

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

Давыдова Анна Сергеевна

**НОВЫЕ МОНО- И БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ
2'-F-МОДИФИЦИРОВАННЫХ РНК-АПТАМЕРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕМОГЛОБИНА
ЧЕЛОВЕКА**

1.4.9 – биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель

к.х.н. Воробьева М. А.

Новосибирск-2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. АПТАМЕРЫ КАК УЗНАЮЩИЕ ЭЛЕМЕНТЫ БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БИОМАРКЕРОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	13
1.1. Получение аптамеров методом SELEX.....	14
1.2. Дизайн комбинаторных библиотек для селекции <i>in vitro</i>	15
1.3. Химические модификации библиотек для SELEX	16
1.4. Применение аптамеров	18
1.5. Аптасенсоры для детекции биомаркеров различных заболеваний в крови	27
1.5.1. Биомаркеры злокачественных заболеваний.....	27
1.5.1.1. Фактор роста эндотелия сосудов.....	27
1.5.1.2. CD63 как основной белок экзосом	30
1.5.1.3. Муцин-1	34
1.5.1.4. Раковый эмбриональный антиген	35
1.5.1.5. Другие маркеры онкологических заболеваний.....	36
1.5.2. Биомаркеры нейродегенеративных заболеваний	37
1.5.2.1. Дофамин.....	37
1.5.2.2. Другие маркеры нейродегенеративных заболеваний.....	40
1.5.3. Биомаркеры стресс-опосредованных заболеваний	40
1.5.4. Биомаркеры воспалительных заболеваний	41
1.5.5. Биомаркеры сердечно-сосудистых заболеваний	44
1.5.6. Биомаркеры сахарного диабета.....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	56
2.1. Материалы	56
2.1.1. Реактивы и ферменты.....	56
2.1.2. Буферные растворы	56
2.2. Методики эксперимента	57

2.2.1. Химический синтез, деблокирование и очистка ДНК-библиотек и праймеров для их амплификации.....	57
2.2.2. Исчерпывающий гидролиз ДНК-библиотек с помощью фосфодиэстеразы змеиного яда.....	58
2.2.3. Ферментативный синтез двуцепочечных ДНК-библиотек	58
2.2.4. Синтез 2'-F-РНК-библиотеки методом транскрипции <i>in vitro</i>	58
2.2.5. Химический синтез, деблокирование и очистка индивидуальных 2'-F-РНК-аптамеров.....	58
2.2.6. Химический синтез, деблокирование и очистка индивидуальных ДНК-аптамеров.....	59
2.2.7. Иммобилизация белковых мишеней для проведения селекции	59
2.2.7.1. Ковалентная иммобилизация белков-мишеней на магнитных частицах	59
2.2.7.2. Нековалентная иммобилизация His ₆ -содержащих белков на Ni-сорбентах	60
2.2.8. <i>In vitro</i> селекция 2'-F-РНК-аптамеров к белковым мишеням.....	60
2.2.8.1. Отбор 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих суммарный гемоглобин	60
2.2.8.2. Отбор 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих гликированный гемоглобин HbA _{1c}	61
2.2.8.3. Отбор 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих фотопротеин обелин.....	61
2.2.8.4. Анализ обогащения библиотек в ходе селекции аптамеров.....	61
2.2.8.5. Высокопроизводительное секвенирование на платформе MiSeq (Illumina) и анализ полученных данных.....	62
2.2.9. Введение радиоактивной метки на 5'-конец 2'-F-пиримидин-модифицированных РНК-библиотек и индивидуальных аптамеров.....	62
2.2.10. Синтез конъюгатов 2'-F-РНК-аптамеров.....	62
2.2.10.1. Синтез биотинилированных производных индивидуальных аптамеров	62
2.2.10.2. Синтез флуоресцентно меченых индивидуальных аптамеров	63
2.2.11. Исследование вторичной структуры квадруплекс-формирующих 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих суммарный гемоглобин	63
2.2.11.1. КД-спектроскопия.....	63

2.2.11.2. Частичный гидролиз 2'-F-РНК-аптамеров с помощью РНКазы Т1 в неденатурирующих условиях	63
2.2.11.3. Частичный гидролиз 2'-F-РНК-аптамеров с помощью РНКазы Т1 в денатурирующих условиях	63
2.2.11.4. Частичный щелочной гидролиз 2'-F-РНК-аптамеров.....	64
2.2.11.5. Флуоресцентная спектроскопия	64
2.2.12. Билюминесцентный гетерофазный анализ связывания аптамеров с белками	64
2.2.13. Колориметрический анализ аффинности 2'-F-РНК-аптамеров к гемоглобину	65
2.2.14. Анализ аффинности радиоактивно меченых 2'-F-РНК-библиотек и индивидуальных аптамеров к обелину.....	66
2.2.14.1. Анализ образования комплексов аптамеров с обелином методом задержки в геле	66
2.2.14.2. Анализ формирования комплексов аптамеров с обелином методом DRaCALA	66
2.2.15. Колориметрическая микропланшетная детекция гемоглобина в формате сэндвич-системы.....	67

ГЛАВА 3. СОЗДАНИЕ НОВЫХ 2'-F-МОДИФИЦИРОВАННЫХ РНК-АПТАМЕРОВ И АНАЛИТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ НА ИХ ОСНОВЕ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА (РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ)	68
3.1. Получение комбинаторной 2'-F-РНК-библиотеки для селекции <i>in vitro</i>	69
3.1.1. Оптимизация условий химического синтеза исходной ДНК-библиотеки.....	69
3.1.2. Определение равномерности нуклеотидного состава ДНК-библиотеки	70
3.1.3. Секвенирование рандомизированной ДНК-библиотеки	71
3.1.4. Получение исходной 2'-F-РНК-библиотеки для отбора аптамеров.....	73
3.2. Получение 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих суммарный (Hb) и гликированный (HbA1c) гемоглобина человека	74
3.2.1. <i>In vitro</i> селекция 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих различные варианты гемоглобина человека	74
3.2.2. Рациональный дизайн и синтез укороченных 2'-F-РНК-аптамеров	80
3.2.3. Исследование связывания 2'-F-РНК-аптамеров с белками-мишенями	84

3.2.3.1. Биоломинесцентный анализ аффинности индивидуальных аптамеров к суммарному и гликированному гемоглобинам.....	84
3.2.3.2. Гетерофазный колориметрический анализ аффинности аптамеров к суммарному и гликированному гемоглобинам.....	89
3.2.4. Анализ вторичной структуры 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих суммарный и гликированный гемоглобины	92
3.2.4.1. Исследование структуры 2'-F- РНК-аптамеров методом КД-спектроскопии....	92
3.2.4.2. Частичный гидролиз 2'-F-РНК-аптамеров с помощью рибонуклеазы Т1	94
3.2.4.3. Анализ связывания 2'-F-РНК-аптамеров с квадруплекс-специфичным флуоресцентным красителем тиофлавином Т	96
3.2.5. Исследование возможности применения полученных 2'-F-РНК-аптамеров в составе сэндвич-системы для колориметрической детекции суммарного гемоглобина	98
3.2.6. Конструирование сэндвич-системы детекции гликированного гемоглобина методом твердофазного биоломинесцентного анализа	101
3.3. Получение устойчивых в биологических средах РНК-аптамеров, связывающих фотопротеин обелин.....	102
3.3.1. Селекция <i>in vitro</i> 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих фотопротеин обелин.....	102
3.3.2. Дизайн и синтез укороченных 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих обелин.....	106
3.3.3. Анализ связывания индивидуальных 2'-F-РНК-аптамеров с обелином.....	107
3.3.4. Влияние связывания с аптамером на биоломинесцентную активность обелина..	110
3.3.5. Дополнительное укорочение 2'-F-РНК-аптамера O79t.....	112
3.4. Бифункциональные конструкции на основе 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров для детекции гемоглобина человека.....	113
3.4.1. Дизайн бифункциональных конструкций	113
3.4.2. Гетерофазный биоломинесцентный анализ связывания бифункциональных аптамеров с гемоглобином	115
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	117
ВЫВОДЫ.....	119
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	121
ПРИЛОЖЕНИЯ	137

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- 2'-F-СТР – 2'-дезоксид-2'-фтор-цитидинтрифосфат
- 2'-F-УТР – 2'-дезоксид-2'-фтор-уридинтрифосфат
- 2'-F-РНК-аптамер – РНК-аптамер, содержащий 2'-F-пиримидиновые нуклеотиды (U и C)
- ABTS – 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоукислота)
- АТР – аденозинтрифосфат
- AuNP – наночастицы золота
- Bio – биотин
- BP – бромфеноловый синий
- СТР – цитидинтрифосфат
- dNTP – дезоксирибонуклеозидтрифосфат
- DTT – дитиотреит
- FITC – изотиоцианат флуоресцеина
- GTP – гуанозинтрифосфат
- IgG – иммуноглобулины класса G
- Obe – обелин
- PEG – полиэтиленгликоль
- SELEX– systematic evolution of ligands by exponential enrichment
- УТР – уридинтрифосфат
- ХС – ксиленцианол
- АТ – антитела
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ДМФА – диметилформамид
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- дцДНК – двуцепочечная ДНК
- е. а. – единица активности
- ИФА – иммуноферментный анализ
- НК – нуклеиновая кислота
- о. е. – оптическая единица
- оцДНК – одноцепочечная ДНК
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ППР – поверхностный плазмонный резонанс
- ПСА – простатспецифический антиген
- ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

РЭА – раковый эмбриональный антиген

Трис – трис(оксиметил)аминометан

ЧСА – человеческий сывороточный альбумин

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Аптамеры на основе нуклеиновых кислот (НК-аптамеры) представляют собой относительно короткие одноцепочечные фрагменты ДНК и РНК, способные узнавать заданные молекулы-мишени за счет формирования уникальной пространственной структуры. По аффинности и специфичности связывания с мишенью аптамеры являются наиболее близкими аналогами моноклональных антител [1]. При этом возможность воспроизводимого и масштабируемого химического синтеза НК-аптамеров, их устойчивость при хранении и транспортировке, а также толерантность к введению химических модификаций делают их привлекательной альтернативой белковым антителам для решения различных молекулярно-биологических, биомедицинских и биотехнологических задач [2].

Химическая природа НК-аптамеров обуславливает целый ряд преимуществ для создания молекулярных конструкций на их основе. Прежде всего, функциональная активность аптамеров определяется их пространственной структурой, в основе которой лежат комплементарные взаимодействия между нуклеотидами. Таким образом, за счет варьирования длины и состава нуклеотидной последовательности можно изменять свойства аптамера. Кроме того, аптамеры представляют собой универсальные «строительные» блоки для создания многокомпонентных конструкций на основе нуклеиновых кислот. Комбинируя аптамерные модули, можно получать молекулы с необходимым набором свойств и функций [3,4]. Так, например, мультивалентные аптамеры могут включать в себя несколько копий одной и той же нуклеотидной последовательности для многоцентрового связывания молекул-мишеней. С другой стороны, соединение в одной конструкции аптамеров к разным мишеням позволяет получить молекулу, обладающую сочетанием функциональных характеристик. Уникальные возможности, которые дает использование аптамеров в качестве молекулярных узнающих элементов, обеспечили стойкий интерес исследователей в этой области синтетической химии нуклеиновых кислот. При этом одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений применения НК-аптамеров является создание на их основе адресных терапевтических препаратов и диагностических тест-систем [5,6].

В рамках данной работы была исследована возможность создания новых систем детекции на основе НК-аптамеров для количественного определения белковых биомаркеров на примере суммарного и гликированного гемоглобинов. Гликированный гемоглобин HbA_{1c} является одним из основных биомаркеров сахарного диабета. Его относительное содержание в суммарном гемоглобине крови позволяет оценить средний уровень гликемии за прошедшие 6-8 недель и может быть использовано для ранней диагностики заболевания или корректировки схемы лечения [7]. В текущей клинической практике для определения уровня

гликированного гемоглобина используют аффинную хроматографию, иммуноферментный анализ и масс-спектрометрию, однако каждый из этих методов имеет ряд недостатков, связанных с достоверностью и воспроизводимостью результатов, а также необходимостью приобретения высокотехнологичного дорогостоящего оборудования и привлечения высококвалифицированного персонала (см., например, [8,9]). Таким образом, создание доступных и надежных способов детекции биомаркеров сахарного диабета остается актуальной задачей. На данный момент в литературе описано несколько вариантов биосенсоров на основе ДНК-аптамеров (аптасенсоров) для количественного определения гликированного гемоглобина с использованием флуоресцентной детекции, поверхностного плазмонного резонанса или электрохимической детекции [10–13]. В данной работе мы предложили создание новых биолюминесцентных и колориметрических аптасенсоров, которые отличаются простотой и доступностью проведения анализа при достаточно высокой чувствительности, а также могут быть адаптированы под микропланшетный формат анализа. В качестве узнающих элементов аптасенсоров мы выбрали устойчивые в биологических средах 2'-фтор-пиримидин-модифицированные РНК-аптамеры.

Целью данной работы является получение новых моно- и бифункциональных конструкций на основе 2'-F—пиримидин-модифицированных РНК-аптамеров и исследование возможности создания на их основе систем для оптической детекции белковых биомаркеров на примере суммарного и гликированного гемоглобинов.

Для этого необходимо решить следующие задачи:

- 1) провести селекцию 2'-F-РНК-аптамеров¹, связывающихся с суммарным и/или гликированным гемоглобином; оптимизировать их нуклеотидные последовательности, определить аффинность к белковым мишеням и селективность связывания;
- 2) сконструировать на основе гемоглобин-специфичных 2'-F-РНК-аптамеров системы детекции с колориметрическим и биолюминесцентным типом сигнала и исследовать их свойства;
- 3) провести селекцию 2'-F-РНК-аптамеров, узнающих фотопротейн обелин; оптимизировать их нуклеотидные последовательности, определить аффинность к белку-мишени;
- 4) сконструировать бифункциональные аптамеры, в которых модули, связывающие белок-аналит и репортерный белок обелин, объединены в одну молекулу, и показать

¹ Здесь и далее под 2'-F-РНК-аптамерами подразумеваются РНК-аптамеры, в составе которых все пиримидиновые нуклеотиды заменены на их 2'-F-аналоги.

принципиальную возможность создания на их основе системы биолюминесцентной детекции гемоглобина.

Научная новизна и практическая значимость работы

В рамках данной диссертационной работы впервые получены 2'-F-РНК-аптамеры, способные связывать суммарный и гликированный гемоглобин человека. Проведена оптимизация их нуклеотидной последовательности, с использованием комплекса биофизических методов анализа показано формирование квадруплексных структур в составе G-богатых аптамеров. Сконструирована система гетерофазной колориметрической детекции гемоглобина с помощью полученных аптамеров с прямой иммобилизацией аналита, а также в сэндвич-формате в сочетании с гемоглобин-специфичными поликлональными антителами. Разработана система биолюминесцентной детекции гемоглобина в гетерофазном варианте с использованием конъюгатов Ca^{2+} -зависимого фотопротеина обелина с антителами. Показана принципиальная возможность селективной биолюминесцентной детекции гликированного гемоглобина в присутствии суммарного гемоглобина.

Предложена новая стратегия создания систем для биолюминесцентной детекции с нековалентной иммобилизацией фотопротеина обелина через специфичный к нему аптамер. Впервые получены 2'-F-РНК-аптамеры, узнающие фотопротеин обелин, проведена оптимизация их нуклеотидной последовательности с сохранением аффинности к белковой мишени. Создана серия бифункциональных аптамеров с переключаемой активностью, состоящих из гемоглобин-связывающего и обелин-связывающего модулей. Показана принципиальная возможность биолюминесцентной детекции суммарного гемоглобина в растворе с использованием бифункциональных конструкций. Полученные данные позволяют рассматривать предложенный подход к конструированию аптасенсоров в качестве принципиально нового метода детекции белковых биомаркеров.

Положения, выносимые на защиту

1. Созданы 2'-F-РНК-аптамеры, способные связывать суммарный гемоглобин человека либо только гликированный гемоглобин, а также 2'-F-РНК-аптамеры к фотопротеину обелину. Оптимизированы нуклеотидные последовательности аптамеров, охарактеризована их аффинность к соответствующим белковым мишеням.
2. С использованием комплекса биофизических методов анализа показано, что наиболее вероятной структурой в составе 2'-F-РНК-аптамеров к суммарному гемоглобину является G-квадруплекс с параллельной топологией.

3. Показана возможность использования полученных аптамеров для билюминесцентной детекции суммарного и гликированного гемоглобина, в том числе в составе смеси белков. Показана возможность использования аптамера H9t1 для колориметрической детекции суммарного гемоглобина как в системе с прямой иммобилизацией анализируемого белка, так и в сэндвич-формате с применением специфических антител.
4. Создана серия бифункциональных конструкций, в которых гемоглобин-связывающий и обелин-связывающий аптамеры объединены в одну молекулу с переключаемой активностью. Показана возможность их использования для микропланшетной билюминесцентной детекции гемоглобина человека.

Степень достоверности и апробация результатов

По результатам работы опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Основные результаты были представлены на российских и международных конференциях: II Всероссийская конференция с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (18-23 июня 2017 г., Новосибирск, Россия); Всероссийская конференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (24-26 июля 2017 г., Новосибирск, Россия); 7th Cambridge Symposium «Nucleic Acids Chemistry and Biology» (Cambridge, UK, 3-6 September 2017); 43rd FEBS Congress «Biochemistry forever» (6-13 July, 2018, Prague, Czech Republic); Международная конференция «Aptamers in Russia 2019» (27-30 августа 2019 г., Красноярск, Россия).

Личный вклад автора

Основная часть экспериментальной работы и анализ полученных данных были выполнены лично автором: ферментативный синтез исходных 2'-F-РНК-библиотек, селекция модифицированных РНК-аптамеров, связывающих суммарный и гликированный гемоглобин человека, оптимизация их нуклеотидных последовательностей и исследование вторичной структуры, конструирование колориметрической системы детекции суммарного гемоглобина на их основе, селекция аптамеров, связывающих фотопротейн обелин, оптимизация их структуры, конструирование серии бифункциональных аптамеров для детекции гемоглобина в растворе. Химический синтез исходных ДНК-библиотек, праймеров и индивидуальных 2'-F-РНК-аптамеров был проведен в ЛХРНК ИХБФМ СО РАН к.х.н. Мещаниновой М. И., к.х.н. Крашенининой О. А. и к.х.н. Тимошенко В. В. Эксперименты по термической денатурации дцДНК-библиотек и исследованию сродства 2'-F-РНК-аптамеров к

обелину выполнены совместно с к.х.н. Воробьевым П. Е. Высокопроизводительное секвенирование обогащенных библиотек и биоинформатический анализ полученных данных проведены в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН к.б.н. Кабиловым М. Р. и Тупикиным А. Е. Эксперименты по биолюминесцентному анализу проведены в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН ФИЦ «Красноярский научный центр» д.б.н. Франк Л. А., к.б.н. Красицкой В. В. и к.б.н. Башмаковой Е. Е.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 142 страницах, содержит 45 рисунков, 14 таблиц и 3 приложения. Библиография включает 200 литературных источников.

ГЛАВА 1. АПТАМЕРЫ КАК УЗНАЮЩИЕ ЭЛЕМЕНТЫ БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БИОМАРКЕРОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Аптамеры — это короткие фрагменты нуклеиновых кислот (ДНК или РНК), способные связывать заданные молекулы-мишени за счет формирования специфичной пространственной структуры. В начале 1990-х годов тремя независимыми группами исследователей был предложен метод получения аптамеров, известный в настоящее время как SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения [14–16]. По своей аффинности и специфичности аптамеры являются ближайшими аналогами моноклональных антител, при этом аптамеры отличаются целый ряд уникальных свойств. Получение аптамеров не требует иммунизации животных, что дает возможность проводить селекцию независимо от токсичности или иммуногенности молекулы-мишени. Нуклеотидные последовательности НК-аптамеров точно определены и хранятся в цифровом виде, что позволяет синтезировать их химически на любом автоматическом ДНК/РНК синтезаторе в условиях исследовательской лаборатории или коммерческой компании. Высокая воспроизводимость автоматического химического синтеза также обеспечивает стабильность свойств аптамеров (аффинность и специфичность). Это минимизирует различия между партиями и дает возможность использовать разнообразные химические модификации для повышения сродства аптамеров к мишеням, увеличения стабильности в биологических средах и улучшения фармакокинетических свойств [17]. Также к важным преимуществам аптамеров можно отнести относительную простоту их конъюгирования с различными репортерными группами и лекарственными препаратами, что позволяет использовать их в составе многокомпонентных конструкций. Химическая природа НК-аптамеров обеспечивает универсальный способ регуляции их функциональной активности через комплементарные олигонуклеотиды-антидоты [18]. Кроме того, аптамеры устойчивы в условиях длительного хранения и многократных повторений термической денатурации/ренатурации и не требуют холодной доставки. В настоящее время получено большое количество аптамеров к самым разным мишеням, начиная от ионов металлов и низкомолекулярных соединений и заканчивая целыми вирусами и клетками (см., например, обзор [2]). Среди всех мишеней для отбора аптамеров особый интерес представляют собой белки. Аптамеры, направленные на белки, ассоциированные с различными заболеваниями, могут быть использованы как основа для создания новых терапевтических средств [5] или в качестве узнающих элементов при конструировании систем диагностики [6].

1.1. Получение аптамеров методом SELEX

Общая схема метода SELEX состоит из нескольких последовательных стадий: 1) получение комбинаторной ДНК- или РНК-библиотеки; 2) инкубация библиотеки с мишенью; 3) разделение комплексов НК с мишенью и несвязавшихся последовательностей; 4) выделение связавшихся НК из комплексов с мишенью и их амплификация (рис. 1). Полученная в результате обогащенная библиотека используется на следующем раунде отбора. В большинстве случаев для получения обогащенной библиотеки с необходимой аффинностью к мишени требуется от 7 до 15 раундов SELEX. Для установления нуклеотидных последовательностей индивидуальных аптамеров в составе обогащенной библиотеки проводят высокопроизводительное секвенирование или классическое секвенирование по Сэнгеру. После биоинформатического анализа данных секвенирования, выбора серии кандидатов и их химического синтеза необходимо исследование аффинности и специфичности аптамеров для определения наиболее удачных вариантов.

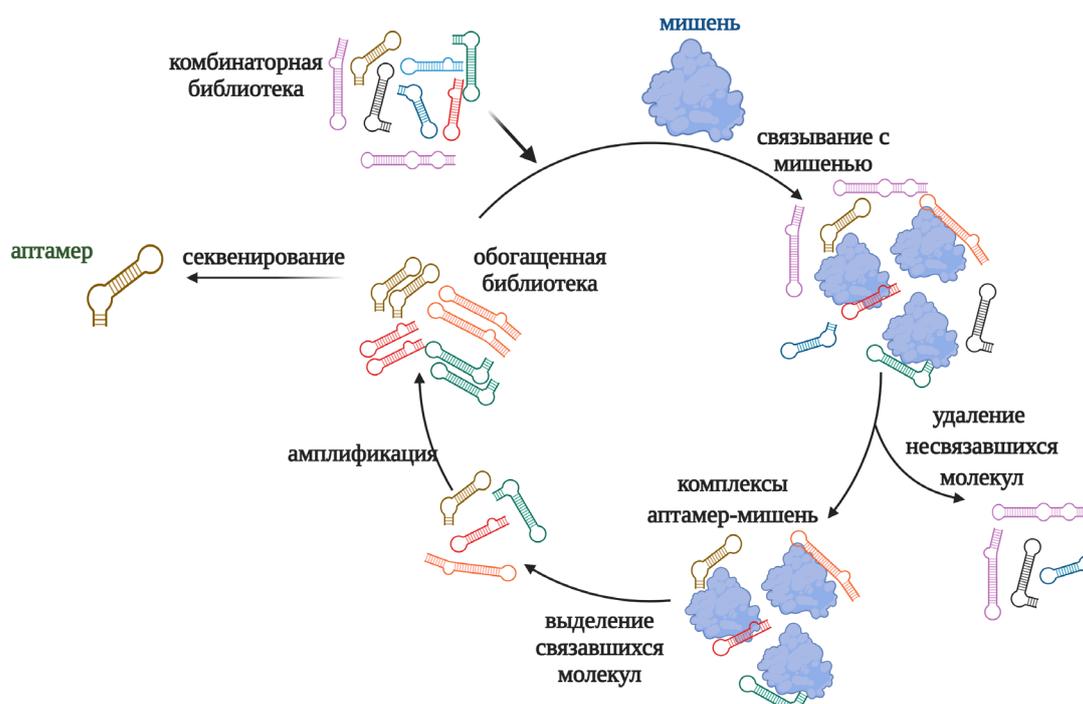


Рисунок 1. Общая схема получения аптамеров методом SELEX.

В настоящее время предложено большое количество модификаций метода SELEX, разработанных для решения определенных задач [19,20]. В частности, выбор типа сахарофосфатного остова (ДНК, РНК или их аналоги), длины и способа рандомизации исходной библиотеки определяются особенностями конкретной мишени для отбора и предполагаемого дальнейшего использования аптамеров [21]. Далее эти аспекты *in vitro* селекции НК-аптамеров будут рассмотрены более подробно.

1.2. Дизайн комбинаторных библиотек для селекции *in vitro*

Ключевые характеристики аптамеров, такие как аффинность по отношению к мишени и устойчивость в биологических средах, в значительной степени предопределяются тем, какая именно исходная комбинаторная библиотека НК будет использована в ходе селекции *in vitro*. Выбор типа комбинаторной библиотеки для селекции (ДНК, РНК или их аналоги) в каждом конкретном случае зависит как от типа мишени, так и от конечного назначения аптамеров. Для отбора аптамеров с целью получения новых терапевтических агентов или аналитических систем могут быть использованы как ДНК, так и РНК-библиотеки. Как правило, все нуклеиновые кислоты в составе комбинаторной библиотеки содержат рандомизированную область, фланкированную константными праймер-связывающими участками для амплификации библиотеки в ходе отбора. При выборе длины рандомизированного участка библиотеки необходимо учитывать представленность библиотеки и её структурное разнообразие. В общем случае максимально возможное число различных последовательностей длиной n нуклеотидов составляет суммарно 4^n . Таким образом, полностью представленная комбинаторная библиотека, содержащая 28-нуклеотидную рандомизированную область, будет состоять из $\sim 7 \times 10^{16}$ молекул или $\sim 0.1 \times 10^{-6}$ моль. Учитывая реальные масштабы синтеза НК-библиотек в лабораторных условиях, полной теоретически возможной представленности можно достичь для библиотек, содержащих меньше 28 нуклеотидов в рандомизированной области [22]. Для более протяженных рандомизированных участков селекция из полностью представленной библиотеки не представляется возможной. С другой стороны, более длинные нуклеотидные последовательности могут формировать более сложные пространственные структуры, необходимые для специфического связывания мишеней селекции. Таким образом, для успешного отбора аптамеров с высоким сродством к мишени следует соблюдать баланс между разнообразием последовательностей и «сложностью» их пространственной структуры. Чаще всего для получения аптамеров используют библиотеки с рандомизированным участком длиной 30-50 нуклеотидов [23].

В подавляющем большинстве случаев при создании комбинаторных библиотек используют равномерную рандомизацию случайной области, когда все четыре нуклеотида представлены в каждом положении рандомизированного участка комбинаторной библиотеки с равной вероятностью. Предполагается, что равномерное распределение нуклеотидов способствует максимальному разнообразию последовательностей, что повышает вероятность отбора аптамеров с высокой аффинностью к мишени [24,25]. К настоящему моменту для получения равномерно представленных библиотек разработаны протоколы автоматического

химического синтеза, которые учитывают различную реакционную способность исходных фосфитаминов нуклеотидов [26]. Для оценки равномерности нуклеотидных последовательностей НК-библиотек используют методы высокопроизводительного секвенирования в сочетании со специально разработанными пакетами программ, вычисляющими степень рандомизации последовательностей на основе анализа нуклеотидного состава или набора коротких олигонуклеотидных последовательностей, например, гексануклеотидов [25,27]. Следует отметить, что в данный момент существует всего несколько работ, посвященных исследованию влияния нуклеотидного состава на структуру библиотеки. Проведенный в работе [28] компьютерный анализ распределения структур РНК-библиотек показал, что для рандомизированных участков длиной 40 нуклеотидов повышенное содержание G и C (по 30% каждого) приводило к преимущественному образованию структур с большим количеством стеблей по сравнению с повышенным содержанием A и U. В то же время, для рандомизированных участков длиной 100 нуклеотидов подобное изменение нуклеотидного состава не приводило к преимущественному формированию определенного типа элементов вторичной структуры РНК. Вместе с тем, в литературе описаны примеры отбора РНК-аптамеров из равномерно представленных библиотек, в ходе которого накапливались пиримидин-богатые последовательности и уменьшалось количество аденозина в их составе [24,29]. Снижение содержания аденозина наблюдалось для всех аденозин-содержащих динуклеотидов, что соответствует уменьшению общего значения минимума свободной энергии РНК-библиотеки и приводит к накоплению последовательностей РНК с более стабильными вторичными структурами [29]. Таким образом, незначительное отклонение от «идеального» распределения нуклеотидов, в особенности в сторону пиримидиновых нуклеотидов, может считаться приемлемым с учетом того факта, что в ходе селекции представленность нуклеотидов неизбежно будет изменяться.

1.3. Химические модификации библиотек для SELEX

Создание новых терапевтических препаратов, конструирование систем доставки лекарственных средств или биосенсоров на основе аптамеров предполагает их использование в биологических средах, содержащих ДНК- и РНК-гидролизующие ферменты. Для повышения устойчивости НК-аптамеров к действию нуклеаз был разработан целый ряд химических модификаций. Необходимо отметить, что любая химическая модификация, введенная в состав аптамера после проведения селекции *in vitro* (так называемая постселекционная модификация), может значительно изменить его сродство к мишени. Поэтому в каждом отдельном случае необходимо оптимизировать количество, тип и расположение модификаций, что представляет собой отдельную исследовательскую задачу.

Более предпочтительным вариантом является введение химических модификаций в состав исходной библиотеки для получения аптамеров, обладающих высоким сродством к мишени и устойчивостью к действию нуклеаз. При выборе конкретных химических модификаций исходных библиотек наиболее важным критерием является возможность использования данного типа модифицированных нуклеотидов в основных ферментативных реакциях в ходе селекции. В настоящее время разработан достаточно широкий спектр химических модификаций (рис. 2), удовлетворяющих данному требованию (см., например, [17,30–33]), который включает в себя модификации рибозы (2'-NH₂, 2'-F, 2'-O-метил, 4-S-, LNA, TNA, FANA и HNA) и межнуклеотидных фосфатных групп (боранофосфаты и тиофосфаты).

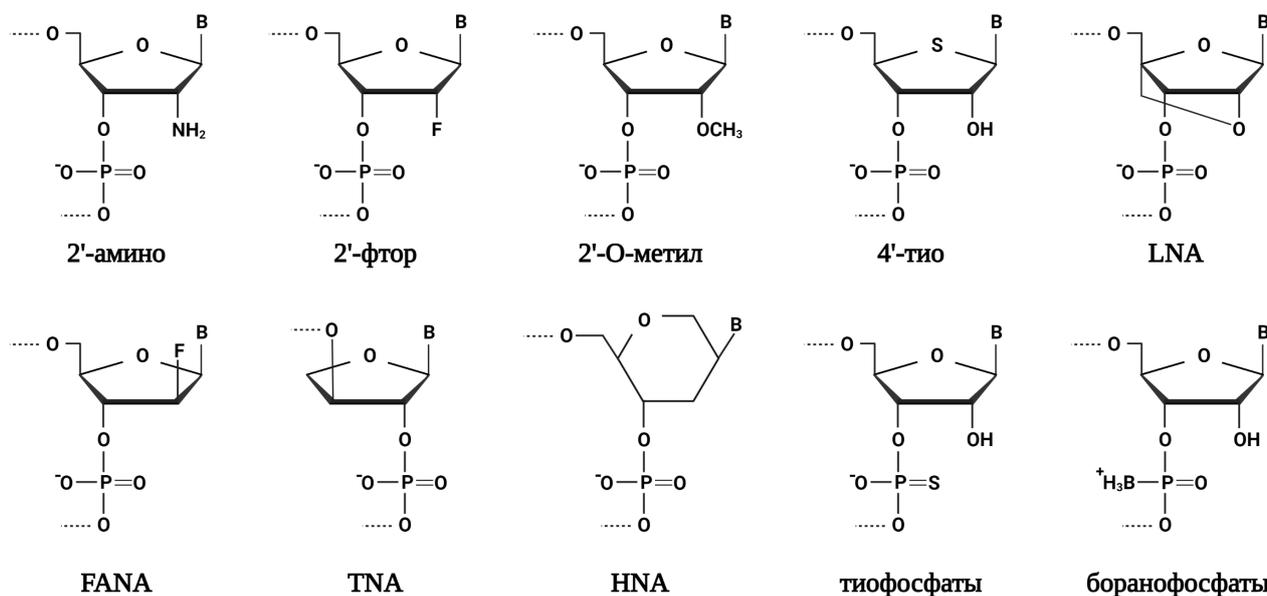


Рисунок 2. Химические модификации, используемые в составе комбинаторных библиотек для отбора аптамеров. LNA (locked nucleic acid) – мостиковая нуклеиновая кислота, FANA – 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-арабинонуклеиновая кислота, TNA – трезонуклеиновая кислота, HNA – гекситол-нуклеиновая кислота.

Наибольшее распространение получили химические модификации, затрагивающие 2'-положение рибозы. В 1994 г. была предложена замена 2'-гидроксильной группы в составе рибозы на 2'-аминогруппу [34]. Хотя с использованием данного типа модификации был получен ряд РНК-аптамеров, она не получила впоследствии широкого распространения. Значительно большую популярность при селекции устойчивых в биологических средах РНК-аптамеров приобрела замена пиримидиновых нуклеотидов их 2'-F-аналогами, предложенная практически одновременно с аминомодификацией. Такая модификация обеспечивает необходимую устойчивость аптамеров к расщеплению рибонуклеазами, не вносит существенных изменений в пространственную структуру РНК, а для ее введения в состав РНК можно использовать реакцию транскрипции *in vitro* в оптимизированных условиях с помощью природной T7 РНК-полимеразы [35]. В тоже время для введения в ходе

селекции других описанных выше модификаций необходимо использовать мутантные варианты полимераз, которые являются менее доступными и экономичными (см., например, [33,36,37]).

1.4. Применение аптамеров

Уникальные свойства аптамеров определили их широкое применение как специфических узнающих молекул в различных областях фундаментальных и прикладных исследований. Так, аптамеры, селективно связывающие патогенные белки и ингибирующие их функциональную активность, могут быть использованы для создания новых терапевтических препаратов для лечения инфекционных, сердечно-сосудистых, онкологических и др. заболеваний [38–40]. Аптамеры с высоким сродством к определенным рецепторам на поверхности клеток, участвующим в транспорте через клеточную мембрану, демонстрируют хороший потенциал для направленной доставки лекарственных препаратов в клетки заданного типа [41,42]. Как отмечалось ранее, по своим функциональным свойствам аптамеры близки к моноклональным антителам. Это позволяет заменять антитела аптамерами для проведения аффинной хроматографии белков в лабораторной практике [43], а также использовать меченые аптамеры, узнающие характерные элементы на поверхности клеток определенного типа, для их визуализации [44,45]. Частным случаем использования аптамеров, обладающих высоким сродством к целым клеткам определенного типа, является поиск новых клеточных биомаркеров [46].

Практически любой ДНК/РНК-аптамер можно рассматривать в качестве узнающего элемента для определенной молекулярной мишени, поэтому наиболее широкое применение аптамеры получили именно в биоаналитической области [47–49]. Относительная простота введения химических модификаций в состав аптамеров и, как следствие, совместимость с различными типами биосенсорных платформ позволили разработать огромное количество систем детекции, начиная от простых портативных устройств и заканчивая весьма сложными схемами с применением высокотехнологичного оборудования. Биосенсоры на основе аптамеров получили название аптасенсоров. Они представляют собой аналитические устройства, состоящие из узнающего элемента (аптамера) и передатчика, обеспечивающего количественный аналитический сигнал при связывании анализируемой молекулы. Благодаря разнообразию возможных мишеней, аптасенсоры нашли применение в таких областях как исследование безопасности пищевой продукции, мониторинг окружающей среды и диагностика различных заболеваний. Наиболее широкое распространение получили аптасенсоры с оптическим (колориметрический, флуоресцентный, люминесцентный или ППР) [50,51] и электрохимическим типами детекции [52,53]. Следует отметить, что

аптасенсоры с флуоресцентным, ППР- и электрохимическим методами детекции отличаются наибольшей чувствительностью детекции, однако при этом они требуют использования дорогостоящего оборудования и привлечения высококвалифицированных операторов. С другой стороны, для колориметрической детекции аналита, как правило, достаточно стандартных для клинической лаборатории спектрофотометра или колориметра, что делает их привлекательными для разработки систем клинической диагностики. На данный момент описаны примеры использования аптамеров в составе коммерчески доступных диагностических наборов для колориметрической детекции отдельных биомаркеров в биологических образцах [54,55]. В рамках данной диссертационной работы представляло интерес более детально проанализировать литературу по созданию колориметрических аптасенсоров для детекции биомаркеров различных заболеваний - онкологических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, аутоиммунных и воспалительных. Данные о чувствительности и селективности детекции с помощью описанных в литературе аптасенсоров представлены в сводной табл. 1.

