

ТОО «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР БИОТЕХНОЛОГИИ»
(ТОО «НЦБ»)

УДК 606:616-056.7

МРНТИ 76.03.00

№ госрегистрации 0124РК01157



УТВЕРЖДАЮ

Управляющий директор по науке

ТОО «Национальный центр

биотехнологии», к.х.н.

Национальный центр биотехнологии

М.Б. Жумабекова
2025 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНЫХ, ГЕНОМНЫХ И ПРОТЕОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН
(промежуточный)
Шифр программы Ф.1350

Подпрограмма 101 «Программно-целевое финансирование субъектов научной и/или
научно-технической деятельности»
Приоритетное направление «Наука о жизни и здоровье»

Руководитель НИР,
зав. лаб., Ph.D., проф.

П.В. Тарлыков

Астана 2025

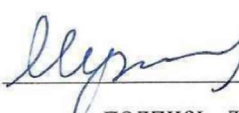
СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР:
Зав. лаб., Ph.D., проф.

 22.10.25 П.В. Тарлыков
подпись, дата (введение, основная часть,
заключение)

Исполнители:

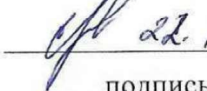
Гл. науч. сотр., д-р биол.наук,
проф.

 22.10.25 К.Н. Мукантаев
подпись, дата (раздел 3.7-3.8)

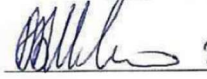
Гл. науч. сотр., канд.хим.наук,
проф.

 22.10.2025 Б.Б. Хасенов
подпись, дата (раздел 3.9-3.10)

Гл. науч. сотр., канд.биол.наук,
ассоц. проф.

 22.10.2025 Е.В. Жолдыбаева
подпись, дата (раздел 3.1-3.3)

Гл. науч. сотр.,
канд.биол.наук

 22.10.2025 А.Б. Шевцов
подпись, дата (раздел 3.1-3.3)

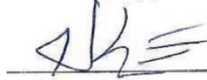
Гл. науч. сотр.,
канд.биол.наук

 22.10.25 О.Н. Хапилина
подпись, дата (раздел 3.14-3.16)

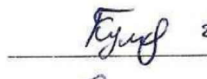
Гл. науч. сотр., Ph.D

 22.10.25 С.К. Абельденов
подпись, дата (раздел 3.10-3.11)

Гл. науч. сотр., канд.хим.наук,
ассоц. проф.

 22.10.25 А.Т. Кулыясов
подпись, дата (раздел 3.5)

Гл. науч. сотр., Ph.D., ассоц. проф.

 22.10.25 Г.Н. Кулмамбетова
подпись, дата (раздел 3.4)

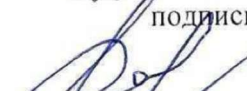
Гл. науч. сотр., Ph.D., ассоц. проф.

 22.10.25 Е.О. Остапчук
подпись, дата (раздел 3.13)

Вед. науч. сотр., канд.вет.наук,
ассоц. проф.

 22.10.25 М.А. Куйбагаров
подпись, дата (раздел 3.1-3.3)

Вед. науч. сотр., д-р биол. наук

 22.10.25 М.И. Филипенко
подпись, дата (раздел 3.1-3.3)

Вед. науч. сотр., проф., доц.
генетики

 22.10.25 Р.Н. Календарь
подпись, дата (раздел 3.1-3.3,3.16)

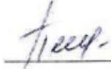
Вед. науч. сотр., канд.биол.наук,
проф.

 22.10.25 Ю.А. Скиба
подпись, дата (раздел 3.13)

Вед. науч. сотр., канд.биол.наук,
ассоц. проф.

 22.10.25 А.С. Низкородова
подпись, дата (раздел 3.13)

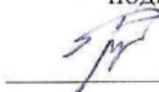
Вед. науч. сотр., PhD, ассоц.проф.

 22.10.25 Ю.В. Перфильева
подпись, дата (раздел 3.13)

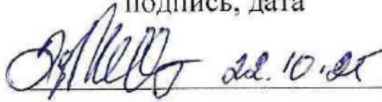
Вед. науч. сотр., к.м.н.

 22.10.25 М.Ф. Баянова
подпись, дата (раздел 3.1)

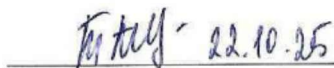
Ст.науч. сотр., PhD

 22.10.25 К.А. Турсунов
подпись, дата (раздел 3.7-3.8)

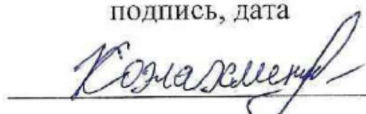
Ст. науч. сотр.

 22.10.25 Ж. Әдіш
подпись, дата (раздел 3.7-3.8)

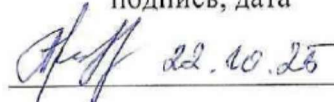
Ст. науч. сотр., PhD

 22.10.25 А.М. Тургимбаева
подпись, дата (раздел 3.10-3.11)

Ст. науч.сотр., канд.биол.наук,
ассоц.проф.

 22.10.25 С.С. Кожаметова
подпись, дата (раздел 3.1-3.3)

Ст. науч. сотр.

 22.10.25 А.С. Мусахметов
подпись, дата (раздел 3.9-3.10)

Ст. науч. сотр., PhD

 22.10.25 Ж.Д. Акишев
подпись, дата (раздел 3.9-3.10)

Ст. науч. сотр., PhD

 22.10.25 С.А. Актаева
подпись, дата (раздел 3.9-3.10)

Научн. сотр.

 22.10.25 С.Ш. Атавлиева
подпись, дата (раздел 3.6)

Научн.сотр.

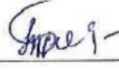
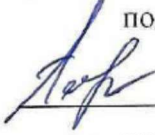
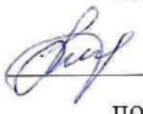
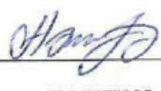
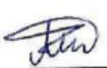
 22.10.25 Д.С. Баянбек
подпись, дата (раздел 3.4)

Научн. сотр.

 22.10.25 М.А. Мамлин
подпись, дата (раздел 3.4)

Научн. сотр.

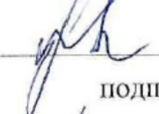
 22.10.25 Л.А. Тохтарова
подпись, дата (раздел 3.7-3.8)

Научн. сотр., PhD	 22.10.25	А.Д. Каиржанова
	подпись, дата	(раздел 3.1-3.3)
Научн. сотр	 22.10.25	Д.С. Тагиманова
	подпись, дата	(раздел 3.15-3.16)
Научн. сотр.	 22.10.25	О.Б. Райзер
	подпись, дата	(раздел 3.15-3.16)
Научн. сотр.	 22.10.25	А.О. Амиргазин
	подпись, дата	(раздел 3.1-3.3)
Научн.сотр.	 22.10.25	Д.А. Найзабаева
	подпись, дата	(раздел 3.13)
Научн. сотр.	 22.10.25	А.О. Бисенбай
	подпись, дата	(раздел 3.13)
Научн. сотр.	 22.10.25	Д.К. Камалова
	подпись, дата	(раздел 3.1-3.3)
Научн. сотр.	 22.10.25	Д.Б. Канаев
	подпись, дата	(раздел 3.7-3.8)
Научн. сотр	 22.10.25	А.С. Туржанова
	подпись, дата	(раздел 3.15-3.16)
Мл. научн.сотр.	 22.10.25	А.Ж. Аюпова
	подпись, дата	(введение, реферат)
Мл. научн.сотр.	 22.10.25	М.А. Рахимбергенова
	подпись, дата	(введение, реферат)
Мл. научн.сотр.	 22.10.25	Д.Н. Ауганова
	подпись, дата	(раздел 3.6)
Мл. научн.сотр.	 22.10.25	М. Нуртлеу
	подпись, дата	(раздел 3.7-3.8)
Мл. научн.сотр.	 22.10.25	Б.Е. Абирбеков
	подпись, дата	(раздел 3.7-3.8)
Мл. научн.сотр.	 22.10.25	М.Ж. Аманжолова
	подпись, дата	(раздел 3.11-3.12)

Мл. научн. сотр.

 22.10.25 А.Ж. Рыскельдина (раздел 3.1)
подпись, дата

Мл. научн. сотр.

 22.10.25 А.А. Романова
подпись, дата (раздел 3.1-3.3)

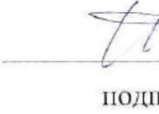
Мл. научн. сотр.

 22.10.25 А.Ж. Данияров
подпись, дата (раздел 3.1-3.3)

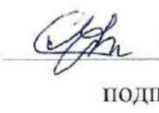
Мл. научн. сотр.

 22.10.25 А. Бекбаева
подпись, дата (раздел 3.1-3.3)

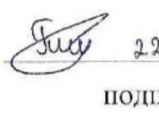
Мл. научн. сотр.

 22.10.25 В.А. Шевцов
подпись, дата (раздел 3.15-3.16)

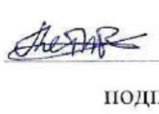
Мл. научн. сотр.

 22.10.25 С.М. Магзумова
подпись, дата (раздел 3.15-3.16)

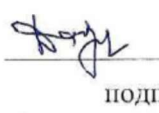
Мл. научн. сотр.

 22.10.2025 А.Д. Гусмаулемова
подпись, дата (раздел 3.4)

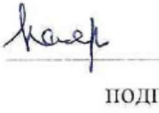
Лаборант

 22.10.25 Т. Жумадилов
подпись, дата (раздел 3.7-3.8)

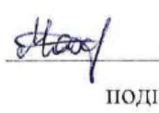
Лаборант

 22.10.2025 А.Е. Даулетов
подпись, дата (раздел 3.2)

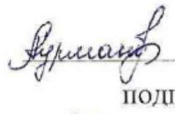
Лаборант

 22.10.2025 О.М. Қасен
подпись, дата (раздел 3.2)

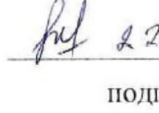
Лаборант

 22.10.2025 С.А. Махсатова
подпись, дата (раздел 3.5)

Лаборант

 22.10.2025 А.Б. Құрманбай
подпись, дата (раздел 3.5)

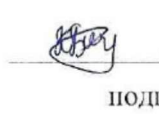
Лаборант

 22.10.2025 А.Б. Төлеужанова
подпись, дата (раздел 3.1-3.3)

Лаборант

 22.10.2025 Д.А. Бапарова
подпись, дата (раздел 3.1-3.3)

Лаборант

 22.10.2025 Б.А. Курентай
подпись, дата (раздел 3.4)

Лаборант

Куз- 22.10.25 А.В. Кулигин
подпись, дата (раздел 3.13)

Лаборант

Май- 22.10.25 А.А. Конарбаева
подпись, дата (раздел 3.6)

Лаборант

Остров- 22.10.25 А.С. Островский
подпись, дата (раздел 3.2)

Нормоконтролер

Аюпова- 22.10.25 А.Ж. Аюпова
подпись, дата

РЕФЕРАТ

Отчет 131 с., 41 рис., 5 табл., 93 источн, 7 прил.

СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ, ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА, МЕДИЦИНСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ, ДИАГНОСТИКА, ГЕНОМИКА, ПРОТЕОМИКА

Объекты исследования – фенилкетонурия, MODY-диабет, синдром Альпорта, болезнь Гоше, инсульт, колоректальный рак, *Acinetobacter baumannii*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia miyamotoi*.

Цель работы – разработать клеточные, геномные и протеомные технологии для диагностики социально-значимых заболеваний в Республике Казахстан.

Методы исследования: в процессе работы использовались клеточные, молекулярно-генетические и масс-спектрометрические методы.

Полученные результаты: проведена проверка работоспособности праймеров и оптимизированы условия ПЦР реакции для амплификации целевых регионов генов. Собран биоматериал от условно-здоровых людей, а также пациентов с диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет, синдром Альпорта, колоректальный рак, болезнь Гоше. Проведен скрининг мутаций KRAS/BRAF. Применена оптимизированная методика иммунодеплеции плазмы крови у экспериментальных животных. Получен рекомбинантный гексон аденовируса типа 3 и отработаны условия его очистки. Разработан и оптимизирован состав реакционной смеси тест-систем. Получен штамм-продуцент и наработана рекомбинантная обратная транскриптаза в клетках *E. coli*. Проведен подбор универсальных праймеров для амплификации генетических маркеров используемых в ДНК-баркодировании растений. Проведено определение генетических маркеров устойчивости к антибиотикам.

Новизна полученных результатов – была показана возможность применения клеточных, геномных и протеомных технологий для диагностики социально-значимых заболеваний в Республике Казахстан.

Степень внедрения – во второй год выполнения программы внедрение результатов ее выполнения не было запланировано.

Основные, основные конструктивные и технико-экономические показатели – разработаны высокочувствительные и точные методы диагностики заболеваний.

Экономическая эффективность – использование разрабатываемых методов диагностики непосредственно связано с улучшением качества жизни пациентов, снижением затрат на лечение пациентов, и уровня инвалидизации пациентов.

Область применения – медицина и здравоохранение.

ТҰЖЫРЫМ

Есеп 131 бет, 41 сурет, 5 кесте, 93 әдебиет көзі, 7 қосымша

ӘЛЕУМЕТТІК МАҢЫЗЫ БАР АУРУ, ДЕРБЕСТЕНДІРІЛГЕН МЕДИЦИНА, МЕДИЦИНАЛЫҚ БИОТЕХНОЛОГИЯ, ДИАГНОСТИКА, ГЕНОМИКА, ПРОТЕОМИКА

Зерттеу нысаны – фенилкетонурия, MODY-диабеті, Альпорт синдромы, Гоше ауруы, инсульт, колоректальды қатерлі ісік, *Acinetobacter baumannii*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia miyamotoi*.

Жұмыстың мақсаты – Қазақстан Республикасындағы әлеуметтік-маңызы бар ауруларды анықтауға бағытталған жасушалық, геномдық және протеомдық технологияларды әзірлеу.

Зерттеу әдістері: жұмыс барысында жасушалық, молекулалық-генетикалық және масс-спектрометриялық әдістер қолданылды.

Зерттеулер нәтижелері: праймер панельдерінің жобасы жүргізілді. Алынған нәтижелер: праймерлердің өнімділігін тексеру жұмыстары жүргізілді және гендегі мақсатты аймақтарды амплификациялау үшін ПТР реакциясының шарттары оңтайландырылды. Шартты түрде сау адамдардан, сондай-ақ фенилкетонурия, MODY қант диабеті, Гоше, Альпорт синдромы, колоректальды қатерлі ісік диагнозы қойылған пациенттерден биоматериалдар жиналынды. KRAS/BRAF мутациясының скринингі жүргізілді. Эксперименттік жануарлардың қан плазмасын иммуносупрессиялаудың оңтайландырылған әдісі қолданылды. 3 типті аденовирустың рекомбинантты гексоны алынып, оны тазарту шарттары анықталды. Тест-жүйелерінің реакциялық қоспасының құрамы әзірленіп, оңтайландырылды. Штамм-өндірушісі алынып, рекомбинантты кері транскриптаза *E. coli* жасушаларында жинақталды. ДНҚ баркодтау кезінде қажетті өсімдіктердің генетикалық маркерлерін амплификациялау үшін қолданылатын әмбебап праймерлер таңдалынды. Антибиотиктерге төзімділікті анықтайтын генетикалық маркерлер айқындалды.

Алынған нәтижелердің жаңалығы – Қазақстан Республикасында әлеуметтік маңызы бар ауруларды диагностикалау үшін жасушалық, геномдық және протеомдық технологияларды қолдану мүмкіндігі бар екендігі көрсетілді.

Орындалу дәрежесі – бағдарламаны орындаудың екінші жылында нәтижелерді іске асыру жоспарланбады.

Негізгі, негізгі-конструктивтік және техника-экономикалық көрсеткіштері – ауруларды диагностикалаудың жоғары сезімтал және дәл әдістері әзірленді.

Экономикалық тиімділігі – әзірленген диагностикалық әдістерді қолдану пациенттердің өмір сүру сапасын жақсартуға, науқастарды емдеуге кететін шығындарды азайтуға және науқастардың мүгедектік деңгейін төмендетуге тікелей байланысты.

Қолдану саласы – медицина және денсаулық сақтау.

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ	11
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	12
ВВЕДЕНИЕ.....	13
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА О НИР.....	17
1 Выбор направления исследований	17
2 Материалы и методы исследования	24
2.1 Объекты исследований.....	24
2.2 Дизайн панелей праймеров.....	24
2.3 Выделение ДНК.....	25
2.4 Патентно-информационный поиск.....	25
2.5 Пробоподготовка образцов для масс-спектрометрического анализа.....	26
2.6 Масс-спектрометрический анализ.....	26
2.7 Разработка иммунохроматографического теста.....	27
2.8 Секвенирование гена 16S рРНК.....	27
2.9 ПЦР в реальном времени.....	27
2.10 Биоинформатический анализ и выбор последовательностей.....	27
2.11 Клонирование, модификация и секвенирование генов.....	28
2.12 Разработка базы данных и программного обеспечения	28
3 Результаты и их обсуждение	29
3.1 Сбор биоматериала и формирование коллекции образцов	29
3.2 Проверка работоспособности праймеров и оптимизация условий ПЦР	35
3.3 Апробация отработанных условий на контрольных образцах ДНК	43
3.4 Генетический анализ и валидация результатов скрининга мутаций.....	47
3.5 Иммунодеплеция плазмы крови и масс-спектрометрический анализ	51
3.6 Определение активности фермента β -глюкоцереброзидазы	56
3.7 Получение рекомбинантного гексона аденовируса	58
3.8 Получение рекомбинантного VP4 антигена ротавируса	59
3.9 Экспрессия гена обратной транскриптазы и получение штамма-продуцента ..	61
3.10 Проверка активности рекомбинантной обратной транскриптазы	64
3.11 Определение генетических маркеров устойчивости к антибиотикам	67
3.12 Дизайн и синтез CRISPR-РНК, проведение CRISPR-детекции.....	69

3.13 Оптимизация состава реакционной смеси тест-системы, получение образцов положительного контроля.....	72
3.14 Подбор универсальных праймеров для амплификации генетических маркеров используемых в ДНК-баркодировании растений.....	76
3.15 Формирование ДНК коллекции фармакопейных стандартных образцов.....	78
3.16 Приготовление библиотек и высокопроизводительное секвенирование ДНК лекарственных видов растений.....	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	84
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	88
ПРИЛОЖЕНИЕ А – Календарный план работ на 2024-2026 гг.....	96
ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Список опубликованных работ.....	109
ПРИЛОЖЕНИЕ В – Оттиски публикаций.....	111
ПРИЛОЖЕНИЕ Г – Отчет о патентных исследованиях.....	120
ПРИЛОЖЕНИЕ Д – Распределение картированных ридов по парам праймеров.....	125
ПРИЛОЖЕНИЕ Е – Нуклеотидная последовательность фрагментов генов резистентности.....	128
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж – Схема плазмиды pET-GlpQ.....	131

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие термины с соответствующими определениями

Антиген	– вещество, воспринимаемое организмом как чужеродное и вызывающее специфический иммунный ответ
Антитела	– синтезируемые В-лимфоцитами белки в ответ на попадание в организм различных антигенов и специфически с ними взаимодействующие с образованием комплекса «антиген – антитело»
Ген	– транскрибируемый участок хромосомы, кодирующий функциональный белок либо тРНК или рРНК
Генотипирование	– метод, основанный на новейших достижениях в области биотехнологии, позволяющий проводить индивидуальное сравнение генотипов разных людей
Мутация	– стойкое (то есть такое, которое может быть унаследовано потомками данной клетки или организма) изменение генотипа, происходящие под влиянием внешней или внутренней среды
Настой	– водная вытяжка лекарственного сырья преимущественно из мягких частей растений (травы, листьев, цветков)
Полимеразная цепная реакция	– метод амплификации фрагментов нуклеиновых кислот <i>in vitro</i>
Праймер	– короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонуклеотид), комплементарный ДНК или РНК мишени, служит затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы, а также при репликации ДНК
Сбор лекарственный	– фармацевтический препарат, представляющий собой смесь нескольких видов измельченного или цельного лекарственного растительного сырья
Секвенирование	– определение первичной структуры ДНК, то есть последовательности расположения нуклеотидных остатков в полинуклеотидной цепи ДНК
Экстракт	– концентрированное извлечение из лекарственного растительного сырья

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения

БГ	– болезнь Гоше
БСК	– болезни системы кровообращения
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ГФА	– гиперфенилаланинемия
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	– дезоксирибонуклеозидтрифосфат
ИФА	– иммуноферментный анализ
ИХА	– иммунохроматографический анализ
кДа	– обозначение молекулярного веса белков
KRP	– колоректальный рак
ПААГ	– полиакриламидный гель
П.н.	– пара нуклеотидов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РНКП	– РНК полимераз
СД	– сахарный диабет
СД2	– сахарный диабет второго типа
ТЛЧ	– тест на лекарственную чувствительность
ФАГ	– фенилаланингидроксилаза
ФКУ	– фенилкетонурия
FDR	– false discovery rate
LB	– Lysogeny broth
NCBI	– National Center for Biotechnology Information
NGS	– next-generation sequencing
MODY	– maturity-onset diabetes of the young
PAH	– phenylalaninehydroxylase gene
pET28	– plasmid for expression by T7 RNA polymerase
pET32	– plasmid for expression by T7 RNA polymerase
PBS	– phosphate buffered saline
TFA	– trifluoroacetic acid
TOF	– time of flight

ВВЕДЕНИЕ

В Республике Казахстан государственная политика в сфере здравоохранения придаёт особое значение разработке высокочувствительных и высокоспецифичных методов диагностики широкого спектра заболеваний. Кроме того, в стране утвержден перечень социально-значимых заболеваний, утверждённый приказом Министра здравоохранения Республики Казахстан от 23 сентября 2020 года № ҚР ДСМ-108/2020, который включает орфанные патологии, злокачественные новообразования, сахарный диабет, ряд сердечно-сосудистых и инфекционных болезней, а также заболевания нервной системы и другие нозологические формы.

В рамках реализуемой научно-технической программы предусматривается разработка современных методов и технологий для ранней и высокоточной диагностики ряда социально-значимых заболеваний с применением клеточных, геномных и протеомных подходов, а также передовых инструментальных платформ — секвенирования нового поколения (NGS), масс-спектрометрии, цифровой и количественной ПЦР, технологий CRISPR/Cas, ДНК-баркодирования.

Отдельным направлением программы является разработка методик ранней диагностики орфанных заболеваний, включая фенилкетонурию и болезнь Гоше, а также синдрома Альпорта, MODY-диабета, ишемического инсульта и колоректального рака. Запланировано создание технологий и тест-систем для детекции инфекционных агентов бактериальной природы (*Borrelia burgdorferi*, *Borrelia miyamotoi*, *Acinetobacter baumannii*) и вирусного происхождения (рота- и аденовирусы).

Для последующего налаживания отечественного производства диагностических наборов предполагается разработка технологии получения термостабильных РНК- и ДНК-зависимых полимераз, используемых в ПЦР-системах, а также внедрение высокоточной ДНК-технологии аутентификации фитопрепаратов. Реализация данных разработок призвана повысить качество лабораторной и клинической диагностики в Казахстане, и укрепить её конкурентоспособность на международном уровне, способствуя более широкому внедрению современных молекулярных технологий в практическое здравоохранение и улучшению качества жизни пациентов.

Таким образом, для достижения прогресса в этом актуальном направлении была сформулирована главная цель нашего исследования и определены его задачи.

Цель — разработать клеточные, геномные и протеомные технологии для диагностики социально-значимых заболеваний в Республике Казахстан.

Задачи программы:

1. Разработка метода таргетного секвенирования гена фенилаланингидроксилазы

для диагностики фенилкетонурии, а также разработка таргетных панелей для диагностики MODY диабета, и диагностики синдрома Альпорта на основе секвенирования нового поколения. Изучение распределения мутаций в генах KRAS/BRAF при колоректальном раке на основе высокочувствительного метода диагностики редких мутаций.

2. Разработка метода диагностики болезни Гоше; разработка метода определения протеомных биомаркеров инсульта на основе масс-спектрометрии.

3. Разработка метода иммунохроматографического анализа для определения иммунного статуса против рота- и аденовирусных инфекций с применением коллоидного золота и квантовой точки. Разработка технологии детекции антибиотикорезистентности внутрибольничных инфекций на основе CRISPR/Cas для *Acinetobacter baumannii*. Разработка отечественной тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для выявления и дифференциации возбудителей Лайм-боррелиоза (*Borrelia burgdorferi sensu lato*) и клещевой возвратной лихорадки, вызываемой *Borrelia miyamotoi*.

4. Разработка технологии получения термостабильных РНК и ДНК зависимых полимераз для молекулярно-генетической детекции возбудителей урогенитальных инфекций. Разработка технологии аутентификации фитопрепаратов, используемых в педиатрической практике, с использованием ДНК-баркодинга и высокопроизводительного секвенирования.

В соответствии с поставленной целью и задачами, на 2025 год были запланированы следующие работы (Приложение А):

5. Проверка работоспособности праймеров и оптимизация условий ПЦР реакции для амплификации целевых регионов генов *PAH*, *HNF4A*, *GCK*, *HNF1A*, *IPF1/PDX1*, *HNF1B*, *NEUROD1*, *KLF11*, *CEL*, *PAX4*, *INS*, *BLK*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *APPL1*, *WSF1*, *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*, *COL4A6*.

6. Сбор биоматериала от условно-здоровых людей, а также пациентов с диагнозом болезнь Гоше для последующего масс-спектрометрического анализа. Использование оптимизированной методики иммунодеплеции плазмы крови у экспериментальных животных.

7. Получение рекомбинантного гексона аденовируса типа 3 и отработка условий его очистки. Разработать и оптимизировать состав реакционной смеси тест-системы. Отработать режим термоциклирования для выбранного состава тест-системы.

8. Экспрессия гена обратной транскриптазы в клетках *E. coli* и получение штамма-продуцента. Нарботка рекомбинантной обратной транскриптазы в клетках *E. coli*, выделение и очистка фермента. Подбор универсальных праймеров для амплификации генетических маркеров используемых в ДНК-баркодировании растений.

9. Продолжение работ по формированию коллекции образцов для таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Продолжение формирования группы исследования по колоректальному раку согласно критериям. Скрининг мутаций KRAS/BRAF.

10. Подготовка иммунодеплетированных образцов из плазмы крови экспериментальных животных для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.

11. Определение генетических маркеров устойчивости к антибиотикам. Пополнение коллекции фармакопейных стандартных образцов лекарственных растений. Формирование ДНК коллекции ваучерных (фармакопейных стандартных образцов), а также образцов из лекарственного сырья и фитопрепаратов.

12. Апробация отработанных условий на контрольных образцах ДНК и оценка покрытия секвенирования целевых участков генов *PAH, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6*. Валидация результатов скрининга мутаций KRAS/BRAF.

13. Определение активности фермента β -глюкоцеребозидазы в контрольных и экспериментальных образцах на основе квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии. Подготовка иммунодеплетированных образцов для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.

14. Получение рекомбинантного VP4 антигена ротавируса человека и отработка условий его очистки. Определение иммунохимических и диагностических свойств рекомбинантных антигенов. Дизайн и синтез CRISPR-PHK. Проведение CRISPR-детекции генетических детерминант резистентности. Клонировать последовательности выбранных для тест-системы фрагментов в плазмиды для получения образцов положительного контроля.

15. Проверка активности рекомбинантной обратной транскриптазы, подбор буфера хранения и оптимизация состава реакционного буфера. Оптимизация условий получения рекомбинантной обратной транскриптазы в полупромышленных условиях. Оптимизация условий ПЦР амплификации на коллекции ДНК лекарственных видов растений, приготовления библиотек и высокопроизводительного секвенирования.

Метрологическая обеспеченность НИР: все средства измерений и испытательное оборудование, использованные при проведении научных исследований, прошли процедуры поверки и аттестации в соответствующих аккредитованных органах (ТОО

«KazMedServiceGroup»). Исследования проводятся на базе лаборатории протеомики и масс-спектрометрии, Национальной научной лаборатории биотехнологии коллективного пользования, лаборатории прикладной генетики, лаборатории генетики и биохимии микроорганизмов, лаборатории иммунохимии и иммунобиотехнологии, лаборатории молекулярной биотехнологии, лаборатории геномики растений и биоинформатики ТОО «Национальный центр биотехнологии», а также в филиале ТОО «Национальный центр биотехнологии» в г. Алматы. Для выполнения данной программы имеются необходимые соответствующие помещения и коммуникации. Лаборатории исполнителя оснащены всем необходимым оборудованием: ламинарные боксы, ПЦР-амплификаторы, термостаты, центрифуги, секвенаторы, масс-спектрометры, камеры для электрофореза, холодильники и морозильные камеры. В выполнении запланированных работ принимали участие врачи Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии, ТОО «Национальный научный онкологический центр», Национального научного центра материнства и детства, и другие специалисты.

Патентные исследования. В результате проведенного патентного поиска на веб-ресурсе www.kazpatent.kz, содержащего реестр казахстанских патентов, сходства с предлагаемыми задачами обнаружено не было (приложение Г).

Регистрационный номер промежуточного отчета за 2024 г.: 0124PK01157.

Уровень готовности технологии. Уровень готовности технологии для естественных наук, к которому относится данная программа, – категория А, уровень готовности технологии (УГТ/TRL) – 2, так как были опубликованы научные публикации с описанием результатов изучения объектов исследования.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА О НИР

1 Выбор направления исследований

Выбор направления настоящего исследования обусловлен необходимостью внедрения в Казахстане интегрированных мультиомных подходов, основанных на передовых инструментальных платформах — секвенировании нового поколения, масс-спектрометрии, цифровой и количественной полимеразной цепной реакции, а также технологиях редактирования генома CRISPR/Cas и ДНК-баркодировании. В мировой практике эти методы формируют основу персонализированной медицины и молекулярной диагностики, обеспечивая высокую чувствительность и специфичность детекции биомолекулярных маркеров заболеваний.

Одним из ключевых приоритетов является использование методов NGS для разработки таргетных панелей диагностики моногенных заболеваний, таких как ФКУ, MODY-диабет и синдром Альпорта. При несвоевременном лечении эти заболевания имеют серьезные клинические последствия, что делает их своевременное генетическое тестирование актуальной задачей. Применение NGS позволяет выявлять как известные, так и новые мутации в генах, ассоциированных с этими патологиями, что повышает точность диагностики и улучшает прогнозирование.

Фенилкетонурия представляет собой одно из первых наследственных заболеваний обмена веществ, для которого был внедрён неонатальный скрининг. Однако современные данные показывают значительную генетическую гетерогенность мутаций в гене PANK, что требует перехода от классических методов к высокопроизводительным технологиям секвенирования для точного молекулярного подтверждения диагноза. По состоянию на 2 ноября 2022 года в базе данных PANKdb собрано 1583 типа вариантов PANK, включая миссенс-варианты, варианты со сдвигом рамки считывания, синонимичные варианты и варианты сплайсинга, вариации в нетранслируемых областях (UTR) и крупномасштабные делеции. Эти вариации, в основном, сосредоточены в экзонах и на границах экзон-интрон. Учитывая высокую генетическую вариабельность мутаций в гене PANK методы, основанные на мультиплексной ПЦР, и мультиплексной амплификации лигированных зондов, имеют ограничения в обнаружении возможных мутаций, связанных с ФКУ. В связи с этим методы секвенирования являются единственной альтернативой для идентификации мутаций. В случае ФКУ разработка таргетного секвенирования гена PANK обеспечивает возможность точной дифференциальной диагностики и улучшает генетическое консультирование [1-10]. Благодаря идентификации редких мутаций можно оптимизировать лечение, включая применение препаратов, таких как тетрагидробиоптерин, для пациентов с определёнными генотипами. В свою очередь, в рамках выполнения программы особое внимание было

уделено моногенным формам диабета MODY, которые часто ошибочно диагностируются как диабет 1-го или 2-го типа. Панели для диагностики MODY-диабета нацелены на выявлении мутаций в ключевых генах (HNF1A, HNF4A, GCK и других), что позволяет персонализировать лечение, включая отказ от инсулинотерапии в ряде случаев [11-15]. Аналогично, синдром Альпорта, характеризующийся мутациями в коллагеновых генах IV типа, требует многоцелевого анализа с применением NGS-панелей, позволяющих одновременно исследовать несколько генов и обеспечивать дифференциальную диагностику. Для синдрома Альпорта разработка панелей диагностики на основе NGS способствует выявлению мутаций в генах коллагена IV типа (COL4A3, COL4A4, COL4A5), что особенно важно для раннего выявления клинического течения заболевания [16-22].

Не менее актуальным и социально-значимым направлением данной программы является онкогенетика. Анализ распределения мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* при колоректальном раке, третьем по распространенности онкологическом заболевании в мире, направлен на улучшение диагностики и прогнозирования этого заболевания [23-27]. Одним из ключевых направлений в онкологии является изучение молекулярных механизмов канцерогенеза и поиск генетических маркеров, позволяющих персонализировать терапевтические подходы. Важную роль в развитии и прогрессии КРР играют мутации в онкогенах *KRAS* и *BRAF*, участвующих в регуляции сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK, контролирующего пролиферацию и выживание клеток. По различным данным, мутации гена *KRAS* выявляются примерно у 35–45% пациентов с КРР, а мутации *BRAF* – у 8–12%. Эти изменения ассоциированы с неблагоприятным прогнозом, резистентностью к анти-EGFR терапии и особенностями клинико-патологического течения заболевания. Использование таких технологий как цифровой ПЦР, обеспечивает высокую чувствительность в обнаружении редких мутаций, что имеет решающее значение для выбора подходящего лечения. Кроме того, исследование этнических и географических особенностей появления мутаций способствует разработке диагностических протоколов, учитывающих этнические особенности популяции Казахстана.

Второе направление программы связано с развитием клеточных и протеомных технологий для идентификации биомаркеров и оптимизации лабораторной диагностики. Определение активности фермента β -глюкоцереброзидазы в образцах сухих пятен крови для диагностики болезни Гоше и методы диагностики инсульта с использованием масс-спектрометрии обеспечивает возможность практически неинвазивной и высокоточной диагностики. В рамках данной научной программы будут разработаны отечественные методы диагностики болезни Гоше и инсульта на основе масс-спектрометрического анализа. Болезнь Гоше относится к лизосомным болезням накопления, характеризующимся

дефицитом фермента β -глюкоцереброзидазы, приводящим к накоплению глюкоцереброзида в макрофагах и последующим повреждениям печени, селезёнки, костного мозга и других органов. Основными методами диагностики БГ являются биохимические анализы оценки активности ферментов, молекулярно-генетическое тестирование и измерение уровней биомаркеров [1, 28-33]. Однако традиционные методы часто сталкиваются с ограничениями в чувствительности и специфичности. Использование масс-спектрометрии стало важным дополнением к существующим подходам, позволяя выявлять биомаркеры, такие как Lyso-Gb1, на самых ранних стадиях заболевания. Анализ активности ферментов, используя сухие пятна крови – это относительно недорогой способ диагностики ЛБН, для которого используется минимальное количество биологического материала. Данная технология подразумевает забор небольшого количества крови у новорожденных или у взрослых пациентов, капля высушивается на фильтровальной бумаге и далее анализируется, используя tandemную масс-спектрометрию. Настоящее исследование было направлено на определение активности фермента β -глюкоцереброзидазы в образцах биоматериала от условно-здоровых людей и пациентов с диагнозом болезнь Гоше методом квадрупольно-времяпролётной масс-спектрометрии.

Инсульт, являющийся одной из ведущих причин смертности и инвалидности, требует высокочувствительных методов диагностики, которые позволят обнаруживать заболевание на самых ранних этапах. Протеомика, изучающая белковый состав биологических образцов, открывает новые горизонты в поиске биомаркеров инсульта [34-40]. Основным инструментом в данном подходе является масс-спектрометрия, которая обеспечивает высокую точность идентификации белков [41, 42]. Современный масс-спектрометр позволяет получать детализированные данные об аминокислотных последовательностях и структурных особенностях белков [38, 43]. Особые трудности в этом направлении связаны с необходимостью пробоподготовки образцов, так как наличие даже минимальных концентраций посторонних веществ может снижать точность анализа. Поэтому разработка методов очистки плазмы крови становится ключевым этапом в исследовании. В отличие от традиционных методов, которые могут быть менее специфичными и давать ложноположительные результаты, масс-спектрометрия обеспечивает точность выявления биомаркеров.

Третье направление охватывает вирусологические и микробиологические исследования, направленные на создание отечественных диагностических систем. Стоит отметить, что современная медицинская наука сталкивается с необходимостью разработки инновационных подходов для диагностики инфекционных заболеваний, антибиотикорезистентности и зоонозных инфекций, что обусловлено ростом глобальных

угроз общественному здравоохранению. В рамках данной программы будут разработаны тест-системы и новые технологии, основанные на иммунохроматографии, CRISPR/Cas и полимеразной цепной реакции в реальном времени для совершенствования диагностики и контроля за инфекционными заболеваниями.

Ротавирусные и аденовирусные инфекции являются одной из ведущих причин гастроэнтеритов и других осложнений, особенно у детей младшего возраста и пациентов с ослабленным иммунитетом. Несмотря на существующие методы диагностики, такие как ИФА и ПЦР, существует необходимость создания более доступных, быстрых и точных решений, позволяющих проводить анализы в полевых условиях или без специализированного оборудования. Введение методов ИХА с применением коллоидного золота и квантовых точек обеспечивает возможность оперативного выявления патогенов и оценки иммунного статуса пациентов. Современные технологии, такие как синтез ДНК-последовательностей *de novo* и получение моноклональных антител, значительно расширяют возможности оптимизации тест-систем. Методы ИХА активно применяются в диагностике вирусных заболеваний, включая аденовирусную и ротавирусную инфекции человека. Наибольшую диагностическую значимость представляют такие белки вирусов, как гексон аденовируса и антиген VP4 ротавируса. Гексон аденовируса выступает в качестве доминантного нейтрализующего антигена, причем антигексонные антитела эффективно ингибируют вирусную инфекцию. Анализ гипервариабельных регионов гексона позволяет типировать циркулирующие штаммы, оценивать иммунологическую изменчивость и определять эпидемиологические закономерности распространения вируса. VP4 антиген ротавируса это негликозилированный белок, формирующий шиповидные выступы на поверхности зрелых вирионов, внешняя оболочка которых преимущественно представлена гликопротеином VP7. Этот белок выполняет ряд критически важных функций, включая связывание с клеткой, проникновение, гемагглютинацию, нейтрализацию, а также определяет вирулентность вируса и его видовую специфичность. Количественная оценка белка VP4 имеет ключевое значение при разработке диагностических тест-систем, а также в процессе производства и контроля качества рекомбинантных трехвалентных ротавирусных вакцин на его основе.

Проблема антибиотикорезистентности, особенно у внутрибольничных патогенов, таких как *Acinetobacter baumannii*, представляет собой одну из основных угроз современной медицины. Этот патоген, устойчивый к множественным классам антибиотиков, входит в группу ESKAPE, представляющую глобальную угрозу здравоохранению [44-46]. Традиционные методы детекции генов резистентности, такие как изотермическая амплификация, часто сталкиваются с проблемами специфичности и показывают ложные

результаты. Введение технологии CRISPR/Cas для диагностики резистентности *A. baumannii* предлагает революционный подход [47-51]. Технология позволяет быстро и точно выявлять гены резистентности, используя эндонуклеазу Cas12a и флуоресцентные зонды. Преимущества CRISPR/Cas включают простоту в использовании, высокую чувствительность и возможность масштабирования для детекции различных патогенов. Эти разработки обеспечат возможность эффективного контроля антибиотикорезистентности, что актуально в условиях роста резистентных штаммов и госпитальных инфекций.

Следующей актуальной задачей стала диагностика зоонозных инфекций, включая Лайм-боррелиоз и клещевую возвратную лихорадку, эндемичных для юго-восточных и южных регионов Казахстана [52-58]. Текущая диагностика этих заболеваний ограничена доступностью коммерческих тест-систем, что создает необходимость разработки отечественного решения [59-64]. Разработка тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для одновременной детекции *Borrelia burgdorferi sensu lato* и *Borrelia miyamotoi* не только повысит точность и доступность диагностики, но и обеспечит возможности для дальнейшего эпидемиологического мониторинга. Проведение мониторинга распространения данных патогенов в Казахстане может существенно повлиять на профилактику и обеспечения контроля над возникающими инфекционными угрозами.

Данная программа направлена на разработку методов, которые позволят улучшить диагностику возбудителей урогенитальных инфекций, а также обеспечить точную аутентификацию фитопрепаратов, используемых в педиатрической практике. Урогенитальные инфекции остаются одной из наиболее распространенных групп заболеваний, требующих точной и оперативной диагностики. Основой молекулярно-генетической детекции патогенов являются полимеразы, такие как обратная транскриптаза, выполняющая синтез комплементарной ДНК на матрице РНК [65-68]. Однако природные ферменты, такие как ревертазы из вирусов лейкемии мышей или иммунодефицита человека, имеют ограниченную термостабильность и невысокую точность полимеризации, что снижает их эффективность в современных диагностических тестах [12, 69-71]. Разработка термостабильных ферментов с температурным оптимумом 68–72°C и сниженной рибонуклеазной активностью станет важным шагом в создании одношаговых ПЦР-систем. Такие ферменты обеспечат более точную амплификацию ДНК, минимизируют деградацию РНК и повысят надежность диагностики на ранних стадиях заболеваний. Внедрение технологий, основанных на искусственной эволюции и сайт-направленном мутагенезе, позволит разработать ферменты нового поколения, соответствующие требованиям как научных исследований, так и клинической практики. Применение генной инженерии и технологии рекомбинантных ДНК позволяет метить ферменты, что

значительно облегчает процесс очистки. Для промышленного производства рекомбинантных ферментов подходит глубинная ферментация штаммов-продуцентов в биореакторе. Использование биореактора позволяет контролировать такие параметры ферментации как температура, аэрация, плотность культуры, pH и осуществлять подпитку источниками углерода и азота. Представляется актуальной задачей получение рекомбинантной модифицированной обратной транскриптазы в клетках *E. coli*, проверка её активности и подбор условий для ферментации штамма-продуцента обратной транскриптазы в биореакторе.

В Республике Казахстан остро стоит проблема обеспечения качества лекарственных средств растительного происхождения, особенно актуальная в педиатрической практике [72]. Растительные препараты приобретают всё большую популярность благодаря их мягкому действию и минимизации побочных эффектов [73, 74]. Однако наряду с ростом интереса к фитопрепаратам обостряются вопросы качества и безопасности. Фальсификация сырья, ошибки в идентификации видов растений и примеси представляют серьёзную угрозу здоровью потребителей, особенно детей [75, 76]. Таким образом актуальной является проблема точной идентификации используемых в качестве сырья растений. В ответ на эти вызовы технологии ДНК-баркодинга и высокопроизводительного секвенирования предлагают эффективные решения для аутентификации растительного сырья [77-80]. ДНК-штрихкодирование позволяет идентифицировать растения на видовом уровне, даже в измельченных смесях, где традиционные методы анализа неэффективны. Создание базы данных ваучерных образцов лекарственных растений, применяемых в фитотерапии, станет важным инструментом для контроля качества фитопрепаратов. Такие базы данных позволят исключить использование малоэффективных заменителей и вредных примесей, что обеспечит безопасность потребителей и соответствие препаратов международным стандартам качества. Интеграция геномных и биоинформатических технологий в процесс аутентификации фитопрепаратов будет способствовать развитию системы менеджмента качества растительного сырья, что особенно актуально в условиях растущего спроса на фитопрепараты. Создание баз данных эталонных образцов, в том числе растений, используемых в педиатрической практике, позволит минимизировать риски фальсификации, обеспечить безопасность продукции и укрепить доверие к фитопрепаратам в обществе. Таким образом, задачи по разработке термостабильных ферментов и технологии аутентификации фитопрепаратов позволят повысить эффективность диагностики инфекционных заболеваний, и обеспечить безопасность использования растительных лекарственных средств.

