

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



ИРКУТСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

**ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ  
ПРИКЛАДНАЯ ХИМИЯ  
И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Научный журнал

**Выпуск № 2 (13)**



**ИЗДАТЕЛЬСТВО  
Иркутского национального исследовательского  
технического университета  
2015**



## СОДЕРЖАНИЕ

## ОРГАНИЧЕСКИЙ И НЕОРГАНИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ

Лебедева О.В., Синев А.Э. Гибридные композиты и их свойства.....	7
Шаглаева Н.С. Синтез ударопрочного полистирола.....	11

## ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ПРИРОДНОГО И ТЕХНОГЕННОГО СЫРЬЯ

Яковлева А.А., Мальцева Г.Д. Влияние оксида цинка на поглотительную способность талька.....	16
---	----

## ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Гришин Д.В., Соколов Н.Н. Рекомбинантные эластомерные белки как основа для создания новых тканеинженерных матриц.....	24
Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Браилко В.А., Лесникова-Седошенко Н.П. Биотехнологические и физиологические особенности культивирования <i>in vitro</i> ценных генотипов розы эфиромасличной.....	37
Абросимова Л.А., Мигур А.Ю., Кубарева Е.А., Венде В., Железная Л.А., Орцкая Т.С. Разработка ингибиторов никующей эндонуклеазы BspD6I на основе синтетических фрагментов ДНК.....	48
Базарнова Ю.Г. Биотехнологический потенциал сухого экстракта бересты и возможности его использования в технологии продуктов здорового питания.....	59
Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Мамаев А.Л., Кузнецов В.Л., Мосеенков С.И. Биокатализаторы с активностью термостабильной липазы для процессов биоконверсии триглицеридов растительных масел: приготовление и свойства.....	65
Соколова М.Г., Белоголова Г.А., Акимова Г.П., Верхотуров В.В. Бактериальные технологии в физиологии растений при техногенезе.....	76
Галкин А.Ю., Горшунов Ю.В., Соловьева В.Ф. Оптимизация методики получения Fc-фрагментов IgA человека .....	80

## ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ПРОИЗВОДСТВА И ЗАЩИТА ОТ КОРРОЗИИ

Михайлов Б.Н. Исследование наномодифицированных водоэмульсионных красок..	87
---	----

## ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ХИМИИ И ТЕХНОЛОГИИ

Филатова Е.Г. Обзор технологий очистки сточных вод от ионов тяжелых металлов, основанных на физико-химических процессах.....	97
Гунич С.В., Янчуковская Е.В., Днепровская Н.И. Анализ современных методов переработки твердых бытовых отходов.....	110

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Бегунов А.И., Бегунов А.А. Будущие технологии лёгких металлов и кремния.....	116
--	-----

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ.....	118
ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ.....	125

## CONTENTS

## ORGANIC AND NON-ORGANIC SYNTHESIS

- Lebedeva O.V., Sinev A.E.** Hybrid composites and their properties..... 7  
**Shaglaeva N.S.** Synthesis of high-impact polystyrene..... 11

## CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF NATURAL AND TECHNOGENIC RAW MATERIALS

- Yakovleva A.A., Mal'tseva G.D.** The effect of zinc oxide on the absorption capacity of talc..... 16

## APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

- Grishin D.V., Sokolov N.N.** Recombinant elastomeric proteins as baseline for creation of new scaffolds for tissue engineering..... 24  
**Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Brailko V.A., Lesnikova-Sedoshenko N.P.** Biotechnology and physiology features of valuable genotypes of essential oil roses *in vitro* cultivation..... 37  
**Abrosimova L.A., Migur A.Y., Kubareva E.A., Wende W., Zheleznaya L.A., Oretskaya T.S.** Engineering of the inhibitors of nicking endonuclease BspD6I using synthetic DNA fragments..... 48  
**Bazarnova U.G.** Dry birchbark extracts biotechnological potential and possibilities of its using in the healthy food technology..... 59  
**Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B., Mamaev A.L., Kuznetsov V.L., Moiseenkov S.I.** Biocatalysts with the activity of thermostable lipase for the processes of vegetable oil triglycerides' bioconversion: preparation and properties..... 65  
**Sokolova M.G., Belogolova G.A., Akimova G.P., Verkhoturov V.V.** Bacterial technologies in plant physiology under technogenic impact..... 76  
**Galkin A.Yu., Gorshunov Yu.V., Solovjova V.F.** Optimization procedures for human IgA Fc-fragments preparing..... 80

## ELECTROCHEMICAL PRODUCTION AND ANTICORROSION PROTECTION

- Mikhailov B.N.** Study of nanomodified water-emulsion paints..... 87

## ENVIRONMENTAL ISSUES OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

- Filatova E.G.** Wastewater treatment from heavy metal ions, based on the physico-chemical processes. Review..... 97  
**Gunich S.V., Yanchukovskaya E.V., Dneprovskaya N.I.** Analysis of modern methods of hard domestic wastes processing..... 110

## BRIEF COMMUNICATIONS

- Begunov A.I., Begunov A.A.** Future technologies of light metals and silicon..... 116

- AUTHORS' INDEX**..... 118  
**GUIDE FOR AUTHORS**..... 125

lications of the OJIP fluorescence transient. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 2011, vol. 104, no. 1–2, pp. 236–257. doi:10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010.

Поступила в редакцию 2 апреля 2015 г.  
После переработки 17 апреля 2015 г.

УДК 577.151.45

## РАЗРАБОТКА ИНГИБИТОРОВ НИКУЮЩЕЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ BspD6I НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФРАГМЕНТОВ ДНК

Л.А. Абросимова<sup>1</sup>, А.Ю. Мигур<sup>1</sup>, Е.А. Кубарева<sup>1</sup>,  
В. Венде<sup>2</sup>, Л.А. Железная<sup>3</sup>, Т.С. Орецкая<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, 1.

<sup>2</sup>Университет имени Юстуса Либиха, институт Биохимии,  
D-35392, Германия, г. Гиссен, Хайнрих-Буфф-Ринг, 58.

<sup>3</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,  
142290, Россия, Московская область, г. Пущино, Институтская ул., 3, oretskaya@belozersky.msu.ru

*Никующие эндонуклеазы (НЭ), узнающие в двуцепочечной ДНК специфические последовательности и вносящие разрыв в определенное положение только одной из цепей ДНК, нашли широкое применение в молекулярной биологии и генетической инженерии. НЭ представляют собой перспективные ферменты в качестве молекулярных инструментов для расщепления ДНК вблизи дефектного гена с целью его последующего «исправления». Отсутствие неспецифического гидролиза ДНК является ключевым требованием этого метода. Актуальной задачей является направленное регулирование активности НЭ, что предотвратит появление неконтролируемых разрывов в ДНК, приводящих к нежелательным последствиям для клетки. На примере НЭ BspD6I разработан подход, позволяющий «выключать» и «включать» фермент в заданный момент времени с помощью внешнего сигнала (изменение температуры) за счет использования термочувствительных аналогов субстрата. Сконструированы 13- и 15-звенные немодифицированные синтетические ДНК-дуплексы, которые блокируют активность фермента при 20 °С. Повышение температуры вызывает диссоциацию дуплексов-ингибиторов и приводит к инициации ферментативного гидролиза протяженной ДНК при ~ 40–50 °С. Предлагаемый подход может быть использован для оптимизации реакции изотермической амплификации ДНК с вытеснением цепи, а также для модулирования активности химерных нуклеаз, применяемых в генной терапии.*

Ил. 6. Табл. 1. Библиогр. 14 назв.