Таблица 1. Детекция биомаркеров различных заболеваний с помощью колориметрических аптасенсоров.

аптамер	мишень	тип детекции	предел обнаружения	селективность/ специфичность ²	ссылка
ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ					
ДНК	VEGF ₁₆₅	колориметрическая детекция в микропланшетном формате	0.3 пМ	специфичность: IgG, БСА, РЭА, ДНК-метилтрансфераза 1	[56]
ДНК	VEGF ₁₆₅	хемилюминесценция	18 нМ		[57]
ДНК		хемилюминесценция	2.6 нМ		
ДНК	VEGF ₁₆₅	колориметрическая детекция с амплификацией сигнала	2.1 пМ	специфичность: ЧСА, овальбумин, трансферрин, цитохром С, интерферон гамма	[58]
ДНК	VEGF ₁₆₅	колориметрическая детекция с использованием золотых наночастиц	0.11 нМ	специфичность: тромбин, БСА, ЧСА	[59]
ДНК	VEGF ₁₆₅	колориметрическая детекция с использованием золотых наночастиц с амплификацией сигнала	0.13 нМ	специфичность: БСА, интерферон гамма	[60]
ДНК	CD63	колориметрическая детекция с использованием золотых наночастиц			[61]
ДНК	CD63	колориметрическая детекция с амплификацией сигнала	160 частиц/мл (экзосомы)		[62]
ДНК	CD63	колориметрическая детекция с амплификацией сигнала	7700 частиц/мл (экзосомы)		[63]
ДНК	CD63	колориметрическая детекция с использованием углеродных нанотрубок	5.2x10 ⁵ частиц/мл		[64]

² Здесь и далее под селективностью детекции подразумевается способность аптасенсора различать близкие по структуре молекулы-мишени (например, разные формы одного и того же белка), а под специфичностью – способность определять заданную мишень в смеси с различными «мешающими» компонентами (белки, аминокислоты, сахара, низкомолекулярные соединения и т. д.).

ДНК	CD63	колориметрическая детекция с использованием нитрид-углеродных наночастиц	13.5×10^5 частиц/мл		[65]
ДНК	CD63	детекция теплового сигнала в формате тест-полоски	1.4×10^4 частиц/мл		[66]
ДНК	CD63	колориметрическая детекция в формате тест-полоски	-	селективность: экзосомы из фибробластов	[67]
ДНК	MUC1	колориметрическая система детекции в сэндвич-формате	83 нМ		[68]
ДНК	MUC1	колориметрическая детекция	0.09 мкг/мл*	специфичность: БСА, лизоцим, IgG, тромбин	[69]
ДНК	MUC1 (экзосомы)	колориметрическая детекция	3.94×10^5 частиц/мл	селективность: экзосомы из клеток печени	[70]
ДНК	РЭА	колориметрическая детекция с использованием золотых наночастиц	16.7 пМ	специфичность: БСА, миоглобин, мукопротеин	[71]
ДНК	РЭА	колориметрическая детекция с использованием золотых наночастиц с амплификацией сигнала	2.2. пМ	специфичность: БСА, α -фетопротеин, лизоцим, тромбин	[72]
ДНК	РЭА	колориметрическая детекция	5.5 пМ	специфичность: БСА, лизоцим, инсулин, ПСА	[73]
ДНК	ПСА	колориметрическая детекция с использованием золотых наночастиц	0.7 пМ	специфичность: БСА, ЧСА, РЭА, СА-125, IgG, α -фетопротеин	[74]
ДНК	HER2	колориметрическая детекция с использованием золотых наночастиц в растворе и в формате тест-полосок	10 нМ* 20 нМ* (тест-полоски)	специфичность: БСА, тромбин, овальбумин, маммаглобин А	[75]
ДНК	DKK1	микропланшетная колориметрическая система детекции в сэндвич-формате	2.3 пМ		[76]

НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ					
РНК	дофамин	микропланшетная колориметрическая система детекции в сэндвич-формате	1 пМ	селективность: 3-метокситирамин, эпинефрин, гомованилиновая кислота, норадреналин	[77]
РНК и ДНК	дофамин	микропланшетная колориметрическая система детекции в сэндвич-формате	51 нМ (РНК) 0.5 нМ (ДНК)*		[78]
ДНК	дофамин	колориметрическая детекция с использованием золотых наночастиц	0.36 мкМ	селективность: 3,4-дигидроксифенилаланин, пирокатехин, 3,4 – дигидроксифенилуксусная кислота, гомованилиновая кислота, эпинефрин, аскорбиновая кислота	[79]
ДНК	дофамин	колориметрическая и флуоресцентная детекция с использованием золотых наночастиц	0.14 мкМ для колориметрической, 78.7 нМ для флуоресцентной детекции	селективность: гидрохинон, глюкоза, аскорбиновая кислота, L-фенилаланин, L-триптофан, норадреналин, 5-гидрокситриптамин, 3,4-дигидрокси-фенилаланин	[80]

ДНК	дофамин	колориметрическая и флуоресцентная детекция в формате наночипа	0.6 мкМ для колориметрической, 3.3 нМ для флуоресцентной детекции	цистамин, ЧСА, ацетилхолин, аскорбиновая кислота, эpineфрин	[81]
ДНК	дофамин	колориметрическая детекция с использованием золотых наночастиц в формате тест-полосок	~0.3 мкМ	селективность и специфичность: кортизол, эpineфрин, норадреналин, серотонин	[82]
ДНК	α -syn олигомеры	колориметрическая детекция с использованием золотых наночастиц	10 нМ в растворе	специфичность: БСА, тромбин, IgG	[83]
СТРЕСС-ОПОСРЕДОВАННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ					
ДНК	кортизол	колориметрическая детекция с использованием золотых наночастиц	150 нМ	селективность: эpineфрин, норадреналин, холевая кислота	[84]
ДНК	кортизол	колориметрическая детекция с использованием золотых наностержней	0.7 мМ	селективность: норадреналин, прогестерон	[85]
ДНК	кортизол	колориметрическая детекция в формате тест-полосок	2.8 нМ		[86]
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ					
ДНК	C-реактивный белок	микропланшетная колориметрическая система детекции в сэндвич-формате	0.07 пМ	специфичность: миоглобин, тропонин I, БСА, γ -глобулин, аспарагиновая кислота, аргинин, глицин, глюкоза, фибриноген, GDF 15, трансферрин	[87]

ДНК	С-реактивный белок	колориметрическая детекция с использованием золотых наночастиц	10 нМ		[88]
ДНК	sIL-2Ra	колориметрическая детекция с использованием золотых наночастиц	1 нМ*	специфичность: БСА; селективность: IL-5Ra, IL-13Ra2, IL-17Ra, CD166	[89]
ДНК	IL-6 мыши	колориметрическая детекция с использованием золотых наночастиц		селективность: IL-6 человека	[90]
ДНК	HNE	колориметрическая и флуоресцентная детекция	0.4 пМ	специфичность: тромбин, трипсин, протеиназа К, протеиназа З, химотрипсин, лизоцим, IgG, ЧСА, катепсин G, трансферрин, свиная панкреатическая эластаза	[91]
СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ					
ДНК	тропонин Т	микропланшетная колориметрическая детекция в сэндвич-формате	3.13 нМ*		[92]
ДНК	тропонин I	хемилюминесцентная детекция на микрочипе в сэндвич-формате	0.5 пМ	специфичность: БСА, фибриноген, BNPT	[93]
ДНК	HIF-1 α	микропланшетная колориметрическая детекция с использованием золотых наночастиц	2 фМ		[94]
ДНК	тромбоспондин-1	колориметрическая детекция	7 фМ	специфичность: БСА, VCAM-1, ICAM-1, E-селектин	[95]

САХАРНЫЙ ДИАБЕТ					
ДНК	НbA1c и Нb	хемилюминесцентная детекция на микрочипе в сэндвич-формате (аптамер + антитело)	0.1 мМ для НbA1c и 1.4 мМ для Нb*		[96]
ДНК	НbA1c и Нb	хемилюминесцентная детекция на микрочипе в сэндвич-формате (аптамер + аптамер)			[97]
ДНК	НbA1c	Двойной электрохимический аптасенсор	3.7 нМ		[98]
ДНК	НbA1c	ППР	1 нМ	специфичность: БСА	[1]
ДНК	НbA1c и инсулин	ППР-аптасенсор для одновременной детекции двух аналитов	1% НbA1c, 4 пМ инсулин*		[99]
ДНК	НbA1c	ППР			[100]
ДНК	НbA1c	Электрохимическая детекция	1 нМ	специфичность: аскорбиновая кислота, мочевиная кислота, дофамин, глюкоза	[101]
ДНК	НbA1c и Нb	Электрохимическая детекция	3 пМ для НbA1c, 5 пМ для Нb		[10]
ДНК	НbA1c и Нb	Флуоресцентная детекция		специфичность: БСА, CFTR и SMN белки	[102]
ДНК	НbA1c и Нb	Электрохимическая детекция	2 фМ для НbA1c, 0.5 фМ для Нb	специфичность: CFTR, SMN, STAT3 и DOCK8 белки	[103]
ДНК	Нb	Флуоресцентная детекция			[12]
ДНК	инсулин	колориметрическая детекция	2.6 пМ		[104]
ДНК	инсулин	колориметрическая детекция	0.2 пМ*		[105]
ДНК	RBP4	микрочиповая колориметрическая детекция в сэндвич-формате	3.7 нМ	селективность: висфатин, васпин; специфичность: сывороточный	[106]

				альбумин, иммуноглобулин, фибриноген	
ДНК	васпин		1 нМ	селективность: висфатин, RBP4; специфичность: сывороточный альбумин, иммуноглобулин, фибриноген	
ДНК	висфатин		0.4 нМ	селективность: васпин, RBP4; специфичность: сывороточный альбумин, иммуноглобулин, фибриноген	
ДНК	RBP4	хемилюминесцентная детекция	50 фМ		[107]
ДНК	васпин	система сэндвич-детекции в формате тест-полосок	~0.1 нМ*		[108]

*предел обнаружения указан для детекции в биологических жидкостях (сыворотка крови, слюна, пот и т. д.).

1.5. Аптасенсоры для детекции биомаркеров различных заболеваний в крови

1.5.1. Биомаркеры злокачественных заболеваний

1.5.1.1. Фактор роста эндотелия сосудов

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) – это сигнальный белок, секретируемый как нормальными эндотелиальными клетками, так и раковыми клетками, который выполняет важные функции в процессе ангиогенеза [109]. Кроме того, данный белок является биомаркером различных заболеваний, в том числе онкологических [110] и нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона) [111,112], ревматоидного артрита [113,114] и псориаза [115]. РНК-аптамер, связывающий VEGF, был получен Дж. Ракман с соавт. [116] и использован для создания терапевтического препарата Макуген (пегаптаниб) для лечения возрастной дистрофии сетчатки глаза. Альтернативный отбор VEGF-специфичных аптамеров из комбинаторной библиотеки ДНК позволил получить квадруплекс-формирующие аптамеры с высоким сродством к мишени [117,118].

Ц. Дун с соавт. использовали ДНК-аптамер для создания колориметрической микропланшетной системы детекции в сэндвич-формате [56]. На первой стадии анализа рекомбинантный белок VEGF₁₆₅ иммобилизовали в лунках микропланшета, после чего добавляли раствор аптамера, содержащего остаток биотина. Для визуализации комплекса аптамера с мишенью в лунки планшета вносили конъюгат пероксидазы хрена со стрептавидином. В результате ферментативного окисления субстрата в присутствии перекиси водорода происходило образование окрашенного продукта, для количественного определения которого измеряли оптическую плотность раствора. При добавлении в систему анализируемого раствора, содержащего свободный VEGF₁₆₅, иммобилизованный в лунках планшета VEGF₁₆₅ конкурирует со свободным белком за связывание с аптамером. В результате этого часть молекул аптамера диссоциирует из комплекса с мишенью в лунке планшета и удаляется после промывки. Таким образом, интенсивность окрашивания раствора уменьшается при увеличении концентрации белка-аналита в растворе. Предел обнаружения данного аптасенсора составил 0.3 пМ (10 пг/мл) в модельном буферном растворе. Разработанный аптасенсор показал высокую специфичность в отношении IgG, БСА, ракового эмбрионального антигена и ДНК-метилтрансферазы 1. Результаты анализа содержания VEGF₁₆₅ в образцах сыворотки человека с помощью предложенного метода хорошо согласовались с результатами контрольного анализа с использованием стандартного набора для ИФА с хемилюминесцентным типом детекции. Важным достоинством данного аптасенсора является возможность детекции белковой мишени в образцах сыворотки без предварительной пробоподготовки, что значительно упрощает и ускоряет анализ.

Способность VEGF-специфичного ДНК-аптамера формировать гем-связывающий G-квадруплекс, обладающий пероксидазной активностью в присутствии перекиси водорода, была использована при разработке хемилюминесцентной детекции VEGF в растворе [57]. В присутствии белковой мишени аптамер формирует активную квадруплексную структуру, необходимую для ее связывания, и приобретает способность связывать гем и окислять субстрат (люминол) в присутствии перекиси водорода (рис. 3А). Зависимость интенсивности люминесцентного сигнала была прямо пропорциональна концентрации VEGF в растворе. Созданная система обладала высокой чувствительностью (предел обнаружения - 18 нМ или 684 нг/мл), однако в отсутствие мишени детектировался достаточно высокий неспецифический сигнал, обусловленный самопроизвольным формированием активной квадруплексной структуры аптамера. Разделение аптамера на два отдельных олигонуклеотида таким образом, чтобы активная квадруплексная структура формировалась только в присутствии белковой мишени, позволило значительно уменьшить уровень неспецифического сигнала и понизить предел обнаружения до 2.6 нМ в растворе.

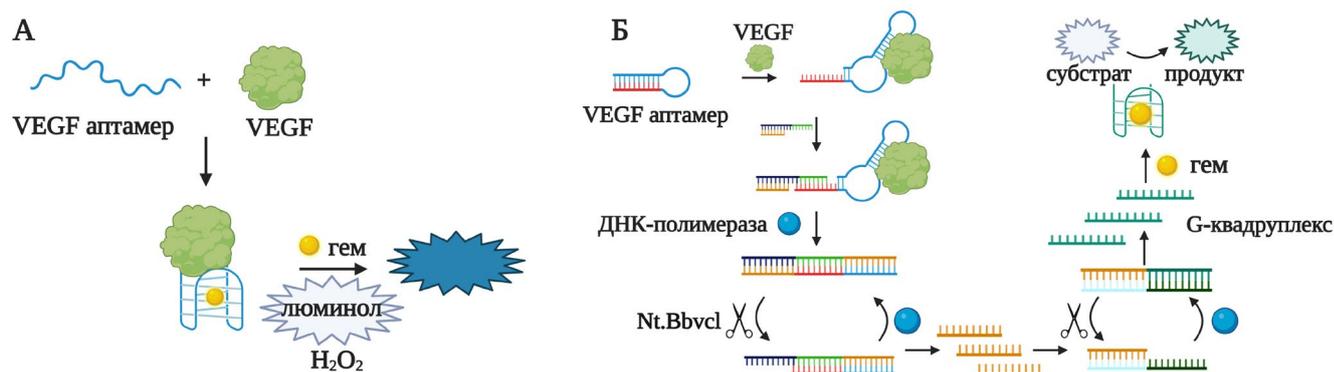


Рисунок 3. Аптасенсоры на основе ДНКзимов с пероксидазной активностью. **А.** Хемилюминесцентная система детекции VEGF [57]. **Б.** Система детекции VEGF с амплификацией сигнала [58].

Альтернативная система детекции VEGF, использующая пероксидазную активность гем-связывающего ДНК-квадруплекса для окисления хромогенного субстрата и генерации колориметрического сигнала, была предложена в работе [58]. Разработанная аналитическая система состоит из ДНК-шпильки, включающей в себя последовательность аптамера, набора вспомогательных ДНК, фрагмента Кленова ДНК-полимеразы и эндонуклеазы рестрикции, необходимых для амплификации сигнала. В присутствии белка VEGF происходит изменение пространственной структуры аптамер-содержащей ДНК-шпильки, активирующее запуск каскада ферментативных реакций, в результате которого накапливается большое количество ДНК-триггеров, стимулирующих высвобождение активных квадруплекс-формирующих последовательностей ДНК (рис. 3Б). Предел обнаружения разработанного аптасенсора составил 1.7 пМ. Специфичность детекции была показана на примере ЧСА, овальбумина, трансферрина,

цитохрома С и гамма-интерферона. Кроме того, данная система была успешно использована для детекции VEGF в образцах разбавленной сыворотки крови здорового донора с добавлением анализируемого белка. Безусловным преимуществом разработанного аптасенсора является возможность изотермической амплификации сигнала без использования специального оборудования (термоциклера).

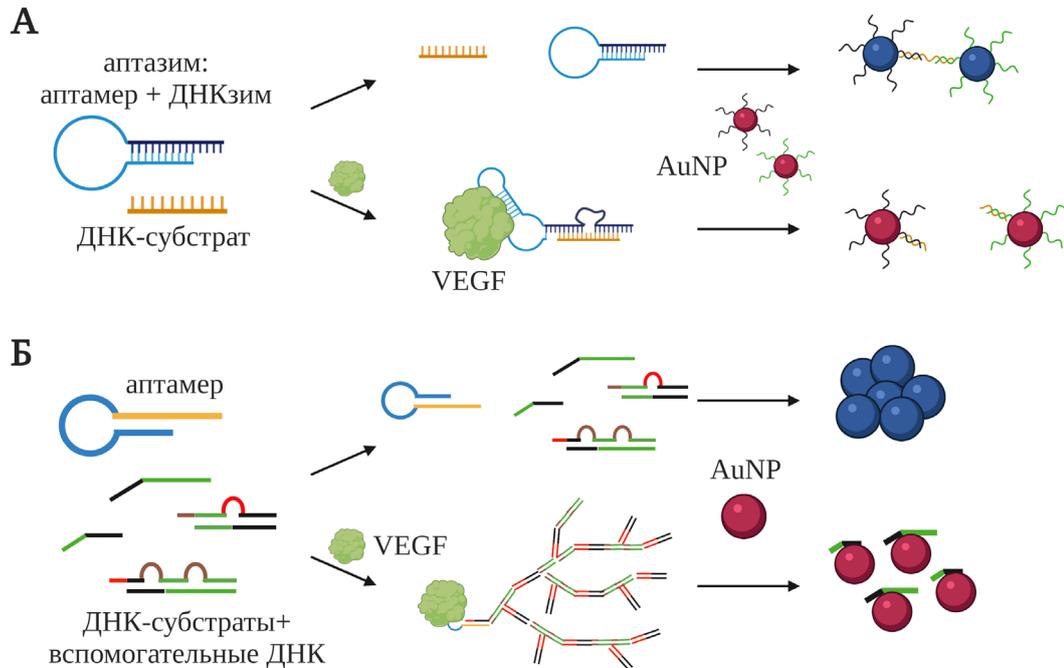


Рисунок 4. Аптасенсоры на основе наночастиц золота для детекции VEGF. **А.** Аптазим, предложенный в работе [59]. **Б.** Система детекции с амплификацией сигнала, разработанный Chang с соавт. [60]. AuNP – наночастицы золота.

Широко распространенным способом получения колориметрического сигнала является использование коллоидных растворов наночастиц золота, изменяющих цвет с красного на синий при их агрегации. В работе [59] был создан аптазим, включающий в себя VEGF-специфичный аптамер и ДНКзим, соединенные линкерной нуклеотидной последовательностью. В отсутствие белковой мишени аптазим формировал шпилечную структуру, что препятствовало образованию активной формы ДНКзима и последующему расщеплению соответствующего ДНК-субстрата. Нуклеотидная последовательность субстрата была подобрана таким образом, чтобы он мог формировать комплементарные дуплексы с короткими фрагментами ДНК, иммобилизованными на поверхности наночастиц золота. Образование таких дуплексов приводило к пространственному сближению наночастиц с их последующей агрегацией, в результате чего раствор приобретал синий цвет (рис. 4А). При добавлении в систему белка VEGF аптамер формировал активную структуру, необходимую для связывания мишени, что изменяло структуру аптазима в целом и приводило к восстановлению каталитической активности ДНКзима. Селективное расщепление субстрата ДНКзимом препятствовало агрегации наночастиц и, как следствие, изменению цвета раствора. Разработанный метод позволял

детектировать VEGF в буферном растворе в диапазоне концентраций от 0.1 до 100 нМ. Специфичность детекции была подтверждена на примере тромбина, БСА и ЧСА, используемых в 5 раз более высоких концентрациях по сравнению с VEGF. Сравнительный анализ результатов детекции VEGF в модельном буферном растворе и в 1%-ной сыворотке с добавлением VEGF показал принципиальную возможность использования данной системы для анализа реальных клинических образцов.

Для создания более чувствительного аптасенсора Ч. Чан с соавт. была предложена система детекции VEGF на основе наночастиц золота с амплификацией сигнала [60]. В состав системы входили аптамер-содержащая шпилечная ДНК, два ДНК-субстрата и два вспомогательных фрагмента ДНК. В отсутствие мишени все молекулы ДНК формировали «закрытые» структуры, исключая комплементарные взаимодействия друг с другом. При добавлении в систему наночастиц золота вспомогательные фрагменты ДНК неспецифично сорбировались на поверхности наночастиц, препятствуя их агрегации в растворе. Добавление VEGF инициировало изменение пространственной структуры шпилечной ДНК: аптамер в ее составе формировал активную пространственную структуру для связывания с белковой мишенью, при этом дополнительная последовательность оказывалась доступной для образования комплементарного комплекса с ДНК-субстратом. Образование этого дуплекса инициировало нелинейную цепную реакцию гибридизации с участием второго ДНК-субстрата и вспомогательных фрагментов ДНК с формированием дендримероподобной объемной структуры (рис. 4Б). В результате в отсутствие свободных фрагментов ДНК происходила агрегация наночастиц золота и изменение цвета раствора. Предел обнаружения для описанной системы составил 0.13 нМ (10 нг/мл). Использование дополнительных стабилизирующих олигонуклеотидов, препятствующих агрегации наночастиц в отсутствие VEGF, позволило уменьшить предел обнаружения до 185 пМ (5 нг/мл). Специфичность детекции с использованием разработанной системы была показана на примере БСА и гамма-интерферона. Разработанная система также была протестирована на образцах разбавленной (2.5 %) сыворотки крови с добавлением VEGF. Созданный аптасенсор позволяет детектировать VEGF всего за 1 час и не требует проведения ферментативных реакций амплификации.

1.5.1.2. CD63 как основной белок экзосом

Белок CD63 представляет собой гликопротеин, входящий в состав семейства тетраспанинов. Известно, что CD63 входит в состав мембран экзосом, а его количество зависит от их происхождения. В настоящее время экзосомы все чаще используются в качестве биомаркеров малоинвазивной диагностики различных онкологических заболеваний [119]. Состоящий из 32 нуклеотидов ДНК-аптамер, созданный компанией «BasePair», получил широкое

распространение в качестве узнающего элемента при конструировании различных типов биосенсоров для детекции CD63 в составе экзосом.

Один из первых примеров аптасенсора на основе CD63-специфичного аптамера для колориметрической детекции экзосом в растворе описан в работе [61]. Добавление аптамера в раствор золотых наночастиц приводило к его неспецифической сорбции на поверхности наночастиц и препятствовало их агрегации, поэтому раствор сохранял красный цвет. При одновременном добавлении в раствор аптамера и CD63-положительных экзосом формировался комплекс аптамера с мишенью и происходила агрегация наночастиц с изменением цвета раствора на синий. Созданный аптасенсор позволял отличать друг от друга экзосомы, характеризующиеся различным содержанием белка CD63. Дополнительно была разработана панель из нескольких аптамеров, позволяющая определять наличие нескольких белковых маркеров на поверхности экзосом для их более точной идентификации.

Тот же ДНК-аптамер был использован Чжан с соавт. в качестве узнающего элемента в системе мультицветной детекции экзосом [62]. На первой стадии иммобилизованный на магнитных частицах аптамер связывался с белком CD63 на поверхности экзосом. После этого в систему добавляли холестерин-модифицированную ДНК, способную встраиваться в мембрану экзосом за счет гидрофобного остатка холестерина и экспонировать «липкий» конец ДНК для запуска цепной реакции гибридизации с участием биотинилированных олигонуклеотидов, обеспечивающей амплификацию сигнала. Затем в систему вносили конъюгат щелочной фосфатазы со стрептавидином, взаимодействующий с остатками биотина в составе ДНК. Дефосфорилирование субстрата (фосфата аскорбиновой кислоты) под действием фермента в присутствии солей серебра в растворе инициировало формирование серебряной оболочки на поверхности золотых наностержней (рис. 5). В зависимости от концентрации фосфатазы происходило формирование серебряного слоя различной толщины, которая определяла цвет раствора (последовательное изменение розовый-зеленый-коричневый-фиолетовый-красный). Аптасенсор обеспечивал детекцию экзосом из клеток MCF-7 в диапазоне концентраций от 1400 до 280000 частиц/мл, при этом предел обнаружения составил 160 частиц/мл. Дополнительно была показана возможность использования биосенсора для детекции экзосом из культуры клеток колоректального рака, а также экзосом из сыворотки крови больных раком молочной железы.

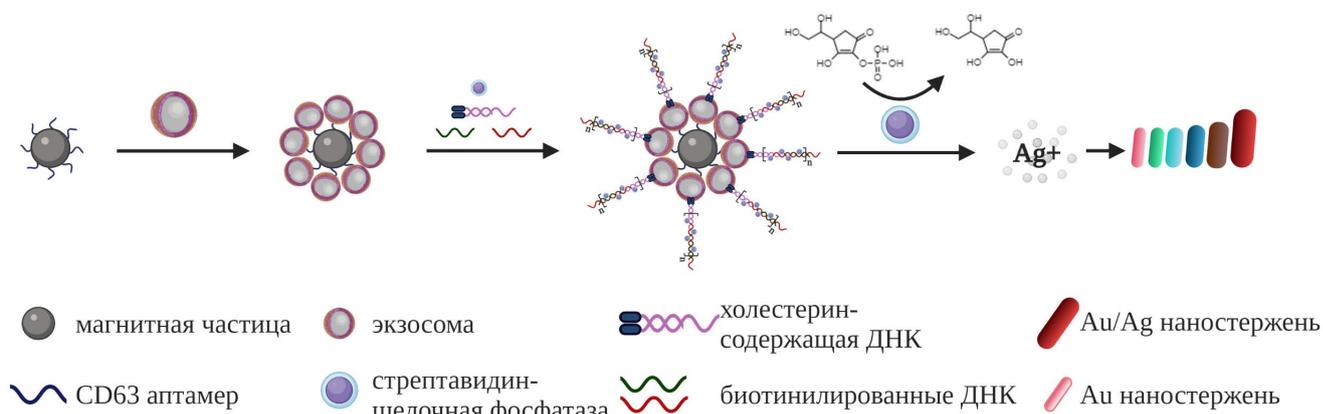


Рисунок 5. Система мультицветной детекции CD63 на поверхности экзосом с помощью аптамера [62].

Альтернативный способ колориметрической детекции экзосом с использованием фермента для генерирования сигнала был предложен в работе [63]. На первом этапе экзосомы ковалентно иммобилизовали на поверхности латексных частиц, а затем добавляли CD63-специфичный аптамер, несущий остаток биотина. После этого вносили конъюгат стрептавидина с пероксидазой, окисляющей бесцветный раствор дофамина в присутствии перекиси водорода с образованием окрашенного продукта реакции – полидофамина. Предложенный аптасенсор позволял детектировать экзосомы в широком диапазоне концентраций, а предел обнаружения составил 7700 частиц/мл. Для демонстрации универсальности разработанной системы были сконструированы аналогичные аптасенсоры для определения белков HER2 и интегрина $\alpha v \beta 6$.

При создании аптасенсоров для получения колориметрического сигнала в качестве альтернативы природным белковыми ферментам могут также использоваться наноматериалы, обладающие пероксидазной активностью. Так, в работе [64] были использованы одностенные углеродные нанотрубки, способные окислять хромогенный субстрат в присутствии перекиси водорода. В отсутствие мишени CD63-специфичный ДНК-аптамер сорбировался на поверхности углеродных нанотрубок, что приводило к значительному увеличению каталитической активности нанотрубок и образованию окрашенного продукта реакции. В присутствии экзосом аптамер диссоциировал с поверхности нанотрубок, образуя комплекс с мишенью, что приводило к снижению каталитической активности нанотрубок и, следовательно, уменьшению количества окрашенного продукта. Предел обнаружения составил 5.2×10^5 частиц/мл. Сравнение результатов детекции экзосом в образцах сыворотки от здоровых доноров и больных раком молочной железы с помощью предложенного метода и коммерческого ИФА-набора показало удовлетворительную сходимость результатов. Аналогичная система детекции была разработана в работе [65], в ее составе для окисления хромогенного субстрата были использованы углерод-нитридные нанолиты, имитирующие пероксидазу. Однако предел обнаружения в этой системе составил только 13.5×10^5 частиц/мл. Созданный аптасенсор позволял достоверно различать экзосомы из

раковых и нормальных клеток, а также выявлять экзосомы в образцах сыворотки крови больных раком молочной железы.

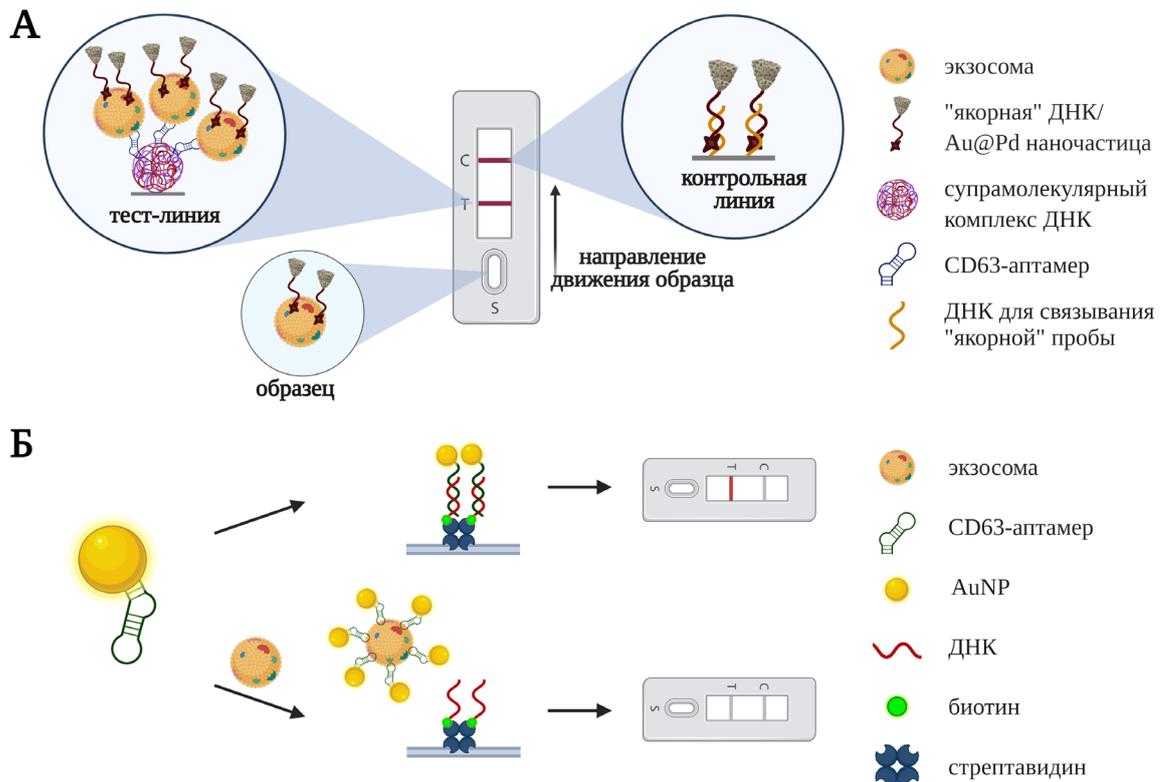


Рисунок 6. Детекция CD63-содержащих экзосом в формате тест-полосок. **А.** Аптасенсор на основе Au@Pd наночастиц, разработанный в работе [66]. **Б.** Аптасенсор на основе наночастиц золота, описанный в работе [67].

Комбинация наноматериалов с CD63-специфичным аптамером для детекции экзосом была использована также для создания аптасенсоров в формате тест-полосок. В работе [66] для связывания экзосом в анализируемом растворе использовали конъюгат «якорной» ДНК с Au@Pd наночастицами, способным встраиваться в липидный бислой экзосом и формировать устойчивые комплексы (рис. 6А). Для визуализации комплексов с экзосомами использовали аптамер в составе супрамолекулярного самоорганизующегося комплекса с протяженной ДНК, нанесенного на тест-линию аптасенсора. При перемещении комплексов экзосом с якорными наночастицами через тест-линию аптамер формировал комплекс с белком CD63 на поверхности экзосом, обеспечивая их концентрирование. При облучении лазером в месте скопления Au@Pd частиц формировалась характерная черная полоса, а также регистрировался термический сигнал. Разработанная тест-система позволяла определить экзосомы в диапазоне концентраций 10^6 - 10^8 частиц/мл, а предел обнаружения составил 1.4×10^4 частиц/мл. Чувствительность детекции тест-полоски при анализе образцов неразбавленной сыворотки крови с добавлением экзосом заметно снижалась, но разбавление образцов в 10 раз позволяло повысить точность детекции.

Альтернативная система детекции экзосом в формате тест-полосок была предложена в работе [67]. Для визуализации экзосом использовали CD63-специфичный аптамер, ковалентно иммобилизованный на наночастицах золота. В отсутствие экзосом аптамер взаимодействовал с комплементарной ДНК, нанесенной на тест-линию мембраны, что приводило к формированию окрашенной полосы за счет концентрирования золотых наночастиц в этой области. При добавлении экзосом аптамер диссоциировал из комплекса с комплементарной ДНК на тест-линии полоски, формируя комплекс с белком CD63 на поверхности экзосом, что приводило к уменьшению интенсивности окрашенной полосы на тест-линии (рис. 6Б). Разработанная тест-система позволяла различать экзосомы, полученные из культуры клеток немелкоклеточного рака легкого, и контрольные экзосомы из культуры фиброцитов.

1.5.1.3. Муцин-1

Муцин-1 (MUC1) - мембранный белок, представленный на поверхности нормальных клеток эпителия. Его гиперэкспрессия характерна для большинства аденокарцином, а также рака легкого, рака молочной железы и др. [120,121].

К. Феррейра с соавт. был получен ДНК-аптамер, способный с высокой аффинностью связывать фрагмент белка MUC1 [68]. Аптамер MUC1-5TR-1 в паре с MUC1-специфичным антителом был использован для создания системы колориметрической детекции в сэндвич-формате. Сначала биотин-содержащий аптамер иммобилизовали в лунки микропланшета, покрытые экстравидином – тетрамерным белком, способным аналогично стрептавидину связывать четыре молекулы биотина с высокой аффинностью. При добавлении раствора аналита в систему происходило образование специфического комплекса аптамера с белком MUC1, обеспечивающее концентрирование аналита. Полученные комплексы визуализировали с помощью первичных MUC1-специфичных антител и вторичных антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой. Предел обнаружения данного метода детекции составил 1 мкг/мл, что в среднем на три-четыре порядка выше предела обнаружения для других биомаркеров злокачественных заболеваний (например, простатспецифического антигена). Авторы объясняют низкую чувствительность детекции высоким уровнем неспецифического связывания аналита с компонентами буферных растворов для активации поверхности планшета и их блокирования.

С. Лю с соавт. сконструировали систему детекции MUC-1, состоящую из аптазима и биотинилированной ДНК, частично комплементарной аптамерной последовательности аптазима [69]. В отсутствие аналита в растворе аптамер формировал комплекс с комплементарной ДНК, иммобилизованной на поверхности стрептавидин-модифицированных магнитных частиц. После этого аптазим в комплексе с ДНК удаляли из раствора с помощью магнитной сепарации. Добавление MUC1 в систему приводило к образованию соответствующего комплекса с аптамером, инициируя формирование активной пространственной структуры гем-связывающего

ДНКзима и последующее окисление хромогенного субстрата. Предел обнаружения в данной системе составил 5 и 5.6 нМ в модельном буферном растворе и в 10%-ной человеческой сыворотке соответственно. Специфичность предложенного метода детекции была показана на примере таких белков как БСА, лизоцим, IgG и тромбин.

Аналогичный подход был использован Ю. Чжоу с соавт. для детекции MUC1 на поверхности экзосом [70]. В присутствии экзосом аптамер в составе аптазима формировал комплекс с белковой мишенью, что приводило к образованию каталитически активной квадруплексной структуры ДНКзима, необходимой для окисления хромогенного субстрата. Предел обнаружения в этом случае составил 3.94×10^5 экзосом/мл. Анализ селективности детекции показал, что разработанный аптасенсор способен различать экзосомы, полученные из культур опухолевых и здоровых клеток. Необходимо также отметить, что весь процесс анализа был достаточно быстрым и занимал около 60 минут.

