

Институт теоретической  
и экспериментальной биофизики РАН

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

# «ДЕНЬ ДНК – 2024»

25 апреля 2024 года

СБОРНИК ТЕЗИСОВ



Издательство «Синхробук»  
Пушино  
2024

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт теоретической и экспериментальной биофизики  
Российской академии наук

**МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ  
«ДЕНЬ ДНК – 2024»**

**25 апреля 2024 года**

**СБОРНИК ТЕЗИСОВ**

Издательство «Синхробук» (Synchrobook™)  
Пушино  
2024

**Материалы конференции «День ДНК – 2024», 25 апреля 2024 года.** Сборник тезисов /  
сост. сост. пресс-служба ИТЭБ РАН: к.б.н. Перевязова Т.А., к.б.н. Дюкина А.Р.,  
к.б.н. Зубов В.В.; оформление Абакумовой Ю.Ю. – Пушкино: ИТЭБ РАН, изд-во  
«Синхробук» (Synchrobook™), 2024. 32 с.

**ISBN 978-5-91874-912-8**

© ИТЭБ РАН, Пушкино, 2024  
© Синхробук (Synchrobook™), Пушкино, 2024  
© Абакумова Ю.Ю., оформление, 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

<i>Алексеев Я.И., Квон Д.А., Волков А.А., Волков И.А., Плугов А.Г., Алексеева А.Я., Малахова М.А., Петров А.И., Резник В.С., Кавалер А.И., Майоров С.Г., Грановский И.Э., Букатин А.С., Евстапов А.А., Мелентьев П.Н., Веретенников А.В., Курочкин В.Е.</i> Отечественные технологии секвенирования ДНК. Успехи и перспективы.....	5
<i>Гриневиц А.А., Масулис И.С., Якушевич Л.В.</i> Траектории кинков в плазмиде Ppf1 со встроенным фрагментом из генома <i>E. coli</i> .....	8
<i>Жданова Е.С., Ермаков А.М., Фролова М.С.</i> Распределение таксонов кишечной микробиоты при использовании секвенирования длинных и коротких фрагментов.....	11
<i>Заринов М.М., Шустов А.В.</i> Запуск РНК-вирусов с ДНК-матрицы вектора.....	13
<i>Зырина Н.В., Антипова В.А.</i> Проблемы неспецифического синтеза и подходы к их решению при изотермической амплификации нуклеиновых кислот.....	15
<i>Колотова А.А., Ермаков А.М.</i> Сравнение транскриптомов пациентов с диагнозом ОМЛ подтипа М2 при наличии и отсутствии мутации FLT3-itd.....	18
<i>Масулис И.С., Кабанов А.В.</i> Транскриптомика на уровне единичной клетки: Возможности. Ограничения. Перспективы.....	21
<i>Сирота Н.П.</i> Анализ цифровых изображений ДНК-комет.....	23
<i>Скалин М.Д., Орехов В.А., Янковский Н.К.</i> Современные подходы к определению биологического родства человека.....	26
<i>Чемерис А.В.</i> История открытия ДНК.....	27
СПОНСОРЫ.....	31



## **Отечественные технологии секвенирования ДНК. Успехи и перспективы**

*Алексеев Я.И.<sup>1,2</sup>, Квон Д.А.<sup>2</sup>, Волков А.А.<sup>2</sup>, Волков И.А.<sup>2</sup>, Плугов А.Г.<sup>2</sup>,  
Алексеева А.Я.<sup>2</sup>, Малахова М.А.<sup>2,3</sup>, Петров А.И.<sup>1</sup>, Резник В.С.<sup>1</sup>,  
Кавалер А.И.<sup>1</sup>, Майоров С.Г.<sup>4</sup>, Грановский И.Э.<sup>4</sup>, Букатин А.С.<sup>1</sup>,  
Евстрапов А.А.<sup>1</sup>, Мелентьев П.Н.<sup>5</sup>, Веретенников А.В.<sup>6</sup>, Курочкин В.Е.<sup>1</sup>*

- 1 Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия;
  - 2 Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственная фирма Синтол», Москва, Россия;
  - 3 Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова;
  - 4 Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пушкино, Россия;
  - 5 Институт спектроскопии РАН, Троицк, Россия;
  - 6 Акционерное общество ЭЗАН, Черноголовка, Россия.
- e-mail: jalex@syntol.ru

В настоящее время мир переживает очередной этап развития и усовершенствования молекулярно-генетических технологий, наиболее значимыми из которых являются технологии секвенирования ДНК. Исторически данные технологии разделяются на три «поколения» – классическое секвенирование по Сенгеру, массовое параллельное секвенирование и одномолекулярное секвенирование ДНК. Данное семейство технологий является востребованным и интенсивно развивающимся. Так, годовая динамика роста рынка молекулярно-генетических технологий РФ составляет около 20% и в перспективе сохранит этот показатель в ближайшие 10 лет.

Технологии секвенирования ДНК состоят из приборов – секвенаторов и вспомогательного оборудования, программного обеспечения для обработки и анализа геномных данных, расходных материалов и реагентов – как непосредственно для секвенаторов, так и для сопутствующих процессов, а также услуг по тестированию пациентов, биоинформатическому анализу и интерпретации геномных данных.

В силу геополитических событий последних лет происходят существенные изменения сложившихся ранее технологических цепочек и каналов

поставок, требующие разработки независимых от транснациональных корпораций суверенных технологических решений, применяющихся в критических областях человеческой жизнедеятельности. Генетические технологии, применяющиеся для решения задач персонализированной медицины, фундаментальной и прикладной науки, обеспечения биологической, экологической и продовольственной безопасности, несомненно, относятся к таковым.

Российская Федерация наряду с США и КНР относится к числу ведущих мировых держав, обладающих собственными технологиями секвенирования ДНК. Разработка классических секвенаторов Нанофор 05 и программного обеспечения к ним в 2011–2014 годах [1, 2], а также набора реагентов для классического секвенирования ДНК Генсек в 2022 году и сопутствующих реагентов и расходных материалов отечественного производства обеспечила независимость от импортных технологий и привела к существенному (в 3–5 раз) удешевлению исследований, и, как следствие, к повышению доступности технологии классического секвенирования ДНК. При этом качество данных, получаемых с помощью отечественной технологии, сопоставимо с лучшими импортными аналогами. В настоящее время в Российской Федерации налажен серийный (100 приборов в год) выпуск отечественных приборов Нанофор 05. Немаловажно, что отечественная технология классического секвенирования востребована и за рубежом. Экспорт составляет порядка 10% выпускаемой продукции. В настоящее время начата разработка более производительной модели классического секвенатора ДНК Нанофор 06. Прибор планируется выпустить на рынок в начале 2026 года.

Второй важнейшей технологией секвенирования ДНК является массовое параллельное секвенирование. До последнего времени на рынке РФ эта технология была представлена исключительно импортными приборами производства США и КНР. В 2020 году была завершена разработка первого отечественного полногеномного секвенатора ДНК Нанофор СПС [3]. По своим техническим характеристикам прибор сопоставим с секвенатором ДНК MiSeq (Illumina Inc., США). В настоящее время выпущено и функционирует 5 приборов, еще 15 находятся в производстве и будут выпущены до конца 2024 года. Также разработан отечественный набор реагентов для подготовки геномных библиотек СинтЭра (Синтол, Россия), аналогичный набору Nextera™ (Illumina Inc., США). Все компоненты, реализующие метод секвенирования путем синтеза с оптической детекцией и расходные материалы к прибору Нанофор СПС также отечественного производства [4]. На сегодняшний день реализовано парноконцевое секвенирование ДНК 2×75 нуклеотидов, обеспечивающее получение объема данных одного запуска более 6 миллиардов нуклеотидов с качеством не ниже Q30. Необходимо отметить, что в период 2019–2024 гг. в РФ спрос на полногеномные секвенаторы вырос на 40% по

сравнению с аналогичным периодом 2013–2018 гг. В связи с этим необходимо наращивать производство Нанофоров СПС, и, одновременно, разработать и вывести на рынок в 20–30 раз более производительный отечественный полногеномный секвенатор.