Выбранные направления исследований научно-технической программы объединяет

цель улучшения качества медицинской помощи через внедрение высокоточных методов диагностики, которые имеют значительный потенциал для внедрения персонализированного лечения, и снижения расходов на здравоохранение за счет ранней диагностики инвалидизирующих заболеваний.

2 Материалы и методы исследования

2.1 Объекты исследований

Для реализации задач были включены следующие объекты исследований: образцы ДНК пациентов с фенилкетонурией, MODY-диабетом, синдромом Альпорта, колоректальным раком, а также ДНК контрольных образцов, собранных от здоровых взрослых добровольцев. Для протеомных исследований использовались образцы крови человека и лабораторных животных (кроликов породы шиншилла), а также сухие пятна крови пациентов с болезнью Гоше. В микробиологических исследованиях применялись бактериальные изоляты *Acinetobacter baumannii*, а также образцы клещей, инфицированных *B. burgdorferi*, *B. miyamotoi*, а также вирусные белки аденовируса и ротавируса. Для фитохимических методов объектами исследований служили высушенные образцы растений с подтверждённой таксономической принадлежностью и эталонные образцы для ДНК-идентификации.

Анкетирование участников для сбора образцов вышеперечисленных патологий проводилось после получения информированного согласия, одобренного локальной этической комиссией. Для анализа было собрано по 10 мл венозной крови с использованием вакуумных систем с ЭДТА. В исследование MODY-диабета включались пациенты с клинически верифицированным диагнозом, установленным эндокринологом. Критерии включали раннее начало заболевания, отсутствие ожирения и наличие диабета у родственников. Образцы венозной крови собирались после получения информированного согласия или согласия законных представителей детей. Для изучения синдрома Альпорта привлекались пациенты с клинически и генетически подтверждённым диагнозом. Использовались архивные образцы ДНК, а также проводился дополнительный набор пациентов на базе медицинских учреждений. Для выполнения задачи изучения мутаций в генах *KRAS/BRAF* при колоректальном раке материалы собирались из образцов тканей опухолей казахстанских пациентов.

2.2 Дизайн панелей праймеров

Разработка панелей праймеров осуществлялась для мультиплексной амплификации участков генов, вовлечённых в патогенез социально-значимых заболеваний. Для гена *PAH*, ответственного за фенилкетонурию, была спроектирована панель из 13 пар праймеров, охватывающих все экзоны и экзон-интронные границы. Для синдрома Альпорта аналогичные панели были разработаны на основе 237 пар праймеров для генов *COL4A3*, *COL4A4* и *COL4A5*, кодирующих α -цепи коллагена IV типа. Для моногенных форм диабета MODY проектировались 92 пары праймеров для генов *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* и *ABCC8*, а для анализа колоректального рака — для *KRAS* и *BRAF*, включая редкие мутации,

связанные с резистентностью к анти-EGFR терапии. Для микробиологических и вирусологических задач разработаны праймеры для выявления генов blaOXA, blaNDM и blaVIM у *A. baumannii*, а также фрагментов генов гексона и VP4 для вирусов. Все последовательности анализировались с использованием NCBI Primer-BLAST, OligoAnalyzer и проверки на димеризацию, вторичные структуры и перекрёстную комплементарность.

2.3 Выделение ДНК

ДНК из образцов крови и тканей выделялась с использованием коммерческих наборов. Для крови применялись наборы QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) и Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), а концентрация ДНК измерялась с помощью флуориметра Qubit 2.0 с набором Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo). Для MODY-диабета и синдрома Альпорта использовались наборы GeneJET (Thermo), а концентрация также определялась с использованием Qubit dsDNA HS Assay Kit (Qiagen).

Для выполнения задачи изучения мутаций KRAS/BRAF экстракция ДНК из FFPE-блоков опухолей проводилась с применением QIAamp DNA FFPE Advanced Kit (Qiagen) после депарафинизации и ферментативной обработки. Конечный продукт растворяли в буфере Tris-EDTA для дальнейшего анализа.

Для работы с ДНК *A. baumannii* геномная ДНК выделялась с использованием набора Monarch (New England Biolabs, США) с модификацией протокола для увеличения выхода ДНК. Чистота выделенной ДНК проверялась электрофорезом в агарозном геле и спектрофотометрическим анализом на NanoDrop 2000 (Thermo). ДНК из образцов гомогенатов клещей выделяли с помощью наборов AmpliSens RIBO-prep (AmpliSens, Россия) и МАГНО-сорб (AmpliSens, Россия). Концентрация и чистота ДНК определялись на NanoDrop 2000, используя отношение A260/A280 для оценки уровня белковых загрязнений.

Для растительных образцов применялся модифицированный СТАВ-протокол с последующей очисткой фенол-хлороформной экстракцией и спиртовой преципитацией. Концентрация и чистота ДНК оценивались с использованием Qubit 2.0 (Invitrogen). Качество экстрактов проверялось методом электрофореза в 1% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием.

2.4 Патентно-информационный поиск

Патентно-информационный поиск был направлен на анализ существующих технологических решений в области геномной и протеомной диагностики, биоинформатики, иммунохимических методов и контроля качества фитопрепаратов. Поиск выполнялся в базах данных WIPO PATENTSCOPE, EPO Espacenet, USPTO и национальной

базе НЦГНТ РК. Особое внимание уделялось патентам, касающимся NGS-панелей для редких заболеваний, LC-MS/MS методик для анализа биомаркеров, CRISPR-диагностики и методов аутентификации растительного сырья. Полученные результаты позволили обосновать оригинальность и прикладную значимость разрабатываемых технологий.

2.5 Пробоподготовка образцов для масс-спектрометрического анализа

Образцы крови для масс-спектрометрического анализа готовились с использованием стандартных протеомных методов. Забор крови проводился с последующим отделением плазмы методом центрифугирования при 1500 об/мин в течение 15 минут. Белковый комплекс фракционировался с использованием градиентного электрофореза в полиакриламидном геле Novex NuPAGE (Thermo, США). Белки визуализировались трифенилметановым красителем Coomassie Brilliant Blue R-250, что позволило оценить их качество и количественный состав. Удаление основных белков (альбумина и иммуноглобулинов) из плазмы осуществлялось методом иммунодеплеции, что повышало чувствительность последующего анализа низкоконцентрированных биомаркеров. Подготовка белков к масс-спектрометрическому анализу включала восстановление и алкилирование с использованием дитиотреитола и йодацетамида, трипсинолиз и обессаливание на колонках micro Zip-Tip (Millipore, Великобритания). Для болезни Гоше из сухих пятен крови диаметром 3,2 мм производили инкубацию с синтетическим субстратом β -глюкоцереброзидазы (C12-глюкоцереброзид) и внутренним стандартом (C14-церамид). Продукты реакции экстрагировали органическим растворителем и анализировали на масс-спектрометре.

2.6 Масс-спектрометрический анализ

Для анализа протеомных биомаркеров использовался масс-спектрометр QTOF Impact II (Bruker) и LC-MS/MS Dionex Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo). Образцы подвергались трипсинолизу, а пептиды анализировались в режиме градиентного разделения, что обеспечивало высокую точность идентификации и количественную оценку белков. Электроспрей-ионизация осуществлялась в положительном режиме, диапазон масс составлял 100–1200 m/z. Хроматографическое разделение проводили на колонках C18 (75 $\mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$, 3 μm). Идентификация белков и пептидов осуществлялась с использованием программ Mascot 2.6.2 и Peaks Studio 11 по базам данных SwissProt и UniProtKB. Для количественного анализа использовался label-free подход с нормализацией интенсивности сигналов. При анализе ферментативной активности применялась tandemная масс-спектрометрия с мониторингом специфических ионных переходов. Качество данных контролировалось по параметрам $\text{FDR} \leq 1\%$ и наличию уникальных пептидов.

2.7 Разработка иммунохроматографического теста

Для создания иммунохроматографического теста использовались плазмиды и бактериальные штаммы. Рекомбинантные антигены (гексон и VP4) экспрессировались в системе *E. coli* BL21(DE3) с использованием векторов pET28 и pET32. Белки очищались методом металл-хелатной хроматографии (Ni-NTA), что подтверждалось SDS-PAGE. Моноклональные антитела конъюгировались с наночастицами золота и HRP для визуальной детекции. Оптимизация чувствительности проводилась путём изменения концентраций конъюгатов и буферных условий. Полученные тесты обеспечивали визуальную детекцию антигенов в течение 10–15 минут.

2.8 Секвенирование гена 16S рРНК

Секвенирование гена 16S рРНК использовалось для идентификации *Borrelia* spp. и оценки микробных сообществ. Амплификация проводилась универсальными праймерами 27F/1492R, ампликоны очищались с помощью AMPure XP beads и секвенировались на Illumina MiSeq с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3 (600 циклов). Контроль качества выполнялся в FastQC и MultiQC, фильтрация низкокачественных прочтений — с Cutadapt. Кластеризация и аннотация последовательностей проводились в DADA2 с использованием баз SILVA и Greengenes. Результаты визуализировались в MEGA и QIIME.

2.9 ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени проводилась на системах CFX96 (Bio-Rad) и QuantStudio 5 (Applied Biosystems). Использовались наборы BioMaster HS-Taq PCR Спец (Биолабмикс) и SYBR Green I для детекции, а также TaqMan-зонды (FAM/HEX) для мультиплексных реакций. Применялись как абсолютный, так и относительный анализ экспрессии ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Для оценки специфичности проводился анализ кривых плавления. Методика применялась для верификации мутаций, анализа экспрессии генов и контроля рекомбинантных конструкций).

2.10 Биоинформатический анализ и выбор последовательностей

Биоинформатическая обработка данных секвенирования включала оценку качества (FastQC, MultiQC), картирование (BWA v0.7.19), вычисление глубины покрытия (SAMtools v1.13) и поиск вариантов (GATK v4.4). Для протеомных данных использовались Mascot (Matrix Science), Peaks Studio (Bioinformatics Solutions) и DataAnalysis (Bruker). Для построения филогенетических деревьев применялись MEGA (Mega) и Geneious (Dotmatics). Статистическая обработка выполнялась в Python с использованием библиотек pandas, seaborn, biopython и matplotlib. Таким образом, в ходе выполнения программы было использовано следующее программное обеспечение: FastQC, BWA, GATK, MEGA, Mascot, Peaks Studio, Perseus, Geneious и Python 3.11.

2.11 Клонирование, модификация и секвенирование генов

Для разработки термостабильных полимераз генно-инженерные конструкции собирались методом безрестрикционного клонирования. После сборки конструкции нуклеотидные последовательности проверялись методом Сэнгера с использованием праймеров T7fw и T7rv. Анализ мутаций в аминокислотных последовательностях ферментов проводился для оптимизации их термостабильности и каталитической активности. Были выбраны и протестированы 25 ключевых мутаций, влияющих на эффективность обратной транскриптазы. Клонирование генов проводилось с применением PCR Cloning Kit (Thermo) и векторов pJET1.2, pET28, pET32. Продукты амплификации лигировались и трансформировались в *E. coli* DH5α методом теплового шока. Отбор колоний осуществлялся на LB-среде с антибиотиками. Очистка плазмид проводилась набором MiniPrep (Thermo).

Клонирование положительных контролей осуществлялось стандартными методами молекулярного клонирования по сайтам эндонуклеаз рестрикции NcoI и HindIII в плазмиду pET28a (для гена BmGlpQ) и в плазмиду pBluescriptII+ для фрагментов генов 16S рРНК (*B. burgdorferi*) и 18S рРНК (референсный ген).

2.12 Разработка базы данных и программного обеспечения

Разработка базы данных для хранения геномных, протеомных и биоинформатических данных осуществлялась на PostgreSQL с реализацией REST и GraphQL API. Интерфейс веб-доступа был создан на ASP.NET Core и Vue.js. В систему интегрированы модули поиска, фильтрации, визуализации и экспорта данных (CSV, FASTA, Excel). Созданы таблицы для учёта образцов, метаданных и результатов секвенирования.

3 Результаты и их обсуждение

3.1 Сбор биоматериала и формирование коллекции образцов

В ходе работ было продолжено формирование коллекции контрольных образцов для отработки условий таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия. Из цельной крови пациентов, а также их прямых родственников (родителей, братьев и сестер) была выделена ДНК. Выход ДНК варьировал от 4,3 до 18,5 мкг, что обеспечило получение концентраций, достаточных для проведения таргетного секвенирования кодирующей последовательности гена PАН. В результате проведенной работы коллекция была дополнена 8 образцами ДНК от пациентов с фенилкетонурией и 23 образцами от их ближайших родственников. Полученный материал в дальнейшем использовался для таргетного секвенирования и анализа мутационного спектра гена PАН в когорте пациентов и их семей.

За отчетный период было рекрутировано 5 пациентов с редким синдромом Альпорта. Из них, пациент №5, несмотря на результаты полноэкзомного секвенирования (полноэкзомное секвенирование проводил пациент самостоятельно в частной лаборатории) и выявленную мутацию - chr2:227310813T>G гетерозиготный COL4A3 ENST00000396578 с.4793T>G p.Leu1598Arg аутосомно-доминантный (104200), синдром Альпорта 2, аутосомно-рецессивный (203780), был впоследствии исключен из анализа. Пациент 5 не имел основных клинических симптомов синдрома Альпорта – микро и макрогематурии, протеинурии. Диагноз синдром Альпорта был поставлен по наличию нейросенсорной глухоты и возможной аутосомно-доминантной мутации в гене COL4A3.

Проведено медико-генетическое консультирование: клинико-генеалогический анализ не обнаружил семейной отягощенности наследственными заболеваниями почек. Фенотипический осмотр выявил: нейросенсорная тугоухость, задержка интеллектуального развития, треугольное лицо по типу "птичьего", гипертелоризм, микрогнатия, неправильно сформированный зубной ряд, клинодактилия мизинцев, кожная неполная синдактилия.

У пациента 5 в полноэкзомном секвенировании были указания на обнаруженную мутацию - chr5:128158071G>C Гетерозиготный SLC12A2 ENST00000262461 с.2382G>C p.Met794Ile, ассоциированную с тремя наследственными аутосомно-доминантными синдромами: 1. 105 Deafness, аутосомно-доминантный 78 (619081), 2. аутосомно-доминантный Delpire-McNeill syndrome (619083), 3. аутосомно-доминантный Kilquist syndrome (619080). Отсутствие семейного анамнеза, клинических основных симптомов синдрома Альпорта, наличие специфичного фенотипа позволило исключить аутосомно-доминантную форму наследования синдрома Альпорта, имеется носительство гетерозиготной мутации COL4A3 с.4793T>G p.Leu1598Arg 138, с установленным

аутосомно-рецессивным типом наследования. Таким образом, пациенту 5 по анамнезу заболевания, семейной отягощенности, результатам медико-генетического консультирования, фенотипического осмотра, лабораторных и инструментальных исследований, результатам полноэкзомного секвенирования выставлен генетический диагноз: синдром Килквиста (Kilquist syndrom, аутосомно-доминантное наследование (OMIM619080). Бессимптомное гетерозиготное носительство аутосомно-рецессивной мутации в гене SLC12A2 с.2382G>C p.Met794Ile, ассоциированной с синдромом Альпорта.

Клинические симптомы четырех обследованных пациентов с синдромом Альпорта представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Клинические характеристики пациентов с синдромом Альпорта

Симптомы	Пациент 1 - 04.09.2017 г.р.	Пациент 2 - 23.07.2012 г.р. (родной брат пациента 1)	Пациент 3 - 15.07.2018 г.р.	Пациент 4 - 05.01.2012 г.р.
1	2	3	4	5
Пол	Женский	мужской	мужской	женский
Возраст исследования	8 лет	13 лет	7 лет	13 лет
Возраст начала заболевания	6 лет	1,5 лет	7 лет	7 лет
Наследственная отягощенность	Родные сибсы, имеют родного дядю по материнской линии с аналогичным заболеванием		Родной дядя со стороны матери болен аналогичным заболеванием	Мама – ХПН1, получает диализ
Первичные симптомы	микрогематурия (эритроциты 10-15 в зр), протеинурия (белок-0,33г/л)	микрогематурия (25-30 в п/з) во время обструктивного бронхита. С 3 лет - макрогематурия Протеинурия – белок – 2,3г/л	макрогематурия (эритроциты в большом количестве), протеинурия до 0,33–0,44 г/л,	макрогематурия – (эр. 30-40 в п.зр) протеинурия (белок 0,3 г/л), Отеки на лице и ногах
Направительный диагноз:	Наследственный нефрит. Хроническая болезнь почек G1A2	Наследственная нефропатия, не классифицированная в других рубриках	Нефритический синдром. Наследственный нефрит	Хронический нефритический синдром, ХБП1

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
Заключительный диагноз	Наследственная нефропатия. Синдром Альпорта. X-сцепленный вариант	Наследственная нефропатия. Синдром Альпорта. X-сцепленный вариант	Нефритический синдром.	Хронический нефритический синдром. Мембрано пролиферативный гломерулонефрит с умеренным фиброзом и лимфоцитарной инфильтрацией
ДНК анализ	Секвенирование экзома: гемизиготная мутация в 23 интроне гена COL4A5 с X-сцепленным синдромом Альпорта, тип1	Секвенирование экзома: гемизиготная мутация в 23 интроне гена COL4A5 с X-сцепленным синдромом Альпорта, тип1		
Нарушения функции почек				
Гематурия	+	+	+	+
Протеинурия	+	+	+	+
Нейросенсорная тугоухость	Не отмечено	Не отмечено	Не отмечено	Не отмечено
Нарушения органов зрения	Не отмечено	Ангиопатия сетчатки	Не отмечено	Не отмечено
УЗИ почек	уплотнение стенок ЧЛС почек с обеих сторон	Не выявлено	Двусторонний нефроптоз	Не выявлено
Биопсия почек	Фокальный глобальный и сегментарный гломерул-склероз. Электронная микроскопия: Картина соответствует врожденной/наследственной патологии коллагена IV типа	Фокальный глобальный и сегментарный гломерулосклероз. Электронная микроскопия: Картина соответствует врожденной/наследственной патологии коллагена IV типа	Не проводилась	морфологические признаки мембранопротиферативного гломерулонефрита с умеренным фиброзом и лимфоцитарной инфильтрацией в межуточной ткани

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
Общий анализ крови	гемоглобин-131 г/л; эритроциты- 4,93x10 ¹² /л; тромбоциты-365x10 ⁹ /л; лейкоциты-6,71 x10 ⁹ /л; СОЭ –4 мм/час.	гемоглобин-123 г/л; эритроциты- 4,36x10 ¹² /л; тромбоциты-341x10 ⁹ /л; лейкоциты-7,71 x10 ⁹ /л; СОЭ –10мм/час.	Лейкоциты – 6,08 x10 ⁹ /л; эритроциты - 4,8x10 ¹² /л; гемоглобин 132 г/л; тромбоциты – 277x10 ⁹ /л; СОЭ – 25мм/час	Нет данных
Анализ мочи	Цвет с/ж; прозрачная; удельный вес-1003; pH – 6,5; белок- 0; лейкоциты – 2 в мкл; эритроциты - 80 в мкл;	белок - 2,0, эритроциты- 40 в мкл., белок- 2,31 г/л, эритроциты- 15-20 в п/з, лейкоциты- 8-12 в п/з. Цвет-мясных помоев. Удельный вес- 1002; pH – 7,0;	Цвет – с/ж, прозрачная; отн. плотность – 1030; белок - 0,264г/л; Лейкоциты - в большом количестве; Реакция (Ph) - кислая	Нет данных
Биохимический анализ крови	Общий белок - 61 г/л; АЛТ – 10,6 U/l; АСТ – 21 U/l; мочевины –3,5 ммоль/л; креатинин – 44,7 ммоль/л; Глюкоза – 4,5 ммоль/л; билирубин - 4,8мкмоль/л.	Общий белок - 49 г/л; АЛТ – 7,6 U/l; АСТ – 19,6 U/l; мочевины –8,2 ммоль/л; креатинин – 69 ммоль/л; Глюкоза – 4,6 ммоль/л; билирубин -3мкмоль/л Креатинин — 46,8 мкмоль/л,	АСТ- 44; общий белок - 65; общий билирубин - 11,2; альбумин - 39; общий холестерин - 3,3; глюкоза – 3,9; креатинин – 34,3; мочевины – 3,53 (АЛаТ) - 16	Общий белок 60-48г/л, альбумин 40-28г/л, холестерин 2,4-9,79ммоль/л. АНА, АНЦА в норме, АСЛО 56 МЕ/л, С3 0,1(0,9-1,7), С4 0,23 (0,5-0,9).
Белок в суточной моче	Белок - 0,2475 г/с; 1,32 г/с.	Белок - 0,528г/л. 0,436 гр/л; 1,815г/с	Белок - 2,31 г/с	Белок - 0,231г/с
Скорость клубочковой фильтрации по Шварцу	129мл/мин/1,73м2	82 мл/мин/1,73 м2; 47 мл/мин/1,73 м2	Не определяли	96мл/мин/1,73м2

Как видно из таблицы, достоверных различий по полу не обнаружено, 50% составили мальчики и 50% – девочки. Пациент 1 и пациент 2 являлись родными сибсами. Средний возраст обследуемых пациентов составил 10,25 лет. Распределение возраста появления первых симптомов СА варьировал от 1,5 до 7 лет, что соответствует известным литературным данным о более тяжелой клинической картине у мальчиков (пациент 2) при X-сцепленной форме СА. У родной сестры заболевание СА проявилось в 6 лет. Все пациенты имели отягощенный семейный анамнез. Пациенты 1,2 и 3 имели родного дядю по материнской линии с аналогичным заболеванием, что свидетельствует о возможном X-сцепленном наследовании, подтвержденном результатами секвенирования и выявленной гемизиготной мутацией в 23 интроне гена COL4A5 (X-сцепленный СА тип 1). У пациентки 4 – мама имеет ХПН и в течение многих лет находится на постоянном гемодиализе, что предполагает аутосомно-доминантную форму СА. Генетический анализ не проводился. У всех пациентов первыми симптомами заболевания явились микрогематурия – 10-20 в п/зрения, которая быстро прогрессировала до макрогематурии – 40-50 в п/зрения, в двух случаях – пациент 2 и 3. Вторым основным диагностическим симптомом явилась протеинурия, содержание белка в моче варьировало от 0,30 г/л у пациента 4, до 2,3 г/л у пациента 2 с клинически более тяжелой X-сцепленной формой СА. Наследственный нефрит. Помимо основных симптомов – гематурии и протеинурии проведен анализ наличия возможных сопутствующих проявлений СА. Нейросенсорная тугоухость и нарушения органов зрения, помимо неспецифичного симптома ангиопатии сетчатки у пациента 2, не было обнаружено у всех 4 пациентов. Это связано с тем, что согласно международным руководствам по диагностике и лечению СА, нарушения слуха и зрения возникают в более позднем подростковом или взрослом возрасте. Нашим двум старшим пациентам исполнилось 13 лет, что предполагает развитие этих симптомов в дальнейшей жизни. Характерные изменения почек были выявлены у двух (50%) пациентов 1 -уплотнение стенок чашечно-лоханочной системы почек с обеих сторон. У пациента 3 - двусторонний нефроптоз, уплотнение стенок чашечно-лоханочной системы почек и каликозктазия с обеих сторон.

Одним из важнейших критериев постановки диагноза СА является инвазивный метод – биопсия ткани почек, которая была проведена 3 (75%) пациентам 1,2 и 4. Картина была характерной для СА и позволяла поставить этот диагноз на основании гистологических нарушений. У родных сибсов - пациентов 1 и 2 был описан Фокальный глобальный и сегментарный гломерулосклероз. Интерстициальный фиброз и атрофия канальцев 1 степени. Электронная микроскопия выявила картину врожденной/наследственной патологии коллагена IV типа, что впоследствии было

подтверждено генетическим анализом. У пациента 4 при биопсии ткани почек обнаружены морфологические признаки мембранопролиферативного гломерулонефрита с умеренным фиброзом и лимфоцитарной инфильтрацией в межуточной ткани (фокальный склероз – 85,2%, гиалиноз и склероз – 14,8%). Полученные результаты подтверждают высокую диагностическую значимость гистологических исследований ткани почек для ранней постановки диагноза СА.

Таким образом, проведенный анализ клинической картины СА у рекрутированных пациентов обнаружил достаточно однородную генетическую гетерогенность клинической симптоматики. Основными диагностическими симптомами явились: 1) наличие макро и микрогематурии 2) протеинурия 3) семейный анамнез, отягощенный по микро/макрогематурии и/или почечной недостаточности, 4) типичные изменения гломерулярной базальной мембраны по электронной микроскопии при отсутствии таких сопутствующих симптомов, как патология глаз (передний лентиконус, макулярная дистрофия) и высокочастотная нейросенсорная тугоухость. Отсутствие сопутствующих нарушений глаз и слуха объясняется детским возрастом пациентов.

За отчетный период было рекрутировано 10 пациентов с возможным диагнозом MODY диабет. Данным пациентам был выставлен диагноз на основе клинических данных. У всех пациентов отсутствовал проведенный генетический анализ, в связи с этим диагноз MODY диабет был под вопросом. При рекрутировании пациентов с MODY диабет каждого пациента рассматривали как «case report». Один из примеров приведен ниже. У матери пробанда, у которой был диагностирован ранний диабет, было три беременности: одна замершая и два живорожденных ребенка. Во время второй беременности в 2018 году она находилась под наблюдением эндокринолога, но не придерживалась инсулинотерапии. В результате ее гипергликемия оставалась неконтролируемой, что привело к плацентарной недостаточности и преждевременному кесареву сечению на 35 неделе. Неконтролируемый материнский диабет является известным фактором риска осложнений беременности, включая потерю плода и преждевременные роды. Эти исходы в сочетании с отягощенным семейным анамнезом раннего диабета дополнительно подтверждают клиническое подозрение на моногенную форму диабета (MODY) у ребенка. В семье наблюдается выраженная кластеризация диабета с клиническими признаками, указывающими на возможный тип MODY диабета, а не на типичный сахарный диабет 2 типа. У матери гипергликемия с HbA1c 9,31% и дефицит витамина D, но при этом сохраняется нормальный ИМТ 23,42 кг/м² без признаков ожирения. У отца ожирение II степени (ИМТ 36,7 кг/м²) и HbA1c 9,20%. У их ребёнка (пробанда) также наблюдается значительная гипергликемия (HbA1c 9,67%) и ИМТ 20,32 кг/м², экзогенно-конституциональное ожирение I степени.

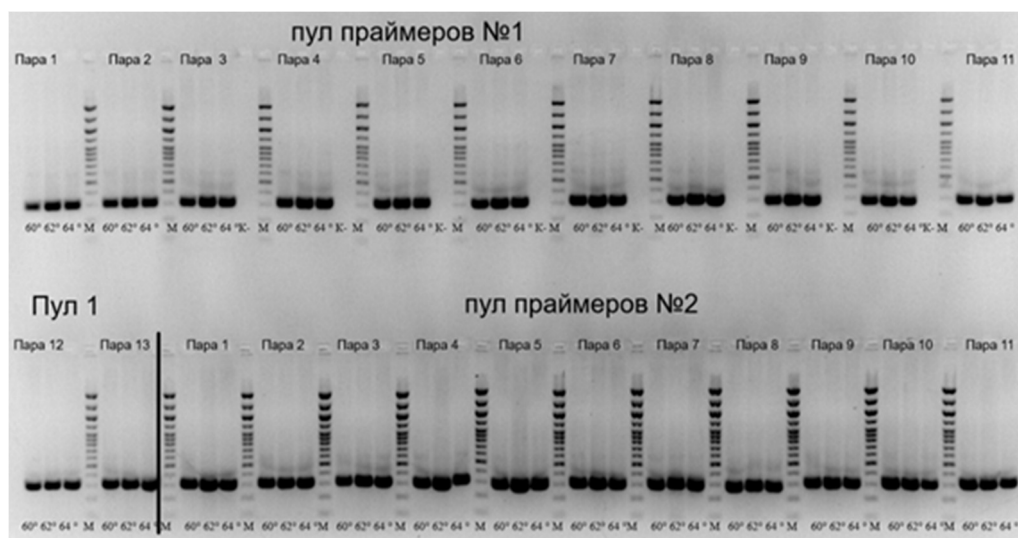
Наличие раннего диабета у пробанда, а также диабет у родителей и лёгкий фенотип ожирения у некоторых членов семьи, вызывает подозрение на наличие моногенной формы диабета, такой как MODY, что требует дальнейшего генетического исследования. Из всех собранных образцов было выделено ДНК для дальнейшего генетического анализа. Для собранных 10 пациентов, у которых установлен диагноз MODY диабет на основе клинических данных, было проведено полноэкзомное секвенирование. Результаты полноэкзомного секвенирования будут служить в качестве контролей при последующей валидации разрабатываемого диагностикума для MODY диабет на основе секвенирования нового поколения.

В рамках задачи, связанной со сбором биоматериала от условно-здоровых людей, а также пациентов с диагнозом болезнь Гоше для последующего масс-спектрометрического анализа была собрана выборка из десяти образцов: восемь контрольных образцов и два образца от пациентов с болезнью Гоше. Активность фермента β -глюкоцереброзидазы (GBA) была успешно измерена во всех образцах с использованием масс-спектрометрического анализа.

3.2 Проверка работоспособности праймеров и оптимизация условий ПЦР

В рамках выполнения этапа программы «Проверка работоспособности праймеров и оптимизация условий ПЦР реакции для амплификации целевых регионов генов RAN, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WFS1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6» проверялась работоспособность праймеров и оптимизация условий ПЦР реакции для амплификации целевых регионов генов RAN. Работоспособность каждой из 26 пар праймеров, подобранных к гену RAN, оценивалась постановкой ПЦР на контрольном образце ДНК при температурах отжига 60°, 62° и 64°C. Специфический амплификационный продукт был получен при всех протестированных температурах, в качестве примера на рисунке 1 приведены результаты ПЦР, полученные для 13 пар праймеров пула 1 и 11 пара праймеров пула 2.

Анализ электрофореграммы показывает, что для большинства пар праймеров наблюдается чёткий одиночный ампликон одинаковой длины, что свидетельствует о высокой специфичности амплификации. У отдельных праймерных пар, в частности 5–7 из пула 1 и 3–6 из пула 2, видны слабые дополнительные полосы или различия в интенсивности, что может быть связано с частичной неспецифической амплификацией или оптимизационными эффектами температуры отжига. С повышением температуры до 64°C побочные продукты исчезают, а основной ампликон становится более выраженным, что подтверждает рост специфичности при более строгих условиях отжига.



60°C, 62°C и 64°C – температура отжига используемая в программе ПЦР амплификации;
 М – ДНК маркер Step 100 Long (Биолабмикс); «К-» - отрицательный контроль постановки
 ПЦР реакции

Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов ПЦР с 24 парами праймеров к гену РАН при температурах отжига 60°C, 62°C и 64°C

Наблюдалось снижение интенсивности свечения ПЦР продуктов для пары 1, 2 и 9 пула праймеров №1 при температуре отжига 60°C, а также для пар 11 для двух пулов праймеров при температуре 64°C. При постановке ПЦР с пулами праймеров к гену РАН в 4 различных концентрациях и 3 температурах отжига праймеров можно наблюдать различную интенсивность свечения ПЦР продуктов (рисунок 2).

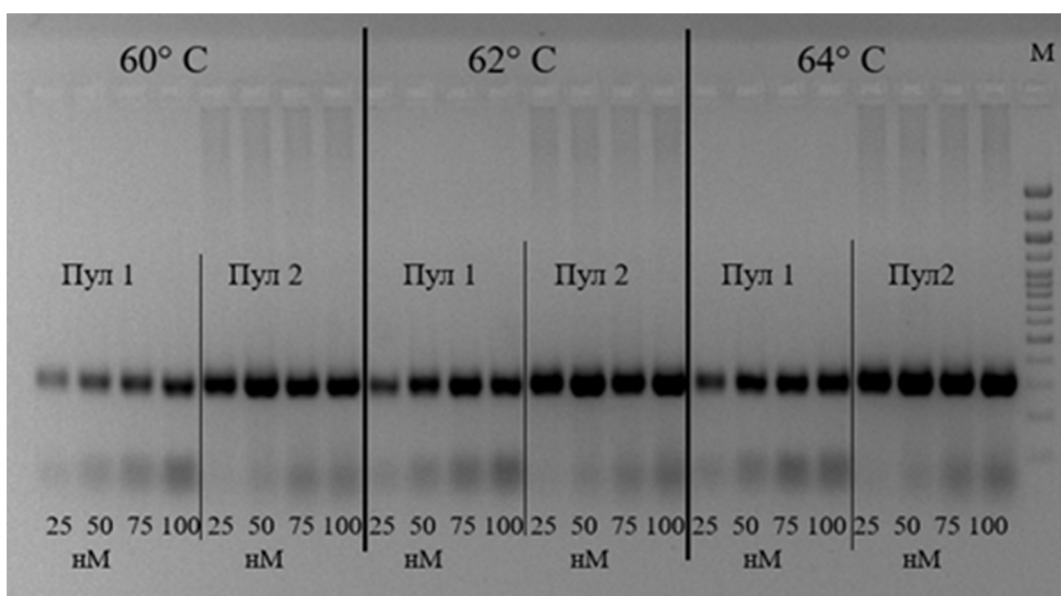


Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов ПЦР полученных при использовании пулов праймеров к гену РАН в концентрациях 25, 50, 75 и 100 нМ с температурами отжига 60°C, 62°C и 64°C

В целом было отмечено снижение уровня интенсивности свечения ПЦР-продуктов в дорожках пула праймеров №1 по сравнению с дорожками пула праймеров №2. Наиболее низкая интенсивность свечения ПЦР-продуктов, полученных с использованием специфических пула праймеров №1, наблюдалась при температуре отжига 60°C. В дорожках, полученных с использованием пула праймеров №2, отсутствовали чётко интерпретируемые различия в интенсивности свечения на всех температурах отжига и при четырёх протестированных концентрациях праймеров.

Тем не менее электрофоретический анализ не позволил объективно оценить эффективность амплификации как всей смеси праймеров, так и каждой отдельной пары в составе пула. В связи с этим, был проведён анализ эффективности амплификации каждой пары праймеров методом ПЦР в режиме реального времени с использованием в качестве матрицы продуктов предварительной ПЦР. В результате постановки ПЦР с интеркалирующим красителем наблюдалась разброс пороговых циклов от 17 до 23 (с учетом первых 10 циклов без учета реакции) для образцов, что свидетельствует о различной эффективности амплификации (рисунок 3).

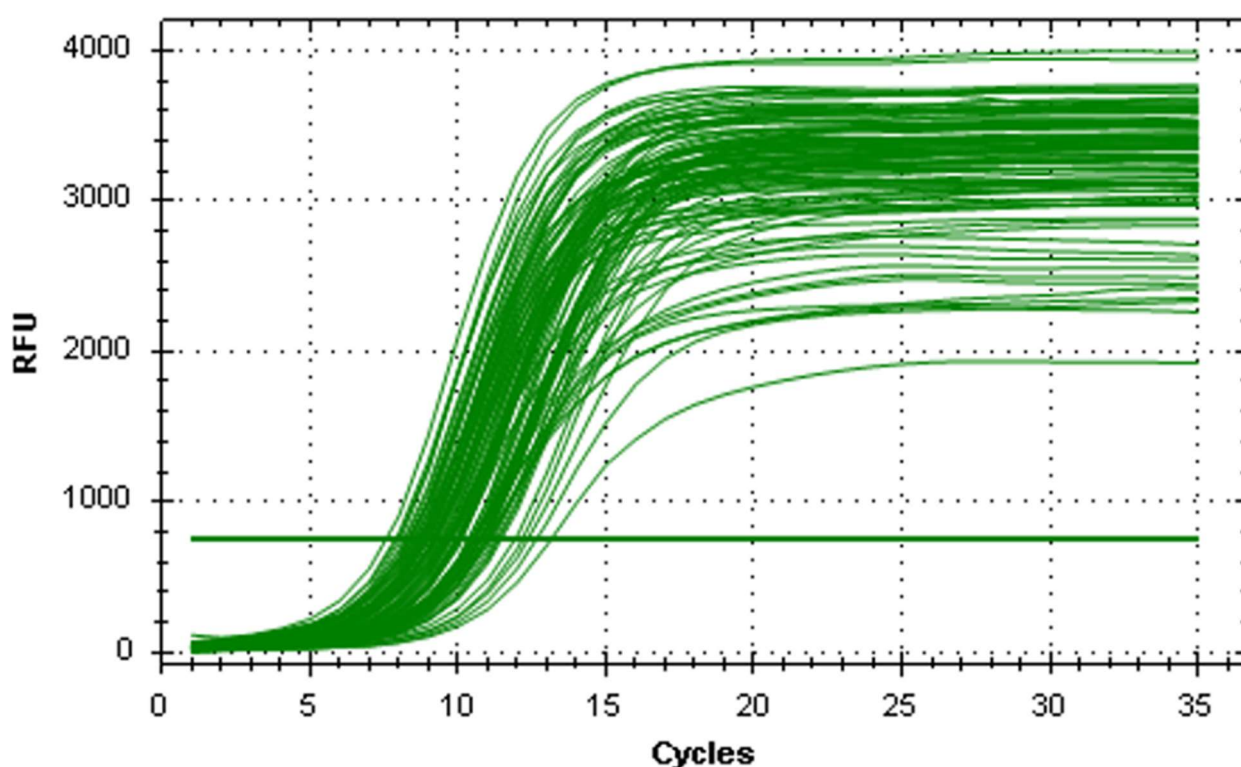


Рисунок 3 – Кривые амплификации отдельных пар праймеров при ПЦР в реальном времени

С целью выбора оптимальных условия для амплификации продуктов полимеразной цепной реакции был проведен анализ значений пороговых циклов, используемый для оценки эффективности амплификации праймеров (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты анализа эффективности амплификации праймеров

Температура отжига	Пара праймеров	Концентрация праймеров 25 нМ	Концентрация праймеров 50 нМ	Концентрация праймеров 75 нМ	Концентрация праймеров 100 нМ	Минимальное значение Ct	ΔCt (25)	ΔCt (50)	ΔCt (75)	ΔCt (100)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
60°C	Пара 1	13,12	11,0	10,47	10,74	10,47	2,66	0,53	0,00	0,27
60°C	Пара 2	11,07	10,03	9,59	9,65	9,59	1,48	0,44	0,00	0,06
60°C	Пара 3	10,95	9,64	9,44	9,55	9,44	1,51	0,20	0,00	0,11
60°C	Пара 4	10,74	10,33	9,80	9,97	9,80	0,94	0,53	0,00	0,16
60°C	Пара 5	12,15	11,19	10,59	10,44	10,44	1,71	0,74	0,14	0,00
60°C	Пара 6	10,72	10,73	10,11	10,02	10,02	0,70	0,72	0,09	0,00
60°C	Пара 7	11,91	11,44	10,80	10,69	10,69	1,22	0,75	0,11	0,00
60°C	Пара 8	11,29	10,34	9,90	9,70	9,70	1,59	0,63	0,20	0,00
60°C	Пара 9	10,95	10,69	10,10	10,02	10,02	0,94	0,68	0,08	0,00
60°C	Пара 10	10,92	10,44	9,95	10,00	9,95	0,97	0,50	0,00	0,05
60°C	Пара 11	12,34	11,09	10,53	10,49	10,49	1,85	0,60	0,04	0,00
60°C	Пара 12	12,63	11,35	10,75	10,92	10,75	1,87	0,60	0,00	0,16
60°C	Пара 13	11,38	11,08	10,77	10,53	10,53	0,85	0,55	0,24	0,00
60°C	Пара 1	10,74	9,61	10,57	10,45	9,61	1,13	0,00	0,96	0,84
60°C	Пара 2	9,37	8,32	9,00	8,85	8,32	1,05	0,00	0,68	0,53
60°C	Пара 3	9,20	8,49	8,88	9,01	8,49	0,71	0,00	0,38	0,52
60°C	Пара 4	9,55	8,33	8,99	8,88	8,33	1,23	0,00	0,66	0,55
60°C	Пара 5	8,71	8,16	8,99	8,64	8,16	0,55	0,00	0,83	0,48
60°C	Пара 6	9,13	8,22	8,61	8,58	8,22	0,91	0,00	0,39	0,36
60°C	Пара 7	9,44	8,66	9,15	9,21	8,66	0,78	0,00	0,49	0,55
60°C	Пара 8	9,47	8,72	9,16	9,12	8,72	0,75	0,00	0,44	0,40
60°C	Пара 9	9,72	8,80	9,69	9,31	8,80	0,92	0,00	0,89	0,50
60°C	Пара 10	8,51	7,54	8,04	7,85	7,54	0,96	0,00	0,50	0,31
60°C	Пара 11	9,11	7,94	8,44	8,31	7,94	1,16	0,00	0,49	0,37
60°C	Пара 12	9,25	8,36	8,81	8,78	8,36	0,89	0,00	0,45	0,43
60°C	Пара 13	11,73	9,26	9,51	9,54	9,26	2,47	0,00	0,24	0,28
62°C	Пара 1	13,10	10,80	10,34	10,16	10,16	2,95	0,65	0,18	0,00
62°C	Пара 2	11,27	9,77	9,54	9,71	9,54	1,73	0,23	0,00	0,16
62°C	Пара 3	10,87	9,99	9,27	9,24	9,24	1,62	0,74	0,03	0,00
62°C	Пара 4	10,99	10,02	9,65	9,64	9,64	1,34	0,37	0,01	0,00
62°C	Пара 5	12,31	10,93	10,24	10,24	10,24	2,07	0,69	0,01	0,00

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
62°C	Пара 6	11,31	9,98	9,78	9,71	9,71	1,60	0,28	0,08	0,00
62°C	Пара 7	12,25	10,89	10,28	10,51	10,28	1,97	0,61	0,00	0,23
62°C	Пара 8	11,27	10,06	9,52	9,49	9,49	1,79	0,58	0,03	0,00
62°C	Пара 9	11,00	10,04	9,44	9,60	9,44	1,57	0,61	0,00	0,16
62°C	Пара 10	11,36	9,76	9,36	9,51	9,36	2,00	0,41	0,00	0,15
62°C	Пара 11	12,23	10,69	9,94	10,03	9,94	2,28	0,75	0,00	0,08
62°C	Пара 12	12,38	10,95	10,45	10,68	10,45	1,93	0,50	0,00	0,23
62°C	Пара 13	12,03	10,31	9,98	9,10	9,10	2,92	1,21	0,87	0,00
62°C	Пара 1	12,20	10,68	12,87	11,70	10,68	1,52	0,00	2,19	1,02
62°C	Пара 2	9,04	8,14	8,70	8,37	8,14	0,90	0,00	0,56	0,23
62°C	Пара 3	9,28	8,41	8,82	8,62	8,41	0,87	0,00	0,41	0,21
62°C	Пара 4	9,38	8,20	8,97	8,46	8,20	1,19	0,00	0,78	0,26
62°C	Пара 5	8,67	7,98	8,42	8,16	7,98	0,69	0,00	0,44	0,17
62°C	Пара 6	9,03	8,13	8,55	8,43	8,13	0,90	0,00	0,42	0,29
62°C	Пара 7	9,20	8,48	9,08	8,63	8,48	0,72	0,00	0,60	0,14
62°C	Пара 8	9,20	8,60	8,85	8,74	8,60	0,59	0,00	0,24	0,13
62°C	Пара 9	9,35	8,76	9,30	9,19	8,76	0,59	0,00	0,54	0,43
62°C	Пара 10	8,35	7,55	7,91	7,67	7,55	0,80	0,00	0,37	0,12
62°C	Пара 11	8,72	7,75	8,12	8,01	7,75	0,97	0,00	0,37	0,25
62°C	Пара 12	9,32	8,27	8,72	8,46	8,27	1,05	0,00	0,45	0,19
62°C	Пара 13	9,00	8,31	8,44	8,42	8,31	0,70	0,00	0,13	0,11
64°C	Пара 1	13,82	10,80	10,80	10,25	10,25	3,57	0,54	0,55	0,00
64°C	Пара 2	12,70	10,17	10,29	9,84	9,84	2,87	0,33	0,46	0,00
64°C	Пара 3	12,59	10,08	10,18	9,81	9,81	2,78	0,27	0,37	0,00
64°C	Пара 4	11,56	9,78	9,71	9,41	9,41	2,16	0,37	0,30	0,00
64°C	Пара 5	13,13	11,03	10,96	10,13	10,13	3,00	0,90	0,83	0,00
64°C	Пара 6	12,14	10,03	10,16	9,51	9,51	2,63	0,52	0,65	0,00
64°C	Пара 7	13,31	11,23	11,26	10,59	10,59	2,72	0,64	0,67	0,00
64°C	Пара 8	12,00	10,16	9,90	9,31	9,31	2,69	0,85	0,59	0,00
64°C	Пара 9	11,74	10,03	10,22	9,75	9,75	1,98	0,28	0,46	0,00
64°C	Пара 10	11,85	10,05	10,23	9,89	9,89	1,95	0,16	0,34	0,00
64°C	Пара 11	13,05	10,83	10,77	10,04	10,04	3,01	0,79	0,73	0,00
64°C	Пара 12	13,17	11,06	11,10	10,40	10,40	2,77	0,65	0,69	0,00
64°C	Пара 13	8,33	7,83	7,98	7,62	7,62	0,70	0,20	0,36	0,00
64°C	Пара 1	14,83	14,19	18,12	16,87	14,19	0,64	0,00	3,93	2,69
64°C	Пара 2	8,58	8,03	8,19	7,99	7,99	0,58	0,04	0,19	0,00
64°C	Пара 3	8,48	8,14	8,45	8,81	8,14	0,34	0,00	0,31	0,67
64°C	Пара 4	8,59	8,01	8,59	8,44	8,01	0,57	0,00	0,58	0,42

Продолжение таблицы 2

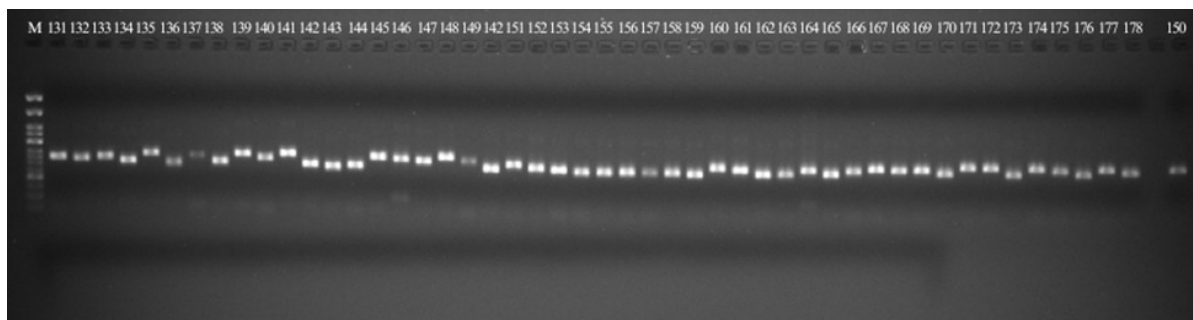
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
64°C	Пара 5	8,35	7,90	8,34	8,43	7,90	0,45	0,00	0,44	0,53
64°C	Пара 6	8,43	7,97	8,41	8,24	7,97	0,46	0,00	0,44	0,27
64°C	Пара 7	8,85	8,38	8,77	8,47	8,38	0,46	0,00	0,39	0,09
64°C	Пара 8	9,01	8,56	8,75	8,53	8,53	0,49	0,04	0,23	0,00
64°C	Пара 9	9,41	8,73	9,55	9,21	8,73	0,68	0,00	0,82	0,48
64°C	Пара 10	8,17	7,56	7,73	7,46	7,46	0,71	0,09	0,26	0,00
64°C	Пара 11	8,34	7,65	7,83	7,57	7,57	0,77	0,08	0,25	0,00
64°C	Пара 12	9,06	8,31	8,41	8,39	8,31	0,75	0,00	0,10	0,08
64°C	Пара 13	7,92	7,35	7,95	7,42	7,35	0,57	0,00	0,60	0,07

Анализ полученных данных показал, что наиболее оптимальной температурой отжига праймеров для обеих исследованных смесей является 62°C. При данной температуре отмечались минимальные значения порогового цикла (C_t), а также наименьший разброс между парами праймеров, что свидетельствует о высокой эффективности амплификации и равномерности работы всех пар праймеров внутри пула. Сравнение с результатами при температурах 60°C и 64°C подтвердило, что именно 62°C обеспечивает наиболее стабильное протекание реакции, снижает вариабельность между парами и повышает воспроизводимость анализа, что позволяет рассматривать её как универсальную для дальнейших исследований.

