Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ БИОМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ В.Н. ОРЕХОВИЧА» (ИБМХ)

№ госрегистрации 121100400105-5

УТВЕРЖДАЮ Директор ИБМХ Е.А. Пономаренко entapa 2022 г. ОТЧЕТ

о выполненных работах по реализации проекта

Детекция единичных биомакромолекул как основа предиктивной диагностики и диагностики социально-значимых заболеваний человека на ранней стадии (УНУ «Авогадро», рег. номер 1405855)

(промежуточный)

Этап 1

Федеральный проект

«Развитие масштабных научных и научно-технологических проектов по приоритетным исследовательским направлениям национального проекта «Наука и университеты»

Соглашение о предоставлении из федерального бюджета гранта в форме субсидии от 28 сентября 2021 г. № 075-15-2021-933 (внутренний номер №13.МНПМУ.21.0001)

Руководитель исследовательской программы (проекта), научный руководитель ИБМХ, академик РАН А.И. Арчаков « 24» enbapg 2022 г.

Москва 2022

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель проекта

Научный руководитель ИБМХ, главный научный сотрудник, д-р биол. наук, академик РАН Исполнители темы Главный научный сотрудник, д-р биол. наук, академик РАН

Заместитель директора по научной работе, главный научный сотрудник, д-р биол. наук

Главный научный сотрудник, д-р биол. наук

Заместитель директора по научно-организационной работе, канд. биол. наук

Заведующий лабораторией, д-р биол. наук

Главный научный сотрудник, д-р биол. наук

Главный научный сотрудник, д-р биол. наук

Главный научный сотрудник, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН

Ведущий научный сотрудник, канд. биол. наук

Ведущий научный сотрудник, канд. хим. наук

Ведущий научный сотрудник, канд. биол. наук

Старший научный сотрудник,

Арт подпись, дата

подпись, дата

<u>иа</u>подпись, дата

подпись, дата



подпись, дата

подпись, дата

подпись, дата

подпись, дата

подпись, дата

иодпись, дата

The

подпись, дата

Атерись, дата



иодпись, дата

подпись, дата

подпись, дата

А.И. Арчаков (разделы 1-17)

А.В. Лисица (разделы 16, 17)

Т.О. Плешакова / (разделы 1-1.8, 11, 14)

Е.А. Пономаренко (разделы 9-10)

Ю.А. Ромашова (разделы 12, 13, 15)

В.Г. Згода (разделы 4, 10)

Ю.Д. Иванов (разделы 1-8)

П.Г. Лохов (раздел 11)

К.Н. Ярыгин (разделы 1-2)

С.П. Радько (раздел 9)

Е.Г. Тихонова (разделы 12, 13, 15)

А.Ю. Лупатов (разделы 1-2,9)

Е.В. Ильгисонис (разделы 16-17)

А.Л. Кайшева (разделы 1-2)

О.В. Тихонова (раздел 10) канд. биол. наук

Старший научный сотрудник, канд. биол. наук

Научный сотрудник

Научный сотрудник

Научный сотрудник

Младший научный сотрудник

Лаборант

Лаборант

Ведущий инженер

Ведущий инженер

Ведущий программист

Ведущий научный сотрудник, канд. биол. наук

подпись, дата



<u>МЗс</u> подпись, дата

подпись, дата

иодпись дата

<u>Мар</u> подпись, дата

подпись, дата

<u>бри</u> подпись, дата

подиись, дата

подпись, дата

подпись, дата

нодпись, дата

подпись, дата

подпись, дата

<u>МА</u> подпись, дата

подпись, дата

Подпись, дата

О.П. Трифонова (раздел 11)

И.В. Холоденко (разделы 1-2)

М.Г. Завьялова (раздел 4)

Л.В. Кострюкова (разделы 12, 13, 15)

К.А. Мальсагова (разделы 1-2)

А.А. Валуева (разделы 3-4)

К.В. Голдаева (раздел 6)

М.О. Ершова (разделы 5, 14)

И.А. Иванова (раздел 14)

А.И. Исаева (раздел 4)

Н.А. Орлова (разделы 12, 13, 15)

Д.И. Ларионов (разделы 16-17)

С.Н. Тарбеева (раздел 16-17)

С.Л. Канашенко (раздел 14)

А.Ф. Козлов (раздел 4, 8)

Р.А. Галиуллин (раздел 7, 8)

М.В. Михайлова (нормоконтроль)

СОДЕРЖАНИЕ

BB	ЕДЕНИЕ	5
1.	Разработка требований к количеству образцов и характеристикам доноров	11
2.	Разработка протокола сбора, хранения, транспортировки биологических образцов	для
фор	омирования коллекций K1 (условно-здоровых добровольцев) и K2 (пациентов с	
онк	сологическими заболеваниями на разных стадиях развития патологического процесс	ca)
		14
3.	Разработка лабораторного регламента и изготовление экспериментальных образцо	OB
чип	юв для атомно-силового микроскопа с функционализированной поверхностью	11
4.	Разработка методики детекции белков с использованием необратимого связывани	я на
пов	ерхности АСМ-чипа и последующим масс-спектрометрическим анализом в модель	ных
сис	темах	23
5.	Разработка ТЗ на специальное по для обработки данных, полученных с помощью	
MOJ	іекулярного детектора – АСМ	54
6.	Разработка методики анализа содержания нуклеиновых кислот использованием	
нан	опроводного биосенсора в модельных системах	80
7.	Разработка ТЗ на специальное по для обработки данных, полученных с помощью	
MOJ	иекулярного детектора – нанопроводного детектора	98
8.	Разработка тз на изготовление экспериментальных образцов чипов для	
нан	опроводного детектора, адаптированных для анализа биологических образцов	110
9.	Разработка схемы анализа транскриптома в биологических образцах с	
исп	ользованием нанопорового детектора	120
10.	Разработка методики панорамного молекулярного профилирования метаболомног	°O
coc	тава биологического образца с использованием масс-спектрометрического детектор	ba
		156
11.	Разработка протокола получения наноразмерных частиц для доставки лекарств	171
12.	Наработка наноразмерных частиц для доставки лекарств без загрузки активных	
ком	понентов	197
13.	Разработка методики АСМ-визуализации наноразмерных частиц для доставки	
лек	арств	
		198
14.	Разработка плана исследования по оценке безопасности и эффективности	
нан	юразмерных частиц для доставки лекарств	214
15.	Разработка СОП обработки первичных мультиомных данных	221

16. Разработка архитектуры и требований к интерфейсу базы данных для хранения и	
обработки результатов мультиомной оцифровки биологических образцов (далее - БД)	252
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	263
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	266
ПРИЛОЖЕНИЕ А	286
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	292
ПРИЛОЖЕНИЕ В	366
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	370
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	375

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ASCII – формат входящих данных при обработке данных АСМ-сканирования

BSA – белок бычий сывороточный альбумин

HRP – фермент пероксидаза хрена;

*I*_{ds} – ток, протекающий между стоком и истоком;

Illumina - метод секвенирования

NGS – Next-generation sequencing – группа методов определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для получения формального описания её первичной структуры

ONТ - метод секвенирования

QNM - Quantitative NanoMechanics

Ribo-seq – *Ribosome sequencing* – метод, основанный на массовом секвенировании фрагментов мРНК, взаимодействующих с рибосомами.

RNA-seq – RNA sequencing - метод определения первичной структуры молекул РНК, представляющий собой высокочувствительный и точный инструмент для изучения траскриптома

RNC-seq – *Ribosome nascent-chain complex-bound RNA sequencing* - метод, основанный на массовом секвенировании фрагментов транслируемых мРНК

SuccBB – фотокросслинкер N-сукцинимидиловый эфир 4-бензоилбензойной кислоты

 V_{ds} – напряжение между стоком и истоком нанопровдного детектора;

АПТЭС (APTES) – аминопропилтриэтоксисилан (англ. 3aminopropyltriethoxysilane, APTES), кремнийорганическое соединение для химической модификации поверхности нанопроволок;

АСМ – атомно-силовая микроскопия (метод) или атомно-силовой микроскоп (прибор)

БКГ – белок-кодирующий ген

ДРС - динамическое рассеяние света (метод)

ДТССП – 3,3'-дитио[сульфосукцинимидилпропионат] (англ. 3,3'-dithiobis (sulfosuccinimidylpropionate)), кросс-линкер для активации поверхности и последующей иммобилизации молекулярных зондов;

КФБ – калий-фосфатный буфер

мРНК – матричная (информационная) РНК, содержащая информацию о первичной структуре (аминокислотной последовательности) белков

МС-масс – спектормерический анализ

Нанопровод – сенсорный элемент (сенсор), расположенный на поверхности нанопроводного чипа и имеющий контактные сток-истоковые области на концах;

Нанопроводный биосенсор (НП-биосенсор) – измерительная система, позволяющая проводить детекцию белков в режиме реального времени;

Нанопроводный чип (НП-чип) – основной структурный элемент НПбиосенсора с интегрированной системой кремниевых нанопроволок;

оДНК – олигонуклеотидная ДНК;

ПО-программное обеспечение

Режим реального времени $(I_{ds}(t))$ – регистрация зависимости величины тока стока-истока (I_{ds}) от времени (t);

УФ – ультрафиолетовое излучение.

ЭМ – электронная микроскопия

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

введение

Целью проекта является поиск клинически значимых белковых маркеров на уровне биоанализа чувствительности И внедрение молекулярного новом профилирования с разрешением на уровне единичных биомолекул в систему оценки состояния здоровья человека. Предлагаемое методическое решение на основе ультрачувствительных молекулярных детекторов ориентировано на полную инвентаризацию протеомного, транскриптомного и метаболомного состава крови (мультиомный анализ) и выявление среди обнаруженных биомакромолекул и низкомолекулярных соединений совокупности клинически значимых биомаркеров, которые будут внедрены в систему малоинвазивной и предиктивной диагностики. Результаты выявлять отклонения позволят В молекулярном профиле, свидетельствующие о возможных нарушениях в организме, и интерпретировать эти отклонения в контексте анализа рисков возникновения патологических процессов на примере онкологических заболеваний.

Основные направления исследований по проекту, следующие: молекулярный анализ биологических образцов с помощью молекулярных детекторов, протеомное, транскриптомное и метаболомное профилирование образцов, биоинформатическая обработка и анализ данных.

По направлению молекулярного анализа биологических образцов с помощью молекулярных детекторов для обнаружения единичных молекул белков в проекте предлагается особый подход на основе комбинации методов анализа с применением молекулярных детекторов и методов фишинга биомакромолекул, позволяющих эффективно концентрировать белки на функционализированной поверхности. Этот подход может быть реализован только на базе УНУ «Авогадро», т.к. в состав УНУ входят молекулярные детекторы и только в ИБМХ разработаны оригинальные методики фишинга.

К молекулярным детекторам относятся – атомно-силовой микроскоп (ACM), нанопроводной и нанопоровой детекторы. Для возможности реализации задачи обнаружения белков и нуклеиновых кислот с помощью молекулярных детекторов разработаны необходимые методики анализа (разделы 4, 6). Регистрации сигнала от единичных молекул недостаточно для решения одной из основных задач проекта «Развитие и применение методов высокочувствительного прецизионного анализа на

уникальных технологических решений комбинации основе молекулярных детекторов в составе УНУ «Авогадро» для определения молекулярного состава биологических образцов»: необходимо не только «регистрировать» отдельные молекулы, но и идентифицировать их. В проекте для решения идентификации предлагается комбинация методов АСМ, масс-спектрометрической идентификации и метода необратимого фишинга на поверхность (раздел 4). Ранее в ИБМХ была показана принципиальная возможность применения комбинации методов ACM/MC и необратимого фишинга для обнаружения биомолекул в модельных растворах. Как показано в разделе 3, ранее используемые условия необратимого фишинга (в том числе кросс-линкер на основе сукцинимида) не являются оптимальными для внедрения метода необратимого фишинга в систему анализа биологических образцов. В связи с этим, в рамках проекта разрабатывается новый тип АСМ-чипов для необратимого фишинга (раздел 3) и новая методика анализа с применением комбинации АСМ/МС (раздел 4).

Для реализации работ по поиску клинически значимых белковых маркеров на чувствительности биоанализа И внедрения новом уровне молекулярного профилирования с разрешением на уровне единичных биомолекул в систему оценки состояния здоровья человека также необходимо решить задачу по обработке полученных данных. Необходимо представить результаты в таком виде, чтобы они позволили выявлять отклонения в молекулярном профиле, свидетельствующие о возможных нарушениях в организме, и интерпретировать эти отклонения в контексте анализа рисков возникновения патологических процессов на примере онкологических заболеваний. Оценка взаимосвязи результатами между молекулярного профилирования и клиническими данными, полученными с помощью молекулярного детектора (АСМ) и нанопроводного детектора (НПбиосенсора), производится с использованием математических и программных инструментов. Для получения статистических данных необходимо создание специального программного обеспечения (ПО) для обработки данных, полученных с помощью АСМ и НП-биосенсора (раздел 5 и раздел 7). ПО предназначено для обработки данных анализа биологического образца или модельной системы. Результаты обработки АСМ-изображений с помощью специального ПО будут отображать все необходимые статистические данные, которые могут быть

представлены в виде таблиц, графиков, диаграмм, числовых значений и др. Разработанное ПО позволят быстро и эффективно анализировать данные.

В рамках выполнения проекта по пункту 1.8 ПГ Соглашения разработано техническое задание на изготовление экспериментальных образцов чипов для нанопроводного детектора (НП-чипов), адаптированных для анализа биологических образцов. Разработка и последующее изготовление НП-чипов нового типа обусловлено несовершенством текущей конструкции чипов и НП-биосенсора. Существующие решения не позволяют проводить массовые измерения с целью анализа большого количества биологических образцов, которые необходимы в проекте. Кроме того, для решения задачи сравнения результатов анализа для образцов, полученных от пациентов с подтвержденными диагнозами и от здоровых пациентов, необходимо использование хорошо охарактеризованных чипов с воспроизводимыми исходными параметрами.

По направлению транскриптомного анализа, в рамках работ по пункту 1.9ПГ предложена схема молекулярного анализа транскриптома биологических образцов с использованием нанопорового детектора УНУ «Авогадро». Транскриптом является промежуточным этапом при реализации генетически закодированной информации в протеом. Предыдущие исследования нашего коллектива показали, что при выборе оптимального сочетания методических подходов и уровня отсечения сигнала может быть получено полное соответствие между количеством белок-кодирующих генов (БКГ) человека и количеством детектированных транскриптов (мРНК): как минимум, один транскрипт с отличным от нуля уровнем экспрессии детектируется для каждого БКГ (1). Согласно опубликованным данным, максимальное количество детектированных транскриптов (мРНК) может быть получено при использовании одновременно транскриптома: секвенирование двух методов анализа С использованием нанопорового детектора, позволяющее получить длинные результатами транскриптомного прочтения транскриптов, В сочетании с секвенирования коротких фрагментов, выполненных с использованием Illumina (1). Разработанная схема учитывает возможность получения результатов анализа транскриптома биологических образцов с использованием нанопорового детектора УНУ «Авогадро»: для увеличения покрытия образцов детектированными мРНК было принято решение проводить параллельное секвенирование коротких

фрагментов с использованием Illumina на этапах РНК-секвенирования и рибосомного профилирования. Предложенная схема позволяет получить научное объяснение усложнения композиции биологических объектов на уровне «ДНК (геном) - мРНК(транскриптом) -белок (протеом)» в ряду от недифференцированных клеток (эмбриональные стволовые клетки, ЭСК) до дифференцированной ткани человека, с учетом анализа в качестве промежуточной стадии образца клеточной линии. В практическом плане развития высокочувствительных технологий регистрации белковых молекул схема предполагает наличие «золотого стандарта» для оценки полноты инвентаризации протеома в биологических образцах. В качестве «стандарта» предлагается использовать транслатом – совокупность транслируемых (т.е., с которых синтезируются белковые молекулы) мРНК.

В результате работ по пунктам 1.10 и 1.11 ПГ были выполнены исследования, необходимые для реализации протеомного и метаболомного профилирования образцов в рамках проекта: разработаны методики панорамного молекулярного профилирования протеомного и метаболомного состава биологического образца с использованием масс-спектрометрического детектора, характеризующиеся высокой точностью определения масс-пиков и повторяемостью измерений интенсивности пика. Разработанные методики будут использованы на последующих этапах проекта для профилирования биологических образцов. Цель работ по пунктам 1.12 и 1.13 ПГ – разработка технологии получения фосфолипидных наноразмерных частиц для предназначенных для насыщения фармакологическими доставки лекарств, субстанциями различных классов для последующего их транспорта в биологические ткани. В качестве метода получения стабильных, стандартных по размеру фосфолипидных частиц, служащих переносчиками различных лекарственных субстанций, был выбран способ гомогенизации и/или экструзии под высоким давлением (1000 – 1200 атм.) с помощью микрофлюидайзера. Использование гомогенизатора высокого давления и микрофлюидайзера позволяет вести процесс в асептических условиях, при постоянном контроле температуры и давления. Преимуществами этих методов являются высокая производительность, минимальное окисление фосфолипидов в процессе обработки. В результате были подобраны оптимальные условия основных разработки технологии технологических процессов (гомогенизация, ультрафильтрации, лиофильная

сушка), выбран криопротектор (мальтоза) для стабилизации размера частиц при регидратации после лиофильного высушивания, разработаны рекомендации по снижению времени сублимационной сушки на производственной установке.

В результате проведенной работы был оптимизирован процесс получения фосфолипидных наноразмерных частиц для доставки лекарств, разработан протокол получения таких частиц и изучены их физико-химические характеристики, на основании которых был разработан аналитический паспорт. В рамках работ по Соглашению была изготовлена партия наноразмерных частиц для доставки лекарств без загрузки активных компонентов в соответствии с разработанным Протоколом получения наноразмерных частиц для доставки лекарств. Партия прошла контроль качества в соответствии с описанными в Протоколе критериями. Для оценки безопасности и эффективности наноразмерных частиц для доставки лекарств в рамках работы по пункту 1.15 ПГ был разработан План исследования по оценке безопасности и эффективности наноразмерных частиц для доставки лекарств.

В рамках выполнения работ по проекту (пункт 1.14 ПГ) разработана методика АСМ-визуализации наноразмерных частиц, позволяющая охарактеризовать объекты по их размерам (высотам) и жесткости. Методики АСМ-визуализации наноразмерных систем для доставки лекарств и протокол проведения экспериментов для их получения необходимы для исследования возможности введения метода АСМ в систему разработки новых наноразмерных лекарственных препаратов. При разработке методики АСМ-визуализации в качестве стандартных объектов использованы наночастицы с известными свойствами (латексные частицы). На этапах разработанная методика будет использована последующих ДЛЯ характеризации наноразмерных частиц для доставки лекарств (разделы 12-13).

Объектом исследования при выполнении работ по пунктам 1.16-1.17 ПГ являются первичные транскриптомные, протеомные и метаболомные данные. Необходимость разработки стандартных операционных процедур СОП и базы данных обусловлена большим количеством данных, которые будут получены при профилировании образцов на последующих этапах реализации проекта. Биоинформатическая обработка данных, полученных в проекте необходима для решения задачи проекта по формированию панели кандидатных молекулярных мишеней (биомакромолекулы И низкомолекулярные соединения) ДЛЯ

потенциального создания медицинских тест-систем, ориентированных на клиническую лабораторную диагностику социально-значимых заболеваний на ранней стадии развития, и, в перспективе, мониторинга успешности терапии и прогнозирования течения патологического процесса, с возможностью модификации состава тест-системы в виде добавления мишеней и/или перегруппировки с целью учета индивидуальных потребностей каждого человека.

Ключевые слова: молекулярные детекторы, детекция единичных биомакромолекул, протеомный анализ, метаболомный анализ, транскриптомный анализ, транслатом, секвенирование, биоинформатическая обработка данных.

1. Разработка требований к количеству образцов и характеристикам доноров

В соответствии с законодательством Российской Федерации донором биоматериала для научно-исследовательских работ является дееспособное лицо, достигшее возраста восемнадцати лет или приобретшее полную дееспособность до достижения им возраста восемнадцати лет, изъявившее добровольное желание сдать биоматериал, прошедшее медицинское обследование И не имеюшее противопоказаний для сдачи биоматериала. До сдачи биоматериала донор должен предоставить паспорт или иной документ, удостоверяющего личность, заполнить анкету донора, информированное добровольное согласие, согласие на обработку персональных данных и предоставить информацию о наличии противопоказаний к донорству (согласно Федеральному закону от 20.07.2012 № 125-ФЗ).

Формирование репозитория биоматериала осуществляется на основании информированного согласия, которое отражает решение донора об участии в исследовательской программе [1]. Информированное согласие является этическим и юридическим документом и обеспечивает защиту прав участников и/или пациентов [2]. Информированное согласие осведомляет донора об условиях участия в исследовании [3].

Формирование коллекции плазмы крови, полученной от пациентов с онкологическими заболеваниями на разных стадиях развития патологического процесса (К2), а также коллекция плазмы крови условно-здоровых участников, составляющая контрольную группу в исследовании (К1), будет выполнятся на основе договора о научном сотрудничестве с клиническим партнером и в соответствии с «Требованиями к количеству образцов и характеристикам доноров» (разработан на данном отчетном этапе и представлен отдельным документом).

Планируется собрать не менее 100 аннотированных образцов плазмы крови, с использованием штрих-кодированных пробирок с целью анонимизации персональных и клинических данных (согласно пп. 9 ч. 1 ст. 6 Закона № 152-ФЗ).

В Таблице 1.1 представлены разработанные критерии сбора биологического материала.

Количество (не менее 100 образцов) и объем биообразца (не менее 500 мкл) обусловлен, тем, что в рамках проекта планируются молекулярное мультиомиксное

профилирование, направленное на выявление возможных нарушений в организме. Был предусмотрен объем достаточный для выполнения комплекса исследований на всех аналитических площадках и количество биологических образцов в каждой группе сравнения достаточное для статистического обоснования полученных результатов измерений.

	1		
Объем биообразца (мкл)	Не менее 500		
Способ забора	Инвазивный, «закрытый»		
Условия сбора	Вакуумная система		
Способ предравители ной нолготорки	Центрифугирование, предварительный		
Способ предварительной подготовки	перемешивание компонентов пробирки		
Перемешивание компонентов пробирки	голубая кодировка: 3-4 раза;		
(переворачивания)	фиолетовая кодировка: 8-10 раз.		
Условия транспортировки	Термосумка/изотермический контейнер		
Условия хранения	-800C		

Таблица 1.1 - Критерии сбора образцов плазмы крови.

На основе результатов исследования [4] для забора крови были выбраны вакуумные системы с целью снижения возможной преаналитической ошибки. При этом, способ предварительной подготовки биоматериала зависит от типа вакуумной системы, определяемой цветовой кодировкой и доступен в [5].

В соответствии с рекомендациями ВОЗ контейнер для транспортировки крови и ее компонентов должен быть термостабилен в диапазоне от +2 °C до +10 °C в течение 24 часов, что достигается с помощью хладагентов [6]. Изготовитель таких контейнеров определяет число пакетов со льдом (хладагентов), необходимое для содержания крови при требуемой температуре. Поскольку медицинские термосумки и термоконтейнеры соответствуют данным условиям, они были выбраны для транспортировки биоматериала.

Оптимальная температура для хранения компонентов крови варьируется в зависимости от конкретного аналита, представляющей интерес.

Как правило, низкая (-20°С) и сверхнизкая температура (-80°С) для кратковременного и длительного хранения, соответственно, являются оптимальными условиями для поддержания целостности и стабильности каждого компонента крови [7, 8].

Разработан перечень основных клинических и антропометрических данных для групп сравнения К1 и К2:

– пол;

- возраст;
- национальность (при согласии донора);
- антропометрические данные (вес, рост, ИМТ);
- диагноз;
- тип биологического материала;
- наличие сопутствующей терапии;
- дата получения биообразца;

Дополнительные сведения предоставлялись для К2 и включали следующие сведения:

- стадия онкологического заболевания (при наличии);
- биохимические показатели крови (при наличии);
- сочетанные хронические заболевания (при наличии);
- гистология (при наличии);
- локализация опухоли;
- результаты компьютерной томографии (КТ);
- размер опухоли.

Данный перечень будет включен в аннотационный лист для биообразцов и передан клиническому партнеру для заполнения.

Разработанный по пункту 1.1 ПГ и Техническому заданию Соглашения документ «Требования к количеству образцов и характеристикам доноров» представлен в составе пакета отчетной документации за отчетный период (файл «Пункт ПГ-1.1-Требования_v1»).

2. Разработка протокола сбора, хранения, транспортировки биологических образцов для формирования коллекций К1 (условнодобровольцев) и K2 здоровых (пациентов c онкологическими заболеваниями на разных стадиях развития патологического процесса)

Разработка новых диагностических систем проводится с использованием максимально доступной исходной информации об образцах и, следовательно, требуется обеспечение исследователя информацией об используемых образцах биологического происхождения. Данная информация должна включать аннотации (клинические данные), а также описание процедур преаналитического этапа – сбор, транспортировка, хранение и предварительная подготовка образцов для проведения аналитических измерений.

На сегодняшний день процедуры преаналитического этапа не стандартизованы. Проблема контроля процедур преаналитического этапа остается актуальной для клинической и научной работы.

Условия сбора, хранения и транспортировки биообразца могут приводить к изменениям молекулярного состава (белкового, метаболитного и геномного). Такие изменения приводят к недостоверным результатам аналитических измерений, которые отражают не истинное состояние in vitro, но профиль, сформированный во время предварительной подготовки образца. В связи с этим стандартизация процедур преаналитического этапа обязательна для получения воспроизводимых и [9]. Особенно достоверных аналитических результатов важно ЭТО при использовании нескольких методов биоанализа для характеризации одного образца, т.е. тот подход, который применяется в данном проекте.

Преаналитический этап включает в себя следующие процедуры:

1) Процедуры, предшествующие сбору биологического материала. На данном этапе необходима разработка критериев включения и исключения доноров в исследовании. Большое значение имеют факторы, связанные с донором – генотип, образ жизни, питание, медикаментозное лечение, сопутствующие заболевания, хирургические вмешательства и др. Также необходима разработка процедур и протоколов условии забора биообразцов (например, натощак или постпрандиально). Процедуры и протоколы, предшествующие сбору биоматериала, разрабатываются

для каждого исследования в соответствии с целью и задачами.

2) Процедуры сбора биологического материала должны быть стандартизованы, т.к. на состояние образцов влияют условия, транспортировка (соблюдение режима холодовой цепи, продолжительность) и цепочка хранения в лаборатории.

3) Процедуры после сбора образцов включают регистрацию и надлежащую аннотацию образцов в базе данных биобанка. Различные условия и время хранения, контроль архивных образцов, процедуры выделения аналитов для последующего исследования могут повлиять на общий результат исследований. Поэтому все этапы жизни образцов должны быть отражены в базе данных биобанка.

Требования к контролю качества, стандартизации преаналитического этапа и последующих стандартных операционных процедур зависят от типа образца и используемой аналитической платформы.

Европейский комитет по стандартизации регулярно проводит мероприятия, направленные на разработку новых технических спецификаций для Международной организации по стандартизации (англ. International Organization for Standardization, ISO), объемов стандартизации преаналитического рабочего процесса, оптимальных процедур транспортировки и обеспечения качества в молекулярном анализе различных типов образцов.

ISO предоставляет технические спецификации для молекулярных диагностических исследований in vitro и процедур предварительной подготовки, которые актуальны как для диагностических лабораторий, так и для биобанков [10].

В соответствии с вышесказанным в настоящем отчетном этапе был разработан «Протокол сбора, хранения, транспортировки биологических образцов (плазмы крови)» (представлен отдельным документом).

2.1. Протокол сбора биологических образцов, отвечающих особенностям эксплуатации УНУ «Авогадро»

Сбор биологического материала начинается с получения информированного согласия участника исследования и одобрения планируемого исследования локальным этическим комитетом (ЛЭК) организации, на базе которой осуществляется сбор биоматериала. ЛЭК проводит оценку этических и правовых аспектов клинических исследований, актуальности решаемой проблемы и адекватности выбранных аналитических подходов для достижения заявленной цели

исследования [11]. Кроме того, наличие ЛЭК является необходимым условием при публикации результатов исследования с использованием биоматериала человека.

Согласно национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ Р 53022.1-2008 «Технологии лабораторные клинические, требования к качеству клинических лабораторных исследований» работу с биологическим образцом условно можно разделить на три этапа: преаналитический, аналитический и постаналитический. Процедуры аналитического этапа осуществляются в лабораторных условиях, два других этапа включают внелабораторную составляющую, что требует согласованных, последовательных мероприятий по обеспечению качества от персонала различных подразделений (структур).

Оценка драматичной роли ошибок, допущенных в разных этапах исследования на качество результатов в целом, отличается в литературных источниках [2 – 6]. Однако такие оценки схожи в том, что ошибки, допущенные в преаналитическом этапе, наиболее драматичны для исследования и нивелирует ценность полученных данных. Основными ошибками преаналитического этапа являются:

 неполная аннотация биоматериала (частичная характеризация клинических данных)

– неправильный выбор типа и количества антикоагулянта;

– нарушения условий и сроков взятия биологического материала.

Таким образом, неполная характеризация клинических данных впоследствии формирования «индивидуального» затруднит процесс цифрового портрета человека. Неправильный выбор типа и количества антикоагулянта приводит к искажению результатов анализа. Молекулярный профиль отражает фактическое состояние здоровья донора in vitro. Так, состав метаболома может изменяться в преаналитическом этапе вследствие сохранения ферментативной активности белков биообразца до и во время сбора, транспортировки образца и хранения. Важность соблюдения условий и сроков взятия биологического материала обусловлена тем, что, целостность белковых молекул сохраняется при немедленном приготовлении плазмы крови [7, 12], а оптимальное качество ДНК, выделяемой из образцов крови, обеспечивается, если подготовка образцов осуществляется в течение 24 ч при 4 °С [13]. Оптимальная температура для хранения компонентов крови варьирует в зависимости от конкретного аналита.

Как правило, оптимальными для сохранения целостности и стабильности компонентов крови являются низкие (-20°С) и сверхнизкие температуры (-80°С) для кратковременного и длительного хранения соответственно [7, 8].

В рамках проекта термин «биологический образец» (биообразец) определяет образцы, предназначенные для проведения исследований в научных целях. В качестве биологического образца выступают образцы эмбриональных стволовых клеток, трансформированные клеточные линии, дифференцированная ткань, а также образцы биологических жидкостей человека.

Процедура забора биоматериала требует:

наличия стандартной операционной процедуры, или инструкции, у процедурной медсестры;

- согласие пациента на участие в исследовании;

- анонимизация персональных данных о пациенте;

 правильный выбор расходных материалов для забора биологического материала.

Согласно национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ Р 530079.4-2008 п. 3.2.1 большая часть клинических лабораторных исследований проводится с использованием образцов крови – венозной, артериальной или капиллярной. Венозная кровь может быть использована для детекции гематологических, биохимических, гормональных, серологических, иммунологических показателей. Для исследования аналитов цельной крови (ДНК, РНК), а также сыворотки / плазмы крови образец крови забирают из локтевой вены.

Способы забора образцов венозной крови можно разделить на:

1) «традиционный», который предполагает сбор крови через закол в пробирку по капиллярному эффекту;

2) «открытый», в котором забор образца крови осуществляется с использованием одноразового шприца либо аспирационных шприцевых систем;

3) «закрытый», в котором забор крови осуществляется с использованием одноразовых вакуумных систем.

Для получения биообразцов в рамках проекта был выбран «закрытый» способ взятия крови, поскольку такой способ обладает следующими преимуществами:

– безопасность пациента и персонала;

- стандартизация процедуры;

комфорт и удобство в использовании;

– экономия рабочего времени.

Вакуумные системы различаются наполнителем. Выбор типа вакуумной системы зависит от области применения (Таблица 2.1).

Для решения протеомных и метаболомных задач используют плазму и/или сыворотку венозной крови поскольку согласно п.3.2.1. ГОСТ Р 53079.4 -2008 венозная кровь — лучший материал для определения гематологических, биохимических, гормональных, серологических и иммунологических показателей. Капиллярная кровь представляет собой смесь крови из капилляров (артериол, венул) и тканевой жидкости, что ведет к ограничению точности результатов и плохой воспроизводимости (результаты, полученные с интервалом во времени в разных лабораториях, могут существенно отличаться) [14, 15].

Сбор венозной крови осуществляется с использованием вакуумных систем с голубой цветовой кодировкой (протеомный анализ) либо фиолетовой (метаболомный).

Важнейшей процедурой первичной обработки биообразцов после забора является их анонимизация и кодирование с целью последующей надежной идентификации. Кодирование образцов участников исследования предпочтительно с применением штрих-кодов, в которых отражены обезличенные клинические данные об участнике исследования. Для этой цели были закуплены пробирки со штрих-кодами, которые будут передаваться ответственному лицу со стороны клинического партнера. Штрих-коды считываются с помощью специального устройства (ридера) в клинической лаборатории и впоследствии в аналитической лаборатории. В некоторых случаях применяется ручное кодирование пробирок путем нанесения на них карандашом по стеклу или фломастером условных знаков и цифр.

Таблица 1. Типы вакуумных систем для забора крови в соответствии с ISO 6710 «Контейнеры для сбора образцов венозной крови одноразовые»

Цветовая маркировка (ISO 6710)	Напол	Применение		
Красный	Активатор свертывания Двуокись кремния (Si02)		Клиническая химия, серология,	
Оранжевый	Активатор свертывания на основе тромбина и разделительный гель	Двуокись кремния (Si02) и гель	определение групп крови	
Зеленый	Антикоагулянт	Соли гепарина (гепарин лития/ гепарин натрия/аммония гепарин)	Биохимические, иммунохимические анализы (Витамины, гормоны, иммунный статус)	
Голубой	Антикоагулянт (1:9)	Цитрат натрия (3,2%, 3,8%)	Коагулологические тесты, гемостаз	
Желтый	ACD (1:4)	Тринатрия цитрат и лимонная кислота, декстроза	Иммуногематология, исследования морфологии клеток, увеличение сроков хранения пробы Гематологические, иммунохимические исследования, ПЦР, генодиагностика Определение СОЭ	
Фиолетовой	Антикоагулянт	ЭДТА К2 (К3)		
Черный	Антикоагулянт (1:4)	Цитрат натрия (3,2%, 3,8%)		
Серый	Антикоагулянт и стабилизатор	Натрия флуорид, калия оксалат, натрия флуорид, ЭДТА	Диабетология	

Прием и хранение биоматериала в биобанке сопровождается последующей передачей анонимизированного образца на участок хранения. В данном участке осуществляется аликвотирование матричного образца. Процедура аликвотирования заключается в разделении матричного образца на меньшие части, что при проведении аналитических измерений позволяет сократить число циклов замораживания / оттаивания биообразца. Создание резервных копий матричного образца упрощает совместное использование образцов несколькими научными коллективами или производственными участками. Так, в биобанке Великобритании (UK Biobank, https://www.ukbiobank.ac.uk/) в результате аликвотирования крови и мочи для одного матричного образца получают от 1 до 6 аликвот в зависимости от типа вакуумной системы и фракции образца [16].

Для целей выполнения проекта «УН-Авогадро» из матричного образца плазмы крови планируется получить 5 аликвот по 100 мкл.

Поскольку, многоступенчатый сбора биообразцов требует процесс стандартизации преаналитического процедур этапа для повышения воспроизводимости результатов аналитического этапа, то все его особенности были разработке «Протокола сбора, хранения, учтены при транспортировки биологических образцов», отвечающих особенностям эксплуатации УНУ «Авогадро» (отдельный документ).

2.2. Протокол транспортировки биологических образцов, отвечающих особенностям эксплуатации УНУ «Авогадро»

Температура транспортировки влияет на стабильность образца и определяется интервалом с момента сбора биообразца и процедурами его предварительной обработки до момента хранения. Оперативность передачи биологического материала на участки проведения аналитических измерений и соблюдение сформулированных правил транспортировки, зависит достоверность результатов аналитических исследований. Нарушения этого процесса (температурный и временной режим) могут привести к недостоверным результатам на аналитическом этапе. Температура и продолжительность транспортировки/хранения также влияют на стабильность исследуемых образцов, скорость их деградации in vitro. В настоящем исследовании предусмотрено проведение комплекса аналитических измерений, в том числе транскриптомный, протеомный и метаболомный анализ, позволяющие охарактеризовать интегральный «цифровой» образ биообразца. В связи с этим следует учитывать необходимость передачи на участки измерений биообразцов в контейнерах с добавлением консервантов, соблюдение требований Нарушения для холодовой цепи влажности. правил транспортировки И биологического материала на участок аналитических измерений может стать причиной следующих негативных событий:

 некорректный результат исследования, а именно ошибка в анализе и интерпретации полученных результатов;

необходимость повторного проведения исследования;

 излишний расход материалов, реагентов, диагностических сред и рабочего времени сотрудников.

Поэтому транспортировка биологического материала на участок аналитических измерений должна выполняться с соблюдением требований согласно разработанным СОП.

Протокол о транспортировке биообразца должен содержать следующую информацию:

- данные о заборе биообразцов (дата забора, тип биоматериала и др.);

– заключение об их пригодности к клиническому применению (контроль качества биообразцов, исключение гемолизированных образцов плазмы крови);

- условия доставки, отчет по соблюдению температурного режима;

 идентификационные данные транспортной компании, выполнявшей доставку;

- дата и время начала и окончания транспортировки;

– акты передачи биообразцов.

Также при доставке биоматериала в лабораторию следует соблюдать общие и частные требования. К первым относятся: наличие маркировки на контейнере или другой упаковке с биоматериалом. Контейнер с биологическим материалом должен быть герметичным и обеспечивать сохранность и стерильность образца. Транспортировку биообразцов может осуществлять сотрудник, прошедший инструктаж или сертифицированные компании. Контакт третьих лиц с материалами запрещен во избежание контаминации образцов. Условия транспортировки плазмы крови в целях выполнения работ по проекту представлены в соответствующем разделе Протокола сбора, хранения, транспортировки биологических образцов, отвечающих особенностям эксплуатации УНУ «Авогадро».

2.3. Протокол хранения биологических образцов, отвечающих особенностям эксплуатации УНУ «Авогадро»

Информационно-технологические решения предлагают различные варианты обслуживания и поддержки баз данных в режиме реального времени с легким доступом и удобным для пользователя интерфейсом. Также важны компоненты защиты конфиденциальности. Цифровые данные требуют оптимизации аппаратного и программного обеспечения [8]. База данных должна соответствовать стандартам международной совместимости. В связи с этим для хранения плазмы крови, полученной в рамках проекта, будет использована ранее приобретенная в ИБМХ

система хранения и систематизации данных "Samples" (Ziath Ltd, Великобритания). Биообразцы будут передаваться на участок хранения вместе с аннотациями и актами передачи образцов. Аннотации биообразцов будут заносятся в "Samples" в соответствии с требованиями по анонимизации.

Пример аннотированных образцов в системе учета Samples представлен на Рисунке 2.1.

Система учета биообразцов (специальное программное обеспечение) рекомендована к эксплуатации совместно с аппаратной частью – ридеры, считывающие штрих коды пробирок, и обеспечивает работу в соответствии с правилами анонимизации.

В настоящем исследовании матричные образцы и их аликвоты планируется хранить в органайзерах на полках криохранилища. В целях обеспечения сохранности биообразцы будут созданы «рабочий» и «резервный» биорепозитории в разных локациях. В одной локации будет размещен «рабочий» биорепозиторий для участка аналитического этапа, во второй локации - «резервный», образцы которого планируется использовать, когда образцы в рабочем биорепозитории будут исчерпаны. Аликвоты планируется извлекать из холодовой цепи для проведения аналитических измерений. Образцы будут извлекаться вручную в соответствии со стандартными процедурами безопасности и эксплуатации [17].

Рисунок 2.1 – Пример аннотированных биообразцов плазмы крови из реестра программного обеспечения "Samples"

Million and the second secon	Доб	Реестр Администрирование хурнала	добавить Редактировать Удалить	Переместить в контейнер Зай	брать	Рестр Контейнер Архия	Использованные Количество
MMA-142 (P) MMA-142 (P) MMA-142 (P) Constraint Amanteence exampleme et attemants Bogoer (ropu) 64 Generations MMA-142 (P) MMA-142 (P) MMA-142 (10) Amanteence exampleme et attemants Bogoer (ropu) 64 Generations MMA-142 (P) MMA-142 (P) MMA-142 (10) DOI et attemants Bogoer (ropu) 64 Generations Constraints Co		Архив		для использованных образцов обр	разец		образцы дей
MMA-142 (9) DOI Her parents: MMA-148 MMA-142 (10) Anazero 50 Ara MMA-148 Jobanes Bogar (104) 64 Anazero 50 Ara Bogar (104) 64 Bogar (104) 64 Anazero 50 Ara MMA-145 (10) Anazero 50 Ara Anazero 50 Ara MMA-155 (11) Anazero 70 Ara Bagar (104) Ara MMA-155 (12) Anazero 10 Ara Anazero 10 Ara MMA-126 (12) Anazero 10 Ara Anazero 10 Ara Anazero 10 Ara MMA-126 (12) Anazero 10 Ara Anazero 10 Ara Anazero 10 Ara Anazero 10 Ara MMA-126 (_	контеинеры		овразец	_	Биды	ФИЛЬТРЫ
MMA-146 [10] DOI Het gammax KOHTREHIEP 2_Corning_biobank MMA-146 [10] Amazora 50 Max KOHTREHIEP 2_Corning_biobank 10070000383153 Anazora 50 Max KOHTREHIEP 2_Corning_biobank 154119 or biobank Dol Het gammax F MMA-155 [11] Dol Het gammax F 1007000383153 Anazora 70 Mox 100 Max F Amazora 70 Mox 100 Max Be (ar) Max F 10070038153 Dol Het gammax F 10070038153 Anazora 70 Mox 100 Max F 10070038153 Anazora 70 Mox 100 Max F 100700038153 Anazora 70 Mox 100 Max F 100700038153 Anazora 70 Mox 100 Max F 100700038157 Anazora 70 Mox 100 Max F 100700038157 Anazora 70 Mox 100 Max F 100700038147 Anazora 70 Mox 100 Max F		ММА-142 [9] 10070000388171 Добавлено с помощью импорта: 26:12:2021 15:41:30 от: biobank	DOI Аликвота Аналитические измерения Вес (кг) Возраст (годы) Гистология Гормональная терапия	нет данных 50 мкл <u>нет данных</u> нет данных 64 Светлоклеточный почечноклеточны нет		ММА-148 10070000388163 Добавлено с помощью импо Созданный: 2 Месяц Изменено: 2 Несяц	орта: 26.12.2021 15:41:19 от: biobar ы назад назад
ММА-155 [11] DDI нет данных Аляквота 100 мл ПОИСКОВЫЕ МЕТКИ 10070000388155 Аналитические измерения нет данных Вовраст (годы) 43 Гостология Сектолоскеточный почечнослеточный Пормональная тералия нет Дата получения биообразца 01.02.2021 00:000 DDI нет данных Аналитические измерения нет данных Возраст (годы) 49 Возраст (годы) 49 ММА-126 [12] DDI нет данных Пормональная тералия нет Дата получения биообразца 01.02.2021 00:000 DDI нет данных Возраст (годы) 49 ММА-126 [12] DDI нет данных Пормональная тералия нет Дата получения биообразца 01.02.2021 00:000 DDI нет данных Возраст (годы) 49 ММА-126 [12] DDI нет данных Пормональная тералия нет Дата получения биообразца 01.02.2021 00:000 MIRE 10 нет данных Дата получения биообразца 01.02.2021 00:000 ММА-195 [13] DDI нет данных Возраст (годы) 39 Клинические измерения нет Дата получения биообразца 0.01.2020 00:000 MIRE 10 неовобразования 10070000388234 Аналитические измерения нет Дата получения биообразца 0.01.2021 00:000 MIRE 10 неовобразования 10070000388234 Аналитические измерения нет Дата получения биообразца 0.01.2021 00:000 MIRE 10 неовобразования 10070000388234 Аналитические измерения нет данных Поскология секлокеточный почечнослеточны Поскология секло 0.000 10070000388234 Аналитические измерения нет данных <td></td> <td>ММА-148 [10] 1007000388163 Добавлено с помощью импорта: 26.12.2021 15:41:19 от: biobank</td> <td>Дата получения биообразца DOI Аликвота Аналитические измерения Bec (кг) Возраст (годы) Гистология Гормональная терапия Дата получения биообразца</td> <td>11.01.2021 0:00:00 нет данных 50 мкл нет данных нет данных 49 Почечноклеточная светлоклеточна нет 19.01.2021 0:00:00</td> <td>• •</td> <td>Контейнер Место расположения Владелец Тип образца Право на редактрование Выдан</td> <td>2_Corning_biobank 10 biobank плазма Только владелец Нет</td>		ММА-148 [10] 1007000388163 Добавлено с помощью импорта: 26.12.2021 15:41:19 от: biobank	Дата получения биообразца DOI Аликвота Аналитические измерения Bec (кг) Возраст (годы) Гистология Гормональная терапия Дата получения биообразца	11.01.2021 0:00:00 нет данных 50 мкл нет данных нет данных 49 Почечноклеточная светлоклеточна нет 19.01.2021 0:00:00	• •	Контейнер Место расположения Владелец Тип образца Право на редактрование Выдан	2_Corning_biobank 10 biobank плазма Только владелец Нет
ММА-126 [12] DOI нет данных Гормональная тералия нет 10070000388147 Аликвота 100 мкл Дата получения биообразца 19:01.2201 0:00:00 15:41:17 от. biobank Аналитические измерения нет данных Ве (к) нет данных Вовраст (годя) 59 Гистология Светлоклеточный почечноклеточны Индекс Глисона (балль) нет данных Клинические измерения нет дата получения биообразца 0:41:2202 0:00:00 МКБ-10 Новсобразования Клинические измерения нет дата получения биообразца 0:41:2202 0:00:00 10070000388234 ООІ нет данных МКБ-10 Новсобразования МКБ-10 Новсобразования 10070000388234 Аналитические измерения нет данных МКБ-10 Новсобразования МКБ-10 Новсобразования 15:41:26 от. biobank Ве (к) 90 Возраст (годы) 50 МКБ-10 Новсобразования 15:41:26 от. biobank ООІ нет данных Ве (к) 90 Возраст (годы) 50 МКБ-10 Новсобразования 10070000388226 Аналитические измерения нет данных Ве (к) 90 Возраст (годы) 50 Осток образида 400 мгл 1007000388226 Аналитические измерения нет данных ПСА свободный (нг/мл) нет данных ПсА свободный (нг/мл) нет данных 10070000388226 Аналитические измерения нет данных ПсА свободный (нг/мл) н		ММА-155 [11] 10070000388155 Добавлено с помощью импорта: 26.12.2021 15:41:21 от: biobank	DOI Аликвота Аналитические измерения Вес (кт) Возраст (годы) Гистология Гормональная терапия Дата получения биообразца	нет данных 100 мкл <u>нет данных</u> 86 43 Светлоклеточный почечноклеточни нет 01.02.2021 0:00:00	4 III	поисковые метки Алике Аналитические измере Вес Возраст (го Гистоло	DOI нет данных юта 50 мкл ния <u>нет данных</u> (кг) нет данных ды) 49 гия Почечноклеточная светлокле
MMA-195 [13] DOI нет данных МКК-10 Новообразования 10070000388234 Аликкота 100 мкл МКК-10 Новообразования Добавлено с помощью импорта: 26.12.2021 Аналитические измерения ист. данных МКК-10 Новообразиа 15/41:26 от: biobank Вес (кг) 90 Возраст (годы) 50 Общее количество образиа 790 мкл ММА-157 [14] DOI нет данных Общее колическая резекци 10070000388226 Аликкота 100 мкл ПСА общий (нг/мл) нет данных Добавлено с помощью импорта: 26.12.2021 Аналитические измерения нет данных Общее количество образиа 400 мкл 10070000388226 Аликкота 100 мкл ПСА общий (нг/мл) нет данных Добавлено с помощью импорта: 26.12.2021 Аналитические измерения нет данных ПСА обводный (нг/мл) нет данных 10070000388226 Аликкота 100 мкл ПА общий (нг/мл) нет данных Добавлено с помощью импорта: 26.12.2021 Аналитические измерения нет данных ПСА обводный (нг/мл) нет данных Возраст (годы) 55 Гистология Хромофобный почеченоклеточный почеченокле		ММА-126 [12] 10070000388147 Добавлено с помощью импорта: 26.12.2021 15:41:17 от: biobank	DOI Аликвота Аналитические измерения Вес (кг) Возраст (годы) Гистология Гормональная терапия Дата получения биообразца	нет данных 100 мкл <u>нет данных</u> нет данных 59 Светлоклеточный почечноклеточни нет 04.12.2020 0:00:00		Гормональная тера Дата получения биообра ИМТ (кг/м Индекс Глисона (бал Клинический парт Количество алик Локализация опух Лучевая тера	пия нет зида 19.01.2021 0:00:00 ^2) нет данных лы) нет данных нер Институт урологии и репрод вот 3 оли нижний сегмент пия нет
MMA-157 [14] DOI нет данных ПСА свободни (нг/лил) нет данных 10070000388226 Аликвота 100 мкл ПСА свободный (нг/лил) нет данных Добавлено с помощью импорта: 26.12.2021 Аналитические измерения нет данных ПСА свободный (нг/лил) нет данных 15/41.21 от: biobank Вес (кг) нет данных Возраст (годы) 55 Пол жен Гистология Хромофобный почеченоклеточный Гормональная тералия нет Дата получения биообразца 01.02.2021 0:00:00 Родительский образец да MMA-144 [15] DOI нет данных Родительский образец		ММА-195 [13] 10070000388234 Добавлено с помощью импорта: 26.12.2021 15:41:26 от: biobank	DOI Аликвота Аналитические измерения Вес (кг) Возраст (годь) Гистология Гормональная терапия Дата получения биообразца	нет данных 100 мкл <u>нет данных</u> 90 50 Светлочный почечноклеточны нет 17.03.2021 0:00-00		МКК М Метаст Национально Общее количество обра Опера Организа Остаток обра ПСА общий из бит	-то повоооразования СКТ В паренхиме левой почки ви азы нет данных усть нет данных зца 790 мкл зца 790 мкл зца 740 мкл зца 640 мкл лад ист должих
ММА-144 [15] DOI нет данных Родительский образец		ММА-157 [14] 10070000388226 Добавлено с помощью импорта: 26.12.2021 15:41:21 от: biobank	DOI Аликвота Аналитические измерения Вес (кг) Возраст (годы) Гистология Гормональная терапия Дата получения биообразца	нет данных 100 мкл <u>нет данных</u> нет данных 55 Хроморобный почеченоклеточный нет 01.02.2021 0:00:00	A	ПСА общий (Н/) ПСА свободный (Н/) Патоло Размер опухоли (Родительский обра. Рост (мил нет данных гия Опухоль левой почки Іол жен см) 1,3х1,2х1,5 зец да см) нет данных
		MMA-144 [15]	DOI	нет данных		Родительский образец	Г — ЛІ

Ранее были опубликованы исследования, посвященные обоснованию стабильности белковой фракции цитокинов в долгосрочном периоде хранения [18], [19, 20]. Цитокины составляют небольшую часть протеома плазмы, поэтому являются чувствительными индикаторами деградации биообразца. В ЭТИХ исследованиях изучали стабильность биообразцов при температурных режимах -70°С и при –180 °С или ниже в жидком азоте в течение 6 лет. В литературе также доступны данные о влиянии температуры и циклов замораживания-оттаивания на стабильность уровня белков β 2M, sIL-2R, неоптерина, IFN- γ , sTNF-RII и TNF- α в плазме при температурных от +24°C до -70°C в течение 20 дней. Было показано, что температура –70°С является оптимальной с точки зрения стабильности образца, хотя некоторые из целевых белков не подвергались деградации даже при комнатной

температуре [21]. Шестилетние исследование, направленное на сравнение стабильности факторов свертывания, фибринолиза и воспалительных факторов в образцах плазмы крови не выявило значительных различий при хранении -70 °C или в жидком азоте [22]. В другом исследовании изучалась стабильность альбумина, аполипопротеина А-1, аполипопротеина В, холестерина, креатининкиназы, креатинина, фибриногена, холестерина ЛПВП, холестерина ЛПНП, общего белка и триглицеридов в плазме при -20°C, -40°C, -80°C и -180°C или ниже при сроке хранения до 6 лет. Была выявлена частичная деградация некоторых целевых аналитов в образцах при хранении -20°C. В Таблице 2.2 приведены основные методы криоконсервации наиболее популярных типов биоматериала, используемых в научно-исследовательских работах.

Таким образом, на основе обширного анализа литературных данных предпочтительным является долгосрочное хранение образцов плазмы крови при температурном режиме не выше -80°C. Хранение образцов плазмы крови планируется в криохранилищах при -80°C.

Требования к хранению биоматериала представлены в соответствующем разделе «Протокола сбора, хранения, транспортировки биологических образцов, отвечающих особенностям эксплуатации УНУ «Авогадро» - разработанного по пункту 1.2 ПГ и Техническому заданию Соглашения (отдельный документ в составе пакета отчетной документации, файл «Пункт_ПГ-1.2-Протокол_v1»).

БМ		Цель	Методы консервации	Кратковременные условия хранения / транспортировки	Условия длительного хранения	Литература
	Кровь	днк	ЭДТА, цельная кровь или сыворотка	4°С или на «мокром» льду в течение 24 часов	-80°С в течение многих лет	[23 – 25]
		РНК	Пробирки Paxgene®/Tempus ^{тм}	4°С или на «мокром» льду в течение 24 часов	-80°С в течение многих лет	[23, 26]
		Протеомика	Пробирка для отделения плазмы с гепарином; пробирка для отделения сыворотки с гепарином.	4°С или на «мокром» льду в течение 24 часов	при -80°С	[23 – 28]
		Биохимия	Пробирка для отделения плазмы с гепарином; пробирка для отделения сыворотки.	4°С или на «мокром» льду в течение 24 часов	немедленный анализ или - 80°С в течение многих лет	[23]
		Циркулирующие опухолевые клетки	Пробирка Cell-Free DNA ™ BCT®	не менее 4 суток при КТ	-80°С или предпочтительно LN2 криоконсервантом	[29, 30]
		Бесклеточная ДНК	Пробирки для забора крови Streck® Cell-Free DNA тм	до 7 дней при температуре окружающей среды, избегать транспортировки / хранения при 4°С	немедленная экстракция или -80°С в течение многих лет	[31 – 35]
		Циркулирующая некодирующая РНК	Плазма или пробирки для разделения плазмы	4°С или на мокром льду в течение 24 часов	образцы плазмы следует немедленно заморозить при температуре -80°С, стабильность до 1 года.	[19, 20, 36]
		Экзосомы	Плазма или пробирки для разделения плазмы	4°С или на «мокром» льду в течение 24 часов	-80°С в течение многих лет	[21, 22]
		Метаболомика	Пробирка для отделения плазмы с гепарином; и пробиркой для отделения сыворотки; простая пробирка	4°С или на «мокром» льду в течение 24 часов	-80°С в течение многих лет	[23]
		днк	Части опухоли: мгновенное замораживание в охлажденном изопентане.	Сохранить в течение часа после иссечения / биопсии; транспортировать в закрытых стерильных контейнерах на льду при температуре 4°С до консервирования.	-80°С или LN2	[23, 37]

Таблица 2.2 - Обзор методов хранения биоматериал для различных научных целей

БМ	Цель	Методы консервации	Кратковременные условия хранения / транспортировки	Условия длительного хранения	Литература
Ткань		Фиксированный формалином, залитый парафином (FFPE)	Хранить при КТ, закладывать в течение 72 ч.	КТ, годы	
	РНК	RNAlater ™ - coxpaнeниe PHK	Сохранить в течение часа после иссечения / биопсии; если добавлен консервант РНК - транспорт в течение 72 часов при хранении при 4°С	без консервационной среды хранить при -80С.	[23, 38, 39]
	Белки	Быстрое замораживание части опухоли в охлажденном изопентане	Сохранить в течение часа после иссечения / биопсии; транспортировать в закрытых стерильных контейнерах на льду при температуре 4°С до консервирования.	−80°C	[23]
	Раковые клетки для посева	Перед выделением клеток - питательная среда с или без фетальной бычьей сыворотки (FBS).	4°С или на «мокром» льду в течение 24 часов	LN2 с криоконсервантом или имплантатом мыши с иммунодефицитом.	[40, 41]
Моча	Продукты обмена, ДНК, РНК, белок	например, 9 мл в системе Vacutainer	4°С или на «мокром» льду в течение 24 часов	непосредственное хранение при –80°С или немедленный анализ	[16, 42]
Слюна	ДНК, биомаркеры	Стерильный контейнер или набор для сбора	КТ, в течение 24 часов	-80°С в течение многих лет	[23, 43]

БМ – биоматериал; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; КТ – комнатная температура; РНК – рибонуклеиновая кислота; LN₂ – жидкий азот.

3. Разработка лабораторного регламента и изготовление экспериментальных образцов чипов для атомно-силового микроскопа с функционализированной поверхностью

Функционализация поверхности играет решающую роль в разработке сенсорных систем для обнаружения биомаркеров [44], а также поверхностей для ферментативного катализа [45]. Биологическая функциональность таких систем достигается путем иммобилизации пептидов [46], ферментов [47], антител [48] и других типов биомолекул. В настоящей работе функционализация поверхности должна обеспечить возможность концентрирования биомолекул на поверхности для последующего анализа – АСМ-регистрации и МС-идентификации. Регистрация биомолекул на поверхности с использованием АСМ в качестве молекулярного детектора лежит в основе высокочувствительных систем биоанализа, способных регистрировать единичные биомолекулы. Метод фишинга - вылавливания биомолекул из большого объема на небольшую активированную поверхность чипа, с последующей детекцией при помощи АСМ был назван АСМ-фишингом [49]. В системе АСМ-фишинга чипы с функциональной поверхностью являются ключевым элементом. В настоящей работе для функционализации поверхности АСМ-чипов могут быть использованы специальные химические вещества – кросслинкеры. Подход с использованием кросслинкеров для активации поверхности АСМ-чипов получил название химического (неспецифического) фишинга. Он перспективен для обнаружения белков в низких концентрациях и решения задачи полной инвентаризации белков – определения всех белков, присутствующих в исследуемом образце. Цель работы на данном этапе: разработка лабораторного регламента и изготовление экспериментальных образцов АСМ-чипов, функционализированных кросслинкером на основе бензофенона – N-сукцинимидиловым эфиром 4бензоилбензойной кислоты (SuccBB).

3.1. Обоснование выбора кросс-линкера для функционализации поверхности

Основными этапами пробоподготовки при проведении ACM-исследований является фиксирование образца на атомарно-ровной поверхности. Для проведения успешной ACM-визуализации исследуемого образца необходимо учитывать, что объекты малого размера, в том числе молекулы белка, требуют использования

плоской поверхности, чтобы размер частиц преобладал гладкой и над топографическими неровностями подложки. Неровности не должны превышать 1нм по своей высоте, а наличие неровностей большего размера может привести к получению ложного результата, так как размеры белков обычно не превышают 10 нм. Также не должно создаваться никаких дополнительных сил дистанционного взаимодействия (притяжения или отталкивания) иглы кантилевера АСМ с материалом подложки, так как любой дополнительный изгиб балки кантилевера приведет к искажению полученных данных. Очень важно обеспечить возможность подложкой химического взаимодействия исследуемого объекта с для иммобилизации его на поверхность во избежание сдвига объекта под действием зонда при сканировании. Широкое применение в качестве подложек для АСМ кремний, слюда (мусковит) И высоко-ориентированный нашли стекло, пиролитический графит. Для выполнения работ по проекту на данном этапе работ в качестве подложки выбрана слюда, так как поверхность отличается достаточной ровностью, а также легко поддается функционализации.

Перед процедурой функционализации слюды необходима процедура модификации поверхности. Ранее, в лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ была разработана уникальная методика модификации поверхности слюды с помощью аминопропилтриэтоксисилана (APTES или АПТЭС). В результате на поверхности слюды формируется слой силана с терминальными аминогруппами толщиной менее 1 нм. После модификации поверхность слюды представляет собой атомарно гладкую поверхность, что соответствует условиям для дальнейших экспериментов с биомолекулами. Слюда, силанизированная по методикам [50], была использована в качестве субстрата в представленной работе.

Экспонированные на поверхности аминогруппы могут быть использованы для иммобилизации молекулярных зондов посредством формирования ковалентной связи между активными аминогруппами на поверхности и группами в составе биомолекулы. Ковалентная связь может быть организована непосредственно между группами белка и группами поверхности, как в случае, например, сульфогрупп биомолекулы и аминогрупп поверхности [51]. Другим способом функционализации поверхности для иммобилизации биомолекул является использование кросслинкеров.

Кросслинкеры представляют собой химические соединения, используемые для ковалентного связывания белков с носителями или конъюгирования биомолекул. Они обладают реакционноспособными фрагментами, специфичными для различных функциональных групп белков, пептидов или других молекулярных комплексов. Несмотря на сложную структуру белка, включающую композицию из 20 различных аминокислот, только небольшое количество функциональных групп можно использовать в качестве мишеней для связывания с кросслинкером. Большинство центров сшивки и химической модификации в белковой молекуле представлены первичными аминами (N-конец каждой полипептидной цепи и в боковой цепи остатков лизина; карбоксилы (С-конец каждой полипептидной цепи и боковые цепи аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты); сульфгидрилы (боковая цепь цистеина); карбонилы (результат окисления углеводных групп в гликопротеинах).

В зависимости от присутствующих функциональных фрагментов кросслинкеры можно разделить на несколько групп. Одним из самых популярных сшивающих агентов является глутаровый альдегид, который применяется для иммобилизации белка на сенсорных поверхностях с терминальными аминогруппами. Но существенным недостатком глутарового альдегида является способность увеличивать шероховатость аминосилановой поверхности, как было описано в работе Carvalho et al. [52]. Также реакция глутарового альдегида с белком приводит к образованию оснований Шиффа, которые нестабильны в кислых условиях, что вызывает потерю биологической функциональности поверхности.

Другой распространенный тип кросслинкеров представлен сложными эфирами N-гидроксисукцинимида, специфичными в отношении первичных аминогрупп. Широкое применение в практике нашли дитиобис (сукцинимидилкарбонат) (DSC), дитиобис (сукцинимидилпропионат) (DSP) И литиобис (сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP). Однако недостатком сшивающих агентов на основе сукцинимида является конкурирующая реакция гидролиза активных сукцинимидных групп [53], что вызывает ИХ деградацию И соответствующее уменьшение поверхностной плотности иммобилизованных молекул зонда на поверхности чипа.

Еще к одному типу кросслинкеров относятся фотокросслинкеры. В их структуре имеются функциональные группы, способные переходить в активное

состояние при облучении светом определенной длины волны. Яркими представителями фотокросслинкеров являются арилазиды. Именно арилазидный фотокросслинкер одним из первых был использован для иммобилизации белка на аминосилановой поверхности [54]. Основным недостатком использования арилазидов является необратимая фотоактивация азидных групп. Время жизни переходного состояния арилазидной группы весьма мало ~10-13 сек [55]. То есть, если во время активации арилаизидный фрагмент не взаимодействует с белком, который должен быть иммобилизован, его функциональность необратимо теряется.

В свою очередь, фотокросслинкеры на основе бензофенона лишены недостатка, связанного с необратимой потерей функциональности, типичной для арилазидов. Реакция бензофенона, преимущественно протекает с участием углеродводородных связей (С-Н) в составе белка. Следует подчеркнуть, что С-Н группы неактивны в случае использования других типов кросслинкеров. Бензофеноны претерпевают два перехода: $\pi - \pi^*$, переход с высокой энергией, и $n - \pi^*$, переход с более низкой энергией. Переход n – π * происходит при 330 – 365 нм и хорошо отделен от перехода $\pi - \pi^*$. Ультрафиолетовое излучение высокой энергии имеет тенденцию повреждать белки из-за спектрального перекрытия эндогенных флуорофоров (например, триптофана, тирозина, гистидина). Таким образом, низкоэнергетический переход $n - \pi^*$ делает бензофеноны более применимыми в биологических условиях. При облучении на соответствующей длине волны бензофенон генерирует триплетный кетилбирадикал, который может реагировать с функциональными группами белка через механизм последовательной абстракциирекомбинации. Фотохимической основой для формирования бирадикала является поглощение кванта (λ ~ 365 нм) хромофором бензофенона, который продвигает несвязывающий электрон на карбонильном кислороде в карбонильную π^* -орбиталь. Образовавшееся триплетное возбужденное состояние может абстрагировать водород в результате дефицита электронов на кетил-кислороде [56]. Механизм протекающей фотохимической реакции представлен на рисунке 3.1.



Рисунок 3.1 - Механизм фотохимической реакции, протекающей при использовании бензофенона

Бензофеноны нашли широкое применение в исследованиях сложных биологических систем, таких как белок-белковые взаимодействия [57]. Так, в работе [58] многофункциональный зонд на основе бензофенона был присоединен к пептиду посредством клик-реакции, катализируемой Си, с использованием двойных алкиновых фрагментов, чтобы сшить два разных аминокислотных остатка пептида и создать α-спираль, стабилизированную синтетической связкой, содержащей бензофенон. Последующее облучение при длине волны 365 нм позволило осуществить перекрестное связывание с взаимодействующими белками В непосредственной близости, что дало представление 0 белок-белковом взаимодействии. При применении к пептиду, производному от р53, полученный фотореактивный сшитый пептид был способен предпочтительно сшиваться с MDM2 (онкоген, препятствующий активирующему действию белка р53) в присутствии конкурирующего белка BSA.

Важной задачей является выявление сайтов, которые обеспечивают активность и опосредуют взаимодействия в биомолекуле. Так, окисление холестерина связано с несколькими видами рака и патологий, и считается, что оно происходит посредством внутримолекулярной абстракции водорода, опосредованной различными ферментативными и свободнорадикальными путями. В работе [59] холестерин был

модифицирован с помощью бензофенона в положении С7, что позволило исследовать возможные места абстракции водорода после фотооблучения. Подтверждая уже известное 38 местоположение абстракции водорода в С4, они также наблюдали аналогичное явление в положении С15, месте, которое является термодинамически неблагоприятным. Авторы предположили, что на основании их открытия активность и механизм холестерина могут сильно зависеть от топологии конкретного реагента, и что это открытие может представлять интерес для изучения реакционной способности поверхностной мембраны.

Используя подход с двойным сшиванием и иммобилизацией Jakubovska и соавторы [60] функционализировали N4 -цитидины с помощью бензофенона. Было показано, что фотоактивная ДНК подходит для прямого ковалентного перекрестного связывания как с взаимодействующими белками, так и с множеством хорошо известных твердых полимерных носителей. Одноцепочечная ДНК также смогла эффективно распознавать И гибридизоваться co своей комплементарной последовательностью, что еще больше расширило применимость этого подхода. Этот двойной подход предоставляет возможность для снижения функционализации и сохранения исходной активности в исследованиях олигонуклеотидов, так как модифицированные бензофенономцитидиновые нуклеиновые основания эффективно считываются и включаются несколькими ДНК-полимеразами, а терминальная дезоксинуклеотидтрансфераза TdT способна генерировать мультибензофенон-модифицированные олигонуклеотиды одноцепочечной ДНК.

Tsai et al. [61] продемонстрировали, что использование модифицированных APTES стеклянных чипов, обработанных кросслинкером SuccBB на основе бензофенона и бычьим сывороточным альбумином BSA, позволяет ковалентно связывать целевые белки, не нарушая их структурную конформацию. Wu и соавторы [62] продемонстрировали, что эффективность иммобилизации бычьего сывороточного альбумина на APTES-модифицированном кварце намного выше при использовании бензофенонового кросслинкера – по сравнению с таковой при использовании малеинового ангидрида.

Таким образом, основываясь на представленных литературных данных успешного применения соединений бензофенона в биологии и биотехнологии, коммерчески доступный N-сукцинимидиловый эфир 4-бензоилбензойной кислоты

(SuccBB) был выбран в качестве неспецифического кросслинкера для изготовления АСМ-чипов с функционализированной поверхностью на данном этапе работ.

3.2. Функционализация поверхности с помощью кросс-линкера на основе бензофенона

субстратов В качестве исходных для изготовления АСМ-чипов с функционализированной поверхностью были использованы пластины слюды, размерами 7,5 мм * 15 мм, со слоем аминосилана (APTES). Размер слюды обусловлен необходимостью использования стандартных одноразовых пробирок для работы, диаметр которых погрузить слюду в рабочие растворы. Как было отмечено в разделе 3.1, неспецифический фотокросслинкер SuccBB на основе бензофенона выступал в роли функционализирующего агента поверхности. На рисунке 3.2 представлена структурная формула SuccBB и схема протекающих химических реакций на аминосилановой поверхности.

A)



Рисунок 3.2 - А) структурная формула кросслинкера SuccBB; Б) схематическое изображение процесса функционализации поверхности аминослюды кросслинкером и последующей иммобилизации исследуемого белка на функционализированной поверхности.
Перед началом процесса функционализации поверхности АСМ-чипа проводились контрольные эксперименты для оценки чистоты используемых растворов: растворителя DMSO, отмывочных компонентов (деионизованная вода и этанол), 3,1 мМ раствора кросслинкера SuccBB в DMSO. Контрольные АСМизмерения проводились при сканировании поверхности слюды на АСМ для учета объектов, высотой более 1 нм. Согласно [50], шумовым сигналом являются максимум 500 объектов на 400 мкм2. Следовательно, на каждом полученном изображении, размером 5*5 мкм2, должно присутствовать не более 30 объектов. В случае оценки чистоты используемых растворов число таких частиц должно быть ниже, чем значение шумового сигнала (как правило не более 200 объектов на 400 мкм2.

На рисунке 3.3 представлены типичные ACM-изображения свежесколотой слюды после инкубации в 1 мл раствора DMSO (А) и 1 мл этанола, соответственно (Б).



Рисунок 3.3 - Результаты контрольных экспериментов: пример ACM-изображения поверхности свежесколотой слюды после инкубации в 1 мл DMSO (A) и 1 мл этанола, соответственно

Как видно из рисунка 3.3, после инкубации свежесколотой слюды в 1 мл DMSO и 1 мл этанола на поверхности практически не визуализируется объектов с высотами >1 нм, а значит, данные растворы могут быть использованы на дальнейших этапах функционализации поверхности.

Рабочая концентрация кросслинкера 3,1 мМ SuccBB в DMSO была 18

использована нами ранее в работе [63]. По результатам ACM-сканирования было установлено, что при концентрации кросслинкера в DMSO, предложенной в литературе (31мM), после инкубации на поверхности наблюдаются объекты до 10 нм, которые, предположительно, являются агрегатам нерастворенного кросслинкера. Поэтому далее, для работы, 31мM раствор был разведен в 10 раз, т.е. увеличено количество добавляемого растворителя и, тем самым, снижена концентрация кросслинкера.



Рисунок 3.4 - Фотографии аминосилановых слюд, при функционализации в капле раствора кросслинкера (A) и в объеме раствора кросслинкера (Б)

Ha этапе функционализации поверхности аминосилановой слюды кросслинкером SuccBB нами были опробованы две схемы (рисунок 3.4: 1) функционализация в капле кросслинкера; 2) функционализация в объеме (1 мл) кросслинкера. При активации в капле на поверхность аминосилановой слюды наносился объем кросслинкера 2 мкл, далее АСМ-чип инкубировался в закрытой чашке Петри в течение 18 часов во влажной среде (капли воды наносились по периметру чашки Петри вокруг слюды). В случае активации в объеме аминосилановая слюда помещалась в пробирку с 1 мл раствора кросслинкера и инкубировалась, при перемешивании на шейкере при комнатной температуре в течение 18 часов. На рисунке 4 показаны фотографии аминосилановых слюд, функционализированных в капле раствора кросслинкера и в объеме раствора кросслинкера, соответственно.

Далее следовала отмывка поверхности АСМ-чипов в три этапа: 1) 1 мл раствора

DMSO/этанол (1:1); 2) 1 мл деионизованной воды/этанола (1:1) (дважды) при T=40 оС и rpm=750.Состав отмывочных растворов был подобран из следующих соображений. Первый этап отмывки с DMSO предназначался для дополнительного растворения частиц кросслинкера, которые могли остаться на поверхности. Следующие два этапа предназначались для выведения в объем отмывочного раствора остатков DMSO и не растворившихся частиц с поверхности. По данным АСМ-сканирования было установлено, что в случае активации поверхности АСМчипа в объеме (1 мл) раствора кросслинкера число неспецифических частиц на поверхности не превышает установленного уровня шума 500 объектов на 400 мкм2. В случае функционализации поверхности аминослюды в капле кросслинкера на поверхности наблюдается большое число неспецифических объектов с высотами, достигающими 15 нм (рисунок 3.5, (А)). Это связано с подсыханием капли за 18 часов и концентрированием кросслинкера на поверхности. АСМ-чипы с такой поверхностью не подходят для необратимого связывания белков и дальнейшего АСМ-сканирования, так как биомолекулы будет невозможно отличить от неспецифических частиц. В случае функционализации поверхности АСМ-чипа в объеме (1 мл) кросслинкера, число неспецифических объектов с высотой >1 нм не превышает уровня шума (рисунок 3.5, (Б)). Таким образом, при составлении регламента нами была выбрана схема с активацией в объеме кросслинкера. Полученные АСМ-изображения функционализированной поверхности аминослюды после инкубации в капле и объеме раствора кросслинкера SuccBB представлены на рисунке 3.5.









Рисунок 3.5 – Результаты отработки схем функционализации поверхности: примеры ACM-изображения функционализированной поверхности аминослюды после инкубации в капле (A) и объеме раствора кросслинкера SuccBB (Б).

Время активации (18 часов) было выбрано для достижения полноты протекания химической реакции. В данном случае процесс активации поверхности протекает как реакция твердое тело-жидкость. Поверхность аминослюды представляет собой достаточно массивный твердый объект (7,5 мм * 15 мм) со слоем кросслинкера на границе раздела фаз. В реакции между твердым телом и жидкостью площадь поверхности твердого тела в конечном итоге влияет на скорость протекания реакции. Это связано с тем, что жидкость и твердое тело могут сталкиваться друг с другом только на границе раздела жидкость-твердое тело, которая находится на поверхности твердого тела, что может значительно снизить скорость протекания реакции.

Таким образом, для составления технологического регламента изготовления ACM-чипов с функционализированной поверхностью были выбраны следующие параметры: 1) пластины аминослюды, размерами 7,5 мм* 15 мм; 2) неспецифический фотокросслинкер на основе бензофенона SuccBB; 3) активация в объеме (1 мл) 3,1 мМ раствора кросслинкера SuccBB в течение 18 часов для полноты протекания химической реакции; 4) отмывка в три этапа с использованием растворителяDMSOu поверхностно-активных веществ (этанол и деионизованная вода).

3.3. Изготовление партии АСМ-чипов

Согласно пункту 6.1.1 Технического задания Соглашения Требования к экспериментальным образцам АСМ-чипов с функционализированной поверхностью были следующими:

-объем партии экспериментальных образов – не менее 50 штук в год;

-шероховатость поверхности чипа - не более 1 нм;

-размеры чипа (ширина и длина)- не более 9мм*15 мм;

-тип функционализации поверхности – функционализация неспецифическим кросс-линкером

По разработанному лабораторному регламенту, было изготовлено 54 экспериментальных образцов АСМ-чипа с функционализированной поверхностью, составлен акт изготовления (представлен в составе Пакета отчетной документации). Каждый из изготовленных чипов был исследован для оценки на соответствие требуемым параметрам. Около 15% от изготовленных чипов были не пригодны для проведения дальнейших экспериментов с растворами белков, так как не соответствовали требованию «шероховатость поверхности чипа - не более 1 нм» и на поверхности присутствовали загрязнения, значительно превышающие уровень шума. Было сделано предположение, что недостаточное качество поверхности может быть связано с наличием механических дефектов на поверхности аминослюды в виде сколов и трещин. В дальнейшем, при изготовлении чипов большее внимание будет уделено качеству исходных подложек, для этого была произведена закупка слюдяных подложек от разных производителей с различными параметрами качества.

Часть изготовленных АСМ-чипов была использована для проведения экспериментов по необратимому связыванию белков на функционализированной кросслинкером SuccBB поверхности АСМ-чипа. Эта часть экспериментальных работ была необходима для оценки эффективности процедуры функционализации поверхности и разработки «Методики детекции белков с использованием необратимого связывания на поверхности АСМ-чипа и последующим массспектрометрическим анализом в модельных системах», которая описана в разделе 4.

Таким образом, на данном этапе работ были подобраны оптимальные к настоящему моменту параметры для изготовления экспериментальных образцов ACM-чипов с функционализированной поверхностью. Большая часть чипов (75%) соответствует требованиям технического задания.

В соответствии с пунктом 1.3 ПГ и Техническим заданием Соглашения разработаны документы «Лабораторный регламент получения АСМ-чипов с функционализированной поверхностью» (файл «Пункт_ПГ-1.3-Лаб_регламент_v1») и составлен Акт изготовления экспериментальных образцов АСМ-чипов с функционализированной поверхностью (файл «Пункт_ПГ-1.3-Акт_нараб_v1»).

22

4. Разработка методики детекции белков с использованием необратимого связывания на поверхности АСМ-чипа и последующим массспектрометрическим анализом в модельных системах

Работы по разработке «Методики детекции белков с использованием необратимого связывания на поверхности АСМ-чипа и последующим массспектрометрическим анализом в модельных системах» по пункту 1.4 ПГ (далее по тексту Методика 1.4) были ориентированы по двум основным направлениям. Вопервых, выполнены экспериментальные работы для составления Методики 1.4 в части использования необратимого связывания на поверхности АСМ-чипа для концентрирования белков. В этих экспериментах проводился фишинг белка из раствора с использованием нового типа АСМ-чипов с функционализированной поверхностью. По результатам проведена оценка эффективности процедуры функционализации поверхности, а также подобраны предварительные условия необратимого связывания с поверхностью. Блок работ по этому направлению описан ниже в подразделе 4.1.

Второй блок экспериментальных работ был направлен на разработку Методики 1.4 в части масс-спектрометрической идентификации биомакромолекул на поверхности АСМ-чипа. В подразделах 4.2-4.3 описываются работы по идентификации биомолекул на поверхности АСМ-чипа, в рамках которых были выполнены:

 Идентификация белков, выловленных на поверхность нового типа ACMчипов, функционализированных фотокросслинкером с использованием ранее применяемых в ИБМХ методов MC-анализа;

2) Разработка нового метода MC-анализа, основанного на применении инжекторной приставки MALDI/ESI к масс-спектрометру Orbitrap Velos.

Также по пункту 1.4ПГ выполнены работы, направленные на исследование влияния электромагнитного воздействия на свойствах белковых растворов. Данный вид воздействия планируется использовать далее в работе для увеличения эффективности фишинга за счет воздействия электрических полей. Эти работы описаны в подразделе 4.4.

23

4.1. Разработка Методики 1.4 в части использования необратимого связывания белков с поверхностью АСМ-чипа

Часть изготовленных АСМ-чипов нового типа была использована для экспериментов необратимому проведения по связыванию белков на функционализированной кросслинкером SuccBB поверхность. Эта часть экспериментальных работ была необходима для оценки эффективности процедуры функционализации поверхности. В качестве модельных систем были использованы растворы белков в концентрации 10⁻⁹ М в воде или 2 мМ буфере PBSD или 2 мМ калий-фталатном буфере.

Для проведения экспериментов по неспецифическому ACM-фишингу были выбраны следующие белки: пероксидаза хрена (HRP), транстиретин (преальбумин, TTR) и бычий сывороточный альбумин (BSA). Изоэлектрическая точка этих белков различна, поэтому ожидалось, что эффективность связывания белков с поверхностью будет различна, что, в конечном итоге будет отражаться на эффективности необратимого связывания с поверхностью.

Пероксидаза хрена (HRP) – гем-содержащий фермент с молекулярной массой ~44 кДа [64]. Известны несколько изоформ этого фермента, однако наиболее распространенной являются С-изоформы HRP. В случае отсутствия отдельных указаний коммерческий препарат HRP состоит из смеси В и С изоформ, которые практически не различаются по химическим и каталитическим свойствам. Значения рІ этих изоформ HRP – основных компонентов большинства коммерческих препаратов – находятся в интервале от 5,75 до 9,63 [65]. Структура молекулы С изоформы ПХ в основном представлена несколькими α-спиралями и небольшой областью β-складчатого слоя и включает в себя ~18% углеводных остатков. В работе использован лиофилизированный препарат пероксидазы хрена (Sigma).

Транстеритин или преальбумин человека (TTR) является белком 18-ой хромосомы. Это сывороточный белок, синтезируемый в основном в печени. Представляет собой тетрамер с молекулярной массой 55 кДа. Преальбумин человека состоит из четырех идентичных нековалентно связанных мономеров из 127 аминокислотных остатков, расположенных с тетраэдрической симметрией. Значение pI составляет 4,7 [66]. В работе использован лиофилизированный препарат преальбумина (Sigma).

Бычий сывороточный альбумин (BSA) является модельным белком в различных исследованиях и состоит из 583 аминокислот. Это водорастворимый белок с молекулярной массой 66,4 кДа. Шесть α-спиралей образуют три гомологичных домена BSA. В зависимости от pH он претерпевает обратимую конформационную изомеризацию. Значение pI составляет 4,5 – 5 [67]. В работе использован лиофилизированный препарат BSA (Sigma).

Сток-растворы готовились из навесок растворением в 2 мМ PBSD буфере, 2 мМ калий-фталатном буфере или деионизованной воде для получения концентрации 10^{-4} М. Далее последовательным разведением готовились растворы белков, объемом 3 мл и концентрацией 10^{-9} М.

Для осуществления необратимого связывания белков на поверхности ACMчипа, функционализированной фотокросслинкером SuccBB, необходим источник УФ-излучения с длиной волны ~ 365 нм. Для достижения этой цели на данном этапе работ нами был выбран УФ-светодиод CMH268A4V111Z1-S4P1 (Bytech Electronics Co., Ltd) с пиковой длиной волны 360 – 370 нм и световым потоком 5000 – 7000 мВт. Установка для облучения была дополнительно оснащена двумя встроенными вентиляторами, предотвращающими перегревание как самого УФ-светодиода, так и раствора белка во время УФ-облучения. Фотоизображение собранной установки для облучения представлен на рисунке 4.1.



Рисунок 4.1 - Фотоизображение установки для УФ-облучения, собранной для процедуры необратимого вылавливания биомакромолекул на поверхность ACM-чипа (изображение установки без защитного экрана)

АСМ-чип с функционализированной фотокросслинкером поверхностью помещался в открытую чашку Петри, заполненную 3 мл раствора белка с концентрацией 10⁻⁹ М. Чашка Петри с реагентами закреплялась на шейкере и АСМчип инкубировался в растворе белка в течение 1 часа под действием УФ-облучения (см рисунок 4.1). Контрольные эксперименты проходили по аналогичной схеме с 1) некоторыми АСМ-чип с функционализированной изменениями: фотокросслинкером поверхностью инкубировался в растворе белка в отсутствии УФ-облучения; 2) аминослюда (без функционализации кросслинкером) инкубировался в растворе белка под облучением. По завершении инкубации в растворах белка АСМ-чипы отмывались от несвязавшихся молекул белка в три этапа в 1 мл 0,01% водного раствора эмульгена 913 и 1 мл деионизованной воды(дважды) в течение 30 минут на каждом этапе при T=37 °C.

Сканирование поверхности АСМ-чипов проводилось в автоматическом режиме на АСМ «Титаниум», входящем в состав УНУ «Авогадро».

На рисунке 4.2 представлены результаты АСМ-сканирования поверхности АСМ-чипа, функционализированной SuccBB, после инкубации в 3 мл 10⁻⁹ М раствора в 2 мМ PBSD HRP под УФ-облучением (А, рабочий эксперимент) и поверхности АСМ-чипа, функционализированной SuccBB, после инкубации в 3 мл 10⁻⁹ М раствора в 2 мМ PBSD HRP без УФ-облучения (В, контрольный эксперимент); Б, Г – соответствующие сечения. Как видно из рисунка 4.1, в случае рабочего эксперимента (А) на поверхности визуализируются фрагменты слоя высотой 1 – 1,5 нм. Эти фрагменты были отнесены к фрагментам белка, так как в случае контрольного эксперимента (В) подобных фрагментов не наблюдалось.

На рисунке 4.3 представлены результаты ACM-сканирования поверхности ACM-чипа, функционализированной SuccBB, после инкубации в 3 мл 10⁻⁹ M раствора преальбумина в 2 мМ PBSD под УФ-облучением (А, рабочий эксперимент) и поверхности ACM-чипа, функционализированной SuccBB, после инкубации в 3 мл 10⁻⁹ M раствора преальбумина в 2 мМ PBSD без УФ-облучения (В, контрольный эксперимент); Б, Г – соответствующие сечения.

Б)

A)



Рисунок 4.2 - Результаты оценки эффективности функционализации поверхности: примеры ACM-изображения поверхности ACM-чипа, функционализированной SuccBB, после инкубации в 3 мл 10⁻⁹ М раствора в 2 мМ PBSD HRP под УФ-облучением (А, рабочий эксперимент) и поверхности ACM-чипа, функционализированной SuccBB, после инкубации в 3 мл 10⁻⁹ М раствора в 2 мМ PBSD HRP без УФ-облучения (В, контрольный эксперимент). Б, Г – соответствующие сечения.

Как видно из рисунка 4.3, в случае рабочего эксперимента (A) на поверхности визуализируются фрагменты слоя высотой 1 - 1,5 нм. Эти фрагменты были отнесены к фрагментам белка, так как в случае контрольного эксперимента (B) подобных фрагментов не наблюдалось. Стоит отметить, что в случае контрольного эксперимента (Б) на поверхности визуализируются компактные единичные объекты с высотами 1 - 2, 5 нм, которые также могут быть отнесены к молекулам белка, так как ранее подобных объектов на поверхности не наблюдалось (изображение не представлено). Это можно объяснить сорбцией белка на поверхность ввиду изменения ее свойств после функционализации SuccBB – поверхность становится более гидрофобной.



Рисунок 4.3 - Результаты оценки эффективности функционализации поверхности Типичные ACM-изображения поверхности ACM-чипа, функционализированной SuccBB, после инкубации в 3 мл 10⁻⁹ M раствора в 2 мМ PBSD HRP под УФ-облучением (А, рабочий эксперимент) и поверхности ACM-чипа, функционализированной SuccBB, после инкубации в 3 мл 10⁻⁹ M раствора в 2 мМ PBSD HRP без УФ-облучения (В, контрольный эксперимент). Б, Г – соответствующие сечения.

На рисунке 4.4 представлены результаты ACM-сканирования поверхности ACM-чипа, функционализированной SuccBB, после инкубации в 3 мл 10⁻⁹ M водного раствора BSA под УФ-облучением (А, рабочий эксперимент) и поверхности ACM-чипа, функционализированной SuccBB, после инкубации в 3 мл 10⁻⁹ M водного раствора BSA без УФ-облучения (В, контрольный эксперимент); Б, Г – соответствующие сечения.

Как видно из рисунка 4.4, как случае рабочего эксперимента (А), так и в случае контрольного эксперимента (В) на поверхности визуализируются фрагменты слоя высотой 1 – 1,5 нм. Эти фрагменты были отнесены к фрагментам белка. Схожесть

результатов рабочего и контрольного экспериментов можно объяснить сильной сорбционной способностью BSA [68], которая часто используется в биоанализе для блокировки поверхности.



Рисунок 4.4 - Результаты оценки эффективности функционализации поверхности: примеры ACM-изображения поверхности ACM-чипа, функционализированной SuccBB, после инкубации в 3 мл 10⁻⁹ М водного раствора BSA под УФ-облучением (А, рабочий эксперимент) и поверхности ACM-чипа, функционализированной SuccBB, после инкубации в 3 мл 10⁻⁹ М водного раствора BSA без УФ-облучения (В, контрольный эксперимент). Б, Г – соответствующие сечения.

Результаты выполненных работ показали, что изготовленные в соответствии с технологическим регламентом ACM-чипы могут быть использованы в экспериментах по необратимому вылавливанию белков из модельных растворов белков. Белки регистрируются на поверхности с помощью ACM, но наблюдается несущественное различие между результатами рабочих экспериментов под действием УФ-облучения и контрольными экспериментами без УФ-облучения. На

следующих этапах работ. для решения данного вопроса планируется повышать качество УФ-облучения образцов, а также переходить к альтернативным схемам отмывки. Для повышения качества облучения закуплен специальный прибор (камера для облучения CL-3000L), который будет апробирован на втором этапе работ. Также будет апробирована схема отмывки, с использованием ультразвуковой ванны для эффективного удаления неспецифических частиц и не связавшихся белков с поверхности АСМ-чипов. Все изменения в процедурах, если они будут приняты по результатам экспериментов, будут отражены в изменениях к Методике 1.4.

4.2. Идентификация белков на поверхности АСМ-чипов, функционализированных фотокросслинкером

В работе использована часть АСМ-чипов, которые применялись ДЛЯ проведения экспериментов необратимому белков по связыванию на функционализированной кросслинкером SuccBB АСМ-чипа поверхности (подраздел 4.1). В серии экспериментальных работ с применением АСМ была проведена оценка эффективности процедуры функционализации поверхности. Далее необходимо было провести идентификацию выловленных биомолекул с помощью масс-спектрометрических (МС) методов. Для краткости в тексте данного подраздела, используется термин «образец» - биомакромолекулы, выловленные на функционализированную поверхность АСМ-чипа.

Для возможности MC-анализа необходимо провести триптический гидролиз белков на поверхности, т.к. последующая идентификация белка по триптическим пептидам проводится с использованием масс-спектрометрических и биоинформатических подходов. Идентификация белков производится сопоставлением измеренных и референсных и/или теоретических пептидных спектров по принципу пептидного отпечатка (Peptide Mass Fingerprint).

4.2.1. Разработка методики для подготовки образцов к МС измерению:

Подготовка образцов перед масс-спектрометрическим анализом является одним из наиболее трудоёмких и важных этапов аналитической процедуры.

Для возможности идентификации белков, сконцентрированных на поверхности чипа необходимо провести процедуру расщепления белков на пептидные фрагменты. Для этого используется протеолиз. Мы используем гидролиз с применением трипсина (например, [69], так как трипсин специфически расщепляет пептидные связи по карбоксильной группе лизина и аргинина. В результате гидролиза (трипсинолиза) получается набор триптических пептидов массой от 600 до 4000 Да. Трипсин обладает рядом уникальных свойств, которые делают его наиболее популярным типом протеаз для масс-спектрометрического анализа. Расщепление трипсином обычно дает пептиды с молекулярной массой меньше 3 – 4 кДа. Известно, что пептиды в этом диапазоне масс легко измеряются методом MALDI [70].

Гидролиз белков, выловленных на поверхность ACM-чипа, проводится раствором трипсина концентрацией 10^{-6} M в 150 мМ бикарбонатном буфере, pH=7,5. Эта стадия отражена в разработанной Методике 1.4, т.к. известно, что трипсин наиболее активен при pH 7,0-8,0 и температуре примерно 37 – 40 °C. Поэтому хранят трипсин в кислом растворе и холоде, а для самой реакции применяют буфер, имеющий более высокий показатель pH, например, бикарбонатный буфер.

Для большей уверенности следует оценить pH получившихся растворов при помощи индикаторной ленты (Universal Indikator papier pH Fluka). Работать следует быстро, так как при попадании трипсина в щелочной буфер, вскоре начинается процесс автолиза трипсина, и вместо целевых белков фермент начинает расщеплять сам себя.

Пробирка выбиралась в зависимости от размера АСМ-чипа, с целью полностью покрыть раствором слюду с использованием минимального количества триптического раствора. Добавляемый к слюде объем бикарбонатного буфера варьировался от 200 до 1000 мкл. Оптимальный объем выбирался в зависимости от размера слюды и количества вещества на слюде. В процессе подбора условий был выбран оптимальный объем раствора для триптического гидролиза, который составил 450 мкл.

Пробирку рекомендовано помещать в сушильный шкаф в горизонтальном положении. Таким образом объема раствора нужно меньше, чтобы покрытие слюды раствором было равномерное.

Белок гидролизуется трипсином 17-19 часов при температуре 40 ^оС. После гидролиза смесь высушивалась на центрифужном концентраторе (Eppendorf,

31

Германия) при температуре 35-45 ^оС около 5-8 часов в зависимости от исходного объема раствора белка.

При разработке Методики 1.4 был добавлен шаг промывания ацетонитрилом слюды с двух сторон для полного снятия пептидов белка растворителем в пробирку с сухим веществом: с двух сторон смываются оставшиеся пептиды ацетонитрилом по 20 мкл с каждой стороны в исходную пробирку, затем чип удаляется.

Полученный раствор высушивается на центрифужном концентраторе при температуре 35-45 0С до объема 10 мкл, далее добавляется в пробирки деионизованной воды по 15 мкл. Раствор в пробирке помещается в термостатический шейкер на 15 минут при температуре 21 °C, далее в центрифугу на 1 минуту PRM 4000 об/мин, MIX 1.

Существует сопутствующая проблема увеличения концентрации солей в образцах, мешающих масс-спектрометрическому анализу, которую можно решить стандартной методикой обессоливания ZipTip C18 [71].

Поэтому в Методику1.4 была добавлена процедура обессоливания пептидов с помощью ZipTip C18 (Millipore, CША) по протоколу производителя. Объем обессоленной смеси высушивается на центрифужном концентраторе (Eppendorf, Германия) при температуре 45 ⁰С. После процедуры обессоливания и высушивания добавляется 15 мкл деионизованной воды и смесь перемешивается на шейкере Eppendorf AG около 10 минут. Таким образом образец готов для измерений на масс-спектрометре.

Введение этапа обессоливания потребовалось по причине неудовлетворительного качества масс-спектра из-за присутствия большого количества солей в образце после процедуры гидролиза. Обессоливание образцов на ZipTip C18 увеличило эффективность масс-спектрометрического детектирования и последующей идентификации пептидов, см Рисунок 4.5. После обессоливания на масс-спектре детектировано 8 m/z пептидов, по сравнению с 2 пептидами до очистки на ZipTip C18.



Рисунок 4.5 - Спектры образцов: A) — раствор, прошедший процедуру обессоливания, B) - раствор без процедуры обессоливания.

4.2.2. МС-измерения

Матрицы для MALDI — нелетучий твердый материал, обеспечивающий процессы десорбции и ионизации посредством поглощения лазерного излучения. Матрицы используются в MC-анализе для увеличения эффективности десорбции образцов с поверхности.

Для проведения эксперимента были выбраны 2 матрицы для положительной ионизации: альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота и 2,5-дигидроксибензойная кислота. Обе матрицы подходят для исследования пептидов.

Приготовление матрицы

В работе использованы 2 матрицы: НССА (Альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота); DHB (2, 5-дигидроксибензойная кислота).

Допускается использование двух точек MALDI-MS анализа с разными матрицами, поскольку от выбора матрицы зависит интенсивность пиков пептидов.

Две матрицы были растворены в смеси 50 % ацетонитрила, 49,3 % деионизованной воды и 0,7 % TFA, с концентрацией 10 мг/мл (HCCA) или 40 мг/мл матрицы (DHB) по протоколу производителя (Bruker Daltonics). Ацетонитрил был

выбран в качестве растворителя, так как матрица НССА плохо растворима в воде.

Растворы матрицы опускали в ультразвуковую ванну на 7 минут при температуре 35 ⁰C. При большом объеме матрицы время экспонирования в ультразвуковой ванне можно увеличить до 15 минут, визуально оценивая отсутствие осадка на дне пробирки.