Третьей и наиболее современной технологией секвенирования ДНК является одномолекулярное секвенирование, реализованное в вариантах нанопорового секвенирования (Oxford Nanopore Technologies Inc., Великобритания) и оптического секвенирования (PacBio Inc., США). Основным преимуществом этих технологий является возможность длинного (10–100 тысяч нуклеотидов) прочтения последовательности с единичных молекул ДНК. В настоящее время разрабатывается отечественная технология одномолекулярного секвенирования в варианте, аналогичном технологии SMRT PacBio Inc. Выпущен опытный образец аппаратно-программного комплекса одномолекулярного секвенирования АПКОС (ИАП РАН, Россия) [5]. В конце 2023 года успешно проведены технические и межлабораторные испытания опытного образца. В настоящее время идет совершенствование аналитических характеристик – чувствительности и длины прочтения. Выход на серийное производство секвенатора АПКОС предполагается в 2026 году.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Малюченко О.П., Монахова Ю.А., Натыров А.Н., Орехов В.А., Коновалов С.В., Курочкин В.Е., Петров А.И.* Генетический анализатор для фрагментного анализа ДНК. // Научное приборостроение. 2012. Т. 22. № 4. С. 86–92.
2. *Волков А.А., Волков И.А., Плугов А.Г., Кулябина Е.В., Мелкова О.Н., Лавров Г.С., Бочарова Д.В., Алексеев Я.И.* Генетический анализатор Нанофор 05 в качестве средства измерений при секвенировании ДНК. // Измерительная техника. 2021. № 1. С. 60–65.
3. *Букатин А.С., Алексеев Я.И., Петров Д.Г., Курочкин В.Е., Евстапов А.А.* Импортозамещение: отечественные приборы для молекулярно-генетического анализа. // Экономические стратегии. 2023. Т. 25. № 3 (189). С. 36–41.
4. *Малахова М.А., Гусев В.С., Седов Я.Д., Смирнов А.Д., Тугушев М.Ш., Резник В.С., Петров А.И., Есикова Н.А., Евстапов А.А., Курочкин В.Е., Алексеев Я.И.* Разработка технологии производства микрофлюидных ячеек для массового параллельного секвенирования ДНК. // Тезисы докладов Второй ежегодной всероссийской молодежной конференции по методам и приборам для анализа биологических объектов «АналитБиоПрибор-2023». 2023. С. 86–88.
5. *Букатин А.С., Мелентьев П.Н., Алексеев Я.И.* Разработка оптического одномолекулярного секвенатора ДНК. // Тезисы докладов Второй ежегодной всероссийской молодежной конференции по методам и приборам для анализа биологических объектов «АналитБиоПрибор-2023». 2023. С. 20–22.



## Траектории кинков в плазмиде *rpf1* со встроенным фрагментом из генома *E. coli*

Гриневич А.А., Масулис И.С., Якушевич Л.В.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия.

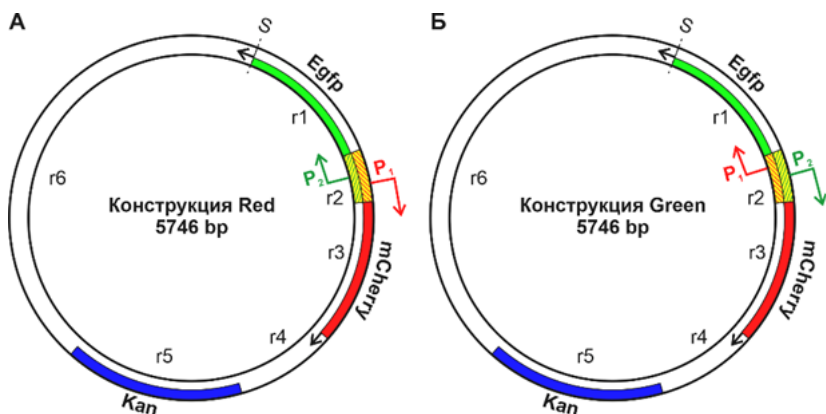
e-mail: grin\_aa@mail.ru

Динамические и функциональные свойства ДНК тесно связаны [1, 2]. Динамика оснований определяет динамические свойства открытых состояний, играющих ключевую роль в процессе транскрипции и регуляции экспрессии генов. Одним из основных методов изучения динамики оснований в ДНК является математическое моделирование. Для математического описания открытых состояний часто используют кинки, формирующиеся в результате нелинейной вращательной динамики оснований вокруг сахара-фосфатного остова [2]. Построение и анализ траекторий кинков в ДНК помогает понять, как динамические свойства молекулы связаны с экспрессией генов и ее регуляцией.

Известно, что в транскрибировании генетической информации важное участие принимает торсионный момент [3]. Он может формироваться в результате различных воздействий, например, при взаимодействии РНК-полимеразы с промоторными участками ДНК. Необходимо учитывать этот ключевой регуляторный фактор в моделировании динамики ДНК для понимания его влияния на форму траектории кинков.

Одним из удобных инструментов для исследования функциональных свойств различных промотороподобных участков в ДНК является плаزمид *rPF1* [4]. Она позволяет регистрировать транскрипцию в двух направлениях. Цель работы, используя математическую модель ДНК, построить и проанализировать траектории кинков в плазмиде *rPF1* со встроенным фрагментом из генома *E. Coli*, насыщенного промотороподобными участками, для выявления связи между динамическими и функциональными свойствами молекулы с учетом влияния торсионного момента.

В данной работе были рассмотрены две генетические конструкции *arrY\_red* (Red) и *arrY\_green* (Green) (рис.), созданных на базе плазмиды *rPF1* со встраиванием в нее в двух разных ориентациях участка *E. Coli*, взятого из регуляторной области гена *arrY*.



**Рис.** Схематическое изображение плазмиды *pPF1* со вставкой фрагмента генома *E. Coli* в двух ориентациях: Red (А) и Green (Б). Зеленым цветом обозначен ген *Egfp*, красным – ген *mCherry*, синим – ген *Kan* (Kanamycin), заштрихованным – исследуемый участок. P1 и P2 – точки стартов промоторов. Точка S указывает на начало нумерации нуклеотидной последовательности.

Для исследования этих конструкций использовалась математическая модель, основное уравнение которой имеет вид:

$$I(z)\partial^2\phi\partial t^2 - K^*a^2\partial^2\phi\partial z^2 + Vz\sin\phi - K^*a^2Rz^2\partial\phi/\partial z\partial R\partial z + \phi\partial^2R\partial z^2 + \lambda z\partial\phi\partial t = Mz.t.$$

где  $\phi$  – угол отклонения оснований от положения равновесия,  $I$  – момент инерции основания,  $K^*$  – кругливая жесткость сахаро-фосфатного остова,  $V$  – потенциал взаимодействия между комплементарными парами,  $R$  – радиус основания,  $\lambda$  – коэффициент трения,  $M$  – торсионный момент.

Были построены энергетические профили исследуемых конструкций и оценены энергетические барьеры. Показано, что наиболее глубокие энергетические ямы находятся в области  $r2$  (рис.), а при активации кинков в этой области их движение, в случае прямой ориентации (Red), энергетически более благоприятно в направлении гена красного белка по кодирующей нити. В случае противоположной ориентации (Green), движение кинков энергетически более благоприятно в направлении гена зеленого белка по комплементарной нити. Это согласуется с наличием промоторов в исследуемом фрагменте *E. Coli* и количественной оценкой экспрессии генов, полученной экспериментально.

Для анализа динамики кинков были построены их траектории для различных значений торсионных моментов в исследуемых конструкциях

и оценены направления и скорости движения кинков, а также минимальные значения торсионных моментов и времена, необходимые для достижения и преодоления кинками энергетических барьеров. Показано, что формы траекторий кинков менялись от затухающих колебаний до поступательного движения при увеличении торсионного момента выше некоторых пороговых значений. При этом в конструкции Red пороговое значение торсионного момента было ниже при движении кинка в сторону гена красного белка, чем в сторону гена зеленого белка. В конструкции Green наблюдалась обратная ситуация. При преодолении барьеров кинк сильно снижал свою скорость, а после, восстанавливал ее до стационарного уровня. Соотношение времен достижения границ области  $r_2$ , скоростей преодоления барьеров и стационарных скоростей движения кинков по участкам генов флуоресцентных белков для промоторов P1 и P2 при одинаковых торсионных моментах менялось при изменении ориентации вставленного фрагмента, что говорит о влиянии окружения плазмиды на активность промоторов.

