

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen111012>

Научная статья

Синтез флуоресцентного РНК-аптамера Broccoli в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

У.А. Шанаа, А.М. Румянцев, Е.В. Самбук, М.В. Падкина

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. РНК-аптамеры — это короткие одноцепочечные олигонуклеотиды, которые могут связываться с молекулами-мишенями с высокой специфичностью и аффинностью. Такие мишени очень разнообразны и могут представлять собой как отдельные ионы, так и целые клетки. РНК-аптамеры широко применяются в биологии и медицине для проведения фундаментальных исследований, а также в практических целях, в терапии и диагностике. В настоящее время, для получения аптамеров РНК в основном используются методы химического синтеза или синтеза *in vitro*. Однако эти методы являются дорогими, трудоемкими и малопродуктивными. Поэтому методы синтеза *in vivo* становятся все более привлекательными для ученых, работающих над оптимизацией производства аптамеров.

Цель данной работы — разработка репортерной системы для оптимизации синтеза малых молекул РНК в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Материалы и методы. Флуоресцентный РНК-аптамер Broccoli был использован для получения репортерной системы, позволяющей оптимизировать условия синтеза коротких РНК *in vivo* в клетках дрожжей. Этот аптамер имеет размер около 112 п.н. и связывается с флуоресцентным красителем DFHBI-1T. Отдельно от аптамера краситель практически не светится. При связывании его с аптамером и облучении светом с длиной волны 482 нм наблюдается эмиссия поглощенного излучения с пиком при 505 нм.

Результаты. Получена репортерная система, обеспечивающая синтез флуоресцентного РНК-аптамера Broccoli в клетках дрожжей *S. cerevisiae*. Транскрипция молекул РНК, содержащих аптамер, обеспечивается за счет регулируемого промотора гена *GAL1*. В синтезируемом транскрипте содержатся рибозимы HN и HDV, которые обеспечивают вырезание последовательности РНК-аптамера.

Выводы. Репортерная система на основе РНК-аптамера Broccoli может быть использована для оптимизации синтеза РНК-аптамеров *in vivo* в клетках дрожжей *S. cerevisiae*. Это является актуальной задачей в связи с активным применением таких аптамеров в научных исследованиях, биотехнологии и медицине.

Ключевые слова: дрожжи; *Saccharomyces cerevisiae*; репортерные системы; флуоресцентные РНК-аптамеры.

Как цитировать:

Шанаа У.А., Румянцев А.М., Самбук Е.В., Падкина М.В. Синтез флуоресцентного РНК-аптамера Broccoli в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Экологическая генетика. 2022. Т. 20. № 4. С. 339–348. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen111012>

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen111012>

Research Article

The synthesis of Broccoli RNA fluorescent aptamer in *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells

Ousama Al Shanaa, Andrei M. Rumyantsev, Elena V. Sambuk, Marina V. Padkina

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

BACKGROUND: RNA aptamers are short, single-stranded oligonucleotides, with remarkable binding ability to target molecules characterized by high specificity and affinity. Such targets are vastly diverse and range from specific ions to entire cells. RNA aptamers are widely used in biology and medicine for basic research, as well as for practical purposes as in therapy and diagnostics. At present, chemical or *in vitro* methods of synthesis are mainly used to obtain RNA aptamers. However, such methods are expensive and time-consuming with low productivity. Therefore, *in vivo* methods are becoming more attractive to researchers working on optimizing high-scale production of RNA aptamers.

AIM: The aim of this work is to develop a reporter system for optimizing the synthesis of small RNA molecules in *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells.

MATERIALS AND METHODS: We used the Broccoli fluorescent RNA aptamer to develop a reporter system allowing us to optimize the conditions for *in vivo* short RNA synthesis in yeast cells. This aptamer is about 112 bp in size and binds to the fluorogenic dye DFHBI-1T. Only upon binding, the aptamer-dye complex exhibits fluorescence properties. After excitation using light with a wavelength of 482 nm, the aptamer-dye complex emission is observed with a peak at 505 nm.

RESULTS: We have designed a reporter system providing the synthesis of the fluorescent Broccoli RNA aptamer in *S. cerevisiae* yeast cells. Transcription of RNA molecules containing the aptamer is carried out by the regulated promoter of the *GAL1* gene. The synthesized transcripts contain the HH and HDV ribozymes to ensure precise cleavage of the RNA aptamer sequences.

CONCLUSIONS: This reporter system is based on the Broccoli RNA aptamer, and it can be used to optimize the *in vivo* synthesis of RNA aptamers in *S. cerevisiae* yeast cells. This work serves an urgent task in connection with the active use of such aptamers in scientific research, biotechnology and medicine.

Keywords: yeast; *Saccharomyces cerevisiae*; reporter systems; fluorescent RNA aptamers.

To cite this article:

Al Shanaa O, Rumyantsev AM, Sambuk EV, Padkina MV. The synthesis of Broccoli RNA fluorescent aptamer in *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. *Ecological genetics*. 2022;20(4):339–348. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen111012>

Received: 29.09.2022

Accepted: 21.10.2022

Published: 22.12.2022

АКТУАЛЬНОСТЬ

Почкующиеся дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* — это одноклеточный организм, принадлежащий к типу *Ascomycetes*. На сегодняшний день эти дрожжи являются одним из наиболее изученных эукариотических организмов [1, 2]. Геном *S. cerevisiae* был секвенирован в 1996 г. первым из геномов эукариот. Он демонстрирует высокую степень сходства в сравнении с геномом человека — для 47 % основных генов *S. cerevisiae* известны соответствующие ортологичные гены человека. Помимо сведений о геноме доступно множество баз данных, содержащих сведения об экспрессии генов и регуляторных сетях, сетях взаимодействия белков, сетях взаимодействия генов, транскриптоме, протеоме и метаболоме [2, 3]. Работа с дрожжами помогает обойти различные экспериментальные или этические ограничения, которые возникают при работе с высшими эукариотами.

Все это позволило успешно использовать *S. cerevisiae* в качестве модельного организма для изучения широкого спектра биологических процессов [4]. За последние 20 лет пять Нобелевских премий были присуждены исследователям, работающим с дрожжами в таких областях, как изучение процессов аутофагии, действия ключевых регуляторов клеточного цикла, транскрипции, функционирования теломер и теломеразы, внутриклеточного транспорта. На основе дрожжевой модели изучались механизмы развития различных болезней человека, таких как онкологические и нейродегенеративные заболевания, наследственные и метаболические нарушения и др. [5].

