

ПРИОРИТЕТНОЕ НАПРАВЛЕНИЕ VI.51. БИОТЕХНОЛОГИЯ

Программа VI.51.1. Микробиология и вирусология, искусственные генетические системы, бионанотехнологии создания терапевтических препаратов и новых материалов (координатор акад. В. В. Власов)

В Институте химической биологии и фундаментальной медицины разработан новый эффективный способ выделения модифицированных РНК-аптамеров в ходе клеточной селекции. Метод основан на разрушении природных РНК реагентами, не затрагивающими модифицированные аптамеры, и позволяет решить проблему извлечения аптамеров из сложных смесей, содержащих природные РНК. Эффективность метода продемонстрирована в ходе селекции модифицированных РНК-аптамеров, связывающихся с рецептором инсулиноподобного фактора роста IGF-IR на поверхности клеток (рис. 28). Такие аптамеры могут быть использованы в качестве основы при раз-

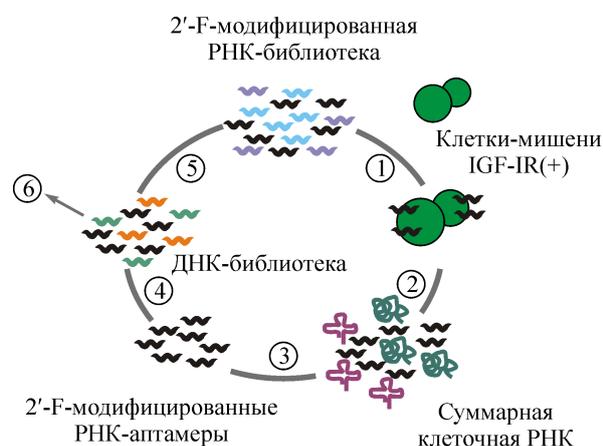


Рис. 28. Схема отбора 2'-модифицированных аптамеров к рецептору инсулиноподобного фактора роста IGF-IR на поверхности клеток.

1 — инкубация клеток-мишеней со смесью 2'-F-модифицированных РНК-олигонуклеотидов (РНК-библиотекой) и отделение несвязавшейся части 2'-F-РНК-библиотеки; 2 — разрушение клеток и выделение суммарной клеточной РНК, включая 2'-F-РНК-аптамеры; 3 — расщепление природных РНК с помощью искусственных рибонуклеаз и выделение модифицированных РНК-аптамеров; 4 — получение ДНК-копий аптамеров; 5 — РНК-транскрипция, получение обогащенной библиотеки 2'-F-РНК-олигонуклеотидов; 6 — клонирование и секвенирование, определение последовательностей РНК-аптамеров.

работке новых методов диагностики и лечения онкологических заболеваний.

Учеными этого же Института предложен оригинальный подход к конструированию средств доставки нуклеиновых кислот в клетки мишени на основе полифункциональных дендримерных конструкций. Подход основан на построении дендримерной конструкции с использованием общего мономера-предшественника, содержащего четыре функциональные группы, одна из которых используется для функционализации соответствующего слоя, а три других — для развития дендримерной цепи (рис. 29). Синтезированные мономерные блоки и линкерные группы позволяют получать дендримерные конструкции, содержащие флуоресцентные метки, пептиды, олигонуклеотиды, поликатионные фрагменты и «маскирующие» и адресующие молекулы в любых сочетаниях.

В Институте биофизики для выявления новых продуцентов биоразрушаемых полиэфиров (ПГА) проведен скрининг коллекции культур синезеленых водорослей базовой кафедры биотехнологии Сибирского федерального университета, выделенных из Красноярского водохранилища и притоков р. Енисей в 2007—2008 гг. (коллекция зарегистрирована во Всемирном центре баз данных микроорганизмов (WDCM) под № 936). Введены в культуру 22 альгологически чистых штамма цианобактерий и исследован жирнокислотный состав экстрагируемых липидов — предшественников ПГА. Отобрана серия штаммов, аккумулирующих ПГА (*Chroococcus limneticus*, *Phormidium subfuscum*, *Nostoc spongiaeforme* и *Trichormus variabilis*), перспективных для дальнейших исследований в качестве продуцентов полимеров. Наибольшие выходы ПГА (до 8 %) получены у *Chroococcus limneticus* (ACCS019) в условиях лимита по азоту и в присутствии в среде в качестве дополнительного источника углерода ацетата натрия (рис. 30).