Оптимальный суммарный объем нанесения матрицы и образца составил 2 мкл на точку, так как при большем объеме капля может растекаться и сливаться с другими образцами.

Преимущественный выбор DHB матрицы для MALDI был определен из-за более высокой интенсивности пиков пептидов на масс-спектре по сравнению с HCCA в большинстве случаев (рисунок 4.6).



Рисунок 4.6 - Спектры образцов: *А*) – раствор с нанесением DHB матрицы, *B*) – раствор с нанесением HCCA матрицы.

Процедура подготовки образца для МС

Два ключевых фактора могут влиять на качество MALDI спектров: матрица и техника, используемая для нанесения матрицы. Для того, чтобы выяснить разницу в способах нанесения матрицы, были проведены эксперименты, идентичные по другим условиям, но нанесение матрицы проводилось Змя способами. В каждом эксперименте: матрица, мишень и образец (в этой серии экспериментов использована пептидная смесь вместо образцов с поверхности ACM-чипов), температура в термошкафу и прочие условия были одинаковыми. Эксперименты

были проведены параллельно.

1-ый способ: послойное нанесение образца и матрицы

На мишень MALDI MTP384 масс-спектрометра (Bruker Autoflex) наносилось по 1 мкл каждого образца.

Далее наносилась матрица 0,5 мкл матрицы НССА или DHB.

Затем мишень выдерживалась в сушильном шкафу 10 минут при температуре 40°С до полного высыхания.

<u>2-ой способ: послойное нанесение образца и матрицы с высушиванием слоя</u>

На мишень MALDI MTP384 масс-спектрометра (Bruker Autoflex) наносилось по 1 мкл каждого образца.

Затем мишень выдерживалась в сушильном шкафу 10 минут при температуре 40°С до полного высыхания.

Далее наносилась матрица 0,5 мкл матрица НССА или DHB.

Затем мишень выдерживалась еще раз в сушильном шкафу 10 минут при температуре 40°С до полного высыхания.

<u>3-ий способ: нанесение смеси матрицы и образца</u>

В отдельной пробирке образец смешивали в равных объемах с матрицей (HCCA или DHB) и перемешивали в ультразвуковой камере.

На мишень MALDI MTP384 масс-спектрометра (Bruker Autoflex) наносилось по 2 мкл каждой смеси образца с матрицей.

Затем мишень выдерживалась еще раз в сушильном шкафу 20 минут при температуре 40°С до полного высыхания.

В результате проведенных экспериментов, на основе качества полученных спектров установлено, что наиболее подходящим является 2-ой способ нанесения матрицы. Спектр в этом случае более стабильный между различными областями сканирования, наблюдается более равномерная кристаллизация матрицы.

Для эффективной идентификации далее может быть использовано послойное нанесение вещества и матрицы с высушиванием слоя образца. Именно эта процедура подготовки была внесена в Методику 1.4.

Интерпретация результатов анализов, полученных с использованием системы MALDI-TOF:

Разработка Методики в части анализа результатов МС измерений и

35

идентификации образцов с поверхности АСМ-чипов была проведена в несколько этапов, на которых выбирался самый эффективный и быстрый способ обработки МС-данных. Для выбора оптимальной обработки были использованы результаты идентификации биомакромолекул, экспериментов по выловленных на функционализированную поверхность АСМ-чипа. В работе использованы следующие образцы:

- 1) Модельный раствора белка 10⁻⁹ моль/л, после процедуры гидролиза;
- и 3) рабочий и контрольный образцы смывы пептидной смеси с поверхности рабочего и контрольного АСМ-чипа после процедуры трипсинолиза (см раздел 4.1.1).

Для того, чтобы идентифицировать пики, относящиеся только к исследуемому белку (пики спектра, полученные для рабочего образца) следует провести сравнение со спектрами референсных образцов (раствор белка и контрольный образец), с целью выявления несоответствующих пиков. Для анализа спектров был применена следующая обработка:

- 1) В программе Flex Analysis проведено сравнение пиков спектров, полученных для контрольного образца и рабочего образца.
- 2) В программе Flex Analysis проведено сравнение пиков спектров, полученных для раствора, контрольного образца и рабочего образца.
- 3) В программе Flex Analysis все графики были совмещены на одном графике.
- 4) Проанализированы повторяющиеся пики во всех спектрах.
- 5) Проанализированы все спектры пептидов, полученных для рабочих и контрольных образцов.

Для выявления несовпадающих пиков наиболее эффективным является анализ всех образцов на одном графике, а также сравнение графиков контрольного образца с рабочим, см Рисунок 4.7.



Рисунок 4.7- Обработка данных МС-анализа в программе Flex Analysis. Спектры всех образов совмещены на одном графике.

4.2.3. Этапы МС-измерений в Методике 1.4.

После расщепления образца протеазой (трипсином) и получения триптических пептидов в первую очередь проводится калибровка с использованием стандартов («Peptide Calibration Standard» и «Protein Calibration Standard II», Bruker Daltonics, Германия), и далее анализ образцов методом MALDI-TOF.

Для анализа смесь пептидов, полученную после ферментативного гидролиза трипсином, наносят на мишень МТР384 с использованием матрицы DHB или HCCA (используя послойное нанесение пептидного раствора и матрицы). Регистрируют спектры образцов - экспериментальное определение молекулярных масс пептидов. Следующий шаг – виртуальный гидролиз трипсином всех белков в базе данных Peptide Mass Fingerprint (Mascot Daemon, Matrix Science, London, UK) в случае, если известен белок (т.е. использован модельный раствор известного белка в известной концентрации), и определяются массы этих пептидов.

В заключение анализа происходит установление соответствия между предсказанными массами пептидов и молекулярными массами, полученными экспериментально на масс-спектрометре MALDI-TOF.

При обработке данных важно учитывать, что для пробоподготовки анализа на стадии гидролиза использован трипсин. Этот фермент расщепляет белки по связи Lys – X и Arg – X (где X — любая аминокислота, отличная от Pro и Hyp). В результате триптического гидролиза (трипсинолиза) получается набор пептидов массой 500–4000 дальтон триптических пептидов. Таким образом, объектом массспектрометрического анализа становится смесь пептидов, являющихся фрагментами исходных белков. Данная информация используется при биоинформатическом анализе результатов МС измерений.

Разработка методики биоинформатического анализа результатов МС измерений и идентификации белков была проведена в несколько этапов. Для выбора оптимального метода были использованы результаты МС-идентификации образцов, описанных в подразделе 4.2.2 (*Интерпретация результатов анализов, полученных с использованием системы MALDI-TOF*). Были проведены различные способы обработки результатов для оценки результатов идентификации белка в образце в зависимости от комбинации рабочих и референсных образцов. Ниже указаны этапы обработки данных после получения экспериментальных данных – спектров образцов

Способ обработки полученных данных при использовании в качестве референсного раствора модельного белка и контрольного образца

Данный способ применяется на этапах разработки методики анализа, в случае, когда для необратимого вылавливания используются модельные растворы белков, т.е. исследуемым объектом для идентификации являются известные белки в растворе с известной концентрацией.

- 1) Анализ спектра раствора белка, в программе Flex Analysis по параметрам m/z, S/N, Resolution, Intensity, Area.
- Расчет m/z пептидов с окисленным метионином, с заменой протона на катион натрия и калия.
- 3) Визуализация спектра рабочего образца в программе Flex Analysis.
- 4) Визуализация спектра контрольного образца в программе Flex Analysis.
- 5) Выведение всех спектров на один график в Analysis List и выделение всех пиков с S/N> 3.
- 6) Анализ спектра раствора белка.
- 7) Анализ спектра контрольного образца.

- Сравнение спектров по пункту 5 со спектрами по пп 6,7. Выделение пиков спектров, относящихся только к рабочему образцу.
- 9) Анализ пиков, найденных в спектре рабочего образца при выполнении п.8,с использованием ресурса сайта <u>https://www.matrixscience.com/.</u>

Mascot Daemon (Matrix Science, London, UK)

Условия поиска:

- a. Peptide Mass Fingerprint
- b. Allow up to 2 missed cleavages
- c. Database SwissProt
- d. Variable modifications Oxidation(M)
- e. *Peptide tol.* ± 10 ppm
- f. Mass values MH+
- g. *Тахопоту* выбрать параметр, относящийся к виду
- *h*. Применить *Decoy*
- i. Пики m/z модельных растворов в Data input
- ј. Начать поиск
- k. Выбрать из списка предложенных нужный модельный белок, проверить удовлетворяет ли критериям достоверности идентификации:
 - і. Вероятность определения белка более 95%
 - *ii.* False Discovery Rate (*FDR*) <1%
- Указать покрытие аминокислотной последовательности и процент покрытия для каждого рабочего образца.
- Если требуется, дополнить данные, найденные в автоматическом режиме, данными, найденными вручную.
- Провести анализ аминокислотной последовательности и расчёт процентного соотношение покрытия вещества в зависимости от полного размера для 3-х повторов каждого эксперимента (при наличии).
- 9) Представить результаты анализа (пример приведен на рисунке 4.8, включающие:
 - Количество пиков для каждого образца и процент покрытия;

- Разницу в количестве найденных пиков для рабочего образца и референсных (раствор белка и контрольный образец);
- Разницу в покрытии последовательности;
- Пояснение результатов.



Рисунок 4.8 - Пример оформления результатов обработки данных MC-анализа в форме таблицы.

Способ обработки полученных данных при использовании в качестве референсного раствора модельного белка и пептидной карты

Данный способ также применяется на этапах разработки методики анализа, в случае, когда для необратимого вылавливания используются модельные растворы белков, но дополнительно применяются пептидные карты UniProt, извлеченные из существующей базы данных.

- 1) Визуализация спектра раствора белка, в программе Flex Analysis.
- 2) Анализ данных, а именно определение m/z пиков, S/N, Resolution, Intensity, Area.
- 3) Составление пептидной карты триптического гидролиза с помощью

программы PeptideMass (https://web.expasy.org/peptide_mass/; Swiss Institute of Bioinformatics) для аминокислотной последовательности модельного белка из UniProtKB (Last modified February 2, 2021 The Universal Protein Resource) с разрешенными пропущенными сайтами гидролиза (не более двух). Для полученных пептидов теоретического гидролиза рассчитать величины m/z = [M+H]⁺, где M – молекулярная масса пептида, H - масса протона.

- Расчет теоретических значений m/z пептидов с окисленным метионином, с заменного протона на катион натрия и калия, добавить к данным в пептидной карте.
- 5) Сопоставление и выделение m/z пиков на спектре раствора белка, с пептидной картой для этого белка с точностью 10 ppm.
- 6) Выделение пиков m/z, совпадающие с пептидной картой;
- 7) Визуализация спектра рабочего образца в программе Flex Analysis.
- 8) Визуализация спектра контрольного образца в программе Flex Analysis.
- Выведение трех спектров на один график в Analysis List и выделение пиков с S/N> 3;
- 10)Сравнение пиков выделенных в пункте 9), с пиками спектра, выделенными в п 5). выделение совпадающих.

11)Анализ пиков образцов сайте <u>https://www.matrixscience.com/.</u>

Mascot Daemon (Matrix Science, London, UK)

Условия поиска:

- a. Peptide Mass Fingerprint
- b. Allow up to 2 missed cleavages
- c. Database SwissProt
- d. Variable modifications Oxidation(M)
- e. *Peptide tol.* ± 10 ppm
- f. Mass values MH+
- g. *Тахопоту* выбрать параметр, относящийся к виду
- *h*. Применить *Decoy*
- i. Пики m/z модельных растворов в Data input
- ј. Начать поиск

- к. Выбрать из списка предложенных нужный модельный белок, проверить удовлетворяет ли критериям достоверности идентификации:
 - і. Вероятность определения белка более 95%
 - *ii.* False Discovery Rate (*FDR*) <1%
- 12)Если требуется, дополнить данные, найденные в автоматическом режиме, данными, найденными вручную.
- 13)Провести анализ аминокислотной последовательности и расчёт процентного соотношение покрытия вещества в зависимости от полного размера для 3-х повторов каждого эксперимента (при наличии).
- 14)Представить результаты анализа, включающие: должен включать:
- Количество пиков для каждого образца и процент покрытия
- Разницу в количестве найденных пиков для 3 образцов
- Разницу в покрытии последовательности
- Пояснение результатов

Поскольку биоинформатический анализ трудоемкая задача с множеством вариантов, нами были выбраны наиболее информативные и быстрые этапы обработки в случае анализа модельных растворов (т.е. выбран способ с использованием пептидных карт). Перед анализом MALDI - ТОГ стоит оценить наличие пептидной карты в базе данных (поиск происходит по уникальному идентификационному номеру и названию модельного белка, используемого для обнаружения), а также наличие референсных образцов. Обработка результатов предоставляет информацию о наличии пиков в полученных спектрах, соответствующим пептидам белка., следовательно белок, необратимо выловленный поверхность АСМ-чипа (рабочий образец), быть на может однозначно идентифицирован. Часть обработки полученных данных также вошла В представленную в составе отчетной документации Методику 1.4.

4.3. Разработка нового метода MC-анализа, основанного на применении инжекторной приставки MALDI/ESI к масс-спектрометру Orbitrap Velos

Разработка новых методов МС-анализа обусловлена необходимостью повышать чувствительность комбинированного метода анализа ACM/MC. Согласно полученным нами ранее данным [72] комбинированная система ACM-MC

обеспечивает повышение концентрационной чувствительности массспектрометрических методов по сравнению с измерениями в растворе, но повышение составляет не более чем на 2 порядка. Поэтому, если использовать АСМ/МС для профилирования биологических образцов, в том числе для поиска низкокопийных неизвестных белков, то чувствительности существующего подхода может быть недостаточно даже в случае необратимого связывания всех Предполагается, биомакромолекул с поверхностью чипа. что потеря чувствительности анализа происходит, в том числе, при подготовке образцов – элюировании триптической смеси с поверхности (как описано в разделе 4.2.1). Неполнота элюции может быть причиной потери чувствительности анализа. Поэтому в рамках проекта предлагается разработать новый подход на основе инжекторной приставки MALDI к масс-спектрометру Orbitrap Velos. Приставка позволяет проводить десорбцию пептидов непосредственно с поверхности чипа, т.е. исключить стадию элюции. При этом образец поступает в масс-спектрометр, позволяющий проводить высокочувствительное профилирование – установить состав биомакромолекул, выловленных на поверхность АСМ-чипа. Однако, готового решения для использования этой системы в комбинации ACM/MC нет. Одной из проблем, которые необходимо решить является особенности поверхности АСМ-чипа: чип изготавливается на основе слюды и его поверхность не является проводящей, т.е. не подходит для метода MALDI. Эта проблема может быть решена двумя способами – подбором условий нанесения матрицы непосредственно на поверхность чипа или изменением поверхности, например за счет напыления металлов в виде атомарно-ровного слоя.

За отчетный период выполнена часть работ по решению вышеуказанной проблемы первым способом и отрабатывался метод нанесения матрицы для экспериментов на инжекторной приставке MALDI к масс-спектрометру Orbitrap Velos. Второе направление будет реализовано на последующих этапах.

Матрица — вещество, обеспечивающее процессы десорбции и ионизации аналита с поверхности посредством поглощения лазерного излучения. Основные преимущества матрицы заключаются в ее высокой способности поглощать лазерное излучение; кристаллизоваться с включением в структуру молекул анализируемого вещества, отличной растворимости в растворителях, используемых для образца, низкой летучести в условиях вакуума.

В качестве матрицы в методике используется твердотельная (в виде порошка) слабая органическая кислота – DHB матрица. Растворитель был подобран по протоколу производителя Bruker.

Для успешного проведения анализа необходимо правильно выбрать не только матрицу, растворитель, отношение между матрицей и аналитом, а также способ нанесения. Важно учитывать, чтобы кристаллизация матрицы и анализируемого вещества проходила одновременно, сопровождаясь встраиванием молекул анализируемого вещества в кристаллы матрицы, что является необходимым условием получения хорошо разрешимого спектра [73]. Для этого нужно равномерное нанесение матрицы, что в случае анализа высококонцентрированных образцов не существенно влияет на чувствительность анализа, а при анализе малого количества биомакромолекул на поверхности становится проблемой.

В разработке методики были использованы две подложки и различные методы нанесения матрицы на подложку с пептидами. Отрабатывалось нанесение с помощью роботизированной ультравысокоточной системы (споттера) iONE-600 (M2-Automation GmbH, Берлин, ФРГ, прибор в составе УНУ «Авогадро»). Раствор различного состава наносился на подложку - ITO слайды, и в экспериментах подбирался состав с добавлением глицерина - вещества, влияющего на вязкость раствора и его способность к высыханию. Также проведена серия по нанесению пептидов на вторую подложку - NALDI мишень. ITO слайды являются рекомендованными производителями подложкой при использовании MALDI приставки. NALDI мишень в качестве подложки использована по причине гидрофобных свойств ее поверхности (будет описана ниже в соответствующем подразделе). Пептидная смесь в проведенных экспериментах имитировала триптическую смесь на поверхности АСМ-чипа после процедуры трипсинолиза, а использование поверхности с известными свойствами (ITO слайды и мишень NALDI) вместо ACM-чипа позволило нивелировать непроводящие свойства поверхности, и, во время методической части работы, исключить этот фактор из рассмотрения.

44

4.3.1. Выбор оптимальной подложки для MALDI-Orbitrap и метода нанесения матрицы

Выбор DHB матрицы основан на полученных результатах - в этом случае наблюдался более интенсивный спектр пептидов, чем при использовании HCCA, CHCA или Sinapinic acid матриц.

Согласно литературным данным [74] производные коричной кислоты обладают недостатками для масс-спектрометрического анализа, особенно а-циано-4гидрокси-коричная кислота (СНСА) и синапиновая кислота (Sinapinic acid). Недостатком СНСА матрицы является генерация сравнительно «горячих» ионов аналита, которые в конечном итоге раскладываются в масштабе времени массспектрометрического анализа. Кроме того, СНСА менее подходит для других типов биомолекулы, как пептиды. Синапиновая кислота производит «охлаждение» ионов и, таким образом, лучше подходит для анализа белков. Однако эта матрица имеет тенденцию образовывать комплексы аддуктов с белками.

Отработка методики на ІТО слайдах

Отработка методики прецизионного нанесения малого количества матрицы в точку с анализируемым веществом проводилась с использованием роботизированной ультравысокоточной системы (споттера) iONE-600 (M2-Automation GmbH, Берлин, ФРГ, прибор УНУ «Авогадро»). Цель разработки –получение спектра высокого разрешения в каждой точке десорбции пептидов с поверхности при обработке лазером приставки. Для достижении цели выполнялась отработка методики нанесения с помощью робота-раскапывателя.

В работе использованы: калибровочный пептид Angiotensin II (m/z = 1046,5) от компании Bruker для нанесения, концентрация 10⁻⁶ моль/л; матрица DHB 40 мг в 1 мл, разведенная в 50% ACN и 0,7% TFA.

Калибровочный пептид и матрица наносились на поверхность слайда, регистрировались спектры. Варьировались условия отмывки поверхности перед стадией нанесения матрицы. Отмечалось качество полученных спектров.

Согласно полученным данным выбрана схема отмывки с использованием спирта и ацетонитрила:

- Отмывка в спирте 30 минут в ультразвуковой ванне
- Отмывка в ACN 1 час минут в ультразвуковой ванне

45

- Отмывка в деионизованной воде 30 минут в ультразвуковой ванне
- Просушивание 2 минуты азотом
- Высушивание в сушильном шкафу 10 минут.

После стадии отмывки поверхности проводилась проверка чистоты поверхности по сравнению с чистотой до отмывки. Проверка проводилась на основе качества спектра, полученного с поверхности, на которую нанесено 1 мкл матрицы.

Раствор матрицы DHB перед нанесением помещался в ультразвуковую баню на 7 минут.

При помощи споттера iONE-600, укомплектованного специализированным дозатором M2MD, проводилось нанесение калибровочного пептида на ITO слайд (ITO-Coated Glass Unpolished Slides 30-60 ohms 25 x 75 mm Pk(25)) по запрограммированной заранее карте, с последующей сушкой в течение 10 минут. Далее в точки с нанесенным на предыдущем этапе пептидом, также при помощи споттера, прецизионно наносилась матрица в уменьшенном количестве (в 2 раза). Аналогично матрица наносилась с помощью автоматической пипетки. Фотоизображения слайда с нанесёнными каплями приведен на рис.4.9. Фотоизображение капель также использовалось для оценки качества нанесения матрицы



Рисунок 4.9- Фотоизображения слайда с нанесёнными каплями образца и матрицы. Слева на слайде -массив капель нанесен раскапывательной системой, справа – автоматической пипеткой.

Поверхность слайда была проанализирована на MALDI-Orbitrap Velos. Спектр регистрировался для каждой точки в массиве капель.

По результатам экспериментов сделан вывод о неравномерной кристаллизации матрицы даже в маленькой капле, нанесенной споттером. Спектр, полученный с такой поверхности нестабилен, режим SRM использовать не удалось. Пример изображения, полученного в этом случае приведен на рис.4.10. Неравномерная кристаллизация матрицы является, по-видимому, причиной нестабильного спектра, так как происходит недостаточное накопление ионов для регистрации в отдельных точках. Было принято решение изменить состав раствора матрицы и добавить глицерин.



Рисунок 4.10 - Пример фотоизображения капли после высыхания, нанесенной на поверхность слайда при помощи споттера iONE-600.

Анализ литературы позволил найти исследования [75] в которых предложены способы повышения чувствительности масс-спектрометрического анализа с применением MALDI. Так, в этой работе показано, что добавление глицерина к раствору матрицы привело к увеличению соотношения сигнал/шум (S/N) при анализе пептидов и, таким образом, к большему охвату белковых последовательностей и упрощению поиска белка в базе данных.

Также в работе [74] показано, что добавка глицерина способствует равномерной кристаллизации раствора. В данном исследовании представлен протокол пробоподготовки DHB матрицы при добавлении глицерина. Частично, этот протокол использован нами в дальнейшей работе. Матрица DHB с глицерином подходит для анализа соединений, которые необходимо стабилизировать в глицерине. Поэтому на следующем этапе разработки Методики 1.4 были проведены экспериментальные работы, целью которых было достижение равномерное кристаллизации раствора матрицы на поверхности слайда при высыхании.

Отработка методики равномерной кристаллизации матрицы

В работе использованы калибровочные пептиды: Angiotensin II (m/z = 1046.5), Tryptic Digest of Bovine Serum Albumin (BSA) и Peptide Calibration Standard от компании Bruker, концентрация 10^{-6} моль/л. Также использован водный раствор BSA с концентрацией 10^{-6} моль/л. Также использован ITO слайд после следующих стадий отмывки:

- Отмывка в спирте 50 минут, рекомендуемый объем 45 мЛ
- Отмывка в АСМ 1 час, рекомендуемый объем 45 мЛ
- Отмывка в деионизованной воде 50 минут, рекомендуемый объем 45 мЛ
- Просушивание азотом 1 минута
- Высушивание в сушильном шкафу 10 минут
- Проверка чистоты на масс-спектрометре MALDI TOF/TOF Bruker.

Калибровочный пептид (смесь пептидов или раствор белка) и матрица DHB (40мг/мл) наносились на поверхность слайда с использованием послойного нанесение, оценивалось качество полученных спектров. Раствор матрицы, с различным содержание глицерина готовился следующим образом:

- Разведение 2 г DHB в 100 мл деионизованной воды. Была выбрана наименьшая рекомендуемая концентрация DHB, так как растворимость в воде DHB матрицы составляет до 20 мг/мл.
- 2. Раствор помещается в ультразвуковую ванну на 10 минут.
- К 100 мл DHB добавляется 8, 16 или 40 мкл смеси глицерина и метанола (2:1).
- 4. Смесь помещается на 10 минут в ультразвуковую ванну.
- 5. Добавляется раствор пептида/пептидов или белка к 10 мкл смеси матрицы с глицерином добавляется:10 мкл Angiotensin II с концентрацией 10⁻⁶ моль/л; или 10 мкл BSA с концентрацией 10⁻⁶ моль/л; или 10 Peptide Calibration Standard с концентрацией 10⁻⁶ моль/л.
- 6. Все три пробы выдерживаются в ультразвуке 4 минуты.
- С помощью споттера раствор пептида/пептидов или белка наносится на ITO слайд по намеченной заранее карте, и высушивается 20 минут.
- 8. На каждую точку с растворами, нанесенную в пункте 5, далее, с

помощью споттера наносится в два раза меньшее количество раствора матрицы.

- ITO слайд помещается в вакуумную камеру для высушивания при 10⁻³ mBar на 5 часов.
- 10. Готовые образцы анализируются на Orbitrap Velos с инжекторной приставкой MALDI, спектры регистрируются для каждой точки в массиве.

Качество нанесения также контролируется визуально по фотоизображениям.

Необходимость высушивания в вакуумной камере вызвана выявленной проблемой долгого высыхания капли на поверхности слайда. Как показано на рисунке 4.11 капля высыхает даже в вакуумной камере при 10⁻³ mBar в течение 5 часов.

В результате проведенной серии экспериментов показано, что добавление глицерина к раствору матрицы обеспечивает более равномерную кристаллизацию матрицы, чем при отсутствии глицерина в растворе. Оптимальным принят объем 8 мкл смеси глицерина и метанола (2:1).



Рисунок 4.11 - Фотоизображение микрокапли смеси пептидов и матрицы с глицерином на поверхности слайда после нанесения массива при помощи споттера iONE-600. а) сразу после нанесения; б) после сушки в вакуумной камере

Наблюдение за кристаллизацией капли при условии ручного раскапывания, т.е. с применением автоматической пипетки, проведено с использованием раствора пептида Angiotensin II, матрицы DHB. Добавлено добавлении 8 мкл смеси глицерина и метанола (2:1). На ITO слайд нанесли 1 мкл раствора пептида и 1 мкл раствора

матрицы. Капля была высушена в вакуумной камере (см. рисунок 4.12). Как видно из рисунка наблюдается равномерное высыхание капли.



Рисунок 4.12 - Фотоизображение капли смеси пептида и матрицы с глицерином на поверхности слайда после нанесения с помощью автоматической пипетки и сушки в вакуумной камере

<u>Отработка методики с использованием NALDI мишени</u>

NALDI мишень была использована как альтернативная подложка ITO слайду. Согласно литературным данным, наноструктуры, такие как углеродные нанотрубки, действуют так же, как матрица, используемая в масс-спектрометрии. Кроме того, использование кремниевой подложки (DIOS) делает процесс десорбции/ионизации эффективным без использования [76]. Сочетание этих двух концепций с использованием пластин с наноструктурным покрытием приводит к появлению нового метода ионизации, получившего название NALDI. Пластина-мишень покрыта слоем полупроводниковых нанотрубок или нановолокон, изготовленных из оксида цинка (ZnO), оксида олова (IV) (SnO), нитрида галлия (GaN) или карбида кремния (SiC). Измерение с помощью NALDI основано на нанесении образца непосредственно на пластину-мишень. Поверхность NALDI сильно гидрофобна, что не дает капле растекаться.

Была проведена экспериментальная серия с использованием NALDI ионизации по обнаружению пептидов на поверхности. Результат одного из экспериментов

приведен на рисунке 4.13. В данном эксперименте на инжекторной приставке MALDI к масс-спектрометру Orbitrap Velos был детектирован пептид APLTKPLK (P00441) m/z = $867,57^+$ в режиме FTMS с использованием MC/MC - HCD. На рисунке отмечены фрагменты MC/MC относящиеся к у и b – ионам. Как видно из рисунка получен спектр хорошего качества.

Таким образом, результаты экспериментов показали, что оба типа подложек (ITO слайды и NALDI мишень) могут быть использованы в наших исследованиях. Результаты резюмированы в таблице 4.1. На дальнейших этапах работ, при усовершенствовании ACM-чипов могут быть использованы следующие предпосылки, сделанные на основании полученных результатов:

- необходима проводящая поверхность чипа для повышения эффективности МС-идентификации;
- если используется матрица, то следует учитывать фактор равномерности кристаллизации раствора на поверхности после высыхания, как вариант может быть использован способ приготовления раствора матрицы с добавкой глицерина;
- применение гидрофобной поверхности (по аналогии с NALDI мишенью) проще в использовании, но, предположительно, проблема будет заключаться в формировании на поверхности ACM-чипа слоя, отвечающего одновременно трем требованиям – атомарная ровность, проводящие и гидрофобные свойства.



Рисунок 4.13 – Результаты MC-идентификации с применением подложки NALDI: спектр пептида APLTKPLK (P00441) m/z = 867,57 полученный на MALDI Orbitrap в режиме HCD

Таблица 4.1 - Сравнение использованных для MC-идентификации ITO слайдов и NALDI мишени.

Подложка	Фото	Свойства	Гидрофобность	Ионизация
ITO слайды	 40 50 50 6 6 6 6 7 1 	Доступность, Многоразовое использование. Нужна отмывка.	Образец растекается. Требуется точное позиционирование образца (нанесение роботом) Требуется очистка стекла.	Эффективность ионизации высокая из-за проводимости
NALDI мишень		Одноразовое использование. Без матрицы, без примесей.	Образец не растекается- Высокая гидрофобность	Эффективность ионизации ниже, чем на подложке ITO слайды

4.4. Исследование влияния электромагнитного воздействия на свойства белка в растворе.

Электромагнитное поле может быть использовано для увеличения эффективности процедуры фишинга – вылавливания биообъектов из большого объема анализируемого раствора на небольшую поверхность. Для повышения эффективности вылавливания (степень концентрирования) биомолекул могут быть использованы гидродинамические методы (интенсивное перемешивание) или электрические (прикладывание электромагнитного поля для направленного движения биомолекул). При анализе низкоконцентрированных растворов второй метод более эффективен. И именно этот метод планируется использовать в преспективе для интеграции в систему высокочувствительного биоанализа с применением Методики 1.4. Однако необходимо учитывать влияние электромагнитного поля на свойства биомакромолекул, находящихся в растворе.

Поэтому в рамках работ проведено исследование касается влияния импульсного электромагнитного поля с пикосекундным временем нарастания и агрегатное состояние импульсного давления влияния наносекундного на пероксидазы хрена в качестве модельного фермента. Методом атомно-силовой микроскопии изучено влияние импульсного электромагнитного поля напряженностью 640 кВ/м с фронтом импульса ~200 пс на активность и агрегатное состояние фермента. Показано, что воздействие такого поля приводит к агрегации белка и снижению его ферментативной активности. Кроме того, показано влияние ударной волны с временем нарастания фронта давления 80 нс на увеличение агрегации ПХ.

Результаты работы опубликованы в отчетной статье по проекту Ziborov V. S. et al. The Impact of Fast-Rise-Time Electromagnetic Field and Pressure on the Aggregation of Peroxidase upon Its Adsorption onto Mica //Applied Sciences. – 2021. – T. 11. – №. 24. – C. 11677.

В соответствии с пунктом 1.4 ПГ и Техническим заданием Соглашения проведены экспериментальные работы и разработан документ «Методика детекции белков с использованием необратимого связывания на поверхности АСМ-чипа в модельных системах» (файл «Пункт_ПГ-1.4-Методика_v1»)
5. Разработка ТЗ на специальное ПО для обработки данных, полученных с помощью молекулярного детектора – АСМ

Работы по пункту 1.5ПГ направлены на разработку программного обеспечения, позволяющего быстро и эффективно обрабатывать данные АСМ-сканирования. На текущий момент данные, полученные в стандартном ПО приборов, входящий в УНУ «Авогадро», экспортируются в формат ASC, далее происходит обработка в ПО, ранее разработанном в ИБМХ для подсчета объектов и определения их высоты. Однако, для того, чтобы далее была возможна интерпретация результатов нужен экспорт полученных в ПО данных в формате txt и дальнейшая обработка в Microsoft Excel – построение графиков, аппроксимация.

При использовании текущего способа обработки данных возникает ряд трудностей. Во-первых, АСМ-молекулярный детектор, регистрирующий сигнал от биомолекул, для анализа регистрируются данные от каждой биомакромолекулы. Но, для получения этих данных сканируется большая площадь поверхности чипа и обрабатываются сигналы от сотен-тысяч биомолекул. Сканирование производится фрагментами (сканами) и поэтому для одного образца регистрируются десятки сканов. Таким образом, для одного образца существует набор сканов, данные с которых должны быть обработаны – подсчитаны и охарактеризованы молекулы, визуализированные на каждом скане. В ИБМХ, существует ранее разработанное ПО (Recognite (совместная разработка ИБМХ и НИЯУ МИФИ), которое позволяет проводить обработку десятков сканов для одного образца. Существующие в открытом доступе другие ПО для обработки АСМ-данных, например Gwidion, предоставляют возможность работать только с одним сканом, а ПО FemtoScane позволяет получать данные по нескольким сканам для одного образца, с помощью специального скрипта, который должен быть написан самим пользователем.

Во-вторых, для возможности интерпретации полученных результатов целесообразно сравнивать данные, полученные для различных образцов (например, рабочих и контрольных). Ранее, это сравнение проводилось в Microsoft Excel. Имеющееся в открытом доступе и ранее разработанное в ИБМХ ПО не позволяют сравнивать результаты сканирования для двух и более образцов. При этом в экспериментальной серии, как правило не менее трех образцов, а в некоторых случаях до 10-15 образцов. Перенос данных в Microsoft Excel и их обработка крайне

54

трудоемкий процесс, требующий скрупулёзной работы, в процессе которой должна быть сохранена маркировка образца, выписаны условия обработки (уровни отсечения, например), данные прибора, с помощью которого получены результаты, построены графики и аппроксимация.

Третьим фактором, который обусловливает необходимость разработки специального ПО является необходимость добавление функции определения не только высоты визуализированных объектов (биомолекул), но и их жесткости (модуля Юнга) и объема. Одной из задач, которая будет выполнена в настоящем проекте – является оценка жесткости наночастиц для таргетной доставки лекарств до и после загрузки активными компонентами. Для решения этой задачи также необходимо определять жесткость с применением автоматических режимов обработки данных. Функция расчета объема и жесткости визуализированных с помощью АСМ объектов для десятка сканов и сотен объектов также не реализована ни в одном из существующих решений ПО.

Разработка специального ПО направлена на решение вышеуказанных проблем. В результате работ должен быть создан продукт, позволяющий быстро провести обработку полученных данных, предоставить возможность сравнить данные для образцов в серии экспериментов, предоставить инструменты для визуализации полученных данных, предусмотреть функционал сохранения данных с полной легендой.

Ниже описаны работы, которые были выполнены при составлении пунктов ТЗ и предпосылки для выбора основных параметров. Составленное ТЗ не является исчерпывающим документом для выполнения работ по созданию ПО. Некоторые работы при разработке ПО на следующем этапе проекта потребуют дополнительных исследований. Например, в настоящий момент не может быть предложен алгоритмы выделения визуализированных объектов на скане, которые позволить проводить обработку эффективно и быстро.

5.1. Формат данных

Выходные данные сканирования представлены в виде файла с кодировкой ASCII. Этот формат предоставляется производителей ПО оборудования. Данные могут быть предоставлены с приборов отечественного производителя NT-MDT (Зеленоград) и зарубежного Bruker®. Эти приборы входят в состав УНУ «Авогадро» В зависимости от прибора формат данных в выходных файлах различаются, и это следует учесть при разработке ПО. Более подробно различия будут рассмотрены далее в данном разделе.

В выходных данных содержится, в том числе, основная информация по параметрам полученных ACM-изображения, которые должны быть учтены при обработке данных такие как:

- размер изображения;
- единицы измерения;
- шаг сканирования и т.д.

5.1.1. Файлы с разрешением .mdt

ACM-данные с разрешением .mdt могут быть получены с нескольких приборов от отечественного производителя NT-MDT (линия приборов NTEGRA, Next). Приборная база в ИБМХ представлена из четырёх приборов, а именно:

- Ntegra Aura;
- Ntegra Prima;
- Titanium;
- Next II (закуплен в процессе выполнения работ по проекту).

Полученные ACM-данные в ходе сканирования могут быть экспортированы в файл с ASCII кодировкой (рис. 5.1), где в качестве разделительных знаков выбирается:

- Для отделения целой части «.»;
- Для разделения значений в строчке «,»;
- Для переноса значений на следующую строчку «,».

Для получения достоверных статистических данных необходимо при обработке исходных файлов учитывать размер АСМ-изображения. Данные по размеру АСМ-изображения можно получить из «шапки» файла. Например, на рисунке 5.1 Б представлен пример эскортированного файла, где отображены основные характеристики АСМ-изображения (таб. 5.1.).



Рисунок 5.1 - Пример выбора параметров экспорта данных сканирования — файла в формате *.mdt. (A) - Диалоговое окно программы Image Analysis 3.5.0.18751 «Export To ASCII», в котором указываются необходимые параметры экспортируемого файла.(Б) – Пример экспортированного файла с кодировкой ASCII.

Таблица 5.1 - Основные значения экспортируемого файла с кодировкой ASCII из программы Image Analysis 3.5.0.18751

Основные параметры	Расшифровка значений	Примечания
документа		
File Format = ASCII	Формат файла	
Created by Nova, NT-	Метрика файла	
MDT ltd., 11/30/2021		
1:55:59 PM		
File: 1F:Height	Название файла	
NX = 256	Количество точек по оси Х	Размер скана в количествах точек
NY = 256	Количество точек по оси Ү	(пикселях)
Scale X = 0.0078	Цена деления шкалы по оси Х	Шаг зонда между точками.
Scale Y = 0.0078	Цена деления шкалы по оси Ү	
Scale Data $= 1.0000$	Цена деления шкалы по оси данных	
Bias X = 61.4283	Смещение начала координат оси Х	Координаты центра площади
Bias Y = 45.6639	Смещение начала координат оси Ү	сканирования.
Bias Data = $0.0000E+0$	Смещение начала координат оси данных	
Unit $X = um$	Единицы измерения по оси Х	Единицы измерения могут быть
Unit Y = um	Единицы измерения по оси Ү	представлены в виде: angstrom, nm,
Unit Data = um	Единицы измерения по оси данных	um, mm, m.
DataScaleNeeded = Yes	Файл экспортирован с/без учета шкал.	Без учета шкал «DataScaleNeeded =
		Yes»
		С учетом шкал «DataScaleNeeded =
		No»

Размер ACM-изображения можно получить при умножении параметров NX, Scale X и Unit X (аналогичный расчет для оси Y). Этот алгоритм должен быть заложен в ПО. Например, исходя из таблицы 1 размер ACM-изображения будет составлять 2*2 мкм: NX * Scale X * UnitX = 256 * 0.0078 * um = 2 um

5.1.2. Файлы с разрешением *.spm

Файлы с разрешением .*spm получаются с приборов от зарубежной компании Bruker. Приборная база в ИБМХ представлена двумя приборами Dimension3100 и Dimension FastScan Данные полученные из файлов с разрешением .spm различаются в структуре построения информации от файлов *mdt. Данные могут быть представлены в трех видах (рис. 5.2.), а именно:

- 1) Один столбец со значениями высот;
- 2) Один столбец со значениями модуля Юнга;
- Два столбца, в одном из которых указываются высоты, а во втором указывается модуль Юнга.

#5_HRP_131120.0_00000Flatten Image View_1.spm − □ ×	#5_HRP_131120.0_00000Flatten Image View_1 (1) (− □ ×	#5_HRP_131120.0_00000Flatten Image View_1.spm − □ ×					
Файл Правка Формат <u>В</u> ид <u>С</u> правка	Файл Правка Фор <u>м</u> ат <u>Вид С</u> правка	Файл Правка Формат Вид Справка					
"\@2:Z offset: V [Sens. ZsensSens] (0.00000000000062: ^	^	^					
	"*File list end"	"*File list end"					
"*File list end"							
	DMTModulus(MPa)	Height_Sensor(nm) DMTModulus(MPa)					
Height_Sensor(nm)	4.692107e+001	1.673856e-001 4.692107e+001					
1.673856e-001	4.524973e+001	-8.774862e-002 4.524973e+001					
-8.774862e-002	4.252416e+001	-1.627593e-001 4.252416e+001					
-1.627593e-001	4.445366e+001	-1.031086e-001 4.445366e+001					
-1.031086e-001	4.447546e+001	-7.101283e-003 4.447546e+001					
-7.101283e-003	4.425407e+001	-3.238502e-002 4.425407e+001					
-3.238502e-002	4.361021e+001	-1.883203e-001 4.361021e+001					
-1.883203e-001	4.362752e+001	-1.375706e-001 4.362752e+001					
-1.375706e-001	4.249308e+001	4.476022e-002 4.249308e+001					
4.476022e-002	4.467694e+001	-4.048708e-002 4.467694e+001					
-4.048708e-002	4.374773e+001	2.976801e-002 4.374773e+001					
2.976801e-002	4.430074e+001	-8.631109e-002 4.430074e+001					
-8.631109e-002	4.288773e+001	-7.414915e-002 4.288773e+001					
-7.414915e-002	4.316344e+001	1.016156e-001 4.316344e+001					
1.016156e-001	4.448941e+001	-7.676204e-002 4.448941e+001					
< >	< >	<pre>< / doi:10.101</pre>					
Стр 1, стлб 1 100% Macintosh (CR) ANSI	Стр 2506, стлб 31 100% Macintosh (CR) ANSI	Стр 2521, стлб 1 100% Macintosh (CR) ANSI					

(A) (Б) (B)

Рисунок 5.2. (A) - Пример экспортированного файла с кодировкой ASCII из файла с разрешением *.spm. Данные в виде одного столбца со значениями высот по оси Z. (Б) – Пример экспортированного файла с кодировкой ASCII. Данные в виде одного столбца со значениями модуля Юнга по оси Z. (В) – Пример экспортированного файла с кодировкой ASCII. Данные в виде двух столбцов со значениями высот и модуля Юнга по оси Z.

Метрика по данным составляет большой список всех параметров, которые получены в ходе сканирования. Описание всех параметров не имеет смысла при решении задачи подсчета биомакромолекул и определения их высоты (и других характеристик), т.к. для статистической обработки необходимо знать только размер АСМ-изображения и единицы измерения данных по оси Z. Необходимые параметры

	-		
#5_HRP_131120.0_00000Flatten Im − □ ×	(//////////////////////////////////////	
<u>Ф</u> айл <u>П</u> равка Фор <u>м</u> ат <u>В</u> ид <u>С</u> правка		<u>Ф</u> айл <u>П</u> равка Фор <u>м</u> ат <u>В</u> ид <u>С</u> правка	
"\@Sens. Ysensor: V 6703.824 nm/V"	^	"*File list end"	^
"*Ciao scan list"		DMTModulus(MPa) 4.692107e+001	
"\Parameter select: Main"		4.25249/36+001 4.252416e+001 4.445365e+001	
"\Operating mode: Image"		4.447546e+001 4.425407e+001	
"\Tip Serial Number: "		4.361021e+001 4.362752e+001	
"\Tip Scanned Distance: 2480.24"		4.249308e+001 4.467694e+001	
"\Tip Frame Count: 2"		4.374773e+001 4.430074e+001	
"\Scan Size: 2000 nm"		4.288773e+001 4.316344e+001	
"\X Position: 0"	J	4.448941e+001 4.360542e+001	
< >> >>		< 2000002-0001 →	
Стр 347, ст 100% Macintosh (CR) ANSI		Стр 2505, с 100% Macintosh (CR) ANSI	

(А) (Б)

Рисунок 5.3 - (A) - Пример экспортированного файла с кодировкой ASCII. С указанием необходимого параметра размера ACM-изображения: "\Scan Size: 2000 nm". (Б) – Пример экспортированного файла с кодировкой ASCII. С указанием необходимого параметра единицы измерения по оси Z: (MPa)

5.2. Формирование изображений

Принцип получения АСМ-изображений в режиме топографии

Сенсорным элементом ACM является зонд (кантилевер), размеры чувствительной зоны которого (острия) соизмеримы с размерами биомолекул и составляет 1-10 нм. Формирование АСМ-изображения поверхности производится построчно при сканировании. Для сканирования, зонд подводится к поверхности на расстояние, порядка, нескольких десятков ангстрем, далее осуществляется перемещение зонда по Х и У направлениям (сканирование). В процессе сканирования между зондом и поверхностью присутствует взаимодействие, в которое основной вклад вносят Ван-дер-Ваальсовы силы, при расстоянии порядка нескольких ангстрем увеличивается вклад силы отталкивания. Параметры взаимодействия зонда и поверхности поддерживаются системой обратной связи микроскопа. Для регистрации рельефа поверхности используется оптическая система: отражающая лазер поверхность зонда – фотодетектор. Получение АСМ-

изображений происходит при «сканировании». Зонд движется вдоль линии (строки) сначала в прямом, а потом в обратном направлении (строчная развертка), затем переходит на следующую строку (кадровая развертка). Движение зонда осуществляется с помощью сканера небольшими шагами под действием пилообразных напряжений, формируемых цифро-аналоговыми преобразователями.

Регистрация информации о рельефе поверхности производится, как правило, на прямом проходе (рисунок 5.4).



Рисунок 5.4 - Схематическое изображение процесса сканирования. Направление прямого хода сканера обозначено стрелками красного цвета, Обратный ход сканера обозначен стрелками синего цвета. Регистрация информации производится в точках на прямом проходе [1]

Информация, полученная с помощью сканирующего зондового микроскопа, хранится в виде C3M кадра - двумерного массива целых чисел а_{ij} (матрицы). Физический смысл данных чисел определяется той величиной, которая оцифровывалась в процессе сканирования. Каждому значению пары индексов ij соответствует определенная точка поверхности в пределах поля сканирования.

Координаты точек поверхности вычисляются с помощью простого умножения соответствующего индекса на величину расстояния между точками, в которых производилась запись информации:

$$x_i = x_0 * i, y_j = y_0 * j$$

Здесь x0 и y0 – расстояния между соседними точками вдоль оси X и Y, в которых производилась запись информации. Как правило, C3M кадры представляют собой квадратные матрицы, имеющие размер n² (в основном 256×256 и 512×512 элементов). Количество элементов в матрице (количество точек сканирования) необходимо учитывать при обработке изображения.

5.3. Параметры объектов, определяемые в результате обработки данных сканирования

5.3.1. Высота визуализированных биомакромолекул

Основной характеристикой при АСМ-сканировании является высота адсорбированных объектов на поверхности. На рисунке 5.5 представлено АСМизображение адсорбированных молекул белка (пероксидаза хрена) на свежесколотой слюде – атомарно-ровной подложке. Как видно, на рисунке имеется градиент окрашивания объектов. С возрастанием высоты объекта его окрашивание будет становиться светлее. Для кодировки высоты может быть использована другая цветовая шкала z.



Рисунок 5.5 - Пример ACM-изображения (A) поверхности с сорбированными биомолекулами и соответствующие сечения иммобилизованных молекул (Б).

Для статистической обработки необходимо выделить частицы, которые соответствуют задаваемым пользователем параметрам. Такими параметрами являются уровень отсечения по высоте и минимальное количество пикселей. Установка этих параметров должна быть предусмотрена в ПО, так как значение параметра зависит от условий эксперимента. Например, уровень отсечения при визуализации объектов на свежесколотой слюде ниже, чем при использовании чипов с функционализированной поверхностью. Количество пикселей варьируется от размера молекул.

Так как АСМ-изображение представляет собой матрицу значений с

размерностью n². Чем больше будет n, тем точнее будут полученные данные.

5.3.2. Объёмы визуализированных биомакромолекул

Объёмы рассчитываются исходя из полученных данных по выделению частиц с дополнительным параметром отсечения по объёму. Расчёт объёмов производится посредством умножения площади выделенной частицы и умножения на максимальную высоту частицы. В расчете задействованы рассчитанные в ПО размер скана, шаг сканирования.

5.3.3. Модуль Юнга

Значения модуля Юнга позволяют описать упругость изучаемого объекта. Данный параметр является важной характеристикой при изучении биомолекул. Так, например, по значениям модуля Юнга можно определить какой природы объект был зарегистрирован с помощью АСМ. Следовательно, можно с высокой точностью различить биомолекулу от солевых остатков.

При статистической обработке, необходимо учитывать соотношение высоты молекулы и модуля Юнга в конкретной точке. Данный параметр позволит оценить, насколько однородной поверхностью обладает объект.

5.4. Статистическая обработка параметров выделенных объектов

Статистическая обработка заключается в подсчете адсорбированных молекул и описании их характеристик. Анализируется не одно изображение (скан), а обычно не менее 16. Эксперименты показали, что при таком минимальном количестве сканов можно с высокой точностью определить количество адсорбированных молекул на всей площади АСМ-чипа. Однако, чтобы получить достоверные данные необходимо визуализировать не менее 500 объектов. В ряде экспериментов, например при низкой степени сорбции объектов на поверхности, чтобы визуализировать требуемое количество объектов необходимо отсканировать гораздо больше чем 16 сканов. Поэтому, при обработке данных необходимо все данные нормировать, т.е. приводить к одной площади сканирования – 400 мкм², чтобы иметь возможность сравнивать результаты разных экспериментов.

Для обработки результатов эксперимента необходимо получить следующие статистические данные:

- 1) Относительное распределение частиц по высотам;
- 2) Распределение количества частиц по высотам;
- 3) Относительное распределение частиц по объему;
- 4) Распределение количества частиц по высотам и объемам;
- 5) Относительное распределение частиц по модулю Юнга;
- 6) Соотношение высот частиц к модулю Юнга;
- 7) Результаты аппроксимации относительных распределений.

5.5. Функционал и интерфейс программного обеспечения

5.5.1. Алгоритм работы с программой

Для статистической обработки выбираются необходимые файлы - файлы, содержащие данные сканирования, полученные штатным ПО, входящим в приборный комплекс ACM, экспортированные в формат *ASCII*. Каждому образцу соответствует пул файлов, количество которых отражает количество полученных для этого образца сканов. Обсчет может производиться как для одного образца, так и для нескольких образцов. Необходимость такой функции в ПО заключается для обеспечения быстрой первичной оценки результатов эксперимента.

Как видно из рисунка 5.6, первым этапом является выбор образцов для обработки. В зависимости от эксперимента выбираются необходимые параметры, такие как:

- Карман высот;
- Диапазон высот;
- Минимум пикселей;
- Диапазон объемов;
- Учет модуля Юнга.

Далее программа выводит обработанные ACM-изображения. В отдельном диалоговом окне выводятся статистические данные, представленные в виде:

- Относительное распределение частиц по высотам;
- Распределение количества частиц по высотам;
- Относительное распределение частиц по объему;
- Распределение количества частиц по высотам и объемам;
- Относительное распределение частиц по модулю Юнга;

- Соотношение высот частиц к модулю Юнга;
- Аппроксимация относительных распределений.

									-		x
окно изображений	окно графиков	меню					работа с файлами	общие на	стройки	работа с г	рафикам
		Сохранит	настройки								
		Выгрузить	настройки]							
							[Тан	ель	5	
							инс	груг	иен	ITO	В
	Pa6	юча	я								
	обл	асті	5								
							Г	Тане	эпн	`	
								-			
							0	paa	ЗЦО	В	
								•	•		

Рисунок 5.6 - Схематичное представление главной страницы программного обеспечения

5.5.2. Главная страница интерфейса специального ПО

Описание: Окно работы программы условно разделяется на 4 части:

- Верхняя панель (навигация программы) содержит в себе кнопки и выпадающие кнопки, при нажатии на которые происходят действия:
 - i) Окно изображений открывает на рабочей области интерфейс работы с изображениями.
 - ii) Окно графиков открывает на рабочей области интерфейс работы с графиками.
 - ііі) Меню выпадающий список, который содержит следующие кнопки:
 - (1) Сохранить настройки нажатие на кнопку вызывает открытие окна файловой системы, внутри которого нужно выбрать место, куда сохраниться файл с настройками программы.
 - (2) Выгрузить настройки нажатие на кнопку вызывает открытие окна файловой системы, внутри которого нужно выбрать файл с настройками программы, после выбора файла все настройки, записанные в файле, применятся к текущему сеансу программы.

- iv) Работа с файлами открывает в боковой панели (панель инструментов) вкладку: "работа с файлами".
- v) Общие настройки открывает в боковой панели (панель инструментов) вкладку "общие настройки".
- vi) Работа с графиками открывает в боковой панели (панель инструментов) вкладку "работа с графиками".
- Рабочая область элемент интерфейса, занимающий две трети экрана, предназначенный для работы с графиками и изображениями (в зависимости от выбранной вкладки).
- Панель инструментов элемент интерфейса, выполняющий функцию меню управления, в зависимости от выбранной вкладки, открываются различные функции.

Панель образцов – элемент интерфейса, не изменяется при выборе вкладок рабочей области или панели инструментов, всегда открыт, является вспомогательным окном, для выбора образцов, с которыми будут проводится манипуляции, зависящие от функций выбранных на панели инструментов.

5.5.3. Вкладка «работа с файлами»



Рисунок 5.7 - Схематичный интерфейс вкладки «Работа с файлами» (А) и обозначение элементов в данной вкладке (Б).

Описание: Вкладка работа с файлами предназначена для обособления функционала работы с файлами внутри программы (рисунок 5.7).

- Кнопка 1 при нажатии, необходимо вывести окно работы с файловой системой, внутри которого будет выбрана одна папка, которая является папкой образца. После выбора папки образца – имя папки становится полем вывода текста (именем объекта), отображается в интерфейсе программы, а данные по снимкам образца – становятся данными для обработки внутри программы.
- Кнопка 2 при нажатии, необходимо вывести окно работы с файловой системой, внутри которого будут выбраны несколько папок, которые являются отдельными образцами. После выбора папок, имя папки становится полем вывода текста (именем объекта), отображается в интерфейсе программы, а данные по снимкам образца становятся данными для обработки внутри программы.
- Кнопка 3 при нажатии, все образцы i, у которых флажок ch(i) находится в положении активен, должны быть удалены из интерфейса программы, после нажатия данные по выбранной группе образцов не будут использоваться внутри программы, пока не будут снова добавлены по кнопке 1 или кнопке 2.
- Кнопка 4 при нажатии, все образцы должны быть удалены из интерфейса программы, после нажатия данные по выбранной группе образцов не будут использоваться внутри программы, пока не будут снова добавлены по кнопке 1 или кнопке 2.
- Поле ввода 1 поле ввода текста, связано с кнопкой 5.
- Кнопка 5 при нажатии, все образцы i, у которых флажок ch(i) находится в положении активен, получат описание, соответствующее тексту введенному в поле ввода 1, описание должно быть автоматически добавлено в поле вывода текста соответствующего образца, поле ввода 1 должно быть очищено после нажатия кнопки 5.
- Поле вывода текста [1;n] Выводит текст, соответствующий названию папки и имени образца внутри программы, так же, данное поле должно

обновляться при нажатии кнопки 5, и помимо названия образца содержать <u>описание образиа</u>. Количество полей вывода текста – соответствует количеству образцов, находящихся в пуле работы программы.

- Ch [1;n] Поле флажок, имеет два состояния, не нажато (неактивно), нажато (активно), нажатие на поле – меняет состояние поля, каждый флажок должен относится к определенному образцу, имя и описание(если есть) которого, указаны с лева от флажка (поле ввода текста).
- КО1 кнопка, при нажатии на которую, происходит выделение (переход полей ch[1;n] в состояние "активно") всех образцов, находящихся в пуле работы программы.
- КО2 кнопка, при нажатии на которую, происходит снятие выделения (переход полей ch[1;n] в состояние "не активно") всех образцов.

Скрол бар 1 – ползунок, который появляется при нехватке места, чтобы отобразить все элементы образцов, добавленных в программу с помощью кнопок 1 и 2.



5.5.4. Вкладка «общие настройки»

Рисунок 5.8. Схематичный интерфейс вкладки «Общие настройки» (А) и обозначение элементов в данной вкладке (Б).

Описание: Данная панель инструментов бокового меню – предназначена для установки параметров обработки данных образцов (рисунок 5.8). Включает в себя следующие управляющие элементы:

- Вв1 числовое поле ввода, является параметром
- Вв2 числовое поле ввода, является параметром
- Вв3 числовое поле ввода, является параметром
- Вв4 числовое поле ввода, является параметром
- Вв5 числовое поле ввода, является параметром
- Вв6 числовое поле ввода, является параметром
- Вв7 числовое поле ввода, является параметром
- О1 флажок, определяющий применение метода выпуклого анализа при обработке данных.
- O2 флажок, определяющий применение метода оконтуирования при обработке данных.
- Кнопка 1 запускает обработку данных по всем образцам с параметрами описанными на рисунке 5.8 Б.
- Кнопка 2 Данная кнопка позволяет построить АСМ-изображения по образцу активированным в поле «Данные для построения графиков». В случае если выбрано несколько в поле «Данные для построения графиков» необходимо вывести ошибку «Функция построить изображения доступна только для одного образца (уберите все галочки с образцов, кроме нужного)».

5.5.5. Вкладка «окно изображений»



Рисунок 5.9. Схематическое изображение окна работы с изображениями.



Рисунок 5.10. Схематическое изображение окна работы с изображениями, с обозначениями.

Описание: Окно изображений – элемент интерфейса (рисунок 5.9-5.10), отвечающий за графическое отображение результатов работы обработки данных. Окно делится на 4 сегмента:

- Исходное изображение массив данных полученных из файла с кодировкой ASCII.
- 2) Обработанное изображение окно, в котором отображается

изображение после обработки.

- Метрика таблица дополнительной информации по обработанным образцам, параметры метрики:
- 4) размер АСМ-изображений;
- 5) размер матрицы;
- 6) общая площадь сканирования, которая попала в обработку.
- Галерея Элемент, который содержит обработанные изображения всех образцов, его цель – в быстром переключении между изображениями образцов.
- Изображение i1 АСМ-изображение до обработки.
- Изображение i2 АСМ-изображение после обработки.
- Изображение [i3;in] АСМ-изображения всех снимков образца после обработки.
- Текстовое поле [1;n] имя АСМ-изображения по которому построено изображение.
- Текст [1;n] названия параметров метрик.
- Значение [1;n] значения метрик.
- Скрол бар 1 предназначен для прокрутки АСМ-изображений по образцу, когда их количество превышает порок вместимости количества изображения в пределах одного монитора (5), позволяет перемещаться между АСМ-изображениями.

5.5.6. Вкладка «окно графиков»



Рисунок 5.11 - Схематическое изображение окна работы с графиками.



Рисунок 5.12 - Схематическое изображение окна работы с графиками с элементами.

Окно работы с графиками представлено на рисунках 5.11-5.12. Описание:

 Относительное распределение частиц по высотам – при нажатии кнопки открывается график «относительного распределения частиц по высотам». По оси Х отображаются карманы высот. По оси Y отображается процентное содержание частиц в соответствующем кармане высот. Тип графика – линейный.

- Распределение количества частиц по высотам при нажатии кнопки открывается график «Распределение количества частиц по высотам». По оси X отображаются карманы высот. По оси Y отображается количество частиц в соответствующем кармане высот. Тип графика – гистограмма.
- 3) Относительное распределение частиц по объему при нажатии кнопки открывается график «Относительное распределение частиц по объему». По оси X отображаются карманы объём частиц. По оси Y отображается процентное содержание частиц в соответствующем кармане объёмов частиц. Тип графика – линейный.
- 4) Распределение количества частиц по высотам и объемам при нажатии кнопки открывается график «Распределение количества частиц по высотам и объемам». По оси X отображаются карманы объём частиц. По оси Y отображается отображаются карманы высот. По оси Z отображается количество частиц в соответствующем кармане высот и объёмов частиц. Тип графика – гистограмма.
- 5) Относительное распределение частиц по модулю Юнга при нажатии кнопки открывается график «Относительное распределение частиц по модулю Юнга». По оси X отображаются карманы значений модуля Юнга (цена деления рассчитывается по формуле: максимальное значение/50). По оси Y отображается процентное содержание частиц в соответствующем кармане значений модуля Юнга. Тип графика – линейный.
- 6) Соотношение высот частиц к модулю Юнга при нажатии кнопки открывается график «Соотношение высот частиц к модулю Юнга». По оси Х отображаются карманы значений модуля Юнга. По оси Y отображается отображаются карманы высот. По оси Z отображается количество частиц в соответствующем кармане значений модуля Юнга и высот частиц. Тип графика – гистограмма.
- 7) Аппроксимация относительных распределений. при нажатии кнопки открывается график «Аппроксимация относительных распределений».
- 8) Изображение графика графическое отображение графика.
- Шкала с делениями оси Y исходное значение цены деления рассчитывается по формуле: максимальное значение/20. Возможность изменять значение цены деления осуществляется в окне «Работа с графиками».
- 10)Шкала с делениями оси X исходное значение цены деления рассчитывается по формуле: верхняя граница/50. Значение «верхняя граница» указывается при работе

с окном «Общие настройки». Следовательно, при работе с графиками, где учитываются высоты, используется параметр «верхней границы» - вв4. При работе с графиками, где учитываются объёмы, используется параметр «верхней границы» вв6. При работе с графиками по модулю Юнга цена деления рассчитывается по формуле: максимальное значение/50. Возможность изменять значение цены деления осуществляется в окне «Работа с графиками».

- 11)Шкала с делениями оси Z значение цены деления рассчитывается по формуле: максимальное количество частиц/50.
- 12)Образец [1:n] цветовое отображение линий или столбцов на графике соответствующих образцов.
- 13)Подпись оси X для графиков «Относительное распределение частиц по высотам» и «Распределение количества частиц по высотам» подпись должна выглядеть «Высота, нм». Для графиков «Относительное распределение частиц по объему» и «Распределение количества частиц по высотам и объемам» подпись должна выглядеть «Объём, нм³». Для графиков «Относительное распределение частиц по модулю Юнга» и «Соотношение высот частиц к модулю Юнга» подпись должна выглядеть «Модуль Юнга, МРа».
- 14)Подпись оси Y для относительных распределений подпись должна выглядеть «Относительное распределение частиц, %». Для распределений количества частиц подпись должна выглядеть «Количество частиц, шт». В случае графика «Распределение количества частиц по высотам и объемам» подпись к оси Y выглядит «Высота, нм». В случае графика «Соотношение высот частиц к модулю Юнга» подпись к оси Y выглядит «Высота, нм».
- 15)Подпись оси Z для графиков «Распределение количества частиц по высотам и объемам» и «Соотношение высот частиц к модулю Юнга» подпись должна выглядеть «Количество частиц, шт.». (рисунок 5.13)
- 16) Таблица описания графика:
 - Имя образца [1:n] название загруженной папки образца.
 - Количество частиц [1:n] посчитанное количество частиц по образцу, приведенных к 400 мкм².
 - Описание образца [1:n] дополнительная информация, которая была введена в окне «Общие настройки» в панели «Поля ввода 1».

Дата сканирования [1:n] – дата сканирования берется из названия АСМизображения. Например, для файлов формата «.spm» имя файла «#5_HRP_131120.0_00000Flatten Image View_1», где дата сканирования 131120, т.е. 13 ноября 2020 года. Для файлов формата «.mdt» имя файла «021221_1F Height_1», где дата сканирования 021221, т.е. 02 декабря 2021 года.



Рисунок 5.13 - Схематическое изображение графиков с дополнительной осью Z.

5.5.7. Вкладка «работа с графиками»

Схематичный интерфейс вкладки «работа с графиками» приведен на рисунке 5.14.



Рисунок 5.14 - Схематичный интерфейс вкладки «работа с графиками» (A) и обозначение элементов в данной вкладке (Б).

Описание:

- 1) ПВ1 поле ввода значений цены деления по оси Х.
- 2) ПВ2 поле ввода значений цены деления по оси Ү.
- Кнопка 1 при нажатии данной кнопки строятся графики по образцам, которые выделены в окне «Данные для построения графиков». Графики строятся с учетом параметров указанных ранее в окне «Общие настройки».
- ПВЗ поле ввода для разделительного знака внутри экспортированного файла, как разграничение столбцов таблицы данных.
- 5) Кнопка 2 экспортируются все графики и данные по каждому образцу.
- Кнопка 3 экспортируются график и данные по каждому образцу, который открыт в рабочей области.

5.5.8. График «Аппроксимация относительных распределений»



Рисунок 5.15 - Схематичный интерфейс вкладки «Аппроксимация относительных распределений». Зеленым выделена вкладка, которая отображается в рабочей области.

Интерфейс вкладки «Аппроксимация относительных распределений» приведен на рисунках 5.15-5.17.



Рисунок 5.16 - Схематичный интерфейс вкладки «Аппроксимация относительных распределений» с обозначением элементов. Зеленым выделена вкладка, которая отображается в рабочей области.



Рисунок 5.17 - Схематичный интерфейс рабочей области вкладки «Аппроксимация относительных распределений» при активной ЧБ1 «Ручная настройка отрезков»

Описание:

- 1. Изображение графика -
- 2. Аппроксимация [1:n]
- 3. Подпись оси Х
- 4. Подпись оси Ү
- 5. Шкала с делениями оси Х
- 6. Шкала с делениями оси Ү
- 7. ЧБ1
- 8. ЧБ2
- 9. Описание графика
 - а) Имя образца
 - b) Количество частиц
 - с) Описание образца
 - d) Дата сканирования
- 10. Таблица 1
 - а) Аппроксимация
 - b) %
 - c) Max
 - d) Ширина h_{1/2}

11. Кнопка 1 12. Кнопка 2 13. Кнопка 3 14. П1 15. П2 16. В1 17. В2

5.6. Словарь понятий, используемых при разработке специального ПО

Описание образца – параметр образца внутри программы, который несет в себе текстовую информацию и который могут использовать некоторые функции программы.

Файл с настройками программы – сохранение параметров окна «Общие настройки», который необходим для применения данных настроек по необходимости. Формат файла не важен, имя файла задается вручную в окне работы с файловой системой.

Экспорт графиков – Экспорт графиков может происходить по двум сценариям:

Экспорт одного графика.

Экспорт всех графиков.

Экспорт одного графика происходит с выгрузкой графического изображения графика в соответствии с рабочей областью программы (сверху изображение, снизу таблица), у аппроксимации таблица аппроксимаций, у остальных типов графиков, таблицы образцов. Формат файла выгружаемого графика – PDF, имя файла: ИМЯ ПАПКИ ОБРАЗЦА НАЗВАНИЕ ТИПА ГРАФИКА ДАТА СОЗДАНИЯ.PDF.

Форматы экспорта может быть изменены, например на docx или другой.

Экспорт нескольких графиков повторяет процесс выгрузки одного графика, но, в конечном файле, должны располагаться все графики, по всем выбранным образцам. Пример:

Выбраны образцы: обр1;обр2; обр3.

Нажата кнопка экспорта всех графиков.

Созданные файлы:

Обр1_графики_ДАТА СОЗДАНИЯ.PDF.

Обр2_графики_ДАТА СОЗДАНИЯ.PDF.

Обр3 графики ДАТА СОЗДАНИЯ. PDF.

Файл Обр1_графики_ДАТА СОЗДАНИЯ. PDF, в свою очередь, содержит страницы:

Относительное распределение частиц по высотам;

Распределение количества частиц по высотам;

Относительное распределение частиц по объему;

Распределение количества частиц по высотам и объемам;

Относительное распределение частиц по модулю Юнга;

Соотношение высот частиц к модулю Юнга;

На каждой странице располагаются графики по обр1, по каждому типу графиков.

Для обр2 и обр3 PDF файлы будут выглядеть аналогично.

Экспорт таблицы аппроксимации – При экспорте графика аппроксимации, необходимо так же выгружать файл с данными таблица аппроксимирующих прямых, формат файла: имя файла: НАЗВАНИЕ ПАПКИ ОБРАЗЦА_таблица аппроксимирующих прямых ДАТА СОЗДАНИЯ.PDF

Экспорт таблиц данных по обсчету – экспортируют данные по обсчету, в формате: , при экспорте одного графика: создается отдельный файл под каждый образец, который учувствовал в создании графика в интерфейсе программы. Если экспорт происходит по всем графикам: создаются файлы по каждому образцу, учувствовавшему в формировании графиков. Внутри каждого из этих файлов будут подпункты страница по всем типам графиков. Пример будет по тому же принципу что и экспорт графиков.

В соответствии с пунктом 1.5 ПГ и Техническим заданием Соглашения проанализированы потребности при обработке данных АСМ-анализа и разработан документ «Техническое задание на специальное ПО для обработки данных, полученных с помощью молекулярного детектора – АСМ (файл «Пункт_ПГ-1.5-ТЗ_ПО_АСМ_v1»)»

6. Разработка методики анализа содержания нуклеиновых кислот использованием нанопроводного биосенсора в модельных системах

Одной из основных задач, которые необходимо решить в рамках проекта, является построение молекулярного профиля человека с использованием высокочувствительных детекторов, в том числе нанопорового детектора УНУ «Авогадро». Современные методы лабораторной диагностики основаны на методах микробиологии, иммуноферментного анализа, а также полимеразной цепной реакции. Однако эти методы обладают рядом недостатков, к которым можно отнести высокую цену, длительность проведения анализа (порядка нескольких часов), нестабильность качества диагностических наборов, а также необходимость спецподготовки персонала. Например, метод полимеразной цепной реакции хоть и обладает высокой чувствительностью, однако при его применении высока вероятность контаминации исходного материала, что, в свою очередь, может привести к высокой вероятности получения ложноположительных результатов.

Таким образом, разработка и интеграция в медицинскую и биомедицинскую практику биосенсоров, способных регистрировать единичные патогенные частицы в образце крови за считанные минуты и с высокой концентрационной чувствительностью (ниже фемтомолярной), означает мощный прорыв в диагностике и терапии различных заболеваний на ранней бессимптомной стадии. Подобные биосенсоры также очень востребованы и в таких областях, как протеомика и метаболомика, для определения содержания конкретных белков и метаболитов в организме человека.

В связи с этим, в рамках проекта была поставлена задача разработки методики анализа содержания нуклеиновых кислот с использованием нанопроводного биосенсора в модельных системах (далее по тексту Методика 1.6). Разработанная методика позволит осуществлять анализ нуклеиновых кислот в модельных буферных растворах с субфемтомолярной чувствительностью и временем детекции ~10 мин. Результаты, полученные на данном этапе работ, в дальнейшем будут полезны для совершенствования методологической базы и разработки методики анализа содержания нуклеиновых кислот с использованием нанопроводного биосенсора уже непосредственно в биологических образцах.

80

6.1. Обзор подходов для обнаружения нуклеиновых кислот

В последние годы использование биомаркеров для мониторинга заболеваний полностью изменило мировую систему здравоохранения, оказав огромное влияние на многие области, от генетики и биологии до судебной медицины. Биомаркеры обычно представляют собой метаболиты, белки или нуклеиновые кислоты, относящиеся к определенному биохимическому процессу, ассоциированному с возникновением или развитием определенного заболевания. Так, одним из широко распространенных в лабораторной практике подходов по определению нуклеиновых кислот является полимеразная цепная реакция (ПЦР), а последующее изобретение методов ПЦР в реальном времени для количественной оценки определенных нуклеотидных последовательностей произвело настоящую революцию в медицине [77, 78]. На данный момент ПЦР в реальном времени активно используется в анализе генома, например, в определении вирусной или бактериальной нагрузки в клинических образцах, диагностике опухолей, экспрессии генов, а также в судебно-медицинской экспертизе [79]. Однако данный подход обладает также рядом существенных недостатков, к которым относятся необходимость в использовании сложного оборудования, требования к наличию специализированных лабораторий и квалифицированного персонала для его использования [80, 81]. Данный подход имеет предел обнаружения порядка 10 копий ДНК на реакцию в объеме сотен микролитров [82, 83]. Следует также отметить, что флуорофоры, используемые в качестве меток, становятся нестабильны с течением времени и чрезвычайно чувствительны к среде раствора, что также влияет на эффективность обнаружения [84]. Эти аспекты в сочетании с высокой стоимостью анализа ограничивают распространение ПЦР В реальном времени ДЛЯ крупномасштабного скрининга и, в том числе, для диагностики заболеваний на ранней стадии.

Помимо ПЦР в реальном времени традиционными методами обнаружения нуклеиновых кислот являются также нозерн-блоттинг, гибридизация *in situ* и секвенирование нового поколения. Однако каждый из этих методов имеет свои ограничения, а именно низкую воспроизводимость и селективность, трудоемкие протоколы, недостаточную концентрационную чувствительность (на уровне 10⁻⁷ М -10⁻¹⁴ М), использование меток, высокую чувствительность к контаминации образца, сложный анализ данных, а также наличие дорогих приборов и квалифицированного персонала [85 – 93]. Таким образом, доступность простых в использовании и недорогих методов анализа нуклеиновых кислот по-прежнему представляет собой приоритетную задачу [94].

В настоящее время для преодоления недостатков стандартных подходов по обнаружению нуклеиновых кислот, исследуются новые биосенсоры на основе наноструктур, не требующие использования меток. Данные биосенсоры основаны на прямом безметочном обнаружении электрического, оптического или другого типа генерируемого при связывании целевой молекулы сигнала, с функционализированным сенсорным элементом [95, 96]. Биосенсор, как правило, состоит трех основных компонентов: (А) элемента биораспознавания или зонда, (В) преобразователя и (С) электронной системы, например усилителя сигнала, процессора и электронного дисплея, как показано на рисунке 6.1 [97].



Рисунок 6.1 - Схематическое изображение трех основных компонентов НП-биосенсора: (A) элементы биораспознавания, взаимодействующие с различными аналитами, такими как нуклеиновые кислоты, антигены, клетки и многие другие; (B) элементы преобразователя, преобразующими в поддающийся количественной оценке сигнал взаимодействия анализируемого вещества с биорецептором; (C) электронные системы, усиливающие и обрабатывающие сигнал от преобразователя с последующим отображением полученного сигнала в виде цифровых данных. Рисунок адаптирован из [98].

Одними из наиболее перспективных устройств являются биосенсоры на основе кремниевых нанопроводов, основанных на архитектуре полевых транзисторов [99, 100]. Кремниевые нанопровода в таких биосенсорах используются в качестве электрического канала между истоком и стоком и позволяют осуществлять мультиплекстный анализ нескольких биомаркеров одновременно [100 – 103]. Более того, предел обнаружения этих биосенсоров может достигать и превышать фемтомолярный предел концентрации [104 – 109] с возможностью обнаружения даже отдельных вирусов или белков, как это было продемонстрировано в работах Патолски с сотр. [110 – 112] и Ли с сотр. [113].



Рисунок 6.2 - Принцип работы нанопроводного биосенсора n-типа. (а) Накапливание положительно заряженных молекул на поверхности нанопровода приводит к повышению проводимости. (b) Базовое состояние нанопровода. (c) Накапливание отрицательно заряженных молекул на поверхности нанопровода приводит к понижению проводимости. Рисунок адаптирован из [114].

Принцип действия нанопроводного биосенсора основан на изменении проводимости нанопроводов вследствие адсорбции на их поверхности заряженных частиц (целевых молекул). Когда молекула из анализируемого раствора связывается с зондом, иммобилизованным на поверхности нанопровода, проводимость между стоком и истоком биосенсора изменяется. Данное изменение проводимости регистрируется и обрабатывается системой электрических измерений. Например, когда положительно заряженные молекулы-мишени связываются с зондом, иммобилизованным на нанопроводе n-типа, количество носителей электронов на поверхности нанопровода увеличивается, что приводит к повышенной проводимости. С другой стороны, когда отрицательно заряженные молекулымишени захватываются зондом, количество носителей электронов уменьшается и, следовательно, понижается электрическая проводимость [112, 115]. Принцип работы нанопроводного биосенсора схематично показан на рисунке 6.2.

Следует отметить, что если размер молекулы, адсорбируемой на поверхность нанопровода, сопоставим с размерами самого нанопровода, то возможно достижение чувствительности сенсорного элемента на уровне единичной молекулы. Это является одним из основных требований к линейным размерам нанопровода – от сотен до единиц нанометров, в зависимости от природы аналита.

Высокая чувствительность нанопроводного биосенсора является следствием его малых размеров. т.к. даже небольшие изменения пространственного заряда на поверхности нанопровода вызывают изменения в его проводимости, как это было показано в работе Elfstrom et al. [116]. В работе Li et al. [117] было продемонстрировано, что уменьшение диаметра кремниевого нанопровода от 200 до 50 нм увеличивает его чувствительность в 206 раз. Однако уменьшение диаметра нанопровода в свою очередь взывает увеличение низкочастотного фликкер-шума, что затрудняет выявление полезного сигнала.

Высокая чувствительность нанопроводного биосенсора достигается при помощи функционализации поверхности нанопроводов, которая заключается в нанесении на их поверхность различных агентов, увеличивающих вероятность селективного связывания анализируемых молекул с поверхностью нанопроводов [112, 118]. Функционализация поверхности нанопроводов является двухстадийным процессом и состоит из химической модификации и сенсибилизации.

Модификация поверхности – это химический процесс, способствующий формированию активных групп на поверхности, необходимых для ковалентной иммобилизации биомолекул. На эффективность модификации поверхности значительно влияют условия предварительной очистки поверхности [119]. Наиболее распространенным методом модификации поверхности нанопроводов является силанизация, основанная на взаимодействии терминальных гидроксильных групп поверхности с органосиланами (например, аминопропилтриэтоксисиланом – АПТЕС) [104, 120, 121]. В работе группы Lieber было показано использование процедуры активации поверхности нанопроводов с использованием кислородной

84

плазмы с последующим погружением в раствор АПТЭС в этаноле, за которым следует нагрев чипа [122], что является широко используемой процедурой [121, 123]. Существуют также альтернативные подходы, например, использование УФ/озона для активации поверхности с последующим использованием чистых АПТЭС [124]. Также ацетон [125] и толуол [126] могут использоваться в качестве растворителя на стадии силанизации.

Для обеспечения биоспецифической детекции молекулярных мишеней, проводится сенсибилизация поверхности нанопроводов с помощью ковалентно иммобилизованных молекулярных зондов, комплементарных целевым молекуламмишеням. Присоединение молекулярных зондов к поверхности нанопровода осуществляется с помощью кросс-линкера. В качестве кросс-линкеров часто используются дитиобис(сукцинимидилпропионат) и дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат), которые являются сложными эфирами N-гидроксисукцинимида. Они способны реагировать с первичными аминогруппами и, в связи с этим, могут быть использованы для ковалентного присоединения биомакромолекул к аминосилановым поверхностям [63].

Можно выделить следующие широко применяемые типы молекулярных зондов:

- Ферменты белки, обладающие крайне высокой селективностью по отношению к субстрату. Ферменты могут быть иммобилизованы как на поверхности сенсора, так и быть связаны с другим биокомпонентом [127 – 129].
- Антитела глобулярные белки плазмы крови с высокой специфичностью в отношении целевого антигена. Взаимодействие антиген-антитело считается высокоселективным и технически удобным для применения в биосенсорах [130, 131].
- ДНК последовательность нуклеотидов, состоящая из пуриновых и пиримидиновых оснований [132 – 134]. ДНК как иммобилизуется на поверхность сенсора в виде предварительно синтезированного зонда (последовательность полинуклеотидной цепи, содержащая десятки нуклеотидов) или каждое основание иммобилизируется на поверхности сенсора индивидуально [135].

Аптамеры – одноцепочечные ДНК или РНК структуры, длина которых составляет около 30-80 пар нуклеотидов. Центральная вариабельная область содержит около 30-50 пар нуклеотидов. Расположенные по бокам константные области (15-20 пар нуклеотидов) используются для отжига праймеров в процессе амплификации. Аптамеры получают *in vitro* с помощью процедуры SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment – систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении) из исходного олигонуклеотидного пула [136].

Таким образом, нанопроводные биосенсоры активно применяются для обнаружения широкого спектра биомолекул, таких как нуклеиновые кислоты [137–141], белки [142], вирусы [112] и других биомаркеров различных заболеваний [107, 143].

6.2. Анализ содержания нуклеиновых кислот с использованием нанопроводного биосенсора

В рамках проекта была разработана методика анализа содержания нуклеиновых кислот с использованием нанопроводного биосенсора в модельных системах. Экспериментальная часть Методики 1.6 состоит из двух основных частей: операций, выполняемых при подготовке к измерениям, основной из которых является функционализация поверхности чипа, и, собственно, самих измерений.

Для достижения селективного и сверхчувствительного обнаружения целевой молекулы, специфический молекулярный зонд должен быть иммобилизован на поверхности нанопровода [122, 144, 145]. Для этого поверхность нанопроводов функционализируется, т.е. подвергается химической модификации, с последующей активацией кросс-линкером И иммобилизацией молекулярных зондов. Функционализация поверхности оказывает большое влияние на показатели производительности сенсора, такие как чувствительность, стабильность, воспроизводимость и регенеративная способность [146, 147]. На рисунке 6.3 представлена общая схема функционализации поверхности нанопроводов, которая использовалась в работе при разработке Методики 1.6



Рисунок 6.3 - Схема функционализации поверхности кремниевых нанопроводов u Обозначения: АПТЭС 3обнаружения иелевой молекулы-мишени. аминопропилтриэтоксисилан, использующийся для химической модификации поверхности нанопроводов; ДТССП – 3,3'-дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат), кросс-линкер, использующийся для активации поверхности; аминолинкер – участок последовательности молекулярного зонда, связывающийся с ДТССП-активированной поверхностью нанопроводов; целевая оДНК – детектируемая молекула-мишень. Рисунок адаптирован из [148].

Предварительная очистка поверхности оказывает значительное влияние на эффективность химической модификации и последующей сенсибилизации [119]. Цель очистки поверхности кремниевых нанопроводов перед их модификацией состоит в удалении нежелательного загрязнения и облегчении образования в основном полярных ОН-групп. На этом этапе основными требованиями к состоянию поверхности являются стабильность, воспроизводимость, а также высокая плотность активных групп.

Поверхность кремниевых нанопроводов обычно очищают влажными методами [149]. Так, для удаления механических и органических загрязнений с поверхности нанопроводов проводят обработку чипа изопропанолом и деионизированной водой [121, 150]. Для удаления с поверхности кремниевых нанопроводов естественного окисла, образующего в процессе хранения чипов, используют плавликовую кислоту (HF) [146]. Данный способ был основан на наблюдении Чичеро с сотр. [151] и до сих пор остается активно применяемым благодаря своей высокой эффективности. Использование для очистки поверхности нанопроводов и образования

гидроксильных групп, необходимых для последующей силанизации, УФ/озона является важным шагом для достижения высокого качества химической модификации [152 – 154].

Существует несколько различных стратегий химической модификации поверхности, применимых к нанопроводам: связывание производных силана (силанизация), присоединение линкера, гидроксилирование и другие [120]. Выбор модификации поверхности определяется областью стратегии применения биосенсора и классом анализируемого вещества (например, ДНК, белки, вирусы, бактерии и др.). При этом биорецепторы, выступающие в качестве молекулярных зондов, такие как олигонуклеотиды, аптамеры или антитела, иммобилизуют на поверхности нанопроводов. Таким образом, ключевым моментом стадии химической модификации поверхности является создание слоя, содержащего функциональные группы, подходящие для связывания молекулярных зондов.

В разработанной методике для химической модификации поверхности использовалась силанизация, являющаяся широко распространенным подходом для связывания органических соединений с поверхностью нанопроводов. Благодаря присутствию на поверхности кремниевых нанопроводов полярных ОН-групп, полученных на стадии очистки поверхности, молекулы силана, несущие различные функциональные группы (например, -NH₂, -COOH, -OH и -CHO), могут образовывать один слой, характеризующийся высокой физической и химической стабильностью [155]. Образующиеся в результате силанизации связи -Si-O-силан или -Si-C-силан считаются наиболее стабильными [156 – 158]. Толщина и качество слоя силана на сенсорной поверхности оказывает большое влияние на чувствительность нанопроводного биосенсора. Многослойность или неровность покрытия поверхности силаном могут быть обусловлены избыточной концентрацией силана и/или временем инкубации [159]. В связи с этим, подбор оптимальных условий проведения силанизации в первую очередь определяется этими параметрами. Формирование монослоя силана возможно при использовании монопроизводных силана [82, 160] или при проведении процедуры силанизации в газовой фазе [148]. Однако при низкой плотности активных гидроксильных групп на поверхности кремниевого нанопровода, использование монопроизводных силана, например, моноалкоксидиметилсилана, может привести к низкой эффективности

88

химической модификации, обусловленной низкой плотностью активных групп, способных образовывать ковалентную связь с биомолекулами.

В Методике 1.6 был использован 3-аминопропилтриэтоксисилан (АПТЭС), имеющий три этоксигруппы (-OCH₂CH₃) на одном конце и аминогруппы (-NH₂) на другом [161 – 163], который является наиболее часто используемым силановым агентом благодаря его структуре и невысокой стоимости [164]. Концевая аминогруппа в дальнейшем реагирует с сукцинимидным фрагментом кросс-линкера. Силанизация твердых поверхностей с помощью АПТЭС зависит от многих факторов, таких как температура, влажность, концентрация, время реакции и растворитель, которые влияют на качество самоорганизующегося монослоя. В работе Ядава с сотр. [161] было показано, что гомогенные, однородные и высококачественные слои силана могут быть получены с использованием АПТЭС. Следует что для обеспечения качественной иммобилизации отметить, высокоселективного молекулярных зондов И, следовательно, И высокочувствительного обнаружения целевых молекул, слои силана должны быть однородными и иметь низкую шероховатость поверхности. Поэтому при проекта дополнительно выполнении силанизации В рамках данного контролировалась ровность слоя силана с помощью АСМ.

Для обеспечения биопецифического анализа проводится иммобилизация молекулярных зондов на поверхности датчика. В качестве молекулярных зондов, согласно Методике 1.6, выступают синтетические олигонуклеотидные ДНК (оДНК), которые комплементарны целевым оДНК. Одним из ключевых аспектов подготовки чипа является выбор подходящей техники иммобилизации. Это связано с тем, что после иммобилизации существует вероятность того, что молекулярный зонд инактивируется. Таким образом, оДНК-зонды должны быть способны сохранять свою структуру, функцию и биологическую активность во время использования биосенсора. Широко известны два метода иммобилизации: физический (обратимый) и химический (необратимый). Выбор подходящей методики зависит от выбранного молекулярного зонда, сенсора, физико-химической среды и характеристик анализируемого вещества [165]. Таким образом, в методике анализа содержания нуклеиновых кислот с помощью нанопроводного биосенсора был выбран метод химической или необратимой иммобилизации молекулярных зондов.

89
Химическая иммобилизация основана на образовании химических связей - ковалентных сшивок, между функциональными группами молекулярного поверхностью нанопровода. Этот процесс зонда И осуществляется с помощью линкеров, которые используются для получения прочной ковалентной связи между молекулярными зондами и предварительно АПТЭС-силанизированной поверхностью нанопровода. Так, для ковалентной иммобилизации оДНК-зондов на поверхность нанопроводов использовался бифункциональный 3.3'кросс-линкер дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (ДТССП), один конец которого связывался с аминогруппами, присутствующими на силанизированной поверхности нанопроводов, а другой – с аминолинкерами оДНК-зондов [166]. Для этого процесса необходимы оптимальные условия, такие как рН, температура и ионная сила, для обеспечения более короткого времени отклика и более сильного связывания [167]. На рисунке 6.4 представлено изображение поверхности чипа к НП-биосенсору в процессе формирования сенсорных зон с различными типами молекулярных зондов. Растворы зондов наносились на поверхность нанопроводов с помощью роботизированной раскапывательной системы. Следует отметить, что для селективной детекции одна часть нанопроводов иммобилизуется оДНК-зондами, комплементарными целевым оДНК (рабочие каналы), а для учета неспецифической сорбции некомплементарными оДНК-зондами (контрольные каналы). Количество иммобилизуемых нанопроводов и тип наносимых зондов определяются при планировании эксперимента. Преимуществами данного метода иммобилизации являются прочное химическое связывание и возможность регулирования среды для сенсора с помощью соответствующих стабилизирующих агентов [168].

Таким образом, основные требования к функционализации поверхности заключаются в следующем: возможность иммобилизации молекулярных зондов для обеспечения селективного и высокоспецифичного взаимодействия с целевыми молекулами, хорошая сила связывания между слоями кросс-линкера, силана и поверхностью сенсора, воспроизводимость, а также однородная и не шероховатая поверхность.

90



Рисунок 6.4 - Процесс формирования сенсорных зон с различными типами молекулярных зондов на поверхности чипа к НП-биосенсору. Растворы с молекулярными оДНК-зонды (черные круги), нанесены на поверхность нанопроводов при помощи роботизированной раскапывательной системы. На фотоизображение приведен пример фотоизображения поверхности с 9-тью каплями растворов, в таком случае чип может быть предназначен для детекции 9-ти типов аналитов (9 типов биомаркеров)

Разработанная Методика 1.6 предназначена для высокочувствительной детекции нуклеиновых кислот в модельных растворах с низкой концентрацией биомакромолекул с помощью нанопроводного биосенсора. Как указывалось выше, в качестве нуклеиновых кислот выступают целевые оДНК.

Детекция оДНК осуществлялась в модельном растворе, в качестве которого выступает 1 мМ калий-фосфатный буфер (КФБ) с pH=7,4. Низкая концентрация буферного раствора была выбрана для избежания эффекта Дебаевского экранирования. Дебаевская длина экранирования (радиус Дебая, λD) является количественной характеристикой эффекта описывающей глубину поля, проникновения поля в полупроводник. По физическому смыслу радиус Дебая соответствует характерному расстоянию, на которое проникает электрическое поле в полупроводник. Когда твердая поверхность полупроводника находится в контакте с электролитом, некоторые из свободных подвижных ионов в электролите приближаются к поверхности полупроводника и перестраиваются в один слой экранирующих ионов, создавая таким образом двойной электрический слой. При длине Дебая ~1 нм (сравнимой с ионной концентрацией 100 мМ) заряды мишени могут быть электрически обнаружены на чувствительной поверхности [169]. заряд Олнако. захваченный целевой когла расположен на расстоянии, превышающем длину Дебая, электростатический потенциал экранируется этими экранирующими ионами; следовательно, чувствительная поверхность полевого транзистора не может обнаружить это событие связывания. Более того, модель

двойного диффузного слоя утверждает, что несоответствие размеров между длиной Дебая и зарядом целевых аналитов будет препятствовать их обнаружению на чувствительной поверхности [170]. Как правило, в физиологических условиях и в высококонцентрированных растворах длина Дебая оказывается небольшой (~0,7–1 нм) [171], в то время как большая часть зарядов мишени находится в молекулах средних и крупных размеров (радиус может достигать ~10 нм). Распространенным методом уменьшения эффектов дебаевского экранирования является разбавление исследуемой пробы буферным раствором для уменьшения концентрации ионов [172]. В работе Штерна с сотр. было продемонстрировано, что чувствительность датчика значительно улучшается в электролите с низкой концентрацией по сравнению с раствором с высокой ионной силой [173]. На рисунке 6.5 показана взаимосвязь между длиной Дебая и ионной силой, согласно Штерну с сотр.



Рисунок 6.5 - Модель длины Дебая (λD) при различной ионной силе натрий-фосфатного буфера (НФБ), разработанная Stern et al. Длина Дебая в 1 × НФБ, 0,1 × НФБ и 0,01 × НФБ представлена зеленой линией, синей линией и оранжевой линией соответственно. Обозначения: синяя полоса представляет активную область устройства; желтые области – выводы (S – исток, D – сток); серая заштрихованная область – нижележащий оксид; фиолетовые ромбы – биотин (зонд); а красные объекты – стрептавидин (отрицательно заряженная целевая молекула) [173].

Таким образом, уменьшение ионной силы в 10 раз увеличивает длину Дебая от поверхности устройства. Также следует отметить, что, сравнивая радиус Дебая с размером молекулы ДНК, иммобилизованной на поверхности, то для растворов с высокой ионной силой ДНК-дуплекс становится длиннее двойного электрического слоя ($\lambda D = 6,65$ нм для 1 мМ фосфатного буфера), таким образом происходит снижение чувствительности, т.к. гибридизация частично происходит за пределами области двойного электрического слоя [174]. В связи с этим, для преодоления эффекта дебаевского экранирования для детекции оДНК и был выбран 1 мМ калий-фосфатный буфер [175, 176].

В методике анализа содержания нуклеиновых кислот в модельных системах

для проведения электрических измерений использовался нанопроводный биосенсор, состоящий из двух модулей – аналитического и электронно-измерительного. Аналитический модуль состоит из микрожидкостной кюветы объемом 1000 мкл, дном которой является встроенный в стандартный корпус микросхемы нанопроводный чип (Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова СО РАН, Новосибирск) с массивом попарно сгруппированных 12-ти нанопроводов n- или ртипов проводимости. Диаметр чувствительной зоны нанопроводного чипа составляет 2 мм. Схема нанопроводного биосенсора, который применяля при разработке Методки 1.6., представлена на рисунке 6.6.



Рисунок 6.6 - Схема нанопроводного биосенсора. Обозначения: 1 – мешалка; 2 – платиновый электрод; 3 – тефлоновая кювета объемом 1000 мкл; 4 – чип с массивом нанопроводов; 5 – полистирольная накладка, в центральное отверстие которой вставляется стерильная прокладка из поливинилхлорида; 6 – держатель чипа; 7 – рычажок; 8 – держатель измерительной ячейки; 9 – перистальтический насос; 10 – стоковая емкость; 11 – электронно-измерительный модуль.

Электронно-измерительный модуль предназначен для регистрации сигналов с нанопроводов, расположенных на чипе, и визуализации сигналов на мониторе компьютера во время проведения эксперимента в режиме реального времени. Преобразование регистрируемого аналогового сигнала в цифровой осуществляется с помощью аналого-цифрового преобразователя. Анализ и визуализация сигналов, полученных в результате измерений, в графическом виде осуществляются с помощью программного обеспечения PowerGraph 3.3 Professional.

Детекция нуклеиновых кислот, а именно целевых оДНК, проводится в кювете нанопроводного биосенсора в режиме реального времени. В кювету вносят раствор аналита, содержащий синтетическую оДНК. В процессе регистрации происходит биоспецифическое связывание детектируемых молекул с молекулярными оДНКзондами на поверхности нанопроводов. С помощью программного обеспечения осуществляют регистрацию сигнала с нанопроводов, который отображался в графическом режиме на мониторе персонального компьютера с помощью программного обеспечения PowerGraph 3.3 Professional.

Регистрацию целевых оДНК осуществляют в режиме реального времени $(I_{ds}(t))$ », то есть в режиме регистрации зависимости величины тока стока-истока (I_{ds}) от времени (t) при постоянном напряжении на затворе (V_g) . В этом режиме задают постоянное рабочее напряжение на затворе (V_g) и напряжение сток-исток (V_{ds}) . Далее собирают кювету, мешалку (скорость перемешивания раствора составляет ~3000 об/мин) и устройство для промывки нанопроводного чипа: стерильные трубки из поливинилхлорида для забора образца и перистальтический насос. Затем в кювету вносят 300 мкл рабочего 1 мМ калий-фосфатного буфера. Измерения проводятся при добавке в кювету 150 мкл раствора оДНК, а также при замене в кювете анализируемого раствора на отмывочный 1 мМ калий-фосфатный буфер. Для повышения стабильности работы системы используют заземленный платиновый электрод, погруженный в раствор измерительной кюветы.

Схема измерения оДНК выглядит следующим образом. В кювету биосенсора добавляют 300 мкл 1 мМ КФБ и прописывают базовую линию в течение 10 мин. Далее в кювету добавляют 150 мкл раствора оДНК в требуемой концентрации (от 10⁻¹⁸ М до 10⁻¹⁵ М) и также осуществляют регистрацию сигнала в течении 10 мин. Затем 450 мкл раствора откачивают из кюветы с помощью перистальтического насоса и 3 раза промывают кювету 300 мкл 1 мМ КФБ. На последнем этапе в кювету добавляют 300 мкл отмывочного 1 мМ КФБ и осуществляют регистрацию сигнала в течение 5 мин. Схема измерений оДНК представлена на рисунке 6.7. Контрольный эксперимент осуществляется аналогичным образом, однако вместо раствора оДНК в кювету добавляют 150 мкл 1мМ калий-фосфатного буфера. Для контрольного и рабочего эксперимента обычно проводится около трех технических повторов.



