

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Лаборатория биомедицинской химии

На правах рукописи

БУЛГАКОВА АНАСТАСИЯ ЕВГЕНЬЕВНА

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Модифицированные нуклеиновые кислоты как инструменты молекулярной диагностики

Направление подготовки

04.06.01 Химические науки

Специальность

1.4.9 Биоорганическая химия

Аспирант _____ А. Е. Булгакова

Научный руководитель _____ к.х.н. Е. В. Дмитриенко

Новосибирск – 2025

Работа выполнена в Лаборатории биомедицинской химии ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

Научный руководитель

Дмитриенко Елена Владимировна

Кандидат химических наук, старший научный сотрудник, заведующий Лабораторией биомедицинской химии ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность

Производные и аналоги нуклеиновых кислот (НК) в настоящее время служат передовыми инструментами в фундаментальных и прикладных молекулярно-биологических исследованиях. Области их практического применения включают биомедицину, биотехнологию и молекулярную диагностику [1, 2,]. Современные подходы к синтезу модифицированных олигонуклеотидов позволяют включать разнообразные функциональные группы, благодаря чему возможно конструирование молекулярных инструментов с требуемыми параметрами. Направленное введение химических модификаций в остов олигонуклеотидов часто приводит к улучшению их физико-химических характеристик и функциональной активности [3]. Хотя количество разрабатываемых типов модификаций олигонуклеотидов постоянно растет, на сегодняшний день только для некоторых из них проведено систематическое изучение влияния введенных модификаций на свойства создаваемых НК-конструкций. Сложный характер взаимосвязи между типом, количеством, расположением модификаций и свойствами олигонуклеотидов существенно усложняет выбор оптимальной комбинации. В связи с чем для эффективного применения таких соединений необходимо изучение влияния их структурных особенностей на биологические свойства, что позволит проводить рациональный дизайн олигонуклеотидов для разработки новых высокоэффективных диагностических и терапевтических систем.

В 2014 году в институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН были созданы электронейтральные фосфорилгуанидиновые (ФГ) производные олигонуклеотидов, содержащие фосфатные группы, в которых на атоме фосфора введен остаток замещенного гуанидина [4]. С момента открытия ФГ-олигонуклеотидов непрерывно исследуют их свойства наряду с возможностями практического применения. Ранее были проведены исследования, направленные на изучение их физико-химических свойств, способности процессирования ФГ-олигонуклеотидов рядом ферментов, а также выступать в качестве зондов для молекулярной диагностики и терапии [5, 6, 7, 8, 9].

Настоящее исследование продолжает цикл работ, посвященных изучению свойств фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов и ДНК-комплексов на их основе, и направлена на исследование изменения гибридизационных и фермент-субстратных свойств данных производных. Полученные результаты предоставят возможность для создания достоверных современных систем количественного анализа и обнаружения НК-биомаркеров, в том числе с применением полимеразной цепной реакции и биосенсорных устройств.

Таким образом, **цель** данной работы: изучение влияния количества и расположения фосфорилгуанидиновых модификаций на субстратные свойства олигонуклеотидов и разработка подходов для анализа нуклеиновых кислот с использованием ФГ-олигонуклеотидов.

В ходе исследования было необходимо решить следующие **задачи**:

1. исследовать субстратные свойства олигонуклеотидов с фосфорилгуанидиновыми модификациями в качестве праймеров и матриц в составе ДНК-дуплексов по отношению к *Taq* ДНК-полимеразе и выбрать оптимальные положения для введения ФГ-модификации в праймер для повышения эффективности ПЦР-анализа;
2. разработать подход для рационального дизайна праймеров с ФГ-модификациями и дополнительными мисматчами для аллель-специфической ПЦР при обнаружении низкого содержания соматических мутаций;
3. разработать подходы к чувствительному и специфичному анализу НК с помощью ФГ-зондов, иммобилизованных на поверхность кремний на изоляторе (КНИ) биосенсора;
4. разработать протоколы для пробоподготовки НК-мишеней методом магнитной сепарации для анализа с помощью КНИ-биосенсора.

1.2. Научная новизна представляемой работы заключается в систематическом анализе влияния количества и положения фосфорилгуанидиновых модификаций в составе ДНК-дуплексов на субстратные свойства олигонуклеотидов по отношению к *Taq* ДНК-полимеразе и разработке подхода для рационального дизайна праймеров с введенной ФГ-модификацией и дополнительными мисматчами для выявления низкого содержания соматических мутаций. Эффективность проведения ПЦР-реакции критически зависит от структурных характеристик праймеров и зондов, что обуславливает необходимость их конструирования в соответствии со строгим набором установленных молекулярно-биологических критериев. Введение модификаций в состав праймеров может обеспечивать повышение эффективности и специфичности ПЦР. Критически важными при этом являются параметры стадии молекулярной гибридизации модифицированных олигонуклеотидов со своими мишенями и влияние, оказываемое введенными в структуру модификациями, на работу ферментативных систем, используемых при проведении ПЦР. Так, выход целевого продукта может зависеть от заряда остова, стерических факторов, места и количества модификаций, введенных в состав олигонуклеотида. Проведенное исследование субстратных свойств модифицированных олигонуклеотидов и разработка подхода конструирования диагностических систем на их основе являются актуальными для понимания фундаментальных процессов взаимодействия модифицированных олигонуклеотидов.

Практическая значимость исследования заключается в разработке кремний на изоляторе (КНИ) биосенсора на основе полевых транзисторов с фосфорилгуанидиновыми олигонуклеотидами в качестве специфических зондов для выявления нуклеиновых кислот без амплификации, а также системы для их очистки и пробоподготовки методом магнитной сепарации на основе магнитных наночастиц и полимера нейлон-6, что в перспективе позволит значительно расширить доступный инструментарий для разработки существующих и создания новых диагностикумов включая системы пробоподготовки, особенно в условиях значительных ограничений на импорт в РФ, а также необходимости создания собственных аналогов в процессе импортозамещения и в условиях ограниченности предложений на мировом рынке.

1.3. Апробация работы

По результатам исследования опубликовано 11 работ, в том числе 1 патент, 3 статьи в рецензируемых изданиях и 7 тезисов конференций:

1. Патент РФ № 2 841 951. **Булгакова А.Е.**, Жуков С.А., Купрюшкин М.С., Ломзов А.А., Дмитриенко Е.В. «Способ получения сенсорного покрытия биосенсора со структурой кремний на изоляторе для выявления нуклеиновых кислот». Заявка № 2024109053. Дата приоритета 04.04.2024

2. **Bulgakova A.**, Berdyugin, A., Naumova, O., Fomin, B., Pyshnyi, D., Chubarov, A., Dmitrienko E., Lomzov, A. Solution pH Effect on Drain-Gate Characteristics of SOI FET Biosensor //Electronics. – 2023. – Т. 12. – №. 3. – С. 777. <https://doi.org/10.3390/electronics12030777>

3. **Bulgakova A.**, Chubarov A., Dmitrienko E. Magnetic Nylon 6 Nanocomposites for the Microextraction of Nucleic Acids from Biological Samples //Magnetochemistry. – 2022. – Т. 8. – №. 8. – С. 85. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry8080085>

4. Булгакова А.Е., Ломзов А.А., Дмитриенко Е.В., Пышный Д.В. Высокочувствительный биосенсор для безметочной детекции биомаркеров. //Наука и технологии Сибири, – 2023. Т. 8. – С. 118-121. ISSN: 2782-4969

5. Рациональный дизайн праймеров с фосфорилгуанидиновыми модификациями для аллель-специфичной ПЦР. **Булгакова А.Е.**, Кабилов М.Р., Дмитриенко Е.В. IV Всероссийская конференция «Высокопроизводительное секвенирование в геномике», Новосибирск, 2025, С. 16. ISBN 978-5-6047686-8-6

6. Введение фосфорилгуанидиновой модификации в праймеры как фактор, увеличивающий их дискриминирующую способность, при аллель-специфической ПЦР. **Булгакова А.Е.**, Кабилов М.Р., Дмитриенко Е.В. V Всероссийская конференция «физико-химическая биология», приуроченная к 40-летию ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, 2024, С. 84. ISBN 978-5-85957-219-9

7. Олигонуклеотиды, содержащие остаток замещенного гуанидина на межнуклеотидном фосфате, в качестве зондов для молекулярной диагностики. **Булгакова А.Е.**, Дмитриенко Е.В. X юбилейный всероссийский форум молодых исследователей «ХИМБИОSEASONS 2024», Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград, 2024, С.159.

8. Влияние фосфорилгуанидиновой модификации в праймерах на процессивность Taq-полимеразы. **Булгакова А.Е.**, Дмитриенко Е.В. Материалы научной школы-конференции для молодых ученых, BioTop-2023: Достижения молодых ученых ИХБФМ — Новосибирск, ИХБФМ СО РАН, 2023, С. 54.

9. Фосфорилгуанидиновые производные олигонуклеотидов как инструменты молекулярной диагностики. **Булгакова А.Е.**, Чубаров А.С., Дмитриенко Е.В. В сборнике: Синтетическая биология и биофармацевтика. Материалы всероссийской конференции. Новосибирск, 2022. С. 158.

10. Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды для молекулярной диагностики. **Булгакова А.Е.**, Дмитриенко Е.В. В книге: IX международная научно-практическая конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов - 2022. Сборник тезисов конференции, проходившей в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2022. Новосибирск, 2022. С. 486.

11. Выявление нуклеотидных маркеров с помощью электрохимического КНИ-биосенсора. **Булгакова А.Е.**, Дмитриенко Е.В. В книге: VIII международная научно-практическая конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов - 2021. Сборник тезисов конференции, проходившей в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2021. Новосибирск, 2021. С. 11.

Вклад автора

Основная часть работы была выполнена автором лично, либо с ее непосредственным участием. В том числе были сконструированы, очищены и проанализированы фосфорилгуанидиновые и нативные олигодезоксирибонуклеотиды, их характеристика методами гель-электрофореза, оптической и УФ-спектроскопии, подбор условий и элонгация комплексов олигонуклеотидов Taq ДНК-полимеразой, анализ продуктов элонгации методом гель-электрофореза, проведение аллель-специфической ПЦР в реальном времени, подбор условий и модификация кремниевой поверхности, обработка и анализ снимков атомно силовой микроскопии, проведение всех измерений на кремний на изоляторе биосенсоре, синтез и модификация магнитных наночастиц и композитов на их основе с полимером нейлон-6, исследование емкостных характеристик полученных наноматериалов. Обработка результатов всех экспериментов проведена лично автором.

Просвечивающая электронная микроскопия магнитных наночастиц и их нанокомпозитов выполнена в ГМИ ИХБФМ СО РАН под руководством профессора, д.б.н. Рябчиковой Е.И. Атомно-силовая микроскопия модифицированных кремниевых пластин выполнена Киселевым К.С. (ЛБОСН ИФП им.Ржанова СО РАН). ИК-спектроскопия выполнена в ЦСИ НИОХ СО РАН. Секвенирование ПЦР-библиотек с использованием платформы MiSeq (Illumina) проведено Тупикиным А.Е. (н.с. ЦКП «Геномика» СО РАН). Биоинформатический анализ результатов секвенирования был выполнен Кабиловым М.Р. (к.б.н., с.н.с., руководитель ЦКП «Геномика» СО РАН). Синтез олигонуклеотидов, в том числе фосфорилгуанидиновых выполнен Бушуевой Т.Ю., Дюдеевой Е.С. (ЛБМХ ИХБФМ СО РАН), Купрюшкиным М.С. (ЛХНК ИХБФМ СО РАН).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Исходные материалы

2.1.1. Реактивы и препараты

В работе использованы следующие **реактивы и растворители**: фосфорамидиты (GlenRes, США), перхлорат лития, Stains-all («Acros Organics», Бельгия), уксусная кислота, ацетон, этанол, этаноламин, триэтиламмоний ацетат, трис(гидроксиметил)аминометана гидрохлорид, гидроксид натрия, аммиак (все «Реахим», Россия), ксиленцианол FF, бромфеноловый синий («Helicon», Россия), феназиний хлорид, 3-глицидоксипропилтриметоксисилан (GOPTS) («abc», Германия), ацетонитрил («Компонент Реактив», Россия), N,N-диметилформамид (DMFA), 2,2,2-трифторэтанол (TFE), формамид, мочеви́на, («Panreac», Испания), N,N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония (PSA), трис(гидроксиметил)аминометан (Tris), N,N'-карбонилдиимидазол (CDI), Tween-20, тетраэтилортосиликат (TEOS), 3-аминопропилтриэтоксисилан (APTES), triton X-100, додецилсульфат натрия (SDS), 1,3,5-трихлоротриазин (TCT), нейлон-6, карбонат натрия безводный, альбумин из яичного белка («Sigma-Aldrich», США), хлорид железа (III) гексагидрат, сульфат железа (II) гептагидрат («PanReac AppliChem», Испания), нитросиний тетразолий хлорид (NBT), динатриевая соль 5-бром-4-хлор-3'-индолифосфата (BCIP) («Thermo Fisher Scientific», США), суммарная РНК пекарских дрожжей («Roche», Швейцария), 2'-дезоксиаденозин-5'-трифосфат (dATP), 2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфат (dGTP), 2'-дезоксцитидин-5'-трифосфат (dCTP), 2'-дезокситимидин-5'-трифосфат (dTTP), флуоресцеин-5(6)-карбоксиамидокапроил-[5-(3-аминоаллил)-2'-деоксиуридин-5'-трифосфат] (FAM-12-dUTP) («Biosan», Россия); **ферменты**: Taq ДНК полимеразы («SibEnzyme», Россия), HotStart Taq ДНК полимеразы («Biosan», Россия), конъюгат стрептавидин-щелочная фосфатаза («Sigma-Aldrich», США). Все растворы были приготовлены с использованием воды MQ (18,2 МΩ). Остальные использованные реактивы и растворители были отечественного производства и имели квалификацию «х.ч.» или «о.с.ч.». Все использованные органические растворители предварительно очищали перегонкой и хранили над молекулярными ситами (4Å) или гидридом кальция.

2.1.2. ОТ-ПЦР продукты и плазмиды

Ферментативный синтез 18S рРНК человека проведен Дюдеевой Е. С. (к.х.н., м.н.с. руководитель ЦКП «Высокоточный синтез ДНК/РНК» ИХБФМ СО РАН) с использованием рекомбинантного фермента – обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей MMLV Н-

(«SibEnzyme», Россия), кДНК данного фрагмента была любезно предоставлена д.х.н., доцентом, г.н.с., зав.лаб. СФР ИХБФ СО РАН Малыгиным А. А.

Плазмидная ДНК N1-peGFP, содержащая фрагмент гена eGFP («Thermo Fisher Scientific», США).

Плазмиды, содержащие частичную последовательность гена KRAS дикого типа и гена KRAS с мутациями в 12 кодоне (p.G12A, p.G12V) были получены компанией «Shanghai RealGene Bio-tech, Inc», Китай. Перед использованием плазмиды были очищены, линейаризованы рестриктазой BamHI и количественно оценены с помощью спектрофотометра NanoDrop Lite A4 («Thermo Fisher Scientific», США).

2.1.3. Буферы и растворы

Таблица 2.1 – обозначение и состав растворов.

Название	Сокращение	Состав
1x Карбонатный буфер, pH 9.2; pH 10.4	CB	50мМ Na ₂ CO ₃ , 50мМ NaHCO ₃
1x Боратный буфер, pH 8.0; pH 9.0	BB	50мМ Na ₂ B ₄ O ₇ , H ₃ BO ₃
1x Ацетатный буфер, pH 3.0-6.0	AcB	200мМ CH ₃ COOH, 200мМ CH ₃ COONa
10x Фосфатный буфер, pH 7.4	PB	100 мМ Na ₂ HPO ₄ , 100 мМ NaH ₂ PO ₄
10x Многокомпонентный буфер, pH 7.5; pH 9.5	AP	20 мМ Tris-HCl, 2 мМ MgCl ₂ , 100 мМ NaCl
10x Буфер Tris-борат-EDTA, pH 8.3	TBE	89 мМ Tris, 89 мМ H ₃ BO ₃ , 2 мМ Na ₂ EDTA
1x ПЦР-буфер	PCRB	6мМ MgCl ₂ , 10мМ Tris-HCl, pH 8.9, 50 мМ KCl, 0.1% Tween-20
1x Real-time ПЦР-буфер	RTB	50 мМ Трис-HCl, pH 8.5, 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl ₂
1x HotStart ПЦР-буфер	HSB	65 мМ Tris-HCl, pH 8.9, 24 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.05% Tween-20, 2.5 мМ MgCl ₂

2.2. Основные методы

2.2.1. Синтез и выделение олигонуклеотидов

Олигонуклеотиды и их модифицированные аналоги (в том числе аминокислотсодержащие) синтезировали на автоматическом ДНК-синтезаторе ASM-800 («Biosset», Россия) согласно

стандартному протоколу 2-цианэтильного фосфитамидного метода, используя коммерческие дезоксирибонуклеозидные мономеры и соответствующие пористые стекла («Glen Research», США) Незаряженные фосфорилгуанидиновые производные олигодезоксирибонуклеотидов также синтезированы в автоматическом режиме на ДНК-синтезаторе Бушуевой Т.Ю., Дюдеевой Е.С. (ЛБМХ ИХБФМ СО РАН), Купрюшкиным М.С. (ЛХНК ИХБФМ СО РАН) с использованием модифицированных протоколов, описанных ранее в работе [10].

Выделение олигодезоксирибонуклеотидов и их производных проводили методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе «Agilent 1200 series» («Agilent», США). Использовали колонку (4.6×150 мм) с сорбентом «Eclipse XDB-C18» (5 мкм) («Agilent», США) и элюировали в градиенте концентрации ацетонитрила (0-90 %) в 0,02 М растворе триэтиламоний ацетата в течение 30 мин; скорость потока 1,5 мл/мин.

Концентрирование фракций олигонуклеотидов и их производных, содержащих целевой продукт, после хроматографии проводили на вакуумном ротационном испарителе Rotavapor R200 («Buchi», Швейцария) при давлении 10-15 мм рт. ст. и температуре 40 °С. Избыток ацетата триэтиламония в образце удаляли повторным концентрированием с этанолом. Затем олигонуклеотиды осаждали из водного раствора 10-кратным объемом 2% LiClO₄ в ацетоне. После добавления каждой новой порции пробирку помещали в морозильную камеру на 2 мин, осаждали образующийся осадок центрифугированием при 14500 об/мин, 2 мин на центрифуге Eppendorf MiniSpin («Eppendorf», Германия). Далее удаляли супернатант, а осадок дважды промывали 1 мл чистого ацетона.

Деблокирование олигонуклеотидов осуществляли путем добавления к осадку 200 мкл ледяной уксусной кислоты. В случае диметокситритильной группировки на конце олигонуклеотида деблокирование проводится в течение 10 минут. Далее осаждали 10-кратным объемом 2% LiClO₄ в ацетоне. Осадок растворяли в 100 мкл 0,1 М раствора Tris-HCl, осаждали 10-кратным объемом 2% LiClO₄ в ацетоне, отмывали чистым ацетоном. Затем высушивали на термошейкере Eppendorf Thermomixer Comfort («Eppendorf», США) при температуре 38°C в течение 20 минут, осадок растворяли в 100 мкл деионизованной воды.

Таблица 2.2 – последовательности олигонуклеотидов, используемые для исследования влияния положения и количества модификаций на процесс элонгации праймеров и эффективности амплификации.

	Обозначение	5'-последовательность-3'
1	P ₀	GGTGCGCTCCTGGACGTAGC
2	P _{h1/5}	G*G*T*G*C*G*C*T*C*C*T*GGACGTAGC
3	P _{h2/5}	G*GT*GC*GC*TC*CT*GGACGTAGC
4	P _{1/5}	G*GT*GC*GC*TC*CT*GG*AC*GT*AG*C
5	P _{2/5}	G*GTG*CGC*TCC*TGG*ACG*TAG*C
6	P _{3/5}	G*GTGC*GCTC*CTGG*ACGT*AGC

7	P _{4/5}	G*GTGCG*CTCCT*GGACG*TAGC
8	P _{5/5}	G*GTGCGC*TCCTGG*ACGTAG*C
9	P _{6/5}	G*GTGCGCT*CCTGGAC*GTAGC
10	P _{7/5}	G*GTGCGCTC*CTGGACGT*AGC
11	P _{8/5}	G*GTGCGCTCC*TGGACGTAG*C
12	P _{3/3}	GGT*GCGC*TCCT*GGAC*GTAG*C
13	P _{4/3}	GGTG*CGCTC*CTGGA*CGTAG*C
14	P _{6/3}	GGTGC*GCTCCTG*GACGTAG*C
15	P _{7/3}	GGT*GCGCTCCT*GGACGTAG*C
16	P ₁	GGTGCGCTCCTGGACGTAG*C
17	P ₂	GGTGCGCTCCTGGACGTA*GC
18	P ₃	GGTGCGCTCCTGGACGT*AGC
19	P ₄	GGTGCGCTCCTGGACG*TAGC
20	P ₅	GGTGCGCTCCTGGAC*GTAGC
21	P ₆	GGTGCGCTCCTGGA*CGTAGC
22	P ₇	GGTGCGCTCCTGG*ACGTAGC
23	P ₈	GGTGCGCTCCTG*GACGTAGC
24	P ₉	GGTGCGCTCCT*GGACGTAGC
25	P _{8,9}	GGTGCGCTCCT*G*GACGTAGC
26	P _{1,2}	GGTGCGCTCCTGGACGTA*G*C
27	P _{1,3}	GGTGCGCTCCTGGACGT*AG*C
28	P _{1,4}	GGTGCGCTCCTGGACG*TAG*C
29	P _{1,5}	GGTGCGCTCCTGGAC*GTAG*C
30	P _{1,6}	GGTGCGCTCCTGGA*CGTAG*C
31	P _{1,7}	GGTGCGCTCCTGG*ACGTAG*C
32	P _{1,8}	GGTGCGCTCCTG*GACGTAG*C
33	P _{1,9}	GGTGCGCTCCT*GGACGTAG*C
34	P _{1,10}	GGTGCGCTCC*TGGACGTAG*C
35	P _{1,11}	GGTGCGCTC*CTGGACGTAG*C
36	P _{7,12}	GGTGCGCT*CCTGG*ACGTAGC
37	P _{11,12}	GGTGCGCT*C*CTGGACGTAGC
38	P _{18,19}	G*G*TGCGCTCCTGGACGTAGC
39	P ₇₋₁₃	GGTGCGC*T*C*C*T*G*G*ACGTAGC
40	P ₆ FAM	FAM-G*GTGCGCT*CCTGGAC*GTAGC
41	P ₆₋₉ FAM	G*GTGCGCT*CCT-FAM-GGAC*GTAGC
42	P _{6/3} FAM	FAM-GGTGC*GCTCCTG*GACGTAG*C
43	P _{6/3-9} FAM	GGTGC*GCTCCT-FAM-G*GACGTAG*C
44	P ₀ FAM	FAM-GGTGCGCTCCTGGACGTAGC
45	P ₀₋₉ FAM	GGTGCGCTCCT-FAM-GGACGTAGC
46	M ₃₀	CTGTTGTTTAGCTACGTCCAGGAGCGCACC
47	Z ₈	FAM-GCTACGTC
48	Q ₀	GTAAACGGCCACAAGTTCAG

Для удобства в работе были введены специальные обозначения:

- знаком * – отмечено место ФГ-модификаций в 20-звенной последовательности;

- подстрочный знак 0 – отсутствие модификаций;
- подстрочный знак без дроби отличный от 0 – положение модифицированных звеньев от 3'-конца олигонуклеотида;
- дробное число в подстрочном знаке показывает, что модифицированные звенья начинаются с 3'-или 5'-конца (знаменатель) и расположены через одинаковое количество фосфодиэфирных связей (числитель), буква h в подстрочном знаке означает, что модифицирована только половина последовательности олигонуклеотида.

Таблица 2.3 – последовательности олигонуклеотидов, используемые в аллель-специфической ПЦР

	Обозначение	5'-последовательность-3'
1	WTO	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCNNG
2	WTX	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*NNG
3	G12AO	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCNNC
4	G12AX	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*NNC
5	G12VO	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCNNT
6	G12VX	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*NNT
7	kWTO	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGG
8	kWTX	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*TGG
9	kG12AO	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGC
10	kG12AX	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*TGC
11	kG12VO	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGT
12	kG12VX	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*TGT
13	CCGA	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCCGA
14	C*CGA	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*CGA
15	CCGG	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCCGG
16	C*CGG	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*CGG
17	CCGT	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCCGT
18	C*CGT	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*CGT
19	CCGC	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCCGC
20	C*CGC	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*CGC
21	CACT	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCACT
22	C*ACT	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*ACT
23	CATT	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCATT
24	C*ATT	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*ATT
25	CAGA	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCAGA
26	C*AGA	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*AGA
27	CGGG	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCGGG
28	C*GGG	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*GGG
29	CGTG	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCGTG
30	C*GTG	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*GTG
31	CTCG	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCTCG
32	C*TCG	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*TCG
33	K-rev (прямой)	CAGAATCATTTTGTGGACGAATATG
34	K-ref (обратный)	GACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTG
35	TaqMan	FAM-CTGTATCGTCAAGGCACTCTTGC-BHQ1

Для удобства в работе были введены специальные обозначения:

- знаком * – отмечено место ФГ-модификаций в аллель-специфическом праймере;
- N – переменный нуклеотид;

- нуклеотиды, выделенные жирным шрифтом, представляют собой несовпадающие нуклеотиды относительно последовательности ДНК дикого типа.

Таблица 2.4 – последовательности олигонуклеотидов, используемые в гетерофазном гибридизационном анализе на КНИ-биосенсоре.

	Обозначение	5'-последовательность-3'
1	M-TN	CAGAAGAAGAUGAAGAAGAAGAGGAAGCAAAGGAG-TAMRA
2	ZF-TN*	C*T*C*C*T*T*T*G*C*T*T*C*C*T*C*T*T*C*T*T*C-NH ₂
3	Z-TN	CTCCTTTGCTTCCTCTTCTTC-NH ₂
4	Z ₁ F-18S*	A*T*C*G*T*T*T*A*T*G*G*T*C*G*G*A*A*C*T*A*C*G-NH ₂
5	Z ₁ -18S	ATCGTTTATGGTCGGAACCTACG-NH ₂
6	Z ₂ F-18S*	C*C*C*T*C*T*T*A*A*T*C*A*T*G*G*C*C*T*C*A*G*T-NH ₂
7	Z ₂ -18S	CCCTCTTAATCATGGCCTCAGT-NH ₂
8	Z ₃ F-18S*	T*T*T*C*G*C*T*C*T*G*G*T*C*C*G*T*C*T*T*-NH ₂
9	Z ₃ -18S	TTTCGCTCTGGTCCGCTT-NH ₂
10	Z-CNTRL	NH ₂ -AGTCTCGACTTGCTACC-TAMRA

Для удобства в работе были введены специальные обозначения:

- знаком * – отмечено место ФГ-модификаций.

Таблица 2.5 – последовательности олигонуклеотидов, используемые в пробоподготовке НК-мишени.

	Обозначение	5'-последовательность-3'
1	Z ₁ -FAM	FAM-GTCTTCCTTCTCCGCTT-NH ₂
2	Z ₁ T ₁₀ -FAM	TTTTTTTTTTGTCTTCCTTCTCCGCTT-FAM
3	Z ₁ T ₁₀ -Bio	TTTTTTTTTTGTCTTCCTTCTCCGCTT-Bio
4	Z ₁	GTCTTCCTTCTCCGCTT-NH ₂
5	Z ₂	TAACCGATTTTCAGATTT-NH ₂
6	Z ₁ T ₁₀	TTTTTTTTTTGTCTTCCTTCTCCGCTT
7	Z ₂ T ₁₀	TTTTTTTTTTTAACCGATTTTCAGATTT
8	M1	FAM-GAGGCGAAGCGGAGAAGGAAGAC

2.2.2. Полиакриламидный гель-электрофорез олигонуклеотидов, их производных и ПЦР-ампликонов проводили в денатурирующем 20% полиакриламидном геле (ПААГ) (акриламид:N,N'-метиленабисакриламид = 29:1, 8 М мочевины) в 1х буфере TBE (таблица 2.1) при напряжении 50 В/см с использованием источника питания Эльф-8 («ДНК-технология», Россия). К реакционной смеси предварительно добавляли 5 мкл раствора красителей (0.05% бромфеноловый синий, 0.05% ксиленианол FF, 95% формамид). Результаты электрофоретического разделения визуализировали окрашиванием геля реактивом stains-all. При наличии флуорофора в составе олигонуклеотидов проводили сканирование флуоресценции при помощи системы гель-документирования VersaDoc MP 4000 Molecular Imager System («Bio-Rad», США). Относительное содержание основных продуктов удлинения праймеров вычисляли, анализируя сканированный сигнал флуоресценции соответствующих полос при помощи программного обеспечения «Quantity One» («Bio-Rad», США).

2.2.3. Спектрофотометрический анализ олигонуклеотидов и их производных осуществляли на спектрофотометре Shimadzu UV–2100 («Shimadzu», Япония) в интервале длин волн 200-800 нм при комнатной температуре в кюветах с длиной оптического пути 1 см и объемом 1 мл. Концентрацию растворов рассчитывали с помощью закона Бугера-Ламберта-Бера. Для расчета коэффициента молярного поглощения использовали суммарные величины молярных коэффициентов поглощения (ϵ_{260}) моно- и динуклеотидов на длине волны 260 нм [11].

2.2.4. Флуориметрический анализ олигонуклеотидов и их производных

В лунки 96-ти луночного планшета TPP-96F («TPP», Швейцария) помещали по 100 мкл растворов олигонуклеотидов и их производных. Интенсивность флуоресценции образцов определяли на планшетном флуориметре Clariostar («BMG LABTECH», Германия) в диапазоне длин волн испускания флуоресцентного красителя TAMRA или FAM. Получали результат в виде значения интенсивности флуоресценции в конечной точке. Диапазон длин волн возбуждения TAMRA– 535 – 585 нм, длина волны испускания – 576 нм. Диапазон длин волн возбуждения FAM – 414 – 483 нм, длина волны испускания – 530 нм.

2.2.5. Исследование стабильности нативных или модифицированных олигонуклеотидных дуплексов проводили в одном из буферов для плавления (1x PBS, 1x PCRB) или деионизованной воде при концентрации каждого компонента $2.5 \cdot 10^{-6}$ М методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала на спектрофотометре Cary 3500 («Agilent», США) с использованием восьмисекционного кюветодержателя, который позиционирует кюветы с помощью зубчато-винтовой передачи и длиной оптического пути 0.2 см. Скорость изменения температуры образцов составляла 0.5 °C/мин. Температуру образца в каждой кювете определяли с использованием термопар «Temperature Probes Series II» («Varian Inc», Австралия). Регистрацию кривых плавления проводили в диапазоне 5-95 °C на трех длинах волн 260, 270 и 330 нм. Профиль оптической плотности на длине волны 330 нм использовали для коррекции кривых термической денатурации.

За температуру плавления олигонуклеотидных комплексов принимали температуру, соответствующую максимуму первой производной зависимости оптической плотности растворов олигонуклеотидов по температуре. Значения температуры плавления, определенные при обработке кривых, зарегистрированных на длинах волн 260 и 270 нм, усредняли. Ошибка определения температур плавления во всех случаях не превышала 0.5 °C.

Для комплексов с протяженной 18S рРНК-матрицей были рассчитаны теоретические значения температуры плавления гибридационных комплексов с помощью программы Oligonucleotide Properties Calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

2.2.6. Реакции элонгации праймеров с помощью *Taq* ДНК-полимеразы проводили в смеси объемом 10 мкл, которая содержала: 2.5 ед. акт. *Taq* ДНК-полимеразы; 10 мкМ эквимольную смесь праймера и матрицы (система M_{30}/P^* или система P^*/Z_8 (Таблица 2)); 1х ПЦР-буфер (PCRB, Таблица 2.1); по 200 мкМ каждого 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфата (dNTP) для флуоресцентно-меченых праймеров или 100 мкМ FAM-12-dUTP вместо dTTP для немеченых модифицированных праймеров. Реакцию проводили в термоциклическом режиме, для системы M_{30}/P^* : 95°C – 2 мин, 30°C – 1 мин, 62°C – 7 мин (7 циклов), для системы (P^*/Z_8): 95°C – 2 мин, 30°C – 1 мин, 45°C – 7 мин (7 циклов).