Таким образом, используемая математическая модель ДНК достаточно хорошо описывает особенности внутренней динамики молекулы ДНК в присутствии внешнего торсионного поля. Она позволила выявить динамические особенности кинков, моделирующих открытые состояния в ДНК, и их важный вклад в эффективность транскрипции, а также то, что рассмотренные конструкции не являются эквивалентными с точки зрения чувствительности их структурно-динамических свойств к уровню суперскрученности ДНК, что и показывает связь между динамическими и функциональными свойствами молекулы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Duzdevich D., Redding S., Greene E.C.* DNA dynamics and single-molecule biology. // *Chemical Reviews*. 2014. Vol. 114. P. 3072–3086.
2. *Yakushevich L.V., Krasnobaeva L.A.* Ideas and methods of nonlinear mathematics and theoretical physics in DNA science: the McLaughlin-Scott equation and its application to study the DNA open state dynamics. // *Biophysical Reviews*. 2021. Vol. 13. P. 315–338.
3. *Ma J., Wang M.D.* DNA supercoiling during transcription. // *Biophysical Reviews*. 2016. Vol. 8. P. 75–87.
4. *Masulis I.S., Babaeva Z.Sh., Chernyshov S.V., Ozoline O.N.* Visualizing the activity of Escherichia Coli divergent promoters and probing their dependence on superhelical density using dual-color fluorescent reporter vector. // *Scientific Reports*, 2015. Vol. 5. P. 11449.

## **Распределение таксонов кишечной микробиоты при использовании секвенирования длинных и коротких фрагментов**

*Жданова Е.С.<sup>1</sup>, Ермаков А.М.<sup>1</sup>, Фролова М.С.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

<sup>2</sup> Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия.

e-mail: dla\_lisa@mail.ru

В желудочно-кишечном тракте живых существ обитает большое количество бактерий, как облигатных, так и факультативных анаэробов. Часть бактерий выполняет полезные функции для организма хозяина, в том числе метаболические и защитные функции в ЖКТ. Кишечные бактерии участвуют в процессах усваивания питательных веществ, с последующим образованием большого числа сигнальных молекул и метаболитов, принимают участие в синтезе витаминов, влияют на дифференцировку иммунных клеток в кишечнике. Нарушения в микробиоте человека связаны с целым рядом заболеваний, от аллергии и аутоиммунных заболеваний до рака и аутизма [1, 2].

Взаимодействия между хозяином и бактериальным сообществом сложны и только начинают изучаться. Большая часть знаний о бактериальном разнообразии в ЖКТ человека была получена путем селективного культивирования микробов из образцов фекалий, что ограничивало количество получаемых данных и их достоверность из-за малого числа культивируемых бактерий. Однако с появлением секвенирования переменных последовательностей 16S рРНК генов получилось обойти это ограничение, но знание о структуре и взаимодействиях кишечного микробиома все еще неполноценны. Одна из причин – отсутствие достаточной изученности микроорганизмов, выделенных из различных отделов кишечника. Современные данные основываются на анализе образцов фекалий, которые значительно отличаются от исследований сообществ, полученных из прямой кишки [3].

Длина гена 16S рРНК составляет около 1500 нуклеотидных пар и содержит девять переменных областей. Большинство протоколов генотипирования на основе 16S рРНК используют гиперпеременные области V5–V6, V3–V4 или V4 для идентификации и каталогизации микробных профилей [4]. Проблема такого подхода заключается в получении профилей сообществ с низким таксономическим разрешением, которые трудно интерпретировать [5].

Альтернативным вариантом является использование длинных фрагментов гена 16S рРНК, что устраняет вопрос выбора переменной области и одновременно повышает таксономическое разрешение. Секвенирование фрагментов более 600 нуклеотидных пар стало возможным благодаря появ-

лению секвенаторов третьего поколения. Ранее отмечались недостатки подобных технологий, в частности, высокий уровень ошибок при считывании, что ограничивало их полезность при профилировании микробиома.

Целью нашего исследования было определить, значительно отличается ли бактериальный состав образцов толстой и тонкой кишки от состава образцов фекалий при нейродегенеративных патологиях, и существуют ли отличия при использовании разных длин фрагментов 16S рРНК.

Для определения различий в таксономическом составе использовались фекальные и кишечные образцы мышей линии BALB/c, предоставленные лабораторией системной организации нейронов. Первая и вторая экспериментальная группа мышей подвергались введению Аβ1-42, второй дополнительно вводили GSK, как терапию селективным ингибитором НАДФН оксидазы 2. Третья группа была контрольной.

Из полученных образцов выделялась тотальная ДНК, которая после подвергалась двух раундам амплификации для получения полных ампликонов 16S РНК. Ранее нами были подобраны универсальные праймеры в базе данных Silva на 16S РНК с покрытием более 82% бактериальных таксонов.

В уже существующих исследованиях по микробиоте используются универсальные праймеры для отдельных участков 16S РНК. Используемый нами праймер для регионов V3–V4 является вырожденным и захватывает также таксон архей. Амплификация коротких фрагментов 16S РНК происходила в один этап.

Подготовка библиотек для секвенирования происходила по протоколу SQK-LSK109, разработанному Oxford Nanopore Technologies, с использованием оригинальных реагентов.

Запуск секвенирования производился на ячейке MinION.

Количество детектируемых видов было выше при использовании полного оперона 16S рРНК, чем при секвенировании участков V3–V4. Наибольшее разнообразие отмечалось в микробиоте, выделенной из фекальных образцов независимо от длины секвенируемых фрагментов ДНК.

При исследовании различий в таксономическом составе в зависимости от места локализации внутри одной исследуемой группы было выявлено, что наибольшее количество различий детектировалось в группе мышей, подвергнутых введению Аβ1-42 и GSK. Такая картина наблюдалась при секвенировании как длинных, так и коротких фрагментов 16S рРНК.

Видовое разнообразие наиболее сильно различалась в тонком кишечнике по сравнению с фекальными образцами и образцами, полученными из толстого кишечника. Часть видов, представленных в фекалиях и толстом кишечнике, отсутствовали в тонком отделе кишечника. К таким видам можно отнести *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Lachnoanaerobaculum umeense*, *Mobilisporobacter senegalensis*, *Anaerostipes butyraticus*,

*Marseilla massiliensis*, *Parabacteroides chartae*, *Muribaculum intestinale*, *Turicimonas muris*, *Parabacteroides chartae* и другие.

На полноту таксономической картины влияет не только место локализации образцов, но и длина используемых фрагментов. Более 20 видов бактерий были обнаружены только при секвенировании полного оперона 16S рРНК.

Исследование было выполнено при поддержке гранта Правительства Московской области в сфере науки, технологий, техники и инноваций (соглашение № 39/12–23).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Neuman H. et al.* Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system. // *FEMS microbiology reviews*. 2015. V. 39. № 4. P. 509–521.
2. *Lynch S.V., Pedersen O.* The human intestinal microbiome in health and disease. // *New England Journal of Medicine*. 2016. V. 375. № 24. P. 2369–2379.
3. *Marteau P. et al.* Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. // *Applied and environmental microbiology*. 2001. V. 67. № 10. P. 4939–4942.
4. *Woo P.C.Y. et al.* Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. // *Clinical Microbiology and Infection*. 2008. V. 14. № 10. P. 908–934.
5. *Janda J.M., Abbott S.L.* 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. // *Journal of clinical microbiology*. 2007. V. 45. № 9. P. 2761–2764.

### Запуск РНК-вирусов с ДНК-матрицы вектора

*Зарунов М.М.<sup>1</sup>, Щустов А.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

<sup>2</sup> Национальный центр биотехнологии, Астана РК.

e-mail: mizaripov@mail.ru

Первым РНК вирусом, запуск которого был осуществлён в эукариотической клетке с бактериальной плазмиды стал вирус полиомиелита. Как пишет в своём коротком сообщении в ноябрьском выпуске журнала *Science* от 1981 года “Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells” 28 летний Винсент Раканиелло, комплементарная ДНК полиовируса была вставлена в плазмидный вектор рBR322 по уникальному сайту PstI [1]. На вопрос к своему PI, на тот момент уже нобелев-

скому лауреату Дэвиду Балтимору, а может добавить какойнибудь промотор, получил ответ – “Don’t bother. Just transfect the plasmid into cells”.