Вместе с тем, оптимальные концентрации для смесей различались: для пула праймеров №1 наилучшие результаты достигнуты при 100 нМ, а для пула праймеров №2 при 50 нМ. В обоих случаях эти значения обеспечивали минимальные C_t и наименьший разброс ΔC_t , что подтверждает их высокую эффективность. Поскольку в дальнейшем все праймеры будут использоваться именно в составе двух объединённых смесей (пула №1 и пула №2), выбранные параметры — температура отжига 62°C и концентрации 100 нМ для пула №1 и 50 нМ для пула №2 — следует рассматривать как оптимальные условия проведения ПЦР в реальном времени, обеспечивающие баланс между специфичностью, эффективностью и воспроизводимостью амплификации.

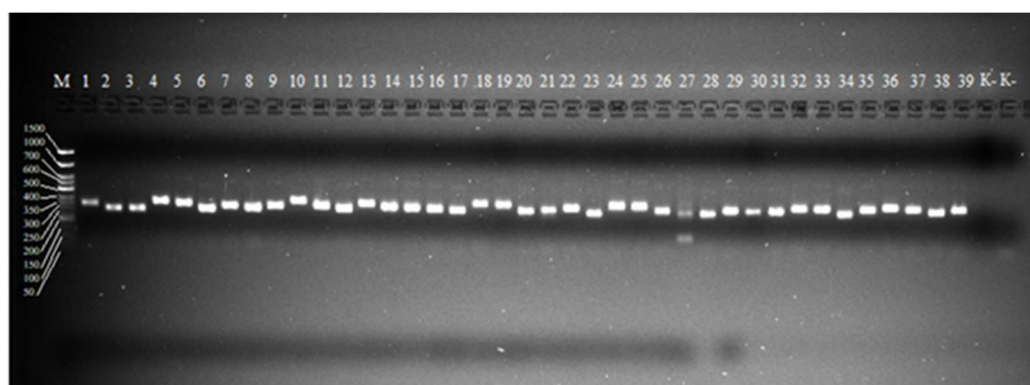
Проверка работоспособности праймеров и оптимизация условий ПЦР реакции для амплификации целевых регионов генов HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6 проводилась в несколько этапов. Первый этап проверки работоспособности праймеров для диагностики MODY диабета состоял в разведении лиофильновысушенных праймеров до одинаковой концентрации 25 нМ. Буфер для разведения использовали 1x TE буфер. Далее оценивали каждую пару праймеров

индивидуально с помощью проведения ПЦР. 40х реакционная смесь содержала ДНК полимеразу *Phusion™ Hot Start II DNA Polymerase* (2 U/μL) (Thermo), буфер, дНТФ, ДНК матрицу (10 нг/мкл). Использовался общий температурный режим для всех пар праймеров: 98°C в течение 30 сек, затем 32-кратная амплификация при 98°C в течение 5 сек, 60° С в течение 60 сек, 72°C в течение 60 сек, затем финальное удлинение при 72°C в течение 1 мин. Необходимо отметить, что температура отжига для всех пар праймеров составляла - 60° С 1 мин. Эксперименты по проверки работоспособности праймеров проводили на матрице ДНК, выделенной от условно-здорового человека. В общей сложности было проверено 237 пар праймеров к генам, мутации в которых участвуют в патогенезе синдрома Альпорта и 92 пары праймеров к генам, мутации в которых участвуют в патогенезе MODY диабета. На рисунке 4 и 5 представлены электрофореграммы ПЦР-продуктов, полученных с использованием разработанных праймеров, демонстрирующие работоспособность предлагаемых праймеров.



М - маркер молекулярных масс (ДНК маркер Step50 plus), 131-178 ПЦР-продукты с разными парами праймеров

Рисунок 4 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов с разработанными праймерами к генам, мутации в которых участвуют в патогенезе синдрома Альпорта



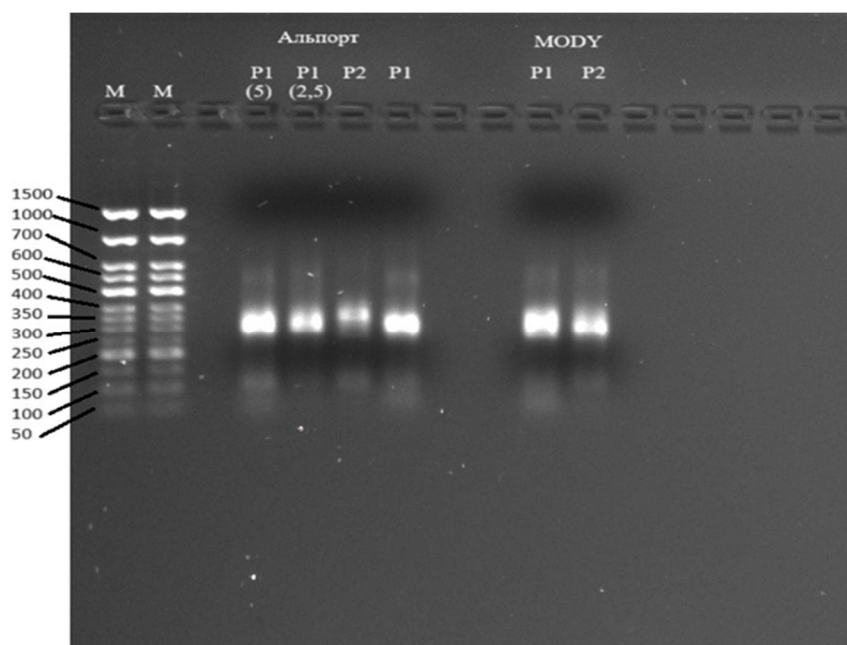
М - маркер молекулярных масс (ДНК маркер Step50 plus), 1-39 ПЦР-продукты с разными парами праймеров, К - отрицательный контроль

Рисунок 5 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов с разработанными праймерами к генам, мутации в которых участвуют в патогенезе MODY диабета

Как видно из рисунков детекция ПЦР-продуктов методом электрофореза в 1,5 % горизонтальном агарозном геле показала бэнды хорошей интенсивности, отсутствие шмеров, что говорит о работоспособности всех подобранных пар праймеров. Нарабатывались размеры ПЦР-продуктов нужного размера в пределах 300-400 нуклеотидов согласно подобранным праймерам.

Следующий этап заключался в проверке работоспособности праймеров в проведении мультиплексной ПЦР, то есть были приготовлены панели праймеров, состоящие из смеси праймеров в одной пробирке, для каждой панели количество пар праймеров варьировало: от 17 до 28. 100 мкл ПЦР смеси для мультиплексного ПЦР включало: мкл MilliQ, 5 мкл ДНК (10 нг/мкл), 20 мкл 5x Phusion Plus Buffer, 2 мкл dNTP (10 mM), 5 мкл 1 мкМ прямые праймеры (из панели, например Panel 1F) (50 nM), 5 мкл 1 мкМ обратных праймеров (из панели, например Panel 1F) (50 nM), 1 мкл Phusion Plus II Hot Start DNA Polymerase (2 ед/мкл). Использовали следующий температурно-временной режим для мультиплексной ПЦР: 98°C в течение 90 сек, затем 32-кратная амплификация при 98°C в течение 5 сек, 60° C в течение 240 сек, 72°C в течение 60 сек, затем финальное удлинение при 72°C в течение 1 мин. Детекцию ПЦР-продуктов проводили в 1,5 % агарозном геле.

На рисунке 6 представлена электрофореграмма мультиплексной ПЦР с панелями праймеров для синдрома Альпорта и MODY диабета, соответственно.

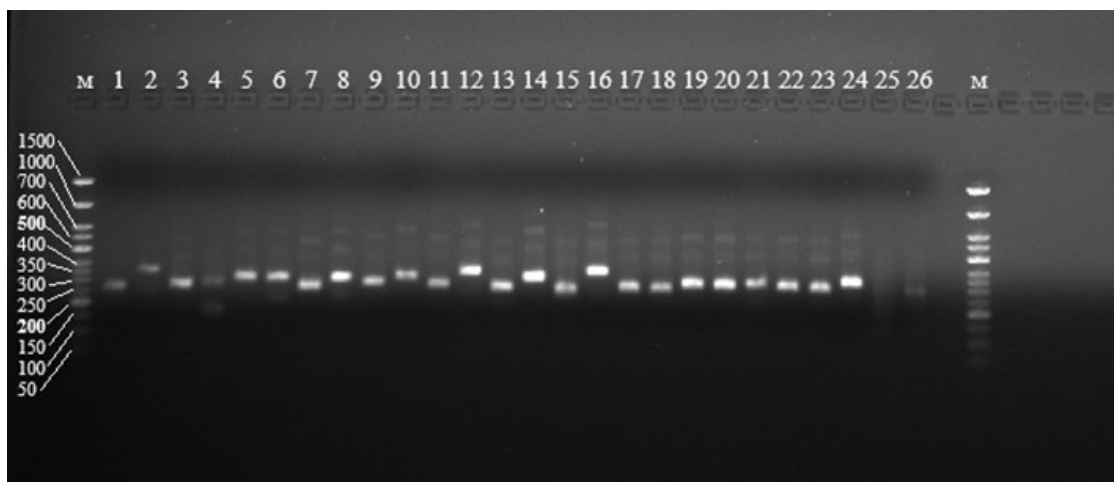


М - маркер молекулярных масс (ДНК маркер Step50 plus), ПЦР-продукты с разными панелями праймеров

Рисунок 6 – Электрофореграмма мультиплексной ПЦР

Детекция ПЦР-продуктов методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле показала большой бэнд в районе 350-400 нуклеотидов, то есть нарабатываются все ПЦР-продукты примерно одинаковым размером (350-400 нуклеотидов).

Следующем этапом была проведена проверка эффективности мультиплексного ПЦР. Оценка эффективности мультиплексного простого ПЦР включает оценку специфичности (отсутствие нежелательных продуктов). ПЦР продукты из рисунка 3 использовали в качестве матрицы при постановке ПЦР. ПЦР проводили с отдельными парами праймеров, которые входили в панель праймеров. На рисунке 7 представлены результаты вышеописанной ПЦР.



М - маркер молекулярных масс (ДНК маркер Step50 plus), отдельные ПЦР-продукты

Рисунок 7 – Электрофореграмма ПЦР продуктов с отдельными парами праймеров на матрицу из мультиплексной ПЦР

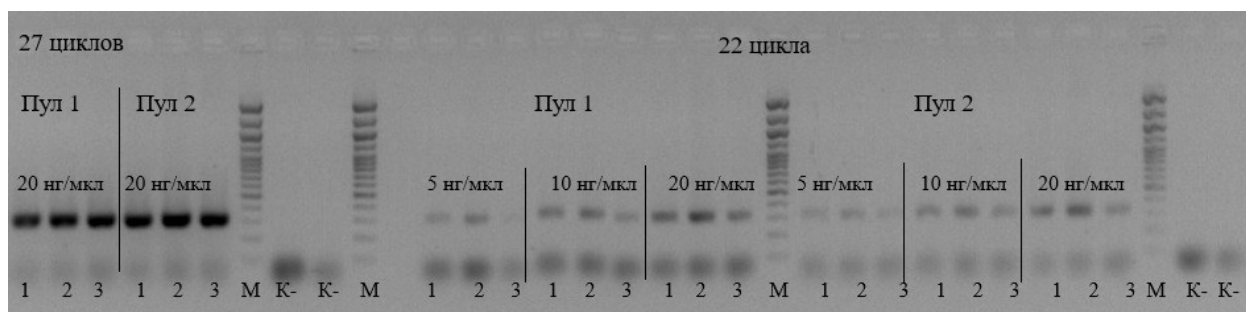
Как видно из рисунка 7 нарабатываются специфичные ПЦР продукты размером порядка 300-400 нуклеотидов, что говорит о высокой работоспособности подобранных праймеров.

При первоначальной постановке ПЦР использовали состав ПЦР смеси и температурно-временной режим, который был описан выше. Учитывая положительные результаты проверки эффективности мультиплексной ПЦР, дополнительных этапов оптимизации не потребовалось.

3.3 Апробация отработанных условий на контрольных образцах ДНК

В рамках выполнения этапа программы «Апробация отработанных условий на контрольных образцах ДНК и оценка покрытия секвенирования целевых участков генов PAX, HNF4A, GSK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6» проводили апробацию отработанных условий и оценку покрытия секвенирования целевых участков гена PAX была выполнена на 3 контрольных образцах ДНК. При амплификации было

протестировано две программы амплификации, отличающиеся количеством циклов. Каждый образец использовался в 3 концентрациях ДНК 5 нг/мкл, 10 нг/мкл и 20 нг/мкл (приложение Д). При этом циклирования с 22 циклами было выполнено на всех данных концентрациях, а циклирование с 27 циклами было выполнено только при концентрации 20 нг/мкл. Целевые ПЦР продукты были установлены во всех образцах (рисунок 8).



1, 2 и 3 – нумерация контрольных образцов; М – ДНК маркер Step 100 Long (ООО «Биолабмикс», S-8103); «К-» - отрицательный контроль постановки ПЦР реакции

Рисунок 8 – Электрофореграмма продуктов ПЦР полученных при использовании пулов праймеров к гену РАН при 22 и 27 циклах амплификации

На представленном изображении показаны результаты электрофоретического анализа продуктов амплификации, полученных с использованием различных условий циклирования и концентраций матричной ДНК. При циклировании в течение 27 циклов как для пула 1, так и для пула 2 наблюдается формирование ПЦР-продуктов с высокой интенсивностью свечения, что свидетельствует о хорошем уровне амплификации и достаточном количестве конечного продукта. В то же время при проведении реакции с 22 циклами интенсивность полос значительно ниже, особенно при низкой концентрации матричной ДНК (5 нг/мкл). Следует отметить, что при увеличении концентрации матричной ДНК (от 5 до 20 нг/мкл) интенсивность амплификационных продуктов возрастает для обоих пулов, однако даже в этом случае при 22 циклах уровень свечения заметно уступает результатам, полученным после 27 циклов.

При секвенировании на генетическом анализаторе MiSeq плотность кластеризации составила 353K/мм². Доля данных, прошедших значение Q30 (точность не менее 99.9%), составило 98.6%. В результате секвенирования было получено от 162612 до 634088 прочтений на образец. Медианная длина прочтений составило 151 п.н. Средняя длина прочтений варьировалась от 135 до 150 п.н. Уровень дупликаций варьировался от 96.5% до 98.1%, что характерно для таргетного секвенирования.

Из представленных данных таблицы Д.1 видно, что, несмотря на более высокую интенсивность свечения при электрофоретическом учёте для образцов, амплифицированных с использованием 27 циклов (рисунок 8), результаты NGS-

секвенирования демонстрируют противоположную тенденцию. В обоих пулах праймеров отмечается снижение общего числа картированных ридов при увеличении числа циклов амплификации. Так, например, при одинаковой концентрации ДНК в образце 1 количество ридов в пуле №1 оказалось меньше на 79 457 (41,7%) по сравнению с амплификацией в 22 цикла, а в пуле №2 — на 60 364 (39,7%).

Также обращает на себя внимание выраженный дисбаланс в картированных ридов при использовании 27 циклов амплификации. Так, число ридов, полученных с праймерной пары 1 в пуле №1 при 20 нг ДНК, составило лишь $\approx 1,37\%$ от общего количества картированных ридов (111 081). Для того же образца при 22 циклах и идентичной концентрации доля пары 1 увеличилась более чем вдвое и достигла $\approx 3,01\%$ (190 538). В пуле №2 ситуация ещё более контрастна: при 27 циклах вклад пары 1 составил всего $\approx 0,13\%$ (118 из 91 697), тогда как при 22 циклах доля возросла до $\approx 0,69\%$ (1 043 из 152 062). При этом при снижении концентрации ДНК до 5 нг и использовании 22 циклов амплификации доля ридов пары 1 в пуле №1 составила $\approx 3,58\%$ (7 042 из 196 916), а в пуле №2 — $\approx 1,33\%$ (3 064 из 230 643), что указывает на более сбалансированное распределение ридов между парами.

На основании проведённых исследований по амплификации и NGS секвенирования кодирующих и регулирующих участков гена РАН можно сделать следующие заключения: Несмотря на более высокую интенсивность свечения при электрофоретическом учёте продуктов амплификации после 27 циклов, результаты NGS-секвенирования показали, что увеличение числа циклов приводит к снижению общего количества картированных ридов и выраженному дисбалансу между парами праймеров. Сравнительный анализ картированных ридов показал, что использование 22 циклов амплификации обеспечивает более равномерное распределение ридов по парам праймеров и снижает эффект переамплификации. Оптимизация условий подбора праймеров показала, что для пула №1 наилучшие результаты достигаются при концентрации праймеров 100 нМ, а для пула №2 — при 50 нМ. Наиболее сбалансированные результаты получены при концентрации матричной ДНК 25 нг на реакцию, что обеспечивает достаточный выход ридов и минимизирует вариации между парами праймеров.

После проверки работоспособности праймеров и оптимизации мультиплексной ПЦР с панелью праймеров на гены HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6 была проведена апробация отработанных условий на контрольных образцах ДНК. ПЦР-продукты, очистили, используя AMPure XP beads (Beckman). Следующим шагом лигировали адаптеры, индексы и секвенирующий праймер, синтез

которых был выполнен на базе лаборатории Национального центра биотехнологии. Остальные шаги делали согласно инструкции набора MiSeq Reagent kit v2 Nano (500 циклов), Illumina. На рисунке 9 показана оценка полученных библиотек после очистки на магнитных частицах и лигирования. Оценку качества библиотек проводили 4150 TapeStation System (Agilent).

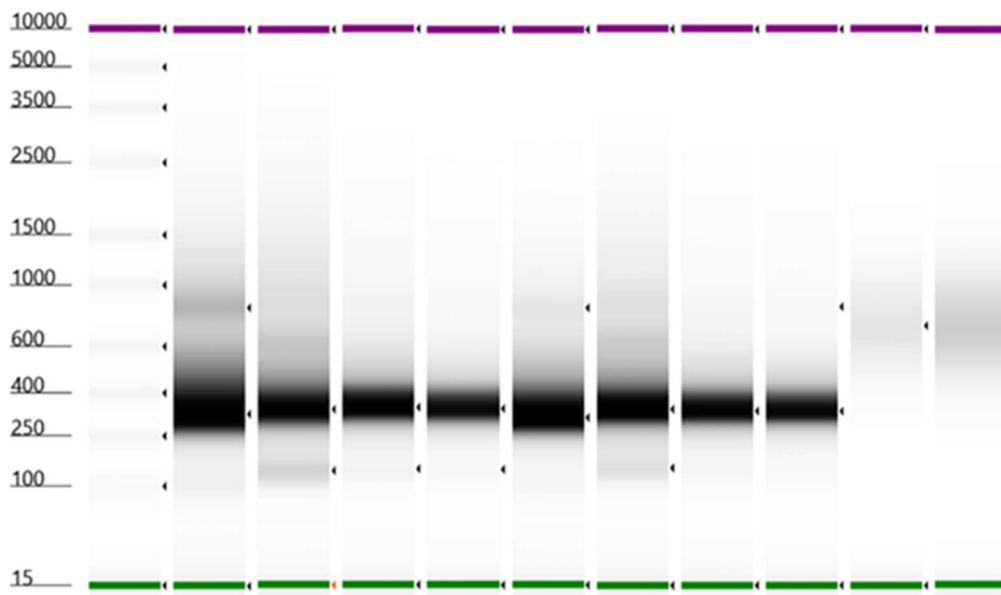


Рисунок 9 – Результаты оценки качества приготовленных библиотек для секвенирования на системе автоматизированного электрофореза 4150 TapeStation

Из рисунка 9 видно, что полученные библиотеки имеют размер в пределах 300-400 нуклеотидов, не деградированы. Размер библиотек в диапазоне 300-400 нуклеотидов свидетельствует о том, что они находятся в нужном диапазоне. Таким образом, контроль качества библиотек показал, что подтверждает пригодность для дальнейшего секвенирования.

Картирование (или выравнивание) последовательностей ДНК, полученных с помощью секвенирования на платформе MiSeq от Illumina, включало несколько ключевых этапов: после первичного секвенирования качество ридов оценивали с помощью программы FastQC, чтобы определить распределение качества по позициям, наличие адаптерных последовательностей и GC-состав. На основании отчёта выполняли тримминг и фильтрацию низкокачественных ридов, адаптеров и других загрязняющих последовательностей. Далее проводили фильтрацию коротких чтений. После предварительной обработки данные выравнивали на референсные гены. Для выравнивания использовался инструмент – bwa mem. На рисунке 10 представлен результат картирования ампликонов на референсный ген Col4A5, состоящий из 51 экзона.

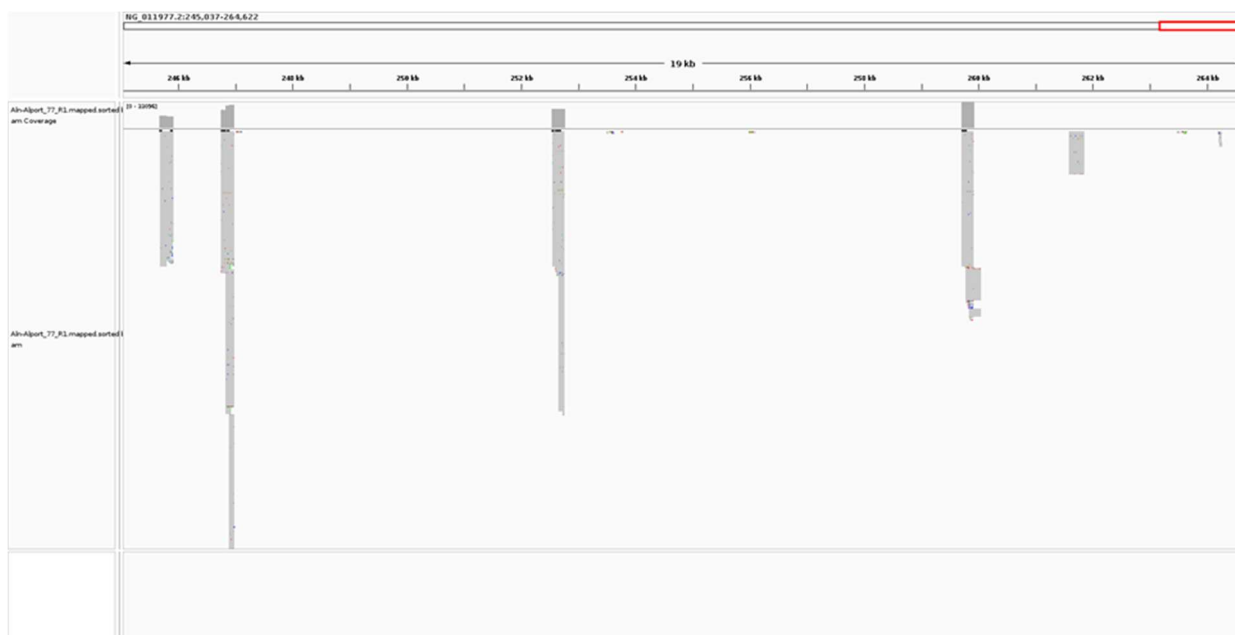


Рисунок 10 – Визуализация секвенирования последовательности ДНК (экзоны гена *Col4A5*)

Из рисунка 10 видно, что секвенированные нами фрагменты после картирования на референсный ген *Col4A5* распределились по экзонам гена. Отдельные столбцы коротких фрагментов отражают количество прочтений. Минимальное покрытие секвенирования целевых участков генов составило 30х, при этом в основном наблюдалось покрытие 100х, что считается достаточным для большинства видов анализа.

3.4 Генетический анализ и валидация результатов скрининга мутаций

В рамках выполнения этапа программы «Скрининг мутаций KRAS/BRAF» был проведен генетический анализ мутаций в генах KRAS/BRAF. Используя набор для мультиплексного скрининга KRAS ddPCR, было обнаружено семь наиболее частых мутаций KRAS в экзоне 2 (кодон 12 и 13). Были определены пороговые значения для нашего анализа. Для этого использовали ДНК, выделенную из FFPE, содержащей гетерозиготную мутацию KRAS G12D (подтвержденную секвенированием), в качестве положительного контроля и ДНК, выделенную из крови здорового пациента, в качестве отрицательного контроля. После установки пороговых значений 6000 для канала 1 и 2500 для канала 2 соответственно, мы применили эти значения к нашим образцам, и в соответствии с этим была рассчитана фракционная представленность для каждого образца первичной опухоли и метастатического образования с помощью программного обеспечения QuantaSoft (рисунок 11).

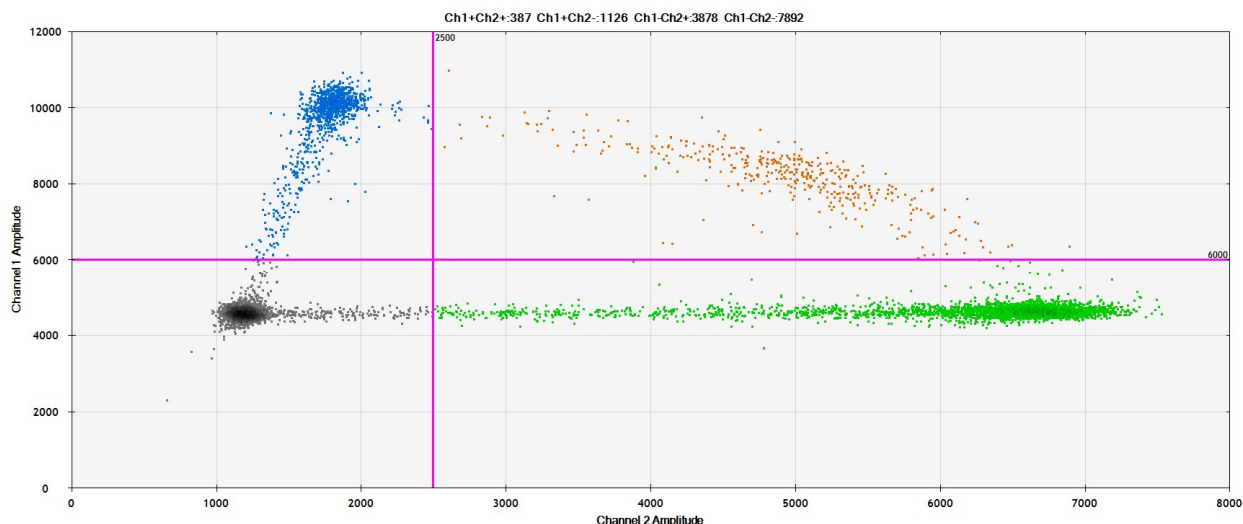


Рисунок 11 – Выходные данные ddPCR в виде двумерной гистограммы

Согласно нашим данным, образцы с $FA \geq 0,1$ были оценены как мутант-положительные, а образцы с $FA < 0,1$ – как мутант-отрицательные. Из 15 образцов первичных опухолей ddPCR выявила mtKRAS в 10 случаях, а в 5 образцах был диагностирован KRAS дикого типа.

При сравнении образцов первичной опухоли с соответствующими метастатическими образованиями в печени ddPCR выявила 3 образцов как KRAS дикого типа, а в 13 метастазах печени была выявлена мутация KRAS. При сравнении результатов, полученных с помощью ddPCR (первичная опухоль и метастазы в печени), у двух пациентов были разные генотипы, относительно мутационного статуса KRAS: мутация была обнаружена в метастазах печени и отрицательная – в первичной опухоли.

Был проанализирован мутационный статус 13 первичных опухолей и 17 метастатических образований печени с помощью таргетированного NGS секвенирования на платформе Illumina (таблица 3).

Таблица 3 – Методы анализа мутаций генов *KRAS*, *BRAF*

Гены	Мутации	Метод анализа
<i>KRAS</i>	Кодон 12, 13 (Экзон 2) Кодон 61 (Экзон 3)	NGS секвенирование
<i>BRAF</i>	Кодон 439, 459 (Экзон 11) Кодон 600, 601 (Экзон 15)	NGS секвенирование

Результаты секвенирования таргетных мишеней генов *KRAS*, *BRAF* представлены в таблице 4. Кодон 13 (G13V) гена *KRAS* — мутация, встречается почти во всех образцах (100% опухоль, ~88% метастазы). Кодон 12 мутации присутствуют, но реже, и распределяются между Asp, Val, Ser. Это соответствует известным «горячим точкам» колоректального рака (G12 и G13). Мутации в гене *BRAF* в первичной опухоли чаще всего

K601E (76,9%), что согласуется с клиническими данными. В метастазах — чаще встречается мутация V600E (17,6%), K601E реже (5,9%). Это может указывать на клональную гетерогенность: разные популяции клеток в первичной опухоли и метастазах. Высокая частота G13V и K601E говорит о том, что такие пациенты не чувствительны к анти-EGFR терапии (цетуксимаб, панитумумаб). Разница между опухолью и метастазами указывает на необходимость обследовать и метастатический материал, а не только первичный.

Таблица 4 – Типы мутаций *KRAS* и *BRAF*

<i>KRAS</i> экзон 2	Дикий тип (амино кислота)	Мутация (амино кислота)	Мутации в опухоли, n (%) 13	Мутации в метастазах, n (%) 17
Кодон 12	GGT (G)	GAT (D)		1 (5,9)
	GGT (G)	GTT (V)	2 (15,4)	4 (23,5)
	GGT (G)	AGT (S)	1 (7,7)	1 (5,9)
Кодон 13	GGC (G)	GTT (V)	13 (100)	15 (88,2)
	GGC (G)	AGT (S)		1 (5,9)
<i>BRAF</i> экзон 15	GTG (V)	GAG (E)	2 (15,4)	3 (17,6)
	AAG (K)	GAG (E)	10 (76,9)	1 (5,9)

В проведённом исследовании показано, что мутации в генах *KRAS* и *BRAF* занимают ведущую роль в молекулярном паттерне колоректального рака. Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым мутации в кодонах 12 и 13 гена *KRAS* являются наиболее частыми в данной опухоли. В нашей выборке мутация G13V выявлялась во всех первичных опухолях (100%) и сохранялась в большинстве метастатических образцов (88,2%). При этом в метастазах наблюдалось более высокое разнообразие мутаций по сравнению с первичной опухолью, в частности, чаще встречались варианты G12V и реже — G12D и G12S (рисунок 12). Полученные результаты показали наличие клональной гетерогенности, которая может возникать в процессе прогрессии опухоли и формирования метастазов. Повышенное разнообразие мутационных вариантов в метастатических очагах может быть следствием селективного давления микроокружения, терапии или активации альтернативных сигнальных каскадов, обеспечивающих выживание опухолевых субклонов. Эти данные подтверждают важность оценки мутационного статуса *KRAS/BRAF* на различных стадиях заболевания, поскольку выявленные различия могут определять чувствительность опухоли к таргетной терапии и влиять на прогноз пациентов.

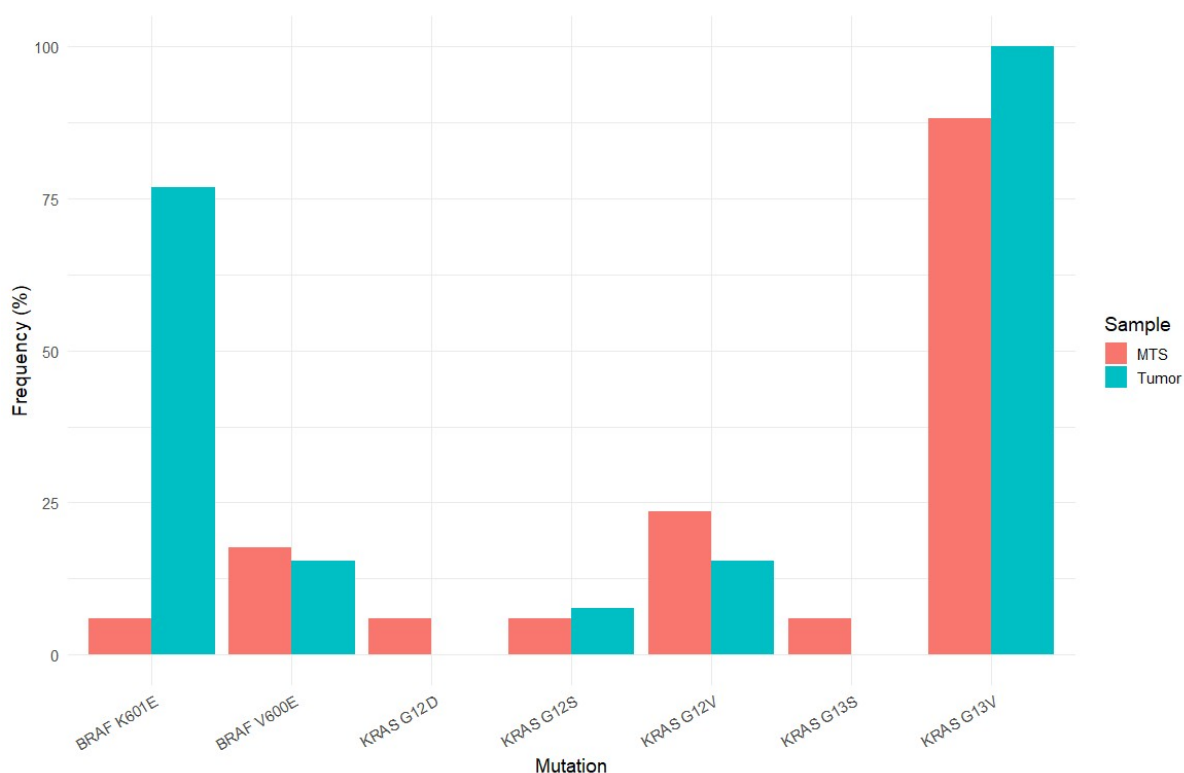


Рисунок 12 – Частота мутаций *KRAS* и *BRAF* в опухолях и метастазах

Распределение мутации *BRAF* V600E не показало принципиальных различий в распределении мутаций. В первичной опухоли она регистрировалась в 15,4% случаев, тогда как в метастазах частота её выявления составляла 17,6%. Данные согласуются с клиническими наблюдениями: небольшая разница в процентах объясняется методикой и гетерогенностью образцов, а принципиально мутация одинакова в первичном и метастатическом очаге.

С клинической точки зрения обнаруженные особенности имеют важное значение. Известно, что наличие мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* является прогностическим и предиктивным фактором: пациенты с такими изменениями, как правило, не отвечают на терапию анти-EGFR антителами (цетуксимаб, панитумумаб). При этом наличие мутации *BRAF* V600E ассоциируется с более агрессивным течением заболевания и худшим прогнозом, однако в нашем исследовании она реже обнаруживалась в первичной опухоли, что может повлиять на выбор тактики лечения.

В нашем исследовании таргетное NGS выявило большее число мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* по сравнению с ddPCR. Это объясняется более высокой чувствительностью NGS, позволяющей детектировать варианты с низкой частотой аллеля, а также более широким охватом «горячих точек», включая редкие мутации. Дополнительно, использование секвенирования позволяет зафиксировать субклональные изменения, отражающие клональную гетерогенность опухоли. Таким образом, полученные результаты

подчёркивают необходимость проведения параллельного анализа первичных и метастатических образцов, поскольку молекулярный профиль может различаться. Это особенно важно в условиях персонализированной медицины, где корректное определение статуса мутаций *KRAS* и *BRAF* напрямую влияет на выбор таргетной терапии.

3.5 Иммунодеплеция плазмы крови и масс-спектрометрический анализ

Для оптимизации масс-спектрометрического анализа плазмы крови рекомендуется применять методы, способствующие удалению из проб основных белков крови, в частности иммунодеплецию. Многие белки клинического интереса присутствуют в низких концентрациях по сравнению с основными белками крови. Основными белками, являются альбумин, alpha-macroglobulin, иммуноглобулины IgA, IgG, IgM, haptoglobin, serotransferrin, apolipoproteins, complement C3, fibrinogen, alpha-antitrypsin, которые составляют ~ 95% всех белков плазмы крови человека. Для удаления перечисленных белков, можно использовать истощающие колонки Thermo Scientific Pierce Top 12 Abundant Protein Depletion Spin Columns, которые предназначены для удаления двенадцати белков с высоким содержанием из 10 мкл сыворотки или плазмы крови человека. В колонках используются высокоспецифичные иммобилизованные антитела для удаления белка, которые обеспечивают минимальное неспецифическое взаимодействие с другими белками.

Стратегия иммунодеплеции включает удаление избыточных или мешающих белков из образца для обогащения несвязанной фракции, тем самым улучшая обнаружение целевых белков или биомаркеров. Альбумин, самый распространенный белок в плазме млекопитающих, составляет более 50% от общего белка плазмы [81]. В данном исследовании использовался коммерчески доступный набор для деплеции альбумина, который эффективно удалил значительную часть этого распространенного белка (рисунок 13). Хотя остаточные количества альбумина все еще были видны на геле, окрашенном красителем кумасси бриллиантовый синий (СВВ), и обнаружены с помощью масс-спектрометрии, количество белковых групп, пептидных последовательностей и совпадений пептидных спектров увеличивалось после деплеции. Как показано на диаграмме Венна (рисунок 13), 199 белков (43,7%) были общими для образцов как до, так и после деплеции. Однако деплецированный образец дал большее количество уникально идентифицированных белков - 175 белков (38,5%) по сравнению с образцом плазмы до удаления альбумина. Кроме того, согласно результатам поиска Mascot, показатель белка альбумина снизился с 15 446 в образце плазмы до 5397 в обедненном образце.

