

смеси и уменьшении времени регбридизации. Скорость гибридизации каждого вида молекул пропорциональна квадрату их концентрации. Меняя скорость и время гибридизации, мы подобрали условия, при которых дц-кДНК фракция в основном формировалась из многокопийных кДНК, полученных из тРНК и рРНК, а молекулы кДНК, имеющие меньшую концентрацию, оставались однопочечными. Эффективность предложенной процедуры (деплеции) была подтверждена сравнением с помощью количественной ПЦР концентрации различных молекул кДНК в обработанных ДСН (деплецированных) и контрольных образцах кДНК *E. coli*. При сравнении популяций кДНК близкородственных штаммов *E. coli*, XL1 blue и BL 21.DE3, культивировавшихся в одинаковых условиях, была показана возможность использования деплецированных образцов для вычитающей гибридизации методом SSH [3]. В контрольном эксперименте использовали недеплецированные образцы кДНК. Вычтенные библиотеки кДНК подвергали дифференциальному скринингу. Дифференциальный характер экспрессии отобранных клонов подтверждали с помощью количественной ПЦР. Дифференциальный характер экспрессии был подтвержден для всех последовательностей, выявленных в экспериментальных (деплецированных) библиотеках. В то же

время все клоны из контрольных (недеплецированных) библиотек оказались ложнопозитивными.

Заключение. Таким образом, разработанный метод, основанный на кинетике гибридизации ДНК и уникальных свойствах дуплекс-специфической нуклеазы камчатского краба, позволяет эффективно избавляться от избытка копий рРНК и тРНК в суммарной кДНК прокарриот, сохраняя при этом относительную представленность мРНК. Метод прост в использовании, не требует большого количества РНК и может быть использован для любых видов микроорганизмов. Эффективность метода была подтверждена в ряде модельных экспериментов. Деплецированную кДНК можно использовать для количественного сравнения уровней экспрессии генов, вычитающей гибридизации и секвенирования с использованием технологий «нового поколения».

Список литературы

1. Bogdanova E.A., Shagin D.A., Lukyanov S.A. Mol. Biosyst. 2008. V. 4. P. 205-212.
2. Matz M., Shagin D., Bogdanova E., et al. Nucleic Acids Res. 1999. V. 27, P. 1558-1560.
3. Lukyanov S.A., Gurskaya N.G., Lukyanov K.A., et al. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 1994. V. 20. P. 386-388.

МЕТОД АЛЛЕЛЬНОЙ ДИСКРИМИНАЦИИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК НА УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБКАХ

Бабенко А.С.¹, Тылец П.В.¹, Статкевич Л.В.¹, Сакович О.К.¹, Чекур О.В.¹, Ионова И.С.², Смолякова Р.М.¹, Грушевская Г.В.², Егорова В.П.², Крылова Н.Г.², Липневич И.В.², Чакуков Р.Ф.²

¹РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Введение. В настоящее время, с развитием нанотехнологий и нанoeлектроники, стало возможным создание экономичной, быстрой и эффективной системы электрохимического анализа ДНК с точностью до одной нуклеотидной замены (SNP). Одним из наиболее прогрессивных методов этого ряда является электрохимический импедансный спектральный метод детектирования гибридизации на поверхности углеродных нанотрубок (УНТ) с небольшим количеством стенок (слоев).

Использование ДНК-УНТ-комплексов обеспечивает чувствительность анализа, выполняя следующие задачи. Во-первых, происходит фиксирование одиночной зондовой ДНК (олигонуклеотида) в вытянутом раскрученном состоянии на поверхности УНТ, что обеспечивает эффективное связывание с комплементарной ДНК-мишенью и минимизирует шумы в электрофизических измерениях. Во-вторых, не требуется использование ковалентной привязки «репортерных» групп, которые могут давать неспецифический вклад в сигнал за счет искажения конформации ДНК или наличия остаточной флуоресценции. В-третьих, комплексообразование с УНТ повышает устойчивость ДНК к действию нуклеаз. Нанотехнология Ленгмюра – Блоджетт позволяет сформировать плотную высокоупорядоченную структуру комплексов УНТ-ДНК на поверхности сенсора.

Цель. Разработать и оптимизировать метод детекции клинически значимых однонуклеотидных замен в гене KRAS. **Задачи** исследования включали: изготовление наносенсора, изготовление детектирующего устройства, разработку специализированного программного обеспечения, оптимизацию детекции мутации, подтверждение данных с помощью классических референсных методов (ПЦР в режиме реального времени, секвенирование по Сэнгеру).

Материалы и методы. В соответствии с поставленными задачами технико-лабораторные работы с аппаратной и программной частью осуществляли на базе НИЛ диэлектрической спектроскопии гетерогенных систем физического факультета Белорусского государственного университета. Молекулярно-генетические этапы работы проводили на базе онкологического отделения биочиповых технологий РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова. В качестве референсной последовательности использовали SNP KRAS GGT>GAT%, имеющую терапевтическое и прогностическое значение в клинике (12 кодон, 2 экзон, частота встречаемости в опухолевой ткани кишечника 10-16).

