

На правах рукописи

Ахметзянова Лиана Ульфатовна

**МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕАКЦИИ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ
АМПЛИФИКАЦИИ И СОЗДАНИЕ КОМПЬЮТЕРНЫХ ПРОГРАММ
ДИЗАЙНА ПРАЙМЕРНЫХ СИСТЕМ**

1.5.3 Молекулярная биология (биологические науки)

Автореферат на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Уфа-2025

Работа выполнена в лаборатории структуры и функций биополимеров Института биохимии и генетики – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Научный руководитель:

Чемерис Алексей Викторович

доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник ИБГ УФИЦ РАН

Официальные оппоненты:

Грядун Дмтрий Александрович

доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией технологий молекулярной диагностики Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН

Рыкова Елена Юрьевна

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции экспрессии генов ФИЦ ИЦиГ СО РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Защита диссертации состоится 24 сентября 2025 года в 10 час.00 мин. на заседании диссертационного совета 24.1.218.01 на базе Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71, каб.409. тел: +7 347 235-60-88, e-mail: dissovet-ibg@mail.ru, сайт: http://ufaras.ru/?page_id=9758

Автореферат разослан ____ июня 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, д.б.н.

Гульназ Фаритовна Корытина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время все более широкое применение находит анализ биологических образцов путем обнаружения в них специфических нуклеиновых кислот (НК) с помощью амплификации – ферментативной реакции, приводящей к наработке фрагментов НК в количестве, которое может быть детектировано инструментальными методами. Разработано множество методов амплификации НК, различающихся способами проведения реакции и детекции ее результатов. Самым популярным методом остается полимеразная цепная реакция – ПЦР [Saiki et al., 1985], которая включает несколько этапов, протекающих при разных температурах. Из-за необходимости термоциклирования продолжительность ПЦР относительно велика, что обуславливает интерес к более быстрым реакциям амплификации, протекающим при постоянной температуре [Бодулев, Сахаров, 2020]. Среди таковых наиболее популярной стала петлевая изотермическая амплификация – LAMP [Notomi et al., 2000]. LAMP применяется в основном для обнаружения генетического материала бактериальных и вирусных патогенов [Sadeghi et al., 2021; Soroka et al., 2021; Park, 2022; Garg et al., 2022]. Активное развитие метод LAMP получил с началом пандемии COVID-19 [Li et al., 2022].

В отличие от классической ПЦР, для проведения которой необходимы два праймера, для протекания LAMP требуется более сложная система праймеров. В первоначально предложенном варианте LAMP использовались два внешних (F3 и B3), и два внутренних (FIP и BIP) праймера. Для ускорения наработки лампликонов было добавлено еще два праймера, получивших название петлевых (FLP и BLP) [Nagamine et al., 2002]. Были сделаны и другие попытки добиться ускорения протекания LAMP за счет использования стержневых праймеров [Gandelman et al., 2011] или дополнительных внутренних праймеров [Wang et al., 2015].

Дизайн LAMP-праймеров представляет собой непростую задачу, при этом количество компьютерных программ их подбора не превышает десяти. Существующие программы имеют определенные ограничения: позволяют осуществлять подбор на основе ограниченных по длине нуклеотидных последовательностей, не учитывают возможность образования гомо- и гетеродимеров праймеров, не позволяют подбирать мультиплексные праймерные системы. Это приводит к подбору праймеров недостаточно высокого качества, что часто обуславливает получение недостоверных результатов LAMP-анализа [Зырина, Антипова, 2021; Meagher et al., 2018; Rolando et al., 2020]. Таким образом, создание инструмента для дизайна «качественных» праймеров для петлевой изотермической амплификации является актуальной задачей.

Целью исследования стало выяснение характера протекания петлевой изотермической амплификации (LAMP), разработка различных вариантов этой

реакции и создание компьютерных программ для дизайна соответствующих LAMP-праймерных систем.

Задачи исследования:

1. Оптимизировать номенклатуру зон в мишени/лампликонах для реакции LAMP, смоделировать ее протекание и определить структуру продуктов LAMP;
2. Разработать новые варианты LAMP и смоделировать соответствующие молекулярные системы, пригодные для обнаружения специфических НК-мишеней;
3. Определить оптимальные критерии и алгоритм подбора специфичных LAMP-праймеров;
4. Разработать компьютерные программы дизайна LAMP-праймеров для разных вариантов реакции, провести *in silico* тестирование их функционала;
5. Показать принципиальную возможность обнаружения специфических НК-мишеней с помощью праймеров, сконструированных разработанными компьютерными программами.

Научная новизна исследования. Предложена новая система обозначений (номенклатура) зон отжига LAMP-праймеров, облегчающая понимание структуры праймеров и продуктов реакции, а также подбор нетипичных праймерных систем. Разработан новый алгоритм подбора LAMP-праймеров, включающий новую математическую модель расчета температуры отжига праймеров и подразумевающий задание более жестких критериев их отбора и возможность сближения зон отжига с целью уменьшения длины мишени. Разработаны новые варианты LAMP, предназначенные для обнаружения специфических НК-мишеней. Написано пять компьютерных программ для дизайна специфичных LAMP-праймеров: LAMPprimers iQ, LAMPprimers iQ_loop, LigLAMP, miRLAMP, MIP-LAMP. Показана принципиальная возможность обнаружения специфических НК-мишеней с помощью праймеров, сконструированных разработанными компьютерными программами.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы облегчают понимание структуры LAMP-праймеров и продуктов реакции, процесс подбора праймеров, особенно для нетрадиционных вариантов реакции. Предложенные варианты LAMP обеспечивают расширение спектра мишеней, которые можно обнаружить данным методом. Разработанные компьютерные программы расширяют арсенал программных средств для дизайна LAMP-праймеров, обеспечивают более высокую специфичность обнаружения НК-мишеней благодаря оптимизированному алгоритму их подбора. Они могут применяться в научно-исследовательских учреждениях и лабораториях, занимающихся амплификацией нуклеиновых кислот, например, при решении ряда задач молекулярной биологии, для создания диагностических тест-систем, обеспечивающих высокую чувствительность и достоверность обнаружения специфических РНК и ДНК.

Методология и методы исследования. При выполнении работы использовались методы молекулярной биологии: выделение нуклеиновых кислот, конструирование олигонуклеотидных матриц и праймеров, амплификация нуклеиновых кислот, гель-электрофоретический анализ, секвенирование; методы молекулярного моделирования и компьютерного программирования.

Положения, выносимые на защиту.

- Новая система обозначений зон отжига LAMP-праймеров значительно облегчает понимание их структуры и обеспечивает более точный подбор праймерных систем, особенно для нетрадиционных вариантов реакции.
- Новый алгоритм подбора LAMP-праймеров обеспечивает более высокую специфичность обнаружения с их помощью НК-мишеней.
- Разработанные варианты реакции LAMP обеспечивают достоверное обнаружение мРНК с помощью данного метода.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.3 – Молекулярная биология (биологические науки) и затрагивает проблемы, связанные с молекулярным моделированием НК-НК взаимодействий и разработкой новых методов исследования биополимеров и их комплексов.

Апробация результатов исследования. Результаты диссертационной работы докладывались на международной научной конференции «Параллельные вычислительные технологии (ПаВТ)» (Пермь, 2020 г., Волгоград, 2021 г., Челябинск, 2024 г.), Международной научной конференции «Уфимская осенняя математическая школа» (Уфа, 2020, 2021 гг.), XXVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2020 г.), IX Международном научном семинаре «Математическое моделирование, численные методы и комплексы программ» им. Е.В. Воскресенского (Саранск, 2020 г.), Международной научно-практической конференции «Интеллектуальные информационные технологии и математическое моделирование» (Дивноморское, г. Геленджик, 2021, 2022 гг.), The Thirteenth International Multiconference. Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022), (Новосибирск, 2022 г.).

Личный вклад автора. Определение темы диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научным руководителем. Автор оптимизировал номенклатуру и смоделировал структуру продуктов LAMP-реакции, разработал новые варианты реакции и смоделировал соответствующие молекулярные схемы. Автор разработал пять компьютерных программ для подбора LAMP-праймеров, систематизировал результаты исследования.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 15 научных трудов, из них 5 статей в журналах, индексируемых в WoS/Scopus и/или из перечня ВАК. Получено 5 свидетельств о регистрации программ для ЭВМ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 142 страницах, состоит из введения, обзора литературы (глава I), описания материалов и методов (глава II), обсуждения результатов (глава III), выводов и списка литературы (220 наименований). Работа содержит 8 таблиц и 36 рисунков.