1.5.1.4. Раковый эмбриональный антиген

Раковый эмбриональный антиген (РЭА) представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 180 кДа и является одним из наиболее широко используемых биомаркеров онкологических заболеваний желудочно-кишечного тракта, а также рака груди и шейки матки [122,123].

Для детекции РЭА в растворе был разработан аптасенсор на основе наночастиц золота [71]. В отсутствие мишени свободный SH-модифицированный ДНК-аптамер ковалентно связывался с наночастицами и препятствовал их агрегации в растворе. Добавление РЭА инициировало формирование активной пространственной структуры аптамера, необходимой для связывания белковой мишени. Образование комплекса аптамера с мишенью препятствовало взаимодействию аптамера с наночастицами, что приводило к их агрегации в растворе с высоким содержанием соли и изменению цвета с красного на синий. Предел обнаружения для данного аптасенсора составил 3 нг/мл в модельном буферном растворе. Специфичность детекции РЭА была показана на примере миоглобина, мукопротеина и БСА. Предложенный аптасенсор также позволял определять РЭА в разбавленных образцах сыворотки крови (2 %) с добавлением известного количества анализируемого белка.

К. Лян с соавт. сконструировали аптасенсор с амплификацией сигнала на основе наночастиц золота [72]. В отсутствие белковой мишени аптамер формировал дуплекс с комплементарной ДНК и не мог препятствовать агрегации наночастиц золота. При добавлении РЭА аптамер предпочтительно связывал белковую мишень. При этом диссоциировавшая из дуплекса ДНК вступала в реакцию амплификации по принципу катящегося кольца с образованием большого количества одноцепочечных ДНК, способных сорбироваться на поверхности наночастиц золота и блокировать их агрегацию, что, в свою очередь, обеспечивало

изменение цвета раствора. Предел обнаружения в данной системе составил 2 пМ, специфичность детекции была показана на примере БСА, альфа-фетопротейна, лизоцима и тромбина.

В работе [73] был создан РЭА-зависимый аптазим, состоящий из аптамера и двухкомпонентного квадруплекс-формирующего ДНКзима. Фрагменты ДНКзима соединяла линкерная олигонуклеотидная последовательность, комплементарная фрагменту аптамера. В отсутствие белковой мишени этот комплементарный комплекс препятствовал образованию каталитически активной структуры ДНКзима. При добавлении РЭА аптамер связывался с белковой мишенью, освобождая линкерную последовательность. В результате ДНКзим восстанавливал свою каталитическую активность, что приводило к окислению хромогенного субстрата и изменению оптической плотности анализируемого раствора. Предел обнаружения для предложенного аптасенсора составил 5.5 пМ (1 нг/мл). Специфичность детекции была показана на примере БСА, лизоцима, инсулина и ПСА. Кроме того, авторам удалось показать возможность детекции искусственно добавленного РЭА в образцах слюны здоровых доноров.

1.5.1.5. Другие маркеры онкологических заболеваний

Простатспецифический антиген (ПСА) – гликопротеин, в норме присутствующий в крови в малом количестве (0.5–2 нг/мл). Повышение его уровня (4-10 мг/мл) может свидетельствовать о развитии рака простаты [54]. Колориметрический аптасенсор на основе золотых наночастиц для детекции ПСА был предложен в работе [74]. Свободный ДНК-аптамер, содержащий дополнительную A₁₅-последовательность, сорбировался на поверхности золотых наночастиц и препятствовал их агрегации. Добавление ПСА инициировало диссоциацию аптамера с поверхности частиц и их последующую агрегацию. Сконструированный аптасенсор позволял детектировать ПСА в физиологическом диапазоне концентраций, предел обнаружения составил 20 пг/мл. Специфичность аптасенсора была показана на примере БСА и ЧСА, РЭА, СА-125, альфа-фетопротейна и IgG. Предложенный аптасенсор также позволял детектировать ПСА, искусственно добавленный в образцы разбавленной сыворотки крови.

Рецептор эпидермального фактора роста типа 2 (HER2) – трансмембранный белок семейства тирозиновых протеинкиназ, повышенная экспрессия которого характерна для рака легкого, рака молочной железы и яичников [124]. ДНК-аптамер к этому маркеру был использован для создания колориметрической системы детекции на основе наночастиц золота в двух вариантах: в растворе и в формате тест-полосок [75]. При проведении анализа в растворе добавление в систему HER2 приводило к диссоциации аптамеров с поверхности наночастиц золота, что инициировало их агрегацию. Разработанная система позволила успешно детектировать HER2 в образцах разбавленной сыворотки (10 %), предел обнаружения составил 10 нМ. Для детекции HER2 с использованием тест-полосок использовали биотинилированный HER2-специфичный аптамер. В отсутствие белковой мишени аптамер сорбировался на

поверхности наночастиц золота за счет образования комплекса биотина со стрептавидином, иммобилизованным на тест-линии, что приводило к появлению окрашенной полосы. В то же время расположенный в контрольной зоне полидиаллилдиметиламмонийхлорид неспецифично связывал наночастицы. Таким образом, на тест-полоске формировались красные полосы в области контрольной линии. Добавление HER2 приводило к образованию комплекса между аптамером и белковой мишенью, блокирующему взаимодействие аптамера с наночастицами. Полученный аптамер-белковый комплекс связывался со стрептавидином на тест-линии за счет остатка биотина в составе аптамера, однако в отсутствие наночастиц окрашенная полоса не визуализировалась. Свободные наночастицы золота связывались с полидиаллилдиметиламмонийхлоридом в контрольной зоне, формируя одну красную полосу. Предел обнаружения в такой системе составил 20 нМ. Для обоих вариантов детекции была показана высокая специфичность анализа с использованием БСА, тромбина, овальбумина и маммаглобина А.

И. Чжоу с соавт. был проведен отбор ДНК-аптамеров, способных связывать белок Dickkopf-1 (DKK1), повышенный уровень которого характерен для многих видов онкологических заболеваний [76]. Аптамер TD10, обладающий наибольшей аффинностью, был использован для создания микропланшетной колориметрической системы детекции в сэндвич-формате. Аптамер TD10 ковалентно иммобилизовали в лунках планшета для связывания и концентрирования белковой мишени. Для визуализации полученного комплекса использовали биотин-меченые DKK1-специфичные антитела в сочетании с конъюгатом стрептавидина с пероксидазой и хромогенным субстратом. Разработанный метод позволял определять белок-мишень в диапазоне концентраций от 62.5 до 4000 пг/мл. Аптасенсорная система также была протестирована на 60 образцах сыворотки крови от пациентов с колоректальным раком, полученные значения концентраций DKK-1 хорошо совпадали с данными, полученными при анализе тех же образцов с помощью коммерческого ИФА-набора.

1.5.2. Биомаркеры нейродегенеративных заболеваний

1.5.2.1. Дофамин

Дофамин – небольшая молекула с молекулярной массой 189 Да – входит в семейство катехоламиновых нейротрансмиттеров, выполняющих различные функции в центральной нервной системе. Изменение уровня дофамина может приводить к развитию целого ряда нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера [125]. С. Маннирони с соавт. был получен дофамин-связывающий 67-звенный РНК-аптамер, константа диссоциации комплекса аптамера с мишенью составила 1.6 мкМ [126]. Полученный аптамер был использован для создания прямой конкурентной системы детекции дофамина с

колориметрическим типом сигнала [77], по аналогии с конкурентным ИФА. На первом этапе анализа биотин-содержащий аптамер иммобилизовали в лунках планшета, модифицированного нейтравидином, после чего в систему добавляли раствор дофамина. Для получения аналитического сигнала, пропорционального количеству связавшегося дофамина, использовали конъюгат пероксидазы хрена с дофамином, конкурирующий за связывание с аптамером на поверхности лунки. Селективность детекции была показана на нескольких структурно близких соединениях (3-метокситирамин, эpineфрин, гомованилиновая кислота, норадреналин). Разработанный метод позволял проводить анализ в образцах разбавленной 10%-ной сыворотки с добавлением дофамина после фильтрации через диализную мембрану (3 кДа) для удаления белков. Предел обнаружения составил 1 пМ, что примерно в 1000 раз меньше по сравнению с пределом обнаружения для ИФА.

Р. Уолш с соавт. был получен ДНК-аналог укороченного 57-звенного дофамин-связывающего РНК-аптамера путем непосредственной замены рибонуклеотидов на соответствующие дезоксирибонуклеотиды в его составе. Следует отметить, что это один из немногих примеров успешной конверсии РНК-аптамера в ДНК с сохранением аффинности аптамера к мишени ($K_d = 0.7$ мкМ) [127]. Авторы работы предполагают, что G-богатые последовательности, способные формировать квадруплексные структуры, являются наиболее перспективными объектами для подобных нуклеотидных преобразований. Сравнение 57-звенного РНК-аптамера и его ДНК-аналога в системе прямой конкурентной колориметрической детекции показало, что использование ДНК-аптамера позволяет детектировать дофамин в более широком диапазоне концентраций: 0.1 нМ - 5 мкМ для ДНК-аптамера и 0.1 мкМ – 0.1 мМ для укороченного РНК-аптамера [78]. Использование 57-звенного ДНК-варианта аптамера также обеспечивало предел обнаружения 3.2 пМ, что почти в 200 раз ниже, чем для 57-звенного РНК-аптамера, и сопоставимо со значением предела обнаружения для 67-звенного РНК-аптамера.

ДНК—аптамер был использован в качестве узнающего элемента при создании колориметрического аптасенсора с использованием суспензии наночастиц золота [79]. Данный аптасенсор обеспечивал детекцию дофамина в диапазоне концентраций от 0.54 до 5.4 мкМ, а предел обнаружения составил 0.36 мкМ. Селективность детекции была показана на примере структурно близких соединений (3,4-дигидроксифенилаланина, пирокатехина, 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты, гомованилиновой кислоты, эpineфрина и аскорбиновой кислоты).

И. Чжан с соавт. использовали флуоресцентно меченый ДНК-аптамер при конструировании бимодального аптасенсора для детекции дофамина [80]. Свободный аптамер в растворе связывался с наночастицами золота и блокировал их агрегацию, при этом сами частицы

выполняли роль «тушителя» флуоресценции для остатка флуоресцеина в составе аптамера. Добавление дофамина в раствор инициировало диссоциацию аптамера с поверхности наночастиц и их последующую агрегацию, что приводило к изменению цвета раствора. При этом пространственное разделение флуорофора и тушителя приводило к разгоранию флуоресценции. В режиме колориметрической детекции предел обнаружения составил 140 нМ. Переключение аптасенсора в флуоресцентный режим работы позволило повысить чувствительность детекции и уменьшить предел обнаружения до 78.7 нМ. Высокая селективность детекции была показана на примере гидрохинона, глюкозы, аскорбиновой кислоты, L-фенилаланина, L-триптофана, норадреналина, 5-гидрокситриптамина и 3,4-дигидроксифенилаланина. Была также продемонстрирована возможность использования созданного аптасенсора для определения дофамина, искусственно добавленного в образцы сыворотки крови человека.

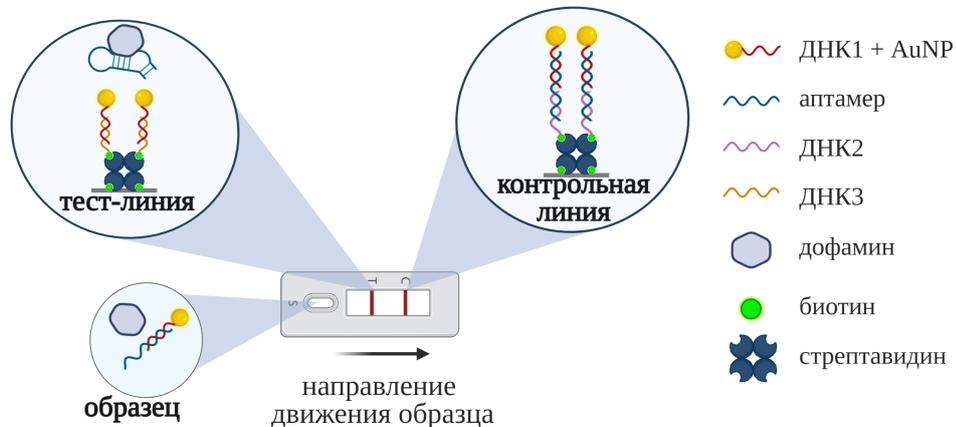


Рисунок 7. Система детекции дофамина в формате тест-полоски, предложенная в работе [82]. ДНК1 – олигонуклеотид, иммобилизованный на поверхности AuNP; ДНК2 – иммобилизованный в контрольной зоне олигонуклеотид, комплементарный фрагменту ДНК1; ДНК3 – иммобилизованный в зоне анализа олигонуклеотид, комплементарный фрагменту ДНК1.

Еще один бимодальный аптасенсор для детекции дофамина был разработан в работе [81]. ДНК-аптамер, иммобилизованный на поверхности наночипа, связывал дофамин в анализируемом растворе. Последующая обработка наночипа щелочным раствором приводила к окислению дофамина с образованием окрашенного продукта реакции. Предел обнаружения в этом случае составил 0.6 мкМ. Для флуоресцентной детекции дофамина в систему добавляли нанокластеры золота, стабилизированные БСА. При этом продукт окисления дофамина выполнял функцию «тушителя» флуоресценции нанокластеров. Предел обнаружения в этом варианте составил 3.3 нМ. Селективность и специфичность детекции были показаны на примере цистамина, ЧСА, 1 %-ной бычьей эмбриональной сыворотки, ацетилхолина, аскорбиновой кислоты и эpineфрина. Разработанный аптасенсор был успешно использован для детекции дофамина в модельных биологических образцах (искусственная спинномозговая жидкость, бычья эмбриональная сыворотка).

Альтернативная селекция дофамин-связывающих ДНК-аптамеров была проведена в работе [128]. Полученный аптамер был использован для разработки аптасенсора в формате тест-полоски для определения уровня дофамина в моче [82]. В отсутствие дофамина аптамер формировал комплекс с комплементарной ДНК, иммобилизованной на поверхности наночастиц золота. При движении по тест-полоске полученный комплекс связывался с биотинилированной ДНК, иммобилизованной в контрольной зоне за счет взаимодействия со стрептавидином, что приводило к появлению окрашенной полосы (зона «С» на рис. 7). Добавление дофамина инициировало диссоциацию аптамера из комплементарного дуплекса и формирование комплекса с мишенью. Полученный комплекс связывался с ДНК в тест-зоне, в результате чего визуализировалась окрашенная полоса (зона «Т» на рис. 7). При этом избыток аптамера в комплексе с комплементарной ДНК, иммобилизованной на поверхности наночастиц золота, связывался с ДНК, иммобилизованной в контрольной зоне, что приводило к появлению второй окрашенной полосы. Данная тест-система позволяла отличать дофамин от кортизола, эпинефрина, норадреналина и серотонина в образцах мочи. Созданный аптасенсор позволял детектировать дофамин в образцах мочи в диапазоне клинически значимых концентраций 2.6 – 3.2 мкМ (500-600 нг/мл), при этом время анализа составило около 15 минут.

1.5.2.2. Другие маркеры нейродегенеративных заболеваний

Альфа-синуклеин (α -syn) относится к группе белков, обнаруживаемых в нервной ткани. Белок α -syn может формировать растворимые олигомеры, повышенное содержание которых было обнаружено в спинномозговой жидкости и плазме крови пациентов с болезнью Паркинсона [129,130]. В работе [131] был получен ДНК-аптамер, селективно связывающий α -syn олигомеры. Этот аптамер был использован К. Сунь с соавт. для создания колориметрического аптасенсора с использованием наночастиц золота [83]. Предел обнаружения в данной системе составил 10 нМ. Специфичность детекции была показана на примере БСА, IgG и тромбина. Однако использование даже разбавленных в 50 раз образцов сыворотки крови для определения количества α -syn олигомеров ингибировало селективную агрегацию наночастиц золота, что делало невозможной колориметрическую детекцию данной белковой мишени.

1.5.3. Биомаркеры стресс-опосредованных заболеваний

Кортизол – глюкокортикоидный гормон, который участвует в регуляции различных физиологических процессов в организме человека и рассматривается как биомаркер стрессовых состояний [132]. Повышенный уровень кортизола характерен для таких стресс-опосредованных заболеваний как синдром хронической усталости, депрессия, биполярное расстройство и пост-травматический синдром [133,134].

Дж. Мартин с соавт. были получены ДНК-аптамеры, связывающие кортизол [84]. Аптамер с наибольшим сродством к мишени был использован в качестве узнающего элемента в составе колориметрического аптасенсора на основе золотых наночастиц. Разработанный аптасенсор позволял детектировать кортизол в диапазоне концентраций от 150 до 600 нМ, что соответствует его физиологическим значениям в сыворотке крови. Селективность детекции была показана на примере эпинефрина, норадреналина и холевой кислоты. Аналогичный аптасенсор на основе золотых наностержней был разработан С. Бао с соавт. [85]. Однако в этом случае предел обнаружения составил 690 мкМ (0.25 мг/мл), что заметно выше по сравнению с другими аптасенсорами. Селективность детекции была показана на примере норадреналина и прогестерона.

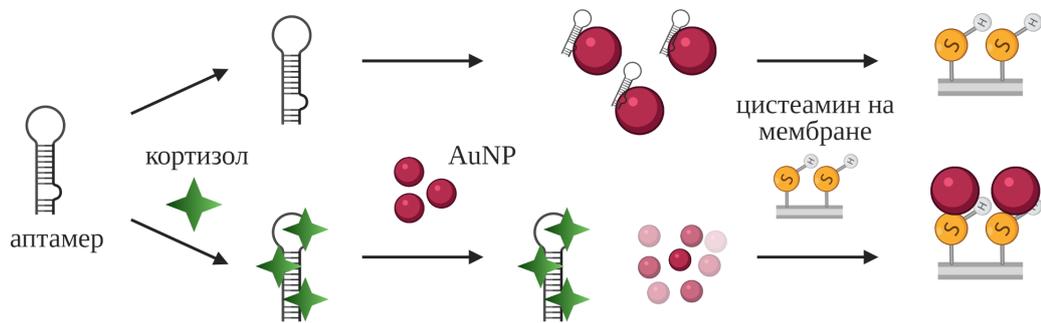


Рисунок 8. Аптасенсор для детекции кортизола в формате тест-полосок, разработанный в работе [86].

Еще одним примером использования ДНК-аптамера, полученного Дж. Мартин с соавт., является разработка системы детекции кортизола в формате тест-полосок [86]. В отсутствие кортизола аптамер сорбировался на поверхности золотых наночастиц и блокировал их взаимодействие с цистеамином, иммобилизованным на тест-линии. При добавлении кортизола аптамер диссоциировал с поверхности частиц за счет образования специфического комплекса, что приводило к взаимодействию наночастиц с цистеамином на тест-линии и последующему формированию окрашенной полосы (рис. 8). Интенсивность окрашенной полосы на тест-линии увеличивалась пропорционально увеличению концентрации кортизола в образце. Отличительной особенностью данной системы было отсутствие контрольной полосы на тест-полоске. Разработанная тест-система позволяла определять концентрацию кортизола в образцах искусственного пота, при этом предел обнаружения составил 2.8 нМ (1 нг/мл).

1.5.4. Биомаркеры воспалительных заболеваний

С-реактивный белок (СРБ) - неспецифический биомаркер острой фазы воспаления, определение которого актуально для целого ряда заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых [135] и ревматических [136]. ДНК-аптамер, способный связывать СРБ, был получен Б. У с соавт. и использован для создания оптического ППР-аптасенсора [137]. Этот аптамер также был

использован в качестве репортерной молекулы при конструировании колориметрической системы детекции в сэндвич-формате [87]. На первом этапе анализа в лунки планшета иммобилизовали конъюгат БСА с цитиколином (цитидин-5-дифосфохолином) – селективным лигандом СРБ. Для визуализации связавшегося с цитиколином СРБ в лунки планшета вносили конъюгат аптамера с золотыми наночастицами, способными окислять хромогенный субстрат в присутствии перекиси водорода. Предел обнаружения в такой системе детекции составил 0.07 пМ. Специфичность аптасенсора была показана в отношении широкого спектра соединений различной химической природы (белки, аминокислоты и др.). Кроме того, разработанный аптасенсор был успешно использован для детекции СРБ в образцах крови модельной линии крыс с острым инфарктом миокарда. Полученные результаты хорошо согласовывались с данными стандартного ИФА.

Другой вариант аптасенсора с колориметрическим способом детекции на основе наночастиц золота был разработан М. Антонио с соавт. [88]. Предел обнаружения СРБ в модельном буферном растворе составил 10 нМ. Однако исследование специфичности анализа показало, что сывороточный альбумин, используемый в близкой к реальной концентрации в крови (≥ 3 г/л БСА), маскирует влияние СРБ на специфичную агрегацию наночастиц, что в значительной степени затрудняет его детекцию. Авторы полагают, что БСА может в целом стабилизировать наночастицы в растворе за счет непосредственного взаимодействия с поверхностью и препятствовать их агрегации.

Растворимый рецептор интерлейкина-2 (sIL-2Ra) - растворимая форма субъединицы рецептора интерлейкина-2, преимущественно продуцируемая Т-лимфоцитами. Повышенный уровень sIL-2Ra в сыворотке крови ассоциирован с развитием различных воспалительных процессов, в том числе аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваний [138]. В работе [89] был создан колориметрический аптасенсор на основе ДНК-аптамера для детекции sIL-2Ra. В отсутствие sIL-2Ra сорбция аптамера на поверхности наночастиц золота увеличивала их отрицательный заряд, что обеспечивало накопление вблизи поверхности положительно заряженного субстрата - ортофенилендиамина. За счет каталитической активности наночастиц происходило окисление субстрата в присутствии перекиси водорода с образованием окрашенного продукта. Добавление sIL-2Ra в раствор инициировало диссоциацию аптамера с поверхности наночастиц. Снижение суммарного отрицательного заряда на поверхности частиц понижало концентрацию субстрата вблизи наночастиц и, соответственно, интенсивность окрашивания раствора. Аптасенсор позволял всего за 25 минут детектировать белок sIL-2Ra в диапазоне концентраций 1–100 нМ, а предел обнаружения составил 1 нМ как в модельном буферном растворе, так и в образцах 10 %-ной сыворотки. Селективность детекции была показана на примере БСА, IL-5Ra, IL-13Ra2, IL-17Ra и CD166.

Интерлейкин-6 (IL-6) - цитокин, участвующий в иммунном ответе при различных воспалительных заболеваниях, а также в регуляции метаболических и регенеративных процессов [139]. Пара ДНК-аптамеров, связывающих разные эпитопы на поверхности мышиного IL-6, была использована для конструирования колориметрического аптасенсора [90]. Для детекции были использованы наночастицы золота двух типов - несущие на поверхности первый или второй аптамер. Добавление интерлейкина-6 приводило к образованию специфического комплекса белка с парой аптамеров, и за счет этого вызывало агрегацию наночастиц с изменением цвета раствора. Аптасенсор обеспечивал детекцию интерлейкина-6 в диапазоне концентраций от 1 до 125 мкг/мл, при этом для изменения окраски раствора требовалось около 5 минут. В то же время, анализ селективности детекции показал, что система способна различать мышиный и человеческий интерлейкины, и поэтому не может быть использована для детекции IL-6 человека.

Эластаза нейтрофилов человека (HNE) относится к классу сериновых протеаз и участвует в формировании иммунного ответа против различных патогенов. Нарушение экспрессии HNE может приводить к развитию таких патологий как острый респираторный дистресс-синдром, хроническая обструктивная болезнь легких, кистозный фиброз, острое повреждение легких, артрит, эмфизема и атеросклероз [140]. ДНК-аптамер, связывающий HNE, был отобран ещё в 1995 г. Ю. Линь с соавт. [141]. На основе этого аптамера была создана система для колориметрической детекции белковой мишени с использованием для получения аналитического сигнала собственной ферментативной активности HNE [91]. Аптамер, иммобилизованный на твердой подложке (магнитные частицы или лунки микропланшета) связывал HNE в анализируемом растворе. После этого в систему добавляли специфический пептид, представляющий собой субстрат HNE, в результате расщепления которого происходило накопление окрашенного продукта. Созданный аптасенсор позволял детектировать HNE в диапазоне концентраций от 4 до 400 пМ, предел обнаружения составил 0.4 пМ. Для определения специфичности аптасенсора детекцию HNE проводили в присутствии тромбина, трипсина, протеиназы К, протеиназы 3, химотрипсина, лизоцима, катепсина G, иммуноглобулина класса G, ЧСА, трансферрина и свиной панкреатической эластазы. Надо отметить, что при анализе биологических образцов препятствием для анализа стало присутствие в сыворотке ингибиторов эластазы. Для образцов с искусственно добавленной HNE авторы решили эту проблему, используя предварительную инактивацию ингибиторов прогреванием при 65 °C в течение 30 минут; использование этого протокола для анализа реальных образцов сыворотки пока остается под вопросом.

1.5.5. Биомаркеры сердечно-сосудистых заболеваний

Сердечные тропонины - тропонин I и тропонин T являются биомаркерами различных сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе инфаркта миокарда [142]. В работе [92] были получены ДНК-аптамеры, способные связывать тропонин T. Высокая аффинность и селективность аптамеров позволила сконструировать на их основе микропланшетную систему колориметрической детекции в двух форматах. В первом варианте анализируемый белок был сорбирован непосредственно на поверхности лунок микропланшета, после чего в них последовательно вносили биотин-модифицированный аптамер и конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена. Предел обнаружения составил 1.06 нМ в модельном буфере и 3.42 нМ в неразбавленной сыворотке крови. Проведение прямой детекции тропонина выявило проблему неспецифического сигнала в образцах сыворотки крови. Для ее решения авторами была предложена альтернативная система детекции тропонина в сэндвич-формате. В этом варианте анализа один аптамер иммобилизовали в лунках планшета, а второй использовали в качестве репортерной молекулы. Предел обнаружения в такой системе детекции составил 1.57 нМ и 3.13 нМ в модельном реакционном буфере и неразбавленной сыворотке соответственно.

С использованием модифицированного метода SELEX на микрочипе А. Синха с соавт. отобрали ДНК-аптамер, способный связывать тропонин I [143]. Этот аптамер был использован в качестве узнающего элемента хемилюминесцентного аптасенсора в формате микрочипа [93]. Иммобилизованный на поверхности магнитных частиц аптамер использовали для связывания белка-аналита на соответствующих участках микрочипа. Для визуализации полученного комплекса использовали первичные тропонин-специфичные антитела и конъюгированные с пероксидазой вторичные антитела. Предел обнаружения в данной системе составил 0.5 пМ (12 нг/л), что сопоставимо или даже превосходит пределы обнаружения, характерные для коммерческих ИФА-наборов на основе антител (12.5–40 пМ или 300–1000 нг/л). Специфичность детекции была показана на примере БСА, фибриногена и белка BNPT (N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide). Разработанный аптасенсор был использован для детекции тропонина I в образцах сыворотки крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями и здорового донора.

Белок HIF-1 α , контролирующий транспорт кислорода, рассматривается как перспективный биомаркер инфаркта миокарда [144]. В работе [94] конъюгат аптамера, связывающего HIF-1 α , с золотыми наночастицами был использован в качестве репортерной молекулы для детекции HIF-1 α на поверхности специфичных экзосом, образующихся после перенесенного инфаркта миокарда. На первом этапе анализа экзосомы связывались с HIF-1 α -специфичными антителами, иммобилизованными в лунках планшета. После этого в лунки вносили конъюгат аптамера с наночастицами золота, обладающими пероксидаза-подобной активностью. Окисление хромогенного субстрата в присутствии перекиси водорода обеспечивало получение

аналитического сигнала. Предел обнаружения для данного аптасенсора составил 7 фМ (0.2 нг/л) в модельном буферном растворе. Кроме того, была показана возможность использования аптасенсора для количественного анализа HIF-1 α в составе экзосом в образцах сыворотки крови модельных животных с инфарктом миокарда.

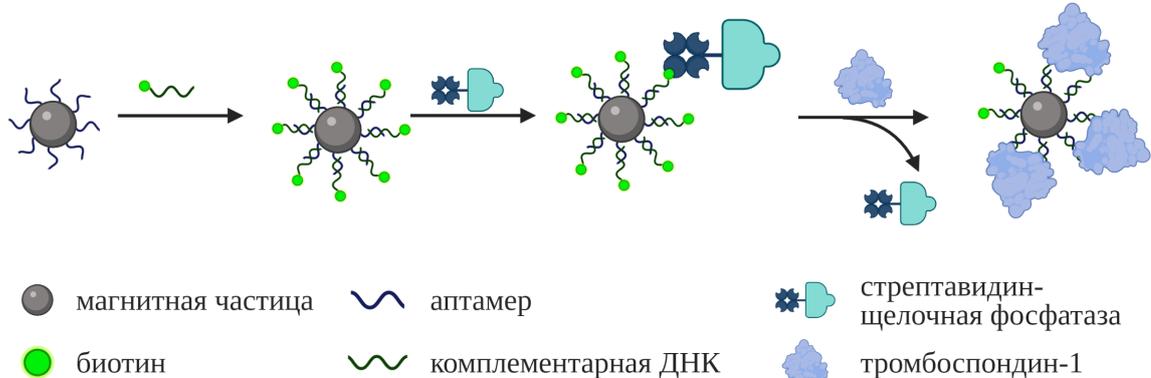


Рисунок 9. Система детекции тромбоспондина-1, предложенная К. Цзи с соавт. [95].

Тромбоспондин-1 - гликопротеин, выполняющий множество функций в организме человека. Повышенный уровень этого биомаркера в крови может говорить о развитии таких заболеваний как атеросклероз и инфаркт миокарда [145,146]. В работе [95] были получены ДНК-аптамеры, связывающие тромбоспондин-1. Укороченный вариант аптамера M55 был использован для конструирования колориметрического аптасенсора. Аптамер, присоединенный на поверхность магнитных частиц, гибридизовали с биотин-модифицированным олигонуклеотидом, после чего в систему добавляли конъюгат стрептавидина с пероксидазой. Таким образом, в отсутствие мишени пероксидаза оказывалась связанной с магнитными частицами. В присутствии тромбоспондина-1 аптамер связывался с белковой мишенью, в результате чего происходило вытеснение биотин-содержащего олигонуклеотида из комплекса на поверхности частиц и накопление пероксидазы в растворе. После отделения магнитных частиц и добавления хромогенного субстрата регистрировали изменение оптической плотности (рис. 9). Предел обнаружения тромбоспондина-1 в предложенной системе составил 7 фМ в модельном буферном растворе. Специфичность детекции была показана на примере БСА, VCAM-1, ICAM-1 и E-селектина. Кроме того, данный аптасенсор был использован для определения концентрации тромбоспондина-1 в сыворотке крови больных атеросклерозом и здоровых доноров.

1.5.6. Биомаркеры сахарного диабета

Сахарный диабет объединяет группу патологий эндокринной системы, связанных с нарушением выработки гормона инсулина и повышением уровня глюкозы в крови. Серьезными осложнениями данного заболевания являются различные патологии глаз, почек, сердечно-сосудистой и нервной систем [147]. Для предотвращения этих последствий больным сахарным диабетом необходимо проводить регулярную оценку уровня глюкозы в крови. Данный

биохимический показатель сильно зависит от режима питания, уровня физической активности и ряда других факторов. В настоящее время установлено, что уровень гликированного гемоглобина HbA1c в крови человека является более точным показателем, отражающим средний уровень содержания глюкозы в крови за предшествующие 2-3 месяца [148]. Так, например, уровень HbA1c является диагностическим критерием диабета (≥ 6.5 %) и преддиабетического состояния (5.7-6.4 %) [149]. Гликированный гемоглобин HbA1c представляет собой продукт неферментативного гликирования N-концевых остатков валина в составе β -цепей гемоглобина человека. В настоящее время в литературе описаны ДНК-аптамеры, способные связывать суммарный (Hb) и/или гликированный (HbA1c) гемоглобин человека, полученные разными группами исследователей. Х. Линь с соавт. отобрали аптамеры, связывающие суммарный и гликированный гемоглобины с высокой аффинностью ($K_d = 7.6$ нМ и 7.3 нМ для Hb и HbA1c, соответственно) [11]. Отличительной особенностью данной селекции является использование микрофлюидных чипов для проведения SELEX. Авторы работы ковалентно иммобилизовали белковую мишень на поверхности магнитных частиц, после чего помещали их в отдельную камеру внутри чипа. Таким образом удалось заметно сократить время, затрачиваемое на проведение одного раунда селекции, и снизить расход реактивов на всех стадиях отбора. Полученные аптамеры были использованы для селективного связывания аналита в исследуемом образце при конструировании хемилюминесцентной системы детекции в сэндвич-формате с использованием микрофлюидного чипа [96]. В качестве репортерного компонента были использованы Hb- или HbA1c-специфичные антитела. Предел обнаружения составил 0.1 мМ для HbA1c и 1.4 мМ для Hb в образцах разбавленной в 50 раз крови. Результаты определения количества гликированного гемоглобина HbA1c в образцах крови в диапазоне от 4.9 до 12.5 % с помощью разработанного аптасенсора либо метода ионообменной хроматографии показали хорошую сходимость: коэффициент вариации составил не более 6.6 %. Кроме того, разработанный аптасенсор позволял проводить анализ за 25 минут в автоматическом режиме. На следующем этапе оптимизации системы детекции в качестве репортерных компонентов вместо гемоглобин-специфичных антител были использованы соответствующие ДНК-аптамеры [97]. Использование двух одинаковых аптамеров для детекции обоих вариантов гемоглобина позволило полностью исключить из системы антитела без снижения эффективности детекции. Результаты определения гемоглобина в образцах крови с помощью разработанного аптасенсора и методом хроматографического анализа хорошо согласовывались между собой (погрешность определения не превышала 10–12 %).

ДНК-аптамер, селективно связывающий гликированный гемоглобин HbA1c, был использован Дж. Мун с соавт. при создании двойного амперометрического сенсора для электрохимического анализа процентного содержания HbA1c по отношению к суммарному

гемоглобину в образцах капиллярной крови [98]. Аптасенсор представлял собой два углеродных электрода, покрытых композитным материалом из углеродных нанотрубок и проводящего полимера и объединенных в одну микрофлюидную структуру. На поверхности обоих электродов ковалентно иммобилизовали краситель толуидиновый синий О, способный усиливать электрохимический сигнал, получаемый при восстановлении металлсодержащих белков, в частности, гемоглобина. Для специфичной детекции гликированного гемоглобина HbA1c на поверхности второго электрода ковалентно иммобилизовали соответствующий NH₂-модифицированный аптамер. При внесении исследуемого образца в микрофлюидный сенсор регистрировали изменение электрохимического сигнала. Предел обнаружения в модельном буферном растворе составил 82 нМ для суммарного и 3.7 нМ для гликированного гемоглобинов. Созданный аптасенсор был использован для определения относительного содержания HbA1c в образцах капиллярной крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом. Полученные результаты хорошо согласовывались с результатами хроматографического анализа тех же образцов.

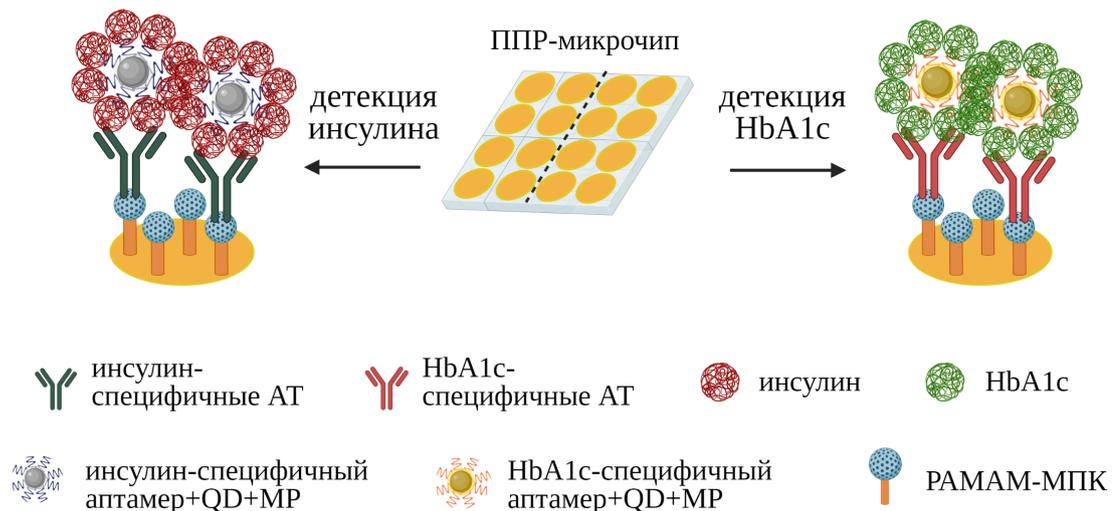


Рисунок 10. ППР-аптасенсор для одновременной детекции инсулина и гликированного гемоглобина HbA1c, разработанный в [99]. МПК – меркаптопропионовая кислота, РАМАМ – полиамидамин.

