На правах рукописи

Башмакова Евгения Евгеньевна

ВЫЯВЛЕНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ Ca^{2+}- РЕГУЛИРУЕМОГО ФОТОПРОТЕИНА ОБЕЛИНА

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский федеральный университет» и в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) – обособленном подразделении Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук (ИБФ СО РАН)

Научный руководитель: **Франк Людмила Алексеевна,**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты**:** **Тикунова Нина Викторовна,**
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, заведующая лабораторией молекулярной микробиологии

Малиновская Наталия Александровна,
доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

Защита состоится «21» сентября 2017 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 003.075.04 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБФ СО РАН и на сайте: www.ibp.ru

Автореферат разослан «___»_____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук Есимбекова Е.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Важнейшей задачей современной биотехнологии является создание новых высокоспецифичных и чувствительных аналитических систем для применения в медицине, генетике, экологии, микробиологии и других смежных областях, поскольку с развитием этих наук спектр диагностически важных мишеней постоянно расширяется.

Аналитические методы, применяемые в медицинской генетике, можно условно разделить на методы генетического анализа, направленные на выявление известных клинически значимых вариаций ДНК, и методы, направленные на поиск новых вариантов и установление их значимости. Однонуклеотидный полиморфизм (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) является наиболее распространенным типом генетической изменчивости. Эти вариации ДНК относительно равномерно распределены по всему геному, как в кодирующих, так и в регуляторных областях генов, и могут приводить к изменению структуры и функции белков, а также влиять на экспрессию затронутого гена.

В настоящее время существует множество методов по поиску новых SNP и выявлению их ассоциации с различными заболеваниями с использованием высокотехнологичных подходов геномного секвенирования с высокой пропускной способностью (Invader анализ, Perlegen Genotyping Platform, Affymetrix GeneChips, Illumina's Infinium Beadchips). В то же время для рутинного скринига SNP с известной локализацией и установленной значимостью используют более простые и недорогие подходы, такие как TaqMan анализ, пиросеквенирование, аллель-специфическая гибридизация. Многие из этих систем основаны на регистрации светового сигнала и используют флуоресцентные или хемилюминесцентные репортеры. В связи с этим особый интерес представляет далеко не исчерпанный потенциал аналитических систем с использованием биолюминесцентных репортеров. Высокий квантовый выход биолюминесцентых реакций, высокое отношение сигнал-шум, доступность ключевых репортерных элементов – люцифераз и люциферинов, а также наличие современных высокочувствительных фотометров различного формата определяют перспективность таких разработок.

Одним из направлений исследований лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН является разработка методов молекулярного микроанализа на основе биолюминесцентных белков особого типа – Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов. Эти белки представляют собой стабильные нековалентные комплексы апобелка (одноцепочечный полипептид с молекулярной массой около 20 кДа) и предокисленного субстрата – пероксицелентеразина. Присоединение ионов кальция вызывает декарбоксилирование субстрата, которое сопровождается выделением кванта голубого света (максимумы биолюминесценции находятся в диапазоне от 460 до 480 нм, в зависимости от организма, из которого выделен белок).

В настоящее время доступны рекомбинантные аналоги этих белков и интенсивно разрабатываются различные аналитические системы *in vitro* и *in vivo* с использованием фотопротеинов в качестве высокочувствительных репортеров. В том числе в литературе имеются единичные данные о применении Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов для выявления однонуклеотидных полиморфизмов в различных генах.

Для одного из фотопротеинов – обелина гидроидного полипа *Obelia longissima*, сайт-направленным мутагенезом аминокислот целентеразин-связывающей области белка получена группа мутантных вариантов с измененными биолюминесцентными свойствами. Например, вариант с заменами W92F,H22E, с максимумом излучения при 387 нм и вариант с заменой Y138F с максимумом излучения при 493 нм, названные цветными обелинами (фиолетовым и зеленым, соответственно) обладают еще и разными кинетиками сигнала (k_d = 0,6 c^{-1} и 6,1 c^{-1}, соответственно). На основе этих белков как репортеров был разработан одновременный иммуноанализ двух мишеней в одном образце. При этом

биолюминесценция обоих репортеров инициируется единичным впрыском раствора $CaCl_2$, а разделение сигналов осуществляется с помощью спектрального и временно́го разрешения.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлась разработка способа одновременного выявления нескольких однонуклеотидных полиморфизмов на основе цветных вариантов Ca^{2+}-регулируемого фотопротеина обелина и демонстрация его потенциальных возможностей для выявления клинически значимых мутаций. Для выполнения данного исследования требовалось решить следующие экспериментальные задачи:

1. Оптимизировать способ химического синтеза биоспецифических коньюгатов цветных вариантов обелина – ключевых репортерных молекул при выявлении SNP биолюминесцентным способом.
2. Разработать биолюминесцентный способ одновременного выявления нескольких полиморфизмов, локализованных в разных участках генома, на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции.
3. Показать пригодность предлагаемого способа SNP-генотипирования на примере исследования полиморфизмов гена MC1R у пациентов с диагнозом меланома и здоровых доноров.

Научная новизна и практическая значимость.

Представленная работа посвящена разработке биолюминесцентного способа выявления однонуклеотидных полиморфизмов ДНК человека с использованием производных Ca^{2+}-активируемого фотопротеина обелина в качестве репортеров.

В ходе выполнения данной работы сайт-направленным мутагенезом мутантных форм обелина с заменами W92F,H22E и Y138F впервые получены варианты с уникальным остатком цистеина, доступным для химических модификаций. Использование этих вариантов существенно упрощает синтез конъюгатов с биоспецифическими молекулами и повышает их выход, обеспечивая доступность цветных фотопротеиновых меток – ключевых элементов биолюминесцентного анализа.

Для одновременной детекции нескольких полиморфизмов, связанных с риском схожих патологий, разработан биолюминесцентный способ анализа на основе мультиплексной ПЦР и показана его применимость для исследования точковых мутаций, локализованных как на разных хромосомах, так и на разных участках одной хромосомы.

Проведенное биомедицинское исследование по распространенности и ассоциациям ряда полиморфизмов гена MC1R у пациентов с диагнозом меланома и здоровых доноров демонстрирует перспективность и надежность разработанного способа генотипирования и позволяет сделать заключение о возможности его практического использования в медицинской диагностике.

Все результаты данной работы получены впервые и могут быть использованы для создания отечественных высокоэффективных и чувствительных биолюминесцентных методов для выявления известных однонуклеотидных полиморфизмов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Получены мутантные варианты цветных обелинов с уникальными цистеиновыми остатками и разработан сайт-направленный синтез их коньюгатов с биоспецифическими молекулами, обеспечивающий высокий выход целевых продуктов (до 70%).
2. Разработан способ одновременного выявления нескольких однонуклеотидных полиморфизмов на основе мультиплексной ПЦР и универсальных биолюминесцентных репортеров – коньюгатов цветных обелинов с биоспецифическими молекулами.

3. Установлены распространенность полиморфизмов гена MC1R (R151C, I155T, R160W, R163Q, D294H) среди населения Красноярского края, их взаимосвязь с риском развития меланомы и рядом клинико-морфологических характеристик заболевания.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы докладывались на международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых СФУ (Россия, Красноярск, 2014), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2014» (Москва, 2014), Международной конференции и выставке по аналитическим и биоаналитическим методам (Китай, Пекин, 2014), Международной научной конференции молодых ученых биотехнологов, вирусологов, молекулярных биологов, Open Bio, (Россия, Кольцово, 2015), Международном симпозиуме по биолюминесценции и хемилюминесценции (Япония, Цукуба, 2016), конференциях молодых ученых ИБФ СО РАН и КНЦ СО РАН (Россия, Красноярск, 2015, 2017).

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского научного фонда (проекты № 14-14-01119 и 14-35-00107), а также мегагранта «Биолюминесцентные биотехнологии» по Постановлению Правительства РФ № 220 от 9 апреля 2010 г. (договор № 11.G34.31.0058, 2011-2013 гг.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 3 статьи в журналах, входящий в перечень ведущих рецензируемых научных изданий и журналов, рекомендуемых ВАК и 5 публикаций в сборниках докладов научных конференций.

Структура и объем работы. Работа изложена на 116 страницах машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, описание методов исследования, изложение результатов исследования, заключение, выводы и список цитируемой литературы (155 источников). Диссертационная работа содержит 16 таблиц и 21 рисунок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов цельной крови, где мутации генов FV (G1691A, rs6025), FII (G20210A, rs1799963), MTHFR (C677T, rs1801133), и FVII (G10976A, rs6046) определены методом ПЦР в реальном времени, были предоставлены Красноярским филиалом гематологического научного центра Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Образцы крови здоровых доноров были предоставлены Красноярским краевым центром крови № 1. Образцы крови пациентов с диагнозом меланома предоставлены Красноярским краевым клинический онкологическим диспансером им. А.И. Крыжановского. Данное исследование было одобрено локальным этическим комитетом, информированное согласие получено от всех пациентов, принявших участие в исследовании.