Благодарности. Работа частично выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант «Аспиранты», № 20-37-90091 (2020-2022) «Разработка программы дизайна праймеров для Loop AMPlification - петлевой изотермической амплификации на основе технологий машинного обучения»).

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, Заслуженному деятелю науки РФ, доктору биологических наук, профессору Чемерису Алексею Викторовичу за постановку цели и задач, поддержку и полезные советы на всех этапах выполнения диссертационной работы. Автор также выражает благодарность д.ф.-м.н., профессору Губайдуллину Иреку Марсовичу за наставления, ценные советы и всестороннюю поддержку, д.х.н. Гарафутдинову Равилу Ринатовичу за консультации, ценные советы и замечания и к.б.н. Сахабутдиновой Ассоль Рафиковне за помощь в освоении методов молекулярной биологии.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Новая номенклатура LAMP.

Петлевая изотермическая амплификация (LAMP) является достойной альтернативой ПЦР. В оригинальной статье [Notomi et al., 2000] для проведения LAMP-реакции было предложено использовать два внешних, F3 и B3, и два внутренних (FIP и BIP) праймера. FIP и BIP содержат по паре мест отжига на мишени: F1c|F2 и B1c|B2, соответственно (рис. 1).

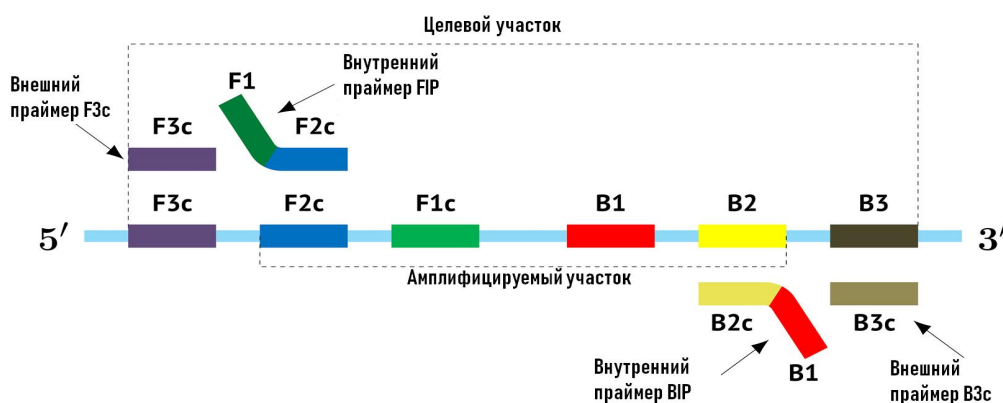


Рисунок 1 - Стандартная схема расположения зон отжига праймеров в LAMP и их обозначение согласно [Notomi et al., 2000].

Для обеспечения удобства работы с LAMP-системой, нами предлагается использовать новые обозначения зон отжига праймеров согласно латинскому алфавиту: вместо зон F3c, F2c, F1c, B1, B2, B3 – буквы F, A, B, C, D, E, а для

комплементарной цепи – f, a, b, c, d, e. В целом все эти зоны можно обозначить как Z и z (zone), сопроводив цифрами, соответствующими числу таких зон в конкретном лампликоне. Тогда LAMP-праймеры будут иметь следующие обозначения: праймер F3c – ‘F’, B3 – ‘e’, FIP и BIP – bA и Cd, соответственно. Исходя из вышесказанного, протекание начальных этапов LAMP можно отобразить в виде следующей схемы:

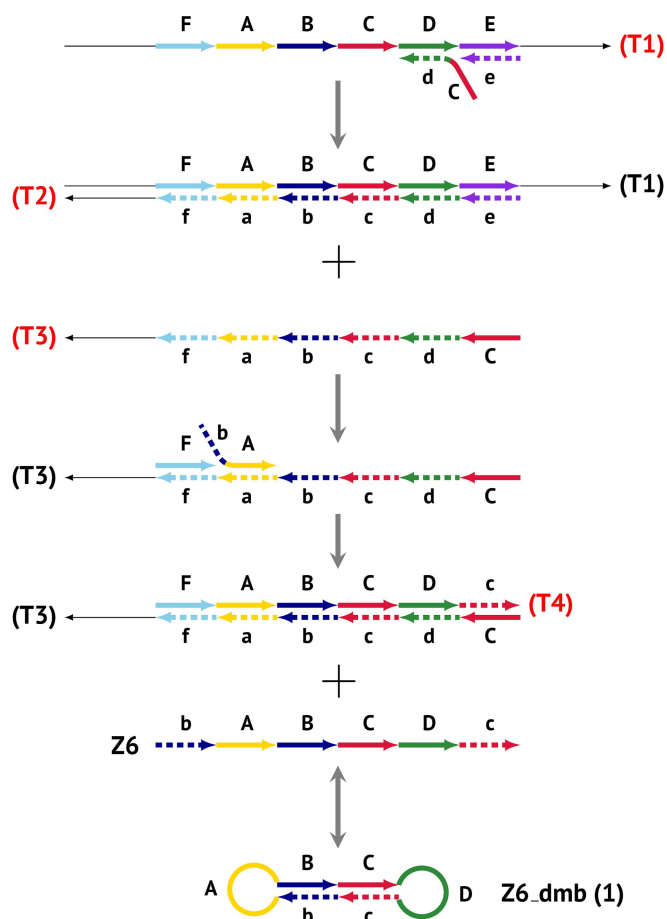


Рисунок 2 - Начальные этапы преамплификационной фазы LAMP.

Каждая из ДНК-структур может возникать с определенной вероятностью, которая зависит от конкуренции между отжигом праймеров и самопраймированием, что определяется нуклеотидным составом последовательностей различных зон мишени. Главным условием протекания LAMP является опережающий отжиг на начальных этапах преамплификационной фазы внутренних праймеров, чтобы построенные с них цепи были затем смещены и оказались одноцепочечными. Удлиняясь, праймер ‘F’ приведет к смещению цепи 5’-bABCDc-3’ (обозначена как Z6_dmb(1)), являющейся первой гантелеподобной структурой и одним из основных элементов реакции. Она далее запускает экспоненциальную амплификацию в виде LAMP-цикла (рис. 3), продолжающуюся за счет выхода ряда продуктов во внешний контур NGEL (Next Generation of Extended Lamplicons).

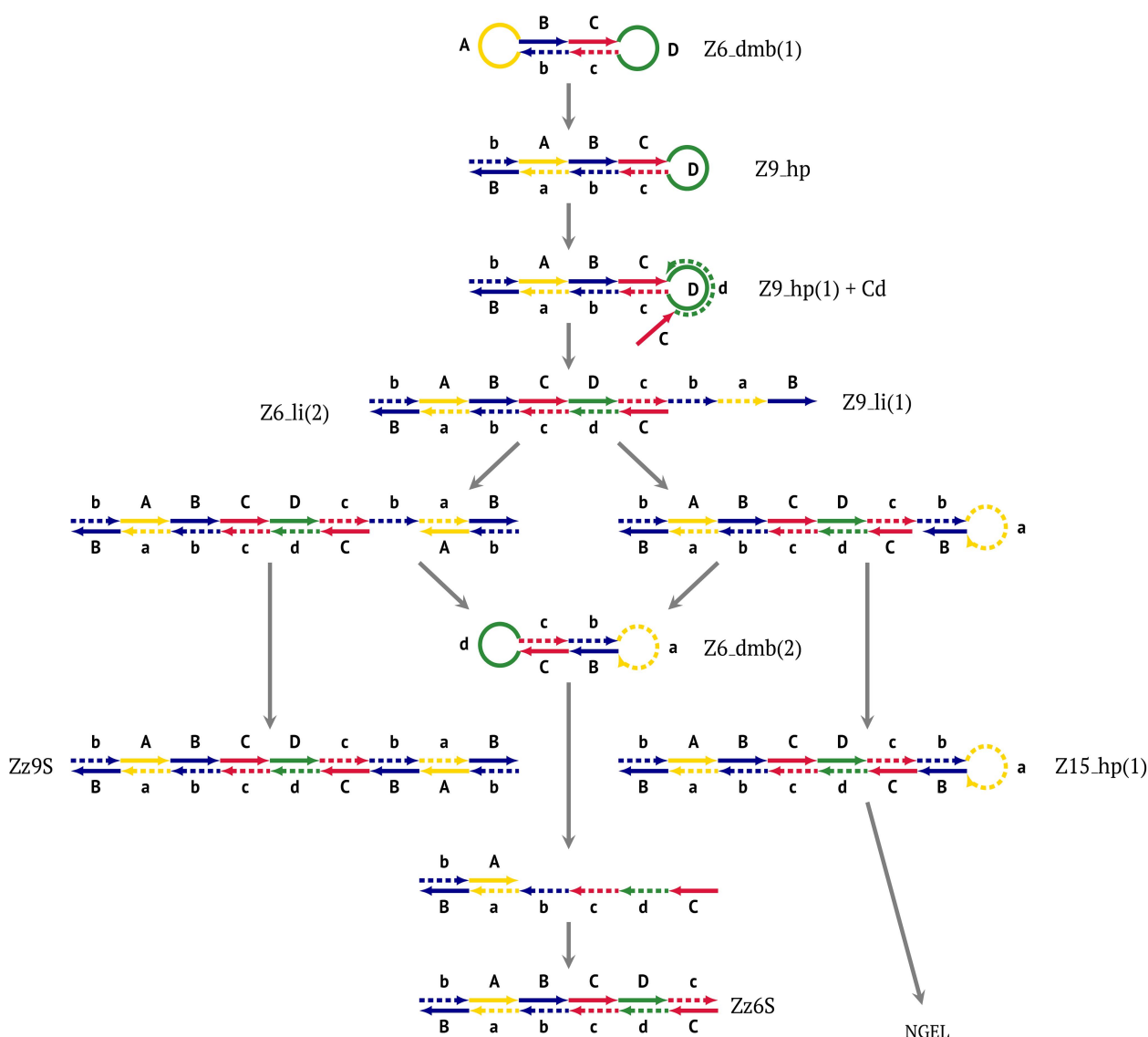
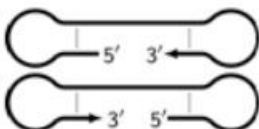
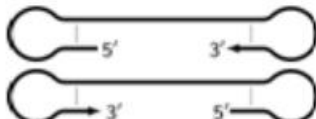
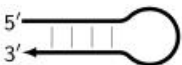
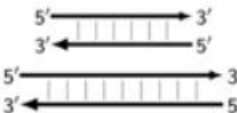