Реакцию останавливали добавлением 2% раствора перхлората лития в ацетоне. Продукты реакций анализировали в 20%-ном денатурирующем ПААГ, результат электрофоретического анализа фиксировали с помощью системы гель-документирования и окрашиванием реактивом Stains-all (метод 2.2.2.).

2.2.7. Амплификация фрагмента гена eGFP в реальном времени и определение эффективности ПЦР

Амплификацию фрагмента гена eGFP проводили в 1х Real-time ПЦР-буфере (RTB, Таблица 2.1), содержащем 0,2 мМ каждого dNTP, 1 ед. акт *Taq* ДНК-полимеразы. В качестве прямого праймера использовали олигонуклеотиды P^* , обратного – Q_0 (Таблица 2.2). Концентрация каждого праймера составляла 500 нМ. В качестве матрицы использовали последовательное 10-кратное разведение плазмидной ДНК, содержащей ген eGFP, от 10^{-9} г до 10^{-17} г. Режим амплификации: 95 °C – 5 мин, 47 циклов: 95 °C – 10 сек, 61 °C – 10 сек, 72 °C – 10 сек. Эффективность амплификации определяли методом ПЦР в режиме реального времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I на приборе CFX96 («Bio-Rad,» США) с детекцией флуоресцентного сигнала по каналу SYBR. Сравнение эффективности амплификации проводили по значениям коэффициентов амплификации (k_{eff}), используя подход линеаризующих координат зависимости $C_t(\lg C_0)$ (где C_t – пороговый цикл, C_0 – исходная концентрация матрицы), реализованный в программном обеспечении CFX Maestro 1.1 («Bio-Rad,» США).

2.2.8. Аллель-специфическая ПЦР в реальном времени и определение эффективности ПЦР

ПЦР в реальном времени проводили в 20 мкл, содержащих 1х HotStart ПЦР-буфер (HSB, Таблица 2.1), 0.2 мМ dNTP, 300 нМ праймеров (Таблица 2.3) и 100 нМ флуоресцентного зонда, 1 ед. акт. HotStart *Taq* ДНК-полимеразы, в качестве матрицы – плазмиды с частичной последовательностью гена KRAS дикого типа и гена KRAS с мутациями в 12 кодоне (p.G12A, p.G12V) от 10^0 до 10^5 копий на реакцию. Амплификацию проводили в системе детектирования

ПЦР в реальном времени CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: 95°C – 15 мин с последующими 45 циклами: 95°C – 10 сек, 60°C – 40 сек с детекцией флуоресцентного сигнала по каналу FAM. Реакции проводили по меньшей мере трижды. Эффективность амплификации определяли согласно методу 2.2.7.

2.2.9. Гетерофазный гибридизационный анализ на стеклянных слайдах и кремниевых пластинах

Для модификации («Corning», США, размер 75×25 мм, толщина 0,96-1,06 мм) поверхность обрабатывали 10% раствором бихромата калия в концентрированной серной кислоте в течение 10 минут. Затем, промывали водой (3×10 мл) и этанолом (1×10 мл), далее выдерживали в 5% растворе 3-глицидоксипропилтриметоксисилана (GOPTS) (50 мл) в этаноле или в растворе CDI (10 мг/1 мл) в ацетонитриле (50 мл) в течение 2 часов. Далее стекла/пластины промывали этиловым спиртом (2×10 мл) или ацетонитрилом (2×10 мл) и высушивали.

Иммобилизацию аминокислотсодержащих олигонуклеотидных зондов (НК, ФГ) (Таблица 2.4) на поверхность модифицированных (CDI, GOPTS) стеклянных слайдов осуществляли путем нанесения по 0,5 мкл в диапазоне концентраций 10^{-8} – 10^{-6} М на точку в 50мМ карбонат/бикарбонатном буфере, pH 10.4 (если не указано иное) с последующей отмывкой водой. Стекла с нанесенными зондами помещали в чашку Петри на водяную подушку и выдерживали в течение 18 часов, затем отмывали водой (3×10 мл), этиловым спиртом (2×10 мл) и ацетоном (1×10 мл).

Гетерофазную гибридизацию на стеклянных слайдах, содержащих иммобилизованные аминокислотсодержащие олигонуклеотидные зонды (НК, ФГ), проводили, добавляя раствор флуоресцентно-меченой матрицы в концентрации 10^{-6} М в 1х фосфатном буфере (PB, Таблица 2.1) из расчета 5 мкл/см². Стеклянный слайд помещали на водную подушку на 2 часа в условиях защиты от освещения. Зону нанесения ограничивали покровным стеклом («Deltalab», Испания, размер 24×24 мм). Затем стекла отмывали от не связавшейся матрицы 1х фосфатным буфером (3×10 мл).

Измерение интенсивности флуоресценции на стеклянных слайдах, содержащих иммобилизованные зонды, после проведения гетерофазного гибридизационного анализа с флуоресцентно-меченой матрицей проводили на лазерном сканере Perkin Elmer ScanArray Express («Perkin Elmer», США) при использовании лазера с длиной волны 543 нм. В результате получали изображение слайда, отображающее интенсивность флуоресцентного сигнала, по которому на полуколичественном уровне можно судить об эффективности связывания зондов с матрицей.

2.2.10. Гетерофазный гибридный анализ КНИ-биосенсоре

Модификацию КНИ-сенсоров осуществляли аналогично методу 2.2.9.

Иммобилизацию аминокислотсодержащих олигонуклеотидных зондов (НК, ФГ) (Таблица 2.4) на поверхность модифицированных (CDI, GOPTS) КНИ-сенсоров осуществляли путем нанесения по 0,5 мкл 10^{-6} М на проволоку в 50 мМ карбонат/бикарбонатном буфере, pH 10.4, КНИ-сенсоры с нанесенными зондами помещали в чашку Петри на водяную подушку и выдерживали 18 часов с последующей отмывкой водой (3×10 мл), этиловым спиртом (2×10 мл) и ацетоном (1×10 мл).

Гетерофазную гибридную анализацию на КНИ-биосенсоре с контрольными проволоками и проволоками проводили при нанесении 10 мкл анализируемой мишени в диапазоне концентраций 10^{-20} – 10^{-7} М в 1х РВ (Таблица 2.1), измерения с помощью КНИ-биосенсора проводили сразу или по истечении 30 минут инкубации.

Для электрических измерений на КНИ-биосенсоре использовали n-канальные КНИ-транзисторы, которые были изготовлены фирмой INEX® (Великобритания) на основе дизайна подготовленного совместно с ЛБМХ ИХБФМ СО РАН, ЗАО «МБС-Технология» (Россия) и ИФП СО РАН [12]. Каждый чип содержал кристалл с 12-ю микропроволочными сенсорными элементами. Длина каждой кремниевой микропроволоки составляет 10 мкм, ширина – 3 мкм, толщина проводящего слоя кремния 30 нм [13].

Сенсорную поверхность КНИ-биосенсоров модифицировали активирующими агентами GOPTS или CDI, как описано в 2.2.9. На часть проволок иммобилизовали НК- и/или ФГ-зонды (рабочие проволоки), как описано в 2.2.10., а другие проволоки оставляли пустыми или модифицировали этаноламином (контрольные проволоки).

Для создания заданных напряжений на подложке использовали пикоамперметр/источник питания Keithley 6487 (США). Схема измерений приведена на рисунке 2.1. Между истоком и стоком прикладывается постоянное напряжение 0,194 В и проводится измерение напряжения, выдаваемое операционным усилителем, входящего в состав блока измерений. Электрические измерения проводили с помощью мультиметра Agilent 34410A (США). При анализе в исследованиях в режиме № 1 проводили измерения сток-затворных характеристик (зависимости тока истока от напряжения на затворе) каждой кремниевой проволоки с иммобилизованным на неё зондом в условиях 10мМ фосфатного буфера не менее трех раз при развертке напряжения на затворе от 0 до 30 В с шагом 1 В.

Затем, наносили мишень, как описано в 2.2.10., записывали вольт-амперные характеристики проволок не менее трех раз, либо переходили на режим №2. Для этого после

измерения сток-затворных характеристик проволок в режиме №1 выбирали пороговые значения напряжения для последующего измерения в режиме №2. В режиме №2, на поверхность чипа наносили по 1-2 мкл 10 мМ фосфатного буфера для стабилизации отклика биосенсора, затем добавляли по 3 мкл выявляемой мишени в диапазоне концентраций от 10^{-20} до 10^{-7} М так, чтобы зона нанесения включала в себя все 12 проволок, чтобы оценить предел чувствительности биосенсора. В данном режиме регистрировали отклик биосенсора на добавление мишени в реальном времени. Через 30 минут переходили на режим №1 и последовательно записывали вольт-амперные характеристики всех проволок не менее трех раз и обрабатывали полученные данные.

Обработку данных, полученных при снятии вольт-амперных характеристик проволок после иммобилизации зондов и после гибридизации с мишенью проводили в программе Excel. Для построения графиков вольт-амперных характеристик КНИ-биосенсора рассчитывали средние значения измерений. Погрешность измерений рассчитывали, как стандартную ошибку среднего значения измерения. Расчеты значений изменения тока после добавления мишени относительно сигнала после иммобилизации зондов проводили путем вычитания значений сигнала, полученных после иммобилизации зондов, из значений после гибридизации с мишенью ($\Delta I = I_{\text{комплекс}} - I_{\text{зонд}}$), погрешности складывались соответственно.

2.2.11. Синтез и модификация магнитных наночастиц (МНЧ)

Для получения магнитных наночастиц на основе смешанного оксида железа использовался метод соосаждения хлоридов железа II и III. Для этого брали навески 0.918 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0.332 г $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, растворяли в 40 мл H_2O MQ при нагревании до 90°C при 700 об/мин в течение 15 минут на термошейкере (Dlab, Китай). Далее по каплям добавляли 7.5 мл 2 М NaOH и перемешивали в течение 30 мин при 700 об/мин. Частицы отделяли магнитной сепарацией на магнитном штативе Dynal («Invitrogen», США), осадок промывали H_2O MQ (3×30 мл), этиловым спиртом (3×30 мл). Затем наночастицы ресуспендировали в этиловом спирте для дальнейшей модификации.

Модификацию МНЧ проводили в пробирке на 5 мл, к 300 мкл суспензии частиц Fe_3O_4 добавляли 2.5 мл перегнанного этанола и 200 мкл H_2O MQ. Обрабатывали в ультразвуковой бане («Сапфир», Россия) в течение 15 минут. Затем к смеси добавляли 75 мкл водного раствора аммиака и 10,5 мкл TEOS и снова обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин. Далее раствор оставляли на шейкере (Heidolph, Германия) при 1500 об/мин на 18 часов при комнатной температуре. После этого отделяли полученный осадок магнитной сепарацией и промывали этиловым спиртом (3×3 мл). Далее к осадку добавляли 150 мкл 5% спиртового раствора APTES

и инкубировали при перемешивании на шейкере при 1500 об/мин в течение 2 часов. Осадок отделяли на магните, промывали этанолом (3×3 мл) и ацетонитрилом (1×3 мл). Затем к осадку добавляли 3 мл раствора 1,3,5-трихлоро-2,4,6-триазина (10 мг/мл) в ацетонитриле и оставляли на шейкере при перемешивании 1500 об/мин еще на 2 часа. Осадок отделяли магнитной декантацией и промывали ацетонитрилом (3×3 мл).

К 1.13 мг МНЧ добавляли 300 мкл олигонуклеотидного зода в концентрации 10^{-5} М в 50мМ ВВ, рН 9.0 (Таблица 2.1) и инкубировали на термошейкере Eppendorf Thermomixer Comfort («Eppendorf», США) при температуре 25°C в течение ~15 часов. Затем для оценки емкостных характеристик МНЧ после иммобилизации аминоксодержащего НК-зонда отбирали немагнитные фракции от МНЧ и промывали H₂O MQ (3×1 мл). Для расчета емкости МНЧ определяли концентрацию олигонуклеотида в надосадочных растворах спектрофотометрическим 2.2.3. или флуориметрическим методами 2.2.4.

2.2.12. Синтез и модификация нанокомпозитов на основе полимера нейлон-6 и МНЧ (МНЧ@Н6)

Нейлон-6 (Н6) растворяли в 2,2,2-трифторэтаноле при перемешивании в течение 30 мин при 60°C для получения 5%-ного раствора. К суспензии МНЧ 0.125 мг (для МНЧ1%Н6) или 0.625 мг (для МНЧ5%Н6) в 125 мкл воды добавляли 250 мкл 2,2,2-трифторэтанола и 250 мкл раствора нейлона-6 при перемешивании в течение 5 мин. К реакционной смеси постепенно добавляли H₂O MQ до начала образования осадка. Полученную суспензию оставляли на ночь для полного осаждения нанокомпозитов МНЧ@Н6. Нанокомпозиты собирали магнитной сепарацией, промывали этанолом (3×1.5 мл), водой и высушивали в вакууме.

Модификацию нанокомпозитов МНЧ@Н6 осуществляли при добавлении к 1 мг 100 мкл олигонуклеотида, содержащего на конце декатимидилатный домен (Т-домен) в концентрации 10^{-5} М в 50 мМ ВВ, рН 9.0 (Таблица 2.1) при перемешивании (500 об/мин) в течение 15 ч при 20 °С. Полученную смесь помещали под источник УФ-облучения (2 ртутных лампы низкого давления ДБ-15, $\lambda=253,7$ нм) на расстоянии 10 см на 10 мин [14]. МНС@Н6 с иммобилизованным олигонуклеотидом собирали магнитной сепарацией, промывали H₂O MQ (3×1 мл). Для расчета емкости МНЧ@Н6 определяли концентрацию олигонуклеотида в надосадочных растворах спектрофотометрическим 2.2.3. или флуориметрическим методами 2.2.4.

2.2.13. Гетерофазный гибридизационный анализ на МНЧ и МНЧ@Н6 с иммобилизованными зондами

К контрольным с некомплементарным зондом и несущим комплементарный олигонуклеотидный зонд наноматериалам (МНЧ/МНЧ@Н6) добавляли 300 мкл раствора,

содержащего 0,5% суммарной РНК пекарских дрожжей в 50 мМ РВ, рН 7.4 (Таблица 2.1) и инкубировали в течение 20 минут на термошейкере Eppendorf Thermomixer Comfort («Eppendorf», США), 1400 об/мин, 4°C. Затем к данной суспензии добавляли мишень, содержащую флуоресцентную метку, (10^{-6} М) в 50 мМ РВ, рН 7.4 и инкубировали на термошейкере Eppendorf Thermomixer Comfort («Eppendorf», США), 1400 об/мин, 4°C, 1 час. Далее отбирали надосадочные фракции для исследования интенсивности флуоресценции на планшетном флуориметре методом 2.2.4.

Денатурация матрицы при пробоподготовке

К наноматериалам (контрольным и содержащим гибридизационный комплекс) добавляли 300 мкл 50% раствора формамида, инкубировали на термошейкере Eppendorf Thermomixer Comfort («Eppendorf», США), 1400 об/мин, 95°C в течение 10 минут. Затем отбирали надосадочные фракции для исследования интенсивности флуоресценции с помощью флуориметрического анализа (метод 3.2.1.12).

2.2.14. Колориметрический анализ для выявления биотиновой метки

К 2 мг МНЧ@Н6, содержащих зонд, добавляли раствор 0.1% яичного альбумина, 0.5% Tween-20 в АР буфере, рН 7.5 (таблица 2.1), инкубировали при перемешивании на термошейкере Eppendorf Thermomixer Comfort («Eppendorf», США), 600 об/мин, 25°C в течение 15 минут. Затем к МНЧ@Н6 добавляли 50 мкл 1 мкг/мл раствора стрептавидин-щелочной фосфатазы в буфере (АР, рН 7.5, 0.05% Triton, 0.05% SDS), инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая. Затем частицы отмывали раствором, содержащим 20% этанол, 0.5% Tween-20 в буфере АР, рН 7.5 (4×200 мкл); раствором 0.1% Tween-20 в буфере АР, рН 9.5 (1×200 мкл). Добавляли 100 мкл раствора хромогенных субстратов 0.495 мг NBT и 0.6 мг BCIP в буфере АР, рН 9.5. Визуализацию результата колориметрического анализа проводили в течение 30 минут, фиксируя изменение окраски МНЧ@Н6.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Химически модифицированные аналоги нуклеиновых кислот находят широкое применение как в фундаментальных исследованиях, так и в практической биомедицине. Путем направленного изменения химической структуры олигонуклеотидов удастся получать соединения с принципиально новыми физико-химическими и биологическими свойствами, что открывает дополнительные возможности для использования таких соединений. В связи с чем важной задачей остается систематическое исследование новых свойств олигонуклеотидов, содержащих химические модификации.

Как было сказано ранее в ИХБФМ СО РАН разработаны фосфорилгуанидиновые производные олигонуклеотидов, в которых на межнуклеотидном атоме фосфора введен остаток замещенного гуанидина, при этом сохраняется хорошая растворимость в воде. ФГ олигонуклеотиды образуют термодинамически стабильные дуплексы с ДНК с сохранением структуры двойной спирали ДНК [15]. Полученные ранее результаты демонстрируют эффективность применения ФГ-олигонуклеотидов в ферментативных системах при разработке диагностикумов (классическая ПЦР, аллель-специфическая ПЦР, ПЦР с обратной транскрипцией) [5, 6, 7]. Однако на данный момент не существует систематического анализа влияния химических модификаций на эффективность протекания ферментативных реакций, в связи с чем остается неясным критерий выбора положения и количества введенных модификаций для разработки диагностических систем.

В данной части работы исследовано влияние количества и положения незаряженных ФГ-модификаций, введенных в состав ДНК-комплексов, на субстратные особенности модифицированных дуплексов по отношению к *Taq* ДНК-полимераза. На основе охарактеризованных свойств была рассмотрена возможность применения ФГ-олигонуклеотидов в качестве праймеров в аллель-специфической (АС) ПЦР с повышенной эффективностью по отношению к нативным праймерам.

3.1. Исследование влияния количества и положения ФГ-модификаций в составе дуплексов на эффективность протекания реакции удлинения цепи с помощью *Taq* ДНК-полимеразы

Для исследования влияния ФГ-модификации на способность олигонуклеотидов проявлять субстратные свойства в фермент-зависимых реакциях были синтезированы более 40 последовательностей олигонуклеотидов, содержащие модифицированные звенья в различном количестве и положениях от 3'-конца (Таблица 2.1 №1-38). Все синтезированные олигонуклеотиды были исследованы, как в качестве праймеров при ферментативной элонгации в составе дуплексов с комплементарной 30-звенной матрицей M_{30} (Таблица 2.1 №46), так и в качестве матричных цепей в дуплексах с комплементарной 8-звенной последовательностью флуоресцентно-меченного олигонуклеотида Z_8 (Таблица 2.1 №47) с использованием *Taq* ДНК-полимеразы (Рис. 3.1).

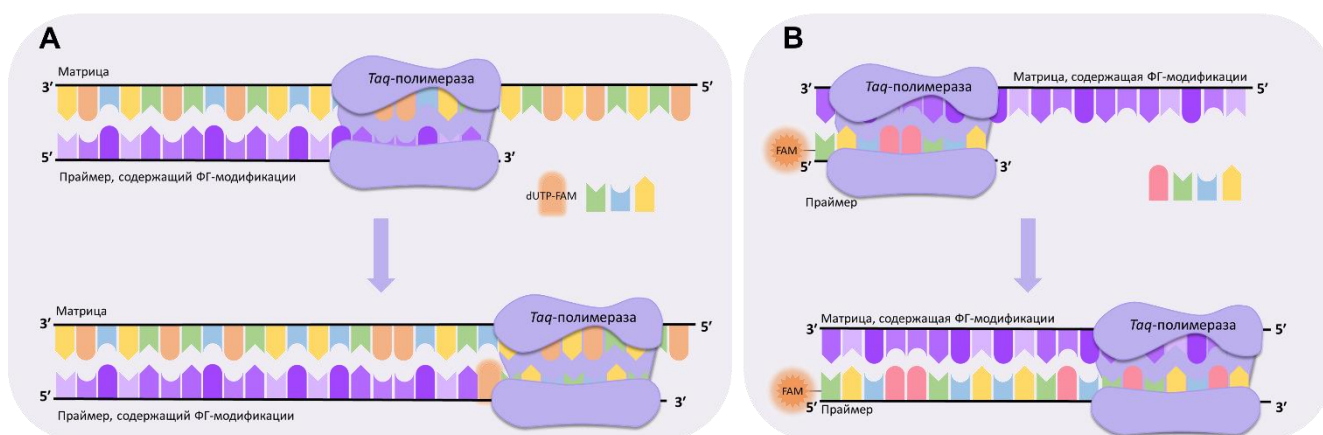


Рисунок 3.1 – субстратные комплексы для *Taq* ДНК-полимеразы: А) комплекс из нативной 30-звенной матрицы M_{30} и 20-звенных ФГ-модифицированных праймеров; Б) комплекс из 20-звенных ФГ-модифицированных матриц и нативного флуоресцентно-меченного 8-звенного праймера Z_8 .

В первом случае (Рис. 3.1 А) детекцию образования продукта элонгации осуществляли по флуоресценции FAM-меченого дезоксиуридинтрифосфата (FAM-12-dUTP), который выступал в качестве первого включаемого нуклеотида, что позволяло фиксировать удлинение праймера даже на одно нуклеотидное звено. Во втором случае (рис. 3.1 Б) анализ результатов элонгации основан на детекции флуоресценции FAM-меченного праймера Z_8 (Таблица 2.1 №47). В результате в исследуемых системах флуоресцентная метка находится в середине или на 5'-конце детектируемого олигонуклеотида на разном удалении от модифицированных звеньев, что может влиять на эффективность флуоресцентного анализа.

С целью изучения флуоресцентных свойств олигонуклеотидов в процессе элонгации была синтезирована серия идентичных по нуклеотидному составу как нативных, так и ФГ-модифицированных последовательностей с разным расположением FAM-метки: на 5'-конце или

в срединном положении в непосредственной близости и на удалении от ФГ-модификации (Таблица 2.1 №40-45), и проанализированы их спектральные характеристики.

Было показано, что при сравнении интенсивности флуоресценции олигонуклеотидов в ряду P₀ FAM, P_{6/5} FAM, P_{6/3} FAM, несущих флуоресцентную метку на 5'-конце, и в ряду P₀₋₉ FAM, P_{6/5-9} FAM, P_{6/3-9} FAM с флуоресцентной меткой в середине тушение флуоресценции не наблюдалось (Рис. 3.2). Кроме того, при смене положения флуорофора с концевое на срединное менялась интенсивность флуоресценции: как в нативных, так и модифицированных олигонуклеотидах наблюдалось разгорание флуоресценции при расположении флуорофора внутри олигонуклеотидной последовательности (~на 30%).

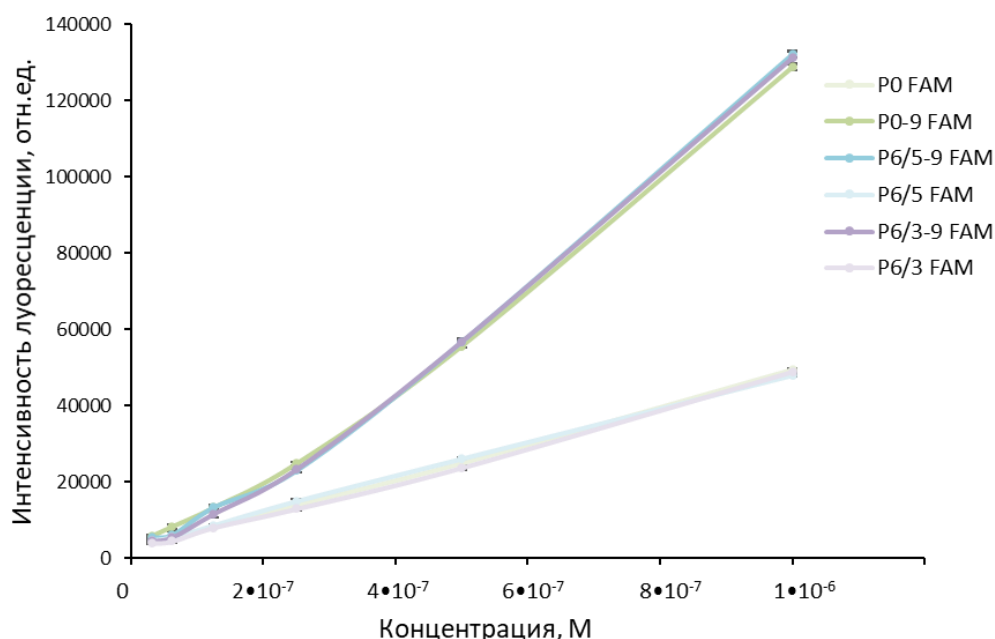


Рисунок 3.2 – зависимость интенсивности флуоресценции олигонуклеотида от концентрации с разным расположением FAM-метки: на 5'-конце или в срединном положении в непосредственной близости и на удалении от ФГ-модификации.

При концевом расположении FAM-метки тушение флуоресценции может быть обусловлено двумя механизмами: динамическим тушением из-за высокой подвижности 5'-конца олигонуклеотида и столкновений между возбужденной меткой и гуанином; фотоиндуцированным переносом электронов от возбужденного флуорофора к гуанину. При изменении расположения метки с концевое в срединное положение возбужденное состояние флуорофора стабилизируется стэкинг-взаимодействиями с соседними основаниями, экранированием от водного окружения и снижением полярности локальной среды. Влияние ФГ-модификации при этом отсутствует, как в непосредственной близости флуорофора к модификации, так и на удалении. Полученные результаты демонстрируют возможность корректного исследования олигонуклеотидов с различным количеством и расположением ФГ-

модификаций в составе дуплексов в качестве субстратов по отношению к *Taq* ДНК-полимеразе в обеих предложенных системах.

3.1.1. Исследование влияния количества и положения ФГ-модификаций в составе праймера на эффективность протекания реакции удлинения цепи с помощью *Taq* ДНК-полимеразы

На первом этапе исследовали влияние количества и расположения ФГ-модификаций в составе праймера при ферментативной элонгации *Taq* ДНК-полимеразой на системе, описанной выше, состоящей из 30-звенной матрицы M_{30} и 20-звенного ФГ-модифицированного праймера P_x^* (Рис. 3.1 А). На рисунке 3.3 представлен результат электрофоретического анализа продуктов реакции ферментативного удлинения. Причем, в случае достройки модифицированного праймера количество ФГ-звеньев в последовательности влияет на его электрофоретическую подвижность: расстояние от кармана до бенда уменьшается пропорционально количеству модифицированных звеньев. Тогда как расположение модифицированных звеньев не влияет на электрофоретическую подвижность.

Во всех случаях наблюдается образование полноразмерного продукта, длиной 31 нуклеотид, что превышает длину матричной цепи (30 нуклеотидов). Это явление объясняется способностью ДНК-полимеразы к неспецифическому присоединению нуклеотидов (чаще всего dATP) по тупым концам при отсутствии 3'→5' экзонуклеазной активности.

При интегральном анализе электрофореграмм, как и следовало ожидать, максимальный выход продукта наблюдается с участием нативного праймера P_0 (1 дорожка), а также с модификациями $P_{h1/5}$ (2), $P_{h2/5}$ (3), P_3 (18), P_6 (21), P_7 (22). При этом при элонгации праймера $P_{h2/5}$ наблюдаются точки паузы *Taq* ДНК-полимеразы за несколько нуклеотидов до полноразмерного продукта. А минимальный выход продукта наблюдается с участием модифицированных праймеров $P_{1/5}$ (2), $P_{2/5}$ (5), $P_{3/3}$ (12), $P_{1,2}$ (26), $P_{1,3}$ (27), $P_{1,4}$ (28), $P_{1,5}$ (29).

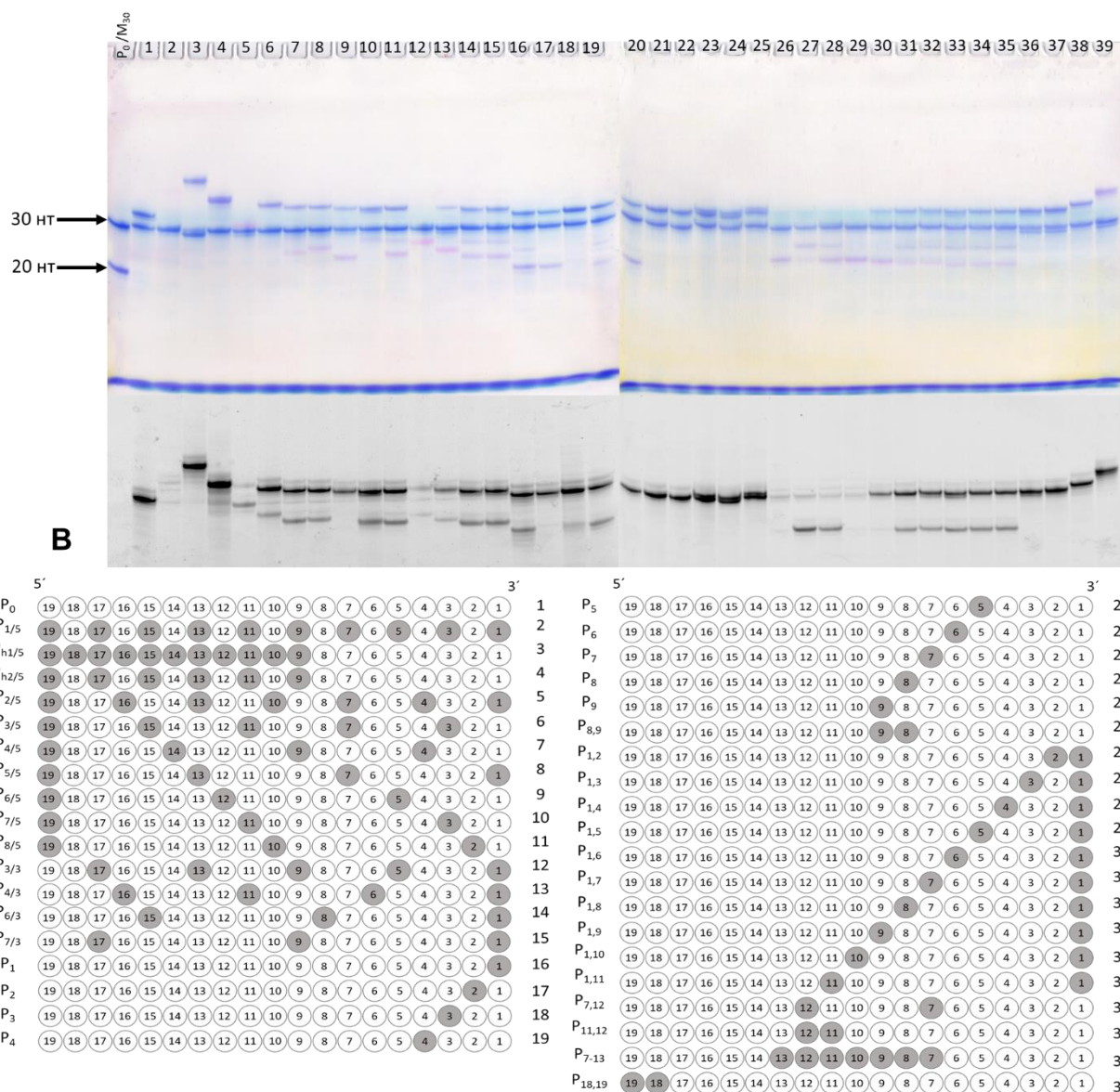


Рисунок 3.3 – Влияние модификаций на выход продуктов элонгации в зависимости от их положения в праймере. Режим амплификации 7 циклов: 95°C – 2 мин, 30°C – 1 мин, 62°C – 7 мин. А) Визуализация результатов по интенсивности флуоресценции и окрашиванию реактивом Stains-all. В) Схематическое изображение межнуклеотидных фосфатов: белые круги – немодифицированные, серые – с введенной ФГ-модификацией.