Результат можно было бы назвать революционным, если бы ранее похожий трюк прошел и с РНК-вым бактериальным вирусом в бактерии, и таким образом вдохновил коллектив Балтимора. Тем не менее, результат этих экспериментов позволил работать с молекулярными клонами, невероятно облегчил работу с РНК-выми вирусами, позволив применить к ним методы генетической инженерии, открыл широчайшие возможности для изучения многих аспектов их репликации и что особенно важно стал мощным базовым подходом при создании современных вакцин.

Немного позже инфекционность таких плазмид была улучшена многочисленными логическими и конструкционными модификациями, среди которых можно перечислить установление перед кДНК вируса эукариотических промоторов или их синтетических вариантов, фланкирование HHR (hammerhead ribozyme) и HDR (рибозим из вируса гепатита дельта), установление сигналов эукариотического полиаденилирования, транскрипционных энхансеров типа WPRE (посттранскрипционный регуляторный элемент из вируса гепатита сурка) [2]. Все эти ухищрения приводили к кратному или существенному улучшению инфекционности плазмид. В некоторых случаях конструкторы прибегали даже к вставке интронов, что бы улучшить экспрессионные свойства или же для блокирования нежелательной экспрессии токсичных последовательностей при наработке плазмид в бактериях (необходимость такого приёма была, в частности, продиктована вирусом леса Семлики) [3].

Здесь необходимо сделать оговорку в отношении РНК-вых вирусов с негативной полярностью. С вполне объяснимым запозданием системы запуска таких вирусов с плазмидных векторов так же были реализованы или продолжают разрабатываться, но в силу концептуальной большей сложности стратегии сохранения и репликации генетического материала применение таких систем остаётся в рамках научного поиска. Интересующийся читатель легко найдёт свежие обзоры для ознакомления с положением дел [4].

Дальнейшее изложение темы будет проиллюстрировано в устной презентации и будет касаться трёх вирусов, которыми мы занимаемся в лаборатории клеточной инженерии. В частности, это вирусы (молекулярные клоны 1 и 3 штаммов) полиомиелита из вакцины Сэйбина. Коронавирус SARS-CoV-2, вирус краснухи. Эти вирусы рассматриваются нами в качестве перспективных и безопасных вакцин для индукции мукозного иммунитета. Вкратце так же будет представлена генетическая карта плазмиды с ВЭЛ (вирус венесуэльского энцефалита лошадей) и будут описаны некоторые перспективные полезные свойства этого вируса.

Все геномы этих вирусов сконструированы нами для запуска с плазмидных векторов.

В заключение стоит добавить, что «плазмидный» подход кратно, если не на порядки удешевляет работы с РНК-выми вирусами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Racaniello V.R., Baltimore D.* Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. // *Science*, 1981, 214, 916–919.
2. *Herold J., Andino R.* Poliovirus Requires a Precise 5' End for Efficient Positive-Strand RNA Synthesis. // *J Virol*. 2000. Jul;74(14):6394–400.
3. *Viru L.* Development and analysis of novel alpha virus-based multifunctional gene therapy and expression systems. 2013. Диссертация.
4. *Wang M., Wu J., Can X., Xu L., Wu J., Ding H., Shang Y.* Developments in Negative-Strand RNA Virus Reverse Genetics Microorganisms. 2024, 12(3), 559;

### **Проблемы неспецифического синтеза и подходы к их решению при изотермической амплификации нуклеиновых кислот**

*Зырина Н.В.<sup>1,2</sup>, Антипова В.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

<sup>2</sup> Институт биологического приборостроения РАН, Пущино, Россия.

e-mail: zyrina.nv@gmail.com

Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот разрабатываются в качестве перспективной альтернативы ПЦР, особенно для средств диагностики, которые можно применять непосредственно «на местах» [1, 2]. Разработаны различные тесты для обнаружения ДНК и РНК патогенов, такие как NUCLISENS (bioMerieux, Франция), Illustra TempliPhi™ (Cytiva, США), WarmStart® LAMP Kit (NEB, США), LavaLAMP™ DNA Master Mix (Lucigen, США), Амплитест SARS-COV-2 LAMP (ФМБА, России) и др.

Однако существует проблема, которой не уделяется должного внимания. Проблема эта – появление неспецифических продуктов амплификации, критически препятствующих идентификации специфических последовательностей или их синтезу в препаративных количествах за счет появления ложноположительных результатов, значительного снижения чувствительности и специфичности метода, а также ограничения максимальной длины синтезируемого фрагмента [3]. Таким образом, неспецифический синтез ограничивает применение изотермической амплификации нуклеиновых кислот в качестве альтернативы ПЦР. Возникновение неспецифических продуктов при изотермической амплификации объяс-



няют некорректной гибридизацией праймеров, синтезом ДНК *ab initio* и дополнительными активностями ДНК-полимераз.

Основной причиной образования неспецифических продуктов считают нежелательные взаимодействия комплементарных участков праймеров с образованием димеров и шпилек, способных к удлинению ДНК-полимеразой, а также неспецифические взаимодействия праймеров с матрицей. Для решения проблемы некорректного праймирования предлагаются различные подходы: детекция амплификации мишени с помощью зондов, маяков, или схем «репортер-гаситель» [4]. Другой подход заключается в использовании математических моделей и ПО, позволяющих предсказывать размер, количество и специфичность искомым продуктам в зависимости от целевой ДНК, набора праймеров, а также условий реакции [5, 6]. Еще один подход, применяемый для снижения количества неспецифических продуктов, – дополнительное внесение химических соединений: диметилсульфоксида, тетраметилсульфоксида, глицерина и пулулана в реакцию изотермической амплификации [7]. Кроме этого, предлагают блокирование 3'-конца матрицы, например, с помощью пептидной нуклеиновой кислоты [8], и ослабление взаимодействий ДНК, независимых от последовательности, например, добавлением белка SSB *E. coli* [9].

В качестве причины появления неспецифических продуктов в реакциях изотермической амплификации ДНК рассматривают нетривиальный феномен – синтез ДНК *ab initio* или безматричный синтез [10]. Он представляет собой способность ДНК-полимераз синтезировать ДНК в отсутствие праймера/матрицы. Результатом является целый спектр продуктов от нескольких десятков до десятков тысяч п.о. Эффективность синтеза ДНК *ab initio* значительно увеличивается в присутствии эндонуклеаз рестрикции и никующих эндонуклеаз, которые применяют в ряде методов изотермической амплификации. Показана возможность ингибирования синтеза *ab initio* добавлением в реакционную смесь белков T4 gp32 и SSB *E. coli* [11].

И, наконец, синтез неспецифических продуктов объясняют проявлением дополнительных активностей ДНК-полимераз [12]. Так, кроме полимеразной и экзонуклеазной активностей ДНК-полимеразы могут иметь активности обратной транскриптазы (RT) и терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TdT). Источником проблем амплификации может выступать и конфликт функциональных свойств ДНК-полимеразы [12]. Так, полимеразы, которые позволяют получать высокий выход продукта, имеют меньшую точность. Эти факты необходимо учитывать, выбирая ДНК-полимеразу при разработке или адаптации метода изотермической амплификации для определенной задачи.

На наш взгляд, для успешного внедрения каждого метода изотермической амплификации в широкую практику проблема синтеза неспецифических продуктов требует отдельного внимания. Имеющиеся данные позволяют предположить, что сам механизм того или иного метода изотермической амплификации нуклеиновых кислот наряду с условиями реакции может диктовать основную причину неспецифической амплификации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L. and Fan C. Isothermal amplification of nucleic acids. // Chem. Rev. 2015, 115, 12491–12545, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00428.
2. Obande G.A. and Banga Singh K.K. Current and future perspectives on isothermal nucleic acid amplification technologies for diagnosing infections. // Infect. Drug Resist. 2020, 13, 455–483, doi: 10.2147/IDR.S217571.
3. Зырина Н.В., Антипова В.А. Неспецифический синтез нуклеиновых кислот в реакциях изотермической амплификации. // Биохимия, 2021. 86, 1066–1077, DOI: 10.31857/S0320972521070101.
4. Rolando J.C., Jue E., Barlow J.T. and Ismagilov R.F. Real-time kinetics and high resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification. // Nucleic Acids Res. 2020, 48, e42–e42, doi: 10.1093/nar/gkaa099.
5. Markham N.R. and Zuker M. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. // Nucleic Acids Res. 2005, 33, W577–W581, doi: 10.1093/nar/gki591.
6. Schneider L., Blakely H. and Tripathi A. Mathematical model to reduce loop mediated isothermal amplification (LAMP) false-positive diagnosis. // Electrophoresis, 2019, 40, 2706–2717, doi: 10.1002/elps.201900167.
7. Gao X., Sun B. and Guan Y. Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). // Anal. Bioanal. Chem. 2019, 411, 1211–1218, doi: 10.1007/s00216-018-1552-2.
8. Lobato I.M. and O'Sullivan C.K. Recombinase polymerase amplification: basics, applications and recent advances. // Trends Anal. Chem. 2018, 98, 19–35, doi: 10.1016/j.trac.2017.10.015.
9. Inoue J., Shigemori Y. and Mikawa T. Improvements of rolling circle amplification (RCA) efficiency and accuracy using *Thermus thermophilus* SSB mutant protein. // Nucleic Acids Res. 2006, 34, e69–e69, doi: 10.1093/nar/gkl350.
10. Zyrina N.V., Antipova V.N. and Zheleznyaya L.A. *Ab initio* synthesis by DNA polymerases. // FEMS Microbiol. Lett. 2014, 351, 1–6, doi: 10.1111/1574-6968.12326.
11. Зырина Н.В., Артюх Р.И., Свадьбина И.В., Железная Л.А., Матвиенко Н.И. Влияние белков, связывающихся с одноцепочечной ДНК, на безматричный/беспраймерный синтез ДНК в присутствии никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I. // Биоорганическая химия. 2012, 38, 199–205, doi: 10.1134/S1068162012020161.

