

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ СИНТЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ

О.М. Алехина, Д.С. Матюшкина, Г.Ю. Фисунов, П.В. Башкиров, Д.В. Басманов, В.М. Говорун

Лаборатория простых систем, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Развитие современных методов геномной инженерии, секвенирования ДНК, синтеза и редактирования геномов, а также появление мультиомиксных подходов к исследованию живых организмов позволило нам перейти на новый уровень в науке, подразумевающий не только наблюдение и ограниченное вмешательство в природу, но и возможность создавать биологические системы с определенными функциями *de novo*. Это направление науки получило название "синтетическая биология", и благодаря бурному развитию в последнее десятилетие оно позволяет приблизиться к решению многих сложнейших научных задач и открывает перспективы для невиданных ранее достижений как в фундаментальных исследованиях, так и в области прикладных разработок. Так, благодаря подходам синтетической биологии становится возможным воспроизводить отдельные биологические процессы с целью их детального изучения и получения новых знаний о законах живой природы. Синтетическая биология позволяет также развивать биотехнологии, например, производство новых лекарств и способов их доставки, получение новых искусственных материалов, создание биопродукторов для наработки полезных веществ и энергии и другие вещи, которые казались невозможными. Чтобы решать задачи с помощью подходов синтетической биологии, необходимо иметь в арсенале некоторое количество базовых методик. Эти методики можно разделить на три части: 1) дизайн и сборка генетической программы (ДНК в форме плазмид или хромосом); 2) разработка внутренней среды искусственных систем, осуществляющей базовые метаболические реакции и/или реализацию генетической информации; 3) создание компартментов с заданными свойствами для инкапсуляции искусственных систем. Разработка оптимальной среды, обеспечивающей стабильное существование искусственных систем, является нетривиальной задачей, для решения которой мы создали библиотеку осциллирующих реакций, в том числе гликолитического пути, которая позволит смоделировать простейшие условия существования протоклеток, осуществляющих лишь базовые биохимические процессы, которые могут быть самодостаточными. Также была разработана бесклеточная система транскрипции-трансляции на основе экстракта из *E. coli* и эффективной РНК-полимеразы фага T7, которая позволяет экспрессировать любые генетические конструкции, регулируемые T7 промотором, и таким образом реализовывать заложенную в них информацию. Для инкапсуляции любых сложных систем мы отладили методики получения везикул, обладающих свойствами живых клеток, и микрочипов из полимерных материалов, позволяющих моделировать сложные динамические процессы. Дальнейшие усовершенствования этих методик позволят нам



НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ
РОСПОТРЕБНАДЗОРА

ИТОГОВАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

Москва

20 декабря 2022

получить многофункциональную платформу, позволяющую решать самые интересные задачи молекулярной биологии, а также разрабатывать подходы к решению насущных прикладных биомедицинских вопросов.

**МОТОРНАЯ АКТИВНОСТИ БЕЛКА ДИНАМИНА-1 И ЕЕ РОЛЬ В ДЕЛЕНИИ
МЕМБРАН.**

П.В. Башкиров

Лаборатория биоэлектрохимии, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Динамин 1 является основоположником суперсемейства динаминов – механоферментов, управляющих перестройкой мембран внутри клетки. Белкам этого большого семейства присущи атрибуты как молекулярных моторов (перекачивание химической энергии гидролиза ГТФ в механическую работу по увеличению кривизны мембраны), так и активных полимеров (использование энергии гидролиза для динамического контроля размера и геометрии белкового ансамбля). Хотя динамические характеристики структуры полимера Динамина1 установлены и подробно описаны, его моторная активность оставалась до сих пор неуловимой. Используя в данной работе ультракороткие мембранные нанотрубки (уНТ) и комбинацию методов регистрации одиночных молекул и измерения производимых ими сил, мы смогли реконструировать структурную перестройку мембран, опосредованную активностью Динамина 1 как молекулярного мотора. В условии избытка ГТФ (поддержание цикла гидролиза ГТФ) анализ характерных флуктуаций силы, удерживающей уНТ, и проводимости просвета уНТ выявил возникновение квазипериодического процесса изменения радиуса НТ, в результате которого происходило ее деление. Осцилляции возникали, когда радиус уНТ сужался до 2 нм просвета. Из величины амплитуды осцилляций проводимости нами был установлен характерный размер двигательной единицы, который соответствует 2-3 сцепленным между собой тетрамерам. Также нами показано что изгибный стресс мембраны, при достижении которого возникают осцилляции, соответствует предкритическому значению, выше которого в мембране могут возникать проводящие дефекты – поры. В такой ситуации квазипериодическое сужение-расширение позволяет белку на очень ограниченное время индуцировать в мембране закритический стресс, катализирующий деление мембраны, избегая при этом формирования в ней пор.

**ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ COVID-19**

И.О. Бутенко, Н.А. Кициловская, А.А. Илюшкина

*Лаборатория мультиомиксных исследований, НИИ системной биологии и медицины
Роспотребнадзора*

Масштабные вспышки, эпидемии и пандемии заболеваний, вызванных новыми или вновь распространяющимися патогенами, требуют быстрого создания и введения в клиническую практику методов диагностики, оценки состояния пациентов и прогнозирования тяжести течения заболеваний. Подходящими молекулярными мишенями для измерения в таких методах являются белки плазмы крови человека.

На примере COVID-19 нами показано, что простой и быстрый относительный безметковый количественный анализ протеома плазмы крови позволяет пронаблюдать отличия между здоровыми и диагностированными пациентами, сформулировать панель белков для прогнозирования тяжести течения, а также, предсказать скорую манифестацию симптомов заболевания у здорового пациента.

О ПОПУЛЯЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ. ЭЛЕМЕНТ ЦИФРОВОГО НАПРАВЛЕНИЯ НИИ СБМ

К.С. Горбунов¹, Д.Е. Федоров²

¹Лаборатория эпидемиологии и ²Лаборатория математического моделирования и биоинформатики, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Цифровые платформы призваны расширить возможности исследования, надзора и наблюдения сложных социально-биологических процессов, таких как эпидемии, общее состояние здоровья, демографии и др. Поточное использование больших данных и использование моделирования позволяет дополнить и сбалансировать картину, получаемую из множества источников информации. С марта 2022 коллектив исследователей из НИИ СБМ работает над созданием системы для работы с популяционными данными.

**РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ
ФАКТОРОВ У *Mycoplasma gallisepticum***

Д.В. Евсютина¹, Г.Ю. Фисунов¹, И.А. Гаранина², Т.А. Семашко¹, В.А. Манувера²,
Д.Р. Харрасов¹, В.М. Говорун¹

¹Лаборатория системного анализа микроорганизмов, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России

Микоплазмы – представители класса Молликут, были одними из первых бактерий, чьи геномы были полностью секвенированы и со временем, как бактерии с редуцированным геномом, стали главными модельными объектами системной биологии. Несмотря на активное изучение микоплазм, мало известно о механизмах регуляции экспрессии генов у этих бактерий. Долгое время у микоплазм был охарактеризован всего лишь один консервативный транскрипционный фактор (ТФ) – HrcA. В нашей работе мы провели поиск факторов регуляции транскрипции у *Mycoplasma gallisepticum* S6, охарактеризовали их сайты связывания и мишени. В результате мы обнаружили 10 потенциальных факторов регуляции транскрипции у *M. gallisepticum*. Среди предсказанных регуляторов только четыре белка – HrcA, MraZ, WhiA и YebC – были представлены у более 70% видов Молликут. Экспериментальная работа по поиску и валидации мишеней ТФ-ов была проведена для консервативных белков MraZ и WhiA, а также для кладоспецифичных – Xre и Fur. Мы показали, что MraZ и WhiA регулируют основные клеточные функции микоплазм – деление клетки и синтез белка. Xre - выступает репрессором генов одной из систем рестрикции–модификации, а Fur регулирует экспрессию гена, кодирующего транспортер ионов металлов. Таким образом, наша работа расширила знания о регуляторных сетях у микоплазм.

**ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МОЮЩИХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ
ПРОБИОТИКОВ**

А.В. Ильякова, Л.С. Федорова

Лаборатория преодоления микробной резистентности, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Образование и широкое распространение возбудителей, устойчивых к традиционным лекарственным препаратам и дезинфицирующим средствам, является в настоящее время одной из важнейших проблем современной медицины. Учитывая социальную и экономическую значимость проблемы, одной из приоритетных задач является разработка альтернативных способов борьбы с резистентными микроорганизмами. Использование моющих средств на основе пробиотиков, может стать одним из вариантов решения данной проблемы. Данные средства в качестве пробиотиков содержат спорообразующие бактерии рода *Bacillus*, в сочетании с поверхностно-активными веществами. Способность бактерий рода *Bacillus* к спорообразованию и высокая устойчивость этих спор к физическим и химическим факторам позволяет использовать их в составе моющих средств. Пробиотические бактерии способны предотвращать колонизацию поверхностей условно-патогенными и патогенными микроорганизмами за счет угнетения их активности вследствие конкуренции за питательные вещества, и путём синтеза ряда антибактериальных метаболитов (бактериоцины, биосурфактанты и т.д.). С целью изучения эффективности моющих средств на основе пробиотиков в отношении резистентных микроорганизмов, было проведено исследование моющего средства, содержащего в своем составе споры бактерии рода *Bacillus*, при обеззараживании тест-поверхностей, контаминированных клиническими изолятами *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*. Перечисленные клинические изоляты обладали устойчивостью к двум и более группам антибиотиков и дезинфицирующим средствам на основе четвертичных аммониевых соединений. По результатам исследования установлено, что использование моющих средств на основе пробиотиков для обработки поверхностей, обеспечивает снижение микробной обсемененности через 2 часа на 90,99 %, через 24 часа на 99,99%. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования моющих средств на основе пробиотиков для санации внутрибольничной среды в медицинских организациях.

**МОНИТОРИНГ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ
БАКТЕРИАЛЬНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИМ ВЕЩЕСТВАМ**С.Н. Ковальчук, А.Л. Архипова*Лаборатория преодоления микробной резистентности*

Контроль над распространением патогенных микроорганизмов является ключевой задачей в профилактике инфекционных заболеваний. Дезинфицирующие вещества (ДВ) широко используются для неспецифической профилактики инфекций в медицинских учреждениях, на предприятиях общественного питания, пищевой промышленности, на коммунальных объектах, в образовательных учреждениях и в быту. Однако, наблюдаемый уже с 1950-х годов феномен устойчивости микроорганизмов к ДВ приводит к снижению эффективности дезинфекционных мероприятий. Одним из основных механизмов формирования микробной резистентности к ДВ является снижение их внутриклеточной концентрации за счет активного выведения из клетки с помощью эффлюксных насосов. Приобретение путем горизонтального переноса плазмид, несущих гены эффлюксных насосов, является одним из наиболее распространенных генетических механизмов формирования и распространения микробной резистентности к ДВ. Известны гены эффлюксных насосов *OqxA*, *OqxV*, *QacA*, *QacB*, *QacE*, *QacEdelta1*, *QacF/L/H/I* и *QacG* плазмидной локализации, которые способствуют формированию микробной устойчивости к четвертичным аммониевым соединениям и бигуанидинам. Поскольку горизонтальный перенос генов этих эффлюксных насосов посредством плазмид представляет большой риск широкого распространения резистентности к ДВ среди изолятов клинически значимых бактерий, представляется актуальным проведение мониторинга их распространения. В связи с этим нами были исследованы 62 изолята бактерий группы ESKAPE (*Klebsiella pneumoniae* (n=45), *Escherichia coli* (n=6), *Enterococcus faecium* (n=5) и *Staphylococcus aureus* (n=6)) из коллекции микроорганизмов Лаборатории преодоления микробной резистентности, выделенных с объектов внутрибольничной среды и из патологических локусов пациентов в медицинских организациях г. Москвы. Для выявления генов *qacA*, *qacB*, *oqxA* и *oqxV* использовали методы ПЦР с флорезной детекцией продуктов ПЦР. В качестве положительного контроля использовали амплификацию фрагмента гена 16S рРНК. В результате проведенных исследований гены *qacA* и *qacB* в исследованных образцах обнаружены не были. У всех изолятов *K. pneumoniae* и у двух изолятов *E. coli* были обнаружены гены *oqxA* и *oqxV* только хромосомной локализации. Учитывая, что в исследованной выборке были клинические изоляты как чувствительные, так и устойчивые к ДВ, полученные результаты означают, что устойчивость к ДВ у резистентных штаммов может быть связана с другими генетическими детерминантами резистентности. С целью их идентификации нами был проведен биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей других генов семейства *qac* – *qacE*, *qacEdelta1*, *qacH/L/F* и *qacG* – и выявлены высококонсервативные участки, на основании которых будут разработаны тест-системы на основе ПЦР для мониторинга распространения этих генов среди изолятов клинически значимых видов бактерий.