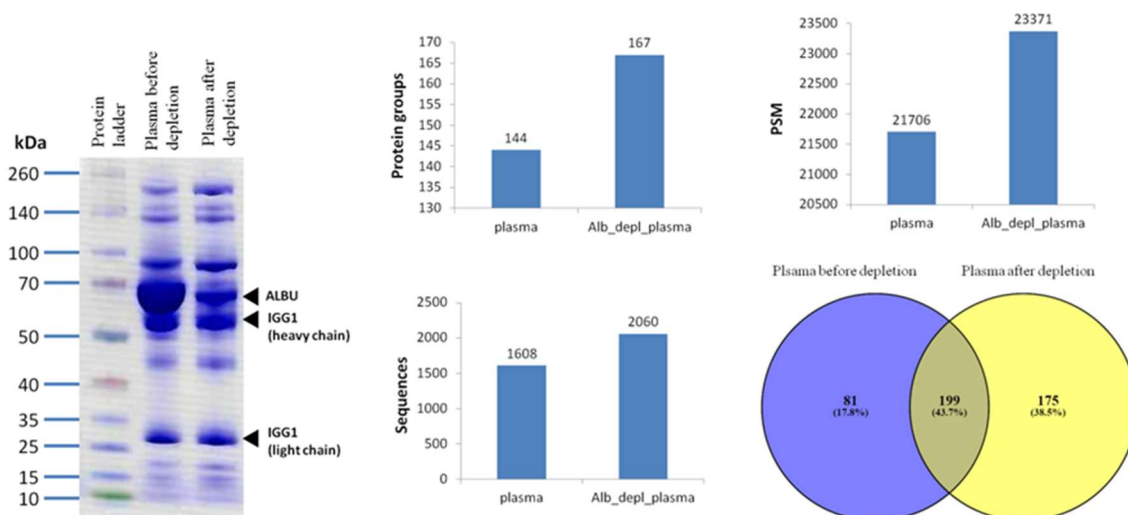


Рисунок 13 – Истощение альбумина из плазмы крови. Удаление наиболее распространенного белка из плазмы крови проводилось с помощью набора для удаления альбумина. Данные, полученные с помощью инструмента PEAKS, представлены в виде столбчатых диаграмм

Осаждение белка является важным этапом подготовки образца для детального протеомного анализа. Обычно используются несколько методов осаждения, включая протоколы с ацетоном, сульфатом аммония, трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и хлороформом/метанолом, которые были применены к плазме человека, жировой ткани, коровьему молоку и тканям мозга крысы [82-85]. Хотя эти методы в целом дают сопоставимые результаты, их эффективность зависит от источника образца, будь то ткань, клетки или кровь. Например, осаждение ТХУ и ацетоном оказалось наиболее эффективным для плазмы человека, в то время как метод хлороформа/метанола обеспечил более высокую степень извлечения белка из жировой ткани человека. Сравнение методов осаждения с колонками для удаления детергентов (DRS) и методом подготовки образцов с помощью фильтрации (FASP) показало, что эффективность каждого метода существенно зависит от исходного количества белка [86]. Метод FASP наиболее эффективен при низких концентрациях белка (около 10 мкг), но его эффективность сопоставима с другими методами при более высоких начальных концентрациях (более 100 мкг). Таким образом, он предпочтителен при ограниченном количестве доступного образца. Однако стоимость фильтрующих устройств, используемых в FASP, может увеличить общие расходы на исследование. В связи с отсутствием ограничений на доступность образцов, предпочтение было отдано методам осаждения, а не FASP. Среди них протокол с хлороформом/метанолом был выбран благодаря своей простоте, отсутствию необходимости в охлаждении и скорости выполнения (30–40 мин), что минимизирует риск деградации белка.

Предложена полезная модель рабочего процесса по идентификации белков в сложных образцах, которая заключается в сочетании длинного градиента жидкостной хроматографии и высоких частот накопления масс-спектров. Полученные результаты показывают, что увеличение частоты накопления масс-спектров в целом улучшает идентификацию белков, хотя степень улучшения зависит от типа образца. Для лизатов из образцов обедненной альбумином плазмы кролика продемонстрировали прирост 2,6% соответственно. Более высокие вклады в идентификацию белков были также достигнуты с расширенными градиентами LC, что привело к улучшению на 10,3% для плазмы. Более того, использование более современных биоинформатических инструментов (deep learning boost PEAKS) значительно повысило идентификацию, с ростом на 9,2% для плазмы.

Плазму человека и кролика, истощенную по альбумину, выбрали в качестве сложных образцов для трехкратного анализа с использованием методов А, В, С и D (рисунок 14). Подготовку образцов проводили согласно модифицированному протоколу протеолиза в растворе, описанному Кимом [87]. Этот протокол обеспечивал более высокий выход пептидов, по сравнению с протеолизом в буфере, содержащим мочевины.

Перед трипсинолизом образцы из плазмы человека были растворены в буфере экстракции, содержащем 4% SDS, денатурированы нагреванием, восстановлены и алкилированы. Детергенты, соли и низкомолекулярные компоненты из буфера экстракции были удалены путем осаждения белка смесью хлороформ/метанол. Полученные белковые осадки были ресуспендированы в 100 мМ NH_4HCO_3 и обработаны ультразвуком, после чего был проведен ночной трипсинолиз. После протеолиза образцы были высушены с помощью вакуумного концентратора SpeedVac для удаления растворителей. Для каждого анализа пептидная смесь, содержащая 900–1000 нг, была загружена в колонку nanoLC с обращенной фазой 75 мкм I.D.×15 см, вблизи предела насыщения [88].

В этом исследовании пептидные смеси, полученные из плазмы кролика, анализировали с помощью нано LC-MS/MS с использованием четырех методов А, В, С и D. Эти методы использовали различные комбинации градиентов LC и частот накопления спектров MS (рисунок 14), включая метод А: градиент LC 48 мин, MS-2,00 Гц, MS/MS -4,00 Гц; метод В: градиент LC 48 мин, MS-4,00 Гц, MS/MS -8,00 Гц; метод С: градиент LC 90 мин, MS-2,00 Гц, MS/MS -4,00 Гц; метод D: градиент LC 90 мин, MS-4,00 Гц, MS/MS -8,00 Гц.

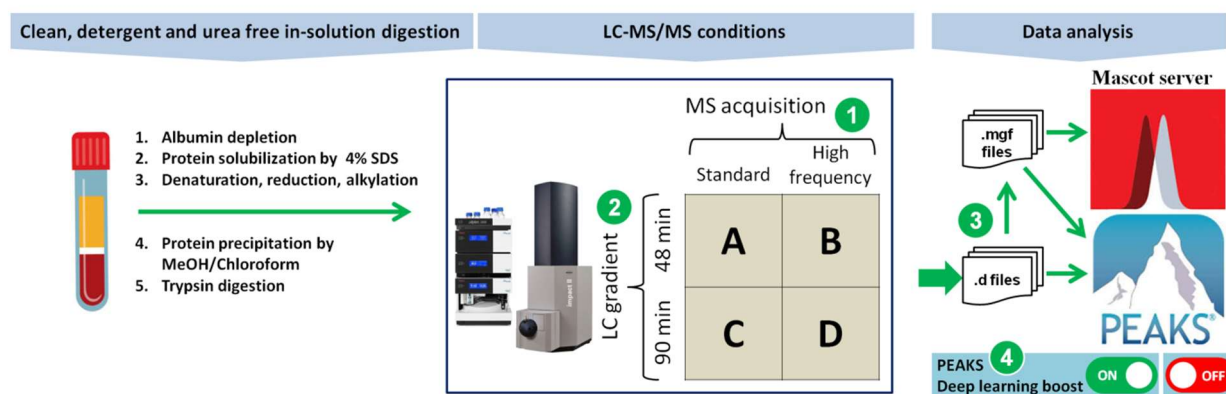


Рисунок 14 – Подготовка образцов и условия ЖХ-МС/МС. (а) Экспериментальный рабочий процесс описывает анализ образцов из обедненной альбумином плазмы с использованием методов А, В, С и D. Заполненные зеленые круги отображают параметры, изменяемые в ходе этого рабочего процесса: 1 — частота сбора данных МС, 2 — градиент ЖХ, 3 — форматы файлов и 4 — функция усиления Deep Learning boost PEAKS

Установлено, что для образца плазмы крови повышение частоты накопления MS спектров увеличивает количество идентификации более чем на 2,6% (рисунок 14). Использование сырых выходных файлов (.d формат) вместо файлов mgf увеличило идентификацию групп белков на 8,6%. Использование более длинного градиента (90 мин) хроматографического разделения привело к более значительному увеличению идентификации на 10,2%. Применение DLboost для анализа DDA (DL_boost) улучшила идентификацию белков более чем на 9%.

Peaks Studio 11 предлагает обучаемую опцию идентификации для анализа DDA, который увеличивает идентификацию PSM в процессе поиска в базе данных и увеличивает скорость идентификации более чем на 10% [89, 90]. Были проанализированы как MGF, так и необработанные файлы (.d Extension) с этой опцией и без него (рисунок 15). Использование необработанных файлов вместо файлов MGF увеличило идентификацию белковых групп. Например, максимальное увеличение для истощенных от альбумина образцов около 10%. Столбцы серого цвета соответствуют результатам, полученным с помощью Mascot, данные, обозначенные остальными столбцами получены с помощью программы PEAKS Studio 11.

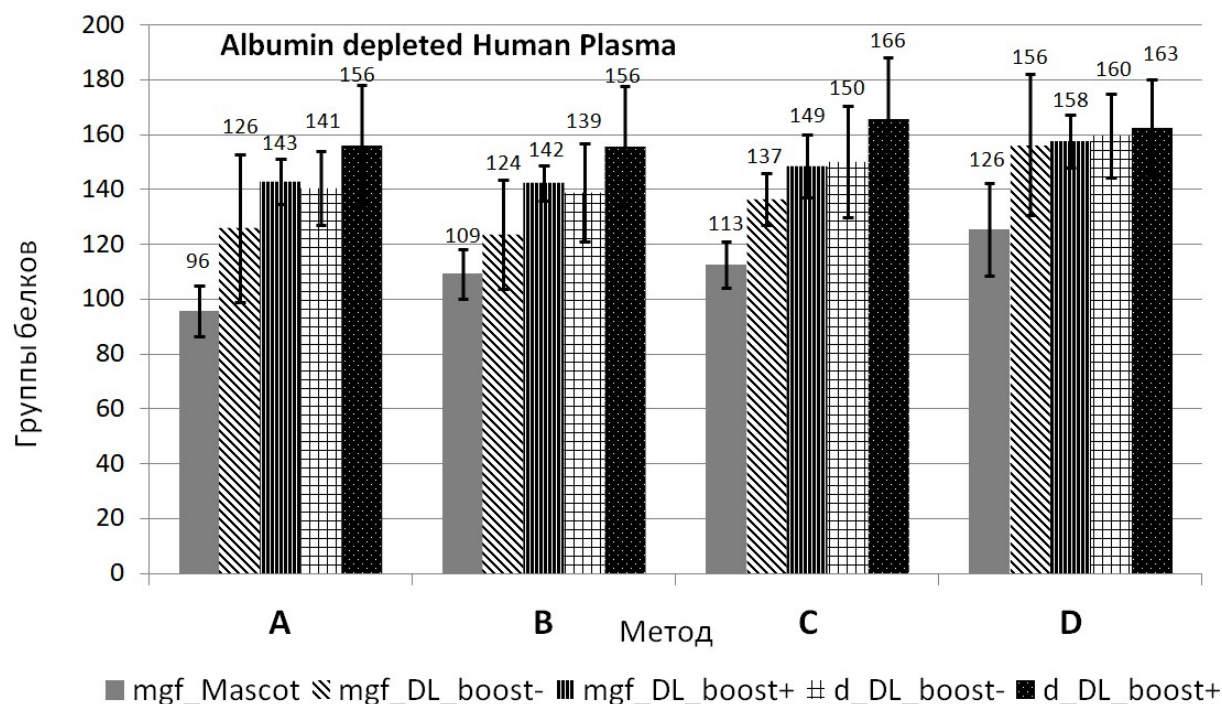


Рисунок 15 – Влияние различных параметров, включающих формат файлов (.d или .mgf), опции глубокого обучения на количество идентификаций групп белков для методов А, В, С и D сложных протеомов из истощенного от альбумина образца плазмы крови. Столбцы серого цвета соответствуют результатам, полученным с помощью Mascot, данные, обозначенные остальными столбцами получены с помощью программы PEAKS Studio 11. Опция усиления глубокого обучения включается для столбцов с более интенсивными оттенками (обозначена как DL_boost+). Планки погрешностей представляют собой стандартные отклонения данных из трех биологических реплик

Используя высокоразрешающую ЖХ-МС/МС и рабочие процессы идентификации на основе баз данных, мы исследовали протеомы плазмы, истощенной от альбумина (рисунок 16). Гаптоглобин (HPT_HUMAN) был уверенно идентифицирован с 63% покрытием последовательностей поисковыми системами Mascot и PEAKS. Пептид VQTECVDKDGASGAPAHWDFTWTVDGTLSPK был валидирован с помощью надежной фрагментации MS/MS, что подтвердило его назначение. Гаптоглобин, белок острой фазы с антиоксидантными и противовоспалительными функциями, ранее был связан с сосудистым повреждением и окислительным стрессом при инсульте [91], и наши результаты еще раз подтверждают его клиническую ценность. Этот белок является еще клиническим биомаркером, одобренным FDA [92].

MASCOT Search Results

Protein View: HPT_HUMAN

Haptooglobin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HP PE=1 SV=1

Database: Homo_sapiens
Score: 14070
Monoisotopic mass (M_0): 45861
Calculated pI: 6.13
Taxonomy: Homo_sapiens

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of HPT_HUMAN against nr](#).

Search parameters

MS data file: ProteinAnalysisResults.mgf
Enzyme: Trypsin/P; cuts C-term side of KR.
Fixed modifications: Carbamidomethyl(C)
Variable modifications: Oxidation(M), Acetyl (Protein N-term)

Protein sequence coverage: 63%

Matched peptides shown in **bold red**.

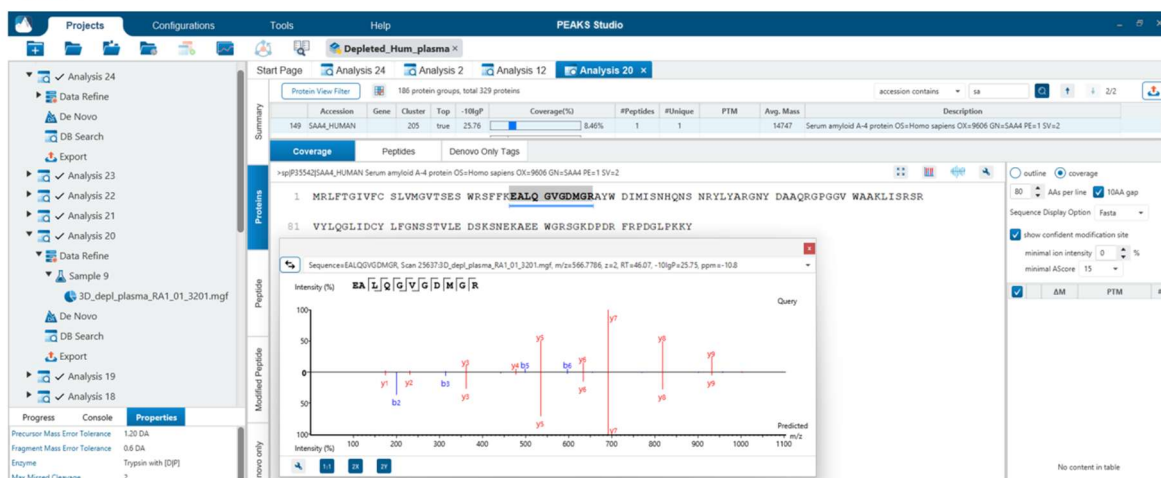
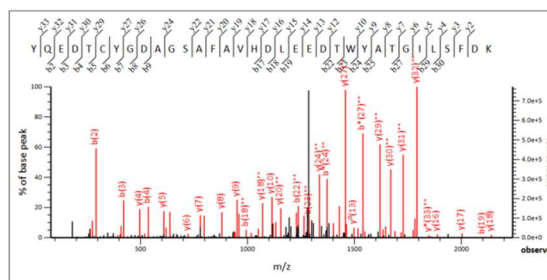
1 MSALGAVIAL LINGOLFVAD SONDVTDAD DCFPFPEIA KQYVEHVRY
51 QCHYTYELMT KQGVYELND KQWINEAVG DKLKRCAGD GCKPFPEIAM
101 QYVHEVRYQ CHYVYELATE GQVYELANE KQWINEAVG KLFKPCAVOG
151 KQWINEAVG RILGGLIAK GFFWQAKMV SHNDLTGAT LINEQMLLT
201 KXNLFILHSE NATARDIAPT LTYVQKGL VEIEKVLMP NYQVQIGLI
251 KLKQKVEVNE RVNPLCLPK DYAEVGVGV VSGWQKSNF KFTDHLRYVM
301 LPVQDQCCI RHYKSTVPE KCTPRSPGV QFILNRTFC AGMKYQEDT
351 CYDAGSAFA VHLEEDTWY ATGLSPFDS CAAVEGVVY KVTYIQWVQ
401 KTIKEN

Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **YQEDTCYGDAGSAFAVHLEEDTWYATGLISFDK**
Found in **HPT_HUMAN** in **Homo_sapiens**, Haptooglobin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HP PE=1 SV=1

Match to Query 69212: 3873.716352 from(1292.246060.3+) intensity(289958.0000) rtinseconds(4995.27) scan(MS: 51283 MSMS: 51310) index(49272)
Title: Cmpd 49286, +MS2(1292.2461), 55.0eV, 83.3 min #51310
Data file ProteinAnalysisResults.mgf



В верхней части приведены результаты покрытия сиквенса последовательности белка гаптоглобина HPT и MS/MS спектр одного из триптических пептидов (Mascot). В нижней части рисунка показано покрытие сиквенса амилоидного белка SAA4 (PEAKS)

Рисунок 16 – Белки-биомаркеры инсульта, идентифицированные с помощью ЖХ-МС/МС

Кроме того, амилоидный белок сыворотки A4 (SAA4_HUMAN) был идентифицирован с помощью анализа PEAKS. SAA4, представитель семейства сывороточного амилоида A, является аполипопротеином острой фазы, связанным с воспалением, липидным обменом и сосудистым ремоделированием [91, 93].

3.6 Определение активности фермента β -глюкоцереброзидазы

Активность β -глюкоцереброзидазы (GBA) была успешно измерена во всех образцах с использованием масс-спектрометрического анализа. Для этого брали диск сухого пятна крови толщиной 3,2 мм. В пробирку с образцом добавляли реакционную смесь, которая содержит C12-глюкоцереброзид (синтетический субстрат глюкоцереброзидазы), внутренний стандарт C14-церамид и буферный раствор. Инкубация образца с РС проходила при температуре 37 °C в течение 18 часов. В реакционную смесь добавляли гаситель и перемешивали пипетированием. Для проведения жидкостной экстракции к полученной смеси добавляли этилацетат и воду. Смесь центрифугировали при 1500 об/мин. Верхнюю

органическую фазу отделяли от нижней, неорганической. Содержимое высушивали под вакуумом. Для ресуспендирования образца добавляли 84% ацетонитрил. Полученный раствор переносили на фильтр при последующем центрифугировании (1500 g в течение 2 минут при комнатной температуре). Анализ образцов проводили на масс-спектрометре Impact II (Bruker). Средний уровень активности фермента в контрольных образцах составлял в пределах физиологической нормы (около 1,2–1,5 мкмоль/л/ч), в то время как в образцах пациентов с болезнью Гоше активность находилась ниже предела обнаружения метода (0,5 мкмоль/л/ч). Статистический анализ показал достоверные различия между контрольной и патологической группами ($p < 0,001$), что подтверждает чувствительность метода к выявлению ферментного дефицита. Масс-спектрометрический анализ обеспечил чёткое разделение между контрольными и патологическими образцами, что указывает на его высокий аналитический диапазон и специфичность. На рисунке 17 показан процесс пробоподготовки образцов при диагностике болезни Гоше.

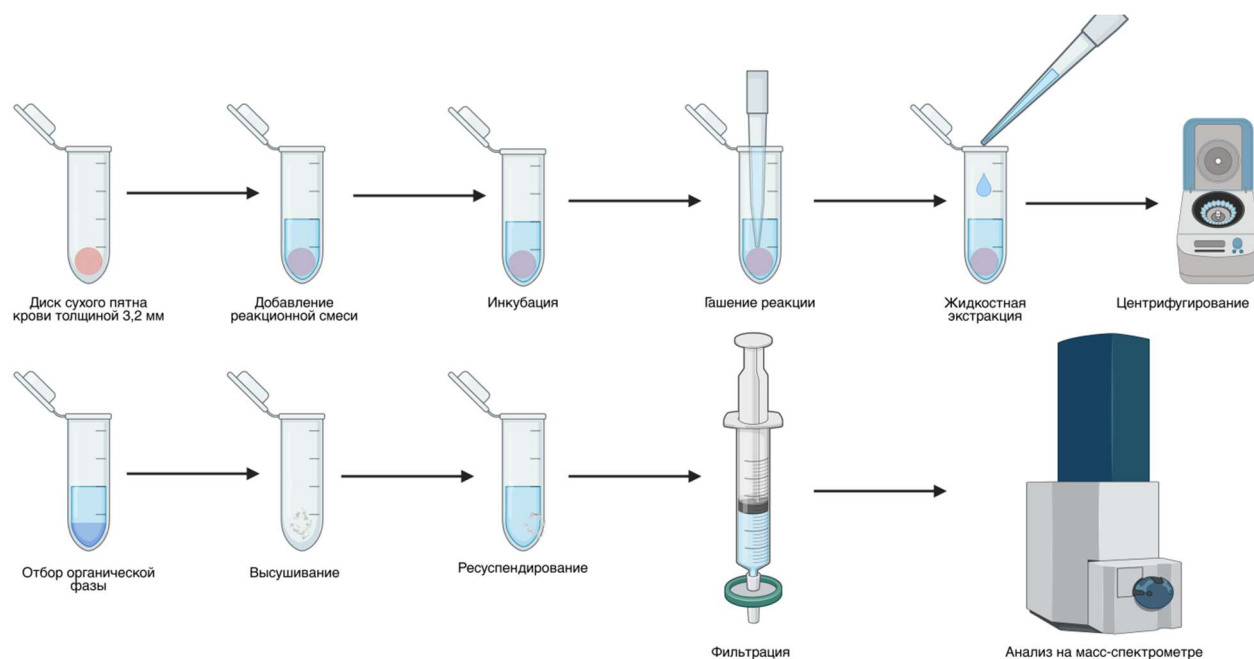


Рисунок 17 – Пробоподготовка образцов для диагностики болезни Гоше методом масс-спектрометрии

Метод масс-спектрометрии продемонстрировал чувствительность 100% в пределах исследуемой выборки, корректно идентифицировав оба образца болезни Гоше как положительные. При этом масс-спектрометрический тест также показал 100% специфичность, не выдав ложноположительных результатов среди здоровых доноров.

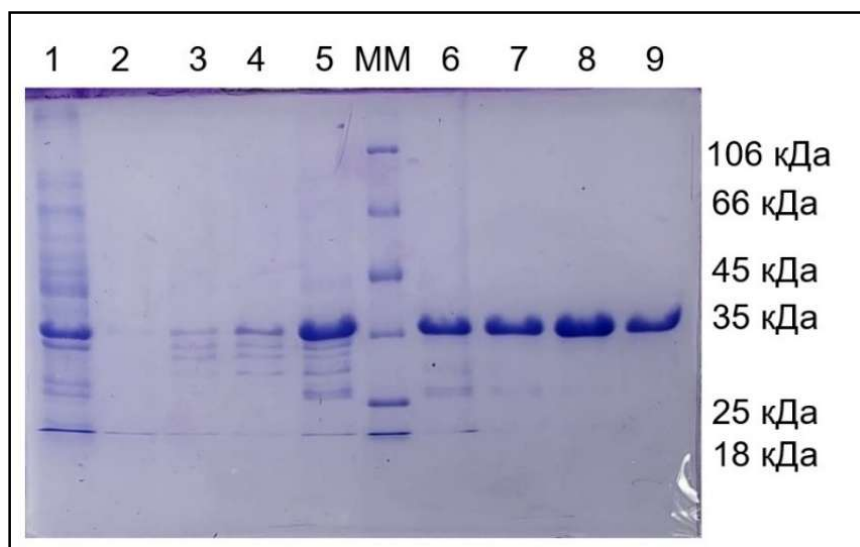
Таким образом, tandemная масс-спектрометрия на приборе Impact II (Bruker Daltonics) позволила достоверно измерить активность фермента β -глюкоцереброзидазы в сухих пятнах крови и обеспечила возможность количественной дифференциации между

нормальной и патологически сниженной активностью фермента. Метод продемонстрировал высокую точность, воспроизводимость и применимость для скрининговой диагностики болезни Гоше в клинических лабораториях Казахстана.

3.7 Получение рекомбинантного гексона аденовируса

В результате трансформации экспрессионной плазмидой pET28, содержащей ген фрагмента N-концевой части гексона аденовируса человека 3-го типа, был получен штамм *E. coli* BL21/pET28/hNAdV. Анализ экспрессионной активности показал, что данный штамм продуцирует белок с молекулярной массой 35 кДа. Индукция экспрессии с использованием 0,2 mM IPTG обеспечивала высокую концентрацию белка уже через 4 часа инкубирования. Максимальная продукция рекомбинантного белка в растворимой фракции наблюдалась при температуре культивирования штамм-продуцента 37°C.

Оптимизация параметров выделения и очистки позволила получить препараты очищенного рекомбинантного гексона аденовируса человека 3-го типа. Для очистки белка применялась металлохелатная хроматография на никель-сефарозе. В качестве элюирующего буфера использовался раствор, содержащий 8 M мочевины и различные концентрации имидазола. Результаты очистки рекомбинантного гексона аденовируса человека 3 типа представлен на рисунке 18.



1 – Проток через колонку; 2 – Промывка колонки; 3-4 – 50 mM имидазол; 5-7 – 100 mM имидазол; 8-9 – 150 mM имидазол; MM – молекулярные маркеры

Рисунок 18 – ПААГ электрофорез рекомбинантного hNAdV после хроматографической очистки

Согласно литературным данным, был разработан укороченный вариант гексона, включающий около 20 % полной длины молекулы, однако содержащий шесть из семи гипервариабельных регионов (HVR). Анализ показал, что основная иммунная реактивность сосредоточена в последовательности HVR 1–6. Очищенные фрагменты гексона нашли

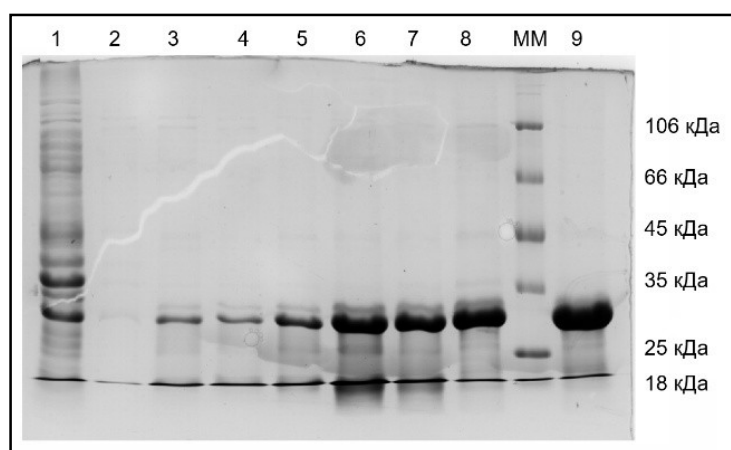
применение не только для иммунизации животных, но и в ряде биохимических методов, включая нейтрализационные тесты, методы аффинного вытягивания и конкурентные исследования. Представленная технология отличается экономической эффективностью и позволяет получать миллиграммовые количества растворимого рекомбинантного гексона. Таким образом, она дополняет традиционные методы и способствует развитию исследований в области аденовирусов, а также созданию новых диагностических систем.

3.8 Получение рекомбинантного VP4 антигена ротавируса

В результате клонирования гена VP4 антигена ротавируса человека в экспрессионную плазмиду pET28 и последующей трансформации pET28/VP4 HRV плазмиды в компетентные кишечные палочки получен штамм *E. coli* B121/pET28/VP4 HRV. Определение экспрессионной активности штамма *E. coli* B121/pET28/VP4 HRV показало, что штамм-продуцент производит белок молекулярной массой 30 кДа при индукции 0,2 мМ IPTG.

В результате отработки параметров выделения и очистки были получены очищенные препараты рекомбинантного VP4 антигена ротавируса человека. Для очистки рекомбинантного антигена использовали металлхелатную хроматографию на основе никель-сефарозы. В качестве элюирующего буфера использовали буфер с содержанием 8М мочевины и различных концентрациях имидазола в соответствии с рисунком 19. Отработанный протокол выделения и очистки позволяет получать препараты, содержащие рекомбинантный VP4 антиген ротавируса человека без примесей. Концентрация белка в очищенных препаратах составило 1700 мкг/мл.

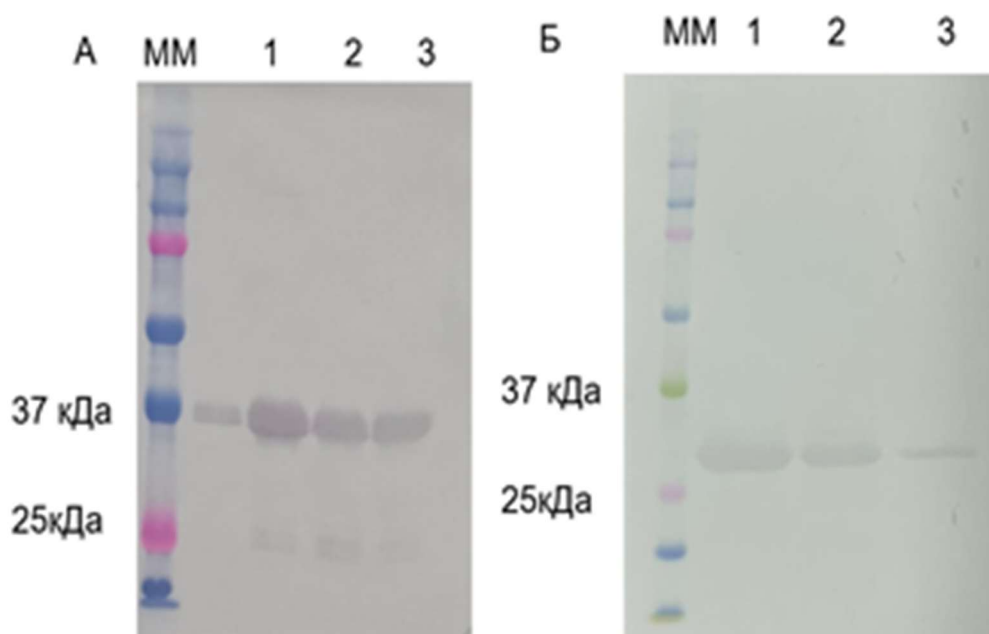
Применение VP4P, как по отдельности (группы P7-25, P7-100, P23-25 и P23-100), так и в комбинации (группа P7-P23), приводило к значительному повышению уровней IgG и нейтрализующих антител (NAbs). Совместное введение этих белков по 25 мкг каждого вызывало более выраженный иммунный ответ по сравнению с их отдельным применением в дозах 25 или 100 мкг. Применение рекомбинантного антигена в концентрации 100 мкг обеспечивала аналогичный уровень активации В-клеток, что указывает на потенциально большую иммуногенность антигена. Представленные в литературе данные подтверждают высокую иммуногенность комбинации белков с VP4 антигеном, что делает их перспективными кандидатами для разработки эффективной вакцины и диагностических тест-систем. Полученные результаты подчеркивают перспективность комбинации VP4P для разработки эффективных вакцинных композиций и диагностических тест-систем.



1 – Проток через колонку; 2 – Промывка колонки; 3-4 – 50 мМ имидазол; 5-7 – 100 мМ имидазол; 8-9 – 150 мМ имидазол; MM – молекулярные маркеры

Рисунок 19 – ПААГ электрофорез рекомбинантного VP4 HRV после хроматографической очистки

Для определения иммунохимических характеристик рекомбинантных гексона аденовируса и VP4 антигена ротавируса человека использовали Вестерн-блот и ЖХ-МС/МС спектрометрию. В результате Вестерн-блота выявлено, что рекомбинантный гексон аденовируса 3-го типа и рекомбинантный VP4 антиген ротавируса человека специфический реагируют с anti-His-tag моноклональными антителами в соответствии с рисунком 20.



Линия 1-3 – рекомбинантные антигены; MM – молекулярные маркеры

Рисунок 20 – Вестерн-блот рекомбинантного гексона аденовируса 3-го типа (А) и рекомбинантного VP4 антигена ротавируса человека (Б) с anti-His-tag моноклональными антителами

В результате программы Mascot были представлены 43 наиболее вероятных белков, соответствующие полученным масс-спектрам, из которых наибольший скор (Score 2033) соответствовал только одному гексону рода Mastadenovirus семейства Adenoviridae. MS/MS спектры пептидов NPTQTPCYGSYAKPTNEHGGITK, TGDNGNPETVIFYTEEADVLTDPDTHLVHAVPAADR этого белка со схемами их фрагментации представлены на рисунке 21.

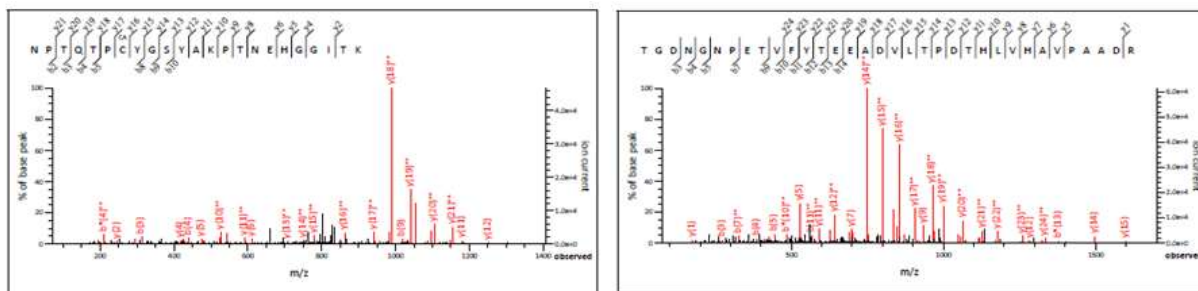


Рисунок 21 – MS/MS спектры пептидов со схемами фрагментации аминокислотных последовательностей белка гHexon

В результате проведенных исследований получен фрагмент гексона HAdV составляющий 16% от всей длинный гексона, начиная с A(120) до R(316) аминокислот. Данный фрагмент содержит два гипервариабельный участка аминокислотная последовательность которого характерна только для гексона аденовируса человека 3 типа. После успешной бактериальной экспрессии и очистки методом металл аффинной хроматографии получили очищенный препарат рекомбинантного гексона HAdV. Анализ антигена методом ЖХ-МС/МС-спектрометрии и поиска в базе данных SwissProt показал совпадение с гексоном аденовируса человека 3 типа с высоким показателем.

Полученные антигены могут быть использованы в диагностических целях, а также для генерации как моноклональных, так и поликлональных антител к вирусам, которые трудно культивировать в клеточных системах. Такие антигена и антитела способны существенно ускорить оптимизацию условий выращивания и очистки вируса, а также способствовать более глубокому изучению вирусного инфекционного цикла и применяться для диагностики инфекционных заболеваний человека.

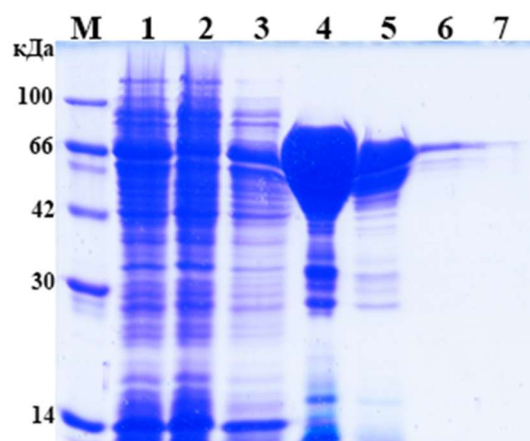
3.9 Экспрессия гена обратной транскриптазы и получение штамма-продуцента

Ранее, ген модифицированной обратной транскриптазы из ВИЧ, содержащий 18 аминокислотных замен был синтезирован и успешной клонирован в векторе pET-28c(+) под контролем промотора T7 с получением результирующего вектора pET28c/RT-HIV. Компетентные клетки штамма E. coli BL-21(DE3) были трансформированы вектором pET28c/RT-HIV. Клетки электропорировали с помощью электропоратора MicroPulser (Bio-Rad) при следующих режимах: кювета 2,0 мм; напряжение 2,5 кВ; время переноса 4,7 мс.

Клоны трансформанты отбирали на ЛБ-агаре с канамицином (50 мкг/мл) и культивировали на ЛБ-бульоне с канамицином до достижения $OD_{600}=0,6$, после чего добавляли ИПТГ в концентрации 0,5 мМ и проводили индукцию белка в течение 20 часов при 18°C. Образцы культуры отбирали через 2, 4 и 20 часов индукции, клетки лизировали и анализировали с полиакриламидном геле-электрофорезе с последующим анализом лизатов в сравнении с лизатом неиндуцированной культуры. Все буферы готовили на деионизованной воде, фильтровали через 0,22-мкм мембраны и хранили при +4°C не более одного месяца. Ингибитор протеаз PMSF добавляли непосредственно перед использованием. Установлено, что наблюдалась экспрессия гена модифицированной обратной транскриптазы уже через 2 часа после индуцирования экспрессии и наблюдалось в течение всего периода инкубации.

Молекулярная масса рекомбинантного белка составляла 62,5 кДа. Клон, продуцирующий рекомбинантную модифицированную обратную транскриптазу, нарабатывали в ЛБ-бульоне с канамицином в объеме 10 мл при 37°C в шейкере-инкубаторе до достижения плотности $OD_{600}=1,0$, собирали центрифугированием при $6000\times g$, при 4°C в течение 7 минут. Удаляли надосадочную жидкость, а осадок суспендировали в 2 мл свежего стерильного ЛБ-бульона с 50% стерильным глицерином. Аликвотировали по 1,5 мл в стерильных криопробирках и закладывали на криосохранение при -80°C с постепенным понижением температуры -10°C каждые 10 минут. Трижды, с интервалом 1 месяц брали образцы штамма-продуцента, проверяли жизнеспособность клеток путем культивирования в ЛБ-бульоне с канамицином.

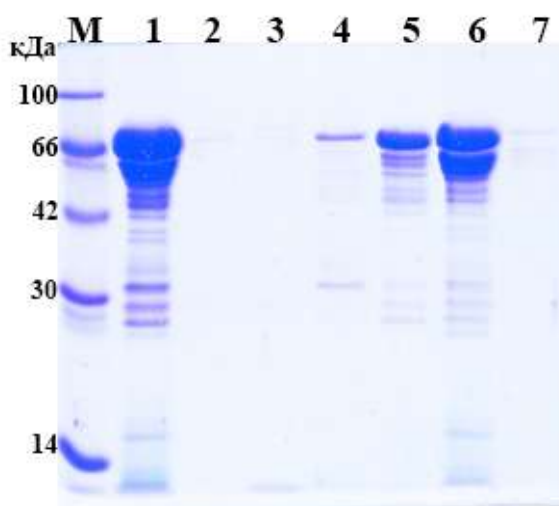
Штамм-продуцент растили в объеме 1 литра ЛБ-бульона с канамицином (50 мкг/мл) в шейкере-инкубаторе при 37°C до достижения $OD_{600}=0,6$, после чего добавляли ИПТГ в концентрации 0,5 мМ и проводили индукцию белка в течение 20 часов при 18°C. Клетки собирали центрифугированием при $6000\times g$ в течение 6 минут и лизировали ультразвуком на соникаторе Sonicators (Qsonica). Водорастворимую фракцию отделяли от клеточного дебриса центрифугированием при $40000\times g$, в течение 1 часа при 4°C. Металлоаффинная хроматографическая очистка с использованием имидазола в качестве элюирующего буфера позволила выделить рекомбинантную модифицированную обратную транскриптазу из бактериального лизата используя встроенную с N-конца гексагистидиновую метку белка (рисунок 22).



1 - фракция до колонки с Ni-NTA, 2 - фракция после колонки с Ni-NTA, 3-8 элюаты с имидазолом, где 3 - 20 mM, 4 - 100 mM, 5 - 150 mM, 6 - 200 mM, 7 - 250 mM, М - белковый маркер

Рисунок 22 – Полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия после хроматографической очистки рекомбинантной модифицированной обратной транскриптазы на Ni-NTA

Вторым этапом очистки с использованием гепарина в качестве ДНК-имитирующего агента позволила получить высокоочищенный рекомбинантный белок RT-HIV (рисунок 23), который был использован в экспериментах по получению комплиментарной ДНК на основе РНК, выделенной из различных источников.



1 - фракция до колонки HiTrap Heparin 1ml, 2 - фракция после колонки HiTrap Heparin 1ml, 3-8 элюаты с NaCl, где 3 - 100 mM, 4 - 200 mM, 5 - 300 mM, 6 - 500 mM, 7 - 800 mM, М - белковый маркер

Рисунок 23 – Полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия после хроматографической очистки рекомбинантной модифицированной обратной транскриптазы на HiTrap Heparin 1 мл

3.10 Проверка активности рекомбинантной обратной транскриптазы

Реакцию обратной транскрипции проводили на образцах РНК выделенных из *Secale cereale* и крови человека. РНК из *Secale cereale* выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit 50 (QIAGEN) по протоколу производителя. При выделении РНК из *Secale cereale* присутствие ДНК в образце не было установлено, что было подтверждено электрофорезом в агарозном геле. Реакционная смесь для получения кДНК фрагмента 18S рРНК *Secale cereale* протяженностью 357 п.о. состояла из следующих компонентов; 2 мкл РНК (700 нг/мкл), 4,5 мкл 10 мМ dNTP, по 4,5 мкл 10 мМ праймеров 18SpPHK5337 (5'-TGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTC-3') и 18SpPHK5339 (5'-CAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGT-3'), 119 мкл деионизированной воды. Образцы прогревали при 70°C в течение 1 минуты и при 65°C в течение 5 минут. Добавляли 15 мкл 10X ОТ буфера (200 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 500 мМ KCl, 100 мМ (NH₄)₂SO₄, 1% Tween-20) и 2,5 мМ MgCl₂, разделили по 15 мкл и инкубировали каждый образец при температуре: 50, 51, 54, 58, 62, 66, 68 или 70°C. Далее, на полученных образцах ставили ПЦР. Полимеразную цепную реакцию на кДНК полученную в результате реакции обратной транскрипции проводили с использованием термоциклера-амплификатора Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf) при следующих условиях: 1 мкл кДНК, 10 мкл 5x OneTaq Standard Reaction Buffer, 1 мкл 10 мМ dNTP, 1,5 мкл 10 мМ праймеров 18SpPHK5337 и 18SpPHK5339, 0,5 мкл 5 Ед/мкл OneTaq DNA Polymerase (New England Biolabs, США). Программа амплификации: 95°C - 1 минута; 25 циклов (95°C - 15 секунд, 60°C - 30 секунд, 72°C - 10 секунд); 72°C - 10 секунд.