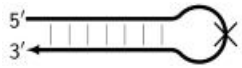
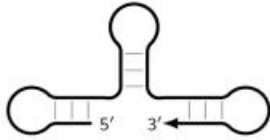
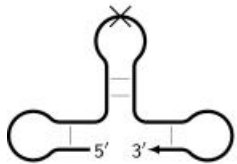
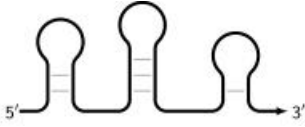
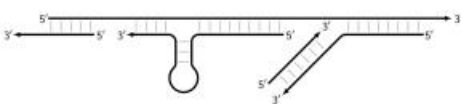
Рисунок 3 - Схема протекания первого этапа экспоненциальной фазы LAMP.

Цепь Z6_dmb(1) оказывается пригодной как для отжига праймера Cd, что приводит к тупиковому лампликону Zz6S, так и для самопраймирования, что приводит к шпильчатой структуре Z9_hp(1). На ней способен отжечься вновь праймер Cd, удлинение которого превратит Z9_hp(1) в линейаризованный вариант Z9_li(1). Далее на цепи Z9_li(1) отождется праймер bA, что приведет к тупиковому лампликону Zz9S и к другой гантелеподобной структуре Z6_dmb(2), затем Z9_li(1) за счет самопраймирования даст Z15_hp(1). Z6_dmb(2) будет претерпевать те же превращения, что и Z6_dmb(1). Таким образом, в рамках одного LAMP-цикла в классическом варианте реакции сформируется шесть промежуточных продуктов и четыре тупиковых лампликона, а также во внешний контур выйдут две удлиненные шпильчатые структуры Z15_hp.

Однако в LAMP возникают и некоторые другие типы лампликонов (табл. 1). Вероятность образования тех или иных типов продуктов зависит от их локальной первичной структуры и не может быть предсказана с высокой точностью.

Таблица 1 - Типы продуктов в классической LAMP.

Рисунок	Название	Краткое описание
Промежуточные продукты реакции LAMP		
	Z_dmb(1) Z_dmb(2)	Структуры в виде одно-/двухцепочечной ДНК, напоминающие гантель (dumbbell). Буква Z (zone) сопровождается численным значением, соответствующим количеству зон в конкретных продуктах. Z6_dmb(1) и Z6_dmb(2) - основные типы лампликонов, запускающие каскады построения цепей ДНК и обеспечивающие экспоненциальное размножение.
	Z9_dmb(1) Z9_dmb(2)	Удлиненные dmb структуры в виде одно-/двухцепочечной ДНК, аналогичные Z6_dmb, но отличающиеся длиной межпетлевых участков за счет разного числа зон.
	Z_hr	Структура в виде одноцепочечной ДНК (петля) и двухцепочечной ДНК (стержень), напоминающая шпильку. Возникает из Z_dmb.
	Z_li	Одно-/двухцепочечная структура ДНК (linear), возникающая при линеаризации шпильчатой структуры Z_hr и превращающаяся затем в новую структуру Z_hr большего размера и при этом генерирующая структуры Z_dmb меньшего(их) размера(ов).
Тупиковые (Stop) лампликоны в реакции LAMP		
	ZzS	Полностью двухцепочечная структура ДНК (например Zz9S), порождаемая достройкой полимеразой какой-либо структуры типа Z_li или Z_dmb (в данном случае Z9_li или Z9_dmb) и неспособная к дальнейшему размножению.

	Z_hpS	Структура, напоминающая шпильку (hairpin) в виде двухцепочечной ДНК (стержень) и одноцепочечной ДНК (петля), на которой (петле) не может отжечься очередной праймер, что отмечено перечеркиванием петли.
Другие нестабильные продукты LAMP-реакции		
	Z_dmb_hp	Гантелеподобная структура с выпетливанием в стержневой части, на петле которой также способен отжечься один из внутренних праймеров с последующей элонгацией и смещением цепей.
	Z_dmb_hp	Гантелеподобная структура с выпетливанием в стержневой части, на петле которой не способны отжечься внутренние праймеры, что символизирует перечеркивание петли
	Z_mtlp	Возникающая на поздних стадиях одно-/двухцепочечная ДНК, содержащая множественные различные выпетливания (multiple loops), также способная принимать участие в дальнейшей амплификации
	cauliflower-like	Возникающая на поздних стадиях высокомолекулярная одно-/двухцепочечная ДНК, несущая отжегшиеся друг на друге цепи в хаотичном порядке. Ограниченно годна для дальнейшей амплификации.

Две разные цепи Z15_hp, выйдя за пределы LAMP-цикла, приведут к дальнейшему росту цепей ДНК и сформируют новые самоудлиняющиеся шпильчатые структуры. Помимо основного LAMP-цикла (Z6→Z9→Z6) выявлено протекание LAMP-циклов большего размера: Z9→Z15→Z9, Z15→Z27→Z15 и т.д., которые генерируют LAMP-циклы меньших размеров (рис. 4).

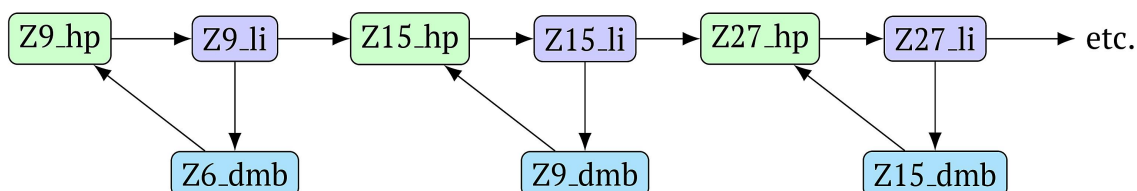


Рисунок 4 - «Круговорот» лампликонов в LAMP-реакции.

Таким образом, основная линия генерации лампликонов в сторону их удлинения выглядит как $Z_6 \rightarrow Z_9 \rightarrow Z_{15} \rightarrow Z_{27} \rightarrow Z_{51} \rightarrow Z_{99} \rightarrow \dots$. Для другой линии выстроится иной ряд: $Z_{18} \rightarrow Z_{33} \rightarrow Z_{63} \rightarrow Z_{123} \rightarrow \dots$. Здесь важно заметить, что зонами самопраймирования выступают только 'с' и 'В'. Это необходимо учитывать при дизайне праймерных систем, обращая особое внимание на 5'-концы праймеров bA и Cd. За счет самопраймирования увеличение количества зон в лампликонах подчиняется формуле:

$$Z_i = 2Z_{i-1} - 3.$$

Для экспериментального подтверждения изложенных выше закономерностей размножения и структуры цепей лампликонов было проведено нанопоровое секвенирование продуктов LAMP-амплификации кДНК вируса Y картофеля. Было получено несколько тысяч ридов, биоинформатический анализ которых выявил наличие ожидаемых структур. В качестве одного из примеров можно привести достаточно протяженную последовательность, содержащую чередующиеся тройки зон (рис. 5). Чередование зон в нем полностью соответствует закономерностям размножения лампликонов в классической LAMP.