Введение ФГ-модификации в первое положение от 3'-конца праймера является наиболее критичным с неполной достройкой праймера до полноразмерного продукта, а дополнительное введение модификации со второго по пятое положения от 3'-конца ингибирует элонгацию праймера, также как в случае модифицированного через одно звено праймера ($P_{1/5}$). Введение модификаций, равномерно распределенных по всей длине праймера ($P_{2/5}$, $P_{3/3}$, $P_{4/3}$) также снижает выход продукта. При этом множественная модификация половины праймера со стороны 5'-конца ($P_{h1/5}$, $P_{h2/5}$) не оказывает ингибирующего влияния на процесс элонгации.

Наблюдаемая зависимость эффективности элонгации от положения модификации в олигонуклеотиде, вероятно, обусловлена структурными особенностями сайта связывания *Taq*

ДНК-полимеразы [16]. По данным рентгеноструктурного анализа активный центр фермента охватывает 8 пар нуклеотидов дуплекса матрица/праймер, причем наиболее жесткие стерические ограничения характерны для каталитического центра ладонного домена (первые 3-4 нуклеотида от 3'-конца), в котором происходит координация ионов Mg^{2+} тремя консервативными остатками (Asp785, Glu786, Asp610) и формирование фосфодиэфирной связи. Введение ФГ-групп приводит к двум ключевым изменениям в свойствах олигонуклеотидов: нейтрализации отрицательного заряда фосфатного остова, что ослабляет электростатические взаимодействия с положительно заряженными аминокислотными остатками полимеразы (Lys540, Arg587), и появлению объемной 1,3-диметилимидазолидин-2-иминовой группы, создающей стерические препятствия для связывания с ферментом. В частности, введение ФГ-модификации в терминальное положение со стороны 3'-конца вызывает смещение 3'-ОН группы праймера от оптимальной позиции для нуклеофильной атаки на α -фосфат входящего дезоксинуклеозидтрифосфата (dNTP) и нарушение координации ионов Mg^{2+} , что блокирует формирование активного центра.

Для праймеров P_{3/5} (6), P_{4/5} (7), P_{5/5} (8), P_{7/5} (10), P_{8/5} (11), P_{3/3} (12), P_{4/3} (13), P_{6/3} (14), P_{7/3} (15), P₁ (16), P₄ (19), P_{1,3} (27), P_{1,4} (28), P_{1,7} (31), P_{1,8} (32), P_{1,9} (33), P_{1,10} (34), P_{1,11} (35) наблюдается образование короткого продукта, причем для всех модифицированных праймеров данный продукт находится на одинаковом расстоянии от основного продукта элонгации. Данный факт может быть объяснен тем, что при введении фосфорилгуанидиновой модификации атом фосфора становится хиральным, что приводит к образованию диастереомеров (Sp и Rp конфигурации), которые сложно поддаются разделению. В связи с чем модифицированные олигонуклеотиды являются рацемической смесью диастереомеров. Согласно молекулярному моделированию (неопубликованные данные) для модифицированных праймеров (P₁ – P_{8,9}) наблюдалось четкое пространственное разделение диастереомеров: Sp-изомер располагался в большой бороздке ДНК, ориентированный вне *Taq* ДНК-полимеразы, тогда как Rp-изомер находился в малой бороздке, формируя плотные контакты с аминокислотными остатками белка. Таким образом можно предположить, что побочный продукт элонгации образуется при частичном удлинении Rp-изомера, когда стерические ограничения позволяют полимеразе включить лишь ограниченное число нуклеотидов до полной блокировки транслокации. Это объясняет появление укороченных продуктов амплификации наряду с полноразмерными.

Полученные результаты были сведены в общую матрицу и обработаны в программе STATISTICA 10 (Statsoft). Проведенный статистический анализ выявил значимую корреляцию между экспериментальными и расчётными данными (Рис. 3.4).

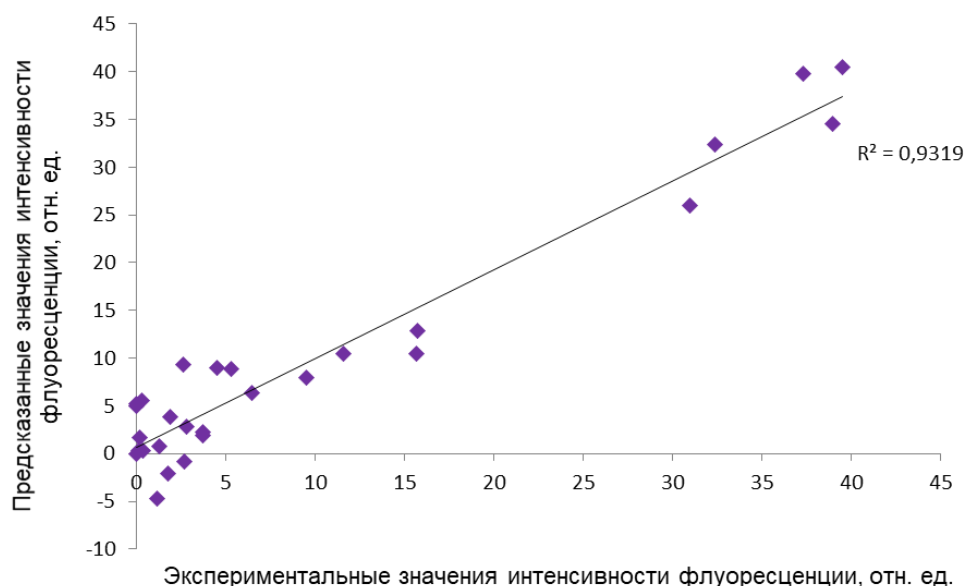


Рисунок 3.4 – Корреляция между экспериментальными и расчетными данными значений интенсивности флуоресценции продукта элонгации.

Предсказано влияние положения ФГ-модификации на эффективность выхода полноразмерного продукта удлинения (Таблица 3.1). Как и ожидалось, наибольший ингибирующий эффект оказывает введение модификаций в 3'-терминальную зону праймера с максимальным подавлением полимеразной активности *Taq* ДНК-полимеразы при модификации первого фосфатного звена. Примечательно, что модификации со стороны 5'-конца также проявляют негативное влияние на процесс элонгации, вероятно, связанное с нарушением взаимодействий с пальцевым доменом полимеразы. Напротив, модификации в позициях с 7 по 13 от 5'-конца приводили к увеличению выхода продукта, возможно, за счет стабилизации дуплекса.

Таблица 3.1 – Значения расчетных данных влияния положения ФГ-модификации в праймере на эффективность элонгации.

положение модифицированного фосфата с 3'-конца	B	p-level
1	-21,2622	0,001334
2	-6,3261	0,473165
3	-6,9055	0,190659
4	-9,1978	0,150337
5	-10,6917	0,058364
6	-4,6149	0,585591
7	23,8341	0,003914
8	21,9187	0,026808

9	29,9339	0,006288
10	31,8002	0,002170
11	25,8006	0,002711
12	15,3672	0,233342
13	7,8153	0,338680
14	-8,9307	0,541820
15	-20,7895	0,019611
16	-26,9030	0,020734
17	-25,3070	0,033472
18	-25,1837	0,007126
19	-28,4783	0,000062

На основании расчетных данных, были синтезированы олигонуклеотиды, содержащие модификации в положениях, предсказанных либо увеличивать выход продукта ($P_{7,12}$, $P_{11,12}$, P_{7-13}), либо снижать выход продукта ($P_{18,19}$). Экспериментальные данные подтвердили хорошую корреляцию с теоретическими данными для модификаций, расположенных в центральной области праймеров, независимо от их количества. Однако в случае двух модификаций на 5'-конце, которые, согласно расчетам, должны были уменьшить выход продукта, ожидаемого эффекта не наблюдалось (Рис. 3.3 №39). Возможно, для значимого подавления реакции ферментативного удлинения требуется большее количество модификаций.

3.1.2. Исследование влияния количества и положения ФГ-модификаций в составе матрицы на эффективность протекания реакции удлинения цепи с помощью Taq ДНК-полимеразы

Как было сказано ранее, по данным рентгеноструктурного анализа, активный центр Taq ДНК-полимеразы формирует специфические взаимодействия как с матричной цепью, так и с праймером. В связи с чем, введение модификаций в матричную цепь также оказывает влияние на ее субстратные свойства. На основании вышеуказанных результатов установлено, что ФГ-модификации, введенные с первого по четвертый межнуклеотидный фосфат на 3'-конце праймера оказывают наиболее выраженное влияние на эффективность амплификации, что связано их непосредственным взаимодействием с аминокислотными остатками каталитического центра полимеразы. В то же время ФГ-модификации, расположенные за пределами данного участка, демонстрируют меньшее влияние на эффективность элонгации.

Таким образом, на следующем этапе работы исследовали эффективность ферментативной элонгации 8-звенного флуоресцентно-меченного олигонуклеотида Z₈ в составе дуплекса с 20-звенными матричными последовательностями, содержащими ФГ-модификации (Рисунок 3.1 В). Стоит отметить, что электрофоретическая подвижность матричных цепей отличается в зависимости от количества введенных ФГ-модификаций, при этом продукты элонгации состоят только из немодифицированных звеньев, следовательно, подвижность будет одинаковой (Рис. 3.5). Длина полноразмерного продукта также, как и в предыдущем исследовании, на 1 нуклеотид (21) длиннее матричной цепи (20) из-за отсутствия корректирующей 3'→5' экзонуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы.

По данным электрофоретического анализа (Рис. 3.5) для большинства исследованных комплексов Z₈/P_x^{*} показана эффективная элонгация праймера до полноразмерного продукта, сопоставимая с достройкой праймера по немодифицированной матрице. Исключение составляют системы, содержащие модифицированные матричные цепи P_{1/5} (2 дорожка), P_{11/5} (3), P_{4/5} (7), P_{3/3} (12), P_{7/3} (15), P_{1,9} (33), P₇₋₁₃ (38). Максимальный выход продукта наблюдается с участием нативной матрицы P₀ (1), а также с модификациями P_{7/5} (10) и P₃ (18). Эффективность элонгации снижается по мере удаления фосфорилгуанидиновой модификации от 3'-конца матрицы, множественные модификации в любом положении матричной цепи также приводят к снижению выхода полноразмерного продукта.

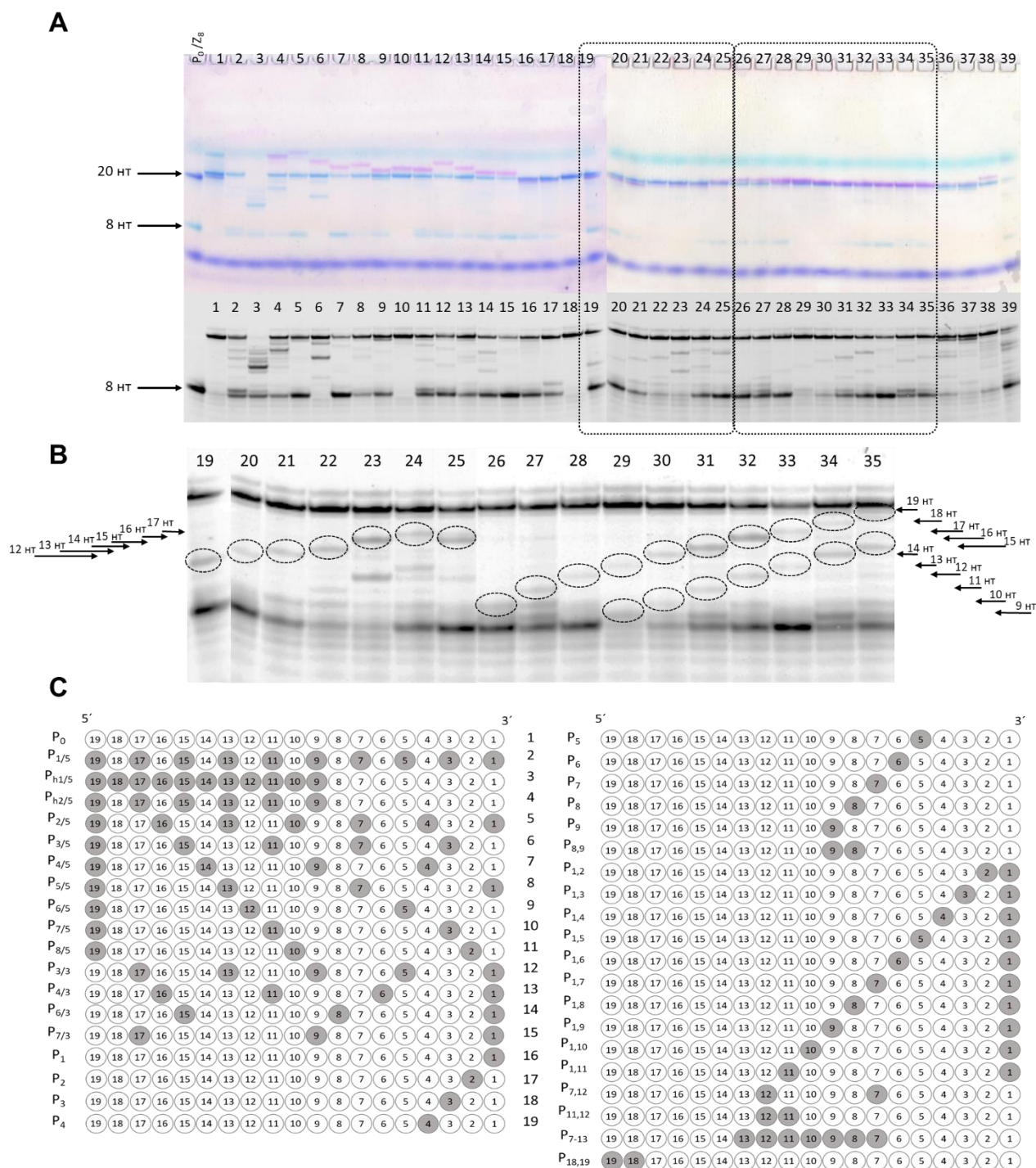


Рисунок 3.5 – Влияние модификаций на выход продуктов элонгации в зависимости от их положения в матрице. Режим амплификации 7 циклов: 95°C – 2 мин, 30°C – 1 мин, 45°C – 7 мин. Визуализация результатов по интенсивности флуоресценции и окрашиванию реактивом Stains-all. В) Промежуточные продукты при элонгации комплексов с модифицированными матрицами. С) Схематическое изображение межнуклеотидных фосфатов: белые круги – немодифицированные, серые – с введенной ФГ-модификацией.

Введение ФГ-модификации в участок матричной цепи, соответствующий зоне элонгации, приводит к существенному ингибированию удлинения праймера. Примечательно, что данный эффект проявляется независимо от наличия или отсутствия модификаций в области связывания

ДНК-полимеразы, что свидетельствует о важности структурных особенностей матрицы в зоне элонгации для эффективного синтеза ДНК.

Кроме того, в ходе исследования выявлено систематическое накопление промежуточных продуктов элонгации длиной +8 нуклеотидов относительно положения модификации в матрице, что указывает на существование специфических точек останова полимеразы. Например, в ряду P_4 – P_9 (19–24) для олигонуклеотида P_4 основной промежуточный продукт имеет длину 12 нуклеотидов, тогда как для P_9 накапливается 17-звенный фрагмент. А в ряду $P_{1,2}$ – $P_{1,11}$ (26–35): для $P_{1,2}$ – продукт длиной 10 нуклеотидов, для $P_{1,11}$ – длиной 19 нуклеотидов, при этом в ряду $P_{1,5}$ – $P_{1,11}$ (29–35) появляется дополнительный побочный продукт длиной 9–15 нуклеотидов соответственно (Рис. 3.5 В). Такая закономерность, вероятно, обусловлена стерическими ограничениями в фермент-субстратном комплексе, а не специфичностью к последовательности ДНК, так как, *Taq* ДНК-полимераза не проявляет сиквенс-специфичности при включении модификаций в ДНК-дуплекс [17].

Таким образом, исследованы субстратные свойства олигонуклеотидов, содержащих фосфорилгуанидиновые модификации на межнуклеотидном фосфате, в составе ДНК/ДНК дуплексов в реакциях элонгации, катализируемых *Taq* ДНК-полимеразой.

В ходе данной части работы показано, что при ферментативном удлинении:

а) введение ФГ-модификации в третье положение от 3'-конца олигонуклеотида, как в случае праймера, так и матрицы не оказывает ингибирующего влияния на процесс элонгации;

б) наибольшее ингибирование элонгации наблюдается при наличии ФГ-модификации одновременно в первом и втором положениях от 3'-конца **праймера** и при их равномерном распределении по всей длине, при этом множественная модификация в 5'-прилегающей половине праймера ингибирующего эффекта не вызывает. Удаление модификации от 3'-конца к середине праймерной цепи приводит к восстановлению удлинения до полноразмерного продукта.

в) наличие ФГ-модификаций вблизи 3'-конца **матричной цепи** практически не влияет на элонгацию, а степень образования полноразмерного продукта снижается при удалении ФГ-группы от 3'-конца матрицы, при этом наибольшее ингибирующее влияние оказывают как множественные, так и двойные ФГ-модификации.

3.2. Рациональный дизайн праймеров с фосфорилгуанидиновыми модификациями для аллель-специфической ПЦР

Выявление соматических мутаций может играть ключевую роль в выборе тактики противоопухолевой терапии. При этом основные технологические сложности детекции связаны с низкой аллельной нагрузкой (<1%) и опухолевой гетерогенностью, что требует применения методов высокопроизводительного секвенирования и цифровой ПЦР, существенно повышающих стоимость анализа. Альтернативой может служить аллель-специфическая (АС) ПЦР. Однако при стандартном подходе её чувствительности, как правило, недостаточно для обнаружения мутантного аллеля с содержанием <1% на фоне дикого типа. Одним из способов повышения селективности АС-ПЦР является модификация структуры праймеров путём введения дополнительных нуклеотидных несоответствий и/или химических модификаций. Тем не менее, поиск оптимальных «возмущений» обычно сводится к перебору ограниченного числа вариантов, поскольку анализ всех возможных комбинаций требует значительных временных и финансовых затрат.

В связи с чем на данном этапе работы проводили рациональный подбор праймеров для АС-ПЦР с максимальной селективностью при выявлении соматических мутаций в протоонкогене KRAS (гомолог вирусного онкогена саркомы крыс Кирстена). Мутации гена KRAS (преимущественно в кодонах 12, 13, 61, 117 и 146) приводят к конститутивной активации сигнальных путей и обнаруживаются при 20-30% злокачественных новообразований [18]. Согласно базе данных COSMIC (the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) подавляющее большинство (90-95%) мутаций, активирующих KRAS, локализуется во втором экзоне в 12 (p.G12A, p.G12C, p.G12D, p.G12R, p.G12S, p.G12V) или 13 (p.G13D) кодонах. В связи с чем установление мутационного статуса гена KRAS является критически важным для выбора тактики лечения пациентов.

3.2.1. Разработка библиотек АС-праймеров для биоинформатического анализа продуктов амплификации с целью отбора наиболее перспективных пар

Для эффективной дискриминации между ДНК дикого типа и мутантными ДНК в АС-ПЦР используют праймеры с 3'-концевым мисматчем, соответствующим определенному сайту мутации, и дополнительным несоответствием на расстоянии 2-4 нуклеотида от 3'-конца [19, 20]. С учетом полученных данных в ходе исследования влияния положения модификации на эффективность ферментативного удлинения праймеров при конструировании аллель-специфических праймеров для введения ФГ-модификации был выбран третий межнуклеотидный фосфат от 3'-конца. Были синтезированы библиотеки нативных и ФГ-модифицированных АС-праймеров (Рис. 3.6), содержащих вырожденные нуклеотиды во втором и третьем положениях от 3'-конца (Таблица 2.3 №1-6).

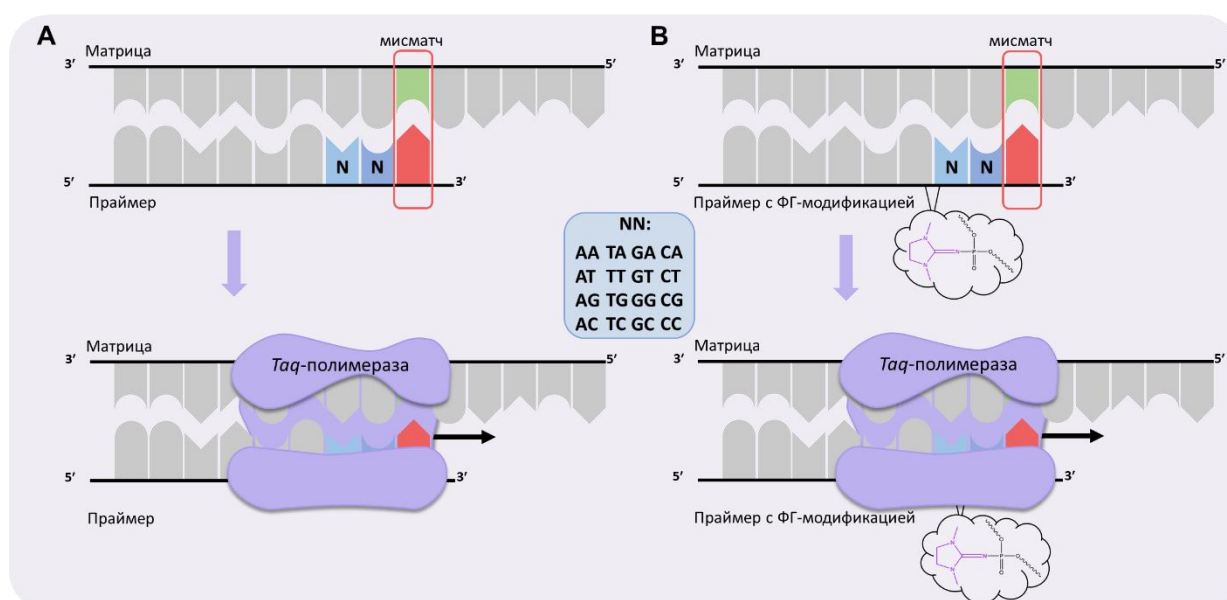


Рисунок 3.6 – Схема разработанных библиотек аллель-специфических праймеров для выявления мутаций в гене KRAS: А) библиотека нативных АС-праймеров; Б) библиотека АС-праймеров с ФГ-модификацией в 3 положении от 3'-конца. N – вырожденные нуклеотиды. Несовпадающие нуклеотиды в матрице отмечены зеленым, а в праймерах – красным.

Последовательности АС-праймеров были выбраны, исходя из ранее установленных праймеров для выявления мутаций KRAS (Таблица 2.3 №7, 9, 11) [21]. Все реакции с АС-праймерами осуществляли с применением общего прямого праймера (Таблица 2.3 №33) и TaqMan-зонда (Таблица 2.3 №35). В качестве контроля для каждого эксперимента использовали референсный праймер k-ref (Таблица 2.3 №34), фланкирующий мутации. АС-ПЦР анализ проводили на плаزمидях, содержащих фрагменты гена KRAS дикого типа (WT) и с мутациями в 12 кодоне (p.G12A, p.G12V). В таблице 3.2 представлены рассчитанные значения C_q для каждой библиотеки праймеров (с ФГ-модификациями и без).

Таблица 3.2 – Рассчитанные значения C_q для праймерных библиотек в АС-ПЦР с использованием ДНК дикого типа (WT) и с мутациями (p.G12A, p.G12V) в концентрациях 10^4 копий на реакцию.

матрица		WT	p.G12A	p.G12V
праймер	C_q			
	WTO	$30,20 \pm 0,04$	$35,01 \pm 0,07$	$36,12 \pm 0,20$
	WTX	$30,64 \pm 0,06$	$38,68 \pm 0,20$	$39,01 \pm 0,20$
	G12AO	$37,71 \pm 0,08$	$27,25 \pm 0,08$	$30,80 \pm 0,01$
	G12AX	N/A	$31,73 \pm 0,17$	$38,08 \pm 0,03$
	G12VO	$31,12 \pm 0,01$	$30,06 \pm 0,08$	$28,28 \pm 0,01$
	G12VX	N/A	N/A	$33,93 \pm 0,04$

- Во всех контрольных образцах без добавления ДНК-матрицы (NTC) амплификация отсутствовала;
- N/A означает, что пороговый цикл (C_q) не был достигнут в течение 45 циклов АС-ПЦР.

Для библиотек праймеров показана дискриминация несовпадающего аллеля с $\Delta C_q > 4$ циклов, кроме G12VO с $\Delta C_q \geq 1,78$. Данный факт связан с тем, что несовпадение G/T на 3'-конце удлиняющейся цепи обычно имеет одну из самых низких специфичностей. Полимеразы из разных организмов демонстрируют снижение дискриминации нуклеотидных несовпадений в следующем порядке: Pur/Pur > Pur/G/Pur > Pur/G/Pur = Pur/G/Pur. Однако также существуют исключения из этого общего правила, которые можно объяснить нарушением термодинамической стабильности, оказывающей сильное влияние на эффективность удлинения праймера [22]. При этом дополнительное введение ФГ-модификации (G12VX) позволяет дискриминировать синтез мутантных ДНК при отсутствии амплификации на протяжении 45 циклов АС-ПЦР. Однако, для библиотек праймеров, с введенными модификациями по сравнению с нативными, показано ингибирующее действие ФГ-модификации на амплификацию при идеальном совпадении 3'-концевых нуклеотидов.

Продукты АС-ПЦР, полученные для трёх вариантов ДНК: дикого типа и мутантных, были использованы для подготовки ДНК-библиотек и секвенированы с помощью платформы MiSeq (Illumina) Тупикиным А.Е. (н.с. ЦКП «Геномика» СО РАН). Биоинформатический анализ результатов секвенирования был выполнен Кабиловым М.Р. (к.б.н., с.н.с., руководитель ЦКП «Геномика» СО РАН) и позволил отобрать 10 пар АС-праймерой с ФГ-модификациями и без (Таблица 2.3 №13-32).

3.2.2. Исследование эффективности АС-ПЦР и специфичности отобранных пар АС-праймеров

Как упоминалось выше, подбор дополнительных несоответствий для повышения специфичности праймера до сих пор остается сложной задачей и чаще всего сводится к перебору

вариантов. В связи с чем отобранные 10 пар праймеров с дополнительными несоответствиями после биоинформатического анализа продуктов амплификации с использованием библиотек праймеров были исследованы в реакциях АС-ПЦР на плаزمидах, содержащих фрагменты гена KRAS дикого типа (WT) и с мутациями в 12 кодоне (p.G12A, p.G12V). В таблице 3.3 представлены рассчитанные значения Cq и ΔCq для каждой пары праймеров (с ФГ-модификациями и без). Несовпадающие нуклеотиды по отношению к матрице дикого типа выделены жирным шрифтом.

Таблица 3.3 – Рассчитанные значения Cq и ΔCq для отобранных АС-праймеров в АС-ПЦР с использованием ДНК дикого типа (WT) и с мутациями (p.G12A, p.G12V) в концентрациях 10⁴ копий на реакцию.

копии на реакцию.							
Матрицы		WT	p.G12A	p.G12V	ΔCq		
Праймеры	Cq				$ Cq_{WT} - Cq_{G12A} $	$ Cq_{WT} - Cq_{G12V} $	$ Cq_{G12A} - Cq_{G12V} $
	CCGA	31,68 ± 0,21	36,27 ± 0,21	34,55 ± 0,15	4,59	2,86	1,72
	C*CGA	34,97 ± 0,17	41,33 ± 0,18	39,57 ± 0,25	6,36	4,60	1,77
	CCGG	26,60 ± 0,12	32,83 ± 0,09	34,43 ± 0,26	6,23	7,83	1,60
	C*CGG	27,48 ± 0,23	35,03 ± 0,16	37,26 ± 0,17	7,56	9,78	2,23
	CCGT	28,88 ± 0,24	27,71 ± 0,14	25,48 ± 0,08	1,18	3,40	2,23
	C*CGT	30,55 ± 0,05	32,54 ± 0,15	25,86 ± 0,03	2,00	4,69	6,69
	CCGC	33,42 ± 0,08	25,49 ± 0,04	32,92 ± 0,01	7,93	0,50	7,43
	C*CGC	35,24 ± 0,05	26,21 ± 0,17	33,77 ± 0,25	9,03	1,47	7,56
	CACT	38,55 ± 0,11	27,38 ± 0,27	33,74 ± 0,16	11,17	4,81	6,36
	C*ACT	41,74 ± 0,04	29,81 ± 0,29	39,66 ± 0,18	11,93	2,08	9,85
	CATT	37,73 ± 0,17	35,84 ± 0,12	27,87 ± 0,20	1,89	9,86	7,97
	C*ATT	40,28 ± 0,24	39,72 ± 0,12	32,81 ± 0,13	0,56	7,47	6,91
	CAGA	31,27 ± 0,11	35,73 ± 0,25	33,94 ± 0,08	4,46	2,67	1,79
	C*AGA	34,83 ± 0,21	N/A	N/A	10,17	10,17	0,00
	CGGG	25,37 ± 0,09	33,68 ± 0,18	34,79 ± 0,07	8,31	9,42	1,11
	C*GGG	25,62 ± 0,16	35,05 ± 0,14	35,32 ± 0,08	9,43	9,70	0,27
	CGTG	28,03 ± 0,19	29,27 ± 0,10	31,26 ± 0,13	1,24	3,23	1,99
	C*GTG	27,50 ± 0,12	31,41 ± 0,09	33,00 ± 0,08	3,91	5,51	1,60
	CTCG	26,06 ± 0,20	34,14 ± 0,22	33,09 ± 0,10	8,08	7,03	1,05
	C*TCG	27,63 ± 0,18	36,38 ± 0,23	36,11 ± 0,11	8,75	8,48	0,27

- Во всех контрольных образцах без добавления ДНК-матрицы (NTC) амплификация отсутствовала;
- знаком * – отмечено место ФГ-модификаций в аллель-специфическом праймере;
- нуклеотиды, выделенные жирным шрифтом, представляют собой несовпадающие нуклеотиды относительно последовательности ДНК дикого типа;
- N/A означает, что пороговый цикл (Cq) не был достигнут в течение 45 циклов АС-ПЦР

Далее из 20 праймеров были выбраны те, которые обладают наибольшей дискриминацией для обоих несовпадающих вариантов ДНК (с наибольшими значениями ΔC_q , в таблице 3.3 выделены жирным шрифтом) для дальнейших исследований эффективности и специфичности АС-ПЦР. Для количественной оценки эффективности дискриминации между мутантными ДНК и ДНК дикого типа ΔC_q является ключевым параметром при выборе праймеров. Так введение одного несоответствия (CCGG/C*CGG, CGGG/C*GGG и CTCG/C*TCG) позволяет с хорошей селективностью дискриминировать две мутантные ДНК (p.G12A, p.G12V), при этом дополнительное введение ФГ-модификации в третье положение повышает дискриминацию с незначительным увеличением порогового цикла (<1) для целевой ДНК. Примечательно, что для праймера с двумя несоответствиями CAGA наблюдается низкая дискриминирующая способность по отношению к мутантным вариантам ДНК, тогда как введение ФГ-модификации (C*AGA) способствует полной остановке амплификации по матрицам с мутациями. Хотя для C*AGA и наблюдается высокая дискриминирующая способность ($\Delta C_q=10,17$), значения порогового цикла для целевой ДНК близки к 35, что указывает на низкую эффективность амплификации. Несмотря на то, что описанные выше праймеры разработаны для амплификации ДНК дикого типа, что не критично при обнаружении соматических мутаций с их низким содержанием на фоне преобладающей немутированной ДНК, предложенный подход отбора праймеров продемонстрировал высокую селективность и позволил отобрать три оптимальные пары праймеров, обеспечивающих дискриминацию мутантных вариантов ДНК.