12. Pavlov A.R., Pavlova N.V., Kozyavkin S.A, and Slesarev A.I. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. // Trends Biotechnol. 2004, 22, 253–260, doi: 10.1016/j.tibtech.2004.02.011.

## **Сравнение транскриптомов пациентов с диагнозом ОМЛ подтипа М2 при наличии и отсутствии мутации FLT3-*itd***

*Колотова А.А.<sup>1</sup>, Ермаков А.М.<sup>2</sup>*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.

<sup>1</sup>e-mail: anas.kolotowa2010@yandex.ru; <sup>2</sup>e-mail: ao\_ermakovy@rambler.ru

Ген рецептора тирозинкиназы FLT3 играет ключевую роль в регуляции нормального кроветворения. В результате мутаций рецептор тирозинкиназы сверхэкспрессируется или чрезмерно активируется, что приводит к лиганд-независимой передаче сигналов FLT3, затрагивающих нисходящие сигнальные пути, преимущественно стимулирующие пролиферацию миелоидных клеток [1].

Наиболее распространенной аномалией, на которую приходится до 34% случаев острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), является внутреннее тандемное удвоение нуклеотидов (internal tandem duplication, ITD). При этом типе мутации короткая последовательность ДНК копируется и вставляется непосредственно после исходной последовательности. Дублированная последовательность ДНК может варьироваться по размеру, но 75% FLT3-ITD мутаций приводят к изменениям именно в области околотебранного домена. Измененный домен позволяет рецептору FLT3 активировать сигнальные пути без связывания лигандом. Постоянная сигнализация затрагивает сигнальные пути STAT5, RAS/MAP, PI3K/АКТ [2] и приводит к неконтролируемой пролиферации аномальных, незрелых лейкоцитов, которые являются отличительной чертой ОМЛ.

Наличие мутации FLT3-ITD приводит к снижению общей выживаемости у пациентов с нормальным кариотипом, что делает ее значимым прогностическим фактором для пациентов с ОМЛ. Больные с этой мутацией имеют неблагоприятный прогноз и сравнительно короткий срок жизни [3].

В результате нанопорового РНК-секвенирования образцов моонуклеарной фракции клеток костного мозга пациентов с ОМЛ М2 FLT3-ITD+ в сравнении с ОМЛ М2 FLT3-ITD- ( $n = 2$  для ОМЛ М2 FLT3-ITD- и  $n = 2$  для М2 FLT3-ITD+) и биоинформатического анализа данных (DESeq2 и анализ обогащения наборов генов по антологии GO) получены следующие результаты:

Выявлен 21 ген с достоверно изменяющейся экспрессией в образцах M2 FLT3-ITD+ по сравнению с M2 FLT3-ITD-;

Из группы 21 гена к генам, имеющих наиболее повышенную экспрессию ( $\log_2\text{FoldChange} > 2$ ) в образцах M2 FLT3-ITD+ в сравнении с M2 FLT3-ITD-, относятся два гена: MS4A3 (Membrane Spanning 4-Domains A3) и DEFA3 (Defensin Alpha 3).

Ген MS4A3 является гемопоэтический модулятором для перехода G1-S клеточного цикла и модулирует уровень фосфорилирования циклинзависимой киназы 2 (CDK2) посредством ее прямого связывания с ингибитором циклинзависимой киназы 3 (CDKN3/КАР) [4]. Повышенная экспрессия данного гена в образцах FLT3-ITD+ может свидетельствовать о форсировании перехода в фазу репликации ДНК и вследствие этого еще более активной пролиферации клеток.

Продукты гена DEFA3 относятся к семейству антимикробных и цитотоксических белков, которые, как полагают, за счет своих антибиотикоподобных свойств участвуют в защите организма от широкого спектра инфекционных агентов, включая бактерии, грибки и вирусы. Также данные белки обладают способностью нейтрализовать бактериальные токсины, такие как летальный фактор *B. anthracis*, цитотоксин В *Clostridium difficile*, а также лейкоцидин, продуцируемый золотистым стафилококком [5]. Влияние повышенной экспрессии данного гена в данном случае нуждается в дополнительном исследовании;

После анализа обогащения GO по онтологии генов, относящихся к биологическим процессам (BP), были выявлены биологические процессы с пониженной и повышенной экспрессией в них.

Биологические процессы с пониженной экспрессией генов можно разделить на две группы. Первая группа включает процессы, отвечающие за нарушение целостности плазматической мембраны, структуры клеток и клеток в целом. Понижение экспрессии генов в этих процессах указывает на большую стабильность клеток и, как следствие, повышении их выживаемости в подтипе M2 FLT3-ITD+. Ко второй группе относятся процессы иммунного ответа в слизистой оболочке, специфического иммунного ответа в органах и тканях, защитного ответа на воздействие патогенных грибов и бактерий, в которых понижение экспрессии может свидетельствовать о повышении уязвимости организма для инфекционных агентов и появлении сопутствующих заболеваний, осложняющих лечение.

Повышенной экспрессией генов обладает группа биологических процессов, связанных с подвижностью клеток, в частности подвижности с помощью ресничек. Наличие также повышения экспрессии в путях транспорта, обусловленного микротрубочками, которые входят в состав

ресничек, может говорить о прохождении в клетках процессов, не связанных с внешней подвижностью, но необходимых для выживания и размножения клетки. Так, например, описаны процессы постоянного перемещения внутренних органелл клетки для поддержания своего метаболизма, а также значительные структурные перестройки цитоскелета, влияющие на работу митотического веретена деления, которое разделяет хромосомы в процессе митоза [6]. Соответственно, повышение активности данных процессов в клетках может свидетельствовать о увеличенном метаболизме клеток и форсировании процесса деления клеток вследствие ускорения работы веретена деления, то есть в целом о более стремительном увеличении количества бластов при ОМЛ M2 FLT3-ITD+ в сравнении с ОМЛ M2 FLT3-ITD– за счет ускорения процесса пролиферации клеток, что может быть причиной осложненного течения заболевания и снижения общей выживаемости.

Таким образом, можно предположить, что наличие мутации FLT3-ITD в подтипе M2 ОМЛ различными путями ускоряет пролиферацию клеток и снижает устойчивость организма к грибковым и бактериальным инфекционным агентам, что в совокупности осложняет течение заболевания, ухудшает прогноз выздоровления пациентов и снижает общую выживаемость в сравнении с подтипом M2 без данной мутации.

