

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет имени К.И.Сатпаева

Институт Геологии и Нефтегазового дела им. К.Турысова

Кафедра Химической и Биохимической Инженерии

Имирова Фируза

Разработка технологии получения клик-реагентов для
применения на ДНК

ДИПЛОМНЫЙ ПРОЕКТ

Специальность 5В – «Биотехнология»

Алматы 2023

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный исследовательский
технический университет имени К.И.Сатпаева»

Институт геологии и нефтегазового дела им. К.Турысова
Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»

ДОПУЩЕН К ЗАЩИТЕ

Заведующий кафедрой
«Химическая и биохимическая
инженерия» PhD, ассоц.
профессор

А.А.Амитова

«7» июня 2023г.



ДИПЛОМНЫЙ ПРОЕКТ

На тему: «Разработка технологии получения клик-реагентов для применения на ДНК»

По специальности 6В05101 – Химическая и биохимическая инженерия

Выполнила

Имирова Ф.Т.


Рецензент

Доктор Ph.D, руководитель
лаборатории «Перспективные
материалы и технологии» АО
КБТУ

Научный руководитель
ассоциированный
профессор, доктор Ph. D.

 Шарипов Р.Х.

«25» мая 2023г.

 Хабиев А.Т.

«25» мая 2023г.

Алматы 2023

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный исследовательский
технический университет имени К.И.Сатпаева»

Институт Геологии и Нефтегазового дела им. К.Турсыова

Кафедра Химической и биохимической инженерии

6B05101 — «Химическая и биохимическая инженерия»

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой
Химической и биохимической
инженерии

PhD, ассоциированный профессор

Амитова А.А.

«7» июня 2023 г.



ЗАДАНИЕ

на выполнение дипломного проекта

Обучающейся Имирова Ф.Т.

Тема: «Разработка технологии получения клик-реагентов для применения на ДНК»

Утверждена приказом Б. Жаутикова № 408-П/Ө от «23» ноября 2022 г.

Срок сдачи законченной работы «25» мая 2023г.

Перечень подлежащих разработке в дипломном проекте вопросов:

- а) разработать технологию получения клик-реагента
- б) Разработать технологическую схему
- в) Рассчитать материальный баланс
- г) провести расчет затрат и прибыли




Исходные данные к дипломному проекту: клик-реагент

Перечень графического материала: представлены 12 слайдов презентации

Рекомендуемая основная литература: из 15 наименований





ГРАФИК

подготовки дипломного проекта

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю	Примечание
Литературный обзор	17 марта 2023 г.	
Технологический раздел	17 апреля 2023 г.	
Раздел расчетной части	17 мая 2023 г.	

Подписи

консультантов и нормоконтролера на законченный дипломный проект с указанием относящихся к ним разделов проекта

Наименования разделов	Консультанты, И.О.Ф. (уч. степень, звание)	Дата	Подпись
Литературный обзор	А. Т. Хабиев Ассоц. профессор, доктор Ph. D.		
Технологический раздел	А. Т. Хабиев Ассоц. профессор, доктор Ph. D.		
Раздел расчётной части	А. Т. Хабиев Ассоц. профессор, доктор Ph. D.		
Нормоконтролер	А. Т. Хабиев Ассоц. профессор, доктор Ph. D.		

Научный руководитель



Хабиев А.Т.

Задание принял к исполнению обучающийся



Имирова Ф.Т

Дата

«5» мая 2023 г.

АННОТАЦИЯ

Тема: Разработка технологии получения клик-реагентов для применения на ДНК.

Структура и объем дипломного проекта: текст дипломного проекта изложен на 40 страницах. По содержанию диплом охватывает три основных раздела: литературный обзор, практическая часть и экономические расчеты. В дипломном проекте имеется библиографический список использованной литературы, содержащий 15 наименования. В документе дипломного проекта содержится 12 рисунков и 8 таблиц.

Ключевые слова: клик химия, клик реагенты, ДНК, пролиерация клеток

Цель: Разработать технология получения клик-реагентов для применения на ДНК.

Задачи: Провести теоретические исследования по изучению клик-реагентов, разработать технологию получения клик-реагента. Разработать технологическую схему получения реагента и найти его применение.

Объект исследования: клик-реагент.

Предмет исследования: разработка технологии получения клик-реагента и его дальнейшее внедрение в фармацевтическую химию.

АНДАТПА

Тақырыбы: ДНҚ - да қолдану үшін клик-реагенттерді алу технологиясын әзірлеу.

Дипломдық жобаның құрылымы мен көлемі: дипломдық жобаның мәтіні 40 бетте көрсетілген. Мазмұны бойынша диплом үш негізгі бөлімді қамтиды: әдеби шолу, практикалық бөлім және экономикалық есептеулер. Дипломдық жобада 15 атаудан тұратын пайдаланылған әдебиеттердің библиографиялық тізімі бар. Дипломдық жобаның құжатында 12 сурет және 8 кесте бар.

Түйін сөздер: клик химия, клик реагенттер, ДНҚ, жасуша пролиерациясы

Мақсаты: әзірлеу ДНҚ-ға қолдану үшін клик-реагенттерді алу технологиясы.

Міндеттері: клик-реагенттерді зерттеу бойынша теориялық зерттеулер жүргізу, клик-реагент алу технологиясын әзірлеу. Реагентті алудың технологиялық схемасын жасаңыз және оны қолдануды табыңыз.

Зерттеу нысаны: клик-реагент.

Зерттеу пәні: клик-реагент алу технологиясын әзірлеу және оны фармацевтикалық химияға одан әрі енгізу.

ANNOTATION

Topic: Development of technology for obtaining click reagents for use on DNA.

The structure and scope of the diploma project: the text of the diploma project is presented on 40 pages. In terms of content, the diploma covers three main sections: a literary review, a practical part and economic calculations. The diploma project has a bibliographic list of references containing 15 titles. The diploma project document contains 12 figures and 8 tables.

Keywords: click chemistry, click reagents, DNA, cell proliferation

Purpose: To develop a technology for obtaining click reagents for application to DNA.

Tasks: To conduct theoretical research on the study of click-reagents, to develop a technology for obtaining a click-reagent. To develop a technological scheme for obtaining the reagent and find its application.

Object of research: click-reagent.

Subject of research: development of a technology for obtaining a click reagent and its further introduction into pharmaceutical chemistry.

СОДЕРЖАНИЕ

	Введение	7
1	Строение молекулы ДНК	10
1.1	Клеточный цикл	11
1.2	Последствия нарушения клеточной пролиферации	13
1.3	Проблемы медицинской значимости ДНК	15
1.4	Клик химия в ДНК	16
1.5	Клик реагенты	17
1.6	Клик химия в пролиферации клеток	19
2	Практическая часть	21
2.1	Клик реакция и ее применение	21
2.2	Методика проведения проточной цитометрии на основе клик реакции	22
2.3	Клик реагенты	25
2.4	Синтез этилированного EdU	27
2.5	Расчет материального баланса	27
2.6	Технологическая схема	27
3	Расчетная часть	29
3.1	Расчет стоимости реагентов	33
3.2	Затраты на оборудование	33
3.3	Расчет затрат по заработной плате персонала	34
3.4	Расчет годового дохода	35
3.5	Расчет возврата инвестиций	35
	Заключение	
	Список используемой литературы	

ВВЕДЕНИЕ

Клик-химия представляет собой современный подход к синтезу органических соединений, основанный на высокоселективных реакциях между двумя молекулами. Одной из самых известных реакций клик-химии является реакция «щелчка», основанная на циклонониновой алкин-азидной реакции. Эта реакция позволяет эффективно соединять молекулы с высокой степенью специфичности и селективности.

В последние годы, разработка клик-реагентов стала активной областью исследований в биологической и медицинской науке. Клик-реагенты обладают рядом преимуществ, таких как быстрая реакционная кинетика, стабильность и специфичность, что делает их привлекательными инструментами для маркировки и визуализации биомолекул и клеточных структур.

Целью проектной работы является разработка технологии получения клик-реагентов для дальнейшего их развития в фармацевтической химии.

Основные задачи:

- Структура и классификация клик-реагентов
- Разработка и применение клик-реагента
- Изучение клик химии в ДНК

1 Аналитический обзор литературы

1.1 Строение молекулы ДНК

Дезоксирибонуклеиновая кислота состоит из двух цепочек нуклеотидов, которые объединены меж собой водородными связями и закручиваются в двойную спираль. Нуклеотиды в каждой цепи - это кирпичики, из которых складываются гены, биологическая их кодировка. Для каждого гена его место положения в цепочке и порядок нуклеотидов условно одинаков. Условно поскольку у одного гена возможны вариации, различное расположение некоторых нуклеотидов в составе гена. Но, в таком случае вместе со сменой структуры меняется и функциональность самого гена.

Путь от цепочки к хромосоме такой, что всех живых организмов клеточная структура и эти клетки содержат внутри себя ядро – такие клетки называются эукариоты. Ядра клеток содержат в себе структуры, хранящие наследственную информацию – хромосомы. А вот сама хромосома и содержит внутри себя спиральную молекулу дезоксирибонуклеиновой кислоты, которая осуществляет функцию хранения наследственной информации.



Рисунок 1- Молекула ДНК человек

Молекула ДНК была открыта в 1869 году швейцарским химиком Фридрихом Мишером. Однако только в 1944 г. была впервые выдвинута гипотеза о том, что молекулы ДНК являются носителями генетической информации. Представление о том, что ДНК служит носителем генетической информации, было доказано Херши и Чейзом в 1952 г., а уже в 1953 г. на основе рентгеноструктурного анализа была описана структура молекулы ДНК. Эти открытия привели к последующему огромному всплеску интереса к ДНК и интенсивному увеличению знаний о процессах, связанных с ее организацией,

репарацией, репликацией и выражением генетической информации. В последующие годы было, например, обнаружено, что эукариотическая хромосомная ДНК реплицируется посредством большого количества сегментов ДНК, известных как репликоны, которые непрерывно активируются в S-фазе, и что их репликация обеспечивается парами «сестринских» реплисомы. Также было описано, что репликация происходит от источников репликации в обоих направлениях посредством двух вилок репликации и завершается, когда вилки соседних репликонов сходятся.

