**Субач, Федор Васильевич.**

## Исследование структуры комплекса эндонуклеазы рестрикции EcoRII с ДНК с помощью биохимических и спектральных методов : диссертация ... кандидата химических наук : 02.00.10. - Москва, 2005. - 142 с. : ил.

## Оглавление диссертациикандидат химических наук Субач, Федор Васильевич

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.

ВВЕДЕНИЕ.

ГЛАВА 1. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭР ТИПА IIИ СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭР ТИПА НЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).

1.1. Методы изучения ЭР типа II.

1.1.1. Кинетический подход.

1.1.1.1. Методы регистрации расщепления ДНК.

1.1.1.2. Стационарная кинетика гидролиза.

1.1.1.3. Однооборотная кинетика гидролиза ДНК.

1.1.1.4. Влияние условий на кинетику расщепления ДНК ЭР.

1.1.1.5. Классификация ЭР типа II согласно их кинетическим механизмам расщепления ДНК.

1.1.2. Использование модифицированных субстратов для изучения контактов, образуемых ЭР с ДНК.

1.1.2.1. Модификация гетероциклических оснований.

1.1.2.1.1. Классификация модификаций.

1.1.2.1.2. Энергетическая оценка ДНК-белковых взаимодействий в терминах теории переходного состояния.

1.1.2.1.3. Факторы, которые необходимо учитывать при определении ДНКбелковых контактов.

1.1.2.1.4. Наиболее охарактеризованные модификации.

1.1.2.1.5. Мало охарактеризованные модификации.

1.1.2.1.6. Определение контактов со стороны белка, с помощью модифицированных аналогов субстрата.

1.1.2.2. Модификация углеводофосфатного остова.

1.1.2.2.1. Статистическое алкилирование или футпринтинг.

1.1.2.2.2. Межнуклеотидная тиофосфатная (Ps-) группа.

1.1.3. Аффинная модификация ЭР типа II.

1.1.3.1. Зондирование ДНК-белковых контактов.

1.1.3.1.1. 5-Иодо-2'-дезоксиуридин (5-IdU) и 5-иодо-2'-дезоксицитидин (5-IdC).

1.1.3.1.2. 5-бромо-2'-дезоксиуридин (5-BrdU).

1.1.3.1.3. 6-тио-2'-дезоксигуанозин (d6SG) и 4-тио-2'-дезокситимидин (d4ST).

1.1.3.1.4. Азидофенацильная группа.

1.1.3.1.5. Замещённая пирофосфатная группа (ЗПГ).

1.1.3.1.6. Диальдегидная группа.

1.1.3.2. Определение механизма действия ЭР типа II с помощью аффинной модификации ЭР или модификации ЭР низкомолекулярными бифункциональными реагентами.

1.1.4. Использование спектроскопических методов для изучения ЭР типа II.

1.2. Сравнительный анализ ЭР типа НЕ.

1.2.1. Структурная организация.

1.2.2. Гомология с другими ферментами.

Ф 1.2.3. Механизм гидролиза ДНК.

1.2.3.1. Критерии двухсайтового механизма действия ЭР.

1.2.3.2. Число гидролизуемых связей.

1.2.3.3. Зависимость гидролиза от длины односайтового субстрата.

1.2.3.4. Цис- и /я/«шс-взаимодействия.

1.2.2.5. Механизм транслокации.

1.2.2.6. Кинетические модели гидролиза ДНК.

ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСА ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ ECORIIС ДНК С ПОМОЩЬЮ БИОХИМИЧЕСКИХ И СПЕКТРАЛЬНЫХ МЕТОДОВ (ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ).

2.1. Зондирование контактов эндонуклеазы EcoRII с фосфатными группами ДНК.

2.1.1. ДНК-дуплексы, содержащие модифицированные углеводные остатки.

2.1.2. ДНК-дуплексы, содержащие межнуклеотидную хиральную тиофосфатную группу.

2.1.2.1. Синтез и хроматографическое разделение Rp- и »Ур-диастереомеров 12-звенных олигонуклеотидов.

2.1.2.2. Получение 12-звенных олигонуклеотидов, содержащих хиральную тиофосфатную группу, с помощью хроматографического разделения 5-7-звенных олигонуклеотидов и последующего ферментативного лигирования.

2.1.2.3. Определение конфигурации тиофосфатной группы.

2.1.2.4. Гидролиз эндонуклеазой EcoRII ДНК-дуплексов, содержащих в участке узнавания EcoRII тиофосфатную группу.

2.1.3. Зондирование контактов эндонуклеазы EcoRII с группами атомов ДНК, расположенными в малой бороздке, с помощью ДНК-дуплексов, содержащих остатки (+)- или (-)-/мрянс-ан/ми-бензо[а]пирена^ -dG.

2.2. Идентификация участка эндонуклеазы EcoRII, взаимодействующего с центральной нуклеотидной парой участка узнавания в ДНК, методом фотоаффинной модификации.

2.3. Изучение структуры комплекса R.EcoRII-ДНК с помощью флуоресценции.

2.3.1. Взаиморасположение участков узнавания EcoRH в комплексе R.EcoRII-ДНК.

2.3.1.1. Транс-локализация участков узнавания.

2.3.1.2. Zfuc-локализация участков узнавания.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

3.1. Материалы.

3.2. Приборы и методы.

3.3. Общие методики.

3.3.1. Выделение R.EcoRII.

3.3.2. Хроматографическое разделение Rp- и ^р-диастсрсомсров олигонуклеотидов и определение их конфигурации.

3.3.3.5'-Фосфорилирование олигонуклеотидов.

3.3.4. Ферментативное лигирование.

3.3.5. Выделение олигонуклеотидов из геля.

3.3.6. Гидролиз ДНК-дуплексов эндонуклеазой EcoRII.

3.3.7. Разделение (-)- и (+)-диастереомеров олигонуклеотидов, содержащих остаток (+,-)-TpaHc-aHTH-B[a]P-N2-dG.

3.3.8. Получение ДНК методом ПЦР.

3.3.9. Комплексообразование ЭР EcoRII с ДНК.

3.3.10. Фотоаффинная модификация ЭР EcoRII IdU-содержащими ДНК-дуплексами.

3.3.11. Гидролиз ковалентных конъюгатов протеолитическими ферментами с последующей очисткой и анализом.

3.3.12. Измерение переноса энергии и расчет геометрии петли ДНК.

ВЫВОДЫ.