Ранние исследования генетики дрожжей были сосредоточены на изучении метаболических процессов и их генетического контроля. Это привело не только к выявлению путей синтеза различных аминокислот, азотистых оснований и других соединений в дрожжевых клетках, но и позволило использовать гены ряда ферментов в качестве удобных селективных маркеров. Действительно, маркеры ауксотрофности зарекомендовали себя как полезный инструмент генетического анализа. Наиболее распространенные ауксотрофные маркерные гены включают *URA3*, *LYS2*, *LEU2*, *TRP1*, которые кодируют ферменты, необходимые для синтеза урацила, гистидина, лейцина, триптофана соответственно [6, 7].

У дрожжей *S. cerevisiae* описаны строго регулируемые промоторы, которые можно использовать для эффективной экспрессии генов интереса. *S. cerevisiae* способны использовать галактозу в качестве неферментируемого источника углерода в отсутствие глюкозы. Белок Gal4 представляет собой фактор транскрипции, который связывает активирующую последовательность в промоторах генов *GAL* в присутствии галактозы в питательной среде. Таким образом, осуществляется регуляция экспрессии ряда структурных и регуляторных генов *GAL*, которые обеспечивают внутриклеточный транспорт и метаболизм галактозы [8]. На сегодняшний день исследователи активно

используют промоторные области генов *GAL* для обеспечения экспрессии генов интереса, которая регулируется в ответ на добавление галактозы в среду.

Изученность дрожжей *S. cerevisiae*, а также наличие удобных методов и инструментов работы с ними являются основой для их активного практического использования в биотехнологии в качестве организма-производителя [9, 10]. Одновременно с успешным применением дрожжей для синтеза белков развивается их использование для производства препаратов небелковой природы. Например, с помощью *S. cerevisiae* осуществляется промышленное производство гидрокортизона [11] и артемизиновой кислоты (предшественник противомалярийного артемизинина) [12]. Отдельно следует отметить наличие современных исследований, направленных на использование дрожжей *S. cerevisiae* для производства и доставки коротких молекул РНК, в частности РНК-аптамеров.

Молекулы РНК всегда привлекали большое внимание исследователей в связи с разнообразием выполняемых функций, перечень которых постоянно расширяется. Аптамеры представляют собой одноцепочечные олигонуклеотиды РНК или ДНК, которые обладают характерной пространственной структурой, вследствие чего способны узнавать и с высокой специфичностью связывать различные мишени, такие как нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды, небольшие органические соединения, а также вирусы и клетки [13, 14]. Первые аптамеры на основе нуклеиновых кислот были получены в 1990 г. одновременно в лабораториях Голда и Шостака с использованием технологии SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment — систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения) [15, 16].

Особое положение занимают аптамеры, способные специфично связывать флуоресцентные красители. Примером служит аптамер длиной 112 нуклеотидов, названный Broccoli, который активирует флуоресценцию красителей DFHBI или DFHBI-1T. Отдельно от аптамера красители практически не светятся. При связывании его с аптамером и облучении светом с длиной волны 482 нм наблюдается эмиссия поглощенного излучения с пиком при 505 нм. Аптамер Broccoli имеет более высокое сродство к флуорофорам, и Broccoli-DFHBI-1T дает более яркий сигнал, чем аналогичные аптамеры [17, 18]. Структура аптамера Broccoli и его сравнительно небольшой размер позволяют получать димеры аптамера, что приводит к увеличению флуоресценции примерно на 70 % [19]. РНК-аптамер Broccoli и другие флуоресцентные аптамеры активно используются для визуализации молекул РНК как при проведении *in vitro* экспериментов, так и внутри живых клеток [20].

Помимо применения в научных исследованиях аптамеры активно используются в практических целях. На их основе разработаны тест-системы и биосенсоры, позволяющие выявлять наличие в пробах тяжелых металлов [21], антибиотиков [22, 23], аллергенов [24], различных белков [25]

и даже клеток бактерий [26]. При этом становится необходимым синтезировать большие количества аптамеров. Основными подходами считаются методы химического синтеза [27] и методы, использующие транскрипцию *in vitro* [28]. Однако эти методы очень дорогостоящи и трудоемки. Альтернативой им могут стать подходы, основанные на синтезе аптамеров внутри живых клеток.

На сегодняшний день появляется все больше научных исследований, в которых дрожжи *S. cerevisiae* используют для синтеза коротких молекул РНК [29]. При этом клетки дрожжей рассматривают не только как организм-продуцент, но и в качестве носителя для доставки таких молекул [30]. Вместе с этим при работе с *S. cerevisiae*, а также другими видами дрожжей все чаще используют методы CRISPR-Cas направленного редактирования генома [31, 32]. В основе их применения лежит синтез или доставка в клетки коротких направляющих РНК. Таким образом, необходима разработка удобных репортерных систем, позволяющих быстро и эффективно подбирать оптимальные условия для синтеза коротких функциональных РНК в клетках дрожжей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмиды. В работе использовали плазмиду pYES2 (Invitrogen, США). Последовательность, кодирующая рибозимы HammerHead (HH), Hepatitis Delta Virus (HDV) и аптамеры Broccoli, была синтезирована (Lumiprobe, Россия) и получена в составе плазмиды pUC57 (GenScript, США).

Молекулярные методы. Обработка молекул ДНК эндонуклеазами рестрикции HindIII и XhoI, а также фосфатазой проводили согласно рекомендациям производителя (Сибэнзим, Россия). Лигирование фрагментов ДНК осуществляли с помощью лигазы T4 (Евроген, Россия).

Методы трансформации микроорганизмов. Трансформацию бактерий проводили согласно методике [33], а дрожжей — согласно [34]. Культивирование бактерий проводили при 37 °С, дрожжей — при 30 °С.

Выделение ДНК. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора реактивов «Plasmid Miniprep» (Евроген, Россия) по методике, рекомендованной производителем. Для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля и реакционных смесей использовали набор «Evrogen Cleanup standard kit» (Евроген, Россия).

Штаммы микроорганизмов. Для работы с плазмидной ДНК использовали бактериальный штамм *Escherichia coli* DH5 alpha [генотип F⁻ φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rK⁻, mK⁺)*phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1*] (Thermo Fisher Scientific, США). Для синтеза РНК-аптамера Broccoli использовали штамм дрожжей *S. cerevisiae* D623 (*ura3 lys2 leu2 trp1*).