Ключевые слова: регулирование активности ферментов; никующие эндонуклеазы; термочувствительные аналоги субстрата.

## ENGINEERING OF THE INHIBITORS OF NICKING ENDONUCLEASE BspD6I USING SYNTHETIC DNA FRAGMENTS

L.A. Abrosimova<sup>1</sup>, A.Y. Migur<sup>1</sup>, E.A. Kubareva<sup>1</sup>,  
W. Wende<sup>2</sup>, L.A. Zheleznaya<sup>3</sup>, T.S. Oretskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University,  
1, Leninskie gory, Moscow 119991, Russia.

<sup>2</sup>Justus-Liebig University, Institute of Biochemistry,

58, Heinrich-Buff-Ring, Giessen, D-35392, Germany.

<sup>3</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Science, 3, Institutskaya St., Pushchino, Moscow region, 142290, Russia, oretskaya@belozersky.msu.ru

*Nicking endonucleases (NE) recognize specific sites in double-stranded DNA and cleave only one strand in predetermined position. These enzymes have become widely used in molecular biology and genetic engineering. NEs are possible to consider as powerful molecular tools for DNA cleavage near defective gene that may further result in its repair by cell mechanisms. The absence of non-specific DNA hydrolysis is a key requirement of this method. The targeting regulation of NEs activity represents a critical task at present: it is necessary to prevent the undesirable cleavage of DNA since it can have harmful effects for the cell. Using NE BspD6I as a model we developed the strategy that allows to "switch" on and off the enzymatic activity at any given point in time by means of external signal (changing of temperature). The approach is based on using thermosensitive analogues of enzyme's substrate. We constructed 13 and 15 b.p. non-modified synthetic DNA duplexes that can block the enzymatic activity at 20 °C. Temperature increase causes dissociation of duplexes-inhibitors and results in enzymatic hydrolysis of long length DNA at ~ 40–50 °C. The proposed approach can be used for optimization of isothermal strand displacement amplification of DNA, as well as for hydrolytic activity modulation of chimeric nucleases used in gene therapy.*

6 figures. 1 table. 14 sources.

*Key words: regulation of enzymatic activity; nicking endonucleases; thermosensitive substrate's analogues.*

## ВВЕДЕНИЕ

Эндонуклеазы рестрикции, узнающие в двутяжевой ДНК специфические последовательности и гидролизующие её в строго фиксированном месте относительно участка узнавания, являются незаменимыми инструментами генетической инженерии. Однако в последнее время в молекулярной биологии всё чаще возникает потребность в сайт-специфических эндонуклеазах, вносящих разрыв в определенное положение только одной из цепей ДНК. Эти ферменты получили название никующих эндонуклеаз (НЭ, от англ. nicking endonucleases, nick – разрыв (ник)).

Первая НЭ была обнаружена Абдурашитовым и др. в 1996 г. [1]. За десятилетие эти ферменты нашли широкое применение в различных областях молекулярной биологии. Их используют для изотермической амплификации олигонуклеотидов и геномной ДНК [11], для экономного клонирования ДНК, не требующего ферментативного лигирования [14], для конструирования ДНК-интермедиатов репарационных процессов [13]. С помощью НЭ созданы наномашин и сверхчувствительные ДНК-сенсоры, в том числе для детекции ДНК болезнетворных микроорганизмов [4]. Благодаря своей уникальной способности вносить одноцепочечный разрыв в ДНК НЭ представляют собой перспективные ферменты для целей геной терапии [12]. Вносимый НЭ одноцепочечный разрыв в ДНК репарируется по механизму гомологичной рекомбинации с большей вероятностью, чем двуцепочечный разрыв. Именно репарация путем гомологичной рекомбинации лежит в основе «исправления» последовательности ДНК с использованием высокоспецифичных химерных белков [10]. Однако неконтролиру-

емое проявление активности этими белками может привести к нежелательным последствиям для клетки. Актуальной задачей является разработка подходов к направленному регулированию функционирования таких белков, а именно «включению» и «выключению» их активности в заданный момент времени с помощью внешнего сигнала.

Объектом данного исследования является НЭ BspD6I, обнаруженная в природном термофильном штамме *Bacillus species* D6 [2]. Было показано, что НЭ BspD6I является большой субъединицей гетеродимерной эндонуклеазы рестрикции BspD6I, в присутствии второй (малой) субъединицы происходит гидролиз обеих цепей ДНК. Целью данного исследования являлась разработка методов регулирования активности НЭ BspD6I для расширения границ ее практического использования.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали на автоматическом синтезаторе ASM 800 компании BIOSSET (Россия) по стандартному регламенту с использованием коммерческих реагентов и растворителей.

<sup>32</sup>P-Метку на 5'-конец олигонуклеотидов вводили с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 (Thermo Fisher Scientific, США) в присутствии [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ при 37 °C в течение 30 мин. в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl (pH 7,6), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ ДТТ. Меченый олигонуклеотид выделяли на колонке MicroSpin G-50 (GE Healthcare, США). Радиоактивность <sup>32</sup>P-меченных препаратов определяли методом счета по Черенкову в импульсах в минуту на счетчике Tracor Analytic Delta 300 («ThermoQuest/CE

Instruments», США).

ДНК-дуплексы (рис. 1) формировали из комплементарных олигонуклеотидов, смешивая их в эквимольных количествах.  $^{32}\text{P}$ -меченные дуплексы с известной удельной радиоактивно-

стью получали добавлением к определенному количеству ДНК-дуплекса соответствующего  $^{32}\text{P}$ -меченного олигонуклеотида. Смесь нагревали до 90 °С и медленно охлаждали до комнатной температуры.

ДНК-дуплекс	Последовательность, 5'→3'/3'→5'	Длина, п.н.												
I	GATGCTGCCAAGAGTCCTCTAGCTTCATAC CTACGACGGTTCTCAGGAGATCGAAGTATG	30												
I-1	$^{32}\text{P}$ GATGCTGCCAAGAGTCCTCTAGCTTCATAC CTACGACGGTTCTCAGGAGATCGAAGTATG													
I-2	GATGCTGCCAAGAGTCCTCTAGCTTCATAC-TAMRA CTACGACGGTTCTCAGGAGATCGAAGTATG													
II	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GCGTGGTC</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">TCGAGTC-ТТСТС</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GGTACCTG</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CGCACCAG-AGCTCAG</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AAGAGTT-CCATGGAC</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td></td> </tr> </table> <p>Олигонуклеотиды, составляющие дуплекс:            1) 5'-GCGTGGTC-3'            2) 5'-TCGAGTCTTCTCAA-3'            3) 5'-GGTACCTG-3'            4) 5'-GACTCGAGACCACGC-3'            5) 5'-CAGGTACCTTGAGAA-3'</p>	1	2	3	GCGTGGTC	TCGAGTC-ТТСТС	GGTACCTG	CGCACCAG-AGCTCAG	AAGAGTT-CCATGGAC		4	5		30
1	2	3												
GCGTGGTC	TCGAGTC-ТТСТС	GGTACCTG												
CGCACCAG-AGCTCAG	AAGAGTT-CCATGGAC													
4	5													
III	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GCGTGGTC</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">TGTGCTA-ТТСТС</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GGTACCTG</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CGCACCAG-ACACGAT</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AAGAGTT-CCATGGAC</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td></td> </tr> </table> <p>Олигонуклеотиды, составляющие дуплекс:            1) 5'-GCGTGGTC-3'            2) 5'-TGTGCTATTCTCAA-3'            3) 5'-GGTACCTG-3'            4) 5'-TAGCACAGACCACGC-3'            5) 5'-CAGGTACCTTGAGAA-3'</p>	1	2	3	GCGTGGTC	TGTGCTA-ТТСТС	GGTACCTG	CGCACCAG-ACACGAT	AAGAGTT-CCATGGAC		4	5		30
1	2	3												
GCGTGGTC	TGTGCTA-ТТСТС	GGTACCTG												
CGCACCAG-ACACGAT	AAGAGTT-CCATGGAC													
4	5													
IV	GGTCTCGAGTCТТСТ↓ CCAGAGCTCAGAAGA	15												
V	ТСТCGAGTCТТСТ↓ AGAGCTCAGAAGA	13												

