

ПРИМЕНЕНИЕ ДУПЛЕКС-СПЕЦИФИЧНОЙ НУКЛЕАЗЫ ИЗ КАМЧАТСКОГО КРАБА В МЕТОДАХ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Д. А. Шагин¹, Д. В. Ребриков^{1,2} ✉

¹ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

Дуплекс-специфичная нуклеаза (ДСН) из гепатопанкреаса крабоида *Paralithodes camtschaticus* (камчатский краб) обладает уникальным сочетанием свойств. Наряду с термостабильностью и высокой оптимальной температурой катализа, фермент проявляет высокую субстратную избирательность, расщепляя исключительно ДНК в составе дуплексов (ДНК-ДНК или ДНК-РНК). Соответственно, ни одиночные цепи ДНК, ни одноцепочечные участки ДНК, ни цепи РНК с любой вторичной структурой субстратами ДСН не являются. Такие свойства позволяют создавать уникальные молекулярно-биологические протоколы на основе ДСН, которая также представляет собой важный объект фундаментальных исследований в области эволюции нуклеаз. В обзоре рассматриваются различные применения ДСН из камчатского краба в современных методах молекулярной биологии.

Ключевые слова: дуплекс-специфичная нуклеаза, ДСН, гепатопанкреас краба, *Paralithodes camtschaticus*, камчатский краб

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке грантом № 075-15-2019-1789, Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины.

Вклад авторов: Д. А. Шагин — подготовка рукописи; Д. В. Ребриков — редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Денис Владимирович Ребриков
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; ncagip4@gmail.com

Статья получена: 22.02.2022 **Статья принята к печати:** 27.02.2022 **Опубликована онлайн:** 28.02.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.010

MOLECULAR BIOLOGY APPLICATIONS OF THE RED KING CRAB DUPLEX-SPECIFIC NUCLEASE

Shagin DA¹, Rebrikov DV^{1,2} ✉

¹ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Duplex-specific nuclease (DSN) from hepatopancreas of the craboid *Paralithodes camtschaticus* (red king crab) has a unique combination of properties. Along with thermal stability and a high optimal temperature of catalysis, this enzyme exhibits high substrate selectivity, cleaving only DNA in duplexes (DNA-DNA or DNA-RNA). Accordingly, it digests neither single strands (nor single-stranded regions) of DNA, nor RNA strands with any secondary structure. Such properties make it possible to create unique protocols based on DSN, which is also an important object of fundamental research in the field of nuclease evolution. The review considers diverse applications of the red king crab DSN in modern methods of molecular biology.

Keywords: duplex-specific nuclease, DSN, crab hepatopancreas, *Paralithodes camtschaticus*, red king crab

Funding: the study was supported by the grant no. 075-15-2019-1789, Center for High Precision Genomic Editing and Genetic Technologies for Biomedicine.

Author contribution: DA Shagin — preparation of the manuscript; DV Rebrikov — editing of the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Denis V. Rebrikov
Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; ncagip4@gmail.com

Received: 22.02.2022 **Accepted:** 27.02.2022 **Published online:** 28.02.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.010

Дуплекс-специфичная нуклеаза (ДСН) из гепатопанкреаса камчатского краба была впервые охарактеризована в 2002 г. [1]. Фермент с молекулярной массой 41,5 кДа состоит из 407 аминокислотных остатков (Genbank AAN86143) и обладает уникальным набором функциональных свойств [2, 3]:

ДСН проявляет максимальную активность при 60–65 °С pH 6,6;

ДСН сохраняет активность после прогрева при 90 °С или инкубации при pH 4–12;

ДСН является Mn²⁺, Co²⁺ и Mg²⁺-зависимой;

ДСН устойчива к действию протеаз (в том числе протеиназы К и папаина);

ДСН расщепляет только двухцепочечную ДНК, оставляя одиночные цепи интактными;

ДСН не проявляет заметной активности в отношении цепей РНК с любой вторичной структурой, при этом эффективно гидролизует цепь ДНК в ДНК-РНК гибридах.

Уникальное сочетание свойств позволяет создавать молекулярно-биологические протоколы на основе ДСН,

которая также представляет собой важный объект фундаментальных исследований в области эволюции нуклеаз [4]. В обзоре рассматриваются различные применения ДСН в современных методах молекулярной биологии.

Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов

Анализ однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП, англ. single nucleotide polymorphisms, SNP) применяется в диагностике генетических предрасположенностей, фармакогенетике, криминалистике, молекулярной генеалогии, популяционной генетике и других областях исследований [5–9]. На основании уникального свойства ДСН расщеплять совершенные (т. е. полностью гибридные) короткие двухцепочечные фрагменты ДНК с гораздо большей эффективностью, чем несовершенные, был разработан метод анализа ОНП, известный как DSNP-анализ (от англ. duplex-specific nuclease preference, предпочтительное расщепление дуплексов нуклеазами) [10].

Для выявления ОНП при помощи DSNP-анализа необходимы два сигнальных зонда, представляющих собой 10-членные олигонуклеотиды с флуорофором на 5'-конце и гасителем на 3'-конце — так называемые FRET-меченные пробы (от англ. FRET, fluorescence resonance energy transfer, резонансный перенос энергии флуоресценции). Один из зондов соответствует последовательности ДНК дикого типа, второй зонд соответствует мутантной последовательности. В случае совершенного дуплекса между сигнальным зондом и исследуемым фрагментом ДНК происходит гидролиз сигнального зонда, приводящий к разобщению флуорофора и гасителя; в результате детектируется флуоресценция с определенной длиной волны. В отсутствие гидролиза сигнального зонда флуоресценция не детектируется.