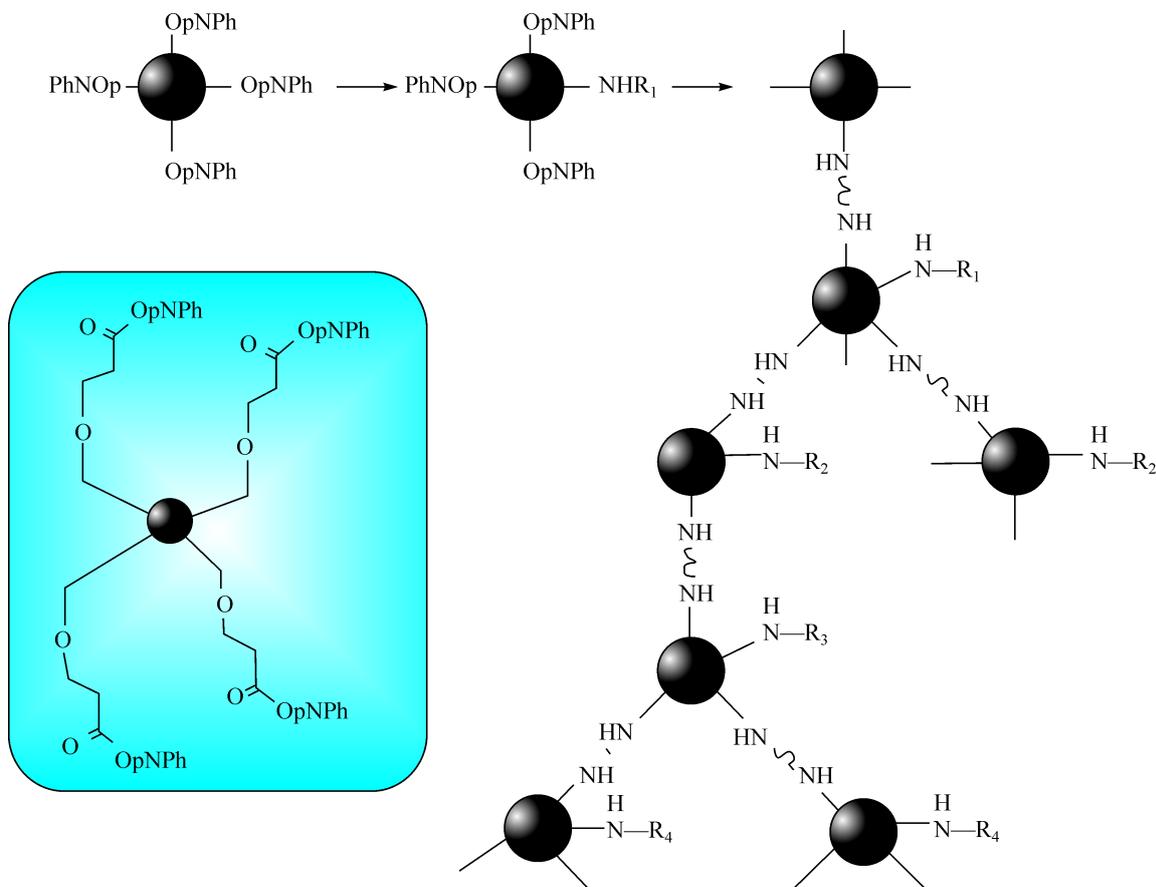


Рис. 29. Принципиальная схема получения мультифункциональных дендримерных конструкций. рNPh — остаток п-нитрофенола, R₁—R₄ — функциональные группы, вводимые в соответствующий слой дендримерной конструкции-доставщика. В качестве функциональных групп могут выступать флуоресцентные метки, пептиды или олигонуклеотиды, остатки полиэтиленполиимина (поликатионный фрагмент) и полиэтиленгликоля («маскирующий» гидрофильный полимер).