**SNAPPER: АЛГОРИТМ ИДЕНТИФИКАЦИИ САЙТОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ
НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ OXFORD NANOPORE**

Д.Н. Конанов

*Лаборатория математической биологии и биоинформатики, НИИ системной биологии и
медицины Роспотребнадзора*

Технология секвенирования Oxford Nanopore широко используется для анализа модификаций ДНК и РНК, в частности, метилирования ДНК. К настоящему моменту разработан ряд инструментов, нацеленных на определение модифицированных позиций геноме, однако определенную сложность здесь представляет корректное выделение конечного набора последовательностей сайтов модификации, поскольку алгоритмы MEME, используемые для этой задачи, зачастую оказываются недостаточно чувствительными.

Нами был разработан новый алгоритм позиционно-специфичного мотивного обогащения, который лег в основу инструмента Snapper. Snapper в первую очередь создавался как готовое решение для быстрого и чувствительного поиска сайтов модификации, но, формально, созданный алгоритм может быть полезен и в других задачах, требующих проведения позиционно-специфичного мотивного обогащения.

Для валидации предложенного алгоритма с помощью Snapper был проанализирован метилом *H. pylori* J99, ранее охарактеризованный с помощью конкурирующей технологии PacBio. *H. pylori* уникален тем, что в его геноме может быть закодировано до 30 различных систем рестрикции-модификации, поэтому один из штаммов этой бактерии и был выбран в качестве объекта анализа. Дополнительно, сырые данные секвенирования *H. pylori* J99 были обработаны с помощью инструментов Tombo и Nanodisco. Snapper значительно превзошел по точности восстановления последовательностей сайтов автоматизированные режимы Tombo и Nanodisco, и оказался немного более чувствительным, чем Nanodisco в режиме ручного извлечения мотивов. В сравнении с результатами PacBio алгоритм показал эквивалентную чувствительность.

Дополнительно, Snapper был использован для анализа метилома нового штамма *H. pylori* A45. Анализ показал присутствие в диком типе 15 активных систем рестрикции-модификации, из которых три не были описаны ранее (сайты метилирования CCAG, GGGA и GAAC), CCAG-специфичная метилтрансфераза была подтверждена экспериментально. Кроме дикого типа, для дополнительной верификации метода были проанализированы три мутанта A45 *hpy*, *hp9192* и *hp1352*, нокаутированные по генам известных метилтрансфераз, специфичных к CATG, GATC и GANTC соответственно. Ожидаемо, во всех случаях Snapper успешно определил деактивированную метилтрансферазу, но также в мутантах *hpy* и *hp9192* был обнаружен новый для *H. pylori* сайт метилирования CCAAK, не представленный в диком типе. Действительно, в геноме дикого типа ген соответствующей метилтрансферазы содержит фреймшифт-вставку в гомополимерном фрагменте, в то время как в мутантах *hpy* и *hp9192* наблюдается реверс-мутация, возвращающая активность R-M системе III типа. Активность



НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ
РОСПОТРЕБНАДЗОРА

ИТОГОВАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

Москва

20 декабря 2022

ССААК-специфичной метилтрансферазы в мутантах *hru* и *hr9192* была дополнительно подтверждена данными протеомного анализа.