Исследование было выполнено при поддержке гранта Правительства Московской области в сфере науки, технологий, техники и инноваций (соглашение № 39/12–23).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Nitika, Wei J., Hui A.-M.* Role of Biomarkers in FLT3 AML. // *Cancers*, 2022, 14, 1164. <https://doi.org/10.3390/cancers14051164>.
2. *Gu T., Nardone J., Wang Y. et al.* Survey of Activated FLT3 Signaling in Leukemia. // *PLoS ONE*. 2011;6(4):e19169. doi: 10.1371/journal.pone.0019169.
3. *Radmacher M.D. et al.* Independent confirmation of a prognostic gene-expression signature in adult acute myeloid leukemia with a normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. // *Blood*. 2006. V. 108. № . 5. P. 1677–1683.
4. MS4A3 Gene, GeneCards®: The Human Gene Database. — Израиль. 1996–2024. — URL: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MS4A3> (дата обращения: 24.03.2024).
5. *Ericksen B., Wu Z., Lu W., Lehrer R.I.* Antibacterial activity and specificity of the six human {alpha}-defensins. // *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jan;49(1):269–75. doi: 10.1128/AAC.49.1.269–275.2005. PMID: 15616305; PMCID: PMC538877.
6. *Risler T.* Cytoskeleton and Cell Motility. In: Meyers, R. (eds) *Encyclopedia of Complexity and Systems Science*. // Springer, 2013. New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-27737-5\\_112-3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-27737-5_112-3).

## **Транскриптомика на уровне единичной клетки: Возможности. Ограничения. Перспективы**

*Масулис И.С., Кабанов А.В.*

Институт биофизики клетки РАН «Федерального исследовательского центра  
«Пуцинский научный центр биологических исследований Российской  
академии наук».  
e-mail: masulus@icb.psn.ru

Применение методов масштабного секвенирования РНК (RNAseq), ставшее возможным благодаря появлению инструментария нового поколения, широко применяется для исследования глобального переключения экспрессии генов при самых разных физиологических воздействиях, адаптации к неблагоприятным условиям, при изучении патогенеза заболеваний. Транскриптомный анализ превращается в неотъемлемый элемент исследования биологической системы на молекулярном уровне, приобретая характер рутинной процедуры. В большинстве случаев источником материала для выделения РНК являются образцы тканей или культуры микроорганизмов, что неизбежно предполагает реконструкцию усредненного профиля представленности транскриптов в силу гетерогенности клеточного состава. Это, бесспорно, позволяет выявить наиболее выраженные эффекты на уровне дифференциальной экспрессии генов. Однако, многие патологические явления, включая онкопластическую трансформацию, аутоиммунные синдромы, инициируются в отдельных клетках, развиваясь затем в генерализованные процессы. Поэтому исследователей давно интересовала возможность получения информации о состоянии транскрипционного профиля индивидуальных клеток. Первые попытки изучения экспрессии генов в изолированных нейронах были предприняты в начале 90-х гг. прошлого века [1]. Аппликация обратной транскриптазы, олигонуклеотидного праймера и субстратов для синтеза кДНК проводилась непосредственно в клетку с использованием микроэлектродов, последующий синтез кДНК проходил в капилляре микроэлектрода. Так была впервые показана принципиальная возможность анализа транскриптов в одиночной клетке. Эта идея была взята на вооружение в ИБК РАН при исследовании экспрессии генов рецепторных и сигнальных белков в одиночных клетках вкусовой почки млекопитающих в работах М.Ф. Быстровой с коллегами [2]. С помощью ОТ-ПЦР были проанализированы выборки отдельных клеток, репрезентативных для трех клеточных типов вкусового анализатора и показана вариабельность в составе транскриптов характерных маркерных генов. Этот факт подтвердил интуитивную гипотезу о стохастическом характере реализации генетической информации, на которую оказывают влия-

ние стадия клеточного цикла, микроокружение, эпигенетический статус клетки, вовлеченность хроматина в процессы транскрипции и репликации. Аналогичные работы с анализом выборочных генов в «ручном» режиме экстракции РНК из отдельных клеток были сделаны немецкими учеными для обонятельного эпителия мыши [3]. Этот период совпал с имплементацией NGS-транскриптомики в практику исследований и адаптации этого метода для характеристики спектра РНК в отдельных клетках смешанной популяции. С 2010 года зафиксирован 20-кратный рост публикаций, базирующихся на данных single cell секвенирования РНК (scRNAseq). Критичным этапом для внедрения scRNAseq является технология сепарирования и лизиса клеток [4]. В технологиях scRNAseq используются сортировка клеток по флуоресценции (fluorescence-activated cell sorting (FACS), иммуносорбция с помощью специфических антител, микрофлюидные системы [5]. Возможности комбинаторного бар-кодирования клеток и транскриптов дает возможность целенаправленного маркирования РНК-продуктов индивидуальных клеток с помощью платформы 10xGenomics. Платформа бар-кодирования позволяет анализировать одновременно около 30 образцов, содержащих около 250 000 клеток. Однако, используемые принципы в силу недостаточной чувствительности позволяют зарегистрировать только около половины транскриптов, которые представлены в значительном количестве копий. Альтернативные методы приготовления библиотек используют ферменты с комбинированными активностями, позволяющими минимизировать число этапов приготовления библиотек и совместить процедуры молекулярной идентификации клеток и синтеза кДНК [6]. В этом направлении можно ожидать существенного прогресса в развитии энзиматического инструментария получения библиотек. Отдельной проблемой является разработка программного обеспечения для анализа данных, базирующегося на алгоритмах кластеризации клеток по их транскрипционному «портрету» [7], позволяющего варьировать наборы маркерных генов и пороги чувствительности при распределении клеток по кластерам.

Тем не менее, невзирая на ряд ограничений (в том числе, трудности с дифференциацией смысловых и бессмысловых транскриптов, узкий диапазон длин картируемых прочтений и т.д.) scRNAseq становится мощным инструментом для решения задач биологии развития, изучения первоосновы заболеваний нервной, иммунной сердечно-сосудистой систем, диабета, канцерогенеза [8], позволяя выявить триггерные механизмы и предложить маркеры для ранней диагностики. Аккумуляция данных scRNAseq и их мета-анализ позволят реконструировать новые регуляторные связи, определяющие реализацию генетической программы клетки во времени и пространстве.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Eberwine J., Yeh H., Miyashiro K., Cao Y., Nair S., Finnell R., Zettel M., Coleman P.* Analysis of gene expression in single live neurons. // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992, Apr 1;89(7):3010–4. doi: 10.1073/pnas.89.7.3010.
2. *Bystrova M.F., Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Churbanov G.D., Kolesnikov S.S.* Functional expression of the extracellular-Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor in mouse taste cells. // *J Cell Sci.* 2010, Mar 15;123(Pt 6):972–82. doi: 10.1242/jcs.061879.
3. *Scholz P., Kalbe B., Jansen F., Altmueller J., Becker C., Mohrhardt J., Schreiner B., Gisselmann G., Hatt H., Osterloh S.* Transcriptome Analysis of Murine Olfactory Sensory Neurons during Development Using Single Cell RNA-Seq. // *Chem Senses.* 2016, May;41(4):313–23. doi: 10.1093/chemse/bjw003.
4. *Tang F., Lao K., Surani M.A.* Development and applications of single-cell transcriptome analysis. // *Nat Methods.* 2011, Apr;8(4 Suppl):S6–11. doi: 10.1038/nmeth.1557.
5. *Yifan C., Fan Y., Jun P.* Visualization of cardiovascular development, physiology and disease at the single-cell level: Opportunities and future challenges. // *J Mol Cell Cardiol.* 2020, May;142:80–92. doi: 10.1016/j.yjmcc.2020.03.005. Epub 2020 Mar 20. PMID: 32205182.
6. *Cole C., Byrne A., Beaudin A.E., Forsberg E.C., Vollmers C.* Tn5Prime, a Tn5 based 5' capture method for single cell RNA-seq. // *Nucleic Acids Res.* 2018, Jun 1;46(10):e62. doi: 10.1093/nar/gky182.
7. *Beccuti M., Calogero R.A.* Single-Cell RNAseq Clustering. // *Methods Mol Biol.* 2023;2584:241–250. doi: 10.1007/978-1-0716-2756-3\_12.
8. *Rosati D., Giordano A.* Single-cell RNA sequencing and bioinformatics as tools to decipher cancer heterogeneity and mechanisms of drug resistance. // *Biochem Pharmacol.* 2022 Jan;195:114811. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114811.