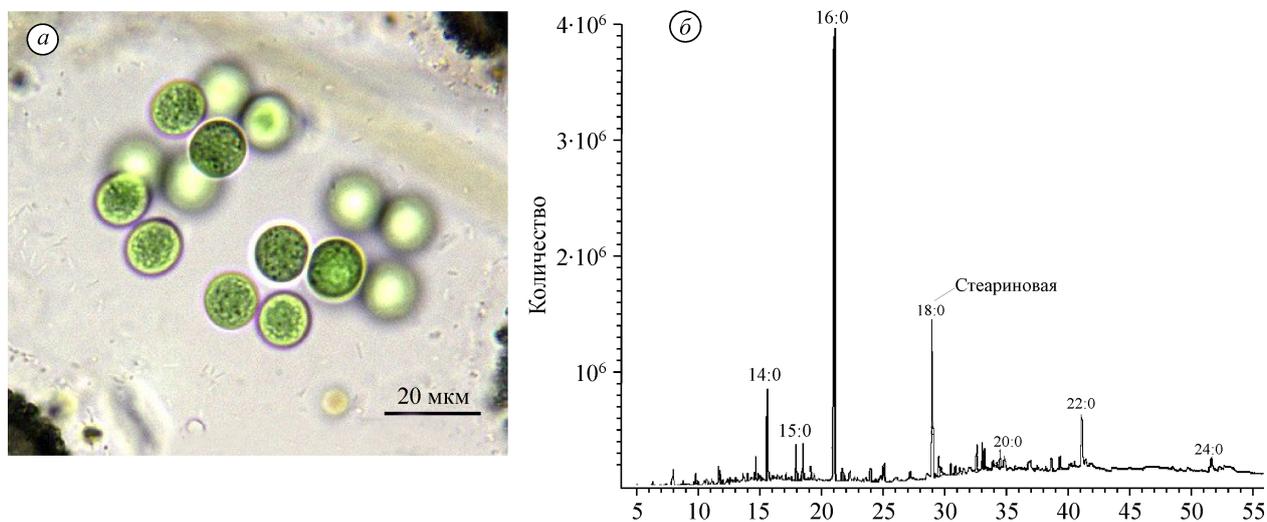


Рис. 30. *Chroococcus limneticus* (а) и хроматограммы жирных кислот липидов *Chroococcus limneticus* (ACCS019), продуцирующего биоразрушаемые полиэфиры (б).

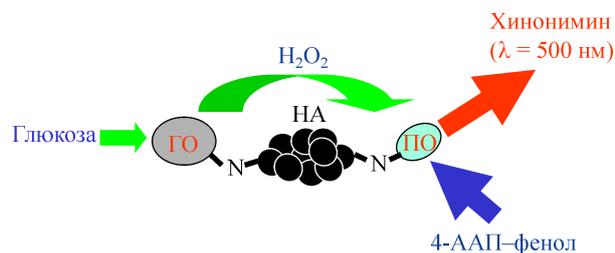


Рис. 31. Схема работы тест-системы наноалмазы — иммобилизованные ферменты.

НА — наноалмазы (носитель), ГО и ПО — глюкозооксидаза и пероксидаза, ковалентно иммобилизованные на наночастицах, Глюкоза — определяемый аналит (субстрат ГО), 4-ААП — 4-аминоантипирин, Хинонимин — цветной продукт реакции окислительного азосочетания (H₂O₂—4-ААП + фенол), катализируемой ПО.