**АУТОИММУННЫЙ ЭФФЕКТ АНТИТЕЛ К НУКЛЕОКАПСИДНОМУ БЕЛКУ
ВИРУСА SARS-CoV-2**

Д.С. Матюшкина¹, В.А. Шокина¹, П.О. Тихонова³, В.А. Манувера³, Д.А. Широков³,
Д.Д. Харламбиева³, В.Н. Лазарев³, А.М. Варижук³, Т.С. Ведехина³, А.В. Павленко²,
Г.П. Арапиди³, В.М. Говорун¹

¹Лаборатория простых систем и ²Лаборатория математической биологии и биоинформатики, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России

Последствия развившейся пандемии COVID-19 показали, что важно не только элиминировать возбудителя из организма, но и проанализировать механизмы возникновения постковидных осложнений. В связи с этим, нами был проведен анализ гуморального ответа пациентов с COVID-19 на линейные и конформационные эпитопы вирусных белков с помощью методов ИФА, микрочипов и вестер-блоттинга. Исследование проводилось с использованием рекомбинантно синтезированных структурных (нуклеокапсидный и Spike белки) и неструктурных (nsp2, nsp5, nsp7, nsp9, nsp10, nsp15) белков вируса SARS-Cov-2. В исследование входило 149 пациентов с диагнозом COVID-19. Были отобраны сыворотки в 4 временные точки: поступление в стационар, через 48 часов, через 7 дней (не для всех) и на момент выписки. Контрольная группа составила 48 человек. Наиболее интригующие и интересные результаты были получены для нуклеокапсидного белка Sars-Cov-2. Титр антител к конформационным эпитопам нуклеопротеина был в 2,5 раза выше в группе тяжелых больных и коррелировал с потребностью больного в кислороде. Не менее важно наличие IgG к линейным эпитопам нуклеопротеина, что может свидетельствовать о риске развития аутоиммунного процесса. Мы проанализировали перекрестную реактивность этих антител с собственными белками человека. С помощью конкурентного вестерн-блоттинга мы выявили, что аутоиммунное проявление обусловлено антителами к нуклеокапсидному белку. В соответствии с пересечением аминокислотных последовательностей, с возможностью презентации HLA биоинформатическим (NetMHCIIpan 4.0) и масс-спектрометрическим подходами были определены основные возможные мишени аутоантител. Таковыми оказались белки цитокератин 18, тубулин альфа и фактор элонгации 1-альфа. В связи с полученными результатами можно сделать вывод, что для понимания течения заболевания COVID-19, прогнозирования развития у пациента пролонгированной формы и возможных осложнений, таких как переход на искусственную вентиляцию легких, необходим не только качественный, но и количественный анализ титра IgG антител к нуклеокапсидному и Spike белкам вируса SARS-Cov-2. Кроме того, более полную картину может дать информация о наличии антител к линейным эпитопам антигенов. Картирование таких эпитопов позволит предсказать развитие у пациента аутоиммунных реакций и длительного постковидного синдрома.