Аналогичным образом с использованием праймеров 18SpPHK5337 и 18SpPHK5338 (5'-CAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGT-3') получали кДНК с последующей ПЦР фрагмента 18S рРНК *Secale cereale* протяженностью 1062 п.о. Программа амплификации состояла из следующих циклов: 95°C - 1 минута; 25 циклов (95°C - 15 секунд, 60°C - 30 секунд, 72°C - 30 секунд); 72°C - 10 секунд.

РНК выделяли из крови человека. Из 10 мл крови путем удаления эритроцитов получали лейкоцитарную массу. Для этого кровь обрабатывали 17 мл 0,5% уксусной кислотой и таким же количеством 1,8% NaCl с центрифугированием при 500×g в течение 10 минут. Лейкоциты лизировали добавлением 500 мкл лизирующего буфера RLT (79216, Qiagen) и инкубацией в течение 5 минут. Добавляли 100 мкл хлороформа, инкубировали 5 минут, центрифугировали 10000×g в течение 10 минут при 4°C. Надосадочную жидкость обрабатывали изопропиловым спиртом в соотношении 1:1 при 0°C. Центрифугировали 12000×g в течение 20 минут при 4°C. РНК осаждали 70% этанолом и растворяли в стерильной безнуклеазной воде.

Реакционная смесь для получения кДНК гена актина Б протяженностью 1128 п.о. состояла из следующих компонентов; 2 мкл РНК (876 нг/мкл), 2 мкл 10 мМ dNTP, по 1 мкл 10 мкМ праймеров ActBfw (5'-ATGGATGATGATATCGCCGCGCT-3') и ActBrv (5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGA-3'), 11 мкл деионизированной воды. Образцы прогревали при 70°C в течение 5 минут. Добавляли 2 мкл 10X ОТ буфера с 2,5 мМ MgCl₂ и модифицированную обратную транскриптазы в объеме 1 мкл и инкубировали при температуре 50°C в течение 30 минут. Далее, на полученных образцах ставили ПЦР. Полимеразную цепную реакцию проводили при следующих условиях: 2 мкл кДНК, 5 мкл 5x Phusion HF Buffer, 2 мкл 10 мМ dNTP, 1 мкл 10 мкМ праймеров ActBfw и ActBrv, 0,5 мкл 2 Ед/мкл Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo). Программа амплификации: 98°C - 1 минута; 25 циклов (98°C - 15 секунд, 55°C - 30 секунд, 72°C - 30 секунд); 72°C - 10 минут. Для проверки результатов проводили электрофорез в агарозном геле с этидиум бромидом в трис-ацетатном буфере с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете.

Проверка ревертазной активности полученной рекомбинантной модифицированной обратной транскриптазы на РНК, выделенной из образцов *Secale cereale* показала, что фермент обладает требуемой ревертазной активностью в диапазоне температур 50-58С для фрагментов кДНК протяженностью 1000 п.о. и в диапазоне 50-70С для более коротких фрагментов 350 п.о. (рисунок 24).

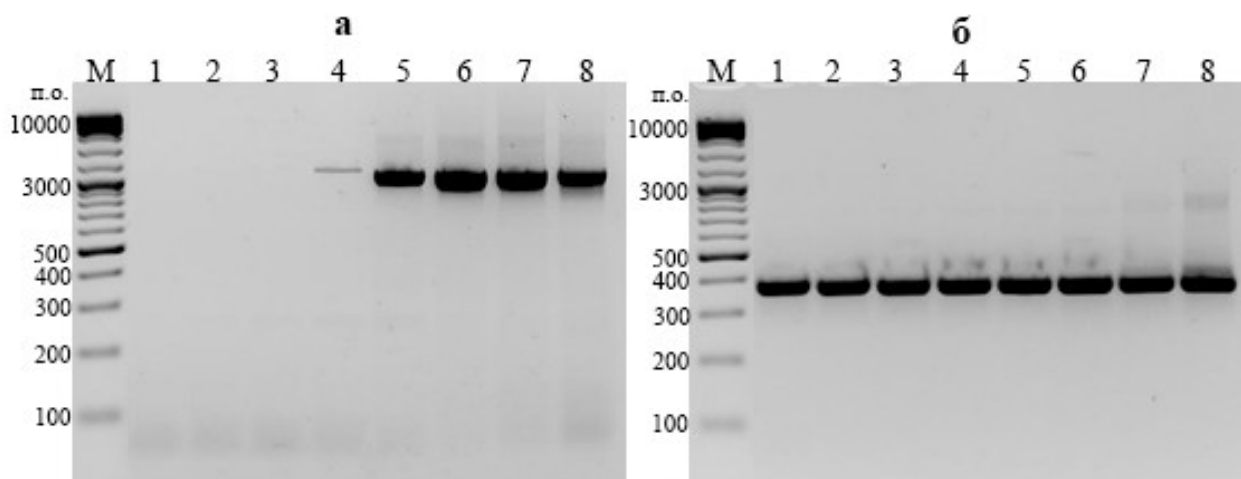
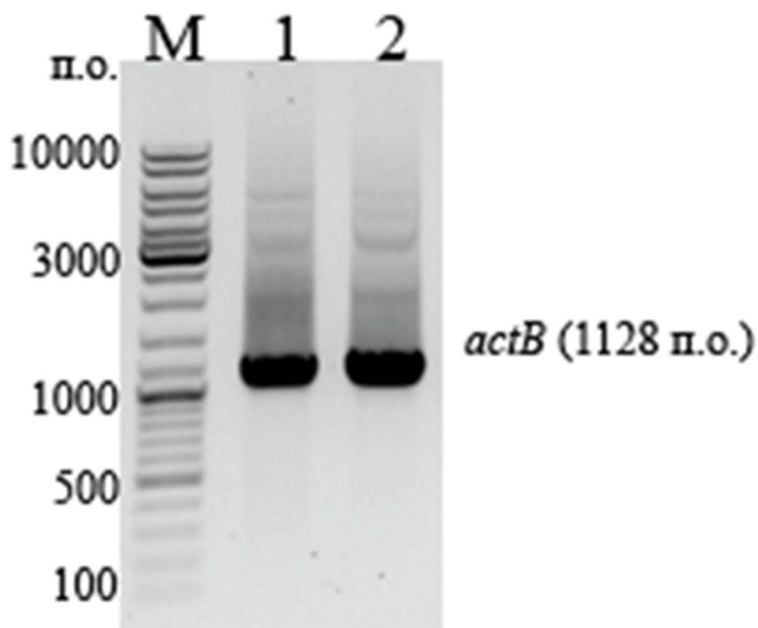


Рисунок 24 – Результаты ПЦР амплификации фрагментов 18S рРНК *Secale cereale* на 1062 п.о. (а) и 357 п.о.(б), проведенной на кДНК, полученной с помощью рекомбинантной модифицированной обратной транскриптазы

Проверка ревертазной активности на РНК, выделенной из крови человека с использованием праймеров специфичных к гену актина Б (*actB*) также показала, что рекомбинантная модифицированная обратная транскриптаза из вируса иммунодефицита

человека обладает РНК зависимой ДНК полимеразной активностью и может быть использована при получении кДНК (рисунок 25).



1,2-ПЦР продукт, М-ДНК маркер

Рисунок 25 – Результаты ПЦР амплификации гена актина Б человека, проведенной на кДНК полученной с помощью рекомбинантной модифицированной обратной транскриптазы

Для оптимизации условий получения рекомбинантной обратной транскриптазы в биореакторе проведена ферментация штамма-продуцента *E. coli* BL-21(DE3)/pET28c/RT-HIV в лабораторном ферментере Habitant Fermenter (IKA-Werke) для оптимизации условий культивирования. На первом этапе получали накопительную культуру, для этого клетки штамма-продуцента инокулировали в 5 мл ЛБ-бульона и растили в шейкере-инкубаторе при 37°C и встряхивании 180 об/мин. Через 16 часов культуру переносили в 50 мл ЛБ-бульона и выращивали в тех же условиях в течение следующих 16 часов. Клетки переносили в 2 л среды стерильного ЛБ-бульона и осуществляли культивирование в биореакторе. Массу клеток оценивали гравиметрическим способом, путем центрифугирования при 10000×g, в течение 10 мин. Определено, что оптимальными условиями являются следующие условия: температура культивирования 37°C, подача стерильного воздуха 1,5 л/мин, перемешивание 180 об/мин, pH среды 7,0. После достижения плотности OD₆₀₀=0,6 активировали индукцию культуры с помощью 0,5 мМ ИПТГ и инкубировали культуру при 18°C и 120 об/мин в течение 20 часов. В конце фазы ферментации выход мокрых клеток составил 2,23 грамма с 1 литра культуры. Общее время культивирования составило 23 часа. Далее, проведена ферментация штамма *E. coli* BL-21(DE3)/pET28c/RT-HIV в пилотном 10-литровом ферментере Biostat Plus (Sartorius).

Ферментер стерилизовали текучим паром с помощью парогенератора DM9-0.8 LDR0.025-1.0 в течение 20 минут. Ферментацию проводили при оптимальных условиях. Сбор культуры осуществляли методом проточного центрифугирования с использованием полупромышленной трубчатой центрифуги GF45 GQ45. Выход мокрых клеток составил 4,3 грамма с 1 литра культуры в конце фазы ферментации. Общий выход рекомбинантного фермента составил 97 мг на 1 грамм мокрой биомассы клеток. В результате очистки рекомбинантного фермента получено 34 мл рекомбинантной модифицированной обратной транскриптазы RT-HIV. Результаты показали, что ферментация штамма-продуцента *E. coli* BL-21(DE3)/pET28c/RT-HIV в биореакторе позволяет получать рекомбинантную модифицированную обратную транскриптазу в полупромышленных условиях.

3.11 Определение генетических маркеров устойчивости к антибиотикам

Проведены ПЦР-анализы и секвенирование для выявления генетических маркеров устойчивости в 64 образцах *A. baumannii*. Использованы праймеры, подобранные на основе научных публикаций, что обеспечило высокую специфичность анализа: *blaOXA-23*, *blaOXA-51*, *blaTEM*, *blaOXA-40*, *blaVIM*, *blaSPM*, *aacA4*, *aacC1*. Статистика наличия генов: *blaOXA-23* – в 20 образцах (31,25%); *blaOXA-51* – в 62 образцах (96,875%); *blaTEM* – в 54 образцах (84,375%); *blaOXA-40* – в 34 образцах (53,125%); *blaVIM* – в 19 образцах (29,6875%); *blaSPM* – в 4 образцах (6,25%); *aacA4* – в 2 образцах (3,125%); *aacC1* – в 46 образцах (71,875%). Комбинации генов: *blaOXA-23* + *blaOXA-51* – в 20 образцах (31,25%); *blaOXA-23* + *blaTEM* – в 19 образцах (29,6875%); *blaOXA-23* + *blaOXA-40* – в 14 образцах (21,875%); *blaOXA-23* + *blaVIM* – в 9 образцах (14,0625%); *blaOXA-23* + *blaSPM* – в 4 образцах (6,25%); *blaOXA-23* + *aacA4* – в 1 образце (1,5625%); *blaOXA-23* + *aacC1* – в 18 образцах (28,125%); *blaOXA-51* + *blaTEM* – в 19 образцах (29,6875%); *blaOXA-51* + *blaOXA-40* – в 14 образцах (21,875%); *blaOXA-51* + *blaVIM* – в 9 образцах (14,0625%); *blaOXA-51* + *blaSPM* – в 3 образцах (4,6875%); *blaOXA-51* + *aacA4* – в 1 образце (1,5625%); *blaOXA-51* + *aacC1* – в 18 образцах (28,125%); гены KPS, NDM и IMP не были обнаружены. На рисунке 26 представлены 4 наиболее часто встречающихся генов резистентности: *blaOXA-51*, *blaTEM*, *blaOXA-40* и *blaOXA-23*.

Выбор генов обусловлен их значимостью в формировании антибиотикорезистентности *A. baumannii*. *blaOXA-23*, *blaOXA-40* и *blaOXA-51* (карбапенемазы класса D) обеспечивают устойчивость к карбапенемам, причем *blaOXA-51* является видоспецифичным маркером и внутренним контролем. *blaTEM* (класс A) придает устойчивость к пенициллинам и цефалоспорином, часто передаваясь через плазмиды.

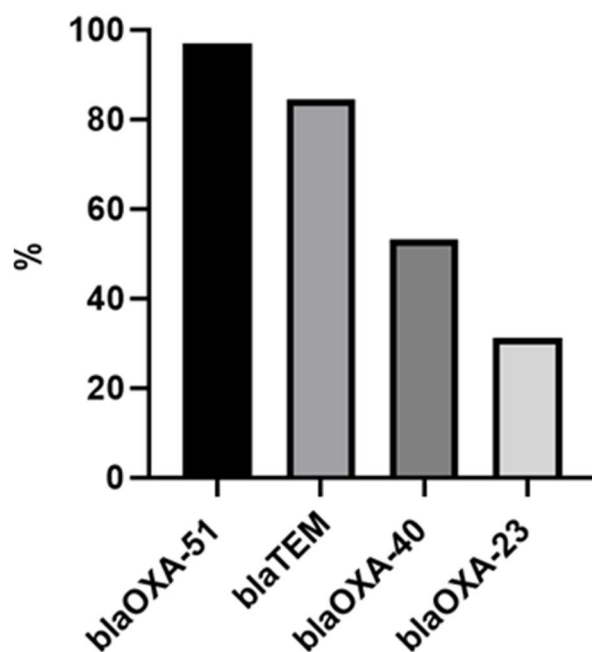


Рисунок 26 – Распространенность генов резистентности *Acinetobacter baumannii*

blaVIM и *blaSPM* (металло-бета-лактамазы класса В) выбраны для мониторинга редких, но опасных механизмов устойчивости к карбапенемам. *aacC1* и *aacA4* определяют устойчивость к аминогликозидам, снижая эффективность терапии. ПЦР-продукты фрагментов генов резистентности изображены на рисунке 27.

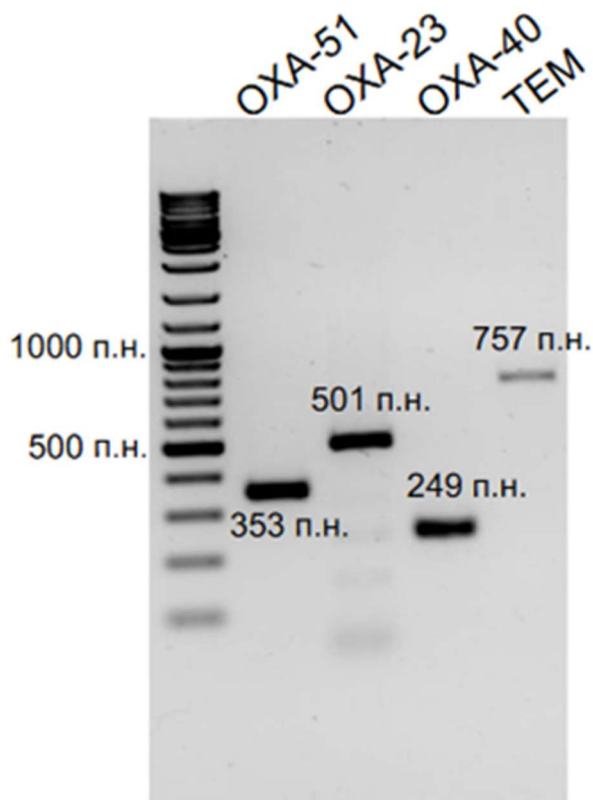


Рисунок 27 – Амплификация фрагментов генов *Acinetobacter baumannii*

С использованием амплифицированных фрагментов генов резистентности (приложение Е), были получены рекомбинантные вектора с клонированными генами (рисунок 28).

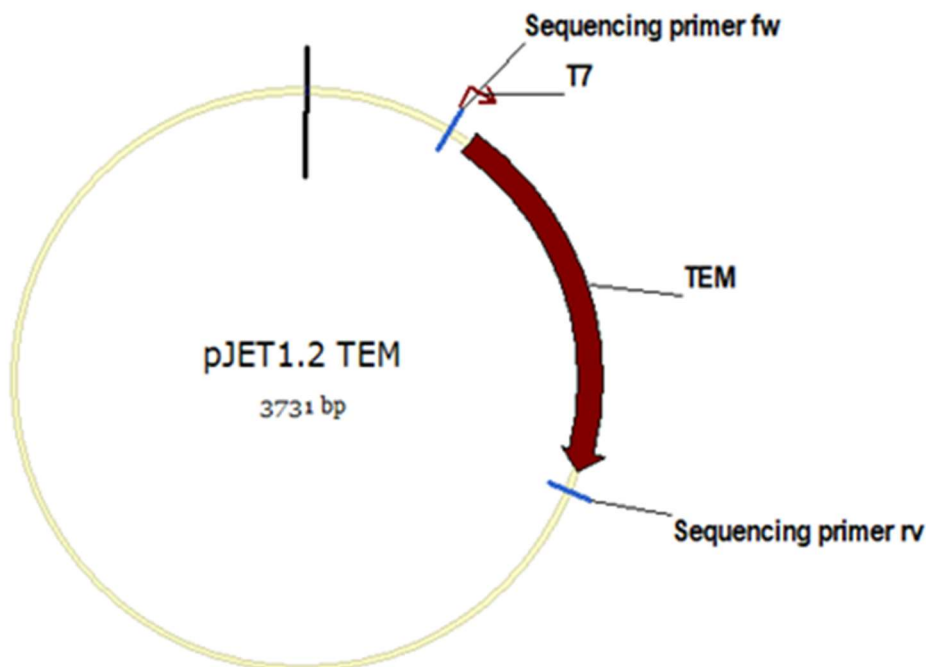


Рисунок 28 – Рекомбинантный вектор pJET1.2с клонированной последовательностью целевого гена *blaTEM Acinetobacter baumannii*

ПЦР-скрининг колоний проводили с использованием специфических праймеров, входящих в набор для клонирования. Для положительных клонов выполнялось секвенирование вставки с последующим сравнительным анализом. В результате сличения результатов секвенирования с референсными последовательностями было установлено, что идентичность составила более 95%, что подтверждает корректность вставки. Полученные последовательности послужили основой для дизайна crРНК.

3.12 Дизайн и синтез CRISPR-РНК, проведение CRISPR-детекции

В результате работы были получены направляющие РНК (crРНК), нацеленные на ключевые гены антибиотикорезистентности *Acinetobacter baumannii*: *blaOXA-23*, *blaOXA-40*, *blaOXA-51* и *blaTEM*. crРНК — crRNA_OXA23, crRNA_OXA40, crRNA_OXA51 и crRNA_TEM— продемонстрировали высокий выход и стабильность.

Анализ качества и количественных характеристик показал, что концентрации полученных crРНК находились в диапазоне 2-2,5 мкг/мкл, что указывает на воспроизводимость реакции и пригодность материала для дальнейшего использования. Чистота образцов была подтверждена спектрофотометрическим контролем, значения

A260/A280 находились в оптимальных пределах, что свидетельствует об отсутствии примесей белков и органических соединений.

Для дизайна праймеров были подготовлены генетические мишени из геномной ДНК бактерий *Acinetobacter baumannii*. С помощью метода биоинформатического анализа полных геномов бактерий *Acinetobacter baumannii* были выбраны последовательности: гена *blaOXA-23* (NCBI: GenBank: ARM10298.1, GenBank: ARM10298.1, GenBank: ACR84315.1, GenBank: ADU58356.1, GenBank: ADU58353.1, GenBank: ADU58351.1, GenBank: ACR61576.1, GenBank: AEY55407.1, GenBank: AER61540.1, GenBank: ADA70729.1, GenBank: ADA70728.1, GenBank: ALN66866.1, GenBank: CAI6157176.1); гена *blaOXA-40* (NCBI: GenBank: ADB28893.1 GenBank: AFI32809.1); гена *blaOXA-51* (NCBI: GenBank: QNL14850.1, GenBank: QNL14849.1, GenBank: QNL14848.1, GenBank: QNL14847.1, GenBank: QNL14846.1 GenBank: QNL14845.1, GenBank: ARM36026.1, GenBank: ABD47672.1, GenBank: CEE15336.1, GenBank: AMC30570.1, GenBank: ALL99116.1), представляющие собой продукцию оксациллиназ класса D, гена *blaVIM* (NCBI: GenBank: XDI42706.1, GenBank: XDI42705.1, GenBank: ANG60018.1, GenBank: AEI25982.1, GenBank: AEI25981.1, GenBank: AEI25980.1, GenBank: ACT66695.1); гена *blaIMP* (NCBI: GenBank: XDI42704.1, GenBank: XDI42703.1, GenBank: ANG60017.1, GenBank: ANG60016.1, GenBank: WEM34149.1, GenBank: WEM32865.1, GenBank: WEM32864.1, GenBank: WEM32863.1); представляющие собой продукцию металло- β -лактамаз класса B, гена *blaTEM* (NCBI: GenBank: AHL30826.1, GenBank: AGW28875.1, GenBank: UQM62326.1, GenBank: QWB12052.1, GenBank: ASF75692.1, GenBank: ATP85514.1, GenBank: QBY34674.1), представляющие собой продукцию β -лактамаз расширенного спектра, гена *aacA4* (NCBI: GenBank: UVF03947.1, GenBank: AXG64296.1, GenBank: ABN48510.1, GenBank: AID65146.1, GenBank: PAL54231.1, GenBank: WEI48480.1, GenBank: AOF43031.1, GenBank: ATP88812.1, GenBank: QDD67485.1); гена *aacCI* (NCBI: GenBank: AHL30835.1, GenBank: AHL30834.1, GenBank: ASF75699.1, GenBank: ATP88811.1, GenBank: QGT52031.1, GenBank: QGT52029.1, GenBank: QGT52026.1, GenBank: ALJ84045.1, GenBank: ALD03719.1, GenBank: ALD03708.1) представляющие собой фрагменты генов, кодирующие аминогликозид-модифицирующие ферменты.

Теоретическая специфичность разработанных праймеров была подтверждена *in silico* с использованием BLAST и Primer-BLAST на NCBI сервере. Данные олигонуклеотиды были синтезированы на ASM-800 фосфоамидитным способом. Концентрация синтезированных олигонуклеотидов составила 188,6-274,9 пкмоль/мкл.

Метод РПА представляет собой чувствительный метод изотермической амплификации, позволяющий быстро и эффективно амплифицировать целевой ген в

изотермических условиях. В данном исследовании были использованы специфические праймеры, предназначенные для амплификации специфичных генов.

Реакцию РПА проводили с использованием праймеров: RPA_OXA40_Fw (CCCCCTTAAAATTACACCAGTACAAGAAGT); обратный праймер RPA_OXA40_Rv (GTCAACCAACCTACCTGTGGAGTAACATCC); обратный праймер RPA_OXA23_Fw (GAAACAAACTCTACCTCTTGAATAGGCGTA); обратный праймер RPA_OXA23_Rv (AGACATGACACTAGGAGAAGCCATGAAGCT); обратный праймер RPA_OXA_51_Fw (CATAAGGCAACCACCACAGAAGTATTTAAG); обратный праймер RPA_OXA_51_Rv (CTCTTGCTGAGGAGTAATTTTAAAGGACC); обратный праймер RPA_TEM_Fw (TTAGGCTAAAGAAATGAGTCCAAGTCTAAC); обратный праймер RPA_TEM_Rv (GTTATTCCTCATTTATGCCCTCTAACTTCT).

Амплификацию проводили в соответствии с протоколом производителя. Результаты амплификации при изотермической амплификации представлены на рисунке 29.

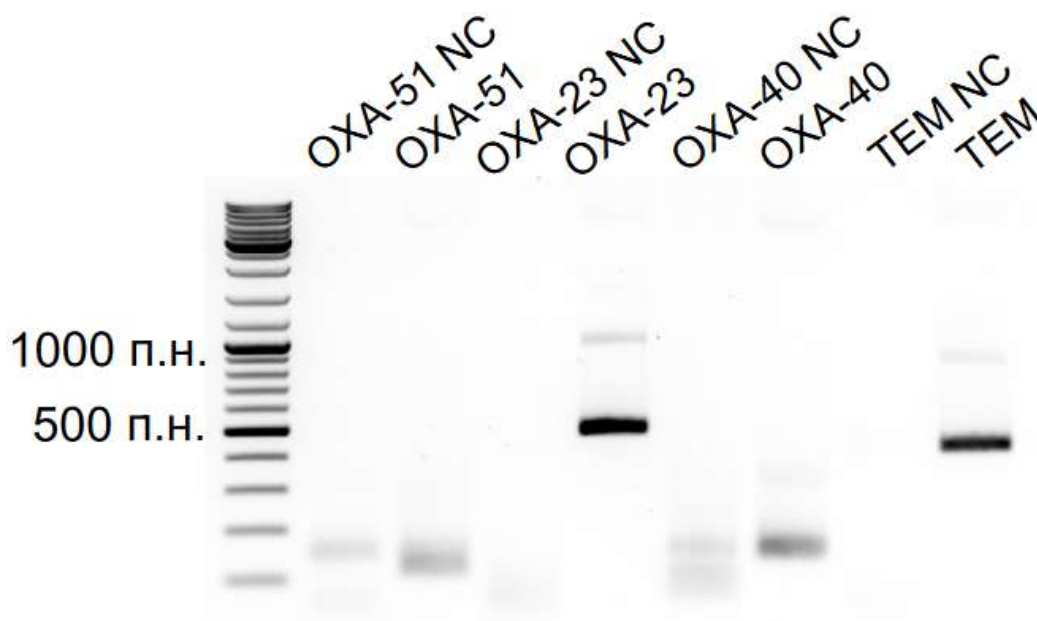


Рисунок 29 – Результаты гель-электрофореза, показывающие продукты амплификации, полученные в результате реакции РПА (NC – отрицательный контроль)

Коллатеральная активность Cas12a была использована для детекции генов антибиотикорезистентности *blaOXA-23*, *blaOXA-40*, *blaOXA-51* и *blaTEM* у *Acinetobacter baumannii*. Амплификация целевых последовательностей методом РПА обеспечила получение специфических ДНК-мишеней для формирования комплекса Cas12a-crRNA. В результате связывания комплекса с целевой последовательностью происходила активация фермента, сопровождавшаяся транс-расщеплением флуоресцентно-меченых репортерных

зондов. Это приводило к появлению отчетливого флуоресцентного сигнала, который визуализировался с помощью трансиллюминатора (рисунок 30).



Сверху – положительные образцы; снизу – отрицательные

Рисунок 30 – Результаты коллатеральной активности Cas12a спустя 30 минут

3.13 Оптимизация состава реакционной смеси тест-системы, получение образцов положительного контроля

При оптимизации реакционной смеси для тест-системы на основе ПЦР-в-РВ, дифференциально детектирующей *B. burgdorferi* s.l. и *B. Miyamotoi* были выявлены недостаточная специфичность сетов праймеров и проб на гены *fla*, которые предполагалось использовать для дифференциальной детекции патогенов ранее. Сеты перекрывали друг друга при работе в дуоплексе. Поэтому были дополнительно разработаны сеты праймеров и проб к локусам гена 16S rRNA для детекции *B. burgdorferi* s.l.) и гена, кодирующего фермент глюкофосфатидилинозитол-фосфатазу (*glpQ*, glycerophosphodiester phosphodiesterase) для детекции *B. miyamotoi*.

Сеты праймеров и проб подбирали таким образом, чтобы двуцепочечные взаимодействия были минимальными как внутри одного сета, так и между обоими сетами (для *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*). Взаимодействия между парами праймеров/проб оценивали в программе RNAStructure 5.0 (“MathewsLab”); отбирали таким образом, чтобы взаимодействие в каждом из возможных дуоплексов не превышало 12 kcal/mol. Помимо взаимодействия компонентов целевых сетов между собой оценивали также их взаимодействие с сетом на референсный ген *18S rRNA I. ricinus*.

Таким образом, для создания тест-набора, детектирующего и дифференцирующего *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*, были разработаны дополнительные праймеры и зонды к генам 16S rRNA *B. burgdorferi* s.l. и *glpQ* *B. miyamotoi*. Разработанные праймеры и зонды были синтезированы на синтезаторе олигонуклеотидов, а их очистку – на высокоэффективном жидкостном хроматографе методом ВЭЖХ в лаборатории органического синтеза ТОО «НЦБ».

Специфичность праймеров и зондов проверяли на архивных образцах гомогенатов

клещей вида *I. persulcatus*, собранных в эпидемиологический сезон 2023 и 2024 г. *Ixodes persulcatus* являются основным резервуаром и вектором *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi* в Азии, в том числе в южном и восточном регионах Казахстана. Исследовательской группой в рамках выполнения предыдущих проектов и за отчетный период был сформирован архив гомогенатов клещей, содержащих ДНК данных патогенов.

Всего для проверки праймеров и зондов было использовано шесть образцов гомогенатов *I. persulcatus*, в двух из которых было установлено наличие ДНК *B. afzelii*, в одном ДНК *B. garini*, относящихся к группе *B. burgdorferi* s.l., в одном ДНК *B. miyamotoi*, также два образца отрицательных по ДНК *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*.

На первом этапе исследования была проверена специфичность сета на референсный ген 18S rRNA *I. ricinus*. Поскольку сет разрабатывался как универсальный для всего отдела клещей (как твёрдых иксодовых клещей, так и мягких аргасовых клещей) его проверяли на всех имеющихся в наличии гомогенатах клещей. Результаты показаны на рисунке 31. Использовалась тотальная ДНК, выделенная из гомогенатов клещей видов: *Argas persicus*, *Hyalomma asiaticum*, *Rhipicephalis pumilio*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma anatolicum*, *Hyalomma turanicum*, *Ixodes persulcatus*.

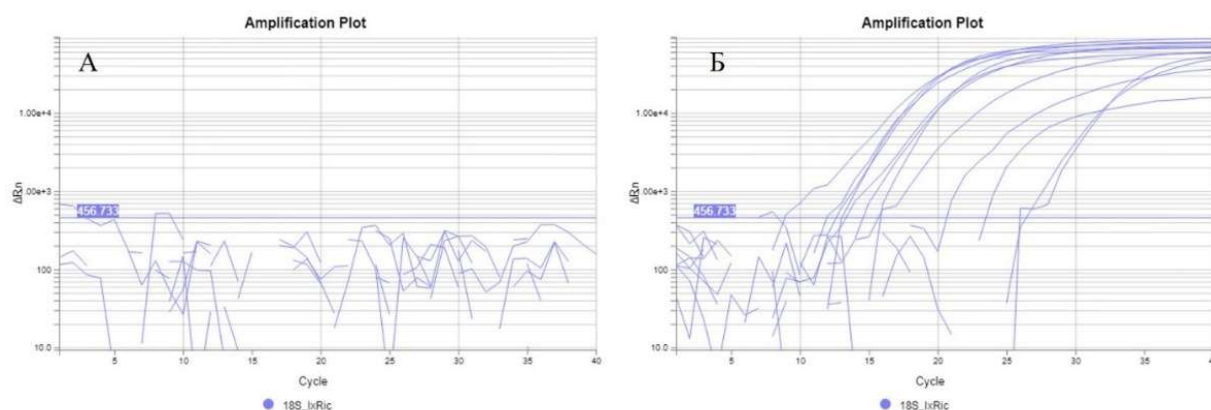


Рисунок 31 – Результаты ПЦР-в-РВ сета на референсный ген 18S rRNA: отрицательного контроля, включая (А) образцы ДНК, полученные из биологических образцов крупного рогатого скота и (Б) гомогенатов различных видов клещей различных видов

Разработанный референсный сет показал высокую чувствительность и 100%-ю специфичность, поскольку ПЦР-в-РВ протекала со всеми имеющимися видами клещей, и в то же время показал отсутствие срабатывания с образцами ДНК животных.

Далее нами проверялись разработанные дополнительно сеты на 16S rRNA *B. burgdorferi* s.l. и *glpQ* *B. miyamotoi*. Реакции проводились в виде синглплексов для предварительной оценки чувствительности сетов. На рисунке 32 представлены результаты ПЦР-в-РВ, проведённой с архивными образцами клещей, в которых ранее были детектированы боррелии.

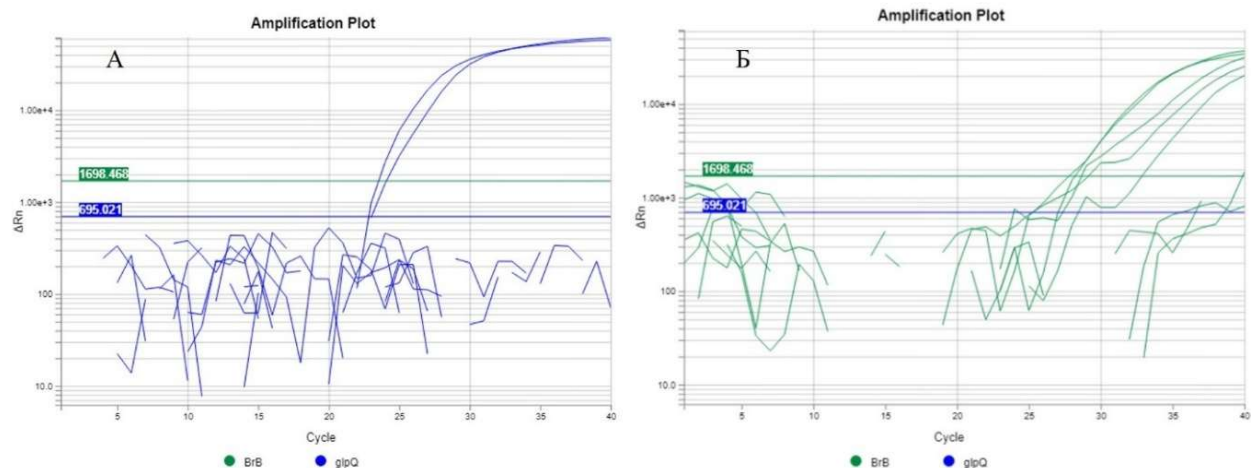


Рисунок 32 – Результаты ПЦР-в-РВ синглексов одних и тех же полевых образцов гомогенатов клещей на ген *glpQ* (А) и ген 16S rRNA (Б)

Последним этапом работ данного отчётного года была отработка реакционной смеси и режимов термоциклирования для разработанных сетов в виде триплекса, то есть возможность одновременной детекции генов *glpQ*, 16S rRNA и референсного гена 18S rRNA (универсального для клещей). Сначала триплекс проверяли на образцах ДНК, полученных из культур *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*, полученных нами в рамках научного сотрудничества с German National Reference Centre for Borrelia at the Bavarian Health and Food Safety Authority, г. Мюнхен, Германия, и Центральным научно-исследовательским институтом эпидемиологии, г. Москва, Россия. Результаты ПЦР-в-РВ представлены на рисунке 33.

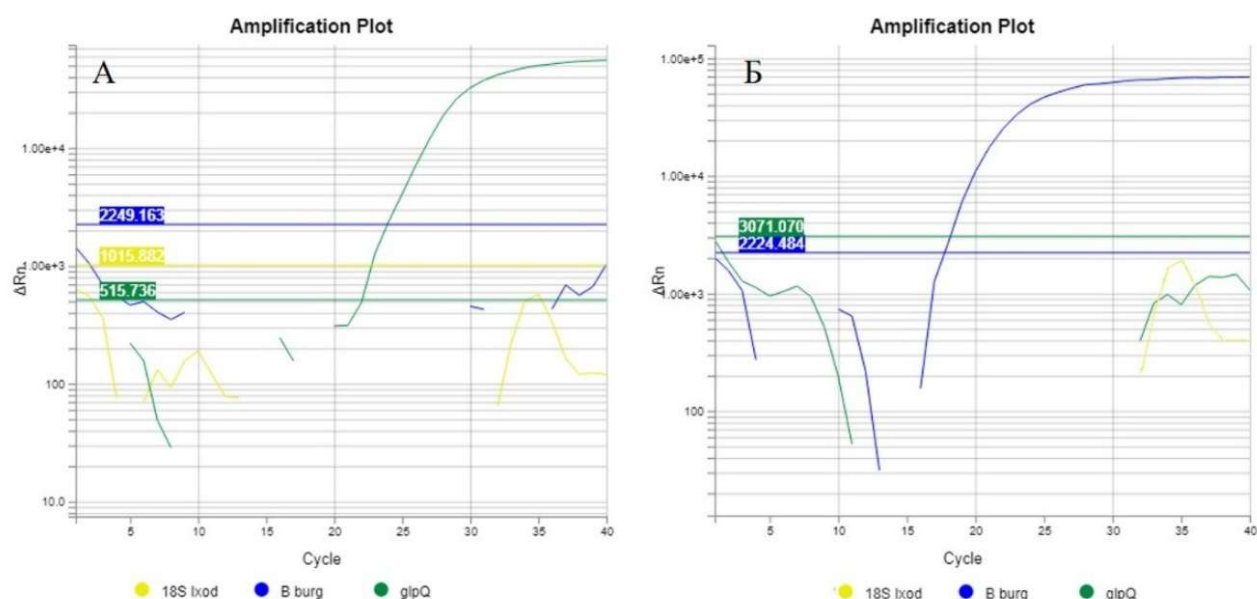


Рисунок 33 – Результаты ПЦР-в-РВ триплексов ДНК культур *B. miyamotoi* (А) и *B. burgdorferi* s.l. (Б)

Поскольку триплексы показали отсутствие взаимного ингибирования, дальнейшие испытания проводились на полевых образцах ДНК клещей. На рисунке 34 представлены результаты, полученные после отработки режимов термоциклирования и подбора реакционной смеси. Режимы термоциклирования для триплексов подбирали от 58 °С – 62 °С с шагом в 1 °С. Оптимальным режимом для разработанного триплекса был следующий: (3 мин 95 °С) – 1 цикл, (10 сек 95 °С, 1 мин 60 °С) – 40 циклов. Также для триплексов была подобрана оптимальная реакционная смесь, содержащая 3,5 мМ MgCl₂; по 270 нМ праймеров на *glpQ* и 16S rRNA; по 380 нМ на референсный 18S rRNA; 110 нМ пробы на референсный 18S rRNA; 220 нМ пробы на *glpQ* и 16S rRNA.

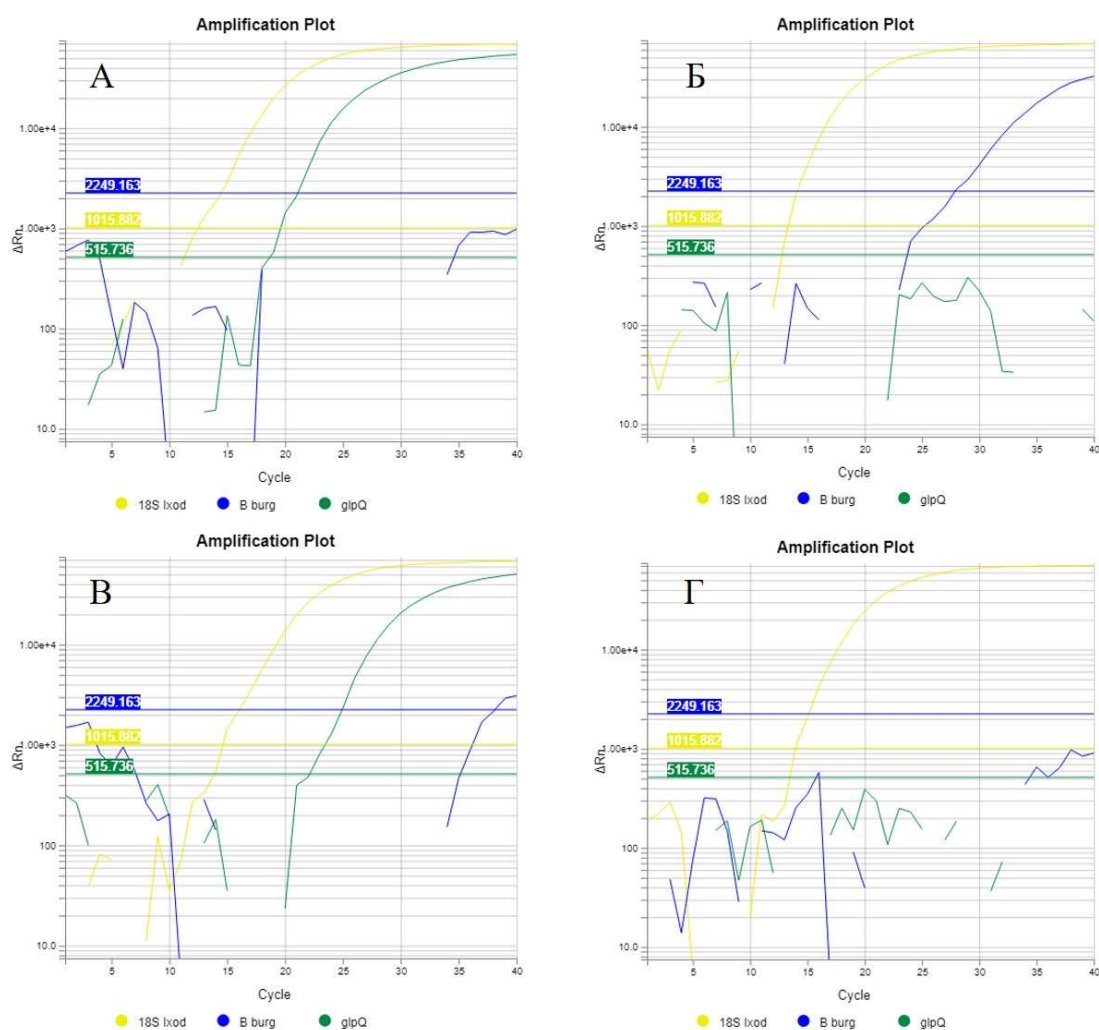


Рисунок 34 – Результаты ПЦР-в-РВ триплексов ДНК гомогенатов клещей, инфицированных: *B. miyamotoi* (А), *B. burgdorferi* s.l. (Б), микс-инфекция *B. miyamotoi*+*B. burgdorferi* s.l. (В), неинфицированный (Г)

Таким образом, разработанная рабочая модель тест-системы может быть использована для проверки чувствительности и специфичности и, впоследствии, для выявления в носителях (клещах) и дифференциации возбудителей Лайм боррелиоза (*B. burgdorferi* s.l.) и клещевой возвратной лихорадки, вызываемой *B. miyamotoi*.

Для получение положительного контроля в плазмиду pET28a был клонирован полнодлинный ген *BmGlpQ*, содержащий целевой участок для определения *B. miyamotoi*; схема полученной плазмиды приведена в приложении Ж. Фрагменты генов 16S рПНК *B. burgdorferi* (150 н) и 18S рПНК *Ixodes ricinus* (120 н) были клонированы в плазмиду pBluescriptII+. Все полученные конструкции помещены в музей клонов на -80°C.