Известно, что для SNP типа G/C (мутация p.G12A) самую высокую эффективность дискриминации проявляют несовпадения во второй паре оснований, ближайшей к 3'-концу праймера, затем в третьей [20]. Выбранные праймеры с дополнительным несовпадением CCGC/C*CGC в третьем положении со стороны 3'-конца праймера показали высокую дискриминацию по отношению к целевой ДНК. Неожиданным оказалась дискриминирующая способность праймеров CACT/C*ACT с тремя несовпадениями по отношению к ДНК дикого типа и p.G12A, что, вероятно, связано с образованием водородных связей неканоническими парами.

Для типа SNP G/T (мутация p.G12V) несовпадения в третьем сайте должны иметь самую высокую эффективность дискриминации, за которыми следуют второй и четвертый сайты [20]. Праймеры CATТ/C*АТТ с двумя несоответствиями по отношению к p.G12V ДНК и тремя для ДНК дикого типа продемонстрировали селективность амплификации с $\Delta C_q > 6,91$, причем нативные праймеры обладали большей дискриминирующей способностью с меньшими значениями порогового цикла для целевого аллеля.

В количественной ПЦР эффективность амплификации представляет собой критически важный параметр, который рассчитывается методом линейной регрессии зависимости пороговых циклов (C_q) от десятичного логарифма исходной концентрации ДНК-матрицы. Согласно современным международным рекомендациям (MIQE guidelines), обязательными параметрами для описания стандартной кривой являются эффективность амплификации (E , %), коэффициент детерминации (R^2), отражающий линейность зависимости, и точка пересечения с осью ординат (у-пересечение), определяющая аналитическую чувствительность метода. Для оценки корректности выбора АС-праймеров была рассчитана эффективность ПЦР с серийным разведением ДНК-матриц 10^0 - 10^6 копий на реакцию (Рис. 3.7). Для расчета эффективности ПЦР были выбраны праймеры, обладающие самой высокой селективностью по отношению к целевым матрицам.

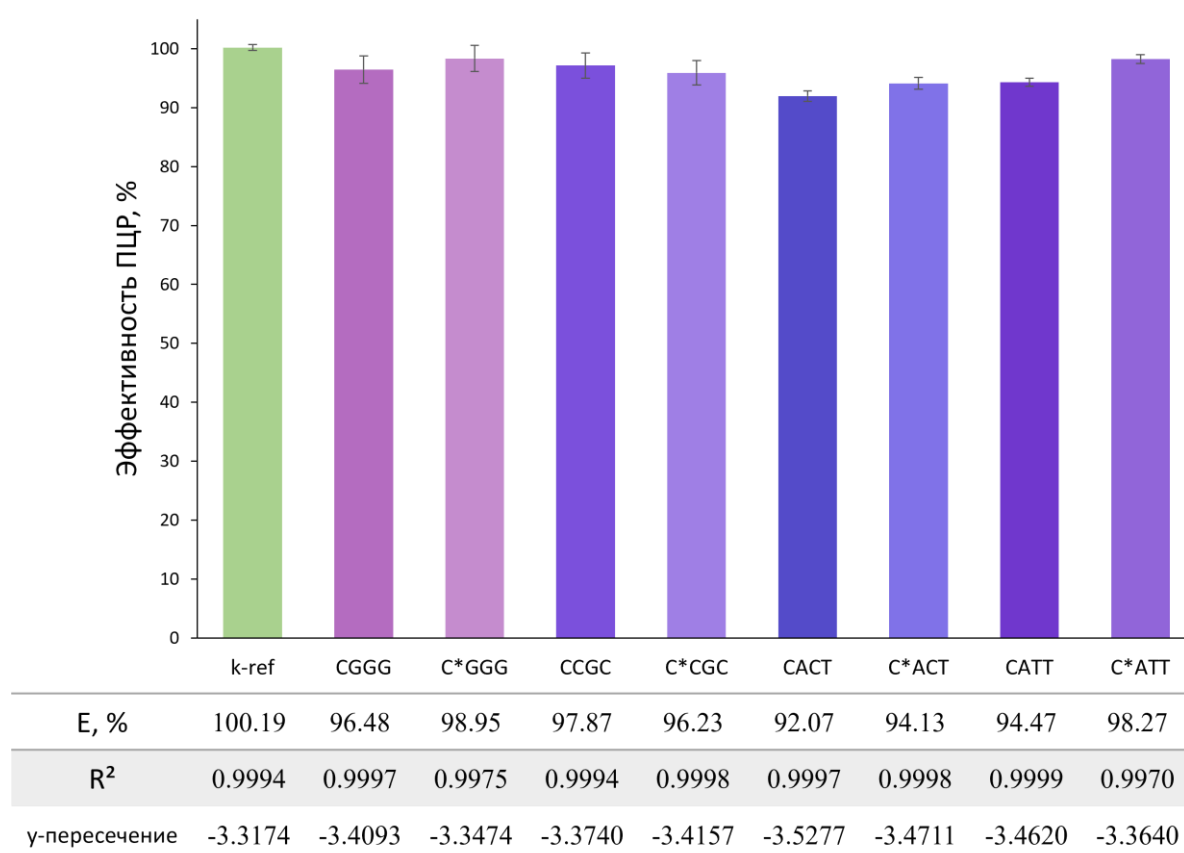


Рисунок 3.7 – Рассчитанные значения эффективности (E , %) АС-ПЦР, коэффициента детерминации (R^2), точки пересечения с осью ординат (у-пересечение). Эффективность ПЦР для каждого праймера была рассчитана с помощью онлайн-калькулятора Thermo Fisher Scientific.

Эффективность ПЦР для всех выбранных праймеров составила больше 92%, в связи чем такие праймеры можно использовать при обнаружении низкого процента мутаций, а при оптимизации условий амплификации может быть достигнута 100% эффективность.

В соответствии с текущими диагностическими стандартами, порог чувствительности АС-ПЦР для обнаружения мутантных аллелей установлен на уровне 1% мутантной ДНК на фоне ДНК дикого типа. На рисунке 3.8 представлены типичные кривые амплификации, полученные в

реакция аллель-специфической ПЦР с использованием нативных и ФГ-модифицированных праймеров.

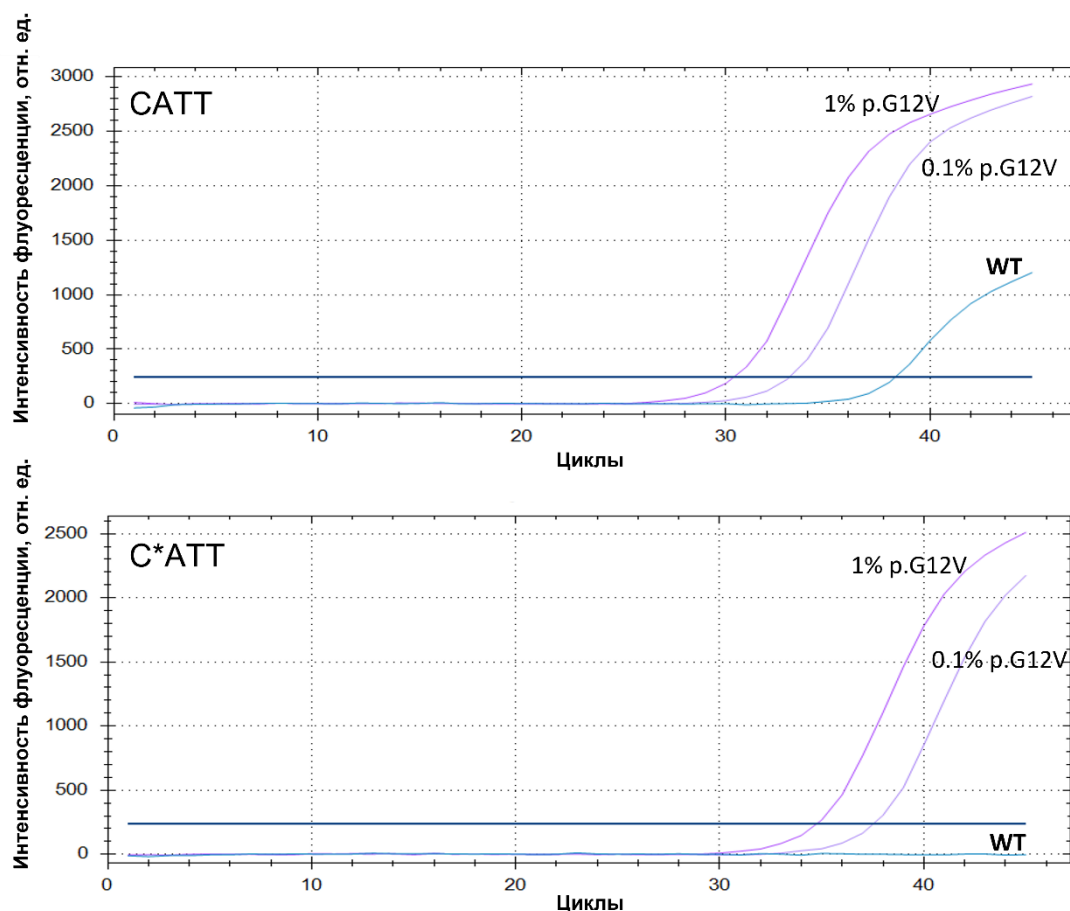


Рисунок 3.8 – Типичные кривые амплификации, полученные при АС-ПЦР. Выявление мутации гена KRAS p.G12V с использованием праймеров CATT и C*ATT на ДНК дикого типа (10^4 копий на реакцию), 1% и 0.1% мутантной ДНК (G12V) на фоне ДНК дикого типа.

Специфичность АС-праймеров была исследована с использованием плазмид, содержащих фрагменты гена KRAS дикого типа (WT) и с мутациями в 12 кодоне (p.G12A, p.G12V) и была рассчитана с использованием уравнения $\Delta Cq = Cq_{WT} - Cq_{1\%}$ ($\Delta Cq = Cq_{WT} - Cq_{0.1\%}$), показывающего разницу между амплификацией ДНК дикого типа и с содержанием 1% (0.1%) мутантной ДНК (всего 10^4 копий на реакцию).

Таблица 3.4 – Рассчитанные значения Cq и ΔCq для обнаружения мутаций KRAS с использованием различных процентных соотношений мутаций (p.G12A, p.G12V) на фоне ДНК дикого типа (WT) концентрациях 10^4 копий на реакцию.

матрицы	праймеры	Cq			ΔCq	
		WT	1%	0.1%	$Cq_{WT} - Cq_{1\%}$	$Cq_{WT} - Cq_{0.1\%}$
p.G12A	CCGC	$35,64 \pm 0,04$	$29,95 \pm 0,05$	$31,62 \pm 0,09$	5,68	4,02
	C*CGC	$43,38 \pm 0,09$	$32,18 \pm 0,14$	$35,48 \pm 0,10$	11,19	7,90

	CACT	40,25 ± 0,12	32,74 ± 0,10	36,53 ± 0,12	7,51	3,72
	C*ACT	43,57 ± 0,11	34,74 ± 0,16	37,95 ± 0,10	8,83	5,62
p.G12V	CATT	38,20 ± 0,07	30,32 ± 0,04	33,06 ± 0,07	7,88	5,15
	C*ATT	N/A	34,89 ± 0,13	37,56 ± 0,15	10,11	7,44

- Во всех контрольных образцах без добавления ДНК-матрицы (NTC) амплификация отсутствовала;
- знаком * – отмечено место ФГ-модификаций в аллель-специфическом праймере;
- нуклеотиды, выделенные жирным шрифтом, представляют собой несовпадающие нуклеотиды относительно последовательности ДНК дикого типа;
- N/A означает, что пороговый цикл (Cq) не был достигнут в течение 45 циклов АС-ПЦР

Для всех выбранных праймеров показана хорошая дискриминация ДНК дикого типа, причем для праймеров с ФГ-модификациями значения ΔCq для 1% и 0.1% составляют больше 8 и 5 циклов соответственно, тогда как для нативных праймеров значения ΔCq составляют больше 5 и 3 циклов. Повышение специфичности обнаружения мутации p.G12V со слабым G/T мисматчем, которая считается одной из наиболее частых мутаций 12 кодона у пациентов с колоректальным раком, особенно важно для улучшения клинических результатов [18]. Более того, p.G12V связан с более агрессивным фенотипом, худшим прогрессированием заболевания и коротким временем выживания [23]. Разработанный подход позволил отобрать праймеры с высокой селективностью при обнаружении низкого процента мутаций на фоне ДНК дикого типа.

Таким образом, разработан и успешно апробирован подход к рациональному подбору высокоселективных праймеров для аллель-специфичной ПЦР, демонстрирующий высокую чувствительность при выявлении редких соматических мутаций. Установлено, что ФГ-модификация может быть использована в качестве дополнительного структурного нарушения в комплексе праймер/ДНК, аналогично мисматчу, при этом сохраняя дискриминационные свойства ДНК-полимеразы. В проведенных экспериментах применялись праймеры, содержащие только одну ФГ-модификацию в третьем положении от 3'-конца. Важно отметить, что ФГ-модификация способствует повышению специфичности праймера за счёт синергетического эффекта с дополнительным нуклеотидным несоответствием.

3.3. Разработка кремний на изоляторе (КНИ) биосенсора на основе полевых транзисторов для обнаружения нуклеиновых кислот

Обнаружение нуклеиновых кислот, белков и других биологических мишеней играет важную роль в клинической диагностике, современной молекулярной биологии, обеспечении безопасности пищевых продуктов и мониторинге окружающей среды [24, 25, 26]. Современной альтернативой ПЦР-анализа могут стать биосенсорные устройства. Использование биосенсоров без меток и амплификации, таких как кремний на изоляторе биосенсоров (КНИ) на основе полевых транзисторов, позволяет упростить и облегчить процедуру детекции [7]. Высокое отношение сигнал/шум для КНИ-сенсоров и низкий предел обнаружения, достигающий аттомольных концентраций биомаркера, открывают перспективы для их использования [27, 28, 29]. Эти два аспекта приводят к нескольким проблемам при разработке такого типа биосенсоров. При проектировании биосенсора необходимо учитывать тип и конструкцию сенсорного элемента, условия детектирования (воздух или раствор), свойства раствора и характеристики аналита, а также модификацию поверхности и иммобилизацию зондов [30, 31, 32, 33]. Все эти факторы взаимосвязаны и накладывают существенные ограничения на конструкцию биосенсоров. Изменение физико-химических свойств ФГ-олигонуклеотидов, а именно отсутствие заряда и способность к формированию гибридационных комплексов в низкосолевых условиях открывает новые возможности их применения в качестве зондов для гетерофазного анализа на таком типе сенсоров.

3.3.1. Устройство КНИ-биосенсора

Основой полевых транзисторов, в данном случае кремниевых, служат полупроводниковые проволоки шириной от нескольких микрометров до сотен нанометров, которые расположены на слое из диоксида кремния, покрывающего кремниевую подложку.

В данной работе использовали n-канальные КНИ-транзисторы с обратным затвором, каждый чип содержал кремниевый кристалл с 12-ю микропроволочными сенсорными элементами (Рис. 3.9 А). Чипы с шириной сенсорного элемента 3 мкм были изготовлены в Институте физики полупроводников им. А Ржанова СО РАН методом литографии [12]. Чипы с шириной сенсорного элемента 0,2 мкм были предоставлены ЗАО «МБС-Технология» (Россия). Длина каждой кремниевой микропроволоки составляет 10 мкм, ширина – 3 или 0,2 мкм, толщина проводящего слоя кремния 30 нм, толщина обратного затвора 200 нм [13]. Кристаллы сенсоров имели контактные площадки истока и стока размером 30×30 мкм². Конструктивные параметры обоих типов чипов были идентичны, за исключением ширины сенсорных элементов.

Принцип детекции биомаркеров на КНИ-биосенсоре заключается в измерении модуляции тока, которая возникает, когда заряженные молекулы адсорбируются на поверхности кремниевого кристалла. Таким образом, специфическое связывание целевых молекул с биорецепторами, иммобилизованными на поверхности сенсорного элемента, приводит к локальному изменению поверхностного заряда. Это, в свою очередь, вызывает модуляцию порогового напряжения полевого транзистора и соответствующее изменение тока стока, который затем фиксируется аналогово-цифровым преобразователем. Общая схема измерений для каждого канала транзистора изображена на рисунке 3.9 В.

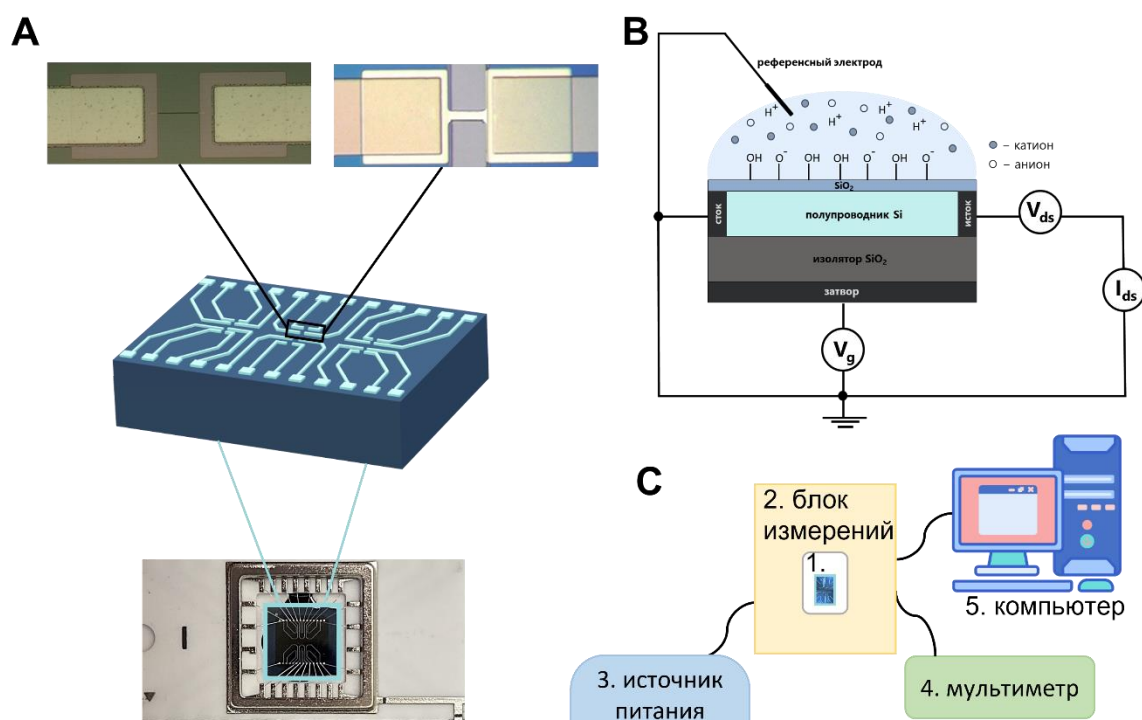


Рисунок 3.9 – А) Структура сенсорного элемента с 12 отдельными транзисторами, изображения микропроводов шириной 0,2 и 3 мкм, полученные методом оптической микроскопии. В) Схема измерений для каждого канала транзистора С) Схема установки для проведения измерений. 1- КНИ транзистор (чип), 2 – блок измерений, 3 – источник питания, 4 – мультиметр, 5 – компьютер для сбора и обработки данных.

3.3.2. Калибровка значений тока истока

Ранее было разработано устройство, позволяющее последовательно измерять сток-затворные характеристики нанопроволок на одном чипе [34]. Для высокоточных измерений тока в схему устройства был включен операционный усилитель. Набор калибровочных резисторов использовался для преобразования значений напряжения, измеряемых вольтметром, в значения тока. Измерение сопротивления проводилось по двухпроводной схеме с использованием мультиметра Agilent 34410A. Анализ полученных значений тока показал, что относительная ошибка определения тока не превышает 1,5% во всем диапазоне измерений (0,01-7 мкА). При этом воспроизводимость повторных измерений была на порядок выше – на уровне 0,1%. Это

позволяет использовать полученную калибровочную зависимость для расчета сток-истоковых характеристик в режиме зависимости тока истока от напряжения на подложке. Более того, реализованный подход обеспечивает автоматизацию и стандартизацию процесса измерений, упрощение обработки полученных данных.

3.3.3. Воспроизводимость измерений

Была проанализирована воспроизводимость сток-затворных характеристик кремниевых микропроводок шириной 0,2 и 3 мкм на немодифицированной поверхности при многократных измерениях. Измерения проводились на воздухе и в деионизованной воде (MQ) (Рис. 3.10). Все 12 исследуемых микропроводок шириной 3 мкм продемонстрировали схожие характеристики, как в воде, так и на воздухе. В воздушной среде наблюдался незначительный разброс значений тока между отдельными проволоками при сохранении общей формы зависимостей. Повторные измерения на одной и той же проволоке показали вариацию не более 6% во всем диапазоне напряжений во всех экспериментах исследования. Среднее значение порогового напряжения, измеренного на воздухе, составило $8,66 \pm 0,76$ В. При погружении сенсорных элементов в воду значения тока для различных проводок практически полностью совпадали во всем диапазоне напряжений на затворе (Рис. 3.10 А, синие кривые). Максимальное значение среднеквадратичного отклонения в серии измерений на воздухе и в воде отличалось в 2,7 раза. Среднее значение порогового напряжения в водной среде составило $20,7 \pm 0,28$ В. В целом, воспроизводимость измерений в водной среде для различных проводов оказалась выше, чем в воздушной, при сохранении общей зависимости вольт-амперных характеристик.

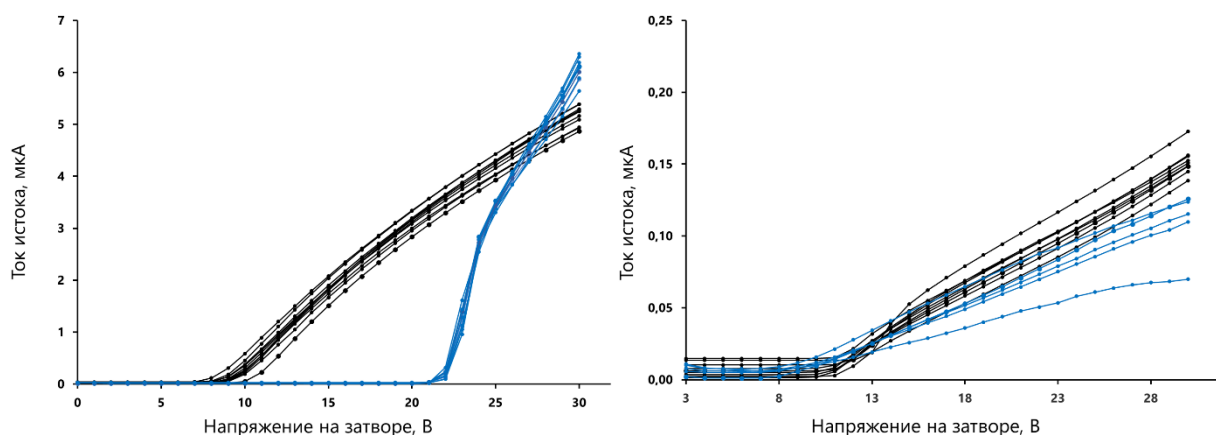


Рисунок 3.10 – Сток-затворные характеристики транзисторов на воздухе (чёрный) и в воде (синий). (А) Проволоки шириной 3 мкм; (В) Проволоки шириной 0,2 мкм.

Для 0,2 мкм микропроводок были зарегистрированы достаточно воспроизводимые сток-затворные характеристики в воздушной среде (Рис. 3.10 В, черные кривые). Среднее значение порогового напряжения, измеренного на воздухе, составило $9,56 \pm 0,72$ В. Однако при измерениях в водной среде наблюдались значительные изменения характеристик для проводок

на одном чипе: только 5 из 10 сохраняли нормальный тип вольт-амперных характеристик со средним значением порогового напряжения $8,50 \pm 0,52$ В. Остальные пять проволок демонстрировали аномальное поведение, переходя в область отрицательных значений тока. Аналогичные тенденции наблюдались для четырех различных чипов, содержащих проволоки шириной 0,2 мкм. Вероятно, данный эффект обусловлен наличием токов утечки. Таким образом, для проволок шириной 3 мкм показана достаточная воспроизводимость сток-затворных характеристик как на воздухе, так и в деионизированной воде, тогда как для проволок шириной 0,2 мкм удовлетворительная корреляция результатов наблюдалась только при измерениях в воздушной среде.

3.3.4. Исследование влияния pH раствора на сток-затворные характеристики транзистора

Величина pH оказывает существенное влияние на поверхностный заряд и, как следствие, на чувствительность анализа биосенсоров на основе полевых транзисторов. Кремниевая поверхность биосенсора покрыта тонким слоем оксида кремния, при этом в процессе окисления поверхности формируется слой силанольных групп, величины значений pK_a для которых составляют от 4,5 до 8,5 [35, 36]. В связи с чем протонирование силанольных групп происходит в кислой среде, а депротонирование – в щелочной, поэтому условия проведения анализа, включая pH раствора, оказывают существенное влияние как на состояние сенсорной поверхности, так и на эффективность ее взаимодействия с детектируемыми молекулами. В связи с этим критически важным является выбор оптимального значения или диапазона значений pH.

В качестве исследуемых растворов использовали 200 мМ буферные растворы ацетата натрия со значениями pH от 3 до 12. Выбор высокой ионной силы буферного раствора обусловлен необходимостью минимизации влияния изменений ионной силы при различных значениях pH. Увеличение значения pH приводит к смещению сток-затворных характеристик в область более высоких напряжений (Рис 3.11), что согласуется с литературными данными [37, 38, 39]. Следует отметить, что для части проволок шириной 200 нм, расположенных на одном чипе, при высоких значениях pH не наблюдалась воспроизводимость сток-затворных характеристик. Для обеспечения достоверности анализа использовали отдельные проволоки на одном чипе, обладающие наиболее повторяющимися сток-затворными характеристиками.

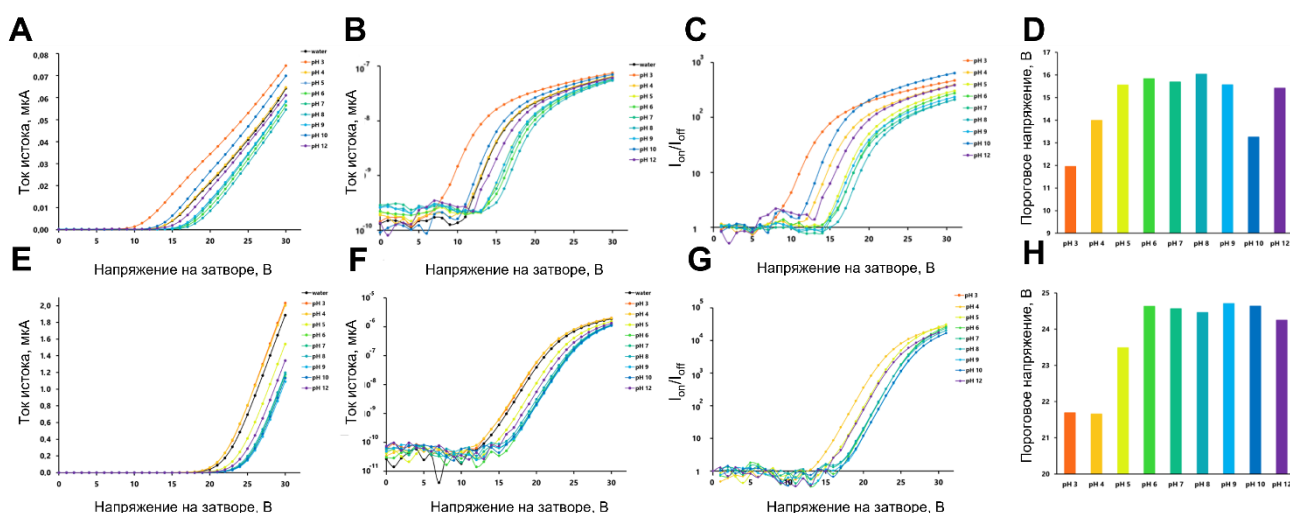


Рисунок 3.11 – Анализ сток-затворных характеристик КНИ-транзисторов в зависимости от pH раствора (200 мМ ацетат натрия). А–D) Характеристики для КНИ-транзистора шириной 0,2 мкм; Е–Н) для КНИ-транзистора шириной 3 мкм. А, Е, В, F) Сток-затворные характеристики одной микропроволоки во всем диапазоне значений pH раствора в линейном и логарифмическом масштабах. С, G) Кривые отношения токов включения (I_{on}) и выключения (I_{off}); D, H) Зависимость порогового напряжения от pH.

Анализ сток-затворных характеристик выявил существенную разницу в поведении микропроволок разной ширины. Для широких проволок (3 мкм) зафиксировано более высокое отношение токов включения (I_{on}) и выключения (I_{off}). Установлено, что во всем исследованном диапазоне pH значения I_{on}/I_{off} достигали 4600 и 30800 для проволок шириной 0,2 и 3 мкм соответственно, в связи чем использование более широких проволок предпочтительнее.

Пороговое напряжение перехода было рассчитано с использованием метода отношений [40]. Для микропроволок шириной 3 мкм зарегистрирован рост порогового напряжения с 21,7 до 24,5 В при увеличении pH с 3 до 12 (Рис. 3.11 D), причем максимальный переход находился между pH 4 и pH 6. Рассчитанная чувствительность широких микропроволок (3 мкм) в данном диапазоне составила 1,49 В/pH. Для проволок шириной 0,2 мкм аналогичное изменение pH вызывало увеличение порогового напряжения от 12,0 до 15,8 В (Рис. 3.11 H). Основные изменения наблюдались в диапазоне pH от 3 до 6. Чувствительность микропроволок шириной 0,2 мкм в данном диапазоне pH составила 0,97 В/pH. Некоторые отклонения в измерениях при pH 10-12 были обусловлены сниженной буферной емкостью раствора при этих значениях.

В некоторых случаях измерения на КНИ-транзисторе проводили при фиксированном напряжении на затворе с регистрацией тока сток-истока (I_{ds}) в момент добавления буфера. Анализ тока при напряжениях на затворе, превышающих пороговое значение в зависимости от pH, выявил обратную зависимость, представленную на рисунке 3.11 D, H.

Далее исследовали характеристики тока I_{ds} при фиксированных напряжениях на затворе. Были выбраны значения pH равные 3, при котором силанольные группы поверхности полностью протонированы и 7, при котором зависимость pH выходит на плато, а поверхность депротонирована. Для обоих типов проволок получена зависимость относительного изменения тока I_{ds} при pH 3 и 7 $\left(\frac{I_{ds}(pH\ 3) - I_{ds}(pH\ 7)}{I_{ds}(pH\ 7)} \right)$ от напряжения на затворе (Рис. 3.12).

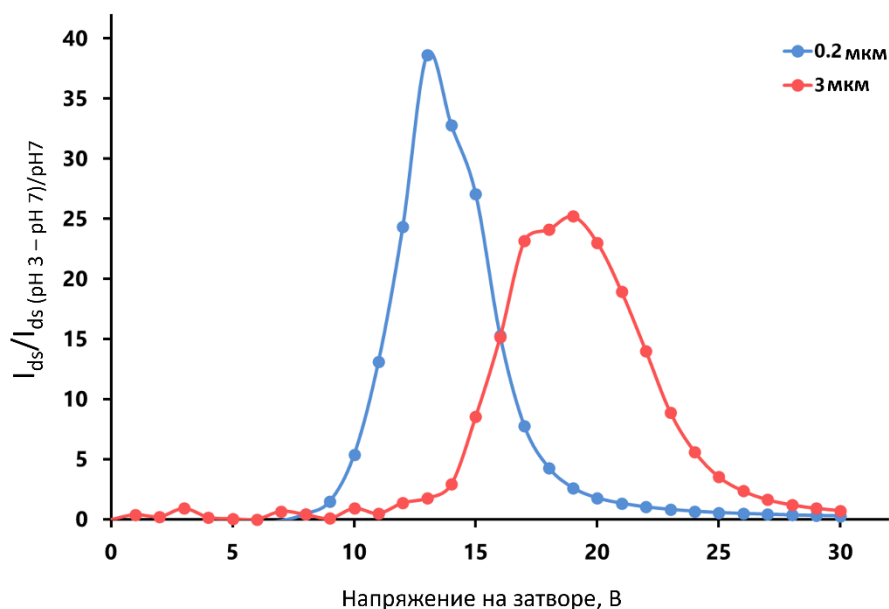


Рисунок 3.11 – Зависимость относительных изменений тока I_{ds} при pH 3 и 7 от напряжения на затворе для КНИ-транзистора 0,2 мкм (синий) и 3 мкм (красный).