Условия культивирования микроорганизмов. Для культивирования бактерий использовали среду LB: 1 % триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 1 % NaCl, 2 % агар (если среда твердая). Для селекции трансформантов

в среду добавляли антибиотик ампициллин в концентрации 100 мкг/мл.

Для рутинного культивирования дрожжей использовали среду YEPD: 1 % дрожжевой экстракт, 2 % пептон, 2 % D-глюкоза, 2 % агар (если среда твердая). Для селекции трансформантов и поддержания плазмиды использовали среду MD: 1 % глюкоза; 2,4 % агар (если среда твердая); соли 0,9 мМ CaCl₂, 37,85 мМ (NH₄)₂SO₄, 7,34 мМ KH₂PO₄, 0,95 мМ K₂HPO₄ · 2H₂O, 4 мМ MgSO₄ · 7H₂O, 1,7 мМ NaCl, витамины, микроэлементы и аминокислоты: лизин 5 мг/л, лейцин 5 мг/л, триптофан 5 мг/л. При индукции синтеза целевых молекул РНК использовали среду MG в которую вместо 1 % глюкозы добавляли 1 % галактозы.

Олигонуклеотиды. Для проверки структуры полученной плазмиды pYES2x2Broccoli с помощью методов ПЦР и секвенирования использовали следующие праймеры:

PGAL-F 5'-ACTAGTACGGATTAGAAG-3',
PGAL-R5'-CCTTAATATCCCTATAGTGAGTCG-3',
CYC1-R5'-ATTAAGCCTTCGAGCGTC-3',
Broccoli-2F 5'-CTCGTCGTTGCCATGTGTATGTGG-3',
Broccoli-2R5'-GGCCGTTGCCATGAATGATCC-3'.

ПЦР. Для проведения ПЦР использовали полимеразу Encyclo и набор реактивов «Encyclo Plus PCR kit» (Евроген, Россия). Режим реакции ПЦР: 95 °С — 3 мин, далее 30 циклов: 95 °С — 30 с, 53 °С — 45 с, 72 °С — 90 с.

Секвенирование проводилось в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Анализ флуоресценции клеток дрожжей. Для анализа продукции флуоресцентного РНК-аптамера клетки собирали центрифугированием (здесь и далее 2 мин при 6000 об/мин) из 1 мл среды. Промывали клетки, разводя их в 0,5 мл буфера PBS (200 мг/л KCl : 200 мг/л KH₂PO₄ : 8 г/л NaCl, pH 7,4). После центрифугирования буфер отбирали и разводили клетки в 100 мкл буфера PBS с добавлением красителя DFHBI-1 (концентрация 500 мкМ) и инкубировали в течение 1 ч. После инкубации клетки собирали центрифугированием, дважды промывали от остатков красителя буфером PBS и ресуспендировали в 1 мл буфера PBS. Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием спектрофлуориметра в ресурсном центре СПбГУ «Обсерватория экологической безопасности». При этом использовали следующие длины волн: поглощение — 480 нм, эмиссия — 520 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Разработка репортерной системы на основе аптамера Broccoli

В качестве основы для репортерной системы была выбрана описанная ранее последовательность, состоящая из двух аптамеров Broccoli [35]. К этой последовательности с 3'-конца была добавлена последовательность рибозима Hepatitis Delta Virus (HDV). На 5'-конец была добавлена последовательность рибозима HammerHead (HH). Чтобы обеспечить его правильную укладку были также

добавлены комплементарные друг другу последовательности (плечи гомологии). Ожидаемая вторичная структура синтезированных молекул РНК представлена на рис. 1.

Для того чтобы обеспечить встраивание полученной последовательности в плазмиду pYES2, были добавлены сайты рестрикции HindIII и XhoI. Итоговая последовательность представлена в приложении 1.

Получение плазмиды pYES2x2Broccoli

Разработанная репортерная конструкция была химически синтезирована (LumiProbe, Россия). На следующем этапе работы проводили ее встраивание в дрожжевую плазмиду pYES2. Общая схема конструирования представлена на рис. 2.

Фрагмент, соответствующий репортерной конструкции, вырезали из плазмиды pUC57x2Broccoli, обрабатывая ее последовательно рестриктазами HindIII и XbaI. Проводили препаративный электрофорез в агарозном геле и очищали нужный фрагмент. Плазмиду pYES2 обрабатывали последовательно рестриктазами HindIII и XbaI. Далее дефосфорилировали полученный линейный фрагмент с помощью щелочной фосфатазы. Проводили препаративный электрофорез в агарозном геле и очищали нужный фрагмент плазмиды. Проводили лигирование фрагмента плазмиды pYES2 и репортерной конструкции. Лигазной смесью трансформировали бактерии *E. coli* и отбирали трансформантов на среде с антибиотиком ампициллином.

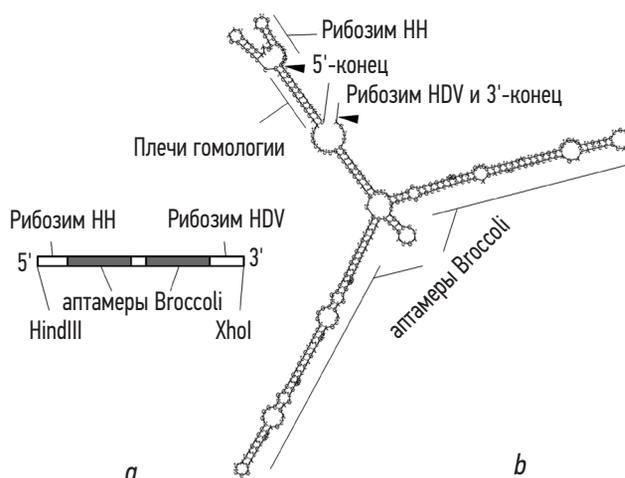


Рис. 1. Схема репортерной конструкции, содержащей tandemный аптамер Broccoli, рибозимы Hammerhead (HH), Hepatitis Delta Virus (HDV) и сайты рестрикции (HindIII и XhoI) (a); вторичная структура основной части конструкции, демонстрирующая правильную укладку рибозима HH за счет добавленных в последовательность комплементарных участков (плеч гомологии) (b)

Fig. 1. Diagram showing the design of the reporter system containing: tandem Broccoli aptamer, Hammerhead (HH) and Hepatitis Delta Virus (HDV) ribozymes, in addition to two restriction sites (HindIII and XhoI) (a); diagram showing the secondary structure of RNA transcript demonstrating the correct folding of the aptamer and the HH ribozyme facilitated by sequence complementarity added to the aptamer sequence (homology arms) (b)