ДНК выделяли из лейкоцитов цельной крови набором «БиоСилика» (Россия), концентрацию выделенной ДНК определяли денситометрически по картинке электрофореза в 1% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, с помощью программного обеспечения AlphaEasyTM (Alpha Innotech Corporation, США).

Клонирование и получение экспрессионных плазмид для обелина *Obelia longissima* и его цветных вариантов было выполнено старшим научным сотрудником лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН канд. биол. наук Марковой С.В.

Сайт-направленный мутагенез вариантов обелина проводили методом ПЦР с помощью набора QuickChange site-directed mutagenesis (Stratagene, США) в соответствии с протоколом изготовителя

Трансформированные клетки *E. coli* (штаммы XL1-Blue и BL21(DE3) Codon Plus (RIPL)) культивировали в LB-среде, содержащей ампициллин. Индукцию осуществляли добавлением ИПТГ.

Выделение и очистку рекомбинантного обелина и его мутантных форм проводили по способу, разработанному в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН для рекомбинантного обелина дикого типа с небольшими модификациями. Апообелин выделяли из телец включений, проводили рефолдинг с субстратом целентеразином и очищали с помощью ионообменной хроматографии.

Биолюминесцентный сигнал фотопротеинов и кальций-независимую люминесценцию измеряли с помощью кюветного люминометра (модель БЛМ 8802, СКБ Наука, Красноярск). Удельную биолюминесцентную активность мутантных вариантов обелина определяли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 Multimode Reader (Berthold, Германия). Спектры биолюминесценции измеряли на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, США). Все спектры были корректированы на чувствительность ФЭУ к различным длинам волн с помощью программного обеспечения прибора.

Участок гена, кодирующий меланокортиновый рецептор первого типа, синтезировали ПЦР с использованием образца геномной ДНК человека, выделенной из лейкоцитов цельной крови. Полученный фрагмент MC1R клонировали в вектор pBluescript SK+ (Stratagene, США), трансформировали в компетентные клетки *E.coli* XL1-Blue для анализа нуклеотидной последовательности. Контрольный образец ДНК, содержащий однонуклеотидные замены C451T (rs1805007), C478T (rs1805008) и G880C (rs1805009), получали путем последовательного сайт-направленного мутагенеза полученной плазмиды, используя набор QuikChange SiteDirected Mutagenesis Kit (Stratagene, США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета Microsoft Excel для Windows 8.1, статистического программного обеспечения STATISTICA 12 (Statsoft, Россия) и Comprehensive Meta-Analysis (Biostat Inc, США). Статистическую обработку данных в исследовании случай-контроль проводили с использованием программы «Ген Эксперт» (http://www.gen-exp.ru/calculator_or.php).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение мутантных вариантов Ca^{2+}-регулируемого фотопротеина обелина для сайт-специфического конъюгирования

Задачей нашего исследования было получить варианты цветных обелинов с уникальными цистеиновыми остатками, пригодными для сайт-направленного коньюгирования с биоспецифическими молекулами. Цветными обелинами здесь и далее мы называем фиолетовый вариант, с заменами W92F,H22E испускающий быстрый (k_d = 0,6 c^{-1}), сдвинутый в коротковолновую область сигнал (λ_{max} = 387 нм) и зеленый вариант с заменой Y138F с медленным (k_d = 6,1 c^{-1}), смещенным в длинноволновую область сигналом (λ_{max} = 493 нм).

Ранее в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН был разработан способ химического синтеза конъюгатов обелина с биоспецифическими молекулами с использованием гетеробифункционального реагента сукцинимидил- (N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилата (SMCC), (Рисунок 1а). Он включал в себя три этапа: 1) введение дополнительных SH-групп в молекулу обелина с использованием реагента Траута (2-иминотиолана); 2) активация биоспецифической молекулы (антитело, антиген,

олигонуклеотид и т.д.) реакцией с SMCC; 3) взаимодействие SH-обелина и SMCC-активированной биоспецифической молекулы.

Каждый этап сопровождался частичной инактивацией обелина (падение биолюминесцентной активности иногда достигало 40%) и потерями при хроматографической очистке продуктов реакции. Для получаемых при этом конъюгатов характерна непредсказуемая гетерогенность, неизбежная при химическом синтезе. Выход целевых соединений был низок и составлял от 10 до 35%.

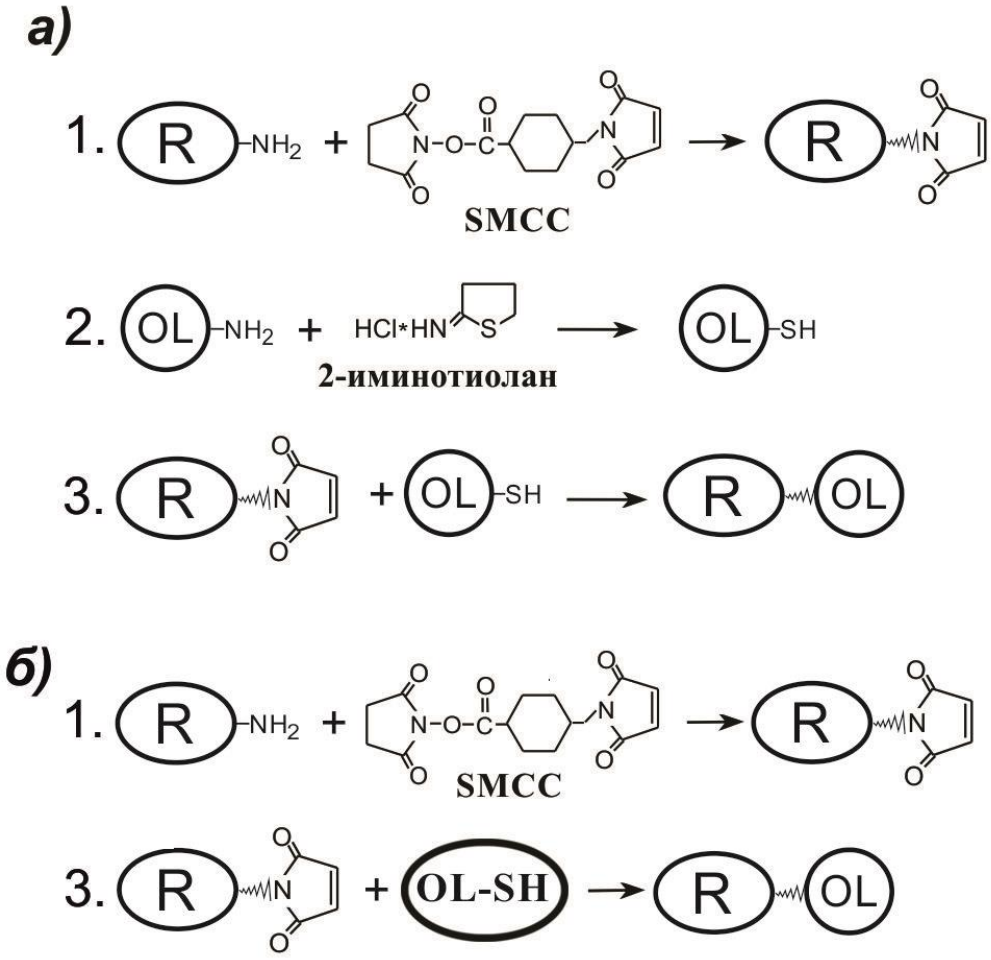

Рисунок 1 – Химический синтез конъюгатов обелина с биоспецифическими молекулами: а) трехэтапный синтез; б) двухэтапный синтез, предложенный в данной работе. OL – обелин, R – биоспецифическая молекула, OL-SH– вариант обелина с уникальным остатком цистеина.

Получение цветных обелинов с уникальным доступным для синтеза остатком цистеина проводили сайт-направленным мутагенезом следующих аминокислот: Ala-6, Asp-12, расположенных на свободном NH_2-конце молекулы, и Ser-44, Val-66, экспонированных в окружающую среду (Рисунок 2).

Для контроля те же мутации были проведены в молекуле обелина дикого типа (WT).

Все белки были получены путем экспрессии в рекомбинантных клетках *E.coli* и выделены в высокоочищенном виде (по данным SDS гель-электрофореза) с помощью технологии, разработанной для рекомбинантного обелина WT. Далее были изучены их основные свойства.