Данная зависимость позволяет определить оптимальное напряжение на затворе для измерений проводимости проволок при варьировании любых влияющих на него факторов (в нашем случае – изменения pH). Величина изменения тока для различных значений pH существенно зависит от выбранного напряжения на затворе, достигая значений относительных изменений тока I_{ds} 35 и 29 при напряжениях затвора 13 В и 19 В для проволок шириной 0,2 мкм и 3 мкм соответственно. Для исследуемых проволок указанные напряжения соответствовали максимальной чувствительности к изменению pH.

3.3.5. Исследование влияния ионной силы раствора на сток-затворные характеристики транзистора

Концентрация ионов в буферном растворе является критически важным параметром в эффективности обнаружения биомолекул из-за экранирования заряда. В растворе любой заряд на поверхности сенсора притягивает противоионы, формируя двойной электрический слой, который экранирует поверхностный заряд. Эффективность экранирования заряда определяется длиной Дебая, величина которой в физиологических средах не превышает 10 нм [41]. Повышение ионной силы раствора приводит к сжатию двойного электрического слоя и длины Дебая из-за

экранирования поверхностного заряда противоионами, что снижает чувствительность биосенсора [42]. Поэтому необходимо выбрать оптимальный диапазон концентрации ионов в растворе для измерений на биосенсоре на основе полевых транзисторов.

Для изучения влияния ионной силы раствора на сток-затворные характеристики КНИ транзистора использовали водные буферные растворы ацетата натрия (рН 6.0) в диапазоне концентраций от 2 до 100 мМ. Выбор указанного диапазона концентраций обусловлен необходимостью охватить как физиологические условия (~ 150 мМ), так и области пониженной ионной силы, позволяющие максимизировать чувствительность детекции. Сравнительный анализ проводили с использованием чипов, содержащих немодифицированные проволоки шириной 3 и 0,2 мкм (Рис. 3.12). Как и в случае исследования влияния рН на сток-затворные характеристики сенсоров анализировали отдельные микропроволоки в составе одного чипа, обладающие наиболее повторяющимися сток-затворными характеристиками. Установлено, что повышение ионной силы раствора от 2 до 100 мМ вызывает положительный сдвиг порогового напряжения транзисторов с уменьшением крутизны порогового наклона. При этом сток-затворные характеристики сохраняют параллельность в пороговой области, что свидетельствует о постоянстве подвижности носителей заряда в канале полупроводника.

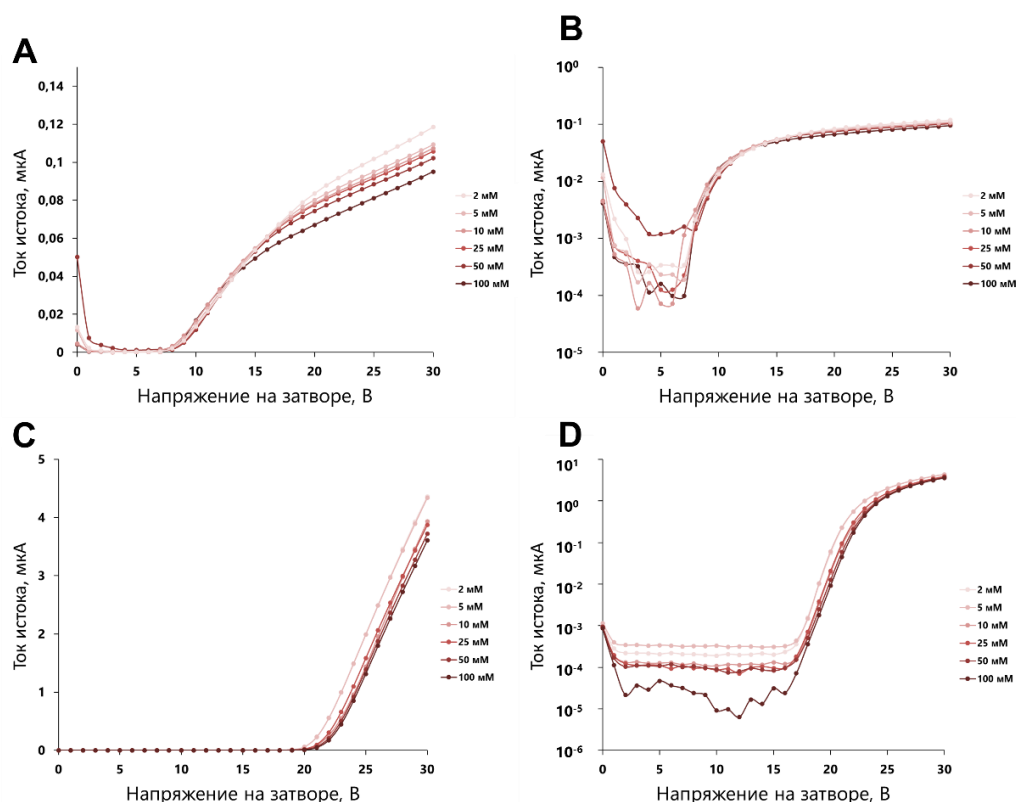


Рисунок 3.12 – Анализ сток-затворных характеристик КНИ-транзисторов в зависимости от ионной силы раствора (ацетат натрия, рН 6.0). А, В) Характеристики для КНИ-транзистора шириной 0,2 мкм; С–D) для КНИ-транзистора шириной 3 мкм. Сток-затворные характеристики одной микропроволоки во всем диапазоне значений рН раствора в линейном (А, С) и логарифмическом масштабах. (В, D).

Для микропроволок шириной 3 мкм зарегистрирован рост порогового напряжения с 21 до 24 В при увеличении ионной силы с 2 до 100 мМ. Для проволок шириной 0,2 мкм аналогичное изменение ионной силы вызывало увеличение порогового напряжения с 17 до 21 В. Влияние повышения ионной силы раствора проявляется в противоположных эффектах по отношению к увеличению рН раствора, что обусловлено уменьшением дебаевской длины экранирования с ~6,8 нм до ~0,96 нм (в соответствии с уравнением $\lambda_D = \left(\epsilon k_B \times \frac{T}{q^2 I}\right)^{1/2}$), что приводит к усилению экранирования отрицательного заряда силанольных групп поверхности кремния ионами раствора.

Представленные результаты демонстрируют важность тщательного подбора рабочих параметров раствора для повышения эффективности полупроводниковых сенсорных систем. Таким образом, оптимальными условиями для проведения анализа являются: низкосолевой буфер с концентрацией 2-10 мМ и диапазоном рН от 6 до 8, использование КНИ-транзисторов с микропроводами шириной 3 мкм. В связи с чем все дальнейшие эксперименты проводились только на чипах, содержащих 3мкм сенсоры.

3.3.6. Подбор условий модификации поверхности КНИ-транзисторов для иммобилизации олигонуклеотидных зондов

3.3.6.1. Исследование морфологии и толщины модифицированного слоя методом атомно-силовой микроскопии

Да первом этапе работы использовали кремниевые пластины в качестве аналога сенсорной поверхности КНИ-транзисторов. Исследовали три варианта модификации поверхности: с помощью бифункционального реагента карбонилдиимидазола (CDI) и модифицированных силанов: 3-глицидоксипропилтриметоксисилана (GOPTS) и 3-аминопропилтриэтоксисилана (APTES).

Для исследования морфологии и толщины модифицированного слоя на кремниевой пластине был проведен метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). Сравнительный анализ проводился по АСМ-изображениям, полученным в режиме постоянного контакта при сканировании областей размером 2×2 мкм². Для оценки локальной неоднородности поверхности был проведен анализ линейных профилей, полученных из АСМ-изображений.

На рисунке 3.13 представлен типичный линейный профиль поверхности очищенной кремниевой пластины. Величина размаха высот R_z составила 1,815 нм, что свидетельствует о высокой гладкости исходной поверхности. Значения средней шероховатости (R_a) и

среднеквадратичной шероховатости (R_q) для чистой кремниевой пластины составили 0,3057 нм и 0,4034 нм соответственно.

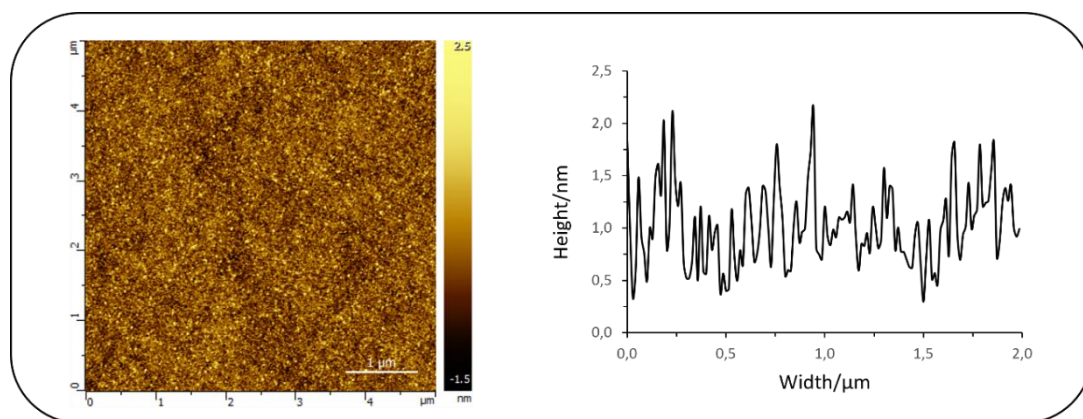


Рисунок 3. 13 – АСМ-изображение очищенной немодифицированной кремниевой пластины (слева) и линейный профиль высоты (справа).

Первый вариант активации кремниевой пластины заключался в модификации карбонилдиимидазолом (CDI), который вступает в реакцию с силанольными группами кремниевой поверхности с образованием легкодеградируемой сложноэфирной связи (Рис. 3.14 А). АСМ-анализ показал формирование однородного молекулярного слоя с низкой шероховатостью (Рис. 3.14 В).

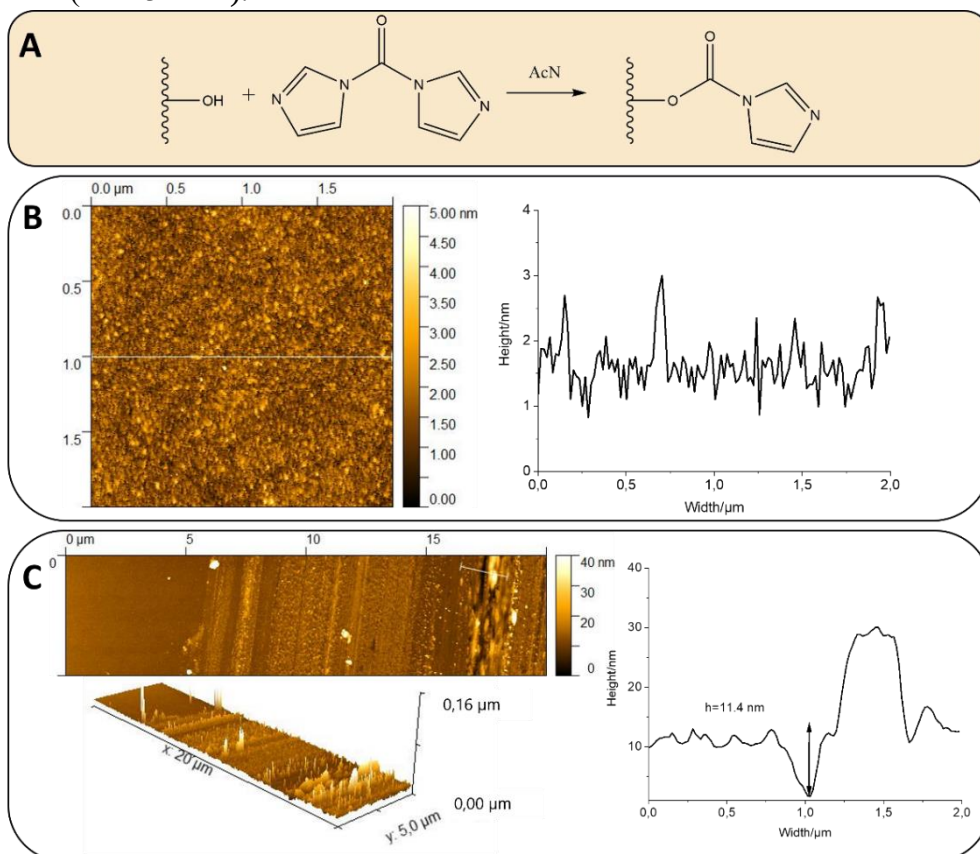


Рисунок 3. 14 – А) схема активации кремниевой поверхности с помощью CDI. В) 2D АСМ-изображение CDI-модифицированной кремниевой пластины (слева) и линейный профиль высоты (справа). С) 2D (слева сверху) и 3D (слева снизу) АСМ-изображение CDI-модифицированной кремниевой пластины со сколом и линейный профиль высоты вдоль указанной желтой линии (справа).

Для CDI-модифицированной поверхности значение R_z составило 2,191 нм, а параметры R_a и R_q – 0,2837 нм и 0,3601 нм соответственно. Для определения толщины нанесенного слоя на поверхности кремниевой пластины методом АСМ был использован механический метод скалывания с помощью скальпеля для обнажения подложки (Рис. 3.14 С). Измеренная высота ступени между поверхностью модифицированного слоя и подложкой составила 11,4 нм, что соответствует толщине нанесенного покрытия.

Второй вариант модификации поверхности основан на силанизации Si-OH-групп 3-глицидоксипропилтриметоксисиланом (GOPTS), приводящей к образованию эпоксидных функциональных групп на поверхности (Рис. 3.15 А). GOPTS-модифицированная поверхность характеризуется более высокой неоднородностью, что проявляется в увеличении размаха высот R_z до 3,787 нм. Параметры средней ($R_a = 0,3253$ нм) и среднеквадратичной ($R_q = 0,4182$ нм) шероховатости также демонстрируют рост.

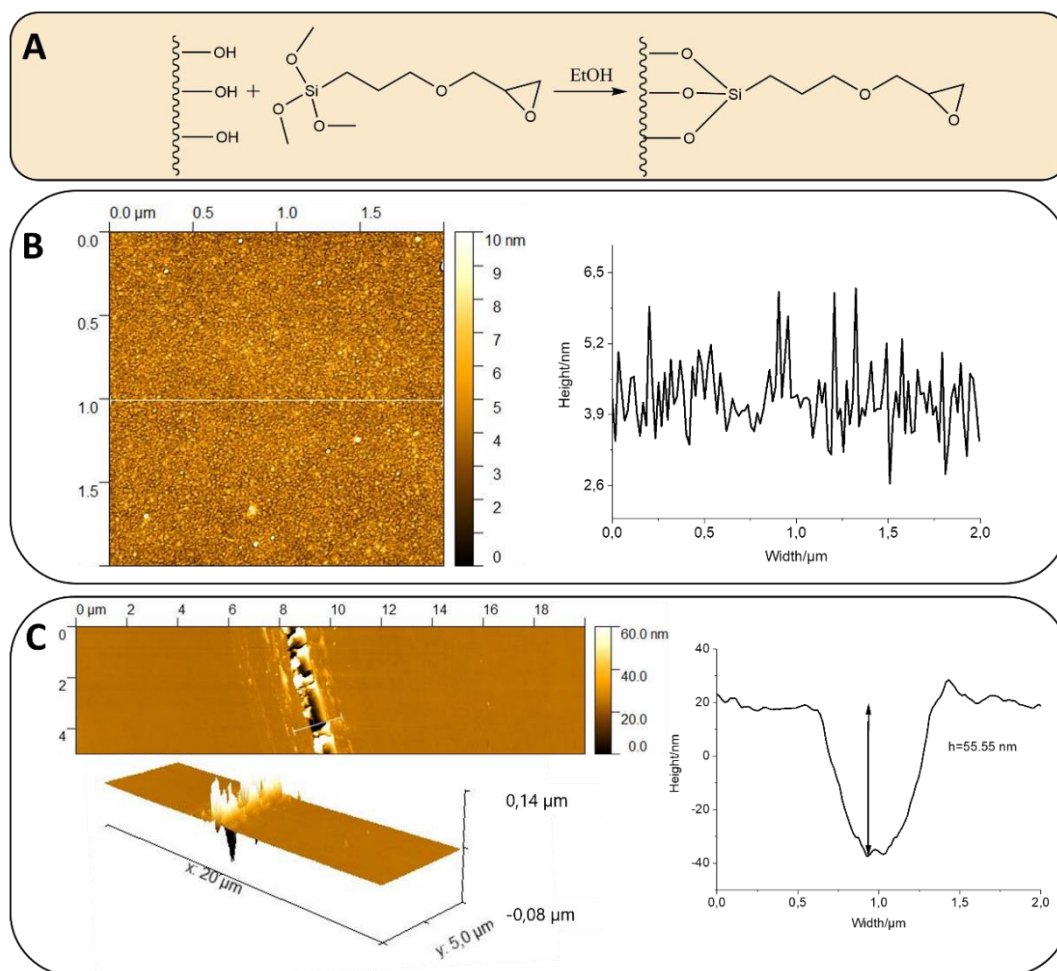


Рисунок 3. 15 – А) схема активации кремниевой поверхности с помощью GOPTS. В) 2D АСМ-изображение GOPTS-модифицированной кремниевой пластины (слева) и линейный профиль высоты (справа). С) 2D (слева сверху) и 3D (слева снизу) АСМ-изображение GOPTS-модифицированной кремниевой пластины со сколом и линейный профиль высоты вдоль указанной желтой линии (справа).

На топографии (Рис. 3.15 В) визуализируется образование преимущественно однородного слоя, однако наблюдаются точечные объекты с высоким контрастом, что свидетельствует о межмолекулярной конденсации молекул GOPTS и формированием олигомерных структур на поверхности. Измерение толщины методом механического скалывания показало, что перепад высот между поверхностью покрытия и подложкой составляет 55,55 нм (Рис. 3.14 С), что указывает на формирование не мономолекулярного покрытия, а полисилоксановного слоя.

Другим вариантом силанизации является обработка поверхности 3-аминопропилтриэтоксисиланом (APTES) с формированием аминогрупп на поверхности кремниевой пластины (Рис. 3.15 А). Поверхность, модифицированная APTES, демонстрирует принципиально иную морфологию по сравнению с образцами, обработанными CDI и GOPTS (Рис. 3.15 В).

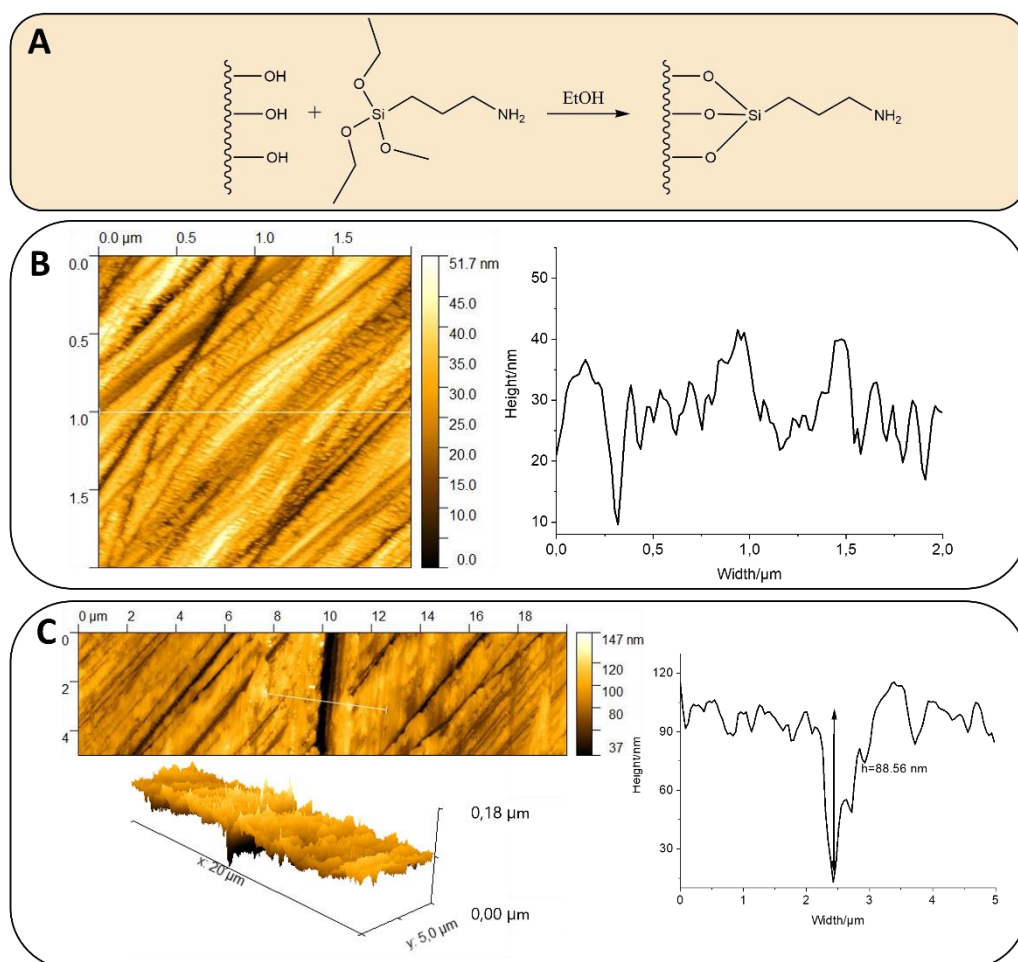


Рисунок 3. 16 – А) схема активации кремниевой поверхности с помощью APTES. В) 2D АСМ-изображение APTES-модифицированной кремниевой пластины (слева) и линейный профиль высоты (справа). С) 2D (слева сверху) и 3D (слева снизу) АСМ-изображение APTES-модифицированной кремниевой пластины со сколом и линейный профиль высоты вдоль указанной желтой линии (справа).

Количественный анализ шероховатости выявил формирование высоконеоднородного слоя: средняя шероховатость (R_a) составила 2,345 нм, среднеквадратичная шероховатость (R_q) — 2,915 нм, а размах высот (R_z) достиг 20,38 нм. Ключевым фактором, определяющим морфологию,

является способность APTES к интенсивной межмолекулярной поликонденсации [43]. Измеренная методом механического скалывания толщина слоя составила 88,56 нм (Рис. 3.15 С), что однозначно указывает на формирование не мономолекулярного покрытия, а плотного поперечно-сшитого полисилоксанового слоя с выраженной трехмерной архитектурой. В связи с чем применения данного модификатора для анализа на КНИ-биосенсоре не представляется возможным и для дальнейших исследований использовали модификацию поверхности с помощью CDI и GOPTS.

Важным параметром выбора в качестве модифицирующих поверхность агентов CDI и GOPTS помимо их однородного покрытия является возможность исключения блокировки поверхности благодаря их способности к самопроизвольному гидролизу. В случае GOPTS гидролитическому раскрытию подвергается эпоксидная группа. В свою очередь, CDI-модификация является обратимой: в ходе гидролиза происходит удаление имидазольного фрагмента и образование гидроксильной группы, что обеспечивает регенерацию поверхности.

3.3.6.2. Оптимизация параметров иммобилизации аминосодержащих олигонуклеотидных зондов

Иммобилизацию аминосодержащих олигонуклеотидных зондов осуществляли на CDI- и GOPTS-модифицированные поверхности стеклянных слайдов (Рис.3.16).

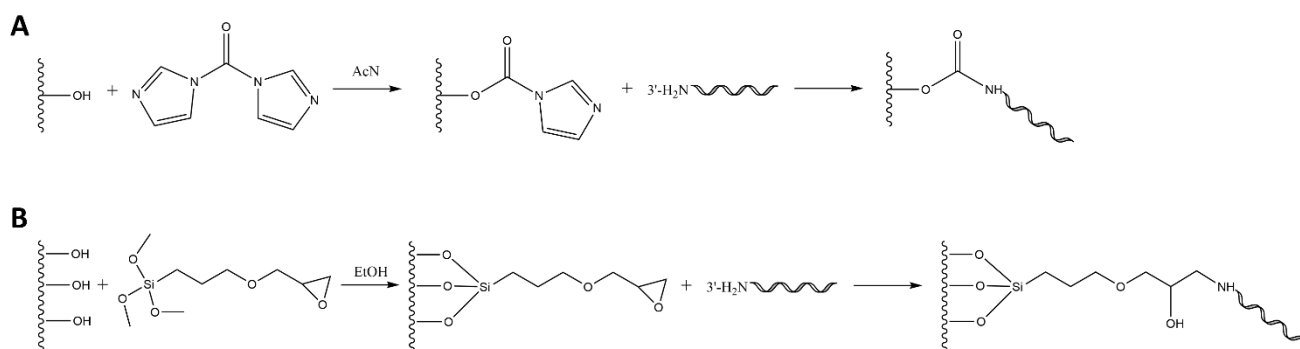


Рисунок 3.16 – Схема модификации стеклянной поверхности и иммобилизации олигонуклеотидных зондов с помощью CDI (A) и GOPTS (B).

Эффективность иммобилизации аминосодержащих олигонуклеотидных зондов на модифицированную SiO₂ поверхность оценивали флуориметрически, используя в качестве модельного зонда 17-звенный олигонуклеотид, меченный на 3'-конце красителем TAMRA и содержащий на 5'-конце аминогруппу (Таблица. 2.4 №10). Ковалентная иммобилизация зонда на модифицированной поверхности, происходящая по механизму нуклеофильного замещения и/или присоединения-отщепления с участием непротонированной аминогруппы (pK_a = 10,64), критически зависит от pH среды. С целью определения оптимальных условий иммобилизации проведен сравнительный анализ влияния буферных систем (50 мМ боратный буфер, pH 8.0/9.0;

50 мМ карбонатный буфер, pH 9.2/10.4) на эффективность связывания модельного зонда в диапазоне концентраций 10^{-6} – 10^{-8} М на поверхностях, модифицированных CDI и GOPTS (Рис. 3.17).

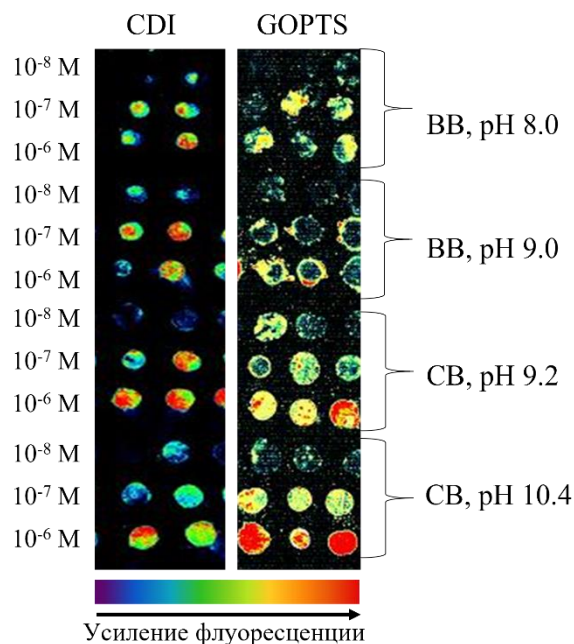


Рисунок 3.17 – Сравнительный анализ эффективности иммобилизации олигонуклеотида Z-CNTRL на CDI и GOPTS активированных слайдах в зависимости от состава и pH буферного раствора.

Анализ полученных данных демонстрирует, что максимальная эффективность иммобилизации олигонуклеотида наблюдается в карбонатном буфере при pH 9.2–10.4. Данное явление объясняется увеличением в щелочной среде доли непротонированной формы аминогруппы, обладающей высокой нуклеофильной активностью. Успешная иммобилизация зонда наблюдается как на GOPTS-, так и на CDI-модифицированных поверхностях. Ключевое различие заключается в качестве флуоресцентного сигнала: для CDI-поверхности характерен минимальный фоновый шум, в отличие от GOPTS-модифицированной, при этом на GOPTS-слайдах при высоких значениях pH наблюдается улучшение однородности сигнала (снижение шума) интенсивности флуоресценции. Для CDI-покрытия не выявлено выраженной зависимости интенсивности сигнала от pH, что свидетельствует о стабильности процесса иммобилизации в данном диапазоне. На основании проведенного анализа для последующих экспериментов в качестве оптимальной среды был выбран 50 мМ карбонатный буфер с pH 10.4.

3.3.7. Гетерофазный гибридационный анализ нуклеиновых кислот на стеклянных слайдах

Как уже было сказано ранее, для биосенсоров на основе полевых транзисторов критически важно проводить анализ низкосолевых (≤ 10 мМ) или вовсе бессолевых (деионизованная вода) условиях с целью увеличения длины дебаевского радиуса. В связи с чем применение

фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов (Рис. 3.18), способных образовывать дуплексы с нуклеиновыми кислотами в данных условиях, может привести к увеличению чувствительности и специфичности анализа на КНИ-биосенсоре.

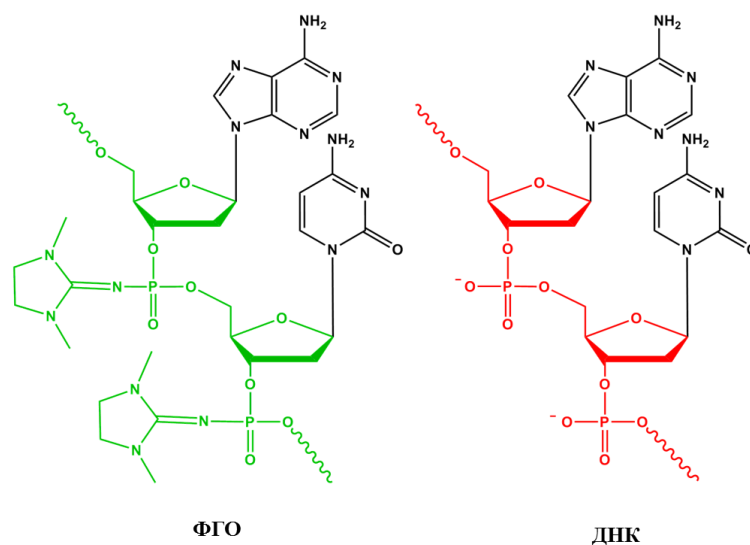


Рисунок 3.18 – структуры фосфорилгуанидинового и нативного олигодезоксирибонуклеотида.

Возможность гетерофазного гибридационного анализа на КНИ-биосенсоре исследовали на двух модельных системах. Первая система представляла собой мРНК, кодирующую белок тропонин I человека (233 нт), ассоциированного с инфарктом миокарда. Для неё была синтезирована короткая (35 нт) ДНК-мишень М-TN (Таблица 2.4 №1), соответствующая линейному участку вторичной структуры данной мРНК (Рис. 3.19). В качестве зондов использовали синтезированные ДНК- (Z-TN) и ФГ- зонды (ZF-TN*) длиной 21 нуклеотид (Таблица 2.4 №2-3).