Рис. 1. ДНК-дуплексы, использованные в работе: жирным шрифтом отмечен участок узнавания НЭ BspD6I; стрелкой (↓) указана фосфодиэфирная связь, которую гидролизует НЭ BspD6I; п.н. – пара нуклеотидов

Термическую стабильность ДНК-дуплексов определяли в 10 мМ буфере Трис-НСI (рН 7,8), 150 мМ КСI, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> на спектрофотометре U-2800A HITACHI с температурным регулятором SPR-10 HITACHI (Япония). Использовали термостатируемые кварцевые кюветы Hellma (Германия) с длиной оптического пути 1 см. УФ-поглощение фиксировали при длине волны 260 нм, соблюдая следующий температурный режим: 15 °С – 10 мин., нагрев от 15 до 80 °С – 130 мин. Результаты представляли как в интегральной (зависимость оптической плотности раствора дуплекса от температуры  $f(T) = A_{260}$ ), так и в дифференциальной форме:  $f(T) = \Delta A_{260} / \Delta(T)$ . Для обработки экспериментальных данных использовали программу Origin (США). Температуру плавления ( $T_{пл}$ ) дуплексов определяли по максимуму первой производной оптической плотности по температуре. Рассчитывали среднее арифметическое двух или трех независимых экспериментов. Ошибка составляла  $\pm 1$  °С.

Для экспрессии гена НЭ BspD6I использовали штамм Nova Blue (DE3) (Novagen, США) клеток *E. coli*. Трансформацию клеток *E. coli* проводили методом электропорации сначала плазмидой pRARE/M.SscL1I, которая содержала ген метилтрансферазы SscL1I (M.SscL1I) и гены, кодирующие tРНК для редко используемых в *E. coli* кодонов. На втором этапе клетки трансформировали плазмидой pET28b/Nick, кодирующей НЭ BspD6I с дополнительным гексагистидиновым блоком на С-конце [3].

Клетки выращивали в 3 л среды LB, содержащей канамицин (35 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США) и хлорамфеникол (10 мкг/мл, Sigma-Aldrich), при 37 °С и при интенсивной аэрации до плотности культуры  $A_{590} = 0,6-0,8$  О.Е. Затем проводили индукцию экспрессии рекомбинантного белка, добавляя в среду изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозид (ИПТГ) (Хеликон, Россия). Культуру растили ещё 3 ч, затем клетки осаждали центрифугированием (4000 об./мин, 30 мин), ресуспендировали в 200 мл буфера для лизиса (20 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН 7,5), 1 М КСI, 0,1 мМ ЭДТА, 7 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол), содержащем ингибитор протеаз – 2 мМ фенилметилсульфонил фторид (AppliChem, Германия). Клеточную биомассу разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1А (Россия) в ледяной бане четырьмя импульсами по 60 с, с интервалом между импульсами по 60 с. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием в течение 30 мин. при 4 °С при 30000 об./мин. Жидкость над осадком отбирали и наносили на колонку, заполненную 5 мл Ni-NTA агарозы (QIAGEN, Германия) и уравновешенную буфером А (50 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН 7,5), 1 М КСI, 10 мМ

имидазол). Перед нанесением на колонку к раствору, содержащему НЭ, добавляли имидазол до концентрации 10 мМ. Выделение НЭ BspD6I на Ni-NTA-агарозе проводили в соответствии с протоколом QIAexpressionist фирмы QIAGEN. После нанесения препарата колонку промывали десятью объемами буфера А. При разделении использовали ступенчатый градиент имидазола в буфере А: 30 мМ (для удаления примесей) и 200 мМ (для элюирования НЭ BspD6I). Все операции по выделению НЭ BspD6I проводились при температуре +4 °С. Наличие целевого белка во фракциях определяли методом электрофореза по Лэммли [9].

НЭ BspD6I переводили в буфер для хранения (10 мМ Трис-НСI (рН 7,5), 50 мМ КСI, 0,1 мМ ЭДТА, 50% глицерин) посредством диализа. Концентрацию препаратов НЭ BspD6I определяли спектрофотометрически по формуле Бугера-Ламберта-Бера, используя молярный коэффициент экстинкции при 280 нм ( $77240 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Комплексообразование НЭ BspD6I с 5'-<sup>32</sup>P-меченным ДНК-дуплексом I-1 проводили в течение 30 мин. при 37 °С в 10 мкл буфера Б (10 мМ Трис-НСI (рН 7,5), 150 мМ КСI, 1 мМ ДТТ, 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА)), содержащего 10 мМ CaCl<sub>2</sub>. Использовали 25 нМ НЭ BspD6I и 10 нМ ДНК-дуплекс. За образованием комплексов НЭ BspD6I с ДНК следили методом электрофореза в 7%-м полиакриламидном геле (ПААГ, акриламид: N,N'-бисакриламид = 29 : 1) в пластинах размером 200 × 200 × 1 мм. Электрофорез проводили в буфере TBE (50 мМ Трис-НСI, 50 мМ борная кислота, 1 мМ ЭДТА, рН 8,3) при силе тока 15 мА. Здесь и далее электрофореграммы получали с помощью прибора Турхооп FLA 9500 (GE Healthcare, США). Анализ интенсивности зон, соответствующих ДНК и продуктам ее взаимодействия с белком, проводили, используя программу Quantity One (Bio-Rad Laboratories, США). Степень связывания ДНК-субстрата с ферментом рассчитывали как отношение интенсивности зоны, соответствующей комплексу, к суммарной интенсивности зон исходной ДНК и ДНК-белкового комплекса.

Значение  $K_d$  комплекса НЭ BspD6I с ДНК-дуплексом I-1 определяли как среднее арифметическое не менее трех независимых экспериментов. Считали, что значению  $K_d$  белково-нуклеинового комплекса соответствует концентрация НЭ, при которой 50% <sup>32</sup>P-меченного ДНК-субстрата I-1 находится в комплексе с ферментом. Стандартную ошибку определяли в программе Origin по формуле

$$SE = s / n^{0,5},$$

5'...GAGTCNNNN↓N... 3'

3'...CTCAGNNNN-N... 5'

Участок узнавания НЭ VspD6I выделен жирным шрифтом,

↓ - место гидролиза НЭ VspD6I.