Полученный Х. Линь с соавт. ДНК-аптамер, узнающий гликированный гемоглобин HbA1c, был использован также при создании ППР-аптасенсоров. Так, в работе [1] аптамер иммобилизовали на поверхности золотого ППР-чипа. Предел обнаружения в этой системе составил 1 нМ. Тот же ДНК-аптамер был использован для одновременного определения гликированного гемоглобина и инсулина в образцах крови [99]. При создании двойного ППР-аптасенсора на золотой подложке ковалентно иммобилизовали инсулин- и HbA1c-специфичные антитела, используя для этого функционализацию поверхности с помощью меркаптопропионовой кислоты и полиамидамина. Для селективного связывания инсулина и гликированного гемоглобина в исследуемых образцах использовали конъюгаты

соответствующих ДНК-аптамеров с магнитными частицами, модифицированными одним из двух типов квантовых точек (см. рис. 10). Для валидации работы ППП-аптасенсора использовали растворы разбавленной в 20 раз крови с добавлением известного количества инсулина и гликированного гемоглобина. Предел обнаружения в этой системе составил 1% для гликированного гемоглобина и 4 пМ для инсулина. Разработанный аптасенсор был использован для одновременной детекции гликированного гемоглобина и инсулина в образцах крови больных диабетом.

В работе [101] HbA1c-специфичный ДНК-аптамер, полученный Х. Линь с соавт., был использован как узнающий элемент электрохимического биосенсора. В качестве электрода был использован графитовый лист с нанесенным на его поверхность нанокompозитным материалом, состоящим из золота и восстановленного оксида графена. Тиол-модифицированный аптамер ковалентно иммобилизовали на электроде за счет взаимодействия с золотом на его поверхности. Предел обнаружения составил 1 нМ в модельном буферном растворе. Специфичность детекции была показана на примере аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты, дофамина и глюкозы в концентрации 100 мкМ (что примерно соответствует их концентрации в крови). Сравнение определения концентрации HbA1c в лизированных образцах разбавленной крови с помощью разработанного аптасенсора и стандартного лабораторного метода анализа показал хорошую сходимость результатов.

Альтернативный отбор ДНК-аптамеров, способных связывать суммарный и гликированный гемоглобин, был проведен Ш. Эйсса с соавт. [10]. В качестве мишени для отбора аптамеров был использован гликированный гемоглобин HbA1c, ковалентно иммобилизованный на поверхности магнитных частиц. Анализ аффинности кандидатных последовательностей выявил аптамер, обладающий высоким сродством к HbA1c ($K_d=2.8$ нМ). Кроме того, авторами был получен еще один аптамер, с приблизительно одинаковой аффинностью к обоим вариантам гемоглобина. Константа диссоциации комплексов аптамера с мишенью составила 3.3 нМ для гликированного и 2.8 нМ для суммарного гемоглобина. Интересно отметить, что последовательности данных аптамеров не имели общих нуклеотидных мотивов с ДНК-аптамерами, полученными Х. Линь с соавт. Отобранные Ш. Эйсса с соавт. аптамеры были использованы в качестве узнающих элементов при создании электрохимических биосенсоров для детекции обоих вариантов гемоглобина. Предел обнаружения в модельном буферном растворе составил 5 пМ для общего и 3 пМ для гликированного гемоглобинов. Созданные аптасенсоры были использованы для определения процентного содержания гликированного гемоглобина HbA1c в образцах разбавленной крови.

Укороченные варианты аптамеров, полученных Ш. Эйсса с соавт., были также использованы для создания аптасенсора с флуоресцентным типом детекции на основе оксида

графена [102]. В отсутствие белковой мишени флуоресцеин-меченые аптамеры физически адсорбировались на поверхности оксида графена, что приводило к тушению флуоресценции. При добавлении анализируемого образца происходило образование специфического комплекса между аптамером и одним из вариантов гемоглобина, в результате чего наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции за счет диссоциации аптамера с поверхности оксида графена. Специфичность данного метода детекции была показана на примере БСА, CFTR и SMN белков. Разработанный аптасенсор был использован для определения процентного соотношения между двумя вариантами гемоглобина в образцах крови больных сахарным диабетом в сравнении с колориметрическим турбидиметрическим методом, широко применяемым в лабораторной диагностике. Результаты, полученные двумя методами, хорошо согласовывались между собой. Кроме того, укороченные аптамеры, полученные в работе [102], были использованы для сравнительного исследования различных углеродных наноматериалов в качестве компонентов электрохимических биосенсоров для детекции суммарного и гликированного гемоглобинов [103]. Для этого поверхность печатного углеродного электрода модифицировали одним из исследуемых материалов (графен, оксид графена, одностенные углеродные нанотрубки, многостенные углеродные нанотрубки, углеродное нановолокно), а затем физически сорбировали один из аптамеров на его поверхность. При взаимодействии с белковой мишенью в анализируемом образце аптамер диссоциировал с поверхности электрода, в результате чего регистрировался электрохимический сигнал. Было показано, что наибольшая амплитуда изменения электрохимического сигнала характерна для электрода, модифицированного одностенными углеродными нанотрубками. Предел обнаружения для такого аптасенсора составил 0.5 фМ для суммарного и 2 фМ для гликированного гемоглобина в модельном буферном растворе. Специфичность детекции была показана на примере таких встречающихся в крови белков как CFTR, SMN, STAT3 и DOCK8. Разработанный аптасенсор был использован для определения содержания гликированного относительно суммарного гемоглобина. Результаты анализа хорошо согласовывались с данными, полученными стандартными методами лабораторной диагностики.

В работе [12] также была проведена селекция ДНК-аптамеров на гемоглобин человека. Полученные аптамеры были использованы для флуоресцентной детекции суммарного гемоглобина, основанной на высвобождении флуоресцентно меченого аптамера с поверхности оксида графена, выполняющего функцию тушителя флуоресценции. Селективность разработанного метода детекции была показана на примере гемоглобинов млекопитающих (коровы, свиньи, овцы и мыши), а также ЧСА и миоглобина.

Б. Камерон с соавт. также были получены ДНК-аптамеры, селективно связывающие гликированный гемоглобин HbA1c [100,150,151]. Полученные аптамеры были иммобилизованы

на ППР-чипах и показана принципиальная возможность их использования в качестве узнающих элементов для детекции белка HbA1c.

Наряду с определением уровня гликированных белков крови для диагностики сахарного диабета может быть использован количественный анализ инсулина. В работе [104] квадруплекс-формирующий ДНК-аптамер, узнающий инсулин, был использован в составе системы колориметрической детекции. На первом этапе анализа биотинилированный аптамер нековалентно связывался со стрептавидин-модифицированными магнитными частицами, иммобилизованными на поверхности биотинилированных ДНК-нанотрубок. При взаимодействии с инсулином аптамер формировал активную гем-связывающую структуру и приобретал способность окислять хромогенный субстрат в присутствии перекиси водорода. Предел обнаружения инсулина в разработанной системе составил 2.6 пМ (0.0156 нг/мл), в то время как для коммерчески доступного ИФА-набора эта величина равна 42 пМ (0.25 нг/мл).

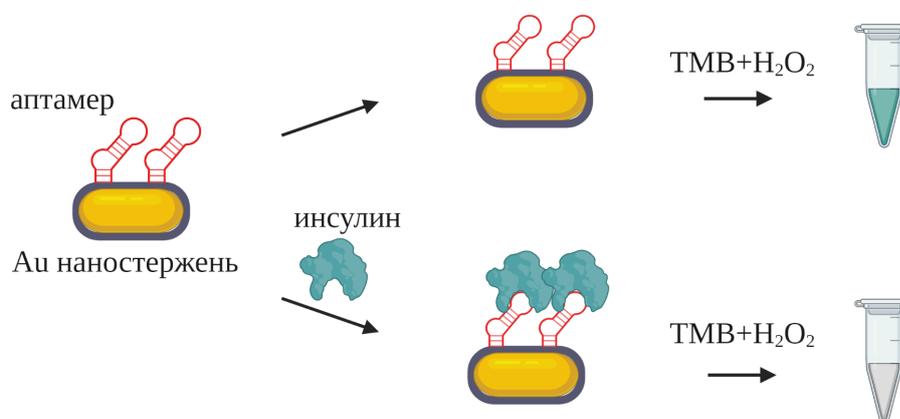


Рисунок 11. Детекция инсулина с помощью аптасенсора на основе золотых наностержней с пероксидазной активностью [105]. ТМВ - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

Этот же ДНК-аптамер был использован при конструировании аптасенсора для определения инсулина и/или соотношения инсулина и глюкозы в образцах сыворотки крови больных сахарным диабетом [105]. Тиол-модифицированный аптамер ковалентно иммобилизовали на поверхности золотых наностержней, способных окислять хромогенный субстрат в присутствии перекиси водорода с образованием окрашенного продукта реакции. При добавлении инсулина в раствор аптамер на поверхности наностержня формировал комплекс с мишенью, ингибируя пероксидазную активность пропорционально увеличению концентрации инсулина (рис. 11). Предел обнаружения инсулина в сыворотке крови составил 0.2 пМ. Для одновременного определения инсулина и глюкозы в систему дополнительно вносили фермент глюкозооксидазу. В результате ферментативного окисления глюкозы в растворе накапливалась перекись водорода, которая затем была использована в пероксидазном окислении субстрата с помощью золотых наностержней. Разработанный аптасенсор позволял определять соотношение инсулина и глюкозы в образцах сыворотки крови больных сахарным диабетом. Авторы работы

предполагают, что данный аптасенсор в перспективе может быть использован для дифференциальной диагностики сахарного диабета первого и второго типов.

В настоящее время адипокины – пептидные гормоны, вырабатываемые клетками жировой ткани – также рассматриваются в качестве перспективных биомаркеров ожирения и сахарного диабета. В работе [106] была разработана микропланшетная система детекции нескольких адипокинов (васпина, висфатина и ретинол-связывающего белка 4 (RBP4)) на основе аптамеров. В созданной аналитической системе аптамеры были использованы для селективной иммобилизации соответствующего белка-аналита в лунках планшетов. Для детекции полученных комплексов использовали аналит-специфичные первичные антитела и вторичные антитела, конъюгированные с ферментом. Селективность детекции каждого из трех адипокинов была показана на примере двух других адипокинов, использованных в данной работе, специфичность анализа – с помощью мажорных белков крови (сывороточный альбумин, иммуноглобулин, фибриноген). Пределы обнаружения в разработанной системе детекции составили 3.7 нМ (78 нг/мл) для RBP4, 1 нМ (39 нг/мл) для васпина и 0.4 нМ (19 нг/мл) висфатина как в буферном растворе, так и в разбавленной сыворотке крови.

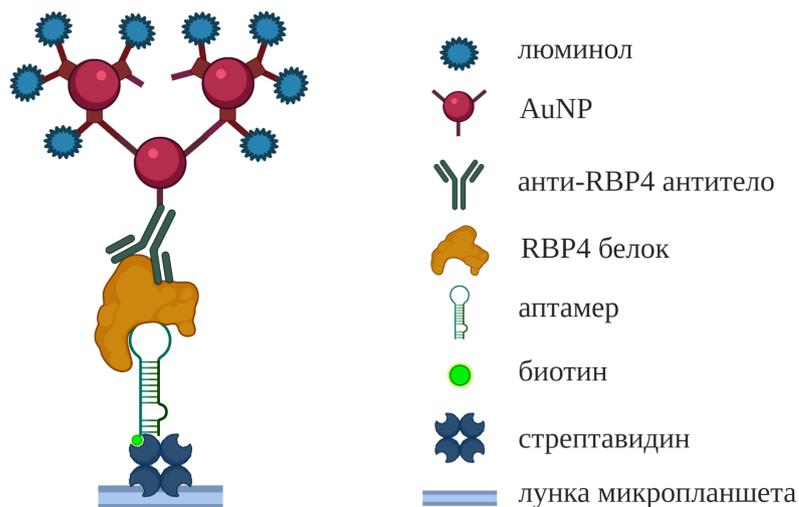


Рисунок 12. Схема хемилюминесцентной детекции белка RBP4, разработанной в работе [107].

ДНК-аптамер, связывающий белок RBP4, был использован для создания хемилюминесцентного биосенсора [107]. RBP4-специфичный аптамер, иммобилизованный в лунках микропланшета, селективно связывал белок-мишень в анализируемом растворе. Визуализацию полученных комплексов проводили с помощью анти-RBP4 антител, иммобилизованных на поверхности ковалентно-сшитых между собой наночастиц золота, модифицированных люминолом (рис. 12). В результате окисления люминола в присутствии перекиси водорода регистрировали хемилюминесцентный сигнал. Предел обнаружения составил 50 фМ (1 пг/мл) в модельном буферном растворе. Разработанный аптасенсор был использован для детекции RBP4 в образцах сыворотки крови больных сахарным диабетом и здоровых

доноров. Результаты анализа хорошо согласовались с результатами, полученными с использованием коммерческого ИФА-набора.

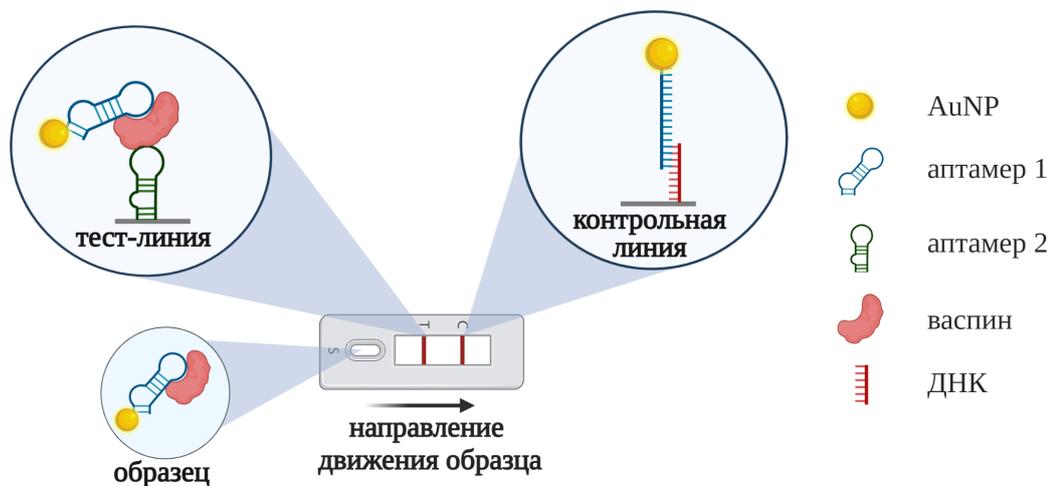


Рисунок 13. Аптасенсор в формате тест-полоски для детекции васпина [108]. ДНК – олигонуклеотид, комплементарный фрагменту репортерного аптамера 1.

Пара ДНК-аптамеров, узнающих различные эпитопы в составе васпина, была использована для создания системы детекции в формате тест-полосок [108]. Первый аптамер, иммобилизованный на тест-полоске, был использован для селективного связывания васпина из анализируемого раствора. Второй аптамер, ковалентно иммобилизованный на поверхности золотых наночастиц, выполнял функцию репортерной молекулы. Таким образом, при нанесении на тест-полоску образца, содержащего репортерный аптамер в комплексе с васпином, происходило связывание этого комплекса с иммобилизованным на тест-полоске аптамером, в результате чего в тест-зоне проявлялась окрашенная полоса (рис. 13). В отсутствие васпина в анализируемом образце конъюгат репортерного аптамера с золотыми наночастицами формировал дуплекс с комплементарной ДНК, иммобилизованной в области контрольной зоны. В результате в контрольной зоне формировалась окрашенная полоса. Авторы отмечают, что при анализе образцов с высокими концентрациями васпина происходило снижение интенсивности окрашивания контрольной полосы, что может быть связано с недостатком репортерного аптамера в растворе после формирования специфического комплекса в тестовой зоне. Предел обнаружения васпина в разработанной системе составил ~ 0.1 нМ как в модельном буферном растворе, так и в образцах сыворотки крови.

В силу высокой степени значимости определения гликированного гемоглобина HbA1c как биомаркера сахарного диабета в настоящее время разработано более 300 различных методов его детекции, включая различные типы хроматографического анализа, масс-спектрометрию, иммуноферментный анализ, капиллярный электрофорез и др. [152]. В качестве референсных методов анализа Международной федерацией клинической химии были утверждены ионообменная ВЭЖХ и капиллярный электрофорез [153]. Также традиционно в клинической

практике применяется аффинная хроматография с использованием 3-аминофенилборной кислоты, избирательно связывающей остатки глюкозы в составе гликированного гемоглобина HbA1c. Данные методы позволяют определять относительное содержание гликированного гемоглобина в диапазоне от 4.5 до 8.5 %. К существенным недостаткам хроматографических методов можно отнести большое время анализа, необходимость приобретения дорогостоящего оборудования, а также требование высокой квалификации персонала, выполняющего процедуру. В последнее время для определения HbA1c получил широкое распространение турбодиметрический иммунохимический анализ, основанный на конкурентном связывании суммарного и гликированного гемоглобина с латексными частицами [154]. Для количественного определения гликированного гемоглобина в данном случае используются HbA1c-специфичные антитела. Данный метод анализа отличается более высокой чувствительностью, но при этом включает в себя все недостатки методов, основанных на использовании антител (чувствительность к условиям хранения, различия между партиями антител, высокая стоимость реагентов). Таким образом, разработка новых методов определения гликированного гемоглобина как биомаркера сахарного диабета остается актуальной задачей. Отдельной задачей при конструировании систем детекции является подбор репортерной молекулы, обеспечивающей стабильную и высокочувствительную детекцию аналита. Использование люминесцентных белков в качестве репортерных молекул в составе биосенсоров различных типов представляет собой относительно новый подход к разработке диагностических тест-систем. Одним из наиболее перспективных белков такого типа является Ca^{2+} -регулируемый фотопротеин обелин. Обелин представляет собой нековалентный комплекс апобелка (22.2 кДа, 195 аминокислот) и предокисленного субстрата — 2-гидропероксицелентеразина, впервые полученный из *Obelia longissima* [155]. Рентгеноструктурный анализ данного белка показал, что обелин включает 8 альфа-спиралей, организованных в виде двух соединенных краями полусфер с внутренней полостью, образованной боковыми цепями гидрофобных аминокислот [156]. Связывание специфического субстрата происходит в этой полости за счет формирования сети нековалентных связей. Взаимодействие с ионами кальция приводит к структурным изменениям фотопротеина, в результате которых происходит инициирование реакции декарбоксилирования субстрата целентеразина с образованием продуктов реакции – целентерамида в возбужденном состоянии и молекулы углекислого газа (рис. 14) [157]. Переход целентерамида из возбужденного в релаксированное состояние сопровождается испусканием кванта света в видимой области ($\lambda_{\text{max}} = 485 \text{ нм}$).

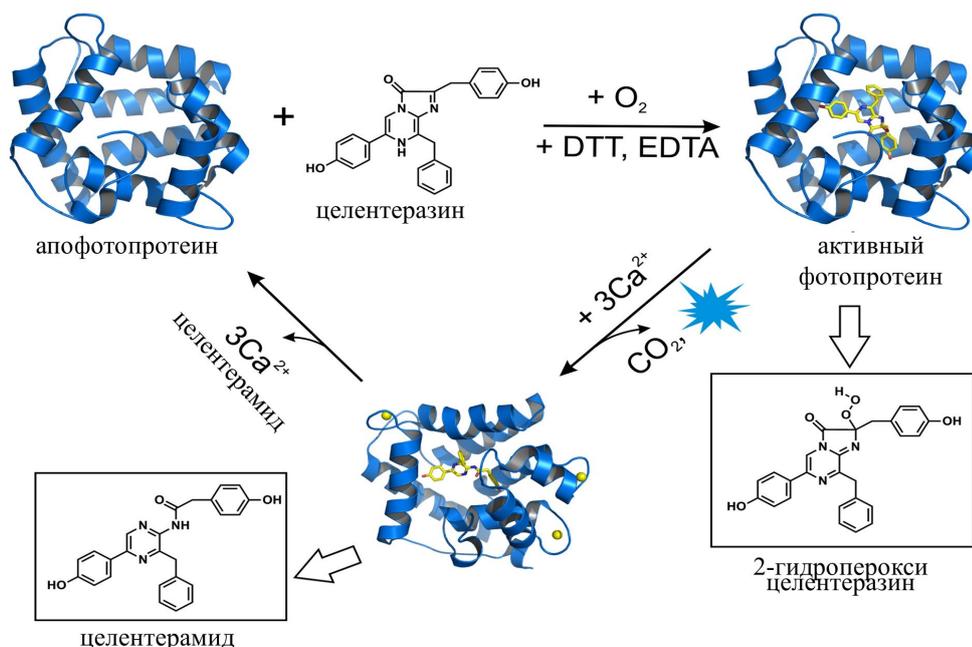


Рисунок. 14. Схема биолуминесцентной реакции обелина [157].

Данный белок отличается высокой стабильностью при хранении, а также возможностью сохранять активность даже после введения химических или генетических модификаций, что позволяет использовать его в качестве репортерного компонента при создании биоаналитических систем [158]. Кроме того, обелин характеризуется исключительно широким линейным диапазоном зависимости биолуминесцентного сигнала от концентрации фотопроина. Важным преимуществом обелина является высокий квантовый выход биолуминесцентной реакции, что позволяет детектировать чрезвычайно малое количество фотопротеина, и, следовательно, обеспечивает высокую чувствительность детекции с его использованием без необходимости амплификации сигнала. Получение рекомбинантного обелина и его мутантных вариантов [159,160] позволило разработать биолуминесцентные системы для количественного определения различных белковых мишеней, а также для проведения гибридизационного анализа и генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов [161–165].

* * *

Таким образом, аптамеры получили широкое применение в качестве узнающих элементов при конструировании колориметрических аптасенсоров для детекции биомаркеров различных заболеваний. Следует отметить, что при этом набор определяемых биомаркеров достаточно ограничен и не систематизирован. Кроме того, в настоящий момент отсутствует протокол единой валидации таких ключевых характеристик разрабатываемых аптасенсоров как предел обнаружения и селективность детекции. Из приведенных в табл. 1 данных видно, что выбор соединений для оценки селективности и специфичности анализа носит произвольный характер и в некоторых случаях не имеет отношения к компонентам реальных биологических образцов,

используемых для лабораторной диагностики. Также в ряде описываемых работ было отмечено выраженное негативное влияние отдельных составляющих биологических жидкостей на результаты анализа с помощью аптасенсоров. Очевидно, что разработка протоколов дополнительной пробоподготовки является актуальной задачей для оптимизации систем детекции на основе аптамеров.

Также необходимо подчеркнуть, что в настоящее время описаны единичные примеры успешного создания аптасенсоров в сэндвич-формате с использованием двух аптамеров. Зачастую в качестве одного из компонентов в составе сэндвич-конструкций используются аналит-специфичные антитела. Такой вариант хоть и делает аналитическую систему экономически более выгодной по сравнению с традиционным ИФА, однако не позволяет полностью исключить недостатки использования антител, упоминавшиеся в предыдущих разделах.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы и ферменты

В работе были использованы следующие реактивы: SYBR Green I, Твин-20, фосфатный буфер (PBS, 2.7 мМ КСl, 1.5 мМ КН₂РO₄, 138 мМ NaCl, 8.1 мМ Na₂НРO₄, рН 7.0-7.3), тозил-активированные магнитные частицы M-280 Dynabeads™, рибонуклеозидтрифосфаты (Thermo Fisher Scientific, США), сорбент Ni Sepharose 6 FF и магнитные частицы His Mag Sepharose Ni (GE Healthcare, Великобритания), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты («Биосан», Россия), 2'-F-СТР, 2'-F-УТР («Нанотех-С», Россия).

В работе были использованы следующие ферменты: Таq ДНК-полимераза (Биосан, Россия), фосфодиэстераза змеиного яда (Sigma-Aldrich, США), T7 РНК-полимераза, неорганическая пирофосфатаза, термочувствительная щелочная фосфатаза FasAP, T4 полинуклеотидкиназа, ДНКаза I, обратная транскриптаза MMuLV, обратная транскриптаза RevertAid – все производства Thermo Fisher Scientific.

В работе использовали гемоглобин человека, сывороточный альбумин человека и стрептавидин (Sigma-Aldrich), гликированный гемоглобин человека HbA1c (Fitzgerald, США), поликлональные антитела козы против гемоглобина человека (Novus Biologicals, США). Фотопротеин обелин дикого типа, обелин с N-концевым гексагистидиновым фрагментом (His₆-Obe), а также зеленый флуоресцентный белок с N-концевым гексагистидиновым фрагментом (His₆-GFP) были предоставлены д. б. н. Л. А. Франк и к. б. н. В. В. Красицкой (Институт биофизики СО РАН, ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»).

2.1.2. Буферные растворы

Таблица 2. Буферные растворы, использованные в работе.

Буфер А	2.7 мМ КСl, 1.5 мМ КН ₂ РO ₄ , 138 мМ NaCl, 8 мМ Na ₂ НРO ₄
Буфер В	2.7 мМ КСl, 1.5 мМ КН ₂ РO ₄ , 138 мМ NaCl, 8 мМ Na ₂ НРO ₄ , 1 мМ Na ₂ ЭДТА, 0.05 % Твин-20
Буфер С	2.7 мМ КСl, 1.5 мМ КН ₂ РO ₄ , 138 мМ NaCl, 8 мМ Na ₂ НРO ₄ , 1 мМ Na ₂ ЭДТА
Буфер D	2.7 мМ КСl, 1.5 мМ КН ₂ РO ₄ , 138 мМ NaCl, 8 мМ Na ₂ НРO ₄ , 5 мМ MgCl ₂ , 0.05 % Твин-20
Буфер E	2.7 мМ КСl, 1.5 мМ КН ₂ РO ₄ , 138 мМ NaCl, 8 мМ Na ₂ НРO ₄ , 5 мМ MgCl ₂
Буфер для гибридизации	10 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 10 мМ MgCl ₂
Буфер для фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I	10 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 5 мМ MgCl ₂ , 1 мМ DTT
Буфер для транскрипции	40 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 12 мМ MgCl ₂ , 5 мМ DTT, 1 мМ спермидина гидрохлорид, 4 %-ный PEG 8000, 0.002 %-ный тритон X-100

Буфер для обратной транскрипции	50 мМ Трис-НСl, рН 8.3, 50мМ КСl, 4 мМ MgCl ₂ , 10 мМ DTT
Буфер для ПЦР	10 мМ Трис-НСl, рН 8.3, 50 мМ КСl, 7.5 мМ MgCl ₂
Буфер для Т4 ПНК	50 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 10 мМ MgCl ₂ , 5 мМ DTT, 0.1 мМ спермидин
ТБЕ	0.089 М Трис-борат, рН 8.3, 2 мМ Na ₂ EDTA

2.2. Методики эксперимента

2.2.1. Химический синтез, деблокирование и очистка ДНК-библиотек и праймеров для их амплификации

Одноцепочечные ДНК-библиотеки (5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTGCGAA-N₄₀-TTGAGCGTTTATTCTTGTCTCCC-3'), прямой PF1 (5'-GCTAATACGACTCACTATAGGGA GACAAGAATAAACGCTCAA-3', жирным шрифтом выделена последовательность T7 промотора) и обратный PR1 (5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTGCGAA-3') праймеры для амплификации, а также описанные в литературе гемоглобин-специфичные ДНК-аптамеры (соответствующие нуклеотидные последовательности приведены в табл. 9 в разделе 3.2.3.1) были синтезированы в ЛХРНК ИХБФМ СО РАН к.х.н. М. И. Мещаниновой и к.х.н. О. А Крашенининой. твердофазным фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе ДНК/РНК ASM-800 («Биоссет», Россия) в масштабе 0.4 мкмоль по оптимизированным для данного прибора протоколам. Для синтеза рандомизированной области библиотеки использовали смесь четырех стандартных полностью защищенных фосфитамидов дезоксирибонуклеотидов (GlenResearch, США) в соотношениях, указанных в разделе 3.1.1. Удаление полимерного носителя и деблокирование проводили в условиях, рекомендованных производителем.

Очистку праймеров для амплификации библиотек проводили методом препаративного гель-электрофореза в денатурирующем 15 %-ном ПААГ с последующей элюцией олигодезоксирибонуклеотидов из геля 0.1 М водным раствором NaClO₄. Растворы праймеров после элюции обессоливали с использованием картриджей с фазой C18 и осаждали 2 %-ным раствором NaClO₄ в ацетоне. Осадки высушивали на воздухе в течение 10 мин и растворяли в деионизованной воде.

Очистку ДНК-библиотек проводили методом препаративного гель-электрофореза в денатурирующем 12 %-ном ПААГ с последующей элюцией ДНК из геля ТЕ-буфером и концентрированием с использованием центрифужных модулей Amicon Ultra-0.5 10K (Millipore, США).

2.2.2. Исчерпывающий гидролиз ДНК-библиотек с помощью фосфодиэстеразы змеиного яда

Реакционную смесь объемом 50 мкл, содержащую 1 нмоль ДНК-библиотеки и 0.01 е. а. фосфодиэстеразы в буфере (10 мМ Трис-НСl, рН 7.8, 0.5 мМ MgCl₂), инкубировали в течение 16 ч при 37 °С. После инкубации в реакционную смесь добавляли 10 е. а. термочувствительной фосфатазы FastAP и инкубировали 30 мин при 37 °С, а затем прогревали 10 мин при 75 °С. Состав реакционных смесей после гидролиза анализировали ОФ ВЭЖХ на хроматографе «Миличром А-02» (Эконова, Россия) с использованием колонки ProntoSil-120-5-C18 AQ.

2.2.3. Ферментативный синтез двуцепочечных ДНК-библиотек

Реакционную смесь (100 мкл), содержащую оцДНК-библиотеку (2 нмоль) и праймер PF1 (1 нмоль) в буфере для гибридизации, инкубировали при 90 °С в течение 5 мин, а затем охлаждали при 25 °С в течение 10 мин. Полученный раствор использовали в качестве матрицы в реакции элонгации ДНК. Для этого реакционную смесь (600 мкл), содержащую 0.5 мМ каждого из четырех dNTP, ДНК-матрицу (100 мкл) и 50 е. а. фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* в реакционном буфере, инкубировали при 37 °С в течение 2 ч, а затем прогревали при 75 °С в течение 10 мин. Продукт реакции очищали с помощью набора для выделения ДНК MinElute Reaction Cleanup kit (Qiagen, Германия). Очищенную дцДНК-библиотеку использовали в качестве матрицы для транскрипции *in vitro*.

2.2.4. Синтез 2'-F-РНК-библиотеки методом транскрипции *in vitro*

Синтез 2'-F-РНК-библиотеки проводили по протоколу, описанному в работе [35]. Реакционную смесь объемом 500 мкл, содержащую 1 мМ АТР, 1 мМ GTP, 3 мМ 2'-F-УТР, 3 мМ 2'-F-СТР, 500 пмоль дцДНК-матрицы, 1 е. а. неорганической пирофосфатазы, 1800 е. а. T7 РНК-полимеразы в буфере для транскрипции, инкубировали при 37 °С в течение 16 ч. После этого в реакционную смесь добавляли 50 е. а. ДНКазы I и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч, а затем прогревали при 70 °С в течение 10 мин. Полученный 2'-F-РНК-транскрипт дважды экстрагировали хлороформом и осаждали этанолом. Осадок растворяли в деионизованной воде, очищали гель-фильтрацией на колонке Sephadex G-50 (fine) и анализировали методом электрофореза в 12 %-ном денатурирующем ПААГ.

2.2.5. Химический синтез, деблокирование и очистка индивидуальных 2'-F-РНК-аптамеров

Индивидуальные 2'-F-РНК-аптамеры были синтезированы в ЛХРНК ИХБФМ СО РАН к. х. н. В. В. Тимошенко твердофазным фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе ДНК/РНК ASM-800 в масштабе 0.4 мкмоль по оптимизированным для данного прибора протоколам. Для деблокирования 2'-F-олигодезоксирибонуклеотидов к полимер-связанному

олигонуклеотиду добавляли 300 мкл смеси АМА (30 % NH_4OH :40% водный метиламин 1:1) инкубировали при 25 °С в течение 4 ч, раствор отделяли от полимерного носителя центрифугированием и переносили в новую пробирку. Полимерный носитель промывали дважды смесью ацетонитрил:этанол:вода (1:1:1), все растворы объединяли и упаривали на вакуумном концентраторе. Удаление 2'-О-третбутилдиметилсилильных защитных групп проводили смесью N-метил-2-пирролидинон:триэтиламин:TEA•3HF (1.5:0.75:1) при 65 °С в течение 1.5 ч при перемешивании, после чего к раствору добавляли этокситриметилсилан, перемешивали и осаждали олигонуклеотид серным эфиром. Осадок сушили на воздухе и растворяли в воде. Все синтезированные олигонуклеотиды очищали методом препаративного электрофореза в 12 %-ном денатурирующем ПААГ как описано в разделе 2.2.1.

2.2.6. Химический синтез, деблокирование и очистка индивидуальных ДНК-аптамеров

Индивидуальные гемоглобин-связывающие ДНК-аптамеры, описанные в литературе, были синтезированы в ЛХРНК ИХБФМ СО РАН к. х. н. М. И. Мещаниновой твердофазным фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе ДНК/РНК ASM-800 в масштабе 0.4 мкмоль по оптимизированным для данного прибора протоколам. Удаление полимерного носителя и деблокирование проводили в условиях, рекомендованных производителем. Все синтезированные олигонуклеотиды очищали методом препаративного электрофореза в 12 %-ном денатурирующем ПААГ, как описано в разделе 2.2.1.

2.2.7. Иммуобилизация белковых мишеней для проведения селекции

2.2.7.1. Ковалентная иммуобилизация белков-мишеней на магнитных частицах

Реакционную смесь, содержащую 100 мкг (250 мкл) Hb или HbA1c и 5 мг тозил-активированных магнитных частиц M-280 Dynabeads™ в 0.1 М боратном буфере (pH 9.5), содержащем 1.2 М сульфат аммония, инкубировали при 37 °С в течение 16 ч при перемешивании. После удаления раствора белка частицы промывали буфером А и инкубировали в буфере В при 37 °С в течение 1 ч при перемешивании для блокирования непрореагировавших тозильных групп. Полученные магнитные частицы с иммобилизованными белками промывали дважды 1 мл буфера В и ресуспендировали в 250 мкл буфера В до достижения концентрации примерно 20 мг/мл.

Для качественной оценки эффективности присоединения белков реакцию смесь, содержащую 0.5 мг (25 мкл) частиц и 1.25 мкг гемоглобин-специфичных антител в буфере В, инкубировали при 25 °С в течение 2 ч при перемешивании. После удаления раствора антител частицы промывали трижды 100 мкл буфера В и инкубировали в 20 мкл буфера для нанесения при 90 °С в течение 10 мин. Полученный после элюции раствор анализировали на наличие антител электрофорезом в денатурирующем ПААГ с последующим окрашиванием красителем Кумасси.

2.2.7.2. Нековалентная иммобилизация His₆-содержащих белков на Ni-сорбентах

Для иммобилизации белка на сефарозе 5 мкл суспензии Ni Sepharose 6 FF промывали трижды 500 мкл буфера В, добавляли 150 мкл раствора His₆-Обе в буфере В (20 мкг/мл) и инкубировали при 25 °С в течение 1 ч при перемешивании. После удаления раствора белка сорбент промывали трижды 150 мкл буфера В.

Для иммобилизации на Ni-NTA магнитных частицах 20 мкл суспензии частиц промывали трижды 200 мкл буфера В, добавляли 100 мкл раствора His₆-Обе в буфере В (70 мкг/мл) и инкубировали при 25 °С в течение 1 ч при перемешивании, а затем промывали трижды 200 мкл буфера В.

2.2.8. *In vitro* селекция 2'-F-РНК-аптамеров к белковым мишеням

2.2.8.1. Отбор 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих суммарный гемоглобин

Перед инкубацией с белковой мишенью 100 мкл раствора 2'-F-РНК-библиотеки (1 нмоль) прогревали в буфере С при 90 °С в течение 5 мин, а затем охлаждали при 25 °С в течение 10 мин. После этого в раствор добавляли Твин-20 до концентрации 0.05 %, ЧСА до концентрации 0.01 % и суммарную РНК дрожжей до концентрации 100 мкг/мл и инкубировали 10 мин при 25 °С.

На первой стадии селекции, так называемой негативной селекции, РНК-библиотеку инкубировали с магнитными частицами, заблокированными Твин-20 (с 1-го по 5-й раунд) или с магнитными частицами с ковалентно иммобилизованным ЧСА (с 6-го по 10-й раунды), при 25 °С в течение 1 ч при перемешивании. Затем смесь помещали в магнитный сепаратор на 2 мин, раствор переносили в отдельную пробирку для последующей инкубации с гемоглобин-содержащими магнитными частицами (0.5 мг) при 25 °С в течение 1 ч при перемешивании. После инкубации частицы промывали 200 мкл буфера В, добавляли 20 мкл воды и прогревали 5 мин при 95 °С для элюции связавшихся молекул РНК.