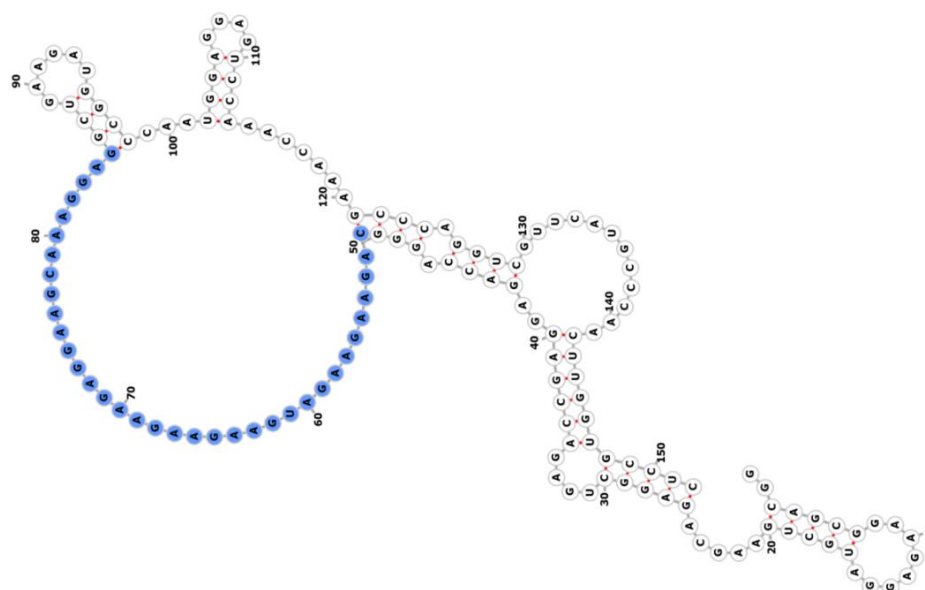


Рисунок 3.19 – Вторичная структура мРНК тропонина I, предсказанная с помощью программы RNAstructure. Участок, обозначенный синим цветом, соответствует синтезированной мишени М-TN.

Вторая модельная система представляла собой структурированный фрагмент 18S рРНК человека (558 нт) (Рис. 3.20). В качестве зондов был синтезирован набор олигонуклеотидов, комплементарных трем различным участкам 18S рРНК: два 22-звенных и один 19-звенный ДНК- и ФГ-зонды (Таблица 2.4 №4-9).

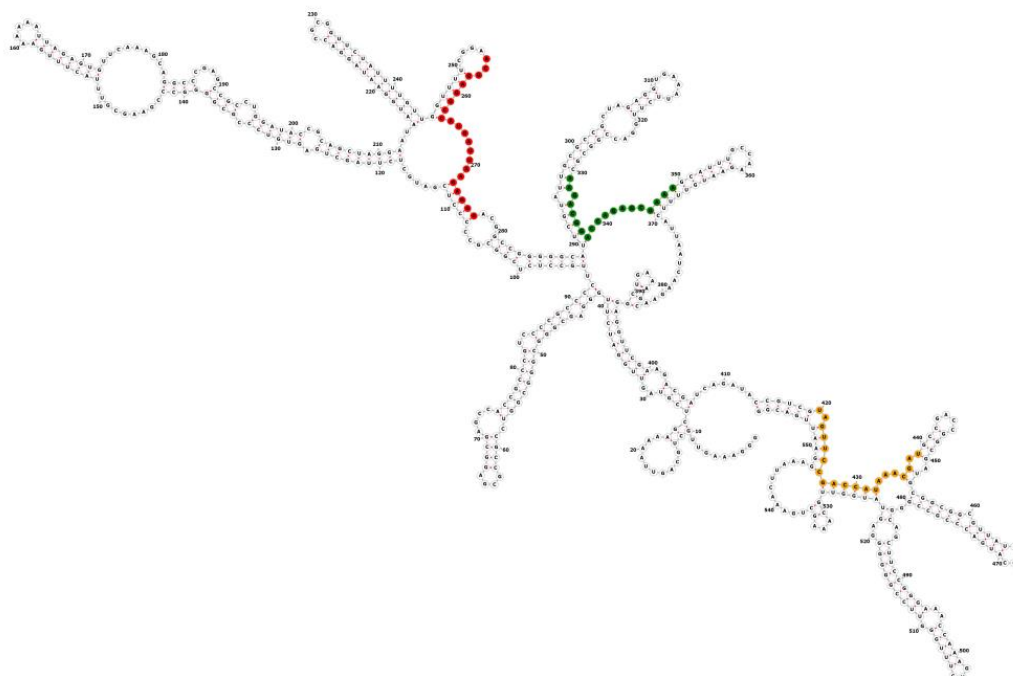


Рисунок 3.20 – Вторичная структура фрагмента 18S рРНК с указанием сайтов связывания ДНК- и ФГ-зондов. Участки, комплементарные синтезируемым зондам: оранжевый – Z₁F-18S*/ Z₁-18S; красный – Z₂F-18S*/ Z₂-18S, зеленый – Z₃F-18S*/ Z₃-18S. Изображение построено с использованием программы RNAstructure.

Для первой системы была исследована способность олигонуклеотидных зондов Z-TN и ZF-TN* образовывать дуплексы с ДНК-мишенью М-TN в низкосолевых (10 мМ фосфатный буфер, pH 7.4) и бессолевых (деионизованная вода) условиях методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. Полученные данные представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Температуры плавления гибридизационных комплексов с ДНК-мишенью в деионизованной воде и 10 мМ фосфатном буфере.

Вода, MQ			10 мМ РВ, pH 7.4		
Зонд	Мишень	T _{пл} , °C	Зонд	Мишень	T _{пл} , °C
Z-TN	М-TN	24.1	Z-TN	М-TN	41.1
ZF-TN*	М-TN	50.1	ZF-TN*	М-TN	55.3

Результаты термической денатурации демонстрируют зависимость температуры плавления дуплексов от химической структуры зондов: в деионизованной воде для комплекса с ДНК-зондом характерна более низкая температура плавления, чем в случае ФГ-зонда. В условиях гомофазной гибридизации при комнатной температуре лишь половина ДНК-зондов будет

образовывать комплексы с мишенью, тогда при переходе в гетерофазные условия эта доля будет еще меньше, что невозможно для эффективного анализа на КНИ-биосенсоре. Таким образом, детекция анализируемой мишени с использованием ФГ-зондов может быть реализована как в 10 мМ фосфатном буфере (РВ), так и в деионизованной воде, в то время как применение ДНК-зондов может быть эффективно только в низкосолевых условиях.

С целью изучения образования дуплексов при гетерофазном анализе на модифицированные стеклянные слайды иммобилизовали аминокислотсодержащие олигонуклеотидные зонды Z-TN и ZF-TN* в интервале концентраций 10^{-6} – 10^{-7} М в оптимальных условиях (50 мМ карбонатный буфер, pH 10.4). На следующем этапе осуществляли гибридизацию с 10^{-6} М флуоресцентно-меченой мишенью М-TN, содержащей на 3'-конце флуорофор TAMRA, в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7.4. Оценку эффективности гибридизационного анализа проводили с использованием конфокального сканера Perkin Elmer ScanArray Express по интенсивности флуоресцентного сигнала мишени. Важно отметить, что детекция флуоресцентного сигнала возможна исключительно при условии успешного образования специфического гибридизационного комплекса между зондом и мишенью (Рис. 3.21).

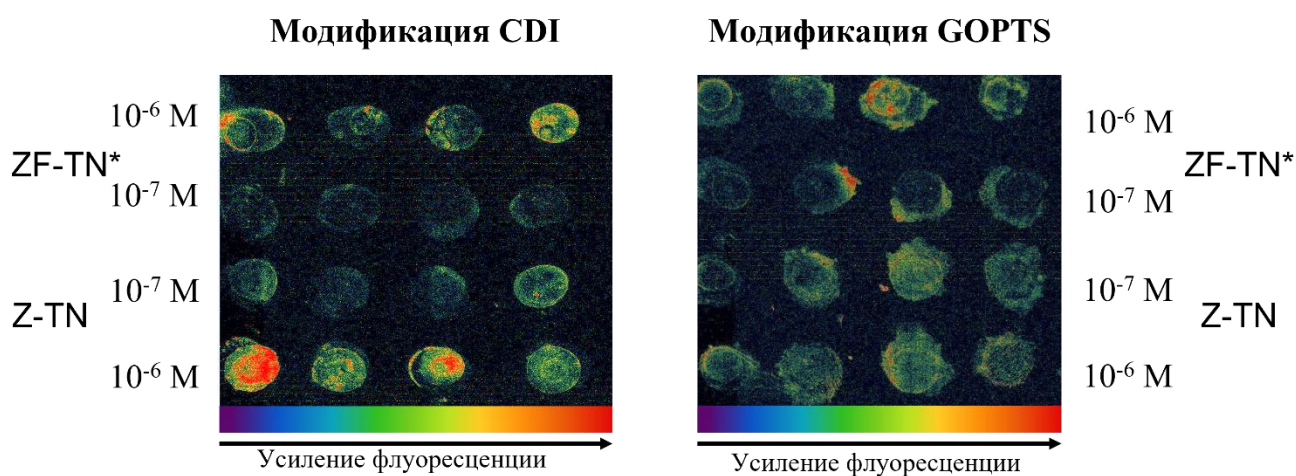


Рисунок 3.21 – Изображения сканированных стекол после гибридизации с флуоресцентно-меченой мишенью на CDI- и GOPTS-модифицированной поверхностях.

Флуоресцентный сигнал детектируется, как на CDI-, так и на GOPTS-модифицированных слайдах с иммобилизованными зондами. Регистрация флуоресцентного сигнала исключительно в зонах иммобилизации олигонуклеотидных зондов подтверждает низкий уровень неспецифической сорбции на поверхности. Данный факт позволяет исключить стадию экпирования поверхности, что представляет существенное технологическое преимущество при адаптации методики для КНИ-транзисторов.

Таким образом, для поверхностей диоксида кремния были оптимизированы условия проведения иммобилизации олигонуклеотидных зондов и последующей гибридизации с модельными нуклеиновыми кислотами. Установлено, что максимальная эффективность иммобилизации как ДНК, так и ФГ-зондов достигается в 50 мМ карбонатном буфере при pH 10.4. Доказана возможность образования гибридизационных комплексов в гетерофазной системе с использованием обоих типов зондов в условиях низкой ионной силы. Для последующих исследований гетерофазной гибридизации на КНИ-транзисторах в качестве рабочей была выбрана концентрация зондов 10^{-6} М.

3.3.8. Гетерофазный гибридизационный анализ нуклеиновых кислот на КНИ-биосенсоре

На следующем этапе исследования оптимизированные методы модификации и иммобилизации, апробированные на кремниевых пластинах и стеклянных слайдах, были адаптированы для КНИ-биосенсора. Модификацию поверхности сенсора осуществляли также с использованием активирующих агентов GOPTS и CDI. Далее на поверхность кремниевого кристалла иммобилизовали по 1 мкл 10^{-6} М аминокислотных олигонуклеотидных зондов (ДНК и ФГ), при этом часть проволок оставалась пустыми для формирования контрольных зон. На рисунке 3.22 В области иммобилизации обозначены красным и зеленым цветами, оставшиеся проволоки служат в качестве контроля. Расположение зон иммобилизации может быть различным, главное, чтобы они не перекрывались.

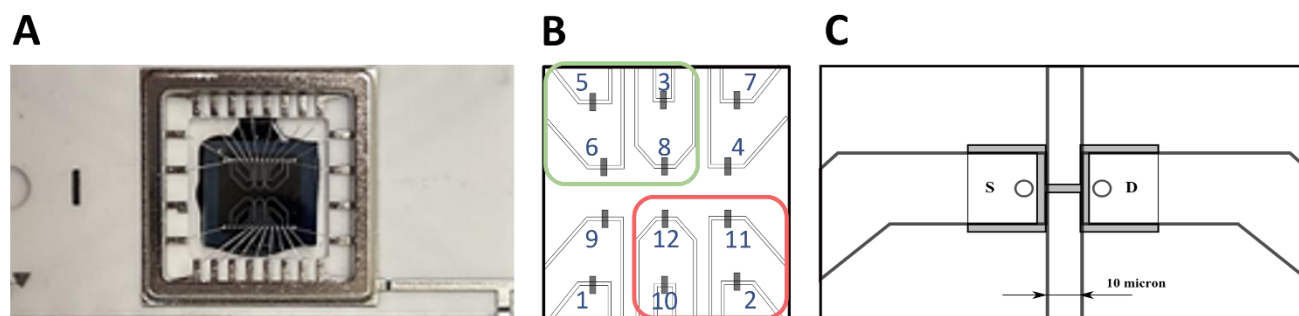


Рисунок 3.22 – А) Вид готового чипа для КНИ-биосенсора. В) Структура транзистора из 12 индивидуальных сенсоров, номерами обозначены сенсоры (проволоки). С) Структура отдельного сенсорного элемента.

Для детекции нуклеиновых кислот с помощью КНИ-биосенсора регистрировали вольт-амперные характеристики (ВАХ) каждого сенсора-проволоки. Измерения проводили в 10мМ фосфатном буфере (РВ), pH 7.4 в минимум в трех повторностях в режиме развертки напряжения №1 (от 0 до 30 В с шагом 1 В). Затем на сенсорную поверхность КНИ-транзистора добавляли комплементарную мишень и повторно записывали ВАХ не менее трех раз, либо переключали на режим измерений при постоянном напряжении №2 для детекции отклика биосенсора на добавление мишени в реальном времени.

При работе в режиме №2 на сенсорную поверхность наносили по 2 мкл РВ для стабилизации отклика биосенсора, далее наносили по 3 мкл мишени в диапазоне концентраций 10^{-20} – 10^{-7} М так, чтобы зона нанесения охватывала все проволоки для оценки чувствительности анализа. Инкубировали в течение 30 минут, а затем переходили в режим развертки напряжения №1 с последующей записью ВАХ каждой проволоки и математической обработкой полученных данных. На всех представленных графиках продемонстрированы усредненные результаты измерений с погрешностями.

3.3.8.1. Анализ специфического сигнала при связывании с мишенью

Первоначальный этап работы на КНИ-биосенсоре включал исследование возможности формирования специфических гибридизационных комплексов между анализируемой мишенью и зондами, иммобилизованными на микропроводах. Для обеспечения специфичности анализа и предотвращения возможного растекания ДНК-зонда контрольные проволоки были блокированы этаноламином. В результате на кристалле биосенсора содержались проволоки с ДНК-зондами и контрольные, модифицированные этаноламином, проволоки. На рисунке 3.23 представлены ВАХ проволок до и после гибридизации с 18S рРНК-мишенью.

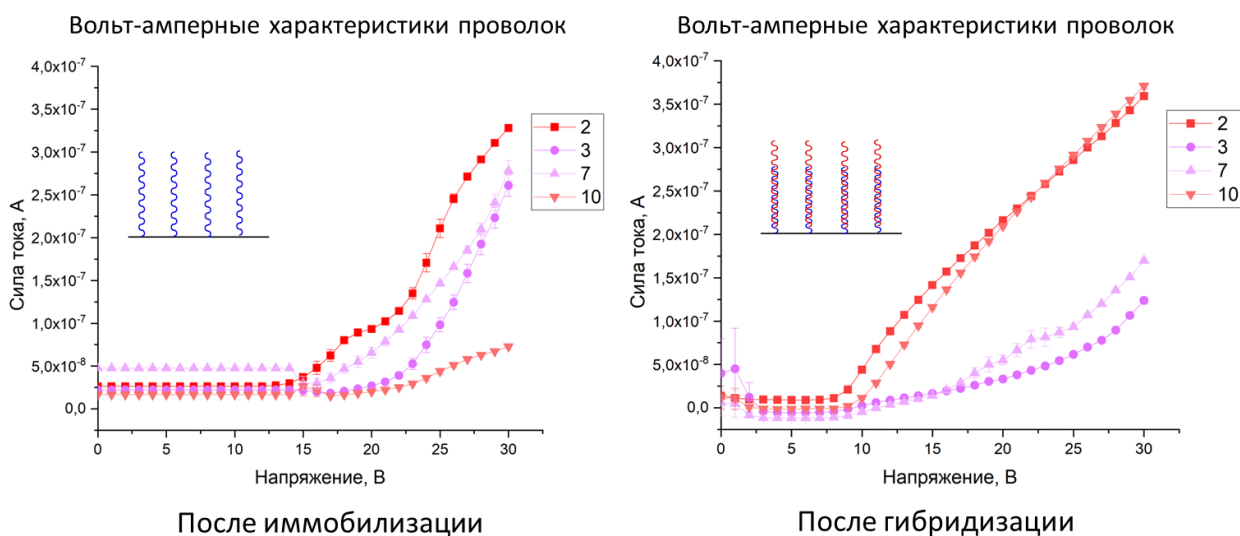


Рисунок 3.23 – Вольт-амперные характеристики CDI-модифицированных кремниевых проволок КНИ-биосенсора, содержащих ДНК-зонды (2, 10 – красные) и модифицированных этаноламином (3, 7 – сиреневые) в качестве контроля до (слева) и после (справа) гибридизации.

При гибридизации с целевой РНК-мишенью наблюдается смещение показателей силы тока, что обусловлено изменением поверхностного заряда проволок. При проведении измерений ВАХ после иммобилизации ДНК-зондов и после гибридизации с мишенью показано, что значения порогового напряжения для проволок с иммобилизованными ДНК-зондами составляют 14 и 19 В (для проволок № 2 и 10 соответственно), тогда как после образования гибридизационных дуплексов с рРНК наблюдается смещение пороговых значений до 8 В. При

этом наблюдается увеличение значений силы тока на проволоках, содержащих специфический ДНК-зонд, относительно контрольных проволок, что подтверждает регистрацию специфического отклика при образовании гибридных комплексов на поверхности КНИ-биосенсора.

3.3.8.2. Влияние модификации поверхности при гетерофазном гибридном анализе на КНИ-биосенсоре

На следующем этапе была проведена оценка влияния функционализации сенсорной поверхности на эффективность детекции. На рисунке 3.24 представлены вольт-амперные характеристики проволок КНИ-биосенсора с иммобилизованными ДНК-зондами до и после образования комплексов с синтетической ДНК-мишенью М-ТН. При образовании специфических дуплексов также наблюдается смещение ВАХ.

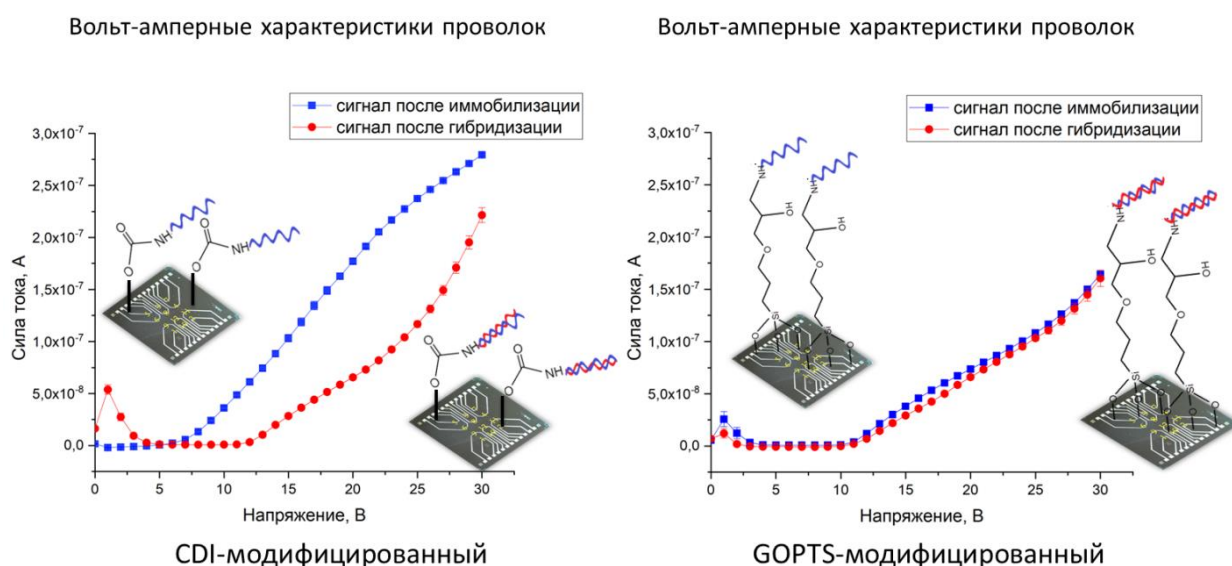


Рисунок 3.24 – Сравнительный анализ ВАХ проволок с иммобилизованными ДНК-зондами на CDI- и GOPTS-модифицированной поверхности КНИ-биосенсора.

При анализе полученных графиков показано выраженное смещение порогового напряжения на CDI-модифицированном чипе с 5 до 11 В при гибридизации с ДНК-мишенью, в то время как на GOPTS-модифицированной поверхности статистически значимых изменений не наблюдается, что может быть обусловлено разницей в длине линкерных молекул: расчетный дебаевский радиус в условиях эксперимента составляет порядка 10 нм, однако протяженность линкера в случае GOPTS-модификации превышает данное значение, что препятствует эффективной детекции. В связи с этим последующие исследования были проведены с использованием активирующего агента CDI.

3.3.8.4. Влияние длины детектируемой мишени на отклик КНИ-биосенсора

Следующим этапом исследования стала оценка эффективности отклика КНИ-биосенсора в зависимости от длины детектируемой нуклеиновой кислоты, что критически важно для возможности детекции структурированных природных НК. Исследование эффективности обнаружения структурированных НК проводили на модельной 18S рРНК в качестве мишени в сравнении с короткой ДНК-мишенью М-TN. На рисунке 3.25 представлена зависимость индуцируемого тока в каналах кремниевых проволок до и после гибридизации с ДНК-мишенью М-TN, на рисунке 3.26 – со структурированной 18S рРНК-мишенью.

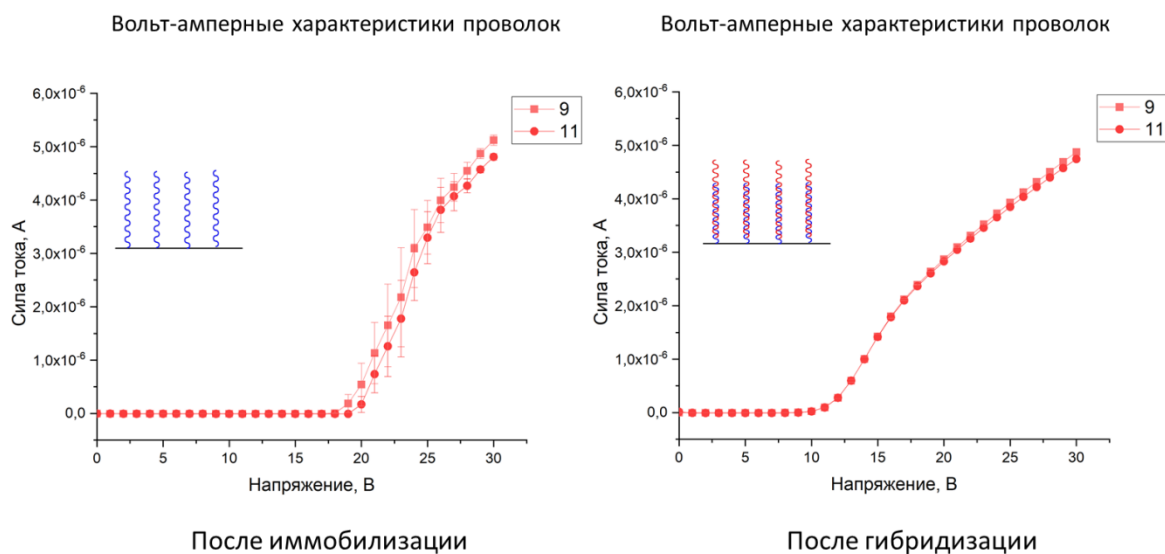


Рисунок 3.25 – ВАХ проволок с иммобилизованными зондами на CDI-модифицированной поверхности КНИ-биосенсора до (слева) и после (справа) гибридизации с ДНК-мишенью М-TN.

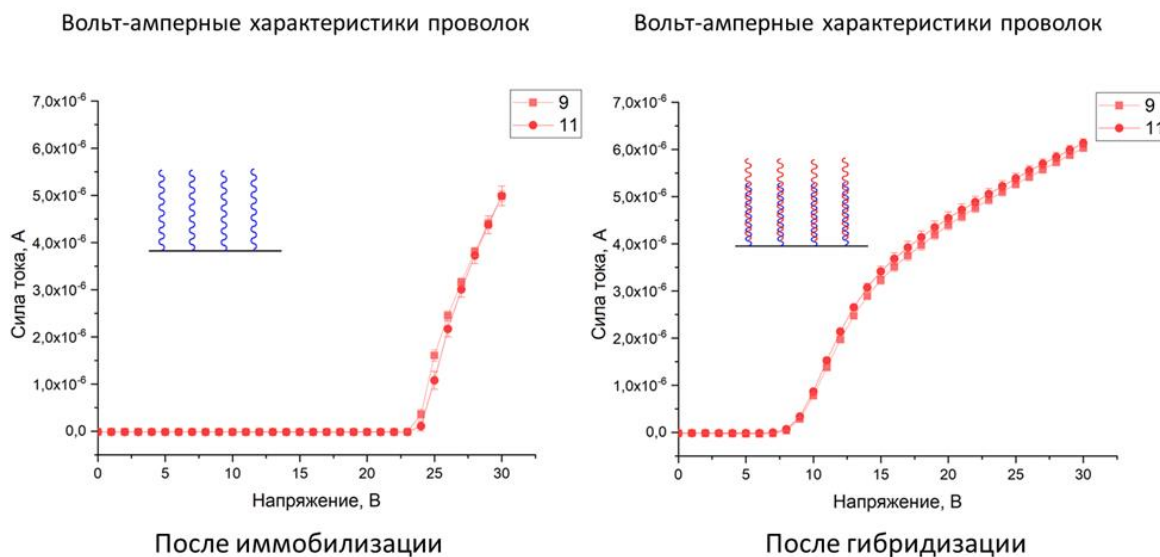


Рисунок 3.26 – ВАХ проволок с иммобилизованными зондами на CDI-модифицированной поверхности КНИ-биосенсора до (слева) и после (справа) гибридизации с 18S рРНК-мишенью.

На представленных графиках ВАХ показано, что после гибридизации с короткой ДНК-мишенью наблюдается смещение значения порогового напряжения с 19 до 9 В, а после гибридизации с протяженной структурированной 18S рРНК-мишенью – с 27 до 9 В. Увеличение амплитуды изменения сигнала при гибридизации с протяженной мишенью по сравнению с короткой обусловлено накоплением большего отрицательного заряда на поверхности КНИ-транзистора, что способствует более чувствительной детекции.

На рисунке 2.27 представлены рассчитанные параметры изменения силы тока после гибридизации с НК-мишенью по отношению сигналу после иммобилизации зондов. Рассчитанные значения изменения силы тока определяли как разность между сигналом после образования гибридизационного комплекса и сигналом после иммобилизации зондов ($\Delta I = I_{\text{комплекс}} - I_{\text{зонд}}$).

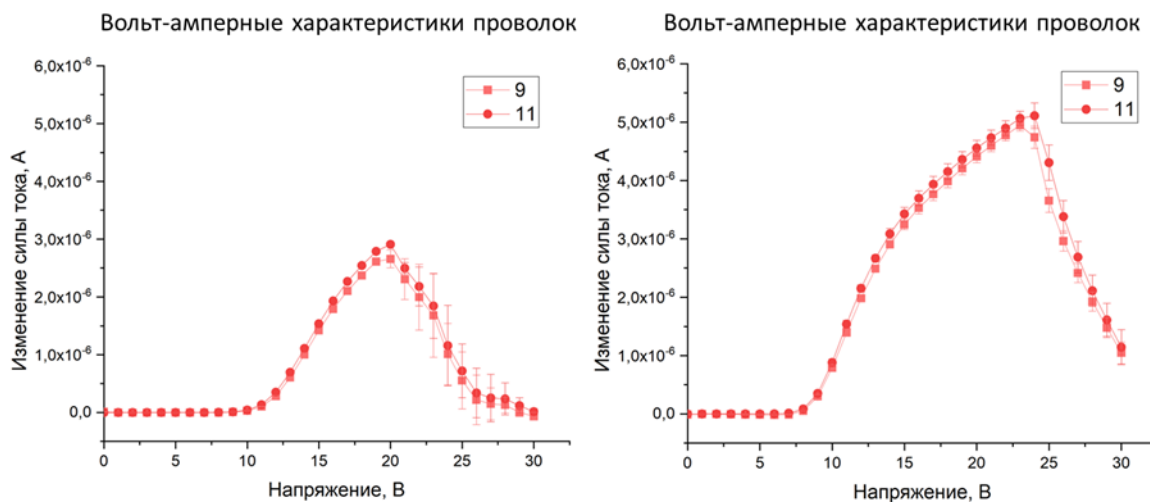


Рисунок 3.27 – Изменение силы тока КНИ-транзистора на CDI-модифицированной поверхности в процессе гибридизации с короткой ДНК-мишенью М-TN (слева) и протяженной 18S рРНК-мишенью (справа).

Сравнительный анализ отклика КНИ-транзистора при детекции короткой ДНК- и протяженной РНК-мишеней показал, что при увеличении длины мишени происходит смещение максимума отклика сенсора с 19 до 24 В со значительным увеличением силы тока. Полученные значения максимального изменения силы тока на проволоке №9 составили $(2,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$ А для короткой ДНК-мишени и $(4,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$ А для протяженной рРНК-мишени. Рассчитанные значения изменения силы тока после добавления матрицы относительно сигнала после иммобилизации зондов для протяженной мишени выше почти в 2 раза. Таким образом, для получения высокого и достоверного сигнала на КНИ-транзисторе выявление протяженных нуклеотидных маркеров предпочтительнее. Все последующие анализы проводили с использованием протяженной структурированной 18S рРНК-мишени.

3.3.8.5. Влияние структуры зонда на эффективность выявления мишени

Как было сказано ранее, применение электронейтральных ФГ-зондов способствует повышению чувствительности анализа на КНИ-биосенсоре благодаря снижению поверхностного заряда сенсора. Проведен сравнительный анализ эффективности гетерофазной гибридизации с использованием нативных олигонуклеотидов и их ФГ-аналогов в качестве специфических зондов. На рисунке 3.28 представлены ВАХ проволочек КНИ-биосенсора с иммобилизованными ДНК- (красные проволочки № 11,12) и ФГ-зондами (зеленые проволочки № 6,8) до и после гибридизации с 18S рРНК-мишенью.

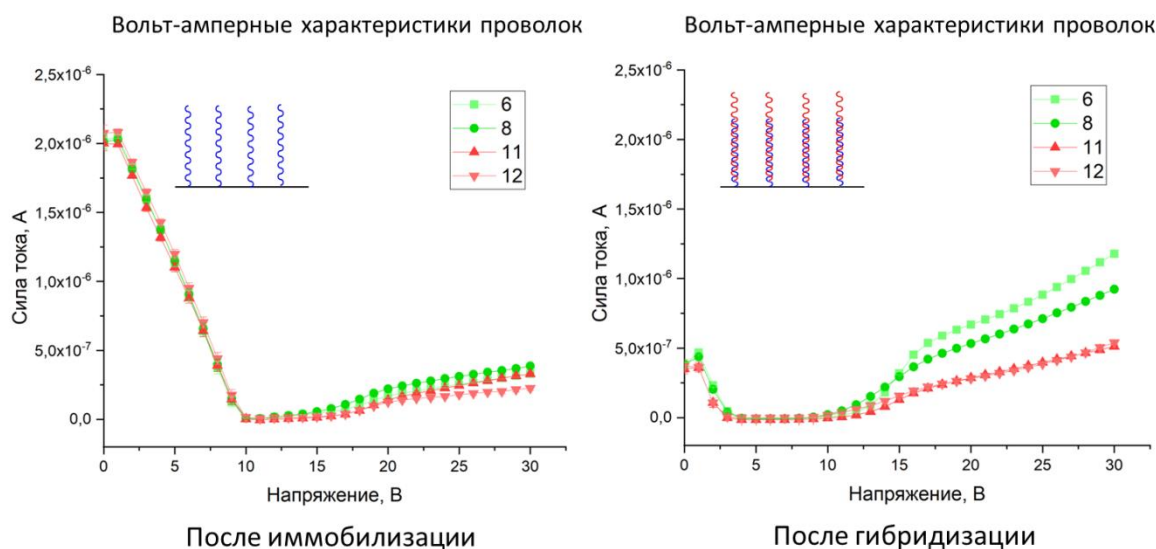


Рисунок 3.28 – ВАХ проволочек с иммобилизованными ДНК- (красные) и ФГ-зондами (зеленые) на CDI-модифицированной поверхности КНИ-биосенсора до (слева) и после (справа) гибридизации с 18S рРНК-мишенью.