#### Схема

где SE – стандартная ошибка; s – стандартное отклонение; n – количество независимых экспериментов по комплексообразованию.

Гидролиз НЭ VspD6I ДНК-дуплекса **I-1**, содержащего метку  $^{32}\text{P}$  на 5'-конце «верхней» цепи, или дуплекса **I-2** с флуоресцентной меткой TAMRA (карбокситетраметилпродамин) на 3'-конце той же цепи проводили в течение 30 мин. при 20, 25, 30, 35, 40, 45 и 50 °C в 10 мкл буфера Б, содержащего 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Использовали 10 нМ НЭ VspD6I и 10 нМ ДНК-дуплекс **I-1** или **I-2**. В случае добавления дуплекса-конкурента его концентрация составляла 3 мкМ. Продукты гидролиза разделяли в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной в пластинах размером 200 × 200 × 1 мм (акриламид : N,N'-бисакриламид = 19 : 1) в буфере TBE при напряженности поля 30 В/см. Степень гидролиза ДНК-субстрата ферментом рассчитывали как отношение интенсивности зон, соответствующих продукту гидролиза, к суммарной интенсивности зон исходной ДНК и продукта реакции.

ДНК фага T7 гидролизовали НЭ VspD6I в течение 30 мин при 20, 25, 30, 35, 40, 45 и 50 °C в 10 мкл буфера Б, содержащего 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Использовали 12 нМ НЭ VspD6I и 0,2 нМ ДНК фага T7. В случае добавления дуплекса-конкурента его концентрация составляла 60 мкМ. Перед нанесением на гель в пробы добавляли краситель SybrGold (Life Technologies, США), который, взаимодействует с углеводофосфатным остовом двуцепочечной ДНК. Продукты гидролиза разделяли в 0,7%-м агарозном геле в буфере TBE при напряженности поля 10 В/см. В качестве маркера длины ДНК использовали препарат GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). С помощью прибора Typhoon детектировали флуоресценцию SybrGold, связанного с ДНК. Степень расщепления ДНК-субстрата ферментом рассчитывали как отношение интенсивности зон, соответствующих продуктам гидролиза, к суммарной интенсивности всех зон (исходная ДНК и продукты реакции).

Все эксперименты по гидролизу субстратов НЭ VspD6I выполняли не менее трех раз.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

НЭ VspD6I узнаёт последовательность

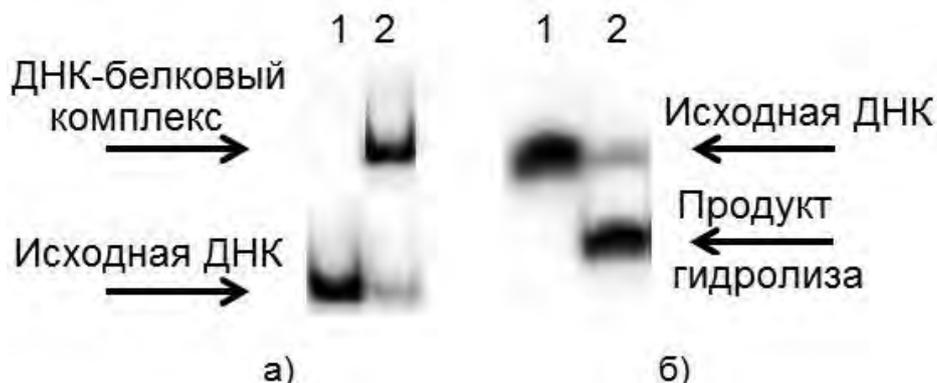
5'-GAGTC-3'/5'-GACTC-3' в двуцепочечной ДНК и гидролизует одну из цепей («верхнюю») на расстоянии 4 нуклеотидных пар (н.п.) от узнаваемой последовательности в направлении 3'-конца (схема) [2].

НЭ VspD6I состоит из 604 аминокислотных остатков (молекулярная масса – 70,8 кДа). Методом PCA была получена ее кристаллическая структура [8]. Оптимум действия НЭ VspD6I составляет 55 °C, однако этот фермент способен проявлять активность и при комнатной температуре.

Для расширения областей практического применения НЭ VspD6I необходимо добиться отсутствия гидролиза ДНК этим ферментом при 20–25 °C. Для «выключения» НЭ VspD6I мы предложили использовать короткие синтетические фрагменты ДНК – негидролизующие аналоги субстрата НЭ. Такие ДНК-дуплексы должны временно и эффективно связываться с НЭ VspD6I, ингибируя ее активность, но при этом не подвергаться гидролизу. Избыток дуплекса-ингибитора «удерживал» бы НЭ в непродуктивном комплексе, что приводило бы к отсутствию гидролиза целевой ДНК в виду отсутствия свободного фермента в реакционной смеси. Повышение температуры должно приводить к диссоциации дуплекса-ингибитора, нарушению его комплексообразования с белком и высвобождению НЭ VspD6I в сферу реакции.

На первом этапе мы изучили взаимодействие 30-звенного ДНК-дуплекса, содержащего участок узнавания НЭ VspD6I, с ферментом. ДНК-дуплекс **I-1** эффективно связывается с НЭ VspD6I ( $K_d = 11 \pm 3$  нМ) и гидролизует этим ферментом (рис. 2). Однако использовать дуплекс **I** в качестве модулятора активности НЭ VspD6I нецелесообразно из-за слишком высокой  $T_{пл}$  (77 °C, таблица), а также потому, что фермент способен расщеплять его и диссоциировать из ДНК-белкового комплекса с последующим гидролизом целевого субстрата.

Следует отметить, что термическая стабильность является ключевым моментом выбора оптимального дуплекса-ингибитора активности НЭ VspD6I.  $T_{пл}$  дуплекса не должна быть слишком высокой, для того чтобы незначительное повышение температуры могло вызвать дестабилизацию двойной спирали. Для умень-



**Рис. 2. Взаимодействие НЭ VspD6I с 5'-32P-меченным ДНК-дуплексом I-1:**  
**а – связывание НЭ VspD6I с ДНК-дуплексом I-1. Радиоавтограф 7%-го ПААГ**  
**после электрофореза в неденатурирующих условиях: дорожка 1 – контроль (исходная**  
**ДНК); 2 – результат связывания белка с ДНК (ДНК-дуплекс + НЭ VspD6I). Концентрации НЭ**  
**VspD6I и ДНК-дуплекса составляют 10 нМ и 25 нМ, соответственно; б – гидролиз НЭ VspD6I**  
**ДНК-дуплекса I-1. Радиоавтограф 20%-го ПААГ, содержащего 7 М мочевины:**  
**дорожка 1 – контроль (исходная ДНК); 2 – результат гидролиза ДНК (ДНК-дуплекс +**  
**НЭ VspD6I). Концентрации НЭ VspD6I и ДНК-дуплекса в обоих случаях составили 10 нМ**

шения стабильности 30-звенного дуплекса мы предложили искусственно внести в его структуру разрывы. В результате был сконструирован 30-звенный дуплекс II. (см. рис. 1). Он был составлен из 5 олигодезоксирибонуклеотидов и, таким образом, содержал разрывы (см. рис. 1, дуплекс II). «Верхняя» цепь дуплекса, гидролизуемая НЭ VspD6I, состояла из 3 олигодезоксирибонуклеотидов; комплементарная цепь 30-звенного дуплекса содержала два 15-звенных олигодезоксирибонуклеотида. Термическая стабильность такого составного субстрата оказалась достаточно низкой (температурный интервал перехода «спираль-клубок» – от 25 до 46 °С). Предполагалось, что при повышении температуры устойчивость ДНК-белкового комплекса значительно понизится из-за диссоциации дуплекса, и фермент будет способен гидролизовать целевую ДНК.