Рисунок 6.7 - Схема измерения целевой оДНК (рабочий эксперимент) с помощью нанопроводного биосенсора п-типа. Обозначения: (1) – базовая линия; (2) – добавка целевой оДНК; (3) – отмывка буфером. Ориентировочное время каждого этапа не более 15 мин.

В Методике 1..6 10-минутное временя регистрации молекул целевых оДНК было выбрано для того, чтобы сделать время анализа менее продолжительным. После 10 минут сигнал должен увеличиваться и в итоге выйти на насыщение, что также подтверждается в работах Яниссена Р. с сотр. [177] и Ли Дз. с сотр. [178]. Однако время анализа может быть изменено, этот вопрос будет освещен ниже в разделе 1.7. Общее время проведения цикла измерений контроль/исследуемая концентрация оДНК не превышает 1 часа

Таким образом, с помощью нанопроводного биосенсора осуществляется детекция целевой оДНК в концентрациях от 10^{-18} M до 10^{-15} M. После каждого цикла контроль/измеряемая концентрация оДНК проводится отмывка поверхности чипа 50 мл деионизированной воды (70^oC) для регенерации поверхности сенсора [179]. Так, продолжительность каждого цикла составляет не более 1 часа, а время регистрации целевой оДНК занимает всего 10 мин, что значительно меньше времени, требуемого для анализа ДНК с помощью других молекулярно-биологических методов [180, 181]. Следует отметить, что нанопроводный биосенсор позволяет осуществлять детекцию целевой оДНК с чувствительностью ниже фемтомолярной (10^{-17} M) [148, 182 - 186].

Полученные в эксперименте данные представляют в виде сенсограмм – графиков зависимости величины тока (I_{ds}) от времени эксперимента (t). Зарегистрированные изменения уровня сигнала тока (I_{ds}) от каждого нанопровода нормализуют к 1 путем деления на начальное значение тока. Для учета неспецифических взаимодействий, значения, полученные контрольном В эксперименте (т.е. с использованием чистого буфера, не содержащего детектируемых целевых оДНК), вычитают из абсолютных данных, полученных во время анализа растворов нуклеиновых кислот (целевых оДНК). Таким образом,

полученные после вышеперечисленных действий зависимости текущего сигнала от времени $I_{ds}(t)$ представляют в виде сенсограмм, отображающих дифференциальный сигнал, рассчитанный путем вычитания сигнала контрольного канала из сигнала рабочего канала. Для каждой кривой также рассчитываются значения стандартного отклонения и строятся полосы погрешностей.

На отчетном этапе работ Методика анализа содержания нуклеиновых кислот разработана с использованием аппаратно-программного инструментария, присутствующего в лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ на данный момент. Приготовление растворов, схема анализа, используемая в разработанной Методике 1.6 будут применены для анализа биологических образцов на последующих этапах работ. Однако, получение и обработка данных, отраженные в текущей версии Методики, достаточно ресурсоемкий процесс, экспорт полученных данных, нормализация, выравнивание и построение графиков в Microsoft Excel требуют значительного времени, превышающее время непосредственного анализа. Поэтому на последующих этапах Методика будет усовершенствована за счет специального ПО, также разрабатываемого в рамках данного проекта (Раздел 1.7). Кроме того, ожидается, что качество получаемых результатов будет улучшено за счет использования более совершенной конструкции чипов к НП-биосенсору, которые также будут разработаны в рамках проекта на следующем этапе работ (Раздел 1.8).

В рамках выполнения работ по пункту 1.6 Плана-графика была разработана методика анализа содержания нуклеиновых кислот с использованием нанопроводного биосенсора в модельных системах. Данная методика позволяет осуществлять детекцию нуклеиновых кислот - олигонуклеотидных ДНК, в модельных буферных растворах. Методика может быть использована для детекции других типов биомаркеров из класса нуклеиновых кислот. Разработанная методика обеспечивает выполнения требований Технического задания (п. 6.1.10):

- время проведения цикла измерений контроль/исследуемая концентрация оДНК составляет не более 1 часа;
- время регистрации целевой оДНК составляет 10 минут;
- - объем анализируемого модельного раствора составляет 450 мкл;
- - количество определяемых аналитов не менее 3;
- - наличие контрольных измерений (контроль проводится каждый раз

96

перед измерением целевой концентрации оДНК).

В соответствии с пунктом 1.6 ПГ и Техническим заданием Соглашения разработан документ «Методика анализа содержания нуклеиновых кислот использованием нанопроводного биосенсора в модельных системах» (файл «Пункт_ПГ-1.6-Методика_v1»)

7. Разработка ТЗ на специальное ПО для обработки данных, полученных с помощью молекулярного детектора – нанопроводного детектора

Принцип работы нанопроводного детектора описан выше в разделе 6. Как было указано в описании рисунка 6.6 нанопроводный биосенсор (НП-биосенсор) содержит два основных блока – аналитический модуль и электронно-измерительный модуль. Электронно-измерительный модуль НП-биосенсоров, входящих в УНУ «Авогадро» представлен в двух основных видах – измерительная система на основе пикоамперметров Kethley (рисунок 7.1а) и система сбора и обработки данных для 10-ти или 20-ти канального НП-биосенсора (СССОД-10 (рисунок 7.1 б) и «Двадцатиканальный измеритель сигнала нанопроводного биосенсорного датчика с синхронным детектированием (ИС-20СД)»).



Рисунок 7.1 – Фотоизображение НП-биосенсоров, входящих в УНУ «Авогадро»: а) пикоамперметры в комплексе с коннекторами Kethley в составе 5-ти канального НП-биосенсора; б) 10-ти канальный НП-биосенсор на основе СССД-НП10

Система на основе пикоамперметров Kethley является пилотной версией НПбиосенсора, и позволяет регистрировать сигнал от 5-ти каналов (каждый канал соответствует одному нанопроводному сенсору на чипе). Для функционирования этой системы в части регистрации сигналов ранее в ИБМХ было разработано специальное ПО «НБС» и «ТурбоНБС», позволяющие вести запись токовых характеристик сенсоров в виде зависимостей уровня тока от времени. Эти ПО были предназначены только для регистрации сигналов и их визуализации в процессе измерений. Обработка полученных данных проводилась с использованием стандартного пакета Microsoft Excel после экспорта результатов регистрации сигналов и размещения их в виде таблиц. С помощью системы на основе Kethley была показана принципиальная возможность высокочувствительной детекции биомакромолекул в модельных растворах и биологической жидкости. Однако, для развития и расширения возможностей исследований с применением молекулярного детектора на основе НП-биосенсора, аппаратно-измерительный комплекс на основе пикоамперметров Kethley имеет определенные недостатки. Так, в этой системе регистрируется сигнал от 5-ти сенсоров, в то время как на НП-чипе с текущей топологией расположено 10 сенсоров, т.е. одновременно регистрировать сигнал от всех сенсоров невозможно. В случае мультиплексного биоанализа (одновременного детектирования нескольких типов биомаркеров в одном образце), этот недостаток снижает количество типов детектируемых молекул в 2 раза. Кроме того, как видно из рисунка 7.1 а, эта система достаточно громоздкая и содержит значительное число кабелей и коннекторов. Третьим негативным фактором применения этой системы является то, что получение и обработка данных (как было указано в разделе 6), достаточно ресурсоемкий процесс, экспорт полученных данных, нормализация, выравнивание и построение графиков в Microsoft Excel требуют значительного времени, превышающее время непосредственного анализа. Этот недостаток приводит к тому, что результаты измерений получаются в режиме реального времени, но интерпретация этих результатов откладывается до получения результатов обсчета. Система на основе пикоамперметров Kethley будет далее использована в составе УНУ «Авогадро» для решения другого типа задач, например повышения чувствительности анализа за счет обеспечения регистрации более низких токов (на уровне фемптоампер). Но, для решения задачи мультиплексного

99

анализа биологических образцов в данном проекте будет использованы другие НПбиосенсоры).

СССОД-10 и Аппаратно-измерительные системы ИС-20СД являются следующим поколением НП-биосенсора. Как видно из рисунка 7.1 б (размеры ИС-20СД аналогичны размерам СССОД-10), это достаточно компактные системы, позволяющие регистрировать сигнал от всех 10-ти сенсоров, расположенных на НПчипе. На сегодняшний день эти системы не лишены недостатка, связанного с задержкой получения результатов интерпретации результатов. Аппаратная архитектура этих систем позволяет решить эту проблему за счет разработки специального ПО, которое может быть интегрировано в систему измерений на основе как СССОД-10, так и ИС-20СД. Однако, функционал, заложенный в разрабатываемом специальном ПО, ориентирован, прежде всего, на ИС-20СД (рисунок 7.2). Это сделано по следующим причинам.



Рисунок 7.2 – Фотоизображение НП-биосенсора на основе ИС-20СД

В перспективе, принцип анализа с применением НП-биосенсора может быть интегрирован в клиническую практику. На сегодняшний день, одним из популярных методов в медицинской диагностике является метод иммуноферментного анализа (ИФА, англ. Enzyme immunoassay, EIA), и в медицинских учреждениях уже существует приборная инфраструктура для проведения анализов биологических образцов этим методом. В частности, анализ проводится с применением 96-ти луночных плашек, для которых разработаны специальные планшетные шейкеры и раскапывательные системы для внесения образцов или отмывочных буферов. В будущем, при интеграции НП-биосенсоров в клиническую систему медучреждений разумно использовать эту инфраструктуру. Подробнее о конфигурации плашек для использования ИФА будет описано ниже в разделе 8, посвященному разработке новой конструкции чипа к НП-биосенсору. В данном разделе принципиально важным является то, что в ИФА использован формат регистрации сигнала одновременно для 96-ти образцов (биологических и контрольных), вносимых в отдельные лунки плашки. Поэтому разрабатываемое ПО имеет архитектуру, которую можно далее использовать для наращивания количества регистрируемых образцов до 96.

В системе НП-биосенсора на основе ИС-20СД реализована схема анализа с применением 2-х чипов. Регистрируется сигнал от каждого из 10-ти сенсоров, расположенных на одном из двух чипов. Следовательно, может быть смоделирована система анализа одновременного двух биологических образцов, поэтому именно эта аппаратная система является основной при разработке ТЗ на специальное ПО в рамках работ по проекту. На рисунке 7.3 приведена блок-схема прибора для измерения сигнала от 96-ти ячеек, каждая из которых содержит 10 сенсоров, т.е. схема, которая может быть использована в перспективе при разработке 960-ти канального НП-биосенсора, ориентированного на одновременный анализ 96-ти образцов с возможностью детекции до 10-ти типов различных биомаркеров. ПО привязано К конкретной конструкции НП-биосенсора, соответствующей прилагаемой блок- схеме.



Рисунок 7.3 – Блок-схема прибора для измерения сигнала от 96-ти ячеек, каждая из которых содержит 10 сенсоров

Использована терминология, которая применялась и ранее (термины упоминаются в разделах 6 и 8), но также потребовалось введение дополнительных терминов. Переменные представлены на латинице, чтобы их можно было вставить в текст программы. Кроме того, уточнены некоторые понятия.

Так, на рисунке 6.7 под номером «З» указана тефлоновая кювета, однако при составлении ТЗ на ПО и на изготовление чипов к НП-биосенсору было введено уточнение: этот элемент объединен с кристаллом, содержащем сенсорные элементы и введено понятие NWC – дословно Nano Wire Cell , ячейка нанопроводных детекторов - лунка (или кювета, или жидкостная кювета), дном которой является поверхность кристалла с 10-тью сенсорными элементами (или «нанопроволоки», в ПО этот термин NW – Nano Wire Detector) нанопроволочный детектор). Ранее использовалась нумерация NW от 1 до 10. Но в конфигурации НП-биосенсора с двумя и более ячейками, требуется детализация: NW(i,j) – j-ый NW , входящий в состав i-ой NWC. Введение некоторых терминов потребовалось для возможности реализации расширенного функционала ПО который будет описан ниже. Полный глоссарий терминов приведен в соответствующем разделе TЗ на ПО.

Разрабатываемое ПО предназначено как регистрации сигнала, так и для интерпретации полученных результатов. Основные блоки, отражающие функционал нового ПО представлены на рисунке 7.4. При разработке ПО за основу взята схема эксперимента с использованием НП-биосенсора, описанная в разделе 6 и представленная на рисунке 6.7. В перспективе, все операции должны будут выполняться последовательно и автоматически. Но, поскольку ПО, после разработки, будет использоваться, прежде всего, в исследовательских работах, направленных как на совершенствование системы биосенсора, так и установление параметров анализа, оптимальных для детекции биомаркеров, то предусмотрена Кнопка «Продолжить», которая появляется, когда программа ждёт от оператора команду продолжать работу. Например, после вывода на экран графиков или данных, чтобы предоставить оператору необходимое время для их просмотра и оценки результатов на той или иной стадии анализа.

Введена функция «Вывод на экран», которая позволит обеспечить визуальный контроль того, что соответствующая операция выполнена и выполнена правильно.

Включение и проверка работоспособности системы:

- Введение или загрузка из файла параметров используемых чипов;
- 2. Ввод параметров измерений;
- 3. Самодиагностика системы.

Проведение эксперимента:

- Регистрация сток-затворных характеристик каждого сенсора и автоматический подбор оптимальных установочных
 параметров измерения сигналов;
- Анализ биологических образцов регистрация уровня тока от времени (получение данных)

Обработка данных:

- Оценка уровня дрейфа базового сигнала на сенсограмме;
- 2. Определение уровня сигнала;
- 3. Интерпретация полученных результатов измерений

Рисунок 7.4 – Иллюстрация функционала разрабатываемого специального ПО для обработки данных. полученных с помощью молекулярного детектора НП-биосенсора.

Принципиальным новшеством функционала ПО является возможность проверки работоспособности системы в целом перед проведением эксперимента. Эта функция позволит исключить из работы неработоспосбные ячейки и не учитывать данные, полученные с сенсоров, расположенных в этих ячейках.

<u>Действия в блоке «Включение и проверка работоспособности системы»</u> (рисунок 7.4, левая панель) включают этап введения параметров НП-чипов, установленных в систему. Оператор заливает начальный буфер в ячейки NWC, т.к. предполагается, что производитель уже проверил все чипы при измерениях в воздушной среде («на воздухе»). Кнопка «Введите параметры» становится активной. Этап введения параметров предполагает два сценария:

а) Параметры загружаются из файла, если это стандартные чипы для рутинной работы. Параметры должны быть указаны в файле производителем (подробнее см. раздел 8 часть «паспорт чипа»)

б) Для исследовательской работы допустимые значения параметров загружаются вручную в специальную форму. После ввода параметров в форму этот набор параметров запоминается в файл, и в дальнейшем может быть загружен из файла.

Самодиагностика с установленными параметрами необходима, т.к. прибор корректно работает при определённом диапазоне напряжений и температур. Измерения при выходе за допустимые пределы будут недостоверными.

Окно сообщения «Ожидаемое время подготовки» необходимо, чтобы оператор мог оценить время подготовки оборудования. Если «Счетчик времени» будет заметно превышать «Ожидаемое время подготовки» это значит, что оборудование неисправно.

Функции в блоке <u>«Проведение эксперимента»</u> (рисунок 7.4, центральная панель) могут быть разделены на две группы: регистрация сток-затворных характеристик (C3X) каждого сенсора (ранее этот режим называли «режим измерения C3X); анализ биологических образцов - регистрация сигнала уровня тока от времени (ранее этот режим называли «режим нанобиосенсора», в котором регистрировались сенсограммы).

Группа функций при регистрации C3X предназначена, в отличие от предыдущих вариантов ПО, не только для регистрации, но и для оптимизации

105

получаемых сигналов. Кроме того на этом этапе также отделяются неработающие ячейки:

- Режим «Измерение тока затвора» необходим для того, чтобы исключить неисправные чипы, а также предотвратить короткое замыкание в цепи затвора. Учет неисправных ячеек необходим, чтобы знать количество и номера исправных, чтобы в дальнейшем работать только с исправными;
- 2) Режим «Установить Isd=0» необходим для того, чтобы компенсировать начальное смещение от нуля каналов измерения. Начальные смещения возникают из-за ненулевых входных токов усилителей, из-за термоЭДС в местах пайки, токов утечки по печатной плате и т.д. При ненулевых начальных токах значительно сужается динамический диапазон канала;
- «вывести на экран Isd(i,j) ячейки NWCC(i,j)» –выводит на экран значения нулевых токов для их визуального контроля;
- Программа вычисляет |< Isd(i,j)>| и если эти значения больше порога Zero, то ячейка бракуется;

Регистрация сток-затворных характеристик (обозначение в ПО «SDG») необходима определения параметров NW. чтобы ДЛЯ корректировать характеристики сквозного канала. Команда «вывести на экран SDG ячейки NWCC(i,j)» - выводит на экран значения SDG для их визуального контроля. По своей физической природе SDG монотонно растущая гладкая функция (пример приведен на рисунке 7.5), а следовательно, имеет положительную производную, но из-за шумов она становится немонотонной и её производная похожа на шум. Произведя сглаживание функции с помощью подходящего фильтра необходимо сделать SDG монотонно растущей гладкой функцией для получения гладкой производной. Сглаживание также будет выполняться в разрабатываемом ПО.



Рисунок 7.5 – Пример СЗХ, зарегистрированных на 5-ти канальном НП-биосенсоре в логарифмическом масштабе

Функция «Выводится на экран графики производных SDG ячейки NWCC(i,j)» - выводит на экран значения производных SDG для их визуального контроля.

Возможность в ПО провести дифференцироване SDG каждого NW, найти её крутизну для каждого значения Vg, позволяет выбрать оптимальный параметр для измерений выбрать рабочее значение Vgw. Ранее этот параметр выбирался не на основе программно-расчитанных данных, на основе опыта оператора. В разрабатываемом ПО для выбора рабочей точки:

- 1) Оценивается расчетным способом крутизна характеристик NW при Vgw;
- Бракуются те ячейки, где разброс крутизны характеристик более N. N выбирается экспериментально и будет установлено в дальнейшей работе;
- 3) Рассчитывается коэффициенты усиления каждого канала так, чтобы крутизна характеристики (значение производной) в точке Vgw, были одинаковыми и равнялись значению самого низкого уровня сигнала (из сигналов из всех сенсоров в ячейке) –вводится ослабление в каждый канал кроме самого маленького. После того как рассчитаны коэффициенты усиления каналов снова измеряются SDG.
- 4) Выводятся на экран графики SDG ячейки NWCC(i,j) выводит на экран значения производных SDG одной из ячеек для их визуального контроля;
- 5) При рабочем значении напряжения затвора крутизна всех SDG должна быть одинакова;
- Так как коэффициенты усиления каналов различны, уровень постоянной составляющей сигналов будет разным. Необходимо привести их к

одному среднему уровню <Isd(i,j)>. Теперь и крутизна и постоянная составляющая сигнала всех каналов при Vgw равны. Чтобы убедиться в этом введена команда «вывод на экран Isd(i,j) для NWCC(i,j)».

К анализу биологических образцов (измерениям) можно приступить, когда все каналы измерения проверены и настроены. Ранее, как показано на рисунке 6.7, необходимо было соблюдать три временных отрезка (Время (1)....Время (3)). Установлены интервалы (порядка 15 мин каждый) были на основе опыта экспериментов – за это время визуально система приходила в равновесие после добавления каждого из компонентов (буфера, разбавленного образца и т.д.).

В разрабатываемом ПО учтена возможность экспериментально проверить и установить необходимые интервалы измерений каждого этапа анализа. Для этого введена маркировка временных участков T0...T7 и предусмотрены следующие операции:

- Измеряется дрейф постоянной составляющей сигнала с начальным буфером. Для этого: если общее время измерения T3 (например 120сек), определяется среднее значение сигнала за время T4_start (например, 5 сек) в самом начале промежутка T3 и за время T4_end = T4_start в самом конце промежутка T3.
- 2) Рассчитывается дрейф опорного канала и дрейф остальных каналов относительно опорного канала. Величины n5%, T3, T4_start будут определяются экспериментально, т.к. предполагается, что в зависимости от условий экспериментов, типа детектируемых образцов и т.д., эти временные интервалы будут разными.

При появлении окна «Внесите исследуемый образец» -оператор вносит исследуемые образцы, проводит пипетирование, отмывает ячейки в течение времени Т5. При вводе параметров (см выше) это время должно быть таким, чтобы все необходимые работы были произведены. В настоящий момент нельзя оценить примерное значение этого параметра, т.к. на следующих этапах работы по проекту предлагается использовать другую конструкцию чипа (в том числе жидкостной ячейки), для которой будет реализован другой тип перемешивания (см. подробнее раздел 8). Перемешивание является существенным фактором, влияющим на время доставки биомолекул к поверхности сенсоров.

Этап «Измерение с конечным буфером» включает измерение сигнала в течение времени T6=T3 и расчет среднего значения сигнала за время T7_end (причём T7=T4) в самом конце интервала T6.

Для возможности интерпретации результатов вычисляется вычисляем разность сигналов между «рабочими» и «контрольным» сенсором в каждой ячейке:

- δIsd(j,i) между значениями средних величин в конечных отрезках T4_end и T7_end в начальном и конечном буфере ;
- 2) Сравниваются модули полученных величин

 $|\delta Isd(j,i)| = |\langle Isd(k,j)_T4_end \rangle - \langle Isd(k,j)_T7_end \rangle|;$

 Для вынесения оценки «ложь» или «истина» используются следующие соотношения

если $|\delta Isd(j,i)| \ge A$, $\delta Isd(j,i) = 1$;

если $0,5A < |\delta Isd(j,i)| < 1A, \delta Isd(j,i) = 0;$

если $|\delta Isd(j,i)| \le 0.5A$, $\delta Isd(j,i) = -1$.

Порог А, который позволит установить оценку результатов анализа будет определен экспериментально далее, в серии экспериментов по детекции биомаркеров в модельных растворах и биологических образцах.

Разработанное в соответствие с пунктом 1.7 ПГ и Техническим заданием Соглашения документ «Техническое задание на специальное ПО для обработки данных, полученных с помощью молекулярного детектора – нанопроводного детектора» представлен в виде отдельного документа в составе пакета отчетной документации по этапу проекту (файл «Пункт_ПГ-1.7-ТЗ_ПО_НП_v1»).

8. Разработка ТЗ на изготовление экспериментальных образцов чипов для нанопроводного детектора, адаптированных для анализа биологических образцов

В рамках выполнения проекта по пункту 1.8 ПГ Соглашения разработано техническое задание на изготовление экспериментальных образцов чипов для нанопроводного детектора (НП-чипов), адаптированных для анализа биологических образцов (далее ТЗ 1.8). Разработка и последующее изготовление НП-чипов нового типа обусловлено несовершенством конструкции чипов и НП-биосенсора. Существующие решения не позволяют проводить массовые измерения с целью анализа большого количества биологических образцов. Кроме того, для решения задачи сравнения результатов анализа для образцов, полученных от пациентов с подтвержденными диагнозами и от здоровых пациентов, необходимо использование хорошо охарактеризованных чипов с воспроизводимыми исходными параметрами.

При разработке T3 1.8 также учитывалась перспектива использования HПбиосенсора в медицинской практике. Как было указано выше в разделе 7, медицинское устройство на основе HП-биосенсора перспективно для внедрения в существующую систему медицинских анализов. При этом может быть использована широко применяемая в настоящее время приборная инфраструктура для иммуноферментного анализа (ИФА): роботизированные системы внесения образцов и промывки, шейкеры инкубаторы и прочее.

Таким образом, при разработке ТЗ 1.8 учтены фундаментальные принципы анализа с применением НП-биосенсора, методика анализа, но предложены решения, ориентированные на воспроизводимый мультиплексный анализ. При этом учтена перспектива использования НП-биосенсора в медицинской практике.

Состав разрабатываемых чипов определяется назначением изделия и требует включения сенсорного элемента - кристалла с кремниевыми нанопроводными структурами и заземляющими электродами, печатной платы с разъёмом для подключения к электронной схеме измерения токов нанопроводов, жидкостной системы для доставки анализируемого раствора к поверхности сенсорных элементов и документации, отражающей электрические характеристики нанопроводных чипов.

Количество и размеры нанопроводов на кристалле определялись необходимостью мультиплексного анализа и наработанной технологией

изготовления нанопроводных чипов.

В разделе 6, на рисунке 6.6 приведена схема НП-биосенсора в текущей конфигурации. Далее будут использованы фрагменты этого рисунка для обоснования предложений по разработке НП-чипов нового типа, отраженных в разработанном ТЗ 1.8.

Внесение растворов в кювету является необходимым этапом анализа. Как указано в Методике 1.6, требуется внесение буфера для измерений, раствора анализируемого образца, отмывочного буфера. В настоящее время все растворы вносятся с помощью автоматической пипетки. Эта операция также используется в ИФА и может быть произведена автоматически с помощью роботизированной раскапывательной системы или многоканальной автоматической пипетки (например как на рисунке 8.1) и одноразовых наконечников.

В текущей конфигурации для перемешивания растворов используется мешалка (рисунок 8.2 (1)), с помощью которой создается турбулентный поток раствора внутри кюветы. В формате параллельного анализа нескольких образцов установить подобную мешалку в каждую кювету не представляется возможным, т.к. для обеспечения их работы требуются дополнительные электрические блоки. Поэтому принято решение отказаться от этой части биосенсора и для перемешивания использовать пипетирование – циклы внесения/отбора растворов с помощью пипеток. Именно это решение заложено в ТЗ 1.8, но будет дополнительно исследоваться – достаточно ли будет такой интенсивности перешивания для обеспечения движения молекул аналита к поверхности сенсоров на НП-чипе.





Рисунок 8.1 – Пример внесения растворов в плашку для ИФА (левая панель, рисунок адаптирован из ресурса https://sun-clinic.ru/) и 96-ти луночной плашки (планшета), стандартно применяемого в текущей практике медицинских анализов (лправая панель, рисунок адаптирован из https://www.laboratorii.com/)





Рисунок 8.2 — Части НП-биосенсора, требующие модернизации. панель слева 1 — вращающаяся мешалка; паенль в центре 2 — платиновый электрод; панель справа, красные стрелки, кювета и система ее крепления

Другим элементом, требующим внимания, является электрод заземления (рисунок 6.6 и рисунок 8.2 (2)). Платиновый электрод обеспечивает стабильность электрического поля в растворе. Этот электрод, в текущей конфигурации погружается в кювету. Но это решение также не подходит для параллельного анализа нескольких образцов. Поэтому в ТЗ 1.8 предложено интегрировать этот элемент на поверхности каждого чипа. Но, возможен также монтаж электрода в стенку кювету. Однако такой вариант менее предпочтителен по следующим причинам.

В текущей конфигурации для заполнения растворами используется тефлоновая кювета, выточенная на станке. Однако, такой способ изготовления кюветы трудоемкий, а для монтажа требуется особая система планок с винтами (рисунок 8.2, правая панель, красные стрелки). Кроме того, после каждого анализа требуется отмывка кюветы во избежание контаминации исследуемых образцов, что также непрактично. Поэтому в ТЗ 1.8 предложено использовать одноразовые кюветы, которые могут быть изготовлены из обычного лабораторного пластика методом штамповки. Подобный способ использован для изготовления планшетов для ИФА (рисунок 8.1). В таком случае, во-первых, реализован принцип одноразовости, а вовторых, новая конструкция чипа будет приближена к формату плашек, которые используются в ИФА. Но, если использовать для изготовления кюветы метод штамповки пластика, то установка электрода в стенку кюветы (как было указано выше) непрактичное решение, т.к. на производстве полимеров, как правило, не используются те технологии микроэлектроники, которые используются при производстве микросхем. Поэтому интеграция электрода на поверхность чипа

видится как оптимальное решение, но не исключены и другие предложения.

При разработке предложений по конструкции кюветы были проанализированы существующие решения, используемые в высокочувствительном анализе с применение НП-биосенсора. На рисунке 8.3 приведен пример жидкостной системы для подачи растворов на основе микрофлюидных технологий, предложенный в [187].



Рисунок 8.3 – Схематическое изображение и фотография прототипа биочипа с интегрированной микрожидкостной системой подачи растворов; Размер чипа 15×15 мм, 1- платформа, 2 – чип, 3 – канал для ввода жидкости, 4 – ПДМС (полидиметилсилоксан) канал, 5 – канал для вывода жидкости. Рисунок адаптирован из [187]

Микрофлюидные системы являются актуальным инструментальным решением в современном биоанализе. Привлекает возможность миниатюризации устройства, небольшие количества реагентов, требуемые для анализа. Однако микрофлюидная платформа состоит из набора компонентов (приводы, клапаны, смесители и пр.), от согласованного функционирования которых зависит успешность доставки образца к поверхности сенсоров. В условиях параллельного анализа нескольких образцов, а также при необходимости использования одноразовых изделий во избежание контаминации, в текущем проекте, как нам представляется, недостатков интеграции подобной системы в НП-биосенсор достаточно много.

При разработке конструкции кюветы, помимо указанных выше, учитывались следующие факторы. Дном кюветы в аналитическом модуле НП-биосенсора является кристалл с НП-сенсорами. Как указано на рисунке 6.6 на дне кюветы имеется отверстие, которое через прокладку совмещено с кристаллом нанопроводного чипа. Прокладка с помощью накладки и держателя измерительной ячейки обеспечивает герметичное соединение конструкции. Необходимые допуски при совмещении кюветы, прокладки и НП-чипа указаны в ТЗ 1.8. Требование к

разборности конструкции обусловлены необходимости стадии функционализации (см. раздел 6).

При внесении растворов в кюветы происходит свободное омывание анализируемым раствором поверхности кристалла нанопроводного чипа с массивом нанопроволок. Этот принцип должен быть учтен и в новой конструкции.

Для выполнения поставленной в проекте задачи анализа биообразцов, необходимо улучшить качество основных электрических характеристик НП-чипов при работе в буферных растворах, увеличить их долговечность и срок сохраняемости заявленных параметров. Поэтому внимание в ТЗ 1.8 также уделено техническим требованиям к изделию.

Для химической обработки и нанесения молекулярных зондов в лаборатории конструкция нанопроводного биосенсора должна предусматривать свободное омывание растворами реагентов поверхности нанопроводов и несложную сборкуразборку изделия.

Верхняя поверхность кристалла нанопроводного чипа должна быть не ниже уровня верхней поверхности печатной платы нанопроводного чипа, это необходимо для контроля поверхности нанопроводных чипов с помощью атомно-силовых микроскопов.

Нанопроводной чип должен иметь форму с рабочим кристаллом сверху, что необходимо для установки жидкостной кюветы.

Требование – нанопроводной чип должен иметь спрятанные изолированные подводящие дорожки и не иметь открытых припаянных проводов, необходимо для исключения непреднамеренного повреждения нанопроводного чипа при установке в электронно-измерительный блок НП-биосенсора.

Для идентификации и возможности внесения параметров в специальное ПО (см раздел 7) каждый НП-чип должен иметь паспорт и маркировку. В паспорте должны быть приведены сток-затворные характеристики в 1 mM калий-фосфатном буфере всех нанопроводов данного чипа.

Геометрические размеры и материалы изделия, его установка в рабочее положение определялись использованием наработанных методик и удобством работы оператора.

Требования к жидкостной системе определялись исключением протечек и

114

обеспечением воспроизведения местоположения относительно нанопроводного чипа.

Для исключения электромагнитных помех нанопроводной чип должен иметь защитное экранирование от внешнего электромагнитного излучения, а жидкостная система не должна создавать электрических наводок.

Для надежности измерений и проведения запланированных серий экспериментов разрабатываемые чипы должны сохранять работоспособность при работе в 1mM калий-фосфатном буфере не менее 10 дней, а при непрерывной работе не менее 12 часов.

Срок сохраняемости паспортных характеристик изделий не менее 1 года определен исходя из лабораторных потребностей.

Диапазон рабочих температур выбран для проведения анализа в лабораторных условиях.

Требования к персоналу определялись необходимостью проведения массовых анализов в медицинских учреждениях.

Также в ТЗ 1.8 указаны обоснованные требования стандартизации, унификации, каталогизации и по метрологическому обеспечению.

Для дальнейшей модернизации нанобиосенсора и эксплуатации его в условиях медицинского учреждения предложен вариант нового типа чипа, посадочной площадки, прокладки и кюветы. Формат

Был предложен и спроектирован новый формфактор чипов, обеспечивающий точное пространственное позиционирование. Также была предложена новая контактная группа с одним контактном для установки напряжения на затворе Vg транзисторов и десятью контактами для снятия тока сток-исток Ids с каждого нанопровода (рисунок 8.4). Был спроектирован новый формфактор посадочной площадки, обеспечивающий надежную фиксацию чипа, а также удобство установки и снятия чипа (рисунок 8.5), а также новый формфактор прокладки, обеспечивающий герметичное прилегание чипа к стенкам кюветы (рисунок 8.6).



Рисунок 8.4 - Предлагаемая модель чипа с 10 нанопроводами.



Рисунок 8.5 - Предлагаемая модель посадочной (установочной) площадки для НП-чипа



Рисунок 8.6 - Предлагаемая модель герметирующей прокладки для НП-чипа

Был спроектирован новый формфактор кюветы, обеспечивающий герметичность конструкции и удобное взаимодействие оператора установки во время проведения эксперимента (рисунок 8.7).



Рисунок 8.7 - Предлагаемая модель кюветы.

На рисунке 8.8 приводится схема сборки составных компонентов новой системы. Предложенная конструкция имеет ряд преимуществ перед текущей:

- Удобство установки чипа;
- Герметичность конструкции:
- Простота в эксплуатации

Данная модернизация является необходимым этапом для дальнейшей разработки чипа с матрицей кристаллов с нанопроводами, что позволит увеличить количество задействованных нанопроводов при проведении эксперимента до 96 образцов и 960 сенсорных элементов (рис. 8.9).

Подробные чертежи предлагаемых элементов приведены в Приложении А. Конструкции элементов могут быть изменены по предложениям конструкторов исполнителя работ по разработанному ТЗ 1.8.

Следует подчеркнуть, что разработанное T3 1.8 содержит некоторые параметры (указаны в тексте отдельного документа T3 в составе пакета отчетной документации), которые требуют уточнения в процессе выполнения исследовательской работы при изготовлении НП-чипов нового типа.



Рисунок 8.8 - Предлагаемая система сборки составных компонентов в единую систему, где а – собранная конструкция; б – разобранная конструкция.



Рисунок 8.8 - Предлагаемая 96ти луночная система с НП-чипами для применения высокочувствительного анализа в медицинской практике в будущем.

Разработанное в соответствие с пунктом 1.8 ПГ и Техническим заданием Соглашения документ «Техническое задание на изготовление экспериментальных образцов чипов для нанопроводного детектора, адаптированных для анализа биологических образцов» представлен в виде отдельного документа в составе пакета отчетной документации по этапу проекту (файл «Пункт_ПГ-1.8-ТЗ_НП-чипы_v1»).

9. Разработка схемы анализа транскриптома в биологических образцах с использованием нанопорового детектора

Одной из ключевых задач проекта является построение молекулярного профиля человека с использованием высокочувствительных детекторов. В рамках отчетного периода предложена схема молекулярного анализа транскриптома биологических образцов с использованием нанопорового детектора УНУ «Авогадро».

Транскриптом является промежуточным этапом при реализации генетически закодированной информации в протеом. Предыдущие исследования нашего коллектива показали, что при выборе оптимального сочетания методических подходов и уровня отсечения сигнала может быть получено полное соответствие между количеством белок-кодирующих генов (БКГ) человека и количеством детектированных транскриптов (мРНК): как минимум, один транскрипт с отличным от нуля уровнем экспрессии детектируется для каждого БКГ [188].

9.1. Принципы анализа транскриптома биологических образцов

Согласно опубликованным максимальное данным, количество детектированных транскриптов (мРНК) может быть получено при использовании одновременно методов секвенирование двух анализа транскриптома: С использованием нанопорового детектора, позволяющее получить длинные транскриптов, В сочетании с транскриптомного прочтения результатами секвенирования коротких фрагментов, выполненных с использованием Illumina [188].

При разработке схемы анализа транскриптома биологических образцов с использованием нанопорового детектора УНУ «Авогадро» (см. Рисунок 9.1) для увеличения покрытия образцов детектированными мРНК было принято решение проводить параллельное секвенирование коротких фрагментов с использованием Illumina на этапах РНК-секвенирования и рибосомного профилирования.

Предложенная схема позволяет получить научное объяснение усложнения композиции биологических объектов на уровне «ДНК (геном) – мРНК (транскриптом) -белок (протеом)» в ряду от недифференцированных клеток (эмбриональные стволовые клетки, ЭСК) до дифференцированной ткани человека, с

учетом анализа в качестве промежуточной стадии образца клеточной линии. В практическом плане развития высокочувствительных технологий регистрации белковых молекул схема предполагает наличие «золотого стандарта» для оценки полноты инвентаризации протеома в биологических образцах. В качестве «стандарта» предлагается использовать транслатом – совокупность транслируемых (т.е., с которых синтезируются белковые молекулы) мРНК.

Существенно большая чувствительность методов секвенирования следующего поколения (NGS, next generation sequencing) применительно к изучению полного транскриптома (совокупности мРНК) по сравнению с методами исследования полного протеома (совокупности белков), использующими в первую очередь масс-В своё время спектрометрию, породила надежду, что количественное профилирование транскриптома позволит оценивать «невидимую» часть протеома, в том числе количественно. Однако сегодня ясно, что не существует количественной корреляции между транскриптомом и протеомом, наиболее вероятно в силу сложной регуляции процессов, предшествующих трансляции транскриптов в белковые молекулы на рибосомах. Это определило возрастающий интерес к анализу транслатома, который представляет собой ту часть транскриптома, которая ассоциирована с рибосомами и транслируется в белковые молекулы [189]. Предполагается, что транслатом может быть рассмотрен как «проксипротеом» и его количественное профилированием методами NGS позволит получить информацию о части протеома, «невидимой» для современных методов масс-спектрометрии в силу ограниченности их чувствительности.

Экспериментальные подходы к анализу транслатома основаны на выделении молекул мРНК, которые находятся в комплексе с рибосомами, с их последующим секвенированием методами NGS. Классическим подходом является выделение моносом и полисом (молекул мРНК, находящихся в комплексе с одной или рибосомами, соответственно) несколькими методом скоростного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [190]. Наряду с этим классическим подходом, В последнее десятилетие получил широкое распространение подход, основанный на изолировании фрагментов мРНК, которые находятся непосредственно между большой (60S) и малой (40S) субъединицами рибосом и в силу этого недоступны для расщепления рибонуклеазой, с

121

последующим секвенированием этих фрагментов методами RNA-seq (синоним NGS) [191]. Впервые предложенный в 2009 г. [192, 193] подход известен под несколькими названиями: рибосомное профилирование, рибосомный футпринтинг (*Ribosome Footprinting*) и Ribo-seq (См. Рисунок 9.1). Он включает лизис клеток (в том числе в составе ткани), расщепление РНК в лизате добавлением экзорибонуклеазы, выделение рибосом с сохранившимися между субъединицами фрагментами мРНК со средней длиной около 30 нуклеотидов (ribosome footprints) хроматографическим методом (рибосомы выходят в свободном объеме), очистку фрагментов РНК и их анализ методами секвенирования второго поколения (секвенирование относительно коротких фрагментов нуклеиновых кислот).

Дополнительно к анализу транслатома рибосомным профилированием с секвенированием коротких фрагментов РНК, возможно их секвенирование с помощью нанопорового детектора в составе длинных конкатемеров, которые получают путем включения фрагмента РНК в циркулярную молекулу, которую затем превращают методом амплификации «катящееся колесо» в длинную линейную молекулу кДНК с многократным повторением последовательности, комплементарной РНК-фрагменту [194].

Альтернативным рибосомному профилированию подходом к анализу транслатома является подход, известный как RNC-seq (RNC – RNA Nascent Chain) или полисомное профилирование [195]. В этом случае выделяются моносомы и полисомы без разрушения ассоциированной с ними мРНК, которая может быть секвенирована либо с пользованием секвенатором второго поколения, либо третьего (такими, как, например, нанопоровый детектор MinION компании Oxford Nanopore Technology), позволяющими прочтение полноразмерных транскриптов. Секвенирование полноразмерных молекул мРНК имеет несомненные преимущества, так как существенно упрощает последующий биоинформатический анализ, позволяя получать более надёжную и полную информацию, в том числе об альтернативном сплайсинге. До недавнего времени полисомное фракционирование было возможно только с использованием метода выделения полисом центрифугированием в сахарозном градиенте. Недавно была опубликована работа, в которой предложен и экспериментально обоснован способ получения полисом хроматографическим методом [196].

В рамках проекта будет выполнен анализ транслатома клеток клеточной линии, эмбриональных стволовых клеток человека и ткани печени человека. Схема планируемого анализа представлена на рисунке 9.1. Анализ будет проведен с использованием различных подходов: рибосомного профилирования (Ribo-seq) методом секвенирования коротких фрагментов нуклеиновых кислот И С использованием нанопорового детектора, а также полисомного профилирования (RNC-seq). Это позволит сопоставить различные экспериментальные подходы к анализу транслатома и то, как полученные количественные профили соотносятся с количественным профилем протеома в исследуемых объектах. Полученные результаты позволят сделать вывод о том, насколько транслатом может быть использован как «проксипротеом» для оценки недетектируемой части протеома. Кроме того, использование нанопорового детектора позволит получить новые данные о том, с какой эффективностью различные сплайс-варианты мРНК транслируют переносимую ими информацию в белковые продукты.

На Рисунке 9.1 приведена принципиальная схема анализа транскриптома биологических образов с использованием нанопорового детектора. Этапы анализа предусматривают оцифровку биологических образцов трех типов: недифференцированных стволовых клеток, трансформированных клеточных линий тканей. Каждый тип образцов предусматривает наличие нескольких И биологических повторов: образцов ткани разных доноров, или, в случае клеточных линий – различные клеточные пассажи. В эксперименте используются только аннотированные образцы, причем, для клеточных линий аннотации включают полногеномный и STR анализ. В Приложении Б приводятся экспериментальные протоколы 1.9.П.1-1.9.П.3, описывающие этапы культивирования клеток, анализа клеточной гетерогенности и выделения гомогенных популяций. Раздел 2 настоящего отчета включает протокол сбора, хранения и транспортировки биологических образов, содержащий информацию по образцам ткани печени человека, анализ которых предусматривает схема (см. Рисунок 9.1).

Транскриптом каждого образца анализируется методами РНК-секвенирования (помимо секвенирования с использованием нанопорового детектора УНУ «Авогадро» предусмотрено секвенирование коротких фрагментов методом Illumina), транслируемая на рибосомах часть мРНК анализируется методами рибосомного профилирования и секвенирования RNC-seq. В Приложении Б приводятся протоколы проведения экспериментального анализа транскриптома (см. протоколы 1.9.П.4, 1.9.П.5), а также схема биоинформатического анализа получаемых данных. Данные нанопорового секвенирования предлагается анализировать согласно протоколу, предложенному Шаповаловой и соавт., 2020 [197], протокол биоинформатической обработки данных анализа транскриптома с использованием Illumina приведен в Приложении Б (1.9.П.6).

Использование нанопорового детектора предполагается на этапе анализа транслируемых на рибосомах мРНК (транслатомное профилирование). Экспериментальные протоколы и биоинформатические протоколы обработки данных приведены в Приложении Б (см. 1.9.П.7 – 1.9.П.10). В Приложении Б представлены три протокола анализа транслатома, а именно (1) Ribo-seq с секвенированием методом коротких прочтений, (2) Ribo-seq с секвенированием методом длинных прочтений (с использованием нанопорового детектора) и (3) RNC-seq с секвенированием длинных прочтений (нанопоровый детектов). Протоколы разработаны на основе методик, опубликованных в [192 – 194, 196, 198].

Разработанная схема анализа транскриптома биологических образцов предусматривает сопряжение на этапе обработки данных с протеомным блоком работ: дизайн эксперимента предусматривает наряду с транскриптомным анализов масс-спектрометрическое профилирование тех же биологических образов для качественной и количественной оцифровки протеома. Протоколы проведения молекулярного профилирования протеомного состава биололгических образцов с использованием масс-спектрометрическое детектора приведены в Разделе 10 настоящего отчета.



Рисунок 9.1 – Схема анализа транскриптома в биологических образцах с использованием нанопорового детектора УНУ «Авогадро». Схема предусматривает подготовку и аннотацию биологических образцов, РНК-секвенирование и анализ мРНК, транслируемых на рибосомах. Предположительно, перечень идентифицированных на уровне транслатома мРНК наиболее соответствует перечню идентифицированных в том же образце белков (см. пояснения в тексте).
На этапе формирования перечня биологических образов был отобран ряд клеточных линий, которые могут выступать в качестве модельного объекта для проведения транслатомного анализа. Поскольку В качестве образцов дифференцированной ткани предполагается использовать ткань печени, в анализ были включены линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 и HuH-7. Обе клеточные линии имеют свое происхождение из высокодифференцированных опухолей печени в следствии чего сохранили экспрессию целого ряда молекулярных маркеров характерных для этой ткани, включая альфа-фетопротеин и альбумин. Ни HepG2, ни HuH-7 не способны к формированию опухолей в иммунодефицитных животных, что говорит об их невысокой злокачественности. Параллельное использование двух сходных клеточных линий позволит лучше оценить воспроизводимость результатов анализа.

В качестве клеточной линии, обладающей противоположными свойствами, была выбрана карцинома шейки матки HeLa. Эти клетки обладают крайне высокой степенью злокачественности и могут оказаться полезны для оценки влияния опухолевой трансформации на особенности таранслатома. Объектом для сравнения могут выступать клетки линии HEK293 имеющие не опухолевое, а эмбриональное происхождение и трансформированные аденовирусом.

В список исследуемых объектов также были включены линии миелоидных лейкозов: HL60, K562 и NB4. Помимо более стабильного кариотипа и простоты культивирования эти клетки отличаются сохранившейся способностью к спонтанной либо индуцированной дифференцировке в культуре. Это их свойство может быть использовано для изучения влияния дифференцировки на транслатом. Так, клетки HL60 способны к дифференцировке в зрелые гранулоциты под действием ретиноевой кислоты и к моноцитарной дифференцировке под действием витамина D. Это позволяет проводить эксперименты in vitro, имея удобный и надежный контроль для сравнения. Клеточные линии отобранные для проведения исследования представлены в таблице 9.1.

Паспортизированные образцы всех указанных клеточных линий на данный момент имеются в наличии в биобанке ИМБХ. Аутентичность клеточных линий была подтверждена при помощи метода коротких тандемных повторов (STR-анализ) непосредственно перед их использованием.

Для транскриптомного профилирования клеточные линии культивировали в соответствии с протоколом (см. Приложение Б). Был создан сток клеточных линий, сохраняемых в парах жидкого азота, содержащий не менее 10 криопробирок каждой линии с 5 млн клеток в каждой пробирке. После размораживания стоковой пробирки клетки выращивали в течение 3 пассажей и разделяли на миниаликвоты для дальнейшего анализа. Далее из каждой миниаликвоты клеток была выделена тотальная РНК для получения ДНК-библиотек, необходимых для секвенирования с использованием технологии Illumina. Полученные результаты секвенирования клеточных линий были проанализированы согласно биоинформатическому протоколу и сопоставлены между собой.

Клеточная линия	Источник клеток	Идентификатор в коллекции клеточных культур*
HepG2	Гепатоцеллюлярная карцинома челове	ка АТСС НВ-8065
HuH-7	Гепатоцеллюлярная карцинома челове	ка JCRB 0403
HEK293	Эмбриональная почка человека	ATCC CRL-1573
HeLa	Карцинома шейки матки	ATCC CRM-CCL-2
HL60	Промиелоцитарный лейкоз	ATCC CCL-240
K562	Хронический миелоидный лейкоз	ATCC CCL-243
NB4	Промиелоцитарный лейкоз.	DSMZ ACC 207

Таблица 9.1 - Перечень клеточных линий, используемых в работе.

* ATCC – American Type Culture Collection

JCRB – Japanese Collection of Research Bioresources

DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cells

На следующем этапе исследований предполагается частично пересмотреть и дополнить список используемых клеточных культур. Из экспериментов будут исключены клеточные линии, которые по тем или иным причинам (клеточная гетерогенность, нестабильность фенотипа и др.) не будут обеспечивать получение воспроизводимых результатов. Кроме того, в исследование предполагается включить культуру эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека и диплоидных фибробластов человека (ДФЧ). Использование ЭСК позволит исследовать связь между дифференцировкой и особенностями транслатома, реализуя существенно больше число направлений индуцированной дифференцировки чем это возможно при использовании лейкозных линий. Кроме того, это позволит упростить анализ изза характерного для ЭСК сокращенного паттерна экспрессии транскриптов. ДФЧ могут оказаться полезными в качестве референсного контроля, поскольку лишены большинства недостатков, свойственных клеточным линиям. Они обладают стабильным 2n кариотипом, достаточно гомогенны, легко синхронизируются в культуре по клеточному циклу. Эти их свойства позволят использовать их в качестве стандарта для проводимых исследований.

9.2. Перечень идентифицированных мРНК в биологических образцах клеток методом секвенирования нового поколения

В рамках отчетного периода проведена идентификация мРНК методом секвенирования нового поколения в биологических образцах различных линий трансформированных клеток. Протокол проведения эксперимента и обработки данных приведен в Приложении Б (см. 1.9.П.5, 1.9.П.6).

Секвенирование выполнено на приборе NovaSeq 6000 (Illumina) с длиной прочтения 2*100 п.о. Плотность кластеров составила 2961 К/mm². Кластеров, удовлетворяющих внутреннему контролю качества прибора – 78,32±5,35%. Величина Q30 равна 93,11% (*quality score* – предсказатель вероятности ошибки при чтении оснований). Нормальный процент Q30, установленный производителем, составляет ≥85%. Далее было произведено извлечение библиотек в формате FASTQ.

Необходимой характеристикой получаемых транскриптомных данных являлось парноконцевое прочтение длиной не менее 100 п.о. с суммарным количеством прочтений не менее 30 млн. ридов в каждом случае. Общее количество ридов для анализируемых биологических образцов представлено в Таблице 9.2. Средняя длина рида для всех образцов составила ~100 п.о., а доля дуплицированных прочтений в среднем примерно 60%. Величина GC-состава в среднем для всех полученных образцов равнялась 50%, что соответствует критериям качества данных, полученных методом секвенирования нового поколения.

Образец	Колич	Средняя доля		
	тех. повтор 1	тех. повтор 2	тех. повтор 3	дуплицированных прочтений (%)
HEK293	67,6	59,4	77,4	56,6
HeLa	68,6	66,5	70,8	61,3
HepG2	36,9	77,5	71,4	64,4
HL60	66,7	72,7	65,9	64,5
K562	69,4	61,4	75,6	59,9
NB4	77,1	77,2	77,6	61,2

Таблица 9.2 – Перечень характеристик полученных исходных транскриптомных данных, выполненных с помощью технологии Illumina.

Вследствие альтернативного сплайсинга с каждого гена может экспрессироваться несколько вариантов нуклеотидных последовательностей (мРНК). В Таблице 9.3 указано количество мРНК идентифицированных в каждом техническом повторе с учетом сплайс-вариантов, а также данные по количеству уникальных мРНК, идентифицированных в каждом биологическом образце клеток методом секвенирования нового поколения. В каждом случае среди выявленных мРНК к белок-кодирующим генам, согласно базе данных UniProt [199] относится 74%, которые соответствуют от 13,4 до 15,6 тыс. БКГ (таблица 9.4).

Количество Образец идентифицированни транскриптов		Всего в образце	
HEK293_1	33 220		
HEK293_2	32 717	39 227	
HEK293_3	33 898		
HeLa_1	30 940		
HeLa_2	30 463	36 633	
HeLa_3	31 043		
HepG2_1	29 468		
HepG2_2	30 342	35 607	
HepG2_3	29 853		
HL60_1	26 563		
HL60_2	27 467	32 505	
HL60_3	26 641		
K562_1	30 512		
K562_2	29 804	36 242	
K562_3	30 658		
NB4_1	29 525		
NB4_2	29 615	34 928	
NB4_3	29 364		

Таблица 9.3 - Количество транскриптов (мРНК), идентифицированных в каждом техническом повторе (номер технического повтора указан после нижнего подчеркивания).

Таблица 9.4. Покрытие транскриптами белок-кодирующих генов (БКГ)

Образец	Количество детектированных транскриптов	Количество транскриптов, соответствующих БКГ ¹	%	Количество БКГ, для которых идентифицирован хотя бы один транскрипт
HEK293	39 227	29 151	74,3	15 611
HeLa	36 633	27 249	74,4	14 625
HepG2	35 607	26 457	74,3	14 241
HL60	32 505	24 160	74,3	13 446
K562	36 242	26 936	74,3	14 669
NB4	34 928	25 928	74,2	14 191

¹ Идентифицирован ряд транскриптов, соответствующих псевдогенам.

Для оценки воспроизводимости результатов в серии технических повторов, анализировали распределение коэффициентов корреляции между уровнем экпрессии одного и того же транскрипта, идентифицированного в различных технических повторах. Рисунки 9.2 и 9.3 суммируют полученные результаты, и свидетельствуют о том, что для всех проанализированных образцов (HEK293, HepG2, K562, HeLa, NB4, HeLa) коэффициент корреляции составляет 0.99-1. На Рисунке 9.2 приведен пример распределения коэффициентов между техническими повторами для образца HL60. Показано, что для каждого образца наблюдается высокая степень корреляции между техническими повторами, что свидетельствует о пригодности использования полученных результатов в качестве референсных при дальнейшем анализе транслатома.



Рисунок 9.2 - Корреляция уровня экспрессии транскриптов, идентифицированных в различных технических повторах образца HeLa.

<u>Перечень идентифицированных мРНК в биологических образах клеток</u> <u>методом секвенирования нового поколения</u> приведен по ссылке (https://docs.google.com/

spreadsheets/d/1VDSgLPaQbqEdWu27Hwtw7OAj78GkDpZi/edit#gid=1751543457).

Результаты представлены в форме отдельных вкладок на каждый биологический образец. На Рисунке 9.3 приведен пример экранной формы таблицы полученных данных. По каждому биологическому образцу перечень включает следующую информацию: название гена (gene name), идентифиикатор гена в базе Ensembl (gene ID), идентификатор транскрипта в базе Ensembl (транскрипт ID),

идентификатор соответствующего гену белкового продукта согласно базе UniProt (UniProtID), название образца (например, HEK293) и номер технического повтора (указан через нижнее подчеркивание). Последняя колонка содержит информацию об усредненном уровне мРНК согласно анализу данных трех технических повторов. Полученные данные могут быть использованы в качестве референсных при анализе молекулярного состава биологического образца с использованием детекторов УНУ «Авогадро».

;ene name	gene ID	transcript ID	Uniprot ID	HEK293_1 (TPM)	HEK293_2 (TPM)	HEK293_3 (TPM)	HEK293_avg (TPM
TGIF2LY	ENSG00000176679	ENST00000321217	Q8IUE0	0,08	0,09	0,00	0,06
PCDH11Y	ENSG0000099715	ENST00000333703	Q9BZA8	0,00	0,00	0,28	0,09
PCDH11Y	ENSG0000099715	ENST0000622698	Q9BZA8	0,40	0,40	0,00	0,27
DDX3Y	ENSG0000067048	ENST00000336079	015523	0,01	0,00	0,00	0,00
NA	ENSG0000277117	ENST00000623960		0,92	1,31	1,22	1,15
NA	ENSG0000277117	ENST00000623795		0,49	0,00	0,00	0,16
GATD3B	ENSG0000280071	ENST0000620015		11,78	19,85	12,42	14,68
GATD3B	ENSG0000280071	ENST0000620528	AOAOB4J2D5	65,80	54,32	65,97	62,03
GATD3B	ENSG0000280071	ENST0000624120	A0A0B4J2D5	5,47	0,00	0,00	1,82
NA	ENSG0000275464	ENST00000617716		36,49	35,07	38,46	36,67
NA	ENSG0000280433	ENST00000623998		2,31	3,66	2,45	2,81
NA	ENSG0000274559	ENST00000464664		0,00	0,24	0,00	0,08
SIK1B	ENSG0000275993	ENST00000613488	A0A0B4J2F2	2,98	3,83	3,13	3,31
CBSL	ENSG0000274276	ENST0000624406	PODN79	8,02	0,00	0,00	2,67
CBSL	ENSG0000274276	ENST00000398168	PODN79	50,54	42,90	52,04	48,49
CBSL	ENSG0000274276	ENST00000618024	PODN79	10,36	14,33	12,57	12,42
CBSL	ENSG0000274276	ENST0000624934		13,51	14,86	14,79	14,39
U2AF1L5	ENSG00000275895	ENST0000623375		0,52	0,43	0,57	0,50
112AF115	ENSG0000275895	ENST00000610664	PODN76	45 83	0.00	19.50	21 78

Рисунок 9.3 - Фрагмент итоговой таблицы с перечнем транскриптов и соответствующих им уровнем экспрессии.



Рисунок 9.4 - Гистограмма распределения экспрессии белок-кодирующих генов (усредненные по трем техническим повторам) для образцов НЕК293 (а), HepG2 (б), K562 (в), HeLa (г), NB4 (д) и HL60 (е).

Полученные экспериментальные данные были проанализированы, и для каждого биологического образца построено распределение усредненного между техническими повторами уровня экспрессии (ТРМ) для транскриптов, соответствующих БКГ (см. Рисунок 9.4).

Для ДНК-библиотек, полученных в результате пробоподготовки, были получены следующие результаты, приведенные в таблице 9.5. Средний размер ДНК библиотек составил 271 п.о. Полученные данные для образцов соответствуют общепринятым рекомендациям, где средний размер библиотек должен составлять от 250 до 300 пар нуклеотидов.

ID образца	Изначальная концентрация (нг/мкл)	1 измерение конц-ции библиотек (нг/мкл)	2. измерение конц-ции библиотек (нг/мкл)	Средняя концентрация библиотек (нг/мкл)	Длина библиотек (п.о.)	Концентрация библиотек (nM)
K562_1	192	45,2	44	44,6	277	219,10
K562_2	166	42,6	44,6	43,6	287	213,57
K562_3	178	40,8	42	41,4	286	172,92
HL60_1	148	45	47,8	46,4	290	243,96
HL60_2	127	45,4	45,8	45,6	277	230,18
HL60_3	140	46,6	44,6	45,6	272	219,33
NB4_1	233	46,2	47	46,6	281	242,42
NB4_2	187	47,6	47	47,3	282	249,43
NB4_3	195	48	46	47	274	254,01
V_HeLa_1	179	43	43,2	43,1	277	268,2739
V_HeLa_2	181	46,8	47,2	47	287	227,2725
V_HeLa_3	192	45,6	46,2	45,9	280	299,663
V_HEK293_1	155	46,4	47	46,7	277	235,7508
V_HEK293_2	137	48,6	46	47,3	285	248,1256
V_HEK293_3	150	45	41	43	286	248,3764
V_HepG2_1	162	51,4	48,2	49,8	281	255,4423
V_HepG2_2	153	48	46,4	47,2	277	251,4617
V_HepG2_3	134	48,4	45,6	47	271	227,8023

Таблица 9.5 - Характеристики полученных ДНК-библиотек

Разработанная в соответствии с пунктом 1,.9ПГ и Техническим задание Соглашения «Схема анализа транскриптома в биологических образцах с использованием нанопорового детектора УНУ «Авогадро»» представлена на рисунке 9.1. Разработка методики молекулярного профилирования протеомного состава биологического образца с использованием масс-спектрометрического детектора

Целью работы на данном этапе было разработать методику панорамного молекулярного профилирования протеомного состава биологического образца с использованием масс-спектрометрического детектора (Далее Методика 1.10). Для разработки Методики 1.10 выполнен обзор существующих подходов в массспектрометрии. При разработке методики учитывались ранее проведенные экспериментальные работы по детекции белков хромосомы 18, в которых разработаны методики МС-идентификации и предварительной подготовки образцов, которые могут быть адаптированы для решения задач, поставленных в настоящем проекте.

Основной задачей протеомики – сравнительно молодого направления современных биохимических исследований, является проведение инвентаризации белков, которые экспрессируются в клетке. Согласно современным представлениям, 18 хромосома человека кодирует 264 белка, что составляет 1,35% всех белков протеома человека. [200] Особый интерес представляют белки, которые еще никогда не были зарегистрированы в эксперименте, так называемые "missing" белки. На данный момент всего "missing" в протеоме человека – 1689, а тех, которые кодируются 18 хромосомой человека - 9. Интерес исследования белков, кодируемых 18 хромосомой человека, обусловлен не только их широкой представленностью в клетке, но также важностью функций, которые они выполняют. Межклеточные взаимодействия, рецепторные функции, передача сигнала от внешнего воздействия внутрь клетки - это лишь незначительный перечень функций белков, кодируемых 18 хромосомой человека, также на ней находится большое количество белков ассоциированных с заболеваниями человека. Продукты генов, кодируемых 18 хромосомой человека могут обуславливать развитие шизофрении (GNAL), синдрома умственной отсталости (APMR3), карциномы поджелудочной железы (RBBP8, RIM, SCKL2, JWDS). [201 – 203]

Одной из самых трудных задач современных протеомных исследований является эффективное разделение и идентификация белков входящих в состав комплексных биологических образцов, таких как клеточные линии, ткани человека, сыворотка крови человека. Методический подход, который используется для

проведения исследования протеома, кодируемого 18 хромосомой человека должен отвечать нескольким требованиям:

Во-первых, чувствительность и специфичность методики должны быть в достаточной степени высокими, т.е., исходя из того факта, что белки, кодируемые 18 хромосомой человека составляют всего 1,35% протеома человека, а в стандартном Shotgun эксперименте в среднем обнаруживается 30 белков, кодируемых 18 хромосомой человека, используемый метод должен обладать высокой чувствительностью на уровне 10⁻¹² М и выше, а также быть высокоспецифичный, чтобы при таких высоких уровнях чувствительности отличить ложноположительные сигналы.

Во-вторых, идентифицированные белки должны быть оценены количественно, поскольку знание уровня экспрессии биологических молекул является необходимым условием для дальнейшего использования этих данных в диагностике, медицине и в фармпромышленности для поиска мишеней для новых лекарственных соединений.

В-третьих, желательно, чтобы избранный метод обладал возможностью регистрации белков с дефектной и/или модифицированной структурой, поскольку эти изменения также влияют на функцию белка.

Несмотря на огромное разнообразие методов, используемых в современных протеомных исследованиях, настоящее время существует три основных методических подхода, которые отвечают описанным выше требованиям.

Использование двумерного электрофореза в комбинации с идентификацией белков MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) массспектрометрии. [204, 205] Использование гибридных высокоточных приборов с масс анализатором типа Orbitrap и источником ионизации методом электроспреем (ESI), соединенных в единую систему с ВЭЖХ с нано насосом и анализ образцов методом Shotgun. [206] Применение приборов типа тройной квадруполь, соединенных в единую систему с ВЭЖХ и источником ионизации методом электроспреем (ESI) для абсолютного количественного анализа белков с применением меченых стабильными изотопами стандартов [207]. Эти подходы также совместимы с методами фракционирования белков.

9.3. Типы ионизации биомолекул MALDI и ESI

MALDI

Длительное время невозможно было масс-спектрометрически исследовать биополимеры, так как при попытке перевести их в газовую фазу молекулы разрушались, поэтому масс-спектрометрия относительно долго была ограничена исследованием относительно небольших по массе органических соединений. Впервые о новом методе, который позволяет исследовать биомолекулы большой массы, было сообщено Францом Хилленкампом, Майклом Карасом и коллегами [208]. Исследователи обнаружили, что аминокислота аланин может быть ионизирована с намного большей эффективностью, если её смешать С аминокислотой триптофаном и обработать смесь пульсирующим лазером с длиной волны 266 нм. Триптофан поглощал энергию лазера и передавал её аланину, которые не поглощает энергию лазера напрямую. Пептиды массой до 2843 Да могли быть ионизированы, если смешать их с такой матрицей. Данный метод ионизации был назван матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI). Большой прорыв был достигнут в 1987, когда Коичи Танака и его коллеги использовали комбинацию наночастиц кобальта 30 нм в диаметре в глицероле с лазером с длиной волны излучения в 337 нм для ионизации. [209] Используя такую комбинацию лазера и матрицы, исследователи смогли ионизировать целые молекулы белков (34472 Да карбоксипептидаза-А). В дальнейшем Карас и Хилленкамп смогли ионизировать белок молекулярной массой 67 кДа, используя никотиновую кислоту как матрицу и лазер с длиной волны 266 нм. Дальнейшие улучшения методики были связаны с использованием лазера с длиной волны 355 нм и производных коричной кислоты как матрицы. Данный метод ионизации не предусматривает соединение масс-спектрометра с хроматографом, что является его большим недостатком, биомолекулы невозможно разделить в газовой фазе.

ESI

Очень привлекательной является идея соединения жидкостного хроматографа и масс-спектрометра в единую систему, что уменьшит время, необходимое для анализа биологического образца, упростит его пробоподготовку, при этом ещё и увеличит производительность и чувствительность метода. Для реализации идеи был разработан метод ионизации электрораспылением (ESI). Данный метод подразумевает поступление жидкости из жидкостного хроматографа, содержащую молекулы образца к источнику ионизации. Поступающая жидкость обычно содержит органические кислоты (муравьиную, трифторуксусную), как источник протонов. В источнике ионизации жидкость, поступающая из жидкостного хроматографа, распыляется в аэрозоль, каждая капля аэрозоля постепенно высушивается под действием горячего осушающего газа в источнике, по мере высушивания капля становится всё более нестабильной и в конечном итоге достигает предела Релея, так как содержит большое число заряженных молекул. В этот момент капля взрывается, порождая несколько мелких более стабильных дочерних капель, данный процесс повторяется, пока молекулы полностью не освободятся от жидкости и только после этого переходят в газовую фазу. До сих пор детально не выяснен механизм данного метода ионизации. [210]

Именно изобретение ESI методики ионизации открывает доступ к исследованию протеома человека и белков, кодируемых 18 хромосомой человека. Ионизация методом MALDI требует высокой степени очистки белка и фактически на одну мишень целесообразно наносить не больше одного белка, так как иначе расшифровка спектров будет очень затруднена, а это требует очень сложной пробоподготовки. Единственной техникой фракционирования белков, которую можно совместить с MALDI это двумерный электрофорез. Ионизация методом электрораспыления лишена недостатков MALDI подхода и в исследовании комплексных протеомов используется именно этот вид ионизации.

9.4. Типы масс анализаторов, используемых в протеомике

Квадрупольный масс анализатор

По сути является масс фильтром и пропускает ионы только определенного m/z. Электрическое радиочастотное поле используется для направления потока заряженных частиц вдоль центральной оси квадруполя. Наложенное поле постоянного тока используется для избирательной дестабилизации определенных ионов и их выброса из квадруполя. Сила обоих полей может быть настроена так, чтобы только небольшой диапазон m/z имел стабильную траекторию движения вдоль квадруполя. Все ионы вне этого диапазона будут удалены из квадруполя, а частицы внутри этого диапазона будут обнаруживаться. Квадруполи, гекса и октаполи могут использоваться в качестве одной из деталей сложных гибридных масс спектрометров для изоляции родительского иона. Такая модификация используется для накопления и выделения одного иона и его последующей фрагментации. Также используются 3 квадруполя соединенных последовательно для таргетного анализа и мониторинга множественных реакций (SRM, MRM), где возможна изоляция не только родительского иона, но и дочернего. Такая возможность делает тройной квадруполь очень специфичным, но точность такого прибора низкая 0,4 m/z. [211]

ТОF - времяпролетный масс анализатор

Измерение массы заряженного иона основывается на том, за какое время заряженная частица достигает детектора. Каждый ион в трубе пролетает фиксированное расстояние, анализатор измеряет время пролета иона и преобразует его в m/z. В начале области трубы на заряженные частицы действует электрическое поле, которое передает им одинаковую кинетическую энергию. Ионы с низким значением m/z летят быстрее, чем ионы с высоким значение m/z. Такие масс анализаторы имеют высокую разрешающую способность >10000 R и высокую точность масс >4 ppm в сочетании с высокой скоростью сканирования 1000 спектров в секунду. [212]

Orbitrap

Масс анализатор состоит из трех электродов. Внешние электроды имеют форму чашек, обращенных друг к другу. Они электрически изолированы тонким зазором, закрепленным центральным кольцом диэлектрика. Веретенообразный центральный электрод удерживает ловушку вместе и выравнивает ее с помощью диэлектрических концевых прокладок. Когда напряжение подается между внешним и центральным электродами, результирующее электрическое поле строго линейно вдоль оси и следовательно колебания вдоль этого направления будут гармоническими. В то же время радиальная составляющая поля сильно притягивает ионы к центральному электроду. Ионы инжектируются в объем между центральным и внешним касательной через специально обработанную электродами по прорезь С компенсационным электродом («дефлектором») в одном из внешних электродов. При приложении напряжения между центральным и внешним электродами радиальное электрическое поле изгибает траекторию иона к центральному электроду, в то время как тангенциальная скорость создает противодействующую центробежную силу. При правильном выборе параметров ионы движутся внутри ловушки почти по круговой спирали, очень похожей на планету в солнечной

системе. В то же время осевое электрическое поле, вызванное особой конической формой электродов, толкает ионы к самой широкой части ловушки, инициируя гармонические осевые колебания. Затем внешние электроды используются в качестве приемных пластин для обнаружения тока этих осевых колебаний. Оцифрованное текущее изображение временной области BO является преобразованием Фурье в частотной области таким же образом, как и в FTICR и затем преобразуется в масс-спектр. Одно из самых важных достижений, которое сделало возможным использование Orbitrap на практике - изобретение C-trap. Ионная ловушка в форме буквы С ставится перед Orbitrap и последовательно соединена с ним. Она служит накопителем ионов, а по достижению заданного количества ионов происходит импульсная инжекция накопленных ионов в Orbitrap из C-trap. Это изобретение сделало возможным подключение любого устройства передачи ионов и любого метода фрагментации к Orbitrap масс анализатору. Современные Orbitrap масс анализаторы имеют разрешающую способность более 60000 R и точность масс >1 ppm. [213]

9.5. Методы разделения белков, применяемые в протеомных исследованиях.

Двумерный электрофорез (2DE – two dimensional electrophoresis) разработанный О'Фареллом в 1975г представляет собой метод разделения смеси белков, основанный на последовательном использовании двух свойств белков: заряда и массы. [214] Метод двумерного гель-электрофореза, в котором объединены две различные процедуры разделения, позволяет идентифицировать более 2000 белков в одном эксперименте. Результаты при этом получают в виде «двумерной» белковой карты.

Bo (еще время проведения первого направления называемого изоэлектрофокусированием, IEF) разделение белков основано на таком их свойстве, как изоэлектрическая точка (pI – isoelectric point). Изоэлектрическая точка определяется аминокислотным составом белка и зависит от посттрансляционных модификаций белка. [215] Когда белок попадает в гель с градиентом pH, к которому приложено электрическое поле, OH начинает двигаться К электроду с противоположным зарядом. Положительно заряженные белки перемещаются к катоду, а отрицательно заряженные к аноду. Во время миграции белок присоединяет или теряет протоны, в результате чего его заряд и подвижность снижается, и

становится нулевой при достижении точки в градиенте pH, равной его pI. В этой точке он считается «сфокусированным», а на геле он выглядит как четко очерченное пятно. С помощью 2ДЕ возможно разделить белки с очень близкими pI. [216]

На втором этапе гель, содержащий разделенные белки, снова подвергается электрофорезу, на этот раз в направлении перпендикулярном тому, что на первом этапе. Электрофорез во втором направлении проводят в присутствии ДСН и белки разделяют по их молекулярной массе, как в одномерном ДСН-ПААГ. Исходный гель пропитывают додецил-сульфатом натрия и, поместив его на блок ДСН-ПААГ-геля, проводят электрофорез, в ходе которого каждая из полипептидных цепей мигрирует сквозь блок геля и образует в нем отдельную полосу. Так осуществляется разделение во втором направлении двумерного гель-электрофореза. Неразделенными в остаются только те белки, которые неразличимы результате как по изоэлектрической точке, так и по молекулярной массе. Такое совпадение физикохимических характеристик белка встречается очень редко, что и обуславливает отличную разрешающую способность 2ДЕ. (см. рис. 10.1). Теоретически разрешение 2ДЕ может достигать 10 000 на одной электрофореграмме.

Используя различные методы окрашивания белков можно выявить следовые количества практически всех полипептидных цепей. За один раз методом двумерного гель-электрофореза можно разделить 2000 белков и их модифицированных изоформ. Разрешение этого метода настолько велико, что позволяет разделить два белка, первичная последовательность которых отличается лишь одной заряженной аминокислотой. Представленные на электрофореграмме в виде пятен белки идентифицируют с помощью масс-спектрометрии.



Рисунок 10.1 - Схематическое представление хода двумерного электрофореза и массспектрометрической идентификации белков.

Анализ гелей, полученных в результате 2ДЕ, более сложный по сравнению с анализом гелей, полученных в ходе 1DE из-за большего количества белковых пятен. Но это же является и значительным преимуществом 2ДЕ по сравнению с одномерным электрофорезом: одновременно можно анализировать несколько сотен, или даже тысяч белков, которые совместно экспрессируются в ходе изучаемого биологического процесса.

Особенности использования 2ДЕ для мембранных белков.

Несмотря на то, что 2ДЕ до сих пор является одной из главных технологических платформ в протеомике, его применение в изучении и профилировании мембранных белков весьма ограничено. Одной из основных проблем при исследовании протеомов мембран методом 2ДЕ являются трудности солюбилизации гидрофобных белков в буферах которые используются для их последующего разделения в первом направлении методом изоэлектрофокусирования.

Одним из основных лимитирующих факторов использования 2ДЕ является отсутствие достаточно сильных детергентов для солюбилизации белков и совместимых с первым этапом проведения электрофореза –

изоэлектрофокусированием.

Первые попытки разделения мембранных белков методом 2ДЕ появились практически сразу после публикации детализированного протокола проведения 2ДЕ. [217] Исходя из физико-химических свойств мембранных белков не трудно предположить, что дальнейшие модификации протоколов проведения 2ДЕ касались, в основном, типа и концентрации детергентов, которые использовались для проведения ИЭФ. По сравнению с первым протоколом 2ДЕ для мембранных белков, в котором использовали NP40 или Triton X100 в комбинации с мочевиной в качестве солюбилизирующего агента, в новых протоколах применяли различные неионные или цвиттерионные детергенты такие как: CHAPS [218], линейные сульфобетаины [219], аминосульфобетаины или додецилмальтозиды. [220]

Однако, большинство статей демонстрирующих преимущества того или иного детергента основываются в своих выводах на изменении паттерна при визуализации 2ДЕ или появлении новых белковых пятен, которые по утверждению авторов являются мембранными. Проверить данное утверждение в условиях того времени было весьма затруднительно, т.к. тогда не существовало надежного и быстрого способа идентификации белка на 2ДЕ фореграмме.

Тем не менее, в некоторых работах такая идентификация была проведена методами иммуногистохимии. Так, например, было показано успешное разделение мембранного рецептора трансферрина и рецептора АСТН. [221]

Анализ выделенных препаратов очищенных белков методом 2 ДЕ с последующим визуальным сопоставлением положения белковых пятен в реальной пробе также являются весомым доказательством для идентификации мембранных рецепторов. С использованием метода сопоставления электрофореграмм чистых препаратов и находящихся в составе сложной биологической смеси были идентифицированы рецепторы GABA/бензодиазепина рецептор брадикинина и другие белки. [222 – 224]

С другой стороны, в некоторых работах показана обратная ситуация, когда с использованием чистых препаратов мембранных белков была продемонстрирована невозможность или ограничения в применении 2ДЕ для разделения мембранных белков. [225]

Причины, которые препятствуют успешному разделению мембранных белков 2ДЕ методом достаточно просты: низкая ионная сила, невозможность использования ионных детергентов при проведении солюбилизации образца и проведении первого направления разделения – ИЭФ. Соответственно есть только два параметра, которые исследователь может изменять для улучшения ситуации – это вид и/или концентрация детергентов и природа и/или концентрация хаотропных агентов. Исторически, наиболее популярным хаотропным агентом при проведении ИЭФ являлась мочевина. Однако, как указывалось ранее, использование только мочевины, или в сочетании с разными детергентами проявлялось в недостаточной солюбилизации мембранных белков и, как следствие, низкой их представленностью на 2 ДЕ фореграммах.

Ситуация значительно улучшилась после введения в протоколы 2ДЕ тиомочевины в качестве дополнительного хаотропного агента. И хотя первая публикация по использованию тиомочевины не касалась напрямую мембранных белков, в ней было показано, что применение тиомочевины совместно с мочевиной коренным образом улучшает растворимость белков и солюбилизирующую силу даже «мягких» неионных детергентов. [226]

В дальнейшем, данная комбинацию хаотропных агентов протестировали с различными детергентами, включая аминосульфабетанины и другие сульфобетаины. [227 – 229] С использованием данных систем для проведения ИЭФ показана успешная солюбилизация и разделение GPCR содержащего семь трансмембранных фрагментов, белков клеточной мембраны эритроцитов, включая белок Band II с 12-ю трансмембранными фрагментами. [230]

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ)

В середине 60-х годов был разработан модифицированный метод электрофореза - электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ). Этот метод был существенным шагом вперед по сравнению с обычными методами анализа белков, известными к тому времени. При использовании данного метода белки мигрируют в инертном матриксе - полиакриламидном геле с высоким содержанием поперечных сшивок. Обычно гель готовят полимеризацией мономеров непосредственно перед использованием.

Размеры пор геля могут быть подобраны произвольно с тем расчетом, чтобы гель мог замедлить миграцию определенных молекул. При этом белки находятся в растворе, содержащем сильный, отрицательно заряженный детергент - додецил-сульфат натрия или ДСН (SDS).

Связываясь с гидрофобными участками белковой молекулы, этот детергент вызывает их развертывание в длинные вытянутые цепи. Разворачиваясь, отдельные белковые молекулы освобождаются из комплексов с белками или молекулами липидов и солюбилизируются в растворе детергента. В качестве восстанавливающего агента обычно добавляют меркаптоэтанол или дитиотреитол, разрушающие в белках связи S-S. Это дает возможность анализировать полипептиды, образующие мультисубъединичные молекулы.

При проведении разделения в блоке полиакриламидного геля каждая молекула белка связывает значительное количество негативно заряженных молекул детергента, общий заряд которых превосходит общий заряд белка. По этой причине белок после того, как было приложено напряжение, начинает двигаться в направлении положительного электрода. Белки одного размера ведут себя сходным образом, поскольку, во-первых, их природная трехмерная структура полностью нарушена ДСН так, что их форма идентична, во-вторых, они связывают одинаковое количество ДСН и приобретают одинаковый негативный заряд. Крупные белки, обладающие большим действию зарядом, подвергаются значительных электрических сил, а также более существенному торможению. В обычных растворах эти эффекты, как правило, взаимно погашаются, но в порах полиакриламидного геля, действующего как молекулярное сито, большие белки тормозятся значительно сильнее, чем малые белки. Вследствие этого сложная смесь белков делится на ряд полос, расположенных в соответствии с их молекулярной массой.

Особенности разделения мембранных белков

SDS-полиакриламидный гель электрофорез - не требует подбора специальных условий для разделения мембранных белков, поскольку используемые концентрации и типы детергентов в данном подходе заведомо способны солюбилизировать белки любой природы независимо от степени их гидрофобности. Разделенные методом электрофореза белки подвергают триптическому гидролизу в геле и, затем, экстрагированные пептиды анализируют с использованием RP-LC-MS/MS. Схема проведения экспериментов данным подходом представлена на рисунке 2. Поскольку разрешающая способность SDS-PAGE невелика и в одной полосе могут присутствовать десятки, а возможно и сотни разных белков, то для успешного разделения пептидов используют обращенно-фазовую хроматографию, совмещенную с масс-спектрометрическим детектором, способным проводить анализ первичной структуры пептидов – MS/MS анализ (ion trap, q-tof).



Рисунок10.2 - Схема проведения протеомных экспериментов методом SDS-PAGE LC-MS/MS.

Третий метод широко используемый в протеомных исследованиях относится к классу без-гелевых (gel-free) технологий и представляет собой многомерное разделение пептидов, полученных при гидролизе гомогенатов тканей или клеток.

Данный метод получил широкое распространение вследствие простоты проведения пробоподготовки и высокой степени автоматизации процесса. В некоторых статьях он обозначается как «shotgun» или MudPiT. [231]

В общем случае первым этапом данной технологии является гидролиз белков в смеси, за которым следует первое направление разделения пептидов. В самом простом случае это может быть одностадийное разделение методом обращенно-

фазовой хроматографии с одновременной (онлайн) регистрацией спектров пептидов. Дальнейшая фрагментация выбранных родительских ионов методом столкновительной диссоциации (CID), ETD или/и др. позволяет получить дополнительную информацию о первичной структуре пептида.

Кроме того, при разделении пептидов возможно использование нескольких методов, которые основаны на различных физико-химических свойствах пептидов. Например, последовательное разделение пептидов сначала на колонке с сильным катионно-обменником (SCX) и последующее разделение фракций пептидов методом RP-LC-MS/MS. [232] Также возможно использование на первом этапе разделения обращенно фазовой хроматографии в щелочных условиях, сопряженной со собором фракций и дальнейший анализ фракций методом Shotgun или SRM SIS сопряженный с обращенно фазовой хроматографией в кислых условиях. Или использование микрокапиллярного ИЭФ в качестве первого направления разделения пептидов согласно их изоэлектрической точке и, затем, использование традиционного RP-LC-MS/MS. Схема проведения протеомного анализа данным подходом представлена на рис. 10.3.

Другим подходом в улучшении ситуации в протеомном анализе мембранных белков является оптимизация гидролиза. Наиболее часто используемой протеазой для протеомного анализа является трипсин. Однако, в некоторых случаях, перед проведением ферментативного гидролиза трипсином используется химическая реакция, основанная на расщеплении полипептидной цепи бромцианом. Данная реакция проводится в кислых условиях 70% муравьиной кислоты или ТФУ, что обеспечивает растворимость белков и выход реакции на уровне 90-99%. Эта реакция высокоспецифична и разрывает белковую молекулу по пептидной связи Met-X с образованием гомосерина. Однако, размер фрагментов полипептидов, полученных с использованием бромциана как правило слишком велик для масс-спектрального анализа. Поэтому, после дезактивации бромциана используют гидролиз с использованием трипсина. [232]



Рисунок 10.3 - Схема проведения протеомных экспериментов методом MudPiT.

Многомерное хроматографическое разделение белков

Ортогональные многомерные хроматографические системы разделяют белки и пептиды, основываясь на различных физико-химических свойствах, таких как Pi, молекулярный вес, гидрофобность, заряд.

Согласно математической модели предложенной Гиддингсом [233], емкость

хроматографического метода можно выразить следующей формулой:

Pmd=P1*P2*P3...

где Pmd, P1, P2, P3 емкости хроматографических методов многомерной хроматографической системы в первом, втором и третьем направлении соответственно.

Современные протеомные методы анализа сложнокомпонентных смесей используют, как правило не более двух направлений. Например, последовательное проведение ионно-обменной хроматографии и обращенно-фазовой хроматографии для разделения пептидов уже упоминалось при описании MudPit технологии. Другим примером использования многомерной хроматографии является сочетание гель-проникающей хроматографии и капиллярного электрофореза. При условии, что методика анализа сложно компонентной смеси использует два вида хроматографии и при этом емкость каждого из методов составляет 60 фракций, суммарная емкость всей многомерной хроматографической не превысит 3600 белков. Учитывая, что размер протеома человека, составляет приблизительно 20000 кодирующих генов, понятно, что даже теоретически, 2-х измерений недостаточно для проведения полногеномного сканирования протеома.

На первый взгляд, выход из данной ситуации просматривается достаточно просто – введение дополнительного метода фракционирования. Однако, в этом случае на первый план выходят проблемы, связанные со снижением эффективности разделения (снижение емкости метода (Pi)), временными затратами на проведение таких многомерных экспериментов, а также большим начальным количеством биологического материала.

Воспроизводимые и надежные ортогональные 2Д хроматографические системы используются в протеомике более десятилетия. [234] Так, ранее показано успешное применение систем, включающих совмещение таких подходов как 2Д-Гель фильтрация (ГФ)-капиллярный электрофорез (СЕ) и 2Д-ГФ-обращеннофазовая хроматография (RPLC) для исследования протеомов *E. Coli*.

Другой возможностью для увеличения разрешающей способности протеомной технологической платформы является пре-фракционирование образца с использованием методов дифференциального центрифугирования.

На рисунке 10.4 приведена возможная схема проведения протеомного исследования.

		Белн (кле	ковый образец (2.5 мг) етки, ткань, жидкость)]		
Дифференциальное Раство центрифугирование (цито		оримые елки → Нераствори белки (мембр (Мембраны	мые аны) ы)			
Тип колонки	Кол-во белка1	Кол-во фракций		Кол-во фракций	Кол-во белка ¹	Тип колонки
Препа- ративная	1 мг	15	mRP C18 термостабильная колонка	10	0.25 мг	Препа- ративная
			Триптический гидролиз фракций			
Анали- тическая	35 µг	15*10	SCX колонка с сильно- катионнообменной смолой	12.5 μr	10*5	Анали- тическая
Микро- колонка	1.7 µг	150*100 белков	Обращенно-фазовая хроматография, Масс- спектрометрический анализ.	1.3	50*100	Микро- колонка
Всего фракций: 15000 белков по 8.5 нг каждый (1.7*10-13 моль)				Всего фра 6.5 нг каж	кций: 5000 дый (1.2*10	белков по)-13 моль)

¹ С учетом 50% потерь на каждом этапе хроматографии

Рисунок 10.4 - Схема проведения протеомного исследования с использованием методов дифференциального центрифугирования

Как видно на рисунке 10.4, исходный препарат клеток после их лизиса разделяется с использованием методов дифференциального центрифугирования на 2 фракции: цитозольную и мембранную. Затем, каждая из фракций подвергается хроматографированию в препаративном режиме на колонке с обращенной фазой при повышенной до 80°C температуре. Данные температурные условия позволяют значительно снизить потери белка, вызванные его необратимой сорбцией на носителе. В ходе хроматографии собираются фракции с одинаковым содержанием по белку. В дальнейшем эти фракции подвергаются гидролизу трипсином и полученные пептиды каждой из фракций наносятся на колонку с сильным катионнообменным носителем. С использованием данной хроматографии можно получить 5-10 пептидных фракций, каждая из которых будет содержать по 1 мкг пептидов. Данное количество материала обычно является достаточным для проведения масс-спектрометрического анализа и идентификации 100 белков.

2D Фракционирование пептидов.

Одной из наиболее перспективных стратегий исследования протеома человека является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). В работе Ильгисонис с сотр. был исследован вариант разделения пептидов с применением обращенно фазовой ВЭЖХ в щелочных условиях со сбором фракций. [235] Далее фракции были проанализированы на предмет наличия целевых белков стандартной системы UPS2. Система UPS2 представляет из себя смесь из 48 белков человека в различной концентрации от 10⁻¹¹ М до 10⁻⁶ М. таким образом система имитирует динамический концентрационный диапазон белков в комплексных биологических образцах. В работе проводилась оценка специфичности и чувствительности данного подхода. Было показано, что при одномерном фракционировании возможно детектировать 63% белков смеси UPS2 на фоне биологической матрицы в виде экстракта Е. coli. Применение дополнительного метода фракционирования в виде обращенно фазовой ВЭЖХ в щелочных условиях улучшает результат до детектирования 98% белков смеси UPS2 на фоне биологической матрицы. В работе также отмечена высокая специфичность таргетного метода анализа SRM SIS. Анализ проводился на приборе типа тройной квадруполь с применением изотопно меченых стандартных пептидов идентичных по своей аминокислотной последовательности целевым пептидам. Однако такой подход имеет ограничение на количество исследуемых пептидов. Методика подразумевает выбор детектируемых белков соответствующих белков заранее. Однако позволяет детектировать больше белков и получить данные об их точной концентрации в биологическом образце.

В работе Манна с сотр. используется та же тактика разделения пептидов, однако иной вариант детекции. Shotgun анализ не подразумевает предварительный выбор детектируемых белков на этапе планирования эксперимента. В данной работе использовался детектор типа Orbitrap, который позволяет детектировать большинство ионизированных пептидов В поле зрения прибора. [236] Предпосылками для использования дополнительного метода фракционирования в Shotgun методике анализа является работа посвященная подсчету количества пептидов, обнаруживаемых при Shotgun анализе. Авторы сообщают, что с помощью вычислительных методов им удалось подсчитать, что данные стандартного Shotgun анализа без дополнительного фракционирования содержат 100000 пептидов, но детектируется только порядка 16000, то есть около 15% пептидов в образце. таким образом для идентификации пептидов был применен метод дополнительного фракционирования, что позволило увеличить чувствительность метода по количеству идентифицированных белков в 2 раза. [237] Стандартный одномерный анализ позволяет зарегистрировать до 5000 белков, а двумерный до 10000 белков.

Однако Shotgun анализ не позволяет достичь уровня чувствительности SRM SIS анализа. Поэтому для исследования ограниченного пула белков, например белков, кодируемых 18 хромосомой человека, а также missing белков более оптимально использовать SRM SIS анализ с применением двумерного фракционирования. Задачи, которые требуют полногеномного сканирования протеома лучше решаются Shotgun подходом.

Выполненный обзор методов масс-спектрометрического анализа показал, что при разработке Методики 1.10 необходимо учитывать следующие факторы.

Оптимальными методами анализа являются SRM SIS анализ для таргетной количественной детекции высоко- и среднепредставленных белков 18-ой хромосомы. Для достижения детекции белков при более низких концентрациях необходимо применение сочетания методов предварительного фракционирования пептидов в щелочных условиях хроматографии на обращенной фазе и последующий SRM SIS анализ пептидов (2D SRM SIS анализ).

Методы обзорной масс-спектрометрии полногеномного сканирования так же применимы для идентификации белков кодируемых генами 18 хромосомы. Как и в случае SRM SIS анализа, введение дополнительного измерения при фракционировании пептидов пробы приводит к кратному увеличению числа идентификаций всех белков пробы, включая белки 18 хромосомы.

Исходя из вышесказанного для успешного выполнения проекта были разработаны нижеперечисленные стандартизованные лабораторные методики анализа (представлены в виде отдельного документа к настоящему отчету).

 Методика молекулярного профилирования протеомного состава биологического образца с использованием масс-спектрометрического детектора (Методика 1.10 (1))

Методика предназначена для определения белкового состава и математической обработки полученных данных при масс-спектрометрическом анализе комплексных биологических образцов, отражено в пункте №1 методики 1.10 (1).

Методика обеспечивает:

-используемый тип масс-спектрометрического детектора – детектор типа Orbitrap, в комбинации с высокоэффективной жидкостной хроматографией для фракционирования образцов биологического происхождения;

-режимы и условия проведения масс-спектрометрических измерений – электроспрейный тип ионизации, регистрация массово-зарядовых характеристик молекулярных компонентов в положительном режиме ионизации;

-количество биообразца, мкл – не более 10 мкл;

-процедуры предварительной подготовки образца к проведению массспектрометрических измерений – ферментативный гидролиз белка (трипсин;лизилэндоппетидаза, хемотрипсин и т.д.);

-условия ВЭЖХ-фракционирования образца –хроматографическое - фракционирование на обращенных или иных стационарных фазах;

-процедуры анализа результатов измерений – специальное программное обеспечение для анализа хромато-масс-спектрограмм

2) <u>Методика молекулярного профилирования протеомного состава</u> биологического образца с использованием двумерного фракционирования и массспектрометрического детектора (Методика 1.10 (2)).

Методика предназначена для определения белкового состава и математической обработки полученных данных при масс-спектрометрическом анализе комплексных биологических образцов отражено с применением двумерного фракционирования с целью получение углубленных протеомных данных, отражено в пункте №1 методики 1.10 (2).

Методика обеспечивает:

-используемый тип масс-спектрометрического детектора – детектор типа Orbitrap, в комбинации с высокоэффективной жидкостной хроматографией для фракционирования образцов биологического происхождения;

-режимы и условия проведения масс-спектрометрических измерений – электроспрейный тип ионизации, регистрация массово-зарядовых характеристик молекулярных компонентов в положительном режиме ионизации;

-количество биообразца, мкл – не более 10 мкл;

-процедуры предварительной подготовки образца к проведению масс-

спектрометрических измерений – ферментативный гидролиз белка (трипсин;лизилэндоппетидаза, хемотрипсин и т.д.);

-условия ВЭЖХ-фракционирования образца –хроматографическое - фракционирование на обращенных или иных стационарных фазах;

-процедуры анализа результатов измерений – специальное программное обеспечение для анализа хромато-масс-спектрограмм

3) <u>Методика измерений молярной концентрации белков, кодируемых 18</u> хромосомой человека в образцах белков человека методом высокопроизводительной <u>жидкостной хроматографии в комбинации с тандемной масс спектрометрией</u> (Методика 1.10(3)).

Методика предназначена для измерения молярной концентрации белков, кодируемых 18 хромосомой человека в образцах белков человека методом массспектрометрического анализа. Диапазон измерений молярной концентрации белков, кодируемых 18 хромосомой человека от 10⁻¹² М до 10⁻⁹ М, что отражено в пункте №1 методики 1.10 (3).

Методика обеспечивает:

-используемый тип масс-спектрометрического детектора – детектор типа квадруполь, в комбинации с высокоэффективной жидкостной хроматографией для фракционирования образцов биологического происхождения;

-режимы и условия проведения масс-спектрометрических измерений – электроспрейный тип ионизации, регистрация массово-зарядовых характеристик молекулярных компонентов в положительном режиме ионизации;

-количество биообразца, мкл – не более 10 мкл;

-процедуры предварительной подготовки образца к проведению массспектрометрических измерений – ферментативный гидролиз белка (трипсин;лизилэндоппетидаза, хемотрипсин и т.д.);

-условия ВЭЖХ-фракционирования образца –хроматографическое - фракционирование на обращенных или иных стационарных фазах;

-процедуры анализа результатов измерений – специальное программное обеспечение для анализа хромато-масс-спектрограмм

4) Методика измерений молярной концентрации белков, кодируемых 18 хромосомой человека в образцах белка человека методом двумерного

фракционирования в комбинации с высокопроизводительной жидкостной хроматографией и тандемной масс спектрометрией (Методика 1.10(4)).

Методика предназначена для измерения молярной концентрации белков, кодируемых 18 хромосомой человека в образцах белков человека методом массспектрометрического анализа с применением двумерного хроматографического фракционирования, диапазон измерений молярной концентрации белков, кодируемых 18 хромосомой человека от 10⁻¹³ М до 10⁻⁹ М, отражено в пункте №1 Методики 1.10 (4).