Для получения кДНК для ПЦР реакционную смесь (50 мкл), содержащую 20 мкл раствора после элюции, 100 пмоль PR1, 0.5 мМ каждого из четырех dNTP и 100 е. а. обратной транскриптазы MMuLV в реакционном буфере, инкубировали при 42 °С в течение 1 ч, а затем прогревали при 70 °С в течение 10 мин. Полученную кДНК амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров PR1 и PF1. Реакционная смесь объемом 1 мл содержала 2 мкМ PF1, 2 мкМ PR1, 1мМ каждого из четырех dNTP, 50 мкл реакционной смеси после обратной транскрипции и 25 е. а. Taq ДНК-полимеразы в буфере для ПЦР. Амплификацию проводили по следующей программе: 93 °С, 3 мин, 93 °С, 30 с, 59 °С, 1 мин, 72 °С, 1 мин, 72 °С, 3 мин. Продукты реакции осаждали этанолом и использовали в качестве матрицы для транскрипции *in vitro* без дополнительной очистки. Транскрипцию РНК-библиотеки и очистку продукта проводили, как описано выше для исходной библиотеки (раздел 2.2.3). Для увеличения давления

селекции последовательно уменьшали время инкубации и количество белка-мишени, а также увеличивали количество промывок (см. таблицу в Приложении 1).

2.2.8.2. Отбор 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих гликированный гемоглобин HbA1c

Селекцию аптамеров, связывающих гликированный гемоглобин HbA1c, проводили по аналогии с селекцией на гемоглобин (см. раздел 2.2.6.1). В качестве мишени для селекции использовали белок HbA1c, ковалентно иммобилизованный на магнитных частицах. На стадии негативной селекции использовали магнитные частицы, блокированные Твин-20 (1-7 раунды) или гемоглобином человека (8-12 раунды). Для увеличения давления селекции последовательно уменьшали время инкубации и количество белка-мишени, а также увеличивали количество промывок (см. таблицу в Приложении 2).

2.2.8.3. Отбор 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих фотопротейн обелин

Перед инкубацией с белковой мишенью раствор 2'-F-модифицированной РНК-библиотеки прогревали в буфере С при 90 °С в течение 5 мин, а затем охлаждали при 25 °С в течение 10 мин. После этого в раствор добавляли Твин-20 до концентрации 0.05 %, БСА до концентрации 0.01 % и тРНК *E. coli* до концентрации 100 мкг/мл и инкубировали 10 мин при 25 °С. На первой стадии селекции раствор библиотеки инкубировали с не нагруженным белком сорбентом Ni Sepharose 6 FF при комнатной температуре в течение 1 ч при перемешивании. После инкубации смесь центрифугировали в течение 5 мин при 500×g, супернатант переносили в отдельную пробирку для последующей инкубации с His₆-Obe, иммобилизованным на сорбенте Ni Sepharose 6 FF, при комнатной температуре в течение 1 ч при перемешивании. После инкубации с библиотекой смесь центрифугировали, супернатант удаляли, а оставшийся сорбент промывали буфером В. Для элюции связавшихся 2'-F-РНК к сорбенту добавляли 20 мкл раствора 20 мМ Трис-НСl (рН 7.0), содержащего 100 мМ имидазола, и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин при перемешивании, затем центрифугировали в течение 5 мин при 500×g, супернатант переносили в отдельную пробирку. Последующие ОТ-ПЦР и транскрипцию *in vitro* проводили как описано в разделе 2.2.6.1. Для увеличения давления селекции последовательно уменьшали время инкубации и количество белка-мишени, а также увеличивали количество промывок (см. таблицу в Приложении 3).

2.2.8.4. Анализ обогащения библиотек в ходе селекции аптамеров

Для определения степени обогащения библиотек в ходе селекции был использован метод термической денатурации дцДНК-библиотек [166]. Для проведения эксперимента готовили 3×20 мкл реакционной смеси, содержащей 0.5 мкМ дцДНК-библиотеки, 1x SYBR Green I, 10 мМ какодилат натрия (рН 7.4), 100 мМ NaCl. Полученную смесь использовали для плавления на амплификаторе Rotor-Gene Q (Qiagen) по следующему протоколу: гибридизация от 95 °С до

35 °C с шагом 0.5 °C/мин, инкубация при 35 °C в течение 1 часа, денатурация 35 °C до 95 °C с шагом 0.5 °C/мин, регистрация сигнала. Кривые плавления ДНК-библиотек, полученные в результате трех независимых экспериментов, усредняли и вычитали значения интенсивности флуоресценции контрольного раствора, не содержащего ДНК. Полученные кривые плавления представляли в виде зависимости интенсивности флуоресценции (I) или её производной (dI/dT) от температуры.

2.2.8.5. Высокопроизводительное секвенирование на платформе MiSeq (Illumina) и анализ полученных данных

Обогащенные дцДНК-библиотеки после селекции (1 мкг) амплифицировали с использованием пары праймеров, содержащих адаптеры и баркоды для высокопроизводительного секвенирования на платформе MiSeq (Illumina). Секвенирование полученных библиотек с использованием 2x300 bp paired-ends sequencing kit (Illumina) и анализ первичных данных были проведены в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН.

2.2.9. Введение радиоактивной метки на 5'-конец 2'-F-пиримидин-модифицированных РНК-библиотек и индивидуальных аптамеров

Для радиоактивного мечения РНК-библиотек предварительно проводили дефосфорилирование РНК-транскриптов с помощью термочувствительной щелочной фосфатазы FastAP согласно протоколу производителя.

Для введения [³²P]-метки на 5'-конец РНК реакционную смесь объемом 70 мкл, содержащую 100 пмоль РНК, 1 МБк γ -[³²P]-АТР и 1 е. а. полинуклеотидкиназы фага Т4 в буфере для Т4 ПНК, инкубировали при 37 °C в течение 1 ч. Затем добавляли в смесь еще 1 е. а. фермента и инкубировали при 37 °C в течение 1 ч, реакционную смесь прогревали при 70 °C в течение 10 мин. [³²P]-Меченые 2'-F-РНК очищали гель-фильтрацией с использованием центрифужных колонок Micro BioSpin P-30 (Bio-Rad, США).

2.2.10. Синтез конъюгатов 2'-F-РНК-аптамеров

2.2.10.1. Синтез биотинилированных производных индивидуальных аптамеров

Для синтеза биотинилированных производных 2'-F-РНК-аптамеров раствор 3'-аминогексил-модифицированного аптамера (50 мкл) в 0.1 М Na₂B₄O₇ инкубировали в присутствии 100-кратного молярного избытка свежеприготовленного раствора N-гидроксисукцинимидного эфира биотина в ДМФА (50 мкл) при 25 °C в течение 3 ч. Полученные производные осаждали 2 %-ным раствором NaClO₄ в ацетоне, осадок дважды промывали ацетоном (1 мл), сушили на воздухе в течение 10 мин и растворяли в воде. Избыток активированного эфира биотина удаляли с помощью центрифужных модулей Amicon Ultra-0.5 mL 3K (Millipore).

2.2.10.2. Синтез флуоресцентно меченых индивидуальных аптамеров

Для синтеза флуоресцентно меченых 2'-F-РНК-аптамеров раствор 3'-аминогексил-модифицированного аптамера (50 мкл) в 0.1 М Na₂B₄O₇ инкубировали в присутствии 200-кратного молярного избытка FITC в ДМФА (50 мкл) при 25 °С и перемешивании в течение 16 ч. Конъюгаты аптамеров с флуоресцеином осаждали этанолом, осадок промывали 75 %-ным этанолом (1 мл), сушили на воздухе в течение 15 мин и растворяли в воде.

2.2.11. Исследование вторичной структуры квадруплекс-формирующих 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих суммарный гемоглобин

2.2.11.1. КД-спектроскопия

Для записи спектров кругового дихроизма использовали 12 мкМ растворы аптамеров H5t11, H9t11 и gH8t, а также контрольных олигонуклеотидов H5t11m, H9t11m и gH8tm в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7.3). Перед записью спектров анализируемые растворы инкубировали при 90 °С в течение 5 мин, а затем охлаждали при 25 °С в течение 10 мин. Для записи КД-спектров использовали спектрополяриметр Jasco J600 (Easton, США), оснащенный температурным контроллером, и кварцевую кювету объемом 200 мкл с длиной оптического пути 1 мм. Каждый спектр представлял собой усредненный результат 10 сканирований. Для записи базовой линии использовали натрий-фосфатный буфер (рН 7.3), не содержащий 2'-F-РНК. Значение базовой линии вычитали из всех полученных спектров.

2.2.11.2. Частичный гидролиз 2'-F-РНК-аптамеров с помощью РНКазы T1 в неденатурирующих условиях

Перед каждым экспериментом растворы 2'-F-РНК-аптамеров инкубировали при 90 °С в течение 5 мин с последующим охлаждением при 25 °С в течение 15 мин для формирования корректных пространственных структур аптамеров. Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 50 пмоль флуоресцентно меченой РНК в ТЕ-буфере, суммарную РНК из *E. coli* (1 мг/мл), KCl (0-100 мМ) и 1 е. а. РНКазы T1, инкубировали при 25 °С в течение 30 мин. После инкубации в реакционную смесь добавляли 7 мкл 1 %-ного раствора ВР в 8 М мочеvine и сразу же наносили на ПААГ. Состав реакционных смесей после гидролиза анализировали электрофорезом в денатурирующем 15 %-ном ПААГ. Флуоресцентно меченые продукты расщепления РНК визуализировали с использованием сканера Typhoon FLA 9500 Biomolecular Imager (GE Healthcare).

2.2.11.3. Частичный гидролиз 2'-F-РНК-аптамеров с помощью РНКазы T1 в денатурирующих условиях

Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 50 пмоль флуоресцентно меченой РНК, суммарную тРНК из *E. coli* (1 мг/мл) в денатурирующем буфере (25 мМ цитрат натрия, рН 6.0,

1 мМ ЭДТА, 7 М мочевины) и 1 е. а. РНКазы T1, инкубировали в течение 10 мин при 55 °С. После инкубации в реакционную смесь добавляли 7 мкл 1 %-ного раствора ВР в 8 М мочевины и сразу же наносили на ПААГ. Состав реакционных смесей после гидролиза анализировали электрофорезом в денатурирующем 15 %-ном ПААГ. Флуоресцентно меченые продукты гидролиза визуализировали с использованием сканера Typhoon FLA 9500 Biomolecular Imager.

2.2.11.4. Частичный щелочной гидролиз 2'-F-РНК-аптамеров

Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 50 пмоль флуоресцентно меченой РНК в карбонатном буфере (рН 9.5) и суммарную тРНК из *E. coli* (1 мг/мл), инкубировали при 90 °С в течение 15 мин. После инкубации в реакционную смесь добавляли 7 мкл 1 %-ного раствора ВР в 8 М мочевины и сразу же наносили на ПААГ. Состав реакционных смесей после гидролиза анализировали электрофорезом в денатурирующем 15 %-ном ПААГ. Флуоресцентно меченые продукты гидролиза визуализировали с использованием сканера Typhoon FLA 9500 Biomolecular Imager.

2.2.11.5. Флуоресцентная спектроскопия

Для записи спектров флуоресценции использовали 96-луночные черные планшеты с плоским дном (Corning, США). Перед записью спектров флуоресценции растворы 2'-F-РНК в 20 мМ Трис-НСl буфере (рН 7.5), содержащем 40 мМ КСl, инкубировали при 90 °С в течение 5 мин, а затем охлаждали при 25 °С в течение 10 мин. К раствору тиофлавина Т (4 мкМ) добавляли равный объем раствора РНК (0-4 мкМ), перемешивали и инкубировали в темноте в течение 2 ч при 25 °С. Спектр испускания флуоресценции записывали в диапазоне длин волн от 470 до 600 нм при возбуждении на 440 нм с помощью мультимодального микропланшетного спектрофотометра CLARIOstar (BMG Labtech).

2.2.12. Биоломинесцентный гетерофазный анализ связывания аптамеров с белками

Биоломинесцентный анализ был проведен в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН – обособленного подразделения ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН» к. б. н. В.В. Красицкой и к. б. н. Е.Е. Башмаковой.

Перед каждым экспериментом растворы аптамеров инкубировали при 90 °С в течение 5 мин в буфере Е, а затем охлаждали при 25 °С в течение 15 мин. После этого в раствор добавляли Твин-20, БСА и полиА до концентраций 0.05 %, 0.01 % и 0.1 мг/мл соответственно.

В лунки непрозрачного планшета вносили 50 мкл раствора стрептавидина в буфере А (10 мкг/мл), инкубировали при 4 °С в течение ночи, а затем промывали буфером D. После этого в лунки вносили 50-75 мкл раствора биотинилированного аптамера (100 нМ) в буфере для связывания и инкубировали при 25 °С в течение 1 ч при встряхивании. После промывки лунок

вносили 50 мкл раствора белка-мишени в буфере для связывания и инкубировали при 25 °С в течение 40 мин.

При анализе связывания аптамеров с гемоглобином после инкубации с белком-мишенью в лунки вносили 50 мкл раствора конъюгата обелина с гемоглобин-специфичными антителами в буфере E (100 нМ) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем снова промывали буфером D. В контрольные лунки вместо раствора белка вносили буфер для связывания.

При анализе связывания аптамеров с обелином после инкубации с белком-мишенью лунки промывали буфером D. В качестве контрольных использовали лунки, не содержащие иммобилизованного аптамера.

В экспериментах с бифункциональными аптамерами иммобилизованный в лунках планшета аптамер инкубировали с раствором, содержащим 100 нМ обелина и гемоглобин в различных концентрациях, затем промывали буфером D. В контрольные лунки вносили раствор 100 нМ обелина в буфере для связывания.

Во всех случаях на финальной стадии анализа после промывки лунок добавляли 0.1 М раствор CaCl_2 в 0.1 М Трис-НСl буфере (рН 8.8) для инициации билюминесценции обелина. Интенсивность билюминесцентного сигнала регистрировали с помощью люминометра LB 940 Multimode Reader Mithras (Berthold, Германия). Сигнал интегрировали в течение 5 с. Значения билюминесценции контрольных лунок вычитали из значений, полученных для растворов белка-аналита. Все эксперименты проводили в двух повторах.

2.2.13. Колориметрический анализ аффинности 2'-F-РНК-аптамеров к гемоглобину

Перед каждым экспериментом растворы 2'-F-РНК-аптамеров в буфере D инкубировали при 90 °С в течение 5 мин, а затем охлаждали при 25 °С в течение 10 мин.

Анализ связывания аптамеров с гемоглобином проводили в 96-луночных планшетах с высокой сорбционной емкостью (Greiner, Австрия). В лунки планшета вносили 100 мкл раствора гемоглобина в буфере А (10 мкг/мл), инкубировали при 4 °С в течение 16 ч, а затем промывали трижды 200 мкл буфера D. После инкубации удаляли растворы белка, лунки промывали и блокировали 150 мкл 1 %-ного раствора БСА в буфере А при 25 °С в течение 2 ч и встряхивании. После удаления блокирующего раствора и промывки в лунки микропланшета вносили 100 мкл раствора биотинилированного аптамера (200 нМ) и инкубировали при 25 °С в течение 1 ч при встряхивании. Раствор удаляли, лунки промывали, добавляли 100 мкл конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена в буфере А (0.2 мкг/мл) в каждую лунку и инкубировали при 25 °С в течение 40 мин при встряхивании, затем раствор конъюгата удаляли, лунки промывали. Для регистрации колориметрического сигнала в лунки планшета вносили раствор хромогенного субстрата ABTS (0.5 мг/мл), содержащий 0.03 % перекиси водорода, и инкубировали при 25 °С в

течение 20 мин при встряхивании. Колориметрический сигнал регистрировали с помощью микропланшетного спектрофотометра CLARIOstar на длине волны 405 нм.

2.2.14. Анализ аффинности радиоактивно меченых 2'-F-РНК-библиотек и индивидуальных аптамеров к обелину

Перед каждым экспериментом радиоактивно меченые РНК (≥ 5 пмоль) инкубировали при 90 °С в течение 5 мин в 100 мкл буфера С или буфера D, а затем охлаждали при 25 °С в течение 10 мин. После этого в раствор добавляли Твин-20, БСА и полиА до концентраций 0.05 %, 0.01 % и 0.1 мг/мл соответственно. Для инициации связывания к 5мкл раствора РНК добавляли 5 мкл раствора белка (His₆-Obe, wt-Obe или His₆-GFP) в буфере С или буфере D и инкубировали реакционные смеси при 25 °С в течение 40 мин.

При определении сродства РНК-библиотек к белку в присутствии блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов добавляли избыток блокирующего олигонуклеотида (50 пмоль), после чего смесь инкубировали при 90 °С в течение 5 мин, а затем охлаждали при 25 °С в течение 10 мин. После этого в раствор добавляли Твин-20, БСА и полиА до концентраций 0.05 %, 0.01 % и 0.1 мг/мл соответственно, и проводили связывание с белком-мишенью, как описано выше.

2.2.14.1. Анализ образования комплексов аптамеров с обелином методом задержки в геле

Аликвоту реакционной смеси (7.5 мкл) смешивали с 1.5 мкл буфера для нанесения (0.05 % ХС FF и ВР в 50 %-ном водном глицерине) и наносили под напряжением на неденатурирующий 6 %-ный ПААГ (48:1 акриламид:бис-акриламид, 0.5× ТБЕ). После разделения гель сушили и экспонировали с экраном Bio-Rad Phosphorimager в течение ночи. Для получения сканированного изображения использовали сканер Molecular Imager FX, обработку изображения проводили с помощью пакета программ Quantity One 4.5.1 (Bio-Rad).

2.2.14.2. Анализ формирования комплексов аптамеров с обелином методом DRaCALA

Анализ образования комплексов методом радиальной капиллярной диффузии (Differential Radial Capillary Action of Ligand Assay, DRaCALA) проводили по аналогии с [167]. Аликвоту реакционной смеси (5 мкл) наносили на нитроцеллюлозный фильтр (Millipore) и сушили на воздухе не менее 20 мин. Полученные фильтры экспонировали с экраном Bio-Rad Phosphorimager в течение ночи. Для получения сканированного изображения использовали сканер Molecular Imager FX, обработку изображения проводили с помощью пакета программ Quantity One 4.5.1. Количество связавшихся 2'-F-модифицированных РНК определяли из интенсивностей (I_{inner} , I_{total}) и площадей (A_{inner} , A_{total}) внутреннего и внешнего кругов:

$$F_B = \frac{I_{inner} - A_{inner} \times \left(\frac{I_{total} - I_{inner}}{A_{total} - A_{inner}} \right)}{I_{total}}$$

Значения констант диссоциации комплексов рассчитывали путем аппроксимации экспериментальных данных с использованием стандартного уравнения бимолекулярного связывания лиганд-рецептор в пакете программ GraphPad Prism 5.0.

2.2.15. Колориметрическая микропланшетная детекция гемоглобина в формате сэндвич-системы

Перед каждым экспериментом растворы 2'-F-РНК-аптамеров в буфере D инкубировали при 90 °С в течение 5 мин, а затем охлаждали при 25 °С в течение 10 мин.

Для ковалентной иммобилизации аптамера в лунки микропланшета, модифицированного N-оксисукцинимидом (Corning), вносили 100 мкл раствора 3'-амино-модифицированного 2'-F-РНК-аптамера (1 мкМ) в карбонатном буфере (рН 9.5), инкубировали при 25 °С в течение 1 ч при встряхивании, а затем промывали лунки трижды 200 мкл буфера D.

Гемоглобин-специфичные антитела иммобилизовали в лунках планшета нековалентно. Для этого в лунки микропланшета с высокой сорбционной емкостью (Greiner) вносили 100 мкл раствора гемоглобин-специфичных антител (10 мкг/мл) в буфере А, инкубировали при 4 °С в течение 16 ч, а затем промывали лунки трижды 200 мкл буфера D.

После иммобилизации первого компонента (аптамера или антитела) в лунки вносили 150 мкл 1 %-ного раствора БСА в буфере D, инкубировали при 25 °С в течение 2 ч и промывали. Затем в лунки вносили 100 мкл раствора белка-аналита (0.063–1 мкМ), инкубировали при 25 °С в течение 1 ч при встряхивании и промывали. После этого в лунки планшета вносили 100 мкл раствора биотинилированного аптамера (200 нМ), инкубировали при 25 °С в течение 1 ч при встряхивании, промывали. Затем добавляли 100 мкл конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена в буфере А (0.2 мкг/мл) в каждую лунку и инкубировали при 25 °С в течение 40 мин при встряхивании, после чего раствор конъюгата удаляли, лунки промывали. Для регистрации колориметрического сигнала в лунки планшета вносили раствор хромогенного субстрата ABTS (0.5 мг/мл), содержащий 0.03 % перекиси водорода, и инкубировали при 25 °С в течение 20 мин при встряхивании. Колориметрический сигнал регистрировали с помощью микропланшетного спектрофотометра CLARIOstar на длине волны 405 нм.

ГЛАВА 3. СОЗДАНИЕ НОВЫХ 2'-F-МОДИФИЦИРОВАННЫХ РНК-АПТАМЕРОВ И АНАЛИТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ НА ИХ ОСНОВЕ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА (РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ)

Уникальные свойства НК-аптамеров позволяют рассматривать их в качестве универсальных «строительных блоков» для создания мультикомпонентных конструкций, функции которых можно легко изменять в соответствии с конкретной исследовательской задачей. Другими словами, объединяя в одну молекулу несколько аптамеров с разной специфичностью, можно получить практически неограниченный набор функциональных возможностей [4]. В частности, мультикомпонентные биоаналитические конструкции могут включать в свой состав два аптамерных модуля: один для связывания аналита в исследуемом образце, а второй для рекрутирования репортерной молекулы, генерирующей аналитический сигнал [168–170]. Аптамеры, нековалентно связывающие репортерные соединения, могут быть использованы для создания универсальных биоаналитических систем для детекции целого спектра мишеней. В этом случае настройка системы под конкретную задачу будет заключаться в подборе второго аптамерного компонента, обеспечивающего селективное связывание аналита. В рамках данной работы представляло интерес создание биосенсора для детекции биомаркеров на основе двух аптамеров, один из которых был способен селективно связывать фотопротейн обелин как перспективный репортер для генерации билюминесцентного сигнала. Следует отметить, что несмотря на высокую чувствительность детекции и соотношение сигнал-шум, билюминесцентные белки пока не получили широкого применения в качестве репортеров в составе систем детекции на основе аптамеров. Одним из примеров может случить аптасенсор для определения гамма-интерферона на основе ДНК-аптамера, ковалентно соединенного с люциферазой и ее ингибитором [171]. Ранее в рамках совместной работы лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН и лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН был создан билюминесцентный аптасенсор для детекции антител, характерных для больных рассеянным склерозом, отличающийся высокой чувствительностью и селективностью [164,172]. В этом случае 2'-F-РНК-аптамер ковалентно присоединялся к молекуле обелина. Подобное ковалентное присоединение аптамера к молекуле репортерного белка может сузить возможности термической денатурации и фолдинга молекулы аптамера в связи с вероятностью инактивации белковой компоненты. В данной работе мы предлагаем принципиально отличающийся способ конструирования аптасенсоров с билюминесцентным типом детекции - нековалентное связывание обелина. К преимуществам такого подхода можно отнести отсутствие стадии ковалентного присоединения аптамера к фотопротейну или создания химерного белка для использования в качестве репортерной группы. Более того, до внесения обелина аналитическая

система представляет собой раствор нуклеиновой кислоты и, соответственно, может подвергаться многократной термической денатурации/ренатурации без риска инактивации белковой молекулы. В настоящее время известно несколько примеров использования аптамеров, связывающих флуоресцентные соединения, для визуализации РНК [173]. При этом единственным аптамером, обладающим повышенным сродством к репортерному флуоресцентному белку, является РНК-аптамер на зеленый флуоресцентный белок [174]. Данная работа посвящена получению новых 2'-F-РНК-аптамеров, узнающих фотопротеин обелин и гемоглобин человека, и демонстрации возможности их использования в составе моно- и бифункциональных биоаналитических конструкций.

3.1. Получение комбинаторной 2'-F-РНК-библиотеки для селекции *in vitro*

3.1.1. Оптимизация условий химического синтеза исходной ДНК-библиотеки

Исходную 2'-F-модифицированную РНК-библиотеку для отбора аптамеров в большинстве случаев получают в несколько стадий. На первом этапе химически синтезированную одноцепочечную ДНК-библиотеку переводят в двуцепочечную форму с помощью реакции с фрагментом Кленова ДНК-полимеразы или ПЦР. Затем полученную двуцепочечную ДНК-библиотеку используют в качестве матрицы для *in vitro* транскрипции РНК-библиотеки с использованием соответствующих трифосфатов. В рамках данной работы для селекции аптамеров была выбрана 87-звенная ДНК-библиотека 5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTCTCGAA-N₄₀-TTGAGCGTTTATTCTTGTCTCCC-3', содержащая 40-нуклеотидную рандомизированную область, фланкированную двумя константными праймер-связывающими участками для проведения комплекса ферментативных реакций, обеспечивающих амплификацию на каждом цикле селекции (обратная транскрипция, ПЦР, транскрипция *in vitro*). Нуклеотидные последовательности константных праймер-связывающих фрагментов библиотеки были выбраны по рекомендациям Fitzwater с соавт. [35] таким образом, чтобы минимизировать образование праймер-димеров в ходе ПЦР-амплификации и исключить комплементарные взаимодействия между праймер-связывающими участками. При химическом синтезе рандомизированной области одноцепочечной ДНК-библиотеки на стадии конденсации использовали смесь четырех стандартных полностью защищенных фосфитами дезоксирибонуклеотидов. Важно отметить, что все четыре мономера синтона обладают различной реакционной способностью в реакции конденсации, поэтому смешивание их в равных молярных долях при синтезе ДНК-библиотек неизбежно приводит к неравномерному нуклеотидному составу [26]. В литературе приводятся различные варианты молярных соотношений мономеров для синтеза равномерно представленных ДНК-библиотек, однако они не являются универсальными и не могут быть использованы с одинаковой эффективностью на автоматических синтезаторах разных

производителей. Учитывая литературные данные о реакционной способности коммерчески доступных фосфитаминов, а также накопленный в нашей лаборатории экспериментальный опыт по синтезу олигонуклеотидов, для тестирования нами были выбраны два варианта соотношений нуклеотидных мономеров: 1) A:C:G:T=1.1:1:1.3:1 (библиотека DL87-1); 2) A:C:G:T=1.2:1:1.2:1 (библиотека DL87-2).

3.1.2. Определение равномерности нуклеотидного состава ДНК-библиотеки

Для определения нуклеотидного состава синтезированных ДНК-библиотек использовали метод исчерпывающего ферментативного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда с последующим анализом продуктов методом ОФ ВЭЖХ (рис. 15). Идентификацию пиков, соответствующих отдельным нуклеозидам, проводили, используя значения времени удерживания и спектральные соотношения, полученные для нуклеозидов-маркеров [175].

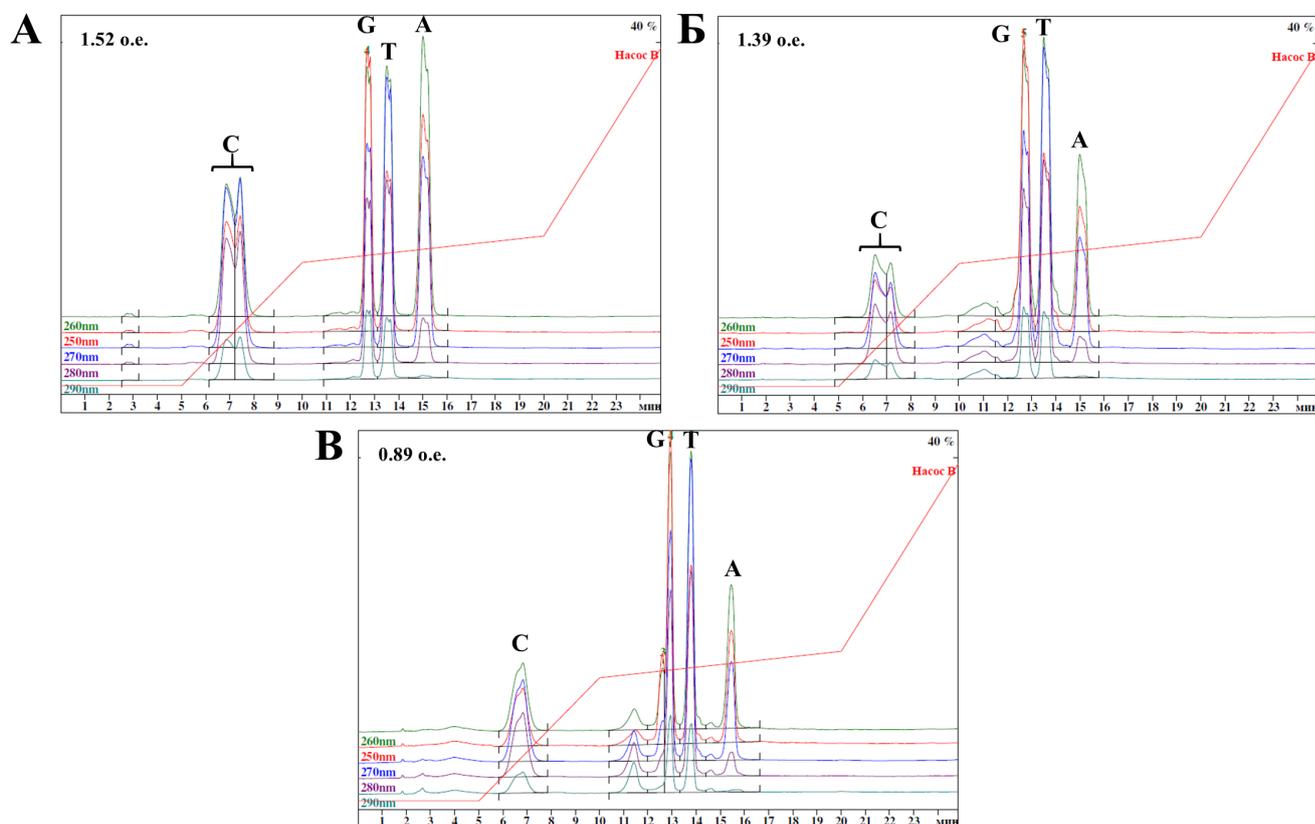


Рисунок 15. А. Хроматограмма анализа контрольной смеси четырех нуклеозидов-маркеров. Б. Хроматограмма анализа продуктов исчерпывающего ферментативного гидролиза ДНК-библиотеки DL87-1. В. Хроматограмма анализа продуктов исчерпывающего ферментативного гидролиза ДНК-библиотеки DL87-2. Подвижная фаза: 0.02M ТЕААс рН 7.0 (водн.)/ 0.02M ТЕААс рН 7.0 (50% CH₃CN), колонка: ProntoSil-120-5-C18 AQ.

Анализ полученных хроматограмм с помощью программного пакета «МультиХром» позволил определить площади пиков, соответствующих каждому из четырех нуклеозидов, и рассчитать их доли в составе ДНК-библиотеки (табл. 3).

Долю каждого нуклеозида $\omega(N)$ в составе рандомизированной области ДНК-библиотеки рассчитывали по формуле $\omega(N) = \frac{87 \times \omega_0(N) - n}{40}$, где ω_0 – это общая доля нуклеозида N в составе библиотеки (рассчитанная из данных хроматографии), а n – количество нуклеозида N в константных участках библиотеки. Полученные данные о представленности каждого нуклеозида в составе исходной ДНК-библиотеки приведены в табл. 3.

Таблица 3. Спектральные соотношения и представленности каждого из четырех нуклеозидов в составе синтезированных ДНК-библиотек.

	A ₂₅₀ /A ₂₆₀	A ₂₈₀ /A ₂₆₀	A ₂₅₀ /A ₂₆₀	A ₂₈₀ /A ₂₆₀	нуклеозид	S/ε*	ω ₀	n	ω(N)
Смесь нуклеозидов-маркеров	0.84	0.93	0.83	0.97	C	-	-	-	-
	0.84	0.94							
	1.14	0.65	1.16	0.68	G	-	-	-	-
	0.65	0.72	0.65	0.70	T	-	-	-	-
	0.78	0.17	0.79	0.15	A	-	-	-	-
DL87-1	0.86	0.93	0.83	0.97	C	1.9	0.26	13	0.23
	0.86	0.93							
	1.14	0.65	1.16	0.68	G	3.0	0.26	10	0.32
	0.65	0.72	0.65	0.70	T	3.4	0.34	18	0.28
	0.77	0.17	0.79	0.15	A	2.2	0.14	5	0.17
DL87-2	0.86	0.94	0.83	0.97	C	1.7	0.27	13	0.26
	1.14	0.66	1.16	0.68	G	1.5	0.24	10	0.27
	0.65	0.73	0.65	0.70	T	2.0	0.33	18	0.27
	0.78	0.22	0.79	0.15	A	0.9	0.15	5	0.20

*S – площадь пика, ε – коэффициент молярной экстинкции.

Согласно приведенным данным хроматографического анализа, библиотека DL87-1 демонстрирует выраженное преобладание G>A (примерно в два раза). Библиотека DL87-2 обладает более равномерным составом рандомизированной области, в которой доля каждого из четырех нуклеозидов приближается к желаемому значению 0.25. При этом суммарные доли пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов в библиотеке DL87-2 примерно равны, что позволяет рассчитывать на достаточное разнообразие структур в соответствующей РНК-библиотеке для продуктивного отбора аптамеров.

3.1.3. Секвенирование рандомизированной ДНК-библиотеки

С целью более детального анализа полученной библиотеки DL87-2 было проведено ее секвенирование на высокопроизводительной платформе MiSeq (Illumina). Для этого химически синтезированную одноцепочечную ДНК-библиотеку переводили в двуцепочечную форму с использованием праймера PF1 и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. Затем в состав полученной двуцепочечной ДНК-библиотеки вводили последовательности-адаптеры для

секвенирования, используя ПЦР со специфическими праймерами. Библиотеку секвенировали на платформе MiSeq с использованием 2x300 bp paired-ends sequencing kit (Illumina) в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия). Анализ данных секвенирования смысловой цепи ДНК-библиотеки показал, что в составе рандомизированной области доли нуклеозидов равны 0.23 для А, 0.33 для С, 0.21 для G и 0.23 для Т (табл. 4). Важно отметить, что при этом соотношение нуклеотидов в каждом конкретном положении рандомизированной области практически не изменяется (рис. 16).

Таблица 4. Нуклеотидный состав рандомизированных участков синтезированных ДНК-библиотек DL87-1 и DL87-2 для антисенс (-) и сенс (+)-цепей.

библиотека	соотношение мономеров при синтезе А:С:G:Т	цепь	ω (A)	ω (C)	ω (G)	ω (T)	метод определения
DL87-1	1.1:1:1.3:1	-	0.17	0.23	0.32	0.28	хроматография
DL87-2	1.2:1:1.2:1	-	0.20	0.26	0.27	0.27	хроматография
		+	0.23	0.33	0.21	0.23	секвенирование

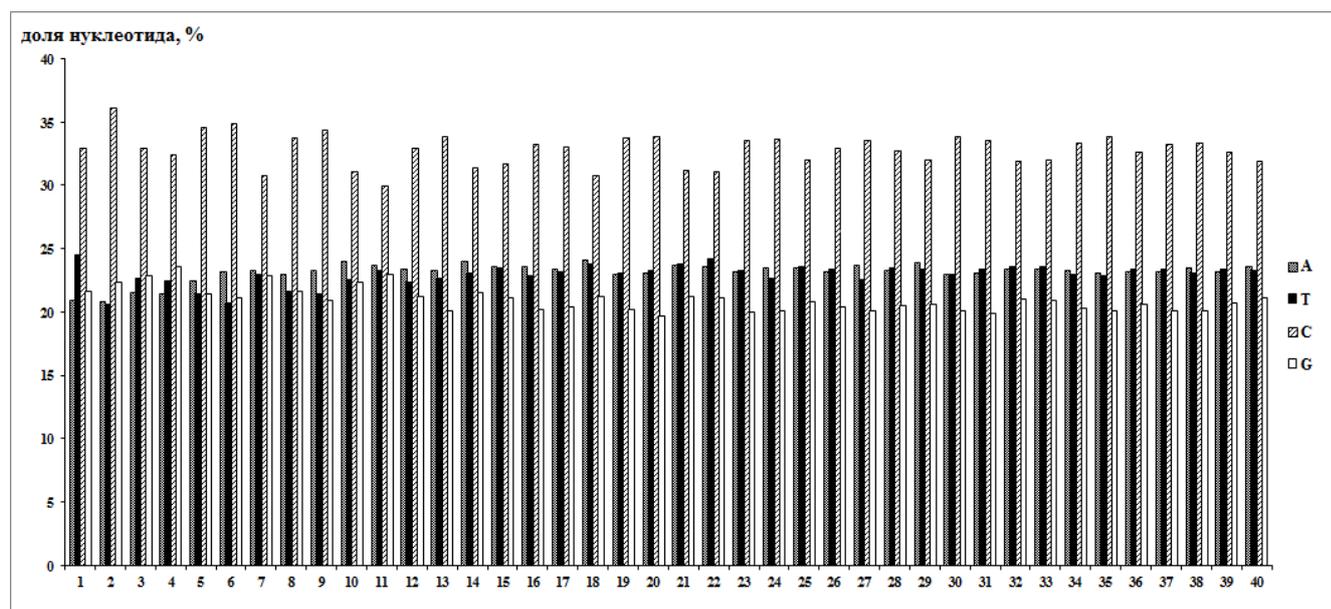


Рисунок 16. Распределение нуклеотидов по позициям 1-40 в рандомизированной области (+)-цепи ДНК-библиотеки DL87-2, полученное по данным высокопроизводительного секвенирования на платформе MiSeq (Illumina).