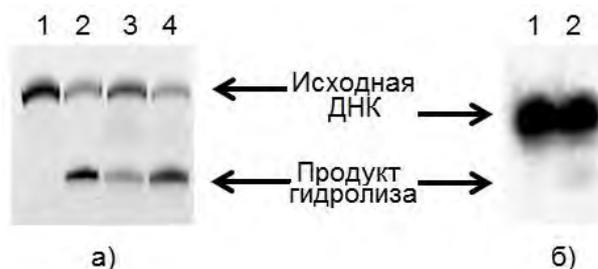
В качестве целевого субстрата НЭ VspD6I для анализа ее ферментативной активности использовали 30-звенный ДНК-дуплекс I-2 с флуоресцентной меткой TAMRA на 3'-конце «верхней» цепи (см. рис. 1). Был изучен гидролиз НЭ VspD6I ДНК-дуплекса I-2 при 300-кратном избытке дуплекса II относительно суб-

страта. Показано, что при 25 °С такой избыток дуплекса II в значительной степени ингибирует активность НЭ VspD6I (рис. 3). В контрольном эксперименте наличие в реакционной смеси составного ДНК-дуплекса III, не содержащего участок узнавания НЭ VspD6I (см. рис. 1), не влияло на ферментативный гидролиз целевого субстрата I-2 (рис. 3, а, дорожка 4). Этот факт свидетельствует о специфичном характере ингибирования активности НЭ VspD6I ДНК-дуплексом II при 25 °С.

Однако, как видно из рис. 3, а (дорожка 3) фермент все же способен в незначительной степени гидролизовать целевой ДНК-дуплекс I-2 в присутствии 300-кратного избытка дуплекса II. Такой результат, по-видимому, обусловлен тем, что  $T_{пл}$  дуплекса II, состоящего из 5 олигонуклеотидов, составляет около 25 °С, то есть при этой температуре он лишь частично сохраняет двуспиральную форму. Также возможно, что НЭ VspD6I способна гидролизовать дуплекс II, после чего фермент диссоциирует из комплекса с продуктом реакции. Данное предположение было проверено экспериментально. Радиоактивную метку  $^{32}P$  вводили на 5'-конец 14-звенного олигодезоксирибонуклеотида (2), вхо-

**Таблица**  
**Термическая стабильность ДНК-дуплексов**

ДНК-дуплекс	Длина, п.н.	$T_{пл}, \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$
I	30	77
II	30	25
IV	15	62
V	13	54



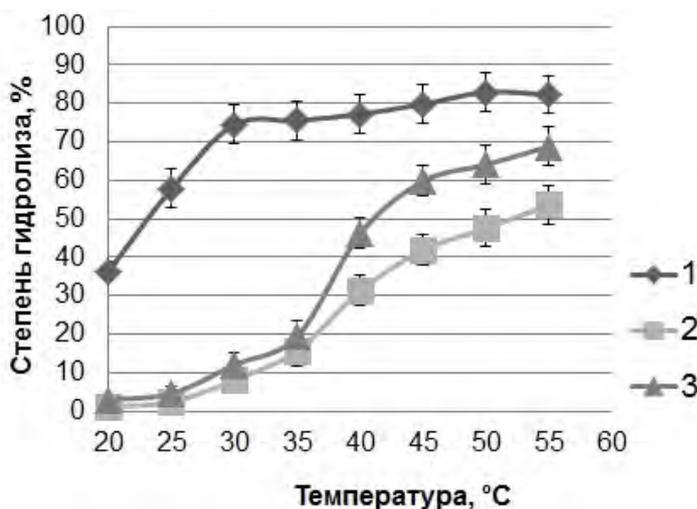
**Рис. 3.** Анализ в 20%-м ПААГ, содержащем 7 М мочевины, продуктов гидролиза НЭ VspD6I (10 нМ) дуплексов I-2 (а) и II (б): а – гидролиз 30-звенного субстрата I-2 в присутствии дуплекса-конкурента II. Зоны ДНК детектировали по флуоресценции. Реакцию проводили в течение 30 мин. при 25 °С: дорожка 1 – исходная ДНК; дорожка 2 – реакционная смесь после гидролиза ДНК-дуплекса I-2 НЭ VspD6I; дорожки 3, 4 – реакционные смеси после гидролиза ДНК-дуплекса I-2 НЭ VspD6I в присутствии дуплексов-конкурентов II и III соответственно. Концентрация субстрата I-2 составляла 10 нМ, дуплекса-конкурента – 3 мкМ; б – Гидролиз 5'-<sup>32</sup>P-меченного ДНК-дуплекса II. Радиоавтограф 20%-го ПААГ, содержащего 7 М мочевины: дорожка 1 – контроль (исходная ДНК), 2 – результат гидролиза НЭ VspD6I. Концентрация ДНК-дуплекса составляла 10 нМ. Реакцию проводили в течение 3 ч при 25 °С

дящего в состав «верхней» цепи дуплекса II и содержащего фосфодиэфирную связь, которую способна расщеплять НЭ VspD6I. Как видно из рис. 3, б, ДНК-дуплекс II действительно может в незначительной степени гидролизоваться НЭ VspD6I. Тем не менее, мы считаем, что ДНК-дуплекс II может служить основой для создания более эффективного ингибитора НЭ VspD6I. Для этого необходимо добиться блокирования гидролиза такой системы с помощью введения модифицированного звена в ДНК, например, в место гидролиза ферментом.

На втором этапе работы было предложено уменьшить длину дуплекса-конкурента. Были

использованы 15- и 13-звенные фрагменты ДНК (см. рис. 1, дуплексы IV и V), содержащие участок узнавания НЭ VspD6I и только 4 п.н. после него. Таким образом, дуплексы IV и V должны связываться с НЭ VspD6I, но не могут подвергаться гидролизу, так как не содержат расщепляемой ферментом фосфодиэфирной связи.