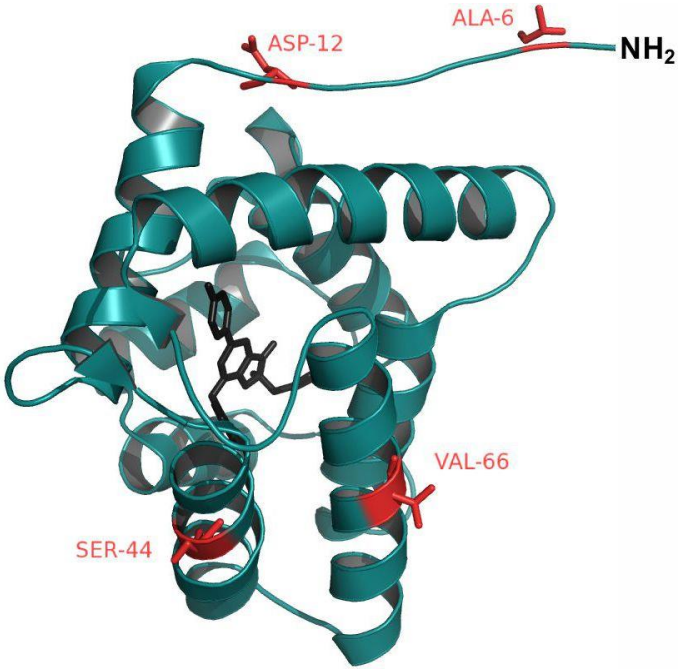

Рисунок 2 – Молекула обелина с указанием аминокислот, замененных на цистеин.

В таблице 1 представлены биолюминесцентные характеристики белков: активность относительно обелина дикого типа (WT), спектры биолюминесценции, константа спада биолюминесцентного сигнала, а также стабильность фотопротеинов, которую оценивали по соотношению между Ca^{2+}-независимой биолюминесценцией и Ca^{2+}-индуцированной биолюминесценцией ($I_{Ca\text{-}free}/I_{Ca}$).

Таблица 1 – Физико-химические свойства мутантных форм обелина

Вариант обелина	Активность, % от WT	Биолюминесценция, λ_{max}/плечо (нм)	Константа спада, $с^{-1}$	$I_{Ca\text{-}free}/I_{Ca}$ x 10^{-6} (0,1 мг $мл^{-1}$)
WT	100	482/400	9,6	0,9
A6C	100	482/400	9,8	0,38
D12C	96	482/400	9,8	0,67
S44C	63	482/400	10,9	0,94
V66C	98	482/400	9,1	1,7
W92F,H22E	10	387	6,1	0,46
W92F,H22E,A6C	1,2	387	6,9	4
W92F,H22E,D12C	9,3	387	7,4	1,3
W92F,H22E,S44C	3,9	387	6,8	4,8
W92F,H22E,V66C	5	387	7	1,5
Y138F	68	493/400	0,6	16
Y138F,A6C	66,7	493/400	0,55	10,4
Y138F,D12C	15,5	493/400	0,59	15,4
Y138F,S44C	7	493/400	0,14	32
Y138F,V66C	27,6	493/400	0,5	33,5

Из таблицы 1 и рисунка 3 видно, что мутантные варианты обелина дикого типа, кроме варианта с заменой S44C, продемонстрировали биолюминесцентные свойства,

близкие исходному белку. Это означает, что выбор аминокислот для замены сделан корректно: произведенные мутации не повлияли на основные свойства фотопротеина.

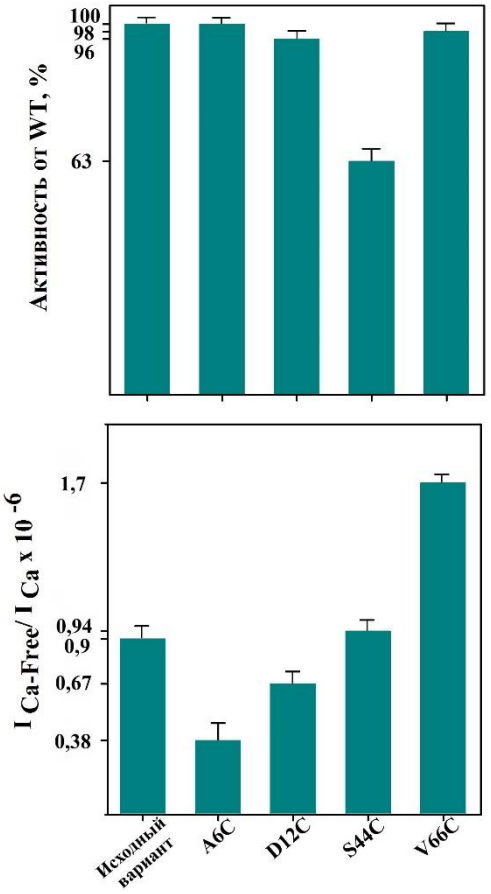

Рисунок 3 – Сравнение биолюминесцентной активности и стабильности мутантов обелина дикого типа с введенными цистеиновыми заменами.

Аналогичные замены аминокислот в цветных обелинах оказали существенное негативное влияние на активность и стабильность этих белков. Замены аминокислот второй и третьей спирали (S44C или V66C) неожиданно вызвали падение биолюминесцентной активности всех вариантов обелина и стабильности в случае зеленого обелина Y138F. Мутация D12C вызвала снижение биолюминесцентной активности зеленого обелина Y138F почти в 5 раз, а мутация A6C вызвала уменьшение активности фиолетового обелина W92F,H22E в 10 раз. В случае фиолетового мутанта только вариант W92F,H22E,D12C продемонстрировал биолюминесцентные свойства, близкие к исходному W92F,H22E обелину, а наиболее активный зеленый обелин был получен при замене A6C (Рисунок 4).

Показателем стабильности фотопротеинов служило значение соотношения Ca^{2+}-независимой биолюминесценции (возникает в результате теплового движения молекулы) к Ca^{2+}-индуцированной биолюминесценции ($I_{Ca\text{-}free}/I_{Ca}$), зарегистрированных в одинаковых условиях (концентрация белка 0,1 мг/мл в 0,1 М Трис-HCl pH 8,8, 5 мМ ЭДТА, комн. температура).

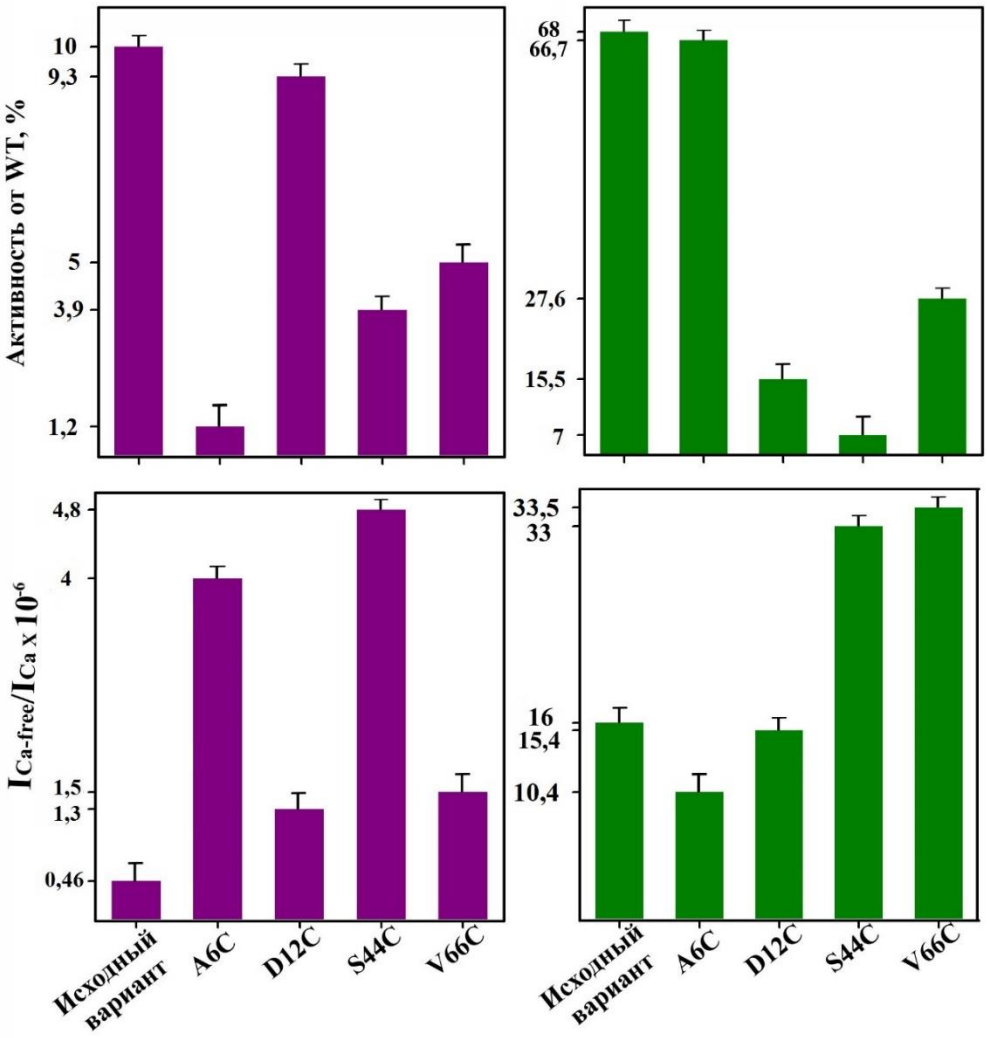

Рисунок 4 – Сравнение биолюминесцентной активности и стабильности цветных вариантов обелина с введенными цистеиновыми заменами: W92F,H22E (слева) и Y138F (справа).