Таким образом, полученные после секвенирования результаты несколько отличаются от результатов хроматографического анализа продуктов исчерпывающего гидролиза исходной ДНК-библиотеки. Согласно литературным данным, синтез комплементарной цепи ДНК с помощью фрагмента Кленова не вносит значительных изменений в нуклеотидный состав двуцепочечной ДНК-библиотеки [35]. Мы предполагаем, что наблюдаемое отклонение может

быть связано с неравномерностью амплификации отличающихся по GC-составу последовательностей («PCR bias») [176] при использовании полимеразной цепной реакции на стадии пробоподготовки ДНК-библиотеки перед проведением секвенирования. Это подтверждается некоторыми литературными данными: так, например, в ходе отбора РНК-аптамеров независимо от типа мишени в результате неравномерной амплификации происходит сдвиг нуклеозидного состава в сторону обогащения пиримидинами [24,29]. Несмотря на ограниченное использование ПЦР (4 цикла) результаты высокопроизводительного секвенирования также демонстрируют увеличение долей цитидина и тимидина на 6 и 3% соответственно, что подтверждает наши предположения. Таким образом, результаты высокопроизводительного секвенирования в нашем случае могут не вполне адекватно отражать нуклеотидный состав исходной рандомизированной ДНК-библиотеки. Отметим, что описанный нами сдвиг в распределении нуклеотидов по данным секвенирования представляет собой определенную проблему именно в случае анализа нуклеотидного состава исходных библиотек, но не препятствует успешному использованию высокопроизводительного секвенирования для установления состава обогащенных библиотек после селекции. После многократных ПЦР в ходе селекции библиотека неизбежно накапливает в том числе и эффективно амплифицируемые последовательности, поэтому несколько дополнительных циклов ПЦР на стадии секвенирования уже не будут значимо влиять на конечный результат.

Совокупность результатов исчерпывающего ферментативного гидролиза и секвенирования говорит о том, что одноцепочечная комбинаторная ДНК-библиотека DL87-2 характеризуется достаточно равномерным соотношением нуклеотидов в каждой позиции рандомизированной области. Поэтому данная библиотека была выбрана для дальнейшего использования.

3.1.4. Получение исходной 2'-F-РНК-библиотеки для отбора аптамеров

Исходную 2'-F-модифицированную РНК-библиотеку для отбора аптамеров получали из ДНК-библиотеки DL87-2 в две стадии: 1) ферментативный синтез комплементарной цепи ДНК, 2) транскрипция *in vitro* РНК-библиотеки по матрице дцДНК-библиотеки (рис. 17).



Рисунок 17. Схема получения исходной 2'-F-модифицированной РНК-библиотеки для селекции аптамеров *in vitro*. Прямоугольником выделена последовательность промотора Т7 РНК-полимеразы.

При получении дцДНК-матрицы для проведения транскрипции *in vitro* использовали реакцию удлинения праймера PF1, комплементарного 5'-константному участку, с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I из *E. coli*. Нуклеотидная последовательность праймера PF1 включает в себя последовательность промотора Т7 РНК-полимеразы, необходимую для проведения транскрипции. Полученную дцДНК-библиотеку после очистки использовали в качестве матрицы для транскрипции с помощью немодифицированной Т7 РНК-полимеразы в реакционном буфере, оптимизированном согласно [35] для повышения эффективности включения 2'-фтор-модифицированных нуклеотидтрифосфатов. Кроме того, для увеличения эффективности транскрипции концентрации 2'-F-модифицированных нуклеотидтрифосфатов увеличивали в 3 раза по сравнению с немодифицированными АТФ и ГТФ. Полученную РНК-библиотеку анализировали методом электрофореза в денатурирующем ПААГ, очищали от избытков нуклеотидтрифосфатов и компонентов реакционного буфера методом гель-фильтрации и использовали для отбора аптамеров.

3.2. Получение 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих суммарный (Hb) и гликированный (HbA1c) гемоглобина человека

3.2.1. *In vitro* селекция 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих различные варианты гемоглобина человека

Полученная на предыдущем этапе работы 2'-F-РНК-библиотека (см. раздел 3.1.4) была использована для отбора с помощью технологии SELEX аптамеров, способных селективно связывать разные варианты гемоглобина человека. Одной из принципиально важных стадий в

ходе селекции *in vitro* является отделение комплексов аптамеров с белковой мишенью от несвязавшихся молекул нуклеиновых кислот. Как правило, для этого используют иммобилизацию белков-мишеней на различных носителях (например, магнитных частицах, микропланшетах, хроматографических сорбентах и др.). Использование магнитных частиц в качестве носителя для иммобилизации белковых мишеней позволяет значительно упростить процесс удаления несвязавшихся нуклеиновых кислот, сведя его к удалению раствора над частицами после магнитной сепарации. Для иммобилизации обоих вариантов гемоглобина был использован метод ковалентного присоединения на магнитные частицы M-280 Dynabeads™ за счет взаимодействия тозилных остатков на их поверхности с аминокетильными группами в составе белковых молекул. Иммобилизация белка-мишени на магнитные частицы позволила отделять несвязавшиеся молекулы РНК в ходе селекции простой промывкой частиц соответствующим буфером.

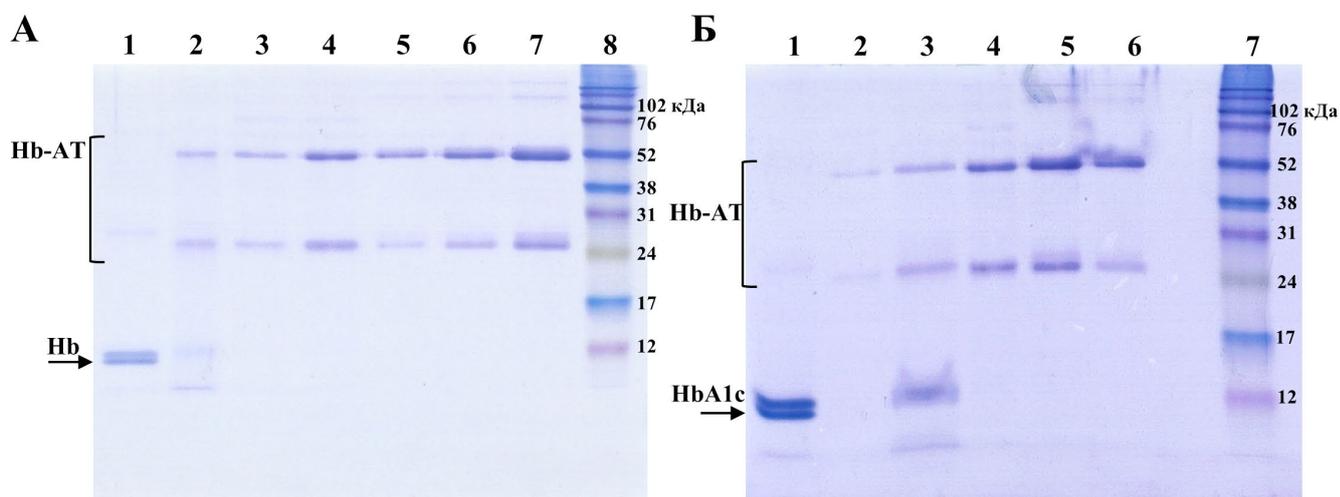


Рисунок 18. Анализ элюатов после инкубации гемоглобин-модифицированных магнитных частиц со специфичными антителами методом электрофореза по Лэммли. **А.** Hb-модифицированные магнитные частицы: дорожка 1 – контроль Hb, 1 мкг; дорожка 2 – элюат с магнитных частиц после инкубации с Hb-AT; дорожка 3 – раствор Hb-AT после инкубации с магнитными частицами; дорожка 4 – контроль Hb-AT, 1 мкг; дорожки 5-7 – контроль IgG человека 0,5, 1 и 2 мкг, соответственно; дорожка 8 – белковый маркер Rainbow (GE healthcare). **Б.** HbA1c-модифицированные магнитные частицы: дорожка 1 – контроль HbA1c, 1 мкг; дорожка 2 – раствор Hb-AT после инкубации с магнитными частицами; дорожка 3 – элюат с магнитных частиц после инкубации с Hb-AT; дорожка 4 – контроль Hb-AT, 1 мкг; дорожки 5 и 6 – контроль IgG человека, 2 и 1 мкг, соответственно; дорожка 7 – белковый маркер Rainbow (GE healthcare).

Для подтверждения иммобилизации суммарного (Hb) или гликированного гемоглобина (HbA1c) полученные магнитные частицы инкубировали с поликлональными гемоглобин-специфичными антителами, связывающими оба варианта белка. После инкубации антитела, связавшиеся с гемоглобином на поверхности частиц, элюировали нагреванием в денатурирующем буфере. Электрофоретический анализ образцов после элюции выявил наличие полос, характерных как для антител, так и для обоих вариантов гемоглобина (рис. 18).

Полученные данные говорят о том, что после ковалентного присоединения на поверхность магнитных частиц оба варианта гемоглобина сохраняют свою нативную конформацию и способны связываться с гемоглобин-специфичными антителами.

В качестве мишени для селекции 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих суммарный гемоглобин человека, мы использовали коммерчески доступный препарат, выделенный из крови здоровых доноров. Согласно описанию фирмы-производителя, данный препарат был выделен из крови как суммарный гемоглобин и состоит преимущественно из негликированного гемоглобина с незначительной долей примеси гликированных форм. Схема селекции представлена на рис. 19. Для отбора аптамеров исходную библиотеку 2'-F-модифицированных РНК, состоящую примерно из 10^{15} молекул (1 нмоль), инкубировали с Нб-содержащими магнитными частицами. Не связавшиеся с частицами молекулы РНК удаляли необходимым количеством промывок, после чего связавшиеся РНК элюировали при нагревании. Выделенные РНК амплифицировали с помощью ОТ-ПЦР, а полученную дцДНК использовали в качестве матрицы для транскрипции 2'-F-модифицированной РНК-библиотеки для следующего раунда отбора. Начиная со 2-го раунда, в протокол отбора аптамеров вводили дополнительную стадию негативной селекции, для чего инкубировали обогащенную библиотеку с магнитными частицами, не несущими белок-мишень. Введение стадии негативной селекции широко используется для удаления неспецифических последовательностей РНК, обладающих сродством к носителю, на котором иммобилизована мишень, т. е. в данном случае к магнитным частицам. Для повышения селективности отбора с 7-го по 10-й раунды использовали негативную селекцию на ЧСА, иммобилизованный на тех же магнитных частицах. Выбор ЧСА в качестве мишени для негативной селекции обусловлен относительно высокой концентрацией этого белка в крови человека, что потенциально может создать затруднения при конструировании системы детекции белковой мишени в реальных образцах крови.

Для получения аптамеров с высокой аффинностью к мишени в ходе отбора повышали давление селекции: последовательно уменьшали количество Нб-содержащих магнитных частиц на стадии позитивной селекции, а также увеличивали количество промывок частиц после инкубации обогащенной РНК-библиотеки с мишенью (табл. в Приложении 1). На заключительных раундах селекции для промывки частиц был использован буферный раствор, содержащий 0.5 М NaCl или 0.5 М мочевины (раунды 9 и 10 соответственно). Согласно [177], использование промывочных буферов с высокой концентрацией солей или денатурирующих агентов позволяет с большей вероятностью исключить из обогащенной библиотеки последовательности с низкой аффинностью к мишени.

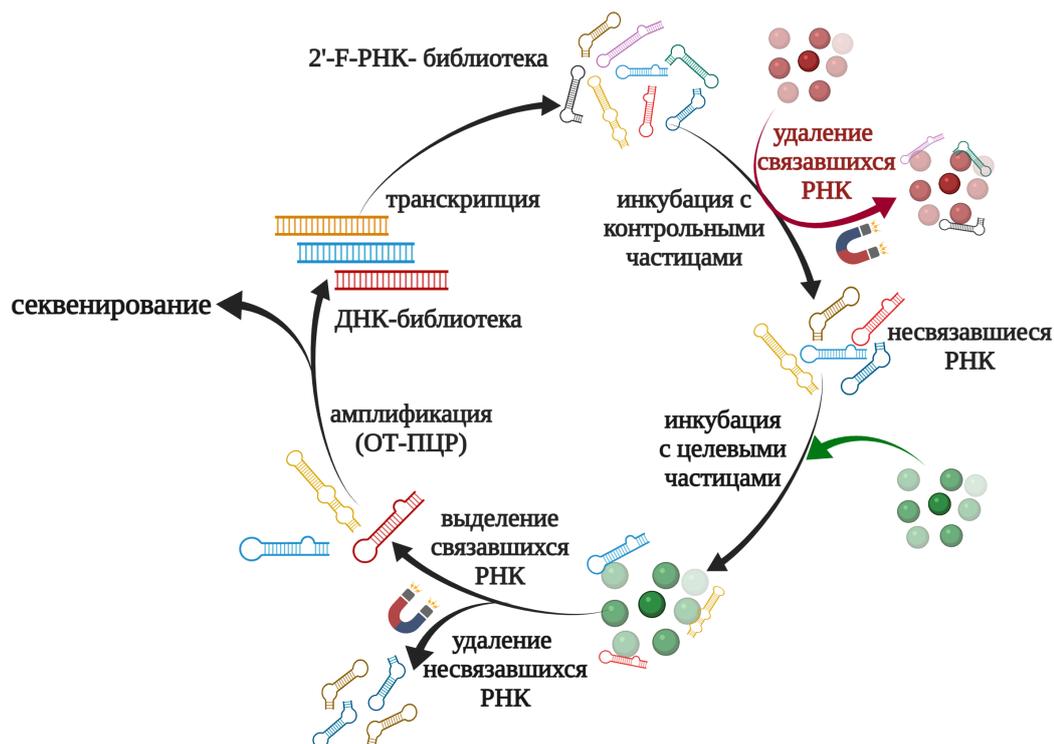


Рисунок 19. Принципиальная схема *in vitro* селекции 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров на Hb и HbA1c. В качестве мишеней для негативной селекции использовали «пустые» или ЧСА-модифицированные магнитные частицы (селекция на Hb), или Hb-модифицированные магнитные частицы (селекция на HbA1c).

По аналогичной схеме был проведен отбор 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих гликированный гемоглобин HbA1c. В качестве мишени для позитивной селекции был использован белок HbA1c, иммобилизованный на магнитных частицах M-280 Dynabeads, а для негативной селекции - магнитные частицы без присоединенного белка. Для получения более селективных аптамеров, способных различать два варианта гемоглобина, начиная с 8-го раунда в качестве мишени на стадии негативной селекции были использованы Hb-содержащие магнитные частицы (табл. в Приложении 2). Для увеличения аффинности обогащенной библиотеки в ходе отбора для промывок использовали буфер, содержащий 0.5 М NaCl.

Для анализа степени обогащения библиотек в ходе селекции на Hb и HbA1c был использован метод термической денатурации дцДНК-библиотек в присутствии SYBR Green I [166]. При ренатурации библиотек в дцДНК-форме образование дуплексов носит статистический характер. При этом с большей вероятностью формируются комплексы, в которых комплементарны только константные участки. Таким комплексам соответствуют относительно низкие температуры плавления. При снижении разнообразия состава библиотеки вероятность формирования комплексов между полностью комплементарными цепями ДНК будет возрастать, таким комплексам будут соответствовать более высокие температуры плавления. Таким образом, метод термической денатурации позволяет качественно сравнивать разнообразие структурного состава библиотек. Для термической денатурации дцДНК-библиотек сначала нагревали

растворы ДНК до температуры, достаточной для полной денатурации дуплексов, а затем постепенно охлаждали для ренатурации всех возможных комплексов, после этого проводили денатурацию с детекцией сигнала. Сравнение профилей плавления исходной и обогащенных ДНК-библиотек в присутствии SYBR Green I выявило последовательное повышение температуры их плавления с увеличением количества раундов отбора, что говорит об уменьшении разнообразия нуклеотидных последовательностей в составе библиотек, и, соответственно, повышении их обогащения конкретными молекулами (рис. 20).

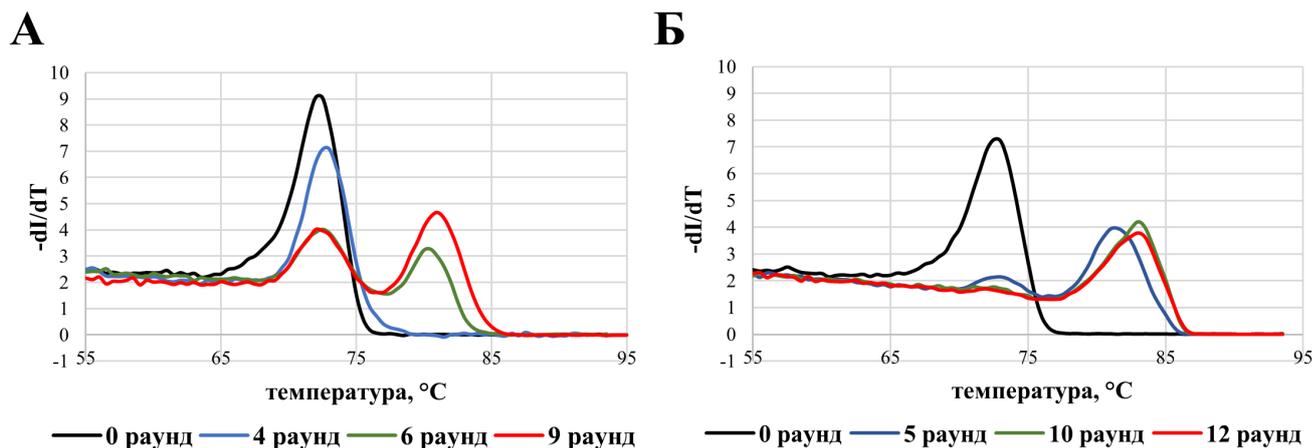


Рисунок 20. Нормализованные дифференциальные кривые плавления исходной и обогащенных дцДНК-библиотек в присутствии SYBR Green I. **А.** Библиотеки после *in vitro* селекции аптамеров на суммарный гемоглобин Hb. **Б.** Библиотеки после *in vitro* селекции аптамеров на гликированный гемоглобин HbA1c. Анализ плавления дцДНК-библиотек был проведен к.х.н., н.с. П. Е. Воробьевым (ЛСБ ИХБФМ СО РАН).

Для получения 2'-F-РНК-аптамеров было проведено 10 раундов отбора на суммарный гемоглобин Hb и 12 раундов – на гликированный гемоглобин HbA1c. Исходные и обогащенные библиотеки после 4-го, 8-го и 10-го раундов селекции на суммарный гемоглобин и 4-го, 7-го, 11-го и 12-го раундов отбора на гликированный гемоглобин переводили в двуцепочечную ДНК-форму и передавали в ЦКП «Геномика» для проведения высокопроизводительного секвенирования на платформе MiSeq. После биоинформатического анализа данных секвенирования ДНК восстанавливали последовательности 2'-F-РНК в составе библиотек. Полученные нуклеотидные последовательности индивидуальных аптамеров были упорядочены в соответствии с их представленностью в конечных обогащенных библиотеках. Для последующего анализа сродства к белковым мишеням были выбраны 2'-F-РНК, представленность которых составила более 1%. После 10 раундов селекции на суммарный гемоглобин 25.5 % всех последовательностей составил аптамер H1, при этом его доля в библиотеке последовательно увеличивалась в ходе селекции (табл. 5). Кроме того, анализ нуклеотидных последовательностей индивидуальных аптамеров выявил наличие нескольких G-богатых участков, потенциально способных формировать G-квадруплексные структуры (G4).

Несмотря на то, что G4 нечасто встречаются в структуре РНК-аптамеров, в литературе описано несколько подобных примеров. Например, аптамеры, связывающие прионовые белки [178,179], рецептор интерлейкина-6 человека [180–182], Tat-белок вируса иммунодефицита человека-1 [183] и флуоресцентный “Spinach” аптамер [184]. Для выявления РНК-аптамеров, способных формировать квадруплексы, был использован анализ наиболее вероятных вторичных структур с помощью алгоритма VIENNA RNAfold (<http://www.tbi.univie.ac.at/RNA>, [185]). В результате в составе аптамеров Н5, Н7, Н1536 и Н9 были обнаружены нуклеотидные последовательности, потенциально способные формировать G-квадруплексы.

Таблица 5. Наиболее часто встречающиеся нуклеотидные последовательности после селекции 2'-F-РНК-аптамеров на суммарный гемоглобин.

аптамер	нуклеотидная последовательность рандомизированного участка, 5'-3'	частота встречаемости, %			G4*
		4 раунд	8 раунд	10 раунд	
H1	UGGCGCCACCUGAAUGCUCAGUACUUAUUUAUGGCGAACCA	9.6	17.1	25.5	-
H2	AGAGAAUUGGGGCUUCCUGCCCAAGUAUACCAUGA	14.2	11.7	8.9	-
H5	CCGAGGGAGGGGGGGAGGAUGGCUGUGCGUUUUACUUCU	0.0	3.4	3.2	+
H870	AGAGAAUUGGGGCUUCCUGCCCAAGUAUACCAUUUUUUGA	5.2	3.3	2.4	-
H3	GGGAGCCUUGGCAGUCGACCUAGACUCAGAUUAUAAAGUU	6.8	4.7	2.2	-
H7	GUGAGACCUCGGUAGUUGCGGGGAAGCGGAGGGAGGGUAG	0.0	3.2	2.1	+
H4	GAGCGGGCACCUAUACCAGUACUUUAUGUUUUUGCCCGCAU	0.2	4.5	1.9	-
H18	UUGUCAGCCCGGUCGACCUAGAAUCCAAAUUUGACAUU	0.0	0.1	1.5	-
H1536	GGGGGGGUCUUGUGAGUUAGGGUUAGGGCCGAGCGUGCUAU	0.0	1.4	1.5	+
H9	UAGUACCUGAUCAGCCUGGCAGUCGCGGGGAGGGGGGAGGAG	0.0	1.2	1.4	+
H17	GGGGUUCUUGGUAAGUGGGAGGGCCAAGAGCAAAUCGCCUG	0.0	0.2	1.3	-
H6	AGGGUGCCGCCUAACACUCUAUUUAUAUGAUCGGCAUACC	13.3	4.6	1.3	-
H29	CGCUUGAUUGUUUUUAGAGCCACCCACCCACCCACAGUGA	0.0	0.0	1.1	-

*Вероятность формирования G4 по данным анализа вторичной структуры с помощью алгоритма Vienna RNAfold.

Все C и U - 2'-F-пиримидиновые нуклеотиды.

Анализ данных секвенирования обогащенных библиотек после селекции на гликированный гемоглобин HbA1c выявил 4 лидирующих по частоте встречаемости последовательности 2'-F-РНК: gH1 (22.5 %), gH2 (10.2 %) и отличающуюся от нее всего одним нуклеотидом gH10 (6.8 %) и gH4 (6.1 %). Анализ предполагаемых вторичных структур этих РНК не выявил в их составе фрагментов, способных формировать G4-структуры (табл. 6). Менее представленные в библиотеке аптамеры gH8 (2.7 %) и gH13 (1.2 %), содержали G-богатые мотивы, потенциально способные формировать квадруплексы по данным анализа Vienna RNAfold.

Интересно, что нуклеотидная последовательность аптамера gH8 была также обнаружена среди частотных лидеров библиотеки после селекции на суммарный гемоглобин (H1536, 1.5 % после 10 раундов). Из приведенных в табл. 5 и табл. 6 данных видно, что в ходе селекции на суммарный гемоглобин частота встречаемости аптамера gH8 (H1536) не превышала 1.5 % после

10 раундов селекции. Частота встречаемости этой же последовательности 2'-F-РНК в ходе селекции на гликированный гемоглобин HbA1c сначала увеличивалась (до 8.1 %), но после введения дополнительной стадии негативной селекции на Hb-модифицированные магнитные частицы снизилась до 2.7 %. Факт отбора данного аптамера в ходе селекции как на суммарный, так и на гликированный гемоглобин HbA1c может свидетельствовать о том, что он связывается с аптатопом, характерным для обеих белковых мишеней.

Таблица 6. Наиболее часто встречающиеся нуклеотидные последовательности после селекции 2'-F-РНК-аптамеров на гликированный гемоглобин HbA1c.

аптамер	нуклеотидная последовательность рандомизированного участка, 5'-3'	частота встречаемости, %				G4*
		4 раунд	7 раунд	11 раунд	12 раунд	
gH1	UGGGGAUUCUGUAGUGGGGAAGGGCCGAGCGUACAAGCC	0.1	5.6	18.0	22.5	-
gH2	GGGGUUCUUGGUAAGUGGGAGGGCCAGGAGCAAAUCGCCUG	0.3	4.8	10.9	10.2	-
gH10	GGGGUUCUUGGUAAGUGGGAGGGCCAAGCGCAAAUCGCCUG	0.0	0.1	4.3	6.8	-
gH4	CUAGAAGGGGCAAUCGUAGGGGACGCUAGUGAGACGGUUA	0.3	0.7	4.8	6.1	-
gH6	AUCGAAAUAGCAAGAACCUGUCGAGCACCCUGCUACAUC	0.0	0.1	6.5	5.9	-
gH7	AGGGGAUUCUGUAGUGGGAGGGCCGAGCGUACAAGCC	0.0	0.6	4.4	5.5	-
gH1124	GGGGUUCUUGGUAAGUGGGAGGGCCAAGAGCAAAUCGCCUG	5.0	18.0	6.6	4.7	-
gH20	UGUACGAAAUAGCUGCCUGAUUGUCC	0.0	0.0	3.5	3.9	-
gH12	GGGGUUCUUGGUAAGUGGGAGGGCCAAGAGCGAAUCGCCUG	0.0	0.9	3.3	3.3	-
gH3391	GGGGUUCUUGGUAAGUGGGAGGGCCAGGAGCAAAACGCCUG	0.0	0.5	2.4	2.8	-
gH8	GGGGGGUCUUGUGAGUUAGGGUUAGGGCCGAGCGUGCUAU	4.3	8.1	4.7	2.7	+
gH11	UCGAAAUAGCAGCAAUCUCAAGAGCCAAACUAUAUGAUAG	0.0	0.0	2.9	2.2	-
gH24	UGGGGAUUCUGUAGUGGGAGGGCCGAGCAUACACCAAGCC	1.9	14.5	3.0	1.9	-
gH192	AGGGGAUUCUGUAGUGGGAGGGCCGAGCGUACACCAAGCU	0.0	1.2	1.7	1.6	-
gH17	AGGUAUCGAAAUAGCAGCCUGCAGAUCUCCACCUAGUGU	0.0	0.0	1.4	1.4	-
gH18	UGUCGAAAUAGCAAUUAUUAACGGACUGUCGCAAAUGUCA	0.0	0.0	1.0	1.3	-
gH13	CCGAGGGAGGGGGGAGGAUGGCUGUGCGUUUACUUCUU	0.9	2.8	1.8	1.2	+
gH23	UAGCCUCCAAGAACGUGACUUCGUGUUUCCCAACCUCCU	0.0	0.0	0.2	1.0	-

*Вероятность формирования G4 по данным анализа вторичной структуры с помощью алгоритма Vienna RNAfold.

Все C и U - 2'-F-пиримидиновые нуклеотиды.

Таким образом, для дальнейшего анализа свойств были выбраны наиболее часто встречающиеся последовательности H1 и gH1, gH2, gH4. Кроме того, были выбраны последовательности H5 и H9 как потенциально квадруплекс-формирующие последовательности, частота встречаемости которых увеличивалась в ходе отбора, а также последовательность gH8, встречающаяся в обогащенных библиотеках после селекции на оба варианта гемоглобина.

3.2.2. Рациональный дизайн и синтез укороченных 2'-F-РНК-аптамеров

Все выбранные на предыдущем этапе аптамеры представляют собой 87-звенные фрагменты 2'-F-РНК. Целесообразным было провести рациональный дизайн кандидатных аптамеров для минимизации их нуклеотидных последовательностей и удаления нуклеотидов, наличие которых

не является критическим для взаимодействия с мишенью или стабилизации необходимой для узнавания мишени вторичной структуры. Минимизация аптамеров позволяет сделать их химический синтез более быстрым и экономичным, а также может увеличить их сродство к белковой мишени. Наиболее распространенным вариантом укорочения является частичное или полное удаление константных праймер-связывающих участков, которые были необходимы для амплификации обогащенной библиотеки в ходе селекции. На основании анализа предполагаемых вторичных структур полноразмерных 87-звенных последовательностей были предложены варианты укорочения кандидатных аптамеров. В случае аптамера Н1 оба константных участка вовлечены в формирование вторичной структуры через комплементарные взаимодействия с нуклеотидами центральной области. Потенциально их удаление может привести к дестабилизации пространственной структуры аптамера, необходимой для связывания белка-мишени. С учетом этого для дальнейшего анализа была использована полноразмерная версия аптамера Н1. В случае аптамеров Н5 и Н9 один из константных участков по данным Vienna RNAfold имеет собственную вторичную структуру с довольно низкой стабильностью и не взаимодействует с нуклеотидами центральной области. Кроме того, предполагаемые вторичные структуры данных аптамеров содержат квадруплексные фрагменты. По аналогии с уже известными G4-аптамерами [186] можно предполагать, что именно квадруплексный фрагмент с прилегающим к нему РНК-стеблем отвечает за взаимодействие с мишенью. Исходя из этих соображений, мы сконструировали серию укороченных вариантов аптамеров Н5 и Н9, последовательно удаляя один из константных участков (3'-концевой для Н5 и 5'-концевой для Н9) и укорачивая РНК-стебель. При этом во всех случаях в составе аптамеров сохраняли квадруплекс-формирующий мотив (рис. 21). В случае аптамера Н5 при дизайне наиболее радикально укороченных вариантов Н5t13 и Н5t14 мы удалили нуклеотиды, образующие в структуре дуплексных участков аптамеров однонуклеотидные выпетливания (отмечены кругами на рис. 21), в предположении, что это будет способствовать стабилизации вторичной структуры. При последовательной минимизации нуклеотидной последовательности аптамера Н9, также с целью повышения стабильности предполагаемой вторичной структуры, была введена дополнительная С-Г пара в состав двуцепочечного участка.

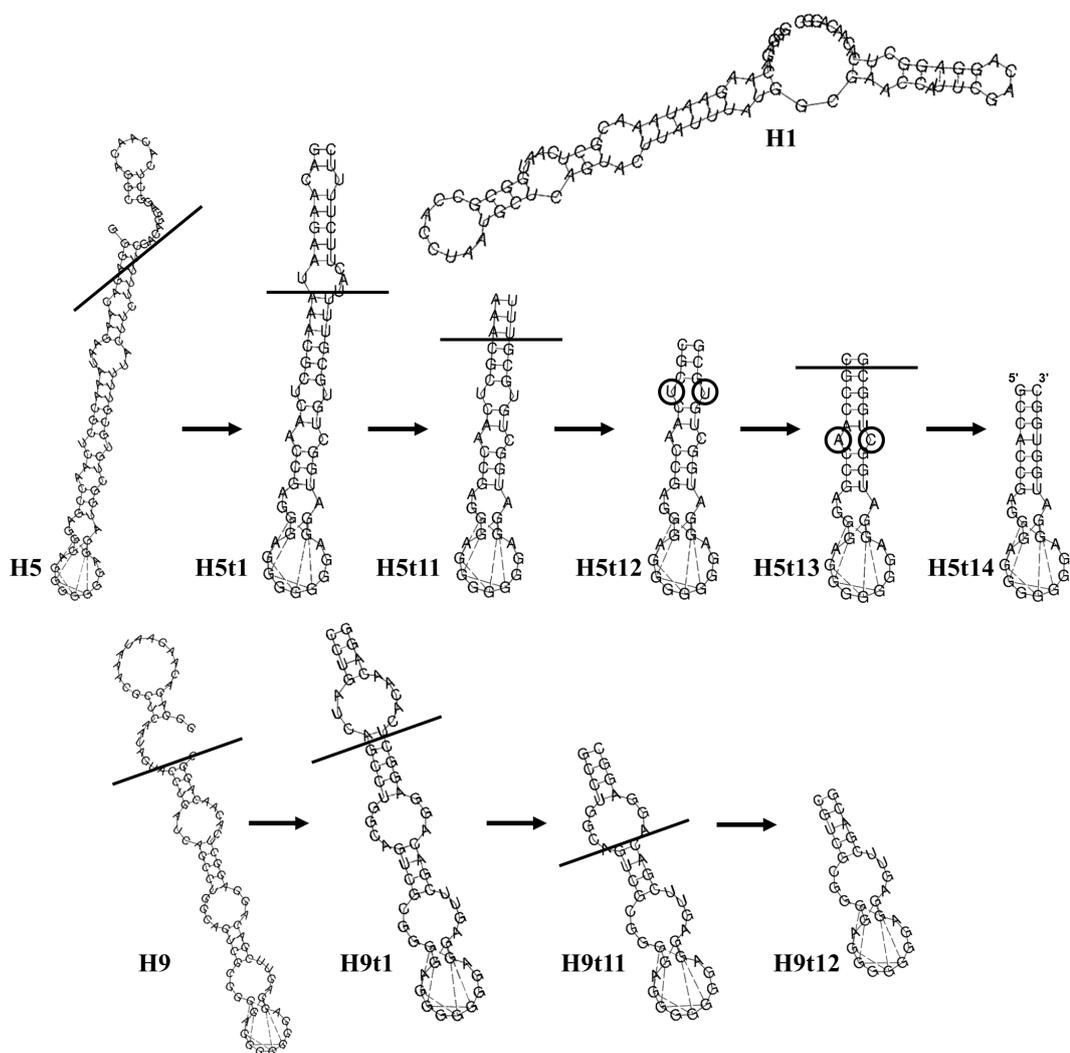


Рисунок 21. Предполагаемые вторичные структуры полноразмерных и укороченных вариантов 2'-F-РНК-аптамеров к суммарному гемоглобину по данным VIENNA RNAfold. Пунктирными линиями соединены остатки гуанозина, формирующие G-квадруплексы. Линиями обозначены границы, в пределах которых удаляли нуклеотиды в составе аптамеров. Кругами показаны нуклеотиды в составе однонуклеотидных выпетливаний, удаленные при конструировании вариантов H5t13 и H5t14.

Анализ предполагаемых вторичных структур наиболее часто встречающихся последовательностей 2'-F-РНК, отобранных по сродству к гликированному гемоглобину HbA1c, выявил наличие протяженных неструктурированных одноцепочечных 5'- и/или 3'-концевых участков для аптамеров gH1, gH2 и gH8. В случае аптамера gH4 5'- и 3'-константные фрагменты не участвовали в формировании элементов вторичной структуры центральной области, образуя дуплекс из 3-х пар нуклеотидов между собой (см. рис. 22). Удаление концевых фрагментов не оказывало существенного влияния на предполагаемые вторичные структуры последовательностей аптамеров.

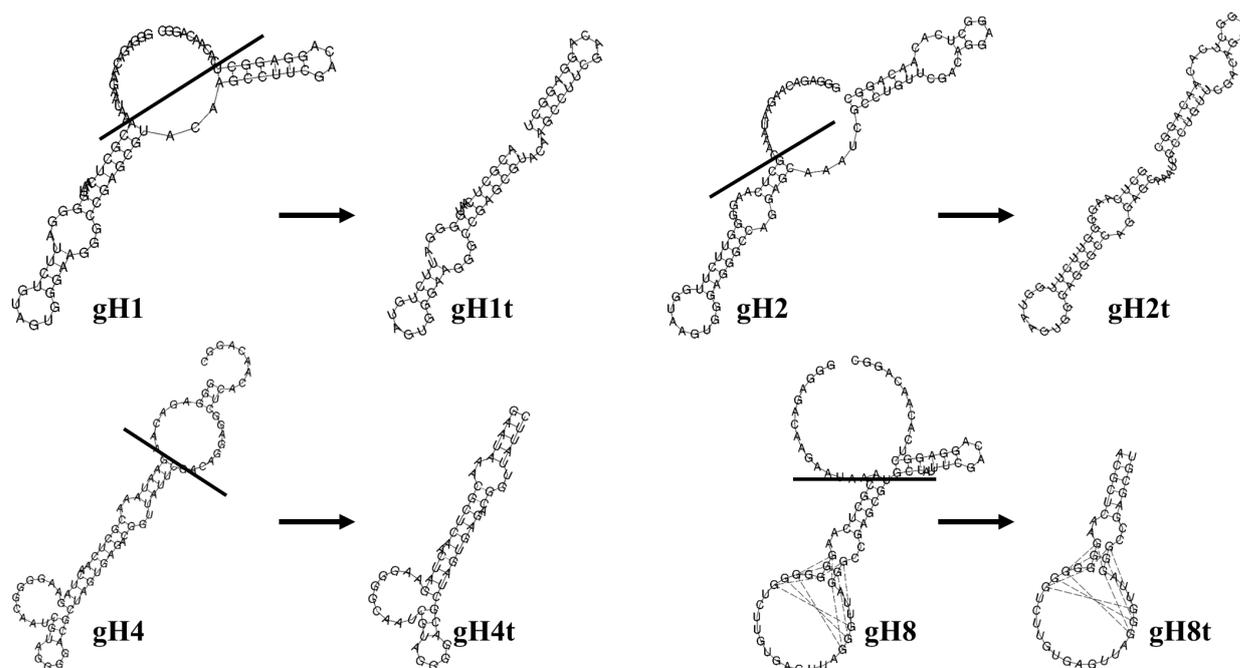


Рисунок 22. Предполагаемые вторичные структуры полноразмерных и укороченных вариантов 2'-F-РНК-аптамеров к гликированному гемоглобину HbA1c по данным VIENNA RNAfold. Пунктирными линиями соединены остатки гуанозина, формирующие G-квадруплексы. Линиями обозначены границы, в пределах которых удаляли нуклеотиды в составе аптамеров.