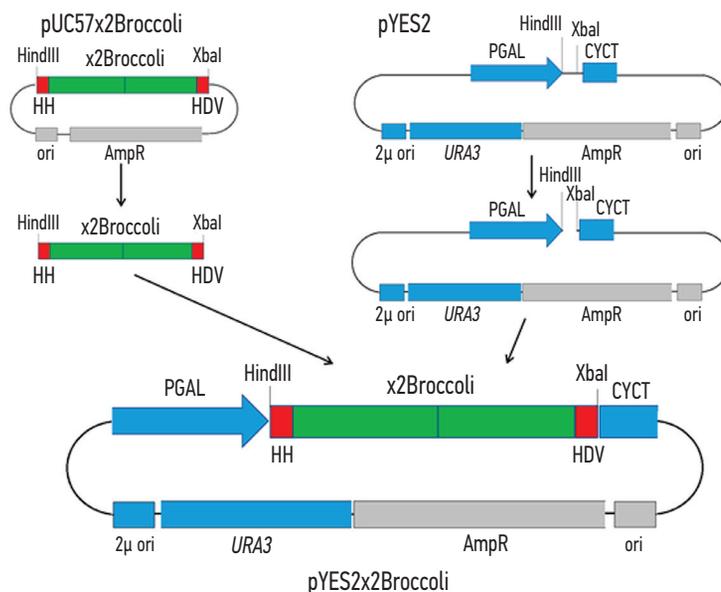


Рис. 2. Общая схема конструирования плазмиды pYES2x2Broccoli. Указаны: элементы репортерной конструкции [красным — рибозимы типов Hammerhead (HH) и Hepatitis Delta Virus (HDV), зеленым — tandemный повтор аптамера Broccoli]; элементы, необходимые для поддержания плазмид в бактериях (серым — бактериальный ориджин репликации ori и ген устойчивости к ампициллину AmpR); элементы, необходимые для поддержания плазмид в клетках дрожжей и экспрессии репортерной конструкции (синим — промотор PGAL, терминатор CYC1, селективный маркер — ген URA3, ориджин репликации 2μ ori)

Fig. 2. Scheme showing the construction of the pYES2x2Broccoli plasmid. The genetic elements of the reporter construct. Hammerhead (HH) and Hepatitis Delta Virus (HDV) ribozymes in red, the tandem repeat of the Broccoli aptamer sequence in green; the necessary plasmid genetic elements for maintaining the vector in bacteria. Origin of replication (ori) and ampicillin resistance gene (AmpR) in grey; the necessary plasmid genetic elements for maintaining the vector in yeasts and for the expression of the reporter construct in blue, including: PGAL promoter, CYC terminator, selectable marker — URA3 gene, origin of replication 2μ ori

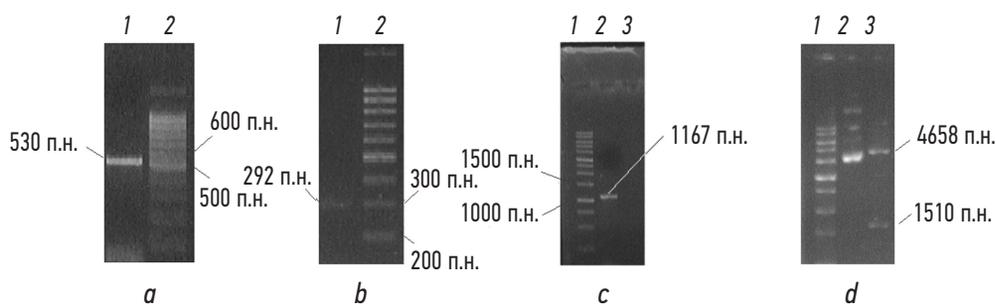


Рис. 3. Электрофореграммы результатов ПЦР-амплификации фрагментов экспрессионной кассеты в составе плазмиды pYES2x2Broccoli (*a-c*) и рестрикционного анализа (*d*): *a*, дорожка 1 — промотор гена *GAL1*, амплифицированный с использованием специфических праймеров PGAL-F и PGAL-R (530 п.н.); *b*, дорожка 1 — тандемный повтор x2Broccoli (292 п.н.), амплифицированный с использованием праймеров Broccoli 2F и Broccoli 2R; *c*, дорожка 2 — полноразмерная кассета экспрессии (1167 п.н.), включающая промотор гена *GAL1*, аптамеры Broccoli, рибозимы HH и HDV и терминатор CYC1, амплифицированная с использованием праймеров PGAL-F и CYC1-R; *d*, дорожка 3 — результаты рестрикционного анализа плазмиды pYES2x2Broccoli, имеющей два сайта рестрикции BglI (один сайт в конструкции экспрессионной кассеты, а другой вне ее), в результате которого наблюдается два фрагмента ДНК: 1510 и 4658 п.н. Использовали маркеры размерами ДНК 100 п.н. и 1 т.п.н. (Евроген). Размеры полученных фрагментов соответствуют теоретически ожидаемым

Fig. 3. Electrophoregrams of the genetic elements of the expression cassette. *a* — *GAL1* promoter gene in lane 1 was amplified using specific PGAL-F-BamHI and PGAL-R primers (530 bp); *b* — x2Broccoli tandem repeat (292 bp) in lane 1 was amplified using Broccoli 2F and Broccoli 2R primers; *c* — total expression cassette (1167 bp) in lane 2 including the reporter construct with *GAL1* promoter, Broccoli aptamers, the pair of ribozymes HH and HDV and CYC1 terminator was amplified using PGAL-F and CYC1-R primers; *d* — restriction analysis of the pYES2x2Broccoli plasmid using BglI restriction enzyme in lane 3 (6168 bp) at two BglI restriction sites, one within the expression cassette construct and the other is not, resulting in two DNA fragments: 1510 bp and 4658 bp. 100 bp and 1 kbp DNA ladders (Evrogen) were used as DNA size markers. All sizes of the amplified fragments correspond to the theoretically expected ones

Из полученных трансформантов выделяли плазмидную ДНК и анализировали ее с помощью методов ПЦР и рестрикционного анализа (рис. 3). С помощью секвенирования полученной плазмиды с использованием праймеров PGAL-F и CYC1-R подтвердили наличие репортерной конструкции в полученной плазмиде pYES2x2Broccoli.