3.14 Подбор универсальных праймеров для амплификации генетических маркеров используемых в ДНК-баркодировании растений

Для разработки универсальных праймеров были собраны из базы данных NCBI GenBank последовательности рибосомных генов (18S и 28S) для эукариотических организмов, представляющих удалённые таксономические группы (Kingdoms): *SAR*, *Percolozoa*, *Amoebozoa*, *Metamonada*, *Fungi*, *Viridiplantae*, *Plantae*, *Animalia*. В выборку включались как индивидуальные последовательности (submissions), так и данные полногеномных секвенирования. Обязательным условием было наличие хотя бы одного из целевых рибосомных генов — 18S или 28S.

Качество последовательностей проверялось с помощью множественного выравнивания для конкретных видов и их близкородственных таксонов. Это позволило выявить наиболее консервативные участки как для генов 18S, так и для 28S, при этом в дизайн были включены и максимально возможные вариабельные области. Дополнительно учитывались гены, кодирующие 5.8S рПНК, а также транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2). В итоге были идентифицированы несколько консервативных участков рибосомной ДНК, пригодных для проектирования праймеров.

Подобранные праймеры тестировались с помощью *in silico* PCR и проверялись для каждой таксономической группы по критериям: отсутствие несовпадений (mismatches) и длине ампликона - от 1 до 5 тыс. п.н. Если 100% последовательностей выбранного таксона совпадали с сайтом праймера, он принимался в работу. Важно подчеркнуть, что проектирование велось только для таких праймеров, которые являются комплементарными к последовательностям всех эукариот. При этом не допускалась дегенерация последовательности праймера, а температура плавления подбиралась не ниже 67°C. Такие праймеры могут использоваться в двухстадийной ПЦР с одновременным проведением стадий отжига и элонгации при 70–72°C. Отсутствие mismatches обеспечивает равномерную и эффективную амплификацию образцов, принадлежащих к различным таксонам.

Следует отметить, что выполнение этих условий является достаточно сложной задачей, и универсальная детекция всех эукариотических 18S и 28S генов рПНК в реальности может оказаться недостижимой. Консервативные участки данных генов

демонстрируют разную степень гетерогенности в зависимости от таксона. Даже если некоторые области полностью идентичны у грибов, высших растений и животных, то у промежуточных групп, например паразитических простейших (*protists, slime molds*), в таких же участках нередко наблюдается вариабельность. В подобных случаях критически важным остаётся сохранение полной консервативности на 3'-конце праймера, тогда как переменные нуклеотиды могут располагаться ближе к 5'-концу.

Кроме того, выбранные участки должны включать достаточное количество вариабельных позиций для последующей видовой идентификации. Следуя этим принципам, нами был разработан универсальный набор праймеров для наиболее консервативных областей 18S и 28S рРНК у эукариот. Дополнительно учитывалось, что размер ампликона не должен превышать «комфортный» диапазон для ПЦР, то есть не более 3 тыс. пар нуклеотидов. Поэтому было разработано несколько наборов праймеров, позволяющих получать продукты различной длины с включением разного числа вариабельных участков (рисунок 35).

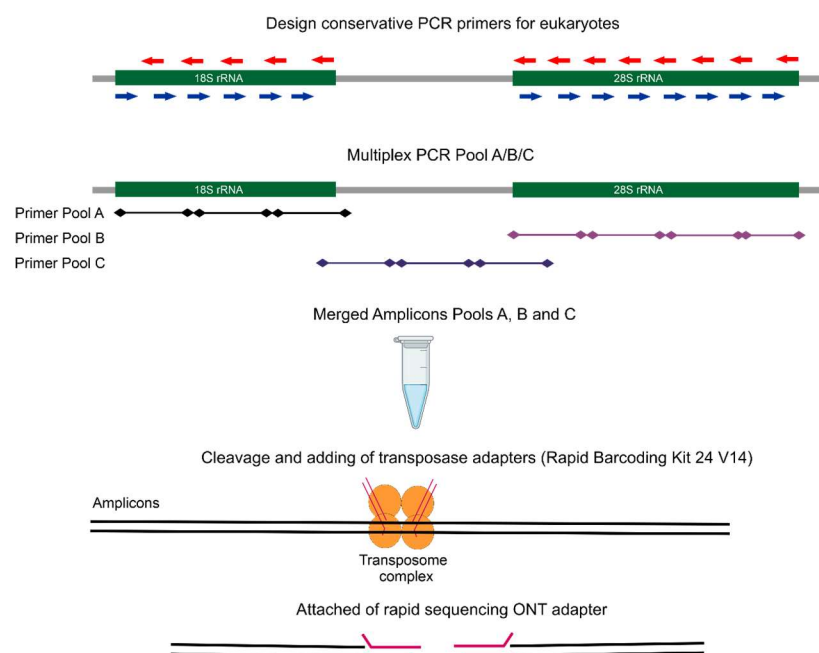


Рисунок 35 – Принципиальная схема ПЦР-амплификации для ДНК-баркодирования лекарственных растений

Разработанные праймеры предназначены для амплификации генов рибосомной РНК (rRNA) и межгенного спейсера (ITS) с последующим секвенированием методом третьего поколения, в частности нанопоровым секвенированием (ONT).

В последующем, разработанные праймеры также могут быть адаптированы для использования в платформах секвенирования нового поколения (NGS).

Далее с помощью программного инструмента Custom Multiplex Tiling PCR Panel Design Tool — современного веб-приложения для проектирования ампликонных панелей,

ориентированных на технологии секвенирования нового (NGS) и третьего (TGS) поколений были созданы три отдельных независимых набора праймеров: первый (15 праймеров) — для амплификации гена 18S rRNA, второй (12 праймеров) — для гена 28S rRNA, и третий (6 праймеров) — для межгенного спейсера ITS (Internal Transcribed Spacer) — некодирующего участка ДНК, расположенного между рибосомальными генами (таблица 5).

Таблица 5 – Комбинации праймеров для амплификации генов рибосомной РНК (rRNA) и внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS)

Смесь 1 (18S rRNA)	Смесь 2 (28S rRNA)	Mix 3 (регион ITS)
5642	4630	5390
5644	5748	5394
5649	5750	5730
5749	5759	5751
5754	5760	5753
5755	5859	5763
5761	5861	
5858	5869	
5860	5871	
5862	5872	
5864	5873	
5865	5877	
5868		
5870		
5878		

В итоге, разработанные комбинации праймеров позволяют генерировать перекрывающиеся фрагменты для каждого пула, обеспечивая равномерную и эффективную амплификацию продуктов различной длины с включением разного числа переменных участков ДНК.

Особое внимание было уделено ITS-региону, так как для большинства эукариот, включая грибы, продукты ITS-амплификации относительно короткие и легко воспроизводятся в стандартных условиях. Ампликоны, генерируемые с помощью двух других наборов — для 18S и 28S рибосомальных генов, как правило, не превышают 2 тыс. пар нуклеотидов. Это делает возможной амплификацию полного гена с использованием разных пар праймеров и обеспечивает высокую эффективность реакции.

3.15 Формирование ДНК коллекции фармакопейных стандартных образцов

Проведен сбор и пополнение коллекции фармакопейных стандартных образцов лекарственных растений для последующей молекулярно-генетической идентификации методом ДНК-баркодинга (локусы *gbcL*, *matK*), для идентификации таксономической принадлежности видов на молекулярном уровне. Были собраны следующие образцы стандартного фармакопейного сырья, включённого в Государственную фармакопею Республики Казахстан.

С целью повышения качественных и количественных характеристик ДНК (особенно из сложных многокомпонентных образцов), была проведена модификация буфера для экстракции ДНК из сложных многокомпонентных образцов. Показано, что добавление в состав 1% сульфита натрия (Na_2SO_3) и 1% поливинилпирролидона (PVP) позволяет эффективно удалять фенольные соединения и полисахариды (рисунок 36).

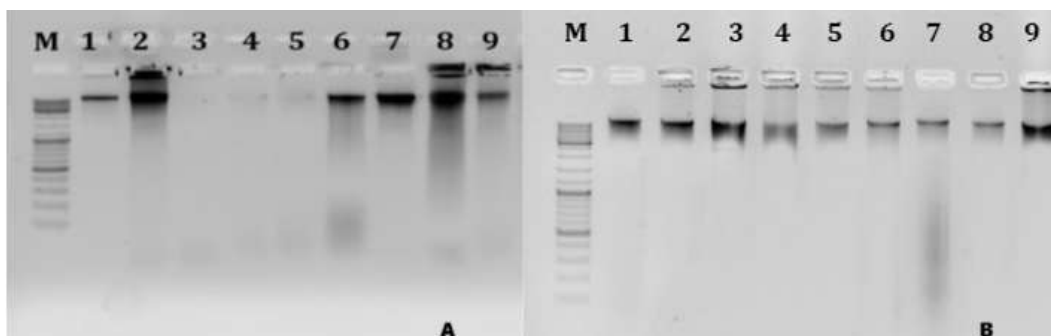


Рисунок 36 – Электрофореграмма выделения ДНК из гербарных образцов при использовании стандартного протокола СТАВ (А) и модифицированного СТАВ с добавлением 1% Na_2SO_3 и 1% PVP (В)

Для последующей разработки веб-приложения была проведена работа над архитектурой базы данных и веб-приложения, что является основой для дальнейшего расширения функционала, включающего карты ареалов, ДНК и инструменты анализа лекарственных растений Казахстана. Веб-интерфейс ресурса находится на стадии разработки и в дальнейшем планируется объединение макета с серверной частью веб-приложения (рисунок 37).

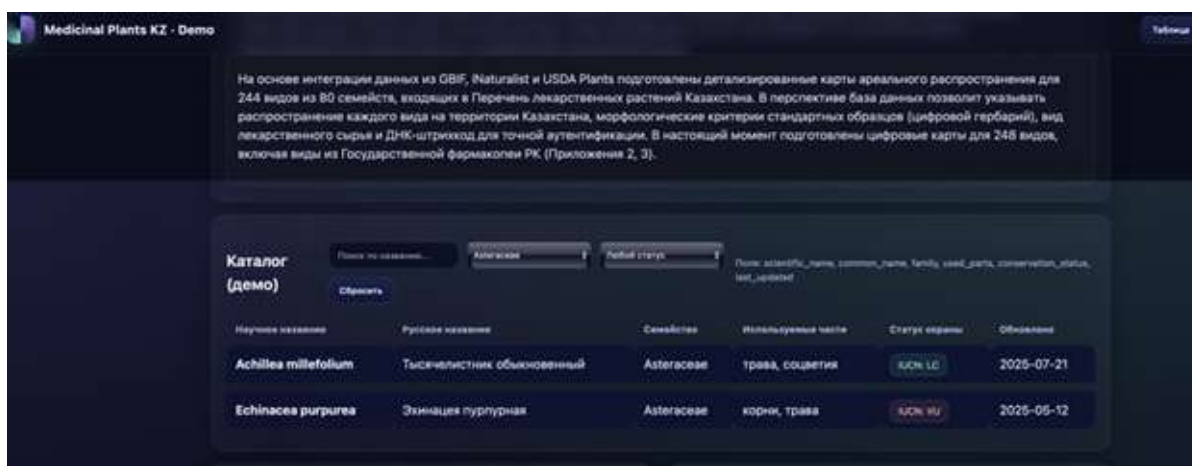


Рисунок 37 – Веб-дизайн интерфейса для базы данных лекарственных растений Казахстана

Для базы данных лекарственных растений Казахстана были выбраны следующие фреймворки, библиотеки, языки программирования и инструменты. В качестве языка запросов был выбран GraphQL, ASP.NET Core версии 7.0 был выбран как фреймворк для разработки серверной части веб-приложения, а для управления данными была выбрана PostgreSQL. Основным языком программирования для серверной части был выбран C#, разработка велась в среде Visual Studio; для работы с веб-интерфейсом использовалась среда Visual Studio Code.

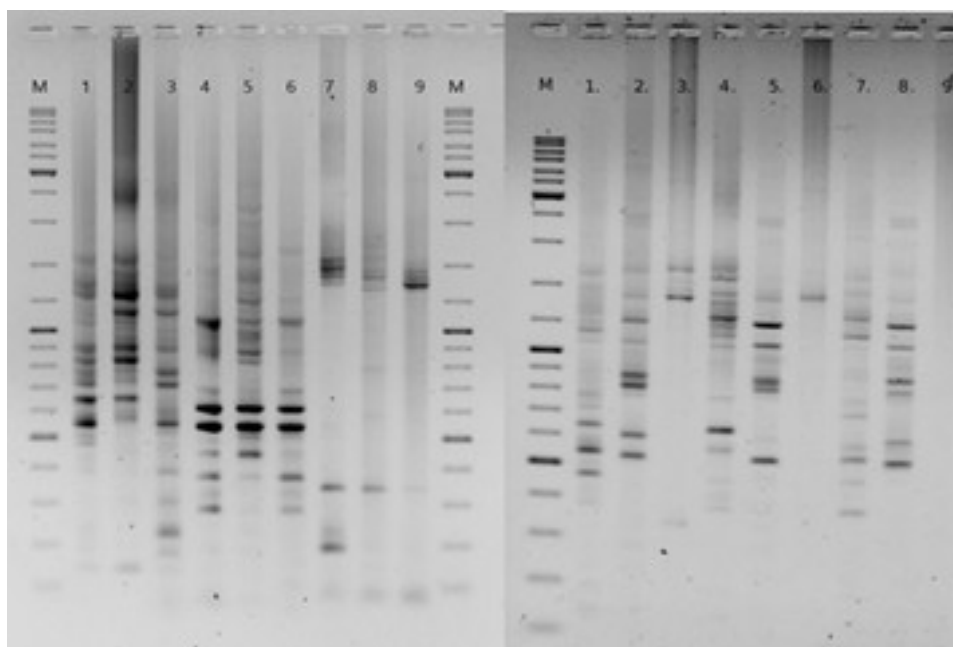
Таким образом, коллекция ДНК коллекция фармакопейных образцов, лекарственного сырья и фитопрепаратов составляет около 80 видов. После завершения проектирования модели данных проект БД перешёл к следующему этапу - созданию веб-интерфейса при помощи Vue.js.

3.16 Приготовление библиотек и высокопроизводительное секвенирование ДНК лекарственных видов растений

Оптимизация условий ПЦР амплификации проводилась по нескольким параметрам: числу циклов амплификации, концентрации праймеров, а также оценивали эффективность полимераз. Амплификацию проводили при следующих условиях: начальная денатурация при 98°C в течение 90 сек, далее 30-37 циклов: 98°C – 5 сек, 60°C – 180 сек, 72°C – 120 сек, завершающая элонгация при 72°C в течение 2 мин. Реакционная смесь объемом 15 мкл содержала ДНК (50 ng/μl), ПЦР-буфер, 30 mM dNTP, 2 U полимеразы и 25-50 nM праймеров из каждого набора (1-3). Исследование количества циклов амплификации показало, что при 35-37 циклах наблюдали избыточное накопление продуктов, в то время как 30 циклах интенсивность амплифицированного продукта была недостаточной. Оптимальным оказался режим с 32 циклами, обеспечивающий достаточный выход целевого продукта при сохранении его специфичности.

При варьировании концентрации праймеров (25 мМ и 50 мМ) выявлено, что при использовании праймеров с концентрацией 25 мМ эффективность реакции снижалась, что выражалось в слабой амплификации, меньшей насыщенности профиля. Использование праймеров с конечной концентрацией 50 мМ обеспечивало чёткое формирование полос целевого размера без появления дополнительных продуктов (рисунок 38).

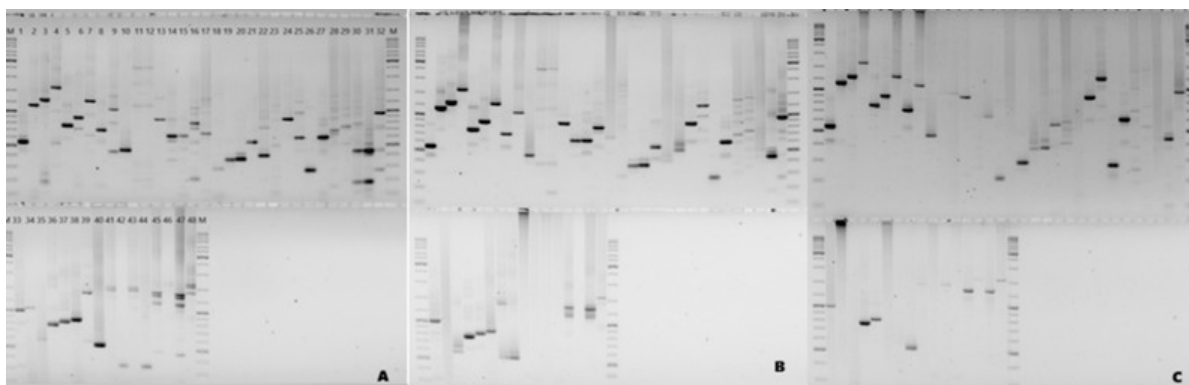
Далее оценивали эффективность полимеразы, для этого проводили амплификацию с разработанными праймерами в присутствии Phusion Plus, Phire II Hot Start, и Phusion HS II Hot Start. Анализ профилей амплификации выявил, что полимеразы Phusion Plus обладает рядом преимуществ для амплификации, основными из которых являются высокая специфичность, стабильность и воспроизводимость при работе с ДНК растений, часто содержащими ингибиторы (полисахариды и полифенольные компоненты).



1, 4, 7 - Phusion Plus DNA Polymerase (mix 1, mix 2, mix 3); 2, 5, 8 - Phire II Hot Start DNA Polymerase (mix 1, mix 2, mix 3); 3, 6, 9 - Phusion HS II Hot Start DNA Polymerase (mix 1, mix 2, mix 3)

Рисунок 38 – Праймер-тест для амплификации ДНК растений с праймерами

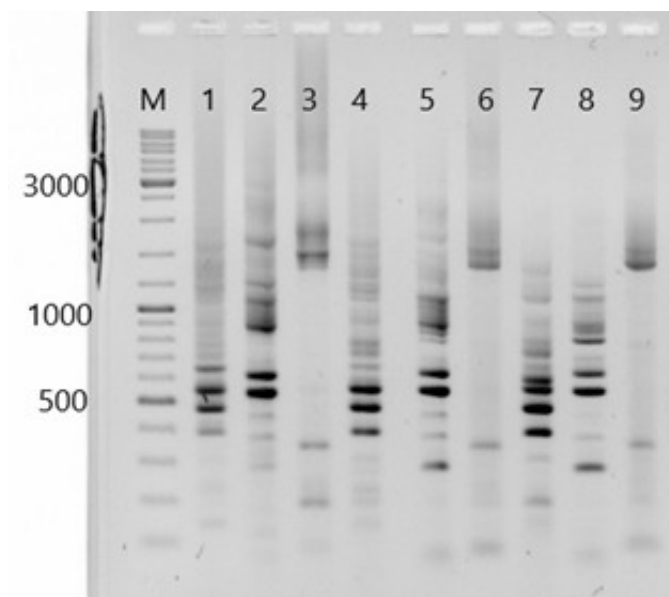
В результате оптимизации были получены продукты амплификации для всех комбинаций праймеров. Далее ПЦР-продукты (Mix 1-3) объединяли в одной пробирке для каждой полимеразы отдельно и проводили ПЦР для анализа генерированных продуктов у всех комбинаций разработанных праймеров (1-48) (рисунок 39).



А - концентрация праймеров 50 nM; В - концентрация праймеров 25 nM

Рисунок 39 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК растений с разработанными праймерами: А – Phusion Plus DNA Polymerase; В – Phire Hot Start DNA Polymerase; С – Phusion HS II Hot Start DNA Polymerase

Далее была проведена апробация разработанных праймеров для анализа поликомпонентных смесей с различным соотношением образцов (1:1:1; 1:0,5:0,5 и 0,5:0,5:1) (рисунок 40).



М - маркер молекулярного веса; 1-3 - образец №1; 4-6 - образец №2; 7-9 - образец №3

Рисунок 40 – Электрофореграмма продуктов амплификации многокомпонентных растительных образцов

Результаты показали, что разработанные наборы праймеров универсальны и позволяют амплифицировать целевые последовательности переменных межгенных и кодирующих областей между эукариотическими генами 18S и 28S рРНК.

В качестве пробного тестирования разрабатываемого подхода для видовой аутентификации видов все последовательности образцов, представленные в исследовании (18 пар чтений), были успешно секвенированы с использованием ампликонного секвенирования на платформе Illumina с длиной ридов 2x150 bp. Целью анализа было

определение растительного генетического материала в растительном образце и верификация целевого региона для последующей таксономической классификации.

Для верификации региона и оценки качества данных был проведен процесс картирования ридов на референсную последовательность с использованием программы Geneious. В качестве референса была выбрана последовательность FN687763.1 (*Hipporphae rhamnoides*), представляющая регион, длиной около 5000 пар оснований растения облепихи крушиновидной. Общий пул ридов, состоящий из 211,676 прочтений, был собран с использованием ассемблера Geneious. Процесс включал до 5 итераций с целью максимизации совпадений ридов с референсом.

Результаты картирования демонстрируют, что более половины ридов (55.73%) успешно выравнивались по референсной последовательности FN687763.1 (*Hipporphae rhamnoides*) (рисунок 41). Высокая доля совпадений (117,972 рида) в лучшей итерации подтверждает корректность выбора данного региона для анализа и его пригодность для дальнейшей дифференциации видов.



Рисунок 41 – Картирование прочтений на референтный целевой регион ДНК

Для повышения точности идентификации рекомендуется дополнить анализ картированием на дополнительные референсные последовательности других видов, что позволит оценить относительное представительство каждого вида в пуле. Картирование ридов на референс FN687763.1 (*Hipporphae rhamnoides*) подтвердило пригодность целевого региона для анализа растительного материала и показало, что 55,73% ридов относятся к облепихе крушиновидной. Данные послужили основой для дальнейшей таксономической классификации и оценки соотношений видов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно поставленной цели и задачам исследования в 2025 г. были получены следующие основные результаты:

В соответствии с этапом 5 календарного плана проведена проверка работоспособности праймеров и оптимизированы условия ПЦР реакции для амплификации целевых регионов генов PAX, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6.

В соответствии с этапом 6 календарного плана собран биоматериал от условно-здоровых людей, а также пациентов с диагнозом болезнь Гоше для последующего масс-спектрометрического анализа. Применена оптимизированная методика иммунодеплеции плазмы крови у экспериментальных животных.

В соответствии с этапом 7 календарного плана получен рекомбинантный гексон аденовируса типа 3 и отработаны условия его очистки. Разработан и оптимизирован состав реакционной смеси тест-системы. Отработан режим термоциклирования для выбранного состава тест-системы.

В соответствии с этапом 8 календарного плана экспрессирован ген обратной транскриптазы в клетках *E. coli* и получен штамм-продуцент. Нарботана рекомбинантная обратная транскриптаза в клетках *E. coli*, фермент выделен и очищен. Проведен подбор универсальных праймеров для амплификации генетических маркеров используемых в ДНК-баркодировании растений.

В соответствии с этапом 9 календарного плана сформирована коллекция образцов для таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Сформирована группа исследования по колоректальному раку согласно критериям. Проведен скрининг мутаций KRAS/BRAF.

В соответствии с этапом 10 календарного плана подготовлены иммунодеплецированные образцы из плазмы крови экспериментальных животных для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.

В соответствии с этапом 11 календарного плана проведено определение генетических маркеров устойчивости к антибиотикам. Продолжен сбор и пополнены коллекции фармакопейных стандартных образцов лекарственных растений. Сформирована ДНК коллекция ваучерных (фармакопейных стандартных образцов), а также образцов из лекарственного сырья и фитопрепаратов.

В соответствии с этапом 12 календарного плана проведена апробация отработанных условий на контрольных образцах ДНК и оценка покрытия секвенирования целевых участков генов PAX, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6. Проведена валидация результатов скрининга мутаций KRAS/BRAF.

В соответствии с этапом 13 календарного плана определена активность фермента β -глюкоцереброзидазы в контрольных и экспериментальных образцах на основе квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии. Подготовлены иммунодеплетированные образцы для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.

В соответствии с этапом 14 календарного плана получен рекомбинантный VP4 антигена ротавируса человека и отработаны условия его очистки. Определены иммунохимические и диагностические свойства рекомбинантных антигенов. Проведен дизайн и синтез CRISPR-ПНК. Проведена CRISPR-детекция генетических детерминант резистентности. Клонированы последовательности выбранных для тест-системы фрагментов в плазмиды для получения образцов положительного контроля.

В соответствии с этапом 15 календарного плана проведена проверка активности рекомбинантной обратной транскриптазы, подобран буфер хранения и оптимизирован состав реакционного буфера. Оптимизированы условия получения рекомбинантной обратной транскриптазы в полупромышленных условиях. Проведена оптимизация условий ПЦР амплификации на коллекции ДНК лекарственных видов растений, оптимизированы условия приготовления библиотек и высокопроизводительного секвенирования.

В рамках реализации научной программы достигнуты результаты, направленные на разработку высокоточных методов диагностики генетических заболеваний и изучение мутаций, связанных с онкогенезом. Важной составляющей работы стало создание методов таргетного секвенирования, апробация праймеров для амплификации генов, связанных с фенилкетонурией, MODY диабетом и синдромом Альпорта. Были сформированы коллекции контрольных образцов ДНК от пациентов с подтвержденными диагнозами и здоровых добровольцев, что было необходимо для дальнейшего тестирования диагностических панелей и методов. Клинический отбор пациентов, проведение лабораторных анализов и получение этических согласий соответствовали существующим требованиям. Кроме того, в рамках задачи по колоректальному раку выполнен целенаправленный скрининг мутаций в генах *KRAS* и *BRAF*, подтвержденный результатами таргетного секвенирования.

Проведена подготовка иммунодеплетированных образцов плазмы крови

экспериментальных животных для анализа методом LC-MS/MS. Применённая методика позволила существенно снизить уровень высокоэкспрессированных белков и повысить качество детектирования низкоконцентрированных биомаркеров, потенциально связанных с инсультом. Результаты масс-спектрометрического анализа выявили набор пептидов, ассоциированных с воспалительными и коагуляционными процессами для дальнейшей валидации панели биомаркеров ишемического повреждения мозга. Определена активность фермента β -глюкоцереброзидазы в контрольных и патологических образцах с применением квадрупольно-времяпролётной масс-спектрометрии. Полученные результаты показали чувствительность разрабатываемого метода для диагностики болезни Гоше.

В области изучения антибиотикорезистентности проведены работы по изучению генетических маркеров антибиотикорезистентности, в том числе у клинических и природных изолятов. Проведён дизайн и синтез CRISPR-ПНК для детекции генетических детерминант резистентности, а также клонирование фрагментов целевых последовательностей в плазмиды для создания положительных контрольных образцов. Совокупность результатов подтвердило перспективность созданных рекомбинантных антигенов и CRISPR-систем для разработки диагностических тестов нового поколения.

В рамках научной программы достигнуты результаты, направленные на разработку новых диагностических методов для инфекционных заболеваний. Разработаны и протестированы генетические конструкции, позволяющие синтезировать рекомбинантные антигены для иммунохроматографического анализа, направленного на определение иммунного статуса против рота- и аденовирусных инфекций. Для выявления и дифференциации возбудителей Лайм-боррелиоза и клещевой возвратной лихорадки была проведена молекулярный скрининг полевых образцов иксодовых клещей методом ПЦР с последующим секвенированием фрагментов генов *flaB*, *ospA*, *ospC* и 16S рПНК. Подтверждено присутствие на территории Казахстана возбудителей *Borrelia burgdorferi* sensu lato и *Borrelia miyamotoi*, включая патогенные генотипы. Впервые охарактеризованы локальные изоляты *B. miyamotoi*, близкие к штаммам Восточной Европы, что имеет важное значение для эпидемиологического мониторинга и разработки диагностических тест-систем.

Проведенные исследования по созданию термостабильных ферментов для молекулярной диагностики инфекций экспериментально подтвердили активность полученной рекомбинантной обратной транскриптазы. Оптимизирован состав реакционного и буферного растворов, что обеспечило стабильность фермента при хранении. Отработаны условия масштабного производства в полупромышленных объёмах, обеспечивающие высокий выход и чистоту фермента.

Кроме того, была сформирована и пополнена коллекция фармакопейных стандартных образцов лекарственных растений. Для каждого ваучерного образца проведено выделение ДНК и создание эталонной библиотеки для дальнейшего баркодирования. Была разработана технология аутентификации фитопрепаратов, используемых в педиатрической практике, с использованием ДНК-баркодинга. Улучшены параметры ПЦР-амплификации для ДНК лекарственных растений и протоколы подготовки библиотек для секвенирования.

Таким образом, согласно запланированным задачам, исследования выполнены в полном объеме. По результатам исследований были опубликованы статьи в рецензируемых зарубежных научных изданиях *Molecular Therapy Nucleic Acids* (Q1 Web of Science, процентиль по CiteScore в базе Scopus - 94), *Applied Sciences* (Q2 Web of Science, процентиль по CiteScore в базе Scopus - 79), *Frontiers in Ecology and Evolution* (Q2 Web of Science, процентиль по CiteScore в базе Scopus - 83), индексируемых в базе данных Web of Science с ненулевым импакт-фактором, а также статьи в отечественных изданиях *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, и *Bulletin of the L.N. Gumilyov Eurasian National University. Bioscience Series* рекомендованных КОКЧНВО (приложения Б и В). По результатам исследований были опубликованы два патента Республики Казахстан на полезную модель и патент Республики Казахстан на изобретение (приложения Б и В).

Научно-технический уровень исследований является высоким, и не уступает передовым исследованиям в исследуемой области знаний.

Технико-экономическая эффективность разрабатываемых высокочувствительных и точных методы диагностики социально-значимых заболеваний с использованием современных клеточных, геномных и протеомных технологий и инструментальных методов непосредственно связана с улучшением качества жизни пациентов, снижением затрат на лечение пациентов, и, в перспективе, со снижением уровня инвалидизации пациентов.

Уровень готовности технологии. Уровень готовности технологии для естественных наук, к которому относится данная программа, – категория А, уровень готовности технологии (УГТ/TRL) – 2, так как были опубликованы научные публикации с описанием результатов изучения объектов исследования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Marsden D., Levy H. Newborn Screening of Lysosomal Storage Disorders // *Clinical Chemistry*. – 2010. – Vol.56, №7. – P.1071-1079.
- 2 Trujillano D., Perez B., González J. Accurate molecular diagnosis of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-deficient hyperphenylalaninemias using high-throughput targeted sequencing // *European Journal of Human Genetics*. – 2014. – Vol.22, №4. – P.528-534.
- 3 Gundorova P., Stepanova A.A., Kuznetsova I.A. Genotypes of 2579 patients with phenylketonuria reveal a high rate of BH4 non-responders in Russia // *PLoS One*. – 2019. – Vol.14, №1. – P.e0211048.
- 4 Louis Isaac Woolf: At the Forefront of Newborn Screening and the Diet to Treat Phenylketonuria—Biography to Mark His 100th Birthday // *Book Dr. Louis Isaac Woolf: At the Forefront of Newborn Screening and the Diet to Treat Phenylketonuria—Biography to Mark His 100th Birthday / MDPI*, 2020. – P. 61.
- 5 Hillert A., Anikster Y., Belanger-Quintana A. The genetic landscape and epidemiology of phenylketonuria // *American Journal of Human Genetics*. – 2020. – Vol.107, №2. – P.234-250.
- 6 Tresbach R.H., Sperb-Ludwig F., Ligabue-Braun R. Phenylketonuria Diagnosis by Massive Parallel Sequencing and Genotype-Phenotype Association in Brazilian Patients // *Genes*. – 2021. – Vol.12, №1.
- 7 Elhawary N.A., AlJahdali I.A., Abumansour I.S. Genetic etiology and clinical challenges of phenylketonuria // *Human Genomics*. – 2022. – Vol.16, №1. – P.22.
- 8 Gao J.S., Li X.L., Guo Y.Q. Identification of phenylketonuria patient genotypes using single-gene full-length sequencing // *Human Genomics*. – 2022. – Vol.16, №1.
- 9 Vinueza A.M.Z.J.C. Recent advances in phenylketonuria: A review // *Cureus*. – 2023. – Vol.15, №6.
- 10 Zhang C., Yan Y.S., Zhou B.B. Identification of deep intronic variants of PAH in phenylketonuria using full-length gene sequencing // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2023. – Vol.18, №1.
- 11 Bansal V., Gassenhuber J., Phillips T. Spectrum of mutations in monogenic diabetes genes identified from high-throughput DNA sequencing of 6888 individuals // *BMC Medicine*. – 2017. – Vol.15, №1. – P.213.
- 12 Malik O., Khamis H., Rudnizky S. The mechano-chemistry of a monomeric reverse transcriptase // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – Vol.45, №22. – P.12954-12962.
- 13 Harris A., Naylor R.N. Pediatric Monogenic Diabetes: A Unique Challenge and Opportunity // *Pediatric Annals*. – 2019. – Vol.48, №8. – P.e319-e325.

- 14 Alvelos M.I., Gonçalves C.I., Coutinho E. Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) in Portugal: Novel GCK, HNFA1 and HNFA4 Mutations // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – Vol.9, №1.
- 15 Yahaya T.O., Ufuoma S.B. Genetics and Pathophysiology of Maturity-onset Diabetes of the Young (MODY): A Review of Current Trends // *Oman Medical Journal*. – 2020. – Vol.35, №3. – P.e126.
- 16 Hudson B.G., Tryggvason K., Sundaramoorthy M. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen // *New England Journal of Medicine*. – 2003. – Vol.348, №25. – P.2543-2556.
- 17 Kashtan C.E., Ding J., Garosi G. Alport syndrome: a unified classification of genetic disorders of collagen IV $\alpha345$: a position paper of the Alport Syndrome Classification Working Group // *Kidney International*. – 2018. – Vol.93, №5. – P.1045-1051.
- 18 Gibson J., Fieldhouse R., Chan M.Y. Prevalence Estimates of Predicted Pathogenic COL4A3-COL4A5 Variants in a Population Sequencing Database and Their Implications for Alport Syndrome // *Journal of American Society of Nephrology*. – 2021. – Vol.32, №9. – P.2273-2290.
- 19 Savige J., Lipska-Zietkiewicz B.S., Watson E. Guidelines for Genetic Testing and Management of Alport Syndrome // *Clinical Journal American Society Nephrology*. – 2022. – Vol.17, №1. – P.143-154.
- 20 Savige J., Renieri A., Ars E. Digenic Alport Syndrome // *Clinical Journal American Society Nephrology*. – 2022. – Vol.17, №11. – P.1697-1706.
- 21 Zacchia M., Capolongo G., Del Vecchio Blanco F. Next-Generation Sequencing (NGS) Analysis Illustrates the Phenotypic Variability of Collagen Type IV Nephropathies // *Genes (Basel)*. – 2023. – Vol.14, №3.
- 22 Galán Carrillo I., Galbis Martínez L., Martínez V. Multidisciplinary management improves the genetic diagnosis of hereditary kidney diseases in the next generation sequencing (NGS) era // *Nefrologia (Engl Ed)*. – 2024. – Vol.44, №1. – P.69-76.
- 23 Zhylkaidarova A., Kaidarova D., Batyrbekov K. Trends of Colorectal Cancer Prevalence in Kazakhstan Related to Screening // *Clinical Endoscopy*. – 2021. – Vol.54, №1. – P.32-37.
- 24 Mauyenova D., Axarin A., Telmanova Z. Colorectal Cancer Mortality in Kazakhstan: Spatio-Temporal Epidemiological Assessment // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2022. – Vol.23, №3. – P.953-960.
- 25 Wang C., Pan D. Mutation patterns and prognostic analysis of BRAF/KRAS/PIK3CA in colorectal cancer // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 2022. – Vol.36, №6. – P.e24444.

- 26 Potocki P.M., Wójcik P., Chmura L. Clinical Characterization of Targetable Mutations (BRAF V600E and KRAS G12C) in Advanced Colorectal Cancer-A Nation-Wide Study // International Journal of Molecular Science. – 2023. – Vol.24, №10.
- 27 Siegel R.L., Giaquinto A.N., Jemal A. Cancer statistics, 2024 // A Cancer Journal for Clinicians. – 2024. – Vol.74, №1. – P.12-49.
- 28 Gelb M.H., Turecek F., Scott C.R. Direct multiplex assay of enzymes in dried blood spots by tandem mass spectrometry for the newborn screening of lysosomal storage disorders // Journal of Inherited Metabolic Disease. – 2006. – Vol.29, №2. – P.397-404.
- 29 Nakamura K., Hattori K., Endo F. Newborn screening for lysosomal storage disorders // American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics. – 2011. – Vol.157, №1. – P.63-71.
- 30 Elliott S., Buroker N., Cournoyer J.J. Pilot study of newborn screening for six lysosomal storage diseases using Tandem Mass Spectrometry // Molecular Genetics and Metabolism. – 2016. – Vol.118, №4. – P.304-309.
- 31 Tortorelli S., Turgeon C.T., Gavrilov D.K. Simultaneous Testing for 6 Lysosomal Storage Disorders and X-Adrenoleukodystrophy in Dried Blood Spots by Tandem Mass Spectrometry // Clinical Chemistry. – 2016. – Vol.62, №9. – P.1248-1254.
- 32 Nalysnyk L., Rotella P., Simeone J.C. Gaucher disease epidemiology and natural history: a comprehensive review of the literature // Hematology. – 2017. – Vol.22, №2. – P.65-73.
- 33 Dardis A., Michelakakis H., Rozenfeld P. Patient centered guidelines for the laboratory diagnosis of Gaucher disease type 1 // Orphanet Journal of Rare Diseases. – 2022. – Vol.17, №1. – P.442.
- 34 Mohr J.P., Caplan L.R., Melski J.W. The Harvard Cooperative Stroke Registry: a prospective registry // Neurology. – 1978. – Vol.28, №8. – P.754-762.
- 35 Gao S., Wang Y.J., Xu A.D. Chinese ischemic stroke subclassification // Frontiers in Neurology. – 2011. – Vol.2. – P.6.
- 36 Mukherjee D., Patil C.G. Epidemiology and the global burden of stroke // World Neurosurgery. – 2011. – Vol.76, №6 Suppl. – P.S85-90.
- 37 Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association // Circulation. – 2013. – Vol.127, №1. – P.143-152.
- 38 Llombart V., Garcia-Berrocso T., Bustamante A. Cardioembolic stroke diagnosis using blood biomarkers // Current Cardiology Reviews. – 2013. – Vol.9, №4. – P.340-352.
- 39 Montellano F.A., Ungethum K., Ramiro L. Role of Blood-Based Biomarkers in Ischemic Stroke Prognosis: A Systematic Review // Stroke. – 2021. – Vol.52, №2. – P.543-551.

- 40 Anogianakis G., Daios S., Topouzis N. Current Trends in Stroke Biomarkers: The Prognostic Role of S100 Calcium-Binding Protein B and Glial Fibrillary Acidic Protein // *Life* (Basel). – 2024. – Vol.14, №10.
- 41 Mesaros C., Blair I.A. Mass spectrometry-based approaches to targeted quantitative proteomics in cardiovascular disease // *Clinical Proteomics*. – 2016. – Vol.13. – P.20.
- 42 Uzozie A.C., Aebersold R. Advancing translational research and precision medicine with targeted proteomics // *Journal of Proteomics*. – 2018. – Vol.189. – P.1-10.
- 43 Shen M., Tastet L., Bergler-Klein J. Blood, tissue and imaging biomarkers in calcific aortic valve stenosis: past, present and future // *Current Opinion in Cardiology*. – 2018. – Vol.33, №2. – P.125-133.
- 44 Kyriakidis I., Vasileiou E., Pana Z.D. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms // *Pathogens*. – 2021. – Vol.10, №3.
- 45 Lee C.R., Lee J.H., Park M. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2017. – Vol.7. – P.55.
- 46 Lam M.M.C., Hamidian M. Examining the role of *Acinetobacter baumannii* Plasmid Types in Disseminating Antimicrobial Resistance // *bioRxiv*. – 2023.10.1101/2023.09.03.556112. – P.2023.2009.2003.556112.
- 47 Kiga K., Tan X.E., Ibarra-Chávez R. Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria // *Nature Communications*. – 2020. – Vol.11, №1. – P.2934.
- 48 Ooi K.H., Liu M.M., Tay J.W.D. An engineered CRISPR-Cas12a variant and DNA-RNA hybrid guides enable robust and rapid COVID-19 testing // *Nature Communications*. – 2021. – Vol.12, №1. – P.1739.
- 49 Wu Y., Battalapalli D., Hakeem M.J. Engineered CRISPR-Cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2021. – Vol.19, №1. – P.401.
- 50 Zheng L., Jiang Y., Huang F. A colorimetric, photothermal, and fluorescent triple-mode CRISPR/cas biosensor for drug-resistance bacteria detection // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2023. – Vol.21, №1. – P.493.
- 51 Cao Y., Tian Y., Huang J. CRISPR/Cas13-assisted carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* detection // *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. – 2024. – Vol.57, №1. – P.118-127.

- 52 Noppa L., Burman N., Sadziene A. Expression of the flagellin gene in *Borrelia* is controlled by an alternative sigma factor // *Microbiology (Reading)*. – 1995. – Vol.141 (Pt 1). – P.85-93.
- 53 Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia // *Emerging Infectious Diseases*. – 2011. – Vol.17, №10. – P.1816-1823.
- 54 Wodecka B. *flaB* gene as a molecular marker for distinct identification of *Borrelia* species in environmental samples by the PCR-restriction fragment length polymorphism method // *Applied Environmental Microbiology*. – 2011. – Vol.77, №19. – P.7088-7092.
- 55 Stanek G., Wormser G.P., Gray J. Lyme borreliosis // *Lancet*. – 2012. – Vol.379, №9814. – P.461-473.
- 56 Krause P.J., Narasimhan S., Wormser G.P. *Borrelia miyamotoi* sensu lato seroreactivity and seroprevalence in the northeastern United States // *Emerging Infectious Diseases*. – 2014. – Vol.20, №7. – P.1183-1190.
- 57 Sato K., Takano A., Konnai S. Human infections with *Borrelia miyamotoi*, Japan // *Emerging Infectious Diseases*. – 2014. – Vol.20, №8. – P.1391-1393.
- 58 Waindok P., Schicht S., Fingerle V. Lyme borreliæ prevalence and genospecies distribution in ticks removed from humans // *Ticks Tick Borne Diseases*. – 2017. – Vol.8, №5. – P.709-714.
- 59 Karan L., Makenov M., Kolyasnikova N. Dynamics of Spirochetemia and Early PCR Detection of *Borrelia miyamotoi* // *Emerging Infectious Diseases*. – 2018. – Vol.24, №5. – P.860-867.
- 60 Middelveen M.J., Shah J.S., Fesler M.C. Relapsing fever *Borrelia* in California: a pilot serological study // *International Journal of General Medicine*. – 2018. – Vol.11. – P.373-382.
- 61 Ostapchuk Y.O., Perfilyeva Y.V., Zhigailov A.V. Monitoring of pathogenic *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the Almaty oblast, Kazakhstan // *Ticks Tick Borne Diseases*. – 2021. – Vol.12, №4. – P.101725.
- 62 Zhigailov A.V., Neupokoyeva A.S., Maltseva E.R. The prevalence of *Borrelia* in *Ixodes persulcatus* in southeastern Kazakhstan // *Ticks Tick Borne Diseases*. – 2021. – Vol.12, №4. – P.101716.
- 63 Ostapchuk Y.O., Dmitrovskiy A.M., Pak E.A. A Case of Combined Infection with Tick-Borne Encephalitis and Lyme Borreliosis with Severe Meningoencephalitis and Complete Recovery // *Journal of Global Infectious Diseases*. – 2023. – Vol.15, №2. – P.81-83.