Обелин, как и другие Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины кишечнополостных, является стабильной молекулой и величина этого свечения в миллион раз меньше чем свечение, инициируемое ионами Ca^{2+}. Тем не менее, при сравнении, из полученных нами вариантов наиболее устойчивыми оказались фиолетовый вариант W92F,H22E,D12C и зеленый вариант Y138F,A6C, обладающие наименьшими значениями этого параметра (Рисунок 4).

Во всех случаях произведенных замен выбранных аминокислот на цистеин не наблюдалось значительных изменений в кинетике и спектрах биолюминесценции, очевидно, потому что аминокислоты, подвергшиеся мутации расположены далеко от активного сайта белка (Рисунок 5).

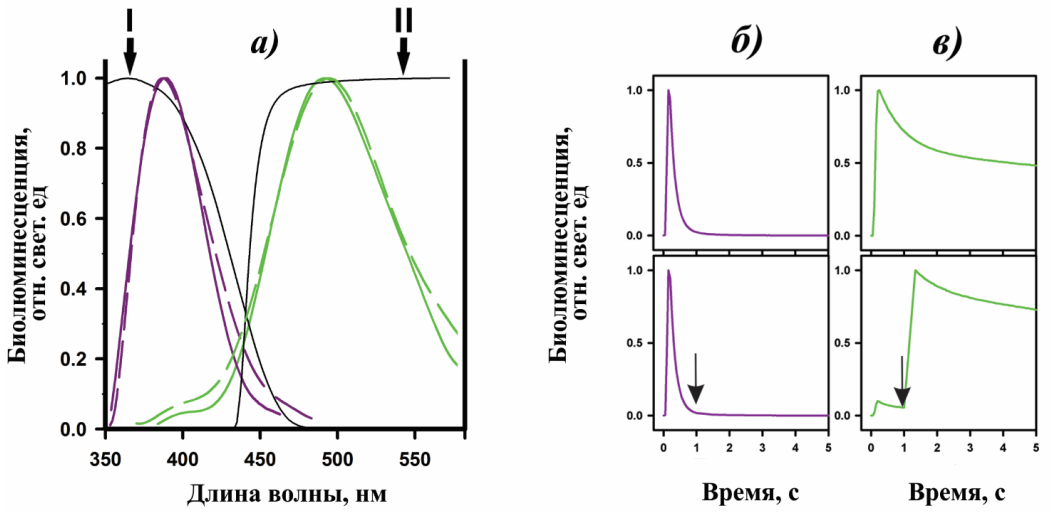

Рисунок 5 – ***а)*** *Спектры биолюминесценции W92F,H22E,D12C и W92F,H22E (фиолетовая сплошная и пунктирная линии, соответственно), Y138F,A6C и Y138F (зеленые сплошная и пунктирные линии, соответственно). Черными линиями показаны спектры пропускания оптических фильтров ФС6 (I) и ЖС16 (II).* ***б), в)*** *Биолюминесцентные сигналы цветных вариантов обелина (сверху) и их пропускание последовательно через фильтр I и фильтр II (снизу). Стрелками обозначен момент смены фильтров.*

Таким образом, среди цветных вариантов обелина с введенными (уникальными) остатками цистеина, наиболее подходящей для применения в качестве репортеров в анализе оказалась пара W92F,H22E,D12C и Y138F,A6C.

Конъюгаты этих белков с биоспецифическими молекулами – олигонуклеотидами и антителами, были получены двухэтапным способом синтеза по схеме, показанной на рисунке 1б).

В таблице 2 представлены выходы различных конъюгатов обелина дикого типа и его цветных вариантов, имеющих уникальные цистеиновые остатки, с различными биоспецифическими молекулами.

Выход определяли относительно специфических молекул, поскольку обелины в реакционных смесях использовали в 5-10-кратном молярном избытке. Средний выход конъюгатов обелина с олигонуклеотидами (разной длины, от 20 до 57 н.о.) составил 67%. В случае традиционного химического введения SH-группы с использованием реагента Траута средний выход этих конъюгатов был существенно ниже и составлял 10-15%. При синтезе конъюгатов обелина с иммуноглобулинами и стрептавидином средний выход составил 65%, в то время как при полностью химическом синтезе, применяемом ранее, выход не превышал 25%.

Таким образом полученные нами варианты цветных обелинов с уникальными цистеиновыми остатками позволили упростить синтез их соединений с биоспецифическими молекулами, сайт-направленным конъюгированием и существенно повысить выход реакции.

Таблица 2 – Выход конъюгатов цистеиновых мутантов обелина дикого типа и цветных вариантов с биоспецифическими молекулами

Вариант обелина	Биоспецифическая часть	Выход конъюгата, %
WT A6C	дезоксирибоолигонуклеотид (20 н.о.)	77
WT D12C	рибоолигонуклеотид (57 н.о.)	74
	антитела к дигоксигенину (ab 64509, Abcam)	97
	антитела к FAM (ab 19224, Abcam)	65,9
	антитела к лютеинизирующему гормону (XL1, Хема-медика)	68,4
	антитела к пролактину (XP85, Хема-медика)	68
	стрептавидин	98
W92F,H22E,D12C	олиготимидилат (dT_{30})	62
W92F,H22E,V66C	олиготимидилат (dT_{30})	94
Y138F,A6C	антитела к FAM (ab 19224, Abcam)	60

Сравнение репортерных свойств коньюгатов, полученных двумя способами в одновременном биолюминесцентном анализе по выявлению однонуклеотидных полиморфизмов

Анализ основан на реакции удлинения аллель-специфического праймера (PEXT) с последующей одновременной биолюминесцентной детекцией двух аллелей в одной лунке (Рисунок 6).

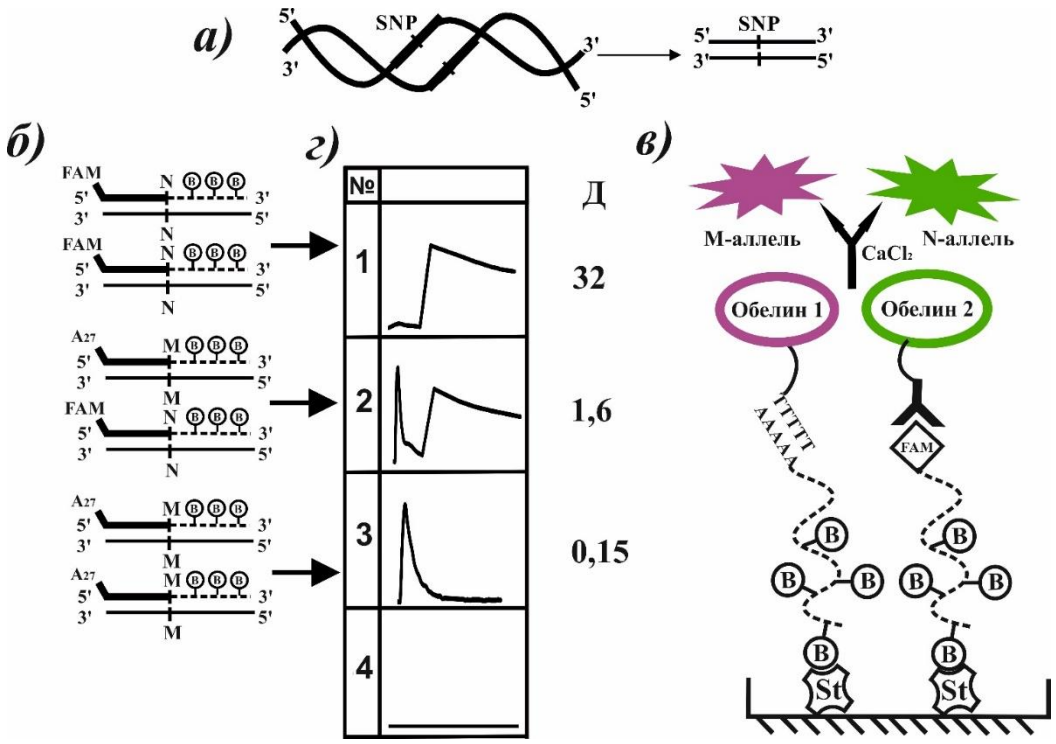

Рисунок 6 – Схема одновременного биолюминесцентного анализа по выявлению однонуклеотидных полиморфизмов. FAM – 6-карбоксифлуоресцеин, A_{27} – олигоаденилат, B – остаток биотина, St – стрептавидин, M – мутантный вариант аллеля, N – нормальный вариант аллеля, Д – дискриминационный фактор. Обелин 1 – конъюгат W92F,H22E- dT_{30} или W92F,H22E,D12C-dT_{30}; Обелин 2 – Y138F-antiFAM IgG или Y138F,A6C-anti FAM IgG, №4 – контрольная лунка, не содержащая PEXT продуктов.