Экспрессия репортерной конструкции в клетках дрожжей *S. cerevisiae*

Плазмидой pYES2x2Broccoli трансформировали полученный ранее в лаборатории штамм дрожжей *S. cerevisiae* D623 (*ura3 lys2 leu2 trp1*). Проводили отбор на селективной среде MD без урацила за счет восстановления

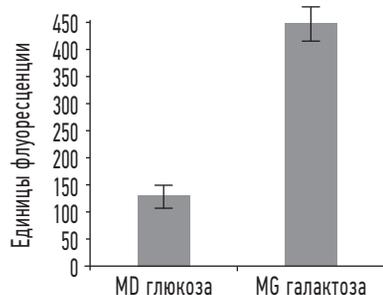


Рис. 4. Средние значения флуоресценции (при длине волны 520 нм) суспензий клеток дрожжей *S. cerevisiae*, инкубированных в средах с глюкозой и галактозой. Измерения проводили в четырех повторностях. Указан 95 % доверительный интервал

Fig. 4. Average fluorescence values (at a wavelength of 520 nm) of *S. cerevisiae* cell suspensions incubated in media with glucose and galactose, respectively. The measurements were carried out for 4 replicas. 95% CI is shown

прототрофности у трансформантов, получивших плазмиду pYES2x2Broccoli с селективным маркером *URA3*.

У отобранных трансформантов анализировали экспрессию репортерной конструкции. Для этого их выращивали в 20 мл жидкой среды MD с глюкозой в течение 24 ч. После наращивания биомассы клетки центрифугировали и переносили в 20 мл среды MG с галактозой (опытные пробы) либо в 20 мл среды MD с глюкозой. Клетки инкубировали в течение 24 ч. При этом в среде с галактозой происходила индукция промотора гена *GAL1* и синтез РНК с аптамером Broccoli.

После инкубирования измеряли плотность клеточных культур и доводили их до одинакового значения ($OD_{600} = 0,5$ за счет разведения водой). Далее анализировали синтез флуоресцентного РНК-аптамера за счет измерения флуоресценции клеток, инкубированных в растворе красителя DFHBI-1 (рис. 4).

При инкубировании клеток полученных трансформантов в средах с галактозой происходила активация промотора гена *GAL1* в составе плазмиды pYES2x2Broccoli. В результате происходила экспрессия репортерной конструкции и синтез аптамера Broccoli. Он взаимодействовал с проникающим в клетки красителем DFHBI-1, что приводило к их свечению. При инкубировании клеток в средах с глюкозой промотор гена *GAL1* был репрессирован. Не происходило синтеза аптамера Broccoli и не наблюдалось флуоресценции.

Таким образом, было продемонстрировано, что полученная в работе плазмиды pYES2x2Broccoli обеспечивает синтез и функционирование флуоресцентных РНК-аптамеров Broccoli в клетках дрожжей *S. cerevisiae*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для широкого использования РНК аптамеров необходимо совершенствовать методы их получения. В настоящее время РНК аптамеры нарабатывают, в основном, за счет трудоемких методов химического или ферментативного синтеза *in vitro*. Синтез РНК аптамеров *in vivo* является перспективным направлением развития РНК нанотехнологии [36]. Подобный подход позволит не только получать необходимые молекулы РНК, но и исследовать их свойства и стабильность внутри клеток.

В качестве организма продуцента в данной работе были использованы дрожжи *S. cerevisiae*. Изученность этого вида дрожжей позволит эффективно исследовать влияние синтеза РНК-аптамеров на клетки эукариот, а также выявить основные факторы, влияющие на стабильность синтезируемых молекул РНК. У дрожжей *S. cerevisiae* отсутствует собственная система РНК-интерференции, что может способствовать стабильному поддержанию синтезируемых аптамеров РНК. В перспективе клетки дрожжей могут стать не только системой синтеза, но и обеспечить доставку аптамеров и других коротких молекул РНК в организмы млекопитающих [29].

В данном исследовании была получена удобная репортерная система для оптимизации синтеза малых молекул РНК в клетках дрожжей и изучения их стабильности. В основе данной системы лежит использование тандемного флуоресцентного РНК-аптамера Broccoli. Уровень синтеза аптамера в клетках *S. cerevisiae* может быть измерен за счет изменения флуоресценции красителя DFHBI-1 при взаимодействии с РНК-аптамером. При таком подходе нет необходимости в выделении малых молекул РНК из клеток дрожжей для анализа их количества. Полученная репортерная система позволит быстро и эффективно подбирать условия для синтеза РНК-аптамеров в клетках *S. cerevisiae*.

В предложенной системе РНК-аптамер Broccoli синтезируется в составе первичного транскрипта за счет активности промотора гена *GAL1*. Таким образом, экспрессия репортерной конструкции строго регулируется в зависимости от источника углерода в среде. При наличии в среде глюкозы синтез подавлен. Индукция происходит при культивировании клеток в среде с галактозой. За счет этого возможно выращивать культуру штамма-продуцента в среде с глюкозой, а затем проводить индукцию синтеза РНК аптамера у всей биомассы клеток. Подобные двухстадийные схемы культивирования используются при синтезе рекомбинантных белков в клетках дрожжей и позволяют значительно снизить уровень протеолиза. Сходным образом такой подход позволит избежать деградации синтезируемого РНК-аптамера.

Вырезание функционального аптамера Broccoli из первичного транскрипта происходит за счет рибозимов HN и HDV. Эффективность этого подхода уже была показана, и он применяется для синтеза направляющих РНК в живых клетках при использовании методов CRISPR-Cas направленного редактирования генома [24]. Таким образом, предложенная репортерная система также может быть использована и для оптимизации синтеза таких направляющих РНК в клетках дрожжей *S. cerevisiae*.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли равный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого автора: У. Аль Шанаа — лабораторное исследование, анализ полученных данных, написание текста, обзор литературы; Е.В. Самбук — концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста; А.М. Румянцев — лабораторное исследование, концепция и дизайн исследования, написание текста, сбор и обработка материалов, обзор литературы; М.В. Падкина — концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-34-90139/20 (У.А.Ш.).

