. *Reddy V. B., Thimappaya B. et al.* «Science», 1978, 200, 494—502.
213. *Rees P. A., Nwankwo D. O. et al.* In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 25.

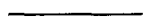
214. Reiser J., Yuan R. «Experientia», 1975, 31, 745.
215. Revel H. R. «Virology», 1967, 31, 688—701.
216. Roberts R. J. «Nucl. Acids Res.», 1984, 12, r167—r203.
217. Roberts R. J. «CRC Crit. Rev. Biochem.», 1976, 4, 123—164.
218. Roberts R. J., Breitmeyer J. B. et al. «J. Mol. Biol.», 1975, 91, 121—123.
219. Roberts R. J., Myers P. A. et al. «J. Mol. Biol.», 1976, 102, 157—165.
220. Roberts R. J., Myers P. A. et al. «J. Mol. Biol.», 1976, 103, 199—208.
221. Roberts R. J., Wilson G. A. et al. «Nature», 1977, 265, 82—84.
222. Rodicio M. R., Chater K. F. In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 7.
223. Rodicio M. R., Chater K. F. «Mol. Gen. Genet.», 1988, 213, 346—353.
224. Roizes G., Pages M. et al. «Gene», 1979, 6, 43—50.
225. Roizes G., Patillon M. et al. «FEBS Lett.», 1977, 82, 69—70.
226. Ross T. K., Achberger E. C. et al. «Gene», 1987, 61, 277—289.
227. Ross T. K., Braymer H. D. «J. Bacteriol.», 1987, 169, 1757—1759.
228. Rubin R. A., Modrich P. In: Methods in Enzymology (Eds. Grossman L., Moldave K.), New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 65, 96—104.
229. Sack G. H. Ph. D. Thesis, Johns Hopkins University, Baltimore, 1974.
230. Sanger F., Coulson A. R. «J. Mol. Biol.», 1975, 94, 441—448.
231. Sanger F., Coulson A. R. et al. «J. Mol. Biol.», 1982, 162, 729—773.
232. Sanger F., Coulson A. R. et al. «J. Mol. Biol.», 1978, 125, 225—246.
233. Sanger F., Nicklen S. et al. «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 1977, 74, 5463—5467.
234. Sasaki J., Murakami M. et al. «Agric. Biol. Chem.», 1985, 49, 3017—3022.
235. Sato S., Hutchison III C. A. et al. «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 1977, 74, 542—546.
236. Schaller H., Nusslein Ch. et al. «Eur. J. Biochem.», 1972, 26, 474—481.
237. Schleif R. In: Methods in Enzymology (Eds. Grossman L., Moldave K.), New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 65, 19—23.
238. Schmid K., Thomm M. et al. «Nucl. Acids Res.», 1984, 12, 2619—2628.
239. Schonher B., Kelly S. et al. «Gene», 1983, 24, 227—236.
240. Seurinck J., van de Voorde A. et al. «Nucl. Acids Res.», 1983, 11, 4409—4415.
241. Sharp P. A., Sugden B. et al. «Biochemistry», 1973, 12, 3055—3063.
242. Shibata T., Ando T. «Mol. Gen. Genet.», 1974, 131, 275—280.
243. Shibata T., Ando T. «Biochim. Biophys. Acta», 1976, 442, 184—196.
244. Shibata T., Ando T. «Mol. Gen. Genet.», 1975, 138, 269—279.
245. Shibata T., Ikawa S. et al. «J. Bacteriol.», 1976, 128, 473—476.
246. Shimotsu H., Takahashi H. et al. «Agric. Biol. Chem.», 1980, 44, 1665—1666.
247. Shimotsu H., Takahashi H. et al. «Gene», 1980, 11, 219—225.
248. Shinomiya T., Sato S. «Nucl. Acids Res.», 1980, 8, 43—56.
249. Sixiang S., Qiliang L. et al. «Sci. Sinica», 1980, 23, 1435—1442.
250. Slatko B. E., Benner J. S. et al. «Nucl. Acids Res.», 1987, 15, 9781—9796.
251. Smith D. I., Blattner F. R. et al. «Nucl. Acids Res.», 1976, 3, 343—354.
252. Smith H. O., Marley G. M. In: Methods in Enzymology (Eds. L. Grossman, K. Moldave), New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 65, 104—108.
253. Smith H. O., Wilcox K. W. «J. Mol. Biol.», 1970, 51, 379—391.
254. Smith L. A., Chirikjian J. G. «J. Biol. Chem.», 1979, 254, 1003—1006.
255. Som S., Bhagwat A. S. et al. «Nucl. Acids Res.», 1987, 15, 313—332.
256. Stawinski J., Hozumi T. et al. «Nucl. Acids Res.», 1977, 4, 353—371.
257. Sternbach H., Engelhardt R. et al. «Eur. J. Biochem.», 1975, 60, 51—55.
258. Stobberingh E. E., Schiphof R. et al. «J. Bacteriol.», 1977, 131, 645—649.
259. Studier F. W., Moffatt B. A. «J. Mol. Biol.», 1986, 189, 113—130.
260. Sugisaki H., Kanazawa S. «Gene», 1981, 16, 73—78.
261. Sugisaki H., Maekawa Y. et al. «Bull. Inst. Chem. Res.», Kyoto Univ., 1982, 60, 328—335.
262. Sugisaki H., Maekawa Y. et al. «Nucl. Acids Res.», 1982, 10, 5747—5752.