При проведении DSNP-анализа фрагмент ДНК, содержащий исследуемый полиморфный участок, прицельно нарабатывают до высокой концентрации, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР) со специфичными праймерами. Продукт реакции смешивают с сигнальными зондами и инкубируют в присутствии ДСН при 60 °С в течение 5–10 мин. Во время инкубации происходит амплификация ДНК-субстрата за счет совместной активности ДСН и термостабильной ДНК-полимеразы, привносимой в реакционную смесь в составе неочищенного продукта ПЦР, используемого в качестве матрицы. ДСН расщепляет двухцепочечную ДНК, что приводит к появлению фрагментов, способных служить затравками для ДНК-полимеразы. Одновременно за счет гидролиза ампликонов происходит образование коротких фрагментов ДНК, способных к эффективной гибридизации с сигнальными зондами. На заключительном этапе анализа реакционную смесь инкубируют при 30–35 °С, что обеспечивает гибридизацию зондов с ДНК-мишенью и эмиссию флуоресценции за счет активности ДСН.

Диапазон длин ПЦР продукта для DSNP-анализа проверяли эмпирически. Фрагменты ДНК различной длины, содержащие С- или Т-вариант полиморфной последовательности митохондриальной ДНК человека *COX1* C7028T, гибридизовали с Т-специфичным зондом. Для всех тестируемых продуктов были получены четкие и однозначные результаты, доказывающие возможность применения ДСНП для ампликонов разного размера.

Существует несколько различных подходов к генотипированию SNP, основанных на особенностях физико-химических свойств ДНК в зависимости от варианта [11, 12]. По сравнению с другими опубликованными протоколами DSNP имеет несколько преимуществ, во-первых, возможность использования свежего неочищенного продукта ПЦР; более того, анализ не требует разделения, очистки или центрифугирования реакционных смесей и занимает час от завершения ПЦР. Во-вторых, протокол позволяет анализировать оба аллеля одновременно в одной пробирке. В-третьих, детекцию флуоресцентного сигнала проводят с помощью стандартного лабораторного оборудования. Наконец, протокол DSNP подходит для практически любой длины продукта ПЦР, содержащего полиморфное положение.

Исследование двух или нескольких аллельных вариантов в одной пробирке предполагает использование зондов с флуорофорами, излучающими на разных длинах волн. Тип флуорофора не влияет на эффективность гидролиза, во всяком случае, если неспаренные нуклеотиды не находятся слишком близко к краям зонда.

Эффективность гидролиза несовершенных дуплексов, содержащих неспаренный нуклеотид в средней части, не зависит от типа флуорофора. Важно отметить, что при использовании зондов для разных аллелей, меченных одинаковыми флуорофорами, анализ необходимо проводить в отдельных пробирках.

DSNP анализ был успешно применен для генотипирования вариантов, вовлеченных в ряд заболеваний или предрасположенностей, в том числе *TP53* C309T; *F2* G20210A, *MTHFR* C677T; *KRAS* G34A, G35T, G35A, и G38A; *NRAS* G34A, G35C, и G35A; *HRAS* G35T; *APOE* C388T; *F5* G1698A; *BRCA1* 5382insC. Аллельный статус исследуемых образцов подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Результаты модельных экспериментов показали, что DSNP-метод позволяет надежно различать мутантные аллели и аллели дикого типа, как в гомозиготных, так и в гетерозиготных образцах. Кроме того, на примере *BRCA1* 5382insC было продемонстрировано, что метод позволяет определять не только точечные замены, но также однонуклеотидные делеции и инсерции. Следует подчеркнуть, что для исследования разных положений использовали одни и те же стандартные условия реакции, что позволяет говорить об универсальности метода DSNP в отношении широкого спектра генетических вариантов.

Хорошо известно, что некоторые участки генома подвержены кластерному мутагенезу [13]. Большинство существующих методов анализа ОНП не позволяют проводить точное определение таких близкорасположенных мутаций. На модели гена *KRAS*, для которого описано несколько мутаций в положениях 34 и 35 (G34A, G35A и G35T [14]) было продемонстрировано, что DSNP можно успешно применять в анализе близкорасположенных точечных мутаций даже мультиплексно. При одновременном использовании до четырех сигнальных зондов включительно флуоресцентный сигнал детектируется, только если зонд полностью комплементарен последовательности-мишени.

Иногда бывает важно не просто обнаружить тот или иной генетический вариант, но и определить соотношение аллелей в образце. Такие задачи возникают при работе с образцами опухолевой ткани или исследовании объединенных (пулированных) образцов геномной ДНК от нескольких доноров [12, 15]. Эксперименты с *KRAS* G35A в качестве модели доказали возможность применения DSNP для полуколичественного определения мутантного аллеля в сложных образцах.

Таким образом, природные свойства фермента ДСН легли в основу нового метода генотипирования, достаточно простого и легко автоматизируемого. К наиболее существенным преимуществам данного метода относят:

- 1) возможность использования неочищенных ПЦР продуктов с произвольным размером ампликонов;
- 2) отсутствие этапов очистки и разделения;
- 3) высокая скорость анализа (менее часа с момента получения продуктов ПЦР);
- 4) возможность оценки соотношения аллелей в образце;
- 5) универсальность: метод подходит для определения однонуклеотидных замен и инделей, в том числе близко расположенных, независимо от контекста.

Протокол не требует специального оборудования, за исключением повсеместно используемого при оснащении молекулярно-биологических лабораторий. Считывание флуоресценции (например, для флуоресцеина) можно

проводить в системах гель-документирования с УФ-лампами.

Недостатками DSNP по сравнению с ПЦР в режиме реального времени являются:

- 1) наличие подготовительного этапа (препаративная ПЦР амплификация целевого фрагмента);
- 2) детекция по конечной точке;
- 3) риск контаминации, обусловленный необходимостью открывать пробирки с ампликонами.