Методика обеспечивает:

-используемый тип масс-спектрометрического детектора – детектор типа квадруполь, в комбинации с высокоэффективной жидкостной хроматографией для фракционирования образцов биологического происхождения;

-режимы и условия проведения масс-спектрометрических измерений – электроспрейный тип ионизации, регистрация массово-зарядовых характеристик молекулярных компонентов в положительном режиме ионизации;

-количество биообразца, мкл – не более 10 мкл;

-процедуры предварительной подготовки образца к проведению массспектрометрических измерений – ферментативный гидролиз белка (трипсин;лизилэндоппетидаза, хемотрипсин и т.д.);

-условия ВЭЖХ-фракционирования образца –хроматографическое - фракционирование на обращенных или иных стационарных фазах;

-процедуры анализа результатов измерений – специальное программное обеспечение для анализа хромато-масс-спектрограмм

Разработанные по пункту1.10 ПГ и в соответсвтии с Техническим заданием Соглашения Методики представлены в составе пакета отчетной документации в виде отедльных документов (Пункт_ПГ-1.10-Методика_1.10(1)_v1; Пункт_ПГ-1.10-Методика_1.10(2)_v1; Пункт_ПГ-1.10-Методика_1.10(3)_v1; Пункт_ПГ-1.10-Методика_1.10(4)_v1)

10.Разработка методики панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава биологического образца с использованием масс-спектрометрического детектора

Целью работы на данном этапе было разработать методику панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава биологического образца с использованием масс-спектрометрического детектора.

10.1. Материалы

B качестве биологического образца для панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава использовали плазму крови, как наиболее часто используемый материал для диагностики. Отражение в метаболоме крови, как в «молекулярном зеркале», событий, происходящих в организме, и ее доступность за счет минимальной инвазивности процедуры забора делает ее одним из самых распространённых биологическим материалом для метаболомных исследований. Кровь – основной переносчик низкомолекулярных веществ в организме, являющихся питательными веществами, гормонами, субстратами и продуктами биохимических реакций. Кровь омывает все ткани в организме, и в нее выделяются вещества в ответ на внешние или внутренние стимулы. Кровь и ее производные уже многие годы используются для диагностики многих социально значимых заболеваний [238 – 240]. Для данной методики использовалась ЭДТА плазма крови, полученная по стандартному протоколу.

Кровь берут из кубитальной вены, обычно утром натощак, в пробирку вакутейнер ('VACUETTE'), содержащую антикоагулянт К2ЭДТА, в объеме 5 мл. Для сбора всех образцов необходимо использовать идентичные вакутейнеры, чтобы количество антикоагулянта во всех образцах плазмы было идентичным. Аккуратно переворачивая вакутейнер, 4–6 раз перемешать кровь с ЭДТА. Избегать встряхивания и пенообразования. Полученную кровь не позднее чем через 15 минут после забора центрифугируют при комнатной температуре в течение 15 мин при 3000 об/мин (1600 g). Полученную плазму с помощью автоматического дозатора переносят в чистую пластиковую пробирку объемом 1,5 мл (EppendorfTM) или специальную криопробирку для хранения биологического материала. Образцы замораживают при -80° С.

Данный подход позволяет стандартизировать анализируемые образцы уже на

этапе забора крови и получения плазмы. Маркированные образцы плазмы крови хранят при температуре -80°С и не подвергают повторному размораживанию/замораживанию. Транспортировка образцов осуществляется в специализированных транспортных контейнерах в замороженном состоянии в жидком азоте.

10.2. Методы

Пробоподготовка биологического образца

Поскольку панорамное молекулярное профилирование метаболомного состава должно предоставлять достоверные данные о многочисленных метаболитах в образце, выбор метода пробоподготовки имеет решающее значение. Подготовка образца крови перед масс-спектрометрическим профилированием метаболитов является одной из наиболее сложных и важных этапов аналитической процедуры. В настоящее время не существует универсальной методики пробоподготовки, профилирования метаболитов подходящей для крови. Необходимость неселективной процедуры подготовки проб продиктована необходимостью анализа как можно более широкого спектра метаболитов. Как правило, это достигается с помощью простых процедур подготовки образцов, таких как разбавление, осаждение или экстракция растворителем. В метаболомных исследованиях более селективные процедуры пробоподготовки, такие как фазовая экстракция, обычно используются для анализа отдельных метаболитов или классов метаболитов [241 -243]. Депротеинизация – это минимальная обработка биологического образца, необходимая до проведения последующего масс-спектрометрического анализа метаболитов крови, и обычно достигается за счет осаждения белков органическим растворителем, денатурацией белков или ультрафильтрацией. Осаждение белков органическим растворителем является наиболее часто используемым методом для панорамного молекулярного профилирования метаболома крови [238, 241, 244, 245]. Помимо осаждения белков, использование органического растворителя позволяет разрушить связи между метаболитами и белками, что анализировать связанные и несвязанные (свободные) метаболиты крови. Различные органические растворители и их комбинации (ацетонитрил, ацетон, метанол, этанол, дихлорметан и другие) используют для получения низкомолекулярной фракции образцов плазмы крови. Как правило, метанол предпочтительнее ацетонитрила для пробоподготовки

образцов плазмы крови, потому что образует хлопьевидный осадок, более стабильный, чем при использовании ацетонитрила. Кроме того, при использовании метанола надосадочная жидкость получается более прозрачная, что облегчает процедуру ее забора [246]. Не стоит также забывать, что в метаболомных исследованиях обычно сравнивают относительные уровни метаболитов в большом количестве образцов, и поэтому воспроизводимость эффективности экстракции для широкого спектра метаболитов играет большую роль для обеспечения точности измерения, чтобы можно было выявить даже небольшие изменения в метаболомном составе. Возможные потери метаболитов предотвращаются за счет минимизации общего количества этапов пробоподготовки, а короткое время самой процедуры обеспечивает высокую пропускную способность метода.

Поэтому для разработанного панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава образца плазмы крови используется метод, основанный на экстракции низкомолекулярной субстанции из биологического материала с одновременным предварительным осаждением белков с помощью 90% раствора метанола. Данный метод экстракции широко используется в метаболомных исследованиях с кровью и хорошо зарекомендовал себя в работах лаборатории массспектрометрической метаболомной лаборатории ИБМХ по анализу метаболомного профиля плазмы крови для диагностики нарушенной толерантности к глюкозе, болезни Паркинсона, ожирения [247 – 250]. Для этого в чистой пластиковой пробирке объемом 1,5 мл (EppendorfTM) смешивали 10 мкл предварительно размороженного при 4°C образца плазмы крови с 10 мкл воды очищенной (LiChrosolv, Merck, США) и 80 мкл метанола (J.T. Baker, США,). Инкубировали при постоянном интенсивном встряхивании (1000 об./мин) в течение 10 минут при комнатной температуре и после этого центрифугировали при 13000 об./мин (Centrifuge 5408R, "Eppendorf", Германия) при температуре 10°С в течение 15 минут. Полученный супернатант (надосадочная жидкость) переносили в чистую пластиковую пробирку объемом 1,5 мл (Eppendorf^{тм}). Таким образом, мы получили низкомолекулярную фракцию образца плазмы крови.

Непосредственно перед масс-спектрометрическим анализом 10 мкл полученной низкомолекулярной фракции отобрать в чистую пробирку и добавить 490 мкл 0,1% раствора муравьиной кислоты (Fluca, США) в метаноле. В полученный раствор низкомолекулярной фракции биологического образца добавить 1 мкл стокового раствора внутреннего стандарта (до конечной концентрации 10 нг/мл) непосредственно перед началом измерений. В качестве внутреннего стандарта использовали синтетическое вещество лозартан (Aldrich, США) с химической формулой C₂₂H₂₃ClN₆O с молекулярной массой 422,917 у.а.е.

Стоковый раствор внутреннего стандарта готовили по следующему протоколу: (1) точную произвольную навеску сухого вещества лозартан взвесить на аналитических весах; (2) добавить воду очищенную до конечной концентрации вещества 5 мкг/мл и перемешать до полного растворения в течение 5 минут при комнатной температуре при постоянном встряхивании 500 об./мин. Стоковый раствор хранить в стеклянном флаконе в течение 30 дней при температуре +2..+6°C. Особых условий к освещению при хранении не требуется.

Для приготовления растворов использовать посуду либо только ИЗ стекла. либо полипропиленовую деактивированного посуду, которую предварительно необходимо сполоснуть Использование ацетонитрилом. боросиликатного стекла или полистирола недопустимо в виду абсорбции низкомолекулярной субстанции на стенках стекла или полистирола. Чистота используемых реактивов была не ниже 99,9%. Остаток неиспользованной надосадочной жидкости (низкомолекулярная фракция) хранить при температуре -80°C.

Масс-спектрометрический анализ

Разработанная методика панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава биологического образца использует массспектрометрический детектор, так как данный метод позволяет анализировать сотни или тысячи метаболитов в одном образце [240, 251]. При масс-спектрометрическом интенсивность каждого масс-спектрометрического анализе пика отражает концентрацию вещества в биологическом образце, а совокупность всех измеренных интенсивностей масс-спектрометрических пиков – метаболомный состав. Несмотря на многообещающие результаты, существует множество технических проблем в масс-спектрометрических метаболомных исследованиях. Хотя использование различных методов на основе масс-спектрометрии позволяет обнаруживать и количественно определять (абсолютные или относительные) сотни различных

метаболитов в сложных биологических образцах, каждая из этих технологий имеет свои преимущества и ограничения [243, 252, 253]. Например, газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией, (ГХ-МС) считается одним из самых простых и недорогих методов анализа метаболитов благодаря своему высокому разрешению и селективности, хорошей разделительной способности, надежности и воспроизводимости, а также простоте идентификации компонентов с использованием универсальных коммерческих и общедоступных баз данных. Однако для анализа требуется дериватизация образца, и поэтому данный метод может применяться для анализа только летучих метаболитов (или тех, которые могут улетучиваться (например, большинство аминокислот, сахарные спирты, ароматические амины и органические кислоты)) [254, 255]. Методы с жидкостной хроматографией (XX-MC) характеризуются высокой эффективностью И разрешением, простой подготовкой образцов и возможностью анализа метаболитов разных химических классов. Однако также существует матричный эффект из-за подавления ионов и трудности с идентификацией метаболитов. Используя различные хроматографические колонки, метод ЖХ-МС имеет более широкий охват и позволяет анализировать как неполярные, так и полярные метаболиты [256, 257]. Еще один способ предварительного разделения сложных биологических смесей капиллярный электрофорез (КЭ) более имеет высокую теоретическую эффективность разделения, хроматография, нежели жидкостная И может использоваться для исследования более широкого диапазона соединений, чем газовая хроматография. Как и все электрофоретические методы, он наиболее удобен для разделения ионов. Однако невозможность анализа неполярных метаболитов и технически сложная процедура разделения привели к тому, что данный метод редко применяют в метаболомных исследованиях [258, 259]. Масс-спектрометрия может применяться как после предварительного разделения веществ образца, так и без него, то есть методом т.н. прямой масс-спектрометрии, которая подразумевает непосредственное внесение анализируемого биоматериала в источник ионизации масс-спектрометра без какого-либо предварительного разделения [239, 260 – 262]. Хотя прямое масс-спектрометрическое профилирование является быстрым и хорошо воспроизводимым методом, позволяющим анализировать большое окличество образцов, оно имеет один недостаток. Из-за одновременного ввода всех

веществ низкомолекулярной фракции биологического образца в источник ионизации при прямом масс-спектрометрическом анализе происходит подавление сигнала отдельных метаболитов (ионная супрессия), что влияет на количественные характеристики масс-спектрометрических данных и затрудняет интерпретацию получаемых результатов. Таким образом, действительно, не существует универсальной аналитической платформы для измерения всего метаболома из-за широких диапазонов концентрации (от г/л до нг/л и ниже) и разнообразия физикохимических свойств метаболитов, что делает анализ полного метаболома технически сложным [263].

При разработке данной методики панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава биологического образца с использованием масс-спектрометрического детектора был выбран метод прямой массспектрометрии, так как исключение предварительного разделения метаболитов, хроматографией, увеличивает воспроизводимость например массспектрометрических данных, что важно при внедрении метода в диагноститку [240, 243, 249, 263 – 266]. Отсутствие эффективного разделения метаболитов компенсируется применением современных масс-спектрометров с высоким разрешением и точностью измерения масс веществ. Так, применение гибридного квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра (Q-TOF) позволяет методом прямой масс-спектрометрии детектировать в крови до тысячи ионов метаболитов. Учитывая, что согласно данным Бичера К.У.У. [267] метаболом человека содержит примерно три тысячи основных метаболитов, можно утверждать, что масс-спектр крови отражает основную часть метаболома человека и может быть использован для эффективного исследования и диагностики заболеваний.

Разработанная на данном этапе выполнения проекта методика включает в себя масс-спектрометрический анализ на гибридном квадруполь-время-пролетном массспектрометре с электроспрейным источником ионизации timsTOF (Bruker Daltonik GmbH, Germany) методом прямой инжекции образца. Для этого использовали стеклянный шприц ("Hamilton Bonaduz", Швейцария) объемом 500 мкл, установленный в встроенный шприцевой инжекторный насос масс-спектрометра. Поток пробы, подаваемой в электроспрейный источник ионизации, составлял 180 мкл/час. Для источника ионизации использовались следующие параметры:
- - температура осушающего газа (азот) 200°С;
- - скорость потока осушающего газа 4 л/мин;
- - напряжение на капилляре 4500 В;
- фокусирующее напряжение: 500 В;
- - давление на распылителе 0,4 Бар.

Настройки прибора были подобраны так, чтобы преимущественно детектировать положительно заряженные ионы в диапазоне m/z от 50 до 1500 Да (Рис 11.1.).

🕄 Mode 뵭 So	urce 🤸 Tune 🌮 MS/MS 📓 Sample Info 🎿 Chromatogram 🚿	🤇 Calibration 🦂 Instrument 🛠 Service	Ion Polarity TIMS
-ग्रेर General	Transfer C Funnel 1 RF 250.0 Vpp Funnel 2 RF 250.0 Vpp isCID 0.0 eV Multipole RF 100.0 Vpp Deflection 80.0 V V VP VP	Stepping	Scan Mode MS Scan Range Mass 50 · 1500 m/z
	Quadrupole Ion Energy 5.0 eV Low Mass 100.00 m/z Collision Cell Collision 10.0 eV Collision RF 800.0 Vpp Frendry Transfer 55.0 µs Pre Pulse 5.0 µs		Rolling Average Spectra Rate ▼ ✓ On 3 × 1.00 Hz Apply Both Polarities All Segments

Рисунок 11.1 - Параметры гибридного квадруполь-время-пролетного масс-спектрометра с электроспрейным источником ионизации timsTOF (Bruker Daltonik GmbH, Germany) для панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава образца плазмы крови методом прямой инжекции в режиме детекции положительно заряженных ионов.

Перед анализом биологического образца была проведена предварительная калибровка масс-спектрометра посредством введения с помощью шприца и шприцевого инжекторного насоса водного раствора смеси низкомолекулярных веществ ESI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent). Калибровка осуществлялась методом улучшенной квадратичной аппроксимации с использованием не менее четырех точек (известных m/z в выбранном диапазоне), и погрешность измерения не превысила 1 ppm (Puc. 11.2).

После калибровки с помощью стеклянного прецизионного шприца объемом 0,5 $c M^3$ И шприцевого инжекторного насоса был произведен ввод раствора низкомолекулярной фракции биологического образца в источник ионизации массспектрометра и запись детектируемых сигналов в течение 1 минуты времени. Массспектрометрические измерения для раствора низкомолекулярной фракции образца плазмы крови были осуществлены В условиях повторяемости (три последовательных технических повтора).

pole Reference List	Tuning Mix ES-1	TOF (ESI)	~	Zooming	±0.1%	~	Calibration Mode	Scan Mode
Name	Ref. Mass	Cur. Mass	Corr. Mass	Error	Int.	^	Enhanced Quadratic	MS
C5H12NO2	118.0863	118.0863	118.0863	0.10	29514		Calibrate	Com Davas
C6H19N3O6P	3 322.0481	322.0479	322.0480	-0.45	210788		Assest	Scan Hange
C12H19F12N	622.0290	622.0295	622.0295	0.88	1022128		Accept Cancel	Mass DU ·
C18H19F24N	922.0098	922.0092	922.0091	-0.78	692120		Calibration Status	
C24H19F36N3	1221.9906	1221.9913	1221.9909	0.25	136942		FIL	Bolling Average -
C30H19F48N	1521.9715						StdDev 🔻 🛛 0.64 ppm	
C36H19F60N3	1821.9523						Score 99.82 %	
C42H19F72N	2121.9331					~		

Рисунок 11.2 - Результаты калибровки гибридного квадруполь-время-пролетного массспектрометра с электроспрейным источником ионизации timsTOF (Bruker Daltonik GmbH, Germany) методом улучшенной квадратичной аппроксимации с помощью водного раствора смеси низкомолекулярных веществ ESI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent).

Обработка результатов измерений

Предварительную обработку масс-спектров проводили в программе DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonik GmbH, Germany) суммированием записанных сигналов. Детекцию пиков в спектрах осуществляли по следующим параметрам: количество точек на пик – 2; отношение сигнал к шуму – 1; отсечение по относительной и абсолютной интенсивности – 0,001% и 100, соответственно. Таким образом получить список характеристик (m/z, интенсивность и др.) пиков массспектра и вычислить интенсивность пиков ионов низкомолекулярных субстанций для всех технических повторов.

10.3. Результаты

Поскольку для панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава биологического образца важно получить достоверные данные по как можно большему количеству метаболитов, относящихся к различных классам химических веществ и метаболических путей (так называемый метаболомный профиль), то необходимо использовать масс-спектрометры с высоким разрешением и точностью определения отношения массы к заряду иона. Современные гибридные квадрупольвремя-пролетном масс-спектрометры с электроспрейным источником ионизации позволяют анализировать сложные биологические смеси с разрешением выше 10000 и точностью измерения масс ионов от 1 до 3 ppm (миллионные доли) даже в режиме ввода образца В источник ионизации, наряду с высокой прямого ЧТО чувствительностью делает прямое масс-спектрометрическое профилирование и ЖХ-

МС наиболее подходящими для метаболомного анализа сложных биологических образцов. Однако, учитывая время, необходимое на проведение анализа, можно сказать, что прямой масс-спектрометрический анализ является более высокопроизводительной технологией, чем ЖХ-МС, что немаловажно в случае анализа большого количества образцов. Это связано, в первую очередь, с невозможностью поддержания высокой воспроизводимости анализа большого количества образцов в течение недель или даже месяцев методом ЖХ-МС из-за хроматографического сдвига и других инструментальных изменений, которые влияют на результаты. В рамках данного проекта была разработана методика панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава биологического образца с использованием масс-спектрометрического детектора. В качестве биологического образца использовалась плазма крови человека, а массспектрометрического детектора - гибридного квадруполь-время-пролетного массспектрометра с электроспрейным источником ионизации timsTOF (Bruker Daltonik GmbH, Germany).

На рисунке 11.3 показаны примеры масс-спектров низкомолекулярной фракции образца плазмы крови, полученные методом прямой инжекции в электроспрейный источник ионизации гибридного квадруполь-время-пролетного масс-спектрометра timsTOF (Bruker Daltonik GmbH, Germany) в режиме детекции положительно заряженных ионов в диапазоне масс (m/z) 50-1500 Да в условиях повторяемости (три последовательных технических повтора). Видно, что общая интенсивность масс-спектров во всех трех повторах составила порядка $6,5 \times 10^5$ a.e. (абсолютные единицы) и распределение пиков в масс-спектрах хорошо воспроизводятся. Количество детектируемых пиков при этом составило 18108±165. Точность определения масс пиков во всех трех повторах составила меньше 3 ррт. В области масс более 500 Да детектировались пики высокопредставленных в крови липидов, таких как фосфолипиды, ди- и триглицериды и лизофосфолипиды. Особенно большое количество пиков детектировались в области от 700 до 900 Да, и связано это с многообразием форм из-за различий в гидроуглеродных цепях жирных кислот, присутствующих в фосфолипидах, которые могут различаться самими группами жирных кислот, позиционном распределении этих групп, расположении двойных связей, геометрии и др. В области масс-спектра до 400 Да регистрируются низкомолекулярные метаболиты разных химических классов, отвечающие за разные физиологические функции – аминокислоты, органические кислоты, пептиды, углеводы и другие соединения [248, 261, 268].



Рисунок 11.3 - Масс-спектры низкомолекулярной фракции образца плазмы крови, полученные методом прямой инжекции в электроспрейный источник ионизации гибридного квадруполь-время-пролетного масс-спектрометра timsTOF (Bruker Daltonik GmbH, Germany) в режиме детекции положительно заряженных ионов в диапазоне масс (m/z) 50-1500 Да в условиях повторяемости (три последовательных технических повтора).

После предварительной обработки масс-спектров в программе DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonik GmbH, Germany) был получен список характеристик (m/z, интенсивность и др.) пиков масс-спектра в следующем формате, где # - порядковый номер масс-спектрометрического пика, m/z – отношение массы к заряду, I – значение интенсивности масс-спектрометрического пика (его высота) и Area – площадь масс-спектрометрического пика (Рис. 11.4).

#	m/z	I	Area
1	84.9625	378	3
2	95.0870	155	1
3	96.9229	845	6
4	97.1017	224	1
5	97.9920	764	6
6	98.9197	498	4
7	98.9758	412	3
8	98.9876	183	1
9	98.9960	319	2
10	99.9803	314	2

Рисунок 11.4 - Формат данных, получаемых после обработки масс-спектров в программе DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonik GmbH, Germany). # - порядковый номер массспектрометрического пика; m/z – отношение массы к заряду; I – значение интенсивности масс-спектрометрического пика и Area – площадь масс-спектрометрического пика.

На основе полученных данных была вычислена интенсивность пиков ионов низкомолекулярных субстанций для всех технических повторов. Окончательные результаты измерений вычислялись и оформлялись с учетом оценки приемлемости результатов измерений в условиях повторяемости согласно приведенной ниже схеме в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002.

Два результата измерений должны быть получены в условиях повторяемости. Фактическое расхождение r_{ϕ} между ними должно в таком случае сравниваться с пределом повторяемости r_i для n=2.

Значение r_{ϕ} рассчитывают по формуле

$$\frac{n \cdot |I_{max} - I_{min}| \cdot 100}{\sum_{i=1}^{n} I_i} = r_{\phi}$$

Значение *r*_i рассчитывают по формуле

 $r_i = 2, 8\sigma_{ri},$

где σ_{ri} - показатель повторяемости измерений интенсивности пика i-го вещества (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), %.

Если фактическое расхождение между результатами двух измерений интенсивности иона в масс-спектрах не превышает *r_i*, оба результата признают приемлемыми, и в качестве окончательного результата должно указываться среднее арифметическое значение результатов этих двух измерений (Таблица 11.1). Если фактическое расхождение превышает *r_i*, то получают еще один результат измерений.

Если при этом диапазон ($I_{max} - I_{min}$) результатов трех измерений интенсивности пика иона в масс-спектрах равен или меньше критического диапазона для уровня вероятности 95% для n=3, $CR_{i0,95}$, то в качестве окончательного результата должно фиксироваться среднее арифметическое значение результатов трех измерений.

Значение *CR*_{*i*0,95} рассчитывают по формуле

 $CR_{i0,95} = 3, 3\sigma_{ri},$

где σ_{ri} – показатель повторяемости измерений интенсивности пика i-го вещества (относительное среднеквадратичное отклонение повторяемости), %.

Если диапазон результатов трех измерений больше критического диапазона для n=3, то в случае, когда невозможно получить четвертый результат измерений, в качестве окончательного результата может фиксироваться медиана результатов трех измерений (Таблица 1).

Название метаболита и форма иона	Отношение массы к заряду иона, m/z		Повторяемость измерений интенсивности	Предел повторяемости, г, % (P=0,95) при p = 2	Критический диапазон CR0,95, %, при р = 3	Интенсивность пика иона, а.е.	
	Теоретическое	Регистрируемое	σ, %	iipn ii 2	iipn ii - 5	Среднее арифметическое	Медиана
Креатинин [М+Н]+	114,0662	114,0663	2,3	6,4	7,6	1030	-
Креатин [M+H]+	132,0768	132,0772	1,9	5,2	6,1	1679	-
L-Глутамин [М+Н]+	147,0764	147,0764	4,0	11,1	13,1	4090	-
L-Карнитин [М+Н]+	162,1125	162,1122	4,8	13,3	15,7	18350	-
D-Глюкоза [M+Na]+	203,0526	203,0523	2,1	5,9	6,9	208230	-
L-Триптофан [М+Н]+	205,0972	205,0962	2,9	8,1	9,6	2821	-
Инозиновая кислота [M+H]+	349,0544	349,0557	10,0	28,0	33,0	-	24809
Изомальтоза [M+Na]+	365,1054	365,1062	2,0	5,6	6,6	40321	-
Лозартан [M+H]+	423,1695	423,1703	2,2	6,2	7,3	46826	-
PC [M+H]+	758,5694	758,5690	10,0	28,0	33,0	-	279453
PC [M+Na]+	780,5514	780,5509	5,3	15,0	17,6	624833	-

Таблица 11.1 - Оценка приемлемости результатов измерений в условиях повторяемости

В Таблице 11.1 приведены данные оценки приемлемости результатов измерений в условиях повторяемости для ряда метаболитов крови, которые были идентифицированы ранее [248, 268]. Видно, что только для двух пиков (m/z 349,0544 и 758,5694) фактическое расхождение результатов измерений превысило и предел повторяемости, и критический диапазон. Поэтому для этих пиков допустимо в качестве результата измерения взять медиану результатов трех измерений в условиях повторяемости.

Таким образом, в результате выполнения первого этапа проекта была разработана Методика панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава биологического образца с использованием массспектрометрического детектора, характеризующаяся высокой точностью определения масс пиков (до 3 ppm) и повторяемостью измерений интенсивности пика (σ ≤ 10%). Разработанная Методика представлена в составе отчетной документации (файл «Пункт ПГ-1.11-Методика v1»).

Отдельные пункты разработанной методики были успешно применены для метаболомного анализа мух *Drosophila* с разной продолжительностью жизни. По результатам в журнале опубликована статья Maslov D.L., Zemskaya N.V., Trifonova O.P., Lichtenberg S., Balashova E.E., Lisitsa A.V., Moskalev A.A., Lokhov P.G., Comparative Metabolomic Study of Drosophila Species with Different Lifespans, International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(23), 12873.

11.Разработка протокола получения наноразмерных частиц для доставки лекарств

11.1. Разработка лабораторных методов приготовления фосфолипидных частиц

11.1.1. Способы получения фосфолипидных частиц

В настоящее время можно выделить три основных способа получения фосфолипидных частиц:

- 1) Обработка грубой эмульсии фосфолипидов в воде ультразвуком.
- 2) Гомогенизация грубой эмульсии фосфолипидов в воде под высоким давлением (свыше 1000 атм.).
- Экструзия грубой эмульсии фосфолипидов в воде под давлением через отверстия, диаметром 75-200 мкм (микрофлюидизация).

Метод ультразвуковой дезинтеграции фосфолипидов обычно рассматривается как грубый, применяется он только в научных исследованиях, а для использования в медицинских и фармацевтических целях (производство липосом) используют, как правило, методы гомогенизации под высоким давлением и/или экструзии (продавливании) водно-липидной эмульсии через отверстия заданного размера (микрофлюидизация).

Еще одним способом диспергирования липидов в водную среду является использование детергентов, в присутствии которых идет образование мицелл/липосом, и которые потом постепенно удаляются (например, диализом) из раствора. Однако список детергентов, разрешенных к применению в фармакологии, весьма ограничен, а собственно метод не технологичен для получения больших количеств материала.

Получение мелких частиц возможно многократным повторением циклов замораживания-высушивания, однако этот способ также не технологичен для использования в условиях промышленного производства.

Анализ данных литературы, а также собственный опыт работы С фосфолипидами растительного происхождения позволяет утверждать, что наиболее технологичным методом получения фосфолипидных частиц для использования их как транспортной системы является способ гомогенизации и/или продавливания отверстия (1000)1200 через узкие под высоким давлением _ атм.)

(микрофлюидизации). Преимуществами этих методов являются высокая производительность и минимальное окисление фосфолипидов в процессе обработки. Эти технологии обеспечивают воспроизводимость и стандартизацию получаемых частиц по размерам. Использование такого оборудования, как гомогенизатор высокого давления и микрофлюидайзер, позволяет вести процесс в асептических условиях, при постоянном контроле температуры и давления.

11.2. Получение стабильных фосфолипидных частиц

На основе анализа данных литературы и собственного опыта работы с фосфолипидами и фосфолипидными частицами для получения стабильных наноразмерных частиц для доставки лекарств нами были выбраны метод гомогенизации под высоким давлением и технология микрофлюидизации. С целью выбора оптимальных условий получения стабильной фосфолипидной наносистемы с размером частиц не более 50 нм, были проведены экспериментальные исследования, результаты которых приведены ниже.

11.2.1. Материалы и методы.

Реактивы

В работе использовались следующие материалы:

1. <u>Соевый фосфатидилхолин</u> марки Lipoid S 100 фирмы Lipoid, Германия. Светло-желтое воскообразное вещество без запаха. Хорошо растворяется в этиловом спирте, хлороформе, плохо в воде и метиловом спирте. Температура спекания 75-80° С. Т_{пл}=120-122° С. Нетоксичен, пожаровзрывобезопасен.

<u>2. Мальтозы моногидрат</u> фирмы MERCK, Германия. Белый порошок без запаха, обладающий слабо сладким вкусом. Хорошо растворяется в воде, плохо в этиловом спирте, практически не растворяется в диэтиловом эфире и хлороформе. Кристаллогидраты мальтозы при нагревании до 95°C начинают плавится, при 130° C постепенно теряет кристаллизационную воду, а при 165° C становятся безводными. Т_{пл}=204° C. Нетоксичен. Пыль мальтозы раздражает дыхательные пути.

Вода для инъекций (согласно требованиям ГФ XIII ФС.2.2.0019.15) [269] Получение эмульсии фосфолипидных наночастиц Готовили два раствора:

Раствор А. 25 г Lipoid S 100, нарезанный тонкими пластинками, растворяли в 250 мл воды для инъекций (pH 6,7), перемешивали с помощью механической мешалки.

Раствор Б. Растворяли 87,5 г мальтозы в воде для инъекций, при тщательном перемешивании и легком подогреве, до полного растворения, конечный объем доводим до 250 мл.

Растворы А и Б смешивали. Доводили общий объем до 500 мл водой для инъекций и тщательно перемешивали до получения однородной эмульсии.

Гомогенизация проводилась с помощью гомогенизатора высокого давления Mini – Lab 7.30 VH, Rannie, Дания при постоянном охлаждении. Выходной патрубок был соединен с водяным холодильником. Из холодильника смесь поступает в делительную воронку, которая служит для аккумуляции эмульсии и наполнения входной воронки гомогенизатора для следующего цикла гомогенизации.

500 мл полученной эмульсии пропускается через гомогенизатор под давлением 1000 атм. Температура эмульсии поддерживается в пределах 40-50°С.

Процесс гомогенизации повторяли от 1 до 10 циклов. В полученной липидной эмульсии после каждого цикла измеряли светопропускание при длине волны 660 нм. (измерение проводили на спектрофотометре Ajilent 8453 UV-visible spectrofotometr, Германия, с использованием программы HP UV Visible ChemStation). Кроме этого, в полученных образцах измеряли диаметр частиц. Определение размеров частиц проводили с помощью лазерного корреляционного спектрометра Beckman-Coulter N5 с программным обеспечением PCS Control Software Version 3.02 (Beckman Coulter Copyright, 2003). Полученные данные приведены в табл. 12.1.

Как видно из табл. 12.1, проведение 1 цикла гомогенизации приводит к образованию фосфолипидных частиц размером около 2000 нм, светопропускание раствора составляет 41%. Дальнейшее увеличение циклов гомогенизации приводит к уменьшению размера частиц. Наименьший размер фосфолипидных частиц был достигнут после 7 циклов гомогенизации. Дальнейшая гомогенизация фосфолипидной эмульсии не приводила к изменению размера частиц. Таким образом, наиболее оптимальное количество циклов для получения раствора фосфолипидных частиц с диаметром ≤ 50 нм.

№ цикла	Размер частиц, нм	Светопропускание,%
1	1978,36	41,32
2	865,47	49,00
3	705,44	69,12
4	542,15	80,58
5	325,76	85,48
6	70,54	90,81
7	28,65	93,58
8	24,25	95,41
9	20,45	94,96

Таблица 12.1 - Показатели качества полученной эмульсии после гомогенизации.

Принцип работы гомогенизатора основан на том, что жидкость продавливается через пружинный клапан, контролирующий размер отверстия, определяющего размер частиц при прохождении жидкости. При этом недостатками процесса при использовании гомогенизаторов является то, что размер частиц сильно варьируется и имеется ограничение по давлению.

Альтернативный способ получения частиц нанодиапазона используется в микрофлуидайзере. Его отличительной особенностью является наличие уникальной камеры, представляющей собой керамическую трубку определенной геометрии, обеспечивающей стандартизацию продукта на выходе камеры. В зависимости от модели в микрофлуидайзере есть пневматический или электрогидравлический насос. В процессе работы микрофлуидайзера поток продукта разгоняется до высокой скорости, создавая скорость сдвига внутри потока продукта, которая по величине больше, чем обычное значение. Вся порция продукта подвергается одинаковым условиям: постоянство давления дает на выходе частицы, гомогенные по размеру. Высокое давление и высокая скорость дают возможность получить на выходе частицы малого размера. Очень большой диапазон давления (вплоть до 40000 psi) открывает возможности применения микрофлуидайзера для получения малых по размеру и гомогенных по распределению частиц, не содержащих примесей побочных продуктов.

Таким образом, преимуществами микрофлюодайзера являются:

- Возможность получения очень мелких частиц;
- Получаемые частицы имеют узкое распределение по размеру;
- Процесс занимает гораздо меньше времени;
- Более точный контроль над приложенным усилием;
- Более высокий уровень прилагаемого давления (вплоть до 40000psi = 2600 атм.)

• Возможность работать как с малым объемом образца, так и с непрерывно поступающим продуктом;

- Отсутствие в камере движущихся частей;
- Минимальные загрязнения;
- Получаемые дисперсии и эмульсии однородны и стабильны.

Размер частиц, в том числе липидных, которые можно получить с использованием микрофлуидайзера, позволяет вводить их внутривенно без опасения закупорить малые кровяные сосуды. Воспроизводимость при получении частиц дает возможность иметь стандарты для сравнения в работе по модификации параметров в исследованиях разного рода.

Для получения мелких липосом (20-30 нм в диаметре) микрофлуидайзер позволяет использовать давление более 1500 атм., поддерживать температуру в интервале 35-40 ⁰C.

<u>Описание эксперимента.</u> Для получения фосфолипидной эмульсии использовали микрофлюидайзер M110EH30K, Microfluidics, CША. Отфлюидизированная эмульсия собиралась в сборнике, откуда переливалась в накопительную емкость микрофлюидайзера для дальнейшей флюидизации. Температура эмульсии поддерживалась на постоянном уровне и не превышала 50 ^оС. Охлаждение эмульсии проводилось с помощью имеющейся в данном аппарате охлаждающей системы.

Эмульсию пропускали через микрофлюидайзер от 1 до 5 циклов под давлением 2000 атм. После каждого цикла флюидизации отбирались пробы для измерения светопропускания (спектрофотометр Ajilent 8453 UV-visble spectrofotometr, Германия, с использованием программы HP UV Visible ChemStation) и размера полученных частиц (лазерный корреляционный спектрометре Beckman-Coulter N5 с программным обеспечением PCS Control Software Version 3.02 (Beckman Coulter Copyright, 2003). Полученные данные приведены в табл. 12.2.

1 иолици 2 – 113менение ризмери фоефолинионогл нино шетиц от циклов флюйойзиции								
№ цикла	Размер частиц, нм	Светопропускание, %						
1	1678,91	45,24						
2	867,24	53,12						
3	378,45	68,18						
4	57,61	85,35						
5	20,21	91,25						

Таблица 2 - Изменение размера фосфолипидных наночастии от ииклов флюидизации

Таким образом, можно сделать вывод, что с позиции размера и стабильности получаемых частиц методы гомогенизации при высоком давлении и технология микрофлуидизации практически равноценны и предлагаются нами для использования при разработке технологии получения наноразмерных частиц для доставки лекарств в организме.

11.3. Изучение влияния основных технологических этапов на размер фосфолипидных частиц. Протокол получения наноразмерных частиц для доставки лекарств

Следующей задачей, которую необходимо было решить - получение препарата фосфолипидных частиц, стабильных при хранении, в виде лиофильно высушенного порошка, который при последующем растворении сохраняет свои свойства (размер частиц, вязкость раствора, светопропускание и т.п.). Известно, что для стабилизации получаемых надмолекулярных структур часто используют технологию замораживания-высушивания в присутствии криопротекторов, так как на стадиях замораживания и обезвоживания при лиофилизации возможно физическое повреждение частиц кристаллами льда. Основным критерием при выборе криопротектора является сохранение стабильности препарата и размера наночастиц при его регидратации (повторном растворении). Помимо этого, криопротектор не должен кристаллизоваться при замерзании. Важным фактором является также правильный подбор скорости снижения температуры (замораживания препарата), режима сушки.

Среди различных способов сушки, применяемых в фармацевтической промышленности (вакуумной, распылительной, в псевдоожиженном, фонтанирующем слое и других гидродинамических режимах), наибольшее распространение получила вакуумная сублимационная сушка при отрицательных температурах.

Сублимационная сушка (сушка вымораживанием, молекулярная сушка, или лиофильная) наиболее популярный стремительно развивающийся И технологический процесс нескольких последних десятилетий. Причиной тому служит высокое качество получаемых продуктов и незаменимость сублимационной фармацевтической, пищевой сушки, прежде промышленности, всего, В

биотехнологии для высушивания термолабильных, окисляющихся и дорогостоящих лекарственных веществ. При таком способе высушивания удается максимально сохранить исходную структуру и свойства высушиваемых препаратов, а также избежать недостатков тепловых способов обработки. Благодаря низкотемпературным условиям сублимационного обезвоживания, первоначальные свойства продукта полностью сохраняются (летучие, биологически активные вещества, первоначальный запах, вкус, цвет).

Сублимационная сушка имеет три основные стадии: предварительное замораживание продукта, удаление из продукта замороженной влаги путем сублимации (период постоянной скорости сушки), удаление невымороженной (связанной) влаги с повышением температуры до допустимого уровня (период падающей скорости сушки). Стадия предварительного замораживания необходима для перевода свободной (капиллярной и осмотически-связанной) влаги из жидкого состояния в твердое и может быть осуществлена при понижении давления или температуры. Граница снижения температуры определяется температурой эвтектики – наибольшей температурой, при которой происходит кристаллизация подлежащего высушиванию материала, и находятся в равновесии жидкость и образующаяся твердая фаза.

Важным параметром является скорость заморозки. Считается, что наилучший вариант – это быстрая заморозка, способствующая образованию наиболее мелких кристаллов. На скорость замораживания существенно влияют условия теплообмена и параметры самого материала. По мере продвижения фронта кристаллизации резко снижается скорость замораживания, а также влияние интенсивности теплообмена. Например, при толщине замораживаемого слоя 50 мм увеличение коэффициента теплоотдачи от некоторого начального значения 10 Вт/м² °С в сто раз, увеличивает скорость замораживания только в три раза.

На стадии сублимации интенсивность удаления замороженной влаги и температура продукта практически не изменяются, и процесс сублимации продолжается до полного удаления свободной влаги из высушиваемого материала. Длительность этапа сублимации, в первую очередь, зависит от температуры материала, состава защитной среды и толщины слоя (объема фасовки в тот или иной вид посуды) замороженного материала при прочих равных условиях процесса

сушки. По окончании стадии сублимации содержание влаги в продукте не превышает 6%, удаление которой происходит при дополнительной подаче тепла: температура продукта постепенно повышается от температуры сублимации до допустимой, определяемой термолабильностью продукта. На этой стадии достигается необходимый уровень влагосодержания ($\leq 0.1-0.5\%$).

По окончанию этапа сублимации температура начинает расти, начинается период тепловой сушки. При этом температура всего материала повышается до максимально допустимого уровня для удаления в результате испарения остаточной, связанной влаги. Величина остаточной влажности в значительной степени влияет на стабильность сухого препарата в процессе хранения.

Таким образом, при разработке лабораторной технологии получения наноразмерных частиц для доставки лекарств при отработке и оптимизации процесса сублимационной сушки определена эвтектическая температура, конечная температура, скорость заморозки, определена допустимая температура нагревания, произведен выбор режима сублимации и досушки. В результате этого этапа работы на пилотной установке сократить время лиофильной сушки при сохранении качества получаемого препарата с 72 до 27 часа. Применение разработанных и опробованных на пилотной установке параметров дает возможность значительно сократить время сушки на промышленной установке, что, в свою очередь, приведет к ощутимой экономической выгоде.

Важным фактором, влияющим на качество получаемого продукта, является выбор криопротектора. Впервые криопротекторы стали применяться в биологии для сохранения жизнеспособности клеток при длительном хранении при низких температурах. Выбор криопротектора определяет скорость и продолжительность сушки.

В качестве криопротекторов при высушивании фосфолипидных частиц используются в основном сахара. Защита мицелл/липосом во время лиофилизации может направлена на предотвращение слияния частиц, сохранение барьера проницаемости двойного слоя. Это может быть достигнуто в том случае, если сахар взаимодействует с головками фосфолипидов и таки образом создает стерический барьер для сохранения липидной поверхности слоев, даже если в процессе лиофилизации частицы концентрируются между кристаллами льда. Кроме того сахара,

образуя водородные связи с полярными головками фосфолипидов, замещают молекулы воды при лиофилизации.

Мальтоза и мальтотриоза показывают высокий криопротекторный эффект для липосом, содержащих яичный фосфатидилхолин, тогда как более длинноцепочечные мальтодекстрины проявляют слабый криопротекторный эффект. В ряде работ было показано, что хорошим криопротектором для различных фосфолипидных частиц и живых клеток, является трегалоза, однако до настоящего времени трегалоза применяется ограниченно.

Существенным требованием при выборе криопротектора и его концентрации в смеси является способность препарата восстанавливать свои физико-химические свойства после регидратации. Таким образом, выбор криопротектора определяется типом субстанции и должен производиться в каждом случае индивидуально. В связи с этим нами была поведена работа по сопоставлению криопротекторных свойств различных сахаров (лактоза, мальтозе, трегалоза) и оптимизации этого выбора по его концентрации в первичной фосфолипидной эмульсии.

11.3.1. Материалы и методы.

Реактивы

В работе использовались следующие материалы:

1. <u>Соевый фосфатидилхолин</u> марки Lipoid S 100 фирмы Lipoid, Германия. Светло-желтое воскообразное вещество без запаха. Хорошо растворяется в этиловом спирте, хлороформе, плохо в воде и метиловом спирте. Температура спекания 75-80° С. Т_{пл}=120-122° С. Нетоксичен, пожаровзрывобезопасен.

<u>2. Мальтозы моногидрат</u> фирмы MERCK, Германия. Белый порошок без запаха, обладающий слабо сладким вкусом. Хорошо растворяется в воде, плохо в этиловом спирте, практически не растворяется в диэтиловом эфире и хлороформе. Кристаллогидраты мальтозы при нагревании до 95°C начинают плавится, при 130° C постепенно теряет кристаллизационную воду, а при 165° C становятся безводными. Т_{пл}=204° C. Нетоксичен. Пыль мальтозы раздражает дыхательные пути.

<u>3. Лактозы моногидрат</u> фирмы MERCK, Германия. Белый порошок без запаха, обладающий слабо сладким вкусом. Хорошо растворяется в воде, плохо в этиловом спирте, практически не растворяется в диэтиловом эфире и хлороформе. Т_{пл}=202° С.

Нетоксична. Лактоза является ценным питательным продуктом в раннем детском возрасте. Пыль лактозы раздражает дыхательные пути. Пожаровзрывобезопасна.

<u>Трегалоза</u> фирмы Acros, Бельгия. Белый порошок без запаха, обладающий слабо сладким вкусом. Хорошо растворяется в воде, плохо в этиловом спирте, практически не растворяется в диэтиловом эфире и хлороформе.

<u>Вода для инъекций</u> (ГФ XIII ФС.2.2.0019.15) [269]

Получение эмульсии фосфолипидных наночастии.

Готовили два раствора:

<u>Раствор А.</u> 25 г Lipoid S 100, нарезанный тонкими пластинками, растворяли в 250 мл воды для инъекций (рН 6,7), перемешивали, используя механическую мешалку.

<u>Раствор Б</u>. Растворяли 87,5 г мальтозы в воде для инъекций, тщательно перемешивая на мешалке, слегка подогрев, до полного растворения, конечный объем доводили до 250 мл.

Растворы А и Б смешивали. Доводили общий объем до 500 мл водой для инъекций и тщательно перемешивали на мешалке до получения однородной эмульсии.

<u>Примечание:</u> 1. количество мальтозы варьировали для определения минимально возможной концентрации криопротектора, при которой сохраняются свойства фосфолипидных частиц после повторного растворения лиофильно высушенного препарата; 2. таким же образом исследовали криопротекторные свойства других сахаров (трегалозы).

<u>Гомогенизация</u> проводилась с помощью гомогенизатора высокого давления Mini – Lab 7.30 VH, Rannie, Дания. Выходной патрубок соединен с водяным холодильником, служащим для охлаждения эмульсии, нагревающейся во время гомогенизации. Из холодильника смесь поступает в делительную воронку, которая служит для аккумуляции эмульсии и наполнения входной воронки гомогенизатора для следующего цикла гомогенизации.

500 мл полученной эмульсии пропускается через гомогенизатор под давлением 1000 атм. Температура эмульсии поддерживается в пределах 40-50°С. Процесс гомогенизации повторяли (5-7 циклов) до достижения величины пропускания липидной эмульсии 66-85% при 660 нм (измерение проводили на спектрофотометре

Ajilent 8453 UV-visible spectrofotometr, Германия, с использованием программы HP UV Visible ChemStation). Полученный раствор фильтровали через мембрану «Владипор» типа МФАС- П4 с размером пор 4 мкм под давлением азота 2 атм. и разливали во флаконы по 10 мл.

Условия лиофильной сушки фосфолипидной эмульсии на пилотной установке.

Лиофильную сушку проводили в лабораторной установке Virtis AdVantage XL

Эмульсию разливали в 50 флаконов объемом 20 мл, в каждый по 10 мл. В два флакона устанавливали термодатчики, так чтобы головка термопары была в придонном слое раствора. В контролер установки вводилась программа и запускался процесс сушки. Информация о температуре продукта, а также температурах полки и конденсора и давлении в камере выводились на принтер через заданный интервал времени. После отработки заданного режима флаконы закрывались под вакуумом с помощью специальной закрывающей плиты с пневматическим приводом. Распечатка с параметрами сушки сканировалась, информация распознавалась в программе Abbyy FineReader 7.0 и импортировалась в MS Excele 2003для построения термограммы сушки.

Качество получаемого лиофилизированного продукта характеризовали в соответствии с требованиями ГФ: внешний вид должен быть от белого до светложелтого, «таблетка» должна быть ровной, мелкопористой, без сколов, с легкостью отходить от дна.

Растворимость продукта не превышала 3-х минут. Светопропускание коллоидного раствора, полученного растворением содержимого флакона в 8,5 мл воды, при 660 нм и толщине светопоглощающего слоя 10 мм, должно быть от 66 до 85%.

Для определения остаточной влаги использовали метод титрования реактивом К. Фишера. Содержание влаги в сухом продукте не превышало 2.5%.

Определение размеров наночастиц.

Определение размеров частиц проводили с помощью лазерного корреляционного спектрометра Beckman-Coulter N5 с программным обеспечением PCS Control Software Version 3.02 (Beckman Coulter Copyright, 2003). Образец - лиофильно высушенную «таблетку» - растворяли в 8,5 мл воды для инъекций, отбирали 1-2 мл шприцом, снабженным насадкой для фильтрации. Раствор

фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 200 нм в пробирку. Для измерений полученный раствор разводили в 100 раз.

Возможное окисление фосфатидилхолина контролировали с помощью определения содержания в опытных образцах лизофосфатидилхолина (лизоФХ).

Определение лизофосфатидилхолина.

Исходный материал Lipoid S 100 и липидную эмульсию на всех стадиях приготовления образца контролировали на содержание (<u>лизоФХ</u>). Его содержание в пробах определяли с помощью жидкостной хроматографии высокого давления на хроматографе Beckman Altex 421 (колонка Altex Ulrasphere Si, 4.6×150 мм), с УФфотометрическим детектором LKB UVicord S2. Анализ проводили в изократических условия, в качестве подвижной фазы использовали система ацетонитрил : метанол : вода (216:72:12 по объему) при скорости потока 0,5мл/мин. Длина волны регистрации 206 нм. Для стандарта время задержки на колонке 4,06 мин., 10 мкг вещества соответствуют площади пика 457148 мкАВ×с.

<u>Методика определения</u>. Навеску стандарта или образца растворяли в дистиллированной воде для получения водной суспензии исследуемого материала (концентрация по фосфолипиду около 50 мг/мл). Полученную суспензию разводили в 100 раз метанолом. 10 мкл метанольного раствора пробы вводили на колонку высоко-эффективного жидкостного хроматографа. Соответствующий по времени выхода пик стандарта по площади (компьютерный анализ) сравнивали с соответствующим пиком образца.

11.3.2. Выбор условий лиофильной сушки и оптимизация процесса на пилотной установке

При разработке метода получения наноразмерных частиц для доставки лекарств в лабораторных условиях, флаконы с липидной эмульсией подвергали лиофильной сушке на пилотной установке производительностью 70 флаконов, объемом 20 см³, /цикл и рабочей поверхностью 0,2 кв.м.

Для определения точки эвтектики был проведен анализ зависимости электрического сопротивления коллоидного раствора фосфолипидных частиц от температуры при его разморозке (результаты одного из опытов представлены на рис. 12.1).

Получено, что температура точки эвтектики равна $T = (-21, 0 \pm 0.5)^{\circ}C$.



Рисунок 12.1 - Анализ зависимости сопротивления эмульсионного раствора фосфолипидных частиц от температуры при его разморозке. Температура пересечения касательных соответствует температуре в точке эвтектики - 21,5°C



Рисунок 12.2 - Схема получения лиофилизата фосфолипидной эмульсии.

Схема получения лиофилизата эмульсии наночастиц представлена на рис. 12.2. В лабораторном варианте стадия ультрафильтрации опущена, все операции проводились в чистом помещении класса С. Содержит две основные стадии: гомогенизацию и сублимационную сушку (лиофилизацию).

В отличие от промышленной технологии, опущена стадия стерилизации, розлив во флаконы не стерилен. Все работы проводились в чистом помещении

класса С

Были оптимизированы условия проведения сублимационной сушки на основании анализа термограмм сушки. Термограмма сушки полностью характеризует режим и дает исчерпывающую информацию о протекающих процессах. При этом основным регулируемым параметром является температура полки (на промышленной установке - температура теплоносителя, которая определяет температуру полки). Модификация условий сублимационной сушки – проведение процесса при максимально возможной температуре, позволило обеспечить высокое качество продукции.

11.3.3. Изучение криопротекторных свойств сахаров, выбор криопротектора и его концентрации

Наличие криопротектора оказывает существенное влияние на процесс лиофильной сушки. Функция криопротектора - защитить материал при замораживании и последующем удалении влаги в ходе высушивания. При замораживании криопротектор создает матрицу, размер пор которой в числе прочего зависит от типа криопротектора и его содержания в образце. Эти параметры будут влиять на температурные режимы высушивания и на скорость сушки в целом. Выбор криопротектора, изучение влияния его концентрации на время сушки и на качество получаемого продукта являются весьма существенными в общей технологии производства нанопрепарата.

В качестве критерия криопротекторного эффекта мы рассматривали сохранение размера фосфолипидных наночастиц после растворения лиофильно высушенного препарата.

Нами было проведено исследование: (1) по выявлению концентрационной зависимости криопротекторных свойств сахаров (мальтоза, трегалоза и лактоза) с целью определения минимальной концентрации сахаров, при которой их криопротекторный эффект сохранялся; (2) по сравнению криопротекторных свойств указанных сахаров, - на основании чего разработаны рекомендации по выбору оптимального криопротектора и его содержания при приготовлении исходной фосфолипидной эмульсии.

Исследование концентрационной зависимости криопротекторного эффекта мальтозы производили, анализируя распределение фосфолипидных частиц по

размерам в растворах до и после высушивания методом фотонной корреляционной спектроскопии на приборе Beckman N5. Анализ автокорреляционной функции (АКФ), получаемой с помощью этого прибора, позволяет не только получать информацию о среднем диаметре частиц и характере распределения (моно- или полидисперсность образца), а также в случае полидисперстности образца выделять фракции частиц различного диаметра.

За характеристический размер частиц в исследуемом образце принимали величину, получаемую при унимодальном анализе (индекс полидисперстности не более 0,3). На рис. 12.3 показано характерное распределение частиц (монодисперсный анализ) по размерам для коллоидного раствора фосфолипидных наночастиц, содержащего 50 мг/мл фосфатидилхолина, 60мг/мл лактозы.

Следует отметить, что согласно теории Релея, отношение интенсивностей рассеянного света для образцов, содержащих частицы разного размера в одинаковой концентрации, можно записать как: $\frac{Ip_1}{Ip_2} = \frac{v^{2_1}}{v^{2_2}} = \frac{d_1^{6_1}}{d_2^{6_2}}$.

Это означает, что вклад в рассеяние света частицами большого диаметра более существенен, чем частицами малого диаметра.



Рисунок 12.3 - Характерное распределение частиц по размерам (монодисперстный анализ). Угол рассеяния света 90°. Средний размер 49.1 нм (положение максимума кривой распределения). Индекс полидисперстности (ИП) 0,361

Анализ автокорреляционной функции с позиции полидисперстности образца (учет квадратичных членов при анализе АКФ) позволяет оценивать вклад частиц

разного диаметра в рассеяние и долю (процент) каждого пула частиц. Для АКФ, унимодальный анализ которой приведен на рис.4, анализ полидисперстности показывает, что основное количество частиц (99,91%) имеет размер ($27,3 \pm 3,5$) нм и только 0,09% имеют диаметр 90,3 нм. Согласно формуле Рэлея, вклад именно этих частиц сдвигает максимум кривой распределения по интенсивности рассеяния в сторону частиц с большим размером (до 49,1 нм). Эксперименты показали, что используемый способ гомогенизации приводит к получению коллоидного раствора, в котором основное количество частиц имеет размеры в диапазоне 20 – 35 нм. При низкой концентрации криопротектора наблюдается разрушение частиц в ходе замораживания с последующей агрегацией при растворении лиофильно высушенного препарата. Размер частиц варьирует в широких пределах: от 80 до 320 нм (графические данные не приведены).

Для эмульсии фосфолипидных наночастиц мы получили следующий результат (рис. 12.4, 12.5): Сопоставление данных рис. 12.4 и 12.5 свидетельствует о том, что наблюдается строгая корреляция между данными по изменению характеристического диаметра частиц и изменению величины светопропускания после лиофильной сушки для всех концентраций мальтозы. Оказалось, что минимальное содержание мальтозы в препарате, не сопровождаемое изменением размера частиц после регидратации, является 30 мг/мл.



Рисунок 12.4 - Диаметр фосфолипидных наночастиц до замораживания и после растворения лиофильно высушенного образца в зависимости от концентрации мальтозы. Концентрация фосфатидилхолина 50 мг/мл



Рисунок 12.5 - Светопропускание коллоидного раствора фосфолипидных частиц до замораживания и после растворения лиофильно высушенного образца в зависимости от концентрации мальтозы. Концентрация фосфатидилхолина - 50 мг/мл

Сравнение криопротекторных свойств сахаров, проведенное нами показало, что мальтоза, лактоза и тригалоза обладают сопоставимыми криопротекторными свойствами. Диапазон исследованных концентраций составил 10-60 мг/мл. Как и для мальтозы было получено, что восстановление размеров частиц после регидратации происходит при концентрации этих сахаров ≥ 30 мг/мл. Однако, учитывая, что мальтоза уже применяется в фармацевтической промышленности, в частности, при производстве инъекционной формы препарата «Фосфоглив», в дальнейшей работе было принято решение об использовании именно мальтозы В качестве криопротектора при производстве наноразмерных частиц для доставки лекарств.

11.3.4. Подбор условий стандартизации размера фосфолипидных мицелл в эмульсии перед высушиванием

Анализ литературы показал, что в лабораторной практике для усреднения размеров фосфолипидных липосом, как правило, применяют стандартизирующую фильтрацию через фильтры из различных материалов со средним диаметром пор 1 – 5 мкм. В связи с этим нами были предложены определенные условия стандартизующей фильтрации фосфолипидных наноэмульсий.

Метод стандартизующий фильтрации.

В образце фосфолипидной эмульсии, полученную методом гомогенизации и/или микрофлюидизации определяли размер фосфолипидных частиц и светопропускание при длине волны 660 нм. Полученные результаты представлены в табл. 12.3. Затем фосфолипидную эмульсию при помощи насоса со скоростью до 800 мл/мин подавали на фильтровальную установку, состоящую из стеклянного фильтра с размером пор 1 мкм., закрепленном на специальном фильтродержателе. После фильтрации отбирали образцы проб, в которых также определяли размер частиц и светопропускание. Полученные результаты представлены в табл. 12.4 и на рис.12.6.

1 и0лици 11	2.5 - 1 usmep	фосфолит	λοποιλ чисп	ιας ου φαлοπ	риции			
Угол	Диапазон	Распределение частиц по размерам						
расе- ивания	измерении, нм.	Размер, нм	% распреде ления	Стандартное отклонение, нм.	Средний размер, нм	Среднее стандартное отклонение, нм	Примеси, %	
90	2.0-3000	15.8 41.9 264.4 1079.7	54.14 28.67 7.88 9.30	1.8 10.2 44.0 111.2	350,45	266.0	0.000	

Таблица 12.3 - Размер фосфолипидных частиц до фильтрации

Таблица 12.4 - Размер фосфолипидных частиц после фильтрации

Угол	Диапа-		Распределение частиц по размерам				
рассеи-	зон изме- рений	Размер,	%	Стандарт-ное	Средний	Среднее	Примеси, %
вания		HM	содержа-	отклонение,	размер,	стандарт-	
			ние	HM	HM	ное откло-	
						нение, нм	
90	5-1000.0	17,8	100,0	7,1	17,8	7,1	0,000

Как показали эксперименты полученная фосфолипидная эмульсия методом гомогенизации или микрофлюидизации до фильтрации имеет неоднородное распределение частиц по размерам. В эмульсии присутствуют частицы как очень мелкого размера (15,8 нм – 54,14%), так и очень крупных размеров (1079,7 нм – 9,3%). Несмотря на то, что большую часть эмульсии составляют частицы размером от 15 до 50 нм (~82%) средний размер из-за присутствия крупных частиц составляет 350 нм. Присутствие крупных частиц в эмульсии способно вызывать резкие спонтанные агрегации фосфолипидных частиц.

После однократного фильтрования распределение частиц существенно изменяется.

Как видно из рис. 12.6, наибольшую часть эмульсии составляют фосфолипидные частицы размером 15-50 нм.

Фильтрация готовой эмульсии фосфолипидных наночастиц оказалась необходимой и для стерилизации препарата, так как известно, что любые препараты, содержащие фосфолипиды легко подвергаются окислению и разрушению при температурных воздействиях. Кроме того, температурная обработка приводит к резкой агрегации фосфолипидных частиц. Поэтому препараты, содержащие фосфолипиды, тем более фосфолипидные наноэмульсии нельзя стерилизовать высокотемпературной обработкой.



Рисунок 12.6 - Распределение фосфолипидных частиц по размерам в эмульсии после стандартизирующей фильтрации

Основываясь на предварительно проведенных экспериментах, были предложены условия стерилизующей фильтрации.

Метод стерилизующей фильтрации.

Фосфолипидную эмульсию после стандартизации при помощи перистальтического насоса подают на фильтровальную установку, состоящую из фильтродержателя с двумя мембранными фильтрами с размером пор 0,45 и 0,22 мкм. Размер частиц в эмульсии до стерилизующей фильтрации соответствует данным, представленным в табл. 12.3.

После проведения стерилизующей фильтрации также были отобраны образцы

эмульсии для определения размера частиц. Полученные данные представлены на рис. 12.7.

Из рис. 7 видно, что распределение частиц по размерам в образцах фосфолипидной эмульсии до фильтрации и после фильтрации не изменилось.

Так как условия стерилизующей и стандартизующей фильтрации совпадают, нами было предложено использовать этап фильтрации, совмещающий стандартизацию и стерилизацию фосфолипидной наноэмульсии.

Таким образом, проведенные исследования показали, что процесс, совмещающий стерилизующую и стандартизирующую фильтрации, не влияет на физико-химические характеристики полученной фосфолипидной наноэмульсии и позволяет получить стерильный и стандартизированный по размеру частиц препарат, который не содержит частицы размером более 50 нм.



Рисунок 12.7 - Распределение фосфолипидных частиц по размерам в эмульсии после стерилизующей фильтрации

11.4. Изучение физико-химических свойств фосфолипидных наночастиц

Были изучены физико-химические свойства фосфолипидных наночастиц, полученных в результате вышеописанных экспериментов и на основании разработанного протокола получения наноразмерных частиц для доставки лекарств.

Лиофильно высушенная эмульсия, представляет собой массу от белого до светло-желтого цвета. При добавлении к содержимому флакона (0,5 г фосфолипида Lipoid S-100 и 2 г мальтозы) 10 мл воды очищенной, лиофилизированная масса

растворяется в течение 3 минут с образованием опалесцирующего раствора светложелтого цвета, pH которого находится в пределах от 6,0 до 7,5.

Фосфолипидные наночастицы являются транспортной системой для различных гидрофобных и гидрофильных веществ. Основными показателями качества наночастиц являются следующие параметры:

- Прозрачность раствора;
- Размер частиц;
- Агрегационная устойчивость частиц и др.

11.4.1. Прозрачность раствора

Значение светопропускания коллоидного раствора, полученного растворением содержимого флакона в 10 мл воды очищенной, а также свежеприготовленной эмульсии при длине волны 660 нм находится в диапазоне от 60 до 85%. При этом толщина светопоглощающего слоя 10 мм. Определение светопропускания проводилось на спектрофотометре Agilent 8453 («Agilent Technologies», Германия) с использованием программы HP UV Visible ChemStation по следующей методике: кювета промывалась дистиллированной водой. В прибор устанавливалась кювета с дистиллированной водой, измерялось ее светопропускание, которое вносилось в программу как фон. Далее вносили в кювету 3 мл исследуемого раствора и определяли его светопропускание за вычетом фона. Проводили несколько замеров до установления сходящихся значений. Использовали среднее из сходящихся значение светопропускания.

11.4.2. Размер частиц

Размер частиц фосфолипидных мицелл был определен двумя методами:

- методом фотонной корреляционной спектроскопии;
- методом атомно-силовой зондовой микроскопии.

В данном разделе представлены результаты анализа первым методом. Метод ACM для измерения размера частиц будет применен на следующем этапе работ, разработанная для этих работ методика описана в разделе 14.

11.4.3. Определение размеров частиц методом фотонной корреляционной спектроскопии

Суть метода фотонной корреляционной спектроскопии заключается в

определении спектральных характеристик квазиупруго рассеянного изучаемой системой света по спектру флуктуации интенсивности регистрируемого излучения. Известно, что рассеяние света на частицах, совершающих броуновское движение, сопровождается увеличением ширины спектра исходного излучения — диффузионным уширением. Так как собственная ширина спектра лазерного излучения очень мала, ширина спектра рассеянного света пропорциональна коэффициенту трансляционной диффузии, связанному аналитически с размером рассеивающих частиц по формуле Эйнштейна - Стокса.

Размер фосфолипидных частиц определяли на приборе «Beckman N5 Submicron Particle Size Analyzer» («Beckman Coulter, Inc.», США). Автокорреляционную функцию светорассеяния получали, используя гелий-неоновый лазер (длина волны λ =632,8 нм) мощностью 25 мВт при угле рассеяния 90°.

Определение размеров частиц проводили по следующей методике:

1. Подготовка образца для исследований. Лиофильно высушенную «таблетку» растворяли в 10 мл воды для инъекций; из полученного раствора отбирали 1-2 мл шприцом, снабженным насадкой для фильтрации. Раствор фильтровали через мембранный фильтр Millipore с диаметром пор 450 нм. Профильтрованный раствор собирали в пробирку. Затем 20 мкл фильтрата (образца) переносили в кювету, содержащую 3 мл фильтрованной дистиллированной воды. Кювету закрывали крышкой и ее содержимое тщательно перемешивали.

2. Устанавливали кювету в прибор и проверяли интенсивность рассеяния света при угле рассеяния 90°. При высокой интенсивности проводили разбавление раствора.

3. Температура термостатирующей ячейки 25°С, время для уравновешивания температуры в кювете - 3 мин. Время снятия спектра задавалось автоматически прибором.

Характеристический диаметр фосфолипидных частиц получается при анализе автокорреляционной функции с позиции монодисперсности распределения.

На рис. 12.8 показано характерное распределение частиц (монодисперсный анализ) по размерам для коллоидного раствора фосфолипидных мицелл, содержащего 50 мг/мл фосфатидилхолина и 200 мг/мл мальтозы, после растворения лиофильно высушенного образца.

90.0°, Repetition 1 Unimodal Distribution



Рисунок 12.8 - Характерное распределение частиц по размерам (монодисперсный анализ)

Таким образом, характеристический диаметр мицелл 43,4 нм (положение максимума кривой распределения). Индекс полидисперсности (ИП) – отклонение от линейности автокорреляционной функции в полулогарифмических координатах – равняется 0,32. При значении индекса полидисперсности более 0,3 более корректно проводить анализ с позиции полидисперсного распределения.

Анализ автокорреляционной функции с позиции полидисперсности образца (в нашем случае ИП=0,32) дает вклад частиц разного диаметра в рассеяние и долю (процент) каждого пула частиц. На рис. 12.9 приведено распределение количества частиц по фракциям того же образца, что и на рис. 12.8. Характерно, что основное количество частиц (99,97%) имеет размер ($27,3 \pm 3,5$) нм и только 0,03% имеют диаметр 97,1 нм. Очевидно, что вклад именно этих частиц сдвигает максимум кривой распределения по интенсивности рассеяния в сторону частиц с большим размером (до 43,4 нм).

В свежеприготовленной эмульсии содержится более 99,9% частиц диаметром около 25 нм и менее 0,1% частиц с размером не более 100 нм.



Рисунок 12.9 - Анализ распределения по размерам с позиции полидисперстности образца

11.4.4. Агрегационная устойчивость частиц при хранении

Безусловным фактором, определяющим качество наночастиц, является стабильность фосфолипидных частиц в растворе.

На основании проведенных ранее исследований было показано существование корреляции между данными по изменению характеристического диаметра частиц и изменению величины светопропускания раствора фосфолипидных мицелл. Поэтому об агрегационной устойчивости частиц судили по изменению прозрачности раствора.

Была изучена стабильность приготовленного раствора мицелл при его хранении. Для этого измеряли светопропускание раствора фосфолипидных наночастиц при длине волны 660 нм непосредственно после гомогенизации и через 1, 4, 5, 6 и 7 суток хранения эмульсии при комнатной температуре в закрытом флаконе из темного стекла.



Рисунок 12.10 - Агрегация фосфолипидных мицелл при хранении эмульсии

Из представленного графика (рис. 12.10) видно, что при хранении фосфолипидной эмульсии при комнатной температуре агрегация частиц происходит только на 6 сутки.

Кроме того, была исследована стабильность частиц при хранении препарата в сухом виде в течение двух месяцев. Содержимое флаконов растворяли через определенные промежутки времени после лиофилизации в 10 мл воды очищенной, перемешивали, выдерживали 3 минуты и определяли светопропускание раствора. Результаты сравнивали со значением светопропускания исходной фосфолипидной эмульсии до ее разлива во флаконы и лиофилизации (нулевой момент времени). Полученные результаты представлены на рис. 12.11.



Рисунок 12.11 - Стабильность фосфолипидных частиц при хранении препарата в сухом виде в течение двух месяцев

Необходимо отметить, что, вызванное лиофилизацией уменьшение величины светопропускания коллоидного раствора фосфолипидных наночастиц на 15% вполне допустимо, так как в процессе лиофилизации происходит уплотнение фосфолипидных слоев. Причем этот эффект сохраняется и в течение определенного времени после регидратации. Процессы уплотнения неминуемо приведут к изменению показателя преломления, что в свою очередь отразиться на величине светопропускания.

Таким образом, при хранении препарата в сухом виде светопропускание раствора за два месяца уменьшилось на 0,4%, что составляет всего 0,6% от первоначального значения (Рис.12.11).

На основании изучения физико-химических свойств фосфолипидных частиц был разработан аналитический паспорт.

На основании полученных результатов в соответствии с Пунктом 12 ПГ и Техническим заданием был разработан «Протокол получения наноразмерных частиц для доставки лекарств», который представлен в виде отдельного документа в составе пакета отчетной документации (файл «Пункт_ПГ-1.12-Протокол_v1»).

12.Наработка наноразмерных частиц для доставки лекарств без загрузки активных компонентов

В рамках работ по Соглашению № 075-15-2021-933 от 28 сентября 2021 г. (Этап №1) изготовлена партия наноразмерных частиц для доставки лекарств без загрузки активных компонентов в количестве 10 (Десяти) флаконов темного стекла объемом 20 мл в соответствии с разработанным Протоколом получения наноразмерных частиц для доставки лекарств.

Акт наработки опытных образцов к отчету прилагается (Представлен в виде отдельного документа в составе отчетной документации, файл «Пункт_ПГ-1.13-Акт v1»).

Партия прошла контроль качества в соответствии с описанными в Протоколе критериями. Характеристики полученных наноразмерных частиц соответствуют пункту 6.1.17.2 Технического задания Соглашения. Аналитический паспорт прилагается (Приложение В).
13. Разработка методики АСМ-визуализации наноразмерных частиц для доставки лекарств

Активное развитие нанотехнологий в последние десятилетия, ориентированное на широкое и всестороннее изучение свойств наноразмерных объектов разной природы, а также возможность их применения в медицине, привело к формированию новых направлений – наномедицины и нанобиологии. Благодаря своим свойствам наночастицы находят применение как в фармакологической отрасли, так и в медицине для диагностических и терапевтических целей. Интеграция наноматериалов в биомедицину привела к разработке специальных диагностических средств (контрастных реагентов, аналитических инструментов) и наноразмерных средств доставки лекарств, позволяющих осуществить адресную доставку препаратов к мишени и повысить эффективность терапии по сравнению с существующими методами лечения.

Использование нанотехнологического подхода - метода сканирующей зондовой микроскопии, а именно атомно-силовой микроскопии (АСМ), является новаторским подходом в области разработки лекарств. Необходимость применения АСМ – метода, позволяющего визуализировать и определять морфологические свойств отдельных биообъектов, обусловлена следующими факторами. Во-первых, внедрение нанотехнологий в разработку лекарств требует введения соответствующих аналитических методов для контроля качества новых препаратов. Из-за крайне малых размеров (обычно меньше 100 нм), необходима разработка методов определения характеристик самих наночастиц в дополнение к обычным характеристикам лекарственных препаратов, включенных в транспортную систему. Так размер и форма наномедицинских препаратов являются важными факторами, которые влияют на их поведение в организме. Как правило, на сегодняшний день, для характеристики нанопрепаратов применяют методы, регистрирующие сигнал от ансамбля молекул, например метод лазерной корреляционной спектроскопии. Однако, подобные методы предоставляют сведения о характеристиках, усредненных по совокупности частиц, а в случае наноразмерных систем определение характеристики препарата как совокупности свойств индивидуальных частиц критически важно. Таким образом разработка и стандартизация аналитического метода на основе ACM для определения морфологии и размера наномедицинских

препаратов представляет интерес как с научной, так и с нормативной точки зрения.

Вторым фактором, определяющим перспективность внедрения ACM в разработку нанолекарств является возможность проведения измерений в нативных условиях. Этот фактор определяет возможность исследования особенностей изменения микро- и наноструктуры поверхности лекарственных форм в процессе выделения биоактивного компонента, а также визуализировать поверхность биообъекта, например поверхности клетки, при взаимодействии с лекарственным препаратом. Для внедрения ACM в систему разработки нанолекарств необходимо решить ряд научных и методических проблем. В том числе, для использования ACM в качестве метода характеристики наномедицинских препаратов в системе контроля качества, необходимо доказать надежность аналитического метода, для этого условия измерений размера и изображений наночастиц с использованием ACM, включая проверку воспроизводимости, зависящей от прибора и верификацию другими методами.

Контроль размера наночастиц лекарственных препаратов имеет важное значение, поскольку фармакокинетика наночастиц in vivo напрямую зависит от их размеров [269]. Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) является широко используемым и быстро развивающимся способом изучения наномеханических материалов и объектов [270] и может свойств стать основой нового метрологического подхода. В рамках выполнения работ по проекту разработана АСМ-визуализации наноразмерных частиц, позволяющая методика охарактеризовать объекты по их размерам (высотам) и жесткости. Полученные АСМ данные по высотам объектов сопоставимы с экспериментальными результатами, полученными методом фотонной корреляционной спектроскопии и электронной микроскопии, а также литературными источниками [270], что позволяет судить об эффективности выбранной методики.

Цель выполнения работ по пункту 1.14 Плана-графика Соглашения – разработка методики ACM-визуализации наноразмерных частиц, применимую для изучения физико-химических свойств наночастиц для доставки лекарств. Задачи:

1) произвести визуализацию объектов размером, нм – 100, не более;

- 2) определить высоту сорбированных частиц и их жесткость;
- 3) использовать стандарты для оценки результатов анализа;

 представить результаты определения высот объектов в виде графиков функции распределения для возможности сравнения с данными, полученными альтернативными методами.

В соответствии с планом-графиком отчетный период является начальным этапом, в котором была разработана методика ACM-визуализации наноразмерных частиц. На следующих этапах реализации проекта данная методика будет применяться для изучения физико-химических свойств наночастиц для доставки лекарств до и после включения активных компонентов

В качестве наноразмерных частиц для отработки методики были использованы сферы из полистирольного латекса, которые широко используются в качестве стандартных образцов для определения размера частиц. Основные преимущества использования стандартных частиц из полистирола - доступность, широкий диапазон диаметров, свойства сферичности, монодисперсность, однородность материала, возможность функционализации для специфических исследований. Широко используются в метрологических, экологических и биомедицинских [271]. Полистирольные исследованиях наноразмерные частицы являются репрезентативными примерами наночастиц, в том числе, фармацевтических, поскольку их размер (или гидродинамический диаметр) является хорошо известным эмпирическим параметром, регулирующим их распределение в органах и тканях [272]. На сегодняшний день для измерения размеров наночастиц используется несколько методов, однако, интерпретация результатов является сложной задачей из-за различных основополагающих метрологических концепций [273].

Двумя наиболее распространенными методами измерения размера наночастиц являются динамическое рассеяние света (ДРС) и электронная микроскопия (ЭМ) [274]. В ДРС средний гидродинамический диаметр наночастиц в водном растворе измеряется на основе интенсивности рассеянного света от частиц, которые считаются сферическими. Основными преимуществами ДРС являются его экспериментальная простота и применимость к наночастицам, взвешенным в водном растворе. Однако, возможно переоценивание средних диаметров в распределении частиц по размерам, поскольку интенсивность рассеянного света от сферической частицы пропорциональна шестой степени ее диаметра, в связи с чем интенсивность от более мелких частиц теряется в фоновом сигнале [275].

Электронная микроскопия также может служить дополнительным методом измерения размеров латексных частиц, поскольку данный метод используется для визуализации морфологии нанообъектов [276].

Атомно-силовая микроскопия является доступным методом для характеристики объектов с нанометровым разрешением. Изображения топографии атомарно ровной поверхности с адсорбироваными частицами формируются путем сканирования образца зондом [277]. АСМ уже продемонстрирован как эффективный способ определения физико-химических свойств наноразмерных полистирольных частиц [270]. В процессе составления методики было проведено сравнение размеров, полученных методом фотонной корреляционной спектроскопии (иначе метод динамического рассеяния света), АСМ, ЭМ, а также литературных данных [276].

Свойства поверхности образца измерялись с помощью режима PeakForce QNM[™] (Quantitative NanoMechanics) [278]. Эта технология позволяет рассчитывать силовые кривые воздействия зонда ACM – кантилевера, в каждой точке соприкосновения с образцом. Силовая кривая сохраняется для каждого пикселя ACM-изображения [279], которая подвергается анализу для вычисления модуля Юнга [280]. Таким образом, именно этот режим ACM был использован для оценки параметров жесткости наноразмерных частиц.

13.1. Материалы и методы

Для серии экспериментов по АСМ-визуализации наночастиц был приготовлен раствор с использованием деионизированной воды (удельное сопротивлением 18,2 МОм × см) полученной с помощью УФ-системы Simplicity (Millipore, Molsheim, Франция). Для качественной оценки полученных результатов анализа в качестве стандартов были использованы полистирольные латексные частицы (3000 Series Nanosphere[™] Size Standards, Thermo Scientific[™], номинальный размер – 40 нм). В качестве подложки для нековалетной сорбции наночастиц была выбрана поверхность слюды (толщина 0,15мм, размер 15х15 мм, TipsNano). Перед использованием слюда была разрезана пополам, скалывалась, для обеспечения атомарно ровного слоя и чистоты поверхности.

Определение размеров частиц методом электронной микроскопии проводилось с использованием растрового электронного микроскопа Hitachi S-5500. Съёмка велась в просвечивающем режиме STEM при напряжении 15 и 30 кВ.

Определение размеров частиц методом фотонной корреляционной спектроскопии определялся на приборе «Beckman N5 Submicron Particle Size Analyzer» («Beckman Coulter, Inc.», США). Автокорреляционную функцию светорассеяния получали, используя гелий-неоновый лазер (длина волны λ=632,8 нм) мощностью 25 мВт при угле рассеяния 90°, воспроизводимость не хуже 3%, область измерений 3-3000 нм.

Изображения наноразмерных частиц получены при помощи атомно-силового микроскопа Dimension со сканером Icon[™] (Bruker, США). Этот прибор входит в состав УНУ «Авогадро». Сканирование производили в полуконтактном режиме. Использовался укороченный держатель для кантилевера, измерения проводились на воздухе. Измерений параметров жесткости и получения силовых кривых проводились с использованием технологии PeakForce QNM[™]. Для измерения модуля Юнга были использованы кантилеверы ACSTA-SS (характерная жесткость 7 Н/м, радиус кривизны менее 5 нм), высота объектов измерялась кантилеверами RTESP (характерная жесткость 20 Н/м, радиус кривизны 8-12 нм). Сканирование проводили в заданной области, в каждом эксперименте было получено не менее 15 кадров, каждый эксперимент был проведен не менее 3 раз. Скорость сканирования 1 Гц, разрешение кадра 256х256 (для модуля Юнга) и 512х512 точек (для сравнения высот), область сканированного кадра 5×5 или 2х2мкм². Чувствительность к отклонению кремниевого зонда была откалибрована на стандартной чистой сапфировой пластине, затем было получено среднее значение для уменьшения случайной ошибки. Параметры жесткости кантилеверов были получены методом тепловой настройки [281]. На дальнейших этапах работы планируется проводить проверку состояния износа кантилеверов до и после использования с помощью сканирующего электронного микроскопа (Hitachi 5500).

Изображения регистрировали при помощи программного обеспечения NanoScope 9.4 (Bruker, США). Обработка АСМ изображений производилась с использованием стандартного программного обеспечения NanoScope Analysis 2.0 (Bruker, США). Анализ результатов проводился в программном обеспечении Recognite (совместная разработка ИБМХ и НИЯУ МИФИ), построение функции распределения и диаграмм проводилось в Microsoft Excel. В дальнейшем планируется использовать специально разработанное ПО для совмещения анализа

большого объема данных, полученных по высотам и модулю Юнга в одной программе (см раздел 5).

13.2. Определение высоты наночастиц методом АСМ

Первоначально был произведен подбор условий для нековалентной иммобилизации наноразмерных частиц. Растворы полистирольных наносфер в концентрации 1% перед использованием обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин, как указано в [282]. Затем наносферы разбавляли в сверхчистой воде и инкубировали слюдяную подложку в 1 мл полученного раствора в течение часа. Для удаления излишней влаги подложку оставляли на воздухе в течение 1-2 мин, далее проводилось сканирование образца.

Визуализированы частицы в монослое (рис.14.1 a, б), а также единично расположенные объекты, находящиеся предположительно в остатках буферных смесей исходного раствора (рис 14.2 a). На рисунке 14.1 представлены примеры изображений, полученных в канале Adhesion (рис. 1 a) и DMTModulus, по которому, в свою очередь определяются силовые кривые для количественного расчета модуля Юнга (рис. 14.1 б).

На рисунке 14.2 а представлен пример визуализации единичных латексных частиц и их профили поперечного сечения (рис 14.2 б). Линия поперечного сечения может быть проведена через любую часть изображения, на графике отображается вертикальный профиль вдоль этой линии. Создав несколько профилей через наночастицу, можно не только вычислить высоту частицы, но также определить, изолирована ли частица и находится ли она на плоской области (например, не на краю ступеньки). Наличие ступеньки в 1-2 нм показывает, что объекты действительно находятся в детергенте, таким образом исключая предположение об артефакте сканирования.



Рисунок 14.1 - Пример ACM изображений наноразмерных латексных частиц, расположенных в монослое. Канал адгезия (а), канал модуля Юнга (б).



Рисунок 14.2 - Результаты АСМ-измерения высот наночастиц, сорбированных на поверхности слюды: пример АСМ-изображения отдельно расположенных наноразмерных латексных частиц, сорбированных на поверхности свежесколотой слюды и профиль поперечного сечения (б) соответствующих линиях на изображении (а). Размер скана 5х5 мкм².

Визуализация в слое препятствует качественному расчету высот объектов, и, вследствие, построения функции распределения частиц. В связи с чем на данном этапе разработки методики было принято рассчитывать параметры высот по единичным объектам. Высоты наночастиц определялись как высоты соответствующих максимумов распределения $\rho(h)$ их изображений по размерам по соотношению:

$$p(h) = \frac{N_h}{N} * 100\%$$
 (1),

где Nh – это число визуализированных объектов с высотой h, a N – это общее число визуализированных объектов. Была построена функция распределения $\rho(h)$ (рис.14.3), максимальная высота которого соответствует 30 нм, ширина распределения показывает наличие частиц с размерами от 20 до 40 нм. Для статистически значимой оценки распределения частиц по размерам, было измерено примерно 200 <Np <400 наночастиц. Для измерения размеров латексных наночастиц анализировали максимальные высоты полученных АСМ изображений.



Рисунок 14.3 - Результаты ACM-измерения высот наночастиц, сорбированных на поверхности слюды: функция распределения визуализированных объектов наноразмерных латексных частиц по высотам $\rho(h)$.

Предполагая, что частицы имеют сферическую форму, высота должна быть идентична диаметру (или размеру) каждой частицы. Однако следует отметить, что деформация объектов, на значения высот могла повлиять вызванная взаимодействием кантилевера и наночастицы во время формирования АСМ изображения, что может привести к отображению меньших значений высот, чем у неповрежденных частиц [270]. Предполагалось, что полученная высота крупных частиц зависит от радиуса кривизны зонда. Сравнительные измерения зондами ACSTA-SS с радиусом кривизны менее 5 нм и RTESP (8-12 нм) показали, что максимальная высота различается в пределах 1-2 нм. Далее было сформировано

предположение, что частота развертки сканирования также может исказить полученные высоты в наименьшую сторону. Сравнительные измерения одного и того же образца в тех же самых точках сканирования с применением одного и того же кантилевера, но с разным разрешением кадров (256 и 512 точек соответственно) также не показали существенных различий в полученных результатах. Из чего был сделан вывод, что радиус кривизны зонда, частота развертки и шаг сканирования не искажают полученные данные высот объектов.

13.3. Определение размеров наночастиц методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)

Суть метода состоит в прямом наблюдении частиц латекса в электронном микроскопе. По микрофотографии проводится измерение площади поперечного сечения частиц, полученные данные пересчитываются в диаметр частицы в предположении, что частицы латекса имеют сферическую форму. По расчетным данным строится гистограмма распределения частиц по размерам.

На стандартную 3-мм электронно-микроскопическую сетку с углеродной плёнкой высаживалась капля раствора, содержащего латексные частицы. Анализу подвергался аналогичный раствор, как и в АСМ измерениях. Через 3 минуты выдержки капля удалялась промокательной бумагой. Адсорбированные на плёнку частицы подвергались анализу в ЭМ. Съёмка велась в просвечивающем режиме STEM. На Рис.14.4а представлена характерная микрофотография адсорбированных латексных частиц.



Рисунок 14.4 - Результаты определения размеров наночастиц с помощью СЭМ: примеры изображений латексных частиц на углеродной плёнке, полученные методом электронной микроскопии а) исходное изображение, б) после обработки в программном обеспечении ImageJ. Масштаб 1 мкм

СЭМ-изображения отдельных частиц были проанализированы с использованием программного обеспечения ImageJ [283]. Был применен порог для устранения фонового шума для каждого изображения и сбор распределения диаметров эквивалентной площади для не менее 500 частиц каждого размера в соответствии с ISO 13322-1 [284]. Пример обработки представлен на Рис.14.4 б. На следующем этапе производился подсчёт числа частиц и определение их площадей в той же программе ImageJ.

Для построения диаграммы распределения было взято 575 частиц. Дальнейшая обработка данных и построение диаграммы распределения частиц по размерам проводились в программе MS Excel (Puc.14.5).



Рисунок 14.5 - Результаты определения размеров наночастиц с помощью СЭМ: гистограмма распределения латексных частиц по размерам.

Для устранения вклада шумовых параметров и посторонних объектов (фрагменты детергента) при подсчете был установлен уровень отсечения 15 нм. Максимум соответствует размерам в интервале 35-45нм, полувысота распределения находится в диапазоне от 25 до 55 нм, что подтверждает наличие широкого распределения размеров частиц и сопоставимо с результатами АСМ измерений.

13.4. Определение размеров наночастиц методом фотонной корреляционной спектроскопии

Суть метода фотонной корреляционной спектроскопии заключается в определении спектральных характеристик квазиупругого рассеянного излучаемой системой света по спектру флуктуации интенсивности регистрируемого излучения. Известно, что рассеяние света на частицах, совершающих броуновское движение, сопровождается увеличением ширины спектра исходного излучения – диффузионным уширением. Так как собственная ширина спектра лазерного излучения очень мала, ширина спектра рассеянного света пропорциональна коэффициенту трансляционной диффузии, связанному аналитически с размером рассеивающих частиц по формуле Эйнштейна – Стокса:

 $D = kT3\pi\eta d_h (2),$

где *D* - коэффициент диффузии (основной параметр, полученный из измерений фотонной корреляционной спектроскопии), *k* - постоянная Больцмана, *T* - температура и *η* - вязкость растворителя.

Измерения фотонной корреляционной спектроскопии требуют большего количества частиц по сравнению с электронной и атомно-силовой микроскопией, и, таким образом, обеспечивают более широкую статистику [276]. Результат предоставляется в виде распределения коэффициентов диффузии, которые могут быть преобразованы в распределения гидродинамических диаметров d_h [285]. Предполагается, что для сферических частиц d_h будет идентичным или несколько выше значений, определенных с помощью атомно-силовой и электронной микроскопии.

Определение размеров частиц проводили по следующей методике:

1. Подготовка образца для исследований. Раствор помещали в кювету, закрывали крышкой и тщательно перемешивали.

2. Устанавливали кювету в прибор и проверяли интенсивность рассеяния света при угле рассеяния 90°. В случае высокой интенсивности проводили разбавление раствора.

3. Температура термостатирующей ячейки 22°С, время для уравновешивания температуры в кювете - 3 мин. Время снятия спектра задается прибором автоматически.

Был использован исходный 1% раствор наноразмерных частиц. Объем пробы соответствовал объему кюветы, что составляет 2 мл. Характеристический диаметр частиц формируется при анализе автокорреляционной функции с позиции монодисперстности распределения.

Результат проведения измерений показал наличие широкого распределения частиц размером от 20 до 50 нм (рис.14.6). Средний взвешенный по интенсивности диаметр составил 31 нм. Кроме того, в исследованиях авторов [286] средний размер высот наночастиц полистирола, полученный с помощью ACM, также сопоставим средневзвешенному диаметру, полученному с помощью DLS. Принимая во внимание погрешности, которые возникают при проведении измерений различными методиками, можем сделать вывод о сопоставимости наших результатов, полученных тремя вышеописанными методами.



Рисунок 14.6 - Результаты определения размеров наночастиц с помощью фотонной корреляционной спектроскопии: распределение (гидродинамического) диаметра d_h наночастиц. Приведены результаты трех технических повторов измерений.

13.5. Определение параметров жесткости наноразмерных латексных частиц с помощью ACM

Механические свойства полимерных наносфер вызывают большой интерес изза их широкого применения в фармакологии [287]. Жесткость и упругость сферической системы доставки лекарств могут повлиять на нацеливание и биораспределение в специфических клетках-мишенях [288]. Полимерные

наносферы ведут себя по-разному в наномасштабе и в макроуровне [289], в связи с чем важно проводить количественную оценку новых синтезированных систем.

Были проведены ACM измерения на приборе Dimension Icon с применением технологии Peak Force QNM. Поскольку данный режим не вызывает резонанса с кантилевером, настройка резонансной частоты не производится. Это является большим преимуществом метода, в особенности для проведений измерений в жидкостных средах, так как не вызывает дополнительных колебаний, отражающихся на качестве полученных результатов. Производится контактная и тепловая калибровка кантилевера, благодаря которой формируются количественные показатели жесткости, адгезии и деформации объектов исследования.

Подготовка образца производится аналогично, как и для ACM-измерений высот. Производится детектирование объектов в масштабе 10x10 либо 5x5 мкм²., далее сканируется интересующая область. Силовые кривые записываются в каждой точке взаимодействия кантилевера и образца. Модуль Юнга *E** вычисляется путем подбора кривой с использованием модели Дерягина, Мюллера, Торопова (ДМТ):

$$F_{\rm tip} = \frac{4}{3} \,{\rm E}^* \,\sqrt{Rd^3} + F_{adh}$$
 (3),

где *F*_{tip} - сила, действующая на кантилевер, *F*_{adh} - сила адгезии, *R* - радиус кривизны, а *d* - расстояние между образцом и кантилевером [290]. Пример изображения обработанной силовой кривой представлен на рис. 14.7.



Рисунок 14.7 - Определение жесткости наночастиц с помощью ACM: пример силовой кривой, полученной в точке взаимодействия кантилевера с образцом. Синяя линия – кривая подвода, зеленая линия - математически вычисленное значение модуля Юнга в заданной точке.

Были проанализированы три типа данных, полученных от объектов с различной локализацией: единичные объекты, объекты, расположенные в монослое и в островках детергента (предположительно солей исходного раствора) (таблица 14.1). Средние значения модуля Юнга были вычислены методом обработки силовых кривых в ручном режиме, со всего участка изображения соответствующей наночастицы. Было проанализировано не менее 10 силовых кривых в каждом заданном участке. Для обработки силовых кривых использовалось стандартное программное обеспечение NanoScope Analysis.

Таблица 14.1 - Значения модуля Юнга, полученные по АСМ-данным (режим сканирования) Peak Force QNM

Локализация наночастицы	Среднее значение
	модуля Юнга
Отдельно лежащие, единичные, без детергента	656,45±297 MPa
В слое наночастиц	1025,6±922,4 MPa
Отдельно лежащие в детергенте	561,65±337 MPa
Слюда без частиц	12948,4±4084,2 MPa

Полученные результаты показывают, что значения модуля Юнга латексных наночастиц, вне зависимости от их локализации, сохраняются в диапазоне 1 GPa. Значение наночастиц расположенных в слое в два раза превышают значения единичных наночастиц. Наличие детергента вокруг частицы создает незначительный вклад и, на данном этапе работ, составляет примерно 100MPa. В связи с чем можно сформировать предположение, что на уровень жесткости объектов оказывает влияние не только сама подложка, но и остаточные частицы исходного раствора.

Авторами [291] было обнаружена зависимость значений модуля упругости полистирольных наносфер и их размеров. Кроме того, в соответствии с данными [292] модуль упругости достигает максимальных значений и является нестабильным при применении оператором небольших сил воздействия на образец. В связи с чем в дальнейших этапах работы нужно провести дополнительные измерения для изучения влияния малых сил на используемые нами объекты, а также статистический анализ с помощью специально разработанного ПО для установления корреляции высот и значений жесткости наночастиц.

13.6. Заключение

В отчетный период, в рамках разработки методики АСМ-визуализации наноразмерных частиц для доставки лекарств было проведено сравнение

результатов измерений с применением трех методов, используемых для определения размера наночастиц - электронной микроскопии, фотонной корреляционной спектроскопии и ACM. Электронная микроскопия дает информацию не только о размерах и распределении по размерам частиц, а также об их форме и морфологии. ЭМ показала, что частицы представляют собой практически идеальные сферы с максимальным средним диаметром приблизительно 40 нм. Одним из недостатков метода является риск изменения свойств частиц во время сушки и контрастирования образца.

Основными преимуществами метода фотонной корреляционной спектроскопии являются доступность и короткое время, необходимое для измерений. Результатом измерений выполнения является распределение коэффициентов диффузии D, которое затем обычно преобразуется в распределение гидродинамических диаметров dh. В случае сферических частиц dh будет идентичным или несколько большим, чем номинальный диаметр частицы. Однако для применения метода необходимо достаточно большое количество образца.

Сравнение методов показало, что распределения по размерам не всегда является симметричным и небольшой процент частиц имеет диаметр вне предполагаемого диапазона. Полученные результаты помогут правильно использовать ACM в качестве мощного инструмента для получения изображений и измерения размеров лекарственных препаратов на основе нанотехнологий для клинического использования.

По результатам работ можно сделать следующие выводы:

1) Подобран протокол нековалентной сорбции объектов на поверхности. Объекты визуализированы в двух состояниях – слое и единичными объектами. Для обработки частиц в слое требуется провести дополнительный анализ специально разработанным ПО.

2) Разработана методика АСМ-визуализации наноразмерных частиц, применимая для изучения физико-химических свойств наночастиц для доставки лекарств. Методика обеспечивает возможность определения характеристик частиц размером до 100нм. Объекты охарактеризованы по высоте сорбированных объектов и их жесткости.

3) Для оценки результатов анализа использовали стандарты – латексные

наночастицы с известными размерами объектов.

4) Использованы дополнительные методики в виде электронной микроскопии и фотонно-коррелиационной спектроскопии. Полученные результаты сопоставимы с результатами АСМ и подтверждают наличие широкого спектра частиц размерами от 20 до 50 нм.

5) Определены значения модуля Юнга как латексных частиц разной локализации, так и подложки. Для дальнейшей разработки методики и ее применения на наноразмерных частицах для доставки лекарств требуется дополнить теоретическую модель расчетов и провести дополнительные измерения.

6) Представлены результаты определения высоты объектов в виде графиков функции распределения визуализированных объектов по высотам ρ(h) и в виде таблицы в случае определения жесткости наночастиц.

Разработанная в соответствии с пунктом 1.14 ПГ и Техническим задание Солглашения Методика АСМ-визуализации наноразмерных частиц для доставки лекарств представлена отдельным документом в составе пакета отчетной документации (файл «Пункт_ПГ-1.14-Методика_v1»).

14.Разработка плана исследования по оценке безопасности и эффективности наноразмерных частиц для доставки лекарств

Вещества в наноформе могут обладать иным токсическим действием, чем в обычном физико-химическом состоянии. В этой связи характеристика потенциального риска для здоровья человека фармакологических веществ, содержащих наночастицы, является обязательной.