2. Номенклатура продуктов LAMP с дополнительными праймерами.

Существует несколько модификаций LAMP, направленных на повышение эффективности этой реакции. Так, ранее был предложен вариант LAMP со множественными внутренними праймерами, но его главными недостатками являются большая длина мишени и высокая вероятность получения ложнопозитивных результатов. В данной работе предложен новый вариант в виде псевдо-полувложенной LAMP (MIP-LAMP), который подразумевает использование одного дополнительного внутреннего праймера (рис. 6). Преимуществом является то, что добавляется всего два места отжига, что не сильно увеличивает длину мишени, но при этом обеспечивается более высокий уровень размножения цепей ДНК.

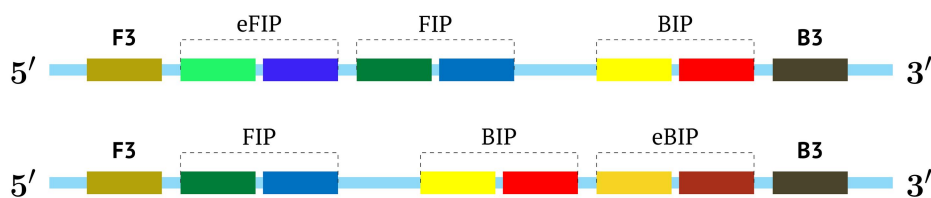


Рисунок 6 - Схемы расположения зон отжига праймеров на мишени в MIP-LAMP в двух ее вариантах (eFIP and eBIP - дополнительные внутренние праймеры).

В ходе преамплификационной фазы MIP-LAMP формируется два типа структур: $bABCD_c$ (Z6_dmb(1)) и $bABCDMN_m$ (Z8_dmb(1)). При их вхождении в LAMP-цикл появятся симметричные им структуры $Cdcba_B$ (Z6_dmb(2)) и $Mnmdcba_B$ (Z8_dmb(2)) (рис. 7):

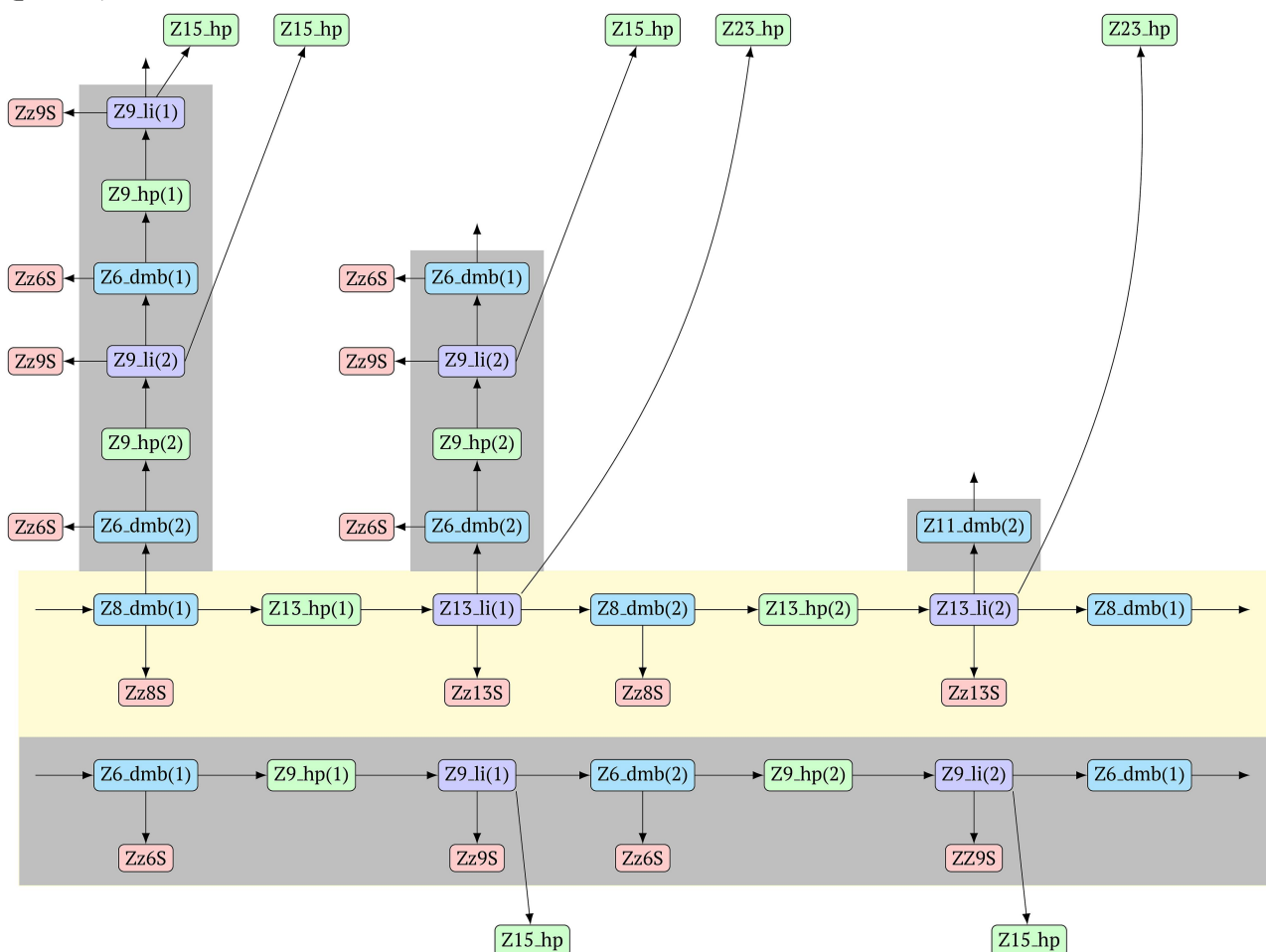


Рисунок 7 - Каскад циклических процессов, протекающих в MIP-LAMP. Желтым фоном показана последовательность основных событий LAMP-цикла, начиная с вхождения в циклический процесс одновременно Z8_dmb(1) и Z6_dmb(1), образовавшихся в ходе преамплификации. Серым фоном выделены позже начинающиеся процессы амплификации, идущие в рамках основного цикла до момента, когда завершится полный цикл основной реакции. Красным цветом обозначены тупиковые лампиконы. Горизонтальными линиями ограничен основной каскад циклических процессов, за пределы которых во внешний контур, переходя к стадии NGEL, выходят лампиконы Z15_hp и Z23_hp.

3. Альтернативные варианты LAMP-реакции.

Традиционные варианты LAMP разработаны для обнаружения нуклеотидных последовательностей, которые являются частью протяженных цепей НК. В этом случае элонгация LAMP-праймеров обеспечивает образование гантелеобразной структуры, амплификация которой приводит к множественным лампликонам увеличивающихся размеров. Реакцию LAMP можно использовать и для обнаружения таких мишеней, как миРНК или другие короткоцепочечные НК. Нами предлагается два подхода для обнаружения миРНК с помощью LAMP. Первый был назван mirLAMP (рис. 8):

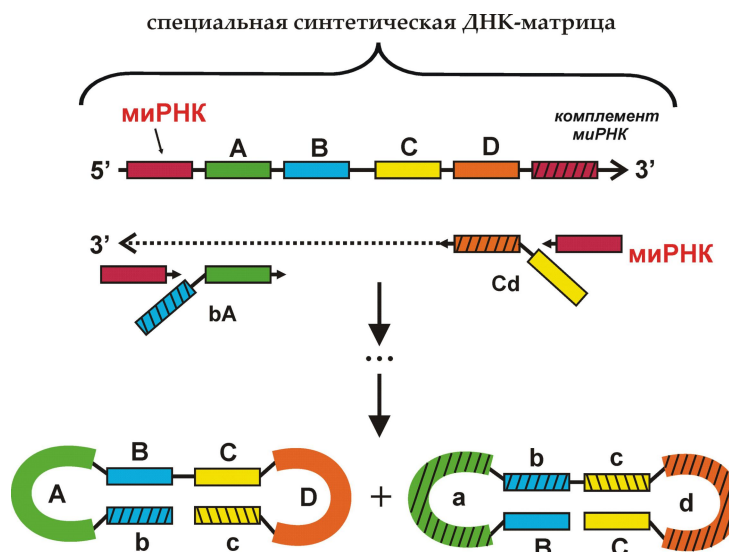


Рисунок 8 - Структура специальной ДНК-матрицы и праймеров и принцип обнаружения миРНК с помощью mirLAMP.