ADDITIONAL INFORMATION

Author contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study. Contribution of the each authors: O. Al Shanaa — laboratory research, analysis of the obtained data, writing of the text, literature review; E.V. Sambuk — concept and design of the study, analysis of the obtained data, writing of the text; A.M. Rummyantsev — laboratory research, concept and design of the study, writing of the text, collection and processing of materials, literature review; M.V. Padkina — the concept and design of the study, the analysis of the data obtained, the writing of the text.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Funding source. The study was supported by funds from Russian Foundation for Basic Research under contract No. 20-34-90139/20 (O.A.S.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barnett J.A. A history of research on yeasts 10: foundations of yeast genetics // *Yeast*. 2007. Vol. 24, No. 10. P. 799–845. DOI: 10.1002/yea.1513
2. Botstein D., Fink G.R. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology // *Genetics*. 2011. Vol. 189, No. 3. P. 695–704. DOI: 10.1534/genetics.111.130765
3. Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., et al. Life with 6000 Genes // *Science*. 1996. Vol. 274, No. 5287. P. 546–567. DOI: 10.1126/science.274.5287.546
4. Karathia H., Vilaprinyo E., Sorribas A., Alves R. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, No. 2. ID e16015. DOI: 10.1371/journal.pone.0016015
5. Bolotin-Fukuhara M., Dumas B., Gaillardin C. Yeasts as a model for human diseases // *FEMS Yeast Research*. 2010. Vol. 10, No. 8. P. 959–960. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2010.00693.x
6. Guthrie C., Fink G.R. Guide to yeast genetics and molecular biology. Academic Press, Cambridge, 1991. 194 p.
7. Pronk J.T. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research // *Appl Environ Microbiol*. 2002. Vol. 68, No. 5. P. 2095–2100. DOI: 10.1128/AEM.68.5.2095-2100.2002
8. Lohr D., Venkov P., Zlatanova J. Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network // *FASEB J*. 1995. Vol. 9, No. 9. P. 777–787. DOI: 10.1096/fasebj.9.9.7601342
9. Nielsen J. Yeast systems biology: model organism and cell factory // *Biotechnol J*. 2019. Vol. 14, No. 9. ID e1800421. DOI: 10.1002/biot.201800421
10. Macreadie I., Dhakal S. “The awesome power of yeast” // *Microbiology Australia*. 2022. Vol. 43, No. 1. P. 19–21. DOI: 10.1071/ma22007
11. Szczebara F.M., Chandelier C., Villeret C., et al. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast // *Nat Biotechnol*. 2003. Vol. 21, No. 2. P. 143–149. DOI: 10.1038/nbt775
12. Paddon C.J., Westfall P.J., Pitera D.J., et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin // *Nature*. 2013. Vol. 496, No. 7446. P. 528–532. DOI: 10.1038/nature12051
13. Klussmann S. The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides And Their Applications // John Wiley & Sons. 2006. 500 p. DOI: 10.1002/3527608192
14. Lee J.F. Aptamer Database // *Nucleic Acids Research*. 2004. Vol. 32, No. S1. P. 95D–D100. DOI: 10.1093/nar/gkh094
15. Ellington A.D., Szostak J.W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands // *Nature*. 1990. Vol. 346. P. 818–822. DOI: 10.1038/346818a0
16. Tuerk C., Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase // *Science*. 1990. Vol. 249, No. 4968. P. 505–510. DOI: 10.1126/science.2200121
17. Filonov G.S., Moon J.D., Svensen N., Jaffrey S.R. Broccoli: rapid selection of an RNA mimic of green fluorescent protein by fluorescence-based selection and directed evolution // *J Am Chem Soc*. 2014. Vol. 136, No. 46. P. 16299–16308. DOI: 10.1021/ja508478x
18. Paige J.S., Wu K.Y., Jaffrey S.R. RNA Mimics of Green Fluorescent Protein // *Science*. 2011. Vol. 333, No. 6042. P. 642–646. DOI: 10.1126/science.1207339
19. Filonov G.S., Kam C.W., Song W., Jaffrey S.R. In-gel imaging of RNA processing using broccoli reveals optimal aptamer expression strategies // *Chem Biol*. 2015. Vol. 22, No. 5. P. 649–660. DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.04.018
20. Song W., Strack R.L., Jaffrey S.R. Imaging bacterial protein expression using genetically encoded RNA sensors // *Nat Methods*. 2013. Vol. 10, No. 9. P. 873–875. DOI: 10.1038/nmeth.2568
21. McConnell E.M., Nguyen J., Li Y. Aptamer-based biosensors for environmental monitoring // *Front Chem*. 2020. Vol. 8. ID434. DOI: 10.3389/fchem.2020.00434
22. Wiedman G.R., Zhao Y., Mustaev A., et al. An Aptamer-based biosensor for the azole class of antifungal drugs // *mSphere*. 2017. Vol. 2, No. 4. ID e00274–17. DOI: 10.1128/mSphere.00274-17.
23. Wu S., Zhang H., Shi Z., et al. Aptamer-based fluorescence biosensor for chloramphenicol determination using upconversion nanoparticles // *Food Control*. 2015. Vol. 50. P. 597–604. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.10.003
24. Eissa S., Zourob M. *In vitro* selection of DNA aptamers targeting β -lactoglobulin and their integration in graphene-based biosensor for the detection of milk allergen // *Biosens Bioelectron*. 2017. Vol. 91. P. 169–174. DOI: 10.1016/j.bios.2016.12.020
25. Yang Y.B., Yang X.D., Zou X.M., et al. Ultrafine graphene nanomesh with large on/off ratio for high-performance flexible biosensors // *Adv Funct Mater*. 2017. Vol. 27, No. 19. ID 1604096. DOI: 10.1002/adfm.201604096
26. Alizadeh N., Memar M.Y., Moaddab S.R., Kafil H.S. Aptamer-assisted novel technologies for detecting bacterial pathogens // *Biomed Pharmacother*. 2017. Vol. 93. P. 737–745. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.07.011
27. Hoffmann S., Hoos J., Klussmann S., Vonhoff S. RNA aptamers and spiegelmers: synthesis, purification, and post-synthetic PEG conjugation // *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. 2011. Vol. 4. DOI: 10.1002/0471142700.nc0446s46
28. Kartje Z.J., Janis H.I., Mukhopadhyay S., Gagnon K.T. Revisiting T7 RNA polymerase transcription *in vitro* with the Broccoli RNA aptamer as a simplified real-time fluorescent reporter // *J Biol Chem*. 2021. Vol. 296. ID100175. DOI: 10.1074/jbc.RA120.014553
29. Duman-Scheel M. *Saccharomyces cerevisiae* (Baker’s Yeast) as an interfering RNA expression and delivery system // *Curr Drug Targets*. 2019. Vol. 20, No. 9. P. 942–952. DOI: 10.2174/1389450120666181126123538
30. Garrait G., Jarrige J.F., Blanquet-Diot S., Alric M. Genetically engineered yeasts as a new delivery vehicle of active compounds to the digestive tract: *in vivo* validation of the concept in the rat // *Metab Eng*. 2009. Vol. 11, No. 3. P. 148–154. DOI: 10.1016/j.ymben.2009.01.001
31. Phelps M.P., Seeb L.W., Seeb J.E. Transforming ecology and conservation biology through genome editing // *Conserv Biol*. 2020. Vol. 34, No. 1. P. 54–65. DOI: 10.1111/cobi.13292
32. Juergens H., Varela J.A., Gorter de Vries A.R., et al. Genome editing in *Kluyveromyces* and *Ogataea* yeasts using a broad-host-range Cas9/gRNA co-expression plasmid // *FEMS Yeast Res*. 2018. Vol. 18, No. 3. ID foy012. DOI: 10.1093/femsyr/foy012
33. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *J Mol Biol*. 1983. Vol. 166, No. 4. P. 557–580. DOI: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8
34. Meilhoc E., Teissie J. Electrotransformation of *Saccharomyces cerevisiae* // *Methods Mol Biol*. 2020. Vol. 2050. P. 187–193. DOI: 10.1007/978-1-4939-9740-4_21
35. Filonov G.S., Jaffrey S.R. RNA Imaging with dimeric Broccoli in live bacterial and mammalian cells // *Curr Protoc Chem Biol*. 2016. Vol. 8, No. 1. P. 1–28. DOI: 10.1002/9780470559277.ch150174

