



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 23/201 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2020140839, 11.12.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.12.2020

Дата регистрации:
19.07.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.12.2020

(45) Опубликовано: 19.07.2021 Бюл. № 20

Адрес для переписки:

660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, 66,
кв. 144, Морячков Роман Владимирович

(72) Автор(ы):

Морячков Роман Владимирович (RU),
Слатинская Ольга Вадимовна (RU),
Щугорева Ирина Андреевна (RU),
Заблуда Владимир Николаевич (RU),
Соколов Алексей Эдуардович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"АПТАСАЙЕНС" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: Galarreta B. C. et al., *Microfluidic
channel with embedded SERS 2D platform for
the aptamer detection of ochratoxin A*, *Analytical
and bioanalytical chemistry*, 2013, Т. 405, N 5, с.
1613-1621. WO 2015023741 A1, 19.02.2015. WO
2013103408 A1, 11.07.2013. RU 2626576 C1,
28.07.2017. RU 2210986 C2, 27.08.2003.

(54) Способ определения пространственной структуры биомолекул

(57) Реферат:

Использование: для определения пространственной структуры биологических молекул олигонуклеотидов, таких как ДНК/РНК-аптамеры. Сущность изобретения заключается в том, что осуществляют измерение малоуглового рентгеновского рассеяния от биомолекул в растворе, определение структурных параметров, измерение спектров гигантского комбинационного рассеяния, моделирование полноатомной модели пространственной структуры биомолекулы олигонуклеотида, при этом при построении полноатомной модели структуры биомолекулы олигонуклеотида используются его олигонуклеотидная последовательность, построенные на её основе

наиболее вероятные вторичные структуры, отдельные уникальные для молекулы полосы спектров гигантского комбинационного рассеяния в диапазоне 600-1800 см⁻¹, из которого извлекается и формируется набор данных о межатомных связях в молекуле, ответственных за образование элементов вторичной и третичной структур, а также прохождение валидации картины малоуглового рентгеновского рассеяния от модели на соответствие картине рассеяния от монодисперсного раствора с молекулами олигонуклеотида. Технический результат: обеспечение возможности получения пространственной структуры биологических молекул олигонуклеотидов высокого разрешения.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
G01N 23/201 (2021.05)

(21)(22) Application: **2020140839, 11.12.2020**

(24) Effective date for property rights:
11.12.2020

Registration date:
19.07.2021

Priority:

(22) Date of filing: **11.12.2020**

(45) Date of publication: **19.07.2021** Bull. № 20

Mail address:

**660036, g. Krasnoyarsk, ul. Akademgorodok, 66,
kv. 144, Moryachkov Roman Vladimirovich**

(72) Inventor(s):

**Moriachkov Roman Vladimirovich (RU),
Slatinskaia Olga Vadimovna (RU),
Shchugoreva Irina Andreevna (RU),
Zabluda Vladimir Nikolaevich (RU),
Sokolov Aleksei Eduardovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**OBShchESTVO S OGRANICHENNOI
OTVETSTVENNOSTIu "APTASAIENS" (RU)**

(54) **METHOD FOR DETERMINING SPATIAL STRUCTURE OF BIOMOLECULES**

(57) Abstract:

FIELD: molecular biology.

SUBSTANCE: invention is aimed to determine the spatial structure of biological oligonucleotide molecules, such as DNA/RNA aptamers. The essence of the invention consists in measuring small-angle X-ray scattering from biomolecules in solution, determining structural parameters, measuring giant Raman scattering spectra, modeling a full-atomic model of the spatial structure of an oligonucleotide biomolecule, while constructing a full-atomic model of the structure of an oligonucleotide biomolecule, its oligonucleotide sequence is used, the most probable secondary structures based on it, separate bands of giant Raman

scattering spectra unique for the molecule in the range of 600-1800 cm^{-1} , from which a set of data on interatomic bonds in the molecule responsible for the formation of elements of secondary and tertiary structures is extracted and formed, as well as the validation of the small-angle X-ray scattering pattern from the model for compliance with the scattering pattern from a monodisperse solution with oligonucleotide molecules.

EFFECT: providing the possibility of obtaining the spatial structure of biological molecules of high-resolution oligonucleotides.

1 cl

Изобретение относится к области биотехнологии, может применяться для определения пространственной структуры биологических молекул олигонуклеотидов.