Нормализация кДНК

Гетерогенные уровни экспрессии генов в клетке усложняют полномасштабный анализ транскриптомов и идентификацию новых генов. Нормализация библиотек кДНК перед анализом позволяет повысить чувствительность к редким транскриптам.

Классический принцип нормализации кДНК основан на кинетике гибридизации. Поскольку скорость гибридизации пропорциональна квадрату концентрации молекул в образце, высококопийные фрагменты ренатурируют быстрее, чем малокопийные фрагменты [16]. Отделение реассоциированных двухцепочечных фрагментов после денатурации сложного образца кДНК позволяет получить библиотеку с выровненными концентрациями обильных и редких транскриптов [17–19].

Существующие протоколы нормализации отличаются способом разделения нормализованных одноцепочечных (оц) и двухцепочечных (дц) фракций. Возможности включают в себя физическое разделение фракций с использованием хроматографии на гидроксипатите [17, 20] или парамагнитных шариков [19, 21], расщепление дц ДНК эндонуклеазами рестрикции [18] и амплификацию оц ДНК с использованием эффекта супрессии ПЦР [22]. К сожалению, большинство предложенных способов не годится для нормализации образцов кДНК, обогащенных полноразмерными последовательностями.

Уникальные свойства ДСН позволили разработать высокоэффективный и простой в исполнении метод, известный как ДСН-нормализация, ставший рутинным во многих лабораториях России и мира, универсально применимый для нормализации как фрагментированных, так и полноразмерных кДНК. Как и большинство его предшественников и аналогов, метод основан на кинетике реассоциации, но отличается способом отделения нормализованной фракции одноцепочечной ДНК [23].

По окончании гибридизации реакцию смесь обрабатывают ДСН для удаления нецелевой фракции дц ДНК. Поскольку ДСН представляет собой термостабильный фермент, активный при температуре 70 °С, гидролиз происходит при той же температуре, что и гибридизация. Такая оптимизация протокола позволяет избежать неспецифической гибридизации и за счет этого уменьшить потери транскриптов, склонных к образованию вторичных структур. Оставшуюся нормализованную фракцию оц кДНК амплифицируют с помощью ПЦР.

Метод хорошо подходит и для неамплифицированной первой цепи кДНК. Элиминация мажорных последовательностей осуществляется в ходе ренатурации первой цепи кДНК с поли(А)+ РНК, служившей матрицей для ее синтеза. Данный протокол применим лишь в случаях, когда доступно большое количество биоматериала и возможно выделение поли(А)+ РНК фракции из суммарной РНК. Следует отметить, что в нормализованных библиотеках содержание клонов, соответствующих некоторым высоко

представленным транскриптам, иногда оказывается ниже, чем количество клонов, соответствующих редким транскриптам. Подобная «сверхнормализация» объясняется сохраняющимся доминированием мажорных последовательностей РНК, которые служат своеобразной наводкой для вытравливания комплементарных молекул ДНК. Высвобождаясь после ДСН-опосредованного гидролиза комплементарной цепи ДНК, мажорные РНК могут образовывать новые гибриды с одноцепочечными молекулами кДНК, тем самым способствуя их гидролизу, и так далее.

Для последующего использования нормализованный продукт должен быть амплифицирован. Поэтому подготовка первой цепи кДНК к ДСН-нормализации всегда включает в себя лигирование адаптерных последовательностей, которые обеспечат сайты отжига олигонуклеотидных затравок (праймеров) при последующей ПЦР амплификации. Как известно, в ходе ПЦР короткие фрагменты амплифицируются более эффективно, чем длинные. Соответственно, амплификация нормализованного пула кДНК сопровождается значительными потерями длинных транскриптов. Для сохранения фракции длинных молекул кДНК при наработке библиотек, в дизайн адаптеров заложены короткие инвертированные повторы. При наработке библиотек с праймером, идентичным фрагменту инвертированного повтора, происходит преимущественная амплификация длинных молекул кДНК на фоне подавления амплификации коротких молекул [24]. Согласно полученным данным нормализация амплифицированной кДНК в целом менее эффективна, чем нормализация первой цепи кДНК, но также обеспечивает значительное снижение концентрации высоко представленных транскриптов, которое позволяет существенно повысить эффективность поиска редких генов в обстоятельствах, когда доступна только суммарная РНК.

На сегодняшний день ДСН-нормализация является наиболее простым и эффективным методом нормализации кДНК. В отличие от ряда других методов, ДСН-нормализация не включает в себя трудоемких и малоэффективных стадий физического разделения ДНК-фракций, может быть применена для нормализации как амплифицированной кДНК, так и первой цепи кДНК, обогащенных полноразмерными молекулами. В ходе нормализации не происходит изменения средней длины кДНК в образцах, и распределение клонов по длине содержащихся в них вставок в нормализованных кДНК библиотеках сходно с распределением в ненормализованных библиотеках.

Специфичное обогащение и нормализация библиотек геномной ДНК

Разработана методика обогащения минорными аллелями (в частности, мутациями, имеющими клиническое или биологическое значение) за счет селективной элиминации аллелей дикого типа в смешанных (пулированных) клинических образцах (Nuclease-Assisted Minor-Allele enrichment using Overlapping Probes, NaME-PrO) [25]. Одновременное удаление избытка ДНК дикого типа для практически неограниченного количества геномных последовательностей-мишеней выполняется до проведения амплификации. Свойства ДСН гарантируют приоритетное расщепление ДНК дикого типа независимо от геномного контекста.

