

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗАМКНУТЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕТЕКЦИИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН В ГУАНИН-ЦИТОЗИН БОГАТЫХ УЧАСТКАХ С ПОМОЩЬЮ ДНК-НАНОМАШИН

Забирова А.А. (Лицей №82), **Луганская П.С.** (ИТМО), **Рубель М.С.** (ИТМО)
Научный руководитель - кандидат биологических наук Кошель Е. И. (ИТМО)

Введение: Однонуклеотидные замены (ОНЗ) являются довольно распространёнными формами генетических вариаций, многие из которых важны с точки зрения клинической диагностики. Некоторые ОНЗ в определённых генах могут являться маркерами, например, лекарственной устойчивости или быть характерными для конкретного генотипа клинически значимого патогена. В исследовании [1] учёные из Института Общей Генетики им. Вавилова РАН показали закономерность между ОНЗ в генах системы токсин-антитоксин *Mycobacterium tuberculosis* и генотипическими линиями и сублиниями туберкулёза. Существующие методы детекции ОНЗ, такие как полимеразная цепная реакция, масс-спектрометрии и полное геномное секвенирование уже успели зарекомендовать себя, однако они довольно дороги и требуют технически сложных манипуляций, что значительно влияет на удобство их применения. Биосенсоры, в свою очередь, видятся как перспективный вариант замены вышеописанных методов вследствие их простоты, высокой чувствительности, короткого времени детекции и доступности. Создание оптимального дизайна биосенсора для детекции однонуклеотидных замен (ОНЗ) в проблемных участках ДНК, как например гуанин-цитозин богатые последовательности, является нерешённым вопросом. Основной проблемой является формирование такими последовательностями стабильных вторичных структур, например шпильки, димеры и G-квадруплексы, которые в свою очередь могут мешать гибридизации биосенсора с аналитом, а также влиять на специфичность распознавания ОНЗ.

Основная часть: Представленное исследование изучает вопрос возможности эффективной детекции ОНЗ в ГЦ-богатом (65%) участке гена системы токсин-антитоксин *Mycobacterium tuberculosis* VarC38-rv2494. В качестве детектирующего агента выступает многокомпонентный гибридизационный зонд на основе дезоксирибозима 10-23. Особенность такой конструкции заключается в разделении зонда на расплетающиеся и ОНЗ-связывающую части, что позволяет ей эффективно встраиваться в структуру двухцепочечного ампликона и детектировать ОНЗ. При положительном результате детектируется сигнал флуоресценции, который возникает в случае сборки дезоксирибозимного ядра и последующего расщепления им флуоресцентного субстрата. Расплетающиеся последовательности гибридизационного зонда были модифицированы замкнутыми нуклеиновыми кислотами (ЗНК), что потенциально может улучшить эффективность встраивания биосенсора в ГЦ-богатый двухцепочечный ампликон [2]. Дизайны гибридизационных зондов и праймеры для амплификации нужного участка гена были разработаны с помощью веб-приложений (mFold, NuPack, PrimerBlast). Была проверена способность к генотипированию двух вариантов биосенсора: без модификаций и модифицированного ЗНК. Результаты показали, что внедрение ЗНК в структуру биосенсора положительно влияет на его чувствительность, однако селективность крайне низкая, что может быть связано с наличием триплетов цитозина в ОНЗ-связывающей руке.

Выводы: По полученным результатам можно сделать вывод о положительном влиянии модификации биосенсора ЗНК на встраивание зонда в двухцепочечный ампликон, однако весьма низкая селективность детекции предполагает дальнейшие исследования для улучшения её показателей. Разработанный прототип биосенсора потенциально может применяться как

более быстрый, простой и более дешёвый аналог полногеномного секвенирования. Проект требует дополнительного исследования для завершения и систематизации знаний.

Авторы исследования благодарны Российскому научному фонду (грант 22-24-00664) и программе «Приоритет 2030» за финансовую поддержку.

Список использованных источников:

1. Zaychikova M. V. et al. Mycobacterium tuberculosis type II toxin-antitoxin systems: genetic polymorphisms and functional properties and the possibility of their use for genotyping //PloS one. – 2015. – Т. 10. – №. 12. – С. e0143682.

2. Mercedes S. A. V. et al. Optimizing locked nucleic acid modification in double-stranded biosensors for live single cell analysis //Analyst. – 2022. – Т. 147. – №. 4. – С. 722-733.