**СТРУКТУРНАЯ ОСНОВА Rho-ЗАВИСИМОЙ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ
В *E. COLI***

В.Н. Молодцов

Лаборатория биоэлектрохимии, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Транскрипционные факторы Rho и NusG опосредуют фактор-зависимую терминацию транскрипции в *Escherichia coli*. Для определения структурной организации транскрипционного комплекса в ходе терминации транскрипции, были собраны транскрипционные комплексы, способные к активной терминации и содержащие РНК полимеразу, Rho, NusG и синтетические мРНК-ДНК сборки. Структурная организация данных комплексов была исследована при помощи криоэлектронной микроскопии. Полученные структуры, решенные с разрешением около 4 Å, выявили, что функциональный фактор-зависимый пре-терминационный комплекс содержит гексамерный комплекс Rho в конформации закрытого кольца, РНК проходит сквозь центральный канал Rho, около 60 нт мРНК участвуют в сиквенс-специфичном взаимодействии с внешней поверхностью Rho, а 6 нт мРНК участвуют в сиквенс-специфичном взаимодействии с аминокислотными остатками центрального канала Rho. При этом, ориентация гексамерного комплекса Rho относительно РНК полимеразы такова, что позволяет Rho осуществлять АТФ-зависимую транслокацию вдоль мРНК и оказывать механическое воздействие на РНК полимеразу при котором Rho и РНК полимеразы остаются связаны при помощи NusG. Данное исследование предоставляет структурную основу, объясняющую биохимические и генетические данные, накопленные за более чем 50 лет исследования механизма фактор-зависимой терминации транскрипции в бактериях.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ РНК С ПОМОЩЬЮ РЕАГЕНТОВ РОССИЙСКОГО ПРОИЗВОДСТВА ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ И ПОСЛЕДУЮЩЕГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПОЛНОГО ГЕНОМА ГРИППА А

Л.Н. Пенкин¹, А.В. Лукина-Гронская¹, Д.В. Кривонос², О.Г. Шпакова³, А.С. Сперанская¹

¹Лаборатория мультиомиксных исследований и ²Лаборатория математической биологии и биоинформатики, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

³ДЦЛИ Департамента Здравоохранения Москвы

Мотивация и цель: В конце осеннего-начале зимнего сезона 2022 года в России был зафиксирован традиционный рост заболеваний ОРВИ, в структуре которых существенную долю занял грипп (19,9% на 49 неделе 2022 года по данным института гриппа). Мониторинг циркулирующих и определение преобладающих вариантов гриппа является актуальной задачей. Наиболее информативным и наукоемким методом мониторинга новых инфекций является высокопроизводительное секвенирование. В условиях беспрецедентного экономического давления на нашу страну важно не терять потенциал мониторинга и противодействия пандемическим инфекциям. В связи с этим, представляется важным в короткие сроки выбрать реагенты для подготовки материала к секвенированию из числа тех, которые производятся в России.

Цель нашей работы: Анализ методов выделения нуклеиновых кислот с помощью реагентов российского производства, с помощью которых можно проводить подготовку материала к секвенированию и отработка методики секвенирования вируса гриппа.

Материалы и методы: В качестве образцов брались мазки из носоглотки и ротоглотки от лиц больных ОРВИ (всего 11 образцов, с Ct не более 32), предоставленные ДЦЛИ Департамента Здравоохранения Москвы. Для выделения РНК из образцов применяли следующие наборы: (1) «ГентаМаг» («GENTERRA», Россия), (2) «Набор для выделения РНК на колонках RU-50» («Биолабмикс», Россия) и (3) Trizol LS (фенол хлороформный метод выделения). Для адекватного сравнения некоторые образцы выделялись несколькими наборами сразу в двух повторностях. Ревертирование и ПЦР амплификацию проводили со специфичными праймерами на Influenza A virus, ранее широко применяемыми в разных статьях по мониторингу, см. например[1]. Индексацию и пробоподготовку библиотек проводили набором EXP-NBD104, EXP-NBD114 (производства Oxford NANOPORE). Секвенирование проводилось на приборе PrometION. Выравнивание на референсный геном производили программой Bowtie 2.