Для каждой последовательности-мишени, проверяемой на наличие мутации, подбирают пару олигонуклеотидных

Таблица. Представленность различных семейств повторяющихся элементов в геномной ДНК человека до и после ДСН-нормализации

Семейства повторяющихся элементов	Контрольный образец ДНК (без нормализации)			Образец ДНК после ДСН-нормализации		
	п.н.	%	Средняя дивергенция последовательностей, %	п.н.	%	Средняя дивергенция последовательностей, %
Общее число нуклеотидов	6 643 277	100	–	6 269 460	100	–
LINE L1P	371 253	5,6	9	69 670	1,1	15
ERV-K	20 597	0,3	8	6 575	0,1	12
SSR	68 367	1	10	18 499	0,3	11
Alu	631 112	9,5	12	6 572	0,1	16
Последовательности-сателлиты	293 827	4,4	15	7 915	0,1	20
ERV1	165 461	2,5	15	105 155	1,7	17
ERV-L	323 437	4,9	19	245 039	3,9	22
LINE L1M/HAL	496 398	7,5	19	605 965	9,7	21
ДНК транспозоны	161 304	2,4	19	170 331	2,7	21
MIR	118 927	1,8	27	142 060	2,3	27
LINE L2	104 535	1,6	28	147 241	2,3	28
LINE CR1/L3	10 226	0,1	29	13 318	0,2	29
LINE L4-L5	3 508	0,05	33	3 701	0,05	30

зондов, комплементарных области-мишени на противоположных (комплементарных) цепях ДНК, с перекрытием в 10–15 нуклеотидов. Избыток зондов добавляет к фрагментированной геномной ДНК, прогретой при 98 °С. При снижении температуры до 67 °С ДНК остается одноцепочечной из-за низкой концентрации и медленной кинетики реассоциации. Зонды отжигаются; если сайт отжига содержит мутацию, из-за точечных несовпадений между последовательностью-мишенью и зондом образуются несовершенные дуплексы. При добавлении ДСН, которая предпочитает совершенные дуплексы, ДНК дикого типа расщепляется, тогда как ДНК с мутацией сохраняет свою целостность. Поскольку два зонда отжигаются на комплементарные участки, расщепляются обе цепи ДНК дикого типа. Если хотя бы одна цепь ДНК содержит мутацию, она сохраняется после обработки ДСН и становится субстратом экспоненциальной амплификации с мультиплексным обогащением по всем мутантным аллелям одновременно. Данный подход представляет собой эффективную альтернативу высокопроизводительному геномному секвенированию для обнаружения редких мутаций. Как продемонстрировали авторы, NaME-PrO обеспечивает 50–200-кратное обогащение образца по клинически значимым целевым мутациям (на примере мутаций KRAS).

В связи со стремительным развитием технологий, секвенирование нового поколения (англ. next generation sequencing, NGS), в частности, полногеномное секвенирование (англ. whole-genome sequencing), становится все более распространенным подходом в фундаментальной науке и клинической лабораторной диагностике. В геномах эукариот значительная часть ДНК состоит из высоко гомологичных повторяющихся элементов, наличие которых не только удорожает процедуру секвенирования, но и крайне затрудняет биоинформатическую обработку и интерпретацию данных.

Для решения этой проблемы предложено несколько подходов. В частности, при секвенировании геномов высших растений можно использовать выраженную склонность повторяющихся последовательностей к гиперметилированию. Yuan и соавт. (2002) использовали селективный гидролиз гиперметилированных участков

с помощью эндонуклеаз рестрикции, чувствительных к 5'-метилированию цитозина [26, 27]. Аналогичным образом Палмер и соавт. (2003) использовали метилационно-зависимую эндонуклеазу MsrBC из штамма *E. coli* K-12 при конструировании геномных библиотек кукурузы, тем самым ограничивая клонирование ДНК с высоким уровнем метилирования [28]. Такие технические решения, однако, не применимы к организмам с другими паттернами метилирования, не избирательными в отношении повторяющихся элементов.

Альтернативное решение проблемы, так называемая C0t-фильтрация, основано на кинетике ренатурации ДНК. Геномную ДНК фрагментируют, денатурируют нагреванием и охлаждают. Поскольку низкокопийные последовательности ДНК ренатурируют медленнее, чем высокоповторяющиеся, за определенное время происходит обогащение одноцепочечной фракции низкокопийными последовательностями [29, 30]. Далее двухцепочечную фракцию, содержащую повторяющиеся элементы, отделяют от одноцепочечной фракции (в классическом варианте, посредством хроматографии на гидроксипатите). Хотя C0t-фильтрация применима к любой сложной смеси неоднородно представленных последовательностей ДНК, ее использование требует точного знания кинетики реассоциации для конкретного генома.

Была исследована возможность применения ДСН-нормализации для удаления высокомолекулярных повторяющихся элементов из геномных библиотек для секвенирования. ДНК подвергают фрагментации, лигируют с адаптерными последовательностями и денатурируют прогревом. В процессе ренатурации образец обрабатывают ДСН. Уцелевшую после обработки одноцепочечную фракцию геномной ДНК, обогащенную низкокопийными последовательностями, амплифицируют с праймерами, соответствующими адаптерным последовательностям [31].

Метод был апробирован в модельном эксперименте по нормализации геномной ДНК человека перед секвенированием в системе 454 GS FLX (Roche). Чтобы повысить эффективность вычитывания нецелевых последовательностей, гибридизацию проводили в присутствии избытка Cot-1 фракции геномной ДНК

человека. Для нормализованного и контрольного образцов было получено 29 240 и 31 789 прочтений с общим покрытием 6 269 460 и 6 643 277 нуклеотидов, соответственно. Уровни представленности различных повторяющихся элементов в данных секвенирования определяли с помощью программного обеспечения Repeat-Masker (repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker). Согласно полученным результатам, содержание повторяющихся элементов при нормализации снижалось с 40% до 25%.

В таблице приведены данные о представленности последовательностей различных семейств повторяющихся элементов в нормализованном и контрольном образцах геномной ДНК человека. Отмечается значительное снижение уровней Alu, LINE L1P, ERV-K и ERV1 повторов, а также сателлитных последовательностей. В то же время некоторые семейства повторяющихся элементов проявляют устойчивость к нормализации данным методом.