Нераздельно методологические подходы, используемые при описании всех этих процессов, постоянно развивались и совершенствовались. Многие из этих подходов также нашли применение в медицинских исследованиях и диагностике различных заболеваний. Кроме того, ДНК стала мишенью для лечения больных, страдающих различными формами злокачественных опухолей.

Одной из важных областей методологии, которая с годами претерпела значительные изменения, является область, связанная с обнаружением репликационной активности. В течение нескольких десятилетий первоначальные методы обнаружения репликационной активности совершенствовались, модифицировались или заменялись другими, более короткими, более чувствительными или менее токсичными.

1.2 Клеточный цикл

Клеточный цикл представляет собой упорядоченную серию событий, включающих рост и деление клеток, в результате которых образуются реплицированная ДНК и содержимое цитоплазмы разделяются, и клетка делится две новые дочерние клетки. Клетки на пути к клеточному делению проходят ряд точно рассчитанных по времени и тщательно регулируемых стадий роста, репликации ДНК и деления, в результате которых образуются две генетически идентичные клетки. Клеточный цикл состоит из двух основных фаз: интерфазы и митотической фазы. Во время интерфазы клетка растет, и ДНК реплицируется. Во время митотической фазы реплицированная ДНК и содержимое цитоплазмы разделяются, и клетка делится.

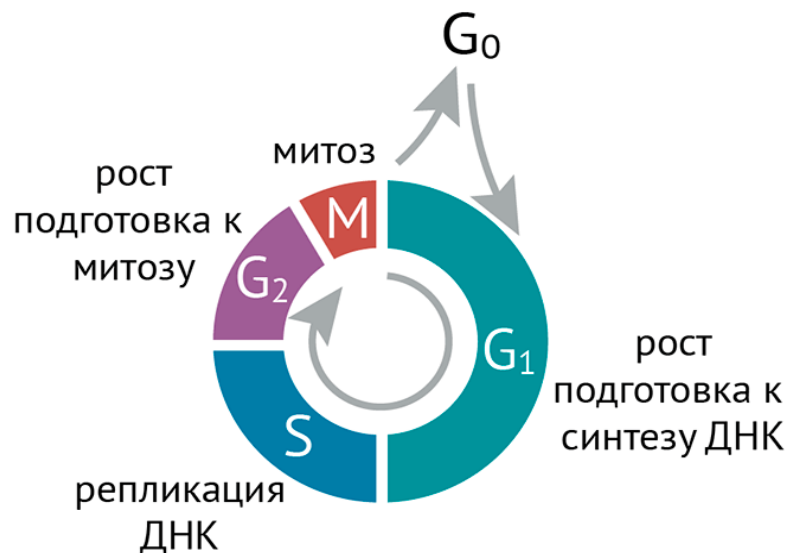


Рисунок 2 - Клетка проходит через ряд фаз упорядоченным образом.

Во время интерфазы G₁ рост клеток и синтез белка, S-фаза включает репликацию ДНК и репликацию centrosомы, а G₂ включает дальнейший рост и синтез белка. Митотическая фаза следует за интерфазой.

Митоз — это деление ядра, во время которого удвоенные хромосомы разделяются и распределяются в дочерние ядра. Обычно клетка делится после митоза в процессе, называемом цитокинезом, при котором цитоплазма делится и образуются две дочерние клетки. Нарушение регуляции клеточного цикла лежит в основе aberrантной клеточной пролиферации, которая характеризует различные заболевания, а потеря контроля контрольных точек клеточного цикла способствует генетической нестабильности. За последние два десятилетия генетика рака показала, что гиперактивация мутаций в сигнальных сетях роста в сочетании с потерей функции белков-супрессоров опухолей приводит к онкогенной пролиферации. Однако профилирование экспрессии генов этих сложных и повторяющихся митогенных путей для выявления прогностических и прогностических признаков и их терапевтического нацеливания оказалось сложной задачей. Механизм клеточного цикла, который действует как точка интеграции информации, передаваемой через восходящие сигнальные сети, представляет собой альтернативную мишень для диагностических и терапевтических вмешательств. Анализ механизма инициации репликации ДНК и белков митотического двигателя в тканях человека в настоящее время ведет к идентификации новых биомаркеров для обнаружения и прогнозирования рака, а также обеспечивает целевую проверку для терапии, направленной на клеточный цикл.

Регуляция клеточного цикла контролирует порядок и скорость этих фаз и обеспечивает правильное функционирование клеток и поддержание нормальной клеточной пролиферации. Она осуществляется за счет множества молекулярных механизмов и сигнальных путей, включая циклин-зависимые киназы (ЦЗК) и их ингибиторы, регуляторы транскрипции, генные выражения и прочие молекулярные компоненты.

Однако нарушение регуляции клеточного цикла может привести к

аберрантной клеточной пролиферации, то есть неправильному или неуправляемому делению клеток. Это может происходить, например, из-за мутаций в генах, ответственных за контроль клеточного цикла, или из-за дисбаланса между активаторами и ингибиторами клеточной пролиферации, нарушения могут привести к различным патологическим состояниям, включая развитие рака. Например, мутации, которые активируют циклин-зависимые киназы, могут привести к постоянной активности этих ферментов и необузданной клеточной пролиферации. Мутации в генах, контролирующих точки проверки в клеточном цикле, могут привести к обходу этих контрольных механизмов и продолжению деления клеток, несмотря на наличие повреждений в ДНК или другие аномалии.

Таким образом, нарушение регуляции клеточного цикла играет ключевую роль в аберрантной клеточной пролиферации и может способствовать развитию различных заболеваний.

1.3 Последствия нарушения клеточной пролиферации

Нарушение клеточной пролиферации может привести к различным заболеваниям, включая:

1. Рак: Неконтролируемая пролиферация клеток может привести к развитию рака. Клетки могут приобретать генетические изменения, которые стимулируют их ненормальное размножение и образование опухолей.

2. Гиперплазия: Это состояние, при котором клетки начинают активно делиться и увеличивать свою численность. Гиперплазия может происходить в различных тканях и органах и может быть предшественником развития опухолей.

3. Гипоплазия: В отличие от гиперплазии, гипоплазия означает недостаточную пролиферацию клеток, что может привести к неполноценному развитию органов или тканей.

4. Неврогенез: Нарушение пролиферации нервных клеток может привести к неврологическим заболеваниям, таким как нейродегенеративные заболевания, включая болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона.

5. Заболевания иммунной системы: Нарушение пролиферации клеток иммунной системы может привести к иммунодефицитным состояниям, аутоиммунным заболеваниям или неправильной регуляции иммунного ответа.

6. Генетические синдромы: Некоторые генетические синдромы связаны с нарушением клеточной пролиферации, например, синдром Дауна или синдром Вернига-Хоффмана.

Это лишь несколько примеров заболеваний, связанных с нарушением клеточной пролиферации. Различные факторы, включая генетические, окружающую среду и образ жизни, могут влиять на нормальную регуляцию пролиферации клеток и приводить к различным патологическим состояниям.

Дерегуляция клеточного цикла относится к нарушению нормальной регуляции клеточной пролиферации и является одной из основных характеристик злокачественных опухолей. ДНК (дезоксирибонуклеиновая

кислота) является главным носителем генетической информации в клетках. Дерегуляция клеточного цикла в злокачественных опухолях связана с нарушениями в нормальной регуляции клеточной пролиферации. Процесс клеточной пролиферации контролируется различными молекулярными механизмами, включая циклин-зависимые киназы (ЦЗК) и генетические контролирующие факторы.

Митогены, сигнальные молекулы, стимулируют прогрессирование клеточного цикла, особенно фазы G1-S, активируя циклин-зависимые киназы, такие как G1-S ЦЗК. Они фосфорилируют белок pRB (ретинобластомный белок), который тормозит прогрессию клеточного цикла. В злокачественных клетках наблюдаются дефекты в тормозах pRB, вызванные активацией опухолевых мутаций. Мутации в генах, регулирующих митогенные сигнальные пути, и генах, контролирующих клеточный цикл, также могут влиять на клеточную пролиферацию.

Эти изменения в ДНК могут приводить к активации циклин-зависимых киназ и нарушению регуляции прогрессии клеточного цикла. Например, мутации в генах, кодирующих рецепторы и сигнальные пути, связанные с митогенными сигналами, могут приводить к активации клеточного цикла и неуправляемой пролиферации. Кроме того, инактивация генов-супрессоров опухолей и генов, кодирующих ингибиторы циклин-зависимых киназ, таких как p15, p16 и p27, является обычным явлением при различных типах опухолей.

Таким образом, изменения в ДНК и дерегуляция клеточного цикла взаимосвязаны и могут влиять друг на друга. Мутации в ДНК могут вызывать изменения в экспрессии генов, регулирующих клеточный цикл, и приводить к нарушению нормальной регуляции клеточной пролиферации. В свою очередь, дерегуляция клеточного цикла может способствовать возникновению новых мутаций в ДНК и геномной нестабильности.

Такое взаимодействие между изменениями в ДНК и дерегуляцией клеточного цикла играет важную роль в развитии и прогрессии злокачественных опухолей. Понимание этих молекулярных механизмов может помочь в разработке новых подходов к диагностике и лечению рака, направленных на нормализацию клеточного цикла и восстановление нормальной регуляции клеточной пролиферации.

Инактивация генов-супрессоров опухолей, которые кодируют ингибиторы циклин-зависимых киназ (CDKI), такие как p15, p16 и p27, также является обычным явлением при различных типах опухолей. Это приводит к снятию тормозов на прогрессию клеточного цикла, и дальнейшее нарушение контрольных точек клеточного цикла приводит к геномной нестабильности, которая способствует эволюции опухоли.

Таким образом, дерегуляция клеточного цикла, особенно в фазе G1-S, играет важную роль в неконтролируемой клеточной пролиферации, характерной для злокачественных опухолей.

Кинетика клеточного цикла опухоли относится к скорости и паттерну прогрессирования клеточного цикла в раковых клетках опухоли. Эта кинетика имеет важное значение для прогнозирования и принятия решений о лечении опухоли, особенно в отношении реакции на агенты, которые могут быть

специфичными для определенных фаз клеточного цикла.