Ключевым компонентом является ДНК-матрица, последовательность которой содержит участки отжига праймеров bA и Cd. На 5'-конце данной матрицы находится последовательность, полностью гомологичная последовательности анализируемой миРНК, а на 3'-конце – комплементарная ей. Преамплификационная стадия LAMP запускается за счет отжига первого праймера (по схеме это праймер Cd) и миРНК, элонгация которой обеспечивает вытеснение цепи, построенной за счет элонгации Cd. На вновь построенной цепи отжигается второй праймер (bA) и миРНК. В результате образуются гантелеобразные структуры, запускающие стандартные LAMP-циклы.

Второй подход был назван ligLAMP (рис. 9). В случае ligLAMP ключевыми структурами являются специальные олигонуклеотидные пробы HP-L и HP-R, представляющие собой ДНК-шпильки со "свисающим" 5'- (HP-R) или 3'-концом (HP-L). Концевые мотивы комплементарны последовательности анализируемой миРНК. При ее наличии в реакционной смеси происходит отжиг проб "встык" на миРНК, и при добавлении лигазы протекает лигирование и образование гантелеобразной структуры, далее запускающей стандартные LAMP-циклы:

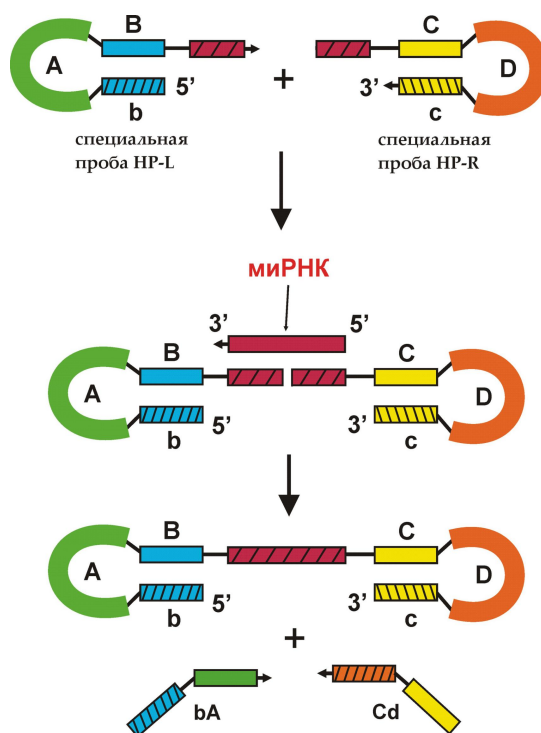


Рисунок 9 - Структура специальных HP-проб и принцип обнаружения миРНК с помощью ligLAMP.

Предлагаемые выше подходы mirLAMP и ligLAMP требуют конструирования специальных ДНК-матрицы и проб, что не позволяет осуществить ни одна из известных программ подбора LAMP-праймеров.

4. Алгоритмы дизайна LAMP-праймеров.

Для подбора праймеров могут быть применены математические алгоритмы поиска подстроки в более длинной строке. Самыми популярными среди них являются прямой поиск, алгоритм Бойера-Мура, Ахо-Корасик и ряд других. Однако для LAMP необходимо подбирать большее количество праймеров по сравнению с ПЦР, поэтому существующие алгоритмы подходят для этой цели не в полной мере.

Одним из критериев подбора праймеров является температура отжига (T_m). Известно несколько формул расчета T_m , самой популярной является формула (1):

$$T_m = 81.5 + 16.6 \cdot (\log_{10}[Na^+]) + 0.41 \cdot (\%G + \%C) - \frac{600}{length} \quad (1)$$

где $length$ – размер амплифицируемого участка, $[Na^+]$ – молярная концентрация однозарядного катиона, $\%G + \%C$ – содержание dG и dC.

На ее основе нами была выведена формула (2):

$$T_m = 78.327 + 17.127 \cdot (\lg[Na^+]) + 0.461 \cdot (GC_{ij}) - \frac{491.84}{L}, \quad (2)$$

где L – длина праймера, GC_{ij} – содержание dG и dC (%).

Расчетные значения, полученные по формуле (2), сопоставлялись с таковыми, полученными по формуле (1) и с помощью web-ресурса OligoAnalyzer. В качестве модели задавали праймеры различной длины (от 18 до 51 нт, с шагом в 3 нт) и с различным GC-составом: 40, 50 и 60% (рис. 10):

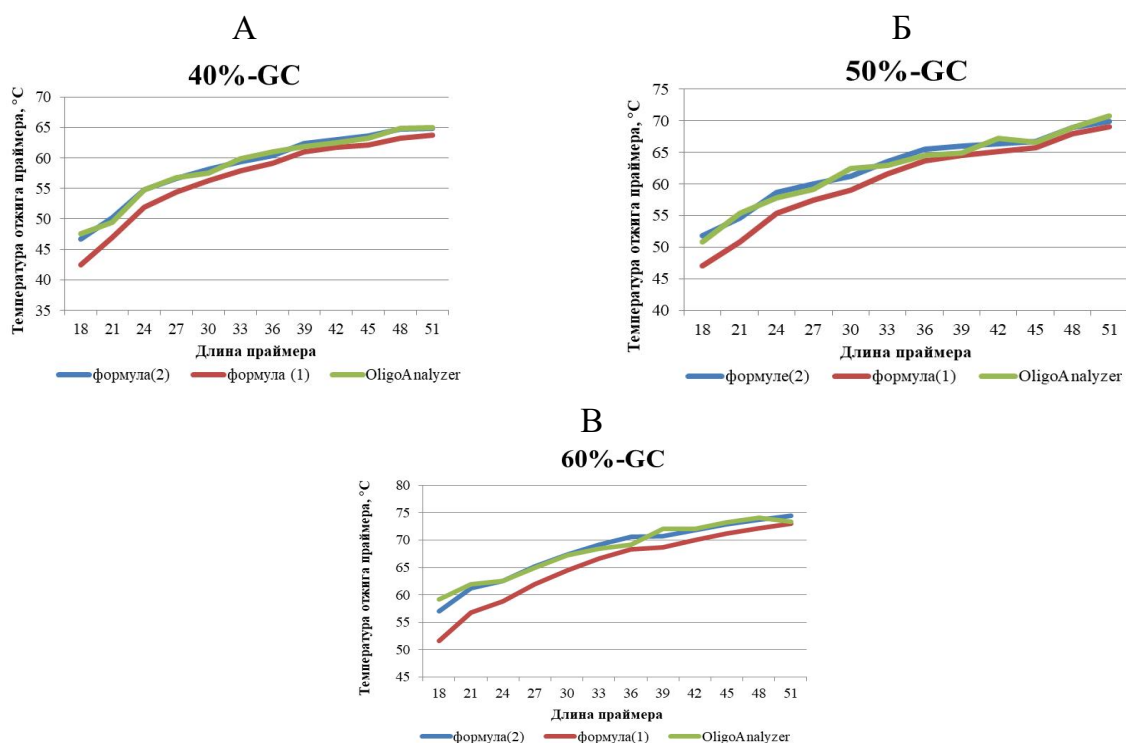


Рисунок 10 – Сравнение значений T_m , полученных с помощью разных формул.

Оказалось, что значения, полученные с помощью формулы (2), ближе к значениям, полученным с OligoAnalyzer, поэтому в дальнейшую работу взяли формулу (2). Был разработан собственный алгоритм поиска праймеров, по которому на первом этапе определяется GC-состав и исключаются фрагменты с идущими подряд четырьмя одинаковыми нуклеотидами. Далее вычисляются T_m и GC-состав; при их соответствии заданным параметрам происходит переход к следующему шагу, а в противном случае – к шагу 1. Затем осуществляется проверка на возможность образования гомо- и гетеродимеров. При их отсутствии последовательность добавляется в массив праймеров.