Контрольные образцы (без нормализации) содержали около 10% последовательностей, совпадающих на 100–91%, и около 20% последовательностей, совпадающих на 90–71%, тогда как оставшиеся 70% последовательностей совпадали менее чем по 71% нуклеотидных положений. ДСН-нормализация воспроизводимо приводила к уменьшению содержания низкодивергентных повторяющихся элементов (идентичных на 100–91%) в 15 раз и среднедивергентных повторяющихся элементов (идентичных на 90–81%) в 2 раза. Концентрация прочих последовательностей в образцах с ДСН-нормализацией не уменьшалась. Сохранность однокопийных геномных последовательностей в процессе ДСН-нормализации была продемонстрирована методом ПЦР в реальном времени на панели из 11 уникальных генов.

На основании полученных данных был сделан вывод, что ДСН-нормализация может эффективно снижать содержание эволюционно молодых низкодивергентных повторяющихся элементов в образцах геномной ДНК. Порог отсечки можно снизить, используя более мягкие условия реассоциации (например, снизив температуру и/или повысив концентрацию катионов), хотя и с риском частичной потери уникальных последовательностей из-за усиления неспецифических взаимодействий.

Изучение микроРНК

Молекулы микроРНК все чаще рассматриваются в качестве перспективных биомаркеров для диагностики и мониторинга различных патологий, включая онкологические и аутоиммунные заболевания. Они обнаруживаются в плазме крови как в свободно

циркулирующем виде, так и в составе экзосомной фракции. МикроРНК легко выделить, они устойчивы к деградации и обладают воспроизводимыми характеристическими паттернами экспрессии.

Уникальные свойства ДСН, в частности индифферентность к РНК субстратам, могут быть использованы в разработке специфичных хемилюминесцентных и флуоресцентных сенсоров для микроРНК [32, 33]. Метод, разработанный Shen с соавт. (2015), основан на использовании биотинилированных молекул ДНК (зондов), меченных флуоресцеином и иммобилизованных на магнитных шариках. Кроме микроРНК-мишени и шариков с ДНК, в систему добавлена ДСН, которая узнает и расщепляет дуплексы, образующиеся при связывании микроРНК с зондом. В результате расщепления от магнитного носителя отделяется в раствор наружный фрагмент зонда с флуоресцентной меткой, а молекула микроРНК связывается со следующим иммобилизованным зондом, и весь цикл повторяется. Флуоресцентно-меченные продукты расщепления зондов накапливаются в растворе. После окончания инкубации частицы с иммобилизованными непрореагировавшими зондами отделяют от раствора с помощью магнита. В растворе остаются микроРНК и продукты расщепления зондов для измерения флуоресценции по конечной точке. Чувствительность системы позволяет детектировать фемтомольные концентрации микроРНК. Примечательно, что, в отличие от протоколов с использованием количественной ПЦР, амплификация сигнала осуществляется изотермически при 40 °С, что делает предложенный метод еще более привлекательным [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дуплекс-специфичная нуклеаза из гепатопанкреаса камчатского краба обладает уникальным сочетанием свойств, включая исключительную субстратную специфичность (избирательно расщепляет двухцепочечную ДНК, не затрагивая одноцепочечную ДНК или РНК), высокую оптимальную температуру катализа (60–65 °С) и термостабильность (сохраняет активность при 90 °С). Начиная с 2002 г., нуклеаза краба используется в различных молекулярно-биологических методиках, которые продолжают развиваться и постоянно обновляются. Фермент успешно применяется для решения широкого спектра задач, включая генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов (в том числе в клинических образцах), нормализацию кДНК и геномной ДНК, селективное удаление нецелевых последовательностей и исследование профилей микроРНК.

Литература

- Shagin DA, Rebrikov DV, Kozhemyako VB, Altshuler IM, Shcheglov AS, Zhulidov PA, Bogdanova EA, Staroverov DB, Rasskazov VA, Lukyanov S. A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas. *Genome Res.* 2002; 12 (12): 1935–42. DOI: 10.1101/gr.547002.
- Anisimova VE, Rebrikov DV, Shagin DA, Kozhemyako VB, Menzorova NI, Staroverov DB, Ziganshin R, Vagner LL, Rasskazov VA, Lukyanov SA, Shcheglov AS. Isolation, characterization and molecular cloning of duplex-specific nuclease from the hepatopancreas of the Kamchatka crab. *BMC Biochem.* 2008; 9: 14. DOI: 10.1186/1471-2091-9-14.
- Anisimova VE, Rebrikov DV, Zhulidov PA, Staroverov DB, Lukyanov SA, Shcheglov AS. Renaturation, activation, and practical use of recombinant duplex-specific nuclease from Kamchatka crab. *Biochemistry (Mosc).* 2006; 71: 513–9. DOI: 10.1134/s0006297906050075.
- Anisimova VE, Shcheglov AS, Bogdanova EA, Rebrikov DV, Nekrasov AN, Barsova EV, Shagin DA, Lukyanov SA. Is crab duplex-specific nuclease a member of the Serratia family of non-specific nucleases? *Gene.* 2008; 418: 41–8. DOI: 10.1016/j.gene.2008.04.005.
- Vodolazhsky DI, Mayakovskaya AV, Kubyshev AV, Aliev KA, Fomochkina II. Clinical significance of gene polymorphisms for hereditary predisposition to breast and ovarian cancer (review of

