**Абросимова, Людмила Алексеевна.**

## Гетеродимерная эндонуклеаза рестрикции BspD61 и конъюгаты гомодимерной эндонуклеазы рестрикции SsoII с олигодезоксирибонуклеотидами : особенности взаимодействия с ДНК : диссертация ... кандидата химических наук : 02.00.10 / Абросимова Людмила Алексеевна; [Место защиты: Моск. гос. ун-т им. М.В. Ломоносова]. - Москва, 2016. - 169 с. : ил.

## Оглавление диссертациикандидат наук Абросимова, Людмила Алексеевна

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВВЕДЕНИЕ

ГЛАВА 1. КОНСТРУИРОВАНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ НИКУЮЩИХ ЭНДОНУКЛЕАЗ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ (Обзор литературы)

1.1. Встречающиеся в природе эндонуклеазы рестрикции и никующие эндонуклеазы

1.2. Конструирование искусственных никующих эндонуклеаз

1.2.1. Получение никующих эндонуклеаз путем нарушения димеризационного интерфейса эндонуклеаз рестрикции

1.2.2. Получение никующих эндонуклеаз на основе гомодимерных эндонуклеаз рестрикции, содержащих один каталитический центр в каждой субъединице

1.2.3. Получение никующих эндонуклеаз путем инактивации одного из каталитических центров эндонуклеаз рестрикции

1.2.4. Получение никующих эндонуклеаз в результате случайного мутагенеза генов эндонуклеаз рестрикции

1.2.5. Получение никующих эндонуклеаз из «хоуминг»-эндонуклеаз

1.3. Стимулирование матрично-независимого синтеза ДНК никующими эндонуклеазами

1.4. Практическое использование сайт-специфических никующих эндонуклеаз

1.4.1. Изотермическая амплификация ДНК

1.4.2. Способы детекции ДНК с использованием никующих эндонуклеаз

1.4.3. Перемещение олигодезоксирибонуклеотида

1.4.4. Клонирование фрагментов ДНК без использования ДНК-лигаз

1.4.5. Детекция РНК с использованием никующих эндонуклеаз

1.4.6. Введение модификаций во внутренние участки ДНК с использованием никующих эндонуклеаз

1.4.7. Использование никующих эндонуклеаз в секвенировании ДНК

1.4.8. Использование никующих эндонуклеаз при анализе профиля метилирования

1.5. Изменение активности никующих эндонуклеаз с помошью псевдокомплементарных ПНК

1.6. Высокоспецифичные эндонуклеазы

1.6.1. Мегануклеазы

1.6.2. Эндонуклеазы с мотивом «цинковые пальцы»

1.6.3. TALE-нуклеазы

1.6.4. Нуклеазы, связанные с триплекс-образующим олигонуклеотидом (TFO-нуклеазы)

1.6.5. Эндонуклеазы системы CRISPR/Cas

1.6.6. Нуклеазы, узнающие «флэп»-структуру в ДНК

1.7. Создание эндонуклеаз с регулируемой активностью

ГЛАВА 2. ГЕТЕРОДИМЕРНАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА РЕСТРИКЦИИ BspD6I И КОНЪЮГАТЫ ГОМОДИМЕРНОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ SsoП С ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДАМИ: ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С

ДНК (Результаты и их обсуждение)

2.1. Характеристика объектов исследования

2.2. Изучение свойств эндонуклеазы рестрикции BspD6I и особенностей ее взаимодействия с ДНК

2.2.1. Определение угла изгиба ДНК, индуцируемого никующей эндонуклеазой BspD6I

2.2.2. Характеристика свойств эндонуклеазы рестрикции BspD6I с помощью немодифицированных ДНК-дуплексов

2.2.3. Взаимодействие эндонуклеазы рестрикции BspD6I с метилированными ДНК-дуплексами

2.2.4. Взаимодействие эндонуклеазы рестрикции BspD6I с азобензолсодержащими ДНК-дуплексами

2.3. Разработка подходов к регулированию активности никующей эндонуклеазы BspD6I с использованием модифицированных ДНК-дуплексов

2.3.1. Подбор оптимальной структуры негидролизуемых аналогов субстрата Nt.BspD6I

2.3.2. Изучение активности Nt.BspD6I в присутствии азобензолсодержащих дуплексов при облучении светом

2.3.3. Использование триэтиленгликольсодержащего дуплекса для регулирования активности Nt.BspD6I в зависимости от температуры

2.4. Изучение свойств конъюгатов гомодимерной эндонуклеазы рестрикции SsoII с ДНК-фрагментами

2.4.1. Выбор положения модификации эндонуклеазы рестрикции SsoII олигонуклеотидом

2.4.2. Выбор структуры олигонуклеотида для ковалентного присоединения к эндонуклеазе рестрикции SsoII

2.4.3. Зависимость устойчивости ДНК-дуплексов от температуры

2.4.4. Модификация мутантной формы R.SsoII(2CS/S171C) олигонуклеотидами, содержащими азобензольную вставку

2.4.5. Гидролиз ДНК-субстрата конъюгатами R.SsoII(2CS/S171C) с азобензол-содержащими олигонуклеотидами в зависимости от облучения УФ-светом

2.4.6. Гидролиз ДНК-субстрата конъюгатами R.SsoII(2CS/S171C) с олигонуклеотидами в зависимости от температуры

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Реактивы и материалы

3.2. Приборы и методы

3.3. Общие методики

3.3.1. Методики, использованные при определении угла изгиба ДНК, индуцированного связыванием Nt.BspD6I

3.3.2. Анализ связывания и гидролиза никующей эндонуклеазой BspD6I и эндонуклеазой рестрикции BspD6I синтетических ДНК-дуплексов

3.3.3. Анализ связывания никующей эндонуклеазой BspD6I синтетических ДНК -дуплексов методом акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре

3.3.4. Регулирование активности никующей эндонуклеазы BspD6I с помощью облучения светом и изменения температуры реакции

3.3.5. Выделение препаратов R.SsoII(2CS/S171C) методом аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе

3.3.6. Получение конъюгатов эндонуклеазы рестрикции SsoII(2CS/S171C) с

олигонуклеотидами

4

3.3.7. Изучение активности эндонуклеазы рестрикции SsoII(2CS/S171C) в зависимости от облучения светом и изменения температуры реакции

ВЫВОДЫ