Результаты: Набор (1) показал наилучшие количественные результаты, однако с помощью полученных препаратов нуклеиновых кислот существенно хуже амплифицируются сегменты генома вируса гриппа длиннее 2000 п.о., в частности сегмент PB1(2274 п.о.) не удалось полностью собрать у всех 10 образцов, полученных с помощью данного метода выделения. При выделении нуклеиновых кислот с реактивами (2) и (3) амплификация сегментов генома длиной больше 2 000 п.о. происходила успешно, у всех 4-х образцов были полностью

собраны все 8 сегментов генома вируса, а распределение ридов было более равномерным. Во всех образцах выделенных методами (1) (2) (3) удалось собрать полностью 7 сегментов вируса гриппа в том числе сегмент PB2 (2280 п.о.). Мы предполагаем, что сегмент PB1 хуже амплифицируется в связи с тем, что выбранные праймеры неспецифически отжигаются на нецелевых участках генома, наряду с целевыми. Согласно данным генотипирования, во всех образцах содержался вирус гриппа А/Н1N1 (свиной грипп). Результаты показали, что мы успешно можем проводить секвенирование гриппа А, с качеством достаточным для рутинного мониторинга данного заболевания, используя для выделения нуклеиновых кислот реагенты российского производства.

1. E.S.Kostryukova, N.B.Zakharzhevskaya, et al. Genetic analysis of pandemic influenza A / H1N1 virus during epidemic. 2012 г.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ФИЛЬТРАЦИИ И АНАЛИЗУ ГЕНОМОВ SARS-CoV-2

А.Е. Самойлов

Лаборатория математической биологии и биоинформатики, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Введение. С начала пандемии COVID-19 мировое научное сообщество накопило значительное количество геномных последовательностей SARS-CoV-2 (более 14 млн. в GISAID, более 6 млн. в GenBank). Для выявления особенностей распространения коронавируса необходим анализ накопленных данных с помощью методов молекулярной биологии. Вместе с этим возникает вопрос о качестве исходных данных и необходимость в разработке алгоритмов фильтрации анализируемых геномных последовательностей.

Материалы и методы. Для отработки способов анализа и фильтрации была выбрана линия BA.2 варианта SARS-CoV-2 варианта Omicron (по классификации ВОЗ). В качестве первичных критериев качества последовательности были установлены длина не менее 29 тыс. п. н. и доля N не более 1%. После фильтрации доступных данных, из международной базы данных GISAID был скачан 1243901 геном, а из национальной российской базы данных VGARus - 1764 генома, удовлетворяющих заданным критериям. Названия всех последовательностей были приведены к единому формату. За основу фильтрации по качеству была использована биоинформатическая программа Nextclade, которая позволяет получать информацию о последовательностях SARS-CoV-2 (принадлежность к филогенетической кладе, оценка качества, список мутаций и др.) в виде табличных данных. Для более детального анализа качества последовательностей в полученную таблицу помимо уже имеющихся метрик качества были введены дополнительные. В конечном итоге фильтрация осуществлялась по таким параметрам, как дата забора, линия pangolin, критерии качества Nextclade (все равны "good"), полнота генома, наличие псевдореверсий (т.е. отсутствие мутаций, характерных для линии BA.2), наличие делеций линии BA.2. Также для анализа завозов SARS-CoV-2 в Россию был применён метод анализа филогенетических деревьев методом максимальной парсимонии, основанный на алгоритме Фитча. Филогенетические деревья были построены методом максимального правдоподобия с моделями замен JC и GTR для полных геномов из России и ближайших к ним геномов, полученных из образцов, собранных в других странах.

Результаты. Среди геномов из GISAID ошибки в дате забора и линии панголина содержали 2% геномов, последовательности с низким качеством составляли 12%, последовательности с псевдореверсиями – 12%, неполные геномы без проблем с качеством составляли 32%, полные геномы без проблем с качеством – 41% (512103). Среди российских геномов из VGARus ошибки в дате забора и линии панголина содержали 0% геномов, последовательности с низким качеством составляли 17%, последовательности с псевдореверсиями – 7%, неполные геномы без проблем с качеством составляли 41%, полные геномы без проблем с качеством – 34% (603). Предварительный анализ распространения линии BA.2 в России показал множественное число завозов (159).