Изучение пространственной структуры биологических молекул является актуальной задачей, необходимой для построения полноатомных моделей биологических
5 макромолекул олигонуклеотидов, используемых в терапевтических и диагностических целях; анализа их структуры и функциональных свойств; идентификации активных сайтов - участков поверхности молекулы, которые непосредственно участвуют в специфическом связывании данных олигонуклеотидов с их молекулярными мишенями, в основном белками; для проведения процедуры молекулярного докинга - взаимного
10 пространственного сопоставления молекулы олигонуклеотида и его мишени на предмет выяснения наиболее вероятных участков связывания биомолекул.

Известен способ определения структуры высокого разрешения биомолекул с помощью рентгеноструктурного анализа - дифракции рентгеновских лучей на кристаллической решётке вещества с помощью выращивания кристалла из биомолекул
15 одного типа в специальных условиях, различающихся в зависимости от типа биомолекул [Nunn CM, Van Meervelt L, Zhang SD, Moore MH, Kennard O. DNA-drug interactions. The crystal structures of d(TGTACA) and d(TGATCA) complexed with daunomycin. J Mol Biol. 1991;222(2):167-77.], [Ruigrok VJ, Levisson M, Hekelaar J, Smidt H, Dijkstra BW, van der Oost J. Characterization of aptamer-protein complexes by X-ray crystallography and alternative
20 approaches. Int J Mol Sci. 2012;13(8):10537-52.]. Таким способом изучено порядка четверти белков человека и других организмов.

Недостатком способа является то, что на данный момент нет отработанных методов по определению третичной структуры биомолекул, которые не поддаются кристаллизации, поэтому ведутся поиски других способов построить молекулярную
25 модель белков и нуклеиновых кислот в растворе.

Известен способ изучения структуры биомолекул в растворе с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса [Wüthrich K. NMR with proteins and nucleic acids //Europhysics News. – 1986. – Т. 17. – №. 1. – С. 11-13.], [Adrian M, Heddi B, Phan AT. NMR spectroscopy of G-quadruplexes. Methods. 2012;57(1):11-24].

Недостатком способа является необходимость внесения изотопов в состав молекулы, замещаая ими оригинальные атомы. Для этого обычно используется выращивание бактерий, экспрессирующих данный белок, в изотопной среде. Таким образом происходит замена в аминокислотах атомов углерода ^{12}C на ^{13}C , азота ^{14}N на ^{15}N , которые дают резонанс. В итоге данный метод выходит довольно затратным.
30 Нуклеиновые кислоты синтезируются искусственно, для этого необходимо использовать изотопированные нуклеотиды как сырьё, что более затратно в производстве, чем производство изотопированных белков.

Известен способ получения информации о наличии элементов вторичной структуры с помощью измерения кругового дихроизма [Paramasivan S, Rujan I, Bolton PH. Circular dichroism of quadruplex DNAs: applications to structure, cation effects and ligand binding. Methods. 2007;43(4):324-31.]. Метод удобен для отслеживания перехода между двумя различными конформациями в молекуле олигонуклеотида. Недостатком метода является то, что он даёт информацию только о некоторых типичных элементах вторичной структуры, к примеру, таких, как двойная спираль, G-квадруплекс.

Известен способ определения структуры многоатомной молекулы [патент РФ №2260791, МПК G01N23/04, опубл. 20.09.2005], основанный на исследовании рассеянных образцом зондирующих частиц.

Недостатком способа является то, что для биомолекул нуклеиновых кислот с

количеством 10-100 нуклеотидов, как используется в ДНК/РНК-аптамерах, необходима высокая интенсивность рентгеновского излучения, либо электронов для того, чтобы получить приемлемую картину рассеяния, так как метод применяется на одиночных частицах. На более длинных олигонуклеотидных цепочках применение способа
5 затрудняется в силу гибкости и подвижности самих молекул, что, собственно, является проблемой и для метода рентгеноструктурного анализа.

Известен также способ Фёрстеровского резонансного переноса энергии [Bood M, Sarangamath S, Wranne MS, Grotli M, Wilhelmsson LM. Fluorescent nucleobase analogues for base-base FRET in nucleic acids: synthesis, photophysics and applications. Beilstein journal of
10 organic chemistry. 2018;14:114-29.], который позволяет определить относительные расстояния между нуклеотидами, мечеными флуоресцентными метками, но не показывает всей структуры биомолекулы.