В прогностических алгоритмах для многих типов опухолей широко используется оценка пролиферативного состояния, основанная на митотическом индексе (частоте митозов) и/или количестве Ki67 - белка, который обычно проявляется в пролиферирующих клетках. Например, Ноттингемский прогностический индекс для рака молочной железы и система классификации Национальных центров онкологии для саркомы мягких тканей учитывают данные о пролиферативном состоянии опухоли.

Интересно отметить, что многие неоадьювантные (предварительные) и адьювантные (послеоперационные) химиотерапевтические протоколы, применяемые в клинической практике, включают агенты, направленные на реплицирующиеся клетки (в фазе S) или делящиеся клетки (в фазе M). Поэтому эти протоколы могут быть эффективны только против клеток, проходящих через клеточный цикл.

Например, при раке молочной железы высокие уровни Ki67 свидетельствуют о более активной пролиферации опухолевых клеток и могут предсказывать пользу от адьювантной терапии таксанами (например, доксорубицином, паклитакселом) по сравнению с другими химиотерапевтическими режимами.

Однако, внедрение Ki67 в рутинную клиническую практику осложнено противоречивыми данными, полученными из метаанализов различных исследований. Кроме того, существуют трудности в согласовании методик количественного определения.

1.4 Проблемы медицинской значимости ДНК

Проблема медицинской значимости генотоксических поражений генома неоднократно привлекала внимание исследователей. В XX веке коллективными усилиями были выявлены основные закономерности проявления патологической наследственной изменчивости у человека. В частности:

- показано, что примерно 25% наследственной патологии манифестирует в гамето- и эмбриогенезе и около 65% – в допубертатном и пубертатном возрасте;

- установлено, что около 10% новорожденных имеют генетически обусловленные дефекты, а у 70% людей в течение жизни проявляется хотя бы одна генетически обусловленная особенность, снижающая продолжительность и(или) качество жизни; сформирована концепция генетического груза;

- выявлена ведущая роль генных, хромосомных и геномных мутаций в накоплении генетического груза, которые соответственно формируют группы генных и хромосомных болезней;

- показано, что мутации сохраняются в десятках и сотнях поколений, их воспроизводство и распространение описывается закономерностями популяционной генетики.

Независимо от того, насколько эти цифры адекватно отражают реальный уровень первичных повреждений ДНК, вопрос о патогенетическом значении

повреждений ДНК и соотношении между уровнями продукции повреждений ДНК и различными категориями мутаций остается открытым (рис.1). Очевидно только, что большая их часть восстанавливается через механизмы репарации, а меньшая – трансформируется в мутации. В соответствии с каноническими воззрениями за повреждениями ДНК оставлена исключительно роль подчиненных, предмутационных событий. Идея о том, что повреждения ДНК следует рассматривать как самостоятельный патогенетический фактор, находится в самом начале развития и, с нашей точки зрения, базируется на нескольких аргументах различной степени проработанности.

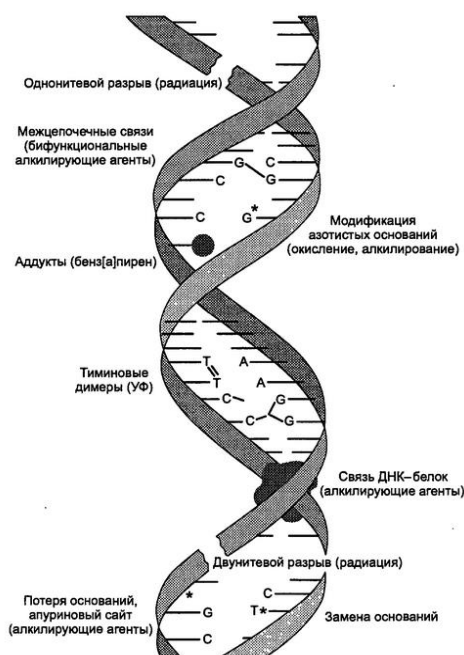


Рисунок 3 - Типы повреждений структуры ДНК и агенты, их вызывающие

1.5 Клик химия в ДНК

Нобелевская премия по химии в 2022 году досталась профессору Стенфордского университета Каролин Бертоцци, профессору Мортену Мелдалу из Копенгагенского университета и химику Барри Шарплессу из Института Скриппса в США за вклад в развитие клик-химии и биоортогональной химии (химические реакции, которые способны протекать внутри живых систем, не мешая естественным биохимическим процессам).

Клик реакция — это химическая реакция, которая может протекать в биологических системах без взаимодействия с внутренними биомолекулами или вмешательства во всю систему. Клик реакция для образования ковалентной связи между хромосомной ДНК и флуоресцентными молекулами с высокой селективностью и реактивностью в биологической среде позволяет, чтобы на изображение хромосомной ДНК не влияли аффинность взаимодействия и структура и т.д. Напротив, традиционные красители работают в аффинно-зависимым образом с хромосомной ДНК внутриклеточная среда может влиять

на взаимодействие хромосомной ДНК и лигандов. Считается, что химическая реакция с помощью ковалентной связи для соединения хромосомной ДНК и флуоресцентных молекул преодолевает эту трудность и в меньшей степени зависит от сродства, окружающей среды или структуры хромосомы.

Применение клик-химии в ДНК имеет широкий спектр приложений в различных областях науки и технологии:

1. Биологическое исследование: Клик-химия позволяет исследовать структуру, функцию и взаимодействие ДНК в биологических системах. Это может включать изучение генетических последовательностей, мутаций, эпигенетических изменений и формирование комплексов ДНК-белок.

2. Геномика: Клик-химия применяется в геномике для маркировки, обнаружения и амплификации ДНК. Это может быть использовано в секвенировании генома, анализе генетического полиморфизма, исследовании генной экспрессии и других геномных исследованиях.

3. Диагностика и медицина: Клик-химия может быть применена в диагностике заболеваний, маркировке биологических образцов и разработке терапевтических стратегий. Например, клик-химические методы могут использоваться для обнаружения мутаций в геноме, диагностики инфекций или определения чувствительности к определенным лекарственным препаратам.

4. Нанотехнологии: Клик-химия применяется в нанотехнологиях для создания функциональных наноструктур и наноматериалов на основе ДНК. Это может включать создание наночастиц, наносенсоров, нанороботов и других интеллектуальных систем.

5. Материаловедение: Клик-химия может быть использована для функционализации поверхностей и материалов с помощью ДНК. Это может быть применено в области катализа, оптики, электроники, наноэлектроники и других технологических приложений.

1.6 Клик реагенты

Клик-химия включает в себя эффективные органические реакции двух или более высокофункциональных химических соединений в экологически благоприятных условиях для синтеза различных гетероциклов. Из-за своей биосовместимости клик-химия широко используется для биоконъюгации: селективного соединения небольших строительных блоков с помощью быстрой и необратимой реакции в одном сосуде в мягких условиях. Биоконъюгация включает конъюгацию (присоединение) зонда к биомолекуле, такой как ДНК, РНК, углеводы и белки. Этот зонд может быть репортером, таким как флуоресцентная или биотинилированная молекула, или субстратом, нацеленным на конкретную биомолекулу.

Существуют различные виды реакций клик-химии, в том числе катализируемая медью азидо-алкильная циклизация (CuAAC), азидо-алкильная циклизация без меди, стимулируемая напряжением (SPAAC) и циклизация алкилазона, стимулируемая напряжением (SPANAC).

Классическим примером клик-реакции может служить азид-алкиновое

циклоприсоединение с образованием 1,2,3-триазолов (рис.5), CuAAC (Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition), катализируемое солями меди (I). Несмотря на то, что общий подход к 1,3-диполярному циклоприсоединению был предложен еще в середине XX в., его широкое использование для биомолекул стало возможным только в последние годы.

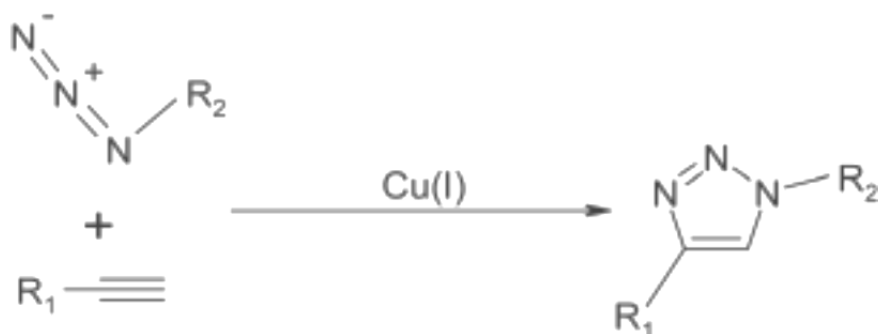


Рисунок 4 - Реакция азид-алкиновое циклоприсоединение

Важным шагом оказалось обнаружение каталитических свойств солей Cu(I), их использование позволило снизить температуру процесса и существенно сократить время протекания реакции. Однако оказалось, что соли одновалентной меди могут приводить к значительной деградации биополимеров – в первую очередь полинуклеотидных цепей. Резко снизить накопление побочных продуктов при CuAAC с участием ДНК удалось с помощью замены солей меди на ее комплексы с хелатирующими лигандами. Среди них наиболее популярны сегодня трис(бензилтриазолилметил)амин (ТВТА), сульфированный батофенантролин, бензимидазольные производные, а также о-фенилендиамин.

В настоящее время ведется поиск реагентов, позволяющих полностью отказаться от катализа реакции Cu(I). Возможность клик-конъюгации в отсутствие ионов меди, например, была продемонстрирована взаимодействием азидов с циклооктинами. Реакция с участием напряженных

циклоалкинов проходит с меньшей в сравнении с CuAAC эффективностью. В то же время ее использование значительно снижает токсичность проведения модификации и перспективно для исследований *in vivo*. Следует отметить, что концепция клик-химии объединяет несколько типов конъюгации: азид-алкиновое циклоприсоединение, реакцию Штаудингера и ряд других. В области химии биополимеров под клик-реакцией обычно принято понимать взаимодействие азидов с алкинами, приводящее к получению замещенных триазолов. Химические аспекты применения клик-химии для получения всевозможных биоконъюгатов, лигирования, фиксации на твердой фазе, маркирования и модификации нуклеиновых кислот, их фрагментов и компонентов достаточно полно освещены в ряде обзоров последних лет.