Вещества, поступающие на тестирование, должны быть стандартизованы, воспроизводимы и получены по отработанной технологии.

Стандартизацию и воспроизводимость получения наноразмерных частиц для доставки лекарств на основе фосфолипидов характеризуют определенными показателями качества, такими как размер наночастиц, прозрачность наноэмульсии (светопропускание) и стабильность при хранении.

14.1. Изучение безопасности

14.1.1. Нормативный материал

Экспериментальная оценка общетоксического действия фармакологических веществ, содержащих наночастицы, базируется на общих принципах доклинической лабораторной практики в соответствии с приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н.

Основными документами, регламентирующими объем, схему и процедуру проведения экспериментов по исследованию безопасности фармакологических веществ, полученных на основе нанотехнологии, являются:

1. Федеральный Закон № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

2. Федеральный Закон № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

3. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 224 от 19.07.2007 г. «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок».

4. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 23 июля 2007 года № 54 «О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащей наноматериалы».

5. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской

Федерации от 31 октября 2007 года № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов».

6. Методические рекомендации (МР) 1.2.2566-09. Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*: Методические рекомендации. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 69 с.

 МР 1.2.2522-09. Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека. Методические рекомендации. — М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 35 с.

 MP 1.2.2639-10. Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии. – М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. — 79 с.

9. Методические указания (МУ) 1.2.2965-11. 1.2. Гигиена, токсикология, санитария. Порядок медико-биологической оценки действия наноматериалов на лабораторных животных по морфологическим признакам и метаболическим параметрам..– М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.

10. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. –М.: Гриф и к, 2012.-944. С.

По мере накопления новых сведений, раскрывающих особенности тестирования токсичности наночастиц, несомненна необходимость гармонизации с международными стандартами International Organization for Standardization — ISO, группой международной Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) и научным комитетом — The Scientific Committee on Emerging and Newly Identifi ed Health Risks (SCENIHR).

14.2. Условия проведения исследований

Работа с фармакологическими веществами, имеющими в своем составе наночастицы, должна проводиться высококвалифицированными специалистами в вытяжных шкафах, оборудованных ULPA фильтрами. Условия проведения работы должны соответствовать требованиям, указанным в Приказе Роспотребнадзора от

19.07.2007 г. № 224 «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок».

14.2.1. Общие положения

Токсикологические исследования обязательны для всех нанопрепаратов, независимо от того, оригинальное или известное фармакологическое вещество или какой-то иной материал использованы в их составе.

Если лекарственный нанопрепарат содержит наночастицы и/или вспомогательные вещества (стабилизаторы, растворители и т. п.), не разрешенные для применения в медицинской практике, то каждое из них подвергают отдельному комбинации токсикологическому исследованию. При нескольких фармакологических веществ в одной лекарственной форме (фиксированная комбинация) изучают токсичность комбинации в целом и каждого ингредиента в отдельности, если он не был ранее разрешен для применения в медицинской практике.

14.2.2. Сведения о лекарственном нанопрепарате

Для проведения токсикологического изучения необходимо иметь характеристику основных и вспомогательных веществ, использованных при ее получении (наночастицы, растворители, наполнители, стабилизаторы и др.).

Следует иметь данные о способе приготовления раствора для введения, растворимости, гидрофобности или липофильности фармакологического вещества, наночастиц, а также данные о химическом составе, адгезивности, размере, форме, поверхностных характеристиках (заряд), химической реактивности наночастиц, их биодеградации и порядка их организации в ЛП. Желательно иметь данные об изменении свойств наночастиц под действием температуры, магнитного поля, облучения и при попадании в биологические жидкости.

14.2.3. Количественная и качественная оценка наночастиц в лекарственном препарате

Гигиеническое нормирование содержания искусственных наночастиц в ЛП требует наличия методов, выявления, идентификации и количественного определения наночастиц. В числе методов, существующих в настоящее время,

наиболее разработанным и надежным применительно к идентификации и выявлению искусственных наночастиц является электронная микроскопия. Она позволяет определять число, размер, форму, кристаллическую структуру, химический состав электроноплотных веществ в диапазоне размеров 1–100 нм.

Токсические свойства наночастиц зависят от их размеров и структурной организации. Чем меньше размер наночастицы, тем больше вероятность индукции воспаления, активации синтеза цитокинов, усиления цитотоксичности. Образование конгломератов наночастиц приводит к изменению физико-химических свойств препарата.

14.3. Оценка «острой» токсичности нанопрепаратов

Исследуется «острая» токсичность как самого фармакологического вещества, содержащего наночастицы, так и его составляющих по отдельности: наночастиц, активного вещества и других компонентов лекарственной формы, если они не были ранее разрешены к использованию в составе ЛС.

Результаты исследований показывают, что проявление токсических свойств наночастиц в значительной мере зависит от пути их поступления в организм. Это означает, что суждение об острой токсичности нанопрепаратов может базироваться исключительно на результатах, полученных в исследованиях, обеспечивающих тот путь введения, который будет использоваться в клинике.

Общая продолжительность наблюдения за животными при исследовании острой токсичности нанопрепаратов должна составлять не менее 30 дней после последнего случая гибели животного. В первый день после введения животные должны находиться под непрерывным наблюдением.

Остальные параметры и процедуры оценки острой токсичности, а также рекомендуемая форма представления результатов не отличаются от типичных, описанных в базовом документе «Методические рекомендации по изучению общетоксического действия ЛС» [293].

14.4. Оценка токсичности нанопрепаратов в хроническом эксперименте

В экспериментах по изучению хронической токсичности используют три дозы нанопрепарата. Дозы рассчитываются по количеству действующего вещества в составе лекарственной формы. Путь введения аналогичен клиническому; если

рекомендуется несколько путей введения, то следует провести оценку при введении нанопрепарата всеми используемыми способами.

Введение максимальной дозы предполагает выявление возможных токсических эффектов и гибель части животных. Эта доза может быть определена из данных по острой токсичности. Минимальная доза должна быть близка к терапевтической дозе, рекомендуемой для клинического изучения. Третья доза является промежуточной.

Основные изучаемые группы:

1. Контроль.

2. Группа животных, получающая нанопрепарат в минимальной дозе,

3. Группа животных, получающая нанопрепарат в максимальной дозе

4. Группа животных, получающая нанопрепарат в дозе промежуточной между минимальной и максимальной дозами.

К отчету прилагаются: таблица 15.1 индивидуальных показателей и результаты их статистической обработки по всем изученным тестам, индивидуальное описание гистологических изменений органов и тканей лабораторных животных.

Рекомендуемые исследования	Минимально достаточные тесты и показатели
Интегральные показатели	Внешний вид, поведение, симптомы интоксикации, масса тела
	(еженедельно), суточное потребление корма и воды (еженедельно)
Гематологические исследования	Содержание в периферической крови эритроцитов, тромбоцитов,
	ретикулоцитов, леикоцитов, леикоцитарная формула, гемоглобин,
	гематокрит, показатели, характеризующие систему свертывания крови
Биохимические исследования	В сыворотке крови: общий белок, билирубин, белковые фракции,
	общий холестерин, общие липиды, глюкоза, триглицериды,
	электролиты, активность основных ферментов, имеющих
	диагностическое значение (ЩФ, АЛТ, АСТ, ЛДГ и др.)
	В моче: концентрация мочевины, креатинина, глюкозы, белка
Физиологические	Частота сердечных сокращений, параметры ЭКГ во втором
исследования	отведении
	Ритм и глубина дыхания
	Диурез, рН, относительная плотность мочи, белок, глюкоза,
	уробилиноген, билирубин, кетоны, кровь (эритроциты, лейкоциты,
	гемоглобин), эпителиальные клетки, цилиндры, соли, бактерии
Патоморфологиче-	Вскрытие, макроскопическое описание состояния органов и
ские исследования	тканей, места введения, определение относительной массы
	органов, гистологические исследования головного мозга, сердца,
	печени, почек, легких, селезенки, тимуса, надпочечников,
	желудка, кишечника, мочевого пузыря, поджелудочной железы,
	щитовидной железы, лимфоузлов, костного мозга, семенников,
	яичников и матки, места введения препарата

Таблица 15.1- Перечень рекомендуемых тестов для определения токсичности средств, содержащих наночастицы

Особенностью лекарственных нанопрепаратов могут явиться изменения функционального состояния центральной нервной системы (ЦНС) и почек как возможных основных мишеней токсического действия нанопрепаратов.

Способность некоторых наночастиц взаимодействовать с ДНК определяет возможное проявление лекарственным нанопрепаратом генотоксических и мутагенных свойств. В связи с этим необходимо провести изучение мутагенной активности наноразмерных частиц для доставки лекарств, например, с использованием метода учета цитогенетических повреждений в клетках костного мозга млекопитающих.

Для изучения генотоксических свойств нанопрепаратов можно воспользоваться механизмом взаимодействия с дсДНК фосфолипидной композиции как модели для фармакогеномного анализа электрохимическими методами.

Несмотря на разработанность методов получения систем транспорта и лекарственных препаратов на их основе, остается неисследованным направление, связанное с особенностями взаимодействия подобных форм лекарственных препаратов с молекулярными мишенями, такими, как ДНК.

ДНК является фармакологической мишенью многих лекарственных препаратов, активно применяемых в клинической практике. В отличие от спектральных методов анализа взаимодействия ДНК с лекарственными средствами, электроанализ ДНК как мишени действия лекарственных средств позволяет зарегистрировать и выявить взаимодействия пуриновых гетероциклических оснований гуанина и аденина, что дает более полную информацию о природе и механизме биоаффинных взаимодействий. Изменение интенсивности сигналов электроокисления гуанина и аденина и смещение потенциала в анодную (положительную) область потенциалов или катодную (отрицательную) область является характеристикой процесса взаимодействия, и позволяет проводить многопараметрический электроанализ биоаффинных взаимодействий. Смещение потенциала электроокисления в положительную область свидетельствует о гидрофобных взаимодействиях ДНК/лиганд, смещение в отрицательную область – об электростатических взаимодействиях с большой или малой бороздкой двойной спирали ДНК [294 – 297].

Для исследования механизмов взаимодействия лекарств и их транспортных

наносистем на основе растительных фосфолипидов с мишенями существуют электрохимические методы регистрации ДНК-лигандных взаимодействий. Для этого разработаны новые модификаторы рабочей поверхности электродов на основе дисперсий углеродных нанотрубок, стабилизированных карбоксиметилцеллюлозой (ПГЭ/УНТ) с целью прямой высокочувствительной регистрации отклика мишени (ДНК или фермента) и/или лекарственного средства в соответствующей форме (субстанция или фосфолипидная нанокомпозиция). Применение взаимозаменяемых планарных электродов с минимальным диаметром рабочего электрода позволяет миниатюризировать и стандартизировать процесс исследования биоаффинных взаимодействий.

План исследования по оценке безопасности и эффективности наноразмерных частиц для доставки лекарств представлен в Приложении Г.

15. Разработка СОП обработки первичных мультиомных данных

Для выполнения задачи проекта - обработки данных мультиомного профилирования выполнена разработка СОПов, предназначенных для обработки первичных мультиомных данных - транскриптомных, протеомных и метаболомных.

В процессе работы операторами технологического процесса проводились исследования различных биоинформатических ПО и подбор выполнимых и понятных пользователям СОП команд.

В результате исследования впервые были созданы три СОП обработки транскриптомных, протеомных и метаболомных данных соответственно. Документы представлены в составе отчетной документации по этапу проекта.

15.1. Геномные и транскриптомные данные

15.1.1. Принцип испытания программ для картирования прочтений

Для испытания инструментов картирования прочтений на геном И транскриптом применяются симулированные данные секвенирования нового Illumina ONT, поколения (платформы И соответствующие ссылки на технологические платформы и методические подходы представлены в (документы: Пункт ПГ-1.16-СОП Illumina v1; Пункт ПГ-1.16-СОП ONT v1), принцип использования симулирования данных приведен на рисунке 16.1 Симулированные данные представляют собой искусственные данные секвенирования, имитирующие данные в формате fastq. Искусственные реальные данные генерируются учитывающими специальными программами, закономерности работы соответствующий реальных приборов, выполняющих секвенирование. Для симуляции данных платформы Illumina использовался программный пакет RSEM, для ONT – tarnsNanoSim. Смысл симуляции данных секвенирования нового поколения заключается в том, что этот процесс является полностью программным, соответственно, имеется возможность отслеживать и контролировать все параметры данного процесса.

Задав на этапе симуляции определённые параметры, далее можно обработать симулированные данные исследуемым инструментом, после чего, сопоставив найденные и заданные значения, сделать вывод о точности обработки данных.

В случае испытания инструментов картирования прочтений отслеживаемым параметром является количество прочтений на ген/транскрипт. Данный параметр

задаётся на этапе симуляции профилем экспрессии (файл, в котором записано число прочтений на каждый ген/транскрипт), далее симулированные данные в формате fastq обрабатываются программой, выполняющей картирование прочтений на геном/транскриптом, после чего считается количество прочтений, картированных на каждый ген/транскрипт и сопоставляется с заданным на этапе симуляции профилем экспрессии, при идеальной работе алгоритма картирования эти множества будут полностью совпадать.



Рисунок 16.1 - Использование симулированных данных

Степень совпадения данных множеств оценивается рядом метрик:

- 1. Корреляция между заданными и найденными значениями.
- 2. Корреляция между заданными и найденными значениями после удаления генов/транскриптов, имеющих нулевые значения в обоих множествах.
- 3. Количество утерянных прочтений (разность между количеством прочтений в fastq файле и количеством картированных прочтений).
- 4. Количество прочтений, картированных не на свои гены/транскрипты.
- 5. Фракция генов/транскриптов, для которых все прочтения были утеряны.
- 6. Фракция генов/транскриптов, на которые были ложно картированы прочтения.
- Фракция генов/транскриптов, на которые прочтения были картированы с минимальной ошибкой.

Для определения метрики №7 считается нормализованная ошибка:

$$E_i = \frac{Diff_i}{S_i + C_i} = \frac{S_i - C_i}{S_i + C_i}$$

Где E_i – нормализованная ошибка для i-го гена/транскрипта,

S_i – количество прочтений для i-го гена/транскрипта, заданное в профиле экспрессии C_i – количество прочтений, картированных на i-й ген/транскрипт,

Diff_i – абсолютная ошибка для i-го гена/транскрипта.

Множество нормализованных ошибок Е визуализируется в виде гистограммы для наглядности.

15.1.2. Принцип оценки точности инструментов поиска мутаций

Поиск мутаций – более точно, вызов вариантов (от англ. variant calling). Вариантами называются все отличия исследуемого генома от генома, который взят в качестве референсного. Мутациями, как правило, называют варианты, редко встречающиеся в популяции и имеющие большое влияние на фенотип. В общем, принцип оценки точности вызова вариантов имеет некое сходство с принципом испытания инструментов картирования прочтений на гены/транскрипты. В случае оценки точности вызова вариантов используются реальные данные секвенирования образцов, варианты для которых хорошо известны. Для проведения сравнения были загружены данные секвенирования РНК образца NA12878, полученные на платформах Illumina и ONT. После обработки данных секвенирования найденные варианты сопоставляются с известными вариантами для данного образца после чего делается вывод о точности обработки данных по 3-м метрикам:

1. Количество верно обнаруженных вариантов.

2. Количество ложноположительных вариантов, т.е. ошибки секвенирования.

3. Количество необнаруженных вариантов (абсолютное значение данной метрики для вызова вариантов из данных секвенирования РНК не имеет особого значения, так как в таком случае возможно найти только те варианты, которые были в экспрессирующихся генах, однако эта метрика может использоваться для сравнения методов).

15.1.3. Общие принципы проведения тестирования

Тестирование проводится на машинах Amazon Web Services, модель процессора: Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2686 v4 @ 2.30GHz, измерение времени выполнения процесса и пиковое потребление оперативной памяти фиксируется консольной утилитой time. В ходе выполнения программы использование ресурсов машины отслеживается с использованием утилиты htop.

На основании результатов тестирования программного обеспечения

(Приложение Д, 1.16.1-II) были выбраны оптимальные инструменты обработки данных.

15.1.4. Обработка данных, полученных с помощью платформы Illumina

Для картирования коротких прочтений на геном между HiSat2 и STAR стоит отдать предпочтение HiSat2, так как результаты STAR и HiSat2 крайне близки (Рисунок 16.2), обе программы дают хороший результат, однако HiSat2 использует значительно меньшее количество оперативной памяти (4,9 Гб против 31,5 Гб), что делает его более удобным и доступным к применению на большем спектре устройств (при использовании HiSat2 протокол обработки данных Illumina может быть выполнен на персональном компьютере или ноутбуке, имеющем не менее 8-ми Гб оперативной памяти).

HiSat2



STAR

Рисунок 16.2 - Сравнение точности картирования коротких прочтений на геном программами HiSat2 (слева) и STAR (справа)

Для квантификации коротких прочтений стоит использовать Salmon (Рисунок 16.3), так как это единственный инструмент, показавший удовлетворительный результат по точности квантификации.

Для поиска мутаций стоит использовать beftools, так как данный инструмент даёт максимальную точность как для SNP так для Indel по сравнению с остальными протестированными инструментами. К недостаткам данного инструмента можно отнести длительное время работы (несколько часов) и отсутствие увеличения скорости работы при использовании нескольких потоков, несмотря на наличие флага —threads (при любом значении данного флага задействуется лишь один поток).

Для аннотации мутаций используется SnpEff, как общепринятый стандарт.



Рисунок 16.3 - Сравнение точности квантификации коротких прочтений при использовании Salmon (слева) и HiSat2 (справа).

Таблица 16.1 - Сравнение точности и эффективности обнаружения мутаций разными программами для транскриптомных данных, полученных на платформе Illumina

	Кол-во	Кол-во		Кол-во	Кол-во	
	правильных	ложноположительных	Точность	правильных	ложноположительных	Точность
Инструмент	SNP	SNP	для SNP	Indel	Indel	для Indel
GATK	19767	15828	0,555	1305	6598	0,165
Strelka	15946	11614	0,579	739	770	0,49
Bcftools	36571	48156	0,432	1097	1883	0,368

Таблица 16.2. Сравнение различных программ по максимальной точности, достигаемой при фильтрации обнаруженных вариантов по качеству (показатель QUAL) для транскриптомных данных, полученных на платформе Illumina.

Инструмент	Кол-во	верных	Точность для SNP	Кол-во	верных	Точность для Indel
	SNP			Indel		
GATK	11402		0,66	796		0,23
Strelka	9460		0,77	497		0,64
Bcftools	10251		0,78	325		0,79

15.1.5. Обработка данных, полученных с помощью платформы ONT

Для картирования длинных прочтений на геном стоит использовать Minimap2 (Рисунок 16.4), так как данный инструмент требует гораздо меньше ресурсов, чем программы, решающие ту же задачу, притом картирование прочтений происходит с хорошей точностью.

Для квантификации стоит использовать Subread featureCounts, так как картирование прочтений на транскриптом, как и в случае с короткими прочтениями, даёт неудовлетворительный результат (Рисунок 16.5 (а)). Salmon quant так же даёт неудовлетворительный результат при подсчёте длинных шумных прочтений (Рисунок 16.5 (в)).



Рисунок 16.4 - Точность картирования длинных прочтений с помощью Minimap2



Рисунок 16.5 - Точность квантификации при а) картировании прочтений на транскриптом, б) картировании прочтений на геном, в) использовании Salmon.

Единственным вариантом провести транскриптомный анализ в случае длинных шумных прочтений является их картирование на геном при помощи minimap2 с последующим подсчётом программой featureCounts (Рисунок 16.5 (б)). Данная программа позволяет посчитать количество прочтений для каждого экзона в геноме, что даёт возможность получить определённую информацию об изоформах транскриптов в образце.

Для поиска мутаций следует использовать bcftools, так как, как и в случае с Illimina, bcftools даёт наилучший результат с точки зрения количества найденных вариантов и точности их обнаружения.

Таблица 16.3 - Сравнение точности и эффективности обнаружения SNP разными программами для данных прямого секвенирования РНК (ONT)*.

	TT		1			т	
	инструм		Кол-во правильных	Кол-во		I очность	для
ент		SNP		ложноположительных SNP	SNP		
	GATK		73	46		0,613	
	Clair3		15926	277528		0,054	
	Bcftools		11986	16821		0,416	

*Данные по обнаружению Indel не приведены, так как для всех инструментов точность обнаружения близка к нулю.

Мутации, обнаруженные программами GATK и Clair3, не поддаются фильтрации по качеству (см. Приложение Д, 1.16.1-І. Результаты тестирования инструментов). Мутации, обнаруженные программой Bcftools, поддаются фильтрации по качеству: максимальная точность составляет 0,646, при этом количество верных SNP составляет 2525.

Для аннотации мутаций используется SnpEff, как общепринятый стандарт.

15.1.6. Используемые в тестировании материалы и программы

(i) Общие материалы

Материалы были получены с сайта gencode.org [298].

1. Геном человека GRCh38.p13.genome с сайта gencodegenes.org

https://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/gencode/Gencode_human/release_38/GRCh38.p13.gen ome.fa.gz

2. Транскриптом человека с сайта gencodegenes.org 38 версии

https://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/gencode/Gencode_human/release_38/gencode.v38.trans cripts.fa.gz

3. Аннотация генома человека gencode.v38.annotation.gff3

https://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/gencode/Gencode_human/release_38/gencode.v3 8.annotation.gff3.gz 4. Расширенная аннотация генома человека для построения индекса STAR:

https://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/gencode/Gencode_human/release_38/gencode.v3 8.chr_patch_hapl_scaff.annotation.gtf.gz

(ii) Использованные программы

Тестовые данные для платформы ONT и Illumina были сгенерированы программами NanoSim [299] и RSEM [300] соответственно. Файл геномного выравнивания предварительно был конвертирован из .sam формата в .bam формат и сортирован с использованием samtools. Подсчёт прочтений после выравнивания на геном для Illumina производился с использованием инструмента htseq [301] - см. листинг i.1 на рисунке 16.6. Подсчёт прочтений после геномного выравнивания для ONT производился с использованием Subread featureCounts [302], см. листинг i.2 на рисунке 16.6.

Подсчёт прочтений после транскриптомного выравнивания производился программой Salmon quant. Ниже, на рисунке 16.7 приведены команды для количественного анализа результатов, полученных на платформах Illimina (листинг i.3) и ONT (листинг i.4).

Уменьшение размера тестовых данных для оценки точности поиска мутаций в ONT данных было произведено с использованием seqtk.

Листинг і.1	samtools view -bS input.sam > output.bam samtools sort -@ 4 output.bam -o sotred_output.bam htseq-count stranded=no -r pos -f bam sorted_hisat_genome_aln.bam /home/ubuntu/work/var_ref/gencode.v38.annotation.gff3 > > > no_stranded_hisat_gene_count.txt > > >
Листинг і.2	/home/ubuntu/subread-2.0.3-Linux-x86_64/bin/featureCounts -T 4 -a /home/ubuntu/work/var_ref/gencode.v38.annotation.gff3 -t exon -g gene_id -G /home/ubuntu/work/var_ref/GRCh38.p13.genome.fa -Jprimary -L -o ./alig_accurate_metrics/minimap2_genome_ONT_stats_non_multi.txt ./alig_accurate_metrics/genome_aln.sam

Рисунок 16.6 - Подсчёт прочтений после выравнивания на геном для Illumina (листинг i.1), для ONT (листинг i.2)

Листинг і.3	/home/ubuntu/salmon-1.5.2_linux_x86_64/bin/salmon ref/gencode.v38.transcripts.fa -1 U -a aln.sam -o salmon.ou	quant ut	threads	4	-t
Листинг і.4	/home/ubuntu/salmon-1.5.2_linux_x86_64/bin/salmon ref/gencode.v38.transcripts.fa -1 Uont -a aln.sam -o salm	quant 10n.out	threads	4	-t

Рисунок 16.7 - Команды для количественного анализа результатов, полученных на платформах Illimina (листинг i.3) и ONT (листинг i.4)

(ііі) Протестированные программы

 GATK [303], Bcftools [304], Strelka [305], Clair3 [306], Salmon [307], Minimap2 [308], Graphmap2 [309], HiSat2 [310], STAR [311].

(iv) Генерация тестовых данных

<u>Illumina.</u> Тестовые данные были сгенерированы программой RSEM [300] - см. листинг i.5 на рисунке 16.8. Референс для RSEM был сгенерирован из генома и аннотации генома см. листинг i.6 5 на рисунке 16.8.

Модель была взята из инструмента lrgasp-simulation [312]

Профиль экспресии был получен из результатов транскриптомной обработки эксперимента HUH7 2.

Листинг і.5	/home/ubuntu/RSEM-master/rsem-simulate-reads ./rsem_from_genome_ref/ref_from_genome ./illum_sim/Illumina150.RNA.model hep_expression_profile.tsv 0.0 1500000 ./illum_sim/gen_ref_hep_expseed 17
Листинг і.6	/home/ubuntu/RSEM-master/rsem-prepare-reference —gff3 /home/ubuntu/work/var_ref/gencode.v38.annotation.gff3 /home/ubuntu/work/var_ref/GRCh38.p13.genome.fa rsem_from_genome_ref

Рисунок 16.8 - Листинги для генерации тестовых данных для платформы Illumina

<u>ONT.</u> Тестовые данные были сгенерированы программой NanoSim [299] - см. листинг i.7 на рисунке 16.9. В качестве модели была использована базовая модель NanoSim, в том числе содержащая профиль экспрессии.

python3 /home/ubuntu/anaconda3/envs/nanosim/bin/simulator.py transcriptome -rg
/home/ubuntu/work/var_ref/GRCh38.p13.genome.fa -rt
/home/ubuntu/work/ref/gencode.v38.transcripts.faexp
/home/ubuntu/work/ngs_simulation/human_NA12878_dRNA_Bham1_guppy/expression_a
bundance.tsvmodel_prefix
/home/ubuntu/work/ngs_simulation/human_NA12878_dRNA_Bham1_guppy/training -o
/home/ubuntu/work/ngs_simulation/sim_out/simulatedseed 17basecaller guppyfastq -
-uracil -r dRNAnum_threads 36number 500000

Рисунок 16.9 – Листинги для генерации тестовых данных для ONT

(v) Генерация индексов для картирования прочтений

Генерация геномного индекса HiSat2, транскриптомного индекса HiSat2, геномного индекса STAR, геномного индекса minimap2 и генерация транскриптомного индекса Salmon - см. листинг i.8 на рисунке 16.10. Извлечение координат сайтов сплайсинга для minimap2 - см. листинг i.9 на рисунке 16.10.

(vi) Данные секвенирования для оценки точности поиска мутаций

Оценка точности поиска мутаций производилась на данных секвенирования РНК образца GM12878, клеточной линии В-лимфоцитов, полученных от NA12878 (HG001) – человека, геном которого был секвенирован в рамках проекта «1000 геномов» [313].

ОNТ — данные прямого секвенирования РНК GM12878 [314].

Была сделана выборка случайных 1250000 прочтений для увеличения удобства тестирования инструментов - см. листинг i.10 на рисунке 16.11.

Листинг і.8	/home/ubuntu/hisat2-2.2.1/hisat2-build -t 4 /home/ubuntu/work/var_ref/GRCh38.p13.genome.fa /home/ubuntu/work/illum/Ht_ref_cont_index
	/home/ubuntu/hisat2-2.2.1/hisat2-build -t 3 /home/ubuntu/work/ref/gencode.v38.transcripts.fa /home/ubuntu/work/illum/tran_ht_index/tran_ht_index
	/home/ubuntu/work/illum/star_alig/STAR-2.7.9a/bin/Linux_x86_64_static/STARrunThreadN16runModegenomeGenerategenomeDir/home/ubuntu/work/illum/star_alig/genomeDirgenomeFastaFiles/home/ubuntu/work/var_ref/GRCh38.p13.genome.fasjdbGTFfile/home/ubuntu/work/illum/star_alig/gencode.v38.chr_patch_hapl_scaff.annotation.gtfminimap2 -d GRCh38.p13.genome.mmi GRCh38.p13.genome.fa
	salmon index -t /home/ubuntu/work/ref/gencode.v38.transcripts.fa -i /home/ubuntu/work/salmon_multifeature_index_gencode_v38 -k 31threads 7
Листинг і.9	/home/ubuntu/minimap2-2.22_x64-linux/k8 /home/ubuntu/minimap2-2.22_x64-linux/paftools.js gff2bed gencode.v38.annotation.gff3 > minimap_splice_anno.bed

Рисунок 16.10 - Листинги для генерации индексов для картирования прочтений

Листинг і.10	seqtk sample -s100 NA12878-DirectRNA_All_Guppy_4.2.2.fastq 1250000 > subset.fq

Рисунок 16.11 - Листинги для случайной выборки прочтений

Illimina — данные секвенирования РНК GM12878 [313], загруженные с NCBI SRA.

Секвенирование проводилось в рамках проекта Genome in a Bottle [315].

Данные доступны по идентификатору SRR15909920 [316].

Для сверки найденных вариантов с известными был использован .vcf файл [317], содержащий информацию об известных вариантах в геноме NA12878, доступный через сайт проекта Genome in a Bottle [315].

Перед сопоставлением .vcf файлы были нормализованы с использованием bcftools: bcftools norm -a -m- input.vcf -o normalized.vcf

Сопоставление найденных вариантов с известными проводилось с использованием инструмента gatk Concordance.

Финальная статистическая обработка производилась в Jupyter notebook [318] с использованием библиотек numpy [319] и pandas [320], для визуализации использовался пакет matplotlib [321].

15.2. Протеомные данные.

Из-за увеличения эффективности методов анализа биомолекул начали возникать широкомасштабные проекты, к каким относятся, например, "Протеом человека" [322]. В проекте "Протеом человека" научные консорциумы из разных стран характеризуют белки, кодируемые генами одной из выбранных соответствующей страной хромосом человека [323].

Со стороны концентрации белков и их участия в молекулярных процессах, все хромосомы примерно равнозначны [324]. Российская Федерация, как страна-участница проекта, завершила масс-спектрометрические измерения для белковых продуктов хромосомы 18 [325, 326]. В ходе выполнения российской части, с использованием хромосомоцентричного подхода, был получен уникальный массив данных. Хромосомоцентричный подход заключается в том, что исследуются белки, которые кодируются генами, локализованными на одной хромосоме. В качестве примера можно рассмотреть массив, опубликованный Красновым и др. [327].

По такому принципу, как правило, работа в широкомасштабных научных проектах не направлена на подтверждение/опровержение научной гипотезы. В результате работы лишь формируется основа сведений [328], которая требует интерпретации в последующих более узконаправленных исследованиях.

Важно понимать, что формирование основы сведений представляет собой выполнение стандартизированных упорядоченных последовательностей операций. В условиях, когда становится необходимой обработка "больших данных", в проекты могут быть приглашены лица-исполнители, в совокупности образующие страту гражданских исследователей. Теперь для построения правильной структуры данных надлежит определить стандарты ее реализации. Настоящая работа описывает стандартную операционную процедуру (СОП) для обработки массивов протеомных данных.

15.2.1. Получение протеомных данных.

Протеомика, как глобальное системное изучение протеома, становится главной особенностью исследований белков в конце XX века [329]. Термин *протеом* предложил в 1994 году, будучи аспирантом, австралийский ученый Марк Уилкинс на симпозиуме "2D

Electrophoresis: from Protein Maps to Genomes" в Сиене, Италия [330]. Печатно термин появился в 1995 году, когда была опубликована часть кандидатской диссертации Марка Уилкинса [331].

Минимальным компонентом протеома является протеоформа. Протеоформа – это отдельный полипептид, имеющий уникальную аминокислотную последовательность, с определенным набором посттрансляционных модификаций (ПТМ) или их отсутствием [331 – 333]. Протеоформы принято определять как белковые группы или белковые виды, возникающие за счет модификаций белка (что может происходить в ходе эволюции или иных процессов).

Соответственно, из-за широкого изотопного разделения часто возникают сложности с анализом белков. Из-за этого белковые образцы перед помещением в масс спектрометр с помощью фермента трипсина разрушают на пептиды массой 500—2500 Да. Затем по данным пептидов восстанавливается информация об исходном белке. Этот подход получил название протеомика "снизу вверх" или "восходящая протеомика" [334].

Этапы изучения протеомных образцов в подходе "снизу вверх" (как изучение на протеомном уровне, так и на уровне отдельных белков) показаны на рисунке 16.12.



Протеолитическое расщепление в растворе

Рисунок 16.12 - Этапы изучения протеомных образцов в подходе "снизу вверх"

Как показано на Рисунке 16.12, биоматериалы могут находиться как в жидком виде (например: культуральная жидкость, плазма крови, слюна), так и твердом состоянии (биопсии, клеточные культуры и т. д.).

Производится выделение белков (экстракция), протокол подбирается на основе типа, природы исследуемого образца и цели эксперимента. Белки в процессе экстракции могут подвергаться воздействию различных ферментов (протеаз, гидролизующих белков и т. д.). Пробоподготовка ведется при низкой температуре, оперативно, с добавлением ингибиторов протеаз. Первый шаг обычно заключается в полном гомогенизировании образца (это может быть даже механическое размельчение образца в гомогенизаторе). Для разрыва клеточных стенок имеется большой арсенал всевозможных подходов и их вариаций (обработка ультразвуком, встряхивание со стеклянными шариками, растирание в порошок замороженного жидким азотом материала в ступке, осмотический шок, осмотический лизис дистиллированной водой, обработка поверхностно-активными веществами, воздействие протеазами). Нежелательные составные части клеток, такие как нуклеиновые кислоты, углеводы и липиды, могут быть затем отделены, например, центрифугированием или переосаждением.

Последующий процесс разделения может основываться на различной (в определенных условиях) растворимости, различном размере, различном электрическом заряде или различных адсорбционных свойствах молекул белков, а также на различной биологической активности. Один из таких подходов положил начало для протеомики — разделение белков двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле (2DE), по своим параметрам он практически не имеет конкурентов уже почти половину века [214, 335].

Для выделения индивидуального белка может быть применено взаимодействие с комплексообразующими веществами (например, альбумины, пектины, альгинаты) [336].

Затем осуществляется расщепление белков на более мелкие полипептиды или аминокислоты (протеолитическое расщепление). Процесс обычно катализируется ферментами.

В практической протеомике самым популярным на данный момент вариантом хроматографического разделения является обратнофазовая хроматография в комбинации с масс-спектрометрией – ВЭЖХ–МС/МС.

2DE имеет важные преимущества, которых пока лишена ВЭЖХ–МС/МС. Совместное использование технологий позволяет оптимально использовать достоинства каждой. В качестве примера можно привести секционный анализ двумерных электрофоретических гелей с помощью высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии [337].
После получения белковых компонентов в разделённом виде, путем измерения отношения их массы к заряду в ионизированном состоянии, проводится их массспектрометрический анализ. Информация с масс-спектрометра представляется в виде набора спектров, задачей последующей компьютерной обработки является характеристика и идентификация исходного белка по базам данных, на основе анализа совокупности пептидов. На сегодняшний день существует множество вариаций массспектрометрического анализа, позволяющих, в том числе, проводить определение аминокислотных последовательностей исследуемого белка.

Безусловно, протеомика "снизу вверх" имеет многопрофильное развитие, свои сильные и слабые стороны и потенциальные способы улучшения существующей методологии [338]. Эти улучшения имеют отношение к проблемам биомедицинским, клиническим, экологическим и т.д.

15.2.2. Программное обеспечение для протеомного анализа

На сегодняшний день для протеомного анализа доступен большой арсенал ПО, некоторые повсеместно используемые, хорошо зарекомендовавшие себя и наиболее популярные пакеты: SearchGUI [339], MaxQuant [340], Mascot [341, 342].

Mascot требует покупки лицензии, поэтому он не предпочтителен для выбора. Для выбора ПО проведен сравнительный анализ MaxQuant и SearchGUI по следующим категориям: доступность, быстродействие, эффективность, дружелюбность интерфейса, наличие нативной программы для последующего биоинформатического анализа. Результаты анализа представлены на Рисунке 16.13

	Доступность	Быстродействие	Эффективность	Дружелюбность интерфейса	Нативное приложение для последующего биоинформатического анализа	Дополнительно
MaxQuant	Распространяется бесплатно, требуется установка .NET 3.1	На одноі	и уровне	Да, есть преимущества	Perseus	Разработчики ежегодно проводят бесплатный курс обучающих семинаров
SearchGUI	Распространяется бесплатно, запуск с Java	см. раздел "Сравнение MaxQuant и SearchGUI"		Да	PeptideShaker	

Рисунок 16.13 - Сравнительный анализ ПО для обработки протеомных данных MaxQuant и SearchGUI

Сравнение MaxQuant и SearchGUI.

Для сравнения ПО был использован набор масс-спектрометрических протеомных данных, которая была получена с использованием "протеомного стандарта" (USP2 — universal protein standard 2) группой Дж. Кокса и др. [343]. Датасет находится в открытом доступе и доступен по идентификатору "PXD000279" в репозитории "ProteomeXchange Consortium" (<u>https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD000279</u>). Обзор файлов датасета с указанием их размеров представлен в Таблице 1.

Сравнение было проведено с использованием мощностей 181 машины ФГБНУ "НИИ биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича: Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2695 v4 @ 2.10 GHz (2 процессора), 64.0 ГБ установленной ОЗУ, 64-разрядная операционная система Windows 7.

Таблица 16.4 - Файлы UPS2 датасета "MaxLFQ label-free quantification algorithm benchmark datasets" (<u>https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD000279</u>).

Имя файла	Объем
20130510_EXQ1_IgPa_QC_UPS2_01.raw	2.72 Гб
20130510_EXQ1_IgPa_QC_UPS2_02.raw	2.82 Гб
20130510_EXQ1_IgPa_QC_UPS2_03.raw	2.53 Гб
20130510_EXQ1_IgPa_QC_UPS2_04.raw	2.62 Гб
	Всего: 10.69 Гб

В дополнение к параметрам по умолчанию для каждой программы были выставлены следующие параметры обработки: изменяемые модификации — окисление, фиксированные модификации — карбамидометил; фермент "переваривания" — трипсин; модификации, использованные в количественной оценке — окисление; запись выходных таблиц — "allPeptides", "msmsScans", "mzRange", "accumulatedMsmsScans". В качестве референсного файла базы данных был использован *.fasta файл UniProt [341]. В SearchGUI было активировано три алгоритма поиска: MS-GF+, X! Tandem, OMSSA. Выбранные параметры позволили обеспечить наибольшую эффективность работы программ: высокая точность идентификации и количественной оценки, при наименьших временных затратах [340, 343].

Программы были запущены независимо, в разное время, для каждой были доступны все имеющиеся вычислительные ресурсы. MaxQuant завершил поиск за 5 часов и 44 минуты, а SearchGUI за 5 часов и 52 минуты. Из белков, представленных в протеомном

стандарте UPS2, алгоритмам каждой программы удалось надежно (по 2 и более пептидам) идентифицировать по 23 белка. При примерно равном затраченном времени, MaxQuant и SearchGUI показывают аналогичные результаты работы, то есть тут рядовой исследователь в выборе ПО может ориентироваться только на удобство и дружелюбность интерфейса.

И MaxQuant, и SearchGUI за годы разработки приобрели проверенный и удобный интерфейс. Тем не менее, MaxQuant в едином окне совмещает множество параметров, что упрощает навигацию по системе. В нем есть возможность провести "сухой прогон" для примерной оценки времени работы и контроля выходных файлов. В MaxQuant при загрузке файлов можно видеть их расположение в системе, что может быть важно для проверки выставляемых параметров. MaxQuant автоматически записывает файл с заданными параметрами и файл с отчетом о ходе обработки, это позволит проверить качество и правильность полученных результатов. Разработчики MaxQuant каждое лето проводят обучающие семинары, где у новичков есть возможность "с нуля" освоить программу, а у более продвинутых пользователей — улучшить свои навыки. Пакет SearchGUI лишен таких преимуществ.

Таким образом, при примерно аналогичных показателях эффективности программ, использование MaxQuant будет более удобным для гражданского исследователя. СОП описывает его использование.

Работа в данном проекте была ориентирована на создание СОП обработки протеомных данных. Все запланированные работы по проекту были выполнены, результатом работы является иллюстрированный документ с описанием каждого шага процедуры. В рамках исследования был проведен литературный обзор способов получения протеомных данных, их обработки и интерпретации. Результаты проведенного обзора были структурированы и отфильтрованы в соответствии с направленностью проекта УНУ, для общего понимания научной проблемы гражданским исследователем. В рамках исследования были выявлены особенности существующих современных решений ПО для анализа протеомных данных. Был проведен сравнительный анализ, в результате которого было выявлено что наилучшим вариантом для целевого пользователя является ПО МахQuant, таким образом СОП описывает его использование.

15.3. Метаболомные данные.

15.3.1. Обзор аналитических платформ, применяемых для получения метаболомных данных.

В 2007 году группа исследователей из Канады, возглавляемая Дэвидом Уишартом, завершила первую версию базы данных о метаболоме человека – Human Metabolome

Database [342]. Метаболомика – это новое перспективное направление в аналитической биохимии, которое предназначено для обнаружения «отпечатков пальцев» процессов, протекающих в данный момент в клетке или в целом организме. Она предоставляет возможность определять как интересующие известные малые молекулы – целевая, направленная или таргетная, метаболомика, так и профиль метаболитов – нецелевая, ненаправленная или широкоохватная метаболомика. Развитие хромато-масс-спектрометрии и масс-спектрометрии в целом стало основополагающим в становлении метаболомики как мощного инструмента функциональной геномики.

Хроматография, масс-спектрометрия: виды и платформы.

В экспериментальной практике на сегодняшний день наиболее распространенным подходом получения «сырых» метаболомных данных является хромато-массспектрометрия (то есть хроматограф физически соединен с масс-спектрометром). Хроматография является физико-химическим методом, который может быть использован для разделения и идентификации метаболитов. Хроматографию считают лучшим методом разделения, который подходит для разделения многокомпонентных смесей, в том числе и биологических жидкостей.

В метаболомных экспериментах наиболее часто используют газовую хроматографию (ГХ) и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). Также используется 2Dгазовая хроматография: ГХ-ГХ-МС. В ГХ неподвижной фазой является твёрдый сорбент – полиоксиран или полиосилоксан, а подвижной – инертный газ-носитель. В ВЭЖХ неподвижной фазой является модифицированный гидрофобными группами силикагель, а подвижной – вода, полярные органические растворители (метанол, ацетонитрил) или их смеси, то есть часто используют обращенно-фазовую ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ). В случае ГХ-МС используют ионизацию электронным ударом (EI), а в случае ВЭЖХ-МС – ионизацию электроспреем или химическую ионизацию при атмосферном давлении (ESI или APCI). Причем ионизация электронным ударом – жесткий тип ионизации, приводящий к фрагментации молекул, а ионизация электроспреем и химическая ионизация – мягкий тип, и на спектре можно наблюдать ионы, которые присутствуют в растворе. Несмотря на то, что это мягкий тип, незначительная фрагментация всё равно присутствует. Наряду с экспериментами, включающими предварительное хроматографическое разделение, в метаболомном профилировании используют масс-спектрометрию прямого ввода. В иностранной литературе данный вид анализа называют как Direct Injection Mass Spectrometry (DIMS) [344], так и Flow Injecton Mass Spectrometry (FIMS) или Flow Infusion Analyis (FIA) [345], но встречаются и разночтения, что часто затрудняет поиск. Причем

часто DIMS используют для данных, полученных ESI-FT-ICR MS, a FIMS – полученных при помощи ESI-QTOF.

Существует большое количество масс-спектрометров с различными ионными источниками, масс-детекторами, и для каждого прибора характерны разрешение и точность определяемых масс, что важно учитывать при осуществлении обработки данных. В таблице 16.5 представлены наиболее часто используемые типы хроматографии, источников ионов, масс-детекторов метаболомного анализа (по данным MetaboLights, Metabolomics Workbench). В зависимости от используемых (хромато-)масс-спектрометров меняется формат выходных данных. Пример расширений выходных файлов с прибора в соответствии с фирмой-изготовителем оборудования приведен ниже (Таблица 16.6).

Таблица 16.5 - Распространенные конструкции приборов для метаболомного анализа

Тип хроматографии	Источник ионов	Масс-детектор
Жидкостная хроматография (LCMS)	ESI, APCI, APPI	S/Q, Orbitrap, QTOF, Ion
		Trap, T/TOF,Q-Exactive
Газовая хроматография (GCMS)	EI	S/Q, Orbitrap, QTOF, Ion
		Trap, T/TOF,Q-Exactive
2D газовая хроматография (GCxGCMS)	EI	S/Q, Orbitrap, QTOF, Ion
		Trap, T/TOF,Q-Exactive
	ESI, APCI	QTOF, FT-ICR

Таблица 16.6 - Форматы файлов, характерные для масс-спектрометров, применяемых в метаболомике

Поставщик	Программное обеспечение	Формат файла
	прибора	
AB Sciex	Analyst	.wiff
Agilent	MassHunter	.d
Bruker	DataAnalysis/Compass	.d
ThermoFisher	Xcalibur	.raw/.RAW
Waters	MassLynx	.raw
LECO Pegasus	-	.peg

15.3.2. Обзор программного обеспечения для обработки и анализа метаболомных данных.

Как показано в пункте 16.3.1 «Обзор аналитических платформ, применяемых для получения метаболомных данных» каждый масс-спектрометр имеет собственное расширение выходного файла. В 2009 году по инициативе Human Proteome Organization (HUPO) был создан общий формат хранения масс-спектрометрических данных – mzML. Это XML-файл, содержащий информацию об одном прогоне масс-спектрометра, включая спектры и связанные метаданные [346]. Часто программное обеспечение ориентировано на этот формат.

Программы для конвертации форматов файлов.

Для конвертации «сырых» файлов в mzML используется программа MSconvert [347], являющаяся одним из Приложений программного пакета ProteoWizard [348]. MSconvert позволяет производить конвертацию в многопоточном режиме. Программы XCMS [349], XCMS Online[350], MetaboAnalyst [351], MetaboAnalyst R [352], MZMine 2 [353] в качестве входного формата используют mzML (но поддерживаются и иные форматы, такие CDF, mzXML).

MSConvert не является универсальным решением для трансформации файлов. На Рисунке 16.14(а) показан фрагмент окна MSConvert, на котором представлены опции для конвертирования исходных файлов. Видно, что в списке выходных форматов отсутствует CDF. MZMine 2 позволяет переводить mzML и иные форматы в CDF, хотя не является программой-конвертером. На Рисунке 16.14(б) показаны параметры для экспорта сырых данных – mzML и NetCDF . MZ Mine 2 предоставляет выбор формата хранения сырых данных.



Рисунок 16.14 - (а) Возможные форматы выходных данных MSConvert, (б) Псевдоконвертер встроенный в MZ Mine 2

Сравнительная характеристика программ XCMS, MS-DIAL, MZ Mine 2.

В связи с тем, что в метаболомном анализе часто применяют хромато-массспектрометрию, существует большое количество программного обеспечения и библиотек языков программирования для работы с данными, содержащими информацию о хроматографии, сопряжённой с масс-спектрометрией. XCMS, MZ Mine2, MS-DIAL [354] – часто используемые программы и библиотеки для предобработки хромато-массспектрометрических данных. В 2018 году Zhucui Li с коллегами проводит сравнение вышеперечисленных Приложений на точность определения пиков соединений и их концентраций в образцах [355]. Исследователями был получен датасет из набора стандартных соединений (метаболиты и лекарства), включающего 1100 веществ с заданными соотношениями концентраций, из них 130 были добавлены в резко разных концентрациях.

ПО не сразу выдаёт список соединений. На этапе препроцессинга формируется листинг неаннотированных пиков, то есть пиков, не сопоставленных с соединениями. Истинные пики – это пики, у которых отношение сигнал/шум больше 5, а соотношения пиковой интенсивности близки к соотношениям стандартного образца. Ложно распознанные пики – это пики, форма которых неправильно огибает распределение изотопов, у них высокий уровень шума или непостоянное соотношение пиковой интенсивности.

Контрольные данные для четко определенных смесей соединений были получены на платформах HRMS, AB SCIEX TripleTOF 6600 и Thermo QE HF. Программное обеспечение, оцениваемое в рассматриваемой статье, включает два коммерческих ПО, разработанных для конкретных приборов MS -MarkerView и Compound Discoverer, и три широко используемых ПО с открытым исходным кодом - XCMS, MZmine 2 и MS-Dial. Программы обработки были всесторонне оценены в отношении идентификации и количественной оценки стандартных соединений. При обработке датасета каждой из оцениваемых программ определялось общее число пиков соединений. Из них выбирали согласованные (или консенсусные) пики – ненулевые пики, присутствующие во всех сканах образца.

			Total features	Consensus True fea True features rate ^a		True feature ID rate ^a (%)
	Targeted		-	-	970	-
TripleTOF		MarkerView	20,000	9,718	833	85.9
6600	6600	MS-Dial	26,185	15,582	871	89.8
dataset	Untargeted	MZmine 2	24,472	23,677	876	90.3
		XCMS	28,168	25,386	896	92.4
	Targeted		-	-	836	-
QE HF dataset		Compound Discoverer	10,525	10,525	748	89.5
	Untargeted	MS-Dial	21,545	17,726	799	95.6
		MZmine 2	20,021	18,871	769	92.0
		XCMS	35,215	30,680	820	98.1

^aPercentage of true features identified by untargeted analysis over those in the benchmark feature list from targeted analysis.

Рисунок 16.15 - Таблица, приведённая в статье Zhucui Li, со сравнением точности поиска пиков соединений в сырых хромато-масс-спектрометрических данных программами XCMS, MZMine 2, MS-Dial, MarkerView.

Исследователи пришли к результату, что XCMS немного превзошел Приложения с открытым исходным кодом путем выявления истинных пиков соединений. На Рисунке 16.15 видно, что XCMS выявил 28168 и 35215 пиков из наборов данных полученных на платформах Triple TOF 6600 и QE HF соответственно, из которых 25386 и 30680 – согласованные пики. Среди согласованных пиков 896 и 820 – истинные пики соединений. Это превосходит даже результаты, полученные в программе MarkerView. MZmine 2 лучше справился с количественной оценкой. На рисунке 16.16 показано, что MZ Mine 2 способен точно определить у 798 и 761 истинно выявленных пиков концентрацию веществ в двух датасетах с 99 % точностью. Более того, комбинация двух нецелевых программ позволила существенно снизить количество обнаружения ложных маркёров, сохраняя при этом большинство истинных маркёров.

На основе анализа эталонного датасета, авторы статьи рекомендуют объединить использование MZmine 2 и XCMS для получения более точных результатов при анализе хромато-масс-спектрометрических данных.

			Accurately quantified true features	Quantification accuracy rate (%)	True discriminating markers	False discriminating markers
	Targeted		970	100	68	0
TripleTOF		MarkerView	737	88.5	41	17
6600	Untergeted	MS-Dial	683	78.4	47	60
dataset	Untargeted	MZmine 2	798	91.1	59	4
		XCMS	588	65.6	55	191
	Targeted		836	100	50	0
QE HF		Compound Discoverer	482	64.4	41	111
dataset	Untargeted	MS-Dial	654	81.9	42	42
	_	MZmine 2	/61	99.0	48	3
		XCMS	731	89.2	45	51

Рисунок 16.16 - Таблица, приведённая в статье Zhucui Li, со сравнением точности количественной оценки соединений в сырых хромато-масс-спектрометрических данных программами XCMS, MZMine 2, MS-Dial, MarkerView.

Возможности и функционал веб-Приложения MetaboAnalyst и пакета MetaboAnalystR.

МetaboAnalyst - это комплексный набор веб-инструментов, призванный помочь пользователям легко выполнять анализ, визуализацию и функциональную интерпретацию данных. Впервые он был представлен в 2009 году с единым модулем для обработки метаболомных данных и статистического анализа. С тех пор он постоянно обновляется. Большинство аналитических инструментов основано на функциях R. Разработчики предоставили пакет для языка R – MetaboAnalystR – полностью повторяющий возможности

веб-Приложения. MetaboAnalyst сохраняет историю R-комманд, которые можно перенести в среду разработки RStudio на локальный компьютер.

Для препроцессинга хромато-масс-спектрометрических данных MetaboAnalyst использует алгоритмы XCMS. Разработчики сделали MetaboAnalyst совместимым с объектами XCMS. В свою очередь разработчики XCMS добавили функцию для экспорта результатов в MetaboAnalyst.

Обычная процедура обработки масс-спектров обычно включает идентификацию пика, спектральную деконволюцию и аннотацию пиков. Для уменьшения количества ложных идентификаций все чаще используется масс-спектрометрия высокого разрешения. С вычислительной точки зрения многообещающий подход состоит в картировании массспектрометрических сведений с теоретически ассоциированными отдельными соединениями - концепция, аналогичная широко используемому анализу обогащения набора генов или GSEA [356]. Алгоритм Mummichog [357] представляет собой осуществление этой концепции. Алгоритм позволяет осуществлять прямое предсказание метаболических путей по МС-пикам высокого разрешения. В MetaboAnalyst алгоритм Mummichog peализован в модуле «MS Peaks to Pathways».

Чтобы использовать этот модуль необходимо загрузить таблицу, содержащую три столбца – характеристики m/z, Р-значения и статистические оценки (например, t-оценки или значения кратного изменения). Если эти значения еще не были рассчитаны, следует загрузить масс-листы в модуль статистического анализа MetaboAnalyst для выполнения статистического анализа, а затем загрузить эти результаты в модуль «MS Peaks to Pathways». Необходимо указать точность измерения массы, ионный режим (положительный или отрицательный) и Р-значение отсечения, чтобы провести границу между значительно обогащенными и фоновыми компонентами. После загрузки данных нужно выбрать организм (библиотеку) для выполнения нецелевого анализа биохимических путей.

Таким образом, при анализе метаболомных данных, полученных при помощи хромато-масс-спектрометрии, в оптимальный набор программ входят XCMS, MZ Mine 2 и MetaboAnalyst (MetaboAnalystR).

Программное обеспечение для обработки данных масс-спектрометрии прямого ввода: MassSpecWavelet, proFIA.

На сегодняшний день для обработки масс-спектрометрических данных прямого ввода используется MassSpecWavelet.

MassSpecWavelet – это пакет языка R, который разработан для обработки данных без информации о хроматографии. Спектры, полученные прямым вводом, обычно довольно

«шумные». Из-за большого количества шумовых пиков происходит ложное распознавание пика, если вести поиск исключительно по амплитуде. При анализе таких данных, эффективным является алгоритм непрерывного вейвлет-преобразования (CWT) [358], который идентифицирует пики с разными масштабами и амплитудами. XCMS имеет функцию-обёртку для интеграции MassSpecWavelet в общий пайплайн обработки метаболомных данных и адаптацию вывода для собственных объектов (xcmsSet, MSnExp).

Известно и другое Приложение для обработки данных прямого ввода – proFIA, однако этот пакет R весьма специфичен для входных данных и не может обрабатывать файлы, содержащие более одного сканирования. Рабочий процесс состоит из 3 этапов: (1) оценка уровня шума, обнаружение пиков и количественная оценка, (2) группирование пиков и (3) импутация отсутствующих значений. Также Приложение позволяет оценивать эффект матрицы. Программный продукт появился в 2017 году, однако всё ещё не получил широкого применения для анализа данных прямого ввода.

15.3.3. Описание выполненных работ и полученных результатов.

Выбор тестового набора данных.

Для выбора программного обеспечения обработки хромато-масс-спектрометрических данных необходимо иметь данные, в которых известно содержание всех компонентов. Однако такие датасеты не представлены в открытых репозиториях, таких как MetaboLights [359], Metabolomics Workbench [360] и GNPS [361].

В статье Дженнифер Кирван и коллег [362] описывается 16 наборов данных – спектров биологических образцов экстрактов сердечных тканей овец и коров с набором образцов контроля качества (QC). Данные представляют собой 208 архивов с файлами в формате .RAW с тремя техническими повторами на образец. Авторы рекомендуют разработанные датасеты для проверки эффективности алгоритмов обработки данных прямого ввода и указывают идентификатор MetaboLights для скачивания. На рисунке 6.17 (а) представлено приведённое в статье описание набора данных, где синим цветом выделен идентификатор.

Как показано на Рисунке 16.17(б), поиск по указанному в статье идентификатору MTBLS79 в репозитории MetaboLights не выдал результатов.

(a) Dataset 1: Instrument .RAW files (IRF)

This dataset is sited at MetaboLights (MTBLS79). It consists of 208 zip files containing the instrument .RAW files for the three replicates per sample that were collected for each blank, QC and biological sample that was analysed by DIMS metabolomics and processed using Xcalibur software (v.2.0.7). This dataset also includes the instrument .RAW files for the nine samples that



Рисунок 16.17 - (a) Описание набора масс-спектрометрических данных прямого ввода экстрактов сердечных мышц животных. (б) Результат поиска набора данных с идентификатором MTBLS79 в открытом репозитории MetaboLights.



Рисунок 16.18 - (a) Результат поиска датасета с ID 1197351, полученного на платформе Q Exactive Orbitrab HF в репозитории XCMS Online. (б) Результат поиска датасета с ID 1197236, полученного на платформе Triple TOF 6600 в репозитории XCMS Online. (в) Ошибка при загрузке датасета MTBLS1968 при помощи утилиты wget в командной строке.

Также при поиске набора данных из статьи по сравнению программного обеспечения для обработки данных с хроматографическим разделением ничего не найдено.

Согласно Zhucui Li в статье, рассмотренной в пункте 16.3.2: «Сырые данные доступны на вебсайте XCMS https://xcmsonline.scripps.edu/ (TripleTOF 6600 dataset ID: 1197236, QE HF dataset ID: 1197351) в репозиторий XCMS не выкладываются непосредственно файлы

спектров. Данные сохраняются вместе с заданными настройками для обработки. На Рисунках 16.18(а) и (б) видно, что указанные датасеты отсутствуют в разделе открытых доступных работ.

При загрузке через командную строку набора данных, полученных на платформе ультраэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии, с идентификатором MTBLS1968, как видно на Рисунке 16.18(в), возникла ошибка: страница не найдена.

В связи с отсутствием данных в открытых репозиториях, необходимо учитывать задачу написания симулятора таргетных метаболомных данных. Подобные программные решения представлены для геномики, транскриптомики и протеомики. В итоге было принято решение использовать данные, содержащиеся в локальном репозитории ИБМХ, – масс-спектры прямого ввода образцов плазмы крови людей здоровых и страдающих ожирением – совместная работа с ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». Данные получены на приборе Bruker maXis II (DI-QTOF-MS) и представляют собой 99 директорий .d совокупным объёмом 5,07 ГБ.

В общем каталоге с данными так же находились конвертированные папки в mzML и масс-листы (в директории Mass Lists), полученные с помощью программы Data Analysis. Общее количество mzML: составило 99 файлов. Объём всех файлов составил 17,8 ГБ.

Создание виртуального рабочего пространства.

Для тестирования программного обеспечения была создана на Amazon Web Services Elastic Cloud 2 виртуальная машина с конфигурацией t3.2xlarge R4.05_Metabolyst. Конфигурация t3.2xlarge означает, что у созданной машины 8 центральных процессоров и объём основного диска 8 ГБ. Для хранения и загрузки данных был подключён дополнительный диск размером 100 ГБ. Также на виртуальной машине был установлен RStudio server и открыт порт 8787 для возможности работы в интерактивной среде разработки через браузер.

<u>Тестирование proFIA.</u>

Программа proFIA реализована на платформе Galaxy [363] как самостоятельный рабочий процесс (workflow). На странице создания нового процесса производят загрузку сырых данных в виде 7z-архива, устанавливают параметры для обработки: максимальное отклонение между центроидными пиками в ppm и Дальтонах, точность масс-спектрометра, методы импутации данных (KNN, RandomForest). При испытании готового пространства на платформе Galaxy успешно осуществлена загрузка файла .mzML, однако произошла ошибка, представленная на Рисунке 16.18. Во время обработки загруженного файла, на сервере произошла ошибка загрузки пакета языка R - mzR, предназначенного для чтения файлов форматов mzML, mzXML, CDF.

Программу proFIA можно использовать в виде пакета R в интерактивной среде разработки RStudio для написания собственных скриптов обработки метаболомных данных. Установка производится при помощи менеджера программных пакетов BiocManager: BiocManager::install(c("xcms", "proFIA"))

При запуске функции analyzeAcquisitionFIA с тем же файлом, что был загружен в рабочее пространство Galaxy, возникла ошибка, представленная на Рисунке 16.20. В консоли RStudio красным шрифтом показан вывод выполняемой функции, выполненные шаги. Возникла ошибка, указывающая на потерянное булево значение в исполняемой функции, и предупреждение о том, что был использован метод списков и векторов - объектов R – для объекта типа S4. При разборе кода функции не удалось найти место ошибки.



Рисунок 16.19 - (a) Успешная загрузка .mzML файла в архиве 7z на сервер Galaxy. (б) Ошибка при загрузке пакета mzR на сервере Galaxy.



Рисунок 16.20 - Ошибка в неизвестном месте при выполнении функции analyzeAcquisitionFIA.

Так как analyzeAcquisitionFIA является функцией-обёрткой для выполнения всех стадий обработки данных, было принято решение расписать отдельными командами рабочий процесс.

library("proFIA")

pth <- "/home/rsuser/MetData/fire/"
list.files(pth)
ppm <- 2
mySet <- proFIAset(pth, ppm=ppm, parallel=FALSE)</pre>

Было установлено, что ошибка возникает на этапе создания объекта proFIAset.

Тестирование XCMS. Сравнение с DataAnalysis.

DataAnalysis – коммерческое программное обеспечение, поставляемое вместе с приборами Bruker, позволяет осуществлять обработку и анализ масс-спектров биологических образцов. Алгоритмы программы адаптированы под аналитические платформы Bruker и позволяют выявлять пики соединений при малой интенсивности среди шума.

XCMS имеет функцию-обёртку для использования пакета MassSpecWavelet, который позволяет производить первичную обработку данных без хроматографического разделения.

Поиск пиков соединений в сырых масс-спектрометрических данных производит функция findChromPeaks. Функция в качестве аргумента принимает файлы формата mzML, которые содержат один скан. В связи с тем, что в выбранном датасете в файлах mzML содержится 60 сканов, был написан на языке R блок кода, объединяющий сканы в один:

```
start.time <- Sys.time()
for(i in 1:length(file.prof)){
  pf <- readMSData(file.prof[i], pdata = NULL, mode = "onDisk")
  spec <- MSpectra(spectra(pf))
  comS <- combineSpectra(spec, timeDomain = F, mzd = 0.001, ppm = 1, weighted = TRUE)
  writeMSData(object = as(comS, "MSnExp"), file = paste0(pth2, basename(file.prof[i])))
}
end.time <- Sys.time()
time.tkn <- end.time - start.time</pre>
```

```
print(time.tkn)
```

В опциях функции findChromPeaks перед обработкой данных обязательно необходимо указать параметры для пакета MassSpecWavelet:

msw <- MSWParam(scales = c(1, 4, 9), nearbyPeak = TRUE, winSize.noise = 500,SNR.method = "data.mean", snthresh = 10, verboseColumns = TRUE, peakThr = 1000) combSpec <-readMSData(

(list.files("/home/rsuser/MetData/dt/NutrInst/Combined_Spectra_Ob/", recursive = TRUE, full.names = TRUE)), mode="onDisk")

peaks <- findChromPeaks(combSpec, param = msw)</pre>

Функция возвращает объект XCMSnExp, содержащий информацию о найденных пиках, массовых числах, интенсивностях пиков и времени удерживания. Важно отметить, что значение времени удерживания для каждого пика будет равно -1, так как данные не содержат информации о хроматографии.

Для удобства информацию о найденных пиках следует перевести в объект R – data.frame:

df <- data.frame(peaks@msFeatureData\$chromPeaks)

При сравнении количества найденных пиков при помощи DataAnalysis и XCMS обнаружено, что из 17356 пиков XCMS находит 15279.

Листинги масс, полученные при помощи DataAnalysis и XCMS, были обработаны при помощи пакета MetaboAnalystR с использованием алгоритма Mummichog:

mSet<-InitDataObjects("mass_all", "mummichog", FALSE)

mSet<-SetPeakFormat(mSet, "rmp")</pre>

mSet<-UpdateInstrumentParameters(mSet, 5.0, "positive", "yes", 0.02);

add.vec <- c("M [1+]","M+H [1+]","M+2H [2+]","M+3H [3+]","M+Na [1+]","M+H+Na [2+]","M+K [1+]")

mSet<-Read.PeakListData(mSet, inFles)

mSet<-SanityCheckMummichogData(mSet)

mSet<-Setup.AdductData(mSet, add.vec)

mSet<-PerformAdductMapping(mSet, "positive")

mSet<-SetPeakEnrichMethod(mSet, "mum", "v2")

mSet<-SetMummichogPval(mSet, 0.99)

mSet<-PerformPSEA(mSet, "hsa_kegg", "current", 3, 100)

В результате был получен файл, в котором указана масса найденного соединения, его идентификатор в базе данных KeGG, форма аддукта, по которой произошло совпадение и разница масс.

Для дальнейшего сопоставления найденных соединений с белками создан скрипт на языке Python forMapping.py, который собирает в один файл все KeGG-идентификаторы. Результирующий файл forConvert.txt загружается в веб-Приложение MetaboAnalyst для конвертирования идентификатора в имя соединения. Ошибка, возникшая при работе с API MetaboAnalyst при помощи языка Python зафиксирована в Приложении Д, 1.16.3 – I. Полученные списки идентификаторов соединений в базе данных KeGG в результирующих файлах mumInputData.csv после обработки DataAnalysis и XCMS были использованы для сравнительного анализа метаболических путей – Pathway Analysis веб-Приложения MetaboAnalyst.

Pathway Name	Match Status	р	-log(p)	Holm p	FDR	Impact	S Details
Steroid hormone biosynthesis	74/85	3.6755E-11	10.435	3.0875E-9	3.0875E-9	0.90505	KEGG SMP
Tryptophan metabolism	39/41	5.5675E-9	8.2543	4.621E-7	2.3383E-7	0.9973	KEGG SMP
Arachidonic acid metabolism	34/36	1.0084E-7	6.9964	8.269E-6	2.8236E-6	0.9798	KEGG SMP
Primary bile acid biosynthesis	39/46	9.5255E-6	5.0211	7.7157E-4	1.7486E-4	0.87071	KEGG SMP
Fatty acid degradation	34/39	1.0409E-5	4.9826	8.3268E-4	1.7486E-4	0.99036	KEGG SMP
Nicotinate and nicotinamide metabolism	15/15	9.8161E-5	4.0081	0.0077547	0.0013743	1.0	KEGG SMP
Steroid biosynthesis	34/42	2.4213E-4	3.6159	0.018886	0.0029056	0.837	KEGG
Purine metabolism	49/65	2.8195E-4	3.5498	0.02171	0.0029605	0.74124	KEGG SMP
Valine, leucine and isoleucine degradation	30/40	0.0052236	2.282	0.39699	0.04289	0.72613	KEGG SMP
Histidine metabolism	14/16	0.0054361	2.2647	0.40771	0.04289	0.9508	KEGG SMP
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	28/37	0.0056165	2.2505	0.41562	0.04289	0.80523	KEGG SMP SMP
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	8/8	0.0073972	2.1309	0.54	0.051781	0.0	KEGG SMP
Porphyrin and chlorophyll metabolism	23/30	0.0092386	2.0344	0.66518	0.058403	0.91135	KEGG
Galactose metabolism	21/27	0.0097339	2.0117	0.69111	0.058403	0.56864	KEGG SMP
Arginine and proline metabolism	28/38	0.010443	1.9812	0.73104	0.058483	0.65443	KEGG SMP
Phenylalanine metabolism	9/10	0.020543	1.6873	1.0	0.10785	1.0	KEGG SMP

Рисунок 16.21 - Анализ метаболических путей. Обработка датасета проводилась при помощи DataAnalysis.

Показанные на рисунках 16.21 и 16.22 результаты анализа и построения метаболических путей с использованием MetaboAnalyst демонстрируют, что при обработке данных XCMS теряется большое количество соединений, что не позволяет дать исчерпывающую информацию о биологических процессах. Однако в колонке Pathway Name в случае XCMS на первый план выходят метаболические превращения углеводов с уровнем значимости p < 0,05, в то время как в данных, обработанных DataAnalysis, основное внимания на себя берут биохимические процессы «домашнего хозяйства» - метаболизм аминокислот, жирных кислот, никотиновой кислоты и её амида, азотистых оснований.

Pathway Name	Match Status	р	-log(p)	Holm p	FDR	Impact	S Details
Galactose metabolism	12/27	6.8696E-9	8.1631	5.7705E-7	5.7705E-7	0.75542	KEGG SMP
Arachidonic acid metabolism	10/36	2.128E-5	4.672	0.0017662	8.9375E-4	0.47057	KEGG SMP
Starch and sucrose metabolism	7/18	3.5814E-5	4.4459	0.0029368	0.0010028	0.54856	KEGG SMP
Linoleic acid metabolism	4/5	5.3269E-5	4.2735	0.0043148	0.0011187	1.0	KEGG SMP
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	4/6	1.5262E-4	3.8164	0.01221	0.0025641	0.0	KEGG SMP
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	8/36	8.0472E-4	3.0944	0.063573	0.011266	0.0	KEGG
Steroid hormone biosynthesis	12/85	0.003015	2.5207	0.23517	0.03618	0.16358	KEGG SMP
Caffeine metabolism	3/10	0.017385	1.7598	1.0	0.18254	0.69231	KEGG SMP
Fructose and mannose metabolism	4/20	0.026093	1.5835	1.0	0.24353	0.09765	KEGG SMP
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	5/37	0.061352	1.2122	1.0	0.51536	0.0	KEGG SMP SMP
Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis	1/2	0.11401	0.94306	1.0	0.87061	0.0	KEGG
Arginine and proline metabolism	4/38	0.17992	0.74493	1.0	1.0	0.13058	KEGG SMP
Pyrimidine metabolism	4/39	0.19203	0.71664	1.0	1.0	0.11788	KEGG SMP
Arginine biosynthesis	2/14	0.1966	0.70641	1.0	1.0	0.0	KEGG
Glutathione metabolism	3/28	0.22407	0.64963	1.0	1.0	0.03169	KEGG SMP
Terpenoid backhone biosynthesis	2/18	0.28564	0 54418	1.0	10	0.00952	KEGG

Рисунок 16.22 - Анализ метаболических путей. Обработка датасета проводилась при помощи XCMS.

Для формирования результирующего файла был создан скрипт на языке Python версии 3.7 InputForAnalytics.py. Скрипт производит сопоставление найденных метаболитов с белками, участвующими в их превращении или транспорте, и их кодирующими генами по базам данных UniProt и Ensembl соответственно. Связь метаболита с UniProt осуществлялась через запись о соединении в базе данных HMDB. Полученные UniProtидентификаторы белков при помощи модуля языка Python ensembl_rest, взаимодействующего с API Ensembl, сопоставлялись с ENSG-идентификаторами кодирующих найденные белки генов.

При осуществлении запроса к API Ensembl необходимо увеличить время ожидания ответа:

```
notFound = []
metEnsmbl = {}
for i in allGnDct:
try:
e = ensembl_rest.symbol_lookup(species="homo sapiens", symbol=allGnDct[i])
time.sleep(1)
metEnsmbl.update({i: e["id"]})
except ensembl_rest.core.restclient.HTTPError:
print("No gene!", i)
```

notFound.append(i)

print(notFound, len(notFound))

Ошибки, возникшие при разработке и тестировании стандартной операционной процедуры обработки метаболомных данных прямого ввода зафиксированы в Приложении Д 1.16.3 – I.

Результирующий файл InputDB.csv содержит следующую информацию: KeGGидентификатор метаболита, название метаболита, HMDB-идентификатор метаболита, UniProt-идентификатор белка, связанного с метаболитом, ENSG-идентификатор гена, кодирующий сопоставленный белок.

В результате работы по пункту 1.16 ПГ в соответствии с Техническим заданием Соглашения разработаны СОП, представленные в виде отдельных документов в составе пакета отчетной документации (Файлы: «Пункт_ПГ-1.16-СОП_Illumina_v1»; «Пункт_ПГ-1.16-СОП_metabolom_v1»; «Пункт_ПГ-1.16-СОП_ONT_v1»; «Пункт_ПГ-1.16-СОП_proteom_v1».

16.Разработка архитектуры и требований к интерфейсу базы данных для хранения и обработки результатов мультиомной оцифровки биологических образцов (далее - БД)

В рамках выполнения работ по пункту 1.17 ПГ были разработаны требования к программному обеспечению, к организации входных и выходных данных, к составу и параметрам технических средств, а также к информационной и программной совместимости, необходимые для создания мультиомных баз данных

16.1. Система анализа данных

Сценарий работы Системы анализа данных мультиомной оцифровки представлен на рисунке 17.1.



Рисунок 17 1 - Схема экстраполяции данных мультиомной оцифровки

Оператор Учетной системы производит запрос к Базе знаний об экстраполяции заданных идентификаторов данных мультиомной оцифровки с указанием настроек

аугментации данных и перечислением идентификаторов экстраполируемых экспериментов и идентификаторов нейросетевых моделей. Компонент аугментации данных получает необходимые списки идентификаторов от Базы знаний и производит заданные пользователем модификации на полученные по идентификаторам данные, которые затем переводятся в специальный формат для формирования входного тензора нейросетевой модели в Компоненте векторизации данных. Затем нейросетевая модель проигрывается Компонентом экстраполяции данных с заданным входом, возвращая, таким образом, предсказания по заданному сочетанию экспериментов. Эти данные получают специальную подпись о проведении эксперимента in silico и записываются в Базу знаний. Оператор может пользоваться инструментами анализа данных и поиском корреляций для работы как с экспериментальными данными, так и с экстраполированными. Выбирать используемые модели для экстраполяции и, меняя настройки модификации данных в Компоненте аугментации данных, производить необходимые эксперименты. Оператор может провести статистический анализ добавленных в систему экстраполированных данных наравне с результатами экспериментов с помощью Компонента анализа данных.

16.1.1. Аугментация данных

Аугментация (раздутие) данных включает в себя модификацию свойств данных, полученных из Базы знаний. В зависимости от выбранной для экстраполяции модели могут быть различные возможные для эксперимента настройки модификаций. Маппинги между различными предметными областями строятся относительны идентификаторов базы данных Uniprot. Используя Компонент аугментации данных, оператор может корректировать входные для модели значения таких параметров как, например, время удерживания (англ. retention time), число считываний гена. Таким образом данный инструмент позволит проверить предсказание нейронной сети с измененной по необходимостью пользователя информацией.

16.1.2. Транскриптомные эксперименты

Для моделей, имеющих вход в виде транскриптомных данных возможно приведение считываний генома или транскриптома для заданного гена. В таком случае в Компоненте аугментации данных будет представлена возможность изменения одного или нескольких нуклеотидов во входной РНК/ДНК последовательности (рисунок 17.2-17.3).

Алфавит ДНК-нуклеотидов

- 1. adenine (A)
- 2. cytosine (C)
- 3. guanine (G)

4. thymine (T)

Алфавит РНК-нуклеотидов

- 1. adenine (A)
- 2. cytosine (C)
- 3. guanine (G)
- 4. uracil (U)

Приведенные преобразования будут выполнятся при помощи модуля Компонента интерфейса.



Рисунок 172 - Аугментация ДНК-последовательности гена



Рисунок 17 3 - Аугментация РНК-последовательности гена

16.1.3. Протеомные эксперименты

Для моделей, работающих с протеомными данными возможно предоставление последовательности аминокислот белка в качестве входной информации для нейронной сети. Таким образом, пользователь должен будет иметь возможность заменить одну или несколько аминокислот в заданных позициях.

Алфавит аминокислот:

- 1. alanine ala A
- 2. arginine arg R
- 3. asparagine asn N

- 4. aspartic acid asp D
- 5. cysteine cys C
- 6. glutamine gln Q

7. glutamic acid - glu - E	14. phenylalanine - phe -
8. glycine - gly - G	15. proline - pro - P
9. histidine - his - H	16. serine - ser - S
10. isoleucine - ile - I	17. threonine - thr - T
11. leucine - leu - L	18. tryptophan - trp - W
12. lysine - lys - K	19. tyrosine - tyr - Y
13. methionine - met - M	20. valine - val - V
21.	

Приведенные преобразования будут выполнятся при помощи модуля Компонента интерфейса.

F

16.2. Векторизация данных

Нейросетевые модели для экстраполяции данных мультиомного профилирования должны использовать в качестве входной информации данные о транскриптомной, протеомной и метаболомной частях эксперимента. Для формирования модели сети была выбрана логика построения многомерных матриц формата NxCxHxW, где вторая размерность С (каналы) разделяет карты признаков по типам, а первая размерность N говорит о числе отдельных примеров в формируемом входе. Для построения матрицы было решено использовать размерность H = 20 (число аминокислот, встречающихся в белках организма человека), таким образом один из каналов – матричное one-hot представление аминокислотной последовательности, где каждый вектор-столбец отвечает за одну аминокислоту (из 20 значений все 0, нужный идентификатор аминокислоты = 1). Пример визуализации onehot-кодирования. Отрисованы значения канала, отвечающего за хранение векторизованной аминокислотной последовательности. Высота каждого изображения Н = 20, ширина W = 256. В каждом столбце данной матрицы ровно одно белое пятно, которое стоит на месте нужной аминокислоты. Окно каждого белка подписано идентификатором Uniprot сверху. Аминокислотные последовательности заполняются из Базы знаний во время обучения. Каналы, отвечающие за маппинги баз данных, построены следующим образом:

a) для генов, участвующих в обучении, производится выборка вектора-столбца уникальных идентификаторов от выбранной базы данных;

б) таким образом для каждой базы данных получается используемый алфавит идентификаторов;

- 1. для каждого гена в каждой базе данных строится нулевой вектор-столбец равной длины алфавита БД;
- 2. если у гена есть идентификаторы из базы данных, на их позициях ставится 1;

 далее вектор столбец обрезается по длине равной WxH и укладывается в финальную матрицу.

Данные с численными значениями активности белка, времени удерживания родительского иона и массы объекта предварительно логарифмируются.

16.3. Экстраполяция данных

Экстраполяция данных производится посредством предварительно обученной модели нейронной сети. Для использования нейронной сети Компоненту экстраполяции данных необходимо загрузить конфигурационные файлы со следующей информацией:

- 1. наименование модели нейронной сети;
- 2. наименование типа архитектуры нейронной сети;
- 3. путь до файла параметров модели;
- 4. путь до файла описания архитектуры модели;
- 5. значения C, H, W входного тензора сети;
- 6. информация о методах нормализации данных для предобработки;
- информация об используемых во входе баз данных для подготовки компонентов входа из маппингов идентификаторов;
- 8. для каждой из используемых баз данных алфавит используемых идентификаторов;
- 9. список идентификаторов тестовой выборки для модели;
- 10. используемый нейросетевой фреймворк для проигрывания сети
 - a) PyTorch
 - б) Apache Mxnet
 - в) TensorFlow
- 11. алфавит мультиомных экспериментов с указанием предметной области происхождения данных
 - а) транскриптомика
 - б) метаболомика
 - в) протеомика

Информация о составе входа сети также используется Компонентом аугментации данных и Компонентом векторизации данных. В зависимости от входа сети в Компоненте аугментации появляются различные способы модификации данных, полученных из Базы знаний. Содержание алфавита экспериментов и алфавита идентификаторов баз данных используются Компонентом векторизации данных для правильного формирования входного тензора сети. Полученный из Компонента векторизации данных тензор формата NxCxHxW проигрывается загруженной в память сервера моделью нейронной сети. Далее компонент производит постобработку выхода сети и приступает к потоковой пересылке результата воспроизведения эксперимента in silico в Базу знаний. База знаний формирует уникальный идентификатор замера и сохраняет в свой журнал результат экстраполяции для дальнейшего анализа.

16.4. Учетная система

Для реализации учетной системы используется документоориентированная нереляционная СУБД MongoDB. Системы подобного типа находят своё применение в системах управления содержимым, документальном поиске. Отсутствие реляционности позволяет реализовать записи различных по структуре документов в формате BSON (надмножество JSON) в одну коллекцию данных. Таким образом, хранение схем экспериментальных данных представлено в учетной системе в виде коллекции JSONдокументов вида, представленного на рисунке 17.4.

Листинг і1:	<pre>{ "name": "huhVariations", "headers": { "ensembl": "string", "effectiveLength": "number", "numReads": "number" }, "dataSources": [{ "name": "file", "delimiter": ",", "parser": "tsv", "headerNamesFlattenMapping": ["_ignore", { "delimiter": ".", "mapping": ["ensembl", "variations"] }, "_ignore", "effectiveLength", "_ignore", "numReads"] } </pre>
	"effectiveLength", "_ignore", "numReads"
], "fileIncludesHeaders" : true }]
	}

Рисунок 174 – Листинг для хранения схем экспериментальных данных в учетной системе

16.4.1. Схема данных 1. Схема нормализации файлов эксперимента

Схема данных включает в себя:

a) headers - описание доступных полей в итоговом JSON, а также их тип: string или number

б) dataSources - описание источников данных и пайплайнов трансформации в итоговый объект.

в) преобразование файлов данных экспериментов в хранимые данные доступно путем применения парсера tsv или tsvStrict.

Первая версия позволяет описывать рекурсивный парсинг заголовков, вторая же предназначена для импорта экспериментов с указанием пользовательских заголовков. Поддерживаются форматы семейства .csv с указанием разделителя (по умолчанию \t) в поле delimiter для источников типа parser: tsv определен headerNamesFlattenMapping - упорядоченный список описаний преобразований из строки данных .csv/.tsv в ключи JSON. Доступны следующие операции с каждой из колонок:

a) игнорировать заголовок и колонку данных - _ignore.

б) заменить заголовок на заголовки из mapping, значение снова разделить по delimiter. Добавить полученные пары ключ-значение в выходной объект JSON. Реализует возможность чтения многомерных файлов, массивов.

в) назначить заголовку новое имя - определяется строкой с новым именем заголовка.

г) оставить заголовок без изменений - null или конец списка преобразований.

Преобразования данных в массиве headerNamesFlattenMapping расположены в порядке, соответствующем порядку колонок, полученных в результате разделения по delimiter из описания источника данных. Данные колонок, не описанных в массиве, переносятся как есть, с ключом равным заголовку.

Иллюстрация работы преобразования по схеме 1 из tsv в JSON (листинг i2 на рисунке 17.5).

Листинг i2:	,ENSG,Length,EffectiveLength,TPM 0,ENSG0000000003.15,8464,7714 Вход tsv	,ENSG,Length,EffectiveLength,TPM,NumReads 0,ENSG0000000003.15,8464,7714.0,20.929510999999998,236.97000000000003 Вход tsv				
	{ "ensembl" "variations" : 15,	: "ENSG000000003",				
	"numReads" "effectiveLength": 7714.0 } Выход JSON	: 236.970000000003,				

Рисунок 17 5 – Листинг для преобразования по схеме 1 из tsv в JSON

Для внесения в Учетную систему данных в .csv/.tsv без заголовков, необходимо использовать источник tsvStrict (листинг i3 на рисунке 17.6).



Рисунок 176 – Листинг для внесения в учетную систему данных в .csv/.tsv без заголовков

16.4.2. Схема данных 2.

Схема нормализации файлов соответствия идентификатора генов в одной базе данных (Uniprot) идентификаторам в других базах (Ensembl, Gene_Name, GI, RefSeq...). Включает в себя:

a) headerNames - упорядоченный список имен ключей, по которым данные из каждой строки входного файла будут записаны в выходной объект. Длина данного массива должна быть равна количеству колонок в каждой строке.

б) fileIncludesHeaders признак наличия в файле встроенных заголовков. Встроенные заголовки будут пропущены.

Пример нормализации по Схеме 2 приведен на рисунке 17.7 (листинг i4):

Листинг	P31946 GI 78101741
i4:	P31946 UniRef100 UniRef100_P31946
	Вход tsv { "uniprot" : "P31946", "targetDbName" : "GI", "targetDbKey" : "78101741" } { "uniprot" : "P31946",

	"targetDbName" : "UniRef100", "targetDbKey" : "UniRef100_P31946" }
	Выход JSON

Рисунок 17 7– Листинг для нормализации файлов по схеме 2

16.5. Анализ данных, поиск корреляций

Веб-интерфейс



Рисунок 17.8 - Схема вызова компонента анализа данных.

Поиск корреляций выполняется путем вызова соответствующей функции в пользовательском интерфейсе (рисунок 17.8). Для этого оператор выбирает:

а) идентификаторы наборов экспериментальных данных

- б) идентификаторы наборов экстраполированных данных (опционально)
- в) алгоритм поиска корреляций

и отправляет запрос в Учетную систему, которая производит объединение данных из указанных наборов, имеющих общие ключи, и сообщает оператору о применимости выбранного алгоритма для указанных данных. После этого оператор запускает поиск корреляций и по окончании операции в Пользовательский интерфейс выводятся статистически значимые корреляции в выбранных наборах данных.

16.6. Пользовательский интерфейс

Пользовательский интерфейс (примеры приведены на рисунках 17.9-.17.10) представляет собой набор веб-страниц с элементами управления и предназначен для вызова анализа данных, поиска корреляций, а также хранения результатов. Компонент пользовательского интерфейса представляет собой набор HTML, CSS, JS файлов. Для получения доступа к пользовательскому интерфейсу, оператору необходимо ввести в адресной строке браузера URL опубликованного сервиса.

≡ Genemappings				c 0	
Users Genemappings					
	□ Id ↑	Uniprot key	Target db name	Target db key	
	61a267f0c720fc29b048de7e	P15880	OrthoDB	1197354at2759	
	61a267f0c720fc29b048de7f	P15880	TreeFam	TF300806	
	61a267f0c720fc29b048de7a	P15880	VEuPathDB	HostDB:ENSG00000140988	
	61a267f0c720fc29b048de7d	P15880	OMA	DLKNWVP	
	61a267f0c720fc29b048de7b	P15880	eggNOG	KOG0877	
	61a267f0c720fc29b048de79	P15880	PharmGKB	PA34806	
	61a267f0c720fc29b048de77	P15880	MIM	603624	
	61a267f0c720fc29b048de76	P15880	HGNC	HGNC:10404	
	61a267f0c720fc29b048de78	P15880	neXtProt	NX_P15880	
	61a267f0c720fc29b048de7c	P15880	GeneTree	ENSGT00940000153095	
				Rows per page: 10 - 1-10 of 10	

Рисунок 17.9 - Табличное отображение сущности (маппингов генов) в панели администратора.

Users					
Genemappings	ld 61a267f0c720fc29b048de79				
	Uniprot key P15880				
	Target db name PharmGKB				
	Target db key PA34806				
	SAVE		DELETE		

Рисунок 17.10 - Форма редактирования сущности (маппингов генов) в панели администратора.

Оператору доступны веб-страницы:

a) обзора и редактирования данных, хранящихся в Учетной системе (схемы, маппинги ключей, учетные данные)

б) вызова системы экстраполяции, согласно пункту 1.3

в) вызова системы поиска корреляций, согласно пункту 1.4. Так же оператору доступно визуально представление найденных корреляций

Разработанные в соответствии с пунктом 1.17 ПГ и техническим заданием Соглашения Технические требования к разработке базы данных представлен в составе отчетной документации (файл «Пункт_ПГ-1.17-ТТ-БД_v1»).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За отчетный период, в рамках работ по проекту, в соответствии с Планомграфиком и Техническим заданием Соглашения получены следующие результаты.

Для реализации возможности формирования аннотированной коллекции образцов биоматериала от пациентов разработаны Перечень требований к образцам и характеристикам доноров для формирования коллекций и Протокол сбора, хранения, транспортировки биологических образцов, отвечающих особенностям эксплуатации УНУ «Авогадро». Разработка протоколов обеспечивает получение стандартизированных образцов, пригодных для последующего мультиомного экспериментального анализа с применением высокопроизводительных методов анализа и методов на основе молекулярных детекторов.

Для возможности реализации протеомного профилирования образцов с помощью молекулярного детектора на основе АСМ был разработан Лабораторный регламент получения АСМ-чипов с функционализированной поверхностью, по которому были изготовлены и апробированы АСМ-чипы с функционализированной поверхностью. Показана возможность использования этих чипов для необратимого связывания белков, присутствующих в модельных системах (буферных растворах). Как показали полученные результаты по фишингу белков из модельных растворов, необходимо на последующих этапах условия анализа дополнительно оптимизировать эффективности С целью повышения вылавливания И концентрирования белков на поверхности. За отчетный период разработано Техническое задание на специальное ПО для обработки данных АСМ-анализа, ориентированное на снижения ресурсоемкости массовой обработки данных АСМанализа.

Разработанная Методика идентификации белков на поверхности АСМ-чипов позволяет дополнить данные АСМ-анализа данными масс-спектрометрического анализа (комбинированная система АСМ/МС). При разработке Методики использованы АСМ-чипы с функционализированной поверхностью. Показана возможность идентификации белков на такой поверхности.

Также на отчетном этапе проведен ряд мероприятий для возможности анализа содержания нуклеиновых кислот в образцах. Разработана и апробирована Методика анализа содержания нуклеиновых кислот с использованием нанопроводного

биосенсора в модельных системах. Разработаны Техническое задание на изготовление экспериментальных образцов чипов для нанопроводного детектора (НП-чипов), адаптированных для анализа биологических образцов и Техническое задание на разработку специального ПО для обработки данных анализа, полученных с помощью НП-биосенсора. Разрабатываемое ПО предназначено как для регистрации сигнала, так и для интерпретации полученных результатов. Совокупность выполненных работ направлена на повышение качества и информативности результатов экспериментов с применением НП-биосенсора.

В рамках разработки на базе УНУ «Авогадро» схемы анализа транскриптома в биологических образцах с использованием нанопорового детектора выполнен аналитический обзор существующих решений и характеристик экспериментальной и биоинформатической части на основе опубликованных данных. Разработана схема анализа, которая является базисом для разработки Методики анализа транскриптома в биологических образцах с использованием нанопорового детектора на следующих этапах работ.

В части экспериментальных работ за отчетный период также разработаны Методики молекулярного профилирования протеомного и метаболомного состава биологических образцов с использованием масс-спектрометрического детектора. Разработанные Методики были апробированы в экспериментах по получению молекулярных профилей тестовых биообразцов на протеомном и метаболомном уровнях.

Был разработан Протокол получения наноразмерных частиц для доставки представляющих собой стабильный при хранении лиофильно лекарств, высушенный порошок фосфолипидных частиц со средним диаметром 30 – 50 нм. Решен технологических задач: оптимизированы условия ряд основных технологических процессов (гомогенизация, ультрафильтрации, сублимационная сушка), выбран криопротектор (мальтоза) для сохранения размера частиц при регидратации после лиофильного высушивания. На основании изученных физикохимических свойств фосфолипидных наночастиц был разработан аналитический паспорт.

Разработанная Методика АСМ-визуализации наноразмерных систем для доставки лекарств разработана для исследования возможности введения метода

АСМ в систему разработки новых наноразмерных лекарственных препаратов. Полученные АСМ характеристики высот исследованных тестовых объектов (латексных частиц) сопоставимы с экспериментальными результатами, полученными методом фотонной корреляционной спектроскопии и электронной микроскопии, а также литературными источниками, что позволяет судить об эффективности выбранной методики.

Выполнены разработка СОП обработки первичных мультиомной данных и разработана архитектура и требования к интерфейсу базы данных для хранения и обработки результатов мультиомной оцифровки биологических образцов (далее - БД). В процессе работы операторами технологического процесса проводились исследования различных биоинформатических ПО и подбор команд для СОП.

В результате исследования впервые были созданы три СОП обработки транскриптомных, протеомных и метаболомных данных соответственно. Были разработаны требования к программному обеспечению, к организации входных и выходных данных, к составу и параметрам технических средств, а также к информационной и программной совместимости, необходимые для создания мультиомных баз данных.

По результатам выполненных за отчетный период работ может быть сделано заключение о выполнении работ согласно Плану-графику Соглашения в полном объеме.

Основные результаты проекты размещены на сайте ИБМХ по ссылке https://www.ibmc.msk.ru/research/research

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- Takai-Igarashi T., Kinoshita K., Nagasaki M., Ogishima S., Nakamura N., Nagase S., Nagaie S., Saito T., Nagami F., Minegishi N., Suzuki Y., Suzuki K., Hashizume H., Kuriyama S., Hozawa A., Yaegashi N., Kure S., Tamiya G., Kawaguchi Y., Tanaka H., Yamamoto M. Security controls in an integrated Biobank to protect privacy in data sharing: rationale and study design // BMC medical informatics and decision making — 2017. — Vol. 17, No. 1. P. 100.
- Grady C. Enduring and emerging challenges of informed consent // The New England journal of medicine — 2015. — Vol. 372, No. 9. P. 855—862.
- 3. Sand K., Kaasa S., Loge J.H. The Understanding of Informed Consent Information—Definitions and Measurements in Empirical Studies // AJOB Prim. Res. 2010. Vol. 1, No. 2. P. 4—24.
- 4. Лынёв В.С., Косарева Ю.С. Основные преимущества использования вакуумных систем для взятия крови // Медицинский Алфавит. Современная Лаборатория. 2013. № 3. С.76—81.
- Вакуумные системы от А до Я на примере PUTH Vacumine: методические рекомендации / Долгов В.В., Джангирова Т.В., Ройтман А.П., Тохман М.А. — М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2012. — 28 с.
- 6. Руководство по организации, обслуживанию и использованию оборудования холодовой цепи для крови / Всемирная организация здравоохранения. 2009. 115с.
- Hsieh S. Y., Chen R. K., Pan Y. H., Lee H. L. Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling // Proteomics. — 2006. — Vol. 6, No. 10. P. 3189—3198.
- Nederhand R.J., Droog S., Kluft C., Simoons M. L., de Maat M. P., Investigators of the EUROPA tria. Logistics and quality control for DNA sampling in large multicenter studies // Journal of thrombosis and haemostasis. — 2003. — Vol. 1, No. 5. P. 987—991.
- 9. Nutrition Research Methodologies / Lovegrove J., Hodson L., Sharma S., Lanbam-New S. Hoboken: Wiley, 2015. 359p.
- Malsagova K., Kopylov A., Stepanov A., Butkova T., Sinitsyna A., Izotov A., Kaysheva A. Biobanks-A Platform for Scientific and Biomedical Research // Diagnostics. — 2020. — Vol. 10, No. 7. P. 485.
- 11. Plebani M. Quality indicators to detect pre-analytical errors in laboratory testing // The Clinical biochemist. Reviews. 2012. Vol. 33, No. 3. P. 85—88.
- 12. Boyanton B.L., Blick K.E. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum // Clinical chemistry 2002. Vol. 48, No. 12. P. 2242—2247.
- Coppola L., Cianflone A., Grimaldi A. M., Incoronato M., Bevilacqua P., Messina F., Baselice S., Soricelli A., Mirabelli P., Salvatore M. Biobanking in health care: evolution and future directions // Journal of translational medicine — 2019. — Vol. 17, No. 1. P. 172.
- Simundic A. M., Nikolac N., Vukasovic I., Vrkic N. The prevalence of preanalytical errors in a Croatian ISO 15189 accredited laboratory // Clinical chemistry and laboratory medicine — 2010.
 — Vol. 48, No. 7. P. 1009—1014.
- 15. Lippi G., Becan-McBride K., Behúlová D., Bowen R. A., Church S., Delanghe J., Grankvist K., Kitchen S., Nybo M., Nauck M., Nikolac N., Palicka V., Plebani M., Sandberg S., Simundic A. M. Preanalytical quality improvement: in quality we trust // Clinical chemistry and laboratory medicine — 2013. — Vol. 51, No. 1. P. 229—241.
- Elliott P., Peakman T. C., UK Biobank. The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine // International journal of epidemiology — 2008. — Vol. 37, No. 2. P. 234—244.
- 17. Fagan M., Ball P. Design and implementation of a large-scale liquid nitrogen archive // International journal of epidemiology 2008. Vol. 37, Suppl 1. P. i62- i64.
- Holland N.T., Smith M. T., Eskenazi B., Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies // Mutation research — 2003. — Vol. 543, No. 3. P. 217— 234.
- Callari M., Tiberio P., De Cecco L., Cavadini E., Dugo M., Ghimenti C., Daidone M. G., Canevari S., Appierto V. Feasibility of circulating miRNA microarray analysis from archival plasma samples // Analytical biochemistry — 2013. — Vol. 437, No. 2. P. 123—125.