Таблица 7. Нуклеотидные последовательности кандидатных 2'-F-РНК-аптамеров.

аптамер	нуклеотидная последовательность, 5'-3'	длина, нт
H1	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAAUUGGCGCCACCUGAUGCUCAGUACUUAUUUAU GGCGAACCAUUCGACAGGAGGCUCACAACAGGC(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~ C ₆ NH ₂	87
H5t1	GACAAGAAUAAACGCUCAACCGAGGGAGGGGGGAGGAUGGCUGUGCGUUUUAC UUCUUUUC(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~ C ₆ NH ₂	62
H5t11	AAACGCUCAACCGAGGGAGGGGGGAGGAUGGCUGUGCGUUU(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~ C ₆ NH ₂	42
H5t12	CGCUCAACCGAGGGAGGGGGGAGGAUGGCUGUGCG(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~ C ₆ NH ₂	36
H5t13	CGCCAACCGAGGGAGGGGGGAGGAUGGCUGGCG(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~ C ₆ NH ₂	34
H5t14	GCCACCGAGGGAGGGGGGAGGAUGCUGGC(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~ C ₆ NH ₂	30
H5t11m	AAACGCUCAACCGAGUUAUUGUUGGAUUAUGGCUGUGCGUUU(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~ C ₆ NH ₂	42
H9t1	CCUGAUCAGCCUGGCAGUCGCGGGAGGGGGGAGGAGUUCGACAGGAGGCUCA CAACAGG(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~ C ₆ NH ₂	61
H9t11	GCCUGGCAGUCGCGGGAGGGGGGAGGAGUUCGACAGGAGGC(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~ C ₆ NH ₂	43
H9t12	CGUCGCGGGAGGGGGGAGGAGUUCGACG(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~ C ₆ NH ₂	30
H9t11m	GCCUGGCAGUCGCGGUUAUUGUUGGAUUAUUGCAGGAGGC(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~ C ₆ NH ₂	43
gH1t	ACGCUCAAUUGGGAUUCUGUAGUGGGAAGGGCCGAGCGUACAAGCCUUCGACAG GAGGCU(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~ C ₆ NH ₂	60
gH2t	GCUCAAGGGUUCUUGGUAAGUGGGAGGGCCAGGAGCAAUCGCCUGUUCGACA GGAGGCUCACAACAGGC(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~ C ₆ NH ₂	71

gH8t	ACGCUCAAGGGGGGGUCUUGUGAGUUAGGGUUAGGGCCGAGCGU(OCH ₂ CH ₂) ₆ P~ C ₆ NH ₂	44
gH8tm	ACGCUCAAUUGGUUUUCUUGUGAGUUAUUUUUAGUUCGAGCGU(OCH ₂ CH ₂) ₆ P~ C ₆ NH ₂	44

Все С и U - 2'-F-пиримидиновые нуклеотиды. Остатки гуанозина, предположительно вовлеченные в формирование G4, выделены жирным шрифтом.

Нуклеотидные последовательности выбранных для дальнейшего исследования полноразмерных и укороченных 2'-F-РНК-аптамеров приведены в табл. 7. Все аптамеры были химически синтезированы твердофазным фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе ASM-800. В ходе автоматического синтеза на 3'-конец всех аптамеров была введена аминогруппа для последующей ковалентной иммобилизации на твердой подложке, а также для синтеза конъюгатов аптамеров с биотином или флуоресцентными красителями. Аминогруппу в состав олигорибонуклеотидов вводили через протяженный гексаэтиленгликольфосфатный линкер (spacer18), чтобы свести к минимуму возможное влияние 3'-концевых функциональных групп на пространственную структуру аптамеров.

3.2.3. Исследование связывания 2'-F-РНК-аптамеров с белками-мишенями

3.2.3.1. Биolumинесцентный анализ аффинности индивидуальных аптамеров к суммарному и гликированному гемоглобину

Аналитические системы с оптическим типом детекции получили в настоящее время широкое распространение. К преимуществам такого типа систем относятся высокая чувствительность детекции и относительная простота анализа. Ранее в лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН совместно с лабораторией фотобиологии ИБФ СО РАН была разработана система гетерофазного биolumинесцентного анализа на основе 2'-F-РНК-аптамеров, способных связывать антитела, характерные для больных рассеянным склерозом [164,172]. В качестве репортерной молекулы был использован фотопротеин обелин, представляющий собой нековалентный комплекс апобелка и предокисленного субстрата 2-гидропероксицелентеразина. При добавлении ионов Ca²⁺ происходит реакция декарбоксилирования субстрата с образованием продукта целентерамида в возбужденном состоянии, релаксация которого сопровождается излучением света в видимом диапазоне. Использование Ca²⁺-регулируемого фотопротеина обелина в качестве репортерной молекулы обеспечивает высокую чувствительность анализа и простоту его проведения [158,187].

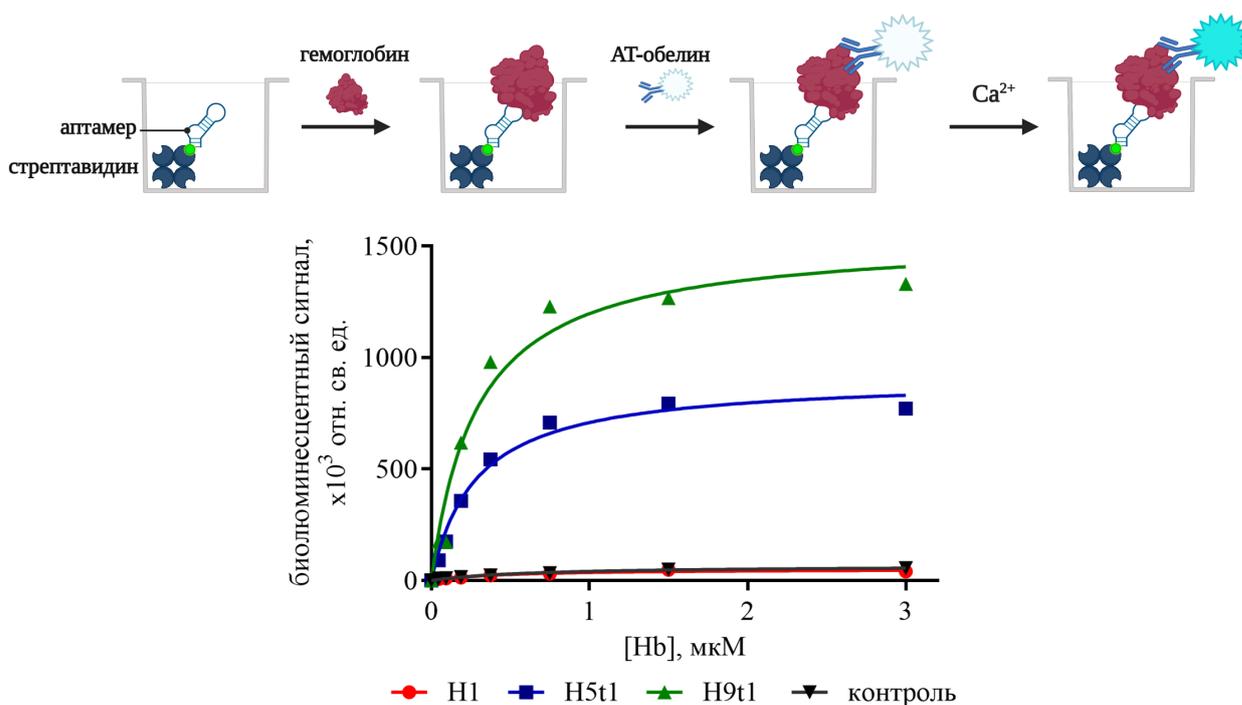


Рисунок 23. Билюминесцентный анализ связывания индивидуальных аптамеров с суммарным гемоглобином. Схема эксперимента приведена в верхней части рисунка. Отн. св. ед. – относительные световые единицы. В качестве контроля использовали образцы, не содержавшие биотинилированный аптамер. Данные получены к.б.н. Е.Е. Башмаковой (ИБФ СО РАН).

Важно отметить, что гетерофазный билюминесцентный анализ может быть использован не только для разработки тест-систем, но и для оценки сродства аптамеров к их мишеням. В нашей работе для определения аффинности индивидуальных аптамеров к белковым мишеням был использован метод гетерофазного билюминесцентного анализа в сэндвич-формате. Данный вариант анализа может быть использован в качестве альтернативы традиционным методам анализа НК-белковых комплексов (электрофорез, удержание на нитроцеллюлозных фильтрах) в том случае, если они нестабильны в условиях проведения анализа. Аптамер, содержащий остаток биотина на 3'-конце, иммобилизовали в лунках микропланшета, покрытых стрептавидином. Лунки планшета промывали и затем вносили раствор гемоглобина (Hb или HbA1c). Образовавшиеся комплексы аптамера с мишенью визуализировали с помощью гемоглобин-специфичных антител, конъюгированных с обелином (схема на рис. 23). Билюминесценцию обелина инициировали добавлением раствора хлорида кальция.

Как видно из приведенных на рис. 23 кривых, наименьшая степень связывания с суммарным гемоглобином была показана для аптамера H1, который характеризуется максимальной частотой встречаемости в обогащенной библиотеке. Уровень билюминесцентного сигнала в случае аптамера H1 практически не превышал значений для контрольных образцов, не содержавших аптамер. Можно предположить, что этот аптамер является так называемой «паразитной» последовательностью. Известно, что разные нуклеотидные последовательности могут амплифицироваться в ходе ПЦР с различной

эффективностью. Таким образом, преобладание аптамера Н1 в обогащенной библиотеке после 10 раундов селекции может быть обусловлено не его высоким сродством к белковой мишени, а предпочтительной амплификацией молекулы с данной последовательностью в ходе ПЦР на каждом раунде селекции. Еще одним возможным объяснением отсутствия билюминесцентного сигнала в случае аптамера Н1 может быть конкуренция за связывание одного и того же эпитопа между исследуемым аптамером и обелин-меченым антителом, используемым для детекции аптамер-белковых комплексов. Наибольшее платовое значение интенсивности билюминесцентного сигнала наблюдалось для аптамера Н9т1, а при связывании аптамера Н5т1 уровень сигнала снижался примерно в два раза. Рассчитанные из данных билюминесцентного анализа значения констант диссоциации комплексов аптамер-мишень оказались примерно одинаковыми и составили 280 и 290 нМ для аптамеров Н5т1 и Н9т1, соответственно (табл. 8).

Таблица 8. Значения K_d для комплексов 2'-F-РНК-аптамеров с суммарным и гликированным гемоглобинами, рассчитанные из данных билюминесцентного анализа.

аптамер	K_d , нМ	
	Нб	НбА1с
Н5т1	280±50	430±100
Н9т1	290±70	380±90
gН1т	нет связывания	250±80
gН8т	190±20	110±40

Из литературных данных (см. раздел 1.5.6 обзора литературы) известно несколько ДНК-аптамеров, способных связывать суммарный гемоглобин человека. Было интересно сравнить аффинность полученных в данной работе 2'-F-РНК-аптамеров с аффинностью ДНК-аптамеров, описанных ранее, с использованием гетерофазного билюминесцентного анализа. Следует отметить, что сродство аптамеров к белковым мишеням может сильно изменяться в зависимости от условий конкретного эксперимента (состав буферного раствора для связывания, температура и время инкубации аптамеров с мишенью и т. д.), поэтому для проведения билюминесцентного анализа нами были использованы условия, описанные в оригинальных исследовательских работах. Нуклеотидные последовательности описанных в литературе ДНК-аптамеров приведены в табл. 9. Все ДНК-аптамеры были химически синтезированы твердофазным фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Новосибирск). В ходе автоматического синтеза на 3'-конец всех аптамеров была введена аминогруппа для последующего конъюгирования с биотином.

Таблица 9. Нуклеотидные последовательности ДНК-аптамеров, связывающих суммарный гемоглобин человека.

аптамер	нуклеотидная последовательность, 5'-3'	длина, нт	ссылка
D10-6	GACAGGCAGGACACCGTAACCCGTAGCATTGCGGAAGTCACCGT GGGTTGAATGGTCTACTGCTACCTCCCTCCTCTTC	79	[12]
D10-9	GACAGGCAGGACACCGTAAGCGCGAGTAAGGGTACGTCTAGTAA CTCCTCGGTACGGTCCTGCTACCTCCCTCCTCTTC	79	
apt1	TTAGCGAGCTGCACACACAATGGACTCGTCATACCGTGCTGTTT	44	[150]
apt2	ATCTGCAGAATTCGCCCTTGCTGGTGCAGTACACACCCGGCGGG	44	
apt3	GGCAGGAAGACAAACACCAGGTGAGGGAGACGACGCGAGTGTT AGATGGTAGCTGTTGGTCTGTGGTGCTGT	72	[11]

Сравнительный анализ связывания с суммарным гемоглобином показал, что для аптамеров D10-6 и D10-9 платовое значение биолюминесценции примерно в 3 раза меньше по сравнению с полученными в данной работе 2'-F-РНК-аптамерами. Биолюминесцентный сигнал для аптамеров apt1, apt2 и apt3 практически не превышал фоновых значений.

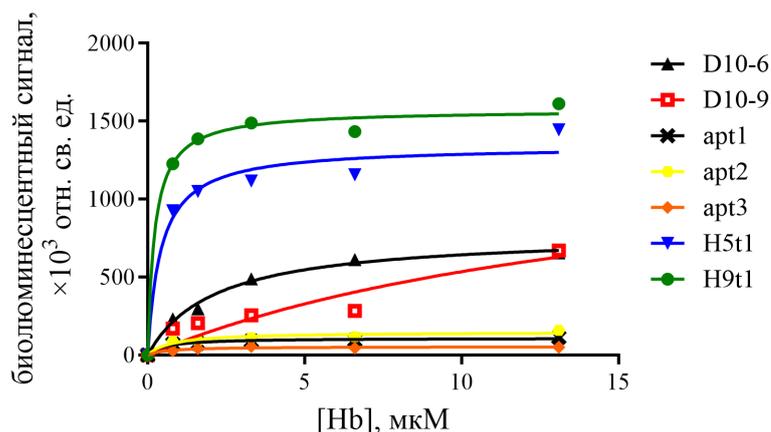


Рисунок 24. Биолюминесцентный анализ связывания 2'-F-РНК и ДНК-аптамеров с суммарным гемоглобином. Отн. св. ед. – относительные световые единицы. Данные получены к.б.н. В.В. Красицкой (ИБФ СО РАН).

Оценка значений констант диссоциации комплексов ДНК-аптамеров, полученных в исходных литературных источниках и в ходе проведенного нами биолюминесцентного анализа, показала существенные различия. Так, для аптамера D10-6 величина K_d , рассчитанная из наших данных, составила около 2 мкМ, что примерно в 20 раз больше по сравнению с оригинальным исследованием. В случае аптамера D10-9 значение K_d , рассчитанное из данных биолюминесцентного анализа, более чем в 300 раз превышало приведенное в оригинальной работе значение. Мы предполагаем, что полученные результаты могут объясняться непосредственно особенностями метода, используемого для анализа белок-аптамерного взаимодействия. Известные из литературных данных ДНК-аптамеры были получены и протестированы в аналитических системах других типов. Возможно, использование

микропланшетов для проведения анализа в значительной степени снизило функциональную активность аптамеров вследствие каких-либо особенностей взаимодействия конкретных олигонуклеотидов с материалом микропланшета.

На основании полученных результатов для дальнейшего анализа были выбраны аптамеры H5t1 и H9t1. Поскольку длина каждого из этих аптамеров составляла примерно 60 нуклеотидов, была проведена их дополнительная минимизация, описанная в разделе 3.2.2. Биоломинесцентный анализ связывания с суммарным гемоглобином обеих серий аптамеров проводили в гетерофазном формате, как описано выше, при 1 мкМ концентрации белка. Согласно полученным данным, при укорочении аптамера H5t1 до 42 нуклеотидов (H5t11) интенсивность сигнала снижается в 1.4 раза, а дальнейшее уменьшение длины аптамера (H5t12, H5t13 и H5t14) приводит практически к полной потере аффинности (рис. 25). Аналогичная зависимость наблюдалась и для аптамера H9t1, укорочение которого до 43 (H9t11) и 30 нуклеотидов (H9t12) приводило к снижению интенсивности биоломинесцентного сигнала в 2.4 и 9 раз, соответственно (рис. 25). Полученные данные позволили заключить, что двуцепочечные участки в составе аптамеров H5t1 и H9t1 необходимы для формирования пространственной структуры аптамеров, обеспечивающей связывание с белком-мишенью.

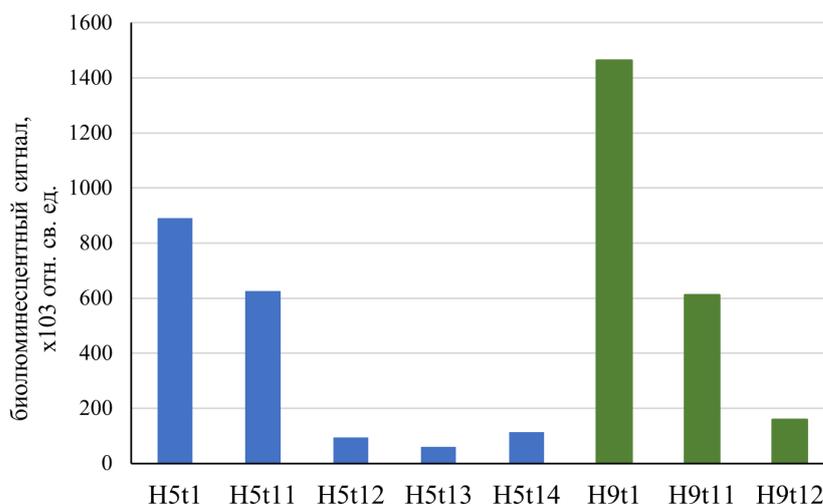


Рисунок 25. Биоломинесцентный анализ связывания серий укороченных аптамеров H5t и H9t с суммарным гемоглобином. Концентрация гемоглобина 1 мкМ. Данные получены к.б.н. Е.Е. Башмаковой. (ИБФ СО РАН).

По описанной выше схеме был проведен биоломинесцентный анализ связывания аптамеров H5t1 и H9t1 с гликированным гемоглобином HbA1c. Как видно из приведенных в табл. 8 значений констант диссоциации комплексов, оба аптамера обладают примерно равным сродством к суммарному и гликированному гемоглобинам. Таким образом, аптамеры H5t1 и H9t1 в перспективе могут быть использованы в качестве универсальных узнающих элементов для детекции обоих вариантов гемоглобина человека. При анализе сродства к гликированному гемоглобину HbA1c для аптамеров gH1t, gH2t, gH4t и gH8t образование комплекса с мишенью

было показано для наиболее представленного в финальной библиотеке аптамера gH1t, а также для аптамера gH8t, который был также получен независимо при селекции на суммарный гемоглобин (рис. 26). Для аптамеров gH2t и gH4t уровни биолюминесцентного сигнала практически не отличались от фоновых значений, данный результат мы расценивали как отсутствие сродства к мишени.

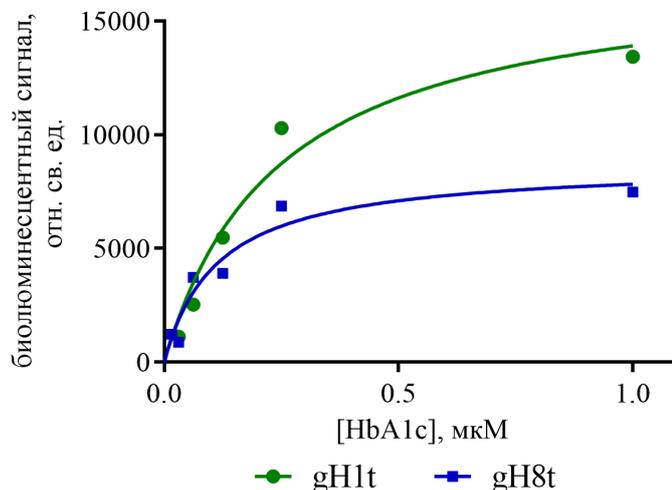


Рисунок 26. Биолюминесцентный анализ связывания аптамеров gH1t и gH8t с гликированным гемоглобином HbA1c. Данные получены к.б.н. Е.Е. Башмаковой (ИБФ СО РАН).

При анализе сродства отобранных на гликированный гемоглобин аптамеров gH1t и gH8t к суммарному гемоглобину образование комплекса с мишенью было выявлено только для аптамера gH8t. Как видно из полученных значений K_d , для этого аптамера характерно примерно одинаковое сродство к обоим вариантам гемоглобина (табл. 8). Полученные результаты также подтверждают сделанное ранее предположение о том, что аптамер gH8t связывается с аптатопом, характерным для обеих белковых мишеней. На основании данных о кросс-селективности связывания с суммарным и гликированным гемоглобинами мы заключили, что аптамер gH1t может быть использован в качестве селективного узнающего элемента для детекции гликированного гемоглобина.

3.2.3.2. Гетерофазный колориметрический анализ аффинности аптамеров к суммарному и гликированному гемоглобинам

В качестве альтернативного метода анализа связывания аптамеров с суммарным и гликированным гемоглобинами мы опробовали колориметрическую детекцию, аналогичную широко распространенному иммуноферментному анализу. Для проведения анализа белок-мишень иммобилизовали в лунках микропланшета с высокой сорбцией, промывали, блокировали 1%-ным раствором БСА и инкубировали с 3'-биотинилированным аптамером в концентрации от 7.8 до 500 нМ. После промывки в лунки планшета последовательно вносили конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена и хромогенный субстрат ABTS (см. схему на рис. 27).

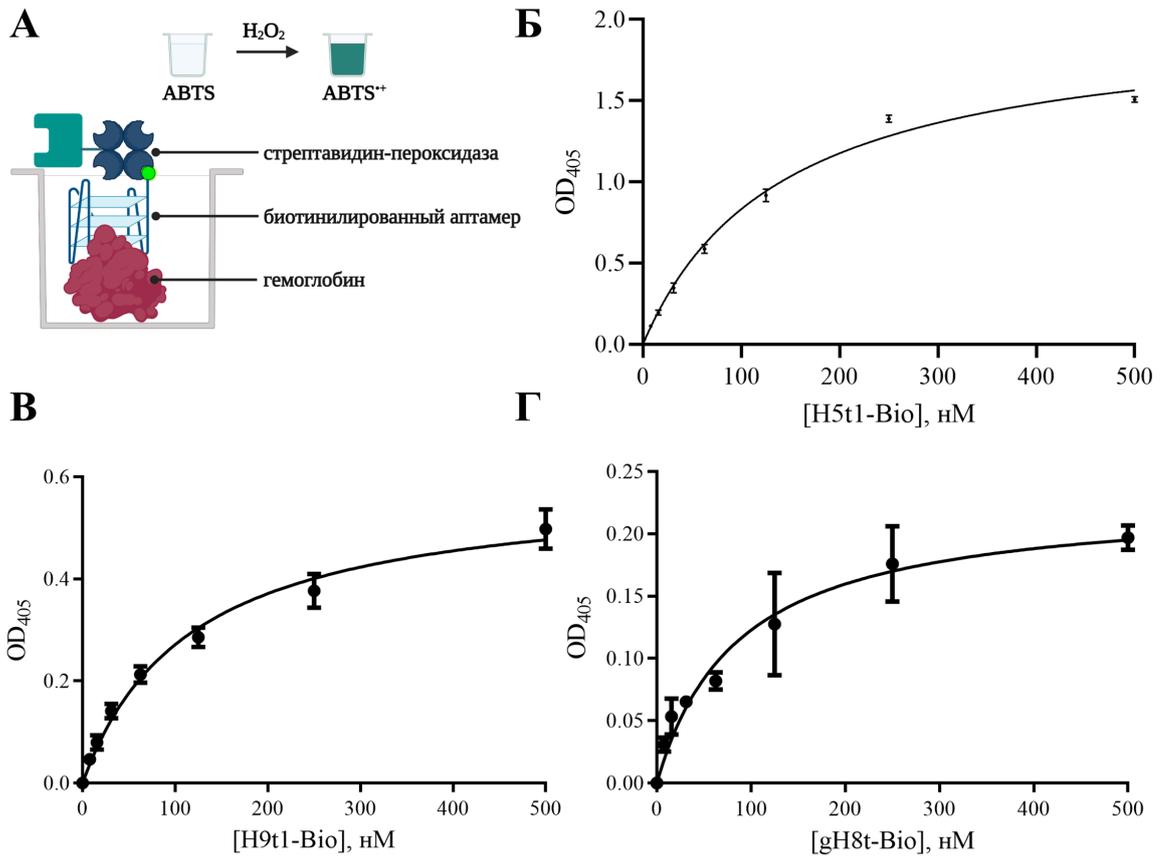


Рисунок 27. Колориметрический анализ связывания индивидуальных аптамеров с суммарным гемоглобином. Для иммобилизации использовали раствор гемоглобина с концентрацией 10 мкг/мл. Концентрация аптамеров варьировалась от 7.8 до 500 нМ. Каждая точка представляет собой усредненное значение трех независимых экспериментов. **А.** Схема колориметрического анализа связывания аптамеров с гемоглобином. **Б.** Кривая связывания биотинилированного аптамера H5t1 с Нб. **В.** Кривая связывания биотинилированного аптамера H9t1 с Нб. **Г.** Кривая связывания биотинилированного аптамера gH8t с Нб.

Таблица 10. Значения K_d для комплексов 2'-F-РНК-аптамеров с суммарным гемоглобином.

аптамер	K_d , нМ	
	колориметрический анализ	биолюминесцентный анализ
H5t1	141±11	280±50
H9t1	117±19	290±70
gH8t	87±20	190±20

Как видно из приведенных на рис. 27 кривых связывания с гемоглобином для аптамеров H5t1, H9t1 и gH8t, все три аптамера связываются с белком, иммобилизованным на поверхности лунок микропланшета. Полученные из данных колориметрического анализа значения констант диссоциации комплексов аптамеров с белком представлены в табл. 10. Необходимо отметить, что значения констант диссоциации, полученные в этом эксперименте, отличаются от полученных ранее значений с использованием гетерофазного биолюминесцентного метода анализа (см. раздел 3.2.3.1), причем во всех случаях значения констант, полученных при

колориметрическом анализе, ниже примерно в два раза. Наиболее вероятной причиной этого можно считать различные схемы анализа – в ходе биолюминесцентного анализа иммобилизованный на планшете аптамер связывал гемоглобин из раствора, а при колориметрическом анализе, наоборот, происходило связывание иммобилизованного гемоглобина с растворенным аптамером. Надо отметить, что сходные результаты были описаны Stoltenburg с соавт. для аптамера PA#2/8, отобранного по сродству к стафилококковому белку А [188]. Авторы предполагают, что такие различия значений констант диссоциации комплексов могут быть обусловлены наличием множественного (авидного) связывания аптамеров с мультивалентным белком А. Поскольку гемоглобин представляет собой тетрамерный белок, состоящий из двух идентичных α - и β -субъединиц, в нашем случае также возможно связывание нескольких (скорее всего, двух) молекул аптамера с одной молекулой белка. Такое связывание с большей вероятностью будет реализоваться при взаимодействии свободного аптамера с иммобилизованным белком, что мы и видим в эксперименте по колориметрической детекции.

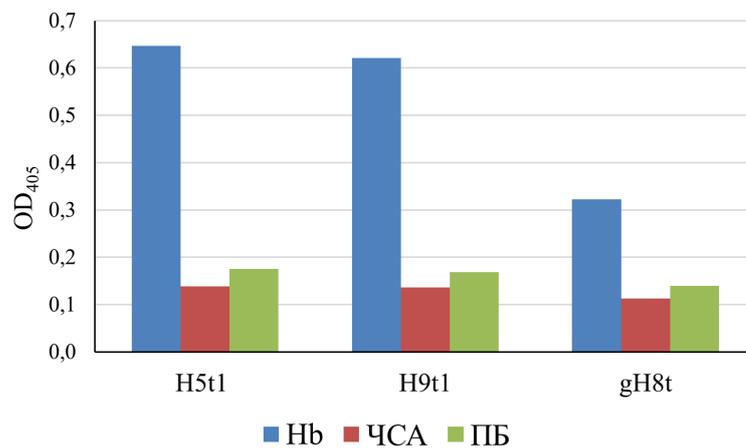


Рисунок 28. Сравнительный анализ связывания аптамеров H5t1, H9t1 и gH8t с суммарным гемоглобином и ЧСА. Концентрация белков 0.5 мкМ, концентрация биотинилированных аптамеров – 200 нМ. ПБ - промывочный буфер, использованный в качестве негативного контроля связывания аптамеров.

Для анализа специфичности связывания аптамеров с гемоглобином в качестве контрольного белка мы использовали ЧСА. Как видно из графика, приведенного на рис. 28, значения оптической плотности в контрольных пробах с альбумином были даже ниже по сравнению с пробами, не содержащими белка вообще. Это свидетельствует о минимальном неспецифическом связывании и подтверждает специфическое узнавание суммарного гемоглобина полученными аптамерами.

3.2.4. Анализ вторичной структуры 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих суммарный и гликированный гемоглобины

Как мы уже отмечали в разделе 3.2.1, анализ наиболее вероятных вторичных структур аптамеров H5t1, H9t1 и gH8t с помощью алгоритма VIENNA RNAfold выявил возможность формирования G-квадруплексных структур в их составе. Представляло интерес выяснить, действительно ли данные аптамеры образуют квадруплексы, и охарактеризовать их структуру. Для этого мы использовали комбинацию биофизических методов исследования, а именно спектроскопию кругового дихроизма (КД), ферментативный пробинг структуры и связывание специфического флуорофора.

3.2.4.1. Исследование структуры 2'-F- РНК-аптамеров методом КД-спектроскопии

Практически все известные на сегодняшний день РНК-квадруплексы, в том числе и в составе РНК-аптамеров, характеризуются параллельной топологией [180,188,189]. Их КД-спектры схожи со спектрами А-формы РНК [190]. В нашем случае предполагаемая вторичная структура исследуемых аптамеров содержит как квадруплексные, так и дуплексные мотивы, поэтому можно было ожидать, что КД-спектры для них будут представлять суперпозицию спектров А-формы РНК и параллельных квадруплексов. Мы предположили, что структурные изменения и различия между дуплексной и квадруплексной структурами будут более отчетливо видны для аптамеров с более короткими участками двойной спирали. Поэтому для уменьшения вклада дуплексного фрагмента в КД-спектры РНК-аптамеров мы использовали в данной серии экспериментов укороченные аптамеры H5t11 (42 нт), H9t11 (43 нт) и gH8t (44 нт), содержащие относительно небольшой дуплексный фрагмент и сохраняющие родство к белковым мишеням. В качестве контролей, не способных формировать квадруплексы, были использованы аптамеры H5t11m, H9t11m и gH8tm с аналогичными нуклеотидными последовательностями, в которых остатки гуанозина, предположительно участвующие в образовании G-квадруплексов, были заменены на остатки уридина (рис. 29 и табл. 7).

КД-спектры регистрировали в 10 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7.3) в отсутствие ионов K^+ . После этого к исследуемым растворам добавляли KCl до конечной концентрации 100 мМ, снова проводили фолдинг и записывали КД-спектры. В КД-спектрах аптамеров H5t11, H9t11 и gH8t наблюдаются положительный максимум эллиптичности в районе 260 нм и отрицательный минимум около 240 нм, характерные для А-формы дуплексов и параллельных квадруплексов (рис. 30) [189,191]. Кроме того, в спектрах всех трех аптамеров был зарегистрирован отрицательный пик в области 210 нм, характерный только для А-формы дуплексов [191]. Как правило, наличие ионов калия способствует стабилизации G-квадруплексных структур, что приводит к увеличению интенсивности пика в КД-спектре в области 260 нм. В случае аптамеров H5t11, H9t11 и gH8t добавление ионов калия в раствор явным образом стимулировало

структурные перестройки. В частности, было зарегистрировано увеличение интенсивности пиков на 260 и 240 нм и уменьшение интенсивности пика в области 210 нм (рис. 30). Аналогичная зависимость была показана в работах исследовательской группы под руководством У. Хана для РНК-аптамера AIR-3А, связывающего интерлейкин-6 человека, и интерпретирована авторами как образование G-квадруплекса [180,181]. Следует отметить, что, судя по приведенным в литературе данным, 2'-F-модификация не оказывает существенного влияния на структуру РНК-квадруплексов. Например, КД-спектры 2'-F-модифицированного РНК-аптамера, связывающего интерлейкин-6 [182], или 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров, узнающих внеклеточные везикулы [192], имеют форму, характерную для параллельных РНК-квадруплексов.

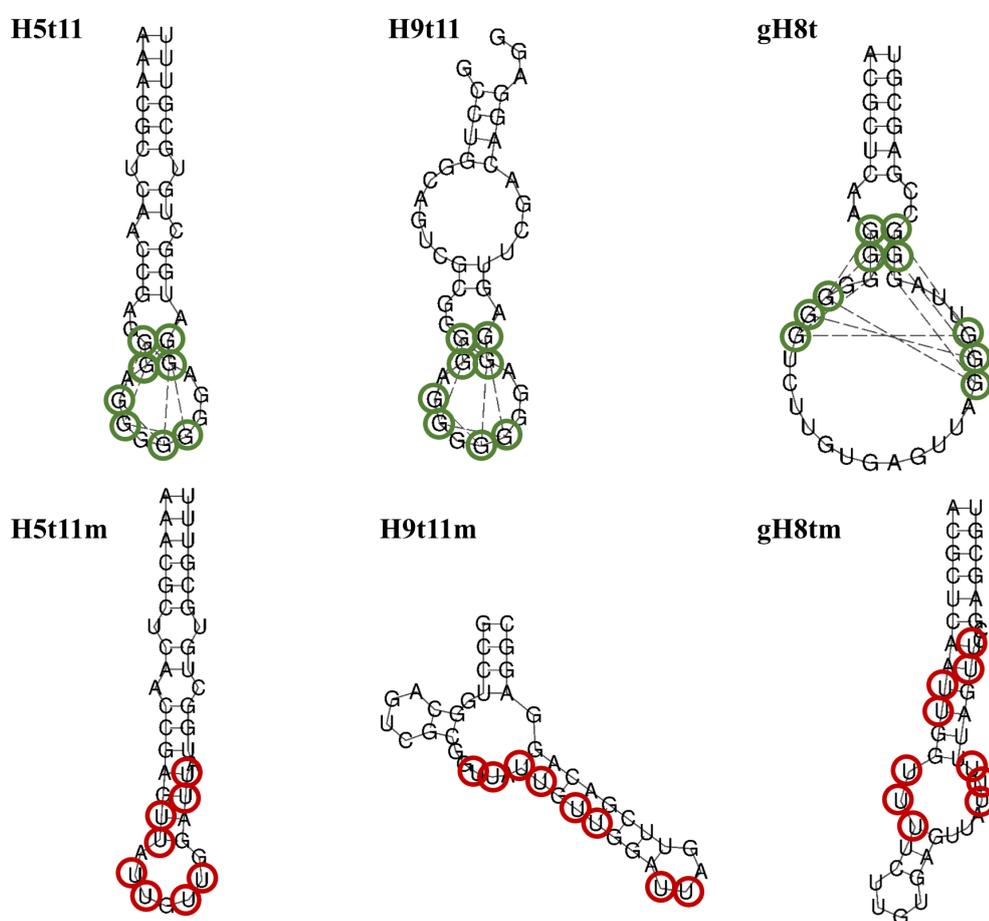


Рисунок 29. Предполагаемые вторичные структуры 2'-F-РНК-аптамеров и контрольных 2'-F-олигонуклеотидов, полученные с помощью алгоритма Vienna RNAfold. Зеленым цветом отмечены остатки гуанозина, предположительно участвующие в формировании квадруплексных структур; красным цветом отмечены нуклеотидные замены G→U в контрольных олигонуклеотидах.

В КД-спектрах контрольных олигонуклеотидов H5t11m, H9t11m и gH8tm также были зарегистрированы положительный пик эллиптичности в районе 260 нм и отрицательные пики в области 240 и 210 нм. В отличие от аптамеров, добавление ионов калия в растворы контрольных олигонуклеотидов приводило к уменьшению интенсивности положительного пика и никак не

влияло на интенсивность отрицательных (рис. 30). Как было показано в работе [193], наличие ионов калия может приводить к различным структурным отклонениям от канонической А-формы РНК-дуплекса, что может объяснять наблюдаемые нами изменения в КД-спектрах контрольных олигонуклеотидов, не содержащих квадруплекс-формирующих мотивов.