Поскольку получение ковалентных конъюгатов поли/олигонуклеотидов и модифицированных фрагментов ДНК представляют несомненный интерес для биотехнологии, диагностики и медицины, важно проанализировать новые

возможности и перспективы использования клик-химии ДНК в медико-биологических исследованиях.

Некоторые из наиболее распространенных видов клик-реагентов включают (таблица 1):

Азиды (Azides) - органические соединения, содержащие азидную группу (-N₃), которые реагируют с соединениями, содержащими алкинидные или терминальные алкинидные группы, в реакции, которая называется циклокадированием Кюри.

Алкины (Alkynes) - органические соединения, содержащие алкиндную группу (-C≡C-), которые могут реагировать с соединениями, содержащими азидные группы, в реакции циклокадирования Кюри.

Триазолы (Triazoles) - гетероциклические соединения, содержащие пятичленное кольцо с тремя атомами азота, которые могут быть получены в результате циклокадирования Кюри азидов и алкиндных соединений.

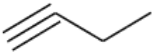
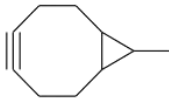
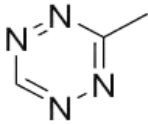
	Алкины (Alkynes)
	Азиды (Azides)
	Триазолы (Triazoles)

Таблица 1- Виды клик реагентов

1.7 Клик химия в пролиферации клеток

Клик химия превосходна в применении измерений пролиферации, поскольку реакция между алкином и азидом биоортогональна; она протекает избирательно, без вмешательства каких-либо других функциональных групп, присутствующих в сложных биологических системах. Алкиновые и азидные соединения являются стабильными, инертными функциональными группами. обычно не присутствует в биологических системах. Реакция на щелчок обнаружит включенный EdU, но не вступает в реакцию с другими молекулами и приводит к надежному яркому сигналу, требующему меньшего количества шагов и меньшего времени для выполнения.

Клеточная пролиферация характеризуется синтезом ДНК во время S-фазы

клеточного цикла. Таким образом, измерение синтеза ДНК имеет важное значение для исследований во многих научных областях, таких как оценка состояния клеток, определение генотоксичности и оценка влияния малых молекул на клеточный цикл. Традиционный подход к мониторингу синтеза ДНК и клеточной пролиферации заключается в измерении включения тимидина, когда клетки вступают в S-фазу. Последующее количественное определение тимидина представляется собой выполняется путем подсчета сцинтилляций или автордиографии. Эта технология является медленной, трудоемкой и имеет ряд ограничений, включая обращение с радиоизотопами и их утилизацию, а также необходимость в дорогостоящем оборудовании. Другой хорошо зарекомендовавший себя метод обнаружения использует бромдезоксифуридин (BrdU), аналог тимидина, с последующим обнаружением с использованием антител к BrdU. Для этого применения BrdU встраивается во вновь синтезированные нити ДНК активно пролиферирующих клеток. После частичной денатурации двойного многожильная ДНК, инкорпорированная BrdU, обнаруживается иммунохимически с помощью антител против BrdU. Основным недостатком метода BrdU является то, что антитела к BrdU будут реагировать только с одноцепочечной ДНК, поскольку двухцепочечная ДНК блокирует доступ анти-BrdU-антител к встроенным молекулам BrdU. Поэтому образцы должны подвергаться жестким денатурирующим условиям, что увеличивает время проведения анализа и может привести к разрушению структуры образца. Чтобы преодолеть эти недостатки, за альтернативу взяли EdU (5-этинил-2'-дезоксифуридин) анализы на пролиферацию. Использование EdU в качестве аналога тимидиннуклеозида является значительным улучшением по сравнению с классическими анализами BrdU и $^3\text{[H]}$ тимидиновой клеточной пролиферации. В отличие от наборов для анализа BrdU, анализы клеточной пролиферации EdU не основаны на антителах и, следовательно, не требуют денатурация ДНК для обнаружения инкорпорированного нуклеозида. Вместо этого в наших анализах клеточной пролиферации EdU используется click chemistry для обнаружения в различных флуоресцентных индикаторах красителей. Кроме того, в оптимизированный протокол обнаружения сокращает общее количество шагов и значительно сокращает общее количество времени. Он обеспечивает более быструю процедуру обнаружения и совместим с проточной цитометрией и микроскопией.

2 Практическая часть

2.1 Клик реакция

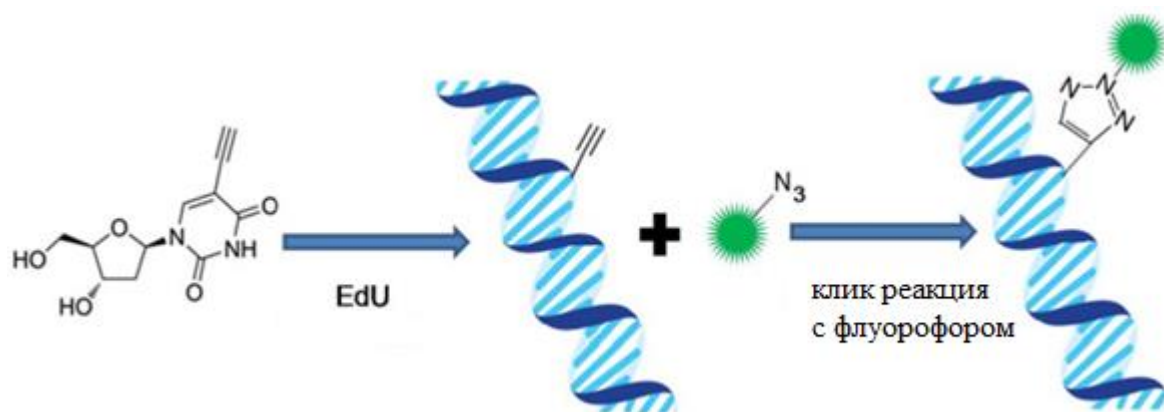


Рисунок 5 - Принцип анализа клеточной пролиферации EdU.

Клетки, выращенные в присутствии 5-EdU, включают соединение в тимидиновые основания во время S-фазы. Меченный флуорофором азид вступает в реакцию со встроенным EdU, что позволяет обнаруживать его с помощью микроскопии или проточной цитометрии.

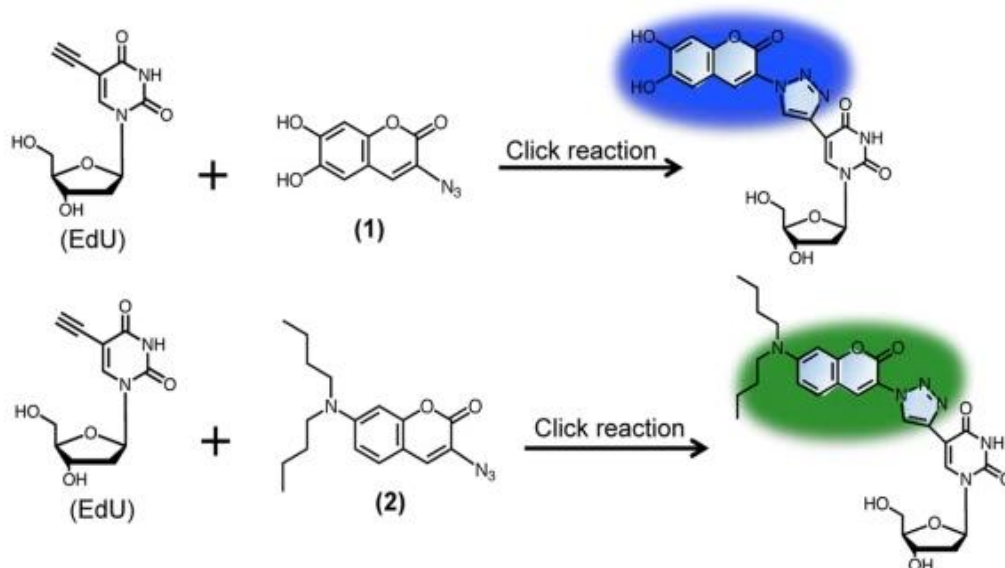
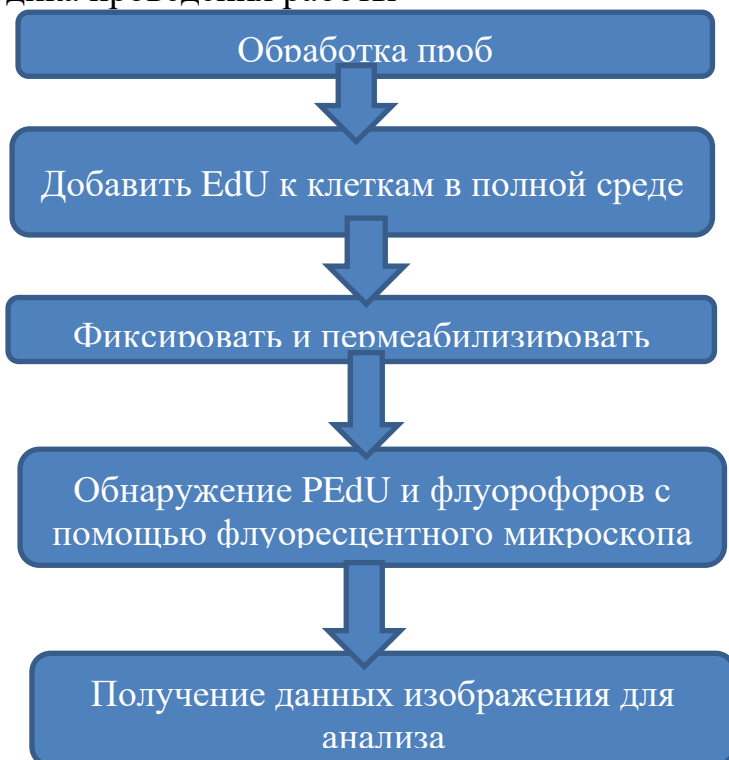


Рисунок 6 - Схема клик-реакции между EdU с флуорофорами, служившими в качестве светящегося репортера.

2.2 Методика проточной цитометрии с помощью клик химии

Методика проведения работы



Клетки для анализа пролиферации можно получить из различных источников, в зависимости от целей исследования. Вот некоторые из них:

1. Клеточные линии: Существует широкий выбор устойчивых клеточных линий, которые могут быть использованы для исследования пролиферации клеток. Они могут быть производными от различных типов тканей или опухолевых клеток.