Проанализирован гидролиз НЭ VspD6I целевого 30-звенного субстрата I-2 в присутствии 300-кратного избытка по отношению к нему ДНК-дуплексов IV и V в течение 30 мин в интервале температур от 20 до 55 °С (рис. 4). Как видно из полученных результатов, дуплексы IV и V эффективно ингибируют функционирование



**Рис. 4.** Графики зависимости степени гидролиза НЭ VspD6I 30-звенного субстрата I-2 без добавления ингибитора (кривая 1) и в присутствии 300-кратного избытка ДНК-дуплексов IV (кривая 2) или V (кривая 3) от температуры. Гидролиз проводился в течение 30 мин (10 нМ НЭ VspD6I, 10 нМ ДНК-дуплекс I-2, 3 мкМ ДНК-дуплекс IV или V)

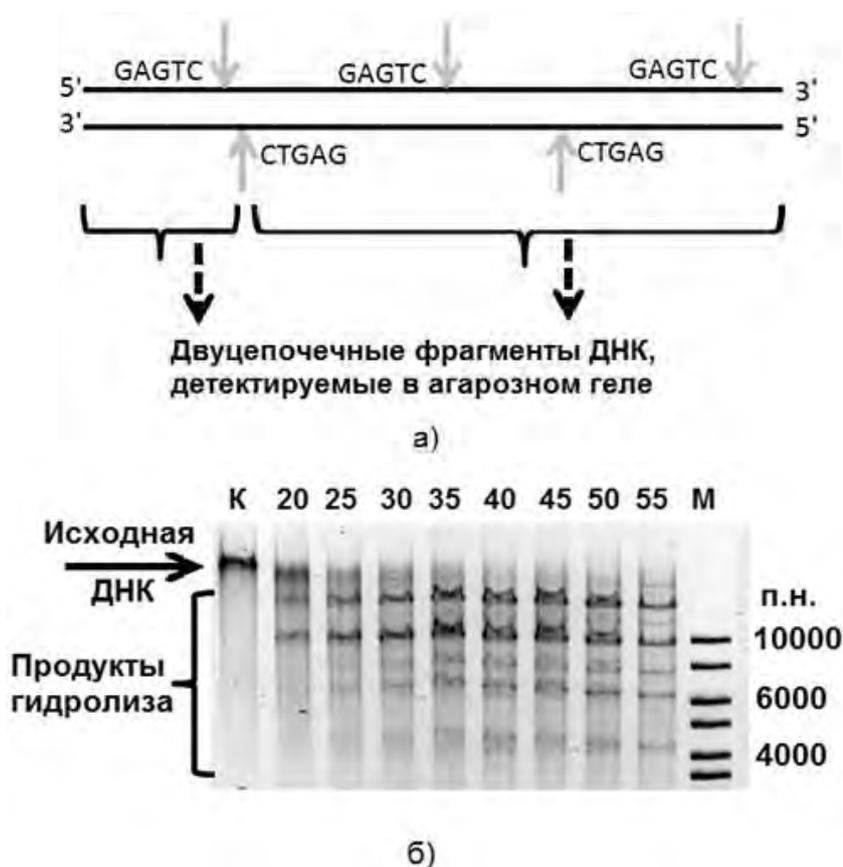
НЭ VspD6I при 25 °С. Активность НЭ VspD6I восстанавливается на 50% при 37 °С в случае использования дуплекса-конкурента **V**, в то время как в случае дуплекса **IV** такая же активность фермента наблюдается только при 45 °С (см. рис. 4). Этот эффект обусловлен более высокой термической стабильностью дуплекса **IV** ( $T_{пл} = 62\text{ °С}$ ) по сравнению с дуплексом **V** ( $T_{пл} = 54\text{ °С}$ ).

Необходимо отметить, что НЭ VspD6I все же способна проявлять незначительную активность в интервале температур от 25 до 40 °С при добавлении ингибиторов **IV** или **V**. Это может быть связано с нестабильностью комплексов НЭ VspD6I с этими дуплексами-ингибиторами: при повышении температуры степень диссоциации ДНК-белковых комплексов увеличивается. При температурах, близких к  $T_{пл}$  дуплексов-ингибиторов, диссоциация самой двуспиральной ДНК вносит дополнительный вклад в этот процесс, обеспечивая «включение»

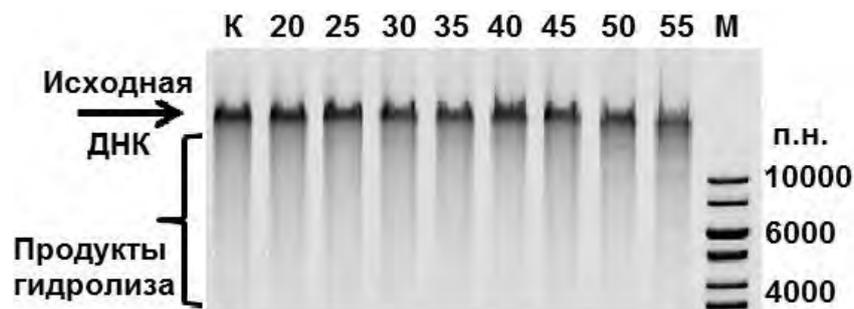
ферментативной активности НЭ VspD6I.

В настоящее время НЭ используют при создании химерных белков в качестве ДНК-гидролизующего модуля [6]. Такие химерные белки способны с высокой специфичностью вносить одноцепочечный разрыв в геномную ДНК, стимулируя при этом гомологичную рекомбинацию [10]. Мы оценили возможность регулирования активности НЭ VspD6I при гидролизе протяженной ДНК с помощью дуплексов **IV** и **V**, используя в качестве модельного субстрата ДНК фага T7.

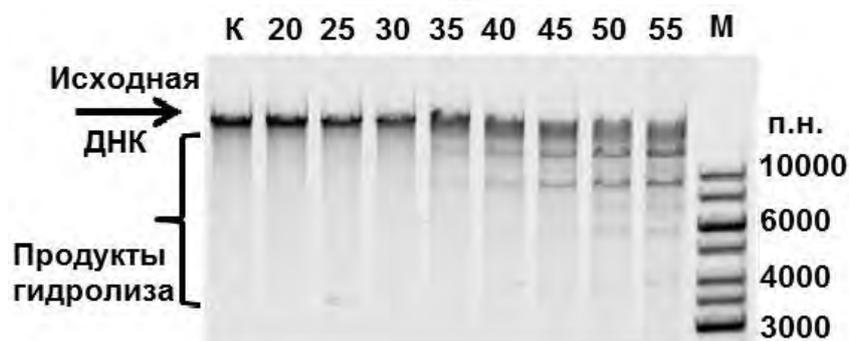
Длина ДНК фага T7 составляет около 40 тыс. п.н. и содержит 115 участков узнавания НЭ VspD6I (программа VectorNTI, США). НЭ расщепляют ДНК на фрагменты только в том случае, когда два противоположно ориентированных участка узнавания расположены на небольшом расстоянии друг от друга (рис. 5, а). В фага T7 НЭ VspD6I в зависимости от температуры ДНК фага T7 близко расположенные ин-



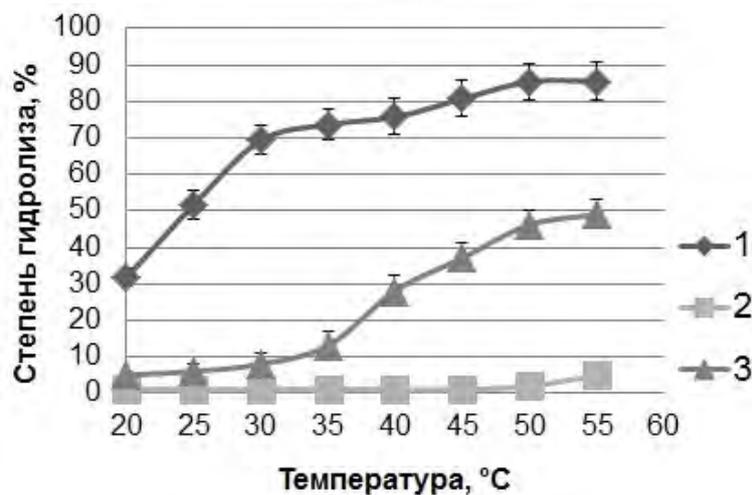
**Рис. 5. Гидролиз ДНК фага T7 НЭ VspD6I: а – принцип тестирования активности НЭ VspD6I при использовании в качестве субстрата ДНК фага T7. Серыми стрелками схематически показаны участки, гидролизующие НЭ VspD6I; б – Анализ в 0,7%-ом агарозном геле продуктов гидролиза ДНК фага T7 НЭ VspD6I. Зоны ДНК детектировали по флуоресценции SYBR Gold. Реакцию проводили в течение 30 мин при температурах, указанных над дорожками. Дорожка К – исходная ДНК, дорожка М – ДНК-маркер. Концентрация НЭ VspD6I составляла 12 нМ, ДНК фага T7 – 0,2 нМ.**