- literature). *Klin Lab Diagn.* 2021; 66 (12): 760–67. English. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-12-760-767.
6. Yan M, Fan X, Si H, Wang X, Wang Z, Wang Z, Lv X, Yin H, Jia Y, Jiang L, Xia Y, Liu Y. Association between gene polymorphism and adverse effects in cancer patients receiving docetaxel treatment: a meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2022; 89 (2): 173–181. DOI: 10.1007/s00280-021-04374-3.
 7. Haddrill PR. Developments in forensic DNA analysis. *Emerg Top Life Sci.* 2021; 5 (3): 381–393. DOI: 10.1042/ETLS20200304.
 8. Kling D, Phillips C, Kennett D, Tillmar A. Investigative genetic genealogy: Current methods, knowledge and practice. *Forensic Sci Int Genet.* 2021; 52: 102474. DOI: 10.1016/j.fsigen.2021.102474.
 9. Боринская С. А., Гурьев А. С., Орлова А. А., Санина Е. Д., Ким А. А., Гасемианродсари Ф., Ширманов В. И., Балановский О. П., Ребриков Д. В., Кошечкин А. В., Янковский Н. К. Распределение частот аллелей по полиморфизму -174G/C регуляторного участка гена интерлейкина 6 (IL6) в населении России и мира. *Генетика.* 2013; 49 (1): 113–24. DOI: 10.7868/s0016675813010037.
 10. Альтшулер И. М., Жулидов П. А., Богданова Е. А., Мудрик Н. Н., Шагин Д. А. Использование метода DSNP для изучения точечных мутаций генов человека. *Биоорганическая химия.* 2005; 31 (6): 627–36.
 11. Syvänen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet.* 2001; 2 (12): 930–42. DOI: 10.1038/35103535.
 12. Syvänen AC, Taylor GR. Approaches for analyzing human mutations and nucleotide sequence variation: a report from the Seventh International Mutation Detection meeting, 2003. *Hum Mutat.* 2004; 23 (5): 401–5. DOI: 10.1002/humu.20031.
 13. Stewart CA, Horton R, Allcock RJ, Ashurst JL, Atrazhev AM, Coggill P, Dunham I, Forbes S, Halls K, Howson JM, Humphray SJ, Hunt S, Mungall AJ, Osoegawa K, Palmer S, Roberts AN, Rogers J, Sims S, Wang Y, Wilming LG, Elliott JF, de Jong PJ, Sawcer S, Todd JA, Trowsdale J, Beck S. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Res.* 2004; 14 (6): 1176–87. DOI: 10.1101/gr.2188104.
 14. Mu DQ, Peng YS, Xu QJ. Values of mutations of K-ras oncogene at codon 12 in detection of pancreatic cancer: 15-year experience. *World J Gastroenterol.* 2004; 10 (4): 471–5. DOI: 10.3748/wjg.v10.i4.471.
 15. Itabashi T, Maesawa C, Uchiyama M, Higuchi T, Masuda T. Quantitative detection of mutant alleles of the K-ras gene with minor groove binder-conjugated fluorogenic DNA probes. *Int J Oncol.* 2004; 24 (3): 687–96.
 16. Young BD, Anderson MLM. Quantitative analysis of solution hybridisation. In: Hames BD, Higgins SJ, eds. *Nucleic acid hybridisation: a practical approach.* Pp. 47–71. Oxford: IRL Press Limited, 1985.
 17. Ko MS. An 'equalized cDNA library' by the reassociation of short double-stranded cDNAs. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18 (19): 5705–11. DOI: 10.1093/nar/18.19.5705.
 18. Coche T, Dewez M. Reducing bias in cDNA sequence representation by molecular selection. *Nucleic Acids Res.* 1994 Oct 25; 22 (21): 4545–6. DOI: 10.1093/nar/22.21.4545.
 19. Carninci P, Shibata Y, Hayatsu N, Sugahara Y, Shibata K, Itoh M, Konno H, Okazaki Y, Muramatsu M, Hayashizaki Y. Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes. *Genome Res.* 2000; 10 (10): 1617–30. DOI: 10.1101/gr.145100.
 20. Soares MB, Ronaldo MF, Jelene P, Su L, Lawton L, Efstratiadis A. Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91 (20): 9228–32. DOI: 10.1073/pnas.91.20.9228.
 21. Sasaki YF, Ayusawa D, Oishi M. Construction of a normalized cDNA library by introduction of a semi-solid mRNA-cDNA hybridization system. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22 (6): 987–92. DOI: 10.1093/nar/22.6.987.
 22. Лукьянов К. А., Гурская Н. Г., Матц М. В., Хаспеков Г. Л., Дьяченко Л. Б., Ченчик А. А., Ильевич-Стучков С. Г., Лукьянов С. А. Метод получения нормализованных библиотек кДНК, основанный на эффекте супрессии полимеразной цепной реакции. *Биоорганическая химия.* 1996; 22 (9): 686–90.
 23. Zhulidov PA, Bogdanova EA, Shcheglov AS, Vagner LL, Khaspekov GL, Kozhemyako VB, Matz MV, Meleshkevitch E, Moroz LL, Lukyanov SA, Shagin DA. Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32 (3): e37. DOI: 10.1093/nar/gnh031.
 24. Shagin DA, Lukyanov KA, Vagner LL, Matz MV. Regulation of average length of complex PCR product. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27 (18): e23. DOI: 10.1093/nar/27.18.e23.
 25. Song C, Liu Y, Fontana R, Makrigiorgos A, Mamon H, Kulke MH, Makrigiorgos GM. Elimination of unaltered DNA in mixed clinical samples via nuclease-assisted minor-allele enrichment. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44 (19): e146. DOI: 10.1093/nar/gkw650.
 26. Yuan Y, SanMiguel PJ, Bennetzen JL. Methylation-spanning linker libraries link gene-rich regions and identify epigenetic boundaries in Zea mays. *Genome Res.* 2002; 12 (9): 1345–9. DOI: 10.1101/gr.185902.
 27. Emberton J, Ma J, Yuan Y, SanMiguel P, Bennetzen JL. Gene enrichment in maize with hypomethylated partial restriction (HMPPR) libraries. *Genome Res.* 2005; 15 (10): 1441–6. DOI: 10.1101/gr.3362105.
 28. Palmer LE, Rabinowicz PD, O'Shaughnessy AL, Balija VS, Nascimento LU, Dike S, de la Bastide M, Martienssen RA, McCombie WR. Maize genome sequencing by methylation filtration. *Science.* 2003; 302 (5653): 2115–7. DOI: 10.1126/science.1091265.
 29. Peterson DG, Schulze SR, Sciara EB, Lee SA, Bowers JE, Nagel A, Jiang N, Tibbitts DC, Wessler SR, Paterson AH. Integration of Cot analysis, DNA cloning, and high-throughput sequencing facilitates genome characterization and gene discovery. *Genome Res.* 2002; 12 (5): 795–807. DOI: 10.1101/gr.226102.
 30. Yuan Y, SanMiguel PJ, Bennetzen JL. High-Cot sequence analysis of the maize genome. *Plant J.* 2003; 34 (2): 249–55. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2003.01716.x.
 31. Shagina I, Bogdanova E, Mamedov IZ, Lebedev Y, Lukyanov S, Shagin D. Normalization of genomic DNA using duplex-specific nuclease. *Biotechniques.* 2010; 48 (6): 455–9. DOI: 10.2144/000113422.
 32. Deng H, Ren Y, Shen W, Gao Z. An ultrasensitive homogeneous chemiluminescent assay for microRNAs. *Chem Commun (Camb).* 2013; 49 (82): 9401–3. DOI: 10.1039/c3cc44824j.
 33. Shen W, Yeo KH, Gao Z. A simple and highly sensitive fluorescence assay for microRNAs. *Analyst.* 2015; 140 (6): 1932–8. DOI: 10.1039/c4an02146k.

