**Модификация и очистка поровых белков для нанопорового секвенирования**

***Петров А.С., Сергеев А.В., Зверева М.Э.***

*Студент, 5 курс специалитета*

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

*Химический факультет, Москва, Россия*

*E–mail:* [*asp2109@yandex.ru*](mailto:asp2109@yandex.ru)

Нанопоровое секвенирование — инновационный метод в молекулярной биологии, основанный на использовании нанометровых пор в роли молекулярных датчиков. Суть метода заключается в пропускании одиночных цепей ДНК или РНК через поровые белки. Изменения в электрическом токе, проходящем через поры, связаны с конкретными нуклеотидами, что позволяет регистрировать последовательность ДНК [1].

Ключевым фактором прогресса в технологии нанопорового секвенирования является постоянное совершенствование поровых белков. Эти белки играют важную роль в правильном распознавании азотистых оснований ДНК.

Технология компании Oxford Nanopore Technology (ONT) прошла три поколения поровых белков: α-гемолизин (Hlyα), MspA, CsgG. В данной работе предлагается пересмотреть использование α-гемолизина с учетом данных по белкам новых поколений, рассмотреть его структурные гомологии и модификации. Гемолизин II (HlyII), структурно гомологичный Hlyα, представляет собой цитолитический порообразующий токсин, продуцируемый бактерией *Bacillus cereus* [2]. Ранее исследованы его способности пропускать ионы и ПЭГ, однако возможность транслокации ДНК остается нерассмотренной.

Проблема α-гемолизина для нанопорового секвенирования заключается в его длинном и узком стволе, смешивающем сигналы соседних нуклеотидов. Таким образом, Hlα с укороченным стволом может представлять собой перспективный белок для секвенирования ДНК.

В данной работе была предпринята попытка тестирования каналов мембран с поровыми белками. Контроль формирования мембран и встраивания в них поровых белков проводили по оценке тока через тестовую ячейку. Были исследованы различные описанные поровые белки: гемолизин II, MspA, Hlyα [2]. Плазмиды на основе векторов pET, кодирующие эти белки, трансформированы в компетентные клетки *E.coli* BL21(DE3). Определены условия экспрессии и выделения белков в денатурирующих условиях, а также рассмотрен вариант рефолдинга в ренатурирующем буфере с добавкой 2М аргинина и 10% глицерина, предложенный И.Н. Зоровым [3].

**Литература**

1. Беркович А.К., Пышкина О.А., Зорина А.А., Родин В.А., Панова Т.В., Сергеев В.Г., Зверева М.Э.. Прямое определение структуры единичных молекул биополимеров с помощью нанопорового севенирования // Успехи биологической химии, 2024. Т. 64. С. 449–478.

2. Rudenko, N.V.; Nagel, A.S.; Melnik, B.S.; Karatovskaya, A.P.; Vetrova, O.S.; Zamyatina, A.V.; Andreeva-Kovalevskaya, Z.I.; Siunov, A.V.; Shlyapnikov, M.G.; Brovko, F.A.; Solonin, A.S. Utilizing Extraepitopic Amino Acid Substitutions to Define Changes in the Accessibility of Conformational Epitopes of the Bacillus cereus HlyII C-Terminal Domain // Int. J. Mol. Sci., 2023. Vol. 24. P. 16437.

3. Sinelnikov I. G. et al. Expression and Refolding of the Plant Chitinase From Drosera capensis for Applications as a Sustainable and Integrated Pest Management // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021. Vol. 9. P. 728501.