Все вышеизложенное показывает необходимость создания нового способа определения пространственной структуры биологических молекул, лишённого
15 обозначенных недостатков и позволяющего повысить точность определения пространственной структуры биомолекул.

В качестве прототипов взяты способ определения пространственной структуры биомолекул методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) [Feigin L. A., Svergun D. I. Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering. – New York : Plenum
20 Press, 1987.], [Petoukhov M. V., Svergun D. I. Analysis of X-ray and neutron scattering from biomacromolecular solutions //Current opinion in structural biology. – 2007. – Т. 17. – №. 5. – С. 562-571.], [Ikebukuro K., Okumura Y. et al. A novel method of screening thrombin-inhibiting DNA aptamers using an evolution-mimicking algorithm // Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, No. 12 e108] и способ получения спектров гигантского комбинационного рассеяния
25 (ГКР), который уже применялся при изучении взаимодействия ДНК-аптамеров с белками [Yang L. et al. Aptamer-based surface-enhanced Raman scattering (SERS) sensor for thrombin based on supramolecular recognition, oriented assembly, and local field coupling //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2017. – Т. 409. – №. 1. – С. 235-242.], [Pagba C. V. et al. Direct detection of aptamer-thrombin binding via surface-enhanced Raman spectroscopy //Journal of
30 biomedical optics. – 2010. – Т. 15. – №. 4. – С. 047006-047006-8.], [Galarreta B. C. et al. Microfluidic channel with embedded SERS 2D platform for the aptamer detection of ochratoxin A //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2013. – Т. 405. – №. 5. – С. 1613-1621.].

Малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР)

Метод МУРР позволяет исследовать биомолекулы напрямую в жидкости, в буферном
35 растворе, соответствующем нативной, естественной среде изучаемой биомолекулы, при температурных условиях, соответствующих условиям функционирования биомолекулы.

Малоугловое рентгеновское рассеяние представляет собой упругое (без передачи энергии системе) рассеяние рентгеновского излучения с длиной волны обычно в пределах
40 0.1-0.2 нм на электронной плотности вещества. Рассеяние происходит в небольшом диапазоне углов от 0° до 15° от основного пучка, поэтому и называется малоугловым. Исследуемые биомолекулы расположены в растворе, поэтому они не упорядочены в пространстве.

В случае, когда вещество упорядочено в кристаллическую решётку, сигнал от
45 рассеяния будет суммироваться, так как рассеяние на электронной плотности происходит от каждой плоскости решётки в том же направлении, что и от предыдущей. Волны рассеянного излучения интерферируют между собой, что даёт яркие дифракционные пики - мы наблюдаем рентгеновскую дифракцию.

В случае малоуглового рассеяния происходит рассеяние лучей во всех направлениях, при этом равные расстояния между рассеивающими центрами внутри молекулы дают рассеяние на равные углы, вследствие чего на детекторе возникает картина рассеяния, симметричная относительно центра пучка, имеющая различные интенсивности на различных углах относительно центра основного пучка.

Рассеяние рентгеновских лучей происходит на электронной плотности любых молекул, поэтому суммарная картина рассеяния несёт в себе как рассеяние на биомолекулах, находящихся в растворе, так и на молекулах самого буферного раствора. Для получения картины рассеяния именно от самой биомолекулы, производится вычитание сигнала от буферного раствора из сигнала от раствора с образцом.

Техническим результатом прототипа является способ, на основе которого из полученных данных производится расчёт структурных параметров молекулы и построение её пространственной структуры низкого разрешения из псевдоатомов. Ранее был описан способ определения структуры одностежковых нуклеиновых кислот с помощью методов малоуглового рентгеновского рассеяния и молекулярного моделирования [Tomilin, F. N., Moryachkov, R., Shchugoreva, I., Zabluda, V. N., Peters, G., Platunov, M., ... & Ovchinnikov, S. G. Four Steps for Revealing and Validating 3D Structure of Aptamers in Solution by Small Angle X-ray Scattering and Computer Simulation //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2019. – Т. 411. – №. 25. – С. 6723.].

