

# Pavienių molekulių fluorescencijos mikroskopija DNR sąveikos su BfiI restriktazėmis tyrimuose

## Studies of DNA interaction with BfiI restriction enzymes using single - molecule fluorescent microscopy

Marijonas Tutkus<sup>1</sup>, Giedrė Karzaitė<sup>1</sup>, Šarūnė Ivanovaitė<sup>1</sup>, Tomas Marčiulionis<sup>1</sup>, Danielis Rutkauskas<sup>1</sup>, Mindaugas Zaremba<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Vilniaus universitetas, Biotechnologijos institutas, Saulėtekio al. 7, 10257 Vilnius

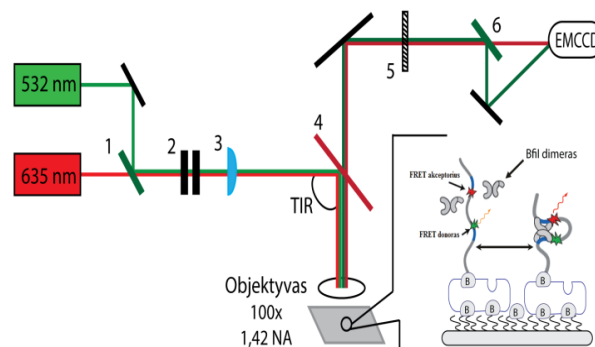
<sup>2</sup> Fizinių ir technologijos mokslų centras, Savanorių pr. 231, 02300 Vilnius  
danielis@ar.fi.lt, marijonas@ar.fi.lt

Restrikcijos endonuklezės (REazės) – tai fermentai, kurių funkcija yra atpažinti specifinę DNR taikinio seką ir ją perkirpti. Jos yra bene vienas svarbiausių įrankių molekulinėje biologijoje, genetikoje ir biotechnologijoje, kurios palengvina laboratorijoje atliekamas analizės.

Šiame darbe tiriamos REazės: WT BfiI, BfiI S-S, BfiI K107A. BfiI baltymai, išskiriami iš *Bacillus firmus* S8120 štamo, yra priskiriami IIS tipo restrikcijos fermentams. BfiI restriktazė skiriasi nuo kitų IIS tipo restriktazių tuo, kad skirtingai nuo daugelio restrikcijos fermentų DNR karpoma nesant Mg<sup>2+</sup>, bet šis kofaktorius pagreitina karpymą dėl konformacinių pokyčių. BfiI pasiekia maksimalų aktyvumą tik tuomet, kai sąveikauja su dviem restrikcijos atpažinimo sekomis. BfiI REazė atpažįsta nepalindromines asimetrines heksanukleotidines ACTGGG sekas. Šis fermentas karpoma dvigrandę DNR vienu po kito einančiais etapais, panaudojant vieną aktyvų centrą, pirmiausia karpoma DNR apatinė grandinė, o po to – viršutinė [1, 2].

Šiame darbe baltymo, indukuojančio DNR kilpojimasi, analizei, dinamikai ir konformaciniams pokyčiams nustatyti, mes taikome smFRET metodą. Ši technologija yra vienas iš pagrindinių biofizikinių metodų, labiausiai pritaikomų vienos molekulės mikroskopijos ar spektroskopijos tyrimams, nes atstumas tarp dažiklių ruožas, kuriame yra jautrus FRET, gerai sutampa su biomolekulių dydžiais. Pavienių molekulių mikroskopija yra galingas metodas, padedantis analizuoti konformacinę dinamiką ir laikinas nehomogeniškas sąveikas [3].

Analizuojant pavienės molekulės TIRF mikroskopu biotinilintos ir FRET pora (cy3B, Atto647N arba cy3, Atto647N) žymėtos DNR molekulės buvo imobilizuotos ant silanizuoto ir PEGilizuoto stiklo paviršiaus per neutravidiną. Ypatingai stipri ir ilgai trunkanti biotino-neutravidino sąveika užtikrina, kad imobilizuotos molekulės neatsiskirs nuo paviršiaus, ir todėl jos gali būti analizuojamos net iki kelių valandų. BfiI dimeras, prisijungęs du DNR taikinius, indukuoja DNR kilpojimasi. Tokiu būdu, dažikliai, esantys prie REazės taikinių, suartėja, ir donoro fluorescencijos energija rezonansiniu būdu yra perduodama į akceptorius. Pernašos sparta priklauso nuo atstumo tarp dažiklių (žr. 1 paveikslėlį).



1 pav. Eksperimento schema

Mūsų atlikti BfiI tyrimai parodė, kad vienas dimeras prisijungia du taikinius, esančius ant vienos DNR molekulės, ir taip suformuoja vieno tipo DNR kilpą. BfiI aktyvaus centro mutantas K107A parodė skirtingą dinaminę sąveiką su DNR negu S-S skersiniais ryšiais sujungtas BfiI S-S baltymas.

*Reikšminiai žodžiai: pavienės molekulės, FRET, restrikcijos endonuklezės, TIRF, DNR baltymo sąveika.*

### Literatūra

- [1] D. Golovenko, E. Manakova, L. Zakrys, M. Zaremba. *Nucleic Acids Res.* (2014).
- [2] S. Grazulis, E. Manakova, M. Roessle, M. Bochtler. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2005).
- [3] H. P. Lu. *Methods in Molecular Biology* (2005).