## Анализ цифровых изображений ДНК-комет

*Сирота Н.П.*

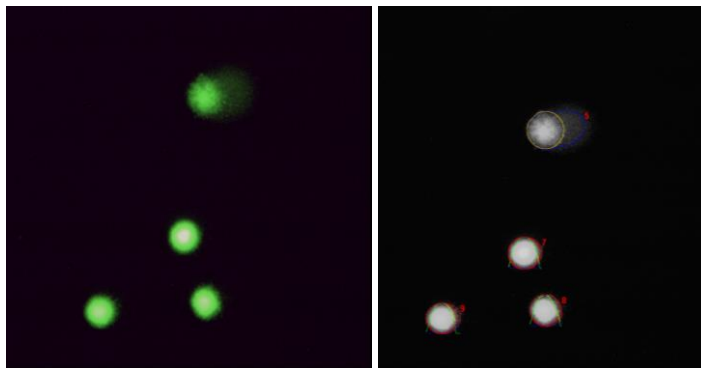
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пушкино,  
Россия.

e-mail: sirota@iteb.ru

Внутриклеточная ДНК по-прежнему является главным объектом при оценке разнообразных воздействий на живое. Изначально необходимо понимать происходят ли изменения в первичной структуре ДНК в ответ на внешнее воздействие. Для этого разработан большой спектр разнообразных методов. Одним из них является метод Comet assay. На конечном этапе выполнения протокола исследователи получают набор микрофото-

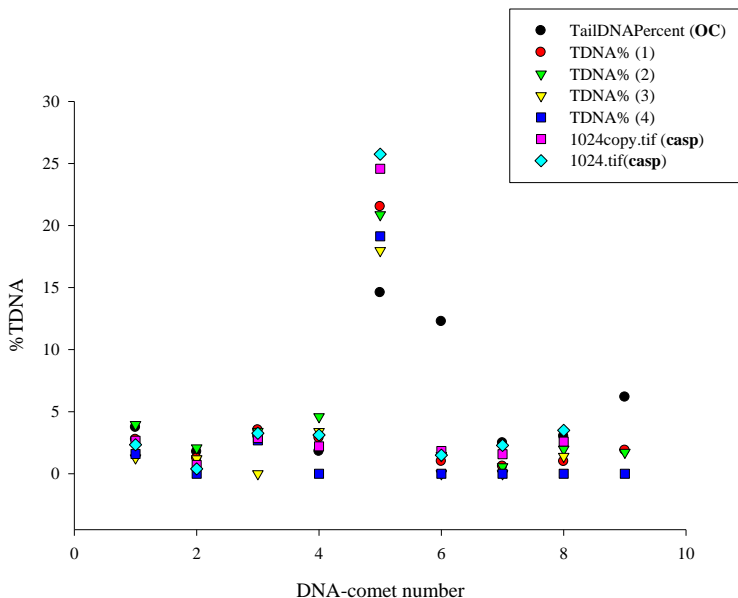


графий с цифровыми изображениями ДНК-комет. Для анализа таких микрофотографий необходимо применять специализированное программное обеспечение (ПО). В настоящее время есть ПО, как находящееся в свободном доступе, так и коммерческое. Доступное в интернете ПО довольно разнообразно по формату используемых для анализа микрофотографий. Например **CometScore** работает только с 8 битными изображениями в формате \*.bmp. **CASP** с изображениями в формате \*.tiff Программа **MAID\_K** (ИБК РАН) работает с микрофотографиями в формате \*.jpg; \*.bmp Программа **OpenComet** (OC) работает с изображениями в формате \*.bmp и \*.tiff. Такое разнообразие требований ПО к форматам микрофотографий, очевидно, обусловлено, как аппаратурой, используемой для захвата полей зрения с ДНК кометами, так и красителями на ДНК (1,2). В литературе редко можно найти публикации с подробным описанием используемой авторами аппаратуры для получения цифровых микрофотографий. Хотя такая информация является крайне важной для понимания причин межлабораторной вариабельности в данных получаемых при скрининговых исследованиях. Оригиналы микрофотографий, собранные нами из разных лабораторий показали, что исследователи часто предпочитают работать с цветными микрофотографиями. В то время как ПО использует для обработки ДНК-комет режим GrayScale. Поэтому важно знать есть ли влияние исходных форматов микрофотографий на результаты определения уровня поврежденности геномной ДНК (% ТДНК) при использовании исследователями не идентичного ПО.



*Рис. 1. Слева фрагмент оригинальной микрофотографии (режим RGB), справа фрагмент этой же микрофотографии (режим GrayScale) после обработки в программе OC.*

Ниже представлены результаты, полученные при обработке цифровых изображений ДНК-комет с этой микрофотографии в трех некоммерческих программах.



**Рис. 2.** Влияние формата и манипуляций с цифровой микрофотографией на результаты анализа ДНК – комет в программе **MAID\_K** (1.r\_1024\_grayscale.bmp;2.r\_1024.bmp; 3.r\_1024\_grayscale copy.bmp; 4.r\_1024 copy.bmp) **CASP** и **OpenComet (OC)**

**ВЫВОДЫ:** Сравнительное тестирование ПО необходимо проводить на микрофотографиях находящихся в режиме Grayscale.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Mahsa Karbaschi et.al.* Evaluation of the Major Steps in the Conventional Protocol for the Alkaline Comet Assay. // Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 6072; doi:10.3390/ijms20236072 Mutagenesis.
2. *Peter Moller et. al.* Visual comet scoring revisited: a guide to scoring comet assay slides and obtaining reliable results. // Mutagenesis, 2023, 38, 253–263 <https://doi.org/10.1093/mutage/gead015>.

## Современные подходы к определению биологического родства человека

*Скалин М.Д.<sup>1,2</sup>, Орехов В.А.<sup>1</sup>, Янковский Н.К.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> ООО «Гордиз», Москва;

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва.

Биологическое родство человека является важным объектом исследования, поскольку результат его анализа находит широкое применение в разнообразных областях науки и повседневной жизни. История, генеалогия, биология, в том числе генетика и антропология, криминалистика – все эти области человеческого знания работают с установлением родственных связей между разными людьми.

Широкое распространение получил анализ молекулярно-генетических ДНК-маркеров – участков генома, которые можно использовать для идентификации личности и сравнительного анализа. Золотым стандартом определения отцовства становится фрагментный анализ аутосомных STR-локусов, входящих в CODIS. Однако для определения отдаленного родства данный метод может применяться не всегда. В более сложных случаях используется анализ дополнительных высокоинформативных аутосомных STR-локусов с высоким показателем гетерозиготности, увеличивающих возможности анализа родства вплоть до второй и третьей степени. Интерес представляют также X- и Y-STR-локусы из-за особенностей их механизмов наследования. X-STR удобно использовать при исследовании родственных связей между женщинами, а Y-STR из-за патрилинейного механизма наследования можно применять для определения происхождения мужчины вплоть до принадлежности к определенному этносу.

Помимо STR-маркеров важную роль в современной генеалогии играют SNP-маркеры, данные о которых собираются методами NGS. При анализе IBD-сегментов становится возможным подтверждение родства даже в том случае, когда общая доля двух геномов менее 1%.

Ключевое место в исследовательской работе занимает удобное и эффективное программное обеспечение (Familias, FaminX, KING и др.), автоматизирующее статистические расчёты с экспортом всей необходимой информации о состоянии родства и достоверности исследования.

Нами был проведен молекулярно-генетический анализ родства для 24 образцов индивидов из четырех родословных. Для установления род-

ства проводилось генотипирование 46 STR-маркеров и 710646 SNP-маркеров.

Полученные данные использовались для анализа 49 родственных связей в исследованных родословных. В качестве контроля проводилась проверка родства для 276 неродственных индивидов. Дана оценка разрешающей способности анализа родства для двух типов ДНК-маркеров.

При анализе STR-маркеров было получено достоверное подтверждение первой и второй степени родства. В отдельных случаях удавалось достоверно подтвердить третью степень родства. Типирование SNP высокой плотности в сочетании с анализом IBD-сегментов позволяет достоверно подтверждать родство до пятой степени родства и выше.