При моделировании полноатомных моделей биомолекул производится проверка корректности построенной модели на соответствие структуре реальной молекулы в растворе с помощью построения картины рассеяния от модели *in silico*, осуществляется так называемый “симулированный прожиг” [Svergun D., Barberato C., Koch M. H. J. CRY SOL—a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates //Journal of applied crystallography. – 1995. – Т. 28. – №. 6. – С. 768-773.].

Недостатками данного прототипа являются отсутствие информации о составе и внутреннем строении молекулы, межатомных взаимодействиях, получение структуры олигонуклеотидов низкого разрешения.

Гигантское комбинационное рассеяние (ГКР)

Комбинационное рассеяние представляет собой неупругое рассеяние света на молекулах, сопровождающееся энергетическим обменом между фотонами и колебательными подуровнями энергии молекулы. В случае комбинационного рассеяния света в спектре рассеянного излучения появляются спектральные линии, которых нет в спектре первичного (возбуждающего) света и отличающиеся от частоты исходного излучения на величину, соответствующую частоте нормальных колебаний молекулы. Число и расположение появившихся линий определяется молекулярным строением вещества, позволяя точно идентифицировать образец [Кэри, П. (1985). Применение спектроскопии КР и РКР в биохимии. (перевод с англ. А. А. С. ; под ред. Б. В. Локшина., Ed.) (Мир). Москва]. Поскольку полосы спектра КР характеризуют колебания химических связей и геометрии рассеивающих молекул, спектроскопия КР находит широкое применение для оценки конформационных изменений исследуемых молекул [Pézolet, M., & Georgescauld, D. (1985). Raman spectroscopy of nerve fibers. A study of membrane lipids under steady state conditions. Biophysical Journal, 47, 367–372. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(85\)83927-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83927-8)]. Комбинационное рассеяние света возникает вследствие того, что движение электронов в молекуле связано с колебаниями ядер. Способность электронного облака деформироваться под действием электрического поля электромагнитной волны зависит от конфигурации ядер в данный момент и в случае внутримолекулярных колебаний изменяется с их частотой. И, наоборот, при деформации

электронного облака могут возникнуть колебания ядерного остова молекулы [Кэри, П. (1985). Применение спектроскопии КР и РКР в биохимии. (перевод с англ. А. А. С. ; под ред. Б. В. Локшина., Ed.) (Мир). Москва.].

Метод спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния использует эффект
5 усиления интенсивности (до 10⁸ – 10¹¹ раз) эффективного сечения комбинационного
рассеяния для ряда молекул, адсорбированных на шероховатой поверхности некоторых
металлов, либо наночастицах металла (золото, серебро, медь, платина) за счёт явления
поверхностного плазмонного резонанса [Емельянов В. И., Коротеев Н. И. Эффект
10 гигантского комбинационного рассеяния света молекулами, адсорбированными на
поверхности металла //Успехи физических наук. – 1981. – Т. 135. – №. 10. – С. 345-361.].

Генерация интенсивного ГКР производится с помощью облучения лазером специально
приготовленных металлических поверхностей с сильной шероховатостью, либо
наночастиц размерами 20-60 нм с неровной поверхностью, либо покрытых шипами и
бороздами, для получения наибольшего эффекта многократного усиления
15 электрического поля вблизи наночастицы или подложки за счёт резонанса частоты
падающего света и частоты коллективных колебаний свободных поверхностных
электронов металла - плазмонов.

Таким образом, ГКР позволяет получить колебательные спектры биомолекул в
растворе, идентифицировать определённые химические связи между атомами внутри
20 молекулы, установить признаки растяжения, деформации отдельных связей. Недостатком
данного способа является отсутствие информации о пространственном взаимном
расположении доменов молекулы, что не даёт возможности построить полноатомную
модель молекулы.

Таким образом, оба прототипа, используемые по отдельности, имеют обозначенные
25 недостатки, не позволяющие определить пространственную структуру, изучаемых
биологических молекул с высоким разрешением. Для решения технической задачи
повышения точности определения пространственной структуры биомолекул
предлагается использовать комбинацию МУРР и ГКР методов и набор данных, которые
будут давать необходимый набор информации о структурных особенностях
30 биомолекулы, используемый при молекулярном моделировании исследуемой молекулы.

Техническим результатом изобретения является способ получения пространственной
структуры биологических молекул олигонуклеотидов в растворе высокого разрешения.

