

Анализ кинетики взаимодействия никующей эндонуклеазы VspD6I с ДНК

Андреева Н.А., Абросимова Л.А.

Студент, 6 курс специалитета

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,

химический факультет, Москва, Россия

E-mail: nataliaandreeva93@hotmail.com

Объектом работы является никующая эндонуклеаза (НЭ) VspD6I. НЭ узнают в двуцепочечной ДНК короткую специфическую последовательность и расщепляют одну цепь ДНК в фиксированном положении относительно участка узнавания. НЭ нашли широкое применение в различных областях молекулярной биологии, однако механизм их взаимодействия с ДНК практически не изучен.

Взаимодействие эндонуклеаз с ДНК протекает в миллисекундном и секундном диапазонах, поэтому для установления механизма функционирования НЭ VspD6I выбран метод «остановленного потока». Кинетические кривые проанализированы с помощью программ OriginPro и DynaFit. Эффективность гидролиза ДНК ферментом анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле.

Сконструированы две серии ДНК-субстратов: 19-звенные дуплексы, содержащие пару флуорофоров FAM/BNQ1, и немодифицированные дуплексы длиной 17-26 пар нуклеотидов (п.н.). Определены кинетические схемы взаимодействия 19-звенного ДНК-субстрата с НЭ VspD6I в присутствии ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} . Экспериментальные кривые для серии ДНК-субстратов разной длины обработаны суммой двух экспонент. Скорость неспецифического связывания ДНК-дуплекса с НЭ линейно уменьшается с увеличением длины субстрата предположительно за счет появления возможности скольжения фермента вдоль ДНК. Скорость образования специфического комплекса выше для ДНК длиной 17 и 19 п.н. и не изменяется при увеличении длины субстрата ≥ 21 п.н.

Минимальная кинетическая схема взаимодействия НЭ VspD6I с ДНК-субстратом в присутствии ионов Ca^{2+} включает одну обратимую стадию комплексообразования, наиболее вероятно вызванную изгибом ДНК под действием фермента. В присутствии ионов Mg^{2+} фиксируется две обратимых стадии комплексообразования: стадия катализа и обратимая стадия диссоциации продукта гидролиза из его комплекса с НЭ. Для образования полноценного фермент-субстратного комплекса необходимо 6 п.н. после расщепляемого НЭ VspD6I межнуклеотидного узла.

Авторы выражают благодарность за помощь в выполнении работы д.х.н. Кузнецову Н.А. (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия) и д.х.н., проф. Кубаревой Е.А. (НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет, Москва, Россия).

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-00049).