На первом этапе с помощью ПЦР амплифицировали участок ДНК с использованием пары праймеров, фланкирующих соответствующий полиморфный сайт (Рисунок 6а). Полученные после амплификации ПЦР продукты без какой-либо дополнительной очистки использовали в качестве матрицы для проведения PEXT реакции.

Для каждого полиморфизма PEXT реакция проводилась в отдельной пробирке с парой соответствующих праймеров, комплементарных мутантному или нормальному аллелю, помеченных олигоаденилатом $(dA)_{27}$ и 6-карбоксифлуоресцеином (FAM), соответственно (Рисунок 6б). При полной комплементарности ДНК-матрицы и аллель-специфического праймера, образовавшиеся дуплексы удлинялись ДНК-полимеразой, в противном случае никакой реакции не происходило. Удлиненные продукты содержали остатки биотина благодаря присутствию в реакционной смеси биотинилированного производного дезоксиуридин трифосфата вместо тимидин трифосфата.

Биотин-содержащие олигонуклеотиды иммобилизовали на стрептавидин-активированной поверхности лунок. Затем в лунки планшета вносили смесь конъюгатов, инкубировали и промывали. Биолюминесцентный сигнал инициировали внесением Ca^{2+} и измеряли последовательно через соответствующие оптические фильтры - в первую секунду быстрый фиолетовый сигнал, а затем медленный зеленый сигнал в течение 3 секунд (Рисунок 5а).

Генотип для каждого образца оценивали по дискриминационному фактору Д, который рассчитывали, как отношение величины зеленого биолюминесцентного сигнала (нормальный аллель) к фиолетовому (мутантный аллель).

Для сравнения коньюгатов цветных обелинов, полученных полностью химическим способом W92F,H22E- dT_{30} и Y138F-antiFAM IgG (пара коньюгатов № 1) и коньюгатов цветных обелинов с уникальными цистеиновыми остатками W92F,H22E,D12C-dT_{30} и Y138F,A6C-anti FAM IgG (пара коньюгатов № 2) как репортеров в анализе по выявлению SNP мы провели специальный эксперимент. В качестве матрицы использовали модельные плазмиды со вставкой полиморфного фрагмента гена MC1R, имеющего полностью нормальный генотип и той же вставкой, содержащей мутацию. Анализ проводили по схеме, представленной на рисунке 6. Полученные при этом значения дискриминационных факторов Д приведены в таблице 3. Обе пары конъюгатов продемонстрировали близкие значения Д. Таким образом, нами показано, что коньюгаты, полученные предложенным укороченным способом синтеза с использованием цветных обелинов с уникальными цистеиновыми остатками, пригодны для применения в качестве меток для анализа по выявлению однонуклеотидных полиморфизмов.

Модельный анализ показал, что значения Д для разных генотипов отличаются на порядок и более, что свидетельствует о надежности генотипирования предложенным способом.

Таблица 3 – Дискриминационный фактор (Д) при SNP генотипировании с двумя парами конъюгатов (N = 3)

Генотип	Д, пара конъюгатов №1	Д, пара конъюгатов №2
Нормальная гомозигота	39 ± 3,06	27,34 ± 2,78
Гетерозигота[1]	2,31 ± 0,07	1,61 ± 0,15
Мутантная гомозигота	0,25 ± 0,02	0,15 ± 0,02

[1]Образец с генотипом «гетерозигота» был получен в виде эквивалентной смеси плазмид с нормальной и мутантной вставками.

Одновременное генотипирование четырех однонуклеотидных полиморфизмов, связанных с факторами риска нарушений гемостаза

Тромбофилия является многофакторным заболеванием, являющимся результатом взаимодействия генетических и внешних факторов. К генетическим факторам относят SNP в генах, кодирующих факторы свертывания крови и метаболизм гомоцистеина, а к внешним – длительный постельный режим, обширные хирургические вмешательства, беременность, прием женщинами оральных контрацептивов и т.д. Накопленные знания о сочетании генетических и приобретенных факторов обеспечивают индивидуальную оценку риска и подбор рекомендаций для профилактики тромбозов.

Наиболее распространенными мутациями, связанными с тромбофилией, являются FV G1691A, FII G20210A и MTHFR C677T. Эти генетические нарушения повышают риск развития инфаркта миокарда, тромбоза глубоких вен, тромбоэмболии легочной артерии и т.д. В то же время G10976A мутация гена FVII приводит к снижению уровня фактора FVII в плазме крови и, как предполагается, имеет защитный эффект против инфаркта миокарда.

Существование ряда полиморфизмов, ассоциированных с риском схожих патологий, а также усиливающих риск заболевания при совместном присутствии, вызывает потребность в простых, быстрых, надежных и экономически эффективных методах генотипирования, направленных на одновременное определение целого набора мутаций.

Нами разработан оптимизированный трехступенчатый способ одновременного генотипирования четырех полиморфизмов (Рисунок 7), ассоциированных с риском нарушения системы гемостаза. Это два полиморфизма генов, локализованных на разных хромосомах (FVII 13q34 и FII 11p11.2) и два полиморфизма генов, локализованных на разных плечах одной хромосомы (FV 1q24.2 и MTHFR 1p36.22).

С использованием мультиплексной ПЦР в одной пробирке одновременно синтезировали 4 фрагмента, содержащих исследуемые полиморфные сайты. Мультиплексную ПЦР проводили в оптимальных условиях, подобранных для раздельного генотипирования, за исключением концентрации праймеров, которая была уменьшена в два раза, чтобы избежать димеризации праймеров. Для мультиплексной ПЦР нами были испытаны несколько полимераз: Hot Start Taq-ДНК-полимераза, Taq-ДНК-полимераза и Tersus ДНК-полимераза (Евроген, Россия) при одинаковых прочих условиях реакции. Во всех случаях по данным электрофореза нами было получено близкое количество четырех ДНК-матриц. Далее смесь из четырех фрагментов без какой-либо дополнительной очистки использовали в качестве матриц в 4-х отдельных PEXT реакциях с использованием соответствующих пар праймеров.

На данном этапе мы использовали SNP detect ДНК-полимеразу, однако ранее в нашей лаборатории для PEXT реакции было также показано успешное применение Vent (exo-) и Taq ДНК полимераз.

Третий этап – биолюминесцентный твердофазный анализ продуктов PEXT реакции, проводили как описано выше (Рисунок 6).

В целом предложенный нами мультиплексный метод генотипирования четырех полиморфизмов занимает 3 часа, из них: 1-й этап – 1час 40 мин, 2-й этап – 15 мин, 3-й этап – 1 час 7 мин (анализ всего 96-луночного планшета).