- Sourvinou I.S., Markou A., Lianidou E.S. Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability // The Journal of molecular diagnostics — 2013. — Vol. 15, No. 6. P. 827—834.
- Baranyai T., Herczeg K., Onódi Z., Voszka I., Módos K., Marton N., Nagy G., Mäger I., Wood M. J., El Andaloussi S., Pálinkás Z., Kumar V., Nagy P., Kittel Á., Buzás E. I., Ferdinandy P., Giricz Z. Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods // PloS one. Public Library of Science 2015. Vol. 10, No. 12. P. e0145686.
- 22. Kim J. W., Wieckowski E., Taylor D. D., Reichert T. E., Watkins S., Whiteside T. L. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes // Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research 2005. Vol. 11, No. 3. P. 1010—1020.
- Guerin J. S., Murray D. W., McGrath M. M., Yuille M. A., McPartlin J. M., Doran P. P. Molecular medicine ireland guidelines for standardized biobanking // Biopreservation Biobanking. — 2010.
 — Vol. 8, No. 1. P. 3—63.
- Mohamadkhani A., Poustchi H. Repository of Human Blood Derivative Biospecimens in Biobank: Technical Implications // Middle East journal of digestive diseases — 2015. — Vol. 7, No. 2. P. 61—68.
- 25. Shabihkhani M., Lucey G. M., Wei B., Mareninov S., Lou J. J., Vinters H. V., Singer E. J., Cloughesy T. F., Yong W. H. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings // Clinical biochemistry — 2014. — Vol. 47, No. 4—5. P. 258—266.
- 26. Duale N., Lipkin W. I., Briese T., Aarem J., Rønningen K. S., Aas K. K., Magnus P., Harbak K., Susser E., Brunborg G. Long-term storage of blood RNA collected in RNA stabilizing Tempus tubes in a large biobank — evaluation of RNA quality and stability // BMC research No.tes — 2014. — Vol. 7, P. 633.
- 27. King M.-J., Garçon L., Hoyer J. D., Iolascon A., Picard V., Stewart G., Bianchi P., Lee S. H., Zanella A., International Council for Standardization in Haematology. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders // International journal of laboratory hematology — 2015. — Vol. 37, No. 3. P. 304—325.
- Common Minimum Technical Standards and Protocols for Biobanks Dedicated to Cancer Research / M. Mendy, E. Caboux, R. T. Lawlor, J. Wright, C. P. Wild. — Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2017. — 101 pages.
- Bush V. J., Janu M. R., Bathur F., Wells A., Dasgupta A. Comparison of BD Vacutainer SST Plus Tubes with BD SST II Plus Tubes for common analytes // Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry — 2001. — Vol. 306, No. 1—2. P. 139—143.
- Kerkay J., Coburn C. M., McEvoy D. Effect of sodium ascorbate concentration on the stability of samples for determination of serum folate levels // American journal of clinical pathology — 1977.
 Vol. 68, No. 4. P. 481—484.
- 31. Oxnard G. R., Paweletz C. P., Sholl L. M. Genomic Analysis of Plasma Cell-Free DNA in Patients With Cancer // JAMA oncology 2017. Vol. 3, No. 6. P. 740—741.
- Ignatiadis M., Dawson S.-J. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for precision medicine: dream or reality? // Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology — 2014. — Vol. 25, No. 12. P. 2304—2313.
- 33. Devonshire A. S., Whale A. S., Gutteridge A., Jones G., Cowen S., Foy C. A., Huggett J. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification //Analytical and bioanalytical chemistry — 2014. — Vol. 406, No. 26. P. 6499—6512.
- 34. Wong D., Moturi S., Angkachatchai V., Mueller R., DeSantis G., van den Boom D., Ehrich M. Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing // Clinical biochemistry 2013. Vol. 46, No. 12. P. 1099—1104.
- Hidestrand M., Stokowski R., Song K., Oliphant A., Deavers J., Goetsch M., Simpson P., Kuhlman R., Ames M., Mitchell M., Tomita-Mitchell A. Influence of temperature during transportation on cell-free DNA analysis // Fetal diagnosis and therapy 2012. Vol. 31, No. 2. P. 122—128.
- 36. Spornraft M., Kirchner B., Haase B., Benes V., Pfaffl M. W., Riedmaier I. Optimization of Extraction of Circulating RNAs from Plasma — Enabling Small RNA Sequencing // PloS one. Public Library of Science — 2014. — Vol. 9, No. 9. P. e107259.

- 37. Aibaidula A., Lu J. F., Wu J. S., Zou H. J., Chen H., Wang Y. Q., Qin Z. Y., Yao Y., Gong Y., Che X. M., Zhong P., Li S. Q., Bao W. M., Mao Y., Zhou L. F. Establishment and maintenance of a standardized glioma tissue bank: Huashan experience // Cell and tissue banking 2015. Vol. 16, No. 2. P. 271—281.
- 38. Hedegaard J., Thorsen K., Lund M. K., Hein A. M., Hamilton-Dutoit S. J., Vang S., Nordentoft I., Birkenkamp-Demtröder K., Kruhøffer M., Hager H., Knudsen B., Andersen C. L., Sørensen K. D., Pedersen J. S., Ørntoft T. F., Dyrskjøt L. Next-generation sequencing of RNA and DNA isolated from paired fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples of human cancer and normal tissue // PloS one — 2014. — Vol. 9, No. 5. P. e98187.
- Florell S. R., Coffin C. M., Holden J. A., Zimmermann J. W., Gerwels J. W., Summers B. K., Jones D. A., Leachman S. A. Preservation of RNA for functional genomic studies: a multidisciplinary tumor bank protocol // Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2001. Vol. 14, No. 2. P. 116—128.
- 40. Mitra A., Mishra L., Li S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy // Trends in biotechnology 2013. Vol. 31, No. 6. P. 347—354.
- 41. Giannini C., Sarkaria J. N., Saito A., Uhm J. H., Galanis E., Carlson B. L., Schroeder M. A., James C. D. Patient tumor EGFR and PDGFRA gene amplifications retained in an invasive intracranial xenograft model of glioblastoma multiforme // Neuro-oncology 2005. Vol. 7, No. 2. P. 164—176.
- Witoń M., Strapagiel D., Gleńska-Olender J., Chróścicka A., Ferdyn K., Skokowski J., Kalinowski L., Pawlikowski J., Marciniak B., Pasterk M., Matera-Witkiewicz A., Kozera Ł. Organization of BBMRI.pl: The Polish Biobanking Network // Biopreservation and biobanking 2017. Vol. 15, No. 3. P. 264—269.
- 43. Podzimek S., Vondrackova L., Duskova J., Janatova T., Broukal Z. Salivary Markers for Periodontal and General Diseases // Disease markers 2016. Vol. 2016, P. 9179632.
- 44. Bilek M. M. M. Biofunctionalization of surfaces by energetic ion implantation: review of progress on applications in implantable biomedical devices and antibody microarrays //Applied surface science 2014. Vol. 310, P. 3-10.
- 45. Bayramoğlu G., Arıca M. Y. Enzymatic removal of phenol and pchlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads // Journal of hazardous materials — 2008. — Vol. 156, No. 1- 3. P. 148-155.
- Meyers S. R., Khoo X., Huang X., Walsh E. B., Grinstaff M. W., Kenan D. J. The development of peptide-based interfacial biomaterials for generating biological functionality on the surface of bioinert materials // Biomaterials — 2009. — Vol. 30, No. 3. P. 277-286.
- 47. Basso A., Serban S. Industrial applications of immobilized enzymes-A review // Molecular Catalysis 2019. Vol. 479, P. 110607.
- 48. Ivanov Y. D., Kaysheva A. L., Frantsuzov P. A., Pleshakova T. O., Krohin N. V., Izotov A. A., Shumov I. D., Uchaikin V. F., Konev V. A., Ziborov V. S., Archakov, A. I. Detection of hepatitis C virus core protein in serum by atomic force microscopy combined with mass spectrometry // International journal of Nanomedicine — 2015. — Vol. 10, P. 1597-1608.
- Ivanov Y.D., Danichev V. V., Pleshakova T. O., Shumov I. D., Ziborov V. S., Krokhin N. V., Zagumennyĭ M. N., Ustinov V. S., Smirnov L. P., Shironin A. V., Archakov, A. I. Irreversible chemical AFM-based fishing for the detection of lowcopied proteins. Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem. — 2013. — Vol. 7, P. 46—61
- 50. Иванов Ю. Д., Даничев В. В., Плешакова Т. О., Шумов И. Д., Зиборов В. С., Крохин Н. В., Загуменный М. Н., Устинов В. С., Смирнов Л. П., Широнин А. В., Арчаков А. И. Химический необратимый фишинг низкокопийных белков // Биомедицинская химия. — 2014. — Т. 60. — №. 1. — С. 28-50.
- Dancil K. P. S., Greiner D. P., Sailor M. J. A porous silicon optical biosensor: detection of reversible binding of IgG to a protein A-modified surface // Journal of the American Chemical Society — 1999. — Vol. 121, No. 34. P. 7925-7930.
- 52. Carvalho F., Paradiso P., Saramago B., Ferraria A., Rego A. M. B., Fernandes P. An integrated approach for the detailed characterization of an immobilized enzyme // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2016. Vol. 125, P. 64-74.
- 53. Mattson G., Conklin E., Desai S., Nielander G., Savage M. D., Morgensen S. A practical approach to crosslinking // Molecular biology reports 1993. Vol. 17, No. 3. P. 167-183.

- 54. Karrasch S., Dolder M., Schabert F., Ramsden J., Engel A. Covalent binding of biological samples to solid supports for scanning probe microscopy in buffer solution // Biophysical journal 1993. Vol. 65, No. 6. P. 2437-2446.
- 55. Voskresenska V., Wilson R. M., Panov M., Tarnovsky A. N., Krause J. A., Vyas S., Winter A. H., Hadad C. M. Photoaffinity labeling via nitrenium ion chemistry: protonation of the nitrene derived from 4-amiNo.-3-nitrophenyl azide to afford reactive nitrenium ion pairs // Journal of the American Chemical Society — 2009. — Vol. 131, No. 32. P. 11535-11547.
- 56. Preston G. W., Wilson A. J. Photo-induced covalent cross-linking for the analysis of biomolecular interactions // Chemical Society Reviews 2013. Vol. 42, No. 8. P. 3289-3301.
- Hoffmann J. E. Bifunctional Non-Canonical amino acids: combining photocrosslinking with click chemistry // Biomolecules — 2020. — Vol. 10, No. 4. P. 578.
- 58. Wu Y., Olsen L. B., Lau Y. H., Jensen C. H., Rossmann M., Baker Y. R., Sore H. F., Collins S., Spring D. R. Development of a multifunctional benzophenone linker for peptide stapling and photoaffinity labelling // Chembiochem: a European journal of chemical biology — 2016. — Vol. 17, No. 8. P. 689-692.
- Palumbo F., Andreu I., Brunetti M., Schmallegger M., Gescheidt G., Neshchadin D., Miranda M. A. Hydrogen Abstraction from the C15 Position of the Cholesterol Skeleton // The Journal of organic chemistry — 2019. — Vol. 84, No. 23. P. 15184-15191.
- Jakubovska J., Tauraitė D., Meškys R. A versatile method for the UVAinduced cross-linking of acetophenone-or benzophenone-functionalized DNA // Scientific reports — 2018. — Vol. 8, No. 1. P. 1-10.
- 61. Tsai H., Doong R., Lin C. A strategy for multi-protein- immobilization using N-succinimidyl 4-Benzoylbenzoic Acid as the Photolabile Ligand // Analytical Sciences — 2001. — Vol. 17, No. ICAS2001. P. i269.
- 62. Wu X., Tang Q., Liu C., Li Q., Guo Y., Yang Y., Lv X., Geng L., Deng Y. Protein photoimmobilizations on the surface of quartz glass simply mediated by benzopheNo.ne // Applied surface science 2011. Vol. 257, No. 17. P. 7415-7421.
- 63. Valueva A. A., Shumov I. D., Kaysheva A. L., Ivanova I. A., Ziborov V. S., Ivanov Y. D., Pleshakova T. O. Covalent Protein Immobilization onto Muscovite Mica Surface with a Photocrosslinker //Minerals 2020. Vol. 10, No. 5. P. 464.
- Shannon L. M., Kay E., Lew J. Y. Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties // The Journal of biological chemistry — 1966. — Vol. 241, No. 9. P. 2166— 2172.
- Aibara S., Yamashita H., Mori E., Kato M., Morita Y. Isolation and characterization of five neutral isoenzymes of horseradish peroxidase // Journal of biochemistry — 1982. — Vol. 92, No. 2. P. 531—539.
- 66. Clinical aspects of the plasma proteins / T. Kawai. Berlin, Germany: Springer, 2013. 464 pages.
- 67. Phan H. T., Bartelt-Hunt S., Rodenhausen K. B., Schubert M., Bartz J. C. Investigation of bovine serum albumin (BSA) attachment onto self-assembled monolayers (SAMs) using combinatorial quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) and spectroscopic ellipsometry (SE) // PloS one 2015. Vol. 10, No. 10. P. e0141282.
- Sun Y. S., Zhu X. Characterization of bovine serum albumin blocking efficiency on epoxyfunctionalized substrates for microarray applications // Journal of laboratory automation — 2016. — Vol. 21, No. 5. P. 625-631.
- 69. Кайшева А.Л., Плешакова Т.О., Французов П.А., Иванов Ю.Д., Згода В.Г., Зибров. В.С., Крохин Н.В., Ястребова О.В., Конев В.А., Учайкин В.Ф., Арчаков А.И. Визуализиция и идентификация вирусных частиц гепатита С при помощи атомносиловой микроскопии, сопряженной с масс-спектрометрией // Биомедицинская химия. — 2010. — Т. 56. — № 1. — С. 26-39.
- Shevchenko A., Keller P., Scheiffele P., Mann M., Simons, K. Identification of components of trans-Golgi network-derived transport vesicles and detergent-insoluble complexes by nanoelectrospray tandem mass spectrometry // Electrophoresis — 1997. — Vol. 18, No. 14. P. 2591-2600
- Kaysheva A.L., Pleshakova T. O., Stepanov A. A., Ziborov V. S., Saravanabhavan S. S., Natesan B., Archakov A. I., Ivanov, Y. D. Immuno-MALDI MS dataset for improved detection of HCVcoreAg in sera // Data in brief 2019. —Vol. 25, P. 104240.
- 72. Kaysheva A.L., Frantsuzov P. A., Kopylov A. T., Pleshakova T. O., Stepanov A. A., Malsagova K. A., Archakov A. I., Ivanov Y. D. Mass Spectrometric Identification of Proteins Enhanced by the Atomic Force Microscopy Immobilization Surface // International Journal of Molecular Sciences 2021. Vol. 22, No. 1. P. 431.
- 73. Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для анализа высокомолекулярных и металлоорганических соединений. Электронное учебно-методическое пособие / Гришин И.Д. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверитет, 2014. 49 с.
- 74. Soltwisch J., Berkenkamp S., Dreisewerd K. A binary matrix of 2,5-dihydroxybenzoic acid and glycerol produces homogenous sample preparations for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // Rapid communications in mass spectrometry — 2008. — Vol. 22, No. 1. P. 59-66.
- 75. Cramer R., Karas M., Jaskolla T. W. Enhanced MALDI MS Sensitivity by weak base additives and glycerol sample coating // Analytical Chemistry 2014. Vol. 86, No. 1. P. 744—751.
- 76. Mass Spectrometry: An Applied Approach / M. Smoluch, G. Grasso, P. Suder, J. Silberring. New York, USA: Wiley, 2019. 448 pages.
- 77. Rozengurt E., Heppel L. A. A Specific effect of external ATP on the permeability of transformed 3T3 cells // Biochem Biophys Res Commun 1975. Vol. 67, No. 4. P. 1581—1588.
- Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M. Real time quantitative PCR // Genome research — 1996. — Vol. 6, No. 10. P. 986—994.
- 79. Li B., Ren N., Yang L., Liu J., Huang Q. A qPCR method for genome editing efficiency determination and single-cell clone screening in human cells // Scientific reports 2019. Vol. 9, No. 1. P. 18877.
- Ye J., Xu M., Tian X., Cai S., Zeng S. Research advances in the detection of miRNA // Journal of Pharmaceutical Analysis — 2019. — Vol. 9, No. 4. P. 217—226.
- 81. Sauer E., Babion I., Madea B., Courts C. An evidence based strategy for normalization of quantitative PCR data from miRNA expression analysis in forensic organ tissue identification // Forensic Science International. Genetics — 2014. — Vol. 13, P. 217—223.
- Forootan A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., & Kubista, M. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR) // Biomolecular Detection and Quantification — 2017. — Vol. 12, P. 1—6.
- Hoy M. A. DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction // Insect Molecular Genetics. Elsevier — 2013. P. 307—372.
- 84. Gan S. D., Patel K. R. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay // The Journal of Investigative Dermatology 2013. Vol. 133, No. 9. P. e12.
- 85. Archakov A. I., Ivanov Y. D., Lisitsa A. V., Zgoda, V. G. AFM fishing nanotechnology is the way to reverse the Avogadro number in proteomics // Proteomics 2007. Vol. 7, No. 1. P. 4—9.
- Armirotti A., Damonte G. Achievements and perspectives of top-down proteomics // Proteomics — 2010. — Vol. 10, No. 20. P. 3566—3576.
- Wu L., Qu X. Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges // Chemical Society reviews — 2015. — Vol. 44, No. 10. P. 2963—2997.
- Várallyay É., Burgyán J., Havelda Z. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes // Nature protocols — 2008. — Vol. 3, No. 2. P. 190—196.
- 89. Tian T., Wang J., Zhou X. A review: microRNA detection methods // Organic biomolecular chemistry 2015. Vol. 13, No. 8. P. 2226—2238.
- Kloosterman W. P., Wienholds E., de Bruijn E., Kauppinen S., Plasterk R. H. In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes // Nature methods — 2006. — Vol. 3, No. 1. P. 27—29.
- 91. Duan D., Zheng K. X., Shen Y., Cao R., Jiang L., Lu Z., Yan X., Li J. Label-free high-throughput microRNA expression profiling from total RNA // Nucleic acids research — 2011. — Vol. 39, No. 22. P. e154.
- 92. Beckers M., Mohorianu I., Stocks M., Applegate C., Dalmay T., Moulton V. Comprehensive processing of high-throughput small RNA sequencing data including quality checking, normalization, and differential expression analysis using the UEA sRNA Workbench // RNA 2017. Vol. 23, No. 6. P. 823—835.

- 93. Chen J. Zhou X., Ma Y., Lin X., Dai Z., Zou X. Asymmetric exponential amplification reaction on a toehold/biotin featured template: an ultrasensitive and specific strategy for isothermal microRNAs analysis // Nucleic acids research — 2016. — Vol. 44, No. 15. P. e130.
- Mabey D., Peeling R. W., Ustianowski A., Perkins, M. D. Diagnostics for the developing world // Nature reviews Microbiology — 2004. — Vol. 2, No. 3. P. 231—240.
- 95. Yoon H., Jang J. Conducting-Polymer Nanomaterials for High-Performance Sensor Applications: Issues and Challenges // Adv. Funct. Mater 2009. Vol. 19, No. 10. P. 1567—1576.
- 96. Xu K., Huang J., Ye Z., Ying Y., Li, Y. Recent Development of nano-materials used in DNA biosensors // Sensors 2009. Vol. 9, No. 7. P. 5534—5557.
- Kumar A., Malinee M., Dhiman A., Kumar A., Sharma T. Aptamer Technology for the Detection of Foodborne Pathogens and Toxins // Advanced Biosensors for Health Care Applications — 2019. P. 45—69.
- Awang M. S., Bustami Y., Hamzah H. H., Zambry N. S., Najib M. A., Khalid M. F., Aziah I., Abd Manaf A. Advancement in Salmonella Detection Methods: From Conventional to Electrochemical-Based Sensing Detection // Biosensors — 2021. — Vol. 11, No. 9. P. 346.
- 99. Cui Y., Zhong Z., Wang D., Wang W.U., Lieber C.M. High Performance Silicon Nanowire Field Effect Transistors // Nano Letters 2003. Vol. 3, No. 2. P. 149—152.
- 100. Noor M. O., Krull U. J. Silicon nanowires as field-effect transducers for biosensor development: a review // Analytica chimica acta 2014. Vol. 825, P. 1—25.
- 101. Gao A., Dai P., Lu N., Li T., Wang Y., Hemmila S., Kallio P. Integration of microfluidic system with silicon nanowires biosensor for multiplexed detection // International Conference on Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale. Suzhou, China: IEEE — 2013. — P. 333—336.
- 102. Shehada N., Cancilla J. C., Torrecilla J. S., Pariente E. S., Brönstrup G., Christiansen S., Johnson D. W., Leja M., Davies M. P., Liran O., Peled N., Haick H. Silicon Nanowire Sensors Enable Diagnosis of Patients via Exhaled Breath // ACS nano — 2016. — Vol. 10, No. 7. P. 7047— 7057.
- 103. Kim J. Y., Ahn J. H., Moon D. I., Park T. J., Lee S. Y., Choi Y. K. Multiplex electrical detection of avian influenza and human immunodeficiency virus with an underlap-embedded silicon nanowire field-effect transistor // Biosensors and Bioelectronics 2014. Vol. 55, P. 162—167.
- 104. Zheng G., Patolsky F., Cui Y., Wang W. U., Lieber C. M. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays // Nature Biotechnology — 2005. — Vol. 23, No. 10. P. 1294—1301.
- 105. Gao A., Yang X., Tong J., Zhou L., Wang Y., Zhao J., Mao H., Li T. Multiplexed detection of lung cancer biomarkers in patients serum with CMOS-compatible silicon nanowire arrays // Biosensors and Bioelectronics — 2017. — Vol. 91. P. 482—488.
- 106. Cheng S., Hideshima S., Kuroiwa S., Nakanishi T., Osaka T. Label-free detection of tumor markers using field effect transistor (FET)-based biosensors for lung cancer diagnosis // Sensors and Actuators B: Chemical — 2015. — Vol. 212, P. 329—334.
- 107. Lu N., Gao A., Dai P., Li T., Wang Y., Gao X., Song S., Fan C., Wang Y. Ultra-sensitive nucleic acids detection with electrical nanosensors based on CMOS-compatible silicon nanowire field-effect transistors // Methods — 2013 — Vol. 63, No. 3. P. 212—218.
- 108. Gao A., Lu N., Wang Y., Dai P., Li T., Gao X., Wang Y., Fan, C. Enhanced sensing of nucleic acids with silicon nanowire field effect transistor biosensors // Nano letters — 2012. — Vol. 12, No. 10. P. 5262—5268.
- 109. Ahmad R., Mahmoudi T., Ahn M. S., Hahn Y. B. Recent advances in nanowires-based field-effect transistors for biological sensor applications // Biosensors and Bioelectronics 2018. Vol. 100, P. 312—325.
- Patolsky F., Lieber C.M. Nanowire nanosensors // Materials Today 2005. Vol. 8, No.
 4. P. 20—28.
- 111. Patolsky F., Zheng G., Lieber C.M. Nanowire sensors for medicine and the life sciences // Nanomedicine 2006. Vol. 1, No. 1. P. 51—65.
- 112. Patolsky F., Zheng G., Hayden O., Lakadamyali M., Zhuang X., Lieber C. M. Electrical detection of single viruses // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004. Vol. 101, No. 39. P. 14017—14022.

- 113. Li J., He G., Ueno H., Jia C., Noji H., Qi C., Guo X. Direct real-time detection of single proteins using silicon nanowire-based electrical circuits // Nanoscale — 2016. — Vol. 8, No. 36. P. 16172—16176.
- 114. Syu Y. C., Hsu W. E., Lin C. T. Review—Field-Effect Transistor Biosensing: Devices and Clinical Applications // ECS Journal Solid State Science Technology — 2018. — Vol. 7, No. 7. P. Q3196—Q3207.
- 115. Ambhorkar P., Wang Z., Ko H., Lee S., Koo K. I., Kim K., Cho D. D. Nanowire-Based Biosensors: From Growth to Applications // Micromachines 2018. Vol. 9, No. 12. P. 679.
- Elfström N., Juhasz R., Sychugov I., Engfeldt T., Karlström A. E., Linnros, J. Surface Charge Sensitivity of Silicon Nanowires: Size Dependence // Nano letters — 2007. — Vol. 7, No. 9. P. 2608—2612.
- Li Z., Rajendran B., Kamins T. I., Li X., Chen Y., Williams R.S. Silicon nanowires for sequence-specific DNA sensing: device fabrication and simulation // Applied Physics A 2005.
 Vol. 80, No. 6. P. 1257—1263.
- 118. Кузнецов Е. В., Рыбачек Е. Н., Кузнецов А. Е. Подготовка поверхности кремниевых нанопроволочных сенсоров для биохимической диагностики // Инновационная экономика. 2010. Т. 4. С. 104—108.
- 119. Naumova O. V., Fomin B. I., Malyarenko N. F., Popov V. P. Modification and Characterization of the Surface of SOI Nanowire Sensors // Journal of Nano Research —2012. — Vol. 18—19, P. 139—147.
- Smet L. C., Ullien D., Mescher M., Sudhölter E. J. Organic Surface Modification of Silicon Nanowire-Based Sensor Devices // Nanowires - Implementations and Applications —2011. — P.267-288.
- 121. Patolsky F., Zheng G., Lieber C. M. Fabrication of silicon nanowire devices for ultrasensitive, label-free, real-time detection of biological and chemical species // Nature Protocols — 2006. — Vol. 1, No. 4. P. 1711—1724.
- 122. Cui Y. Lieber C. M. Functional nanoscale electronic devices assembled using silicon nanowire building blocks // Science 2001. Vol. 291, No. 5505. P. 851—853.
- 123. Wang X., Chen Y., Gibney K. A., Erramilli S., Mohanty P. Silicon-based nanochannel glucose sensor // Applied Physics Letters 2008. Vol. 92, No. 1. P. 013903.
- 124. Li D.-C., Yang P.-H., Lu M.S.-C. CMOS Open-Gate Ion-Sensitive Field-Effect Transistors for Ultrasensitive Dopamine Detection // IEEE Trans. Electron Devices — 2010. — Vol. 57, No. 10. P. 2761—2767.
- 125. Lin M.C., Chu C. J., Tsai L. C., Lin H. Y., Wu C. S., Wu Y. P., Wu Y. N., Shieh D. B., Su Y. W., Chen C. D. Control and Detection of Organosilane Polarization on Nanowire Field-Effect Transistors // Nano Letters 2007. Vol. 7, No. 12. P. 3656—3661.
- 126. Lobert P. E., Boourgeois D., Pampin R., Akheyar A., Hagelsieb L. M., Flandre D., Remacle J. Immobilization of DNA on CMOS compatible materials // Sensors and Actuators B: Chemical 2003. Vol. 92, No. 1–2. P. 90–97.
- 127. Tothill I. E. Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector // Computers and Electronics in Agriculture 2001. Vol. 30, No. 1—3. P. 205—218.
- 128. Patel P.D. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review // TrAC Trends in Analytical Chemistry 2002. Vol. 21, No. 2. P. 96—115.
- 129. Lin L., Rong M., Luo F., Chen D., Wang Y., Chen X. Luminescent graphene quantum dots as new fluorescent materials for environmental and biological applications // TrAC Trends in Analytical Chemistry — 2014. — Vol. 54, P. 83—102.
- 130. Maia M., Takahashi H., Adler K., Garlick R. K., Wands J. R. Development of a two-site immuno-PCR assay for hepatitis B surface antigen // Journal of virological methods 1995. Vol. 52, No. 3. P. 273—286.
- 131. Monjezi R., Tan S. W., Tey B. T., Sieo C. C., Tan W. S. Detection of hepatitis B virus core antigen by phage display mediated TaqMan real-time immuno-PCR // Journal of virological methods 2013. Vol. 187, No. 1. P. 121—126.
- 132. Zheng G., Lieber C. M. Nanowire Biosensors for Label-Free, Real-Time, Ultrasensitive Protein Detection // Methods in molecular biology 2011. Vol. 790, P. 223—237.

- 133. Moon J. M., Hui Kim Y., Cho Y. A nanowire-based label-free immunosensor: Direct incorporation of a PSA antibody in electropolymerized polypyrrole // Biosensors and Bioelectronics 2014. Vol. 57, P. 157—161.
- 134. Chiorcea-Paquim A. M., Oliveira-Brett A. M. DNA Electrochemical Biosensors for In Situ Probing of Pharmaceutical Drug Oxidative DNA Damage // Sensors — 2021. — Vol. 21, No. 4. P. 1125.
- Sassolas A., Leca-Bouvier B. D., Blum L. J. DNA Biosensors and Microarrays // Chemical reviews — 2008. — Vol. 108, No. 1. P. 109—139.
- 136. Кульбачинский А.В. Методы отбора аптамеров к белковым мишеням // Успехи биологической химии. 2006. №. 46. С. 193—224.
- 137. Hahm J., Lieber C. M. Direct Ultrasensitive Electrical Detection of DNA and DNA Sequence Variations Using Nanowire Nanosensors // Nano letters — 2004. — Vol. 4, No. 1. P. 51—54.
- 138. Gao A., Lu N., Dai P., Li T., Pei H., Gao X., Gong Y., Wang Y., Fan C. Silicon-Nanowire-Based CMOS-Compatible Field-Effect Transistor Nanosensors for Ultrasensitive Electrical Detection of Nucleic Acids // Nano letters — 2011. — Vol. 11, No. 9. P. 3974—3978.
- 139. Li Z., Chen Y., Li X., Kamins T. I., Nauka K., Williams R. S. Sequence-Specific Label-Free DNA Sensors Based on Silicon Nanowires // Nano letters — 2004. — Vol. 4, No. 2. P. 245— 247.
- 140. Zhang G. J., Luo Z. H., Huang M. J., Tay G. K., Lim E. J. Morpholino-functionalized silicon nanowire biosensor for sequence-specific label-free detection of DNA // Biosensors and Bioelectronics 2010. Vol. 25, No. 11. P. 2447—2453.
- 141. Lu N., Gao A., Dai P., Song S., Fan C., Wang Y., Li T. CMOS-Compatible Silicon Nanowire Field-Effect Transistors for Ultrasensitive and Label-Free MicroRNAs Sensing // Small — 2014. — Vol. 10, No. 10. P. 2022—2028.
- 142. Ivanov Y. D., Romanova T. S., Malsagova K. A., Pleshakova T. O., Archakov A. I. Use of Silicon Nanowire Sensors for Early Cancer Diagnosis // Molecules — 2021. — Vol. 26, No. 12. P. 3734.
- 143. Lu N., Gao A., Dai P., Mao H., Zuo X., Fan C., Wang Y., L T. Ultrasensitive Detection of Dual Cancer Biomarkers with Integrated CMOS-Compatible Nanowire Arrays // Analytical Chemistry — 2015. — Vol. 87, No. 22. P. 11203—11208.
- 144. Pui T. S., Agarwal A., Ye F., Tou Z. Q., Huang Y., Chen P. Ultra-sensitive detection of adipocytokines with CMOS-compatible silicon nanowire arrays // Nanoscale — 2009. — Vol. 1, No. 1. P. 159—163.
- 145. Becquemont L., Alfirevic A., Amstutz U., Brauch H., Jacqz-Aigrain E., Laurent-Puig P., Molina M. A., Niemi M., Schwab M., Somogyi A. A., Thervet E., Maitland-van der Zee A. H., van Kuilenburg A. B., van Schaik R. H., Verstuyft C., Wadelius M., Daly, A. K. Practical recommendations for pharmacogenomics-based prescription: 2010 ESF-UB Conference on Pharmacogenetics and Pharmacogenomics // Pharmacogenomics — 2011. — Vol. 12, No. 1. P. 113—124.
- 146. Bunimovich Y.L., Shin Y. S., Yeo W. S., Amori M., Kwong G., Heath J. R. Quantitative Real-Time Measurements of DNA Hybridization with Alkylated nonoxidized Silicon Nanowires in Electrolyte Solution // Journal of the American Chemical Society — 2006. — Vol. 128, No. 50. P. 16323—16331.
- 147. Duan X., Rajan N. K., Izadi M. H., Reed M. A. Complementary metal oxide semiconductor-compatible silicon nanowire biofield-effect transistors as affinity biosensors // Nanomedicine — 2013. — Vol. 8, No. 11. P. 1839—1851.
- 148. Malsagova K. A., Pleshakova T. O., Popov V. P., Kupriyanov I. N., Galiullin R. A., Kozlov A. F., Shumov I. D., Kaysheva A. L., Tikhonenko F. V., Archakov A. I., Ivanov Y. D. Optical Monitoring of the Production Quality of Si-Nanoribbon Chips Intended for the Detection of ASD-Associated Oligonucleotides // Micromachines 2021. Vol. 12, No. 2. P. 147.
- 149. Kern W. The Evolution of Silicon Wafer Cleaning Technology // Journal of The Electrochemical Society 1990. Vol. 137, No. 6. P. 1887—1892.
- 150. Meng X., Zhou A., Wang B., Chen Y., Tang Y. H., Yan H. Stable superwetting surface prepared with tilted silicon nanowires // Nano-micro letters 2016. Vol. 8, No. 4. P. 388—393.

- 151. Cicero R. L., Linford M. R., Chidsey C. E. D. Photoreactivity of Unsaturated Compounds with Hydrogen-Terminated Silicon(111) // Langmuir 2000. Vol. 16, No. 13. P. 5688—5695.
- 152. Uosaki K., Quayum M. E., Nihonyanagi S., Kondo T. Decomposition processes of an organic monolayer formed on Si(111) via a silicon-carbon bond induced by exposure to UV irradiation or ozone // Langmuir 2004. Vol. 20, No. 4. P. 1207—1212.
- 153. Ciampi S., Harper J. B., Gooding J. J. Wet chemical routes to the assembly of organic monolayers on silicon surfaces via the formation of Si—C bonds: surface preparation, passivation and functionalization // Chemical Society reviews 2010. Vol. 39, No. 6. P. 2158.
- 154. Subramani C., Cengiz N., Saha K., Gevrek T. N., Yu X., Jeong Y., Bajaj A., Sanyal A., Rotello V. M. Direct fabrication of functional and biofunctional nanostructures through reactive imprinting // Advanced materials — 2011. — Vol. 23, No. 28. P. 3165—3169.
- 155. Воронков М. Г., Южелевский Ю. А., Милешкевич В. П. Силоксановая связь и ее влияние на строение и физические свойства кремнийорганических соединений. 1975. Т. 44. № 4. С. 715—743.
- 156. Han Y., Mayer D., Offenhausser A., Ingebrandt S. Surface activation of thin silicon oxides by wet cleaning and silanization // Thin Solid Films 2006. Vol. 510, No. 1—2. P. 175—180.
- 157. Aswal D. K., Lenfant S., Guerin D., Yakhmi J. V., Vuillaume D. Self assembled monolayers on silicon for molecular electronics // Analytica chimica acta 2006. Vol. 568, No. 1—2. P. 84—108.
- 158. Howarter J. A., Youngblood J. P. Optimization of silica silanization by 3aminopropyltriethoxysilane // Langmuir — 2006. — Vol. 22, No. 26. P. 11142—11147.
- 159. Arnfinnsdottir N. B., Chapman C. A., Bailey R. C., Aksne A., Stokke B. T. Impact of silanization parameters and antibody immobilization strategy on binding capacity of photonic ring resonators // Sensors 2020. Vol. 20, No. 11. P. e3163.
- 160. Carrara S., Cavallini A., Maruyama Y., Charbon E., Micheli G. A new ethylene glycolsilane monolayer for highly-specific DNA detection on Silicon Chips // Surface Science — 2010. — Vol. 604, No. 23—24. P. L71—L74.
- 161. Yadav A.R., Sriram R., Carter J. A., Miller B. L. Comparative study of solution—phase and vapor—phase deposition of aminosilanes on silicon dioxide surfaces // Materials Science and Engineering — 2014. — Vol. 35. P. 283—290.
- 162. Saengdee P., Chaisriratanakul W., Bunjongpru W., Sripumkhai W., Srisuwan A., Jeamsaksiri W., Hruanun C., Poyai A., Promptmas C. Surface modification of silicon dioxide, silicon nitride and titanium oxynitride for lactate dehydrogenase immobilization // Biosensors and Bioelectronics — 2015. — Vol. 67. P. 134—138.
- 163. Bhushan B., Kwak K. J., Gupta S., Lee S. C. Nanoscale adhesion, friction and wear studies of biomolecules on silane polymer-coated silica and alumina-based surfaces // J.ournal of the Royal Society Interface — 2009. — Vol. 6, No. 37. P. 719—733.
- 164. Liang Y., Huang J., Zang P., Kim J., Hu W. Molecular layer deposition of APTES on silicon nanowire biosensors: Surface characterization, stability and pH response // Applied Surface Science — 2014. — Vol. 322, P. 202—208.
- 165. Martinkova P., Kostelnik A., Valek T., Pohanka M. Main streams in the Construction of Biosensors and Their Applications // International Journal of Electrochemical Science —2017. — Vol. 12, No. 8. P. 7386—7403.
- 166. Pham V. B., Pham X. T. T., Dang N. T. D., Le T. T. T., Tran P. D., Nguyen T. C., Nguyen V. Q., Dang M.C., Rijn C. J. M., Tong D. H. Detection of DNA of genetically modified maize by a silicon nanowire field-effect transistor // Advances in Nature Sciences: Natoscitnce and Nanotechnology 2011. Vol. 2, No. 2. P. 025010.
- 167. Pundir C. S., Devi R. Biosensing methods for xanthine determination: A review // Enzyme and Microbial Technology 2014. Vol. 57. P. 55—62.
- 168. Naresh Varnakavi., Lee N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors // Sensors 2021. Vol. 21, No. 4. P. 1109.
- 169. Woo J. M., Kim S. H., Chun H., Kim S. J., Ahn J., Park Y. J. Modulation of molecular hybridization and charge screening in a carbon nanotube network channel using the electrical pulse method // Lab on a chip — 2013. — Vol. 13, No. 18. P. 3755.
- 170. Spijkman M.-J., Brondijk J. J., Geuns T. C. T., Smits E. C. P., Cramer T., Zerbetto F., Stoliar P., Biscarini F., Blom P. W. M., de Leeuw D. M. Dual-Gate Organic Field-Effect

Transistors as Potentiometric Sensors in Aqueous Solution // Advanced Functional Materials — 2010. — Vol. 20, No. 6. P. 898—905.

- Zhang A., Lieber C. M. Nano-Bioelectronics // Chemical Reviews 2016. Vol. 116, No. 1. P. 215—257.
- 172. Kim K.S., Lee H. S., Yang J. A., Jo M. H., Hahn S. K. The fabrication, characterization and application of aptamer-functionalized Si-nanowire FET biosensors // Nanotechnology 2009. Vol. 20, No. 23. P. 235501.
- 173. Stern E., Wagner R., Sigworth F. J., Breaker R., Fahmy T. M., Reed M. A. Importance of the Debye screening length on nanowire field effect transistor sensors // Nano letters 2007. Vol. 7, No. 11. P. 3405—3409.
- 174. Purwidyantri A., Domingues T., Borme J., Guerreiro J. R., Ipato, A., Abreu C. M., Martins M., Alpuim P., Prado, M. Influence of the Electrolyte Salt Concentration on DNA Detection with Graphene Transistors // Biosensors 2021. Vol. 11, No. 1. P. 24.
- 175. Chen H., Zhao X., Xi Z., Zhang Y., Li H., Li Z., Shi H., Huang L., Shen R., Tao J., Wang T. A new biosensor detection system to overcome the Debye screening effect: dialysis-silicon nanowire field effect transistor // International journal of nanomedicine 2019. Vol. 14, P. 2985—2993.
- 176. Li Q., Lu N., Wang L., Fan C. Advances in Nanowire Transistor-Based Biosensors // Small Methods 2018. Vol. 2, No. 4. P. 1700263.
- 177. Janissen R., Sahoo P. K., Santos C. A., da Silva A. M., von Zuben A., Souto D., Costa A., Celedon P., Zanchin N., Almeida D. B., Oliveira D. S., Kubota L. T., Cesar C. L., Souza A. P., Cotta M. A. InP Nanowire Biosensor with Tailored Biofunctionalization: Ultrasensitive and Highly Selective Disease Biomarker Detection // Nano letters — 2017. — Vol. 17, No. 10. P. 5938—5949.
- 178. Li J., Kutovyi Y., Zadorozhnyi I., Boichuk N., Vitusevich S. Monitoring of Dynamic Processes during Detection of Cardiac Biomarkers Using Silicon Nanowire Field-Effect Transistors // Advanced Materials Interfaces 2020. Vol. 7, No. 15. P. 2000508.
- 179. Wu C. C., Manga Y. B., Yang M-H., Chien Z-S., Lee K-S. Label-Free Detection of BRAF^{V599E} Gene Mutation Using Side-Gated Nanowire Field Effect Transistors // Journal of The Electrochemical Society — 2018. — Vol. 165, No. 13. P. B576.
- 180. Precazzini F., Detassis S., Imperatori A. S., Denti M. A., Campomenosi, P. Measurements Methods for the Development of MicroRNA-Based Tests for Cancer Diagnosis // International journal of molecular sciences — 2021. — Vol. 22, No. 3. P. 1176.
- 181. Dave V. P., Ngo T. A., Pernestig A. K., Tilevik D., Kant K., Nguyen T., Wolff A., Bang D. D. MicroRNA amplification and detection technologies: opportunities and challenges for point of care diagnostics // Lab Invest. 2019. Vol. 99, No. 4. P. 452—469.
- 182. Ivanov Y., Pleshakova T., Malsagova K., Kurbatov L., Popov V., Glukhov A., Smirnov A., Enikeev D., Potoldykova N., Alekseev B., Dolotkazin D., Kaprin A., Ziborov V., Petrov O., Archakov A. Detection of Marker miRNAs, Associated with Prostate Cancer, in Plasma Using SOI-NW Biosensor in Direct and Inversion Modes // Sensors. — 2019. — Vol. 19, No. 23. P. 5248.
- 183. Ivanov Y. D., Pleshakova T. O., Malsagova K. A., Kozlov A. F., Kaysheva A. L., Shumov I. D., Galiullin R. A., Kurbatov L. K., Popov V. P., Naumova O. V., Fomin B. I., Nasimov D. A., Aseev A. L., Alferov A. A., Kushlinsky N. E., Lisitsa A. V., Archakov A.I. Detection of marker miRNAs in plasma using SOI-NW biosensor // Sensors and Actuators B: Chemical. 2018. Vol. 261. P. 566—571.
- 184. Ivanov Y. D., Malsagova K. A., Popov V. P., Pleshakova T. O., Kozlov A. F., Galiullin R. A., Shumov I. D., Kapustina S. I., Tikhonenko F. V., Ziborov V. S., Dolgoborodov A. Y., Petrov O. F., Gadzhieva O. A., Bashiryan B. A., Shimansky V. N., Potoldykova N. V., Enikeev D. V., Usachev D. Y., Archakov A. I. Nanoribbon-Based Electronic Detection of a Glioma-Associated Circular miRNA // Biosensors. 2021. Vol. 11, No. 7. P. 237.
- 185. Ivanov Y. D., Malsagova K. A., Popov V. P., Kupriyanov I. N., Pleshakova T. O., Galiullin R. A., Ziborov V. S., Dolgoborodov A. Y., Petrov O. F., Miakonkikh A. V., Rudenko K. V., Glukhov A. V., Smirnov A. Y., Usachev D. Y., Gadzhieva O. A., Bashiryan B. A., Shimansky V. N., Enikeev D. V., Potoldykova N. V., Archakov A. I. Micro-Raman Characterization of Structural Features of High-k Stack Layer of SOI Nanowire Chip, Designed to Detect Circular RNA Associated with the Development of Glioma // Molecules. 2021. Vol. 26, No. 12. P. 3715.
- 186. Malsagova K. A., Popov V. P., Kupriyanov I. N., Pleshakova T. O., Galiullin R. A., Kozlov A. F., Shumov I. D., Larionov D. I., Tikhonenko F. V., Kapustina S. I., Ziborov V. S., Petrov O.

F., Gadzhieva O. A., Bashiryan B. A., Shimansky V. N., Archakov A. I., Ivanov Y. D. Raman Spectroscopy-Based Quality Control of "Silicon-On-Insulator" Nanowire Chips for the Detection of Brain Cancer-Associated MicroRNA in Plasma // Sensors. — 2021. — Vol. 21, No. 4. P. 1333.

- 187. Patolsky F., Timko B. P., Zheng G., Lieber C. M. Nanowire—Based Nanoelectronic Devices in the Life Sciences // MRS Bulletin. 2007. Vol. 32. P. 142—149.
- 188. Ilgisonis E., Vavilov N., Ponomarenko E., Lisitsa A., Poverennaya E., Zgoda V., Radko S., Archakov A. Genome of the Single Human Chromosome 18 as a "Gold Standard" for Its Transcriptome // Frontiers in genetics. — 2021. — Vol. 12. P. 674534.
- 189. Chang C., Li L., Zhang C., Wu S., Guo K., Zi J., Chen Z., Jiang J., Ma J., Yu Q., Fan F., Qin P., Han M., Su N., Chen T., Wang K., Zhai L., Zhang T., Ying W., Xu Z., Zhang Y., Liu Y., Liu X., Zhong F., Shen H., Wang Q., Hou G., Zhao H., Li G., Liu S., Gu W., Wang G., Wang T., Zhang G., Qian X., Li N., He Q. Y., Lin L., Yang P., Zhu Y., He F., Xu P. Systematic analyses of the transcriptome, translatome, and proteome provide a global view and potential strategy for the C-HPP // Journal of proteome research. — 2014. — Vol. 13, No. 1. P. 38—49.
- 190. Rivera M. C., Maguire B., Lake J. A. Isolation of ribosomes and polysomes // Cold Spring Harbor protocols. 2015. Vol. 2015, No. 3. P. 293—299.
- 191. Brar G. A., Weissman J. S. Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis // Nature reviews Molecular cell biology. — 2015. — Vol. 16, No. 11. P. 651— 664.
- 192. Ingolia N. T., Ghaemmaghami S., Newman J. R. S., Weissman J. S. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling // Science (New York, NY). — 2009. — Vol. 324, No. 5924. P. 218—223.
- 193. Ingolia N. T., Brar G. A., Stern-Ginossar N., Harris M. S., Talhouarne G. J., Jackson S. E., Wills M. R., Weissman J. S. Ribosome profiling reveals pervasive translation outside of annotated protein-coding genes // Cell reports. — 2014. — Vol. 8, No. 5. P. 1365—1379.
- 194. Del Piano A., Kecman T., Schmid M., Barbieri R., Brocchieri L., Tornaletti S., Firrito C., Minati L., Bernabo P., Signoria I., Lauria F., Gillingwater T. H., Viero G., Clamer M. Phospho-RNA sequencing with circAID-p-seq // Nucleic acids research. — 2021. P. gkab1158.
- 195. Zhao J., Qin B., Nikolay R., Spahn C. M. T., Zhang G. Translatomics: The Global View of Translation // International journal of molecular sciences. 2019. Vol. 20, No. 1. P. 212.
- 196. Yoshikawa H., Larance M., Harney D. J., Sundaramoorthy R., Ly T., Owen-Hughes T., Lamond A. I. Efficient analysis of mammalian polysomes in cells and tissues using Ribo Mega-SEC // eLife. — 2018. — Vol. 7. P. e36530.
- 197. Shapovalova V. V., Radko S. P., Ptitsyn K. G., Krasnov G. S., Nakhod K. V., Konash O. S., Vinogradina M. A., Ponomarenko E. A., Druzhilovskiy D. S., and Lisitsa A. V. Processing Oxford Nanopore Long Reads Using Amazon Web Services // Biomedical Chemistry: Research and Methods. 2020. Vol. 3, No. 4. P. e00131.
- 198. Cho J., Yu N. K., Choi J. H., Sim S. E., Kang S. J., Kwak C., Lee S. W., Kim J. I., Choi D. I., Kim V. N., Kaang B. K. Multiple repressive mechanisms in the hippocampus during memory formation // Science (New York, NY). 2015. Vol. 350, No. 6256. P. 82—87.
- 199. Boutet E., Lieberherr D., Tognolli M., Schneider M., Bansal P., Bridge A. J., Poux S., Bougueleret L., Xenarios I. UniProtKB/Swiss-Prot, the Manually Annotated Section of the UniProt KnowledgeBase: How to Use the Entry View // Methods in molecular biology (Clifton, NJ). — 2016. — Vol. 1374. P. 23—54.
- 200. Zahn-Zabal M, Michel PA, Gateau A, Nikitin F, Schaeffer M, Audot E, Gaudet P, Duek Roggli P, Teixeira D, Rech de Laval V, Samarasinghe K, Bairoch A, Lane L. The neXtProt knowledgebase in 2020: data, tools and usability improvements // Nucleic Acids Res. — 2020. — Vol. 48, No. D1. P. D328—D334.
- Wildenauer, D. B., Hallmayer, J., Schwab, S. G., Albus, M., Eckstein, G. N., Zill, P., Honig, S., Strauss, M., Borrmann, M., Lichtermann, D., Ebstein, R. P., Lerer, B., Risch, N., Maier, W. Searching for susceptibility genes in schizophrenia by genetic linkage analysis // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1996. Vol. 61. P. 845—850.
- 202. Wali A., Ali G., John P., Lee K., Chishti M. S., Leal S. M., Ahmad W. Mapping of a gene for alopecia with mental retardation syndrome (APMR3) on chromosome 18q11.2-q12.2 // Ann. Hum. Genet. — 2007. — Vol. 71. P. 570—577.

- 203. Wong A. K. C., Ormonde, P. A., Pero R., Chen Y., Lian L., Salada G., Berry S., Lawrence Q., Dayananth P., Ha P., Tavtigian S. V., Teng D. H.-F., Bartel P. L. Characterization of a carboxy-terminal BRCA1 interacting protein // Oncogene. 1998. Vol. 17. P. 2279-2285.
- 204. Henzel W. J., Billeci T. M., Stults J. T., Wong S. C., Grimley C., Watanabe C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993. Vol. 90, No. 11. P. 5011—5015.
- 205. Clauser K. R., Baker P., Burlingame A. L. Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching // Anal. Chem. 1999. Vol. 71, No. 14. P. 2871—2882.
- 206. Yates J. R., Cociorva D., Liao L., Zabrouskov V. Performance of a linear ion trap-Orbitrap hybrid for peptide analysis // Anal Chem. 2006. Vol. 78, No. 2. P. 493—500.
- 207. Zhao Y., Brasier A. R. Applications of selected reaction monitoring (SRM)-mass spectrometry (MS) for quantitative measurement of signaling pathways // Methods. 2013. Vol. 61, No. 3. P. 313—322.
- 208. Hillenkamp F., Unsöld E., Kaufmann R., Nitsche R. A high-sensitivity laser microprobe mass analyzer // Appl. Phys. 1975. Vol. 8. P. 341—348.
- 209. Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., Matsuo T. (), Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 1988. — Vol. 2. P. 151—153.
- 210. Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse, C. M. (), Electrospray ionization—principles and practice // Mass Spectrom. Rev. 1990. Vol. 9. P. 37—70.
- 211. Yost R. A., Enke C. G. Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer // Journal of the American Chemical Society. — 1978. — Vol. 100, No. 7. P. 2274— 2275.
- Boesl U. Time-of-flight mass spectrometry: Introduction to the basics // Mass Spec Rev. — 2017. — Vol. 36. P. 86-109.
- Zubarev R. A., Makarov A. Orbitrap Mass Spectrometry // Analytical Chemistry. 2013.
 Vol. 85, No. 11. P. 5288—5296.
- 214. O'Farrell P. H. () High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // J. Biol. Chem. — 1975. — Vol. 250. P. 4007—4021.
- 215. Cash P.J. Protein mutations revealed by two-dimensional electrophoresis // Chromatogr A. 1995. Vol. 698, No. 1—2. P. 203—224.
- Klose J., Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome // Electrophoresis. — 1995. — Vol. 16. P. 1034-1059.
- Ames G. F., Nikaido K. Two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins // Biochemistry. — 1976. — Vol. 15, No. 3. P. 616—623.
- 218. Perdew G. H., Schaup H. W., Selivonchick D. P. The use of a zwitterionic detergent in two-dimensional gel electrophoresis of trout liver microsomes // Anal Biochem. — 1983. — Vol. 135. P. 453—455.
- 219. Gyenes T., Gyenes E. Effect of "stacking" on the resolving power of ultrathin-layer twodimensional gel electrophoresis // Anal. Biochem. — 1987. — Vol. 165. P. 155—160.
- 220. Rabilloud T., Gianazza E., Cattò N., Righetti P. G. Amidosulfobetaines, a family of Detergents with improved solubilization properties: Application for isoelectric focusing under Denaturing conditions // Anal. Biochem. — 1990. — Vol. 185. P. 94—102.
- 221. Felsted R. L., Gupta S. K., Glover C. J., Fischkoff S. A., Gallagher R. E. Cell surface membrane protein changes during the differentiation of cultured human promyelocytic leukemia HL-60 cells // Cancer Res. — 1983. — Vol. 43. P. 2754—2761.
- 222. Sweetnam P., Nestler E., Gallombardo P., Brown S., Duman R., Bracha H. S., Tallman J. Comparison of the molecular structure of GABA/benzodiazepine receptors purified from rat and human cerebellum // Brain Res. 1987. Vol. 388. P. 223—233.
- 223. Alla S. A., Buschko J., Quitterer U., Maidhof A., Haasemann M., Breipohl G., Knolle J., Müller-Esterl W. Structural features of the human bradykinin B2 receptor probed by agonists, antagonists, and anti-idiotypic antibodies // J. Biol. Chem. — 1993. — Vol. 268. P. 17277—17285.
- 224. Englund A. K., Lundahl P. The isoelectric point of the human red cell glucose transporter // Biochim. Biophys. Acta. — 1991. — Vol. 1065. P. 185—194.

- 225. Rubin R. W., Milikowski C. Over two hundred polypeptides resolved from the human erythrocyte membrane // Biochim.Biophys. Acta. 1978. Vol. 509. P. 100—110.
- 226. Quaranta S., Giuffrida M. G., Cavaletto M., Giunta C., Godovac-Zimmermann J., Cañas B., Fabris C., Bertino E., Mombrò M., Conti, A. Human proteome enhancement: High-recovery method and improved two-dimensional map of colostral fat globule membrane proteins // Electrophoresis. 2001. Vol. 22. P. 1810—1818.
- 227. Chevallet M., Santoni V., Poinas A., Rouquié D., Fuchs A., Kieffer S., Rossignol M., Lunardi J., Garin J., Rabilloud, T. New zwitterionic Detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis // Electrophoresis. 1998. Vol. 19. P. 1901—1909.
- 228. Rabilloud T., Blisnick T., Heller M., Luche S., Aebersold R., Lunardi J., Braun-Breton C. Analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis: Comparison of the proteins extracted from normal or Plasmodium falciparum-infected erythrocyte ghosts // Electrophoresis. — 1999. — Vol. 20. P. 3603—3610.
- 229. Santoni V., Kieffer S., Desclaux D., Masson F., Rabilloud T. Membrane proteomics: Use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties // Electrophoresis. 2000. Vol. 21. P. 3329—3344.
- 230. Rabilloud T., Adessi C., Giraudel A., Lunardi J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients // Electrophoresis. — 1997. — Vol. 18. P. 307—316.
- 231. Gonzalez-Begne M., Lu B., Han X., Hagen F. K., Hand A. R., Melvin J. E., Yates J. R. Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT) // J Proteome Res. 2009. Vol. 8, No. 3. P. 1304—1314.
- 232. Washburn M. P., Wolters D., Yates J. R. III. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology // Nat. Biotechnol. — 2001. — Vol. 19. P. 242—247.
- Giddings J. C. Concepts and comparisons in multidimensional separation // J. High Resol. Chromatogr. — 1987. — Vol. 10. P. 319—323.
- 234. Bushey M. M., Jorgenson J. W. Automated instrumentation for comprehensive twodimensional high-performance liquid chromatography of proteins // Analytical Chemistry. — 1990. — Vol. 62, No. 2. P. 161—167.
- 235. Ilgisonis E. V., Kopylov A. T., Ponomarenko E. A., Poverennaya E. V., Tikhonova O. V., Farafonova T. E., Novikova S., Lisitsa A. V., Zgoda V. G., Archakov A. I. Increased Sensitivity of Mass Spectrometry by Alkaline Two-Dimensional Liquid Chromatography: Deep Cover of the Human Proteome in Gene-Centric Mode // J Proteome Res. — 2018. — Vol. 17, No. 12. P. 4258— 4266.
- 236. Kulak N. A., Geyer P. E., Mann M. Loss-less Nano-fractionator for High Sensitivity, High Coverage Proteomics // Molecular & Cellular Proteomics. — 2017. — Vol. 16, No. 4. P. 694— 705.
- 237. Michalski A., Cox J., Mann M. More than 100,000 Detectable Peptide Species Elute in Single Shotgun Proteomics Runs but the Majority is Inaccessible to Data-Dependent LC–MS/MS // Journal of Proteome Research. — 2011. — Vol. 10, No. 4. P. 1785—1793.
- 238. Psychogios N., Hau D. D., Peng J., Guo A. C., Mandal R., Bouatra S., Sinelnikov, I., Krishnamurthy R., Eisner R., Gautam B., Young N., Xia J., Knox C., Dong E., Huang, P., Hollander Z., Pedersen T. L., Smith S. R., Bamforth F., Greiner R., McManus B., Newman J. W., Goodfriend T., Wishart D. S. The human serum metabolome // PLoS One. — 2011. — Vol. 6. P. e16957.
- 239. Trifonova O., Lokhov P., Archakov A. Postgenomics diagnostics: metabolomics approaches to human blood profiling // OMICS. 2013. Vol. 17. P. 550—559.
- 240. Trifonova O. P., Maslov D. L., Balashova E. E., Lokhov P. G. Mass spectrometry-based metabolomics diagnostics - myth or reality? // Expert Review of Proteomics. — 2021. — Vol. 18, No. 1. P. 7—12.
- 241. Vuckovic D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry // Anal Bioanal Chem. 2012. Vol. 403. P. 1543—1548.

- 242. Tulipani S., Llorach R., Urpi-Sarda M., Andres-Lacueva C. Comparative analysis of sample preparation methods to handle the complexity of the blood fluid metabolome: when less is more // Anal Chem. — 2013. — Vol. 85. P. 341—348.
- 243. Kennedy A. D., Wittmann B. M., Evans A. M., Miller L., Toal D. R., Lonergan S., Elsea S. H., Pappan K. L. Metabolomics in the clinic: a review of the shared and unique features of untargeted metabolomics for clinical research and clinical testing // J Mass Spectrom. 2018. Vol. 53, No. 11. P. 1143—1154.
- 244. Lee D. Y., Kind T., Yoon Y. R., Fiehn O., Liu K. H. Comparative evaluation of extraction methods for simultaneous mass-spectrometric analysis of complex lipids and primary metabolites from human blood plasma // Anal Bioanal Chem. 2014. Vol. 406, No. 28. P. 7275—7286.
- 245. Causon T. J., Hann S. Review of sample preparation strategies for MS-based metabolomic studies in industrial biotechnology // Anal Chim Acta. 2016. Vol. 938. P. 18—32.
- 246. Gika H., Teodoridis G. Sample preparation prior to LC-MS-based metabolomics/metabonomics of blood derived samples // Bioanalysis. — 2011. — Vol. 3. P. 1647—1661.
- 247. Lokhov P. G., Trifonova O. P., Maslov D. L., Balashova E. E., Archakov A. I., Shestakova E. A., Shestakova M. V., Dedov I. I. Diagnosing impaired glucose tolerance using direct infusion mass spectrometry of blood plasma // PLoS One. 2014. Vol. 9, No. 9. P. e105343.
- 248. Lokhov P. G., Balashova E. E., Trifonova O. P., Maslov D. L., Ponomarenko E. A., Archakov A. I. Mass Spectrometry-Based Metabolomics Analysis of Obese Patients` Blood Plasma // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21, No. 2. P. 568.
- 249. Lokhov P. G., Maslov D. L., Lichtenberg S., Trifonova O. P., Balashova E. E. Holistic Metabolomic Laboratory-Developed Test (LDT): Development and Use for the Diagnosis of Early-Stage Parkinson's Disease // Metabolites. 2021. Vol. 11, No. 1. P. 14.
- 250. Balashova E. E., Lokhov P. G., Maslov D. L., Trifonova O. P., Khasanova D. M., Zalyalova Z. A., Nigmatullina R. R., Archakov A. I., Ugrumov M. V. Plasma metabolome signature in patients with early-stage Parkinson disease // Curr Metabolomics. 2018. Vol. 6, No. 1. P. 75—82.
- 251. Zhang X. W., Li Q. H., Xu Z. D., Dou J. J. Mass spectrometry-based metabolomics in health and medical science: a systematic review // RSC Adv. 2020. Vol. 10. P. 3092—3104.
- 252. Nagana Gowda G. A., Djukovic D. Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges // Methods Mol Biol. 2014. Vol. 1198. P. 3—12.
- 253. Kim Y. M., Heyman H. M. Mass spectrometry-based metabolomics. Methods Mol Biol. — 2018. — Vol. 1775. P. 107—118.
- 254. Fiehn O. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: combined targeted and untargeted profiling // Curr Protoc Mol Biol. 2016. Vol. 114. P. 30.4.1—30.4.32.
- 255. Beale D. J., Pinu F. R., Kouremenos K. A., Poojary M. M., Narayana V. K., Boughton B. A., Kanojia K., Dayalan S., Jones O., Dias D. A. Review of recent developments in GC—MS approaches to metabolomics-based research // Metabolomics. 2018. Vol. 14, No. 11. P. 152.
- 256. Vinaixa M., Schymanski E. L., Neumann S., Navarro M., Salek R. M., Yanes O. Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: state of the field and future prospects // TrAC Trends Anal Chem. 2016. Vol. 78. P. 23—35.
- 257. Nassar A. F., Wu T., Nassar S. F., Wisnewski A. V. UPLC—MS for metabolomics: a giant step forward in support of pharmaceutical research // Drug Discov Today. — 2017. — Vol. 22, No. 2. P. 463—470.
- 258. Maier T. V., Schmitt-Kopplin P. Capillary electrophoresis in metabolomics // Methods Mol Biol. — 2016. — Vol. 1483. P. 437—470.
- 259. Sasaki K., Sagawa H., Suzuki M., Yamamoto H., Tomita M., Soga T., Ohashi Y. Metabolomics platform with capillary electrophoresis coupled with high-resolution mass spectrometry for plasma analysis // Anal Chem. 2019. Vol. 91, No. 2. P. 1295—1301.
- 260. Ellis D. I., Dunn W. B., Griffin J. L., Allwood J. W., Goodacre R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool // Pharmacogenomics. 2007. Vol. 8, No. 9. P. 1243—1266.
- 261. Lokhov P. G., Dashtiev M. I., Moshkovskii S. I., Archakov A. I. Metabolite profiling of blood plasma of patients with prostate cancer // Metabolomics. 2010. Vol. 6. P. 156—163.
- 262. Lokhov P. G., Kharybin O. N., Archakov A. I. Diagnosis of lung cancer based on directinfusion electrospray mass spectrometry of blood plasma metabolites // Int J Mass Spectrom. — 2012. — Vol. 309. P. 200—205.

- 263. Pinu F. R., Goldansaz S. A., Jaine J. Translational metabolomics: current challenges and future opportunities // Metabolites. 2019. Vol. 9, No. 6. P. 108.
- 264. Wishart D. S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine // Nat Rev Drug Discov. 2016. Vol. 15, No. 7. P. 473—484.
- 265. Trivedi D. K., Hollywood K. A., Goodacre R. Metabolomics for the masses: the future of metabolomics in a personalized world // New Horizons Transl Med. — 2017. — Vol. 3, No. 6. P. 294—305.
- 266. Lichtenberg S., Trifonova O. P., Maslov D. L., Balashova E. E., Lokhov P. G. Metabolomic Laboratory-Developed Tests: Current Status and Perspectives // Metabolites. — 2021. — Vol. 11, No. 7. P. 423.
- 267. Beecher C. W. W. The Human Metabolome // Metabolic profiling: Its role in biomarker discovery and gene function analysis / Ed. Harrigan G. G., Goodacre R. / New York, USA: Springer, 2002. — P. 311—319.
- 268. Trifonova O. P., Maslov D. L., Balashova E. E., Lokhov P. G. Evaluation of Dried Blood Spot Sampling for Clinical Metabolomics: Effects of Different Papers and Sample Storage Stability // Metabolites. — 2019. — Vol. 9, No. 11. P. 277.
- 269. Ehmann F., Sakai-Kato K., Duncan R., Hernán Pérez de la Ossa D., Pita R., Vidal J. M., Kohli A., Tothfalusi L., Sanh A., Tinton S., Robert J. L., Silva Lima B., Amati M. P. Nextgeneration nanomedicines and nanosimilars: EU regulators' initiatives relating to the development and evaluation of nanomedicines // Nanomedicine. — 2013. — Vol. 8, No. 5. P. 849—856.
- 270. Dagata J., Kavuri P., Vladar A., Ehara K., Farkas N., Wu C., Itoh H. Method for measuring the diameter of polystyrene latex reference spheres by atomic force microscopy // NIST Special publication. — 2016. — Vol. 260. P. 185.
- 271. Linsinger T. P. J., Roebben G., Solans C., Ramsch R. Reference materials for measuring the size of nanoparticles // TrAC Trends in Analytical Chemistry. — 2011. — Vol. 30, No. 1. P. 18—27.
- 272. Goodman T. T., Olive P. L., Pun S. H. Increased nanoparticle penetration in collagenasetreated multicellular spheroids // International journal of nanomedicine. — 2007. — Vol. 2, No. 2. P. 265.
- 273. Baalousha M., Lead J. R. Rationalizing nanomaterial sizes measured by atomic force microscopy, flow field-flow fractionation, and dynamic light scattering: sample preparation, polydispersity, and particle structure // Environmental science & technology. — 2012. — Vol. 46, No. 11. P. 6134—6142.
- 274. Kestens V., Roebben G., Herrmann J., Jämting Å., Coleman V., Minelli C., Clifford C., De Temmerman P. J., Mast J., Junjie L., Babick F., Cölfen H., Emons H. Challenges in the size analysis of a silica nanoparticle mixture as candidate certified reference material // Journal of Nanoparticle Research. — 2016. — Vol. 18, No. 6. P. 1—22.
- 275. Hoo C. M., Starostin N., West P., Mecartney M. L. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions // Journal of Nanoparticle Research. — 2008. — Vol. 10, No. 1. P. 89—96.
- 276. Bootz A., Vogel V., Schubert D., Kreuter J. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles // European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. — 2004. — Vol. 57, No. 2. P. 369—375.
- 277. Maver U., Velnar T., Gaberšček M., Planinšek O., Finšgar M. Recent progressive use of atomic force microscopy in biomedical applications // TrAC Trends in Analytical Chemistry. — 2016. — Vol. 80. P. 96—111.
- 278. Dokukin M. E., Sokolov I. Quantitative mapping of the elastic modulus of soft materials with HarmoniX and PeakForce QNM AFM modes // Langmuir. 2012. Vol. 28, No. 46. P. 16060—16071.
- Johnson K. L., Kendall K., Roberts A. D. Surface energy and the contact of elastic solids // Proceedings of the royal society of London. A. mathematical and physical sciences. 1971. Vol. 324, No. 1558. P. 301—313.
- 280. Smolyakov G., Formosa-Dague C., Severac C., Duval R. E., Dague E. High speed indentation measures by FV, QI and QNM introduce a new understanding of bionanomechanical experiments // Micron. 2016. Vol. 85. P. 8—14.

- 281. Sader J. E., Larson I., Mulvaney P., White L. R. Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers // Review of Scientific Instruments. — 1995. — Vol. 66, No. 7. P. 3789— 3798.
- 282. Kolodny L. A., Willard D. M., Carillo L. L., Nelson M. W., Van Orden A. Spatially correlated fluorescence/AFM of individual nanosized particles and biomolecules // Analytical chemistry. 2001. 73, No. 9. P. 1959—1966.
- 283. Imagej / U.S. Department of Health & Human Services. URL: https://imagej.nih.gov/ij/ (дата обращения 2022-01-25).
- 284. ISO 13322-1:2014. Particle size analysis Image analysis methods Part 1: Static image analysis methods. Geneva, Switzerland, 2014. 24 pages.
- 285. Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics / B. J. Berne,
 R. Pecora. Mineola, New York, USA: Dover Publications, 2000. 376 pages.
- Takechi-Haraya Y., Goda Y., Sakai-Kato K. Imaging and size measurement of nanoparticles in aqueous medium by use of atomic force microscopy // Analytical and bioanalytical chemistry. — 2018. — Vol. 410, No. 5. P. 1525—1531.
- 287. van den Boorn J. G., Schlee M., Coch C., Hartmann G. SiRNA delivery with exosome nanoparticles // Nature biotechnology. 2011. Vol. 29, No. 4. P. 325—326.
- 288. Anselmo A. C., Mitragotri S. Impact of particle elasticity on particle-based drug delivery systems // Advanced drug delivery reviews. 2017. Vol. 108. P. 51—67.
- 289. Tan S., Sherman R. L., Ford W. T. Nanoscale compression of polymer microspheres by atomic force microscopy // Langmuir. 2004. Vol. 20, No. 17. P. 7015—7020.
- 290. PeakForce QNM User Guide. Billerica, Massachusetts, USA: Bruker Corporation, 2011. 84 pages.
- 291. Guo D., Li J., Xie G., Wang Y., Luo J. Elastic Properties of Polystyrene Nanospheres Evaluated with Atomic Force Microscopy: Size Effect and Error Analysis // Langmuir. — 2014. — Vol. 30. P. 7206—7212.
- 292. Huang P., Zhang L., Yan Q., Guo D., Xie G. Size dependent mechanical properties of monolayer densely arranged polystyrene nanospheres // Langmuir. — 2016. — Vol. 32, No. 49. P. 13187—13192.
- 293. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. М., 2015. 3768 с.
- 294. Gulcin B. Investigation of poly(CTAB-MWCNTs) composite based electrochemicalDNA biosensor and interaction study with anticancer drug Irinotecan // Microchemical Journal. 2020. Vol. 159. P. 105426.
- 295. Hatamluyi B., Es'haghi Z. Quantitative Biodetection of Anticancer Drug Rituxan with DNA Biosensor Modified PAMAM Dendrimer/Reduced Graphene Oxide Nanocomposite // Electroanalysis. — 2018. — Vol. 30. P. 1659—1668.
- 296. Hasanzadeh M., Shadjou N. Pharmacogenomic study using bio- and nanobioelectrochemistry: Drug—DNA interaction // Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. — 2016. — Vol. 61. P. 1002—1017
- 297. Muti M., Muti M. Electrochemical monitoring of the interaction between anticancer drug and DNA in the presence of antioxidant // Talanta. 2018. Vol. 178. P. 1033—1039.
- 298. Human Release 39 / GENCODE. URL: https://www.gencodegenes.org/human/ (дата обращения 2022-01-25).
- 299. Hafezqorani S., Yang C., Lo T., Nip K. M., Warren R. L., Birol I. Trans-NanoSim characterizes and simulates nanopore RNA-sequencing data // GigaScience. 2020. Vol. 9, No. 6. P. giaa061.
- 300. Li B., Dewey C. N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome // BMC Bioinformatics. 2011. Vol. 12. P. 323.
- 301. Anders S., Pyl P. T., Huber W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data // Bioinformatics. 2015. Vol. 31, No. 2. P. 166—169.
- 302. Liao Y., Smyth G. K., Shi W. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features // Bioinformatics. — 2014. — Vol. 30, No. 7. P. 923—930.
- 303. Genomics in the cloud: using Docker, GATK, and WDL in Terra / G. A. der Auwera, B. D. O'Connor. Sebastopol, California, USA: O'Reilly Media, 2020. 472 pages.

- 304. Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data // Bioinformatics. 2011. Vol. 27, No. 21. P. 2987—2993.
- 305. Kim S., Scheffler K., Halpern A. L., Bekritsky M. A., Noh E., Källberg M., Chen X., Kim Y., Beyter D., Krusche P., Saunders C. T. Strelka2: fast and accurate calling of germline and somatic variants // Nature Methods. 2018. Vol. 15, No. 8. P. 591—594.
- 306. Репозиторий Clair3 / Github. URL: https://github.com/HKU-BAL/Clair3 (дата обращения 2022-01-25).
- 307. Patro R., Duggal G., Love M. I., Irizarry R. A., Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression // Nature Methods. — 2017. — Vol. 14, No. 4. P. 417—419.
- 308. Li H. Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences // Bioinformatics. 2018.
 Vol. 34, No. 18. P. 3094—3100.
- 309. Marić J., Sović I., Križanović K., Nagarajan N., Šikić M. Graphmap2 splice-aware RNAseq mapper for long reads [Рукопись] // bioRxiv. — 2019.
- 310. Kim D., Paggi J. M., Park C., Bennett C., Salzberg S. L. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype // Nature Biotechnology. — 2019. — Vol. 37, No. 8. P. 907—915.
- 311. Dobin A., Davis C. A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T. R. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics. 2013. Vol. 29, No. 1. P. 15—21.
- 312. A pipeline for simulating RNA sequencing data / GitHub. URL: https://github.com/LRGASP/lrgasp-simulation (дата обращения 2022-01-25).
- 313. Siva N. 1000 Genomes project // Nature biotechnology. 2008. Vol. 26, No. 3. P. 256.
- 314. Workman R. E., Tang A. D., Tang P. S., Jain M., Tyson J. R., Razaghi R., Zuzarte P. C., Gilpatrick T., Payne A., Quick J., Sadowski N., Holmes N., de Jesus J. G., Jones K. L., Soulette C. M., Snutch T. P., Loman N., Paten B., Loose M., Simpson J. T., Olsen H. E., Brooks A. N., Akeson M., Timp W. Nanopore native RNA sequencing of a human poly(A) transcriptome // Nature Methods. — 2019. — Vol. 16, No. 12. P. 1297—1305.
- 315. Genome in a Bottle / U.S. Department of Health & Human Services. URL: https://www.nist.gov/programs-projects/genome-bottle (дата обращения 2022-01-25).
- 316. NCBI SRA / U.S. Department of Health & Human Services. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRR15909920 (дата обращения 2022-01-25).
- 317. Genome in a Bottle FTP server / U.S. Department of Health & Human Services. URL: https://ftp-

trace.ncbi.nlm.nih.gov/giab/ftp/release/NA12878_HG001/NISTv4.2.1/GRCh38/HG001_GRCh38 _1_22_v4.2.1_benchmark.vcf.gz (дата обращения 2022-01-25).

- 318. Jupyter. URL: https://jupyter.org/ (дата обращения 2022-01-25).
- 319. Numpy. URL: https://numpy.org/ (дата обращения 2022-01-25).
- 320. Pandas. URL: https://pandas.pydata.org/ (дата обращения 2022-01-25).
- 321. Matplotlib. URL: https://matplotlib.org/ (дата обращения 2022-01-25).
- 322. Orchard S., Ping P. HUPO World Congress Publication Committee meeting. August 2008, Amsterdam, The Netherlands // Proteomics. 2009. Vol. 9, No. 3. P. 502—503.
- 323. Paik Y. K., Omenn G. S., Uhlen M., Hanash S., Marko-Varga G., Aebersold R., Bairoch A., Yamamoto T., Legrain P., Lee H. J., Na K., Jeong S. K., He F., Binz P. A., Nishimura T., Keown P., Baker M. S., Yoo J. S., Garin J., Archakov A., Bergeron J., Salekdeh G. H., Hancock W. S. Standard guidelines for the chromosome-centric human proteome project // Journal of proteome research. 2012. Vol. 11, No. 4. P. 2005—2013.
- 324. Ponomarenko E., Poverennaya E., Pyatnitskiy M., Lisitsa A., Moshkovskii S., Ilgisonis E., Chernobrovkin A., Archakov A. Comparative ranking of human chromosomes based on postgenomic data // Omics : a journal of integrative biology. — 2012. — Vol. 16, No. 11. P. 604—611.
- 325. Ponomarenko E. A., Zgoda V. G., Kopylov A. T., Poverennaya E. V., Ilgisonis E. V., Lisitsa A. V., Archakov A. I. The Russian part of the human proteome project: First results and prospects // Biomeditsinskaya Khimiya. — 2015. — Vol. 61, No. 2. P. 169—175.
- 326. Ponomarenko E. A., Kopylov A. T., Lisitsa A. V., Radko S. P., Kiseleva Y. Y., Kurbatov L. K., Ptitsyn K. G., Tikhonova O. V., Moisa A. A., Novikova S. E., Poverennaya E. V., Ilgisonis E. V., Filimonov A. D., Bogolubova N. A., Averchuk V. V., Karalkin P. A., Vakhrushev I. V.,

Yarygin K. N., Moshkovskii S. A., Zgoda V. G., Sokolov A. S., Mazur A. M., Prokhortchouck E. B., Skryabin K. G., Ilina E. N., Kostrjukova E. S., Alexeev D. G., Tyakht A. V., Gorbachev A. Y., Govorun V. M., Archakov A. I. Chromosome 18 transcriptoproteome of liver tissue and HepG2 cells and targeted proteome mapping in depleted plasma: update 2013 // Journal of proteome research. — 2014. — Vol. 13, No. 1. P. 183—190.

- 327. Krasnov G., Shkrigunov T., Radko S., Ptitsyn K., Shapovalova V., Timoshenko O., Khmeleva S., Kurbatov L., Kiseleva Y., Ilgisonis E., Kiseleva O., Vakhrushev I., Tsvetkova A., Buromski I., Markin S., Archakov A., Lisitsa A., Ponomarenko E. Human Chr18 transcriptome dataset combined from the Illumina HiSeq, ONT MinION, and qPCR data // Data in brief. 2021. Vol. 36. P. 107130.
- 328. Pearson M. L., Söll D. The Human Genome Project: a paradigm for information management in the life sciences // FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1991. Vol. 5, No. 1. P. 35—39.
- 329. Patterson S. D., Aebersold R. H. Proteomics: the first decade and beyond // Nature genetics. - 2003. - Vol. 33, No. 3S. P. 311-323.
- Wilkins M. Proteomics data mining // Expert review of proteomics. 2009. Vol. 6, No. 6. P. 599—603.
- 331. Schlüter H., Apweiler R., Holzhütter H. G., Jungblut P. R. Finding one's way in proteomics: a protein species nomenclature // Chemistry Central journal. 2009. Vol. 3. P. 11.
- 332. Smith L. M., Kelleher N. L. Proteoform: a single term describing protein complexity // Nature methods. 2013. Vol. 10, No. 3. P. 186—187.
- 333. Naryzhny S. N., Zgoda V. G., Maynskova M. A., Ronzhina N. L., Belyakova N. V., Legina O. K., Archakov A. I. Experimental estimation of proteome size for cells and human plasma // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2015. Vol. 9, No. 4. P. 305—311.
- 334. Ahrné E., Müller M., Lisacek F. Unrestricted identification of modified proteins using MS/MS // Proteomics. 2010. Vol. 10, No. 4. P. 671—686.
- 335. Scheele G. A. Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Charaterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins // The Journal of biological chemistry. — 1975. — Vol. 250, No. 14. P. 5375—5385.
- 336. Schwenke K. D., Raab B., Ender B. Proteingewinnung unter Einsatz von komplexbildenden Stoffen [Isolation of proteins with complex forming agents] // Die Nahrung. — 1975. — Vol. 19, No. 9—10. P. 935—939.
- 337. Naryzhny S. N., Maynskova M. A., Zgoda V. G., Ronzhina N. L., Novikova S. E., Belyakova N. V., Kleyst O. A., Legina O. L., Pantina R. A., Filatov M. V. Proteomic Profiling of High-grade Glioblastoma Using Virtual experimental 2DE // Journal of Proteomics & Bioinformatics. — 2016. — Vol. 9. P. 158—165.
- 338. Dupree E. J., Jayathirtha M., Yorkey H., Mihasan M., Petre B. A., Darie C. C. A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of this Field // Proteomes. — 2020. — Vol. 8, No. 3. P. 1—26.
- 339. Vaudel M., Barsnes H., Berven F. S., Sickmann A., Martens L. SearchGUI: An opensource graphical user interface for simultaneous OMSSA and X!Tandem searches // Proteomics. — 2011. — Vol. 11, No. 5. P. 996—999.
- 340. Tyanova S., Temu T., Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics // Nature protocols. 2016. Vol. 11, No. 12. P. 2301—2319.
- 341. Cox J., Hein M. Y., Luber C. A., Paron I., Nagaraj N., Mann M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ // Molecular & cellular proteomics : MCP. — 2014. — Vol. 13, No. 9. P. 2513—2526.
- 342. UniProt Consortium T. UniProt: the universal protein knowledgebase // Nucleic acids research. 2018. Vol. 46, No. 5. P. 2699.
- 343. Wishart D. S., Knox C., Guo A. C., Eisner R., Young N., Gautam B., Hau D. D., Psychogios N., Dong E., Bouatra S., Mandal R., Sinelnikov I., Xia J., Jia L., Cruz J. A., Lim E., Sobsey C. A., Shrivastava S., Huang P., Liu P., Fang L., Peng J., Fradette R., Cheng D., Tzur D., Clements M., Lewis A., De Souza A., Zuniga A., Dawe M., Xiong Y., Clive D., Greiner R., Nazyrova A., Shaykhutdinov R., Li L., Vogel H. J., Forsythe I. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome // Nucleic acids research. 2009. Vol. 37, No. Database issue. P. D603—610.

- 344. Kai H., Uesawa Y., Kunitake H., Morishita K., Okada Y., Matsuno K. Direct-Injection Electron Ionization-Mass Spectrometry Metabolomics Method for Analyzing Blueberry Leaf Metabolites That Inhibit Adult T-cell Leukemia Proliferation // Planta medica. — 2019. — Vol. 85, No. 1. P. 81—87.
- 345. Sarvin B., Lagziel S., Sarvin N., Mukha D., Kumar P., Aizenshtein E., Shlomi T. Fast and sensitive flow-injection mass spectrometry metabolomics by analyzing sample-specific ion distributions // Nature communications. 2020. Vol. 11, No. 1. P. 3186.
- 346. Martens L., Chambers M., Sturm M., Kessner D., Levander F., Shofstahl J., Tang W. H., Römpp A., Neumann S., Pizarro A. D., Montecchi-Palazzi L., Tasman N., Coleman M., Reisinger F., Souda P., Hermjakob H., Binz P. A., Deutsch, E. W. mzML—a Community Standard for Mass Spectrometry Data // Molecular & Cellular Proteomics : MCP. — 2011. — Vol. 10, No. 1. P. R110.000133.
- 347. Adusumilli R., Mallick P. Data Conversion with ProteoWizard msConvert // Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2017. Vol. 1550. P. 339—368.
- 348. Kessner D., Chambers M., Burke R., Agus D., Mallick P. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development // Bioinformatics (Oxford, England). 2008. Vol. 24, No. 21. P. 2534—2536.
- 349. Domingo-Almenara X., Siuzdak G. Metabolomics Data Processing Using XCMS // Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2020. Vol. 2104. P. 11—24.
- 350. Gowda H., Ivanisevic J., Johnson C. H., Kurczy M. E., Benton H. P., Rinehart D., Nguyen T., Ray J., Kuehl J., Arevalo B., Westenskow P. D., Wang J., Arkin A. P., Deutschbauer A. M., Patti G. J., Siuzdak G. Interactive XCMS Online: simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. Analytical chemistry. 2014. Vol. 86, No. 14. P. 6931—6939.
- 351. Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., de Lima Morais, D. A., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P. É., Li, S., & Xia, J. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights // Nucleic acids research. 2021. Vol. 49, No. W1. P. W388—396.
- 352. Pang Z., Chong J., Li S., Xia J. MetaboAnalystR 3.0: Toward an Optimized Workflow for Global Metabolomics // Metabolites. 2020. Vol. 10, No. 5. P. 186.
- 353. Olivon F., Grelier G., Roussi F., Litaudon M., Touboul D. MZmine 2 Data-Preprocessing To Enhance Molecular Networking Reliability // Analytical chemistry. — 2017. — Vol. 89, No. 15. P. 7836—7840.
- 354. Tsugawa H., Cajka T., Kind T., Ma Y., Higgins B., Ikeda K., Kanazawa M., VanderGheynst J., Fiehn O., Arita M. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis // Nature methods. — 2015. — Vol. 12, No. 6. P. 523—526.
- 355. Li Z., Lu Y., Guo Y., Cao H., Wang Q., Shui W. Comprehensive evaluation of untargeted metabolomics data processing software in feature detection, quantification and discriminating marker selection // Analytica chimica acta. 2018. Vol. 1029. P. 50—57.
- 356. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V. K., Mukherjee S., Ebert B. L., Gillette M. A., Paulovich A., Pomeroy S. L., Golub T. R., Lander E. S., Mesirov J. P. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2005. — Vol. 102, No. 43. P. 15545—15550.
- 357. Mummichog pathway and network analysis for metabolomics. URL: https://shuzhaoli.github.io/mummichog.org/ (дата обращения 2022-01-25).
- 358. Reading and Understanding Continuous Wavelet Transforms / A. Grossmann, R. Kronland-Martinet, J. Morlet // Wavelets. Inverse problems and theoretical imaging. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer, 1990.
- 359. Haug K., Salek R. M., Conesa P., Hastings J., de Matos P., Rijnbeek M., Mahendraker T., Williams M., Neumann S., Rocca-Serra P., Maguire E., González-Beltrán A., Sansone S. A., Griffin J. L., Steinbeck C. MetaboLights--an open-access general-purpose repository for metabolomics studies and associated meta-data // Nucleic acids research. — 2013. — Vol. 41, No. Database issue. P. D781—D786.
- 360. Sud M., Fahy E., Cotter D., Azam K., Vadivelu I., Burant C., Edison A., Fiehn O., Higashi R., Nair K. S., Sumner S., Subramaniam S. Metabolomics Workbench: An international repository for metabolomics data and metadata, metabolite standards, protocols, tutorials and training, and analysis tools // Nucleic acids research. 2016. Vol. 44, No. D1. P. D463—D470.

- Wang M., Carver J. J., Phelan V. V., Sanchez L. M., Garg N., Peng Y., Nguyen D. D., 361. Watrous J., Kapono C. A., Luzzatto-Knaan T., Porto C., Bouslimani A., Melnik A. V., Meehan M. J., Liu W. T., Crüsemann M., Boudreau P. D., Esquenazi E., Sandoval-Calderón M., Kersten R. D., Pace L. A., Quinn R. A., Duncan K. R., Hsu C. C., Floros D. J., Gavilan R. G., Kleigrewe K., Northen T., Dutton R. J., Parrot D., Carlson E. E., Aigle B., Michelsen C. F., Jelsbak L., Sohlenkamp C., Pevzner P., Edlund A., McLean J., Piel J., Murphy B. T., Gerwick L., Liaw C. C., Yang Y. L., Humpf H. U., Maansson M., Keyzers R. A., Sims A. C., Johnson A. R., Sidebottom A. M., Sedio B. E., Klitgaard A., Larson C. B., Boya P. C. A., Torres-Mendoza D., Gonzalez D. J., Silva D. B., Marques L. M., Demarque D. P., Pociute E., O'Neill E. C., Briand E., Helfrich E. J. N., Granatosky E. A., Glukhov E., Ryffel F., Houson H., Mohimani H., Kharbush J. J., Zeng Y., Vorholt J. A., Kurita K. L., Charusanti P., McPhail K. L., Nielsen K. F., Vuong L., Elfeki M., Traxler M. F., Engene N., Koyama N., Vining O. B., Baric R., Silva R. R., Mascuch S. J., Tomasi S., Jenkins S., Macherla V., Hoffman T., Agarwal V., Williams P. G., Dai J., Neupane R., Gurr J., Rodríguez A. M. C., Lamsa A., Zhang C., Dorrestein K., Duggan B. M., Almaliti J., Allard P. M., Phapale P., Nothias L. F., Alexandrov T., Litaudon M., Wolfender J. L., Kyle J. E., Metz T. O., Peryea T., Nguyen D. T., VanLeer D., Shinn P., Jadhav A., Müller R., Waters K. M., Shi W., Liu X., Zhang L., Knight R., Jensen P. R., Palsson B. O., Pogliano K., Linington R. G., Gutiérrez M., Lopes N. P., Gerwick W. H., Moore B. S., Dorrestein P. C., Bandeira N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking // Nature biotechnology. — 2016. — Vol. 34, No. 8. P. 828—837.
- 362. Kirwan J. A., Weber R. J. M., Broadhurst D. I., Viant M. R. Direct infusion mass spectrometry metabolomics dataset: a benchmark for data processing and quality control // Scientific data. 2014. Vol. 1. P. 140012.
- 363. Davidson R. L., Weber R. J. M., Liu H., Sharma-Oates A., Viant M. R. Galaxy-M: a Galaxy workflow for processing and analyzing direct infusion and liquid chromatography mass spectrometry-based metabolomics data // GigaScience. 2016. Vol. 5. P. 10.

ПРИЛОЖЕНИЕ А.

ЧЕРТЕЖИ КОМПОНЕНТНОВ ЧИПОВ К НАНОПРОВОЛОЧНОМУ ДЕТЕКТОРУ, ПРЕДАЛАГАЕМЫХ К РАЗРАБОТКЕ











ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Оглавление

1.9.п.1. Протокол культивирования линий трансформированных клеток	
	293
1.9.п.2. Протокол культивирования человеческих эмбриональных сти	воловых
клеток	296
1.9.п.3. Протокол анализа клеточной гетерогенности и выделения гомогенных	
популяций методом проточной цитометрии	306
1.9.п.4. Протокол экспериментального анализа транскрипто	ома с
использованием нанопорового детектора	314
1.9.п.5. Протокол экспериментального анализа транскрипто	ома с
использованием Illumina	321
1.9.п.6. Протокол биоинформатической обработки данных рнк	анализа
транскриптома с использованием Illumina	328
1.9.п.7. Протокол рибосомального профилирования с использе	ованием
нанопорового детектора	332
1.9.п.8. Протокол рибосомального профилирования с использованием Illumina	
	341
1.9.п.9. Протокол биоинформатической обработки данных рибосомального	
профилирования с использованием Illumina	351
1.9.п.10. Протокол анализа транслируемых мрнк в формате rn	ic-seq c

использованием нанопорового детектора

292

360

1.9.П.1. ПРОТОКОЛ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛИНИЙ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Протокол предназначен для поддержания и наращивания в культуре адгезивных и суспензионных трансформированных клеток, предназначенных для дальнейшего использования в транскриптомных, транслатомных и протеомных исследованиях.

1. Необходимое оборудование и расходные материалы.

1.1. Оборудование: ламинарный шкаф 2 класса защиты; центрифуга с охлаждением; CO₂ инкубатор; инвертированный микроскоп; автоматический счетчик клеток; сосуд Дюара с жидким азотом; водяная баня; диспенсер для серологических пипеток; автоматическая пипетка на 100мкл; вакуумный аспиратор; морозильная камера -70°C; холодильник (4°C) с морозильной камерой (-20) для хранения реактивов.

1.2. Расходные материалы: среда культуральная ДМЕМ/F12 (для адгезивных клеточных культур); среда культуральная RPMI 1640 (для суспензионных клеточных культур); эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС); раствор Хэнкса; раствор Версена (0.02%)ЭДТА фосфатно-солевом буфере); раствор 0,25%; p-p на трипсина пеницилин/стрептомицин для культур клеток; раствор трипанового синего: диметилсульфоксид (DMSO); флаконы культуральные с площадью дна 75 см², центрифужные пробирки с коническим дном на 50 и 15 мл., пробирки типа Eppendorf, серологические пипетки 25, 10, 5, 2 мл, пробирки для криохранения клеток на 2 мл.

2. Подготовка к работе.

Все манипуляции, связанные с культивированием клеток, проводят в стерильных условиях ламинарного шкафа. Подготовка ламинарного шкафа к работе включает стерилизацию внутреннего пространства УФ-облучением в течение 60 мин., а также обработку поверхностей 70% этанолом. Рабочие растворы должны быть заблаговременно извлечены из холодильника и нагреты до комнатной температуры. Следует проверить работу инкубатора (37° C, 5% CO2, 100% влажность). Приготовить полную ростовую среду, для чего в 450 мл питательной среды DMEM/F12 или RPMI1640 добавить 50 мл фетальной телячьей сыворотки и 5 мл пеницилина/стрептомицина. Готовую ростовую среду хранить при 4^oC до 30 сут.

3. Криоконсервация клеток.

3.1. Поместить 5 млн клеток в 0,5мл культуральной среды в пробирку для криохранения.

3.2. Добавить 0,4мл. ЭТС

3.3. Медленно по каплям добавить в пробирку 0,1мл DMSO.

3.4. Инкубировать клетки при 4°C 20 минут. DMSO может инициировать дифференцировку культуры HL60, поэтому при криоконсервации этой культуры данный этап исключить.

3.5. Перенести клетки в контейнер для замораживания клеток (Mr. Frosty[™] или аналог) и поместить в морозильную камеру -70°С на 3 часа.

3.6. Перенести пробирки с клетками в сосуд Дюара с жидким азотом.

4. Разморозка клеток.

4.1. Извлечь криопробирку с клетками из сосуда Дюара.

4.2. Поместить криопробирку в водяную баню (37^оС) и извлечь сразу после полного размораживания содержимого.

4.3. Перенести содержимое криопробирки в пробирку объемом 15 мл, довести объем до 15 мл раствором Хенкса.

4.4. Центрифугировать 5 мин. при 1200 об./мин.

4.5. Удалить супернатант вакуумным аспиратором.

4.6. Осадок ресуспендировать в 25 мл ростовой среды и перенести в культуральный флакон, поместить культуральный флакон в СО₂-инкубатор для дальнейшего культивирования.

5. Пассирование клеток.

Смену среды и пассирование клеток проводить в соответствии с рекомендациями, указанными в паспорте клеточной линии. Соблюдать рекомендуемую частоту пассирования и процент клеток, оставляемых в культуре при пересеве.

5.1. Пассирование адгезивных клеточных культур.

5.1.1. Удалить из флакона ростовую среду вакуумным аспиратором.

5.1.2. Внести в культуральный флакон 10 мл p-ра Версена, ополоснуть клеточный слой путем легкого покачивания флакона и удалить из флакона вакуумным аспиратором.

5.1.4. Повторить процедуру.

5.1.5. Внести в культуральный флакон 2 мл 0,25%-го раствора трипсина, поместить флакон в СО₂-инкубатор. Визуально контролировать снятие клеток с поверхности пластика под микроскопом. Время инкубации подбирается для каждой клеточной культуры индивидуально.

5.1.6. Внести во флакон 48 мл полной ростовой среды DMEM/F12, перемешать содержимое пипетированием.