- 64 Ostapchuk Y.O., Bissenbay A.O., Kuligin A.V. Survey of tick-borne relapsing fever borreliae in southern and southeastern Kazakhstan // Ticks Tick Borne Diseases. – 2024. – Vol.15, №6. – P.102398.
- 65 Baranauskas A., Paliksa S., Alzbutas G. Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants // Protein Engineering, Design and Selection. – 2012. – Vol.25, №10. – P.657-668.
- 66 Zimmerly S., Wu L. An Unexplored Diversity of Reverse Transcriptases in Bacteria // Microbiology Spectrum. – 2015. – Vol.3, №2. – P.0058-2014.
- 67 Baba M., Kakue R., Leucht C. Further increase in thermostability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by mutational combination // Protein Engineering, Design and Selection. – 2017. – Vol.30, №8. – P.551-557.
- 68 Katano Y., Li T., Baba M. Generation of thermostable Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase variants using site saturation mutagenesis library and cell-free protein expression system // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2017. – Vol.81, №12. – P.2339-2345.
- 69 Moelling K. Half a century of the reverse transcriptase-happy birthday // Genome Biology. – 2021. – Vol.22, №1. – P.31-36.
- 70 Luo Z., Xue Y., Chen X. Manganese-independent Reverse Transcriptase Activity of Tth DNA Polymerase with Two Amino Acid Substitutions // Protein Peptide Letters. – 2023. – Vol.30, №3. – P.193-200.
- 71 Sen S., Bhowmik P., Tiwari S. Versatility of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) from diagnosis of early pathological infection to mutation detection in organisms // Molecular Biology Reports. – 2024. – Vol.51, №1. – P.211.
- 72 Hensel A., Bauer R., Heinrich M. Consensus Statement on the Outcome of a Workshop on Paediatric Phytotherapy: Rationalising Optimal Dosing for Use in Children by Real-World Data // Planta Medica. – 2023. – Vol.80.
- 73 Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety // Frontiers in pharmacology. – 2014. – Vol.4. – P.177.
- 74 Al-Worafi Y.M. Herbal medicines safety issues // Drug safety in developing countries Elsevier, 2020. – C. 163-178.
- 75 Sucher N.J., Carles M.C. Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants // Planta medica. – 2008. – Vol.74, №06. – P.603-623.
- 76 Singh D., Mittal N., Verma S. Applications of some advanced sequencing, analytical, and computational approaches in medicinal plant research: a review // Molecular Biology Reports. – 2024. – Vol.51, №1. – P.23.

- 77 Howard C., Lockie-Williams C., Slater A. Applied barcoding: the practicalities of DNA testing for herbals // *Plants*. – 2020. – Vol.9, №9. – P.1150.
- 78 Cottenet G., Cavin C., Blancpain C. A DNA metabarcoding workflow to identify species in spices and herbs // *Journal of AOAC International*. – 2023. – Vol.106, №1. – P.65-72.
- 79 Lee H.B. J.D.H., Cho B.C., Park J.S. Comparative analyses of eight primer sets commonly used to target the bacterial 16S rRNA gene for marine metabarcoding-based studies // *Frontiers in Marine Science*. – 2023. – Vol.10.
- 80 Patil S., Imran M., Jaqueline R.S.M. Standardization of *Euphorbia tithymaloides* (L.) Poit.(root) by conventional and DNA barcoding methods // *ACS omega*. – 2023. – Vol.8, №32. – P.29324-29335.
- 81 Anderson L., Hunter C.L. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins // *Molecular Cell Proteomics*. – 2006. – Vol.5, №4. – P.573-588.
- 82 Jiang L., He L., Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis // *Journal of Chromatography A*. – 2004. – Vol.1023, №2. – P.317-320.
- 83 Vincent D., Ezernieks V., Elkins A. Milk Bottom-Up Proteomics: Method Optimization // *Frontiers in Genetics*. – 2015. – Vol.6. – P.360.
- 84 Fic E., Kedracka-Krok S., Jankowska U. Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis // *Electrophoresis*. – 2010. – Vol.31, №21. – P.3573-3579.
- 85 Benabdelkamel H., Masood A., Alanazi I.O. Comparison of protein precipitation methods from adipose tissue using difference gel electrophoresis // *Electrophoresis*. – 2018.10.1002/elps.201800124.
- 86 Sharma R., Dill B.D., Chourey K. Coupling a detergent lysis/cleanup methodology with intact protein fractionation for enhanced proteome characterization // *Journal of Proteome Research*. – 2012. – Vol.11, №12. – P.6008-6018.
- 87 Kim S.C., Chen Y., Mirza S A Clean, More Efficient Method for In-Solution Digestion of Protein Mixtures without Detergent or Urea // *Journal of Proteome Research*. – 2006. – Vol.5, №12. – P.3446-3452.
- 88 Xu P., Duong D.M., Peng J. Systematical Optimization of Reverse-Phase Chromatography for Shotgun Proteomics // *Journal of Proteome Research*. – 2009. – Vol.8, №8. – P.3944-3950.
- 89 Tran N.H., Qiao R., Xin L. Deep learning enables de novo peptide sequencing from data-independent-acquisition mass spectrometry // *Nature Methods*. – 2019. – Vol.16, №1. – P.63-66.

90 Tran N.H., Zhang X., Xin L. De novo peptide sequencing by deep learning // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2017. – Vol.114, №31. – P.8247-8252.

91 Brea D., Sobrino T., Blanco M. Usefulness of haptoglobin and serum amyloid A proteins as biomarkers for atherothrombotic ischemic stroke diagnosis confirmation // Atherosclerosis. – 2009. – Vol.205, №2. – P.561-567.

92 Anderson N.L. The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum // Clinical Chemistry. – 2010. – Vol.56, №2. – P.177-185.

93 Csosz E., Kallo G., Markus B. Quantitative body fluid proteomics in medicine - A focus on minimal invasiveness // Journal of Proteomics. – 2017. – Vol.153. – P.30-43.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Календарный план работ на 2024-2026 гг.

7

Приложение 1
к настоящему договору
№ _____ от « _____ » _____ 2024 года

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН

1. ТОО «Национальный центр биотехнологии»

1.1 По приоритету: Наука о жизни и здоровье.

1.2 По подприоритету: 7. Молекулярно-генетические и мультиомные исследования в области медицины и биологии.

1.3 По теме программы: №BR24992881 «Разработка клеточных, геномных и протеомных технологий для диагностики социально-значимых заболеваний в Республике Казахстан».

1.4 Общая сумма программы 918 000 000 тенге (девятьсот восемнадцать миллионов) тенге, в том числе с разбивкой по годам, для выполнения работ согласно пункту 3:

- на 2024 год - в сумме 218 000 000 (двести восемнадцать миллионов) тенге;
- на 2025 год - в сумме 300 000 000 (триста миллионов) тенге;
- на 2026 год - в сумме 400 000 000 (четыреста миллионов) тенге.

2. Характеристика научно-технической продукции по квалификационным признакам и экономические показатели

2.1 Направление работы: Медицина и биология.

2.2 Область применения: Медицина и здравоохранение.

2.3 Конечный результат:

- за 2024 год в результате реализации Программы будут получены следующие результаты:

- Проведен дизайн панели праймеров для амплификации целевых регионов генов PAX, HNF4A, GSK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCG8, KCNJ11, APPL1, WFS1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6 и их синтез.
- Проведен анализ и сформирована группа исследования по колоректальному раку.
- Проведен обзор существующих методик диагностики болезни Гоше на основе масс-спектрометрии и других высокоточных методов.
- Проведен патентно-информационный поиск по методам пробоподготовки и биомаркерам БСК. Оптимизирован метод иммунодеплеции плазмы крови экспериментальных животных для удаления основных белков.
- Проведен дизайн и синтез генов гексона аденовируса типа 3 и VP4 антигена ротавируса.
- Получены экспрессионные генетические конструкции, несущих ген гексона аденовируса типа 3 и ген VP4 антигена ротавируса.
- Проведен сбор и идентификация ДНК антибиотикорезистентных изолятов *A. baumannii*.
- Проведено формирование коллекции ДНК изолятов *A. baumannii*.
- Проведен патентный поиск и спроектированы праймеры и флуоресцентные пробы для определения специфичных участков геномной ДНК *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*. Синтезированы и очищены праймеры и флуоресцентные пробы. Проведены проверочные ПЦР с архивными образцами бактерий.
- Проведен биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей обратных транскриптаз и определена оптимальная последовательность фермента. Ген

обратной транскриптазы клонирован в составе экспрессионного вектора.

- Проведен анализ нормативной документации и составлены аннотированные списки лекарственных растений, препаратов на основе растительного сырья и готовых лекарственных форм растительных препаратов, разрешенных к использованию в официальной и народной медицине на территории Республики Казахстан.

- за 2025 год в результате реализации Программы будут получены следующие результаты:

- Проведена проверка работоспособности праймеров и оптимизированы условия ПЦР реакции для амплификации целевых регионов генов.

- Собран биоматериал от условно-здоровых людей, а также пациентов с диагнозом болезнь Гоше для последующего масс-спектрометрического анализа. Применена оптимизированная методика иммунодеплеции плазмы крови у экспериментальных животных.

- Получен рекомбинантный гексон аденовируса типа 3 и отработаны условия его очистки.

- Разработан и оптимизирован состав реакционной смеси тест-системы. Отработан режим термоциклирования для выбранного состава тест-системы.

- Ген обратной транскриптазы экспрессирован в клетках *E. coli* и получен штамм-продуцент. Нарботана рекомбинантная обратная транскриптаза в клетках *E. coli*, фермент выделен и очищен.

- Проведен подбор универсальных праймеров для амплификации генетических маркеров используемых в ДНК-баркодировании растений.

- Сформирована коллекция образцов для таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Сформирована группа исследования по колоректальному раку согласно критериям. Проведен скрининг мутаций KRAS/BRAF.

- Подготовлены иммунодеплетированные образцы из плазмы крови экспериментальных животных для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.

- Проведено определение генетических маркеров устойчивости к антибиотикам.

- Сформирована ДНК коллекция ваучерных (фармакопейных стандартных образцов), а также образцов из лекарственного сырья и фитопрепаратов.

- за 2026 год в результате реализации Программы будут получены следующие результаты:

- Проведено таргетное секвенирование генов на основе секвенирования нового поколения образцов ДНК, собранных от пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Проведена валидация выявленных мутаций методом секвенирования по Сэнгеру.

- Разработан метод диагностики болезни Гоше на основе квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии, а также проведено его сравнение с коммерческим набором. Применена оптимизированная методика иммунодеплеции плазмы крови пациентов, страдающих БСК.

- Определена эффективность конъюгата коллоидного золота на образцах сыворотки от больных детей. Определена эффективность конъюгата квантовой точки на образцах сыворотки от больных детей.

- Оценена чувствительность и специфичность разработанной тест-системы. Оценена стабильность разработанной тест-системы.

- Ген модифицированной ДНК полимеразы экспрессирован в клетках *E. coli* и получен штамм-продуцент модифицированной ДНК полимеразы. Рекомбинантная модифицированная ДНК полимеразы наработана в клетках *E. coli*, фермент выделен и

очищен.

- Созданы тестовые образцы, содержащие смесь ДНК различных лекарственных растений для NGS-секвенирования. Создана электронная база данных ваучерных образцов основных лекарственных растений, используемых в педиатрической практике, для аутентификации растительного сырья.

- Сформирована группа исследования по колоректальному раку. Проведен скрининг мутаций KRAS/BRAF. Проведена валидация результатов скрининга мутаций. Проведен анализ данных.

- Подготовлены иммунодеплементированные образцы из плазмы крови пациентов, страдающих БСК для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.

- Проведена оценка аналитической чувствительности и специфичности. Проведен анализ полученных результатов, проведена оценка диагностической ценности разработанной панели таргетного секвенирования генов.

- Опубликовано монография или учебное пособие по диагностике болезни Гоше на основе масс-спектрометрии, рекомендованное ученым советом организации. Подготовлены иммунодеплементированные образцы для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.

- Определена эффективность комбинированного конъюгата на образцах сыворотки от больных детей. Разработан дизайн набора и упаковки тест-системы. Разработана нормативно-техническая документация на тест-систему.

- Оптимизированы условия получения рекомбинантной модифицированной Taq ДНК полимеразы в полупромышленных условиях.

- Проверена работоспособность разработанной технологии аутентификации фитопрепаратов на основе ДНК-баркодирования и высокопроизводительного секвенирования на сформированной коллекции ДНК лекарственных трав, тестовых образцов, а также доступных коммерческих фитопрепаратах.

- Опубликовано не менее 9 (девятой) статей и (или) обзоров в рецензируемых научных изданиях по научному направлению программы, входящих в 1 (первый), 2 (второй) и (или) 3 (третий) квартиль по импакт-фактору в базе данных Web of Science и (или) имеющих процентиль по CiteScore в базе данных Scopus не менее 50 (пятидесяти).

- Опубликовано не менее 10 (десятой) статей в журналах, рекомендованных КОКНВО.

- Опубликовано не менее 1 (одной) монографии или учебных пособия в зарубежных и (или) казахстанских издательствах, рекомендованных ученым советом и (или) научно-техническим советом организации заявителя.

- Получено не менее 2 (двух) патентов в зарубежных патентных бюро (европейском, американском, японском) или не менее 2 (двух) зарубежных или международных патентов, включенных в базу данных Derwent Innovations Index (Web of Science, Clarivate Analytics) либо не менее 5 (пяти) объектов интеллектуальной собственности (патент; для заявок в области информационных технологий - авторское свидетельство), зарегистрированных в Национальном Институте интеллектуальной собственности Республики Казахстан.

2.4 Патентоспособность: Патентоспособны

2.5 Научно-технический уровень (новизна): разработка передовых отечественных технологий для диагностики ряда социально-значимых заболеваний на основе современных клеточных, геномных и протеомных методов и подходов, таких как секвенирование нового поколения (NGS), масс-спектрометрия, цифровой ПЦР, технология CRISPR/Cas, ДНК-баркодирование.

2.6 Использование научно-технической продукции осуществляется: медицинские учреждения и клиничко-диагностические лаборатории

2.7 Вид использования результата научной и (или) научно-технической деятельности:

отчеты, публикации, объекты интеллектуальной собственности.

3. Наименование работ, сроки их реализации и результаты

Шифр задания, этапа	Наименование работ по Договору и основные этапы его выполнения*	Срок выполнения*		Ожидаемый результат*
		начало	окончание	
2024 год				
1	Дизайн панели праймеров для амплификации целевых регионов генов PAX, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6 и их синтез. Начало формирования коллекции контрольных образцов для отработки условий таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Анализ и формирование группы исследования по колоректальному раку согласно критериям.	Август 2024	До 1 декабря 2024	Будет проведен дизайн панели праймеров для амплификации целевых регионов генов PAX, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6 и их синтез. Будет начато формирование коллекции контрольных образцов для отработки условий таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Будет проведен анализ и сформирована группа исследования по колоректальному раку согласно критериям.
2	Обзор существующих методик диагностики болезни Гоше на основе масс-спектрометрии и других высокоточных методов. Патентно-информационный поиск по методам пробоподготовки и биомаркерам БСК. Оптимизация метода иммунодеплеции плазмы крови экспериментальных животных для удаления основных белков.	Август 2024	До 1 декабря 2024	Будет проведен обзор существующих методик диагностики болезни Гоше на основе масс-спектрометрии и других высокоточных методов. Будет проведен патентно-информационный поиск по методам пробоподготовки и биомаркерам БСК. Будет оптимизирован метод иммунодеплеции плазмы крови экспериментальных животных для удаления основных белков.

3	Дизайн и синтез генов гексона аденовируса типа 3 и VP4 антигена ротавируса. Получение экспрессионных генетических конструкций, несущих ген гексона аденовируса типа 3 и ген VP4 антигена ротавируса. Сбор и идентификация ДНК антибиотикорезистентных изолятов <i>A. baumannii</i>. Формирование коллекции ДНК изолятов <i>A. baumannii</i>. Провести патентный поиск и спроектировать праймеры и флуоресцентные пробы для определения специфичных участков геномной ДНК <i>B. burgdorferi</i> s.l. и <i>B. miyamotoi</i>. Синтезировать и очистить праймеры и флуоресцентные пробы. Провести проверочные ПЦР с архивными образцами бактерий.	Август 2024	До 1 декабря 2024	Будет проведен дизайн и синтез генов гексона аденовируса типа 3 и VP4 антигена ротавируса. Будут получены экспрессионные генетические конструкции, несущих ген гексона аденовируса типа 3 и ген VP4 антигена ротавируса. Будет проведен сбор и идентификация ДНК антибиотикорезистентных изолятов <i>A. baumannii</i>. Будет проведено формирование коллекции ДНК изолятов <i>A. baumannii</i>. Будет проведен патентный поиск и спроектированы праймеры и флуоресцентные пробы для определения специфичных участков геномной ДНК <i>B. burgdorferi</i> s.l. и <i>B. miyamotoi</i>. Будут синтезированы и очищены праймеры и флуоресцентные пробы. Будут проведены проверочные ПЦР с архивными образцами бактерий.
4	Биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей обратных транскриптаз и определение оптимальной последовательности фермента. Клонирование гена обратной транскриптазы в составе экспрессионного вектора. Составление аннотированных списков лекарственных растений, препаратов на основе растительного сырья и готовых лекарственных форм растительных препаратов, разрешенных к использованию в официальной и народной медицине на территории Республики Казахстан.	Август 2024	До 1 декабря 2024	Будет проведен биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей обратных транскриптаз и определена оптимальная последовательность фермента. Будет клонирован ген обратной транскриптазы в составе экспрессионного вектора. Будет проведен анализ нормативной документации и составлены аннотированные списки лекарственных растений, препаратов на основе растительного сырья и готовых лекарственных форм растительных препаратов, разрешенных к использованию в официальной и народной медицине на территории Республики Казахстан. Будут определены ареалы распространения лекарственных растений для отбора и формирования коллекции фармакопейных стандартных образцов.

2025 год				
5	Проверка работоспособности праймеров и оптимизация условий ПЦР реакции для амплификации целевых регионов генов PАН, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6.	Январь 2025	Июнь 2025	Будет проведена проверка работоспособности праймеров и оптимизированы условия ПЦР реакции для амплификации целевых регионов генов PАН, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6.
6	Сбор биоматериала от условно-здоровых людей, а также пациентов с диагнозом болезнь Гоше для последующего масс-спектрометрического анализа. Использование оптимизированной методики иммунодеплеции плазмы крови у экспериментальных животных.	Январь 2025	Июнь 2025	Будет собран биоматериал от условно-здоровых людей, а также пациентов с диагнозом болезни Гоше для последующего масс-спектрометрического анализа. Будет применена оптимизированная методика иммунодеплеции плазмы крови у экспериментальных животных.
7	Получение рекомбинантного гексона аденовируса типа 3 и отработка условий его очистки. Разработать и оптимизировать состав реакционной смеси тест-системы. Отработать режим термоциклирования для выбранного состава тест-системы.	Январь 2025	Июнь 2025	Будет получен рекомбинантный гексон аденовируса типа 3 и отработаны условия его очистки. Будет разработан и оптимизирован состав реакционной смеси тест-системы. Будет отработан режим термоциклирования для выбранного состава тест-системы.
8	Экспрессия гена обратной транскриптазы в клетках <i>E. coli</i> и получение штамм-продуцента. Нарботка рекомбинантной обратной транскриптазы в клетках <i>E. coli</i> , выделение и очистка фермента. Подбор универсальных праймеров для амплификации генетических маркеров используемых в ДНК-баркодировании растений.	Январь 2025	Июнь 2025	Будет экспрессирован ген обратной транскриптазы в клетках <i>E. coli</i> и получен штамм-продуцент. Будет наработана рекомбинантная обратная транскриптаза в клетках <i>E. coli</i> , фермент выделен и очищен. Будет проведен подбор универсальных праймеров для амплификации генетических маркеров используемых в ДНК-баркодировании растений.

9	Продолжение работ по формированию коллекции образцов для таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Продолжение формирования группы исследования по колоректальному раку согласно критериям. Скрининг мутаций KRAS/BRAF.	Январь 2025	До 1 ноября 2025	Будет сформирована коллекция образцов для таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Будет сформирована группа исследования по колоректальному раку согласно критериям. Будет проведен скрининг мутаций KRAS/BRAF.
10	Подготовка иммунодеплементированных образцов из плазмы крови экспериментальных животных для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.	Январь 2025	До 1 ноября 2025	Будут подготовлены иммунодеплементированные образцы из плазмы крови экспериментальных животных для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.
11	Определение генетических маркеров устойчивости к антибиотикам. Пополнение коллекции фармакопейных стандартных образцов лекарственных растений. Формирование ДНК коллекции ваучерных (фармакопейных стандартных образцов), а также образцов из лекарственного сырья и фитопрепаратов.	Январь 2025	До 1 ноября 2025	Будет проведено определение генетических маркеров устойчивости к антибиотикам. Будет продолжен сбор и пополнены коллекции фармакопейных стандартных образцов лекарственных растений. Будет сформирована ДНК коллекция ваучерных (фармакопейных стандартных образцов), а также образцов из лекарственного сырья и фитопрепаратов.

12	Апробация отработанных условий на контрольных образцах ДНК и оценка покрытия секвенирования целевых участков генов PAX, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6. Валидация результатов скрининга мутаций KRAS/BRAF.	Июль 2025	До 1 ноября 2025	Будет проведена апробация отработанных условий на контрольных образцах ДНК и оценка покрытия секвенирования целевых участков генов PAX, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6. Будет проведена валидация результатов скрининга мутаций KRAS/BRAF.
13	Определение активности фермента β-глюкоцереброзидазы в контрольных и экспериментальных образцах на основе квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии. Подготовка иммунодеплетированных образцов для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.	Июль 2025	До 1 ноября 2025	Будет определена активность фермента β-глюкоцереброзидазы в контрольных и экспериментальных образцах на основе квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии. Будет подготовлены иммунодеплетированные образцы для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.
14	Получение рекомбинантного VP4 антигена ротавируса человека и отработка условий его очистки. Определение иммунохимических и диагностических свойств рекомбинантных антигенов. Дизайн и синтез CRISPR-PHK. Проведение CRISPR-детекция генетических детерминант резистентности. Клонировать последовательности выбранных для тест-системы фрагментов в плазмиды для получения образцов положительного контроля.	Июль 2025	До 1 ноября 2025	Будет получен рекомбинантный VP4 антигена ротавируса человека и отработаны условия его очистки. Будут определены иммунохимические и диагностические свойства рекомбинантных антигенов. Будет проведен дизайн и синтез CRISPR-PHK. Будет проведена CRISPR-детекция генетических детерминант резистентности. Будут клонированы последовательности выбранных для тест-системы фрагментов в плазмиды для получения образцов положительного контроля.

15	Проверка активности рекомбинантной обратной транскриптазы, подбор буфера хранения и оптимизация состава реакционного буфера. Оптимизация условий получения рекомбинантной обратной транскриптазы в полупромышленных условиях. Оптимизация условий ПЦР амплификации на коллекции ДНК лекарственных видов растений, приготовления библиотек и высокопроизводительного секвенирования.	Июль 2025	До 1 ноября 2025	Будет проведена проверка активности рекомбинантной обратной транскриптазы, подобран буфер хранения и оптимизирован состав реакционного буфера. Будут оптимизированы условия получения рекомбинантной обратной транскриптазы в полупромышленных условиях. Будет проведена оптимизация условий ПЦР амплификации на коллекции ДНК лекарственных видов растений, оптимизированы условия приготовления библиотек и высокопроизводительного секвенирования.
2026 год				
6	Таргетное секвенирование генов PAX, HNF4A, GSK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WFS1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6 на основе секвенирования нового поколения образцов ДНК, собранных от пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Валидация установленных мутаций методом секвенирования по Сэнгеру.	Январь 2026	Июнь 2026	Будет проведено таргетное секвенирование генов PAX, HNF4A, GSK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WFS1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6 на основе секвенирования нового поколения образцов ДНК, собранных от пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Будет проведена валидация выявленных мутаций методом секвенирования по Сэнгеру.
17	Разработка метода диагностики болезни Гоше на основе квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии и его сравнение с коммерческим набором. Использование оптимизированной методики иммунодеплеции плазмы крови пациентов, страдающих БСК.	Январь 2026	Июнь 2026	Будет разработан метод диагностики болезни Гоше на основе квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии, а также проведено его сравнение с коммерческим набором. Будет применена оптимизированная методика иммунодеплеции плазмы крови пациентов, страдающих БСК.

18	Определение эффективности ИХА с конъюгатом коллоидного золота на образцах сыворотки от больных детей. Определение эффективности ИХА с конъюгатом квантовой точки на образцах сыворотки от больных детей. Оценить чувствительность и специфичность разработанной тест-системы. Оценить стабильность разработанной тест-системы.	Январь 2026	Июнь 2026	Будет определена эффективность ИХА конъюгата коллоидного золота на образцах сыворотки от больных детей. Будет определена эффективность ИХА конъюгата квантовой точки на образцах сыворотки от больных детей. Будет оценена чувствительность и специфичность разработанной тест-системы. Будет оценена стабильность разработанной тест-системы.
19	Экспрессия гена модифицированной ДНК полимеразы в клетках <i>E. coli</i> и получение штамма-продуцента модифицированной ДНК полимеразы. Наработка рекомбинантной модифицированной ДНК полимеразы в клетках <i>E. coli</i>, выделение и очистка фермента. Создание тестовых образцов, содержащих смесь ДНК различных лекарственных растений для NGS-секвенирования. Создание электронной базы данных ваучерных образцов основных лекарственных растений, используемых в педиатрической практике, для аутентификации растительного сырья.	Январь 2026	Июнь 2026	Будет экспрессирован ген модифицированной ДНК полимеразы в клетках <i>E. coli</i> и получен штамм-продуцент модифицированной ДНК полимеразы. Будет наработана рекомбинантная модифицированная ДНК полимеразы в клетках <i>E. coli</i>, фермент выделен и очищен. Будут созданы тестовые образцы, содержащие смесь ДНК различных лекарственных растений для NGS-секвенирования. Будет создана электронная база данных ваучерных образцов основных лекарственных растений, используемых в педиатрической практике, для аутентификации растительного сырья.
20	Продолжение формирования группы исследования по колоректальному раку. Скрининг мутаций KRAS/BRAF. Валидация результатов скрининга мутаций. Анализ данных.	Январь 2026	До 1 ноября 2026	Будет сформирована группа исследования по колоректальному раку. Будет проведен скрининг мутаций KRAS/BRAF. Будет проведена валидация результатов скрининга мутаций. Будет проведен анализ данных.
21	Подготовка иммунодеплептированных образцов из плазмы крови пациентов, страдающих БСК для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.	Январь 2026	До 1 ноября 2026	Будут подготовлены иммунодеплептированные образцы из плазмы крови пациентов, страдающих БСК для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.

22	Оценка аналитической чувствительности и специфичности.	Январь 2026	До 1 ноября 2026	Будет проведена оценка аналитической чувствительности и специфичности.
23	Анализ полученных результатов, оценка диагностической ценности разработанной панели таргетного секвенирования генов PAX, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6.	Июль 2026	До 1 ноября 2026	Будет проведен анализ полученных результатов, проведена оценка диагностической ценности разработанной панели таргетного секвенирования генов PAX, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6.
24	Подготовка монографии или учебного пособия по диагностике болезни Гоше на основе масс-спектрометрии. Подготовка иммунодеплементированных образцов для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.	Июль 2026	До 1 ноября 2026	Будет опубликована монография или учебное пособие по диагностике болезни Гоше на основе масс-спектрометрии, рекомендованное ученым советом организации. Будут подготовлены иммунодеплементированные образцы для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.
25	Определение эффективности ИХА с комбинированным конъюгатом на образцах сыворотки от больных детей. Разработать дизайн набора и упаковки тест-системы. Разработать нормативно-техническую документацию на тест-систему.	Июль 2026	До 1 ноября 2026	Будет определена эффективность комбинированного конъюгата на образцах сыворотки от больных детей. Будет разработан дизайн набора и упаковки тест-системы. Будет разработана нормативно-техническая документация на тест-систему.

26	Оптимизация условий получения рекомбинантной модифицированной Taq ДНК полимеразы в полупромышленных условиях. Оптимизация работы двух ферментов: обратной транскриптазы и модифицированной ДНК полимеразы в едином реакционном буфере и в одном температурном режиме. Тестирование ферментов в диагностических экспериментах по выявлению возбудителей урогенитальных инфекций. Проверка работоспособности разработанной технологии аутентификации фитопрепаратов на основе ДНК-баркодинга и высокопроизводительного секвенирования на сформированной коллекции ДНК лекарственных трав, тестовых образцов, а также доступных коммерческих фитопрепаратах.	Июль 2026	До 1 ноября 2026	Будут оптимизированы условия получения рекомбинантной модифицированной Taq ДНК полимеразы в полупромышленных условиях. Будет оптимизирована работа двух ферментов: обратной транскриптазы и модифицированной ДНК полимеразы в едином реакционном буфере и в одном температурном режиме. Будет проведено тестирование ферментов в диагностических экспериментах по выявлению возбудителей урогенитальных инфекций. Будет проверена работоспособность разработанной технологии аутентификации фитопрепаратов на основе ДНК-баркодинга и высокопроизводительного секвенирования на сформированной коллекции ДНК лекарственных трав, тестовых образцов, а также доступных коммерческих фитопрепаратах.
----	--	-----------	------------------	---

27	Опубликовать не менее 9 (девяти) статей и (или) обзоров в рецензируемых научных изданиях по научному направлению программы, входящих в 1 (первый), 2 (второй) и (или) 3 (третий) квартиль по импакт-фактору в базе данных Web of Science и (или) имеющих проценты по CiteScore в базе данных Scopus не менее 50 (пятидесяти). Опубликовать не менее 10 (десять) статей в журналах, рекомендованных КОКНВО. Опубликовать не менее 1 (одной) монографии или учебных пособия в зарубежных и (или) казахстанских издательствах, рекомендованных ученым советом и (или) научно-техническим советом организации заявителя; Опубликовать не менее 2 (двух) патентов в зарубежных патентных бюро (европейском, американском, японском) или не менее 2 (двух) зарубежных или международных патентов, включенных в базу данных Derwent Innovations Index (Web of Science, Clarivate Analytics) либо не менее 5 (пяти) объектов интеллектуальной собственности (патент; для заявок в области информационных технологий - авторское свидетельство), зарегистрированных в Национальном Институте интеллектуальной собственности Республики Казахстан.	Июль 2026	До 1 ноября 2026	Будет опубликовано не менее 9 (девяти) статей и (или) обзоров в рецензируемых научных изданиях по научному направлению программы, входящих в 1 (первый), 2 (второй) и (или) 3 (третий) квартиль по импакт-фактору в базе данных Web of Science и (или) имеющих проценты по CiteScore в базе данных Scopus не менее 50 (пятидесяти). Будет опубликовано не менее 10 (десять) статей в журналах, рекомендованных КОКНВО. Опубликовано не менее 1 (одной) монографии или учебных пособия в зарубежных и (или) казахстанских издательствах, рекомендованных ученым советом и (или) научно-техническим советом организации заявителя; Будет опубликовано не менее 2 (двух) патентов в зарубежных патентных бюро (европейском, американском, японском) или не менее 2 (двух) зарубежных или международных патентов, включенных в базу данных Derwent Innovations Index (Web of Science, Clarivate Analytics) либо не менее 5 (пяти) объектов интеллектуальной собственности (патент; для заявок в области информационных технологий - авторское свидетельство), зарегистрированных в Национальном Институте интеллектуальной собственности Республики Казахстан.
----	--	-----------	------------------	--

Примечание: * - указываются работы, сроки и их результаты за 2024, 2025, 2026 годы по каждому году, согласно календарному плану конкурсной заявки.

От Заказчика:
Председатель
ГУ «Комитет науки Министерства науки и высшего образования РК»



Жанкуатов Г.Ж.

От Исполнителя:
И.о. генерального директора
ТОО «Национальный центр биотехнологий»



Огай В.Б.

Ознакомлен:
Научный руководитель программы
Тарлыков П.В.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Список опубликованных работ

По результатам исследований в 2025 г. были опубликованы следующие работы:

1. Kalendar R. Comprehensive web-based platform for advanced PCR design, genotyping, synthetic biology, molecular diagnostics, and sequence analysis // *Molecular Therapy Nucleic Acids*. - 2025. - Vol.36, №4. Процентиль по CiteScore в базе Scopus - 94, квартиль в базе Web of Science - Q1.
2. Kulyyassov A., Makhsatova S., Kurmanbay A. Protein Identification Improvement in Complex Samples Using Higher Frequency MS Acquisition and PEAKS Software // *Applied Sciences*. - 2025. - Vol.15, №2. - P.666. Процентиль по CiteScore в базе Scopus - 79, квартиль в базе Web of Science - Q2.
3. Turzhanova A.S., Kubentayev S.A., Magzumova S.M., Sarkytbayeva A.K., Khapilina O.N. The impact of local environmental differences on the phenotypic plasticity and genetic variation of Kazakhstani populations of *Paeonia anomala* // *Frontiers in Ecology and Evolution*. - 2025. - Vol. 13 - 2025. Процентиль по CiteScore в базе Scopus - 83, квартиль в базе Web of Science - Q2.
4. Turzhanova A., Magzumova S., Khapilina O. Assessment of the effectiveness of ITS markers in DNA barcoding of *Betula* species in the Kazakh Altai // *Bulletin of the L.N. Gumilyov Eurasian National University. Bioscience Series*. - 2025. - Vol.150, №1. - P.7-21. Отечественное издание, рекомендованное КОКЧНВО
5. Mukantayev K., Tursunov K., Adish Z., Tarlykov P. Immunochromatographic Analysis: Assessment and Prospects for Application in the Diagnosis of Rotavirus and Adenovirus Infections // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. - 2025.10.11134/btp.3.2025.18 №3. - P.165-174. Отечественное издание, рекомендованное КОКЧНВО
6. Mussakhmetov A., Akishev Z., Khassenov B. Production of Modified RNA-Dependent DNA Polymerase of Human Immunodeficiency Virus for Use as Reverse Transcriptase // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. - 2025.10.11134/btp.3.2025.15 №3. - P.137-146. Отечественное издание, рекомендованное КОКЧНВО
7. Акишев Ж.Д., Мусахметов А.С., Хасенов Б.Б. Способ получения термостабильной обратной транскриптазы на основе модифицированной ревертазы из вируса иммунодефицита человека: пат. на изобретение РК № 37416. – Заявл. 28.02.2025; опубл. 04.07.2025, Бюл. № 27. – 6 с.
8. Кулмамбетова Г.Н., Курентай Б.А., Баянбек Д.С. Набор из праймеров для идентификации мутаций генов KRAS G12/G13, BRAF V600E на основе полимеразной

цепной реакции: пат. на полезную модель РК № 10829. – Заявл. 14.05.2025; опубл. 04.07.2025, Бюл. № 27. – 4 с.

9. Жолдыбаева Е.В., Календарь Р.Н., Жамшитова Д.А., Бекбаева А., Төлеужанова А.Б. Набор олигонуклеотидных праймеров для диагностики синдрома Альпорта: пат. на полезную модель РК № 11179. – Заявл. 24.04.2025; опубл. 19.09.2025, Бюл. № 38. – 4 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Оттиски публикаций

Molecular Therapy
Nucleic Acids
Original Article



Comprehensive web-based platform for advanced PCR design, genotyping, synthetic biology, molecular diagnostics, and sequence analysis

Ruslan Kalendar^{1,2}

¹Helsinki Institute of Life Science (HiLIFE), University of Helsinki, Biocentre 3, P.O. Box 65, Viikinkaari 1, 00014 Helsinki, Finland; ²National Laboratory Astana, Nazarbayev University, 53 Kabanbay batyr Ave., Astana 010000, Kazakhstan

We present a comprehensive web-based platform that integrates a suite of molecular biology tools tailored for PCR-based applications. Key features include custom multiplex tiling PCR panel design for amplicon sequencing, loop-mediated isothermal amplification (LAMP), allele-specific PCR genotyping assay development, Gibson assembly, oligonucleotide analysis and design, and the *de novo* identification, classification, and visualization of repetitive sequences. The platform supports a wide range of PCR primer design tasks, including standard, multiplex, reverse, long-range, quantitative fluorescence (TaqMan and MGB probe), and bisulfite PCR. *In silico* PCR analysis ensures primer and probe specificity across diverse applications such as gene discovery via homology analysis, molecular diagnostics, DNA profiling, and repeat sequence identification. The multiplex tiling PCR tool is optimized for both next-generation and third-generation sequencing technologies. LAMP primer design includes support for loop primers that target eight distinct regions of the DNA template. The allele-specific PCR module enables genotyping of single nucleotide polymorphisms, insertions/deletions, multi-nucleotide variants, and haplotypes at specific loci. Additionally, the platform facilitates genome-wide identification, masking, and clustering of repetitive elements, including interspersed repeats and low-complexity sequences such as simple sequence repeats and telomeres. All tools are freely accessible at <https://primerdigital.com/tools/>.

INTRODUCTION

Contemporary molecular biology research requires increasingly demanding sophisticated computational tools capable of handling complex experimental designs and high-throughput data analysis. Although numerous algorithmic solutions exist for individual applications, the field lacks integrated platforms that efficiently combine multiple functionalities while maintaining high accuracy and computational efficiency. Despite the availability of several online solutions, there is a growing need for integrated, open, and universal platforms that can combine multiple functionalities.^{1–4}

PCR is fundamental in molecular biology and is the most important practical molecular technique in research laboratories. Nucleic acid amplification assays are an essential class of specific target-sequence detection methods in contemporary biology and have a diverse range of applications, including the diagnosis of inherited diseases, human and microorganism identification, genotyping, and DNA sequencing. Numerous isothermal techniques that do not rely on thermocycling to drive the amplification reactions have been developed. For example, loop-mediated isothermal amplification (LAMP)⁵ is an isothermal nucleic acid amplification technique that does not require thermocycling. LAMP is a highly sensitive, specific, and rapid DNA amplification technique with significantly advanced molecular biology research and clinical diagnostics.

The effectiveness of DNA amplification methods largely depends on the identification of unique primer sequences with a high PCR efficiency. Primer design is a crucial step in all PCR applications to ensure specific and efficient amplification of target sequences. Despite the availability of numerous online and commercial bioinformatics tools, primer design remains inconvenient and impractical for routine use.

The evolving applications of PCR have further emphasized the need for advanced tools capable of addressing diverse requirements. These include quantitative fluorescent PCR, multiplex PCR with multiple primer combinations, discovery and amplification of simple sequence repeats for diagnostic markers,⁶ and the design of primers and probes (e.g., dual-labelled oligonucleotide probes, TaqMan, or molecular beacons). TaqMan and molecular beacon assays both use a reporter and quencher dye attached to the probe, which then hybridize to the target sequence during amplification. Developing such tools is essential for supporting the growing range of PCR-based applications.

Received 12 March 2025; accepted 11 September 2025;
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2025.102716>.

Correspondence: Ruslan Kalendar, Helsinki Institute of Life Science (HiLIFE), University of Helsinki, Biocentre 3, P.O. Box 65, Viikinkaari 1, 00014 Helsinki, Finland.

E-mail: ruslan.kalendar@helsinki.fi



Molecular Therapy: Nucleic Acids Vol. 36 December 2025 © 2025 The Author(s).
Published by Elsevier Inc. on behalf of The American Society of Gene and Cell Therapy.
This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1

Article

Protein Identification Improvement in Complex Samples Using Higher Frequency MS Acquisition and PEAKS Software

Arman Kulyyassov , Saya Makhsatova  and Aruzhan Kurmanbay 

Limited Liability Partnership “National Center for Biotechnology” Ministry of Healthcare of the Republic of Kazakhstan, 13/5, Kurgalzhynskoye Road, Astana 010000, Kazakhstan; makhsatova@biocenter.kz (S.M.); kurmanbay@biocenter.kz (A.K.)

* Correspondence: kulyyassov@biocenter.kz; Tel.: +7-7172-707534

Abstract: Protein identification in complex biological samples using the shotgun mode of LC-MS/MS is typically enhanced by employing longer LC columns and extended gradient times. However, improved identification rates can also be achieved by optimizing MS acquisition frequencies and employing advanced software, without increasing analysis time, thus maintaining the throughput of the method. To date, we found only one study in the literature examining the influence of MS acquisition frequency on protein identification, specifically using two ion trap mass spectrometer models. This study aims to address the gap by analyzing the impact of MS acquisition tuning of the QTOF instrument on the analysis of complex samples. Our findings indicate that increasing acquisition frequency generally improves protein identification, although the extent of improvement depends on the sample type. For CHO cell lysates, protein identifications increased by over 10%, while *E. coli* and albumin-depleted plasma samples demonstrated gains of 3.6% and 2.6%, respectively. Higher contributions to protein identification were also achieved with extended LC gradients, resulting in improvements of 21.6% for CHO, 18.2% for *E. coli*, and 10.3% for plasma. Moreover, enabling PEAKS’ deep learning feature significantly boosted identifications, with increases of 22.9% for CHO, 23.2% for *E. coli*, and 9.2% for plasma.