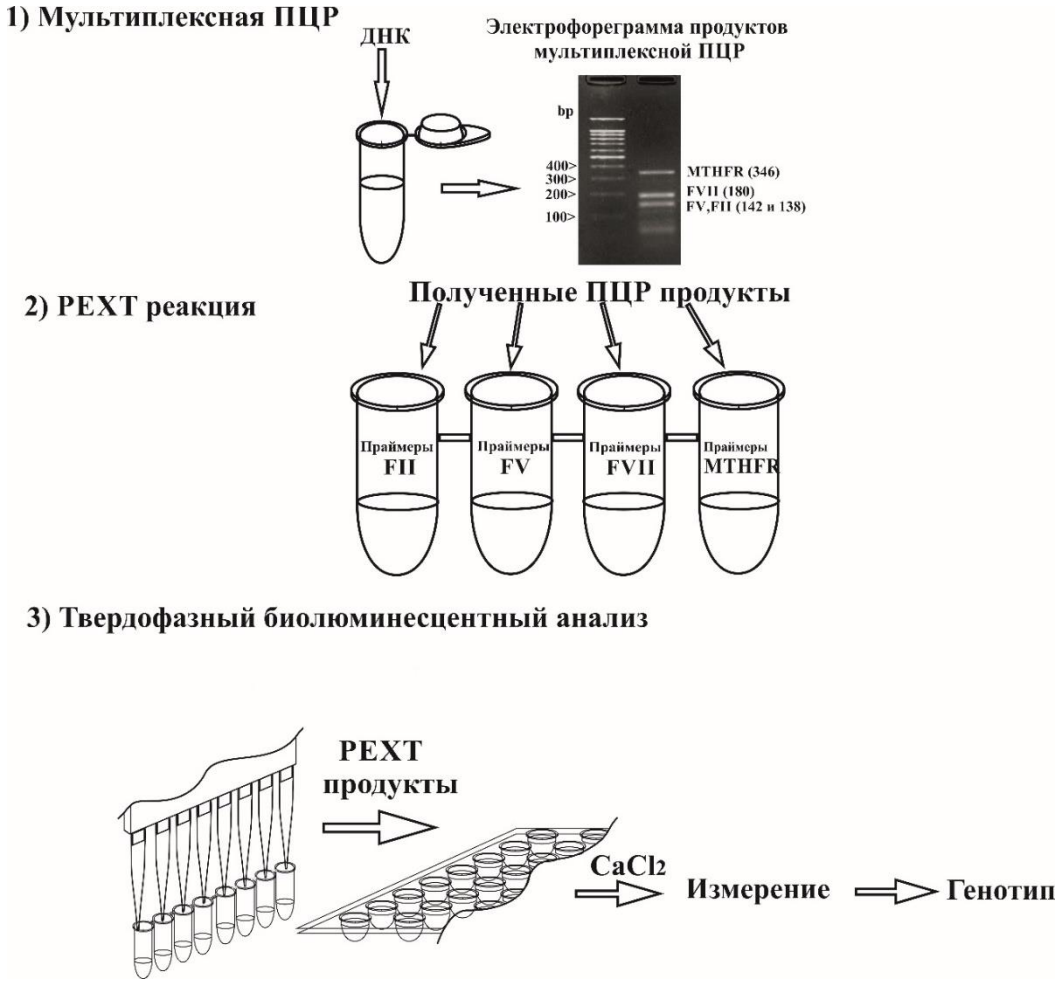

Рисунок 7 – Схема мультиплексного биолюминесцентного анализа четырех полиморфизмов, связанных с нарушениями системы гемостаза.

Исследуемые полиморфизмы генотипировали также в раздельном варианте, когда каждую матрицу амплифицировали в отдельной пробирке. Полученные значения дискриминационного фактора в раздельном и в мультиплексном анализе представлены в таблице 4 и на рисунке 8.

Все исследуемые образцы были ранее проанализированы с использованием метода ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Результаты, полученные нами, полностью совпали с результатами РВ-ПЦР.

Как видно на рисунке 8 мультиплексный вариант генотипирования ДНК дает те же результаты и близкие значения дискриминационного фактора. На рисунке 8 номера образцов одни и те же для всех 4-х полиморфизмов. Таким образом, по данным графикам можно анализировать в образце наличие 4-х мутаций. Например, образец номер 3 имеет гетерозиготный генотип мутаций генов MTHFR, FV и FII, а также нормальный генотип для мутации в гене FVII.

Для оценки воспроизводимости мультиплексного метода два образца ДНК анализировали в разные дни трижды. Коэффициенты вариации значений дискриминационного фактора Д (отношение среднеквадратичного отклонения к среднему арифметическому значению величины, выраженное в процентах) составили 5,3-9,2 %, что подтверждает высокую воспроизводимость разработанного метода.

Таблица 4 – Значение дискриминационных факторов раздельного и мультиплексного определения 4-х полиморфизмов

Вариант генотипа	Д	
	Раздельный анализ	Мультиплексный анализ
FV, 1691 G>A		
Нормальная гомозигота (G/G)	18,7 ± 4,3 (n = 69)	21,8 ± 6,5 (n = 26)
Гетерозигота (G/A)	1,7 ± 0,5 (n = 30)	3,1 ± 0,7 (n = 4)
MTHFR, 677 C>T		
Нормальная гомозигота (C/C)	3 ± 1,4 (n = 51)	3,7 ± 1,3 (n = 15)
Гетерозигота (C/T)	0,41 ± 0,15 (n = 51)	0,6 ± 0,2 (n = 9)
Мутантная гомозигота (T/T)	0,04 ± 0,01 (n = 16)	0,06 ± 0,02 (n = 6)
FII, 20210 G>A		
Нормальная гомозигота (G/G)	31,4 ± 4,2 (n = 25)	29,1 ± 5,6 (n = 25)
Гетерозигота (G/A)	3,4 ± 0,6 (n = 5)	3,3 ± 0,6(n = 5)
FVII, 10976 G>A		
Нормальная гомозигота (G/G)	12,4 ± 3,8 (n = 20)	15,6 ± 5,4 (n = 18)
Гетерозигота (G/A)	0,9 ± 0,1 (n = 11)	1,6 ± 0,4 (n = 10)
Мутантная гомозигота (A/A)	0,06 ± 0,03 (n = 4)	0,3 (n = 2)

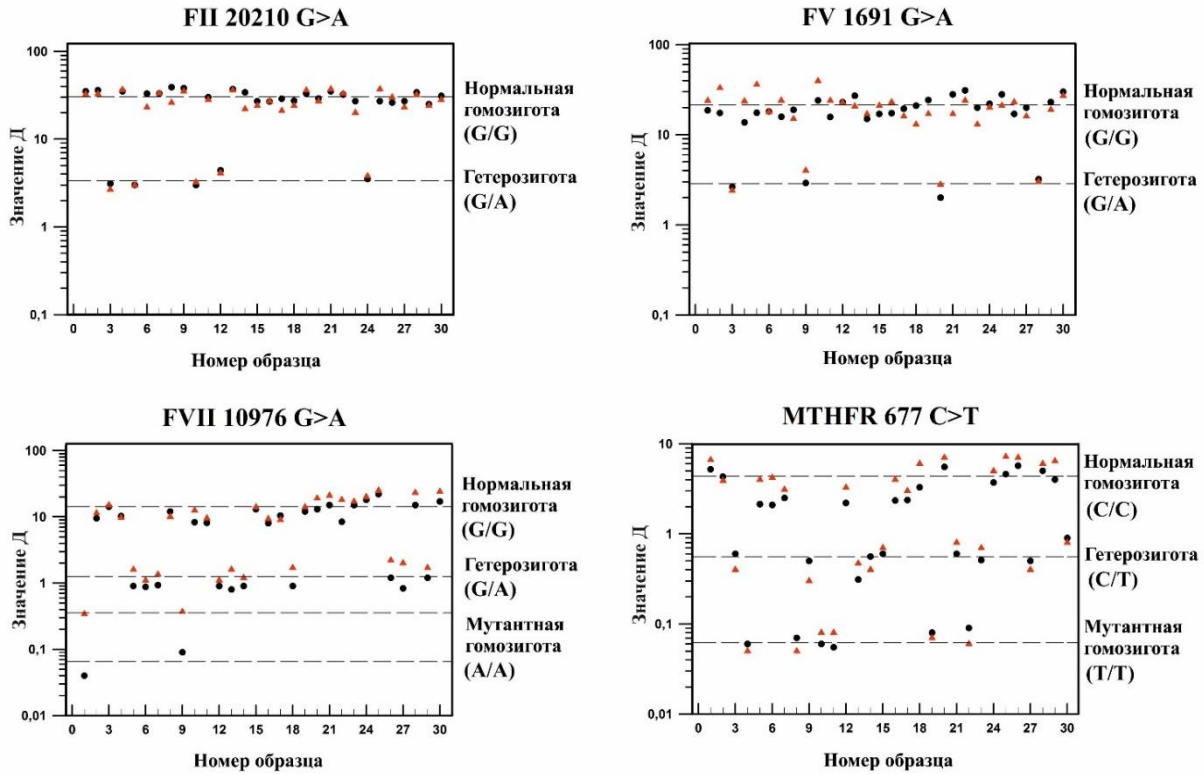

Рисунок 8 – Результаты генотипирования 30 образцов ДНК раздельным (черные кружки) и мультиплексным (красные треугольники) биолюминесцентным анализом.

Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов в гене MC1R одновременным биолюминесцентным анализом

Меланома является самым летальным типом злокачественных заболеваний кожи, которое характеризуется высоким риском метастазирования и устойчивостью к традиционной химиотерапии. В развитии меланомы участвуют генетические и внешние факторы, такие как ультрафиолетовое облучение. Известно, что генетический риск меланомы связан с рядом аллелей предрасположенности, среди них, в частности, однонуклеотидные полиморфизмы гена рецептора меланокортина 1 (MC1R).