5.8. Отобрать из культурального флакона 25 мл клеточной суспензии и перенести в новый флакон. Поместить флаконы в СО₂-инкубатор для дальнейшего культивирования.

5.2. Пассирование суспензионных клеточных культур.

294

5.2.1. Перемешать клеточную культуру путем покачивания флакона и пипетирования.

5.2.2. Разделить клеточную культуру на несколько флаконов в соответствии с рекомендациями в паспорте культуры.

5.2.3. Довести объем каждого флакона до 30 мл полной культуральной средой RPMI1640. Поместить флаконы в CO₂-инкубатор для дальнейшего культивирования.

6. Подсчет количества жизнеспособных клеток.

6.1. Перевести клетки в суспензию, в случае адгезивной клеточной культуры.

6.3. Отобрать аликвоту объемом 25 мкл, перенести в пробирку типа Eppendorf.

6.4. Добавить в пробирку 25 мкл р-ра трипанового синего, перемешать содержимое пипетированием.

6.5. Отобрать из пробирки аликвоту объемом 25 мкл и заполнить клеточной суспензией рабочую камеру счетчика клеток.

6.6. Провести измерение в соответствии с рекомендациями производителя оборудования.

1.9.П.2. ПРОТОКОЛ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Раздел 1: Приготовление Matrigel^{тм} и покрытие культурального пластика *Необходимое оборудование и расходные материалы:*

1. Стерильный ламинарный шкаф

2. Морозильник на-20°С.

3. Холодильник на 4°С.

4. Микропипетки на 200µl и 1000µl со стерильными наконечниками соответствующего объема.

5. Дозатор и расходные материалы к нему.

6. Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл, стерильные

7. Штатив для пробирок

8. Емкость со льдом

9. Конические пробирки на 15 мл, стерильные

10. Серологические пипетки на 10 мл, стерильные

11. 6-луночные культуральные планшеты, стерильные

Необходимые реагенты:

1. MatrigelTM, Growth Factor Reduced

2. Культуральная среда DMEM/F-12

Приготовление аликвот MatrigelTM:

1. Matrigel[™] замерзает при -20°C-80°C, переходит в жидкое состояние при 4°C, и быстро превращается в гель при комнатной температуре. Очень важно хранить Matrigel [™] в замороженном состоянии до приготовления аликвот.

2. Необходимо рассчитать объем MatrigelTM. Как правило, на два 6-луночных планшета требуется 1 мг MatrigelTM.

3. За день до приготовления аликвот необходимо поместить штативы для микроцентрифужных пробирок и контейнеры со стерильными 1,5-мл микроцентрифужными пробирками в морозильную камеру на -20 ° C или -80 ° C. Наконечники для пипеток также необходимо поместить в морозильную камеру.

4. Matrigel^{тм} необходимо размораживать в течение ночи на льду или в холодильнике при 4°С.

5. В зависимости от объемов клеточной культуры могут быть предпочтительны аликвоты разного размера, например, аликвоты по 0,5 мг (достаточно для одного 6луночного планшета), по 1,0 мг (два планшета) и по 2,0 мг (четыре планшета). 6. Все манипуляции с Matrigel[™] необходимо проводить на льду, используя охлажденные (после выдерживания в морозильнике в течение 24 ч) пробирки и наконечники.

7. Аликвоты Matrigel[™] хранить в морозильнике при -20°С или -80°С. Аликвотить Matrigel[™] необходимо как можно быстрее, поскольку, если он нагреется, то застынет и станет непригодным для нанесения на планшет.

Разморозка аликвот и покрытие планшетов:

1. Каждая аликвота MatrigelTM предназначена для одноразового использования. Его нельзя размораживать и повторно замораживать. Избытком MatrigelTM можно покрыть дополнительное число лунок на планшете и использовать в течение 7-10 дней.

2. Все процедуры проводятся в ламинаре. В стерильную 15-мл пробирку необходимо поместить 11 мл холодной стерильной среды DMEM/F-12.

3. Аликвоту MatrigelTM (1.0 мг) достать из морозильника и добавить к этой аликвоте 1 мл холодной среды DMEM/F-12.

4. Аккуратно пипетировать, чтобы разморозить и растворить MatrigelTM. Незамедлительно перенести этот объем в 15-мл пробирку, содержащую 11 мл DMEM/F-12, и снова пипетировать до полного смешивания.

5. В лунку 6-луночного планшета налить по 1 мл получившегося pacтворa MatrigelTM.

6. Использовать планшет с покрытием MatrigelTM можно через 1-2 ч после его инкубации в инкубаторе при 37°С. Для получения оптимальных результатов планшет необходимо покрывать MatrigelTM за день до использования и храните в течение ночи в инкубаторе при 37°С.

7. Если планшеты не будут использоваться в течение двух часов после приготовления, в каждую лунку необходимо добавить по 1 мл среды DMEM/F-12, чтобы предотвратить высыхание. Если какая-либо часть лунки высохла, использовать такую лунку нельзя. Хранить покрытые планшеты в инкубаторе при 37°С, использовать планшеты можно в течение 7-10 дней после приготовления. Необходимо убедиться, что в инкубаторе соответствующий уровень влажности, иначе планшеты с Matrigel[™] быстро высохнут, перед использованием планшеты необходимо проверить.

Раздел 2: Разморозка человеческих ЭСК

Необходимое оборудование и расходные материалы:

- 1. Стерильный ламинарный шкаф
- 2. 37°С/5% СО2 инкубатор
- 3. Водяная баня 37°С
- 4. Центрифуга

5. Микропипетки на 100µl или 200µl с соответствующими стерильными наконечниками.

6. Стерильные серологические пипетки на 5 мл

7. 95% этанол

8. Стерильные микроцентрифужные пробирки на 1.5 мл

9. Штатив для пробирок

Необходимые реагенты:

1. 6-луночные планшеты, покрытые Matrigel^{тм}

2. Специальная культуральная среда mTeSR[™]1 Medium (Stem Cell Technologies, 85850) или mTeSR[™] Plus (Stem Cell Technologies, 05825) или TeSR-E8[™] (Stem Cell Technologies, 05990)

3. Ингибитор ROCK (Y-27632 dihydrochloride; BD Biosciences, 562822), если необходимо

4. Стерильная вода для растворения ингибитора ROCK.

Подготовка планшета для посадки клеток:

1. Извлечь подготовленные планшеты, покрытые MatrigelTM, из инкубатора.

2. Из каждой лунки удалить излишки среды. В каждую лунку незамедлительно добавить по 1,5 мл культуральной среды.

Разморозка человеческих ЭСК:

1. Извлечь криопробирку с чЭСК из сосуда Дьюара с жидким азотом.

2. Используя длинный пинцет, погрузить криопробирку в водяную баню, нагретую до температуры 37°С, не погружая крышку.

3. Когда останутся только лишь небольшие кристаллы льда, необходимо вынуть пробирку из водяной бани.

Убедившись, что крышка криопробирки плотно закрыта, погрузить ее в емкость с
 95% этанолом для стерилизации внешней части пробирки. Кратковременно (15-30 секунд)
 просушить пробирку в ламинаре.

Удаление криопротектора и ресуспендирование чЭСК:

1. Аккуратно перенести суспензию клеток из криопробирки в стерильную центрифужную пробирку на 15 мл. На данном этапе важно не допускать, чтобы клетки стекали по стенке пробирки, так как это приведет к снижению их способности к последующей адгезии.

2. Чтобы уменьшить осмотический шок, к клеткам необходимо медленно по каплям добавить 11 мл культуральной среды. Добавляя среду, осторожно перемещать пробирку

вперед и назад, чтобы аккуратно перемешать ЭСК с культуральной средой. Это снизит осмотический шок для клеток.

3. Центрифугировать клетки при 200 х g в течение 5 мин.

4. Если для улучшения адгезии клеток требуется добавление ингибитора ROCK, необходимо приготовить среду, его содержащую, пока идет центрифугирование. Конечная концентрация ингибитора ROCK в культуральной среде должна составлять 10 μM. В каждую лунку 6-луночного планшета понадобиться 0.5мл культуральной среды.

5. По окончании центрифугирования удалить супернатант.

6. Ресуспендировать клеточный осадок в 0,5 мл культуральной среды из расчета на каждую лунку планшета (т.е. если клетки будут рассажены на все 6 лунок, то осадок нужно ресуспендировать в 3 мл среды).

7. Несколько раз очень аккуратно пропипетировать клеточную суспензию.

Посадка чЭСК:

1. Медленно добавить в каждую лунку планшета по 0,5 мл клеточной суспензии.

2. Аккуратно поместить планшет в инкубатор и осторожно перемещать его впередназад и из стороны в сторону, чтобы равномерно распределить клетки. Важно избегать круговых движений, чтобы клетки не скапливались в центре лунки. Во время прикрепления клеток необходимо ограничить открытие и закрытие дверок инкубатора, а если нужно получить доступ к нему, открывать и закрывать дверцы осторожно. Это предотвратит нарушение равномерного распределения клеток по лунке.

3. Ежедневно в каждую лунку с клетками необходимо добавлять по 2 мл культуральной среды, до тех пор, пока они не будут готовы к пассированию или сбору.

Раздел 3: Культивирование чЭСК

Необходимое оборудование и расходные материалы:

1. Ламинарный шкаф

2. 37°С/5% СО2 инкубатор

3. Световой микроскоп с камерой

4. Серологические пипетки, стерильные на 5 мл и 10 мл

Необходимые реагенты:

1. Специальная культуральная среда mTeSR[™]1 Medium (Stem Cell Technologies, 85850) или mTeSR[™] Plus (Stem Cell Technologies, 05825) или TeSR-E8[™] (Stem Cell Technologies, 05990).

Культивирование чЭСК:

1. Наблюдение за ростом чЭСК производить ежедневно после разморозки, используя микроскоп. Если клеткам требуется пересадка, осуществить пассирование, как описано ниже.

 Если клетки не требуют пассирования, удалить отработанную среду стерильной серологической пипеткой. Если клетки посажены в несколько лунок, для каждой лунки использовать разные пипетки, чтобы снизить риск заражения.

3. В каждую лунку добавить по 2 мл культуральной среды. После смены среды незамедлительно поставить планшет в инкубатор.

4. Повторять эту процедуру необходимо ежедневно, пока клетки не нарастут для пассирования или сбора.

Раздел 4: Пассирование чЭСК

Метод пассирования с использованием специальных pearentroв (EDTA (Versene®), либо Dispase) рекомендуется для культур с более чем 10 колониями и подходит для стандартного пассирования.

Необходимое оборудование и расходные материалы:

- 1. Ламинарный шкаф
- 2. Стереомикроскоп
- 3. Маркер для колоний
- 4. 37°С/5% СО2 инкубатор
- 5. Водяная баня 37°С
- 6. Стерильные серологические пипетки на 5 мл

Необходимые реагенты:

1. 6-луночные планшеты, покрытые Matrigel.

 Специальная культуральная среда mTeSR[™]1 Medium (Stem Cell Technologies, 85850) или mTeSR[™] Plus (Stem Cell Technologies, 05825) или TeSR-E8[™] (Stem Cell Technologies, 05990)

3. Среда DMEM/-F-12, если используется Dispase

4. Dispase или 0.02%-ный раствор EDTA Solution (Versene).

Как правило, пересадка клеток требуется, когда происходит что-нибудь из следующего: 1. Колонии ЭСК становятся слишком плотными или слишком большими. 2. Происходит усиление дифференцировки.

Соотношение пересаживаемых клеток варьируется, хотя обычно составляет от 1:2 до 1:6 при использовании для пассирования Dispase и от 1:8 до 1:20 при использовании для пассирования EDTA. Клетки после разморозки могут расти с иной скоростью, и необходимо корректировать коэффициент разделения. Общим правилом является соблюдение последнего коэффициента и регулирование соотношения в соответствии с внешним видом колоний ЭСК. Если клетки выглядят здоровыми и в колониях достаточно места, разделять их нужно с использованием того же соотношения, если они слишком плотные и скученные, соотношение можно увеличить, а если клетки редкие - уменьшить. Клетки, как правило, необходимо пассировать каждые 4-6 дней в зависимости от внешнего вида, но решения о пассировании следует принимать, оценивая внешний вид клеток. Иногда клетки необходимо пассировать раньше или позже, чем обычно.

Пассирование чЭСК с использованием EDTA:

1. Переместить планшет с клетками в ламинар.

2. Удалить из каждой лунки отработанную культуральную среду.

3. Промыть каждую лунку 1 мл EDTA комнатной температуры.

4. Добавить 1 мл EDTA комнатной температуры в каждую лунку.

5. Инкубировать в EDTA в течение 6-9 мин без перемешивания при комнатной температуре.

6. Аккуратно удалить EDTA, не нарушая прикрепленный клеточный слой. Если клетки открепились, их нужно собрать и ресуспендировать в 3-6 мл среды.

7. Если клетки не открепились, в лунки нужно добавить 3 мл культуральной среды и аккуратным пипетированием собрать клетки. Эту процедуру можно повторить. Если клетки остаются прилипшими после промывки планшета, их можно осторожно соскоблить, а впоследствии увеличить время инкубации с EDTA.

8. Клетки, собранные с лунки поместить в стерильную пробирку.

Посадка чЭСК:

1. Осторожно повторно ресуспендировать клетки с помощью пипетки на 5 мл.

2. Добавить необходимый объем клеточной суспензии в каждую лунку подготовленного планшета.

3. После высева клеток поставить планшет в инкубатор. Осторожно перемещать планшет вперед-назад и из стороны в сторону, чтобы равномерно распределить клетки, избегать круговых движений, чтобы предотвратить скопление в центре лунок.

4. Инкубировать клетки в течение ночи, чтобы позволить колониям прикрепиться.

6. Как описано выше, ежедневно клеткам нужно добавлять свежую культуральную среду.

Раздел 5: Заморозка чЭСК

Необходимое оборудование и расходные материалы:

1. Ламинарный шкаф

2. 37°С / 5% СО2 инкубатор

- 3. Водяная баня 37°С
- 4. Центрифуга
- 5. Световой микроскоп
- 6. Хранилище с жидким азотом
- 7. Контейнер для замораживания с изопропанолом
- 8. Криопробирки на 1,5 мл
- 9. Стерильные серологические пипетки на 5 мл и 10 мл

10. 95% этанол

Необходимые реагенты:

1. Специальная культуральная среда mTeSR[™]1 Medium (Stem Cell Technologies, 85850) или mTeSR[™] Plus (Stem Cell Technologies, 05825) или TeSR-E8[™] (Stem Cell Technologies, 05990)

2. mFreSR™ криопротективная среда (Stem Cell Technologies, 05854/05855)

3. 0.02%-ный раствор EDTA

Замораживание клеток:

1. Клетки из одной лунки могут быть заморожены в 2 криопробирках. Каждую криопробирку необходимо пометить: название клеток, число пассажей, дата заморозки, инициалы сотрудника.

2. Криопробирки дополнительно стерилизовать в ламинаре в течение 20 мин под УФ.

3. Подготовить контейнер для замораживания с изопропанолом.

4. Собрать клетки с помощью раствора EDTA, как описано выше.

5. Промыть лунки средой mFreSR^{тм}, чтобы полностью собрать оставшиеся клетки. Центрифугировать.

6. Добавить среду mFreSR ^{тм} к собранным клеткам после центрифугирования. Для замораживания одного 6-луночного планшета (по 2 криопробирки на каждую лунку) потребуется 12 мл mFreSR ^{тм} среды.

7. Осторожно пропипетировать собранные клетки, чтобы равномерно перемешать суспензию.

8. По 1 мл клеточной суспензии распределить по криопробиркам.

9. Быстро поместить криопробирки в контейнер для замораживания, содержащий изопропанол. Контейнер поместить в морозильную камеру -80°С на ночь.

10. На следующий день перенести криопробирки с клетками в хранилище с жидким азотом.

Раздел 6: Анализ дифференцировки чЭСК.

Эмбриональные стволовые клетки в культуре могут подвергаться спонтанной дифференцировке. Поэтому крайне важно периодически оценивать состояние клеток в культуре, проводя анализ экспрессии плюрипотентных и дифференцировочных маркеров.

Необходимое оборудование и расходные материалы:

- 1. Ламинарный шкаф
- 2. 37°С/5% СО2 инкубатор
- 3. Проточный цитофлуориметр
- 4. Центрифуга
- 5. Световой микроскоп
- 6. Центрифужные пробирки на 15 мл
- 7. Центрифужные пробирки на 1,5 мл
- 8. Микропипетки переменного объема на 200 мкл и 1000 мкл
- 9. Стерильные серологические пипетки на 5 мл и 10 мл
- 10. Микропипетки переменного объема на 2-20 мкл

Необходимые реагенты:

1. Специальная культуральная среда mTeSR[™]1 Medium (Stem Cell Technologies, 85850) или mTeSR[™] Plus (Stem Cell Technologies, 05825) или TeSR-E8[™] (Stem Cell Technologies, 05990)

2. 0.02%-ный раствор EDTA

3. Фосфатно-солевой буфер (PBS), дополненный 2% фетальной телячьей сыворотки (FBS).

4. Моноклональные антитела: Alexa Fluor® 488 anti-Oct4 (Oct3) Antibody (BioLegend, 653706), Alexa Fluor® 488 anti-human/mouse SSEA-3 Antibody (BioLegend, 330306), PE antihuman SSEA-4 Antibody (BioLegend, 330406), Alexa Fluor® 647 anti-Nanog Antibody (BioLegend, 674210), APC anti-human CD15 (SSEA-1) Antibody (BioLegend, 301908), Human TRA-1-60(R) PE-conjugated Antibody (R&D Systems, FAB4770P), Human TRA-1-81 Alexa Fluor® 647-conjugated Antibody (R&D Systems, IC8495R-050UG).

5. Фиксирующий раствор (CytoFix, BD).

6. Triton X100, Tween-20.

Поверхностное окрашивание клеток для проточной цитофлуориметрии:

1. Клетки собрать, как описано выше, с помощью раствора EDTA.

2. Центрифугировать при 200 х g в течение 5 мин.

3. Удалить супернатант, клеточный осадок ресуспендировать в PBS, дополненном 2% FBS. Инкубировать в течение 20 мин для блокирования сайтов неспецифического связывания.

4. Повторить этап центрифугирования. Удалить супернатант. Осадок ресупендировать в таком объеме PBS, дополненном 2% FBS, чтобы на каждый образец для окрашивания приходилось 100 мкл суспензии клеток (концентрация клеток в образце 300 тыс-1 млн/мл).

5. В каждый образец добавить соответствующие флуоресцентно-меченные антитела к поверхностным маркерам (Alexa Fluor® 488 anti-human/mouse SSEA-3, PE anti-human SSEA-4, APC anti-human CD15 (SSEA-1), Human TRA-1-60(R) PE-conjugated Antibody, Human TRA-1-81 Alexa Fluor® 647-conjugated Antibody). Инкубировать с антителами в течение 1 ч при 4°C в темноте.

6. Центрифугировать образцы, как описано выше.

7. Провести две отмывки в PBS центрифугированием.

8. Клеточные осадки ресуспендировать в CytoFix.

9. Перенести образцы в цитометрические пробирки. Провести анализ на проточном цитофлуориметре.

Внутриклеточное окрашивание клеток для проточной цитофлуориметрии:

1. Клетки собрать, как описано выше, с помощью раствора EDTA.

2. Центрифугировать при 200 х g в течение 5 мин.

3. Удалить супернатант, клеточный осадок ресуспендировать в PBS и провести еще одно центрифугирование.

4. Зафиксировать клетки в течение 30 мин в CytoFix.

5. Отмыть клетки дважды в PBS центрифугированием.

6. Провести пермеабилизацию клеточной мембраны, инкубируя клетки в PBS, дополненном 0,1% Triton X100, в течение 10 мин.

7. Провести осаждение и 2 отмывки в PBS, дополненном 2% FBS и 0,1 % Tween-20.

8. Осадок ресупендировать в таком объеме PBS, дополненном 2% FBS и 0,1 % Tween-20, чтобы на каждый образец для окрашивания приходилось 100 мкл суспензии клеток (концентрация клеток в образце 800 тыс-1 млн/мл).

9. В каждый образец добавить соответствующие флуоресцентно-меченные антитела к внутриклеточным маркерам (Alexa Fluor® 488 anti-Oct4 (Oct3), Alexa Fluor® 647 anti-Nanog). Инкубировать с антителами в течение 1 ч при 4°С в темноте.

6. Центрифугировать образцы, как описано выше.

7. Провести две отмывки в PBS центрифугированием.

8. Клеточные осадки ресуспендировать в CytoFix.

9. Перенести образцы в цитометрические пробирки. Провести анализ на проточном цитофлуориметре.
1.9.П.3. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА КЛЕТОЧНОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ И ВЫДЕЛЕНИЯ ГОМОГЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Клеточные культуры не являются гомогенными популяциями одинаковых клеток. Клетки могут находиться на разных стадиях спонтанной дифференцировки, клеточного цикла, реализовывать программу апоптоза, а также заметно отличаться друг от друга по другим признакам, включая морфологические. Все это может влиять на результаты омиксных исследований культур. Для оценки клеточной гетерогенности и, при необходимости, выделения определенных субпопуляций клеток используется метод проточной цитометрии. Этот метод позволяет анализировать поверхностные и внутриклеточные маркеры отдельно каждой из клеток, определять количество ДНК (клеточный цикл), жизнеспособность, стадию апоптоза и другие параметры, включая морфологические.

1. Используемое оборудование и программное обеспечение

При подготовке клеточных образцов к флуоресцентному окрашиванию используется ламинарный шкаф 2 класса защиты, электрический насос-дозатор для серологических пипеток, CO2-инкубатор, световой инвертированный микроскоп, автоматизированный счетчик клеток, центрифуга для пробирок объемом 15-50 мл и планшетов. Для проведения флуоресцентного окрашивания образцов и подготовки к цитометрии используется центрифуга для пробирок объемом 5-15 мл, вортекс, холодильник на +4°C, ультразвуковая баня. Цитометрический анализ и клеточная сортировка производятся с использованием проточного цитометра-сортера BD FACSAria III (BD Biosciences), оснащенного синим (488 нм), желто-зеленым (561 нм), красным (633 нм), фиолетовым (405 нм) и УФ (375 нм) лазерами. Для графического представления результатов цитометрии используют программу FlowJo.

Цитометрический анализ с визуализацией проводится с использованием проточного цитометра с визуализацией Amnis ImageStreamX Mark II (Luminex), оснащенного фиолетовым (405нм), синим (488нм), желто-зеленым (561нм), красным (642нм), дальним красным (785нм) лазерами. Для графического представления результатов цитометрии с визуализацией используют программу Amnis IDEAS.

2. Подготовка клеточных образцов к окрашиванию

2.1 В случае адгезивной культуры клеток монослой необходимо перевести в суспензию. Для этого из культурального флакона/планшета удалить питательную среду, промыть монослой раствором Версена 2 раза. Затем добавить смесь раствора трипсина и

раствора Версена (1:1) или при необходимости более щадящий фермент аккутазу в количестве, достаточном для покрытия всего монослоя клеток и инкубировать при 37°C под контролем микроскопии до момента дезагрегации клеток.

2.2 Подсчитать число клеток с использованием автоматизированного счетчика клеток. Для этого отобрать 20 мкл клеточной суспензии и внести в специальный слайд. При подсчете установить алгоритм, предназначенный для анализа стабильных клеточных линий. Пересчитать данные в соответствии с общим объемом клеточной суспензии.

2.3 Отобрать из флакона необходимый объем суспензии клеток в соответствии с предполагаемым количеством образцов для последующего цитометрического анализа и/или сортировки с расчетом 10^6-10^7 клеток на каждый образец, в т.ч. для контрольных образцов.

2.4 Клеточную суспензию отмыть центрифугированием в растворе Хенкса в течение 3 минут при 300 g. Супернатант слить, а полученный осадок ресуспендировать в фосфатносолевом буфере в концентрации 10⁶-10⁷ клеток на 1 мл. Разделить полученную суспензию на отдельные образцы, поместив по 1 мл в пробирки для цитометрии в соответствии с предполагаемым количеством образцов для цитометрического анализа.

3. Анализ поверхностных маркеров клеток. Иммунофлуоресцентное окрашивание

3.1 Суспензию клеток в концентрации 10⁶-10⁷ клеток на 1 мл центрифугировать 3 минуты при 300 g, образовавшийся супернатант удалить, а осадок ресуспендировать в 100 мкл буфера для окрашивания (Stain buffer).

3.2 Добавить к анализируемому образцу моноклональные антитела к исследуемым конъюгированные поверхностным антигенам, с флуорохромом, в количестве, рекомендуемом производителем (обычно объем варьирует от 1 до 20 мкл на образец в зависимости от концентрации конкретных коммерческих антител). Для контроля неспецифического подготовить контрольные образцы, окрашенные связывания же производителя. При необходимости еще изотипическими антителами того дополнительно сделать образцы, окрашенные только одним каждым используемым флуорохромом/красителем, для процедуры компенсации сигнала. Кроме того, необходимо оставить образец неокрашенных клеток. Дальнейшие манипуляции одинаковы для всех типов образцов.

3.3 Инкубировать в темноте при +4°С в течение 15-30 минут с периодическим встряхиванием пробирок на минишейкере.

3.4 После инкубации к клеткам добавить 1 мл Stain buffer и центрифугировать 3 минуты при 300 g. Повторить отмывку 2-3 раза. Осадок ресуспендировать в Stain buffer.

3.5 В случае прижизненного анализа клеток добавить к образцам 1 мкл флуоресцентного красителя нуклеиновых кислот Sytox Dead Cell Stain для окрашивания мертвых клеток. Цвет красителя выбрать с учетом используемого флуорохрома.

3.6 В случае отсроченного цитометрического анализа окрашенные клетки необходимо зафиксировать. Для этого клеточный осадок ресуспендировать в 250 мкл буфера для фиксации Cytofix и инкубировать 20 минут в темноте. Зафиксированные клетки можно хранить при +4°C в течение 2-3 дней. На время хранения к суспензии фиксированных клеток можно добавить 0,5 мл фосфатно-солевого буфера для минимизации деформации клеток.

4. Анализ внутриклеточных дифференцировочных маркеров. Иммунофлуоресцентное окрашивание

4.1 Суспензию клеток в концентрации 10⁶-10⁷ клеток на 1 мл центрифугировать 3 минуты при 300 g и удалить супернатант. Клеточный осадок ресуспендировать в 250 мкл буфера для фиксации и пермеабилизации Cytofix/Cytoperm и инкубировать в течение 20 минут.

4.2 Довести объем суспензии клеток до 1 мл добавлением буфера для отмывки Perm/Wash, центрифугировать 3 минуты при 300 g и удалить супернатант. Ресуспендировать клеточный осадок в 100 мкл Perm/Wash.

4.3 анализируемому образцу Добавить К моноклональные антитела К внутриклеточным антигенам, конъюгированные с флуорохромом, в количестве, рекомендуемом производителем (обычно объем варьирует от 1 до 20 мкл на образец в зависимости от концентрации конкретных коммерческих антител). Для контроля неспецифического подготовить образцы, связывания контрольные окрашенные изотипическими антителами того же производителя. При необходимости еще дополнительно сделать образцы, окрашенные только одним каждым используемым флуорохромом/красителем, для процедуры компенсации сигнала. Кроме того, необходимо оставить контрольный образец неокрашенных клеток, с которым совершить те же манипуляции, что и при окрашивании экспериментальных образцов.

4.4 Инкубировать клетки с антителами в темноте при +4°С в течение 15-30 минут с периодическим встряхиванием пробирок на минишейкере.

4.5 Довести объем суспензии клеток до 1 мл добавлением буфера для отмывки Perm/Wash, центрифугировать 3 минуты при 300 g и удалить супернатант. Повторить отмывку 2 раза, после чего ресуспендировать клеточный осадок в 0,5-1 мл фосфатно-солевого буфера.

4.6 Суспензию окрашенных зафиксированных клеток можно хранить в темноте при +4°С в течение 2-3 дней до проведения цитометрического анализа.

Важные замечания: Характеристики светорассеяния и неспецифической флуоресценции при цитометрическом анализе зафиксированных и пермеабилизованных клеток изменяются. Поверхностные антигены должны быть окрашены до фиксации клеток.

Специальные рекомендации: Белки цитоскелета, вирусные и некоторые ферменты лучше всего окрашиваются при фиксировании с применением высокой концентрации ацетона, этанола, формальдегида. При детекции секретируемых белков необходимо использовать Брефельдин А или другие блокаторы внутриклеточного транспорта из эндоплазматического ретикулума. При детекции внутриядерных антигенов необходимо использовать сильные детергенты, такие как Тритон X-100 или NP-40 (0.1–1%). При выявлении цитозольных белков, белков поверхности цитоплазмы и растворимых ядерных антигенов можно использовать мягкие детергенты, не разрывающие мембрану, Твин 20, сапонин, дигитонин и лейкоперм (0.5% v/v). При выявлении антигенов, расположенных близко к плазматической мембране и растворимых цитоплазматических антигенов, предпочтительно произвести пермеабилизацию клеток без фиксации.

5. Анализ клеточного цикла (содержания ДНК). Флуоресцентное окрашивание

5.1 Суспензию клеток в концентрации 10⁶-10⁷ клеток на 1 мл центрифугировать 3 минуты при 300 g и удалить супернатант. К клеточному осадку добавить 20 мкл фосфатносолевого буфера, ресуспендировать и встряхнуть на мини-шейкере.

5.2 Зафиксировать клетки в 1 мл холодного 70% этанола, добавляя его по каплям и периодически встряхивая на мини-шейкере. Инкубировать в этаноле в течение 30 минут при +4°C.

5.3 Центрифугировать 5 минут при 850 g и удалить супернатант. Повторить отмывку еще 1-2 раза при тех же параметрах в фосфатно-солевом буфере.

5.4 Обработать клетки рибонуклеазой I для разрушения РНК. Для этого добавить 50 мкл стокового раствора рибонуклеазы I. Концентрация стокового раствора рибонуклеазы I 100 мкг/мл.

5.5 Добавить 200 мкл стокового раствора пропидий иодида. Концентрация стокового раствора пропидий иодида 50 мкг/мл.

5.6 Довести объем образца до 1 мл добавлением фосфатно-солевого буфера, центрифугировать 3 минуты при 300 g, удалить супернатант. Повторить дважды.

5.7 Отмытый осадок ресуспендировать в 1 мл фосфатно-солевого буфера и приступить к цитометрическому анализу.

Важное замечание: Наиболее распространенным красителем для количественного анализа содержания ДНК в клетках является пропидий иодид. Однако при необходимости он может быть заменен 7-AAD, DyeCycle, Hoechst 33342, Hoechst 33258, TO-PRO-3, DAPI, DRAQ5 или DRAQ7 в зависимости от желаемого спектра испускания флуоресценции.

6. Анализ жизнеспособности клеток (выявление доли мертвых клеток и клеток на разных стадиях апоптоза)

6.1 Суспензию клеток в концентрации 10⁶-10⁷ клеток на 1 мл фосфатно-солевого буфера центрифугировать 3 минуты при 300 g и удалить супернатант. Повторить дважды. Клеточный осадок ресуспендировать в 100 мкл связывающего буфера.

6.2 Добавить пропидий иодид. Оптимальное количество пропидий иодида может варьировать в диапазоне 2-10 мкл/образец в зависимости от концентрации и размера клеток.

6.3 Добавить Аннексин V, конъюгированный с флуорохромом. Оптимальное количество Аннексина V варьирует в диапазоне 5-15 мкг/мл в зависимости от концентрации и размера клеток.

6.4 Аккуратно перемешать клетки и инкубировать в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте.

6.5 Довести объем образца до 1 мл добавлением фосфатно-солевого буфера, центрифугировать 3 минуты при 300 g, удалить супернатант. Повторить дважды.

6.6 Отмытый осадок ресуспендировать в 1 мл фосфатно-солевого буфера и приступить к цитометрическому анализу.

7. Цитометрический анализ

7.1 Цитометрический анализ производится на приборе BD FACSAria III (BD Biosciences). Перед эксплуатацией прибора необходимо проверить наличие достаточного объема проточной обжимающей жидкости (Sheath fluid) в соответствующем баке, а также опорожнить бак для приема сливной жидкости. Затем включить рабочую станцию и прибор, запустить программу для управления прибором и первичной обработки данных BD FACSDiva Software version 7. После соединения прибора и рабочей станции начать процедуру запуска и диагностики системы. Поместить в прибор форсунку необходимого диаметра. Для стабильных раковых линий обычно используют диаметр 70 мкм.

7.2 В программе BD FACSDiva Software version 7 выбрать нужную конфигурацию с учетом используемого размера форсунки, желаемого давления проточной жидкости и используемых для конкретного эксперимента лазеров. Произвести калибровку прибора на выбранной конфигурации с использованием специальных калибровочных частиц CST. В дереве папок создать папку для проводимого эксперимента, задать нужное количество образцов и дать им название, обозначить используемые флуоресцентные метки в

соответствующих каналах детекции. Задать линейные координаты в случае анализа клеточного цикла. Использовать логарифмические координаты для других типов экспериментов.

7.3 Подготовленные клеточные образцы перенести в пробирки для цитометрии с крышкой-фильтром с диаметром пор 35 мкм для исключения клеточных агрегатов. После фильтрации поместить образцы в темноту на +4°C до анализа.

7.4 Запустить поток обжимающей жидкости. В случае распыления жидкости форсункой почистить форсунку в ультразвуковой бане в течение 1 мин.

7.5 После настройки потока поместить в прибор контрольный образец неокрашенных клеток для подбора скорости потока и оптимального вольтажа фотоумножетелей в каждом анализируемом канале детекции, а также определения порога регистрации по прямому светорассеиванию. Вольтажи необходимо подобрать так, чтобы все события уместились на шкале детектируемого сигнала.

7.6 При анализе из рассматриваемой клеточной популяции исключить клеточный дебрис и дуплеты на основе параметров их прямого и бокового светорассеяния. Анализировать не менее 10 тыс. событий.

7.7 Записать сигнал от каждого из образцов. При высокой яркости флуоресценции и выходе за пределы шкалы необходимо снизить вольтаж фотоумножителя и перезаписать данные для всех предшествующих образцов. Все образцы в эксперименте должны быть проанализированы на одних и тех же значениях вольтажей.

7.8 При использовании в одном образце нескольких флуорохромов и красителей с пересекающимися спектрами флуоресценции необходимо записать сигналы от образцов, окрашенных только одним каждым из этих красителей/флуорохромов. Затем на основании полученных данных произвести процедуру компенсации сигналов и применить компенсационную матрицу к экспериментальным образцам.

7.9 Для графического представления результатов выгрузить графики в виде изображений в формате TIFF/JPEG. При необходимости наложения гистограмм от нескольких образцов файлы с данными в формате FCS обработать в программе FlowJo.

8. Сортировка клеток

8.1 По результатам цитометрического анализа выделить гейтами интересующие популяции для сортировки. Для увеличения точности сортировки гейты расположить на наибольшем возможном расстоянии друг от друга. При сортировке живых клеток в отсеке с образцом установить температуру +4°C. Желательно установить минимальную скорость потока и использовать форсунку с диаметром 100 мкм и давлением 20 psi для снижения механического повреждения клеток при сортировке.

8.2 Произвести настройку цитометра для сортировки. Для этого настроить капли в потоке – установить оптимальный gap, drop1, частоту и амплитуду колебаний форсунки. Затем зафиксировать оптимальные параметры нажатием клавиши Sweet Spot. После этого с использованием специальных бидсов для настройки сортировки Accudrop определить значение параметра Drop Delay. Помимо этого, запустить режим Test sort и установить оптимальное положение струй жидкости для наиболее точного попадания в пробирки.

8.3 Выбрать режим «Purity» или «Yield» в зависимости от необходимой чистоты образца и запустить сортировку клеток. Сортируемые клеточные популяции собирать в специальные полипропиленовые пробирки, содержащие 0,5-1 мл фосфатно-солевого буфера. По окончании сортировки пробирки с отсортированными клеточными популяциями центрифугировать 3 мин при 300 g, удалить супернатант, и заморозить при - 80°С для проведения последующего анализа.

8.4 При необходимости дальнейшего культивирования отсортированных клеток в фосфатно-солевой буфер для сбора сортируемых клеток дополнительно добавить 10% бычьей эмбриональной сыворотки и 1-кратный антибиотик. Отсортированную суспензию клеток поместить в культуральный флакон/планшет в соответствующую питательную среду.

9. Цитометрический анализ клеток с визуализацией

9.1 Проточная цитометрия с визуализацией клеток проводится с применением проточного цитометра Amnis ImageStreamX Mark-II (Luminex). Перед началом эксплуатации прибора необходимо удостовериться в наличии буферных растворов, калибровочных частиц и чистящих растворов в соответствующих контейнерах, а также опорожнить контейнер для отходов. Затем включить прибор и рабочую станцию.

9.2 Запустить приложение для управления прибором ISX и запустить процедуру промывки прибора и заполнения его обжимающей проточной жидкостью. После промывки прибора запустить процедуру калибровки лазеров и диагностики системы.

9.3 Загрузить в рабочее пространство Стандартный шаблон или Шаблон эксперимента из меню "File".

9.4 Нажать кнопку "Load". Установить образец с клетками в прибор. При анализе образца включить соответствующий лазер и подобрать оптимальное значение мощности излучения, достигая максимальной яркости без засвета сигнала. Обычно канал детекции Brightfield назначают в 1 или 9 канале, мощность для SSC составляет около 40 mW.

9.5 Проанализировать точечные графики, установить гейты и выбрать субпопуляцию клеток, сигналы от которых будут записываться. Обычно записывают сигнал от популяции единичных клеток, которую выявляют с использованием графика Brightfield area vs. Aspect

ratio. Или можно записать сигнал от всех событий. В соответствующем окне дать название образцу, задать адрес папки и установить число событий для записи. Выбрать формат файла «.rif» (IDEAS) или «.fcs» (FlowJo). Запустить сбор данных.

9.6 При использовании в эксперименте нескольких флуорохромов/красителей необходимо дополнительно перед экспериментальным образцом проанализировать контрольные компенсационные образцы, окрашенные только одним каждым из используемых флуорохромов/красителей. Для этого в разделе Wizard выбрать контроль, Compensation Wizard. Затем загрузить В прибор компенсационный удостовериться, что система обнаруживает сигнал в корректном канале детекции. Произвести подбор оптимальных параметров таким же способом, как описано в пп. 8.4-8.5 и собрать сигнал от клеток. Повторить эту процедуру для всех компенсационных образцов. При использовании Compensation Wizard система автоматически выключает лазеры Brightfield и SSC, включает все каналы флуоресценции и производит сбор 500 событий от каждого компенсационного образца. Полученную таким образом компенсационную матрицу необходимо сохранить.

9.7 Шаблон эксперимента для последующих измерений можно сохранить, нажав в меню "File" пункт "Save Template".

9.8 Обработка и представление полученных данных производится в программе Amnis IDEAS.

1.9.П.4. ПРОТОКОЛ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОПОРОВОГО ДЕТЕКТОРА

Протокол предназначен для поведения транскриптомного анализа ткани печени человека и культивируемых клеток (гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 или эмбриональных стволовых клеток) с использованием нанопорового детектора ONT MinION. Протокол описывает процедуру пробоподготовки биологических образцов и процедуру приготовления библиотеки для секвенирования.

1. Используемые материала, растворы и оборудование

1.1. Расходные материалы и реактивы

1.1.1. Набор для выделения суммарной РНК «RNeasy Mini Kit» (Qiagen, Кат. №74104) или аналог

1.1.2. Набор для выделения матричной РНК «Dynabeads® mRNA Purification Kit» (ThermoFisher Scientific, Кат. №61006) или аналог

1.1.3. Набор «Direct RNA sequencing» (ONT, Кат. №SQK-RNA002)

1.1.4. SuperScript III Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, Кат. №18080044, поставляется с «5X first-strand buffer»)

1.1.5. NEBNext Quick Ligation Module (NEB, Kar. №E6056)

1.1.6. Agencourt RNAClean XP beads (Beckman Coulter, Kar. №A63987)

1.1.7. Набор «Qubit dsDNA HS Assay Kit» (ThermoFisher Scientific, Кат. №Q32851) или аналог

1.1.8. β-меркаптоэтанол (β-mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, Кат. №М6250) или аналог

1.1.9. Раствор DTT (dithiothreitol), 1 М в воде (Sigma-Aldrich, Кат. №646563) или аналог

1.1.10. 10 mM раствор dNTP (NEB, Кат. №N0447 или аналог)

1.1.11. 95% этанол производства ООО «БиоФармКомбинат» или аналог

1.1.12. 70% этанол производства ООО «БиоФармКомбинат» или аналог

1.1.13. Вода, свободная от нуклеаз (производитель – любой)

1.1.14. Наконечники для лабораторных механических пипеток, свободные от нуклеаз (производитель – любой)

1.1.15. Пробирки полипропиленовые на 2 мл, свободные от нуклеаз (Eppendorf) или аналог

1.1.16. Пробирки полипропиленовые на 1,5 мл, свободные от нуклеаз (Eppendorf) или аналог

1.1.17. Пробирки полипропиленовые на 1,5 мл, свободные от нуклеаз, DNA LoBind (Eppendorf)

1.1.18. ПЦР-пробирки на 0,2 мл, свободные от нуклеаз (производитель – любой)

1.1.19. Перчатки медицинские (производитель – любой)

1.1.20. Лёд

1.2. Оборудование

1.2.1. Нанопоровый детектор MinION (Oxford Nanopore Technology)

1.2.2. Настольная центрифуга Eppendorf 5415D (Eppendorf) или аналог

1.2.3. Спектрофотометр NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) или аналог

1.2.4. Флуориметр Qubit 4 (ThermoFisher Scientific, Кат. № Q33327) или аналог

1.2.5. Термостат TDB-120 (Biosan) или аналог

1.2.6. Миницентрифуга IKA mini G (IKA, Кат. № 0003958000) или аналог

1.2.7. Магнитный штатив DynaMag-2 (ThermoFisher Scientific, Кат. № 12321D) или аналог

1.2.8. Ротационный перемешиватель HulaMixer[™] Sample Mixer (ThermoFisher Scientific, Кат. № 15920D) или аналог

1.2.9. Набор лабораторных механических пипеток (производитель – любой)

1.2.10. Гомогенизатор ткани Даунса 1 мл (DWK Life Sciences GmbH, Кат. № 357538 или аналог)

1.2.11. Льдогенератор (производитель – любой)

1.2.12. Шприц 2 мл. одноразовый стерильный с иглой 0,6х30 (производитель – любой)

1.2.13. Ножницы STALEKS CLASSIC 20 ТҮРЕ 2 SC-20/2 (STALEKS) или аналог

1.2.14. Пинцет медицинский (производитель – любой)

2. Порядок работы

Все операции выполняются в перчатках.

В зависимости от типа биологического материала руководствоваться либо п. 2.2.3а (образцы ткани печени человека), либо п. 2.2.3б. (культивируемые клетки человека линии НерG2 или эмбриональные стволовые клетки)

2.1. Выделение суммарной РНК.

2.1.1. Добавить по 10 мкл β-меркаптоэтанола на каждые 1 мл буфера RLT из набора «RNeasy Mini Kit».

2.1.2. При первом использовании буфера RPE добавить 4 объема 96% этанола к концентрату буфера RPE из набора «RNeasy Mini Kit».

2.1.3а. Из морозильной камеры достать пробирку с фрагментом образца печени человека в стабилизирующем растворе. Извлечь пинцетом фрагмент образца печени

человека из пробирки со стабилизирующим раствором (RNAlater или аналог) и отделить от него ножницами часть весом около 60 мг (приблизительный размер 6 мм х 3 мм х 3 мм). Отделённую часть обсушить на куске фильтровальной бумаги, при возможности измельчить ножницами и поместить половину её с помощью пинцета в гомогенизатор Даунса. Остаток фрагмента образца печени поместить обратно в пробирку со стабилизирующим раствором и поместить пробирку на хранение в морозильную камеру. Добавить 600 мкл буфера RLT, содержащего β-меркаптоэтанол, и гомогенизировать ткань до исчезновения визуально видимых кусочков. Полученный лизат клеток ткани печени переместить в полипропиленовую пробирку объемом 2 мл и дополнительно пропустить через иглу (диаметр 0,6 мм) шприца объемом 2 мл не менее 10 раз. Сделать тоже самое со второй половиной отделённой части ткани печени. Перейти к п. 2.1.4.

2.1.36. К клеткам в двух центрифужных пробирках (каждая содержит 4-5 млн. клеток в виде осадка) добавить в каждую по 600 мкл буфера RLT, содержащего β-меркаптоэтанол. Лизировать клетки пропусканием их через иглу (диаметр 0,6 мм) медицинского одноразового шприца объемом 2 мл не менее 10 раз. Перейти к п. 2.1.4.

2.1.4. Центрифугировать лизат 3 мин при 16000 g или выше. Отобрать супернатант и поместить в новую пробирку объемом 2 мл.

2.1.5. Добавить равный объем 70% этанола к лизату в каждой пробирке, перемешать пипетированием. Перенести 700 мкл смеси из каждой пробирки в отдельную центрифужную колонку. Колонку поместить в пропиленовую пробирку объемом 1,5 мл из набора «RNeasy Mini Kit». Центрифугировать 30 с при 8000 g. Удалить фильтрат и поместить остаток смеси лизата со спиртом из той же пробирки в эту же центрифужную колонку. Повторить центрифугирование. Удалить фильтрат.

2.1.6. Добавить к каждой колонке 700 мкл буфера RW1 из набора «RNeasy Mini Kit». Центрифугировать 30 с при 8000 g. Удалить фильтрат. Повторить операцию.

2.1.7. Добавить к каждой колонке 500 мкл буфера RPE. Центрифугировать 30 с при 8000 g. Удалить фильтрат. Повторить операцию.

2.1.8. Центрифугировать колонки дополнительно 1,5 мин при 8000 g.

2.1.9. Поместить каждую колонку в новую пропиленовую пробирку объемом 1,5 мл из набора «RNeasy Mini Kit». Добавить 30 мкл воды из набора «RNeasy Mini Kit», не содержащей нуклеаз, и центрифугировать 30 с при 8000 g. Элюаты объединить в одну пробирку и поместить её в ледяную баню.

2.1.10. Определить концентрацию суммарной РНК на спектрофотометре NanoDrop 1000 (или его аналоге), следуя инструкции производителя оборудования. При отсутствии у спектрофотометра опции автоматического вычисления концентрации РНК, рассчитать

концентрацию, исходя из того, что одна единица оптической плотности на 260 нм соответствует концентрации РНК 40 мкг/мл.

2.2. Выделение матричной РНК (мРНК) из препарата суммарной РНК.

2.2.1. Препарат суммарной РНК, содержащий не более 75 мкг РНК, довести до объема 100 мкл водой, не содержащей нуклеаз.

2.2.2. Прогреть полученный раствор суммарной РНК при 65°С в течении 2 мин, поместив в предварительно нагретый блок термостата.

2.2.3. Тщательно ресуспендировать микрочастицы Dynabeads® Oligo (dT)₂₅ из набора «Dynabeads® mRNA Purification Kit» и отобрать 200 мкл в полипропиленовую пробирку объемом 1,5 мл. Поместить пробирку в магнитный штатив на 30 с или пока все микрочастицы не соберутся на стенки пробирки. Удалить растворитель. Удалить пробирку из штатива.

2.2.4. Добавить 100 мкл раствора Binding Buffer из набора «Dynabeads® mRNA Purification Kit» в пробирку с микрочастицами, ресуспендировать микрочастицы перемешиванием. Поместить пробирку в магнитный штатив на 30 с или пока все микрочастицы не соберутся на стенки пробирки. Удалить раствор. Удалить пробирку из штатива.

2.2.5. Добавить 100 мкл раствора Binding Buffer из набора «Dynabeads® mRNA Purification Kit» в пробирку с микрочастицами, ресуспендировать микрочастицы перемешиванием. Смешать полученную суспензию с 100 мкл раствора суммарной PHK, содержащим 75 мкг PHK или менее. Поместить пробирку со смесью в ротационный перемешиватель типа HulaMixerTM Sample Mixer и перемешивать при комнатной температуре 3-5 мин.

2.2.6. После инкубации с перемешиванием, поместить пробирку в магнитный штатив на 30 с или пока все микрочастицы не соберутся на стенки пробирки. Удалить раствор. Удалить пробирку из штатива.

2.2.7. Добавить к микрочастицам 200 мкл раствора Washing Buffer B из набора «Dynabeads® mRNA Purification Kit» и ресуспендировать микрочастицы перемешиванием. Поместить пробирку в магнитный штатив на 30 с или пока все микрочастицы не соберутся на стенки пробирки. Удалить раствор. Удалить пробирку из штатива. Повторить операцию.

2.2.8. Добавить 10 мкл воды, не содержащей нуклеаз, к микрочастицам, ресуспендировать частицы перемешиванием, и поместить пробирку на 2 мин в блок термостата, предварительно нагретый до 65-80°С.

2.2.9. Немедленно поместить пробирку в магнитный штатив на 30 с или пока все микрочастицы не соберутся на стенки пробирки. Собрать элюат и перенести в ПЦР-пробирку. Поместить пробирку в ледяную баню.

2.2.10. Определить концентрацию мРНК на спектрофотометре NanoDrop 1000 (или его аналоге), следуя инструкции производителя оборудования. При отсутствии у спектрофотометра опции автоматического вычисления концентрации РНК, рассчитать концентрацию, исходя из того, что одна единица оптической плотности на 260 нм соответствует концентрации РНК 40 мкг/мл.

Необходимый минимальный выход мРНК составляет 0,5 мкг. Полученный препарат мРНК может быть использован немедленно для приготовления библиотеки для секвенирования или заморожен для хранения при -80°С. При получении меньшего количества мРНК, процедуры, описанные в пп. 2.1.1-2.2.10, необходимо повторить с новым образцом биологического материала, а полученные препараты мРНК объединить.

<u>2.3. Приготовление библиотеки для прямого секвенирования мРНК с использованием</u> нанопорового детектора

2.3.1. Раствор, содержащий 0,5 мкг мРНК, довести при необходимости объем до 9 мкл водой, свободной от нуклеаз. Добавит компоненты из наборов «NEBNext Quick Ligation Module» и «Direct RNA sequencing»: 3 мкл NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer, 0,5 мкл RCS, 1 мкл RTA и 1,5 мкл T4 DNA Ligase. Перемешать пипетированием и осадить коротким центрифугированием на миницентрифуге. Инкубировать смесь 10 мин при комнатной температуре.

2.3.2. Смешать в отдельной пробирке 9 мкл воды, свободной от нуклеаз, 2 мкл раствора dNTP, 8 мкл 5X first-strand buffer, 4 мкл 0,1 M DTT. Добавить полученную смесь к смеси, полученной в п. 3.3.1. Перемешать пипетированием. Добавить 2 мкл SuperScript III Reverse Transcriptase, перемешать пипетированием. Поместить пробирку в блок термостата, предварительно нагретый до 50°C на 50 мин, затем поднять температуру до 70°C и инкубировать 10 мин. Переместить пробирку в ледяную баню.

2.3.3. Переместить раствор, полученный в п. 3.3.2, в полипропиленовую пробирку DNA LoBind. Ресуспендировать микрочастицы «Agencourt RNAClean XP beads», отобрать 72 мкл и добавить к раствору в пробирке DNA LoBind. Перемешать пипетированием и инкубировать на ротационном перемешиватели 5 мин при комнатной температуре.

2.3.4. После инкубации поместить пробирку в магнитный штатив на 30 с или пока все микрочастицы не соберутся на стенки пробирки. Удалить раствор. Не убирая пробирку из магнитного штатива, добавить 150 мкл 70% этанола, не затрагивая осадок микрочастиц.

Повернуть пробирку в штативе на 180°, дождаться полного перемещения осадка на противоположную сторону пробирки, и повторить операцию. Удалить этанол.

2.3.5. Убрать пробирку из штатива и ресуспендировать микрочастицы в 20 мкл воды, свободной от нуклеаз. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре. Поместить пробирку в магнитный штатив, собрать микрочастицы на стенке пробирки и отобрать элюат в пробирку DNA LoBind.

2.3.6. Добавить к элюату 3 мкл воды, свободной от нуклеаз, и компоненты из наборов «NEBNext Quick Ligation Module» и «Direct RNA sequencing»: 8 мкл NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer, 6 мкл RMX, 3 мкл T4 DNA Ligase. Инкубировать полученную смесь 10 мин при комнатной температуре.

2.3.7. Ресуспендировать микрочастицы «Agencourt RNAClean XP beads», отобрать 40 мкл и добавить к смеси в пробирке DNA LoBind, полученной в п. 3.3.6. перемешать пипетированием и инкубировать на ротационном перемешиватели 5 мин при комнатной температуре. После инкубации поместить пробирку в магнитный штатив на 30 с или пока все микрочастицы не соберутся на стенки пробирки. Удалить раствор.

2.3.8. Добавить 150 мкл буфера WSB из набора «Direct RNA sequencing». Убрать пробирку из штатива и ресуспендировать микрочастицы легким встряхиванием пробирки. Поместить пробирку в магнитный штатив, собрать микрочастицы на стенке пробирки. Удалить раствор. Повторить процедуру.

2.3.9. Убрать пробирку из штатива, добавить 21 мкл Elution Buffer из набора «Direct RNA sequencing». Ресуспендировать микрочастицы легким встряхиванием пробирки и инкубировать 10 мин при комнатной температуре. Поместить пробирку в магнитный штатив, собрать микрочастицы на стенке пробирки и отобрать элюат в пробирку DNA LoBind.

2.3.10. Определить концентрацию нуклеиновых кислот, используя набор «Qubit dsDNA HS Assay Kit» и флуориметр Qubit 4 в соответствии с инструкцией производителя.

Ожидаемый выход ~200 нг. При существенно более низком выходе, библиотеку заморозить и хранить при -80°С. Приготовить новую библиотеку и при необходимости библиотеки объединить для получения требуемого суммарного выхода.

2.3.11. Смешать 20 мкл подготовленной библиотеки с 17,5 мкл воды, свободной от нуклеаз, и с раствором RRB из набора «Direct RNA sequencing». Перемешать пипетированием. Полученные 75 мкл библиотеки для секвенирования поместить в нанопоровый детектор MinION (ONT) в соответствии с инструкцией производителя.

2.3.12. Провести секвенирование библиотеки, следуя инструкции производителя нанопорового детектора MinION.

1.9.П.5. ПРОТОКОЛ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ILLUMINA

1. Подготовка ДНК-библиотек

Для приготовления библиотек РНК использовался набор TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (20020594, Illumina). Все этапы проводятся в соответствии с протоколом производителя²:

Этап 1. Очистка и фрагментация РНК

1. РНК разводится очищенной водой до 10 нг в объеме 50 мкл.

2. Добавляется 50 мкл ресуспендированных RNA Purification Beads, смесь хорошо размешивается и инкубируется в термоциклире:

Этап	Температура	Время инкубации
1	65*C	5 мин
2	4*C	Удержание

3. После окончания программы смесь инкубируется на комнатной температуре в течение 5 минут.

4. Пробирки помещаются на магнитный штатив до момента, пока жидкость не станет прозрачной (5 мин.). Супернатант аккуратно отбирается.

5. Образцы убираются с магнитного штатива, после чего к ним добавляется 200 мкл Bead Washing Buffer. Смесь хорошо перемешивается и помещается на магнитный штатив до момента, пока жидкость не станет прозрачной (около 5 минут). Супернатант аккуратно отбирается.

6. Образцы убираются с магнитного штатива. После этого к ним добавляется 50 мкл Elution Buffer и смесь хорошо перешивается.

7. Для элюции образцов с магнитных шариков смесь помещается в термоциклер:

Этап	Температура	Время инкубации
1	80*C	2 мин
2	25*C	Удержание

https://support.illumina.com/content/dam/illumina-

support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/truseq-stranded-mrna-workflow/truseq-stranded-mrna-workflow-reference-1000000040498-00.pdf

8. К 50 мкл смеси добавляется 50 мкл Bead Binding Buffer и хорошо размешивается, и помещается в термоциклер:

Этап	Температура	Время инкубации
1	65*C	5 мин
2	4*C	Удержание

9. После окончания программы смесь инкубируется на комнатной температуре в течение 5 минут.

10. Пробирки помещаются на магнитный штатив до момента, пока жидкость не станет прозрачной (около 5 минут). Супернатант аккуратно отбирается.

11. Образцы убираются с магнитного штатива, после чего к ним добавляется 200 мкл Bead Washing Buffer. Смесь хорошо перемешивается и помещается на магнитный штатив до момента, пока жидкость не станет прозрачной (около 5 минут). Супернатант аккуратно отбирается.

12. Образцы убираются с магнитного штатива. После этого, к ним добавляется 19,5 мкл Fragment, Prime, Finish Mix, смесь хорошо перешивается и помещается в термоциклер:

Этап	Температура	Время инкубации
1	94*C	8 мин
2	4*C	Удержание

Этап 2. Синтез первой цепи кДНК

1. Пробирки с образцами ставятся на магнитный штатив до момента, пока жидкость не станет прозрачной (около 5 минут). 17 мкл супернатанта переносятся в новые пробирки.

2. Готовятся следующие аликвоты: к 1 мкл SuperScript II добавляется 9 мкл First Strand Synthesis Act D Mix. Данная смесь может храниться при температуре -20*С и переносит до 6 разморозок.

3. К образца добавляется 8 мкл смеси SuperScript II и First Strand Synthesis Act D Mix. Смесь хорошо перемешивается и помещается в термоциклер со следующими параметрами программы:

Этап	Температура	Время инкубации
------	-------------	-----------------

1	25*C	10 мин
2	42*C	15 мин
3	70*C	15 мин
4	4*C	Удержание

Этап 3. Синтез второй цепи кДНК

1. К образцам добавляется 5 мкл Resuspension Buffer и 20 мкл Second Strand Marking Master Mix. Смесь хорошо перемешивается и помещается в термоциклер на 16*С на 1 час (крышка нагревается до 30*С).

2. К 50 мкл смеси добавляется 90 мкл (1,8х от объема) ресуспендированных AMPure XP Beads и хорошо перемешивается.

3. Инкубация в течение 5 минут для связывания ДНК с магнитными шариками.

4. Пробирки помещаются на магнитный штатив до момента, пока жидкость не станет прозрачной (около 5 минут). Супернатант аккуратно отбирается.

5. К каждому образцу добавляется 200 мкл свежеприготовленного 80% этанола для отмывки шариков, иммобилизованных на магните. Супенатант удаляется, и процедура повторяется второй раз. Аккуратно удаляются остатки спирта. Осадок высушивается в течение 5-10 минут до полного высыхания магнитных шариков (оценивается визуально). Пересушивание образцов может привести к низкому выходу ДНК. Пробирки с образцами убираются с магнитного штатива.

6. Образцы ресуспендируются в 20 мкл Resuspension Buffer и инкубируются в течение 2 минут. Пробирки помещаются на магнитный штатив до момента пока жидкость не станет прозрачной (около 5 минут). Аккуратно отбирается 17,5 мкл супернатанта, который может храниться при -20*С в течение 7 дней.

Этап 4. Аденилирование 3`-концов ДНК

1. К образцам добавляется 12,5 мкл A-Tailing Mix. Смесь хорошо перемешивается и помещается в термоциклер со следующими параметрами программы:

Этап	Температура	Время инкубации
1	37*C	30 мин
2	70*C	5 мин
3	4*C	Удержание

Этап 5. Лигирование адаптеров

1. К образцам добавляется 2,5 мкл Resuspension Buffer, 2,5 мкл Ligation Mix и 2,5 мкл RNA adapters. Смесь хорошо перемешивается и помещается в термоциклер со следующими параметрами программы:

Этап	Температура	Время инкубации
1	30*C	10 мин
2	4*C	Удержание

2. После окончания программы к образцам добавляется по 5 мкл Stop Ligation Buffer для остановки реакции лигирования. Смесь хорошо перемешивается.

3. К 42,5 мкл смеси добавляется 42 мкл ресуспендированных AMPure XP Beads и хорошо перемешивается.

4. Инкубация в течение 5 минут для связывания библиотек с магнитными шариками.

5. Пробирки помещаются на магнитный штатив до момента, пока жидкость не станет прозрачной (около 5 минут). Супернатант аккуратно отбирается.

6. К каждому образцу добавляется 200 мкл свежеприготовленного 80% этанола для отмывки шариков, иммобилизованных на магните. Супернатант удаляется, и процедура повторяется второй раз. Аккуратно удаляются остатки спирта. Осадок высушивается в течение 5-10 минут до полного высыхания магнитных шариков (оценивается визуально). Пересушивание образцов может привести к низкому выходу ДНК. Пробирки с образцами убираются с магнитного штатива.

7. Образцы ресуспендируются в 52,5 мкл Resuspension Buffer и инкубируются в течение 2 минут. Пробирки помещаются на магнитный штатив до момента, пока жидкость не станет прозрачной (около 5 минут). 50 мкл супернатанта переносят в новую пробирку.

8. К 50 мкл смеси добавляется 50 мкл ресуспендированных AMPure XP Beads и хорошо перемешивается.

9. Инкубация в течение 5 минут для связывания библиотек с магнитными шариками.

10. Пробирки помещаются на магнитный штатив до момента, пока жидкость не станет прозрачной (около 5 минут). Супернатант аккуратно отбирается.

11. К каждому образцу добавляется 200 мкл свежеприготовленного 80% этанола для отмывки шариков, иммобилизованных на магните. Супенатант удаляется, и процедура повторяется второй раз. Аккуратно удаляются остатки спирта. Осадок высушивается в течение 5-10 минут до полного высыхания магнитных шариков (оценивается визуально). Пересушивание образцов может привести к низкому выходу ДНК. Пробирки с образцами убираются с магнитного штатива.

12. Образцы ресуспендируются в 22,5 мкл Resuspension Buffer и инкубируются в течение 2 минут. Пробирки помещаются на магнитный штатив до момента, пока жидкость не станет прозрачной (около 5 минут). Аккуратно отбирается 20 мкл супернатанта, который может храниться при -20*С в течение 7 дней.

Этап 6. Амплификация библиотек

1. Образцы помещаются на лед. К ним добавляется 5 мкл PCR Primer Cocktail и 25 мкл PCR Master Mix. Смесь хорошо перемешивается и помещается в термоциклер со следующими параметрами программы:

Этап	Температура	Время инкубации
1	98*C	30 секунд
	98*C	10 секунд
2 (15 циклов)	60*C	30 секунд
	72*C	30 секунд
3	72*C	5 минут
4	4*C	Удержание

2. К 50 мкл смеси добавляется 50 мкл ресуспендированных AMPure XP Beads и хорошо перемешивается.

3. Инкубация в течение 5 минут для связывания ДНК с магнитными шариками.

4. Пробирки помещаются на магнитный штатив до момента, пока жидкость не станет прозрачной (около 5 минут). Супернатант аккуратно отбирается.

5. К каждому образцу добавляется 200 мкл свежеприготовленного 80% этанола для отмывки шариков, иммобилизованных на магните. Супенатант удаляется, и процедура повторяется второй раз. Аккуратно удаляются остатки спирта. Осадок высушивается в течение 5-10 минут до полного высыхания магнитных шариков (оценивается визуально). Пересушивание образцов может привести к низкому выходу ДНК. Пробирки с образцами убираются с магнитного штатива.

6. Образцы ресуспендируются в 32,5 мкл Resuspension Buffer и инкубируются в течение 2 минут. Пробирки помещаются на магнитный штатив до момента пока жидкость не станет прозрачной (около 5 минут). Аккуратно отбирается 30 мкл супернатанта, который может храниться при -20*С в течение 7 дней.

Этап 7. Анализ качества полученных библиотек

Качество библиотек определяется с помощью проведения капиллярного электрофореза на приборе TapeStation 4200 (Agilent). Дополнительно полученные

библиотеки измеряются с помощью набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США).

2. Разведение библиотек, загрузка в прибор

На основании полученных длин библиотек (пар оснований) и их концентраций (нг/мкл) рассчитывается концентрация в nM. Библиотеки разводятся до 2,5 nM. Добавляется контроль Phix. Проводится денатурация ДНК библиотек с помощью 0,2N NaOH. Для остановки реакции денатурации добавляется 400 nM Tris-HCl (pH=8.0). Образцы загружаются в прибор NovaSeq 6000 (Illumina) для проведения секвенирования с длиной прочтения 2*100 п.о.

3. Используемые материалы и оборудование

3.1. Расходные материалы и реактивы

3.1.1. Набор для приготовления ДНК-библиотекTruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina, Кат. № 20020594).

3.1.2. Трис(гидроксиметил)аминометан (Трис, Merck, Кат. № 252859 или аналог)

3.1.3. Хлорид натрия (Merck, Кат. №S3014 или аналог)

3.1.4. Вода, свободная от нуклеаз (производитель - любой

3.1.5. Этанол, 95% (производитель – любой)

3.1.6. Наконечники для лабораторных пипеток с фильтрами, свободные от нуклеаз (производитель – любой)

3.1.7. Наконечники для внесения образца (Agilent, Кат. № 5067-5598)

3.1.8. Пленка для запечатывания 96-луночного планшета (Agilent, Кат. № 5067-5154)

3.1.9. Планшет 96-луночный (Agilent, Кат. № 5042-8502)

3.1.10. Набор реагентов High Sensitivity D5000 Reagents (Agilent, Кат. № 5067-5593)

3.1.11. Пробирки полипропиленовые на 1,5 мл, свободные от нуклеаз, Protein LoBind (Eppendorf, Кат. № 0030108442 или аналог)

3.1.12. Пробирки полипропиленовые на 0,5 мл, свободные от нуклеаз, Protein LoBind (Eppendorf, Кат. № 0030108434 или аналог)

3.1.13. Пробирки полипропиленовые на 0,5 мл, свободные от нуклеаз (производитель - любой)

3.1.14. Пробирки полипропиленовые на 0,2 мл, свободные от нуклеаз (производитель - любой)

3.1.15. Haбop Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Кат. № Q32851/Q32854)

3.1.16. Контроль Phix (Illumina, Кат. № FC-110-3001)

3.1.17. Перчатки медицинские (производитель – любой)

3.2. Оборудование

3.2.1 Лабораторный рН-метр 765 Calimatic (Knick) или аналог

3.2.2. Магнитная мешалка US-1500A (ULAB) или аналог

3.2.3. Вортекс V4 (IKA) или аналог

3.3.4. Спектрофотометр NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific) или аналог

3.3.5. Флуориметр Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific)

3.3.6. Система автоматизированного электрофореза TapeStation 4200 (Agilent)

3.3.7. Магнитный штатив DynaMag-2 Magnet (ThermoFisher Scientific) или аналог

3.3.8. Робот для создания библиотек чFreedom Evo 150 Base Unit (Tecan)

3.3.9. Водяная баня WB-4MS Stirred water bath (BioSan) или аналог

3.3.10. Центрифуга с охлаждающим модулем Eppendorf 5810R (Eppendorf) или аналог

3.3.11 Термоциклер (ДНК-амплификатор) Mastercycler pro S (Eppendorf) или аналог

3.3.12. Инкубатор с портом доступа КВ53 left 29mm (Binder) или аналог

3.3.13. Секвенатор NovaSeq 6000 (Illumina)

3.3.14. Набор лабораторных механических пипеток (производитель – любой)

3.3.15. Ножницы медицинские прямые остроконечные (производитель – любой)

3.3.16. Пинцет анатомический (производитель – любой)

1.9.П.6. ПРОТОКОЛ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ РНК АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ILLUMINA

Протокол предназначен для обработки данных секвенирования (RNA-seq) образцов. Входной информацией является таблица с описанием образцов и полученные с прибора файлы данных в формате fastq. Результат выполнения протокола - получение значений уровня экспрессии транскрипта (TPM) для каждого образца клеточных линий HEK293, HeLa, HepG2, HL60, K562 и NB4.

Общая информация.

Полученные на платформе Illumina (NovaSeq 6000) в результате секвенирования прочтений RNASeq данные представляют собой последовательности матричной РНК (мРНК) длиной в 100-200 нуклеотидов (или п.о. – пар оснований). Одним из преимуществ использования технологии Illumina является получение парноконцевых последовательностей (ридов), что существенно повышает качество прочтений нуклеотидных последовательностей. Для анализа экспрессии транскриптов существуют различные программные решения – Cufflinks, RSEM, Salnom, kallisto, eXpress и др., которые отличаются по способу анализа, но при этом, сходны по показаниям чувствительности и специфичности (1), (2). В текущем протоколе использовалась программа Salmon (3), как одно из наиболее быстрых решений для анализа экспрессии транскриптов. Обработка данных была выполнена согласно рекомендациями GATK best practices от Broad Institute³. Общая сема анализа представлена на Рисунке 1.

Перечень используемого программного обеспечения и ресурсов:

- 1. Программа FastQC v0.11.9 для анализа исходных файлов в формате fastq, получаемых с секвенатора
- 2. Программа Trummomatic v0.39 для процессинга ридов, необходимых для улучшения качества обрабатываемых данных
- 3. Программа Salmon v1.4.0 для оценки уровня экспрессии транскриптов
- 4. Референсный транскриптом человека Ensemble cDNA v.103 для картирования ридов
- 5. База данных UniProt KB (v.09-2021) для выявления белок-кодирующих генов человека
- 6. Программа Excel Microsoft office для визуализации результатов

³ https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/sections/360007226651-Best-Practices-Workflows

7. Язык программирования R и модуль corrplot для корреляционного анализа

Общая схема анализа:



Рисунок 1 - Схема биоинформатического анализа данных РНК-секвенирования, полученных на платформе Illumina.

- 1) Данные РНК-секвенирования формате fastq (два файла прямого и обратного прочения) загружаются в FastQC (4) для проверки качества полученных ридов.
- Необходимый процессинг ридов (обрезку адаптеров и ридов плохого качества) выполняетя в программе Trimmomatic v.0.39 (5).
- Полученные обновленные fastq файлы и референсный транскриптом человека Ensemble cDNA v.103 в виде gff файла загружается в программу Salmon (3) для получения списка экспрессирующихся транскриптов.
- 4) Полученный csv файл загружается в R для последующего корреляционного анализа.
- 5) Список транскриптов, относящихся к белок-кодирующим генам, получают через конвертацию идентификаторов ENST в базе данных UniProt. Полученные результаты объединяют в программе Excel.

Ключевые параметры анализа данных:

1. При оценке качества ридов в программе FastQC ключевым для дальнейшего анализа является пункт "Per base sequencing quality", который должен выглядеть в соответствии с представленной иллюстрацией на рисунке 2.



Рисунок 2 - Визуализация в программе FastQC удовлетворительного для дальнейшего анализа пункта «Per base sequencing quality» полученных ридов.

2. В пункте "Per sequencing GC-control" распределение гуанинов и цитозинов в полученных ридах должно выглядеть похожим на их теоретическое распределение, согласно представленному распределению на рисунке 3.



Рисунок 3 - Визуализация в программе FastQC удовлетворительного для дальнейшего анализа пункта «Per sequencing GC-control"» полученных ридов.

3. Для достижения ключевых параметров контроля-качества полученные риды процессируются с помощью программы Trimmomatic согласно следующим рекомендуемым параметрам: а) удаление адаптеров Illumina у ридов (запись параметра в программе - TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10), б) обрезка нуклеотидов сначала и конца (запись параметра в программе - LEADING:3 TRAILING:3), в) удаление ридов с низким качеством (менее 30) при сохранении минимальной длины не менее 36 нуклеотидов, согласно данным распределения длин получаемых ридов (запись параметра в программе - SLIDINGWINDOW:4:28 MINLEN:36).

Список используемых источников:

- Teng M, Love MI, Davis CA, Djebali S, Dobin A, Graveley BR, et al. A benchmark for RNA-seq quantification pipelines. Genome biology [Internet]. 2016 Apr 23 [cited 2021 Dec 29];17(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27107712/
- Zhang C, Zhang B, Lin LL, Zhao S. Evaluation and comparison of computational tools for RNAseq isoform quantification. BMC genomics [Internet]. 2017 Aug 7 [cited 2021 Dec 29];18(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28784092/
- Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. Nature methods [Internet]. 2017 [cited 2021 Dec 29];14(4):417–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28263959/
- Trivedi UH, Cézard T, Bridgett S, Montazam A, Nichols J, Blaxter M, et al. Quality control of next-generation sequencing data without a reference. Frontiers in genetics [Internet]. 2014 [cited 2021 Dec 29];5(MAY). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24834071/
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics (Oxford, England) [Internet]. 2014 Aug 1 [cited 2021 Dec 29];30(15):2114–20. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24695404/

1.9.П.7. ПРОТОКОЛ РИБОСОМАЛЬНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОПОРОВОГО ДЕТЕКТОРА

Протокол предназначен для приготовления образцов РНК для «футпринтинга» (footprinting) – секвенирования транслатома, состоящего из секвенирования всех фрагментов мРНК со средней длиной 30 нуклеотидов, находящихся между субъединицами рибосом в момент лизиса культивируемых клеток или клеток ткани. В отличие от секвенирования в формате "Ribo-seq", секвенируются конкатемеры кДНК фрагментов мРНК, находящихся между субъединицами рибосом.

Протокол описывает процедуру пробоподготовки для секвенирования транслатома с использованием нанопорового детектора MinION (Oxford Nanopore Technology) до этапа приготовления библиотеки. Приготовление библиотек проводится в соответствии с протоколами производителя нанопорового детектора с использованием коммерческих наборов реагентов и ферментов для приготовления библиотек, предлагаемых или рекомендованных данным производителем.

1. Используемые материалы, растворы и оборудование

1.1. Расходные материалы и реактивы

- 1.1.1. Трис(гидроксиметил)аминометан (Трис, Merck, Кат. № 252859 или аналог)
- 1.1.2. Хлорид натрия (Merck, Кат. №S3014 или аналог)
- 1.1.3. Хлорид магния безводный (Merck, Кат. № М8266 или аналог)
- 1.1.4. Ацетат натрия (Merck, Кат. № S2889 или аналог)
- 1.1.5. Борная кислота (Merck, Кат. № В7901 или аналог)
- 1.1.6. Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА, Merck, Кат. № Е9884 или аналог)
- 1.1.7. Дитиотреитол (DTT, Merck, Кат. № GE17-1318-01 или аналог)
- 1.1.8. Циклогексимид (Merck, Кат. № 01810 или аналог)
- 1.1.9. Тритон Х-100 (Merck, Кат. № Т8787 или аналог)
- 1.1.10. Концентрированная соляная кислота (HCl), ос. ч. (производитель любой)
- 1.1.11. Вода, свободная от нуклеаз (производитель любой
- 1.1.12. Этанол, 95% (производитель любой)
- 1.1.13. Изопропанол (Merck, Кат. № 19516 или аналог)

1.1.14. Акриламид перекристаллизованный, чистота не менее 99,9%, для электрофореза (AppliChem, Кат. № А-1090,0500 или аналог)

1.1.15. Метилен-бис-акриламид, чистота более 99% (AppliChem, Кат. № А-3636,0050 или аналог)

1.1.16. Мочевина (Urea), чистота более 99% (Sigma-Aldrich, Кат. № U5128 или аналог)

1.1.17. Аммоний персульфат (надсернокислый), чистота более 98% (AppliChem, Кат. № А-1142,0250 или аналог)

1.1.18. Тетраметилэтилендиамин (TEMED), UltraPure (Thermo FS, Кат. № 15524010 или аналог)

1.1.19. Краситель SYBR Gold (Thermo FS, Кат. № S11494 или аналог)

1.1.20. Дезоксирибонуклеаза Turbo DNase I (Thermo Fisher Scientific, Кат. № АМ2238)

1.1.21. Рибонуклеаза RNase I (Thermo Fisher Scientific, Кат. № EN0601)

1.1.22. Ингибитор рибонуклеазной активности SUPERase In (Thermo Fisher Scientific, Кат. № АМ2696)

 1.1.23. Хроматографические колонки MicroSpin S-400 HR (Merck, Кат. № GE27-5140-01) или аналог

1.1.24. Haбop circAID-p-seq Kit (IMMAGINA BioTechnology, Ka. № CA001)

1.1.25. Набор для очистки РНК RNA Clean & Concentrator-5 Kit (Zymo Research, Кат. № R1013)

1.1.26. Набор для удаления рибосомной PHK NEBNext® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (New England Biolabs, Кат. № E6310S)

1.1.27. Набор для определения концентрации РНК Qubit[™] RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Кат. № Q32852)

1.1.28. Краситель бромфеноловый синий, чда (производитель любой)

1.1.29. Формамид (Merck, Кат. № F9037 или аналог)

1.1.30. Гликоген (Merck, Кат. № 10901393001 или аналог)

1.1.31. Реагент для выделения суммарной РНК ExtractRNA (Евроген, Кат. № ВС032) или аналог

1.1.32. Шприц медицинский одноразовый объемом 3 мл (производитель – любой)

1.1.33. Наконечники для лабораторных пипеток с фильтрами, свободные от нуклеаз (производитель – любой)

1.1.34. Пробирки полипропиленовые на 1,5 мл, свободные от нуклеаз, Protein LoBind (Eppendorf, Кат. № 0030108442 или аналог)

1.1.35. Пробирки полипропиленовые на 0,5 мл, свободные от нуклеаз, Protein LoBind (Eppendorf, Кат. № 0030108434 или аналог)

1.1.36. Пробирки полипропиленовые на 0,5 мл, свободные от нуклеаз (производитель - любой)

1.1.37. Пробирки полипропиленовые на 0,2 мл, свободные от нуклеаз (производитель - любой)

1.1.38. Перчатки медицинские (производитель – любой)

1.1.39. Лёд

1.2. Стоковые растворы

1.2.1. Раствор циклогексимида концентрацией 50 мг/мл

Взвесить 50 мг циклогексимида и растворить в 1 мл воды, свободной от нуклеаз. Приготовить аликвоты раствора объемом 20 мкл и поместить их на -20°С для длительного хранения.

1.2.2. 1 М раствор хлорида магния

Взвесить 0,952 г хлорида магния (безводного) и растворить в 10 мл воды, свободной от нуклеаз. Хранить при 4-6°С в течение года.

1.2.3. 20% раствор Тритон Х-100

4 мл раствора Тритон X-100 (4,28 г) довести до 20 мл водой, свободной от нуклеаз. Хранить при комнатной температуре в течение 1 года.

1.2.4. 1 М раствор дитиотреитола

Взвесить 15,4 мг дитиотреитола и растворить в 0,1 мл воды, свободной от нуклеаз. Разделить на аликвоты объемом 2 мкл и хранить при -20°С в течение года.

1.2.5. 5-кратный лизирующий буфер (5хЛБ)

Взвесить 0,121 г Трис и 0,438 г хлорида натрия, растворить в 5 мл воды, свободной от нуклеаз. Добавить 0,25 мл стокового 1 М раствора хлорида магния и довести pH до значения 7,4 концентрированной соляной кислотой. Добавить 2,5 мл 20% стокового раствора Тритон X-100. Довести общий объем раствора до 10 мл. Приготовить аликвоты объемом 1 мл и хранить их при -20°C.

1.2.6. 10% раствор додецилсульфата натрия

Взвесить 0,1 г додецилсульфата натрия в пробирке типа Эппендорф, добавить 0,8 мл воды, свободной от нуклеаз. Пробирку поместить в термостат, нагретый до 60°С. Ждать до полного растворения додецилсульфата. Полученный раствор довести до объема 1 мл водой, свободной от нуклеаз, и перемешать перевёртыванием пробирки. Раствор хранить при комнатной температуре в течение года.

1.2.7. 3 М раствор ацетата натрия

Взвесить 2,46 г ацетата натрия, добавить 8 мл воды, свободной от нуклеаз, растворить перемешиванием на вортексе. Полученный раствор довести до объема 10 мл водой, свободной от нуклеаз. Раствор разделить на аликвоты объемом 1 мл и хранить при при - 20°С. Размороженную аликвоту хранить при 4-6°С в течение месяца.

1.2.8. Концентрированный раствор акриламида (38% акриламид, 2% метил-бисакриламид)

Взвесить 19 г акриламида и 1 г метил-бис-акриламида. Растворить навески, добавив 30 мл деионизованной воды. Довести объем раствора до 50 мл деионизованной водой. Хранить при комнатной температуре.

1.2.9. 10% раствор персульфата аммония (PSA)

Взвесить 1 г PSA и растворить в 1 мл деионизованной воды. Раствор хранить при 4°С и использовать в течение 10 дней.

1.2.10. Концентрированный буфер для электрофореза 10×ТВЕ

Взвесить 21,56 г Трис, 11 г борной кислоты, 1,172 г ЭДТА и растворить в 100 мл деионизованной воды. Довести объём раствора деионизованной водой до 200 мл. Хранить при комнатной температуре.

1.3. Оборудование

1.3.1 Лабораторный рН-метр 765 Calimatic (Knick) или аналог

1.3.2. Магнитная мешалка US-1500A (ULAB) или аналог

1.3.3. Вортекс V-1 plus (BioSan) или аналог

1.3.4. Спектрофотометр NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific) или аналог

1.3.5. Флуориметр Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific) или аналог

1.3.6. Центрифуга с охлаждением Eppendorf 5804R или аналог

1.3.7. Магнитный штатив DynaMag-2 Magnet (ThermoFisher Scientific, Кат. № 12321D) или аналог

1.3.8. Термостат TS100 (BioSan) или аналог

1.3.9. Трансиллюминатор SkyLight 470 нм (Vilber) или аналог

1.3.10. Генератор льда (производитель – любой)

1.3.11. Сосуд Дьюара (производитель – любой)

1.3.12. Комплект для проведения вертикального электрофореза в полиакриламидных гелях «Mini-Protean Tetra» (Bio-Rad, США) или аналог

1.3.13. Источник питания для вертикального электрофореза Power Pac Basic Bio-Rad (Bio-Rad) или аналог

1.3.14. Весы аналитические XP205 (Mettler Toledo) или аналог

1.3.15. Ротационный перемешиватель HulaMixer Sample Mixer (Thermo Fisher Scientific) или аналог

1.3.16. Вортекс MSV-3500 (BioSan) или аналог

1.3.17. Гомогенизатор Даунса (производитель – любой)

1.3.18. Набор лабораторных механических пипеток (производитель – любой)

1.3.19. Ножницы медицинские прямые остроконечные (производитель – любой)

1.3.20. Пинцет анатомический (производитель – любой)

2. Порядок работы

2.1. Приготовление рабочих растворов

2.1.1. Приготовление лизирующего буфера (ЛБ)

Разморозить аликвоту 5-кратного лизирующего буфера 5хЛБ, добавить 4 мл воды, свободной от нуклеаз, перемешать на вортексе и полученный раствор поместить в лёд на 30 мин. Через 30 мин добавить к раствору 10 мкл стокового раствора циклогексимида концентрацией 50 мг/мл и 5 мкл стокового раствора 1 М дитиотреитола, перемешать на вортексе. Отобрать 1 мл ЛБ и добавить к нему 25 единиц активности ДНКазы Turbo DNase I. Перемешать перевертыванием пробирки. Полученный раствор использовать сразу после приготовления. Оставшийся объем ЛБ хранить во льду до использования.

2.1.2. Приготовление 15% полиакриламидного геля

2.1.2.1. Собрать кассету для формирования геля, пользуясь комплектом приспособлений для вертикального электрофореза «Mini-Protean Tetra» в соответствии с инструкцией производителя. Зазор между пластинами кассеты должен составлять 1 мм. Установить кассету в вертикальном положении.

2.1.2.2. Приготовить растворы для формирования ПААГ: смешать 4,2 г мочевины, 1.1 мл деионизованной воды, 1.9 мл концентрированного раствора акриламида, 0.5 мл 10×ТВЕ, 35 мкл 10% раствора PSA, 5 мкл ТЕМЕД. Немедленно залить в кассету для формирования геля. Вставить гребёнку для формирования углублений («карманов») в геле в соответствии инструкцией производителя комплекта приспособлений для вертикального с электрофореза. Дождаться окончания процесса полимеризации акриламида И формирования геля. Гель использовать немедленно или хранить в холодильнике, упаковав кассету с гелем в полиэтиленовый пакет, в течение двух суток.

2.1.3. Приготовление буфера для электрофореза 1×ТВЕ.

К 100 мл концентрированного буфера добавить 900 мл дистиллированной воды, тщательно перемещать.

2.2. Приготовление клеточного экстракта

В зависимости от типа биологического материала руководствоваться либо п. 2.2.1а (культивируемые клетки человека линии HepG2 или эмбриональные стволовые клетки), либо п. 2.2.1б (образцы ткани печени человека).

2.2.1а. К осадку клеток (25-35 млн. клеток) добавить 1 мл свежеприготовленного холодного лизирующего буфера ЛБ, содержащего ДНКазу. Лизировать клетки пропусканием их через иглу (диаметр 0,6 мм) медицинского одноразового шприца объемом 2 мл не менее 10 раз. Поместить пробирку с лизатом в лёд на 10 минут. Центрифугировать пробирку с лизатом 10 мин при 20000 g и 4°C. Отобрать надосадочную жидкость или 700

мкл её верхней части и перенести в новую пробирку. Поместить пробирку в лёд. Перейти к п. 2.2.2.

2.2.16. Образец ткани печени человека размером 1 см х 1 см х 3 мм извлечь пинцетом из раствора для хранения, обсушить на бумажном полотенце или фильтровальной бумаге и разделить ножницами на фрагменты размером не более 3 мм х 3 мм х 3 мм. 3-4 фрагмента поместить в гомогенизатор Даунса и добавить 300-350 мкл свежеприготовленного холодного лизирующего буфера ЛБ, содержащего ДНКазу. Разрушать ткань гомогенизатором Даунса до исчезновения визуально видимых кусочков ткани. Последовательно разрушить все фрагменты образца печени человека и объединить полученные лизаты. Объединённый лизат дополнительно пропустить через иглу (диаметр 0,6 мм) медицинского одноразового шприца объемом 2 мл не менее 10 раз. Поместить пробирку с лизатом в лёд на 10 минут. Центрифугировать пробирку с лизатом 10 мин при 20000 g и 4°С. Отобрать надосадочную жидкость или 700 мкл её верхней части и перенести в новую пробирку. Поместить пробирку в лёд. Перейти к п. 2.2.2

2.2.2. Приготовить 10-кратные разведения буфера ЛБ и лизата, для чего к 1 мкл буфера ЛБ и к 1 мкл лизата добавить по 9 мкл деионизованной воды. Определить значение оптической плотности 10-кратного разведения лизата на 260 нм, A_{260} , на спектрофотометре NanoDrop-1000 или его аналоге, руководствуясь инструкцией производителя и используя 10-кратное разведение ЛБ как «бланк». Рассчитать оптическую плотность на миллилитр лизата $A_{260}(\pi)/m\pi$ по формуле:

 $A_{260}(\pi)/M\pi = A_{260} \cdot 10$

2.2.3. Приготовить две пробы лизата, одну объемом 100 мкл (пометить её «Т») и вторую объемом 200 мкл (пометить её «Р»). Поместить пробу Р в лёд. Пробу Т смешать с реагентом для выделения суммарной РНК ExtractRNA в соответствии с рекомендацией производителя и оставить при комнатной температуре до использования. Остаток лизата хранить во льду до использования.

2.3. Получение мРНК и фрагментов мРНК, защищённых субъединицами рибосом

2.3.1. К 200 мкл пробы Р добавить 7,5 единиц активности рибонуклеазы RNase I на каждую единицу оптической плотности лизата *А*₂₆₀(л). Для расчёта использовать формулу:

Количество единиц активности = $A_{260}(\pi)/M\pi$ 0,2 мл 7,5

2.3.2. Инкубировать пробу Р после добавления рибонуклеазы в течение 45 мин при 37°С. По окончании инкубации остановить реакцию добавлением 20 мкл стокового раствора ингибитора рибонуклеазной активности SUPERase In и поместить пробу Р в лёд. Во время инкубации подготовить хроматографические колонки MicroSpin S-400 в соответствии с п. 2.3.3.

2.3.3. Уравновесить две колонки MicroSpin S-400 буфером ЛБ (без ДНКазы). Для этого у каждой колонки открыть крышку, добавить к ней 3 мл буфера ЛБ, закрыть крышку, ресуспендировать матрикс перевертыванием колонки несколько раз и дать матриксу осесть. При оседании матрикса периодически постукивать по колонке для удаления пузырьков воздуха. Открыть низ и верх колонки и позволить буферу вытечь под действием силы тяжести. Поместить колонку в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировать 4 минуты при 600 g при комнатной температуре. Перенести колонку в новую центрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Использовать колонки сразу же после приготовления, не позволяя матриксу подсохнуть.

2.3.4. Нанести на каждую уравновешенную колонку MicroSpin S-400 по 100 мкл пробы P, обработанной в соответствии с п. 2.3.2. Центрифугировать 2 мин при 600 g при комнатной температуре и собрать раствор, прошедший через колонку, объединить их и смешать с реагентом для выделения суммарной PHK ExtractRNA в соответствии с рекомендацией производителя.

2.3.5. Выделить РНК из смеси проб Т и Р с реагентом для выделения суммарной РНК ExtractRNA в соответствии с инструкцией производителя. Отобрать водную фазу. Высадить РНК добавлением к водной фазе 3 М раствора ацетата натрия до конечной концентрации 0,3 М с последующим добавлением двух объемом изопропанола и инкубированием смеси в течение не менее 8 часов при -20°C. Преципитат РНК осадить центрифугированием (20 мин, 16000 g, 2°C), промыть осадок изопропанолом, высушить на воздухе и растворить в 100 мкл воды, свободной от нуклеаз. Обозначить полученные образцы РНК из проб Т и Р соответственно ТР и РР. Определит концентрацию РНК в образцах ТР и РР на спектрофотометре NanoDrop-1000, руководствуясь инструкцией производителя. Поместить образцы в лёд.

2.3.6. Приготовить образец ТР так, чтобы в 100 мкл образца содержалось не более 75 мкг РНК (при необходимости пробы развести водой, свободной от нуклеаз). Выделить мРНК из образца ТР, используя набор Dynabeads mRNA Purification Kit и магнитный штатив DynaMag-2 Magnet в соответствии с протоколом производителя. Элюировать мРНК с магнитных частиц водой, свободной от нуклеаз, объемом 15 мкл. Обозначить полученную пробу мРНК как МТР и определит в ней концентрацию РНК на флуориметре Qubit 4.0 с

использованием набора Qubit RNA HS Assay Kit в соответствии с инструкцией производителя. Пробу заморозить и хранить на -80°С до использования для приготовления библиотеки для прямого секвенирования кДНК (Direct cDNA Sequencing, SQK-DCS109) на нанопоровом детекторе MinION.

Для секвенированая с использованием нанопорового детектора MinION в формате прямого секвенирования кДНК суммарное количество мРНК в пробе должно быть не менее 100 нг. Если количество мРНК меньше этой величины, то необходимо провести дополнительные мРНК и объединить полученные образцы.

2.3.7. Для образца РР сделать три пробы объемом 12 мкл так, что в каждой из них содержался 1 мкг РНК. Каждую пробу обработать с использованием набора NEBNext rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) в соответствии с протоколом производителя. Обработанные пробы объединить и обозначить по названию образца (PP).

2.3.9. Провести очистку РНК с использованием набора RNA Clean & Concentrator-5 Kit в следующей модификации: к образцу РР добавить буфер RNA Binding Buffer из набора RNA Clean & Concentrator-5 Kit и 95% этанол в пропорции: на 100 мкл образца 200 мкл буфера и 475 мкл 95% этанола. В остальном следовать протоколу производителя набора. Шаг обработки ДНКазой пропустить. Обозначить элюат как образец РР.

2.4. Очистка фрагментов РНК методом гель-электрофореза

2.4.1. Приготовить пробы для электрофореза: к образцу РР добавить равный объем формамида, содержащего 0,02% красителя бромфеноловый синий. Прогреть пробы и маркёры размера фрагментов нуклеиновых кислот 20/100 Oligo Ladder при 95°C в течение 5 мин.

2.4.2. Собрать камеру для электрофореза комплекта «Mini-Protean Tetra» согласно инструкции производителя. Удалить гребенку из кассеты с гелем. Залить в камеру буфер 1×TBE. Поместить в карманы пробу с образцом PP. На соседних дорожках слева и справа нанести маркёры размера фрагментов нуклеиновых кислот 20/100 Oligo Ladder по 4 мкл в каждый карман. Подать на электроды напряжение 50 В в течение первых 10 мин, затем повысить напряжение до 150 В и проводить форез до прохождения красителем 2/3 длины электрофоретической дорожки. Выключить напряжение, слить буфер и разобрать камеру. Достать гель из кассеты.

2.4.3. Добавить 5 мкл стокового раствора красителя SYBR Gold к 50 мл деионизованной воды, поместить гель в раствор и инкубировать 30 мин с периодическим покачиванием. Поместить гель на трансиллюминатор SkyLight и вырезать участок геля, содержащий материал с размером 25-35 нуклеотидов.

2.4.4. Поместить каждый кусочек геля в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл с отверстием на дне, сделанной иглой шприца (0,9 мм диаметр). Центрифугировать 2 мин при 12000 g для измельчения геля. При необходимости повторить центрифугирование до полного прохождения геля через отверстие. Добавить к измельчённому гелю 400 мкл воды, свободной от нуклеаз, 40 мкл 3 М раствора ацетата натрия и 2 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия. Инкубировать пробирки с измельчённым гелем 2 час при комнатной температуре.

2.4.5. После инкубации, осадить кусочки геля центрифугированием 3 минуты при 2000 g при комнатной температуре, отобрать раствор в новую центрифужную пробирку объемом 1,5 мл, добавить 2 мкл коммерческого раствора гликогена и 800 мкл изопропанола. Поместить смесь на -20°C на 1 час.

2.4.6. Осадить преципитат РНК центрифугированием 20 мин, 16000 g, 2°C. Промыть осадок изопропанолом и высушить на воздухе. Растворить осадок в 10 мкл воды, свободной от нуклеаз и определить концентрацию РНК на флуориметре Qubit 4.0 с использованием набора Qubit RNA HS Assay Kit в соответствии с инструкцией производителя. Полученный образец фрагментов РНК обозначить как PP.

2.3.10. Определить концентрацию РНК в образце РР на флуориметре Qubit 4.0 с использованием набора Qubit RNA HS Assay Kit в соответствии с инструкцией производителя. Дальнейшую обработку образца проводить с использованием набора circAID-p-seq Kit, следуя протоколу производителя. Полученный материал использовать для приготовления библиотеки для прямого секвенирования кДНК (Direct cDNA Sequencing, SQK-DCS109) на нанопоровом детекторе MinION.

Для работы с набором circAID-p-seq Kit, суммарное количество РНК должно быть не менее 30 нг. Если количество РНК менее этой величины, провести повторное выделение фрагментов мРНК и объединить образцы.

1.9.П.8. ПРОТОКОЛ РИБОСОМАЛЬНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ILLUMINA

Протокол предназначен для приготовления образцов РНК для «футпринтинга» (footprinting) — секвенирования транслатома в формате "Ribo-seq", включающего секвенирование набора всех фрагментов мРНК со средней длиной 30 нуклеотидов, находящихся между субъединицами рибосом в момент лизиса культивируемых клеток или клеток ткани. Одновременно с приготовлением образца для футпринтинга, в рамках протокола проводится приготовление образца из того же биологического материала для секвенирование полного транскриптома методом RNA-seq.

Протокол описывает процедуру пробоподготовки для секвенирования транслатома на секвенаторах второго поколения (например, на секвенаторах производства компании Illumina) до этапа приготовления библиотек для секвенирования. Приготовление библиотек проводится в соответствии с протоколами производителя оборудования для секвенирования с использованием коммерческих наборов реагентов и ферментов для приготовления библиотек, предлагаемых или рекомендованных производителем используемого секвенатора.