2. Тканевые биопсии: Тканевые образцы могут быть взяты из органов или тканей путем биопсии для анализа пролиферации клеток. Это может включать, например, биопсию опухоли для изучения роста и деления опухолевых клеток.

3. Клетки из жидкостей организма: Некоторые исследования пролиферации клеток могут включать анализ клеток, содержащихся в жидкостях организма, таких как кровь, моча, слюна или цереброспинальная жидкость. Например, анализ пролиферации лимфоцитов в крови может быть полезным для изучения иммунного ответа.

4. Применение модельных организмов: В исследованиях пролиферации клеток могут использоваться модельные организмы, такие как млекопитающие (мыши, крысы), насекомые (дрозофила) или дрожжи. Это позволяет изучать пролиферацию клеток в разных тканях и контекстах.

Кровь состоит из различных компонентов, включая кровяные клетки (эритроциты, лейкоциты и тромбоциты) и плазму. Плазма - это жидкая часть крови, которая содержит различные растворенные вещества, включая белки, гормоны, электролиты и другие молекулы.

Для получения клеток для анализа пролиферации мы хотим разделить клетки от плазмы, чтобы сосредоточиться на клеточных компонентах. Для этого используются методы центрифугирования.

Процесс центрифугирования основан на принципе отделения компонентов на основе их различной плотности. Когда кровь помещается в пробирку и центрифугируется при высокой скорости вращения, силы центробежной силы вызывают разделение компонентов в зависимости от их плотности. Тяжелые элементы, такие как эритроциты, образуют наиболее плотный слой на дне пробирки, а плазма находится в верхней части пробирки. Мононуклеарные клетки, которые являются целевыми для анализа пролиферации, располагаются в промежуточном слое между эритроцитами и плазмой. После центрифугирования вы можете осторожно собрать слой с мононуклеарными клетками (РВМС) или лимфоцитами, перенеся его в новую пробирку, оставив эритроциты и другие остаточные элементы на дне исходной пробирки. Таким образом, вы получите отделенные клетки для дальнейших процедур анализа пролиферации.

После отделения клеток от плазмы и эритроцитов, вам необходимо перенести клетки в суспензию для дальнейшего анализа пролиферации. Вот несколько шагов, которые можно выполнить для этого:

1. Соберите отделенные клетки (РВМС или лимфоциты) в центрифужной пробирке, предварительно оставив небольшой объем суспензии, чтобы не попасть на осадок.

2. Добавьте в пробирку холодный раствор стерильного фосфатного буфера с солевым составом, соответствующим вашим экспериментальным требованиям. Это поможет создать оптимальные условия для клеток и предотвратит их повреждение.

3. Встряхните пробирку мягкими оборотами, чтобы хорошо смешать клетки с буфером. Убедитесь, что клетки равномерно распределены в суспензии.

Методика проведения работы:

А. Приготовление рабочего раствора

Перед вскрытием дайте всем флаконам нагреться до комнатной температуры.

1. Приготовьте 10 мм исходный раствор EdU: добавьте 2 мл ДМСО во флакон и перемешайте до полного растворения EdU. Храните оставшийся раствор при температуре -20°C . При хранении в соответствии с указаниями, исходный раствор стабилен до одного года.

2. Приготовьте 10-кратный исходный раствор буферной добавки: Добавьте по 2 мл деионизированной воды в каждый из флаконов и перемешайте до полного растворения соединения. Храните оставшийся раствор при температуре -20°C . Этот исходный раствор стабилен до 6 месяцев, если хранить его в соответствии с указаниями. Если раствор начинает приобретать коричневый цвет, значит, он испортился и его следует выбросить. Рекомендуется использовать аликвоты, чтобы избежать повторных циклов замораживания/оттаивания.

В. Внедрение, фиксация и проницаемость EdU

Любой тип адгезивных клеток может быть адаптирован к этой процедуре. Рекомендуется начинать с 10 Мкм EdU. Некоторые факторы, такие как изменение типа клеток, плотность клеток и питательная среда, могут влиять на маркировку. Ниже представлены процедуры микроскопической визуализации и

анализа с помощью проточной цитометрии.

Микроскопическое изображение

I. Процедура регистрации EdU

1. Поместите клетки в суспензию по 200 мкл на лунку на предметном стекле с 8 лунками при желаемой плотности. Дайте клеткам восстановиться.

2. Приготовьте 10-кратный рабочий раствор EdU в предварительно подогретой среде из 10 мм исходного раствора EdU, приготовленного на этапе А.1. Рекомендуемый диапазон начальной концентрации составляет 10-20 мкМ конечной. Например, чтобы нанести конечную концентрацию EdU в 10 мкМ, приготовьте рабочий раствор EdU в 100 мкМ путем разбавления 10-миллиметровой смеси 1:100 в готовом средстве. Нанесите 20 мкл рабочего раствора 100 мкМ в каждую лунку, содержащую 200 мкл среды.

3. Инкубируйте клетки в течение желаемого периода времени в условиях, оптимальных для данного типа клеток.

4. Немедленно приступайте к этапам фиксации и проницаемости.

II. Фиксация и проницаемость клеток

В соответствии с этим протоколом клетки сначала фиксируют с использованием 3,7% формальдегида, разведенного в PBS, с последующей стадией пермеабилзации 0,5% Triton X-100.

1. Добавьте 200 мкл 3,7%-ного формальдегида в PBS (фиксирующий раствор) в каждую лунку, содержащую предметное стекло камеры. Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре.

2. Удалите фиксирующий раствор и промойте клетки 200 мкл 3%-ного BSA в PBS на лунку.

3. Удалите промывочный раствор и добавьте по 200 мкл 0,5%-ного раствора Triton X-100 в PBS (растворе для пермеабилзации) в каждую лунку. Инкубируйте в течение 20 минут при комнатной температуре.

4. Дважды промойте клетки 200 мкл 3%-ного BSA в PBS.

C. Флуоресцентное обнаружение EdU

Для предметных стекол или 96-луночных планшетов рекомендуется 100 мкл реакционного коктейля на лунку. По желанию заказчика могут быть применены большие или меньшие объемы, при условии, что компоненты реакции используются в одинаковых соотношениях.

Реакционный коктейль – 100мкл на лунку

Компоненты	Объем
Деионизированная вода	75,8мкл
Реакционный буфер (10X)	10мкл
Раствор катализатора	4мкл
Краситель-азид (10мМ)- профлуорофор	0,2мкл
Буферная добавка (которую мы приготовили)	10мкл
Общий объем	100мкл

Таблица 2 - состав реакционного коктейля (для клик реакции)

2. Добавьте по 100 мкл реакционного коктейля в каждую лунку. Слегка встряхните горку или тарелку, чтобы равномерно распределить реакционный коктейль.

3. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре. Защищайте от света.

4. Удалите реакционный коктейль; трижды промойте клетки 200 мкл 3%-ного BSA в PBS. Удалите промывочный раствор. Для проточного нанесения трижды промойте клетки 200 мкл 3%-ного BSA в PBS путем центрифугирования. Будьте осторожны, чтобы не потревожить гранулы клеток при удалении промывочного раствора.

2.3 Клик реагент

EdU (5-этинил-2'-дезоксидеоксиуридин) представляет собой новую альтернативу анализу BrdU (5-бром-2'-дезоксидеоксиуридин) для прямого измерения активного синтеза ДНК или синтеза S-фазы клеточного цикла. EdU является нуклеозидным аналогом тимидина и встраивается в ДНК во время активного синтеза ДНК.¹ Обнаружение EdU основано на клик-реакции,¹⁻⁵ которая представляет собой катализируемую медью (I) реакцию между азидом и алкином. EdU содержит алкин, который может реагировать с реагентом для обнаружения, содержащим азид, с образованием стабильного триазольного кольца. Преимущества клик-реакции с мечением EdU очевидны при проведении анализа. Небольшой размер азидов для обнаружения позволяет использовать мягкие условия для доступа к EdU, встроенному в ДНК. Это отличается от анализов на основе BrdU, которые требуют денатурации ДНК (обычно с использованием HCl, нагревания или расщепления ДНКазой), чтобы подвергнуть BrdU обнаружению с помощью антитела против BrdU.

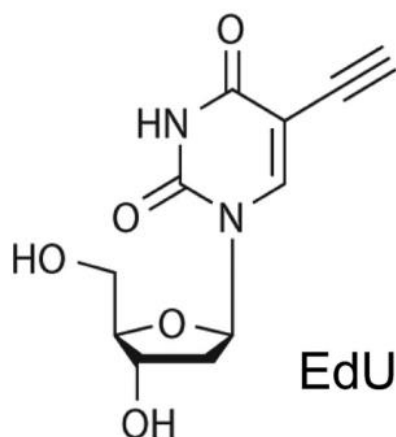


Рисунок 7 - Структура EdU аналогична структуре тимидина, но содержит алкиновую группу в 5-м положении пиримидиновой группы.