Данный алгоритм был заложен в работу пяти новых компьютерных программ. Базовой стала программа LAMPprimers iQ, написанная на языке программирования Python. Она считывает FASTA-файлы, текстовые файлы и последовательности, вставленные через буфер обмена. Код программы находится в открытом доступе: https://github.com/Restily/LAMPprimers-iQ/blob/main/lamp/start_lamp.py. На рисунке 11 представлены основное окно программы (рис. 11А) и визуализация работы программы (рис. 11Б):

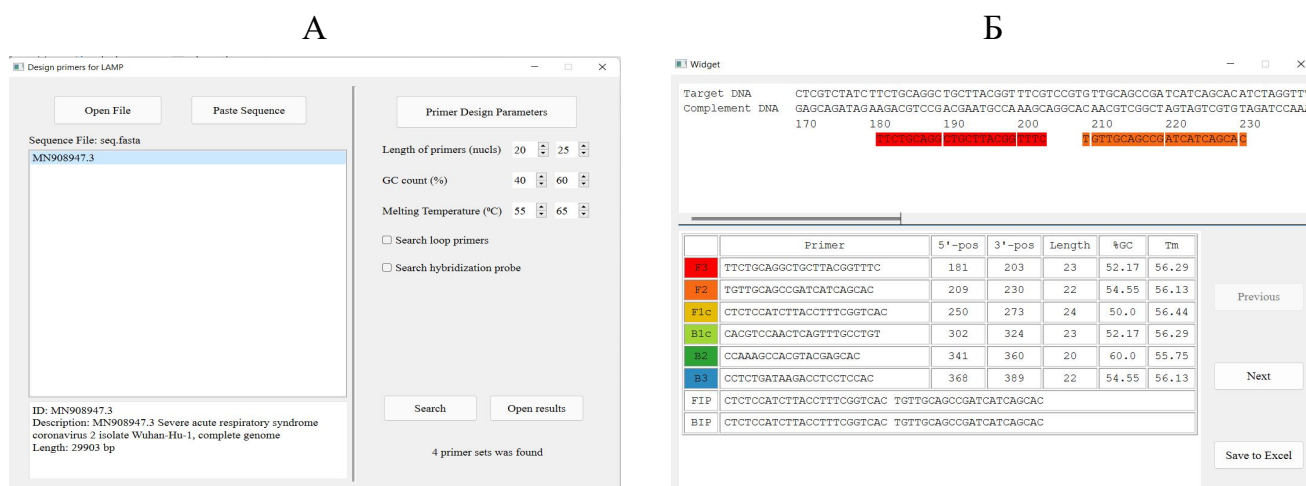


Рисунок 11 – Интерфейс программы LAMPrimers iQ.

Функционал программы LAMPrimers iQ тестировали на примере генома фага *Lambda*. В таблице 2 приведено количество наборов праймеров, подбираемых программой в зависимости от заданных критериев подбора (GC-состав, разница Tm в одном наборе, размер амплифицируемой области). Оказалось, что наибольшее влияние на количество наборов оказывает размер амплифицируемой области. Для относительно коротких последовательностей (до 2000 п.о.) подбор занимает менее 1 с (рис. 12), с увеличением длины продолжительность поиска праймеров увеличивается экспоненциально.

Таблица 2 – Количество наборов праймеров в зависимости от заданных параметров поиска

GC%	$\Delta T_m, ^\circ$	максимальный размер амплифицируемой области, п.о.		
		300	230	160
40-60	5	213	119	3
	2	198	184	3
45-55	5	132	80	0
	2	116	64	0
50-60	5	195	185	4
	2	181	164	4
55-65	5	160	147	4
	2	134	105	0

Помимо LAMPrimers iQ, была разработана ее модификация LAMPrimers iQ_loop, позволяющая подбирать дополнительно к основному набору еще и петлевые праймеры. Для псевдо-полувложенной LAMP была написана программа MIP-LAMP – кроссплатформенная десктопная программа на языке C++. Ее работа основана на многопоточном вычислении оптимизированного алгоритма.

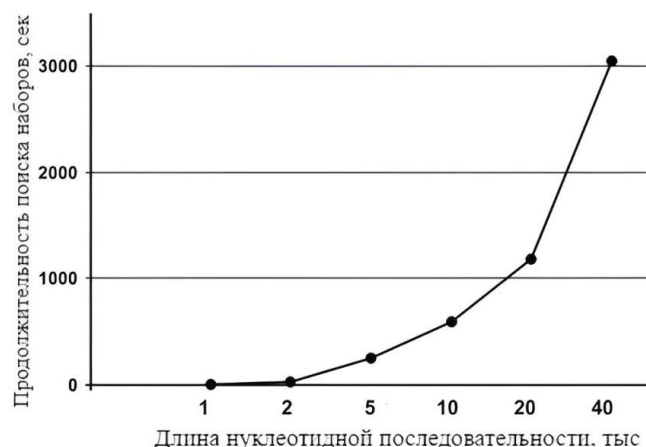


Рисунок 12 - Влияние длины нуклеотидной последовательности на длительность подбора наборов праймеров. Расчетные значения получены на ноутбуке с параметрами: процессор Intel(R) Core(TM) i7-10750H CPU, 6 ядер. 16 ГБ ОЗУ.

Для LAMP-подходов, направленных на обнаружение миРНК, было разработано две программы на языке C++. Первая получила название mirLAMP; она сочетает оптимизацию перебора праймеров с рандомизированной генерацией нуклеотидов. Вторая программа была названа ligLAMP; она предназначена для конструирования одновременно шпилек, лигируемых на миРНК, и подходящих LAMP-праймеров.

5. Обнаружение специфических мишеней с помощью новых вариантов LAMP.

Для оценки качества праймеров, подбираемых с помощью программы LAMPprimers iQ, была проведена серия экспериментов по обнаружению в биологических образцах генетического материала некоторых организмов. Одним из них стал коронавирус SARS-CoV-2. К одному и тому же участку гена *S* этого вируса были подобраны комплекты праймеров с помощью программы LAMPprimers iQ, а также двух альтернативных онлайн доступных программ: фирм New England Biolabs (NEB LAMP) и Eiken Chemical (PrimerExplorer V5). Несмотря на то, что подбор осуществлялся к одному и тому же участку гена, были получены разные праймеры, отличающиеся длиной и T_m .

На рисунке 13 представлены кривые LAMP-амплификации, проведенной с разными комплектами праймеров. Показано, что праймеры, подобранные с помощью программы LAMPprimers iQ, обеспечивают более высокую специфичность анализа, обусловленную снижением скорости протекания неспецифической реакции. Это выражается в отсутствии подъема кривых для образцов отрицательного контроля (L-) в отличие от тестируемых образцов, содержащих генетический материал вируса (L+). Была также оценена чувствительность обнаружения мишени с помощью праймеров, подобранных LAMPprimers iQ. На рисунке 14 красным цветом выделены кривые, соответствующие пяти индивидуальным клиническим образцам.

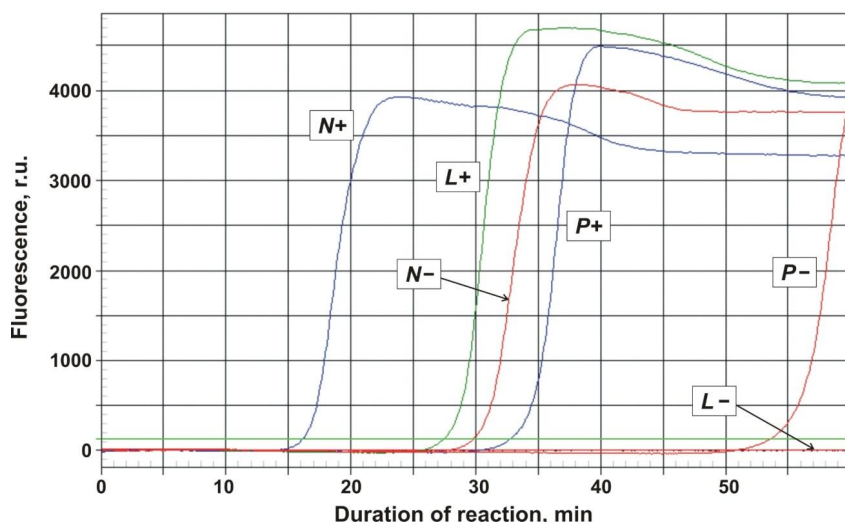


Рисунок 13 – Кривые LAMP-амплификации, проведенной с разными комплектами праймеров: L – праймеры, полученные с помощью LAMPrimers iQ; N – NEB LAMP Primer Design; P – PrimerExplorer; "+" образцы содержали РНК коронавируса SARS-CoV-2; "-" образцы – контрольные образцы (не содержали нуклеиновых кислот).

Путем смешивания этих пяти образцов получали микс, который затем серийно разбавляли в 10, 100 и 1000 раз. Соответствующие этим разбавлениям образцы положительного контроля использовали для оценки чувствительности реакции, а полученные кривые амплификации показаны на рисунке зеленым цветом. Оказалось, что даже при невысоком содержании генетического материала коронавируса праймеры, подобранные с помощью LAMPrimers iQ, позволяют достоверно обнаруживать генетический материал патогена.