Технический результат достигается тем, что способ определения пространственной
структуры биологических молекул олигонуклеотидов в растворе, включает измерение
35 малоуглового рентгеновского рассеяния от биомолекул в растворе, определение
структурных параметров, измерение спектров гигантского комбинационного рассеяния,
моделирование полноатомной модели пространственной структуры биомолекулы
олигонуклеотида. При построении полноатомной модели структуры биомолекулы
олигонуклеотида высокого разрешения используется его олигонуклеотидная
40 последовательность, построенные на её основе наиболее вероятные вторичные
структуры, отдельные уникальные для молекулы полосы спектров гигантского
комбинационного рассеяния в диапазоне 600-1800 см⁻¹, из которого извлекается и
формируется набор данных о межатомных связях в молекуле, ответственных за
образование элементов вторичной и третичной структуры, а также прохождение
45 валидации картины малоуглового рентгеновского рассеяния от модели на соответствие
картине рассеяния от монодисперсного раствора с молекулами олигонуклеотида.

Отличие заявляемого способа от прототипа заключается в том, что в заявляемом
способе определение пространственной структуры биологических молекул

олигонуклеотидов в растворе, включает измерение малоуглового рентгеновского рассеяния от биомолекул в растворе, определение структурных параметров, измерение спектров гигантского комбинационного рассеяния, моделирование полноатомной модели пространственной структуры биомолекулы олигонуклеотида. При построении полноатомной модели структуры биомолекулы олигонуклеотида высокого разрешения используется его олигонуклеотидная последовательность, построенные на её основе наиболее вероятные вторичные структуры, отдельные уникальные для молекулы полосы спектров гигантского комбинационного рассеяния в диапазоне $600-1800\text{ см}^{-1}$, из которого извлекается и формируется набор данных о межатомных связях в молекуле, ответственных за образование элементов вторичной и третичной структуры, а также прохождение валидации картины малоуглового рентгеновского рассеяния от модели на соответствие картине рассеяния от монодисперсного раствора с молекулами олигонуклеотида.

Перечисленные выше отличительные от прототипа признаки позволяют сделать вывод о соответствии заявляемых технических решений критерию «новизна».

Признаки, отличающие заявляемые технические решения от прототипа, не выявлены в других технических решениях и, следовательно, обеспечивают заявляемому решению соответствие критерию «изобретательский уровень».

Сущность изобретения: Метод малоуглового рассеяния даёт информацию об общей форме молекулы и очертания её доменной структуры, так как является структурным методом низкого разрешения. С другой стороны, метод ГКР даёт информацию о строении молекулы на малых масштабах: отдельных химических связях, уровне взаимодействия отдельных нуклеотидов и их составных частей: гетероциклах, сахарных моносахаридах рибозе либо дезоксирибозе, фосфатном остове молекулы, азотистых основаниях. Знание самой последовательности, наличие наиболее вероятных вторичных структур, укладка их в форму общей электронной плотности на основе МУРР и уточнение структуры, наложение соответствующих ограничений на структуру, позволяют построить полноатомную модель структуры молекулы олигонуклеотида в растворе высокого разрешения, при этом построенная модель повторно проходит валидацию на соответствие картины рассеяния от модели картине рассеяния от молекулы из эксперимента МУРР.

Первоначально определяются размеры молекулы, форм-фактор - взаимное распределение объёма молекулы в пространстве, восстанавливается трёхмерная, пространственная структура биомолекулы низкого разрешения, порядка 1-2 нм, с помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния. На основе изначально известной последовательности нуклеотидов, составляющих молекулу олигонуклеотида, строится набор вторичных структур.

Далее, на основе пространственной формы молекулы низкого разрешения производится дизайн полноатомной модели структуры молекулы. На основе данных ГКР производится идентификация вторичной структуры, наиболее соответствующей структуре молекулы олигонуклеотида в растворе, а также накладываются существенные ограничения на расстояния между нуклеотидами, натяжения фосфатного остова, положение и растяжения гетероциклов, участие нуклеотидов в образовании элементов вторичной структуры, таких как шпильки, петли, комплементарное связывание в спираль В-типа, G-квадруплексы, стопкование нуклеотидов и другие. Для этого используется набор спектральных линий в диапазоне $600-1800\text{ см}^{-1}$, из которого извлекается и формируется набор данных о межатомных связях в молекуле. Производится дизайн структуры молекулы олигонуклеотида с учётом трёхмерной

формы общей электронной плотности молекулы и ограничений, накладываемых на химические связи между атомами внутри молекулы, а также на связи, учитывающие взаимодействие внешних частей молекулы с окружающим раствором и распределения зарядов на её поверхности.