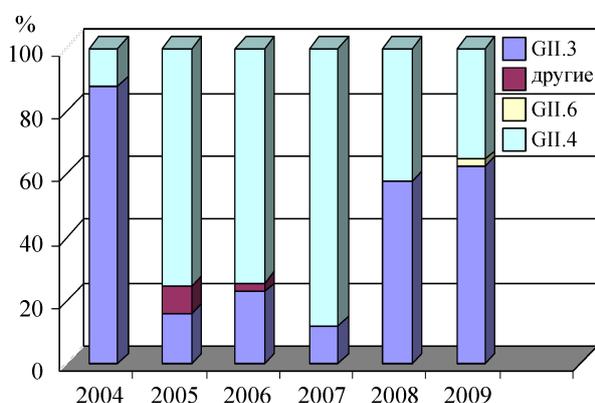


Рис. 32. Динамика выявления норовирусов различных генотипов.

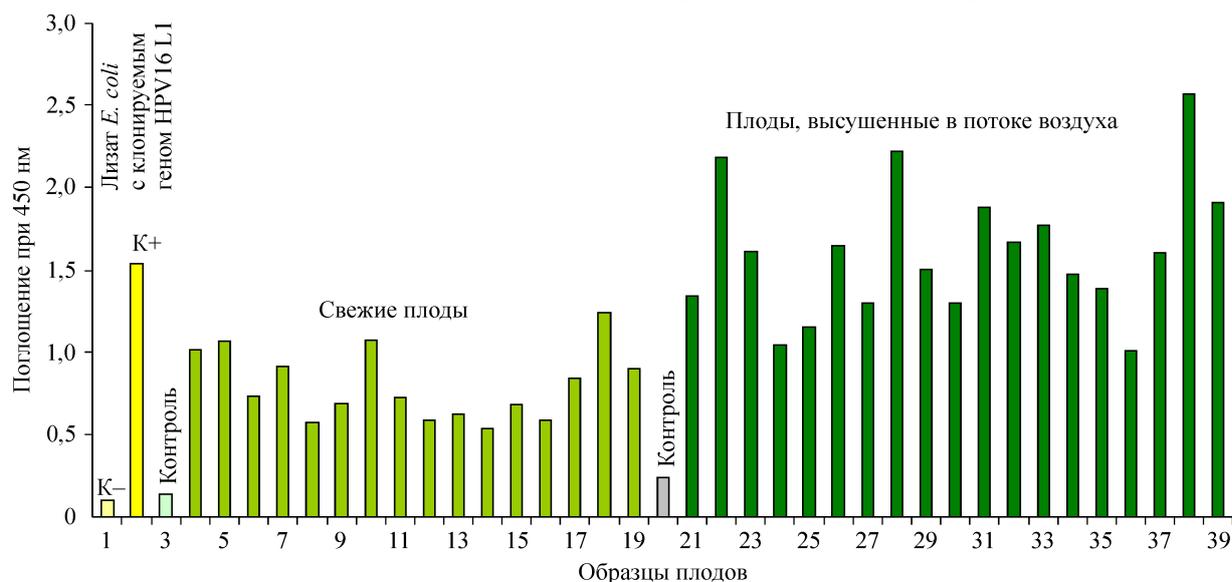


Рис. 33. Определение антигенного белка вируса папилломы человека в трансгенных томатах (иммуноферментный анализ).

1 — К- — отрицательный контроль; 2 — К+ — положительный контроль, содержащий белок; 3 — контрольный свежий плод; 4—19 — свежие плоды трансгенного томата; 20 — контрольный высушенный плод; 21—39 — плоды трансгенного томата, высушенные в потоке воздуха. В иммуноанализе использовали антитела к HPV16 L1 и вторичные антитела к конъюгированной пероксидазой, субстрат — тетраметилбензидин.

В этом же Институте посредством одновременной ковалентной иммобилизации глюкозооксидазы и пероксидазы на частицы наноалмазов, функционализированных бензохиноном, сконструирована тест-система определения глюкозы. Установлено, что иммобилизованные ферменты сохраняют свою активность, катализируют цепь последовательных биохимических реакций (рис. 31), приводящих к образованию окрашенного продукта (хинонимин) в ходе реакции окислительного азосочетания (перекись водорода—4-аминоантипирин—фенол). Комплекс наноалмазы—ферменты может многократно (до 10 раз) использоваться для определения глюкозы *in vitro*. Полученная тест-система сохраняет свою функциональную активность в течение месяца хранения при +4 °С.

