

ровых рыб / Н.Х. Сергалиев, М.Г. Какишев, Н.С. Гинаятов // Наука и образование, – Уральск: РИО ЗКАТУ, 2018. – № 3 (52). – С. 167-172.

4. Bore, E.K., Apostel, C., Halicki, S., Kuzyakov, Y., Dippold, M.A. Microbial metabolism in soil at subzero temperatures: adaptation mechanisms revealed by position-specific (13) C labeling // *Frontiers in Microbiology*, 2017. – Vol. 8. – P. 1-10.

5. Plumb, J.A., Hanson, L.A. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fish. Third ed. Wiley-Blackwell, Iowa, USA, 2011. – 244 p.

[DOI: 10.34617/f7ta-4j87](https://doi.org/10.34617/f7ta-4j87)

УДК 602

**РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЛИНЫ
ГОМОПОЛИМЕРНЫХ УЧАСТКОВ В ТЕХНОЛОГИИ
ИОННОГО ПОЛУПРОВОДНИКОВОГО
СЕКВЕНИРОВАНИЯ**

**SOLVING OF THE PROBLEM OF HOMOPOLYMERIC
LOCI LENGTHS DETECTION IN THE ION
SEMICONDUCTOR SEQUENCING TECHNOLOGY**

Скобников Николай Эдуардович^{1,2}, канд. мед. наук,

Кузнецов Евгений Олегович²,

Мараховская Татьяна Алексеевна²,

Иванченко Анастасия Александровна²

¹ Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии,
г. Краснодар, Российская Федерация

² ООО «СЛ МедикалГруп, г. Краснодар

Skoblikov Nikolai Edwardovich^{1,2}, Ph. D. Med. Sci.

Kuznetsov Evgeny Olegovich²

Marakhovskaya Tatiana Alekseevna²

Ivanchenko Anastasia Aleksandrovna²

¹ Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry and Veterinary
Medicine, Krasnodar, Russian Federation

² «CL MedicalGroup» Ltd., Krasnodar, Russian Federation.

Аннотация: изложена вероятная причина проблемы определения длины гомополимерных участков при проведении полупроводникового секвенирования – локальная полимеризация высвобождающегося пирофосфата в более длинные полифосфатные цепочки. Предложены технологические решения по минимизации влияния образующегося полифосфата на детектируемые изменения pH.

Работа выполнена частично при поддержке РФФИ и Администрации Краснодарского края в рамках научных проектов 19-44-230030 p_a и 19-44-230040 p_a.

Ключевые слова: секвенирование; гомоповторы; полифосфаты.

Abstract: the paper describes polymerization of realized and accumulated pyrophosphates into polyphosphate chains as the probable cause of the problem of the homopolymeric loci lengths detection in the ion semiconductor sequencing technology. The technologic solutions for minimization of the synthesized polyphosphates influence onto detecting pH changing are proposed.

The reported research was funded by Russian Foundation for Basic Research and the government of the Krasnodar region, grants № 19-44-230030-r_a and 19-44-230040-r_a.

Key words: sequencing; homorepeats; polyphosphates.

Существенной проблемой технологии ионного полупроводникового секвенирования является проблема точного определения длины гомополимерных участков – участков секвенируемой ДНК, содержащих 7 и более одинаковых нуклеотидов подряд. Аналогичная проблема наблюдается и при схожей технологии пиросеквенирования. Общим подходом обеих технологий является детекция химических событий, связанных с отщеплением пирофосфатного остатка от дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ), включаемых ДНК-полимеразой в синтезируемую в реакционной ячейке цепь ДНК.

Вероятно, «ошибка» определения количества пирофосфата и, соответственно, рассчитываемой длины гомополимерного участка объясняется утилизацией детектируемого пирофосфата

в ходе другой реакции, параллельно протекающей в ячейке в условиях избыточного образования пирофосфата.

По нашему предположению, такой реакцией является реакция поликонденсации больших количеств высвобождающегося пирофосфата в более длинные олигомерные и полимерные цепочки полифосфорной кислоты.

Такие олигомеры фосфатной природы обладают более низкой константой диссоциации по сравнению с пирофосфорной кислотой, что приводит к совокупному изменению рН в ячейке на значения, меньшие по сравнению с рассчитанными для пирофосфата.

Основным фактором, смещающим равновесие в реакции поликонденсации/гидролиза полифосфата в сторону поликонденсации, является реликтовая полифосфат-синтазная активность молекул полимеразы, проявляющаяся вследствие изменения их конформации в условиях резкого и значительного падения рН.

Дополнительным фактором, усугубляющим проблему, вероятно, является локальное изменение температуры ячейки вследствие расщепления макроэргической фосфодиэфирной связи в дНТФ.

В таком случае, речь идёт не об ошибке измерения, а о несовершенстве применяемого подхода актуальной технологии, фокусирующегося на единственной протекающей в ячейке реакции – реакции поликонденсации дНТФ в молекулу ДНК.

Для проверки предположения следует провести сравнительный анализ содержимого ячеек после flow-цикла на секвенируемых участках с гомоповторами и участках, гетерогенных по нуклеотидному составу, на предмет наличия полифосфатных цепочек.

Также следует провести сравнительную высокочувствительную термометрию ячеек. Особенно успешным представляется сравнительное исследование отличий в конформации полимеразы.

В случае подтверждения причин, оптимальное решение проблемы будет, вероятно, состоять в комбинированном подходе, включающем:

- 1) селективное выравнивание температуры ячеек;
- 2) включение в реакцию смесь соединений, связывающихся предпочтительно с полифосфатом;
- 3) подбор полимераз, обладающих большей конформационной устойчивостью к изменению pH.

Список литературы

1. Kulaev, I.S., Vagabov, V., Kulakovskaya, T.V. (2004). The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates. Wiley – 276 p.
2. Rothberg, J., Hinz, W., Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature, 475:348–352 p.