Выводы. 1. Геномы SARS-CoV-2, доступные в публичных базах данных, не могут быть проанализированы напрямую без предварительной фильтрации, учитывающей характерные ошибки, возникающие при секвенировании отдельной линии SARS-CoV-2. 2. Линия BA.2 была завезена в Россию не однократно, а более 100 раз (по данным анализа 603 геномов из России), реальное количество завозов может превышать тысячи или десятки тысяч.

СБОРКА ГЕНОВ НА ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ФЕРМЕНТНОЙ И ПРОГРАММНОЙ БАЗЕ

Г.Ю. Фисунов, Д.Р. Харрасов, Т.А. Семашко

Лаборатория системного анализа микроорганизмов, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

В настоящее время актуальна разработка собственной платформы для синтеза последовательностей ДНК. В настоящей работе разработан ряд программ и методов для создания собственной платформы для синтеза ДНК. Платформа включает в себя программное обеспечение (ПО) для дизайна последовательности ДНК и разбиения её на олигонуклеотиды, ПО для роботизированного пулирования олигонуклеотидов и высокоточную ДНК-полимеразу, производимую в НИИ СБМ. На примере последовательности длиной 1500 пар оснований показана работоспособность платформы. Собрана статистика по точности сборки. Итоговая точность сборки составляет 1 ошибку на 1000 пар оснований, что близко к максимально достижимой точности без использования систем коррекции ошибок.

МЕТОД МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ ФОТОННОГО КРИСТАЛЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АЗИРИДИНА ДЛЯ БЕЗМАРКЕРНОГО БИОСЕНСИНГА

Р.И. Шакуров, С.В. Сизова, Д.В. Басманов

Лаборатория микро-и нанофлюидики, НИИ системной биологии и медицины
Роспотребнадзора

Для отслеживания в реальном времени процессов образования и диссоциации биомолекулярных комплексов одним из наиболее перспективных инструментов является использование оптических биосенсоров, использующих изменение параметров возбуждения поверхностных волн в одномерных фотонных кристаллах (ОФК). При этом стадия активации поверхности чипа является одним из важнейших этапов анализа, так как создается матрица для специфической сорбции исследуемых биомолекул. Так, например, ранее нами был предложен метод с активацией поверхности чипа (3-аминопропил)триэтоксисилана и последующим формированием трехмерной матрицы на основе эпоксидекстрана [1]. Однако, использованный метод активации многостадийен, модификация ОФК производится вне микрофлюидной кюветы биосенсора, а время подготовки занимает около часа. Полиэтиленимин (ПЭИ) - катионной полимерное производное азиридина, широко применяющееся в биологических приложениях. В данной работе предложено использовать его в качестве материала для быстрого, эффективного и воспроизводимого способа активации чувствительного слоя ОФК в реальном времени.

Модифицируя поверхность ОФК ПЭИ линейной и разветвленной конфигураций, непосредственно в микрофлюидной кювете биосенсора, из водного раствора концентрацией 1 мг/мл, удалось достичь покрытия сопоставимой сорбционной ёмкости с полученной в работе [1], при сокращении времени на подготовку биочипа и проведение исследования.

Полученные покрытия были охарактеризованы методом атомно-силовой микроскопии в жидкой фазе. Высказано предположение о механизме увеличения сорбционной ёмкости связанное как с большим количеством сайтов связывания в ПЭИ_{развл}, так более сложным подходом основанном на реакции кросс-сшивки.

Предложенный подход показал свою работоспособность, позволяя получать покрытия сравнимые с уже известными по характеристике сорбционной ёмкости, и меньших затратах времени.

1. Sizova, S.; Shakurov, R.; Mitko, T.; Shirshikov, F.; Solovyeva, D.; Konopsky, V.; Alieva, E.; Klinov, D.; Bespyatykh, J.; Basmanov, D. The Elaboration of Effective Coatings for Photonic Crystal Chips in Optical Biosensors. *Polymers (Basel)* **2022**, *14*, doi:10.3390/polym14010152.