5 Пример осуществления

Способ был применён для определения пространственной структуры молекулы ДНК-аптамера LC-18t к клеткам раковой опухоли лёгкого. Аптамеры - это короткие (10-100 нуклеотидов) однотяжевые цепочки ДНК, либо РНК, пространственная структура и распределение зарядов на поверхности которых позволяют им с высокой специфичностью и аффинностью связываться с определенными молекулярными мишенями, для которых эти аптамеры были отобраны. В качестве мишеней могут выступать белки, вирусы, бактерии, целые клетки, либо ткани организма. Их отбор производится обычно из большой библиотеки олигонуклеотидов с различными последовательностями. Такой метод называется систематической эволюцией лигандов с экспоненциальным обогащением (SELEX). Высокое сродство аптамера к его молекулярной мишени определяется его первичной структурой - олигонуклеотидной последовательностью. Она формирует вторичную структуру, состоящую из комплементарно связанных Уотсон-Криковских пар нуклеотидов в двойную спираль В-типа, шпильки, петли, G-квадруплексы и другие. Вторичная структура, в свою очередь, укладывается в уникальную вторичную структуру, которая формируется за счёт слабых нековалентных связей: водородных, Ван-дер-Ваальсовых, гидрофобных. Данную трёхмерную структуру довольно сложно, а чаще всего - почти невозможно, предсказать без опоры на какие-либо экспериментальные данные.

Для данных целей был применён представленный в изобретении способ. Аптамер LC-18t был подготовлен в нескольких концентрациях для измерений малоуглового рентгеновского рассеяния: 10, 5, 2 и 1 мг/мл, в буферном растворе PBS. Растворы с аптамером были экспонированы пучком синхротронного рентгеновского излучения с длиной волны 0.1 нм на станции MYP P12 BioSAXS (EMBL, DESY), получены картины рассеяния на детекторе Dectris PILATUS 2M в диапазоне значений вектора рассеяния $0.2 < s < 5 \text{ nm}^{-1}$, на основе которых определены структурные параметры молекулы, такие как максимальный размер, функция распределения по расстояниям между рассеивающими центрами, объём и молекулярная масса, форм-фактор частицы, восстановлена форма общей электронной плотности молекулы низкого разрешения (1-1.5 нм), построена шариковая модель из псевдоатомов для данной молекулы.

Олигонуклеотидная последовательность аптамера известна, её длина 35 нуклеотидов. Далее были построены несколько наиболее вероятных вторичных структур с помощью программы mFold [Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction //Nucleic acids research. – 2003. – Т. 31. – №. 13. – С. 3406-3415.].

Регистрацию спектров гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) осуществляли на приборе i-Raman Plus (B&WTeck) оснащенный ПЗС-матрицей и системой охлаждения до -70 °С. Регистрацию спектров осуществляли при использовании лазера с длиной волны возбуждающего света 532 нм. Время регистрации сигнала – 3 секунды, количество накоплений сигнала – 2, мощность лазера – 40 мВ. Регистрацию спектров осуществляли в диапазоне $150-4000 \text{ cm}^{-1}$ с шагом 1.8 cm^{-1} . Регистрация спектров ГКР с использованием длины волны возбуждающего света 785 нм проводили на приборе i-Raman Pro (B&WTeck) оснащенный ПЗС-матрицей и системой охлаждения до -70 °С. Время регистрации сигнала 5 секунд, мощность лазера 30 мВ. Регистрацию спектров осуществляли в диапазоне

180-3010 cm^{-1} с шагом 2 cm^{-1} .

Для регистрации спектров ГКР использовали серебряные наночастицы (далее, AgNPs) с максимумом поглощения при 400 нм, диаметр составил 33.6 нм. Для регистрации сигнала, на алюминиевую подложку наносили раствор из аптамера (конечная
5 концентрация 1 мг/мл) и серебряных наночастиц в соотношении 1:1. Время агрегации наночастиц составило 20 секунд.