References

1. Shagin DA, Rebrikov DV, Kozhemyako VB, Altshuler IM, Shcheglov AS, Zhulidov PA, Bogdanova EA, Staroverov DB, Rasskazov VA, Lukyanov S. A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas. *Genome Res.* 2002; 12 (12): 1935–42. DOI: 10.1101/gr.547002.
2. Anisimova VE, Rebrikov DV, Shagin DA, Kozhemyako VB, Menzorova NI, Staroverov DB, Ziganshin R, Vagner LL, Rasskazov VA, Lukyanov SA, Shcheglov AS. Isolation, characterization and molecular cloning of duplex-specific nuclease from the hepatopancreas of the Kamchatka crab. *BMC Biochem.* 2008; 9: 14. DOI: 10.1186/1471-2091-9-14.
3. Anisimova VE, Rebrikov DV, Zhulidov PA, Staroverov DB, Lukyanov SA, Shcheglov AS. Renaturation, activation, and practical use of recombinant duplex-specific nuclease from Kamchatka crab. *Biochemistry (Mosc).* 2006; 71: 513–9. DOI: 10.1134/s0006297006050075.
4. Anisimova VE, Shcheglov AS, Bogdanova EA, Rebrikov DV, Nekrasov AN, Barsova EV, Shagin DA, Lukyanov SA. Is crab