1. Используемые материалы, растворы и оборудование

1.1. Расходные материалы и реактивы

- 1.1.1. Трис(гидроксиметил)аминометан (Трис, Merck, Кат. № 252859 или аналог)
- 1.1.2. Хлорид натрия (Merck, Кат. №S3014 или аналог)
- 1.1.3. Хлорид магния безводный (Merck, Кат. № М8266 или аналог)
- 1.1.4. Ацетат натрия (Merck, Кат. № S2889 или аналог)
- 1.1.5. Борная кислота (Merck, Кат. № В7901 или аналог)
- 1.1.6. Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА, Merck, Кат. № Е9884 или аналог)
- 1.1.7. Дитиотреитол (DTT, Merck, Кат. № GE17-1318-01 или аналог)
- 1.1.8. Циклогексимид (Merck, Кат. № 01810 или аналог)
- 1.1.9. Тритон Х-100 (Merck, Кат. № Т8787 или аналог)
- 1.1.10. Концентрированная соляная кислота (HCl), ос. ч. (производитель любой)
- 1.1.11. Додецилсульфат натрия (Merck, Кат. № L3771 или аналог)
- 1.1.12. Вода, свободная от нуклеаз (производитель любой

1.1.13. Этанол, 95% (производитель – любой)

1.1.14. Изопропанол (Merck, Кат. № 19516 или аналог)

1.1.15. Акриламид перекристаллизованный, чистота не менее 99,9%, для электрофореза (AppliChem, Кат. № А-1090,0500 или аналог)
1.1.16. Метилен-бис-акриламид, чистота более 99% (AppliChem, Кат. № А-3636,0050 или аналог)

1.1.17. Мочевина (Urea), чистота более 99% (Sigma-Aldrich, Кат. № U5128 или аналог)

1.1.18. Аммоний персульфат (надсернокислый), чистота более 98% (AppliChem, Кат. № А-1142,0250 или аналог)

1.1.19. Тетраметилэтилендиамин (TEMED), UltraPure (Thermo FS, Кат. № 15524010 или аналог)

1.1.20. Краситель SYBR Gold (Thermo FS, Кат. № S11494 или аналог)

1.1.21. Дезоксирибонуклеаза Turbo DNase I (Thermo Fisher Scientific, Кат. № АМ2238)

1.1.22. Рибонуклеаза RNase I (Thermo Fisher Scientific, Кат. № EN0601)

1.1.23. Ингибитор рибонуклеазной активности SUPERase In (Thermo Fisher Scientific, Кат. № АМ2696)

1.1.24. Хроматографические колонки MicroSpin S-400 HR (Merck, Кат. № GE27-5140-01) или аналог

1.1.25. Набор для очистки PHK RNA Clean & Concentrator-25 Kit (Zymo Research, Кат. № R1017)

 1.1.26. Набор для очистки РНК RNA Clean & Concentrator-5 Kit (Zymo Research, Кат. № R1013)

1.1.27. Набор для удаления рибосомной PHK NEBNext® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (New England Biolabs, Кат. № E6310S)

1.1.28. Набор для определения концентрации РНК Qubit[™] RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Кат. № Q32852)

1.1.29. Краситель бромфеноловый синий, чда (производитель любой)

1.1.30. Формамид (Merck, Кат. № F9037 или аналог)

1.1.31. Гликоген (Merck, Кат. № 10901393001 или аналог)

1.1.32. Шприц медицинский одноразовый объемом 3 мл (производитель – любой)

1.1.33. Наконечники для лабораторных пипеток с фильтрами, свободные от нуклеаз (производитель – любой)

1.1.34. Пробирки полипропиленовые на 1,5 мл, свободные от нуклеаз, Protein LoBind (Eppendorf, Кат. № 0030108442 или аналог)

1.1.35. Пробирки полипропиленовые на 0,5 мл, свободные от нуклеаз, Protein LoBind (Eppendorf, Кат. № 0030108434 или аналог)

1.1.36. Пробирки полипропиленовые на 0,5 мл, свободные от нуклеаз (производитель - любой)

1.1.37. Пробирки полипропиленовые на 0,2 мл, свободные от нуклеаз (производитель - любой)

1.1.38. Перчатки медицинские (производитель – любой)

1.1.39. Жидкий азот

1.1.40. Лёд

1.2. Стоковые растворы

1.2.1. Раствор циклогексимида концентрацией 50 мг/мл

Взвесить 50 мг циклогексимида и растворить в 1 мл воды, свободной от нуклеаз. Приготовить аликвоты раствора объемом 20 мкл и поместить их на -20°С для длительного хранения.

1.2.2. 1 М раствор хлорида магния

Взвесить 0,952 г хлорида магния (безводного) и растворить в 10 мл воды, свободной от нуклеаз. Хранить при 4-6°С в течение года.

1.2.3. 20% раствор Тритон Х-100

4 мл раствора Тритон X-100 (4,28 г) довести до 20 мл водой, свободной от нуклеаз. Хранить при комнатной температуре в течение 1 года.

1.2.4. 1 М раствор дитиотреитола

Взвесить 15,4 мг дитиотреитола и растворить в 0,1 мл воды, свободной от нуклеаз. Разделить на аликвоты объемом 2 мкл и хранить при -20°С в течение года.

1.2.5. 5-кратный лизирующий буфер (5хЛБ)

Взвесить 0,121 г Трис и 0,438 г хлорида натрия, растворить в 5 мл воды, свободной от нуклеаз. Добавить 0,25 мл стокового 1 М раствора хлорида магния и довести pH до значения 7,4 концентрированной соляной кислотой. Добавить 2,5 мл 20% стокового раствора Тритон X-100. Довести общий объем раствора до 10 мл. Приготовить аликвоты объемом 1 мл и хранить их при -20°C.

1.2.6. 10% раствор додецилсульфата натрия

Взвесить 0,1 г додецилсульфата натрия в пробирке типа Эппендорф, добавить 0,8 мл воды, свободной от нуклеаз. Пробирку поместить в термостат, нагретый до 60°С. Ждать до полного растворения додецилсульфата. Полученный раствор довести до объема 1 мл водой, свободной от нуклеаз, и перемешать перевёртыванием пробирки. Раствор хранить при комнатной температуре в течение года.

1.2.7. 3 М раствор ацетата натрия

Взвесить 2,46 г ацетата натрия, добавить 8 мл воды, свободной от нуклеаз, растворить перемешиванием на вортексе. Полученный раствор довести до объема 10 мл водой,

свободной от нуклеаз. Раствор разделить на аликвоты объемом 1 мл и хранить при при - 20°С. Размороженную аликвоту хранить при 4-6°С в течение месяца.

1.2.8. Концентрированный раствор акриламида (38% акриламид, 2% метил-бисакриламид)

Взвесить 19 г акриламида и 1 г метил-бис-акриламида. Растворить навески, добавив 30 мл деионизованной воды. Довести объем раствора до 50 мл деионизованной водой. Хранить при комнатной температуре.

1.2.9. 10% раствор персульфата аммония (PSA)

Взвесить 1 г PSA и растворить в 1 мл деионизованной воды. Раствор хранить при 4°С и использовать в течение 10 дней.

1.2.10. Концентрированный буфер для электрофореза 10×ТВЕ

Взвесить 21,56 г Трис, 11 г борной кислоты, 1,172 г ЭДТА и растворить в 100 мл деионизованной воды. Довести объём раствора деионизованной водой до 200 мл. Хранить при комнатной температуре.

1.3. Оборудование

1.3.1 Лабораторный рН-метр 765 Calimatic (Knick) или аналог

1.3.2. Магнитная мешалка US-1500A (ULAB) или аналог

1.3.3. Вортекс V-1 plus (BioSan) или аналог

1.3.4. Спектрофотометр NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific) или аналог

1.3.5. Флуориметр Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific) или аналог

1.3.6. Центрифуга с охлаждением Eppendorf 5804R или аналог

1.3.7. Термоциклер Bio Rad DNA Engine Tetrad 2 или аналог

1.3.8. Термостат TS100 (BioSan) или аналог

1.3.9. Трансиллюминатор SkyLight 470 нм (Vilber) или аналог

1.3.10. Генератор льда (производитель – любой)

1.3.11. Сосуд Дьюара (производитель – любой)

1.3.12. Комплект для проведения вертикального электрофореза в полиакриламидных гелях «Mini-Protean Tetra» (Bio-Rad, США) или аналог

1.3.13. Источник питания для вертикального электрофореза Power Pac Basic Bio-Rad (Bio-Rad) или аналог

1.3.14. Весы аналитические XP205 (Mettler Toledo) или аналог

1.3.15. Ротационный перемешиватель HulaMixer Sample Mixer (Thermo Fisher Scientific) или аналог

1.3.16. Вортекс MSV-3500 (BioSan) или аналог

1.3.17. Гомогенизатор Даунса (производитель – любой)

1.3.18. Набор лабораторных механических пипеток (производитель – любой)

1.3.19. Ножницы медицинские прямые остроконечные (производитель – любой)

1.3.20. Пинцет анатомический (производитель – любой)

2. Порядок работы

2.1. Приготовление рабочих растворов

2.1.1. Приготовление лизирующего буфера (ЛБ)

Разморозить аликвоту 5-кратного лизирующего буфера 5хЛБ, добавить 4 мл воды, свободной от нуклеаз, перемешать на вортексе и полученный раствор поместить в лёд на 30 мин. Через 30 мин добавить к раствору 10 мкл стокового раствора циклогексимида концентрацией 50 мг/мл и 5 мкл стокового раствора 1 М дитиотреитола, перемешать на вортексе. Отобрать 1 мл ЛБ и добавить к нему 25 единиц активности ДНКазы Turbo DNase I. Перемешать перевертыванием пробирки. Полученный раствор использовать сразу после приготовления. Оставшийся объем ЛБ хранить во льду до использования.

2.1.2. Приготовление 15% полиакриламидного геля

2.1.2.1. Собрать кассету для формирования геля, пользуясь комплектом приспособлений для вертикального электрофореза «Mini-Protean Tetra» в соответствии с инструкцией производителя. Зазор между пластинами кассеты должен составлять 1 мм. Установить кассету в вертикальном положении.

2.1.2.2. Приготовить растворы для формирования ПААГ: смешать 4,2 г мочевины, 1.1 мл деионизованной воды, 1.9 мл концентрированного раствора акриламида, 0.5 мл 10×TBE, 35 мкл 10% раствора PSA, 5 мкл ТЕМЕД. Немедленно залить в кассету для формирования геля. Вставить гребёнку для формирования углублений («карманов») в геле в соответствии инструкцией производителя приспособлений комплекта для вертикального \mathbf{c} электрофореза. Дождаться окончания процесса полимеризации акриламида И формирования геля. Гель использовать немедленно или хранить в холодильнике, упаковав кассету с гелем в полиэтиленовый пакет, в течение двух суток.

2.1.3. Приготовление буфера для электрофореза 1×ТВЕ.

К 100 мл концентрированного буфера добавить 900 мл дистиллированной воды, тщательно перемещать.

2.2. Приготовление клеточного экстракта

В зависимости от типа биологического материала руководствоваться либо п. 2.2.1а (культивируемые клетки человека линии HepG2 или эмбриональные стволовые клетки), либо п. 2.2.1б (образцы ткани печени человека).

2.2.1а. К осадку клеток (25-35 млн. клеток) добавить 1 мл свежеприготовленного холодного лизирующего буфера ЛБ, содержащего ДНКазу. Лизировать клетки

пропусканием их через иглу (диаметр 0,6 мм) медицинского одноразового шприца объемом 2 мл не менее 10 раз. Поместить пробирку с лизатом в лёд на 10 минут. Центрифугировать пробирку с лизатом 10 мин при 20000 g и 4°C. Отобрать надосадочную жидкость или 700 мкл её верхней части и перенести в новую пробирку. Поместить пробирку в лёд. Перейти к п. 2.2.2.

2.2.16. Образец ткани печени человека размером 1 см х 1 см х 3 мм извлечь пинцетом из раствора для хранения, обсушить на бумажном полотенце или фильтровальной бумаге и разделить ножницами на фрагменты размером не более 3 мм х 3 мм х 3 мм. 3-4 фрагмента поместить в гомогенизатор Даунса и добавить 300-350 мкл свежеприготовленного буфера ЛБ, холодного лизирующего содержащего ДНКазу. Разрушать ткань гомогенизатором Даунса до исчезновения визуально видимых кусочков ткани. Последовательно разрушить все фрагменты образца печени человека и объединить полученные лизаты. Объединённый лизат дополнительно пропустить через иглу (диаметр 0,6 мм) медицинского одноразового шприца объемом 2 мл не менее 10 раз. Поместить пробирку с лизатом в лёд на 10 минут. Центрифугировать пробирку с лизатом 10 мин при 20000 g и 4°С. Отобрать надосадочную жидкость или 700 мкл её верхней части и перенести в новую пробирку. Поместить пробирку в лёд. Перейти к п. 2.2.2

2.2.2. Приготовить 10-кратные разведения буфера ЛБ и лизата, для чего к 1 мкл буфера ЛБ и к 1 мкл лизата добавить по 9 мкл деионизованной воды. Определить значение оптической плотности 10-кратного разведения лизата на 260 нм, A_{260} , на спектрофотометре NanoDrop-1000 или его аналоге, руководствуясь инструкцией производителя и используя 10-кратное разведение ЛБ как «бланк». Рассчитать оптическую плотность на миллилитр лизата $A_{260}(\pi)/мл$ по формуле:

 $A_{260}(\pi)/M\pi = A_{260} \cdot 10$

2.2.3. Приготовить две пробы лизата, одну объемом 100 мкл (пометить её «Т») и вторую объемом 200 мкл (пометить её «Р»). Поместить пробу Р в лёд. К пробе Т добавить 10 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия и поместить в лёд. Остаток лизата хранить во льду до использования.

2.3. Получение мРНК и фрагментов мРНК, защищённых субъединицами рибосом

2.3.1. К 200 мкл пробы Р добавить 7,5 единиц активности рибонуклеазы RNase I на каждую единицу оптической плотности лизата *A*₂₆₀(л). Для расчёта использовать формулу:

Количество единиц активности = $A_{260}(\pi)/M\pi \cdot 0,2 M\pi \cdot 7,5$

2.3.2. Инкубировать пробу Р после добавления рибонуклеазы в течение 45 мин при 37°С. По окончании инкубации остановить реакцию добавлением 20 мкл стокового раствора ингибитора рибонуклеазной активности SUPERase In и поместить пробу Р в лёд. Во время инкубации подготовить хроматографические колонки MicroSpin S-400 в соответствии с п. 2.3.3.

2.3.3. Уравновесить две колонки MicroSpin S-400 буфером ЛБ (без ДНКазы). Для этого у каждой колонки открыть крышку, добавить к ней 3 мл буфера ЛБ, закрыть крышку, ресуспендировать матрикс перевертыванием колонки несколько раз и дать матриксу осесть. При оседании матрикса периодически постукивать по колонке для удаления пузырьков воздуха. Открыть низ и верх колонки и позволить буферу вытечь под действием силы тяжести. Поместить колонку в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировать 4 минуты при 600 g при комнатной температуре. Перенести колонку в новую центрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Использовать колонки сразу же после приготовления, не позволяя матриксу подсохнуть.

2.3.4. Нанести на каждую уравновешенную колонку MicroSpin S-400 по 100 мкл пробы P, обработанной в соответствии с п. 2.3.2. Центрифугировать 2 мин при 600 g при комнатной температуре и собрать раствор, прошедший через колонку. К собранному раствору добавить объем 10% раствора додецилсульфата натрия до его конечной концентрации 1%. Обозначить растворы, полученные с каждой колонки, как проба P-1 и проба P-2.

2.3.5. Выделить РНК из проб Т, Р-1 и Р-2, используя набор RNA Clean & Concentrator-25 Kit. К каждой пробе объемом 100 мкл добавить буфер RNA Binding Buffer из набора RNA Clean & Concentrator-25 Kit и 95% этанол в объемах, указанные в таблице 1. В остальном процедуру выделения проводить в соответствии с протоколом производителя набора. Включить в процедуру обработку ДНКазой I, которую провести, руководствуясь указаниями производителя набора. Элюировать РНК добавлением 26 мкл воды, свободной от нуклеаз. Ожидаемый объем элюата – ≈25 мкл. Объединить растворы РНК, выделенной из проб Р-1 и Р-2, и обозначить объединённый образец РНК как РР. Образец РНК, полученный из пробы Т, обозначить как ТР.

Таблица 1. Объемы реагентов для выделения РНК с использованием набора RNA Clean & Concentrator-25 Kit.

Реагент		Проба	
	Т	P-1	P-2

RNA Binding Buffer	220 мкл	220 мкл	220 мкл
95% этанол	240 мкл	540 мкл	540 мкл

2.3.6. Определить концентрацию РНК в образцах РР и ТР на спектрофотометре NanoDrop-1000, руководствуясь инструкцией производителя. Суммарный выход должен лежать в пределах 1-5 мкг РНК, концентрация РНК – выше 80 нг/мкл. Если концентрация РНК в образце ниже 80 нг/мкл, то к образцу необходимо добавить 3 М раствор ацетата натрия до конечной концентрации 0,3 М и два объема изопропанола. Полученную смесь поместить на -20°C на 8 или более часов, после чего преципитат РНК осадить центрифугированием (16000 g, 20 мин, 2°C), осадок промыть изопропанолом, высушить и растворить в 12 мкл воды, свободной от нуклеаз. Определить концентрацию РНК на спектрофотометре NanoDrop-1000. Количество РНК должно быть не менее 1 мкг в 12 мкл образца.

Если количество РНК меньше 1 мкг для образца PP, то повторить пп. 2.3.1 – 2.3.6, используя остаток лизата (п. 2.2.3). Полученный новый образец РНК объединить с образцом PP. Если количество РНК меньше 1 мкг для образца TP, то к 100 мкл остатка лизата (п. 2.2.3) добавить 10 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия и повторить п. 2.3.5. Полученный новый образец РНК объединить с образцом TP. Если концентрации РНК в образцах TP и PP меньше, чем 80 нг/мкл, то провести высаживание и растворение РНК, как описано в п. 2.3.6.

2.3.7. Отобрать объемы образцов ТР и РР так, чтобы в каждом содержался 1 мкг РНК. При необходимости довести их водой, свободной от нуклеаз, до конечного объема 12 мкл. При наличие достаточного количества РНК, сделать две или три пробы объемом 12 мкл каждая для каждого из образцов ТР и РР. Остаток образцов заморозить и хранить при -80°С.

2.3.8. Каждую пробу объемом 12 мкл, содержащую 1 мкг РНК, обработать с использованием набора NEBNext rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) в соответствии с протоколом производителя. Обработанные пробы, относящиеся к одному образцу РНК (TP или PP), объединить и обозначить по названию образца.

2.3.9. Провести очистку РНК с использованием набора RNA Clean & Concentrator-5 Kit. К образцу ТР добавить буфер RNA Binding Buffer из набора RNA Clean & Concentrator-5 Kit и 95% этанол в пропорции: на 100 мкл образца 100 мкл буфера и 105 мкл 95% этанола. К образцу РР добавить буфер RNA Binding Buffer из набора RNA Clean & Concentrator-5 Kit и 95% этанол в пропорции: на 100 мкл образца 200 мкл буфера и 475 мкл 95% этанола. В

остальном следовать протоколу производителя набора. Шаг обработки ДНКазой пропустить.

2.3.10. Определить концентрацию РНК в образце ТР на флуориметре Qubit 4.0 с использованием набора Qubit RNA HS Assay Kit в соответствии с инструкцией производителя. Образцы ТР заморозить и хранить при -80°С до приготовления библиотеки для секвенирования.

2.4. Очистка фрагментов РНК методом гель-электрофореза

2.4.1. Приготовить пробы для электрофореза: к образцу РР добавить равный объем формамида, содержащего 0,02% красителя бромфеноловый синий. Прогреть пробы и маркёры размера фрагментов нуклеиновых кислот 20/100 Oligo Ladder при 95°C в течение 5 мин.

2.4.2. Собрать камеру для электрофореза комплекта «Mini-Protean Tetra» согласно инструкции производителя. Удалить гребенку из кассеты с гелем. Залить в камеру буфер 1×TBE. Поместить в карманы пробу с образцом PP. На соседних дорожках слева и справа нанести маркёры размера фрагментов нуклеиновых кислот 20/100 Oligo Ladder по 4 мкл в каждый карман. Подать на электроды напряжение 50 В в течение первых 10 мин, затем повысить напряжение до 150 В и проводить форез до прохождения красителем 2/3 длины электрофоретической дорожки. Выключить напряжение, слить буфер и разобрать камеру. Достать гель из кассеты.

2.4.3. Добавить 5 мкл стокового раствора красителя SYBR Gold к 50 мл деионизованной воды, поместить гель в раствор и инкубировать 30 мин с периодическим покачиванием. Поместить гель на трансиллюминатор SkyLight и вырезать участок геля, содержащий материал с размером 25-35 нуклеотидов.

2.4.4. Поместить каждый кусочек геля в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл с отверстием на дне, сделанной иглой шприца (0,9 мм диаметр). Центрифугировать 2 мин при 12000 g для измельчения геля. При необходимости повторить центрифугирование до полного прохождения геля через отверстие. Добавить к измельчённому гелю 400 мкл воды, свободной от нуклеаз, 40 мкл 3 М раствора ацетата натрия и 2 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия. Инкубировать пробирки с измельчённым гелем 2 час при комнатной температуре.

2.4.5. После инкубации, осадить кусочки геля центрифугированием 3 минуты при 2000 *g* при комнатной температуре, отобрать раствор в новую центрифужную пробирку объемом 1,5 мл, добавить 2 мкл коммерческого раствора гликогена и 800 мкл изопропанола. Поместить смесь на -20°C на 1 час.

349

2.4.6. Осадить преципитат РНК центрифугированием 20 мин, 16000 g, 2°C. Промыть осадок изопропанолом и высушить на воздухе. Растворить осадок в 10 мкл воды, свободной от нуклеаз и определить концентрацию РНК на флуориметре Qubit 4.0 с использованием набора Qubit RNA HS Assay Kit в соответствии с инструкцией производителя. Полученный образец фрагментов РНК обозначить как PP и использовать немедленно для приготовления библиотеки для секвенирования или заморозить и хранить при -80°C до использования.

1.9.П.9. ПРОТОКОЛ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ рибосомального профилирования с использованием Illumina

Протокол предназначен для обработки данных секвенирования (Ribo-seq) биологических образцов. Входной информацией является таблица с описанием образцов и полученные с прибора файлы данных в формате fastq. Результат выполнения протокола - получение значений уровня экспрессии транскрипта (RPKM) для каждого образца, указанного в таблице.

Общая информация.

Производится контроль качества входных данных для оценки качества секвенирования и подготовки библиотек. Для этого будет использовано стандартное программное обеспечение (ПО) FastQC⁴, которое берёт на вход fastq файлы и формирует html отчёт, содержащий таблицу с основными метриками качества, такие как длина прочтений, GC-состав (гуанин-цитозиновый состав), суммарное количество прочтений и количество прочтений с плохим качеством, а также графики, такие как распределение длины прочтений, качество оснований относительно положения в прочтении и другие. Полный перечень метрик качества, а также детальное описание параметров плохих и хороших данных можно найти в документации к ПО.

Полученные для каждого образца html файлы объединяются в один html отчёт с помощью программы MultiQC⁵. В отчёте строятся объединенные графики для каждой метрики качества по всем образцам.

Fastq данные предобрабатываются с помощью Cutadapt⁶ со следующими параметрами:

«-а AGATCGGAAGAGCACACGTCT» – Удаление адаптерной последовательности с 3`конца. Последовательность адаптера для TruSeq Ribo Profile libraries.

«-u 1» – Удаление одного нуклеотида с 5`конца, так как так часто при обратной транскрипции появляется ошибочный нуклеотид (1).

«-m 25 -M 35» – Фильтрация по длине за пределами 25-35 нуклеотидов. Такой диапазон был использован при обновлении базы RPFdb до v2.0 (2) и в схеме обработки данных RiboDoc (3). Значения минимального и максимального порога фильтрация можно

⁴ https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

⁵ https://multiqc.info/

⁶ https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/

будет изменить, так как при некоторых условиях подготовки библиотек могут быть получены преимущественно RPFs длиной 20-22 нуклеотида (4).

«--max-n 1» – фильтрация прочтений, в которых N (любой нуклеотид по рекомендации IUPAC1) встречается более 1 раза.

Полученные fastq файле второй раз обрабатываются с помощью Cutadapt для удаления поли-А хвоста с 3`конца. Для этого указывается параметр «-b A{15}» и фильтрация по длине .«-m 25 -M 35».

3. Фильтрация тРНК и рРНК контаминации

Среди полученных данных могут оказаться последовательности рибосомальной или транспортной РНК. Длина тРНК составляет ~75 нуклеотидов и при подготовке библиотеки может быть разделена на две части и пойти в дальнейший анализ, также после деплеции рРНК может оставаться значительное количество рРНК. В TruSeq Ribo Profile⁷ этап фильтрации контаминации считается опциональным, так как последующая картировка на референс и фильтрация неуникальных выравниваний отфильтрует контаминированные последовательности, однако в большинстве протоколов данный этап рекомендован, поэтому и в текущем протоколе он будет реализован.

3.1. Загрузить последовательность рРНК

NCBI:

 https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/001/405/GCF_000001405.39_GRCh38.p13/G

 CF_000001405.39_GRCh38.p13_rna.fna.gz
 — необходимо вырезать из файла только

 рибосомальные последовательности, например, следующей командой: seqtk subseq

 GCF_000001405.39_GRCh38.p13_rna.fna.gz
 <(zcat</td>

 GCF_000001405.39_GRCh38.p13_rna.fna.gz | grep 'ribosomal RNA\$' | sed 's/>//g') > rRNA.fasta

3.2. Загрузить последовательности тРНК

GtRNAdb⁸: <u>http://gtrnadb.ucsc.edu/genomes/eukaryota/Hsapi38/hg38-mature-tRNAs.fa</u>

3.3. Объединить и проиндексировать тРНК и рРНК для последующего выравнивания предобработанных fastq файлов. Необходимо использовать bowtie2, так как он будет использован дальше в протоколе.

3.4. Выравнивание fastq файлов на референс из тРНК и рРНК. В большинстве пайплайнов использован картировщик bowtie2⁹ с параметрами запуска по умолчанию, так

7 <u>https://support.illumina.com/content/dam/illumina-</u> support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/truseq-ribo-profile/truseqribo-profile-bioinformatics-user-guide-15066018-a.pdf

8 http://gtrnadb.ucsc.edu/index.html

⁹ http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml

как он эффективно картирует короткие последовательности, он и будет использован в протоколе. Результатом работы bowtie2 являются файлы в формате bam, которые можно просматривать с помощью Samtools¹⁰.

3.5. Из полученного bam файла программой Samtools отфильтровываются последовательности, выравненные на RNA.contamination.fasta, в то время как оставшиеся последовательности записываются в fastq файл.

3.6. С помощью Samtools¹¹ и утилит bash будет подсчитан процент выравненных последовательностей на RNA.contamination.fasta относительно общего числа прочтений, полученных после предобработки. Выявленный процент контаминации будет записан в txt файл contamination.log.

4. Картирование на референсный геном

4.1. Загрузить референсный геном

Последовательность:

https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/001/405/GCF_000001405.39_GRCh38.p13/G CF_000001405.39_GRCh38.p13_genomic.fna.gz

Аннотация:

https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/001/405/GCF_000001405.39_GRCh38.p13/G CF_000001405.39_GRCh38.p13_genomic.gtf.gz

4.2. Индексация референсного генома с использованием STAR.

4.3. Картирование на референсный геном fastq файлов после фильтрации контаминации. При картировании фрагментов PHK используют в качестве референса либо геном, либо транскриптом. Транскриптом не подходит, если задача стоит в поиске новых транслируемых регионов, а так же если есть сомнения относительно точности собранного транскриптома. В большинстве протоколах использован именно геномный референс, однако для выравнивания данных RiboSeq на геном необходимо использовать картировщики, алгоритмы которых учитывают экзон-интронную структуру генов и могут выравнивать в области экзон-экзонных стыков. Наиболее популярными являются STAR¹² и TopHat2¹³. TopHat использован в TruSeq Ribo Profile. STAR использован при анализе данных RiboSeq в базе RPFdb¹⁴. Он так же рекомендован, как наиболее эффективный для RNA-Seq данных, так как работает с высокой скоростью и с высокой точностью определяет

12 https://github.com/alexdobin/STAR

¹⁰ http://www.htslib.org/

¹¹ http://www.htslib.org/

¹³ http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml

¹⁴ http://sysbio.gzzoc.com/rpfdb/

сайты сплайсинга и не сильно зависит от настройки параметров запуска, в отличие от TopHat2 (5). Нестандартное решение в пайплайне RiboDoc: там объединяются результаты работы двух картировщиков bowtie2 и hisat2.

В текущем протоколе используется STAR. Результат выравнивания записывается в sam файл, затем с помощью Samtools файл сортируется и фильтруется от неуникальных выравниваний и записывается в итоговый bam файл, который будет использован для подсчета RPKM и контроля качества результатов.

4.4. С помощью Samtools будет выдана статистика выравнивания: количество всех выравненных прочтений, количество уникально выравненных прочтений, а также их процентное соотношение относительно количества прочтений после фильтрации контаминации.

5. Подсчет RPKM

Единица измерения экспрессии RPKM означает число прочтений на килобазу транскрипта, нормированную на миллион картированных прочтений (Reads Per Kilobase of transcript, per Million mapped reads). Так как покрытие кодирующей (CDS) и нетранслируемых областей (5'UTR и 3'UTR) транскрипта разное, то RPKM можно считать как для гена в целом, так и отдельно для этих регионов. Картирование прочтений на интроны — результат неуникального выравнивания и в анализе не учитывается (6).

Формула подсчета RPKM (7):

RPKM= $10^9 \cdot x / (1 \cdot g)$

х — количество прочтений, картированных на ген/CDS/5`UTR/3`UTR

1 — количество прочтений, картированных на все гены

g — длина гена/CDS/5`UTR/3`UTR

4.1 Подготовка регионов для подсчета RPKM.

RPKM считается для всего гена и отдельно для UTRs и CDSs, Регионы будут записаны в файле формата bed с 5 колонками: хромосома, координата начала, координата конца, структура гена (gene/CDS/5`UTR/3`UTR), название гена. Так как анализ происходит на уровне гена без учета альтернативного сплайсинга, для получения файла с регионами необходимо объединить данные всех транскриптов одного гена с получением одного транскрипта на один ген. В упомянутом ранее протоколе RiboDoc используют самый длинный транскрипт, что некорректно, так как не учитываются все изоформы. В документации RNA-SeQC¹⁵ предложено использовать GTEx collapse annotation script¹⁶, который объединяет координаты всех изоформ таким образом, чтобы создать один транскрипт, который содержит последовательности всех изоформ, но не учитываются отдельно UTR и CDS. В пайплайне будет написан свой скрипт получения объединяются независимо друг от друга. Участки пересечения генов будут удалены из анализа. Транскрипты, аннотированные, как «retained_intron» (удержанный интрон) или «read_through» (химерные транскрипты) будут удалены, как в GTEx collapse annotation script. Границы UTR и CDS так же будут проверены на пересечение с границами других генов и скорректированы. Описанная логика формирования bed файла будет реализована в скрипте, написанном на Python3, который на вход будет принимать gtf файл с аннотацией, а на выходе формировать bed файл.

4.2. Подсчет RPKM в заданном bed файле.

В полученных координатах транскрипта необходимо посчитать покрытие. Для этого будет использован Htseq-count¹⁷, как в RiboDoc и при сборке базы RPFdb. Для снижения шума будет использован параметр «intersection-strict». Будет написан скрипт на Python3, который берет на вход bam файл с выравниванием, bed файл с координатами, а на выходе txt таблица с 5-ю колонками RPKM, как это сделано в открытой базе данных RiboSeq RPFdb: ген, «RPKM гена», «RPKM 5`UTR», «RPKM CDS», «RPKM 3`UTR». Для подсчета RPKM будет использована приведенная выше формула, где количество прочтений в заданном регионе подсчитывается с помощью Htseq-count, а длина региона берется из заданного bed файла.

4.3. Объединение значений RPKM по образцам в итоговый файл будет производиться с помощью стандартных команд bash. В результате будет сформирован xlsx файл с колонками: Образец, ген, «RPKM гена», «RPKM 5`UTR», «RPKM CDS», «RPKM 3`UTR». Пример содержимого файла в Таблице 1.

Таблица 1 – Пример структуры файла с результатами RPKM. Данные из базы RPFdb

Образец	Ген	RPKM	RPKM	RPKM	RPKM
		гена	5`UTR	CDS	3`UTR

15 https://github.com/getzlab/rnaseqc

^{16 &}lt;u>https://github.com/broadinstitute/gtex-pipeline/tree/master/gene_model</u>

¹⁷ https://htseq.readthedocs.io/en/master/

ERX1918552	TP53	8.34	1.69	26.87	5.4
ERX1918553	TP53	4.22	2.51	13.43	2.03

6. Контроль качества результатов

Для подтверждения того, что данные пришли с активных рибосом, необходимо провести контроль качества, учитывающий особенности RiboSeq, такие как длина прочтений, неравномерное покрытие CDS и UTR, триплетная периодичность и метагенный профиль.

6.1. Длина прочтений.

Распределение длины прочтений должно быть нормальным и пик в области 29 нуклеотидов, отклонения могут являться следствием контаминации или присутствия RPFs других субклеточных компартментов, например, митохондрий (6). В TruSeq Ribo Profile предложено использовать samtools и построить график распределения (можно воспользоваться любым удобным языком и пакетом). На Рисунке 1 представлены графики распределения длин RPFs разных компартментов, так наличие двух пиков распределения длин в области 27 и 33 является следствием секвенирования RPFs митохондрий.



Рисунок 1 – График распределения длины прочтений для разных рибосомальных комплексов по (6).

6.2. Покрытие структурных элементов генов.

В хороших данных покрытие в регионах CDS и UTR неравномерное: более 85% прочтений картируются на CDS, 5-10% на 5'UTR и несколько прочтений на 3'UTR, на межгенные регионы и интроны прочтения не картируются (6). Признаки плохих данных: высокий процент прочтений в области интронов, межгенных регионов, а также в области

UTR. На Рисунке 2 приведен пример графика, полученных для данных плохого качества. Для построения диаграммы можно воспользоваться PicardTools 4, как в TruSeq Ribo Profile.



Рисунок 2 – Пример данных, не соответствующих критериям качества: более 70% данных относятся к межгенным регионам. График по ribosomeProfilingQC Guide¹⁸.

6.3. Триплетная периодичность.

18

Во время элонгации рибосомы двигаются с шагом в 3 нуклеотида, что приводит к тому, что 70-90% прочтений попадают на первую позицию в субкодоне. Благодаря этим особенностям данных можно определять ORF. Для определения триплетной периодичности строится график количества RPFs, которое выравнивается на каждую из позиций в субкодоне — каждая позиция отмечается разным цветом. Пример данных с хорошей и плохой триплетной периодичностью представлены на Рисунке 3. В хороших данных более 50% прочтений попадают на первую позицию в субкодоне, в то время как в плохих данных распределение RPFs среди позиций в субкодоне равномерное.

https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/ribosomeProfilingQC/inst/doc/ribosomeProfilingQC.html #fragment-size-distribution



-данные плохого качества. Графики по (4). Цветами обозначены позиции в субкодоне.

6.4. Метагенный профиль.

Представляет собой частоту RPFs относительно всех аннотированных start и stop кодонов (4). В хороших данных должно быть два upstream пика относительно start и stop кодонов. В плохих данных пиков в этих областях не будет. На Рисунке 4 представлены графики метагенного профиля, характеризующие данные, соответствующие критериям качества.



Рисунок 4 – Графики хорошего метагенного профиля в области (a) - start-кодона и (b) — stop-кодона по (6).

Специализированные программные пакеты для контроля качества данных RiboSeq: riboSeqR¹⁹, RiboProfiling²⁰ и RiboSeQC²¹. Все пакеты требуют установки R и дополнительных библиотек, необходимых для их работы. В RiboProfiling можно построить графики из пунктов 5.1 и 5.2, в riboSeqR можно построить графики из пунктов 5.3 и 5.4.

^{19 &}lt;u>http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/riboSeqR.html</u>

²⁰ https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/RiboProfiling.html

²¹ https://github.com/ohlerlab/RiboseQC

Более универсальным является пакет RiboSeQC, который строит html отчёт с графиками из пунктов 5.1-5.4. В протоколе будет использован пакет RiboSeQC.

Список сокращений:

ПО — программное обеспечение
мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота
рРНК — рибосомная рибонуклеиновая кислота
тРНК — транспортная рибонуклеиновая кислота
CDS - coding DNA sequence
ORFs - Open reading frames
RPFs – ribosome-protected fragments (фрагменты мРНК)
RPKM - Reads Per Kilobase of transcript, per Million mapped reads
UTR - untranslated region

Список используемых источников:

(1) Ingolia, N. T. et al. (2012) 'The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments', Nature protocols, 7(8), pp. 1534–1550.

(2) Wang, H. et al. (2019) 'RPFdb v2.0: an updated database for genome-wide information of translated mRNA generated from ribosome profiling', Nucleic acids research, 47(D1), pp. D230–D234.

(3) François, P. et al. (2021) 'RiboDoc: A Docker-based package for ribosome profiling analysis', Computational and structural biotechnology journal, 19, pp. 2851–2860.

(4) Kiniry, S. J. et al. (2020). 'Computational methods for ribosome profiling data analysis', Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 11(3), e1577.

(5) Baruzzo, G. et al. (2017) 'Simulation-based comprehensive benchmarking of RNA-seq aligners', Nature methods, 14(2), pp. 135–139.

(6) Calviello, L. and Ohler, U. (2017) 'Beyond Read-Counts: Ribo-seq Data Analysis to Understand the Functions of the Transcriptome', Trends in genetics: TIG, 33(10), pp. 728–744.

(7) Xie, S.-Q. et al. (2016) 'RPFdb: a database for genome wide information of translated mRNA generated from ribosome profiling', Nucleic acids research, 44(D1), pp. D254–8

1.9.П.10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА ТРАНСЛИРУЕМЫХ мРНК В ФОРМАТЕ RNC-seq С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОПОРОВОГО ДЕТЕКТОРА

Протокол предназначен для приготовления образцов РНК для секвенирования транслатома в формате "RNC-seq" (RNA nascent chain), состоящего в секвенировании полноразмерных мРНК, ассоциированных с рибосомами (полисомами) в момент лизиса культивируемых клеток или клеток ткани. Одновременно с приготовлением образца для RNC-seq, в рамках протокола проводится приготовление образца из того же биологического материала для секвенирования полного транскриптома.

Протокол описывает процедуру пробоподготовки для секвенирования транслатома на секвенаторах второго поколения (например, на секвенаторах производства компании Illumina) и нанопоровом детекторе (компании Oxford Nanopore Technology, например, нанопоровй детектор MinION) до этапа приготовления библиотек для секвенирования. Приготовление библиотек проводится в соответствии с протоколами производителя оборудования для секвенирования с использованием коммерческих наборов реагентов и ферментов для приготовления библиотек, предлагаемых или рекомендованных производителем используемого секвенатора.

1. Используемые материалы, растворы и оборудование

1.1. Расходные материалы и реактивы

- 1.1.1. Трис(гидроксиметил)аминометан (Трис, Merck, Кат. № 252859 или аналог)
- 1.1.2. Хлорид натрия (Merck, Кат. №S3014 или аналог)
- 1.1.3. Хлорид магния безводный (Merck, Кат. № М8266 или аналог)
- 1.1.4. Ацетат натрия (Merck, Кат. № S2889 или аналог)
- 1.1.5. Дитиотреитол (DTT, Merck, Кат. № GE17-1318-01 или аналог)
- 1.1.6. Циклогексимид (Merck, Кат. № 01810 или аналог)
- 1.1.7. Неионный детергент CHAPS (Merck, Кат. № 220201или аналог)
- 1.1.8. Концентрированная соляная кислота (HCl), ос. ч. (производитель любой)
- 1.1.9. Вода, свободная от нуклеаз (производитель любой
- 1.1.11. Изопропанол (Merck, Кат. № 19516 или аналог)
- 1.1.12. Реагент для выделения суммарной РНК ExtractRNA (Евроген, Кат. № ВС032) или аналог

1.1.13. Хлороформ ос. ч., производитель любой

1.1.14. Ингибитор протеаз cOmplete EDTA-free Protease inhibitor (Merck, Кат. № 11873580001) или аналог

1.1.15. Дезоксирибонуклеаза Turbo DNase I (Thermo Fisher Scientific, Кат. № АМ2238)

1.1.16. Набор для выделения мРНК Dynabeads mRNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Кат. № 61006)

1.1.17. Ингибитор рибонуклеазной активности SUPERase In (Thermo Fisher Scientific, Кат. № АМ2696)

1.1.18. Гепарин (Merck, Кат. № Н6279 или аналог)

1.1.19. Насадка-фильтр на шприц, размер пор 0,45 µм (Millex Syringe Filter, Millipore Кат. № SLLHC25NS или аналог)

1.1.20. Набор для определения концентрации РНК Qubit[™] RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Кат. № Q32852)

1.1.21. Шприц медицинский одноразовый объемом 3 мл (производитель – любой)
 Шприц одноразовый объемом 50 мл (производитель – любой)

1.1.22. Наконечники для лабораторных пипеток с фильтрами, свободные от нуклеаз (производитель – любой)

1.1.23. Пробирки полипропиленовые на 1,5 мл, свободные от нуклеаз, Protein LoBind (Eppendorf, Кат. № 0030108442 или аналог)

1.1.24. Пробирки полипропиленовые на 0,5 мл, свободные от нуклеаз, Protein LoBind (Eppendorf, Кат. № 0030108434 или аналог)

1.1.25. Пробирки полипропиленовые на 0,5 мл, свободные от нуклеаз (производитель - любой)

1.1.26. Пробирки полипропиленовые на 0,2 мл, свободные от нуклеаз (производитель - любой)

1.1.27. Перчатки медицинские (производитель – любой)

1.1.28. Лёд

1.2. Стоковые растворы

1.2.1. Раствор циклогексимида концентрацией 50 мг/мл

Взвесить 10 мг циклогексимида и растворить в 0,2 мл воды, свободной от нуклеаз.

Приготовить аликвоты раствора объемом 2 мкл и поместить их на -20°С для длительного хранения.

1.2.2. 1 М раствор хлорида магния

Взвесить 0,952 г хлорида магния (безводного) и растворить в 10 мл воды, свободной от нуклеаз. Хранить при 4-6°С в течение года.

3 М раствор ацетата натрия.

Взвесить

1.2.3. 20% раствор СНАРЅ

Взвесить 1 г CHAPS, растворить в 4 мл воды, свободной от нуклеаз, при 60°С. Охладить раствор до комнатной температуры, довести до объема 5 мл водой, свободной от нуклеаз. Раствор хранить при комнатной температуре в течение года.

1.2.4. 1 М раствор дитиотреитола

Взвесить 15,4 мг дитиотреитола и растворить в 0,1 мл воды, свободной от нуклеаз. Разделить на аликвоты объемом 5 мкл и хранить при -20°С в течение года.

1.2.5. 25-кратный раствор ингибитора протеаз cOmplete EDTA-free Protease inhibitor

Растворить одну таблетку коммерческого препарата ингибитора в 2 мл воды, свободной от нуклеаз. Разделить на аликвоты объемом 100 мкл и хранить при -20°C в течение трех месяцев. После размораживания хранить аликвоту 1 неделю при 4-6°C.

1.2.6. 1 М раствор Трис-НСІ

Взвесить 2,42 г Трис и растворить в 15 мл воды, свободной от нуклеаз. Довести pH до значения 7,4 концентрированной соляной кислотой. Довести общий объем раствора до 20 мл. Приготовить аликвоты объемом 1 мл и хранить их при -20°C. Размороженную аликвоту хранить при 4-6°C в течение месяца.

1.2.7. 1 М раствор хлорида натрия

Взвесить 1,17 г хлорида натрия и растворить в 20 мл воды, свободной от нуклеаз. Приготовить аликвоты объемом 1 мл и хранить их при -20°С. Размороженную аликвоту хранить при 4-6°С в течение трех месяцев.

1.2.8. 1% раствор гепарина

Взвесить 10 мг гепарина и растворить в 1 мл воды, свободной от нуклеаз. Приготовить аликвоты объемом 50 мкл и хранить их при -20°С. Размороженную аликвоту хранить при 4-6°С в течение месяца.

1.2.9. 3 М раствор ацетата натрия

Взвесить 2,46 г ацетата натрия, добавить 8 мл воды, свободной от нуклеаз, растворить перемешиванием на вортексе. Полученный раствор довести до объема 10 мл водой, свободной от нуклеаз. Раствор разделить на аликвоты объемом 1 мл и хранить при при - 20°С. Размороженную аликвоту хранить при 4-6°С в течение месяца.

1.3. Оборудование

1.3.1 Лабораторный рН-метр 765 Calimatic (Knick) или аналог

1.3.2. Магнитная мешалка US-1500A (ULAB) или аналог

1.3.3. Вортекс V-1 plus (BioSan) или аналог

1.3.4. Спектрофотометр NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific) или аналог

1.3.5. Флуориметр Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific) или аналог

1.3.6. Центрифуга с охлаждением Eppendorf 5804R или аналог

1.3.7. Магнитный штатив DynaMag-2 Magnet (ThermoFisher Scientific, Кат. № 12321D) или аналог

1.3.8. Термостат TS100 (BioSan) или аналог

1.3.9. Колонка для ВЭЖХ Agilent Bio SEC-5 2,000 (Agilent) или аналог

1.3.10. Хроматографическая система Agilent 1100 series (Agilent) или аналог

1.3.11. Генератор льда (производитель – любой)

1.3.12. Весы аналитические XP205 (Mettler Toledo) или аналог

1.3.13. Ротационный перемешиватель HulaMixer Sample Mixer (Thermo Fisher Scientific) или аналог

1.3.14. Вортекс MSV-3500 (BioSan) или аналог

1.3.15. Гомогенизатор Даунса (производитель – любой)

1.3.16. Набор лабораторных механических пипеток (производитель – любой)

1.3.17. Ножницы медицинские прямые остроконечные (производитель – любой)

1.3.18. Пинцет анатомический (производитель – любой)

2. Порядок работы

2.1. Приготовление рабочих растворов и подготовка хроматографической колонки

2.1.1. Приготовление лизирующего раствора (ЛР)

Разморозить аликвоты стоковых растворов Трис-HCl, хлорида натрия, циклогексимида, дитиотреитола, гепарина и ингибитора протеаз. Добавить в пробирку типа Эппендорф (1,5-2 мл объемом) 10 мкл 1 М раствора Трис-HCl, 65 мкл 1 М раствора хлорида натрия, 5 мкл 1 М раствора хлорида магния, 25 мкл 20% раствора CHAPS, 10 мкл 1% раствора гепарина, 1,25 мкл 1 М раствора дитиотреитола, 1 мкл раствора циклогексимида (50 мг/мл), 20 единиц активности ингибитора рибонуклеаз SUPERase-In, 25 единиц активности ДНКазы Turbo DNase I и 20 мкл раствора ингибитора протеаз cOmplete EDTAfree Protease inhibitor. Довести до объема 500 мкл водой, свободной от нуклеаз. Конечная композиция лизирующего раствора: 20 mM Трис-HCl (pH 7.4), 130 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1% CHAPS, 0.2 mg/ml heparin, 2.5 mM DTT, 100 mg/ml cycloheximide, 20 U SUPERase In RNase inhibitor, cOmplete EDTA-free Protease inhibitor. Полученный раствор использовать сразу после приготовления.

2.1.2. Приготовление раствора подвижной фазы

Разморозить аликвоты стоковых растворов Трис-HCl, хлорида натрия, циклогексимида, дитиотреитола, гепарина и ингибитора протеаз. Смешать 1 мл 1 М раствора Трис-HCl, 3 мл 1 М раствора хлорида натрия, 0,5 мл 1 М раствора хлорида магния,

0,75 мл 20% раствора CHAPS, 125 мкл 1 М раствора дитиотреитола. Довести до 50 мл водой, свободной от нуклеаз. Пропустить раствор через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Конечная композиция лизирующего раствора: 20 mM Tpuc-HCl (pH 7.4), 60 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1% CHAPS, 2.5 mM DTT.

2.1.3. Подготовка хроматографической колонки

Хроматографическую колонку Agilent Bio SEC-5 2,000 присоединить к ВЭЖХсистеме Agilent 1100 series согласно рекомендациям производителя. Уравновесить хроматографическую колонку пропускание 36 мл раствора подвижной фазы со скоростью потока 0,8 мл/мин.

2.2. Приготовление клеточного экстракта

В зависимости от типа биологического материала руководствоваться либо п. 2.2.1а (культивируемые клетки человека линии HepG2 или эмбриональные стволовые клетки), либо п. 2.2.16 (образцы ткани печени человека).

2.2.1а. К осадку клеток (10-15 млн. клеток) добавить 500 мл свежеприготовленного холодного лизирующего раствора ЛР. Лизировать клетки пропусканием их через иглу (диаметр 0,6 мм) медицинского одноразового шприца объемом 2 мл не менее 10 раз. Поместить пробирку с лизатом в лёд на 10 минут. Центрифугировать пробирку с лизатом 10 мин при 20000 g и 2°C. Отобрать надосадочную жидкость или 400 мкл её верхней части и перенести в новую пробирку. Поместить пробирку в лёд. Перейти к п. 2.2.2.

2.2.16. Образец ткани печени человека размером 1 см х 1 см х 3 мм извлечь пинцетом из раствора для хранения, обсушить на бумажном полотенце или фильтровальной бумаге и разделить ножницами на фрагменты размером не более 3 мм х 3 мм х 3 мм. 3-4 фрагмента поместить в гомогенизатор Даунса и добавить 500 мкл свежеприготовленного холодного лизирующего раствора ЛР. Разрушать ткань гомогенизатором Даунса до исчезновения визуально видимых кусочков ткани. Последовательно разрушить все фрагменты образца печени человека и объединить полученные лизаты. Объединённый лизат дополнительно пропустить через иглу (диаметр 0,6 мм) медицинского одноразового шприца объемом 2 мл не менее 10 раз. Поместить пробирку с лизатом в лёд на 10 минут. Центрифугировать пробирку с лизатом 10 мин при 20000 g и 2°С. Отобрать надосадочную жидкость или 400 мкл её верхней части и перенести в новую пробирку. Поместить пробирку в лёд. Перейти к п. 2.2.2

2.2.2. Приготовить две пробы лизата, одну объемом 150 мкл (пометить её «Т») и вторую объемом 250 мкл (пометить её «Р»). Поместить пробу Р в лёд. Пробу Т смешать с реагентом для выделения суммарной РНК ExtractRNA в соответствии с рекомендацией производителя и оставить при комнатной температуре до использования.

364

2.3. Выделение полисом и мРНК

2.3.1. Нанести 150 мкл пробы Р на подготовленную колонку Agilent Bio SEC-5 2,000, руководствуясь инструкцией производителя ВЭЖХ-системе Agilent 1100 series. Начать разделение материала прокачиваем через колонку раствора подвижной фазы со скоростью потока 0,8 мл/мин. Прохождение материала детектировать, используя изменения оптической плотности на 260 нм. Собирать фракции объемом 0,3 мл. Хроматографическое разделение проводить при температуре 5°С. Собранные фракции, соответствующие первому пику на хроматограмме, объединить. Обозначить полученную пробу РП.

2.3.2. Выделить РНК из проб Т и РП с помощью реагента для выделения суммарной РНК ExtractRNA в соответствии с инструкцией производителя. Отобрать водную фазу. Высадить РНК добавлением к водной фазе 3 М раствора ацетата натрия до конечной концентрации 0,3 М с последующим добавлением двух объемом изопропанола и инкубированием смеси в течение не менее 8 часов при -20° C. Преципитат РНК осадить центрифугированием (20 мин, 16000 g, 2°C), промыть осадок изопропанолом, высушить на воздухе и растворить в 100 мкл воды, свободной от нуклеаз. Обозначить полученные образцы РНК из проб Т и РП соответственно ТР и РПР. Поместить образцы в лёд.

2.3.3. Определить концентрацию РНК в образцах ТР и РПР на спектрофотометре NanoDrop-1000, руководствуясь инструкцией производителя. Приготовить образцы так, чтобы в 100 мкл образца содержалось не более 75 мкг РНК (при необходимости пробы развести водой, свободной от нуклеаз). Выделить мРНК из образцов, используя набор Dynabeads mRNA Purification Kit и магнитный штатив DynaMag-2 Magnet в соответствии с протоколом производителя. Элюировать мРНК с магнитных частиц водой, свободной от нуклеаз, объемом 15 мкл. Обозначить полученные пробы мРНК из образцов ТР и РПР соответственно МТР и МРПР.

2.3.4. Определить концентрацию РНК в пробах МТР и МРПР на флуориметре Qubit 4.0 с использованием набора Qubit RNA HS Assay Kit в соответствии с инструкцией производителя. Пробы использовать для приготовления библиотек немедленно или заморозить и хранить на -80°C до использования.

Для прямого секвенирования мРНК с использованием нанопорового детектора MinION суммарное количество мРНК не должно быть менее 500 нг. Если количество мРНК меньше этой величины, то необходимо провести дополнительные выделения полисом и мРНК и объединить полученные образцы.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ БИОМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ В.Н.ОРЕХОВИЧА» (ИБМХ)

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ № <u>1</u>/100

от « 29 » ноября 2021 г.

НАНОРАЗМЕРНЫЕ ЧАСТИЦЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ БЕЗ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ

Номер серии

Количество флаконов/пакетиков-саше

Дата выпуска

Срок годности

Испытания проведены по

Проекту НД

N⁰	Показатели	Методы	Нормы	Результаты
п/				испытаний
<u> </u>	2	3	4	5
1.	Описание	Визуальный	Лиофилизированная масса от белого до светло-желтого цвета	Лиофилизиро ванная масса светло- желтого цвета
2.	Растворение	Методика ИБМХ	Содержимое флакона или пакетика саше должно растворяться не более чем за 5 минут	Содержимое флакона растворяется за 3 минуты
3.	Прозрачность	Спектрофотометрический метод. Методика ИБМХ	Светопропускание раствора содержимого флакона в 10 мл воды очищенной при 660 нм должно быть от 60 до 85 %.	60,77 <u>+</u> 0,21%
4.	Размер частиц	Фотонная корреляционная спектроскопия. Методика ИБМХ	Размер частиц должен находиться в диапазоне от 15 до 50 нм.	46,93 <u>+</u> 1,65 (99,21 <u>+</u> 0,25%)

1	2	3	4	5
5.	pН	ΓΦ ΡΦ ΧΙV	От 6,0 до 7,5	6,48 <u>+</u> 0,04
		ОФС.1.2.1.0004.15		
		«Ионометрия»		
		(потенциометрический		
		метод)		
7.	Родственные	TCX	Не более 6 %.	Менее 6%
	фосфолипиды			
	(лизофосфати			
	-дилхолин)			
3.	Вода	ΓΦ ΡΦ ΧΙV	Не более 3,0 %	1,76
		ОФС.1.2.3.0002.15		
		«Определение воды»		
		(метод К. Фишера)		
8.	Количествен-	Ферментативный метод	От 0,470 до 0,520 г	0,503
	ное определе-	Методика Липоид ГмбХ	фосфатидилхолина во	
	ние фосфати-		флаконе.	
	дилхолина			
9.	Срок		3 года	
	годности			

Заключение:_____

Должность/Подпись/Расшифровка подписи

Печать

Дата: «____»____202__ г.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г. ПЛАН ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

Согласно Решению Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. №78 «О правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения», «безопасность лекарственного препарата (соотношение "польза - риск") оценка положительных терапевтических эффектов лекарственного препарата по отношению к рискам, связанным с его применением (понятие риска включает любой риск, связанный с качеством, безопасностью или эффективностью лекарственного препарата по отношению к здоровью пациента или населения)» [1].

Наночастицы – высокодисперсные, гомогенные по структуре частицы размером менее 100 нм хотя бы в одном измерении, характеризующиеся физико-химическими свойствами, отсутствующими у исходных материалов (измененные термодинамические характеристики (температура, фазовые переходы, форма «кривых плавления»); каталитическая активность; химическая реакционная способность; «квантовые» эффекты (оптический, электрический, магнитный, кристаллографический и т.д.).

Нанопрепараты – лекарственные формы, содержащие наночастицы.

1. Изучение физико-химических свойств

В соответствиии с рекомендациями [2] изучение физико-химических свойств наноразмерных частиц для доставки лекарств с использованием классических методов должно быть проведено по следующим показателям:

-Химический состав нанопрепарата (или структурная формула), характеристика вспомогательных веществ

-Концентрация наночастиц и основного вещества в растворе

-Наличие примесей

-Внешний вид (прозрачность, цветность)

-pH

-Растворимость

-Характеристика наночастиц (наименование, размер наночастиц, форма, однородность в препарате, заряд)

-Срок годности

-Условия хранения

Для более детального изучения основных физико-химических свойств наночастиц должна быть использована электронно-микроскопическая визуализация и идентификация с определением следующих параметров

-Размер наночастиц

-Форма наночастиц

2.

-Степень агрегированности наночастиц

Токсические свойства наночастиц зависят от их размеров и структурной организации. Чем меньше размер наночастиц, тем больше вероятность индукции воспаления, активации синтеза цитокинов, усиления цитотоксичности. Образование конгломератов наночастиц может приводить к изменению физико-химических свойств препарата.

Изучение безопасности

2.1. Оценка токсичности нанопрепарата при однократном введении

Используется тот путь введения, который будет использоваться в клинике.

2.1.1. Исследование токсичности при однократном введении на мышах обоего пола (самцы и самки по 10 животных в группе) при пероральном (п/о) пути введения. Всего 80 мышей.

Планируется исследование не менее 5-ти доз. В результате исследования токсичности при однократном введении будет дана количественная характеристика токсичности при однократном применении (определены переносимые, максимально переносимые и при возможности летальные дозы).

На основании анализа полученных данных будет сделан вывод о степени опасности исследуемого лекарственного средства при однократном п/о применении у мелких грызунов обоего пола. В рамках исследования будет проведен анализ местнораздражающего действия при п/о пути введения.

2.1.2. Исследование токсичности при однократном введении на крысах обоего пола (самцы и самки по 10 голов каждого пола в группе) при пероральном (п/о) пути введения. Всего 80 крыс.

Планируется исследование не менее 5-ти доз. В результате исследования токсичности при однократном введении будет дана количественная характеристика токсичности при однократном применении (определены переносимые, максимально переносимые и при возможности летальные дозы).

Животные	Путь введения	Количество и пол	Дозы
Мыши	п/о	10 \rightarrow $+10$ \bigcirc $+$	Низкая

Животные	Путь	Количество	Порти
	введения	и пол	дозы
		10♂+10♀	Средняя
		10 [∧] +10 [↓]	Высокая
		10 [∧] +10 [↓]	Плацебо
Крысы		$10^{1}_{\odot}+10^{1}_{\mp}$	Низкая
	/	10♂+10♀	Средняя
	11/0	10♂+10♀	Высокая
		$10^{1}_{\odot} + 10^{\odot}_{+}$	Плацебо

Общая продолжительность доклинического исследования должна составлять не менее 30 дней.

На основании анализа полученных данных будет сделан вывод о степени опасности исследуемого нанопрепарата при п/о применении. В рамках исследования будет проведен анализ местно-раздражающего действия.

2.2. Оценка токсичности препарата при многократном введении

2.2.1. Исследование токсичности при повторном введении на крысах.

Крысы обоего пола, по 10 голов каждого пола. Всего 80 крыс, при пероральном (п/о) пути введения.

2.2.2. Исследование токсичности при повторном введении на кроликах.

Кролики породы Шиншилла обоего пола, по 6 голов каждого пола. Всего 48 кроликов, при пероральном введении (п/о) пути введения.

Исследуют 3 дозы на 2-х видах животных, один из которых не грызуны. Введение максимальной дозы предполагает выявление возможных токсических эффектов и гибель части животных. Эта доза определяется на основании данных по острой токсичности. Минимальная доза близка к терапевтической дозе, рекомендуемой для клинического изучения. Третья доза является промежуточной.

В результате исследования токсичности при повторном введении будет дана количественная характеристика токсичности нанопрепарата при многократном применении. Детально будет исследовано его влияние на состояние внутренних органов и систем организма животных с использованием биохимических, гематологических, физиологических и патоморфологических методов исследования, включая гистологическое исследование внутренних органов и тканей животных после применения исследуемого нанопрепарата.

372

На основании полученных данных будет сделан вывод о степени опасности исследуемого лекарственного средства при многократном п/о введении крысам и кроликам обоего пола. В рамках исследования токсичности при повторном введении будет проведен анализ местно-раздражающего действия.

Животные	Путь введения	Количество и пол	Дозы
		10♂+10♀	Низкая
I/	1	10♂+10♀	Средняя
Крысы	11/0	10♂+10♀ Bb	
		10♂+10♀ I	Плацебо
Кролики		6♂+6 <u></u>	Низкая
	7/2	6♂+6♀ Cp	Средняя
	11/0	6 ♂ +6♀	Высокая Плацебо Низкая Средняя Высокая Плацебо
		6 ♂ +6♀	Плацебо

2.3.Перечень тестов для определения токсичности средств, содержащих наночастицы

N⁰	Рекомендуемые	Минимально достаточные тесты и
п/п	исследования	показатели
	Интегральные	Внешний вид, поведение, симптомы
	показатели	интоксикации, масса тела (еженедельно),
		суточное потребление корма и воды
		(еженедельно)
	Гематологические	Содержание в периферической крови
	исследования	эритроцитов, тромбоцитов, ретикулоцитов,
		лейкоцитов, лейкоцитарная формула,
		гемоглобин, гематокрит, показатели,
		характеризующие систему свертывания крови
	Биохимические	В сыворотке крови: общий белок,
	исследования	билирубин, белковые фракции, общий
		холестерин, общие липиды, глюкоза,
		триглицериды, электролиты, активность
		основных ферментов, имеющих диагнос-
		тическое значение (ЩФ. АЛТ, АСТ, ЛДГ и др.)
		В моче: мочевина, креатинин, глюкоза,
		белок
	Физиологические	Частота сердечных сокращений,
	исследования	параметры
		ЭКГ во втором отведении
		Ритм и глубина дыхания
		Диурез, рН, относительная платность
		мочи, белок, глюкоза, уробилиноген,
		билирубин, кетоны, кровь (эритроциты,
		лейкоциты, гемоглобин), эпителиальные
		клетки, цилиндры, соли, бактерии

Патоморфологические	Вскрытие, макроскопическое описание
исследования	состояния органов и тканей, места введения,
	определение относительной массы органов,
	гистологические исследования головного
	мозга, сердца, печени, почек, легких, селезенки,
	тимуса, надпочечников, желудка, кишечника,
	мочевого пузыря, поджелудочной железы,
	щитовидной железы, лимфоузлов, костного
	мозга, семенников, яичников и матки, места
	введения препарата

2.4. Исследование генотоксических и мутагенных свойств нанопрепарата.

Способность некоторых наночастиц взаимодействовать с ДНК определяет возможное проявление лекарственным нанопрепаратом генотоксических и мутагенных свойств. В связи с этим с помощью электрохимического метода будет проведено исследование генотоксичности, особенностей взаимодействия с гетероциклическими основаниями дсДНК (интеркаляция, генерация активных форм кислорода, расщепление полинуклеотидной цепи ДНК, ковалентные сшивки), определение аффинности и констант связывания.

Для оценки мутагенной активности будет проведен тест учета цитогенетических

повреждений в клетках костного мозга млекопитающих.

3. Изучение эффективности наноразмерных частиц для доставки лекарств

В связи с проявлением гиполипидемических свойств у фосфолипидной системы наноразмерных частиц для доставки лекарств представляется также целесообразным изучить ее специфическую фармакологическую активность с проведением одного из 2-х тестов.

3.1.Экспериментальная гиперлипидемия у крыс, вызванная введением детергентов Животные: крысы, по 10 голов самцов. Всего 40 голов.

<u>Группы</u>:

- 1. доза 1
- 2. доза 2
- 3. доза 3
- 4. контроль

введение препарата: п/о исследуемый биологический материал: кровь (плазма) 3.2.Экспериментальный атеросклероз, вызванный гиперлипидемической диетой Животные: крысы, 10 голов самцов. Всего 40 голов.

- 1. доза 1
- 2. доза 2
- 3. доза 3
- 4. контроль

введение препарата: путь п/о исследуемый биологический материал: кровь (плазма), сосуды.

Литература

1. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 N 78 (ред. от 23.04.2021) "О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения" (с изм. и доп., вступ. в силу с 06.10.2021).

2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая.- М.: Гриф и К, 2012.-944 с.

3. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. Издание второе дополненное.-М.:МДВ, 2008.-196 с.

4. Дурнев А.Д. Токсикология наночастиц. БЭБМ, 2008, 145 (1): 78-80.

приложение д

Приложение 1.16 - Установка VPN-соединения с виртуальными машинами ИБМХ

1. Скачать openconnect-gui-1.5.3-win32.exe, перейдя по ссылке:

https://github.com/openconnect/openconnect-gui/releases

2. Открыть приложение, перейти в настройки. В меню выбрать New profile (advanced)

OpenConnect-GUI VPN client File View Settings Help	- <u>1777</u> -		×	
Main VPN Info				
Server: fox		▼		New profile
				Edit calested profile

Рисунок S1. Стартовое окно OpenConnect-GUI VPN client

3. Заполнить настройки: Name – BIO, Gateway – 195.178.207.254, Username – fox.

Name	BIO	
Gateway	195.178.207.254	
Username	fox	
Groupname		Sur Charles
CA Certificate	•••	5
Server Certificat	e	
OTP Token	•	5
VPN protocol	Cisco AnyConnect	2
Local Certifica	te System Store	
User Certificat	e	
User Key		
Reconnect tim	eout 300s 🖨	
DTLS attempt	period 25s 🜲	
Minimize o	n Connect 🗌 Batch mode	
Disable UD	P Use Proxy	

Рисунок S2. Настройки VPN

- 4. Нажать "Save", согласиться с отсутствием сертификата
- 5. Выбрать группу АNYCONNECT_VPN_ВІО

Main VPN	a group_li	? ×	
	GROUP:		
	ANYCONNECT_VPN	_BIO 🔫	
	ОК	Cancel	View log

Рисунок S3. Выбор группы в стартовом окне.

6. Ввести пароль - Lis2lis22

7. Далее в поисковой строке локального компьютера найти "Подключение к удалённому рабочему столу". Номер машины ИБМХ - 192.168.8.161, имя пользователя - BIO\fox, пароль - Lis2lis22.
Приложение 1.16.1-І. Результаты тестирования инструментов

1. Картирование прочтений Illumina на геном

STAR

Версия программы: 2.7.9а

Команда запуска:

/home/ubuntu/work/illum/star alig/STAR-

2.7.9a/bin/Linux_x86_64_static/STAR --runThreadN 8 -genomeDir /home/ubuntu/work/illum/star_alig/genomeDir -readFilesIn /home/ubuntu/work/illum/SRR15909920_1.fastq /home/ubuntu/work/illum/SRR15909920_2.fastq --outSAMtype BAM Unsorted --outFileNamePrefix /home/ubuntu/work/illum/star alig/mapped/star mapped

Машина: t2.2xlarge

Время исполнения: 608.29 сек.

Пиковое потребеление оперативной памяти: 31,932368 Гб

Метрики точности:

- 1. Прочтений картировано не на свои гены: 0.00644 %
- 2. Прочтений потеряно: 15.3132 %
- 3. Фракция генов, для которых были утеряны все прочтения: 8.4 %
- 4. Фракция генов, на которые ложно картировались прочтения: 0.826 %
- 5. Фракция генов, на которые прочтения были картированы с минимальными ошибками: 73.624 %
- 6. Корреляция: 0.983
- 7. Корреляция после удаления нулевых значений: 0.982



Рисунок S1.16.1-II. Гистограмма нормализованных ошибок картирования коротких прочтений на геном человека. Версия генома GRCh38.p13 release 38. Инструмент картирования STAR 2.7.9a.

HiSat2

Версия программы: 2.2.1

Команда запуска:

/home/ubuntu/hisat2-2.2.1/hisat2 -x
/home/ubuntu/work/illum/Ht_ref_cont_index/Ht_ref_cont_index
--threads 8 -1 ./illum_sim/10M_gen_ref_hep_exp_1.fq -2
./illum_sim/10M_gen_ref_hep_exp_2.fq -S
./hisat test/hisat genome aln.sam

```
Машина: t2.2xlarge
```

Время исполнения: 287.90 сек.

Пиковое потребеление оперативной памяти: 4,88548 Гб

Метрики точности:

- 1. Прочтений картировано не на свои гены: 0.09146 %
- 2. Прочтений потеряно: 16.3761 %
- 3. Фракция генов, для которых были утеряны все прочтения: 6.642 %
- 4. Фракция генов, на которые ложно картировались прочтения: 2.917 %
- 5. Фракция генов, на которые прочтения были картированы с минимальными ошибками: 70.855 %
- 6. Корреляция: 0.9832501700290701
- 7. Корреляция после удаления нулевых значений: 0.9830472757415344



Рисунок S2.16.1-II. Гистограмма нормализованных ошибок картирования коротких прочтений на геном человека. Версия генома GRCh38.p13 release 38. Инструмент картирования HiSat2 2.2.1.

2.

Картирование прочтений Illumina на транскриптом

HiSat2

Версия программы: 2.2.1

Команда запуска:

/home/ubuntu/hisat2-2.2.1/hisat2 -x /home/ubunt

u/work/illum/tran_ht_index/tran_ht_index --threads 8 --nospliced-alignment -1

/home/ubuntu/work/ngs_simulation/illum_sim/10M_gen_ref_hep_
exp 1.fq -2

```
/home/ubuntu/work/ngs_simulation/illum_sim/10M_gen_ref_hep_
exp_2.fq -S ./hisat_test/transcriptome_aln.sam
```

Машина: t2.2xlarge

Время исполнения: 368.78 сек.

Пиковое потребеление оперативной памяти: 3,27934 Гб

Метрики точности:

- 1. Доля неправильно картированных ридов: 27.092 %
- 2. Доля утерянных ридов: 0.0611 %
- Фракция транскриптов, на которые были ложно картированы риды: 58.0526 %
- Фракция транскриптов, для которых риды были полностью потеряны: 1.6947 %
- 5. Фракция транскриптов, для которых риды были картированы с минимальной ошибкой: 29.1492 %
- 6. Корреляция: 0.9497692282148927
- 7. Корреляция после удаления нулевых значений: 0.9496109725706231



Рисунок S3.16.1-II. Гистограмма нормализованных ошибок картирования коротких прочтений на транскриптом человека версии 38. Инструмент картирования HiSat2 2.2.1.

3. Картирование и квантификация Illumina Salmon

Версия программы: 1.5.2

Команда запуска:

```
/home/ubuntu/salmon-1.5.2_linux_x86_64/bin/salmon quant -i
/home/ubuntu/work/salmon multifeature index gencode v38 -l
```

```
A --threads 8 --validateMappings --numGibbsSamples 20 -1
```

- ./illum sim/10M gen ref hep exp 1.fq -2
- ./illum_sim/10M_gen_ref_hep_exp_2.fq -o
- ./salmon test/salmon qnt

Машина: t2.2xlarge

Время исполнения: 143.85 сек.

Пиковое потребление оперативной памяти: 1,501556 Гб

Метрики точности:

- 1. Доля неправильно картированных ридов: 1.3555 %
- 2. Доля утерянных ридов: 0.4222 %
- 3. Фракция транскриптов, на которые были ложно картированы риды: 4.31 %
- 4. Фракция транскриптов, для которых риды были полностью потеряны: 5.57 %
- 5. Фракция транскриптов, для которых риды были картированы с минимальной ошибкой: 84.8583 %
- 6. Корреляция: 0.9993739879171566
- 7. Корреляция после удаления нулевых значений: 0.9993684179379314



Рисунок S4.16.1-II. Гистограмма нормализованных ошибок картирования коротких прочтений на транскриптом человека версии 38. Инструмент картирования Salmon 1.5.2.

4. Картирование прочтений ОМТ на геном

Minimap2

Версия программы: 2.22-r1101

Команда запуска:

/home/ubuntu/minimap2-2.22_x64-linux/minimap2 -ax splice -t

8 --junc-bed

/home/ubuntu/work/var_ref/minimap_splice_anno.bed -uf -k14
/home/ubuntu/work/var ref/GRCh38.p13.genome.mmi

```
./sim out/simulated aligned reads.fastq >
```

./minimap2_test/genome_aln.sam

Машина: t2.2xlarge

Время исполнения: 226.52 сек.

Пиковое потребление оперативной памяти: 12,672652 Гб

Метрики точности:

- 1. Прочтений картировано не на свои гены: 0.15238 %
- 2. Прочтений потеряно: 1.2668 %
- 3. Фракция генов, для которых были утеряны все прочтения: 11.017 %
- 4. Фракция генов, на которые ложно картировались прочтения: 5.264 %
- 5. Фракция генов, на которые прочтения были картированы с минимальными ошибками: 59.272 %
- 6. Корреляция: 0.9526325479866763
- 7. Корреляция после удаления нулевых значений: 0.95221233853005



Рисунок S5.16.1-II. Гистограмма нормализованных ошибок картирования длинных прочтений на геном человека. Версия генома GRCh38.p13 release 38. Инструмент картирования Minimap2 2.22-r1101.

Graphmap2 и deSalt

Graphmap2 был отвергнут на этапе выравнивания, т.к. скорость его работы крайне низка: за 970 секунд было обработано лишь 1.5% прочтений (minimap2 обработал все прочтения за 226 секунд), к тому же данная программа требует 43 Гб оперативной памяти и машину, имеющую 120 Гб оперативной памяти, для построения индекса, помимо этого замечены ошибки выделения памяти при достаточном количестве свободной оперативной памяти, что может свидетельствовать о низком уровне программной реализации данного инструмента.

deSalt был отвергнут по причине высокого потребления оперативной памяти при построении индекса и при работе: 73 Гб и 35 Гб соответственно.

5. Картирование прочтений ОМТ на транскриптом

Minimap2

Версия программы: 2.22-г1101

Команда запуска:

```
/home/ubuntu/minimap2-2.22_x64-linux/minimap2 -ax map-ont -
N 100 -t 8 /home/ubuntu/work/ref/gencode.v38.transcripts.fa
./sim_out/simulated_aligned_reads.fastq >
./minimap2 test/tran aln.sam
```

Машина: t2.2xlarge

Время исполнения: 116.77 сек.

Пиковое потребление оперативной памяти: 5,294332 Гб

Метрики точности:

- 1. Доля неправильно картированных ридов: 0.9865 %
- 2. Доля утерянных ридов: 0.1083 %
- Фракция транскриптов, на которые были ложно картированы риды: 15.7387
 %
- Фракция транскриптов, для которых риды были полностью потеряны: 34.4935 %
- 5. Фракция транскриптов, для которых риды были картированы с минимальной ошибкой: 35.5341 %
- 6. Корреляция: 0.9760158079222877
- 7. Корреляция после удаления нулевых значений: 0.9758332723416269



Рисунок S6.16.1-II. Гистограмма нормализованных ошибок картирования коротких прочтений на транскриптом человека версии 38. Инструмент картирования Minimap2 2.22-r1101.

6. Картирование и квантификация ONT Salmon

Версия программы: 1.5.2

Команда запуска:

```
/home/ubuntu/salmon-1.5.2_linux_x86_64/bin/salmon quant -i
/home/ubuntu/work/salmon_multifeature_index_gencode_v38 -l
A --threads 8 --validateMappings --numGibbsSamples 20 -r
./sim_out/simulated_aligned_reads.fastq -o
./salmon test/salmon qnt ont
```

Машина: t2.2xlarge

Время исполнения: 143.85 сек.

Пиковое потребеление оперативной памяти: 1,501556 Гб

Метрики точности:

- 1. Доля неправильно картированных ридов: 0.001 %
- 2. Доля утерянных ридов: 4.9512 %
- 3. Фракция транскриптов, на которые были ложно картированы риды: 0.3898 %
- 4. Фракция транскриптов, для которых риды были полностью потеряны: 98.8237 %
- 5. Фракция транскриптов, для которых риды были картированы с минимальной ошибкой: 0.0209 %
- 6. Корреляция: 0.10934132586611171
- 7. Корреляция после удаления нулевых значений: 0.1051365488583495



Рисунок S7.16.1-II. Гистограмма нормализованных ошибок картирования коротких прочтений на транскриптом человека версии 38. Инструмент картирования Salmon 1.5.2.

Поиск мутаций ОNТ GATK

Версия программы:

Последовательность действий:

```
1. Конвертация исходного .sam файла в .bam файл:
```

samtools view -bS genome aln.sam > genome aln.bam

2. Подготовка .bam файла:

```
java -jar /home/ubuntu/picard.jar
AddOrReplaceReadGroups I=genome_aln.bam
O=with_groups.bam RGID=1 RGLB=lib1 RGPL=ONT RGPU=unit1
RGSM=20
```

Время выполнения: 159.90 сек.

Пиковое потребелние оперативной памяти: 0,255564 Гб

Машина: t2.2xlarge

3. MarkDuplicates: /home/ubuntu/gatk-4.2.2.0/gatk --java-options "-Xmx32g" MarkDuplicatesSpark -I with_groups.bam -0

marked_dup.bam -M marked_dup_metrics.txt

Время выполнения: 120.72 сек.

Пиковое потребление оперативной памяти: 12,774192 Гб

Машина: t2.2xlarge

4. Поиск вариантов:
/home/ubuntu/gatk-4.2.2.0/gatk --java-options "-Xmx32g"
HaplotypeCaller -R
/home/ubuntu/work/var_ref/GRCh38.p13.genome.fa -I
marked_dup.bam -0 gatk_ont.vfc
Время выполнения: 3927.47 сек.
Пиковое потребление оперативной памяти: 11,83414 Гб
Машина: t2.2xlarge

Таблица S1.16.1-II. Метрики точности variant calling'а. Данные транскриптомного секвенирования ОNТ. Программа обработки GATK.

Тип	Правильные	Ложноположительные	Точность
SNP	73	46	0.613
Indel	0	87	0

Фильтрация по качеству: картина не меняется при фильтрации по качеству.

Поиск мутаций ONT Clair3

Версия программы: 0.1-г7

Последовательность действий:

1. Конвертация исходного .sam файла в .bam файл:

samtools view -bS genome_aln.sam > genome_aln.bam

2. Сортировка .bam файла

```
samtools sort -@ 4 genome_aln.bam -o
sorted genome aln.bam
```

3. Запуск clair3

```
run clair3.sh --
```

bam_fn=/home/ubuntu/work/ngs_simulation/ont_vars/sorted
_genome_aln.bam --

```
ref_fn=/home/ubuntu/work/var_ref/GRCh38.pl3.genome.fa -
-threads=36 --platform="ont" --
```

```
model_path="/home/ubuntu/anaconda3/envs/clair3/bin/mode
```

```
ls/r941 prom hac g360+g422" -
```

```
output="/home/ubuntu/work/ngs_simulation/ont_vars/clair
out/"
```

Время выполнения: 1304.66 сек.

Пиковое потребление оперативной памяти: 0,597068 Гб

Машина: c4.8xlarge

Таблица S2.16.1-II. Метрики точности variant calling'а. Данные транскриптомного секвенирования ОNT. Программа обработки Clair3.

Тип	Правильные	Ложноположительные	Точность
SNP	15926	277528	0.054
Indel	615	150671	0.004

Фильтрация по качеству: варианты не поддаются фильтрации по качеству, так как все варианты имеют низкое значение QUAL и при фильтрации по качеству их

количество быстро снижается, притом значение точности не достигает приемлемого уровня.

7. Поиск мутаций ONT Bcftools

Версия программы: 1.9

Последовательность действий:

2. Конвертация исходного .sam файла в .bam файл:

samtools view -bS genome aln.sam > genome aln.bam

3. Сортировка .bam файла

samtools sort -@ 4 genome aln.bam -o

sorted genome aln.bam

4. Поиск вариантов:

```
bcftools mpileup --fasta-ref
/home/ubuntu/work/var_ref/GRCh38.p13.genome.fa -Ou --
threads 2 sorted_genome_aln.bam | bcftools call -v --
consensus-caller --threads 2 --output-type v -o
bcftools vars.vcf
```

Время выполнения: 21841.24 сек. (6 часов) Пиковое потребление оперативной памяти: 13,117024 Гб Машина: t2.xlarge

Таблица S3.16.1-II. Метрики точности variant calling'а. Данные транскриптомного секвенирования ОNT. Программа обработки Clair3.

Тип	Правильные	Ложноположительные	Точность
SNP	11986	16821	0.416
Indel	11	3605	0.003

Фильтрация по качеству: варианты поддаются фильтрации по качеству, максимальная точность составляет 0.646, при этом количество верных SNP составляет 2525, достигается при пороге QUAL в 60.

8. Поиск мутаций Illumina GATK

Версия программы: 4.2.2.0

Последовательность действий:

```
1. Конвертация исходного .sam файла в .bam файл:
```

```
samtools view -bS ht norm cont.sam > ht norm conts.bam
```

2. Подготовка.bam файла: java -jar /home/ubuntu/picard.jar AddOrReplaceReadGroups I=/home/ubuntu/work/illum/ht_norm_conts.bam O=with_groups.bam RGID=1 RGLB=lib1 RGPL=ILLUMINA RGPU=unit1 RGSM=20

Время выполнения: 1502.39

Пиковое потребление оперативной памяти: 0,208666624 Гб

```
Машина: t2.2xlarge
```

3. MarkDuplicates: /home/ubuntu/gatk-4.2.2.0/gatk --java-options "-Xmx32g" MarkDuplicatesSpark -I /home/ubuntu/work/illum/with_groups.bam -0 /home/ubuntu/work/illum/gatk_test/32g_8t/marked_dup.bam -M /home/ubuntu/work/illum/gatk_test/32g_8t/marked_dup_met rics.txt Время выполнения: 1441.57 сек.

Пиковое потребление оперативной памяти: 30,183868 Гб

Машина: t2.2xlarge

4.

Поиск вариантов:

/home/ubuntu/gatk-4.2.2.0/gatk --java-options "-Xmx32g"
HaplotypeCaller -R

```
/home/ubuntu/work/var ref/GRCh38.p13.genome.fa -I
```

/home/ubuntu/work/illum/gatk_test/16g_4t/marked_dup.bam

-0

/home/ubuntu/work/illum/gatk test/32gb 8t/32gb 8t.vfc

Время выполнения: 4170.63 сек.

Пиковое потребление оперативной памяти: 1,180696576 Гб

Машина: t2.2xlarge

Таблица S4.16.1-I. Метрики точности variant calling'а. Данные транскриптомного секвенирования Illumina клеточной линии GM12878²² SRR15909920²³. Программа обработки GATK.

Тип	Правильные	Ложноположительные	Точность
SNP	19767	15828	0.555
Indel	1305	6598	0.165

Таблица S5.16.1-I. Зависимость количества и качества вариантов от порога фильтрации по качеству. Данные транскриптомного секвенирования Illumina клеточной линии GM12878 SRR15909920. Программа GATK.

QUA	Кол-во верных	Точность для	Кол-во верных	Точность для
L	SNP	SNP	Indel	Indel
25	19767	0,56	1305	0,17
30	19767	0,56	1305	0,17
35	19363	0,58	1295	0,17
40	17121	0,61	1278	0,18
45	17081	0,61	1241	0,18
50	16979	0,62	1188	0,18
55	16848	0,62	1142	0,19
60	16513	0,63	1089	0,19

²² Клеточная линия, полученная от NA12878 – одного из людей, чей геном был секвенирваона в рамках проекта «1000 геномов»

²³ SRA идентификатор датасета с результатами ресеквенирования кл. линии GM12878, проведённого в рамках проекта Genome in a Bottle.

65	16024	0,64	1011	0,19
70	15063	0,64	960	0,19
75	12503	0,63	929	0,2
80	11402	0,66	830	0,22
85	11333	0,66	816	0,22
90	11176	0,66	796	0,23

Варианты умеренно поддаются фильтрации по качеству, начиная с показателя QUAL в 80 точность для SNP выходит на плато.

9. Поиск мутаций Illumina Strelka

Версия программы: 2.9.10

Последовательность действий:

1. Конвертация исходного .sam файла в .bam файл:

samtools view -bS ht_norm_cont.sam > ht_norm_conts.bam

2. Сортировка .bam файла:

samtools sort -@ 4 ht_norm_conts.bam -o

sorted norm conts .bam

3. Конфигурирование задачи:

/home/ubuntu/strelka-2.9.10.centos6_x86_64/bin/configureStrelkaGermlineWorkf low.py --bam /home/ubuntu/work/illum/sorted_norm_conts.bam --rna -referenceFasta /home/ubuntu/work/var_ref/GRCh38.p13.genome.fa --runDir /home/ubuntu/work/illum/Strelka_test_final

Происходит мгновенно, не требует вычислительных ресурсов.

4. Запуск процесса variant calling'a:

```
/home/ubuntu/work/illum/Strelka_test_final/runWorkflow.
py -m local -j 36
```

Время выполнения: 243.64 сек.

Пиковое потребление оперативной памяти: 0,355252 Гб

Машина: c4.8xlarge

Таблица S6.16.1-I. Метрики точности variant calling'а. Данные транскриптомного секвенирования Illumina клеточной линии GM12878 SRR15909920. Программа обработки Strelka, версия 2.9.10.

Тип	Правильные	Ложноположительные	Точность
SNP	15946	11614	0.579
Indel	739	770	0.49

Таблица S7.16.1-I. Зависимость количества и качества вариантов от порога фильтрации по качеству. Данные транскриптомного секвенирования Illumina клеточной линии GM12878 SRR15909920. Программа Strelka, версия 2.9.10.

QUA	Кол-во верных	Точность для	Кол-во верных	Точность для
L	SNP	SNP	Indel	Indel
25	15134	0,67	702	0,53
30	14982	0,68	663	0,55
35	14746	0,69	655	0,56
40	14504	0,7	632	0,57
45	14267	0,71	585	0,58
50	12923	0,73	554	0,6
55	12743	0,74	547	0,6
60	12391	0,75	518	0,62
65	11777	0,75	502	0,63
70	11366	0,76	497	0,64
75	10056	0,76	464	0,63
80	9788	0,76	447	0,64
85	9460	0,77	429	0,64
90	8755	0,76	425	0,64

Варианты хорошо поддаются фильтрации по качеству: максимальная точность достигается для SNP достигается при значении QUAL в 85 и составляет 0,77. Максимальная точность для Indel достигает при значении QUAL от 70 и составляет 0,64

Поиск мутаций Illumina Bcftools

Версия программы: 1.9

Последовательность действий:

1. Конвертация исходного .sam файла в .bam файл:

samtools view -bS ht_norm_cont.sam > ht_norm_conts.bam

2. Сортировка .bam файла:

samtools sort -@ 4 ht_norm_conts.bam -o sorted_norm_conts
.bam

3. Поиск вариантов:

```
bcftools mpileup --fasta-ref
/home/ubuntu/work/var_ref/GRCh38.p13.genome.fa -Ou --
threads 2 /home/ubuntu/work/illum/sorted_norm_conts.bam |
bcftools call -v --consensus-caller --threads 2 --output-
type v -o bcftools_vars_illum.vcf
```

Время выполнения: 8503.12 сек. (2.36 часа) Пиковое потребление оперативной памяти: 0,519128 Гб Машина: t2.xlarge

Таблица S8.16.1-I. Метрики точности variant calling'а. Данные транскриптомного секвенирования Illumina клеточной линии GM12878 SRR15909920. Программа обработки Bcftools, версия 1.9.

Тип	Правильные	Ложноположительные	Точность
SNP	36571	48156	0.432
Indel	1097	1883	0.368

Таблица S9.16.1-I. Зависимость количества и качества вариантов от порога фильтрации по качеству. Данные транскриптомного секвенирования Illumina клеточной линии GM12878 SRR15909920. Программа Bcftools, версия 1.9.

QUA	Кол-во верных	Точность для	Кол-во верных	Точность для
L	SNP	SNP	Indel	Indel
25	22444	0,6	644	0,53
30	21947	0,62	614	0,56
35	16023	0,69	559	0,58
40	15818	0,7	536	0,59
45	14919	0,71	512	0,62
50	14556	0,72	486	0,64
55	14183	0,73	458	0,68
60	12664	0,75	436	0,7
65	12154	0,75	407	0,74
70	11346	0,76	396	0,74
75	11108	0,76	351	0,76
80	10251	0,78	341	0,78
85	9950	0,78	325	0,79
90	9760	0,78	309	0,79

Варианты хорошо поддаются фильтрации по качеству, начиная с показателя QUAL 80 точность для SNP находятся на уровне 0.78, для Indel достигается точность 0.79 при показателе QUAL в 85.

Приложение 1.16.1 – Па. Форма протокола СОП обработки транскриптомных данных, полученных на платформе ONT.

Форма протокола от 20.12.2021

Оператор: ФИО

Дата: ДД.ММ.ГГ

Вход на виртуальную машину ИБМХ	Выполнено/Не выполнено
Название папки с обрабатываемыми данными на диске Miniion	
Контроль 1	
Контроль 2	
Контроль 3	
Контроль 4	

При возникновении трудностей сделать скриншот, вставить в протокол

прохождения СОП и описать проблему.

Приложение 1.16.1 – Пб. Форма протокола СОП обработки транскриптомных данных, полученных на платформе Illumina.

Форма протокола от 20.12.2021

Оператор: ФИО

Дата: ДД.ММ.ГГ

Вход на виртуальную	Выполнено/не выполнено
машину ИБМХ	
SRA идентификатор	
Контроль 1	
Контроль 2	
Контроль 3	

При возникновении трудностей сделать скриншот, вставить в протокол

прохождения СОП и описать проблему.

Приложение 1.16.2 – І. Форма протокола СОП обработки протеомных данных.

Форма протокола от 19.12.2021

Оператор: ФИО

Дата: ДД.ММ.ГГ

1	Вычислительная система Сервер: Процессор: ОЗУ: Система и ее разрядность:	
2	Расположение папки со входными данными	
3	Количество и объем файлов	
4	Расположение FASTA файла	
5	Версия программы MaxQuant	2.0.3.0
6	Число процессоров (napamemp MaxQuant)	
7	Расположение результирующих файлов	
8	Объем результирующих файлов	
9	Объем результирующей папки combined (в результатах \combined \)	
10	Объем результрующей папки txt (в результатах \combined \txt \)	
11	Объем результрующего файла ProteinGroups.txt (в результатах \combined\txt\ProteinGroups.txt)	
12	Объем результрующей папки proc (в результатах\combined\proc)	
13	Контроль 0	
14	Контроль 1 час	
15	Контроль 2 час	

Приложение 1.16.3 – І. Журнал ошибок и их устранения.

Дата: 19.11.2021

```
Блок кода:
import requests
url = "http://api.xialab.ca/mapcompounds"
payload = "{\n\t\"queryList\": \"C05480;C00249;C14748;\",\n\t\"inputType\": \"KEGG
ID \setminus n 
headers = \{
'Content-Type': "application/json",
'cache-control': "no-cache",
}
response = requests.request("POST", url, data=payload, headers=headers)
print(response.text)
Результат: { "Query": [ "C05480", "C00249", "C14748"], "Match": [ "NA", "NA", "NA"], "HM
DB":["NA","NA","NA"],"PubChem":["NA","NA","NA"],"ChEBI":["NA","NA","NA"],
"KEGG":["NA","NA","NA"],"METLIN":["NA","NA","NA"],"SMILES":["NA","NA","
NA"],"Comment":["0","0","0"]}
Временное решение: конвертирование «вручную» путём загрузки файла КЕГГ
идентификаторами соединений в веб-приложение MetaboAnalyst на страницу:
https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/upload/ConvertView.xhtml
```

Дата: 19.12.2021

Команда: python forMapping.py «/home/rsuser/MetData/dt/NutrInst/InputOb/mumInp utObes.csv»

Ошибка: ImportError: No module named pandas Причина: конфликт версий Python Устранение:

```
ubuntu@ip-172-31-10-48:/home/rsuser$ python
Python 2.7.18 (default, Mar 8 2021, 13:02:45)
[GCC 9.3.0] on linux2
Type "help", "copyright", "credits" or "license" for more information.
>>> import pandas
Traceback (most recent call last):
File "<stdin>", line 1, in <module>
ImportError: No module named pandas
>>> exit()
```

```
ubuntu@ip-172-31-10-48:/home/rsuser$ sudo add-apt-repository ppa:deadsnakes/ppa
ubuntu@ip-172-31-10-48:/home/rsuser$ sudo apt-get update
ubuntu@ip-172-31-10-48:/home/rsuser$ sudo apt-get install python3.6
ubuntu@ip-172-31-10-48:/home/rsuser$ sudo apt-get install python3.7
ubuntu@ip-172-31-10-48:/home/rsuser$ sudo apt install python3-pip
ubuntu@ip-172-31-10-48:/home/rsuser$ pip install pandas
```

ubuntu@ip-172-31 -10-48:/home/rsuser\$ python3 Python 3.7.12 (default, Sep 10 2021, 00:20:04) [GCC 9.3.0] on linux Type "help", "copyright", "credits" or "license" for more information. >>> import pandas >>> exit()

Модификация команды: python3 forMapping.py «/home/rsuser/MetData/dt/NutrInst/InputOb/mumInputObes.csv»

Дата: 21.12.2021

Команда: ubuntu@ip-172-31-10-48:/home/rsuser\$ python3 InputForAnalytics.py "/home/rsuser/masses_list.csv" Оцибка: ensembl_rest_core_restclient HTTPError: Server returned HTTP status cod

Ошибка: ensembl_rest.core.restclient.HTTPError: Server returned HTTP status code: 429

Content: You have exceeded the limit of 15 requests per second; please reduce your concurrent connections

Причина: слишком много запросов идёт на сервер в секунду.

Устранение: изменён код отправки запросов

Добавлен модуль time и увеличено время ожидания выполнения запроса.

Дата: 21.12.2021

Команда: >dir.create(paste0(pth, "InputData/")) Ошибка: cannot create dir, "Permision denied" Причина: нет прав для создания новой папки Устранение: sudo chown rsuser –R MetData

Приложение 1.16.3 – II. Форма протокола испытания метаболомного СОП.

Форма протокола от 20.12.2021

Оператор: ФИО

Дата: ДД.ММ.ГГ

Вход на виртуальную машину ИБМХ	Выполнено/Не выполнено	
Расположение папки со входными данными	Z:\MetaboData\	
Количество файлов .d и их объём	N файлов, V KB MB GB	
Количество файлов .mzML и их объём	N файлов, V KB MB GB	
Установка MetaboAnalystR	Вывод команды красным шрифтом в консоли RStudio	
Время «склеивания» спектров	N минут	
Количество combined файлов .mzML и их объём	N файлов, V KB MB GB	
Количество найденных пиков	N пиков	
Путь к файлу InputData.csv	/home/rsuser/MetData/Analysis{date}/	
Объем InputData.csv	V KB MB GB	
PerformPSEA	Вывод команды в консоль RStudio	
Объем mumInputData.csv	V KB MB GB	
forMapping.py	File is ready for name conversion	

InputForAnalytics.py	Время выполнения Объём файла InputDB.csv Список Uniprot ID, к генам которых не найден ENSG
	ENSG