263. Sumegi J., Breedveld D. et al. «Biochem. Biophys. Res. Commun.», 1977, 76, 78—85.
 264. Sussenbach J. S., Monfoort C. H. et al. «Nucl. Acids Res.», 1976, 3, 3193—3202.
 265. Sussenbach J. S., Steenbergh P. H. et al. «Nucl. Acids Res.», 1978, 5, 1153—1164.
 266. Sutcliffe J. F. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol., 1978, 43, 77—90.
 267. Szekeres M. «Virology», 1981, 111, 1—10.
 268. Sznyter L. A., Brooks J. E. In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 27.
 269. Sznyter L. A., Slatko B. et al. «Nucl. Acids Res.», 1987, 15, 8249—8266.
 270. Szomolanyi I., Kiss A. et al. «Gene», 1980, 10, 219—225.
 271. Takanami M., Kojo H. «FEBS Lett.», 1973, 29, 267—270.
 272. Theriault G., Roy P. H. et al. «Nucl. Acids Res.», 1985, 13, 8441—8461.
 273. Thomas M., Davis R. W. «J. Mol. Biol.», 1975, 91, 315—328.
 274. Tomassini J., Roychoudhury R. et al. «Nucl. Acids Res.», 1978, 5, 4055—4064.
 275. Trautner T. A., Pawlek B. et al. «Mol. Gen. Genet.», 1974, 109, 181—191.
 276. Trautner T. A., Pawlek B. et al. «Mol. Gen. Genet.», 1980, 180, 361—367.
 277. Tu C.-P. D., Roychoudhury R. et al. «Biochem. Biophys. Res. Commun.», 1976, 72, 355—362.
 278. Tu C.-P. D., Wu R. In: Methods in Enzymology (Eds. Grossman L., Moldave K.), New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 65, 620—638.
 279. Van Cott E. M., Lunnen K. D. et al. In: «Workshop on biological DNA modification», New England Biolabs, Gloucester, MA, 1988, p. 28.
 280. van den Hondel C. A. M. J. J., van Leen R. W. et al. «FEMS Microbiol. Lett.», 1983, 16, 7—12.
 281. Van Heuverswyn H., Fiers W. «Gene», 1980, 9, 195—203.
 282. Vasquez C. «Biochem. International», 1985, 10, 655—662.
 283. Venetianer P. In: Methods in Enzymology (Eds. Grossman L., Moldave K.), New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 65, 109—112.
 284. Walder R. Y., Hartley J. L. et al. «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 1981, 78, 1503—1507.
 285. Walder R. Y., Langtimm C. J. et al. «J. Biol. Chem.», 1983, 258, 1235—1241.
 286. Walder R. Y., Walder J. A. et al. «J. Biol. Chem.», 1984, 259, 8015—8026.
 287. Walter F., Hartmann M. et al. In: Abstracts of 12th FEBS Symposium, Dresden, 1978, Abstract 0648.
 288. Wang R. Y. H., Chedlarski J. G. et al. «Biochim. Biophys. Acta», 1980, 606, 371—385.
 289. Wani A. A., Stephens R. E. et al. «Biochim. Biophys. Acta», 1982, 697, 178—184.
 290. Watabe H., Shibata T. et al. «J. Biochem.», 1981, 90, 1623—1632.
 291. Watabe H., Shibata T. et al. «Biochem. J.», 1984, 95, 1677—1690.
 292. Watson R., Zuker M. et al. «FEBS Lett.», 1980, 118, 47—50.
 293. Watson R. J., Schildkraut I. et al. «FEBS Lett.», 1982, 150, 111—116.
 294. Whitehead P. R., Brown N. L. «Arch. Microbiol.», 1985, 141, 70—74.
 295. Whitehead P. R., Brown N. L. «FEBS Lett.», 1982, 143, 296—300.
 296. Wilson G. A., Young F. E. «J. Mol. Biol.», 1975, 97, 123—125.
 297. Wu R., King C. T. et al. «Gene», 1978, 4, 329—336.
 298. Xia Y., Burbank D. et al. «Nucl. Acids Res.», 1986, 14, 6017—6030.
 299. Yamada Y., Yoshioka H. et al. «J. Gen. Appl. Microbiol.», 1983, 29, 157—166.
 300. Yoshimori R. PhD Thesis, University of California, San Francisco, 1971.
 301. Yoshimori R., Roulland-Dussoix D. et al. «J. Bacteriol.», 1972, 112, 1275—1279.
 302. Yoshioka H., Nakamura H. et al. «Agric. Biol. Chem.», 1983, 47, 2871—2879.
 303. Zain B. S., Roberts R. J. «J. Mol. Biol.», 1977, 115, 249—255.
-