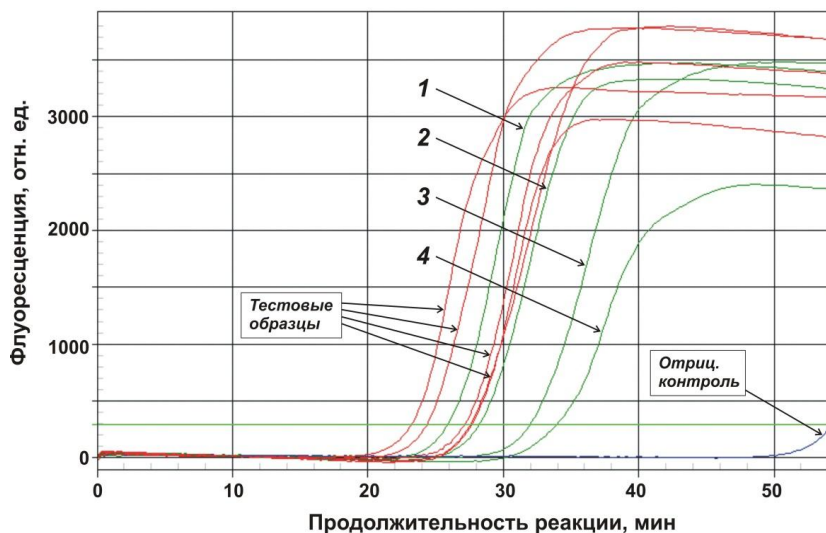


Рисунок 14 - Кривые амплификации, полученные при детекции РНК коронавируса SARS-CoV-2 с использованием праймеров набора L: 1-4 - кривые, соответствующие последовательным разбавлениям смешанного клинического образца Rmix (выделены зеленым цветом: 1 – без разбавления, 2 – разбавление в 10 раз, 3 – в 100 раз, 4 – в 1000 раз). Тестовые образцы – образцы, содержавшие индивидуальные лизаты носоглоточных мазков больных COVID-19 (выделены красным цветом), отрицательный контроль – образец, не содержащий нуклеиновых кислот (выделен синим цветом).

Принципиальную возможность обнаружения НК-мишеней и оценку качества праймеров, подбираемых с помощью программы MIP-LAMP, проводили на примере сравнительной амплификации кДНК вируса *Y* картофеля (рис. 15). Соответствующие образцы содержали либо один, либо два праймера VIP вместе с одним праймером FIP. Показано, что наличие двух праймеров VIP приводит к повышению скорости накопления продуктов реакции. Однако при этом происходит некоторое снижение специфичности, что можно наблюдать по поднимающимся кривым образцов отрицательного контроля.

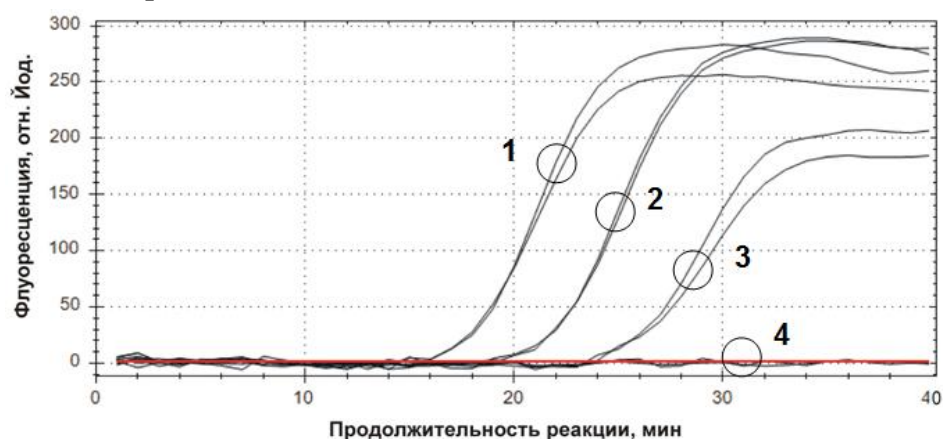


Рисунок 15 - Кривые амплификации, полученные при LAMP-амплификации кДНК вируса *Y* картофеля с использованием праймеров, подобранных программой MIP-LAMP: Образцы 1 – один праймер FIP + два праймера VIP + кДНК вируса *pvY*, Образцы 2 – один праймер FIP + один праймер VIP + кДНК вируса *pvY*, Образцы 3 – один праймер FIP + два праймера VIP без кДНК вируса *pvY*, Образцы 4 – один праймер FIP + один праймер VIP без кДНК вируса *pvY*.

Для технологии *mirLAMP* модельные эксперименты проводили на примере синтетической миРНК-159 мягкой пшеницы. В этом случае показана принципиальная возможность обнаружения мишени, однако требуется тщательный дизайн специальной ДНК-матрицы и кропотливая работа по оптимизации условий анализа, поскольку возможно протекание реакции и в отсутствие мишени (рис. 16).

Оценку возможности обнаружения НК-мишеней с помощью технологии *ligLAMP* также проводили на примере миРНК-159 пшеницы. Тестировали два варианта получения гантелеподобной *dmb*-пробы: с помощью T4 ДНК лигазы и лигазы *Splint(R)*. Последняя рекомендуется для лигирования цепей ДНК на РНК-матрице, однако она менее доступна и значительно дороже, поэтому оценивали применимость ДНК-лигазы T4. Показано, что ее можно использовать для этой цели, однако эффективность реакции для соответствующих образцов в этом случае все же ниже, чем при использовании лигазы *SplintR* (рис. 17).

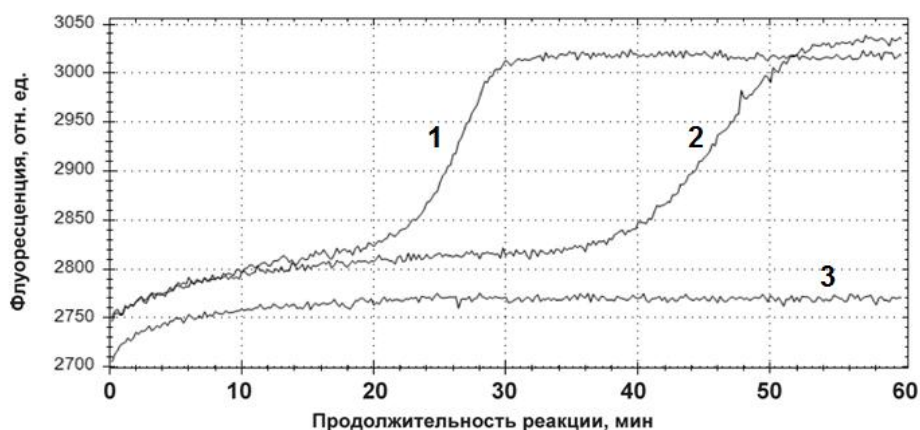


Рисунок 16 - Кривые амплификации, полученные при LAMP-амплификации пробы к миРНК-159 пшеницы *T.aestivum* L. с использованием праймеров, подобранных программой mirLAMP: Образец 1 – присутствие праймеров FIP и BIP + Tae-mir-159 (10^8 копий мишени), Образец 2 – присутствие праймеров FIP и BIP без Tae-mir-159, Образец 3 – отсутствие праймеров FIP и BIP + Tae-mir-159 (10^8 копий мишени).

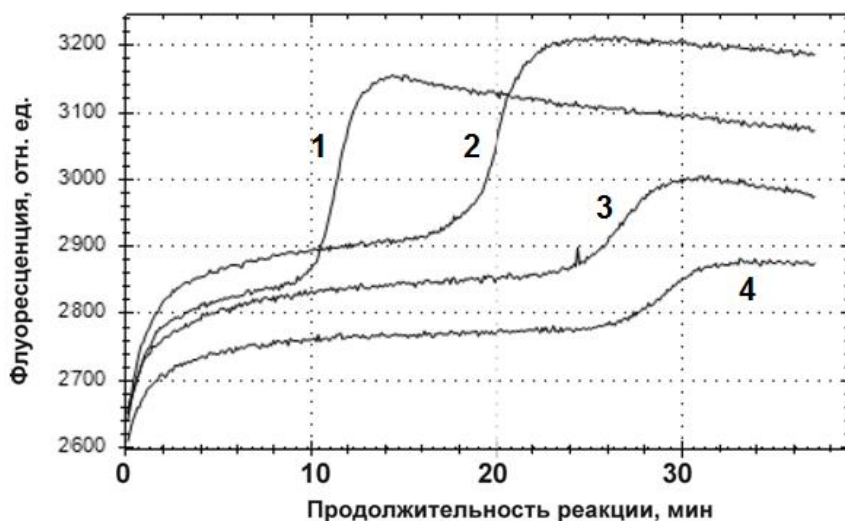


Рисунок 17 - Кривые амплификации, полученные при LAMP-амплификации образцов, полученных лигированием проб НР-R и НР-L на Tae-mir-159 с использованием праймеров, подобранных программой ligLAMP: Образец 1 – лигаза Splint(R) + Tae-mir-159, Образец 2 – ДНК-лигаза T4 + Tae-mir-159, Образец 3 – лигаза Splint(R) без Tae-mir-159, Образец 4 – ДНК-лигаза T4 без Tae-mir-159.