## **История открытия ДНК**

*Чемерис А.В.*

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия.  
e-mail: chemeris@anrb.ru

С учетом того, что ДНК является, бесспорно, самой главной биологической макромолекулой на нашей Планете, то ее обнаружение в 1869 г., совершенное молодым швейцарским ученым Ф. Мишером [1], а затем установление в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком структуры ДНК в виде двойной спирали [2], можно смело считать важнейшими открытиями в биологии позапрошлого и прошлого столетий. Так, в 2024 г. исполняется 155 лет с момента выделения Мишером новой богатой фосфором субстанции и поскольку источником послужили ядра (nucleus) лейкоцитов, добытых им из гноя [3], то назвать ее нуклеином было вполне логично. Спустя два десятилетия, когда выяснилось, что это вещество представляет собой кислоту, то оно было названо нуклеиновой кислотой [4]. В зависимости от того, что служило источником выделения, появились тимонуклеиновая кислота (из тимуса), дрожжевая нуклеиновая кислота (из дрожжей), фитонуклеиновая кислота (из проростков пшеницы). Дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК) она стала называться (и то не сразу) лишь после того, когда в 1929 г. выяснилось, что входящий в ее состав углеводный компонент представлен 2-дезокси-D-рибозой [5]. Одно из первых обозначений этой кислоты как “desoxyribonucleic” приводится в эпохальной статье О.Т. Avery и соавт., доказавших причастность ДНК к передаче наследственной информации [6]. Спустя несколько лет появилось и нынешнее

обозначение этой кислоты без буквы “s” как “deoxyribonucleic” [7]. Первое упоминание в русскоязычной литературе этого вещества как «дезоксирибонуклеиновой кислоты» или «ДНК» было сделано только в 1955 г. в статье А.Н. Белозерского и Г.И. Абелева [8], поскольку до этого ее называли или просто нуклеиновой кислотой или тимонуклеиновой кислотой, либо ядерной нуклеиновой кислотой, либо дезоксирибозной нуклеиновой кислотой или нуклеиновой кислотой дезоксипентозного типа, а также нуклеопротеидом.

Мишер опубликовал не так много работ и поэтому большую ценность представляет его переписка с дядей (братом матери) профессором В. Гисом, в письме которому от 26 февраля 1869 г. из Тюбингена Мишер сообщил о выделении им нового вещества, но о том, что оно богато фосфором напишет ему лишь 21 августа 1869 г. Рукопись статьи о нуклеине Мишер подготовил в октябре 1869 г., находясь уже в Базеле, и для публикации в издававшемся в Тюбингене журнале *Medicinisch-chemische Untersuchungen* отправил ее своему тамошнему учителю и одновременно редактору этого журнала Ф. Гоппе-Зейлеру, причем их переписка представляет не меньший интерес. Гоппе-Зейлер усомнился в том, что Мишеру удалось выделить принципиально новое вещество, и решил перепроверить его результаты, о чем 24 февраля 1870 г. тому сообщил. Выказывая озабоченность, что он тем самым задерживает выход статьи Мишера, предлагает тому направить рукопись в какой-либо другой журнал, но выражает надежду, что Мишер подождет и статья выйдет именно в его журнале. В письме от 21 марта 1870 г. Мишер спрашивает – какова судьба его «первенца» и сообщает, что эта публикация нужна ему для занятия кафедры в Базельском университете. Мишер просит известить его – состоится ли вообще выход запланированного номера журнала или ему следует подумать о публикации своей статьи в другом месте. Наконец, в письме от 14 октября 1870 г. Гоппе-Зейлер сообщает Мишеру, что к изданию почти все готово и шлет ему для ознакомления свою статью о нуклеине. В ответ 20 октября 1870 г. Мишер пишет, что его особенно заинтересовали данные Гоппе-Зейлера о нуклеине дрожжевых клеток, поскольку это позволяет считать, что они имеют дело с «универсальным физиологическим фактором». При этом Гоппе-Зейлер отметил, что публикация его статьи в том же номере журнала будет «способствовать поднятию на должную высоту значения Вашего открытия» и одновременно сообщает, что если Мишер оставит работу с нуклеином, то он сам возьмется за нее, выбрав в качестве объектов дрожжи и низшие растения. Мишер отвечает, что он намерен продолжать исследования нуклеина, в том числе, выделяя его из спермы лосося, и что ему «было бы неприятно, если бы его последнее письмо было истолковано как стремление взять на

нуклеиновую проблему своего рода патент, тем более по отношению к своему учителю, которому он обязан такой большой поддержкой». Из-за той проверки результатов Мишера важнейшая статья последнего вместе с еще рядом схожих публикаций вышла лишь в 1871 г. Причем, Гоппе-Зейлер, поручил также выполнить подобные эксперименты находящимся у него на стажировке венгру Р. Plosz и россиянину Н. Любавину. Но нашему соотечественнику «достался» неудачный объект – молоко, тем не менее, он смог выделить, по словам Гоппе-Зейлера, «родственное нуклеину вещество или идентичное ему тело». Статья Любавина под номером XLVII вышла в том же выпуске журнала (практиковавшего сквозную нумерацию публикаций), что и статья Мишера, имевшая номер XLV. Статьи Plosz и Гоппе-Зейлера имели номера XLVI и XLVIII, соответственно.

Уже тогда Мишер понимал (что видно, в том числе из приведенных фрагментов его писем), что им обнаружен новый класс очень важных биологических соединений, локализующихся в ядре, интерес к которому в те годы начинал расти, и он беспокоился по поводу того, что выход его статьи задерживается, но он был не против исследований нуклеина другими авторами. При этом Мишер в своей первой статье о нуклеине предположил, что «представляется вероятным, что мы открыли целое семейство несколько отличающихся друг от друга фосфорсодержащих веществ, которые, пожалуй, как группа нуклеиновых веществ заслуживает быть поставленной наряду с белками». Также Мишер задается вопросом – не связано ли это вещество с делением клеток? И замечает – «Выявление связей между ядерными веществами, белками и ближайшими продуктами их превращений позволит постепенно поднять покров, которым полностью скрыты от нас интимные процессы клеточного роста». Эти высказывания Ф. Мишера, сделанные им в 1869 г., несомненно, позволяют говорить, что он сумел заглянуть далеко вперед – фактически на столетие и именно его можно считать первым молекулярным биологом и уж точно первым нуклеинщиком.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Miescher F.* Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. // *Medicisch-chemische Untersuchungen.* 1871. V.4. P. 441–460.
2. *Watson J.D., Crick F.H.C.* A structure for deoxyribose nucleic acid. // *Nature.* 1953. V. 171(4356). P. 737–738. doi:10.1038/171737a0
3. *Byrne J., Dahm R.* Friedrich Miescher and the 150<sup>th</sup> anniversary of the discovery of DNA. // *Biomics.* 2019. V.11(3). P. 249–258. doi: 10.31301/2221–6197.bmcs.2019–23
4. *Altmann R.* Über Nucleinsäuren. // *Archiv für Anatomie und Physiologie.* 1889. V. 5–6. P. 524–536.

5. *Levene P.A., London E.S.* The structure of thymonucleic acid. // *J. Biol. Chem.* 1929. V.83. P. 793–802.
6. *Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M.* Studies of the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III. // *J. Exp. Med.* 1944. V.79(2). P.137–158. DOI: 10.1084/jem.79.2.137
7. *Davidson J.N., Leslie I.* Nucleic acids in the development of the chick embryo; changes in ribonucleic acid phosphorus and deoxyribonucleic acid phosphorus in heart and liver. // *Biochem. J.* 1948. V.43(2). xxviii.
8. *Белозерский А.Н., Абелев Г.И.* К вопросу об единстве химической структуры ядерного материала растительных и животных клеток. // *Вестн. Моск. ун-та.* (Сер. физ.-мат. и естеств. наук). 1955. № 9. Вып. 6. С. 103–108.

## СПОНСОРЫ

The logo for SkyGen, featuring the word "Sky" in blue and "Gen" in green.

ООО «SkyGen»

---

The logo for СИНТОЛ, featuring a stylized blue 'S' icon followed by the word "СИНТОЛ" in blue and "НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ КОМПАНИЯ" in smaller blue text below.

ООО «Синтол»

---

The logo for GORDIZ, featuring the word "GORDIZ" in blue followed by four dots (three blue, one red).

ООО «Гордиз»

---

The logo for Genotek, featuring a stylized black 'X' icon followed by the word "Genotek" in black.

ООО «Генотек»

---

The logo for BCM, featuring the letters "BCM" in white on a green rectangular background, with horizontal green lines above and below.

ООО «Биохиммак»



**Материалы конференции  
«День ДНК – 2024»  
25 апреля 2024 года**

**СБОРНИК ТЕЗИСОВ**

Составители  
пресс-служба ИТЭБ РАН:  
к.б.н. Перевязова Т.А.,  
к.б.н. Дюкина А.Р.,  
к.б.н. Зубов В.В.  
Оформление Абакумовой Ю.Ю.  
Обложка: изображение от freerik

