

**Биоспецифические конъюгаты фотопротейна обелина для выявления  
однонуклеотидных полиморфизмов**

**Научный руководитель – Франк Людмила Алексеевна**

**Комарова Анастасия Александровна**

*Студент (бакалавр)*

Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и  
биотехнологии, Красноярск, Россия

*E-mail: komarova.anastasiia.1@yandex.ru*

Ca<sup>2+</sup>-регулируемый фотопротейн обелин - это устойчивый комплекс из апобелка и окисленного субстрата 2-гидропероксицелентеразина. Присоединение Ca<sup>2+</sup> приводит к декарбоксилированию субстрата, что сопровождается выделением энергии в виде кванта голубого света [1]. Показано, что использование обелина в качестве репортера в молекулярном анализе обеспечивает высокую чувствительность выявления мишени. Направленным мутагенезом получены обелины с различными кинетическими и спектральными характеристиками биолюминесценции (медленный зеленый мутант Y138F и быстрый фиолетовый мутант W92F;H22E) и на их основе разработан способ одновременного анализ двух мишеней в одном образце [2].

В рамках данного исследования сайт-направленным мутагенезом были получены новые варианты этих обелинов, содержащие дополнительные реакционноспособные цистеиновые остатки (Y138F;A5C и W92F;H22E;D12C), а также был разработан упрощенный способ синтеза биоспецифических конъюгатов, используемых в качестве репортеров для биолюминесцентного анализа. Это позволило повысить выход конъюгатов до 60%. Полученные конъюгаты использовали для одновременного выявления аллельных вариантов гена меланокортинового рецептора MC1R (полиморфизмы rs1805007, rs1805008 и rs1805009, ассоциированные с риском развития меланомы кожи). Метод основан на реакции ферментативного удлинения меченного аллель-специфичного праймера (primer extension reaction, PEХТ-реакция) с последующим анализом продуктов реакции цветными биолюминесцентными метками. Разделение сигналов проводили на основе спектрального и временного разрешения. Генотип определяли по соотношению сигналов от двух репортеров (дискриминационный фактор, Д). Исследовано 102 клинических образца ДНК пациентов, из них 51 с диагнозом меланомы. Показана высокая достоверность генотипирования: значения дискриминационного фактора для каждого генотипа различаются на порядок и более. Процедура анализа проста и занимает 2,5 часа. Результаты генотипирования данным способом подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-35-00107). Автор выражает благодарность руководителю работы д.б.н. Л.А. Франк, ИБФ СО РАН, Красноярск.

**Источники и литература**

- 1) Высоцкий Е.С. Кальций-регулируемые фотопротейны морских кишечнорастворимых / Е.С. Высоцкий, С.В. Маркова, Л.А. Франк // Мол. Биол. 2006. № 40. С. 404–417.
- 2) Obelin mutants as reporters in bioluminescent dual-analyte binding assay /V.V. Krasitskaya, A.N. Kudryavtsev, O. Shimomura, L.A. Frank. // Analytical Methods. 2013. V.5. P. 636–640.