В представляемом исследовании мы оценивали частоту встречаемости и ассоциацию с меланомой вариантов R151C, I155T, R160W, D294H и R163Q среди пациентов с меланомой и здоровых доноров Красноярского края с использованием разработанного биолюминесцентного анализа.

Известно, что полиморфизмы R151C (rs1805007), R160W (rs1805008), D294H (rs1805009) гена MC1R в европейской популяции в значительной степени связаны с фенотипом (red hair color, RHC) и в литературе обозначаются как R аллели. Полиморфизмы I155T, R163Q имеют слабую связь с RHC фенотипом и обозначаются как r аллели.

Полиморфизмы гена MC1R определяли в 174 образцах ДНК от пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом меланома кожи, зарегистрированных в период с 2013 по 2016 год в канцер-регистре Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. А.И. Крыжановского.

Пациенты прошли клиническое обследование и опрос у врача онколога-дерматолога. Оценивали такие характеристики как: локализация опухоли, гистологический тип меланомы, толщина опухоли по Бреслоу, стадия, прогрессирование и изъязвления меланомы, близлежащие и отдаленные метастазы, заболевания, приводящие к меланоме, профессиональные риски, а также размер и количество невусов, семейную историю меланомы, случаи солнечного ожога, фототип кожи по классификации Фитцпатрика (I, II, III, IV).

167 пациентов были охарактеризованы по клинико-морфологическим признакам, 125 по фенотипическим. К фенотипическим характеристикам относили форму, количество и размер невусов и фототип кожи.

Среди пациентов было 117 женщин и 59 мужчина (средний возраст 59 ± 13,6, медиана: 61; C_{25} – C_{75}:51 – 67).

Контрольная группа включала 200 здоровых доноров и состояла из 115 женщин и 85 мужчин со средним возрастом 33,8 ± 11 (медиана: 50; C_{25} – C_{75}: 25 – 41).

Биолюминесцентный анализ полиморфизмов гена MC1R

При проведении исследования клинических образцов одновременно использовали специально созданный контрольный образец ДНК с генотипом «гетерозигота» по всем трем исследуемым полиморфизмам, который представлял собой эквивалентную смесь плазмидных ДНК со вставками исследуемого полиморфного сайта с нормальной последовательностью и с тремя исследуемыми мутациями. Все полученные значения дискриминационного фактора отличались между собой более чем на порядок для каждого варианта генотипа (Таблица 3). Все полученные результаты были подтверждены секвенированием (ЦКП «Геномика» СО РАН, Новосибирск, Россия).

При генотипировании на первом этапе нами был амплифицирован фрагмент гена, включающий все 5 полиморфных сайта. При этом биолюминесцентое генотипирование проводили в отношении 3-х представляющих наибольший интерес однонуклеотидных полиморфизмов, приводящих к заменам R151C, R160W, D294H, соответственно.

Таблица 5 – Значения дискриминационного фактора для разных вариантов генотипа

Нормальна гомозигота	Гетерозигота	Мутантная гомозигота
R151C, 451 C>T		
22,89 ± 7,25 (n = 317)	2,56 ± 0,75 (n = 47)	0,19 (n = 2)
R160W, 478 C>T		
22,4 ± 8,2 (n = 301)	1,9 ± 0,6 (n = 62)	0,18 ± 0,11 (n = 3)
D294H, 880 G>C		
20,2 ± 7,4 (n = 364)	1,98 (n = 2)	-
Контрольный образец (гетерозигота) (n = 25)		
R151C, 451 C>T	R160W, 478 C>T	D294H, 880 G>C
2,4 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,4

При генотипировании на первом этапе нами был амплифицирован фрагмент гена, включающий все 5 полиморфных сайта. При этом биолюминесцентое генотипирование проводили в отношении 3-х представляющих наибольший интерес однонуклеотидных полиморфизмов, приводящих к заменам R151C, R160W, D294H, соответственно. Поскольку все полученные результаты были подтверждены секвенированием амплифицированного фрагмента целиком, мы использовали эти сиквенсы для оценки распространенности и двух дополнительных r полиморфизмов (I155T, R163Q) ассоциированных в некоторых популяциях с развитием меланомы.

374 образца ДНК были проанализированы на наличие вариантов гена MC1R (Таблица 5). Все исследуемые аллели и генотипы находились в равновесии Харди-Вайнберга (p > 0,05).

Из таблицы 6 видно, что наиболее редкими были варианты I155T и D294H (< 2%) как среди пациентов, так и среди контрольной группы. В группе пациентов наиболее часто встречался минорный аллель T (R160W) – 12,4%, а в контрольной группе минорный аллель A (R163Q) – 14,3%.

Таблица 6 – Ассоциация вариантов гена MC1R с меланомой

MC1R вариант	Аллель	Пациенты (n = 174), %	Контрольная группа (n = 200), %	χ^2	p	OR, 95% CI
R151Q C>T	C	90,8	94,8	4,4	0,04	0,55 (0,31-0,97)
	T	9,2	5,3			1,83 (1,03-3,23)
I155T T>C	T	98	99	1,31	0,25	0,55 (0,14-1,7)
	C	2	1			2,03 (0,59-7)
R160W C>T	C	87,6	92,8	5,58	0,02	0,55 (0,34-0,91)
	T	12,4	7,3			1,8 (1,1-2,96)
R163Q G>A	G	91,4	85,8	5,74	0,02	1,76 (1,1-2,81)
	A	8,6	14,3			0,57 (0,36-0,91)
D294H G>C	G	99,7	99,8	0,01	0,92	0,87 (0,05-13,96)
	C	0,3	0,3			1,21 (0,07-18,45)

OR – отношение шансов, CI – доверительный интервал.

Мы обнаружили, что носители вариантов R151C и R160W имели повышенный риск развития меланомы кожи OR:1,83; 95% CI: 1,03-3,23, p = 0,04 и OR:1,8; 95% CI: 1,1-2,96, p = 0,02, соответственно.

Мы оценили ассоциацию с меланомой носительства одновременно нескольких из исследуемых вариантов гена MC1R. Поскольку наличие двух R аллелей в одном исследуемом образце наблюдались только в двух случаях среди пациентов и у одного

здорового донора (R151C и R160W), мы оценивали комбинацию вариантов R (R151C, R160W, D294H) и r (I155T, R163Q).

Было обнаружено, что носители любых двух полиморфизмов среди пациентов встречаются чаще, чем среди контрольной группы и имеют повышенный риск развития меланомы (OR: 2,913; 95% CI: 1,297-6,543, p = 0,01).

Ассоциация вариантов MC1R и фенотипических характеристик

Фенотипические характеристики сравнивали попарно в группе пациентов, имеющих мутацию и без нее (сравнение проводили для каждого полиморфизма в отдельности).

Было обнаружено, что мутантный аллель T полиморфизма R160W статистически чаще встречался среди пациентов с меланомой, имеющих врожденные невусы (OR:3,15; 95% CI:1,32-7,5, p = 0,01). Это согласуется с литературными данными показывающими, что наличие полиморфизма V92M или R аллелей (D84E, R151C, R160W, D294H) ассоциировано с врожденными невусами, а также увеличением их размера.

Ассоциация вариантов MC1R и различных клинико-морфологических характеристик

Нами было обнаружено, что такие факторы как: наличие отдаленных метастазов, прогрессирование меланомы, средняя толщина опухоли, локализация меланомы, множественная меланома и семейная история меланомы не были связаны с отдельными вариантами гена MC1R p > 0,05 (данные не показаны).

Мы обнаружили, что минорный аллель A данного полиморфизма статистически реже встречался среди пациентов с поверхностной-распространенной меланомой (OR: 0,35; 95% CI: 0,16-0,75, p = 0,006), несмотря на то, что этот гистологический тип меланомы был преобладающим (70,63%) в нашей выборке.

Для полиморфизма R151C была обнаружена статистически значимая ассоциация с изъязвлением (OR: 2,928; 95% CI: 1,289-6,649, p = 0,01).

Для других вариантов гена MC1R в нашем исследовании статистически значимой связи с клинико-морфологическими и фенотипическими характеристиками обнаружено не было.

Ассоциация комбинированных вариантов гена MC1R с клинико-морфологическими и фенотипическими характеристиками.

Для оценки взаимосвязи нескольких вариантов гена с клинико-морфологическими и фенотипическими характеристиками мы сформировали три следующие группы:

а) носители любого варианта R (R151C, R160W и D294H), включая варианты комбинаций R и r (I155C и R163Q);

б) носители только r-вариантов;

в) случаи без какого-либо изучаемых вариантов.

Для каждой из этих групп мы оценили ассоциации с клинико-морфологическими и фенотипическими характеристиками. Между исследуемыми группами не было обнаружено статистически значимой разницы (p > 0,05) относительно фенотипических характеристик (данные не показаны).