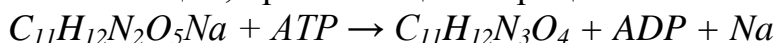
Обнаружение синтеза ДНК в растущих организмах важно для

биологической науки, включая пролиферацию и дифференцировку клеток, динамику клеточного цикла и канцерогенез. Для обнаружения проводят маркировку ДНК с использованием пиримидиновых нуклеозидов, таких как [3H] тимидин, бромдезоксисуридин (BrdU) и 5-этинил-2'-дезоксисуридин (EdU). Мечение ДНК [3H]тимидином - мощный метод, но во многих исследованиях он был заменен BrdU, поскольку автордиография требует специального оборудования и является трудоемкой и отнимающей очень много времени.⁴ В качестве альтернативы BrdU нанесение этикеток происходит быстрее и обеспечивает лучшие результаты при микроскопическом анализе. Однако после включения BrdU в реплицированный ДНК во время S-фазы для этого метода требуется антитело против BrdU, которое не может связываться с BrdU в двухцепочечной ДНК без резкой денатурации ДНК для превращения в одноцепочечную ДНК. Недавно методы мечения ДНК с использованием EdU были описаны как альтернатива как [3H]тимидину, так и BrdU. Он содержит алкиновую группу, которая реагирует с флуоресцентным азидом в катализируемом медью циклоприсоединении азид-алкин (CuAAC) в клик реакции. Основное преимущество использования EdU для обнаружения ДНК заключается в том, что меченая ДНК может быть обнаружена без денатурации, поскольку гораздо меньший размер флуоресцентного азида обеспечивает доступ к алкиновой группе встроенного EdU. Несмотря на эти преимущества, EdU является высокотоксичным антиметаболитом, вызывающим гибель клеток. Его цитотоксичность является препятствием для исследований по мечению ДНК, которые требуют последующего выживания клеток. Поэтому EdU был модифицирован для снижения его цитотоксичности путем замены фтора, гидроксила и метильные группы с 2'-водородом. Были созданы не только пиримидиновые, но и пуриновые аналоги нуклеозидов, содержащие алкиновую группу. Эти соединения были разработаны, чтобы обойти антиметаболический путь EdU и сохранить алкиновую группу для клик-химии с флуоресцентным азидом. Здесь мы применили другой подход путем фосфорилирования EdU. Основываясь на структуре EdU, было проведено химическое фосфорилирование по 5'-гидроксильной группе. Ожидалось, что химическое монофосфорилирование повысит эффективность субстрата при полимеризации ДНК за счет обхода стадия ферментативного монофосфорилирования, которая потребляет энергию. Однако фосфорилированное соединение, как правило, неэффективно при проникновении через клеточную мембрану из-за его отрицательных зарядов. Следовательно, проницаемость клеток была повышена за счет защиты фосфатов бис-пивалоилоксиметилом [бис-(POM)], который достаточно стабилен в буфере и плазме и обратим внутри различных типов клеток. После проникновения в клеточную мембрану прогрессирующая дегградация бис(POM)-защитных групп постепенно восстанавливает монофосфат EdU и может предотвратить чрезмерные концентрации тимидиноподобных антиметаболитов, приводящие к снижению цитотоксичности.

2.4 Синтез этилированного дезоксиуридина (EdU)

Синтез *EdU* был выполнен следующим образом: В круглую колбу был подан аргон, а затем добавлены *IdU* (371 мг, 1,04 ммоль), палладиевый тетраakis(трифенилфосфин) (113 мг, 98 ммоль) и йодид меди (47 мг, 250 ммоль). Анидный *DMF* (12 мл) был добавлен при помощи шприца, и смесь была недолго перемешана при комнатной температуре. После растворения в колбу были добавлены триэтиламин (0,4 мл, 2,9 ммоль) и триметилсилилацилин (0,71 мл, 5,0 ммоль). Грубую смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3,5 часов, затем концентрировали при помощи роторного испарителя. Полученный остаток был очищен методом флэш-колоночной хроматографии (*MeOH-DCM* = 1:9), что дало 444 мг желтоватой пены. Пена, 5-(триметилсилил) этинил-2'-дезоксиуридин, была растворена в *THF* (4 мл), а затем к смеси был добавлен *TBAF* в *THF* (1,2 мл, 1 М, 1,2 ммоль), после чего смесь перемешивалась при комнатной температуре в течение 3 часов. Затем смесь прошла фильтрацию, чтобы удалить белый осадок, который затем промывали малым количеством *THF* и элюировали (*MeOH-DCM* = 1:9). Полученные фильтраты концентрировали и очищали методом флэш-колоночной хроматографии (*MeOH-DCM* = 1 : 9), что дало 181 мг (69%) белого твердого вещества.

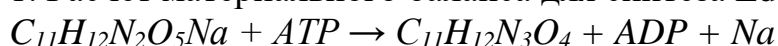
Реакции, протекающие в процессе:



В этом уравнении $C_{11}H_{12}N_2O_5Na$ представляет собой результат реакции синтеза *EdU*. Это соединение реагирует с *ATP* (аденозинтрифосфатом), образуя $C_{11}H_{12}N_3O_4$ (фосфорилированный 5-этинил-2'-дезоксиуридин), *ADP* (аденозиндифосфат) и Na^+ (ион натрия) в качестве побочных продуктов.

2.5 Расчет материального баланса

1. Расчет материального баланса для синтеза *EdU*:



Приведем исходные данные синтеза *EdU* (таблица n).

Состав сырья, г	Вещество	Масса
	<i>IdU</i>	371 мг
	Палладиевый тетраakis(трифенилфосфин)	113 мг
	Йодид меди	47 мг
	Анидный <i>DMF</i>	12 мл
	Триэтиламин	0,4 мл
	Триметилсилилацилин	0,71 мл
	<i>THF</i>	4 мл
	<i>TBAF</i> в <i>THF</i>	1,2 мл, 1 М

Таблица 3 - Исходные данные синтеза *EdU*

Суммарная масса всех компонентов:

$$\Sigma m = 371 \text{ мг} + 113 \text{ мг} + 47 \text{ мг} + 12 \text{ мл} + 0,4 \text{ мл} + 0,71 \text{ мл} + 4 \text{ мл} + 1,2 \text{ мл} = 549,31 \text{ мг}$$

Содержание исходных веществ в смеси рассчитывается по формуле :

$$w_{\text{компонента}} = \frac{m \times 100}{\Sigma m} \quad (1)$$

$$w(\text{IdU}) = \frac{371 \text{ мг} \times 100}{549,31} = 67,5\%$$

$$w_{\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3} = \frac{113 \text{ мг} \times 100}{549,31} = 20,6\%$$

$$w(\text{CuI}) = \frac{47 \text{ мг} \times 100}{549,31} = 8,6\%$$

$$w(\text{анидного DMF}) = \frac{12 \text{ мл} \times 100}{549,31} = 2,2\%$$

$$w((\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}) = \frac{0,4 \text{ мл} \times 100}{549,31} = 0,1\%$$

$$w(\text{C}_8\text{H}_{18}\text{Si}_2) = \frac{0,71 \text{ мл} \times 100}{549,31} = 0,1\%$$

$$w(\text{THF}) = \frac{0,4 \text{ мл} \times 100}{549,31} = 0,7\%$$

$$w(\text{TBAF в THF}) = \frac{1,2 \text{ мл} \times 100}{549,31} = 0,2\%$$

приход			расход		
статья	м, г	w, %	статья	м, г	w, %
IdU	371	67,5	EdU	181	32,9
Палладиевый тетракис(трифенилфосфин)	113	20,6	Нагри	32	5,82
			ADP	158	28,76
			Потери	84,32	1,2
Йодид меди	47	8,6	Палладиевый тетракис(трифенилфосфин)	113	20,6
Анидный DMF	12	2,2	Йодид меди	47	8,6
Триэтиламин	0,4	0,1	Анидный DMF	12	2,2
Триметилсилилацилин	0,71	0,1	Триэтиламин	0,4	0,1

THF	4	0,7	Триметилсилилацилин	0,71	0,1
ТВАФ в THF	1,2	0,2	ТВАФ в THF	1,2	0,9
Итого	549,31	100	Итого	549,31	100

Таблица 4 - Материальный баланс синтеза реагента

Таким образом, содержание компонентов в сырье будет:

1. IdU: 67,5%
2. Палладиевый тетраакис(трифенилфосфин): 20,6%
3. Йодид меди: 8,6%
4. Анидный DMF: 2,2%
5. Триэтиламин: 0,1%
6. Триметилсилилацилин: 0,1%
7. THF: 0,7%
8. ТВАФ в THF: 0,2%

Расчет практического выхода реакции:

Практический выход (%) = (масса полученного продукта / масса теоретического выхода) × 100

Масса полученного продукта = 21 мг (дано)

Теоретический выход = $\Sigma m = 549,31$ мг (рассчитано ранее)

Практический выход = $(21 \text{ мг} / 549,31 \text{ мг}) \times 100 \approx 3.82\%$

Таким образом, практический выход реакции составляет примерно 3.82%.

Расчет процента потерь при очистке:

Потери при очистке (%) = $100 - \text{Практический выход} (\%) = 100 - 3.82\% \approx 96.18\%$

Таким образом, процент потерь при очистке составляет примерно 96.18%.

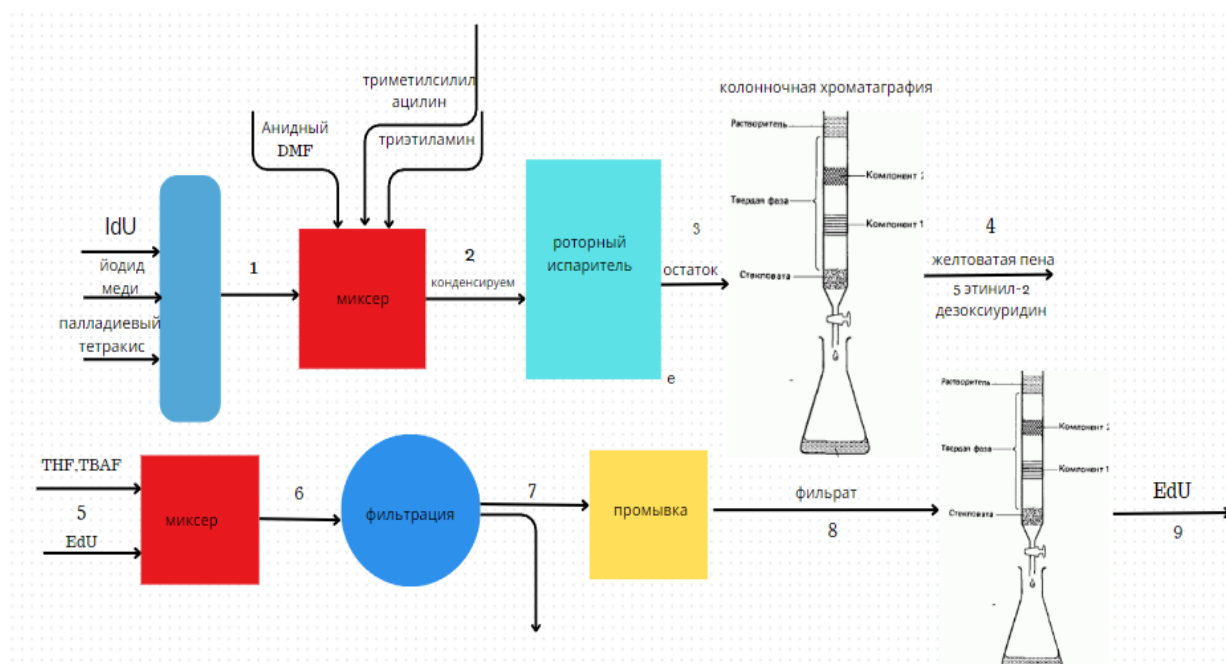


Рисунок 8 - Технологическая схема синтеза клик реагента

- 1-реактор;
- 2,5- миксер;
- 3-роторный испаритель;
- 4,8-хроматография
- 6-фильтрация

