**Рефолдинг белков, образующих поры, в нанопоровом секвенировании**

***Субач М.Ф., Родин В.А., Зверева М.Э.***

*Студент, 4 курс специалитета*

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,*

*Химический факультет, Москва, Россия*

*E–mail: maksim.subach@chemistry.msu.ru*

Нанопоровое секвенирование — метод прямого определения последовательности нуклеотидов в ДНК и РНК последнего поколения, основанный на изменении тока при прохождении через нанопору нуклеотидного остатка (н.о.) цени нуклеиновых кислот вследствие сопоставимости размеров канала поры и гетероциклического основания. Этот метод служит для получения последовательности н.о. длинных прочтений в размере тысяч н.о. без дополнительной биоинформатической сборки или амплификации по сравнению с другими методами секвенирования нового поколения [1].

Для реализации метода создана «ячейка», являющаяся первым гибридом микроэлектроники и биополимеров - нанопора. Такая пора представляет собой канал, сформированный белком и интегрированный в чип, позволяющий определять разницу потенциалов канала.

Для формирования канала используют белки, образующие пору размером порядка нескольких нанометров в мембране (альфа-гемолизин, аэролизин и т.п.) [2]. При проведении анализа НК структура белка, формирующего «продуктивную» нанопору, частично нарушается; белок теряет способность формировать канал и пропускать НК, поэтому актуальной задачей является поиск оптимальных реагентов для рефолдинга белков, формирующих пору, чтобы можно было повторно использовать ячейку.

Одним из реагентов, используемых для разрушения НК-белковых комплексов и рефолдинга белков, является этаноламин. Это хаотропный агент, он ослабляет нековалентные взаимодействия в белках, вызывая локальное разворачивание структуры белка с последующим рефолдингом при снижении концентрации реагента, что способствует превращению в нативную форму [3].

В данной работе было исследовано влияние этаноламина на рефолдинг белка, формирующего нанопоры в «ячейках» R9, производитель Oxford Nanopore Technologies. «Ячейки» промывали растворами 1М этаноламина, 1М этаноламина с 20 мМ HEPES и 10 мМ этаноламина с 20 мМ HEPES в течение 15 минут. Эффект оценивали по изменению потенциала канала с помощью программного обеспечения MinKNOW UI, оценивались следующие параметры: число одиночных пор (функционируют нормально), число «нулевых» пор (через них ток практически не проходит, но потенциально можно их восстановить), число поврежденных пор (пропускают слишком много тока), и число «множественных» пор (несколько пор на один детектор). Получены следующие результаты: 1М этаноламин и 1М этаноламин с 20 мМ HEPES увеличивают число поврежденных пор и уменьшают число нормально функционирующих. Раствор 10 мМ этаноламина с 20 мМ HEPES увеличивает число нормально функционирующих пор и уменьшает число «нулевых» и поврежденных пор. Также при такой промывке увеличивается число «множественных» пор.

**Литература**

1. *Khrenova M. G., Panova T. V., Rodin V. A., Kryakvin M. A., Lukyanov D., Osterman I. A., Zvereva M. I.* Nanopore Sequencing for De Novo Bacterial Genome Assembly and Search for Single-Nucleotide Polymorphism // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol 23(15). P 8569.

2. *Wang S., Zhao Z. , Haque F., Guo P.* Engineering of protein nanopores for sequencing, chemical or protein sensing and disease diagnosis // Current opinion in biotechnology. 2018. Vol 51. P 80-89.

3. *Yamaguchi S., Yamamoto E., Mannen T., Nagamume T.* Protein refolding using chemical refolding additives // Biotechnology journal. 2013. Vol 8(1). P 17-31.