Полученные спектры обрабатывали в программе Origin2017 (OriginLab Corporation, США). Обработка сигнала включала в себя вычитание базовой линии. При высокой зашумленности спектров использовали сглаживание по 5 точкам, которое не влияло
10 на величину и форму пиков. Для построения разностных спектров и сравнения спектров от разных образцов между собой использовали нормировку на максимум полосы воды (диапазон 2900-3800 cm^{-1}) и нормировку на максимум спектра (далее, нормировка на максимум).

Аптамер имеет уникальные для данной молекулы колебания в области 600-2000 cm^{-1} в сравнении с другими исследуемыми аптамерами, характерные колебания СН₂- СН₃-
15 связей в области 2800-3000 cm^{-1} и ОН-групп воды в области 3000-3800 cm^{-1} .

Также выявлены внеплоскостные колебания ССС-связей, колебания С-Н связей, растяжение СОО-связей, растяжение С-С-связей. В области валентных колебаний ОН-
20 групп воды различно положение максимумов, что может указывать на различное электростатическое взаимодействие сильных и слабых О-Н-связей с аптамером, что указывает на различные значения заряда на поверхности молекулы олигонуклеотида.

Выявлен уникальный набор полос (1018, 1195, 1272, 1344, 1352, 1404, 1443, 1583-1586,
25 1622 cm^{-1}), в том числе: 1018 и 1443 - колебания дезоксирибозы, 1272 - растяжение кольца и С-Н деформация тимина, 1583 - участие N₂H в гуанине в водородной связи и другие.

Использование набора индивидуальных полос ГКР позволило наложить требуемые ограничения на положения отдельных нуклеотидов в молекуле аптамера, на участие
30 отдельных азотистых оснований в водородных связях, участвующих в образовании элементов вторичной структуры и укладки её в третичную структуру при построении полноатомной модели структуры биомолекулы олигонуклеотида.

Моделирование атомной структуры аптамеров осуществлялось с помощью программы Facio [Suenaga M., Facio: New Computational Chemistry Environment for PC GAMESS // J. Comput. Chem. Jpn. – 2005. – Vol. 4. –P25–32.]. На первом этапе проводилось
35 построение первоначальной геометрии молекул в пространстве в соответствии с вторичной структурой. Затем, полученные атомные структуры накладывали и сравнивали с экспериментальной формой, полученной из малоуглового рассеяния. Добивались максимального совпадения размеров моделируемой структуры с экспериментально полученным объёмом. На втором этапе осуществляли «тонкую»
40 подстройку геометрии молекулы под экспериментально полученную форму. Проводили подстройку частей молекул (нуклеотидов) таким образом, чтобы по форме они максимально совпадали с экспериментальными особенностями фигуры, полученной по данным МУРР с учётом ограничений и информации из спектров ГКР

Полученная структура прошла валидацию на соответствие её картины рассеяния той картине рассеяния, что была получена в ходе измерений малоуглового
45 рентгеновского рассеяния, с наименьшим значением невязки с экспериментальными данными в сравнении с предыдущими моделями, полученными только с применением способов, выбранных в качестве прототипов.

Использование способа, описанного в изобретении, позволило получить структуру

биомолекулы ДНК-аптамера LC-18t в высоком разрешении, что показывает применимость изобретения при решении поставленных практических задач.

(57) Формула изобретения

5 Способ определения пространственной структуры биологических молекул олигонуклеотидов в растворе, включающий измерение малоуглового рентгеновского рассеяния от биомолекул в растворе, определение структурных параметров, измерение спектров гигантского комбинационного рассеяния, моделирование полноатомной модели пространственной структуры биомолекулы олигонуклеотида, отличающийся
10 тем, что при построении полноатомной модели структуры биомолекулы олигонуклеотида высокого разрешения используются его олигонуклеотидная последовательность, построенные на её основе наиболее вероятные вторичные структуры, отдельные уникальные для молекулы полосы спектров гигантского комбинационного рассеяния в диапазоне $600-1800\text{ см}^{-1}$, из которого извлекается и
15 формируется набор данных о межатомных связях в молекуле, ответственных за образование элементов вторичной и третичной структур, а также прохождение валидации картины малоуглового рентгеновского рассеяния от модели на соответствие картине рассеяния от монодисперсного раствора с молекулами олигонуклеотида.

20

25

30

35

40

45