Экспериментальная часть работы выполнена с использованием оборудования ЦКП «Агидель».

ВЫВОДЫ

1. Предложена новая система обозначений зон отжига LAMP-праймеров, основанная на использовании букв латинского алфавита, регистр которых отображает комплементарность соответствующих зон нуклеотидной последовательности. Разработанная система значительно облегчает понимание структуры LAMP-праймеров и лампликонов и обеспечивает более точный подбор праймерных систем, особенно для нетрадиционных вариантов реакции.
2. Удлинение ДНК-цепей происходит в пределах одного LAMP-цикла и описывается уравнением $Z_i = 2Z_{i-1} - 3$. Помимо основного LAMP-цикла $Z6 \rightarrow Z9 \rightarrow Z6$, при протекании LAMP-реакции на ее дальнейших стадиях реализуются LAMP-циклы большего размера ($Z9 \rightarrow Z15 \rightarrow Z9$, $Z15 \rightarrow Z27 \rightarrow Z15 \dots$).
3. Предложено три новых варианта LAMP и смоделированы соответствующие молекулярные системы, пригодные для обнаружения специфических НК-мишеней: ligLAMP и mirLAMP для обнаружения микроРНК и MIP-LAMP для обнаружения любых НК-мишеней с увеличенной скоростью анализа.
4. Оптимизированы критерии и алгоритм подбора специфичных LAMP-праймеров, включающие новую математическую модель расчета температуры отжига праймеров, подразумевающие задание более жестких критериев их отбора и возможность сближения зон отжига с целью уменьшения длины мишени.
5. Разработано пять компьютерных программ дизайна LAMP-праймеров для разных вариантов реакции. Тестирование функционала показало высокую скорость и гибкость выполнения задач при различных параметрах.
6. Показана принципиальная возможность обнаружения специфических НК-мишеней с помощью праймеров, сконструированных разработанными компьютерными программами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ВХОДЯЩИХ В ПЕРЕЧЕНЬ ВАК МОН РФ И МБД

1. **Akhmetzianova L.U.**, Mikhaylenko C.I., Chemeris D.A., Khairitdinov V.D., Sakhabutdinova A.R., Gubaydullin I.M., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V. Modeling a Standard Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction and Its Modification Involving Additional Inner Primers // *Biomolecules*. 2025. 15(5). 690. (WoS, Scopus, ВАК, Q1) – (Глава 2, 3).
2. **Akhmetzianova L.U.**, Davletkulov T.M., Sakhabutdinova A.R., Chemeris A.V., Gubaydullin I.M., Garafutdinov R.R. LAMPprimers iQ: New primer design software for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // *Anal. Biochem.* 2023. 684. 115376. (WoS, Scopus, ВАК, Q3) – (Глава 3)
3. **Ахметзянова Л.У.**, Давлеткулов Т.М., Гарафутдинов Р.Р., Губайдуллин И.М. Применение алгоритма Ахо-Корасик для подбора праймеров для петлевой изотермической амплификации // *Мат. биол. биоинформ.* 2022. 17(2). 250-265. (Scopus, ВАК, Q4) – (Глава 1, 3).
4. **Ахметзянова Л.У.** Компьютерная программа подбора праймеров для LAMP-амплификации // *Adv. Eng. Res.* 2024. 24(1). 98-108. (ВАК) – (Глава 1, 3)

5. **Akhmetzianova L.U.**, Davletkulov T.M., Gubaidullin I.M., Islamgulov A.R. Parallel implementation of the primer search algorithm for loop-mediated isothermal amplification // J. Phys.: Conf. Ser. 2021. 2131(2). 022004. (Scopus, Q4) – (Глава 1, 3)

Свидетельства о регистрации программ для ЭВМ:

1. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022617417 от 20.04.2022. «LAMPrimers iQ (Loop-mediated isothermal amplification Primers iQ)». Авторы: **Л.У. Ахметзянова**, Т.М. Давлеткулов, Р.Р. Гарафутдинов, А.В. Чемерис, И.М. Губайдуллин.
2. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023662840 от 14.06.2023. «Дизайн праймеров для петлевой изотермической амплификации (LAMPrimers iQ_loop)». Авторы: **Л.У. Ахметзянова**, Т.М. Давлеткулов, В.Д. Хайритдинов, Р.Р. Гарафутдинов, И.М. Губайдуллин.
3. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2025617292 от 25.03.2025 Дизайн олигонуклеотидных шпилечных структур для лигирования на поддерживающей матрице и последующей LAMP-амплификации (LigLAMP). Авторы: **Л.У. Ахметзянова**, Р.Х. Арсланова, В.Д. Хайритдинов, Р.Р. Гарафутдинов, А.В. Чемерис.
4. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2025615182 от 03.03.2025 Дизайн праймеров для LAMP-амплификации микроРНК (miRLAMP). Авторы: **Л.У. Ахметзянова**, Р.Х. Арсланова, Р.Р. Гарафутдинов, В.Д. Хайритдинов, А.В. Чемерис, И.М. Губайдуллин.
Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2025663243 от 27.05.2025 Дизайн множественных внутренних праймеров для петлевой изотермической амплификации (MIP-LAMP). Авторы: **Л.У. Ахметзянова**, В.Д. Хайритдинов, Р.Р. Гарафутдинов, А.В. Чемерис

Прочие статьи и тезисы докладов:

1. Kiryanova O. Yu., **Akhmetzianova L.U.**, Kuluev B.R., Gubaydullin I. M., Chemeris A.V. Computer modelling of primers search in the DNA chain // Comp. math. Inform. technol. 2019. V. 1(1). P. 29-34.
2. Кирьянова О.Ю., **Ахметзянова Л.У.**, Губайдуллин И.М. Алгоритмы поиска в задачах анализа нуклеотидных последовательностей с целью однозначной идентификации геномов // Вестник Баш. ун-та. 2020. Т. 25(2). С. 285-290.
3. Kiryanova O.Yu., Kiryanov I.I., **Akhmetzianova L.U.**, Kuluev B.R., Chemeris A.V., Gubaydullin I.M. Parallel implementation of search algorithm for RNA guide design // Сборник: Параллельные вычислительные технологии (ПаВТ'2020). Короткие статьи и описания плакатов. 2020. С. 52-58.
4. **Ахметзянова Л.У.**, Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М. Компьютерное моделирование петлевой изотермической амплификации // Сборник тезисов международной научной конференции «Уфимская осенняя математическая школа». 2020. С. 169-171.
5. **Ахметзянова Л.У.**, Давлеткулов Т.М., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В., Губайдуллин И.М. Параллельный поиск с использованием алгоритма Рабина–Карпа для петлевой изотермической амплификации ДНК // В сборнике: Параллельные вычислительные технологии (ПаВТ-2021). Короткие статьи и описания плакатов. XV международная конференция. Челябинск, 2021. С. 278.

6. Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Мавзютов А.Р., **Ахметзянова Л.У.**, и др. Петлевая LAMP амплификация нуклеиновых кислот. I. Два десятилетия развития и совершенствования // Биомика. 2021. Т. 13(2). С. 176-226.
7. **Ахметзянова Л.У.**, Давлеткулов Т.М., Губайдуллин И.М. Дизайн праймеров для петлевой изотермической амплификации // Сборник тезисов международной научной конференции «Уфимская осенняя математическая школа». 2021. Т. 2. С.144-146.
8. **Akhmetzianova L.U.**, Davletkulov T.M., Garafutdinov R.R., Gubaydullin I.M., Chemeris A.V. Design primers for LAMP-amplification // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022): Abstracts the Thirteenth International Multiconference, Novosibirsk. 2022. P. 24-25.
9. Гарафутдинов Р.Р., **Ахметзянова Л.У.**, Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Петлевая LAMP амплификация нуклеиновых кислот. II. Детекция коронавируса SARS-CoV-2 с помощью различных вариантов обратнo-транскрипционной петлевой амплификации // Биомика. 2023. Т. 15(4). С. 272-290.
10. Khajritdinov V., **Akhmetzianova L.**, Garafutdinov R. Application of CUDA in design of primers for loop-mediated isothermal amplification. В сборнике: Параллельные вычислительные технологии (ПаВТ'2024). Материалы XVIII Всероссийской научной конференции с международным участием. Короткие статьи и описания плакатов. Челябинск. 2024. С. 31-44.