СО Д Е Р Ж А Н И Е

От редактора	3
А. А. Янулайтис. Ферменты рестрикции и их применение.	4
Введение	4
Часть I. ФЕРМЕНТЫ РЕСТРИКЦИИ II ТИПА	6
1. Ферменты рестрикции, их номенклатура и классификация	6
2. Распространение рестриктаз	12
3. Таксоноспецифичность рестриктаз	25
4. Характеристика субстратной специфичности рестриктаз	33
4.1. Узнаваемая последовательность нуклеотидов	33
4.2. Релаксированная специфичность рестриктаз	41
4.3. Место расщепления субстрата	43
4.4. Специфичность рестриктаз в отношении природных модификаций основания	45
4.4.1. Специфичность рестриктаз по отношению к местоположению модифицированного основания	47
4.4.2. Чувствительность рестриктаз к природе минорного основания	48
4.4.3. Сводные данные о чувствительности рестриктаз к модификациям субстрата	49
4.4.4. Чувствительность изоизомеров к местоположению метилированного основания	57
4.4.5. Чувствительность рестриктаз к m ⁵ CG и m ⁵ CNG метилированию субстрата	58
4.4.6. Чувствительность рестриктаз к dam и dcm зависимому метилированию	58
4.4.7. Чувствительность метилаз к модификациям субстрата	62
4.5. Практическое применение сведений о различных проявлениях субстратной специфичности рестриктаз	63
5. Физико-химические свойства рестрикционных эндонуклеаз	66
6. Ферментативные свойства рестриктаз	68
6.1. Каталитические свойства рестрикционных эндонуклеаз	69
6.1.1. Эффективные кинетические параметры	69
6.1.2. Механизм реакции гидролиза кольцевых форм ДНК эндонуклеазами рестрикции	70
6.1.3. Исследование процесса гидролиза линейных форм ДНК эндонуклеазами рестрикции	74
6.1.4. Гидролиз синтетических олигонуклеотидов эндонуклеазами рестрикции	76
6.1.5. Расщепление однонитевой ДНК эндонуклеазами рестрикции	77
7. Взаимодействие рестриктаз II типа с модифицированными субстратами	78
7.1. Роль отдельных групп атомов гетероциклических оснований участка узнавания	79
7.1.1. Аденин	80
7.1.2. Тимин	82
7.1.3. Цитозин	84
7.1.4. Гуанин	87
7.2. Влияние нуклеотидных последовательностей, фланкирующих участков узнавания	88
7.3. Взаимодействие рестриктаз с углеводфосфатным остовом участка узнавания	90
7.3.1. Фосфатные группы	90
7.3.2. Углеводный остаток	92
7.4. Некоторые аспекты взаимодействия рестриктаз с отдельным нуклеотидом (или его звеном) участка узнавания	94
8. Рентгеноструктурное исследование комплекса рестриктазы EcoRI с субстратом	96
9. Молекулярная генетика ферментов рестрикции-модификации	100