Сотрудниками Института химической биологии и фундаментальной медицины проведен анализ более 1000 образцов фекалий детей раннего возраста, госпитализированных в 2008—2009 гг. с острыми гастроэнтеритами. В 722 образцах выявлены ротавирусы, норовирусы, астровирусы и аденовирусы. Проведено генотипирование большей части выявленных вирусов. Сравнение данных по генотипированию 2008—2009 гг. с данными за предыдущие годы показало, что в 2008 г. произошла смена доминирующего генотипа норовирусов с GII.4 на

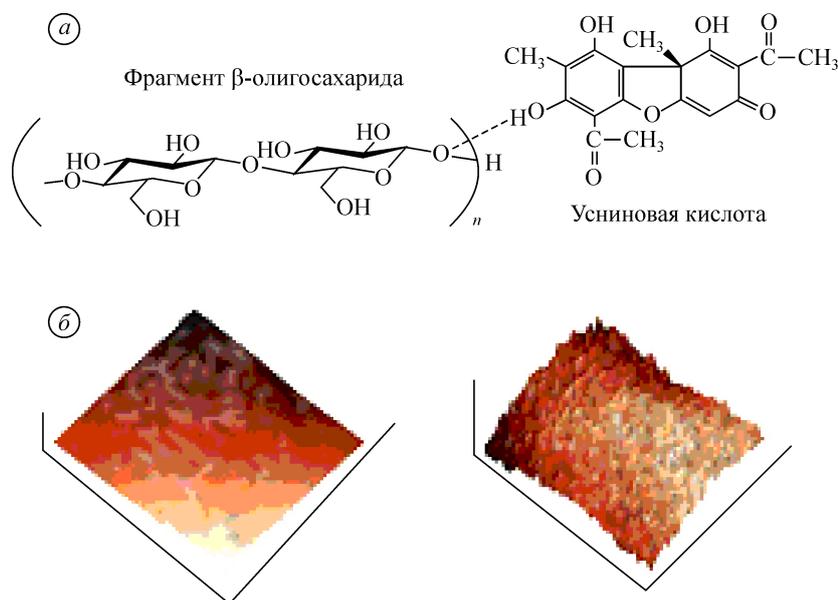


Рис. 34. Схема супрамолекулярного комплекса усиновой кислоты с β -олигосахаридом (а) и структура поверхности порошка ягеля: слева — механического грубого помола, справа — механохимического (б).

ГП.3 и зафиксирована постепенная смена одной линии астровирусов на другую: в 2008 г. преобладали изоляты линии HAsV-1d, в 2009 — HAsV-1c, в то время как в 2007 г. преобладали изоляты линии HAsV-1b (рис. 32). Результаты исследований могут использовать-

ся в врачебной практике для выработки адекватных схем лечения.

В Сибирском институте физиологии и биохимии растений с целью создания съедобной вакцины против онкогенных папиллом, вызывающих рак шейки матки, получены рас-

