

УДК 577.21

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНОМЕ ЯЧМЕНЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ СЕНСОРОВ

Ахметова М. М. (Национальный исследовательский университет ИТМО)

Научный руководитель к.х.н. Колпащиков Д. М.

(Национальный исследовательский университет ИТМО)

Ранее было установлено, что существует связь между устойчивостью ячменя к *Pyrrenophora teres f. teres* и комбинацией однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) в геноме растения. В данной работе рассматривается реализация массового скрининга ОНП с использованием олигонуклеотидных сенсоров.

Введение. *Pyrrenophora teres f. teres* повсеместно вызывает существенное снижение в качестве и количестве урожая ячменя. Одновременно с этим было показано, что определенные комбинации ОНП увеличивают устойчивость ячменя к поражению пиренофорой. Таким образом, существует необходимость в массовом скрининге на ОНП для выявления подходящих для сельскохозяйственных нужд растений. Одними из существующих для генотипирования технологий являются аллель-специфическая ПЦР или ДНК-микрочипы.

Основная часть. В качестве альтернативного метода для генотипирования предлагается использовать подход, разработанный в нашей лаборатории, основанный на использовании олигонуклеотидных сенсоров.

Одной из модификаций метода является использование олигонуклеотидов, которые в результате гибридизации с правильным аналитом образуют G-квадруплекс. Последний является аптамером для гемина. Комплекс гемина с G-квадруплексом катализирует реакцию разложения перекиси. Таким образом, в случае присутствия хромогенного субстрата, в нашем случае 3,3'-диаминобензидина, происходит окрашивание смеси.

Другая вариация метода – это дезоксирибозимные ДНК-машины. В этом случае катализирующая часть является комплементарной субстрату, содержащему тушителю и флуорофор. Только в случае полной комплементарности между аналитом и сенсорной частью, происходит расщепление субстрата, и флуоресценция становится возможной. Дополнительно в составе машины присутствуют олигонуклеотиды, стабилизирующие конструкцию, и помогающие расплести вторичную структуру аналита, делая его более доступным для сенсорной части.

В обоих случаях достижима стандартизация протокола. Перед стадией детектирования необходима стадия ПЦР, осуществление которой возможно в мультиплексном режиме. Далее ампликон разносится по пробиркам содержащими субстрат и ДНК-машину. Стадия инкубации проходит в одинаковых условиях для всех образцов. Флуориметрия осуществляется в 96-ти луночной планшете, что позволяет одновременное сканирование десяти проб.

Выводы. Поскольку основной задачей стоит генотипирование дигиплоидных организмов, которые могут находиться в гетерозиготном состоянии, то к методу предъявляется более высокое требование по разрешающей способности. Хороший сенсор должен позволять различать три случая: отсутствие обоих аллелей, присутствие только одного аллеля, присутствие обоих аллелей. Так как в случае ОНП разница между аллелями составляет только один нуклеотид, то вероятность неспецифической гибридизации оказывается высокой. По этой причине исследования, направленные на улучшение существующих или создание новых методов скрининга ОНП являются актуальными.

В данной работе было показано, что подход, основанный на образовании G-квадруплекса, для генотипирования гетерозигот не обладает соответствующей разрешающей способностью. В случае использования ДНК-машин их дизайн позволяет достигнуть большей селективности. Таким образом, было показано, что дезоксирибозимные сенсоры, катализирующие расщепление флуорофор-содержащего субстрата, являются перспективным инструментом для создания тест-систем для рутинного генотипирования ОНП.

Ахметова М. М. (автор)

Подпись

Колпащиков Д. М. (научный руководитель)

Подпись