Формировании гибридизационного комплекса с рРНК-мишенью сопровождается смещением значений порогового напряжения с 15 до 10 В для обоих типов зондов (ДНК, ФГ). При этом ФГ-модифицированные проволочки характеризуются более высокими значениями силы тока по сравнению с ДНК-модифицированными, что обусловлено электронейтральной природой фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения ФГ-олигонуклеотидов в качестве иммобилизованных зондов для повышения эффективности анализа нуклеиновых кислот с помощью КНИ-биосенсора и все дальнейшие эксперименты проводили с использованием ФГ-зондов.

3.3.8.6. Исследование специфичности отклика КНИ-биосенсора

На следующем этапе проведена оценка специфичности связывания иммобилизованных зондов с целевой мишенью на КНИ-биосенсоре. Сравнительный анализ включал регистрацию отклика проволочек, содержащих специфический зонд, и контрольных проволочек после добавления анализируемой рРНК-мишени. Были рассчитаны изменения силы тока ($\Delta I = I_{\text{комплекс}} - I_{\text{зонд}}$) при

пороговых значениях напряжения, определенных при анализе ВАХ проволок после иммобилизации зондов. Показано, что значения изменения силы тока на проволоках с ФГ-зондами лежат в области положительных значений, в то время как контрольные проволоки – в отрицательной (Рис.3.29).

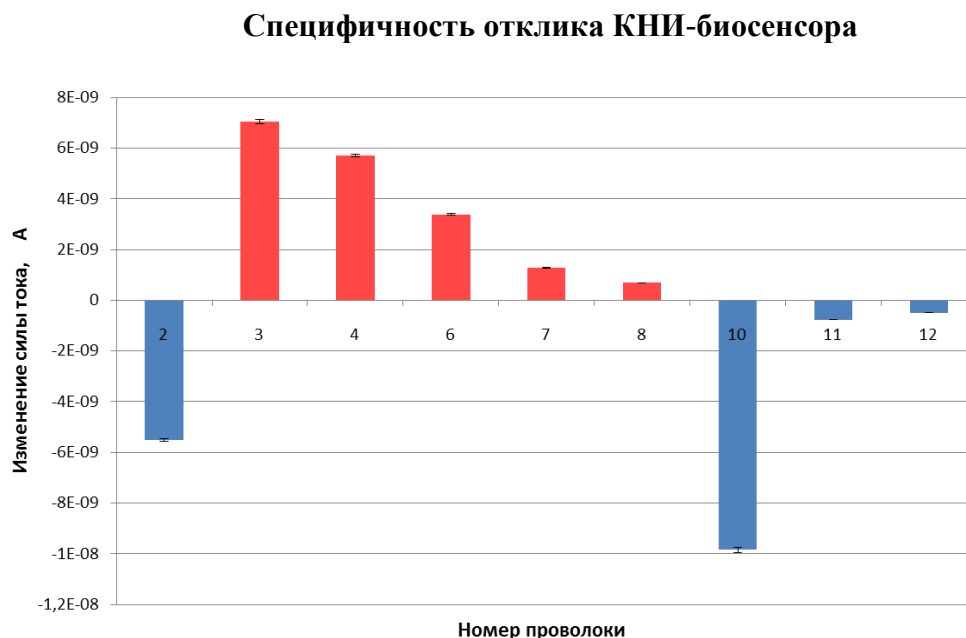


Рисунок 3.29 – Зависимость изменения силы тока от модификации проволок. Красным цветом обозначены проволоки с иммобилизованным ФГ-зондом, синим цветом - контрольные.

3.3.8.7. Определение чувствительности анализа на КНИ-биосенсоре

Согласно литературным данным, для биосенсоров на основе полевых транзисторов чувствительность анализа может достигать аттомолярных концентраций аналита [44, 45]. Исследование чувствительности КНИ-биосенсора проводили при регистрации отклика сенсора на пороговых значениях напряжения в режиме реального времени. Так, при добавлении 18S рРНК-мишени наблюдается резкое увеличение значений силы тока на проволоках с иммобилизованными ФГ-зондами (Рис. 3.30).

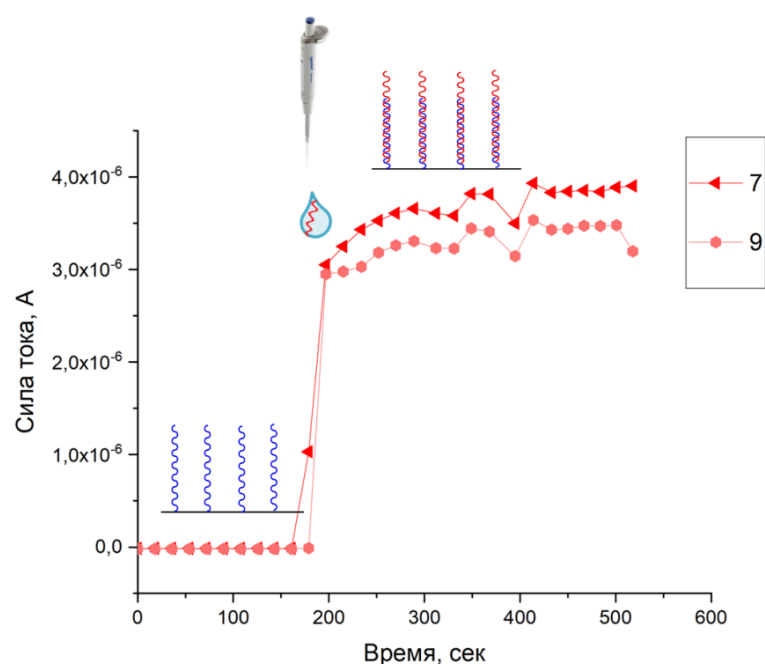


Рисунок 3.30 – Отклик КНИ-транзистора при добавлении 18S рРНК-мишени (10^{-7} М) на CDI-модифицированную сенсорную поверхность.

Для определения предела обнаружения КНИ-биосенсора в режиме реального времени на CDI-модифицированную кремниевую поверхность, содержащую проволоки с иммобилизованными ФГ-зондами и контрольные проволоки, наносили по 3 мкл протяженной рРНК-мишени в диапазоне концентраций 10^{-20} – 10^{-7} М (Рис. 3.31).

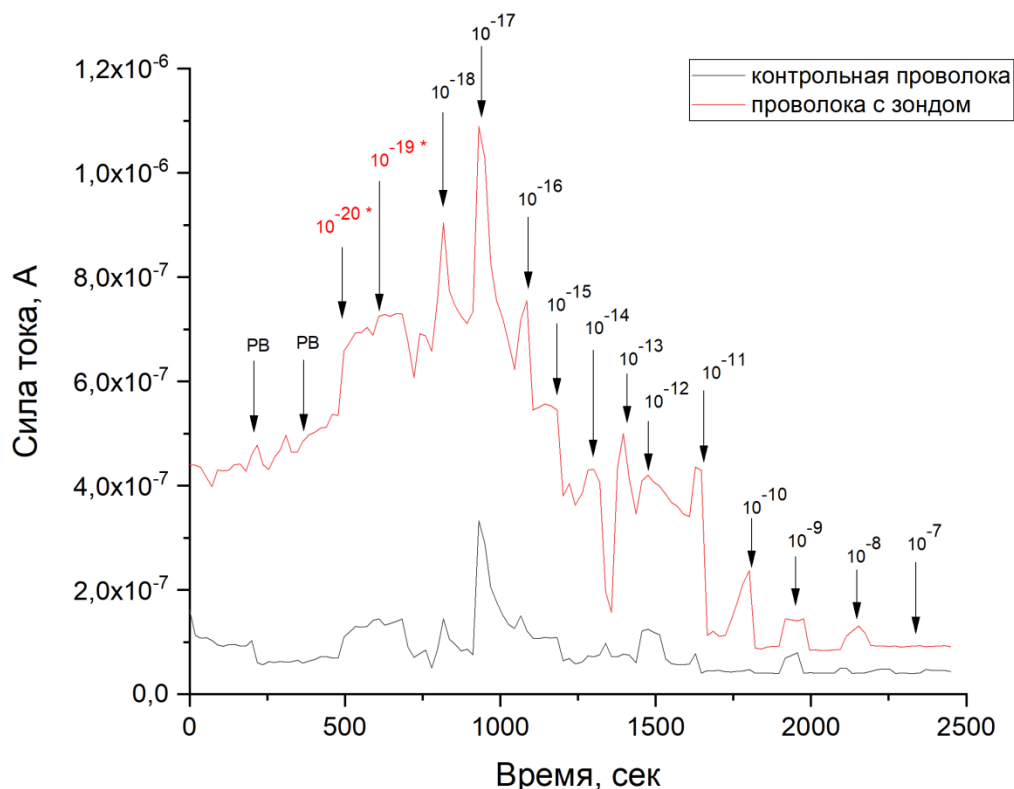


Рисунок 3.31 – Отклик КНИ-биосенсора при последовательном добавлении 18S рРНК-мишени на CDI-модифицированной поверхности. Красная кривая соответствует проволоке с ФГ-зондом, черная — контрольной проволоке. PB – 10 мМ фосфатный буфер, pH 7.4

Для минимизации погрешностей измерений проводили нормировку сигнала относительно 10 мМ фосфатного буфера, pH 7.4 во избежание отклика сенсора на его добавление. На рисунке 3.32 показано, что при добавлении 3 мкл 10^{-20} М рРНК-мишени наблюдается отклик КНИ-биосенсора на проволоке с ФГ-зондом. Максимальное значение силы тока достигается при добавлении 3 мкл мишени в концентрации 10^{-17} М, что соответствует ~ 20 молекулам рРНК в анализируемой пробе. Дальнейшее увеличение концентрации мишени приводит к постепенному снижению сигнала на проволоке с зондом, что, вероятно, обусловлено насыщением поверхности сенсора и образованием всех возможных гибридизационных комплексов. Отклик проволоки с иммобилизованным ФГ-зондом значительно выше, чем для контрольной, что подтверждает специфическое формирование дуплекса зонд/мишень.

В результате данной части работы была разработана система для гетерофазного гибридизационного анализа на основе КНИ-биосенсора, содержащего специфические олигонуклеотидные (НК/ФГ) зонды и контрольные проволоки. Подтверждена специфичность разработанной сенсорной системы. Сравнительные исследования показали, что активирующий агент карбонилдиимидазол (CDI) обеспечивает более высокую чувствительность детекции по сравнению с 3-глицидоксипропилтриметоксисиланом (GOPTS). При этом выявление протяженной структурированной 18S рРНК мишени оказалось более эффективным по сравнению с короткой синтетической ДНК-мишенью. Продемонстрировано преимущество использования ФГ-зондов перед нативными олигонуклеотидами с более высокой чувствительностью гибридизационного анализа. На основании полученных данных определены оптимальные условия для гетерофазного гибридизационного анализа на КНИ-биосенсоре: модификация поверхности активирующим агентом CDI, применение ФГ-олигонуклеотидов в качестве специфических зондов, использование протяженных структурированных НК в качестве мишеней. Чувствительность разработанного подхода составила ~ 20 молекул НК в образце.

3.4. Разработка протоколов для пробоподготовки НК-мишеней на основе магнитной сепарации

Биосенсоры на основе полевых транзисторов обладают высокой чувствительностью сенсорной поверхности, что может приводить к снижению специфичности детекции при работе с многокомпонентными биологическими пробами. Для повышения достоверности анализа на такого типа сенсорах требуется предварительная очистка целевых нуклеиновых кислот.

Традиционные методы выделения НК довольно трудоемкие, состоят из множества этапов, с использованием органических растворителей и хроматографических систем, а также могут приводить к контаминации и деградации НК. Твердофазные протоколы позволяют более эффективно выделять НК. Магнитная твердофазная экстракция — это быстрая и простая процедура с высоким выходом и чистотой НК [46, 47, 48, 49, 50]. Наночастицы магнетита (Fe_3O_4) являются наиболее перспективными для выделения нуклеиновых кислот, благодаря их ферромагнитным свойствам. Обычно для эффективной пробоподготовки НК требуется только магнитный штатив для пробирок. Хотя многие МНЧ коммерчески доступны, стоимость наборов для выделения чрезвычайно высока. Наконец, существующие магнитные наборы для ДНК и РНК не позволяют выделять их специфически. Также для ковалентной иммобилизации НК зачастую необходимо многостадийное и длительное покрытие МНЧ.

3.4.1. Синтез и характеристика модифицированных магнитных наночастиц (МНЧ) и композитов на основе МНЧ и нейлона-6

Наночастицы смешанного оксида железа были синтезированы методом соосаждения хлоридов железа II и III как описано в 2.2.11. Полученные МНЧ имеют средний размер $11,0 \pm 2,5$ нм (Рис. 3.34 А). Далее МНЧ были модифицированы для ковалентной иммобилизации аминокислотных олигонуклеотидных зондов. Модификацию полученных МНЧ проводили последовательной обработкой тетраэтоксисиланом (TEOS) в щелочной среде с последующей функционализацией (3-аминопропил)триэтоксисиланом (APTES) и 1,3,5-трихлоротриазинном (ТСТ). На завершающем этапе осуществляли иммобилизацию аминокислотного олигонуклеотидного зонда на активированную поверхность наночастиц. Схематическое представление процесса модификации поверхности и иммобилизации биомолекул приведено на рисунке 3.32.

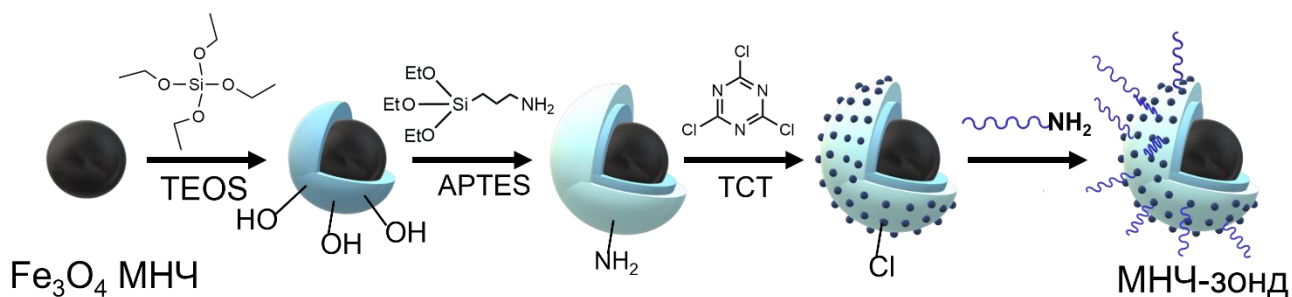


Рисунок 3.32 – Схема модификации поверхности магнитных наночастиц и иммобилизации аминокислотных олигонуклеотидных зондов.

В качестве носителя, обладающего магнитными свойствами для удобства манипуляций и повышенной емкостью по отношению к иммобилизуемым олигонуклеотидам, был разработан композитный материал на основе нейлона-6 и наночастиц оксида железа. Нанокompозиты на основе MNЧ и нейлона-6 (Н6) были синтезированы методом совместного осаждения из раствора нейлона-6 в 2,2,2-трифторэтанол и водной суспензии MNЧ по методу, описанному в 2.2.12 (Рис.3.33). Полученную смесь оставляли на ночь для полного осаждения частиц. Нанокompозиты MNЧ@Н6 отделяли магнитной декантации, промывали этанолом и водой, а затем высушивали. Для получения нанокompозитов с содержанием 1% и 5% магнитного ядра по массе (MNЧ1%@Н6, MNЧ5%@Н6) использовали два соотношения MNЧ/нейлон-6.

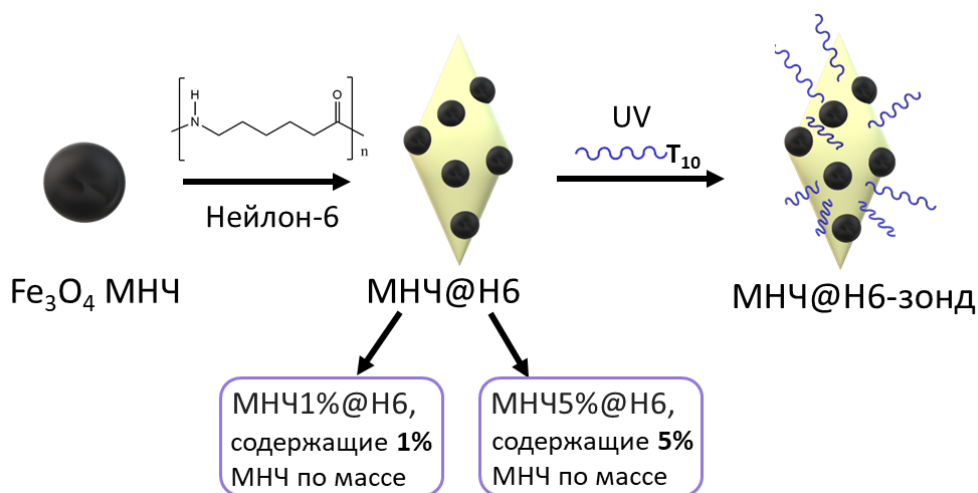


Рисунок 3.33 – Схема получения композитов из раствора нейлона-6 с добавлением суспензии MNЧ, с последующей иммобилизацией олигонуклеотидных зондов, несущих на 5'-конце декатимидилатный домен.

При переходе капрона из растворенного состояния в твердотельное в присутствии наночастиц оксида железа происходило формирование композитных частиц. Магнитные наночастицы оседали на лепестках капрона или внутри них, и при приложении магнитного поля такие композитные частицы легко отделялись магнитной декантацией. Наличие полимера нейлона-6 в составе композита позволяло использовать упрощенный подход к иммобилизации

олигонуклеотидного зонда, содержащего терминальный декатимидилатный (T_{10}) домен, под действием УФ-облучения [14].

Полученные композиты были охарактеризованы методами динамического светорассеяния, ИК-спектроскопии и просвечивающей электронной микроскопии. Гидродинамический диаметр нанокомпозитов МНЧ@Н6, определенный методом динамического светорассеяния, составил 598 ± 47 нм. Изображения просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) нанокомпозитов представлены на рисунке 3.34, МНЧ осаждаются на поверхности нейлона, формируя нанокомпозиты. Для образца МНЧ5%@Н6 наблюдается более равномерное распределение магнитных наночастиц по поверхности нейлона. Так, при анализе микрофотографий композитов видны лепесткообразные полимерные структуры нейлона-6 размером около 1 мкм, малой электронной плотности, с вкраплениями электронно-плотных частиц магнетита и их агломератов размером до 100 нм. С увеличением содержания МНЧ количество вкраплений значительно увеличивается.

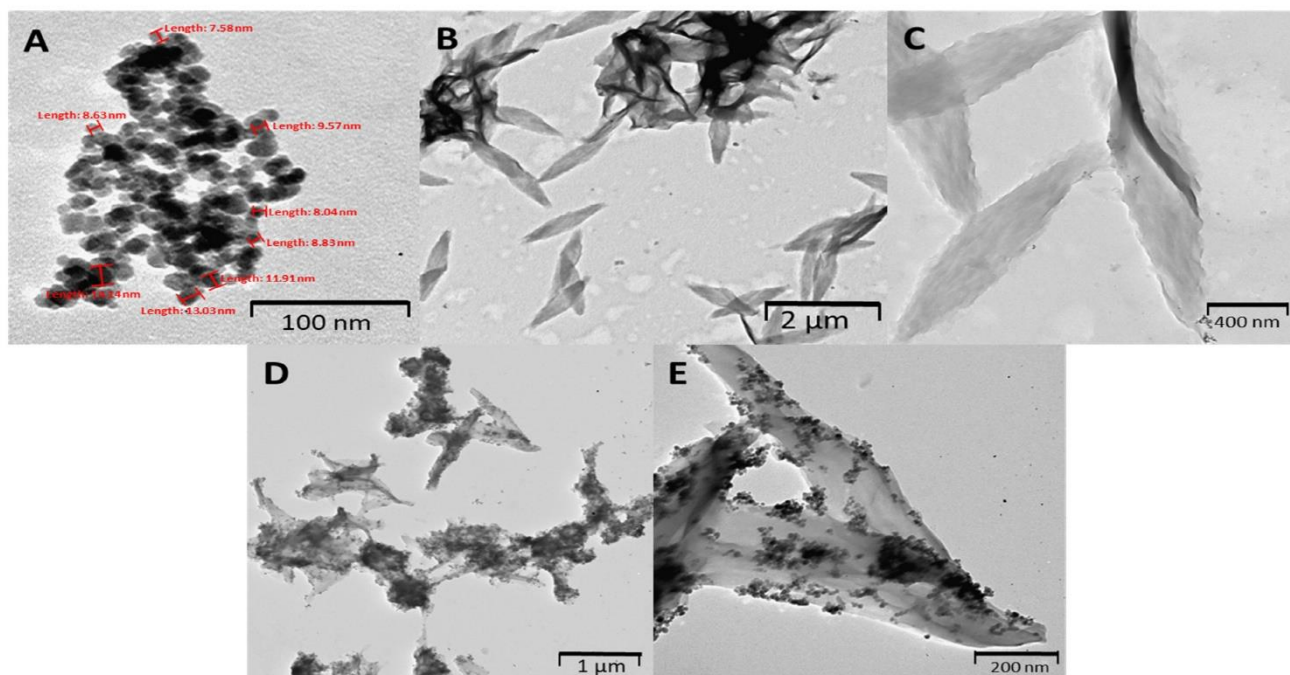


Рисунок 3.34 – Просвечивающая электронная микроскопия магнитных наночастиц и нанокомпозитов. А) ПЭМ изображение с высоким увеличением исходных МНЧ Fe_3O_4 . (В) ПЭМ-изображение с малым увеличением МНЧ1%@Н6. (С) ПЭМ-изображение МНЧ1%@Н6 с высоким увеличением. (D) ПЭМ-изображение МНЧ5%@Н6 с малым увеличением. (Е) ПЭМ-изображение МНЧ5%@Н6 с высоким увеличением. ПЭМ изображения магнитных наночастиц получены в ГМИ ИХБФМ СО РАН под руководством профессора, д.б.н. Рябчиковой Е.И.

Наличие нейлона-6 в композитных частицах с содержанием 1% и 5% наночастиц оксида железа было доказано путем регистрации ИК-спектроскопии в ближнем диапазоне. На рисунке 3.35 представлены спектры ближней инфракрасной области (БИК, $4000 - 12500$ cm^{-1}) полученных композитных частиц двух видов и стандартных МНЧ. Видно, что на спектрах композитных

частиц появляются пики, характерные для нейлона-6, в то время как спектр наночастиц оксида железа не имеет выраженных пиков в данном диапазоне.

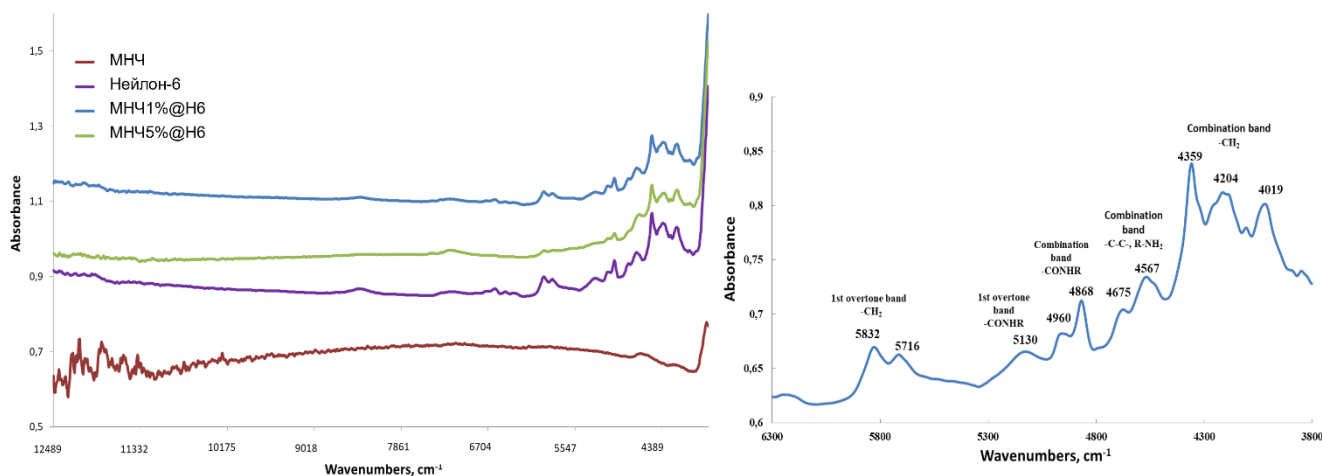


Рисунок 3.35 – Спектры Фурье ближней инфракрасной области для МНЧ, нейлона-6 (Н6) и нанокомпозитов МНЧ1%@Н6 и МНЧ5%@Н6.

3.4.2. Исследование емкостных характеристик МНЧ и нанокомпозитов МНЧ@Н6 по отношению к олигонуклеотидным зондам

Как было сказано ранее, исследовали два подхода к иммобилизации олигонуклеотидных зондов. В первом случае в качестве носителя использовали магнитные наночастицы, которые были химически модифицированы для возможности ковалентной иммобилизации аминокислотного олигонуклеотидного зонда Z₁-FAM с флуоресцентной меткой (Таблица 2.5 №1) на их поверхность. Емкость МНЧ по отношению Z₁-FAM рассчитывали флуориметрическим анализом супернатантов как отношение количества зонда до и после связывания. Емкость МНЧ составила $1,5 \pm 0,3$ нмоль/мг наночастиц с эффективностью иммобилизации 50%.

Во втором случае для демонстрации возможности иммобилизации олигонуклеотидного зонда Z₁T₁₀-FAM (Таблица 2.5 №2) на нейлон-магнитные композиты с массовым содержанием 1% Fe₃O₄ и 5% Fe₃O₄ осуществляли фотоиммобилизацию олигонуклеотида, несущего 5'-декатимидилатный домен и 3'-флуоресцентную метку. Емкость композита по отношению к иммобилизованному зонду составила $2,2 \pm 0,2$ нмоль/мг для 1% МНЧ и $2,0 \pm 0,3$ нмоль/мг для 5% МНЧ с эффективностью иммобилизации 73,3% и 66,7% соответственно.

Для подтверждения иммобилизации, стабильности и отсутствия разрушения функциональной части последовательности был синтезирован олигонуклеотид Z₁T₁₀-Bio (Таблица 2.5 № 3) с биотиновой меткой на 5'-конце. После иммобилизации зонда частицы

обрабатывали конъюгатом стрептавидин-щелочная фосфатаза, выявляли связывание биотин-стрептавидин хромогенными субстратами BCIP/NBT, что приводило к качественной оценки эффективности иммобилизации (Рис. 3.36).

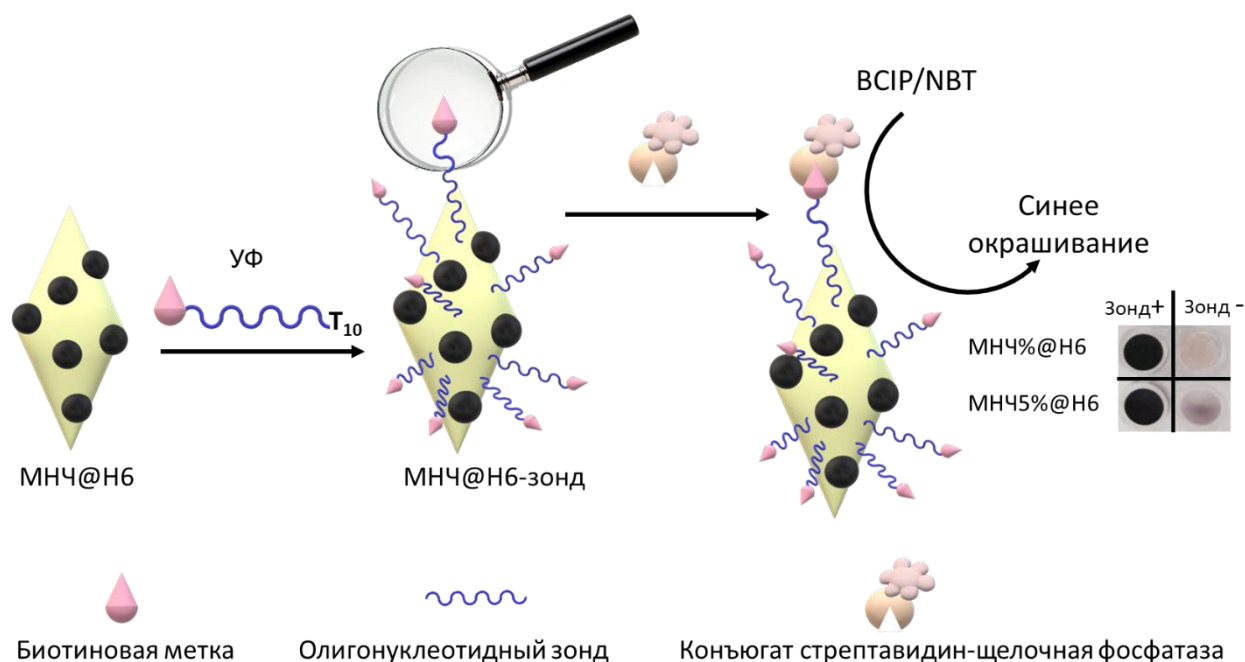


Рисунок 3.36 – Схема иммобилизации олигонуклеотидного зонда, несущего 5'-декатимидилатный домен и 3'-биотиновую метку с последующей обработкой хромогенными субстратами.

Было показано, что частицы после УФ-иммобилизации олигонуклеотида и выявления биотиновой метки приобретают темно-синее окрашивание, что свидетельствует об иммобилизации олигонуклеотида Z_1T_{10} -Bio на нанокompозит и отсутствии разрушения олигонуклеотидной цепи. При этом в отсутствие иммобилизованного зонда окрашивание не наблюдается. Данный эксперимент демонстрирует возможность иммобилизации специфического зонда на нейлон-магнитные композиты путем фотоиммобилизации. Использование магнитно-нейлоновых композитов облегчает манипуляции с частицами в силу приобретенных магнитных свойств, а нейлон-6 увеличивает 3Д поверхность, доступную для иммобилизации и упрощает процедуру иммобилизации олигонуклеотидов на поверхность наночастиц с длительного многостадийного процесса, до 10-минутного облучения УФ светом.

3.4.3. Исследование эффективности и специфичности гибридизации и высвобождения РНК-мишени при пробоподготовке

Далее исследовали эффективность гибридизации анализируемой молекулы из смеси, содержащей избыток случайных последовательностей нуклеиновых кислот. В качестве мажорного компонента использовали суммарную РНК пекарских дрожжей в концентрации, превышающей концентрацию мишени на два порядка. В качестве модельной РНК-мишени была

синтезирована 23-звенная последовательность РНК M_1 (Таблица 2.5 №8), соответствующая участку мРНК белка NELF-A (WHSC2, NM_005663), которая, как было показано, в значительном количестве присутствует в плазме крови у больных раком легких. Также были синтезированы комплементарные (Таблица 2.5 № 4, 6) и не комплементарные (Таблица 2.5 № 5, 7) ей 17-звенные зонды, которые иммобилизовали на наноматериалы для оценки специфичности связывания. Таким образом, при формировании гибридизационного комплекса происходит удаление мишени из раствора, а при последующей денатурации комплекса, мишень возвращается в уже очищенный от примесей раствор (Рис. 3.37).