Keywords: collision-induced dissociation (CID); data-dependent acquisition or shotgun (DDA); deep learning (DL); false discovery rate (FDR); full width at half maximum (FWHM); liquid chromatography-tandem mass-spectrometry LC-MS/MS; mascot generic format files (.mgf files); machine learning (ML); peak capacity; peptide spectrum match (PSM)



Academic Editor: Zhibin Lv

Received: 13 December 2024

Revised: 8 January 2025

Accepted: 9 January 2025

Published: 11 January 2025

Citation: Kulyyassov, A.; Makhsatova, S.; Kurmanbay, A. Protein Identification Improvement in Complex Samples Using Higher Frequency MS Acquisition and PEAKS Software. *Appl. Sci.* **2025**, *15*, 666. <https://doi.org/10.3390/app15020666>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Proteomics workflows start with sample preparation, which involves extracting and solubilizing proteins from complex sources such as mammalian cells, bacterial samples, or biological fluids like plasma or serum. The standard protocol then proceeds with steps such as denaturation, reduction and alkylation of cysteine residues, and enzymatic digestion [1,2]. Complex proteomic samples are commonly prepared using in-solution digestion by proteases, such as trypsin or Lys-C, in the presence of urea as a chaotropic agent [3,4]. This approach is simpler, more scalable, and less time-consuming compared to in-gel digestion. Some variations for in-solution digestion utilize buffers with minimal surfactant concentrations, like SDS [5] or SDC [6,7]. Urea or detergents help solubilize proteins, enhancing digestion efficiency and peptide yield. However, SDS and urea are incompatible with LC-MS/MS, requiring an additional step to reduce their concentration before downstream analysis by mass spectrometry. Kim et al. [8] developed a protocol for clean sample



OPEN ACCESS

EDITED BY

Neeta Lohani,
Donald Danforth Plant Science Center,
United States

REVIEWED BY

Rania Kouli,
High Agronomic Institute of Chott Mariem,
Tunisia
Hossein Zeinalzadeh Tabrizi,
Kyrgyz Turkish Manas University, Kyrgyzstan

*CORRESPONDENCE

Oxana N. Khapilina
✉ oksfur@mail.ru

RECEIVED 24 April 2025

ACCEPTED 27 June 2025

PUBLISHED 22 July 2025

CITATION

Turzhanova AS, Kubentayev SA,
Magzumova SM, Sarkytbayeva AK and
Khapilina ON (2025) The impact of local
environmental differences on the phenotypic
plasticity and genetic variation of Kazakhstani
populations of *Paeonia anomala*.
Front. Ecol. Evol. 13:1608776.
doi: 10.3389/fevo.2025.1608776

COPYRIGHT

© 2025 Turzhanova, Kubentayev, Magzumova,
Sarkytbayeva and Khapilina. This is an open-
access article distributed under the terms of
the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The use, distribution or reproduction
in other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original publication
in this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

The impact of local environmental differences on the phenotypic plasticity and genetic variation of Kazakhstani populations of *Paeonia anomala*

Ainur S. Turzhanova¹, Serik A. Kubentayev²,
Saule M. Magzumova¹, Aisulu K. Sarkytbayeva³
and Oxana N. Khapilina^{1*}

¹Plant Genomics and Bioinformatics Laboratory, National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan, ²Laboratory of Flora and Plant Resources, Astana Botanical Garden, Orynbor, Astana, Kazakhstan, ³Faculty of Biology and Biotechnology, Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

Medicinal plants are highly vulnerable to overexploitation and environmental pressures, leading to a risk of extinction. Local ecological heterogeneity influences phenotypic variability and adaptive responses to stress. Species survival under specific conditions depends on genome plasticity, which can be altered by the activation of retrotransposons that are sensitive to environmental changes. Genome profiling using the inter-primer binding site (iPBS) polymerase chain reaction (PCR) method enables the assessment of genetic polymorphisms within and between populations over small geographical ranges, thereby providing crucial insights for conservation efforts. *Paeonia anomala* L. (*P. anomala*) is a valuable medicinal plant that has experienced a population decline in Kazakhstan due to extensive harvesting for medicinal use. This study investigated and analyzed the morphometric traits, genetic diversity, and environmental conditions of five *P. anomala* populations in the Kazakh Altai. Phenotypic variability analysis revealed significant interpopulation differences in traits such as plant diameter, plant height, raw biomass, and leaf blade length and width. We found that spatial orientation, slope angle, and human activity had a significant effect on the phenotypic variability of *P. anomala* plants in the studied populations. Genetic analysis using iPBS genome profiling identified 1,176 PCR fragments, of which 860 were polymorphic, with polymorphism levels ranging from 46% to 64%. The IVA population exhibited the highest genetic variability ($H_e = 0.212$; $I = 0.315$), whereas the ASU population exhibited the lowest genetic diversity ($H_e = 0.163$; $I = 0.244$). Our study provides a better understanding of *P. anomala* population differentiation under local environmental conditions and supports the development of effective conservation strategies.

KEYWORDS

Paeonia anomala L., biodiversity, retrotransposons, iPBS markers, morphometric variability, ecological adaptation



Assessment of the effectiveness of ITS markers in DNA barcoding of *Betula* species in the Kazakh Altai

A. Turzhanova*¹, S. Magzumova¹, O. Khapilina¹

¹National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan

*Corresponding author: ospanov396@gmail.com

Abstract. This study investigates the effectiveness of ITS (Internal Transcribed Spacer) DNA barcoding markers for identifying and differentiating eight species of *Betula* within the Kazakh Altai flora: *Betula glandulosa*, *B. pendula*, *B. pubescens*, *B. rotundifolia*, *B. reznitzenkoana*, *B. tianschanica*, *B. microphylla*, and *B. kirghisorum*. By extracting and sequencing DNA from herbarium specimens, the study focuses on assessing the genetic diversity and resolving phylogenetic relationships among these *Betula* species, many of which have close morphological similarities that can complicate traditional taxonomy. The results reveal that ITS markers provide clear genetic differentiation between these species, highlighting the effectiveness of ITS in distinguishing even closely related species within the *Betula* genus. Analysis using the Neighbor-Joining method showed two primary clusters, aligning well with known phylogenetic sections, *Apterocaryon* and *Betula*, which are established classifications within the genus. Furthermore, the study offers the first ITS sequence data for two species, *B. reznitzenkoana* and *B. kirghisorum*, contributing new genetic information to the NCBI database. These findings are crucial for ongoing conservation efforts, given the ecological and environmental pressures facing native *Betula* species in the Kazakh Altai. By providing reliable molecular markers, this research supports future studies on species distribution, genetic diversity, and conservation planning within this biodiverse and ecologically sensitive region.

Keywords: *Betula* L. species, ITS markers, DNA barcoding, evolutionary relationships, genetic variability

Received: 05.11.2024. Accepted: 06.12.2024. Available online: 04.04.2025

UDC 57.083.2

Review Article

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ANALYSIS: ASSESSMENT AND PROSPECTS FOR APPLICATION IN THE DIAGNOSIS OF ROTAVIRUS AND ADENOVIRUS INFECTIONS

Mukantayev Kanatbek , Tursunov Kanat* , Adish Zhansaya , Tarlykov Pavel 

National Center for Biotechnology, 13/5 Korgalzhyn Highway, Astana, 010000, Kazakhstan

*Corresponding author: kanat_tka@mail.ru

ABSTRACT

The objective of this review was to provide information on immunochromatographic assays (ICA) relevant to the diagnosis of human adenovirus (HAdV) and rotavirus (HRV) infections. HAdVs and HRVs cause respiratory and gastrointestinal diseases in children and are characterized by strong inflammatory responses. Virological diagnostic methods include virus isolation in cell cultures, molecular-biological techniques, and immunological assays. These methods are considered the gold standard; however, obtaining results requires a significant amount of time. The development of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) has greatly facilitated the diagnosis of viral infections due to its high specificity and sensitivity. However, the complexity of the reaction protocol and the need for additional laboratory equipment make RT-PCR unsuitable for point-of-care testing. Immunochromatographic analysis, due to its low cost, simple sample preparation, and ease of use, represents an excellent alternative for bedside diagnostics. In studies on other infections, ICA has demonstrated the absence of cross-reactivity, high reproducibility, and acceptable sensitivity compared to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and RT-PCR. In conclusion, ICA test systems may be useful in clinical practice for the rapid detection of rotavirus and adenovirus infections. However, the possibility of false-positive results and differences in subtype identification across various diagnostic methods should be taken into account.

Keywords: rotavirus, adenovirus, diagnosis, polymerase chain reaction, ELISA, immunochromatographic analysis, colloidal gold.

INTRODUCTION

The incidence of rotavirus (HRV) and adenovirus (HAdV) infections in young children is extremely high in developing countries [1]. HRV is the primary causative agent of severe diarrhea in this age group, leading to a significant number of hospitalizations and fatalities, as well as considerable economic burdens on healthcare systems. HRV accounts for approximately 2 million hospitalizations and 450,000 deaths of children worldwide, with the highest mortality rates recorded in Asia and Africa [2]. Another significant etiological factor in infants and young children is HAdV. Hospital-based studies have established a link between adenoviral infection and gastrointestinal disease. In recent years, adenovirus has played an increasingly important role among children who have undergone bone marrow transplantation. Infection with this virus can result in severe complications, increased mortality risk, and prolonged disease duration. Given these factors, the accurate and timely identification of the causative pathogen remains a critical issue in viral infections [3].

Timely and effective antiviral interventions require accessible, convenient, and rapid diagnostic methods. Currently, polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are the most widely used techniques for diagnosing viral infections. However, their multi-step protocols and the need for specialized laboratory equipment make them less effective for large-scale screenings. In contrast, immunochromatographic assays (ICA) is a one-step method that can be performed without additional equipment or reagents [4]. These technical characteristics make ICA well-suited for rapid testing and easy visual interpretation of results in point-of-care settings [5]. Additional advantages of ICA include low cost, long shelf life, and simple sample preparation [6, 7].

In recent years, ICA technology has been increasingly utilized not only in infectious disease diagnostics but also in

food safety monitoring. The scope of ICA applications has significantly expanded with advancements in nanotechnology. As improvements in sensitivity and performance continue, ICA is emerging as a key approach for pathogen detection. This review discusses the fundamental principles and classification of ICA technology, examines current trends in human rotavirus (HRV) and human adenovirus (HAdV) diagnostics, and highlights recent advancements aimed at enhancing the sensitivity of ICA test systems.

Diagnosis of Adenovirus and Rotavirus Infections

Diagnosis of HAdV and HRV infections relies on standard virological, molecular, and immunological methods. Virological methods include virus isolation and culture, electron microscopy, and serological tests [8]. Molecular methods primarily involve various types of PCR screening [9]. Immunological approaches based on antigen-antibody interactions include immunofluorescence assay (IFA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and ICA [10–12].

In an evaluation of ICA for the rapid detection of adenoviral conjunctivitis, the sensitivity of the control and test kits was 89.8% and 98.3%, respectively, while the specificity of both kits was 100%. A significant difference was observed in the sensitivity of the two ELISA kits for samples that tested positive by PCR. The sensitivity of the test kit was 32–64 times higher than that of the control kit for both adenovirus types. These findings suggest that the new enhanced kit for detecting adenovirus in tears, including conjunctival exudates, is advantageous because it reduces patient discomfort during specimen collection and offers substantially higher sensitivity compared with the conventional ICA kit [13,14].

The HAdV ICA kit was evaluated using 138 nasopharyngeal specimens collected from patients at a clinic in Japan between January and June 2003. Patients had clinical manifestations of pharyngoconjunctival fever (n = 38) or exuda-

УДК 577.215.3

Original Article

ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ РНК ЗАВИСИМОЙ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ

Мусахметов А.^{1,2}, Акишев Ж.^{1,2}, Хасенов Б.^{1,2}¹ТОО «Национальный центр биотехнологии», Коргалжынский шоссе, 13/5, Казахстан, Астана, 010000.²ТОО «GenLab», ул. М.Габдуллина, 19/1. Казахстан, Астана, 010000.

*khasenov@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Обратная транскриптаза вируса иммунодефицита человека является РНК зависимой ДНК-полимеразой, позволяющая получить комплементарную ДНК на РНК матрице. Исходная аминокислотная последовательность обратной транскриптазы была модифицирована путем внесения 18 замен и кодоноптоптимизирована для экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Методом *безрестрикционного клонирования* получен плазмидный вектор, в котором ген модифицированной обратной транскриптазы ВИЧ встроен под контроль индуцируемого промотора. Трансформацией данным вектором компетентных клеток *E. coli* получен штамм, продуцирующий рекомбинантную модифицированную обратную транскриптазу ВИЧ с молекулярной массой 62,5 кДа. Рекомбинантный фермент был хроматографически очищен двухступенчатой элюцией на ионах Ni^{2+} и гепарине, выход составил 420 мг с 1 литра индуцированной культуры. РНК зависимая ДНК-полимеразная активность очищенного фермента подтверждена на образцах РНК, выделенных из *Secale cereale* и крови человека путем амплификации фрагментов генов 18S рРНК и актина Б, соответственно. Рекомбинантная модифицированная обратная транскриптаза демонстрирует полимеразную активность в диапазоне температур 50-70°C, что свидетельствует о её термостабильности. Биохимические показатели показывают перспективность применения фермента в качестве ревертазы в научных исследованиях и диагностической практике.

Ключевые слова: РНК, ДНК, РНК зависимая ДНК-полимераза, ВИЧ, *E.coli*, хроматография.

ВВЕДЕНИЕ

Обратная транскриптаза (ЕС 2.7.7.49) является РНК зависимой ДНК-полимеразой, без которой не происходит процесс обратной транскрипции – образование комплементарной ДНК (кДНК) на РНК матрице. Обратные транскриптазы (ОТ), их еще называют ревертазы, были открыты в 1970-ом году [1]. В 1975 году Д. Балтимор и Х. Темин за открытие обратной транскриптазы были награждены Нобелевской премией. Первоначально считалось, что обратная транскрипция имеется только у ретровирусов [2], однако позже установили, что данный механизм присутствует в эукариотических (человека, животных, растений) [3] и прокариотических клетках [4-10]. У эукариот обратная транскрипция встречается в контексте ретротранспозонов – мобильных генетических элементов, способных самостоятельно транспортироваться из одного участка генома в другой. В клетках человека обратную транскрипцию осуществляет еще и теломераза, достраивая теломерные участки на хромосомах [3].

Наиболее изученной является ревертаза ретровируса птиц, вызывающего миелобластоз (avian myeloblastosis virus, AMV) [11]. Ревертаза выполняет синтез молекулы ДНК на РНК матрице и расщепляет молекулу РНК в комплексе РНК-ДНК. Фермент ОТ имеет первостепенное значение в жизненном цикле многих вирусов, в первую очередь ретровирусов, таких как вирус иммунодефицита человека (human immunodeficiency virus, HIV) [2], так как с помощью механизма обратной транскрипции происходит встраивание РНК вириона в геном пораженной клетки и появление большого количества его копий внутри нее.

В научных исследованиях ОТ используют для чтения последовательности белков эукариотических организмов. Полученную с помощью ОТ кДНК используют в полиме-

разной цепной реакции, чтобы искусственно увеличить число копий полученной кДНК. Данный метод используется также и в диагностических целях – для идентификации РНК вирусов.

Известными ОТ являются ревертазы полученные из вирусов, вызывающих лейкемию мышей (murine leukemia viruses, M-MuLV) [12, 13] кошек [14], вызывающих лейкоз крупного рогатого скота (bovine leukemia virus, BLV) [15, 16], миелобластоз птиц AMV [11], обезьяньего пенистого вируса [17], вируса иммунодефицита человека HIV 1 и 2 типов [18-20].

Целью работы являлось получить рекомбинантную обратную транскриптазу в клетках *Escherichia coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Векторы, штаммы, ферменты, реактивы

В работе использовали плазмиду рЕТ-28с(+) (Novagen, США). Ген модифицированной обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека был синтезирован в компании Macrogen (Южная Корея). Для клонирования и получения рекомбинантного белка использовали штаммы *Escherichia coli* DH5α (Promega, США) и BL21(DE3) (Novagen, США), соответственно. Использовались высокоточная полимеразы Phusion и эндонуклеаза DpnI производства (Thermo Fisher, США). Химические реактивы, использованные в этом исследовании, были производства Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США) и AppliChem (Дармштадт, Германия). Векторы и фермент хранились при -20°C, штаммы хранились при -80°C, а реактивы хранились в соответствии с рекомендациями производителя. Для культивирования штаммов использовали среда Миллера (0,5% дрожжевого экстракта, 1% триптона, 0,5% NaCl, pH 7.5) и SOC (2 % триптона, 0,5

137

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ PATENT

№ 37416

ӨНЕРТАБЫСҚА / НА ИЗОБРЕТЕНИЕ / FOR INVENTION



(21) 2025/0184.1

(22) 28.02.2025

(45) 04.07.2025

- (54) Адамның иммун тапшылығы вирусынан модификацияланған ревертазасы негізіндегі термотұрақты кері транскриптазаны алу тәсілі
Способ получения термостабильной обратной транскриптазы на основе модифицированной ревертазы из вируса иммунодефицита человека
Method for production of thermostable reverse transcriptase based on modified revertase from human immunodeficiency virus
- (73) «Национальный центр биотехнологии» жауапкершілігі шектеулі серіктестігі (KZ)
Товарищество с ограниченной ответственностью «Национальный центр биотехнологии» (KZ)
«National center of biotechnology» Limited Liability Partnership (KZ)
- (72) Акишев Жигер Дастанович (KZ) Akishev Zhiger Dastanovich (KZ)
Мусахметов Арман Сартамбаевич (KZ) Mussakhmetov Arman Sartambayevich (KZ)
Хасенов Бекболат Бауржанович (KZ) Khasenov Bekbolat Baurzhanovich (KZ)



ЭШК қол қойылды
Подписано ЭШП
Signed with EDS

С. Ахметов
С. Ахметов
S. Akhmetov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РПП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ PATENT

№ 10829

ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL



(21) 2025/0722.2

(22) 14.05.2025

(45) 04.07.2025

- (54) Полимеразды тізбекті реакцияға негізделген KRAS G12/G13, BRAF V600E гендік мутацияларын анықтауға арналған праймерлер жинағы
Набор из праймеров для идентификации мутаций генов KRAS G12/G13, BRAF V600E на основе полимеразной цепной реакции
Set of primers for identification of KRAS G12/G13, BRAF V600E gene mutations by polymerase chain reaction
- (73) «Национальный центр биотехнологии» жауапкершілігі шектеулі серіктестігі (KZ)
Товарищество с ограниченной ответственностью «Национальный центр биотехнологии» (KZ)
«National center of biotechnology» Limited Liability Partnership (KZ)
- (72) Кулмамбетова Гульмира Нигметжановна (KZ) Kulmambetova Gulmira Nigmatzhanovna (KZ)
Курентай Ботакөз Амандосқызы (KZ) Kurentay Botakoz Amandoskyzy (KZ)
Баянбек Дина Сериковна (KZ) Bayanbek Dina Serikovna (KZ)



ЭЦҚ қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed with EDS

С. Ахметов
С. Ахметов
S. Akhmetov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ PATENT

№ 11179

ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL



(21) 2025/0631.2

(22) 24.04.2025

(45) 19.09.2025

- (54) Альпорт синдромын диагностикалауға арналған олигонуклеотидті праймерлер жиынтығы
Набор олигонуклеотидных праймеров для диагностики синдрома Альпорта
Oligonucleotide primer set for the diagnosis of Alport syndrome
- (73) «Ұлттық биотехнология орталығы» жауапкершілігі шектеулі серіктестігі (KZ)
Товарищество с ограниченной ответственностью «Национальный центр биотехнологии» (KZ)
«National center of biotechnology» Limited Liability Partnership (KZ)
- (72) Жолдыбаева Елена Витальевна (KZ) Zholdybayeva Yelena Vitalyevna (KZ)
Календарь Руслан Николаевич (KZ) Kalendar Ruslan Nikolayevich (KZ)
Жамшитова Диана Азаматовна (KZ) Zhamshitova Diana Azamatovna (KZ)
Бекбаева Аяжан (KZ) Bekbaeva Ayazhan (KZ)
Төлеужанова Айғаным Бауыржанқызы (KZ) Toleuzhanova Aiganym Bauyrzhankyzy (KZ)



ЭЦҚ қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed with EDS

С. Ахметов
С. АХМЕТОВ
S. Akhmetov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Отчет о патентных исследованиях

Отчет о патентных исследованиях



УТВЕРЖДАЮ

Руководитель НТП BR24992881,

Тарлыков П.В.

«17» октября 2025 г.

ОТЧЕТ

о патентных исследованиях для выполнения задачи «Разработка отечественной тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для выявления и дифференциации возбудителей Лайм-боррелиоза (*Borrelia burgdorferi sensu lato*) и клещевой возвратной лихорадки, вызываемой *Borrelia miyamotoi*» по программе «РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНЫХ, ГЕНОМНЫХ И ПРОТЕОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН», в соответствии с Патентным Законом Республики Казахстан и СТ РК ГОСТ Р 15.011-2005 «Система разработки и постановки продукции на производство. Патентные исследования. Содержание и порядок проведения», а также с Межгосударственным стандартом "Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу" ГОСТ 7.32-2017.

Этап работы: промежуточный (2025 год)

Начало поиска 17.09.2025

Окончание поиска 17.10.2025

Исполнитель: Низкородова А.С.

Регламент поиска выполнен без отступлений.

Таблица Б.1 – Патентная документация

Предмет поиска (объект исследования, его составные части)	Страна выдачи, вид и номер охранного документа. Клас- сификационный индекс	Заявитель (патентообладатель), страна. Номер заявки, дата приоритета, конвенционный приоритет, дата публикации	Название изобретения (полной модели, образца)	Сведения о дейст- вии охранного документа или причина его анну- лирования (для анализа патентной чистоты)
1	2	3	4	5
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. and/or <i>Borrelia miyamotoi</i> detection / детекция <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. и/или <i>Borrelia miyamotoi</i>	US6087097A C12Q1/689; C07K14/20	David H. Persing // Mayo Foundation for Medical Education and Research Appl. No.: US08/642,807 1996-05-03	PCR detection of <i>Borrelia burgdorferi</i>	
	WO2018083491A1 WIPO (PCT) C12Q1/689; C12Q1/6811; C12Q1/6888; G01N2333/20	Rebecca Jane Martha CLOKIE, Jinyu SHAN // University Of Leicester, Phelix Research And Development Limited Appl. No.: PCT/GB2017/053323 2017-11-03	Phage-based detection of borreliosis and means therefor	
	US11326213B2 (United States) C12Q1/689; C12N15/1013	Thomann U.H., Neely L.A., Dhanda R.K., Sweeney F., Lowery JR T.J., Townsend J.A., Snyder J.L., Giese H.S., Bandoski-Gralinski C.A., Logan D.L. // T2 Biosystems, Inc. Appl. No.: US15/545,663 2015/01/21	NMR methods and systems for the rapid detection of tick- borne pathogens	
	RU2629604C1 (Россия) C12Q1/6844; C12Q1/686; C12Q1/6881; C12Q2561/113; C12Q2600/16	А.О. Семенцова, В.А. Терновой, Е.В. Чуб, М.Ю. Карташов, В.Б. Локтев // ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Appl. No.: RU2016125498A 2016-06-24	Набор олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации вируса клещевого энцефалита, вируса лихорадки Западного Нила, боррелий и риккетсий методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени	

1				5
	RU2763595C1 C12Q1/68	Ю.Ю. Комаровский, А.С. Горбенко, И.А. Ольховский, М.А. Столяр, Д.И. Васильева Appl. No.: RU2021120350A 2021-07-10	Набор реагентов для обнаружения возбудителей клещевых боррелиозов	
	RU2289627C2 Y02A50/30	Иванчук И.И. // Сибирский государственный медицинский университет ГОУ ВПО СибГМУ Appl. No.: RU2004105688 2004-02-25	Способ и набор для обнаружения ДНК бактерии заболевания лаймского боррелиоза - <i>Borrelia burgdorferi</i>	
	CA 2209991 C07H 21/00 C12P 19/34	Hogan, J.J., Yang, Y., Carter, N. // GEN- PROBE INCORPORATED Appl. No.: 08/374,863 1995-01-19	NUCLEIC ACID AMPLIFICATION OLIGONUCLEOTIDES AND PROBES TO LYME DISEASE ASSOCIATED BORRELIA	
	CA 3039102 C12Q 1/68	Auvray P., Dessauge E., Fritz D. // D.F. CONSEILS (France) Appl. No.: 1659525 2016-10-03	Method and kit for detecting, discriminating and identifying <i>Borrelia</i> species present in a sample of human or animal origin	
	CA 2960776 C12Q 1/68 C12Q 1/02 C12Q 1/04	Parveen N.T, Marras S.A.E. // RUTGERS, The State university of New Jersey (United States of America) Appl. No.: 61/877,479 2013-09-13	Multiplex diagnostic assay for Lyme disease and other tick- borne diseases	
	US20100278866 C12Q 1/68 G01N 33/53 G01N 33/68 G01N 33/50	Alan G. Barbour, Philip L. Felgner // The Regents of the University of California (Oakland, CA) Appl. No.: 12/676,794 Sep 8, 2008	<i>Borrelia</i> diagnostics and screening methods	

1	2	3	4	5
	US20030108875 C12Q001/68 C07H021/04	M. Exner, H. Hamdan, M.I Lewinski Appl. No.: 10011340 Dec 4, 2001	Oligonucleotides and methods for detecting <i>Borrelia burgdorferi</i>	
	US20070172829 C12Q 1/68 C12P 19/34 C07H 21/04	M. Exner, H. Hamdan, M.I Lewinski Appl. No.: 10/764,186 Jan 23, 2004	Oligonucleotides and methods for detecting <i>Borrelia burgdorferi</i>	
	US6074826 C12Q 168 C12P 1934 C07H 2104	Hogan, J.J., Yang, Y., Carter, N. // GEN- PROBE INCORPORATED Appl. No.: 8/953,094 Oct 17, 1997	Nucleic acid amplification oligonucleotides and probes to Lyme disease associated <i>Borrelia</i>	

Таблица Б.2 – Научно-техническая, конъюнктурная, нормативная документация и материалы государственной регистрации (отчеты о научно-исследовательских работах)

Предмет поиска	Наименование источника информации с указанием страницы источника	Автор, фирма (держатель технической информации)	Год. Место и орган издания (учреждения. Депонирования источника)
1	2	3	4
Боррелиоз и/или <i>Borrelia spp.</i>	Особенности распространения трансмиссивных природно-очаговых заболеваний в Казахстане Руководитель проекта: Егембердиева Р.А. Исполнитель проекта: Шапиева Ж.Ж.	Казахский национальный медицинский университет им. С.Д.Асфендиярова	Инвентарный номер: 0212PK02363 Регистрационный номер: 0112PK01622
	Молекулярная эпидемиология вирусов Крым-Конго геморрагической лихорадки, лихорадки Западного Нила, клещевого энцефалита и возбудителей клещевого боррелиоза Руководитель проекта: Атшабар Б.Б. Исполнитель проекта: Сансызбаев Е.Б.	Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М.Айкимбаева	Инвентарный номер: 0215PK00968 Регистрационный номер: 0115PK02229

1	2	3	4
	Идентификация и молекулярно-генетическая характеристика штаммов <i>Borrelia sp.</i> , распространенных в различных регионах Казахстана, для усовершенствования системы эпидемиологического надзора за клещевым боррелиозом Руководитель проекта: Скиба Ю.А.	РГП на ПХВ "Национальный центр биотехнологии"	Инвентарный номер: 0218PK00569 Регистрационный номер: 0118PK00927
	Клинико-лабораторная диагностика клещевых инфекций	Разработчики: Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Государственное учреждение образования «Минский государственный медицинский университет», Учреждение здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска	Утверждены первым заместителем Министра Здравоохранения Д.Л. Пиневич 27.12.2013 г. Регистрационный № 192- 1113
	Об утверждении Санитарных правил "Санитарно- эпидемиологические требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий по предупреждению паразитарных заболеваний"	Утверждены Приказом Министра здравоохранения Республики Казахстан от 16 мая 2022 года № ҚР ДСМ-44.	Зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 17 мая 2022 года № 28086
	Об утверждении форм учетной и отчетной документации в сфере санитарно- эпидемиологического благополучия населения	Утверждены Приказом Министра здравоохранения Республики Казахстан от 20 августа 2021 года № ҚР ДСМ-84.	Зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 24 августа 2021 года № 24082

1	2	3	4
	Клинические рекомендации. Болезнь Лайма	Разработчики: Андропова Н.В. к.м.н. ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ПО ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ; Малинникова Е.Ю. д.м.н., доцент, заведующая кафедрой вирусологии ФГБОУ «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» МЗ РФ; Позднякова Л.Л. к.м.н., главный врач ГБУЗ Новосибирской области «Городская инфекционная клиническая больница №1»; Тихонова Е.П. д.м.н., профессор Зав. кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии ПО ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ; Филина Е.И. к.м.н. заведующая отделением №5 ГБУЗ НСО «Городская инфекционная клиническая больница №1»	Некоммерческое партнерство «Национальное научное общество инфекционистов» (ННОИ)
	Методические рекомендации по эпидемиологии, клинике, диагностике, лечению и профилактике иксодового клещевого боррелиоза	Составители: Шапиева Ж.Ж., Егембердиева Р.А., Дмитровский А.М., Умешова Л.А. Рецензенты: Тыныбеков А.С., Доскожаева С.Т.	Утверждены Приказом Председателя Главного государственного санитарного врача Республики Казахстан от 12 ноября 2010 года № 313

1	2	3	4
	Инструкция по применению набора реагентов «РеалБест ДНК <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l./PHK ВКЭ»	АО «Вектор Бест»	РУ № РЗН 2013/1180 РФ, 630559, Новосибирская область, р. п. Колыцово, Научно-производственная зона, корпус 36
	Инструкция по применению набора реагентов «РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> »	АО «Вектор Бест»	РУ № РЗН 2014/1405 РФ, 630559, Новосибирская область, р. п. Колыцово, Научно-производственная зона, корпус 36
	Инструкция по применению набора реагентов «АмплиСенс <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL»	ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии	от 05.03.18 111123, Россия, г. Москва, ул. Новогиревская, дом 3А
	Инструкция по применению набора реагентов «АмплиСенс TBEV, <i>B. burgdorferi</i> s.l., <i>Aphagocytophilum</i> , <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i> -FL»	ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии	от 22.02.23 111123, Россия, г. Москва, ул. Новогиревская, дом 3А
	Инструкция по применению набора реагентов для выявления ДНК боррелии бургдорфери (<i>Borrelia burgdorferi</i>) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) «Боррелио Ген»	ООО "ДНК Технология"	160-6 от 12 ноября 2018 117587, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное, Варшавское шоссе, дом 125Ж, корпус 5
	Инструкция по применению набора реагентов «РеалБест ДНК <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.»	АО «Вектор Бест»	РУ № РЗН 2017/6037 РФ, 630559, Новосибирская область, р. п. Колыцово, Научно-производственная зона, корпус 36

1	2	3	4
	Manual for "GeneProof™ <i>Borrelia</i> PCR Kit"	GeneProof a.s.	Version: DOK_140_17_03 Valid from: 04.09.2017 Videňská 101/119 Dolní Heršpice CZ - 619 00 Brno
	Manual for "AccuPower® <i>Borrelia burgdorferi</i> Real-Time PCR Kit"	BIONEER CORPORATION	BQ-042-101-03, Revision 7 (2021-04-12) Bioneer Global Center, 71, Techno 2-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34013, Republic of Korea
	Manual for " <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato qPCR Kit"	NZYtech Lda.	MD0739_IFU_en_V2402 Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar, 1649- 038 Lisboa, Portugal
	Manual for " <i>Borrelia</i> qPCR Detection Kit"	EURx Ltd.	E0450 80-297 Gdańsk Poland, ul. Przyrodników 3
	Manual for " <i>Borrelia Burgdorferi</i> Real Time PCR Kit"	BioServices AB	YJC60113NW Solkraftsvägen 33, 135 70 Stockholm
	Manual for "Real Time PCR Detection Kit <i>Borrelia burgdorferi</i> "	Biopremier	Produção e Desenvolvimento, Unipessoal Rua Henrique de Paiva Couceiro 10 2700-453 Amadora Portugal
	Manual for "BactoReal® <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato"	ingenetix GmbH	IFU Version 2.0 2024-03-31 Haidingerasse 1, 1030 Wien, Austria

ЗАКЛЮЧЕНИЕ о выполнении патентных исследований

Проведен патентно-информационный поиск на глубину 28 лет. Патентно-информационный поиск проводился по электронным базам данных, информационно-справочным системам: USPTO Patent Full-Text and Image Database (Патентное ведомство США), Deutsches Patent- und Markenamt (Патентное ведомство ФРГ), European Patent Office (Европейское Патентное ведомство), Евразийская патентная информационная система EAPATIS и др.

В результате проведенного поиска в странах Евразийского союза, Евросоюза, Великобритании, Японии, США по классам МКП: C12Q1/68, G01N2333/20, C07K14/20, C12N15/1013, C12Q2561/113, C12Q2600/16, Y02A50/30, выявлены патенты, имеющие общую направленность с тематикой работы, проводимой в рамках данного проекта. В мировой практике имеются патенты по использованию для детекции *Borrelia burgdorferi* s.l. и *Borrelia miyamotoi* методом ПЦР и ПЦР-в-реальном времени следующих генов-мишеней: *16S rRNA*, *OspA*, *OspB*, *flaA*. Пересечения с предлагаемыми нами для детекции участками генов-мишеней не прослеживается.

Просмотр конъюнктуры и нормативной документации по диагностическим системам на возбудителей болезни Лайма и возвратных лихорадок позволяет сделать заключение о том, что предпринимаемые нами НИР являются не только актуальными и перспективными, но и конкурентоспособными. Большая часть тест-систем базируется на определении только одного из патогенов – либо *Borrelia burgdorferi* s.l., либо *Borrelia miyamotoi*. Диагностическая система "BactoReal® *Borrelia burgdorferi* sensu lato" предлагает определение гена *ospA* *Borrelia burgdorferi*; «АмплиСенс *Borrelia miyamotoi*-FL» – гена *gfpQ*; «Боррелио Ген» и «АмплиСенс TBEV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* / *E. muris*-FL» - гена *16S rRNA*. Для тест-наборов фирмы «Вектор Бест» не указываются гены-мишени, но они также выполнены в виде синглексов, т.е. либо *B. burgdorferi*, либо *Borrelia miyamotoi*. Кит "GeneProof™ *Borrelia* PCR Kit" предлагает дуоплекс (один ген внутреннего контроля) для определения 15 видов *B. burgdorferi* sl. Также "*Borrelia* qPCR Detection Kit" (EURx Ltd) предлагает дуоплекс с внутренним контролем и, судя по размеру целевого фрагмента (153 н.) это, скорее всего, *16S rRNA*. Наборы португальских компаний «Biopremier» и «NZYtech Lda» также не указывают целевые гены, но оба набора определяют *B. burgdorferi* sl. в синглексе. Таким образом, аналогов запланированному нами исследованию в патентных базах данных и на открытом международном рынке не обнаружено.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Распределение картированных ридов по парам праймеров

Таблица Д.1 – Распределение картированных ридов по парам праймеров в зависимости от условий амплификации (5–20 нг ДНК; 22 и 27 циклов)

Праймеры	Количество полученных ридов											
	27 циклов амплификации			22 цикла амплификации								
	Контроль-1, 20 нг/мкл	Контроль-2, 20 нг/мкл	Контроль-3, 20 нг/мкл	Контроль-1, 5 нг/мкл	Контроль 2, 5 нг/мкл	Контроль 3, 5 нг/мкл	Контроль-1, 10 нг/мкл	Контроль-2, 10 нг/мкл	Контроль-3, 10 нг/мкл	Контроль-1, 20 нг/мкл	Контроль-2, 20 нг/мкл	Контроль-3, 20 нг/мкл
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Смесь праймеров (пул) №1												
Пара 1	1522	899	762	7042	4370	4940	3932	4668	5261	5731	3857	2664
Пара 2	2782	1869	1695	11331	7058	8573	5295	7376	8117	7202	5527	4062
Пара 3	2642	1948	1211	10497	5702	7048	4451	6266	7088	6511	5719	2743
Пара 4	8004	9207	8821	23012	21150	26330	18195	21882	23456	16835	18863	8527
Пара 5	13962	10323	8644	22586	14415	15742	13743	17363	18832	23861	20263	11318
Пара 6	4451	3389	2943	10936	6296	7074	6212	7165	8803	9968	8289	4765
Пара 7	7305	5748	4111	14684	8248	8879	9289	10820	11463	14886	13130	6426
Пара 8	8083	6648	5286	12666	7808	8387	8430	9678	12159	12805	12254	5724

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Пара 9	7331	6159	6031	9805	6494	7071	7442	9423	11324,5	12747	10026	5507
Пара 10	22074	19580	18011	19949	20475	21546	16077	22942	25740	27674	26408	14533
Пара 11	4057	1996	1080	7855	8321	7809	4743	6846	7300	10122	5608	4892
Пара 12	5347	4151	3546	10155	6244	7221	5946	7532	9846	9367	8527	5205
Пара 13	23521	24096	23922	36398	27415	36022	29824	37073	34094	32829	31771	22275
Итого	111081	96013	86063	196916	143996	166642	133579	169034	183484	190538	170242	98641
	Смесь праймеров (пул) №2											
Пара 1	118	146	68	3064	3205	5327	1791	2547	2405	1043	905	875
Пара 2	6227	6713	4903	20906	17959	20778	14351	16999	19367	12527	13364	6413
Пара 3	8003	9207	8821	23010	21149	26329	18194	21880	23455	16835	18862	8526
Пара 4	7956	10832	7723,5	25508	21054	25129	20454,5	25677	24300	14434	17973	7499
Пара 5	2375	6064,5	4367	5695	14011	17393	4823	14611	15761	2893	9183	3612
Пара 6	4400	5854	5860	13816	14336	16861	11710	14544	15190	6655	9381	6905
Пара 7	5254	6890	4311	11916	13167	16052	14071	13308	13338	8289	9864	3772
Пара 8	6127	7689	6576	13829	15040	16955	16459	16321	17231	8998	10842	7039
Пара 9	6055	8741	6609	23651	24458,5	27111,5	20751	26893	28251	12856	16737	7654
Пара 10	11548	15132	13198	21563	21173	29559	21387	24098	25487	18514	21086	9183
Пара 11	3335	4625	3759	10922	12108	15770	10581	12667	12542	6218	7913	2813
Пара 12	23519	24094	23921	36397	27415	36022	29820	37071	34094	32826	31769	22264

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Пара 13	6780	8820	5587	20366	20019	22539	17926	20651	21480	9974	15068	6112
Итого	91698	114807	95703	230643	225095	275826	202319	247268	252901	152062	182947	92667

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Нуклеотидная последовательность фрагментов генов резистентности

Амплификация гена OXA-23:

AGATGGATTGGAGAACCAGAAAACGGATATTAATGAAATATTTAAATGGAAGGGCG
AGAAAAGGTCATTTACCGCTTGGGAAAAAGACATGACACTAGGAGAAGCCA
TGAAGCTTTCTGCAGTCCCAGTCTATCAGGAACTTGC GCGACGTATCGGTCTTGATC
TCATGCAAAAAGAAGTAAAACGTATTGGTTTCGGTAATGCTGAAATTGGACAGCAG
GTTGATAATTTCTGGTTGGTAGGACCATTAAGGTTACGCCTATTCAAGAGGTAGAG
TTTGTTCCTCAATTAGCACATACACAGCTTCCATTTAGTGAAAAAGTGCAGGCTAAT
GTAAAAAATATGCTTCTTTTAGAAGAGAGTAATGGCTACAAAATTTTTGGAAAGACT
GGTTGGGCAATGGATATAAAACCACAAGTGGGCTGGTTGACCGGCTGGGTTGAGCA
GCCAGATGGAAAAATTGTCGCTTTTGCATTAAATATGGAAATGCGGTCAGAAAT

Амплификация гена OXA-40:

GATTAGTTGGCCCCCTTAAAATTACACCAGTACAAGAAGTTAATTTTGCCGATGACC
TTGCACATAACCGATTACCTTTTAAATTAGAACTCAAGAAGAAGTTAAAAA
AATGCTTCTAATTAAAGAAGTAAATGGTAGTAAGATTTATGCAAAAAGTGGATGGG
GAATGGATGTTACTCCACAGGTAGGTTGGTTGACTGGTTGGGTGGAGCAAGCTAAT
GGAAAAAAAATCCCCTTTTCGCTTCAAA

Амплификация гена OXA-51:

TAATGCTTTGATCGGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAAGTATTTAAGTG
GGATGGTAAAAAAAGGTTATTCCCAGAATGGGAAAAGGACATGACCCTAGG
CGATGCCATGAAAGCTTCCGCTATTCCAGTTTATCAAGATTTAGCTCGTCGTATTGG
ACTTGAGCTCATGTCTAAGGAAGTGAAGCGTGTTGGTTATGGCAATGCAGATATCGG
TACCCAAGTCGATAATTTTTGGCTGGTGGGTCCTTTAAAAATTACTCCTCAGCAAGA
GGCACAGTTTGCTTACAAGCTAGCTAATAAAACGCTTCCATTTAGCCAAAAAGTCCA
AGATGAAGTGCAATCCA

Амплификация гена TEM:

AAACGCTGGTGAAAGTAAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTA
CATCGAACTGGATCTCAACAGCGGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGA
AGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATC
CCGTGTAGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATG
ACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTA
AGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCTGCCAACTTACTT
CTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGA
TCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACG

ACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTA
ACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGC
GGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGC
TGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGAGG
CCAGATGGTAAGTCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAAC
TATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT

Амплификация гена SPM:

ACATTATCCGCTGGAACAGGTCTGAAGTGAAGTTGTTTCATGCAGCCACTCATGAACT
GATAGCGACTGCAATTACCAACCAAGATGGGCGAGTGAGTGATTTTGGAATAAAAA
ACTTAGGTAAAGGTGCTTATCAACTTGAATTTGAAGTTGCCCCTTATTTTTCATCACA
GCAAATCAAAACSTTTTTTCCCGTGTTTGTATTCAATTTTTCATAGAAGACACCACT
CAGCATTACCACATTCCATTACTGATCAGCCCGTTTGCGTACCCAGATTTT

Амплификация гена VIM:

CGAATGCGCAGCACCAGTTAGGCTAAAGAAATGAGTCCAAGTCTAACTTTAAAACT
TCATGATTTTTTTCAACATTTTAGCGGGGATTTAATTTATCATCATGAAGAGCAAATA
TTATGTTATCTCGGTGAGCAAGATCTTTTTCAAACCATCAGTAAACGTAGTGAAATT
CATGATATTCCCGCATTACGTGGTCACTTACGTACCATGACTATGCCGCAATATGAA
AAATTTTCAGCAATTCATGCTTAATTTAATTAAATAAATCTCTCGTACTGCTGAACTG
GCAACTTATTAATAAAAAATAAGAAGTTAGAGGGCATAATGAGGGAATAACAATAAG
AGGAGTAAAAATGACAGGTTTATTCATTTTCTTGGGGATTTTCGTTGTACTGATTGCT
TGGGGCATCCACATTCGCAATAACATTGTGCGTTATTTCAATGCGACCAAACACCAT
C

Амплификация гена aacA4:

ATGACTGAGCATGACCTTGCGATGCTCTATGAGTGGCTAAATCGATCTCATATCGTC
GAGTGGTGGGGCGGAGAAGAAGCACGCCCCGACACTTGCTGACGTACAGGAACAGT
ACTTGCCAAGCGTTTTAGCGCAAGAGTCCGTCACTCCATACATTGCAATGCTGAATG
GAGAGCCGATTGGGTATGCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGG
TGGAAGAAGAAACCGATCCAGGAGTACGCGGAATAGACCAGTTACTGGCGAATGC
ATCACAACCTGGGCAAAGGCTTGGAACCAAGCTGGTTCGAGCTCTGGTTGAGTTGCT
GTTCAATGATCCCGAGGTCACCAAGATCCAAACGGACCCGTCGCCGAGCAACTTGC
GAGCGATCCGATGCTACGAGAAAGCGGGGTTTGAGAGGCAAGGTACCGTAACCACC
CCATATGGTCCAGCCGTGTACATGGTTCAAACACGCCAGGCATTCGAGCGAACACG
CAGTGATGCCTAA

Амплификация гена aacC1:

TTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAA
CTTTGTATAGAGAGCCACTGCGGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGACGTAAGATCAC
ATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAA
TGCCTTGCCTCCGGTGCTCGCCGGAGACTGCGAGATCATAGATATAGATCTCACTAC
GCGCCTGCTCAAACCTTTGGCAGAACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCT
TGGTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGTCTTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTA
ATCGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAACCTCACGACCGA
AAAGATCAAGAGCAGCCCTCATGGATTTGACTTGGTCAGGGCCGAGCCTACATGTG
CGAATGATGCCCAT

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж
Схема плазмиды pET-GlpQ