В исследование включено 20 образцов опухолевой ткани кишечника – рак сигмовидной кишки и ректосигмоидного соединения, IIIA стадия. Половина из них (n=10)

содержали мутацию, а остальные (n=10) имели дикий генотип. Результаты подтверждены с помощью ПЦР в режиме реального времени (РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александра) и секвенирования по Сэнгеру. Общую фракцию ДНК выделяли с использованием набора реагентов «РНК-БЕЛ» (РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александра, Беларусь) из образцов нативной ткани (-70 °С). ПЦР в режиме реального времени в формате TaqMan проводили с использованием реагентов производства компании «Праймтех» (Беларусь). Качественные и количественные характеристики ДНК оценивали с использованием спектрофотометрии. Амплификацию для референсных методов проводили на оборудовании CFX-96 touch (Bio-Rad, США).

Основные результаты. В результате исследования сконструирована экспериментальная установка с электрохимическими импедансными ДНК-наносенсорами для определения мутационного статуса генов с использова-

нием принципа «label-free» детектирования методами диэлектрической спектроскопии. Разработаны численные методы анализа данных по секвенированию. Оптимизированы условия детекции однонуклеотидной замены SNP KRAS GGT>GAT в экспериментальных образцах (в повторениях). Во всех случаях получено 100% соответствие данным референсных методов.

Заключение/выводы. Электрохимическая импедансная спектральная нанотехнология ДНК-секвенирования на основе ДНК/УНТ комплексов является перспективной для определения мутационного статуса генов, может быть масштабирована для создания диагностических панелей в клинической медицине и исследованиях. Секвенирование с использованием наноуглеродных трубок в качестве переносчика сигнала образования дуплексов не требует привлечения ПЦР-стадии, что делает риск контаминации образцов ниже.

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АЛГОРИТМ ПОИСКА И АНАЛИЗА CRISPR/CAS-СИСТЕМ И СКРИНИНГА ФАГОВ ЧЕРЕЗ СПЕЙСЕРЫ CRISPR-КАССЕТ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Борисенко А.Ю.¹, Джиев Ю.П.^{1,2}, Злобин В.И.¹, Перетолчина Н.П.¹, Парамонов А.И.², Степаненко Л.А.¹, Колбасеева О.В.¹, Гусевская К.А.¹, Кузьмина В.А.³

¹ ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет», Иркутск, Россия

² ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия

³ ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

Введение. В настоящее время стафилококковые инфекции остаются серьезной проблемой практической медицины, среди них доминантом является *Staphylococcus aureus* [2, 3]. Учитывая тот факт, что стафилококковые инфекции крайне устойчивы к применяемой в их адрес терапии с использованием антибиотиков, необходима разработка новых подходов с применением новых технологий [1, 5]. Долгое время считалось, что бактерии беззащитны в отношении бактериофагов. Однако в последние годы в геноме бактерий была открыта CRISPR-система (англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) – это прямые повторы, разделенные переменными участками ДНК, спейсерами. Спейсеры соответствуют по нуклеотидной последовательности определенным фрагментам ДНК чужеродных генетических элементов (протоспейсерам), которые совместно с ассоциированными генами (*cas*, англ. *CRISPR-associated genes*) обеспечивают защиту клетки от чужеродных ДНК. Скрининг спейсеров с помощью биоинформационных методов позволяет определить степень устойчивости бактерий к специфичным фагам и плазмидам [4, 6, 7].

Цели исследования. 1. Поиск CRISPR/Cas-систем в геномах штаммов *Staphylococcus aureus* из базы данных GenBank. 2. Анализ бактериофагов, выявленных через расшифрованные спейсерные последовательности CRISPR-кассет анализируемых штаммов, при помощи разработанного биоинформационного программного алгоритма.

Материалы исследования. В качестве объекта исследования использовались геномы пяти штаммов

S. aureus, загруженные из базы данных GenBank: KB822075.1, CP007447.1, FN433596.1, CP009681.1, NZ_JXZM01000001.1.

Методы исследования. Для поиска CRISPR/Cas-систем использовались методы программного моделирования MacSyFinder (Macromolecular System Finder, ver.1.0.2). Для поиска CRISPR-кассет в геноме использовались три алгоритма поиска: PILER-CR: fast and accurate identification of CRISPR repeats, CRISPI: a CRISPR Interactive database and CRISPRFinder. Для поиска фагов через расшифрованные спейсерные последовательности использовали приложение CRISPRTarget: a tool to explore targets of CRISPR RNAs, Mycobacteriophage Database и Phages database.

Результаты и обсуждение. В результате анализа геномов исследуемых штаммов *S.aureus* было выяснено, что CRISPR-система бактерий относится к IIIA типу. При помощи алгоритма MacSyFinder удалось обнаружить структурные гены CRISPR: нуклеазные гены (*cas1*, *cas2*); RAMP семейства PHКаз, участвующих в обработке crRNA (*cas6*); малых и больших субъединиц (*cas10*, *cas2*); Cascade субъединиц (*csm3*, *csm4*, *csm5*) и регуляторов транскрипции (*csm6*). Для поиска CRISPR-кассет в геномах использовались три программных алгоритма поиска: PILER-CR, CRISPI и CRISPRFinder, которые позволили получить наборы компонентов кассет: повторов и спейсеров, перекрывающихся в 30 фрагментах. На основании трех программных совпадений по каждому участку были обнаружены до 29 повторов и до 27 спейсерных участков. Спейсеры были размером от 32 до 49 н.о., разделенные повторами длиной 37 н.о., имеющими следующую структуру последовательностей: TGATCGATAACTACCCCGAAGAATAGGGGACGAGAAC.