- duplex-specific nuclease a member of the Serratia family of non-specific nucleases? *Gene*. 2008; 418: 41–8. DOI: 10.1016/j.gene.2008.04.005.
5. Vodolazhsky DI, Mayakovskaya AV, Kubyshkin AV, Aliev KA, Fomochkina II. Clinical significance of gene polymorphisms for hereditary predisposition to breast and ovarian cancer (review of literature). *Klin Lab Diagn*. 2021; 66 (12): 760–67. English. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-12-760-767.
 6. Yan M, Fan X, Si H, Wang X, Wang Z, Wang Z, Lv X, Yin H, Jia Y, Jiang L, Xia Y, Liu Y. Association between gene polymorphism and adverse effects in cancer patients receiving docetaxel treatment: a meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2022; 89 (2): 173–181. DOI: 10.1007/s00280-021-04374-3.
 7. Haddrill PR. Developments in forensic DNA analysis. *Emerg Top Life Sci*. 2021; 5 (3): 381–393. DOI: 10.1042/ETLS20200304.
 8. Kling D, Phillips C, Kennett D, Tillmar A. Investigative genetic genealogy: Current methods, knowledge and practice. *Forensic Sci Int Genet*. 2021; 52: 102474. DOI: 10.1016/j.fsigen.2021.102474.
 9. Borinskaya SA, Gureev AS, Orlova AA, Sanina ED, Kim AA, Gasemianrodsari F, Shirmanov VI, Balanovsky OP, Rebrikov DV, Koshechkin AV, Yankovsky NK. [Allele frequency distributions of -174G/C polymorphism in regulatory region of interleukin 6 gene (IL6) in Russian and worldwide populations]. *Genetika*. 2013; 49 (1): 113–24. Russian. DOI: 10.7868/s0016675813010037.
 10. Al'tshuler IM, Zhulidov PA, Bogdanova EA, Mudrik NN, Shagin DA. [Application of the duplex-specific nuclease preference method to the analysis of point mutations in human genes]. *Bioorg Khim*. 2005; 31 (6): 627–36. Russian.
 11. Syvänen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet*. 2001; 2 (12): 930–42. DOI: 10.1038/35103535.
 12. Syvänen AC, Taylor GR. Approaches for analyzing human mutations and nucleotide sequence variation: a report from the Seventh International Mutation Detection meeting, 2003. *Hum Mutat*. 2004; 23 (5): 401–5. DOI: 10.1002/humu.20031.
 13. Stewart CA, Horton R, Allcock RJ, Ashurst JL, Atrazhev AM, Coghill P, Dunham I, Forbes S, Halls K, Howson JM, Humphray SJ, Hunt S, Mungall AJ, Osoegawa K, Palmer S, Roberts AN, Rogers J, Sims S, Wang Y, Wilming LG, Elliott JF, de Jong PJ, Sawcer S, Todd JA, Trowsdale J, Beck S. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Res*. 2004; 14 (6): 1176–87. DOI: 10.1101/gr.2188104.
 14. Mu DQ, Peng YS, Xu QJ. Values of mutations of K-ras oncogene at codon 12 in detection of pancreatic cancer: 15-year experience. *World J Gastroenterol*. 2004; 10 (4): 471–5. DOI: 10.3748/wjg.v10.i4.471.
 15. Itabashi T, Maesawa C, Uchiyama M, Higuchi T, Masuda T. Quantitative detection of mutant alleles of the K-ras gene with minor groove binder-conjugated fluorogenic DNA probes. *Int J Oncol*. 2004; 24 (3): 687–96.
 16. Young BD, Anderson MLM. Quantitative analysis of solution hybridisation. In: Hames BD, Higgins SJ, eds. *Nucleic acid hybridisation: a practical approach*. Pp. 47–71. Oxford: IRL Press Limited, 1985.
 17. Ko MS. An 'equalized cDNA library' by the reassociation of short double-stranded cDNAs. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18 (19): 5705–11. DOI: 10.1093/nar/18.19.5705.
 18. Coche T, Dewez M. Reducing bias in cDNA sequence representation by molecular selection. *Nucleic Acids Res*. 1994 Oct 25; 22 (21): 4545–6. DOI: 10.1093/nar/22.21.4545.
 19. Carninci P, Shibata Y, Hayatsu N, Sugahara Y, Shibata K, Itoh M, Konno H, Okazaki Y, Muramatsu M, Hayashizaki Y. Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes. *Genome Res*. 2000; 10 (10): 1617–30. DOI: 10.1101/gr.145100.
 20. Soares MB, Bonaldo MF, Jelene P, Su L, Lawton L, Efstratiadis A. Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91 (20): 9228–32. DOI: 10.1073/pnas.91.20.9228.
 21. Sasaki YF, Ayusawa D, Oishi M. Construction of a normalized cDNA library by introduction of a semi-solid mRNA-cDNA hybridization system. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22 (6): 987–92. DOI: 10.1093/nar/22.6.987.
 22. Luk'ianov KA, Gurskaia NG, Matts MV, Khaspekov GL, D'iachenko LB, Chenchik AA, Il'evich-Stuchkov SG, Luk'ianov SA. Metod poluchenii normalizovannykh bibliotek kDNK, osnovannyi na éffekte supressii polimeraznoï tseproï reaksii [A method for obtaining the normalized cDNA libraries based on the effect of suppression of polymerase chain reaction]. *Bioorg Khim*. 1996; 22 (9): 686–90. Russian.
 23. Zhulidov PA, Bogdanova EA, Shcheglov AS, Vagner LL, Khaspekov GL, Kozhemyako VB, Matz MV, Meleshkevitch E, Moroz LL, Lukyanov SA, Shagin DA. Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32 (3): e37. DOI: 10.1093/nar/gnh031.
 24. Shagin DA, Lukyanov KA, Vagner LL, Matz MV. Regulation of average length of complex PCR product. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27 (18): e23. DOI: 10.1093/nar/27.18.e23.
 25. Song C, Liu Y, Fontana R, Makrigiorgos A, Mamon H, Kulke MH, Makrigiorgos GM. Elimination of unaltered DNA in mixed clinical samples via nuclease-assisted minor-allele enrichment. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44 (19): e146. DOI: 10.1093/nar/gkw650.
 26. Yuan Y, SanMiguel PJ, Bennetzen JL. Methylation-spanning linker libraries link gene-rich regions and identify epigenetic boundaries in *Zea mays*. *Genome Res*. 2002; 12 (9): 1345–9. DOI: 10.1101/gr.185902.
 27. Emberton J, Ma J, Yuan Y, SanMiguel P, Bennetzen JL. Gene enrichment in maize with hypomethylated partial restriction (HMPCR) libraries. *Genome Res*. 2005; 15 (10): 1441–6. DOI: 10.1101/gr.3362105.
 28. Palmer LE, Rabinowicz PD, O'Shaughnessy AL, Balija VS, Nascimento LU, Dike S, de la Bastide M, Martienssen RA, McCombie WR. Maize genome sequencing by methylation filtration. *Science*. 2003; 302 (5653): 2115–7. DOI: 10.1126/science.1091265.
 29. Peterson DG, Schulze SR, Sciara EB, Lee SA, Bowers JE, Nagel A, Jiang N, Tibbitts DC, Wessler SR, Paterson AH. Integration of Cot analysis, DNA cloning, and high-throughput sequencing facilitates genome characterization and gene discovery. *Genome Res*. 2002; 12 (5): 795–807. DOI: 10.1101/gr.226102.
 30. Yuan Y, SanMiguel PJ, Bennetzen JL. High-Cot sequence analysis of the maize genome. *Plant J*. 2003; 34 (2): 249–55. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2003.01716.x.
 31. Shagina I, Bogdanova E, Mamedov IZ, Lebedev Y, Lukyanov S, Shagin D. Normalization of genomic DNA using duplex-specific nuclease. *Biotechniques*. 2010; 48 (6): 455–9. DOI: 10.2144/000113422.
 32. Deng H, Ren Y, Shen W, Gao Z. An ultrasensitive homogeneous chemiluminescent assay for microRNAs. *Chem Commun (Camb)*. 2013; 49 (82): 9401–3. DOI: 10.1039/c3cc44824j.
 33. Shen W, Yeo KH, Gao Z. A simple and highly sensitive fluorescence assay for microRNAs. *Analyst*. 2015; 140 (6): 1932–8. DOI: 10.1039/c4an02146k.