а)



б)



в)

**Рис. 6.** Зависимость степени гидролиза НЭ BspD6I ДНК фага T7 в присутствии ингибиторов IV и V от температуры. Реакцию проводили в течение 30 мин. Концентрация НЭ BspD6I составляла 12 нМ, ДНК фага T7 – 0,2 нМ, дуплекса-конкурента – 60 мкМ: а и б – анализ в 0,7%-м агарозном геле продуктов гидролиза ДНК фага T7 НЭ BspD6I в присутствии дуплексов-конкурентов IV или V соответственно. Реакцию проводили при температурах, указанных над дорожками. Зоны ДНК детектировали по флуоресценции SYBR Gold: дорожка K – исходная ДНК; дорожка M – ДНК-маркер; в – графики зависимости степени гидролиза НЭ BspD6I ДНК фага T7 без добавления ингибитора (кривая 1) и в присутствии ДНК-дуплексов IV (кривая 2) и V (кривая 3) от температуры

вертированные участки 5'-GAGTC-3'/3'-CTCAG-5' встречаются 4 раза, что в свою очередь обусловлено тем, что эти последовательности

входят в состав фагоспецифических промоторов [5]. Характерная картина гидролиза ДНК представлена на рис. 5, б. Как видно из рис. 5, б,

НЭ VspD61 достаточно эффективно расщепляет ДНК фага T7 при 20 °С. При использовании в генной терапии даже незначительный неспецифический гидролиз НЭ геномной ДНК в составе химерного белка может стать фатальным для клетки. «Включение» активности НЭ при повышенной температуре будет способствовать формированию специфического фермент-субстратного комплекса и, как следствие, исключению неспецифического гидролиза.

Для «выключения» активности НЭ VspD61 дуплексами IV и V в более широком диапазоне температур было решено использовать их в относительно высокой концентрации. Проанализирован гидролиз НЭ VspD61 ДНК фага T7 (концентрация – 0,2 нМ) в присутствии 60 мкМ ДНК-дуплексов IV или V в течение 30 мин. в интервале температур от 20 до 55 °С (рис. 6). Бóльшая концентрация дуплексов IV и V, использованная для ингибирования гидролиза фаговой ДНК (60 мкМ) по сравнению с экспериментом по гидролизу субстрата I-2 (3 мкМ), приводит к блокированию действия НЭ VspD61 при 20–25 °С (рис. 6, в). Активность НЭ VspD61 восстанавливается на 50% при 45 °С в случае использования дуплекса V. При добавлении ингибитора IV НЭ VspD61 гидролизует ДНК при 55 °С, хотя и с низкой эффективностью. Таким образом, опираясь на наши результаты, можно «программировать» температуру, при которой происходит гидролиз целевой ДНК НЭ VspD61, варьируя концентрацию негидролизуемого дуплекса-ингибитора, содержащего только 4 п.н. после участка узнавания, и изменяя длину фланкирующих последовательностей с 5'-конца от него.

Разработанный подход может быть применен в реакции амплификации ДНК с вытеснением цепи [7]. Из-за неконтролируемой активности НЭ при использовании этого метода возможен высокий уровень синтеза нецелевых фрагментов ДНК. Для преодоления указанной про-

блемы мы предлагаем использовать специально сконструированные дуплексы-ингибиторы. Добавление их в реакционную смесь после инициации синтеза ДНК приведет к блокированию активности НЭ и позволит избежать накопления нежелательных продуктов. Амплификация ДНК с вытеснением цепи происходит в широком диапазоне температур в зависимости от типа используемых ДНК-полимеразы и НЭ. Предлагаемый нами подход позволяет подобрать оптимальный дуплекс-ингибитор для каждого отдельного случая. Изменяя температуру реакции, можно добиться обратимого «включения» – «выключения» активности НЭ в нужный момент времени.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложены синтетические ДНК-дуплексы, позволяющие регулировать активность НЭ VspD61 с помощью изменения температурного режима реакции гидролиза ДНК. Наиболее перспективными являются дуплексы – аналоги субстрата НЭ VspD61, содержащие в своем составе участок связывания фермента, но не подвергающиеся гидролизу в связи с отсутствием расщепляемой фосфодиэфирной связи. Такие соединения не расходуются в ходе гидролиза НЭ целевой ДНК. Продемонстрировано, что 13-звенный ДНК-дуплекс, используемый в определенной концентрации, может блокировать гидролиз ДНК фага T7 при 20–25 °С. Повышение температуры реакционной смеси приводит к восстановлению ферментативной активности. Степень активации НЭ зависит как от концентрации используемого дуплекса-ингибитора, так и от его структуры. Разработанный подход может быть использован для снижения количества нецелевых продуктов в ходе реакции амплификации ДНК с вытеснением цепи, а в перспективе для модулирования активности химерных нуклеаз, содержащих НЭ в качестве гидролизующего домена, в клетках.

*Авторы выражают благодарность сотрудникам НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова Романовой Е.А. за синтез олигодезоксирибонуклеотидов и Рязановой А.Ю за помощь при выделении НЭ VspD61.*

*Работа проводилась при поддержке гранта РФФИ-ННИО (№ 14-04-91340) в рамках образовательной программы «Международные исследовательские группы с участием молодых ученых».*

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Абдурашитов М.А., Беличенко О.А., Шевченко А.В., Дегтярев С.Х. N.BstSE – сайт-специфическая нуклеаза из *Bacillus stearothermophilus* SE-589 // Молекулярная биология. 1996. Т. 30. С. 1261–1267.
2. Железная Л.А., Перевязова Т.А., Альжанова Д.В., Матвиенко Н.И. Сайт-специфическая

никаза из штамма *Bacillus species* D6 // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 1215–1220.

3. Рогулин Е.А., Перевязова Т.А., Железная Л.А., Матвиенко Н.И. Плазмида pRARE в качестве вектора для клонирования при получении суперпродукта сайт-специфической никазы N.VspD61 // Биохимия. 2004. Т. 69. С.

1381–1386.

4. Chen Y., Wang Q., Xu J., Xiang Y., Yuan R., Chai Y. A new hybrid signal amplification strategy for ultrasensitive electrochemical detection of DNA based on enzyme-assisted target recycling and DNA supersandwich assemblies // *Chem. Commun. (Camb)*. 2013. V. 49. P. 2052–2054.

5. Dunn J.J., Studier F.W. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements // *J. Mol. Biol.* 1983. Vol. 166. P. 477–535.