9.1. Структура генов рестрикции-модификации	101
9.2 Регуляция экспрессии генов рестрикции-модификации	104
9.2.1. Структура регуляторных областей генов gm	105
9.2.2. Возможные механизмы скоординированной экспрессии генов gm	107
9.3. Гомология генов, кодирующих ферменты рестрикции-модификации	114
Литература	116
Часть II. МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕСТРИКТАЗ	126
1. Определение активности рестриктаз	126
2. Поиск продуцентов рестриктаз	130
2.1. Биологические подходы к поиску продуцентов рестриктаз	131
2.2. Биохимические методы поиска продуцентов специфических эндонуклеаз	135
3. Очистка рестриктаз	141
3.1. Получение бесклеточных экстрактов	144
3.2. Разделение нуклеиновых кислот и рестриктаз	144
3.2.1. Нехроматографические методы	145
3.2.2. Хроматографические методы разделения нуклеиновых кислот и рестриктаз	148
3.3. Методы, используемые для очистки рестриктаз	154
3.4. Возможные перспективные направления развития препаративной биохимии рестриктаз	160
3.4.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография	160
3.4.2. Новые методические подходы к разработке схем очистки	161
3.5. Выделение гомогенных препаратов рестриктаз	162
4. Определение субстратной специфичности рестриктаз	170
4.1. Косвенные методы определения узнаваемого участка	170
4.2. Методы определения места расщепления субстрата	173
5. Клонирование генов рестрикции-модификации	180
5.1. Методические аспекты клонирования генов gm	185
5.2. Факторы, влияющие на успешное клонирование генов gm	188
5.2.1. Скоординированная экспрессия	188
5.2.2. Ограничение модифицированной ДНК	191
5.3. Конструирование продуцентов рестриктаз и метилаз	193
Литература	195



Технический редактор *В. С. Рябова*

Корректор *В. В. Рассказова*

Сдано в набор 28.07.89

Подписано в печать 06.10.89

T—15133

Формат бумаги 60×90¹/₁₆

Бум. кн.-журн.

Литературная гарнитура

Высокая печать.

Усл. печ. л. 12,75

Усл. кр.-отт. 12,94

Уч.-изд. л. 14,53

Тираж 500

Заказ 5933

Цена 1 р. 50 к.

Адрес редакции: 125219, Москва, А-219, Балтнйская ул., 14. Тел. 155-42-12

Производственно-издательский комбинат ВИНТИ,

140010, Люберцы, 10. Московской обл., Октябрьский просп., 403

УДК 577.21

А. А. Янулайтис. Ферменты рестрикции и их применение — Итоги науки и техники. ВИНТИ. Биотехнология. т. 17, 1989. 1—201

Обзор содержит информацию о способах поиска, характеристики, свойствах и использовании ферментов рестрикции, ключевой группы ферментов, необходимых для проведения современных теоретических и прикладных молекулярно-биологических исследований. Библ. 722

Зак. 5933