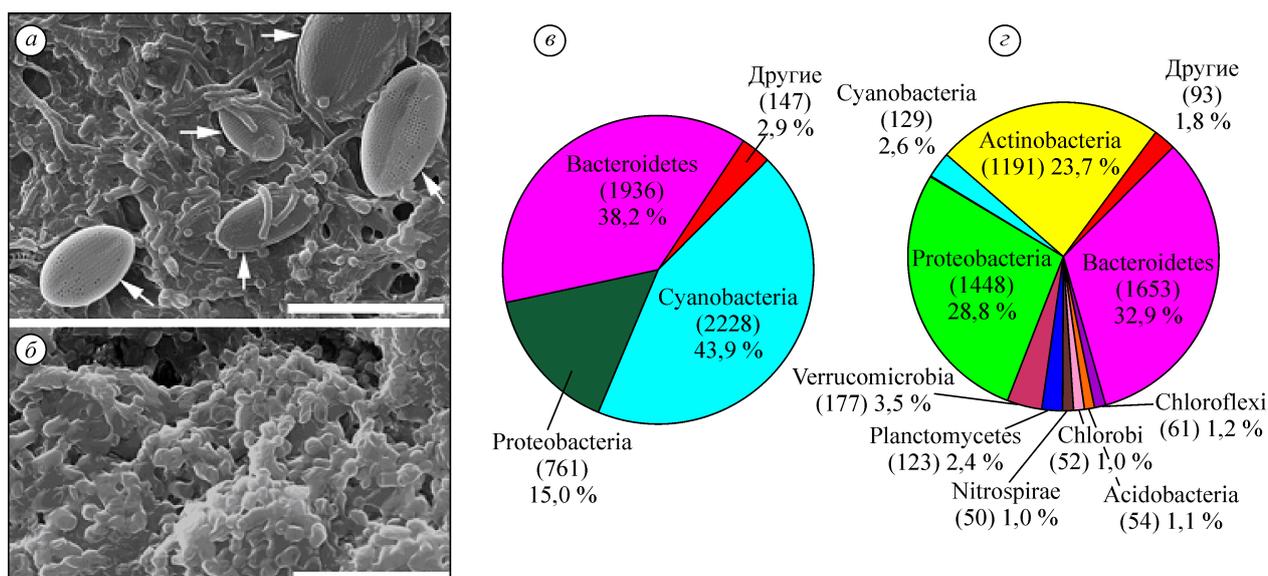


Рис. 35. Микроскопический и генетический анализ биопленки в оз. Байкал.

а, б — сканирующая электронная микроскопия: а — диатомовые водоросли *Cocconeis* sp. (показаны стрелкой) и нитчатые цианобактерии *Heteroleibleinia* sp.; б — бактериальные агрегаты. Метагеномный анализ бактериального сообщества по гену 16S рРНК биопленки (е) и бактериопланктона (з). В скобках указано количество определенных последовательностей.

тения томатов, экспрессирующие антигенный белок L1 оболочки вируса папилломы человека (рис. 33).

В Институте биологических проблем криолитозоны совместно с Северо-Восточным федеральным университетом разработана механохимическая технология получения высокоактивного биопрепарата «Наноягель-М» антибиотического действия из слоевищ лишайников, обеспечивающая твердофазное химическое преобразование лишайниковых кислот и расщепление части лишайниковых полисахаридов с образованием олигосахаридов без участия растворителей в одну технологическую стадию. Установлено, что «Наноягель-М» содержит наноразмерные супрамолекулярные комплексы, образование которых в 8—10 раз повышает биодоступность и биоактивность компонентов препарата (рис. 34).

В Лимнологическом институте комплексом методов проведен анализ биопленки, снятой с искусственного субстрата в литорали оз. Байкал. Показано, что биопленка представляет собой структурно и функционально организованное микробное сообщество с доминированием автофототрофных азотфиксирующих

цианобактерий, которые являются основным продуцентом органического вещества и отвечают за структуру биопленки. Микроскопическими методами изучены морфология и ультраструктура доминирующих представителей прокариот и эукариот (рис. 35, а, б), определены строение и структура биопленки. Методами культивирования выявлены физиологические особенности микроорганизмов. Метагеномный анализ по гену 16S рРНК, проведенный методом пиросеквенирования (рис. 35, в), показал значительное таксономическое разнообразие микробного сообщества биопленки. Установлено, что в составе биопленки преобладают цианобактерии (43,9 %), субдоминантами являются Bacteroidetes (38,2 %) и Proteobacteria (15 %). В биопленке с помощью генетических маркеров обнаружены цианобактерии, способные фиксировать атмосферный азот. Сравнительный анализ состава биопленки и планктонной пробы выявил их существенное различие, в планктоне (рис. 35, г) доминировали Bacteroidetes (32,9 %), второй по разнообразию была фила Proteobacteria (28,8 %), фила Cyanobacteria составляла лишь 2,6 %.