6. Gabsalilow L., Schierling B., Friedhoff P., Wende W., Pingoud A. Site- and strand-specific nicking of DNA by MutH-derived fusion proteins // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41: e83.

7. Joneja A., Huang X. Linear nicking endonuclease-mediated strand-displacement DNA amplification // *Anal. Biochem.* 2011. V. 414. P. 58–69.

8. Kachalova G.S., Rogulin E.A., Yunusova A.K., Artyukh R.I., Perevyazova T.A., Matvienko N.I., Zheleznaya L.A., Bartunik H.D. Structural analysis of the heterodimeric type IIS restriction endonuclease R.BspD6I acting as a complex between a monomeric site-specific nickase and a catalytic subunit // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 384. P.

489–502.

9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.

10. Pingoud A., Wende W. Generation of novel nucleases with extended specificity by rational and combinatorial strategies // *ChemBioChem*. 2011. V. 12. P. 1495–1500.

11. Van Ness J., Van Ness L.K., Galas D.J. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. P. 4504–4509.

12. Van Nierop G., de Vries A., Holkers M., Vrijnsen K., Gonçalves M. Stimulation of homology-directed gene targeting at an endogenous human locus by a nicking endonuclease // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. 5725–5736.

13. Wang H., Hays J.B. Simple and rapid preparation of gapped plasmid DNA for incorporation of oligomers containing specific DNA lesions // *Mol. Biotechnol.* 2001. V. 19. P. 133–140.

14. Yang J., Zhang Z., Zhang X.A., Luo Q. A ligation-independent cloning method using nicking DNA endonuclease // *Biotechniques*. 2010. V. 49. P. 817–821.

## REFERENCES

1. Abdurashitov M.A., Belichenko O.A., Shevchenko A.V., Degtyarev S.Kh. N.BstSE – сайт-специфическая нуклеаза из *Bacillus stearothermophilus* SE-589 [N.BstSE – site-specific nuclease from *Bacillus stearothermophilus* SE-589]. *Molekulyarnaya biologiya – Molecular Biology*, 1996, vol. 30, pp. 1261–1267.

2. Zheleznaya L.A., Perevyazova T.A., Al'zhanova D.V., Matvienko N.I. Сайт-специфическая никаза из штамма *Bacillus species* D6 [Site-specific nickase from strain *Bacillus species* D6]. *Biokhimiya – Biochemistry*, 2001, vol. 66, pp. 1215–1220.

3. Rogulin E.A., Perevyazova T.A., Zheleznaya L.A., Matvienko N.I. Плазмиды pRARE в качестве вектора для клонирования при получении суперпродуктанта сайт-специфической никазы [Plasmid pRARE as a vector for cloning to construct a superproducer of the site specific nickase N.BspD6I]. *Biokhimiya – Biochemistry*, 2004, vol. 69, pp. 1381–1386.

4. Chen Y., Wang Q., Xu J., Xiang Y., Yuan R., Chai Y. A new hybrid signal amplification strategy for ultrasensitive electrochemical detection of DNA based on enzyme-assisted target recycling and DNA supersandwich assemblies. *Chem. Commun. (Camb)*, 2013, vol. 49, pp. 2052–2054.

5. Dunn J.J., Studier F.W. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol.*,

1983, vol. 166, pp. 477–535.

6. Gabsalilow L., Schierling B., Friedhoff P., Wende W., Pingoud A. Site- and strand-specific nicking of DNA by MutH-derived fusion proteins. *Nucleic Acids Res.*, 2013, vol. 41: e83.

7. Joneja A., Huang X. Linear nicking endonuclease-mediated strand-displacement DNA amplification. *Anal. Biochem.*, 2011, vol. 414, pp. 58–69.

8. Kachalova G.S., Rogulin E.A., Yunusova A.K., Artyukh R.I., Perevyazova T.A., Matvienko N.I., Zheleznaya L.A., Bartunik H.D. Structural analysis of the heterodimeric type IIS restriction endonuclease R.BspD6I acting as a complex between a monomeric site-specific nickase and a catalytic subunit. *J. Mol. Biol.*, 2008, vol. 384, pp. 489–502.

9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685.

10. Pingoud A., Wende W. Generation of novel nucleases with extended specificity by rational and combinatorial strategies. *ChemBioChem.*, 2011, vol. 12, pp. 1495–1500.

11. Van Ness J., Van Ness L.K., Galas D.J. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, pp. 4504–4509.

12. Van Nierop G., de Vries A., Holkers M., Vrijnsen K., Gonçalves M. Stimulation of homology-

directed gene targeting at an endogenous human locus by a nicking endonuclease. *Nucleic Acids Res.*, 2009, vol. 37, pp. 5725–5736.

13. Wang H., Hays J.B. Simple and rapid preparation of gapped plasmid DNA for incorporation of oligomers containing specific DNA lesions.

*Mol. Biotechnol.*, 2001, vol. 19, pp. 133–140.

14. Yang J., Zhang Z., Zhang X.A., Luo Q. A ligation-independent cloning method using nicking DNA endonuclease. *Biotechniques*, 2010, vol. 49, pp. 817–821.

Поступила в редакцию 6 мая 2015 г.  
После переработки 30 мая 2015 г.

УДК 664.8.039

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ СУХОГО ЭКСТРАКТА БЕРЕСТЫ И ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОДУКТОВ ЗДОРОВОГО ПИТАНИЯ

Ю.Г. Базарнова

Санкт-Петербургский торгово-экономический университет,  
194021, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Новороссийская, д. 50, j.bazarnowa2012@yandex.ru

*Изучены спектральные характеристики сухого экстракта бересты (БЭС). Выявлено, что основным компонентом экстракта является тритерпеновый спирт бетулин. Получены результаты исследований антиоксидантных свойств экстракта бересты в составе белково-жировых эмульсий и композиций на основе растительных масел. Проведены исследования влияния БЭС на динамику накопления перекисей в майонезах при холодильном хранении. Изучены бактериостатические и фунгистатические свойства сухого экстракта бересты, определены его эффективные концентрации для применения в рецептурах пищевых продуктов.*

*Ил. 5. Табл. 4. Библиогр. 7 назв.*

*Ключевые слова: сухой экстракт бересты, бетулин, функциональные продукты, антиоксидантные свойства, бактериостатические и фунгистатические свойства*

## DRY BIRCHBARK EXTRACTS BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL AND POSSIBILITIES OF ITS USING IN THE HEALTHY FOOD TECHNOLOGY

U.G. Bazarnova

St.-Petersburg commercial-economic University,  
50, Novorossiyskaya st., Saint-Petersburg, 194021, Russia, j.bazarnowa2012@yandex.ru

*The spectral characteristics of dry birchbark extract (BED) are studied. It was revealed that the main component of the birchbark extract is the triterpene alcohol betulin. The results of studies of birch bark extracts antioxidant properties in the composition of protein-fatty emulsions and compositions based on vegetable oils are received. The effect of BED on the dynamics of the accumulation of peroxides in mayonnaises with refrigeration storage are investigated. Bacteriostatic and fungistatic properties of dry birchbark extract are studied, effective concentration for use in food recipes are defined.*

*5 figures. 4 tables. 7 sources.*

*Key words: dry extract of birchbark; betulin; functional products; antioxidant properties; bacteriostatic and fungistatic properties*