36. Nelissen F.H., Leunissen E.H., van de Laar L., et al. Fast production of homogeneous recombinant RNA — towards large-scale

production of RNA // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40, No. 13. P. e102. DOI: 10.1093/nar/gks292

REFERENCES

1. Barnett JA. A history of research on yeasts 10: foundations of yeast genetics. *Yeast.* 2007;24(10):799–845. DOI: 10.1002/yea.1513
2. Botstein D, Fink GR. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics.* 2011;189(3):695–704. DOI: 10.1534/genetics.111.130765
3. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, et al. Life with 6000 Genes. *Science.* 1996;274(5287):546–567. DOI: 10.1126/science.274.5287.546
4. Karathia H, Vilaprinyo E, Sorribas A, Alves R. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS One.* 2011;6(2): e16015. DOI: 10.1371/journal.pone.0016015
5. Bolotin-Fukuhara M, Dumas B, Gaillardin C. Yeasts as a model for human diseases. *FEMS Yeast Research.* 2010;10(8):959–960. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2010.00693.x
6. Guthrie C, Fink GR. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology.* Academic Press, Cambridge, 1991. 194 p.
7. Pronk JT. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(5):2095–2100. DOI: 10.1128/AEM.68.5.2095-2100.2002
8. Lohr D, Venkov P, Zlatanova J. Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB J.* 1995;9(9):777–787. DOI: 10.1096/fasebj.9.9.7601342
9. Nielsen J. Yeast systems biology: model organism and cell factory. *Biotechnol J.* 2019;14(9): e1800421. DOI: 10.1002/biot.201800421
10. Macreadie I, Dhakal S. “The awesome power of yeast”. *Microbiology Australia.* 2022;43(1):19–21. DOI: 10.1071/ma22007
11. Szczebara FM, Chandelier C, Villeret C, et al. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat Biotechnol.* 2003;21(2):143–149. DOI: 10.1038/nbt1775
12. Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature.* 2013;496(7446):528–532. DOI: 10.1038/nature12051
13. Klussmann S. *The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications* // John Wiley & Sons. 2006. 500 p. DOI: 10.1002/3527608192
14. Lee JF. Aptamer Database. *Nucleic Acids Research.* 2004;32(S1):95D–D100. DOI: 10.1093/nar/gkh094
15. Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 1990;346:818–822. DOI: 10.1038/346818a0
16. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 1990;249(4968):505–510. DOI: 10.1126/science.2200121
17. Filonov GS, Moon JD, Svensen N, Jaffrey SR. Broccoli: rapid selection of an RNA mimic of green fluorescent protein by fluorescence-based selection and directed evolution. *J Am Chem Soc.* 2014;136(46):16299–16308. DOI: 10.1021/ja508478x
18. Paige JS, Wu KY, Jaffrey SR. RNA mimics of green fluorescent protein. *Science.* 2011;333(6042):642–646. DOI: 10.1126/science.1207339
19. Filonov GS, Kam CW, Song W, Jaffrey SR. In-gel imaging of RNA processing using broccoli reveals optimal aptamer expression strategies. *Chem Biol.* 2015;22(5):649–660. DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.04.018
20. Song W, Strack RL, Jaffrey SR. Imaging bacterial protein expression using genetically encoded RNA sensors. *Nat Methods.* 2013;10(9):873–875. DOI: 10.1038/nmeth.2568
21. McConnell EM, Nguyen J, Li Y. Aptamer-based biosensors for environmental monitoring. *Front Chem.* 2020;8:434. DOI: 10.3389/fchem.2020.00434
22. Wiedman GR, Zhao Y, Mustaev A, et al. An aptamer-based biosensor for the azole class of antifungal drugs. *mSphere.* 2017;2(4): e00274–17. DOI: 10.1128/mSphere.00274-17.
23. Wu S, Zhang H, Shi Z, et al. Aptamer-based fluorescence biosensor for chloramphenicol determination using upconversion nanoparticles. *Food Control.* 2015;50:597–604. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.10.003
24. Eissa S, Zourob M. *In vitro* selection of DNA aptamers targeting β -lactoglobulin and their integration in graphene-based biosensor for the detection of milk allergen. *Biosens Bioelectron.* 2017;91:169–174. DOI: 10.1016/j.bios.2016.12.020
25. Yang YB, Yang XD, Zou XM, et al. Ultrafine graphene nanomesh with large on/off ratio for high-performance flexible biosensors. *Adv Funct Mater.* 2017;27(19):1604096. DOI: 10.1002/adfm.201604096
26. Alizadeh N, Memar MY, Moaddab SR, Kafil HS. Aptamer-assisted novel technologies for detecting bacterial pathogens. *Biomed Pharmacother.* 2017;93:737–745. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.07.011
27. Hoffmann S, Hoos J, Klussmann S, Vonhoff S. RNA aptamers and spiegelmers: synthesis, purification, and post-synthetic PEG conjugation. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.* 2011;4. DOI: 10.1002/0471142700.nc0446s46
28. Kartje ZJ, Janis HI, Mukhopadhyay S, Gagnon KT. Revisiting T7 RNA polymerase transcription *in vitro* with the Broccoli RNA aptamer as a simplified real-time fluorescent reporter. *J Biol Chem.* 2021;296:100175. DOI: 10.1074/jbc.RA120.014553
29. Duman-Scheel M. *Saccharomyces cerevisiae* (Baker’s Yeast) as an interfering RNA expression and delivery system. *Curr Drug Targets.* 2019;20(9):942–952. DOI: 10.2174/1389450120666181126123538
30. Garrait G, Jarrige JF, Blanquet-Diot S, Alric M. Genetically engineered yeasts as a new delivery vehicle of active compounds to the digestive tract: *in vivo* validation of the concept in the rat. *Metab Eng.* 2009;11(3):148–154. DOI: 10.1016/j.ymben.2009.01.001
31. Phelps MP, Seeb LW, Seeb JE. Transforming ecology and conservation biology through genome editing. *Conserv Biol.* 2020;34(1): 54–65. DOI: 10.1111/cobi.13292
32. Juergens H, Varela JA, Gorter de Vries AR, et al. Genome editing in *Kluyveromyces* and *Ogataea* yeasts using a broad-host-range Cas9/gRNA co-expression plasmid. *FEMS Yeast Res.* 2018;18(3): foy012. DOI: 10.1093/femsyr/foy012
33. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983;166(4):557–580. DOI: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8
34. Meilhoc E, Teissie J. Electrotransformation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol.* 2020;2050:187–193. DOI: 10.1007/978-1-4939-9740-4_21
35. Filonov GS, Jaffrey SR. RNA Imaging with dimeric broccoli in live bacterial and mammalian cells. *Curr Protoc Chem Biol.* 2016;8(1): 1–28. DOI: 10.1002/9780470559277.ch150174
36. Nelissen FH, Leunissen EH, van de Laar L, et al. Fast production of homogeneous recombinant RNA — towards large-scale production of RNA. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(13):e102. DOI: 10.1093/nar/gks292