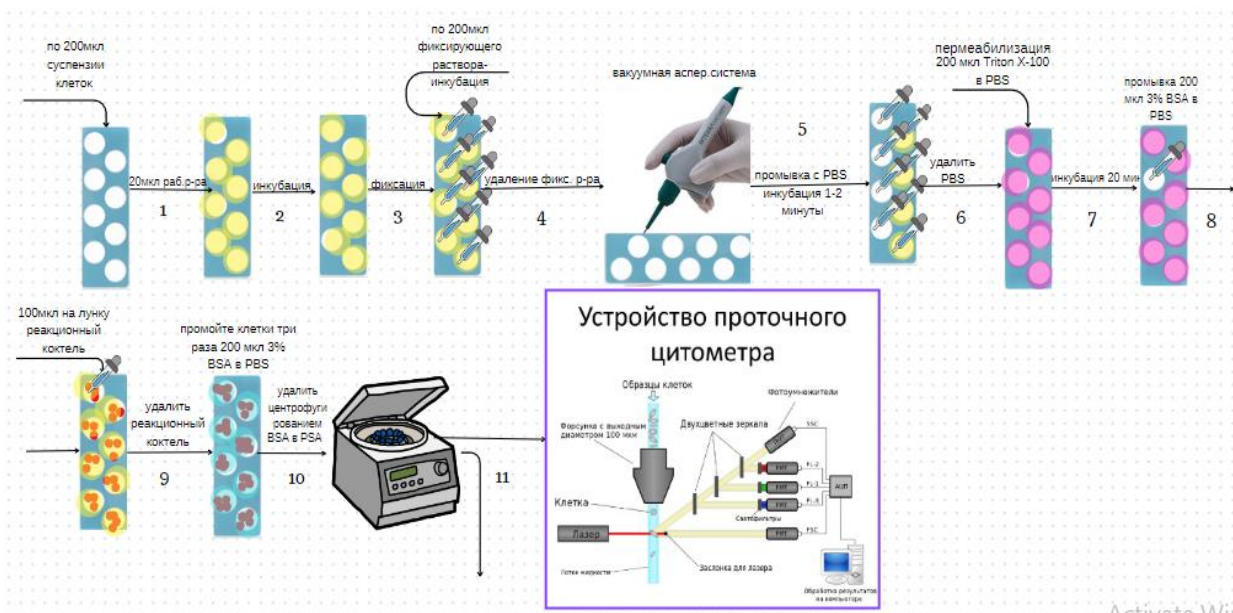


Рисунок 9 - Технологическая схема проточной цитометрии

Расчет материального баланса анализа проточной цитометрии

Материал	Вход	Материал	Выход
Суспензия клеток	По 212,032 мг	Мы прекращаем репликацию и изменение клеток с помощью формальдегида	375,032 мг
формальдегид	По 163мг		

Таблица 5 - Фиксация клеток

Промывка

Материал	Вход	Материал	Выход
Фиксированные клетки	По 375,032 мг	Удаляем фиксирующий раствор	215,032мг
Промывочный раствор BSA в PBS	По 423.032 мг	Промываем и удаляем промывочный раствор	227,032

Таблица 6 – Промывка клеток от фиксирующего раствора

Материал	Вход	Материал	Выход
Промытый раствор клеток	По 227,032мг	Пермеабиллизированные клетки уже позволяют проникать клеткаи внутрь, разрушены их клеточные мембраны	428,102
Triton X-100	По 201,07мг		

Таблица 7 - Пермеабиллизация

Промывка

Материал	Вход	Материал	выход
Пермеабиллизированные клетки	По 428,102мг	Triton X-100 Удаляют	238,102мг
Промывочный раствор BSA в PBS	По 446мг	Промываем клетки	246,102мг

Таблица 8 – Промывка клеток после пермеабиллизации

Материал	вход	материал	выход
Промытые клетки	По 246,102мг	В ходе клик реакции, к нашим клеткам присоединился флуорофор, катализатор, деионизированная вода, реакционный буфер , и прошла клик реакция, клетки окрасились. Инкубируем и удаляем реакц.коктель	266мг

Реакционный коктейль	По 100 мг		
промывка	474мг	удаляем промывочный раствор	274мг

Таблица 9 – Клик реакция в анализе

В ходе использования клик реагента в проточной цитометрии, мы получили окрашенные клетки, которые связались с азидом флуорофором, с помощью клик реакции.

3 Расчетная часть

3.1 Расчет стоимости исходных веществ

Расчет стоимости исходных веществ получали исходя из рыночной стоимости необходимых веществ. Среди стран СНГ средняя цена на бензилхлорид составляет 745 \$ за 50 кг. За 1 кг соответственно – 14,9 \$/кг. На предприятии среднегодовое получение продукта составляет 1,1 т/год. Таким образом рассчитываем стоимость веществ на 1кг, а также годовую стоимость (таблица 21).

Вещество	Це на за 200 мг, \$	Ко л-во, мг	Дневн ая стоимость, \$	Итогов ая стоимость, тыс. \$
Формальдегид 3,7	11,5	200	11,5	4.1тыс.
Triton X-100 0,5 %	264,8	100	132,4	48тыс.
Деионизированная вода	5,82	75,8	1,86	0,678тыс.
Реакционный буфер (10X)	156,69	10	15,34	5,5тыс.
Раствор катализатора	33,62	4	7,34	2.7тыс.
Краситель-азид	203,4	0,2	9,42	3,4тыс.
3 % BSA	165	400	330	120тыс
IdU	362,76	371	487,2	177тыс.
Палладиевый тетракис	14,51	113	10,4	1,1тыс.
Йодид меди	31,52	47	15,2	0,714тыс.
Анидный DMF	29,02	12	4,2	1,5тыс.
Триэтиламин	18,24	0,4	1,1	0,401тыс.
Триметилсилилаци лин	381,23	0,71	9,2	3,3тыс.
Смесь TBAF	82,22	1,2	2,6	0,949тыс.
Итого	1759,64	1335,31	1037,76	369342

Таблица 10 — Расчет стоимости исходных веществ

3.2 Затраты на оборудование и аренду помещения

Оборудование, которое необходимо для оборудования:

- проточный цитометр;
- центрифуга;
- фильтрация;

- роторный испаритель;
- флэш-колоночная хроматографии;
- холодильник;
- пипетка.

В таблице 23 указаны характеристики выбранного нами оборудования. Выбор оборудования производился строго по его параметрам и характеристикам. Указанные цены актуальны на май 2023 года.

№	Наименование	Кол-во	Стоимость, \$
1	Проточный цитометр	1	146,12
2	Центрифуга	1	448,22
3	Фильтрация	1	225
4	Роторный испаритель	1	2650
5	Флэш-колоночная хроматография	2	2000
6	Пипетка	1	15
7	Холодильник	1	483,6
	Итого		5967,94

Таблица 11 — характеристики основного оборудования

Для размещения производства нам необходимо помещение площадью 11×100 или 11 соток. Учитывая среднюю стоимость помещения подобной площади для лабораторий, возьмем арендную плату 750 \$/мес. В год это составит:

$$750\$/мес \times 12мес = 9000\$/год$$

3.3 Расчет затрат на заработную плату персонала

Для нашего производства необходимо 4 человека:

- 2 научных сотрудника
- 1 профессор
- 1 технолог

Средняя зарплата профессора сотрудников составляет 800 тыс. тенге/месяц. Средняя зарплата научных сотрудников составляет 400тыс тенге/месяц, с учетом количества работников заработная плата составит 1млн.600тыс тенге/мес. Зарботная плата технолога — 200тыс. тенге/месяц.

$$C_{OL} = N_{чел} \times ЗП \frac{\text{тенге}}{\text{мес}} \times 12 \frac{\text{мес}}{\text{год}} \quad (4)$$

$$C_{OL1} = 1чел \times 800тыс. \frac{\text{тенге}}{\text{месяц}} \times 12 \frac{\text{мес}}{\text{год}} = 9,6 \text{ млн. тенге}$$

$$C_{OL2} = 2 \text{ чел} \times 400 \text{ тыс.} \frac{\text{тенге}}{\text{месяц}} \times 12 \frac{\text{мес}}{\text{год}} = 9,6 \text{ млн. тенге}$$

$$C_{OL3} = 1 \text{ чел} \times 200 \text{ тыс.} \frac{\text{тенге}}{\text{месяц}} \times 12 \frac{\text{мес}}{\text{год}} = 2,4 \text{ млн. тенге}$$

Общие затраты на работников составит 36,1 млн. тенге/год или 81000\$/год (таблица 24)

№	должность	Кол-во	Зарботная плата на 1 чел, тг	Зарботная плата в год, тг	Зарботная плата в год, \$
1	Профессор	1	800 000	9,6млн	21523,29
2	Научный сотрудник	2	400 000	9,6млн	21523,29
3	Технолог	1	200 000	2,4 млн	5395,82
	Итого	4	1 960 000	36,1 млн	80877,35

Таблица 12 — заработная плата персонала

3.4 Расчет годового дохода

Рыночная стоимость анализов составляет 250 \$. В год производительность составит 250г/год. Тогда доход составит:

$$250 \text{ г/год} \times 250 \text{ \$} = 625 \text{ млн \$}$$

Учитывая налог в 10% на юридическое лицо, мы получим 562млн \$.

3.5 Расчет возврата инвестиций

Рассчитаем показатель ROI («return on investment», возврат инвестиций) по формуле (5)

$$ROI = \left(\frac{(\text{доход} - \text{затраты})}{\text{затраты}} \right) \times 100\% \quad (5)$$

Расходы на оборудование: \$5952,94

Расходы на реагенты: \$369342

Затраты на зарплату персонала в год: \$80877,35

Аренда помещения: \$9000 в год

Прибыль в год: \$33,7 млн в год

$$ROI = \left(\frac{(562500000 - 465171,94)}{465171,94} \right) \times 100\% = 120\%$$

Показатель больше 100, что означает хорошую окупаемость проекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была изучена литература по клик химии и по клик реагентам, а также по синтезу получения клик реагента, а также его дальнейшее использование.