Статистически значимые ассоциации были обнаружены между: R-вариантами и изъязвлением (OR: 3,38; 95% CI: 1,709-6,698, p < 0,001); R и средней толщиной опухоли <1 мм (OR: 2,496; 95% CI: 1,257-4,955, p = 0,009). Толщина меланомы является одним из основных критериев прогрессирования опухоли и прогнозирования выживаемости. В литературе имеются сведения о том, что у носителей аллельных вариантов MC1R утолщение опухоли наблюдалось в три-четыре раза чаще, чем у неносителей.

В нашем исследовании была обнаружена связь между тонкой меланомой (< 1 мм) и носительством R-вариантов. Однако пациенты, имеющие тонкую меланому, были преобладающими в нашем исследовании (пациенты со стадиями I-II, которые характеризуются тонкой меланомой, а также пациенты с III стадией, но в то же время тонкой меланомой). Именно поэтому мы не принимали во внимание полученные нами ассоциации с толщиной меланомы.

Гораздо важнее, по нашему мнению, была обнаруженная ассоциация носительства R-вариантов с изъязвлением. Изъязвление является более значимым предиктором течения заболевания для ранних стадий (I и II), поскольку его наличие означает более агрессивное течение заболевания.

Необходимо отметить, что масштаб проведенного ассоциативного исследования был относительно небольшим и, возможно, поэтому для редких вариантов в нашей популяции (I155T и D294H) ассоциаций обнаружить не удалось.

Результаты нашей работы подтвердили перспективность разработанного биолюминесцентного анализа для выявления SNP и проведения локальных исследований по распространенности и ассоциациям известных мутаций в популяции. Все исследование полиморфизмов гена MC1R было проведено в течение 2-х месяцев. При этом было проанализировано 374 образца и полученные результаты полностью совпали с данными контрольного прямого секвенирования. Анализ полученных данных впервые выявил некоторые ассоциации вариантов гена MC1R с клинико-морфологическими и фенотипическими характеристиками жителей Красноярского края. Было показано, что наличие вариантов R160W или R151C, а также одновременное носительство двух любых вариантов из пяти исследованных связано с увеличением риска меланомы кожи.

Важным является тот факт, что данный способ выявления можно легко адаптировать для исследования других однонуклеотидных полиморфизмов, представляющих интерес для медиков, простой заменой комплекта соответствующих праймеров.

ВЫВОДЫ

1. Сконструированы, получены в высокоочищенном виде и изучены варианты цветных обелинов с уникальными цистеиновыми остатками. Показано что пара вариантов W92F,H22E,D12C и Y138F,A6C обладают свойствами исходных цветных обелинов и могут быть использованы в качестве репортеров в биолюминесцентном анализе.

2. Разработан способ сайт-направленного синтеза коньюгатов цветных вариантов обелина с биоспецифическими молекулами, обеспечивающий высокий выход целевых продуктов (до 70%), в том числе универсальных биолюминесцентных меток для SNP-генотипирования.

3. Разработан способ одновременного выявления нескольких однонуклеотидных полиморфизмов на основе мультиплексной ПЦР и универсальных биолюминесцентных меток. Испытания способа на примере исследования полиморфизмов генов FV, FII MTHFR, FVII, связанных с риском нарушений системы гемостаза, показали достоверность и высокую воспроизводимость генотипирования.

4. Исследованы распространенность и значимость однонуклеотидных полиморфизмов R151C, R160W, D294H гена MC1R среди пациентов Красноярского края с диагнозом меланома (N=174) и без него (N=200). Корректность генотипирования контролировали с помощью специально созданного положительного контроля – образца плазмидной ДНК, обеспечивающего при корректном генотипировании результат «гетерозигота» по всем исследуемым полиморфизмам.

5. Установлено, что наиболее распространенным полиморфизмом среди пациентов был R160W, среди здоровых доноров – R163Q. Полиморфизмы I155T и D294H являются редкими (<2%) и их дальнейшее тестирование нецелесообразно.

6. Установлена взаимосвязь полиморфизмов гена MC1R с риском развития меланомы: носители вариантов R151C и R160W имели повышенный риск развития меланомы кожи OR: 1,83; 95% CI:1,03-3,23, p = 0,04 и OR: 1,8; 95% CI: 1,1-2,96, p = 0,02, соответственно. Обнаружено, что носители одновременно любых двух полиморфизмов среди пациентов встречаются чаще, чем среди контрольной группы и имеют повышенный риск развития меланомы (OR: 2,913; 95% CI: 1,297-6,543 p = 0,01).

7. Установлена взаимосвязь полиморфизмов гена MC1R с рядом клинико-морфологических характеристик. В группе пациентов-носителей R аллелей (R151C, R160W, D294H) чаще наблюдалось изъязвление опухоли (OR: 3,38 95% CI: 1,709-6,698, p < 0,001).

Полиморфизм R151C имеет статистически значимую ассоциацию с изъязвлением опухоли (OR: 2,928; 95% CI: 1,289-6,649, p = 0,01).

Полиморфизм R163Q, статистически реже встречался среди образцов от пациентов с поверхностно-распространенной меланомой (OR: 0,35; 95% CI: 0,16-0,75, p = 0,006).

Полиморфизм R160W статистически чаще встречался среди пациентов с меланомой, имеющих врожденные невусы (OR: 3,15; 95% CI: 1,32-7,5, p = 0,01).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. **Bashmakova E.E.** Simultaneous genotyping of four single nucleotide polymorphisms associated ith risk factors of hemostasis disorders / E. E. Bashmakova, V. V. Krasitskaya, L. A. Frank // Journal of Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. – 2015. – V. 18, N. 10. – P. 930-937.
2. **Башмакова Е. Е.** Выявление однонуклеотидных полиморфизмов (R160W, R151C, D294H) в гене рецептора меланокортина-1 (MC1R) биолюминесцентным анализом / Е. Е. Башмакова, В. В. Красицкая, А. А. Бондарь, А. В. Козлова, Т. Г. Рукша, Л. А. Франк // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49, N. 6. – С. 953-958.
3. Krasitskaya V. V. Mutants of Ca^{2+}-regulated photoprotein obelin for site-specific conjugation / V. V. Krasitskaya, L. P. Burakova, A. A. Komarova, **E. E. Bashmakova**, L. A. Frank // Photochem Photobiol. – 2017. – V. 93, N. 2. – P. 553-557.

Тезисы в сборниках материалов конференций

1. **Башмакова Е. Е.** Одновременное выявления четырёх клинически значимых полиморфизмов плазменного гемостаза биолюминесцентным твердофазным микроанализом / Е. Е. Башмакова // Молодежь и наука: материалы X Юбилейной Всерос. науч.-технич. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых с междунар. участием, посвящ. 80-летию образования Красноярского края / Сибирский федеральный университет. – Красноярск, 2014.
2. Красицкая В. В. Разработка набора для определения мутации Лейден и метилентетрагидрофолатредуктазы методом ферментативного удлинения аллель-специфичного праймера с двойной биолюминесцентной детекцией (PED -биолюм) / В. В. Красицкая, **Е. Е. Башмакова**, Т. Н. Субботина, М. А. Суховольская, Л. А. Франк // Молекулярная диагностика-2014: материалы VIII Всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участием / ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и Национальным научным обществом инфекционистов. – Москва, 2014. – Т. 2. – С. 380.
3. **Bashmakova E. E.** Identification of Plasma Hemostasis Mutations by Enzyme Extension of the Allele Specific Primer with Dual Bioluminescent Detection (PED-Biolume) / E. E. Bashmakova, V. V. Krasitskaya, L. A. Frank // 5th International Conference and Exhibition on Analytical & Bioanalytical Techniques, August 18-20, 2014 (Beijing, China) / Journal of Analytical & Bioanalytical Technigues, 2014. – V. 4, N. 4. – P. 108.
4. **Башмакова Е. Е.** Выявление однонуклеотидных полиморфизмов методом ферментативного удлинения аллель-специфичного праймера с двойной биолюминесцентной детекцией / Е. Е. Башмакова, В. В. Красицкая, Л. А. Франк // Площадка открытых коммуникаций Open Bio: сборник материалов II междунар. науч. конф. молодых ученых биотехнологов, вирусологов, молекулярных биологов, 1-2 октября 2015. – Кольцово (Новосибирская обл.), 2015.
5. **Bashmakova E. E.** Biolumenescent Multiplex SNP Identification Based on Obelin Color Variants / E. E. Bashmakova, V. V. Krasitskaya, L. A. Frank // ISBC-2016 : abstracts of 19th International Symposium on Bioluminescence & Chemiluminescence, May 29-June 2, 2016. – Tsukuba City, Japan, 2016. – B1-5.