Приложение 1 / Appendix 1

Последовательность экспрессионной кассеты в составе плазмиды pYES2x2Broccoli

The sequence of the expression cassette in the pYES2x2Broccoli plasmid

Обозначены:

Промотор гена **GAL1** и терминатор **СУС1Т**,

сайты рестрикции **HindIII** и **XbaI**,

последовательности рибозимов **НН** и **HDV**,

последовательность тандема аптамеров **Broccoli**

5'-A**CGGATTAGAAGCCGCCGAGCGGGTGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCTCCCGT**
GCGTCCTCGTCTTACCCGGT**CGCGTTCTCTGAAACGCAGATGTGCCTCGCGCCGCACT**
GCTCCGAACAATAAAGATTCTACAATACTAGCTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAAT
TGGCAGTAACCTGGCCCCACAACCTTCAAATGAACGAATCAAATTAACAACCATA
GGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGGTAATTAATCAGCGAAGC
GATGATTTTTGATCTATTAACAGATATATAAATGCAAAAACCTGCATAACCACITTA
СТААТАCTTTCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAAAAGTAT
СААСААААААТТГТТААТАССТСТАСТТТААСГТСААГГААААААССССС
GATCGGACTACTAGCAGCTGTAATACGACTCACTATAGGGAATATT**AAGCTT****ggaacca**
gtgctgatgagtcctgtaggacgaaacgagtagctcgtc**CACTGGTTCCAATTgTaTTGCTTGCCATGTGTA**
TGTGGGAGACGGTTCGGTCCATCTGAGACGGTTCGGTCCAGATATTCGTATCTGTCC
AGTAGAGTGTGGCTCAGATGTCGAGTAGAGTGTGGCTCCCACATACTCTGATGAT
CCAGACGGTTCGGTCCATCTGAGACGGTTCGGTCCAGATATTCGTATCTGTGAGTA
GAGTGTGGCTCAGATGTCGAGTAGAGTGTGGCTGGATCATTTCATGGCAA**ggttcagcc**
eggcatggtcccagctcctcgtgctgcccggctgggcaacatgcttcggcatgccaatgggacacaggccccctttcttgcgat**TC**
TAGA**GGGCCGCA****TCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCA**
CATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTT
ATTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTT
TTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAG
GTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTC**GGC-3'**

ОБ АВТОРАХ

***Усама Аль Шанаа**, мл. научн. сотр. кафедры генетики и биотехнологии; адрес: Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1462-1687>; eLibrary SPIN: 7453-9258; e-mail: st072427@student.spbu.ru

Андрей Михайлович Румянцев, канд. биол. наук, мл. научн. сотр. кафедры генетики и биотехнологии; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1744-3890>; eLibrary SPIN: 9335-1184; Scopus: 55370658800; e-mail: rumyantsev-am@mail.ru

Елена Викторовна Самбук, д-р биол. наук, профессор кафедры генетики и биотехнологии; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0837-0498>; eLibrary SPIN: 8281-8020; Scopus: 6603061322; e-mail: e.sambuk@spbu.ru

Марина Владимировна Падкина, д-р биол. наук, профессор кафедры генетики и биотехнологии; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4051-4837>; SPIN: 7709-0449; Scopus: 6602596755; e-mail: m.padkina@spbu.ru

AUTHORS' INFO

***Ousama Al Shanaa**, Junior Research Associate of the Department of Genetics and Biotechnology; address: 7/9 Universitetskaya em., Saint Petersburg, 199034, Russia; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1462-1687>; eLibrary SPIN: 7453-9258; e-mail: st072427@student.spbu.ru

Andrei M. Rumyantsev, Cand. Sci. (Biol.), Junior Research Associate of the Department of Genetics and Biotechnology; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1744-3890>; eLibrary SPIN: 9335-1184; Scopus: 55370658800; e-mail: rumyantsev-am@mail.ru

Elena V. Sambuk, Dr. Sci. (Biol.), Professor of the Department of Genetics and Biotechnology; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0837-0498>; eLibrary SPIN: 8281-8020; Scopus: 6603061322; e-mail: e.sambuk@spbu.ru

Marina V. Padkina, Dr. Sci. (Biol.), Professor of the Department of Genetics and Biotechnology; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4051-4837>; SPIN: 7709-0449; Scopus: 6602596755; e-mail: m.padkina@spbu.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author