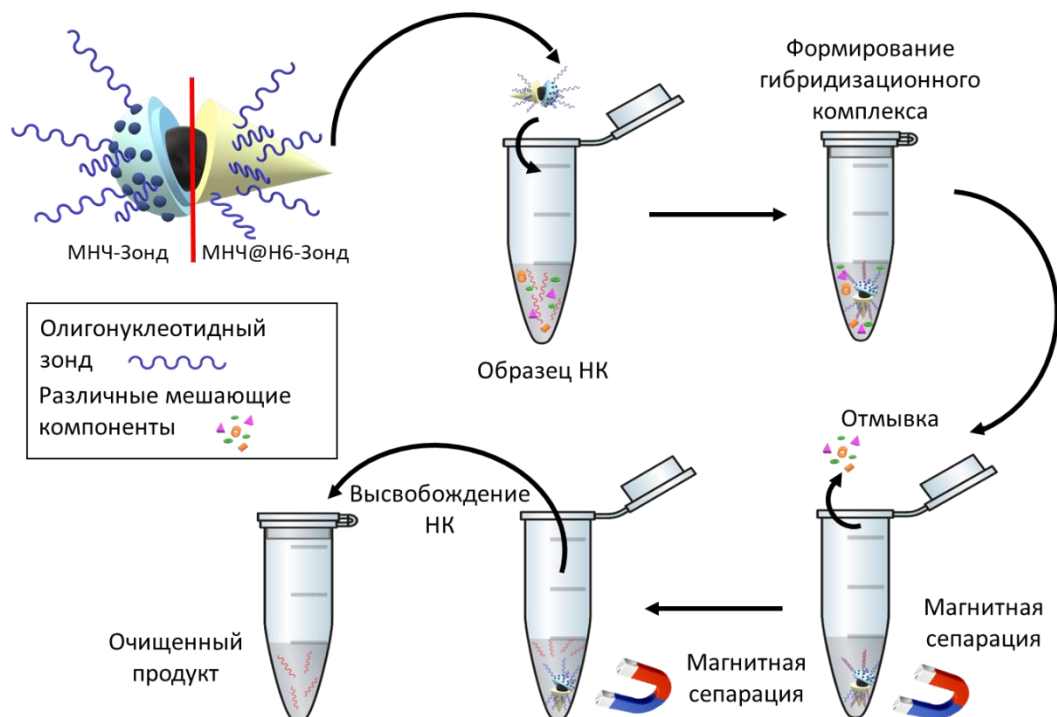


Рисунок 3.37 – схема выделения РНК-мишени с помощью разработанных наноматериалов.

Смесь целевой РНК-мишени и суммарной РНК пекарских дрожжей инкубировали в течение часа с МНЧ и МНЧ@Н6, содержащими в первом случае комплементарный зонд, а во втором случае некомплементарный. Затем частицы отделяли магнитной декантацией и измеряли интенсивность флуоресценции надосадочных растворов. На рисунке 3.38 продемонстрирована связывающая способность разработанных наноконпозитов по отношению к РНК-мишени. Показано, что связывающая способность всех частиц с комплементарным зондом (Рис.3. 39 красные столбцы) значительно выше, чем для частиц, несущих неспецифический зонд (Рис. 3.39 синие столбцы).

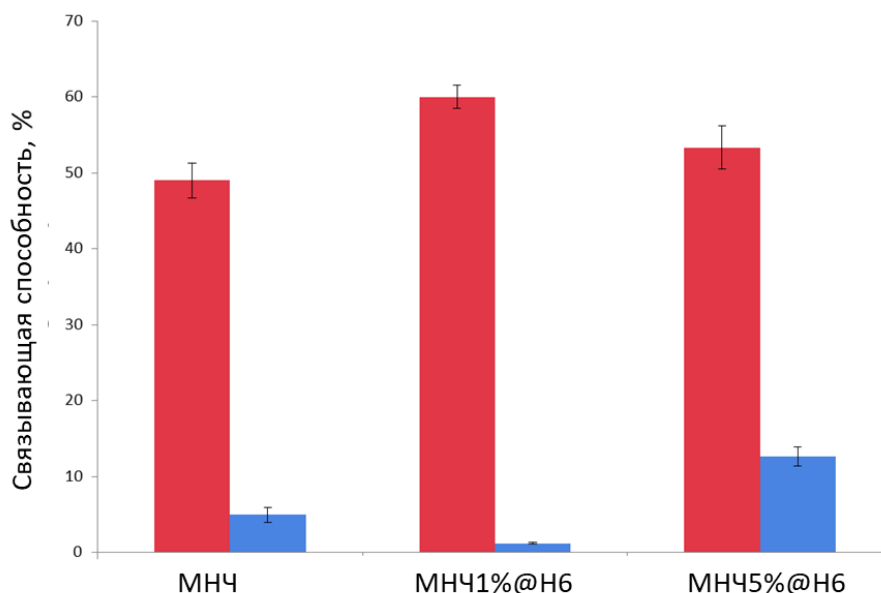


Рисунок 3.39 – Связывающая способность МНЧ и МНЧ@Н6 по отношению к целевой РНК. Красным обозначены нанокompозиты несущие специфический зонд, синим – неспецифический.

Таким образом, продемонстрировано специфичное связывание целевой РНК из раствора, содержащий 100-кратный избыток случайных последовательностей НК. Наиболее специфичным к целевой РНК и обладающим наибольшей емкостью является МНЧ1%@Н6, которая составила 60%, что соответствует $0,180 \pm 0,010$ нмоль/мг нанокompозита. Количественные характеристики МНЧ и нанокompозитов на их основе с нейлоном-6 по отношению к иммобилизованному зонду и связанной РНК-мишени представлены в таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Количественные характеристики МНЧ и композитов МНЧ@Н6.

Тип МНЧ	Иммобилизация зонда	Исходное количество целевой РНК	Гибридизация с целевой РНК ^а	Высвобождение целевой РНК ^б	Эффективность связывания РНК ^с
МНЧ	50,0%	0,30 нмоль	$0,147 \pm 0,015$ нмоль 49,0%	$0,033 \pm 0,010$ нмоль 22,4%	11,0%
МНЧ1%@Н6	73,3%		$0,180 \pm 0,010$ нмоль 60,0%	$0,160 \pm 0,013$ нмоль 88,8%	53,3%
МНЧ5%@Н6	66,7%		$0,160 \pm 0,018$ нмоль 53,3%	$0,087 \pm 0,013$ нмоль 54,4%	29,0%

а) эффективность гибридизации, % = количество связанной РНК-мишени/исходное количество РНК-мишени $\times 100\%$; б) эффективность высвобождения, % = количество высвобожденной РНК-мишени/количество связанной РНК-мишени $\times 100\%$; с) эффективность связывания РНК, % = количество высвобожденной РНК-мишени /исходное количество РНК-мишени $\times 100\%$.

Для высвобождения целевой РНК с поверхности наноматериалов добавляли 50% водный раствор формамида. Смесь инкубировали при перемешивании и нагревании до 90 °С в течение 10 минут. После магнитной декантации проводили флуоресцентный анализ надосадочных

растворов. Наиболее эффективное высвобождение РНК наблюдалось для нанокомпозитов МНЧ1%@Н6, что составило 88,8% или $0,160 \pm 0,013$ нмоль/мг. Низкий уровень высвобождения для МНЧ может быть объяснен неспецифическим связыванием нуклеиновых кислот на поверхности частиц [51]. В связи с этим нанокомпозиты с 1% МНЧ имеют большой потенциал в области выделения ДНК для различных приложений с общей эффективностью очистки РНК-мишени в 53%.

Таким образом на данном этапе работы разработаны подходы для эффективной пробоподготовки НК-мишеней из смеси, содержащей 100-кратный избыток случайных последовательностей нуклеиновых кислот, на основе модифицированных МНЧ и нанокомпозитов на основе МНЧ и полимера нейлон-6. В качестве перспективного кандидата для очистки нуклеиновых кислот был выбран нанокомпозит, содержащий 1% МНЧ с 60%-эффективностью захвата целевой РНК-мишени. Высвобождение связанной РНК составило 88,8% в количестве 0,16 нмоль/мг, а общая эффективность выделения РНК составила 53%. В связи с чем дальнейшая оптимизация анализа может привести к более эффективному связыванию и повысить выход очищенных НК-мишеней.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день использование нуклеиновых кислот в различных фундаментальных исследованиях и практических приложениях требует повышения их функциональности, поскольку природных свойств нативных олигонуклеотидов становится недостаточно для решения новых задач. В связи с чем активно развивается направленное изменение химической структуры нативных олигонуклеотидов.

В данной работе была исследована возможность применения фосфорилгуанидиновых производных олигонуклеотидов, содержащих фосфатные группы, в которых на атоме фосфора введен остаток замещенного гуанидина, в качестве праймеров для полимеразной цепной реакции и зондов для гетерофазного гибридационного анализа с помощью кремний на изоляторе (КНИ) биосенсора на основе полевых транзисторов. Систематически изучено влияние количества и положения ФГ-модификаций в олигонуклеотидах в составе 20- и 30- звенных дуплексов как в качестве праймерных, так и матричных цепей на способность элонгации с помощью *Taq* ДНК-полимеразы. Определено оптимальное положение для введения ФГ-модификации в праймеры для их дальнейшего применения в аллель-специфической ПЦР. Разработан подход к рациональному дизайну праймеров с ФГ-модификациями для аллель-специфической ПЦР при выявлении редких соматических мутаций. Подобраны оптимальные условия для эффективного гетерофазного гибридационного анализа на КНИ-биосенсоре с использованием ФГ-олигонуклеотидов в качестве специфических зондов с учетом модификации поверхности, условий иммобилизации зондов, анализируемого раствора НК-мишени (рН, ионная сила, протяженность мишени). Чувствительность разработанного анализа составила ~20 молекул НК в образце. Также разработан подход для пробоподготовки нуклеиновых кислот на основе магнитных наночастиц и нанокомпозитов на их основе с полимером нейлон-6 для анализа на КНИ-биосенсоре с 53%-эффективностью выделения целевой РНК-мишени.

Полученные данные в значительной степени расширяют понимание функциональных особенностей фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов и играют важную роль для улучшения и создания новых диагностических систем, в том числе для персонализированной медицины.

5. ВЫВОДЫ

1. исследованы субстратные свойства олигонуклеотидов с фосфорилгуанидиновыми модификациями в качестве праймеров и матриц в составе ДНК-дуплексов по отношению к *Taq* ДНК-полимеразе:
 - введение ФГ-модификации в **третье** положение от 3'-конца олигонуклеотида, как в случае праймера, так и матрицы не оказывает ингибирующего влияния на процесс элонгации и является оптимальным;
 - наибольшее ингибирование элонгации наблюдается при наличии ФГ-модификации одновременно в первом и втором положениях от 3'-конца **праймера** и при их равномерном распределении по всей длине, при этом множественная модификация в 5'-прилегающей половине праймера ингибирующего эффекта не вызывает. Удаление модификации от 3'-конца к середине праймерной цепи приводит к восстановлению удлинения до полноразмерного продукта;
 - наличие ФГ-модификаций вблизи 3'-конца **матричной цепи** практически не влияет на элонгацию, а степень образования полноразмерного продукта снижается при удалении ФГ-группы от 3'-конца матрицы, при этом наибольшее ингибирующее влияние оказывают как множественные, так и двойные ФГ-модификации.
2. разработан подход для рационального дизайна праймеров с ФГ-модификациями, введенными в третий межнуклеотидный фосфат от 3'-конца, и дополнительными мисматчами для аллель-специфической ПЦР при обнаружении низкого содержания соматических мутаций:
 - отобраны две пары праймеров (с ФГ-модификацией и без) с 3'-концевым квадруплетом CCGC/C*CGC и CATT/C*ATT для выявления соматических мутаций p.G12A, p.G12V соответственно в 12 кодоне протоонкогена KRAS с высокой эффективностью дискриминации ДНК дикого типа при обнаружении 1% мутантной ДНК на фоне ДНК дикого типа с $\Delta Cq = 5,68/11,19$ и $7,88/10,11$.
3. разработан чувствительный (20 молекул в образце) и специфичный анализ с помощью кремний на изоляторе биосенсора на основе полевых транзисторов для обнаружения нуклеиновых кислот: мРНК тропонина I человека и 18S рРНК с иммобилизованными ФГ-зондами:
 - оптимальными условиями являются использование карбонилдиимидазола в качестве модификатора поверхности и 50 mM карбонатного буфера, pH 10.4 для иммобилизации олигонуклеотидных зондов на поверхность оксида кремния;

- использование фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидных зондов увеличивает эффективность гетерофазной гибридизации нуклеотидных маркеров на КНИ-биосенсоре.
4. разработаны протоколы для пробоподготовки НК-мишеней методом магнитной сепарации на основе магнитных наночастиц и нанокомпозитов на их основе с полимером нейлон-6 для анализа с помощью КНИ-биосенсора, обеспечивающие возможность выделения из смеси целевых НК в присутствии 100-кратного избытка конкурирующей РНК с 53%-эффективностью.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Glazier D. A. et al. Chemical synthesis and biological application of modified oligonucleotides //Bioconjugate Chemistry. – 2020. – Т. 31. – №. 5. – С. 1213-1233.
- 2 Ochoa S., Milam V. T. Modified nucleic acids: Expanding the capabilities of functional oligonucleotides //Molecules. – 2020. – Т. 25. – №. 20. – С. 4659.
- 3 Duffy K., Arangundy-Franklin S., Holliger P. Modified nucleic acids: replication, evolution, and next-generation therapeutics //Bmc Biology. – 2020. – Т. 18. – №. 1. – С. 112.
- 4 Kupryushkin M. S., Pyshnyi D. V., Stetsenko D. A. Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic acid analogues //Acta Naturae (англоязычная версия). – 2014. – Т. 6. – №. 4 (23). – С. 116-118.
- 5 Dyudeeva E. S., Pyshnaya I. A. Phosphoryl guanidine oligonucleotides as primers for RNA-dependent DNA synthesis using murine leukemia virus reverse transcriptase //Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2022. – Т. 26. – №. 1. – С. 5.
- 6 Chubarov A. S. et al. Allele-specific PCR for KRAS mutation detection using phosphoryl guanidine modified primers //Diagnostics. – 2020. – Т. 10. – №. 11. – С. 872.
- 7 Garafutdinov R. R. et al. Prevention of DNA multimerization using phosphoryl guanidine primers during isothermal amplification with Bst exo-DNA polymerase //Biochimie. – 2020. – Т. 168. – С. 259-267.
- 8 Lebedeva N. A. et al. Design of a new fluorescent oligonucleotide-based assay for a highly specific real-time detection of apurinic/apyrimidinic site cleavage by tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 //Bioconjugate chemistry. – 2015. – Т. 26. – №. 10. – С. 2046-2053.
- 9 Kupryushkin M. S. et al. Antisense oligonucleotide gapmers containing phosphoryl guanidine groups reverse MDR1-mediated multiple drug resistance of tumor cells //Molecular Therapy Nucleic Acids. – 2022. – Т. 27. – С. 211-226.
- 10 Zhukov S. A., Pyshnyi D. V., Kupryushkin M. S. Synthesis of novel representatives of phosphoryl guanidine oligonucleotides //Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2021. – Т. 47. – №. 2. – С. 380-389.
11. Gallagher, S. Quantitation of nucleic acids with absorption spectroscopy // Curr. Protoc. Protein Sci. – 1998. – V. 13. – No. 1. – С. A. 4K. 1-A. 4K. 3.
- 12 Naumova, O., Fomin, B., Nasimov, D., et al. SOI nanowires as sensors for charge detection // Semicond. Sci. Technol. – 2010. – V. 25. – No. 5. – С. 055004.
13. Dmitrienko, E., Naumova, O., Fomin, B., et al. Surface modification of SOI-FET sensors for label-free and specific detection of short RNA analyte // Nanomedicine. – 2016. – V. 11. – No. 16. – С. 2073-2082.

- 14 Dmitrienko E. V., Pyshnaya I. A., Pyshnyi D. V. Oligonucleotide derivatives in the hybridization analysis of nucleic acids. I. Covalent immobilization of oligonucleotide probes on nylon //Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2010. – Т. 36. – №. 5. – С. 645-656.
- 15 Dyudeeva E. S. et al. Physicochemical properties of the phosphoryl guanidine oligodeoxyribonucleotide analogs //Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2019. – Т. 45. – №. 6. – С. 709-718.
- 16 Eom S. H., Wang J., Steitz T. A. Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site //Nature. – 1996. – Т. 382. – №. 6588. – С. 278-281.
- 17 Пышная И. А. и др. Мостиковые олигонуклеотиды-молекулярные зонды для исследования фермент-субстратного взаимодействия и аллельспецифичного анализа ДНК //Биохимия. – 2009. – Т. 74. – №. 9. – С. 1238-1251.
- 18 Serebriiskii I. G. et al. Comprehensive characterization of RAS mutations in colon and rectal cancers in old and young patients //Nature communications. – 2019. – Т. 10. – №. 1. – С. 3722.
- 19 Rejali N. A., Moric E., Wittwer C. T. The effect of single mismatches on primer extension //Clinical Chemistry. – 2018. – Т. 64. – №. 5. – С. 801-809.
- 20 Liu J. et al. An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application //Plant methods. – 2012. – Т. 8. – №. 1. – С. 34.
- 21 Lang A. H. et al. Optimized allele-specific real-time PCR assays for the detection of common mutations in KRAS and BRAF //The Journal of Molecular Diagnostics. – 2011. – Т. 13. – №. 1. – С. 23-28.
- 22 Vinogradova O. A., Pyshnyi D. V. Selectivity of enzymatic conversion of oligonucleotide probes during nucleotide polymorphism analysis of dn //Acta Naturae (англоязычная версия). – 2010. – Т. 2. – №. 1 (4). – С. 36-52.
- 23 Olmedillas López S. et al. KRAS G12V mutation detection by droplet digital PCR in circulating cell-free DNA of colorectal cancer patients //International journal of molecular sciences. – 2016. – Т. 17. – №. 4. – С. 484.
- [24] Leung, W.H.; Pang, C.C.; Pang, S.N.; Weng, S.X.; Lin, Y.L.; Chiou, Y.E.; Pang, S.T.; Weng, W.H. High-Sensitivity Dual-Probe Detection of Urinary Mir-141 in Cancer Patients Via a Modified Screen-Printed Carbon Electrode-Based Electrochemical Biosensor. *Sensors* **2021**, *21*, 3183.
- [25] Dos Santos, G.M.C.; Alves, C.R.; Pinto, M.A.; Leon, L.A.A.; Souza-Silva, F. Detection of Antibodies against Hepatitis a Virus (Hav) by a Surface Plasmon Resonance (Spr) Biosensor:

- A New Diagnosis Tool Based on the Major Hav Capsid Protein Vp1 (Spr-Havp1). *Sensors* **2021**, 21,
- [26] Stortini, A.M.; Baldo, M.A.; Moro, G.; Polo, F.; Moretto, L.M. Bio- and Biomimetic Receptors for Electrochemical Sensing of Heavy Metal Ions. *Sensors* **2020**, 20, 6800.
- 27 Panahi A. et al. Recent advances of field-effect transistor technology for infectious diseases // *Biosensors*. – 2021. – T. 11. – №. 4. – C. 103.
- 28 Kim J. W. et al. Attomolar detection of virus by liquid coplanar-gate graphene transistor on plastic // *Nanotechnology*. – 2019. – T. 30. – №. 34. – C. 345502.
- 29 Purwidyantri, A.; Palacio, I.; Moreno, M.; Almudena, N.; Mendieta-moreno, J.I.; Torres-v, B.; García-hern, M.; Luis, V.; Jelínek, P.; L, M.F.; et al. Attomolar detection of hepatitis C virus core protein powered by molecular antenna-like effect in a graphene field-effect aptasensor. *Biosens. Bioelectron.* **2023**, 222, 115006
- 30 Chen H. et al. Aptamer-functionalized carbon nanotube field-effect transistor biosensors for Alzheimer's disease serum biomarker detection // *ACS sensors*. – 2022. – T. 7. – №. 7. – C. 2075-2083.
- 31 Boyd E. J., Brown S. A. The size dependence of tin oxide atomic cluster nanowire field effect transistors // *Nanotechnology*. – 2009. – T. 20. – №. 42. – C. 425201.
- 32 Chen S. et al. Monolayer MoS₂ nanoribbon transistors fabricated by scanning probe lithography // *Nano Letters*. – 2019. – T. 19. – №. 3. – C. 2092-2098.
- 33 Park C. W. et al. Control of channel doping concentration for enhancing the sensitivity of 'top-down' fabricated Si nanochannel FET biosensors // *Nanotechnology*. – 2009. – T. 20. – №. 47. – C. 475501.
- 34 Ivanov Y. D. et al. Method for Automating Parallel Tagless Detection of a Biological Marker and a Device for Its Implementation 2017 // *RU Patent RU2696114C2*. – 2019. – T. 31.
- 35 Leung K., Nielsen I. M. B., Criscenti L. J. Elucidating the bimodal acid– base behavior of the water–silica interface from first principles // *Journal of the American Chemical Society*. – 2009. – T. 131. – №. 51. – C. 18358-18365.
- 36 Sulpizi M., Gaigeot M. P., Sprik M. The silica–water interface: how the silanols determine the surface acidity and modulate the water properties // *Journal of chemical theory and computation*. – 2012. – T. 8. – №. 3. – C. 1037-1047.
- 37 Cho S. K., Cho W. J. Ultra-high sensitivity pH-sensors using silicon nanowire channel dual-gate field-effect transistors fabricated by electrospun polyvinylpyrrolidone nanofibers pattern template transfer // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2021. – T. 326. – C. 128835.

- 38 Sinha, S.; Pal, T.; Sharma, P.; Kharbanda, D.; Khanna, P.K.; Tanwar, A.; Sharma, R.; Mukhiya, R. Fabrication, Characterization, and Modeling of an Aluminum Oxide-Gate Ion-Sensitive Field-Effect Transistor-Based pH Sensor. *J. Electron. Mater.* **2021**, 50, 7085–7097.
- 39 Kamarozaman N. S. et al. Highly sensitive and selective sol-gel spin-coated composite TiO₂–PANI thin films for EGFET-pH sensor // *Gels*. – 2022. – T. 8. – №. 11. – C. 690.
- 40 Ortiz-Conde A. et al. A review of recent MOSFET threshold voltage extraction methods // *Microelectronics reliability*. – 2002. – T. 42. – №. 4-5. – C. 583-596.
41. Elnathan, R., Kwiat, M., Pevzner, A., et al. Biorecognition layer engineering: overcoming screening limitations of nanowire-based FET devices // *Nano Lett.* – 2012. – V. 12. – No. 10. – C. 5245-5254.
- 42 Ju, H. Biosensors: signal amplification for highly sensitive bioanalysis based on biosensors or biochips // *J. Biochips Tiss. Chips*. – 2012. – V. 2. – C. e114
- 43 Zhu M., Lerum M. Z., Chen W. How to prepare reproducible, homogeneous, and hydrolytically stable aminosilane-derived layers on silica // *Langmuir*. – 2012. – T. 28. – №. 1. – C. 416-423.
- 44 Hwang, M., Heiranian, M., Kim, Y., et al. Ultrasensitive detection of nucleic acids using deformed graphene channel field effect biosensors // *Nat. Commun.* – 2020. – V. 11. – No. 1. – C. 1-11.
- 45 Chou, W., Hu, W., Yang, Y., et al. Neutralized chimeric DNA probe for the improvement of GC-rich RNA detection specificity on the nanowire field-effect transistor // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9. – No. 1. – C. 1-10.
- 46 Li P. et al. Solid-phase extraction methods for nucleic acid separation. A review // *Journal of separation science*. – 2022. – T. 45. – №. 1. – C. 172-184.
- 47 Ali T. H. et al. Sugar based cationic magnetic core-shell silica nanoparticles for nucleic acid extraction // *RSC advances*. – 2022. – T. 12. – №. 22. – C. 13566-13579.
- 48 Pang Y. et al. Fe₃O₄@Ag magnetic nanoparticles for microRNA capture and duplex-specific nuclease signal amplification based SERS detection in cancer cells // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – T. 79. – C. 574-580.
- 49 Damavandi F. et al. Enrichment of low abundance DNA/RNA by oligonucleotide-clicked iron oxide nanoparticles // *Scientific Reports*. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 13053.
- 50 Bordelon H. et al. A magnetic bead-based method for concentrating DNA from human urine for downstream detection // *PloS one*. – 2013. – T. 8. – №. 7. – C. e68369.
- 51 Bobrikova E., Chubarov A., Dmitrienko E. The Effect of pH and Buffer on Oligonucleotide Affinity for Iron Oxide Nanoparticles // *Magnetochemistry*. – 2021. – T. 7. – №. 9. – C. 128.



Отчет о проверке

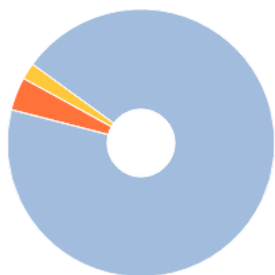
Автор: Булгакова Анастасия Евгеньевна

Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна

Название документа: аттестация_Булгакова_26.08.25_wm

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ

Тариф: FULL



Совпадения:
4,5%



Оригинальность:
93,54%



ИИ-контент:
0%



Цитирования:
0%



Самоцитирования:
1,96%



«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует проверенному тексту документа.

Проверено: 89,63% текста документа, исключено из проверки: 10,37% текста документа. Разделы, отключенные пользователем: Методы, Библиография

- Совпадения** — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.
- Самоцитирования** — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.
- Цитирования** — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.
- Текстовое пересечение** — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
- Источник** — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
- Оригинальный текст** — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

Номер документа: 29

Тип документа: Не указано

Дата проверки: 09.09.2025 09:02:35

Дата корректировки: 09.09.2025 09:11:57

Количество страниц: 67

Символов в тексте: 115368

Слов в тексте: 14417

Число предложений: 1608

Комментарий: не указано

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да

Исключение элементов документа из проверки: Да

Выполнено распознавание текста (OCR): Нет

Выполнена проверка с учетом структуры: Да

Модули поиска: Шаблонные фразы, Цитирование, Коллекция НБУ, Публикации eLIBRARY, Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования), СПС ГАРАНТ: аналитика, Патенты СССР, РФ, СНГ, Сводная коллекция ЭБС, Кольцо вузов, Публикации РГБ, ИПС Адилет, СМИ России и СНГ, Рувики, Диссертации НББ, IEEE, Переводные заимствования IEEE, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Переводные заимствования, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Медицина, Кольцо вузов (переводы и перефразирования), Публикации РГБ (переводы и перефразирования), Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Перефразирования по коллекции IEEE, Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Интернет Плюс

❗ Модули, недоступные в рамках тарифа: Интернет Free

ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	17,73%	0%	ДИПЛОМ_Булгакова_А.Е.	24 Мая 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[02]	7,34%	0%	ДИПЛОМ_Булгакова_А.Е.	24 Мая 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Собственный диплом автора на основе которого выполнен научный доклад
[03]	4,58%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	12 Фев 2023	Переводные заимствования	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[04]	3,24%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	12 Фев 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[05]	2,42%	2,32%	ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН	06 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[06]	2,14%	0%	Фосфорилгуанидиновые олигону... http://elibrary.ru	01 Янв 2024	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[07]	1,3%	1,3%	ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫЕ ОЛ...	02 Ноя 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[08]	1,14%	0%	Фосфорилгуанидиновые олигону... http://elibrary.ru	01 Янв 2024	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[09]	0,96%	0%	Введение фосфорилгуанидиново...	20 Сен 2024	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[10]	0,88%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	20 Авг 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[11]	0,87%	0%	SBB_2022.pdf https://pure.nsu.ru	03 Ноя 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[12]	0,75%	0,44%	Исследование ферментативного ...	07 Июл 2025	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[13]	0,68%	0,54%	ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ХР...	08 Июл 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[14]	0,65%	0,65%	pcb_2024_sbornik.pdf http://niboch.nsc.ru	14 Окт 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[15]	0,59%	0%	ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН	06 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[16]	0,54%	0%	Алексеев, Александр Андреевич ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2023	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[17]	0,5%	0%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[18]	0,48%	0%	%D0%BF%D0%BE%D0%BF%D0%B... http://niboch.nsc.ru	26 Июн 2025	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[19]	0,46%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	04 Фев 2024	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[20]	0,45%	0%	Ольхов, Анатолий Александрови... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2023	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[21]	0,43%	0%	ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ХР...	08 Июл 2023	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[22]	0,42%	0,22%	Олигонуклеотиды, содержащие о...	26 Сен 2024	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[23]	0,39%	0%	Черемискина, Анастасия Алексее... http://dlib.rsl.ru	20 Сен 2024	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[24]	0,39%	0%	Сведения об авторах. http://elibrary.ru	01 Янв 2024	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[25]	0,37%	0%	Черемискина, Анастасия Алексее... http://dlib.rsl.ru	20 Сен 2024	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[26]	0,37%	0%	Постановление Правительства Н... http://ivo.garant.ru	06 Июн 2023	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[27]	0,37%	0%	Постановление Правительства Н... http://ivo.garant.ru	08 Июн 2023	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	0,36%	0%	Дюдеева, Евгения Сергеевна Исс... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2022	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	0,3%	0%	openbio_tezis_2020.pdf https://pure.nsu.ru	17 Окт 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[30]	0,3%	0%	https://www.openbio.ru/openbio_t... https://openbio.ru	26 Мая 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[31]	0,3%	0%	Голышев, Виктор Михайлович Ра... http://dlib.rsl.ru	20 Сен 2024	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	0,28%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	13 Дек 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[33]	0,26%	0,26%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	16 Янв 2023	Переводные заимствования	
[34]	0,26%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	12 Фев 2023	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Библиография определена неверно.
[35]	0,26%	0,26%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	26 Янв 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	
[36]	0,25%	0%	Способ очистки вируса осповакц... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,25%	0%	Анализирующие фторированные ... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,25%	0%	Средство для нейтрализации вир... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0,25%	0%	Способ получения наноразмерн... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	0,25%	0%	Формирование подходов к оценк... https://book.ru	01 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,25%	0%	Три бердских предприятия назва... http://berdsk.bezformata.ru	07 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0,25%	0%	БЭМЗ, Нотис и Продсиб из Бердс... http://berdsk.bezformata.ru	07 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,25%	0%	Дайджест решений в сфере конт... http://novosibirsk.bezformata.ru	12 Янв 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	0,25%	0%	Список кавалеров ордена Алекса... https://ru.ruwiki.ru	раньше 2011	Рувики	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0,25%	0%	Распоряжение Губернатора Ново... http://ivo.garant.ru	14 Фев 2024	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[46]	0,25%	0%	Распоряжение Губернатора Ново... http://ivo.garant.ru	18 Фев 2024	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0,25%	0,25%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	20 Авг 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[48]	0,25%	0%	pcb_2024_sbornik.pdf http://niboch.nsc.ru	14 Окт 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[49]	0,25%	0%	Черемискина, Анастасия Алексее... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2023	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	0,25%	0%	Постановление Совета Министро... http://ivo.garant.ru	17 Янв 2023	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,24%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	17 Фев 2023	Переводные заимствования	
[52]	0,24%	0%	ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНО... http://elibrary.ru	01 Янв 2022	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,24%	0%	Современный состав, внутривид... https://elib.nlb.by	01 Янв 2023	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,24%	0%	Современный состав, внутривид... https://elib.nlb.by	01 Янв 2022	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,22%	0,22%	исследование свойств частично ... http://niboch.nsc.ru	03 Ноя 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[56]	0,22%	0%	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДО... http://elibrary.ru	01 Янв 2012	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0,21%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	17 Фев 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,21%	0%	Вестник гематологии. Том IX. № 2... http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,21%	0%	Всероссийская научно-практичес... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,2%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	26 Янв 2023	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,2%	0%	ВКР	26 Мая 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0,19%	0%	Сведения об авторах. http://elibrary.ru	26 Дек 2013	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,17%	0%	Попова, Виктория Константинов... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2025	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0,16%	0%	dyudeeva_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	23 Мая 2025	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0,15%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	07 Янв 2024	Переводные заимствования	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,15%	0%	Т. 2 part#1 http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,15%	0%	popova_vk_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	12 Фев 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,15%	0%	%D0%BF%D0%BE%D0%BF%D0%B... http://niboch.nsc.ru	26 Июн 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[69]	0,13%	0%	Пышный, Дмитрий Владимирови... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2011	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[70]	0,12%	0%	Дилом_10_06_2	10 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	0,11%	0%	Юдкина, Анна Владимировна Вза... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на
объём заимствования

Булгакова Анастасия Евгеньевна

«Модифицированные нуклеиновые кислоты как инструменты молекулярной
диагностики»»

Оригинальность работы составляет 93.54%, что соответствует требованиям
порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на
заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь АК – к.б.н. С.К. Мирошниченко