Были проведены расчеты, и подсчитаны затраты на лабораторию.

Разработка клик реагента поможет проводить высокоточные анализы определяющие пролиферацию клеток, это поможет в диагностировании заболеваний, в определении эффективности лечения. Помимо этого анализы могут проводиться и в исследовательских целях.

ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

EdU – 5-этинил-2-дезоксиуридин

pRB – Ретинобластомный белок

BrdU – Бромдезоксиуридин

ЗН – Тимидин

АТФ – Аденозинтрифосфатом

РВМС – Мононуклеарная клетка

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шелбурн, М. ; Браун, Т. ; Эль-Сагир, А.Х. ; Браун, Т. Быстрое и эффективное сшивание ДНК и множественное ортогональное мечение с помощью Click Chemistry, не содержащей меди. 2012
2. Дебец, МФ ; Ван Беркель, СС ; Доммерхолт, Дж. ; Диркс, Эй Джей ; Рутес, ФРТ ; Ван Делфт, Ф.Л. Биоконъюгация с напряженными алкенами и алкинами . 2011
3. Эманн, Великобритания; Уильямс, младший; Нэгл, Вашингтон; Браун, Дж. А.; Белли, Дж. А.; Летт, Дж. Т. Нарушения хода клеточного цикла из-за радиоактивных предшественников ДНК.
4. Цэн, СВ; Пан, ФХ; Джонс, Лос-Анджелес; Лим, ММ; Гриффин, ЕА; Шелин, Ю.И.; Минтун, Массачусетс; Хольцман, ДМ; Мах, Р. Х. Оценка окрашивания 5-этинил-2'-дезоксинуридином как чувствительного и надежного метода изучения пролиферации клеток во взрослой нервной системе. *Mozg Res.* 2010.
5. Бойс, М. и Бертоцци, Ч.Р. Химия в жизни. Нац. Методы 8, 638–642 (2011).
6. Грамлич, П. М., Виргес, С. Т., Манетто, А. и Карелл, Т. Постсинтетическая модификация ДНК с помощью катализируемой медью реакции азид-алкинового циклоприсоединения. *Ангью. хим. Междунар. Эд.* 47, 8350–8358 (2008).
7. Эль-Сагир, А. Х. и Браун, Т. Лигирование нуклеиновых кислот по щелчку: приложения в биологии и нанотехнологиях. *Акк. хим. Рез.* 45, 1258–1267 (2012).
8. Салик А. и Митчисон Т.Дж. Химический метод быстрого и чувствительного обнаружения синтеза ДНК *in vivo* . *проц. Натл. акад. науч. США* 105, 2415–2420 (2008).
9. Ямакоши, Х. и др. Визуализация EdU, меченого алкином зонда для пролиферации клеток, с помощью рамановской микроскопии. *Варенье. хим. соц.* 133, 6102–6105 (2011).
10. Зессин, П.Дж., Финан, К. и Хейлеманн. М. Флуоресцентная визуализация хромосомной ДНК со сверхвысоким разрешением. *Дж. Структура. биол.* 177, 344–348 (2012).
11. Ли, К., Ли, Л.А., Лу, Х. и Ван, К. Флуорогенная реакция «щелчка» для мечения и обнаружения ДНК в пролиферирующих клетках. *Биотехнологии* 49, 525–527 (2010).
12. Лим, Р.К. и Лин, К. Биоортогональная химия: недавний прогресс и будущие направления. *хим. коммун.* 46, 1589–1600 (2010).
13. Сивакумар, К. и др. Флуорогенная реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения 3-азидокумаринов и ацетиленов. *Орг. лат.* 6, 4603–4606 (2004).
14. <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/11/3007#B115-molecules-23-03007>

15. <https://mygenetics.ru/blog/genetika/iz-chego-sostoit-dnk/>

РЕЦЕНЗИЯ

на _____ дипломный проект _____
(наименование вида работы)

Имирова Фируза Тохтахуновна

(Ф.И.О. обучающегося)

6B05101 — «Химическая и биохимическая инженерия»

(шифр и наименование ОП)

На тему: «Разработка технологии получения клик-реагентов для применения на ДНК»

ЗАМЕЧАНИЯ К РАБОТЕ

Дипломный проект на тему «Разработка технологии получения клик-реагентов для применения на ДНК» был выполнен в соответствии со всеми требуемыми нормами и целями. В работе выполнен тщательный аналитический обзор литературы, и произведены все расчеты.

Проект содержит важные результаты исследования, включая разработку конкретного клик-реагента с использованием его в качестве инструмента для молекулярных исследований на ДНК. Студент представил все необходимые данные, доказывающие значимость и практическую применимость разработанного клик-реагента. Работа заслуживает оценки "отлично" и может быть использована в качестве основы для дальнейших исследований и разработок в области молекулярной генетики и фармацевтической химии.

Данный дипломный проект посвящен разработке клик реагентов для применения на ДНК и показывает высокий уровень подготовки и компетентности студента. Представленный дипломный проект выполнен на высоком уровне, соответствует всем требованиям, предъявляемым к работам данного уровня, работа заслуживает оценки «отлично».

Оценка работы

Дипломный проект на тему «Разработка технологии получения клик-реагентов для Применения на ДНК» оцениваю на хорошо, и считаю, что Имирова Фируза Тохтахуновна заслуживает квалификации бакалавра по образовательной программе 6B05101 — «химическая и биохимическая инженерия».

Рецензент

Доктор Ph.D, руководитель лаборатории «Перспективные материалы и технологии» АО

КБТУ
(должность, уровень, звание)

Шарипов Р.Х.

(подпись)
« 25 »

май

2023 г.



ОТЗЫВ

НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

на дипломный проект

(наименование вида работы)

Имирова Фируза Тохтахуновна

(Ф.И.О. обучающегося)

6B05101-Биотехнология

(шифр и наименование специальности)

Тема:

Разработка технологии получения клик-реагентов для применения на ДНК

Клик химия является одной из многообещающих подходов в области синтеза органических соединений и функционализации биомолекул. Она основана на быстрых и специфичных реакциях между выбранными реагентами, которые обеспечивают высокую чистоту и эффективность реакций.

Разработка клик реагентов и использование клик химии представляет собой важное направление исследований в области биологии и молекулярной генетики. Данное направление предлагает новый подход к маркировке и визуализации ДНК, который может иметь значительное влияние на наше понимание процессов репликации и пролиферации клеток.

Однако, необходимо отметить, что данная технология все еще находится в стадии развития и требует дальнейших исследований. Важно продолжать работу над оптимизацией клик реагентов, а также исследовать их воздействие на живые системы, включая клетки и организмы.

Применение клик реагентов на ДНК может иметь широкий спектр применений. Исследования показывают, что изменения в репликации и синтезе ДНК могут быть связаны с различными заболеваниями. Поэтому, использование разработанных клик реагентов может предоставить новые инструменты для диагностики и изучения этих заболеваний.

В целом, произведена работа по изучению и разработке клик реагента для применения на ДНК, что представляет собой важный вклад в наше понимание клеточных процессов и их связи с различными заболеваниями. Дальнейшие исследования и оптимизация данного подхода могут привести к новым диагностическим и терапевтическим возможностям в медицине и сельском хозяйстве.

Дипломная работа на тему «Разработка технологии получения клик-реагентов для применения на ДНК» оцениваю на 95 баллов, и считаю, что Имирова Фируза Тохтахуновна заслуживает квалификации бакалавра по специальности 6B05101-«Химическая и биохимическая инженерия».

Научный руководитель

Ассоциированный профессор, доктор Ph. D

(должность, уч. степень, звание)



Хабиев А.Т.

(подпись)

«___» _____ 2023г.



Метаданные

Название

Разработка технологии получения клик реагентов для применения на ДНК.docx

Автор

Научный руководитель / Эксперт






Имирова Фируза**Алибек Хабиев**

Подразделение

ИГИНГД

Список возможных попыток манипуляций с текстом

В этом разделе вы найдете информацию, касающуюся текстовых искажений. Эти искажения в тексте могут говорить о ВОЗМОЖНЫХ манипуляциях в тексте. Искажения в тексте могут носить преднамеренный характер, но чаще, характер технических ошибок при конвертации документа и его сохранении, поэтому мы рекомендуем вам подходить к анализу этого модуля со всей долей ответственности. В случае возникновения вопросов, просим обращаться в нашу службу поддержки.

Замена букв		0
Интервалы		0
Микропробелы		4
Белые знаки		0
Парафразы (SmartMarks)		2

Объем найденных подобиий

Обратите внимание! Высокие значения коэффициентов не означают плагиат. Отчет должен быть проанализирован экспертом.



КП1

25

Длина фразы для коэффициента подобия 2



КП2

7830

Количество слов



КЦ

38541

Количество символов

Подобия по списку источников

Просмотрите список и проанализируйте, в особенности, те фрагменты, которые превышают КП №2 (выделенные жирным шрифтом). Используйте ссылку «Обозначить фрагмент» и обратите внимание на то, являются ли выделенные фрагменты повторяющимися короткими фразами, разбросанными в документе (совпадающие сходства), многочисленными короткими фразами расположенные рядом друг с другом (парафразирование) или обширными фрагментами без указания источника ("криптоцитаты").

10 самых длинных фраз

Цвет текста

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ И АДРЕС ИСТОЧНИКА URL (НАЗВАНИЕ БАЗЫ)	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)	
1	https://stroyfederal.ru/mednye-krovli-dlya-hramov/	8	0.10 %
2	https://stroyfederal.ru/mednye-krovli-dlya-hramov/	6	0.08 %
3	https://stroyfederal.ru/mednye-krovli-dlya-hramov/	5	0.06 %

из базы данных RefBooks (0.00 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

из домашней базы данных (0.00 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

из программы обмена базами данных (0.00 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

из интернета (0.24 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	ИСТОЧНИК URL	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)	
1	https://stroyfederal.ru/mednye-krovli-dlya-hramov/	19 (3)	0.24 %

Список принятых фрагментов (нет принятых фрагментов)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	СОДЕРЖАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	------------	---