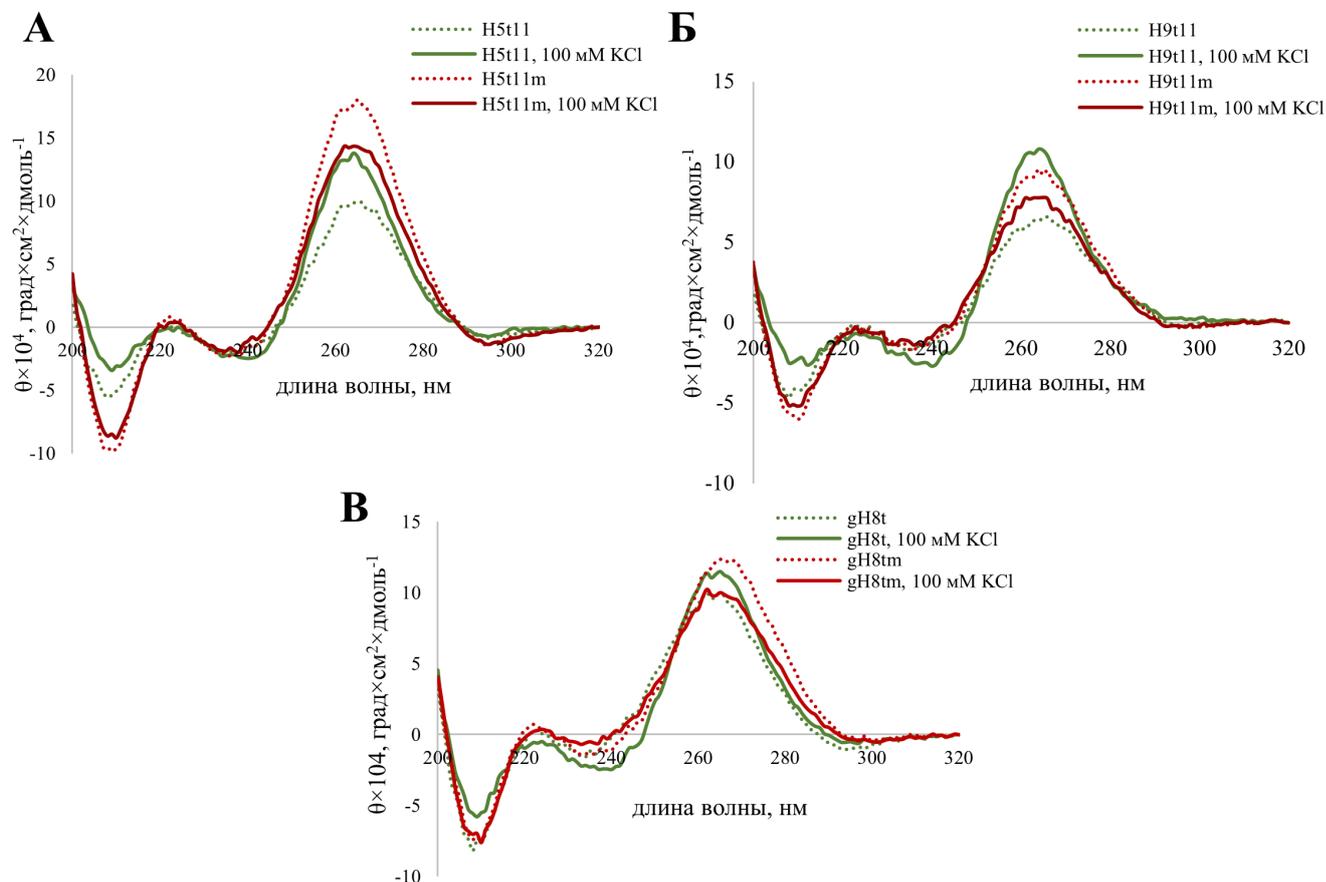


Рисунок 30. КД-спектры 2'-F-РНК-аптамеров и контрольных олигонуклеотидов. Все спектры регистрировали в 10 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7.3) в присутствии или отсутствие ионов K^+ при 25 °С. Концентрация олигонуклеотидов составила 12 мкМ. **А.** Аптамер H5t11 и контрольный олигонуклеотид H5t11m. **Б.** Аптамер H9t11 и контрольный олигонуклеотид H9t11m. **В.** Аптамер gH8t и контрольный олигонуклеотид gH8tm.

Таким образом, по данным КД-спектроскопии добавление ионов калия, стабилизирующих структуру G-квадруплекса, приводило к явной реорганизации пространственной структуры исследуемых 2'-F-РНК-аптамеров, причем характер изменения спектров свидетельствовал в пользу образования параллельных квадруплексов. Однако в КД-спектрах контрольных олигорибонуклеотидов при добавлении ионов калия мы также регистрировали изменения, поэтому данный метод не может служить исчерпывающим доказательством формирования квадруплексов в составе полученных аптамеров.

3.2.4.2. Частичный гидролиз 2'-F-РНК-аптамеров с помощью рибонуклеазы T1

Метод статистического гидролиза с помощью рибонуклеазы T1 в неденатурирующих условиях достаточно широко используется для выявления квадруплексных мотивов в составе

РНК [189]. Рибонуклеаза Т1 специфично гидролизует фосфодиэфирные связи после остатков гуанина в GrX-сайтах, расположенных в одноцепочечных участках РНК. Как правило, формирование квадруплексных структур в присутствии ионов калия делает GrX-сайты в составе квадруплекса недоступными для гидролиза рибонуклеазой Т1 (см., например [194]). На электрофореграмме после анализа гидролизатов данным сайтам расщепления соответствуют пропуски полос по сравнению с паттерном статистического Т1-гидролиза той же РНК в денатурирующих условиях.

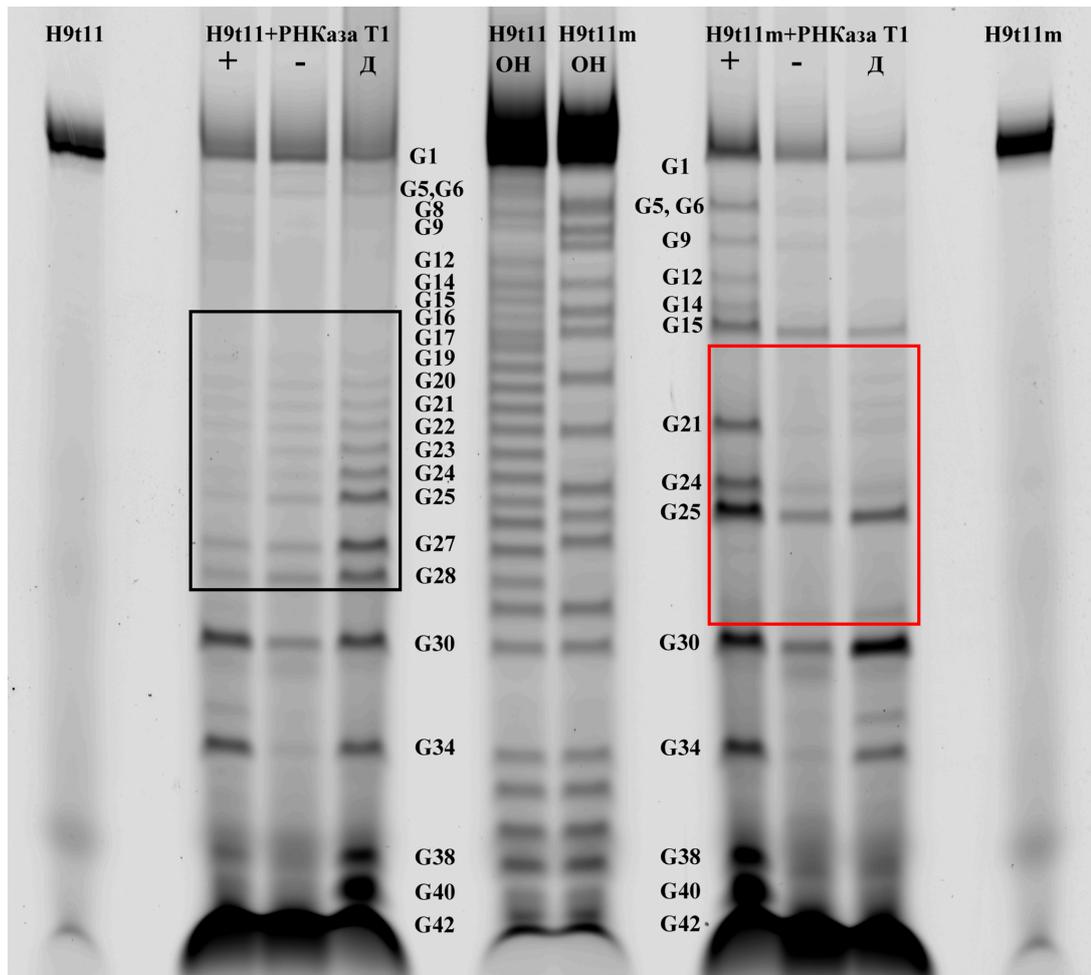


Рисунок 31. Электрофоретический анализ продуктов статистического гидролиза 2'-F-РНК-аптамера H9t11 и контрольного 2'-F-РНК-олигонуклеотида H9t11m в 10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 1 мМ EDTA в присутствии («+») или в отсутствие («-») ионов K^+ в 12%-ном денатурирующем ПААГ. Участки нуклеотидной последовательности РНК, вовлеченные в образование предполагаемых квадруплексных структур, выделены прямоугольниками. Дорожки «ОН» - продукты статистического гидролиза 2'-F-РНК в щелочной среде, дорожки «Д» - продукты частичного расщепления 2'-F-РНК РНКазой Т1 в денатурирующих условиях.

В данной работе для подтверждения формирования квадруплексных структур в составе РНК-аптамеров мы проводили статистический гидролиз флуоресцентно меченых аптамеров H5t11, H9t11 и gH8t и контрольных олигорибонуклеотидов H5t11m, H9t11m и gH8tm с помощью РНКазы Т1 в неденатурирующих условиях. В качестве примера на рис. 31 приведена электрофореграмма анализа продуктов гидролиза аптамера H9t11 и контрольного

олигонуклеотида H9t11m. Для аптамеров H5t11 и gH8t и соответствующих контрольных 2'-F-РНК были получены аналогичные результаты.

Для корректной идентификации полос, соответствующих продуктам расщепления РНКазой T1, мы использовали статистический гидролиз РНК в щелочных условиях, а также статистический гидролиз РНКазой T1 в денатурирующих условиях. В случае статистического гидролиза 2'-F-РНК-аптамеров в щелочной среде (дорожки «ОН», рис. 31) расщепление имело А+G специфичность, поскольку фосфодиэфирные связи в сайтах UrX и CrX были стабильны в данных условиях из-за наличия атома фтора в 2'-положении. Для более точного отнесения полос, соответствующих продуктам гидролиза по GrX-сайтам, проводили статистический гидролиз аптамеров и контрольных олигонуклеотидов РНКазой T1 в денатурирующих условиях (дорожка «Д», рис. 31).

В присутствии ионов калия для всех трех аптамеров наблюдалось общее снижение интенсивности гидролиза после остатков гуанина, предположительно участвующих в образовании квадруплексных структур (соответствующий участок отмечен прямоугольником черного цвета на рис. 31). В то же время, в случае контрольных олигонуклеотидов H5t11m, H9t11m и gH8tm, заведомо не способных формировать квадруплексы, добавление ионов калия в реакционные смеси повышало эффективность расщепления по GrX-сайтам, расположенным в аналогичных участках РНК (соответствующий фрагмент отмечен прямоугольником красного цвета на рис. 31). По аналогии с недавно опубликованной работой Е. Чэнь с соавт. [193] по влиянию солевых условий в растворе на структуру РНК можно предположить, что наблюдаемые нами изменения обусловлены структурными перестройками двойной спирали РНК в присутствии ионов калия.

Таким образом, для исследуемых 2'-F-РНК-аптамеров ферментативный гидролиз с помощью РНКазы T1 также лишь частично подтверждает формирование квадруплексных структур.

3.2.4.3. Анализ связывания 2'-F-РНК-аптамеров с квадруплекс-специфичным флуоресцентным красителем тиофлавином Т

В качестве независимого метода исследования структуры 2'-F-РНК-аптамеров мы использовали анализ связывания с квадруплекс-специфичным флуоресцентным красителем. Флуоресцентный краситель тиофлавин Т (ThT) традиционно применяют для гистологического окрашивания амилоидных фибрилл. Недавно было показано, что данный флуорофор способен специфично связываться с квадруплекс-содержащими НК, что приводит к значительному увеличению интенсивности его флуоресценции [195,196]. Основываясь на этих данных, мы также исследовали спектры флуоресценции красителя ThT в присутствии или в отсутствие

квадруплекс-формирующих аптамеров или соответствующих контрольных олигонуклеотидов в 20 mM Трис-НСl буфере (рН 7.5), содержащем 40 mM КСl (рис. 32).

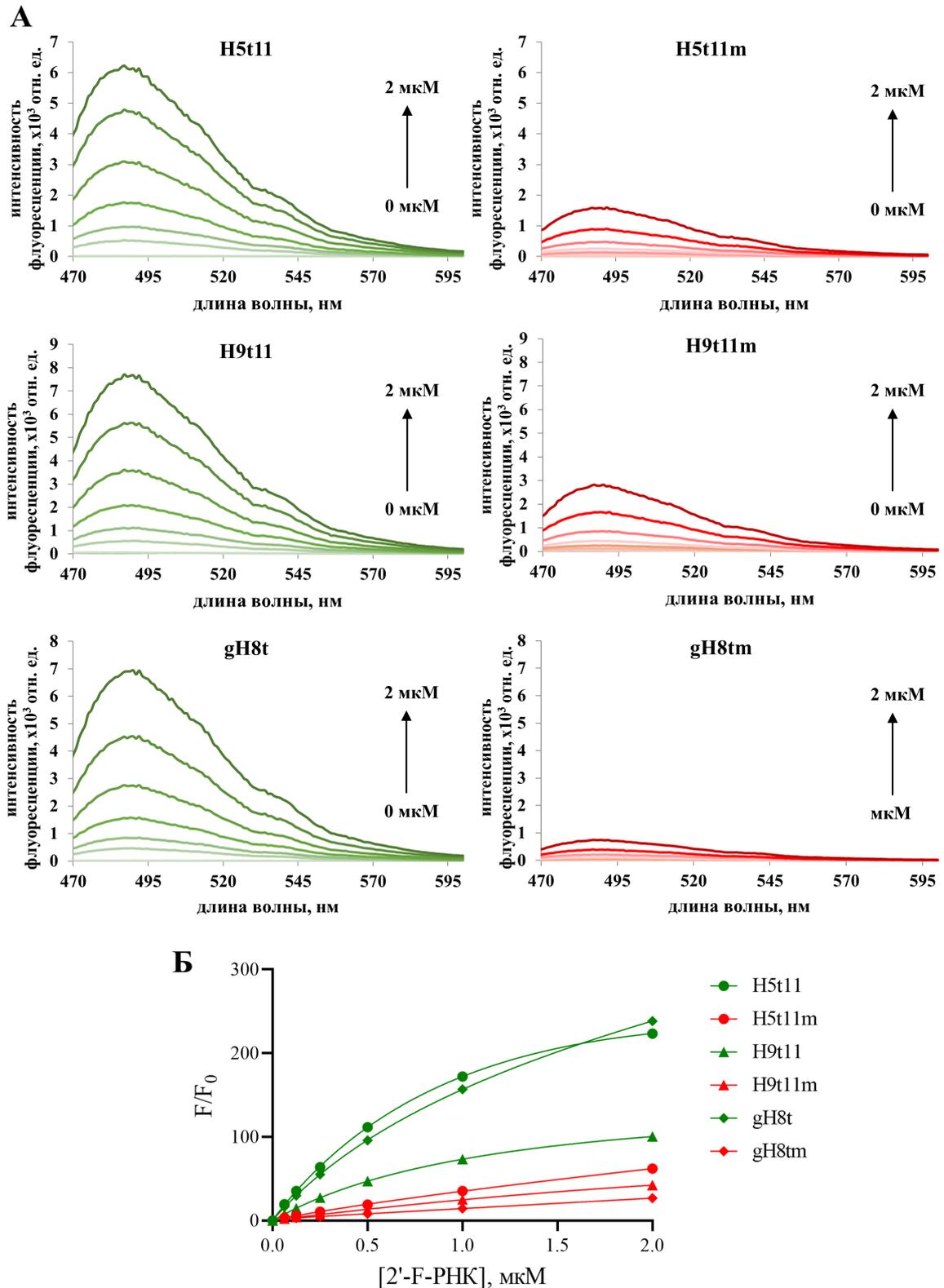


Рисунок 32. Исследование взаимодействия квадруплекс-специфического флуоресцентного красителя ThT с 2'-F-RНК-аптамерами и контрольными олигонуклеотидами. **А.** Спектры флуоресценции красителя ThT (2 мкМ) в 20 mM Трис-НСl буфере (рН 7.5), содержащем 40 mM КСl, при различных концентрациях аптамеров или контрольных олигонуклеотидов (0–2 мкМ). **Б.** Зависимости интенсивности флуоресценции красителя ThT (2 мкМ) на длине волны 487 нм от концентраций аптамеров и контрольных олигонуклеотидов.

Как видно из спектров, представленных на рис. 32А, интенсивность собственной флуоресценции красителя ThT в Трис-НСI/КСI буфере, крайне низка и сопоставима по величине с фоновым значением. При добавлении в раствор любого из трех аптамеров регистрировалось значительное увеличение интенсивности флуоресценции с характерным пиком в районе 487 нм. Последовательное увеличение концентрации аптамера приводило к соответствующему увеличению интенсивности флуоресцентного сигнала. В то же время, в присутствии любого из контрольных олигонуклеотидов мы наблюдали значительно более низкую интенсивность сигнала по сравнению с соответствующим аптамером в той же концентрации. Исходя из полученных кривых зависимости интенсивности флуоресценции на 487 нм от концентрации 2'-F-РНК (рис. 32Б), мы рассчитали значения констант диссоциации комплексов олигонуклеотидов с красителем ThT (табл. 11).

Таблица 11. Значения K_d для комплексов 2'-F-РНК-аптамеров и контрольных 2'-F-РНК с красителем ThT.

аптамер	K_d , мкМ	контрольный олигонуклеотид	K_d , мкМ
H5t11	1.0±0.1	H5t11m	5.3±0.7
H9t11	1.2±0.1	H9t11m	4.7±0.5
gH8t	1.9±0.1	gH8tm	5.8±2.3

Как видно из приведенных в табл. 11 значений K_d , аптамеры H5t11, H9t11 и gH8t формировали значительно более стабильные комплексы с красителем ThT по сравнению с контрольными олигонуклеотидами H5t11m, H9t11m и gH8tm. Таким образом, данные флуоресцентного титрования с использованием квадруплекс-специфического красителя ThT позволяют утверждать, что наиболее вероятной структурой в составе исследуемых аптамеров H5t11, H9t11 и gH8t является G-квадруплекс.

Подводя итог, необходимо отметить, что для подтверждения формирования G-квадруплексных структур с параллельной топологией в составе 2'-F-РНК-аптамеров нам потребовалось использовать несколько независимых экспериментальных методов. Структурные особенности именно РНК-квадруплексов делают их исследования более сложными по сравнению с ДНК-аналогами, вследствие чего только комбинация нескольких методов позволяет получить исчерпывающую информацию об их пространственной структуре.

3.2.5. Исследование возможности применения полученных 2'-F-РНК-аптамеров в составе сэндвич-системы для колориметрической детекции суммарного гемоглобина

На следующем этапе работы была сконструирована система колориметрической детекции сэндвич-типа для определения суммарного гемоглобина в растворе. Подобные системы детекции характеризуются высокой чувствительностью анализа за счет возможности специфического

связывания и концентрирования молекул аналита даже при его низкой концентрации в исследуемом образце. Кроме того, системы детекции сэндвич-типа не подразумевают непосредственной сорбции молекул-мишеней на поверхность микропланшета, поэтому эффективность детекции не зависит от сорбционных характеристик материала микропланшета.

Для детекции суммарного гемоглобина в растворе была сконструирована сэндвич-система на основе двух 2'-F-РНК-аптамеров, один из которых был ковалентно иммобилизован на поверхности лунки планшета, содержащего активированные карбоксильные группы, и предназначался для связывания белка-мишени. Второй гемоглобин-узнающий аптамер, несущий на 3'-конце остаток биотина, выполнял функции репортерной молекулы для колориметрической детекции за счет связывания с конъюгатом стрептавидина с пероксидазой хрена и последующего окисления хромогенного субстрата с образованием окрашенного продукта реакции (см. схему на рис. 33).

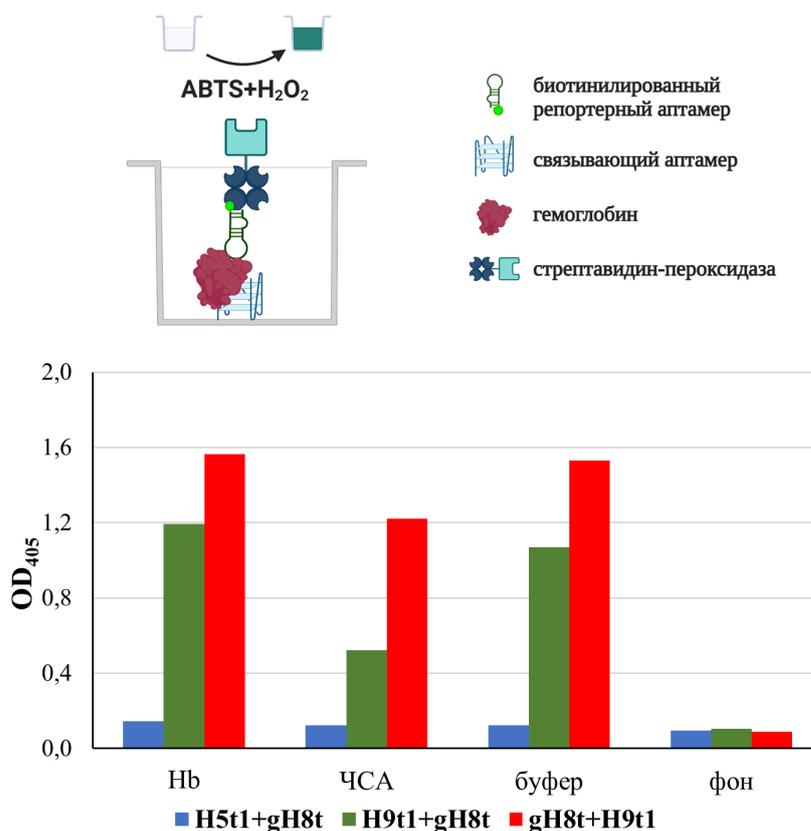


Рисунок 33. Схема и результаты колориметрической детекции суммарного гемоглобина в формате сэндвич-системы на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров. Первый компонент пары ковалентно иммобилизован на поверхности модифицированного микропланшета, содержащего активированные карбоксильные группы, из 1 мкМ раствора, второй компонент использован в концентрации 200 нМ. Концентрация белка (Нб или ЧСА) - 2 мкМ. В качестве отрицательного контроля использован промывочный буфер, не содержащий белка. Столбцы «фон» соответствуют лункам планшета, не содержащим иммобилизованный аптамер.

При использовании 3'-аминомодифицированного аптамера H5t1 для связывания белка-аналита не удалось зарегистрировать достоверное увеличение оптической плотности по

сравнению с фоновыми значениями (рис. 33). Замена аптамера H5t1 на аптамер H9t1 или gH8t позволила получить достоверное увеличение оптической плотности в лунках микропланшета, содержащих раствор суммарного гемоглобина. Аналогичное увеличение оптической плотности раствора наблюдалось также в контрольных лунках, содержащих ЧСА или промывочный буфер (рис. 33). В то же время уровень колориметрического сигнала в лунках, не содержащих иммобилизованный аптамер, оставался на уровне фоновых значений. На основании этих данных мы предположили, что высокий уровень неспецифического колориметрического сигнала обусловлен формированием комплексов между двумя аптамерами – компонентами сэндвич-пары.

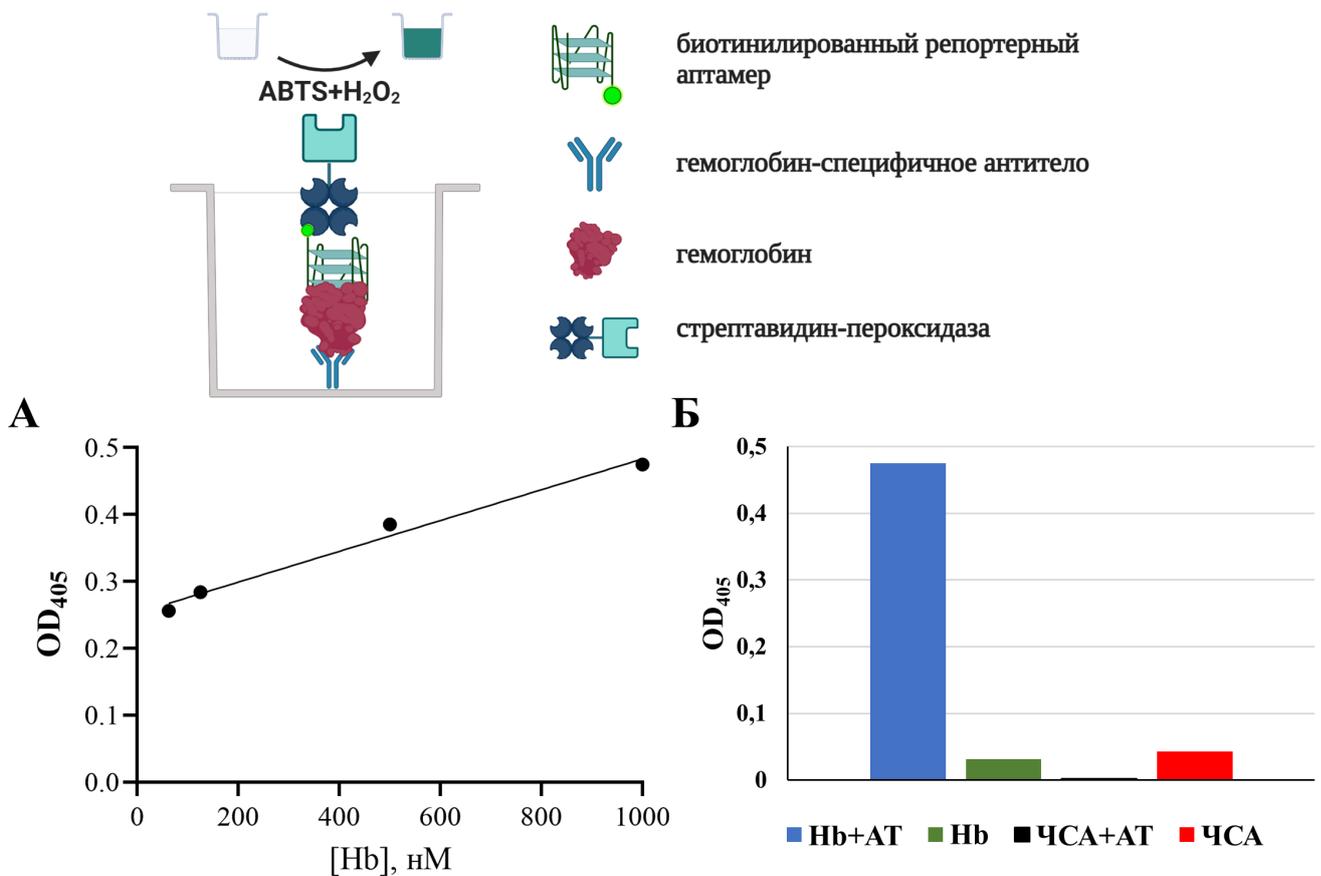


Рисунок 34. Схема и результаты колориметрической детекции суммарного гемоглобина в формате сэндвич-системы на основе пары антитело-аптамер. Гемоглобин-специфичные антитела нековалентно иммобилизованы на поверхности лунок микропланшета, 3'-биотинилированный аптамер H9t1 использован в концентрации 200 нМ. **А.** Связывание суммарного гемоглобина, концентрация белка варьировалась в диапазоне 62.5-1000 нМ. **Б.** Анализ специфичности детекции суммарного гемоглобина с использованием ЧСА в качестве контроля. Концентрация белков – 2 мкМ.

Для проверки данного предположения была сконструирована альтернативная система детекции сэндвич-типа, в которой иммобилизованный в лунках планшета аптамер заменили на антитело. Гемоглобин-специфичные антитела сорбировали на поверхность лунок планшета, после чего лунки блокировали 1%-ным раствором БСА. После промывки в лунки вносили раствор суммарного гемоглобина (диапазон концентраций от 0 до 1 мкМ) и инкубировали в

течение 2 ч. После промывки в лунки последовательно вносили 3'-биотинилированный аптамер, конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена и хромогенный субстрат для генерации колориметрического сигнала (см. схему на рис. 34).

Замена иммобилизованного в лунках микропланшета аптамера на антитело позволила детектировать колориметрический сигнал, интенсивность которого увеличивалась пропорционально увеличению концентрации белка-аналита в растворе (рис. 34А). При этом в отсутствие антител в лунках планшета или при использовании ЧСА в качестве контроля уровень сигнала не превышал фоновых значений (рис. 34Б), что говорит о специфичности детекции гемоглобина. Таким образом, была показана принципиальная возможность использования 2'-F-РНК-аптамера в качестве репортерного компонента в составе сэндвич-системы со специфическими антителами.

3.2.6. Конструирование сэндвич-системы детекции гликированного гемоглобина методом твердофазного биолюминесцентного анализа

В рамках данной работы представляла интерес детекция гликированного гемоглобина в присутствии суммарного гемоглобина с использованием двух 2'-F-РНК-аптамеров, обладающих различной специфичностью связывания. Проведение анализа в таких условиях позволяет смоделировать условия детекции в реальных образцах крови. Для этого эксперимента в качестве метода детекции был выбран гетерофазный биолюминесцентный анализ.

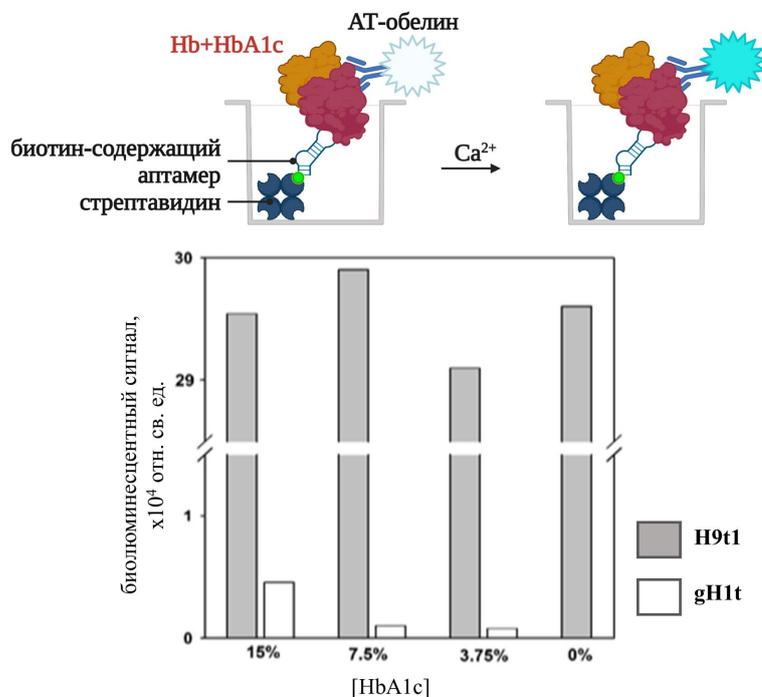


Рисунок 35. Схема и результаты определения содержания гликированного гемоглобина HbA1c в присутствии суммарного гемоглобина методом гетерофазного биолюминесцентного анализа в формате сэндвич-системы. Данные получены к.б.н. Е. Е. Башмаковой. (ИБФ СО РАН).

Для детекции гликированного гемоглобина HbA1c 3'-биотинилированный аптамер (H9t1 или gH1t) иммобилизовали на стрептавидин-модифицированной поверхности планшета, после чего в лунки вносили раствор с общей концентрацией гемоглобина 2 мкМ и заданной долей гликированного гемоглобина HbA1c (3.75, 7.5 или 15 %). В качестве репортерного компонента использовали гемоглобин-специфичные антитела, конъюгированные с обелином (рис. 35).

При анализе модельных растворов в системе с иммобилизованным аптамером H9t1, способным узнавать оба варианта гемоглобина, мы наблюдали приблизительно одинаковые значения интенсивности биолюминесцентного сигнала во всех образцах, содержащих гемоглобин (различия в значениях составили не более 3%). Если же в лунках планшета был иммобилизован аптамер gH1t со сродством только к гликированному гемоглобину, то интенсивность биолюминесцентного сигнала изменялась пропорционально концентрации HbA1c в образцах (рис. 35). При этом интенсивность биолюминесценции в контрольном образце, не содержащем HbA1c, была сопоставима с фоновым уровнем биолюминесценции. Таким образом, была показана принципиальная возможность использования полученных 2'-F-РНК-аптамеров для детекции суммарного гемоглобина либо только гликированного гемоглобина HbA1c в одном и том же модельном растворе методом гетерофазного биолюминесцентного анализа.

3.3. Получение устойчивых в биологических средах РНК-аптамеров, связывающих фотопротеин обелин

В рамках данной работы мы предложили принципиально отличающийся способ введения обелина в биоаналитическую систему через нековалентное связывание с использованием соответствующего НК-аптамера. Для реализации данного подхода нам необходимо было, в первую очередь, получить аптамеры, способные селективно связывать обелин.

3.3.1. Селекция *in vitro* 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих фотопротеин обелин

В качестве мишени для отбора аптамеров был использован рекомбинантный обелин, содержащий на N-конце гексагистидиновый фрагмент для иммобилизации на Ni-NTA сефарозе (His₆-Obe). Иммобилизация белка-мишени через концевой His₆-фрагмент широко используется в настоящее время при селекции аптамеров к белкам [55,177,197]. Как было показано ранее, наличие гексагистидинового фрагмента в составе молекулы обелина не изменяет его основные физико-химические свойства [198]. Удельная биолюминесцентная активность гистидин-содержащего варианта составляет около 90% от удельной активности обелина дикого типа (wt-Obe). Спектральные характеристики обоих вариантов обелина практически идентичны, что свидетельствует об их близкой пространственной структуре. Показателем, отражающим стабильность фотопротеинового комплекса, является уровень так называемой Ca²⁺-независимой

биоломинесценции, возникающей в процессе его распада в результате тепловых флуктуаций молекулы. Эта величина также близка для His₆-Obe и wt-Obe и почти в миллион раз меньше, чем уровень Ca²⁺-инициируемой биоломинесценции.

Полученная на первом этапе работы 2'-F-РНК-библиотека (см. раздел 3.1.4) была использована для отбора аптамеров, связывающих фотопротейин обелин. Для удаления из обогащенной библиотеки молекул 2'-F-РНК, связывающихся с носителем для иммобилизации белковой мишени, на каждом раунде проводили негативную селекцию с использованием не нагруженного белком носителя в качестве мишени. Кроме того, для снижения уровня неспецифического связывания в качестве РНК-компетитора была использована суммарная тРНК *E. coli* с 1-го по 6-ой раунды, а затем полиА с 7-го по 12-й раунды отбора. Учитывая повышенное сродство пурин-богатых РНК-последовательностей к ионам никеля [199] мы предположили, что присутствие полиА в буфере для связывания снизит вероятность неспецифического связывания с носителем пурин-богатых 2'-F-РНК в составе библиотеки и, соответственно, предотвратит потерю этих молекул в ходе негативной селекции. Дополнительно, после 6 раундов селекции Ni-NTA сефароза в качестве носителя для иммобилизации His₆-Obe была заменена на Ni-NTA-модифицированные магнитные частицы. Такая замена позволяет дополнительно снизить вероятность получения нецелевых аптамеров со сродством к носителю, а также повышает эффективность промывок после инкубации библиотеки с белком-мишенью за счет более надежного отделения частиц от раствора при магнитной сепарации. Для увеличения давления селекции и отбора более аффинных аптамеров от раунда к раунду последовательно уменьшали количество белка, время инкубации библиотеки с мишенью, а также увеличивали число промывок после инкубации (см. таблицу в Приложении 3). Для анализа обогащения библиотеки в ходе селекции использовали описанный выше метод термической денатурации дцДНК-библиотек в присутствии SYBR Green I (раздел 3.2.1). Как видно из кривых плавления дцДНК-библиотек (рис. 36А), при увеличении числа раундов отбора происходит последовательное увеличение температуры плавления библиотек. Это свидетельствует о снижении разнообразия нуклеотидных последовательностей, характерном для процесса обогащения библиотеки.

При исследовании образования комплексов обогащенных библиотек с His₆-Obe методом задержки в геле было показано постепенное увеличение аффинности библиотеки на 6-ом и 8-ом раундах отбора. Различия сродства обогащенных библиотек после 8-го и 10-го раундов селекции были незначительными (рис. 36Б). Полученные результаты согласуются с данными анализа обогащения библиотеки методом термической денатурации дцДНК-библиотек в присутствии SYBR Green I и говорят о том, что библиотека обогащается именно 2'-F-РНК со сродством к белку-мишени.

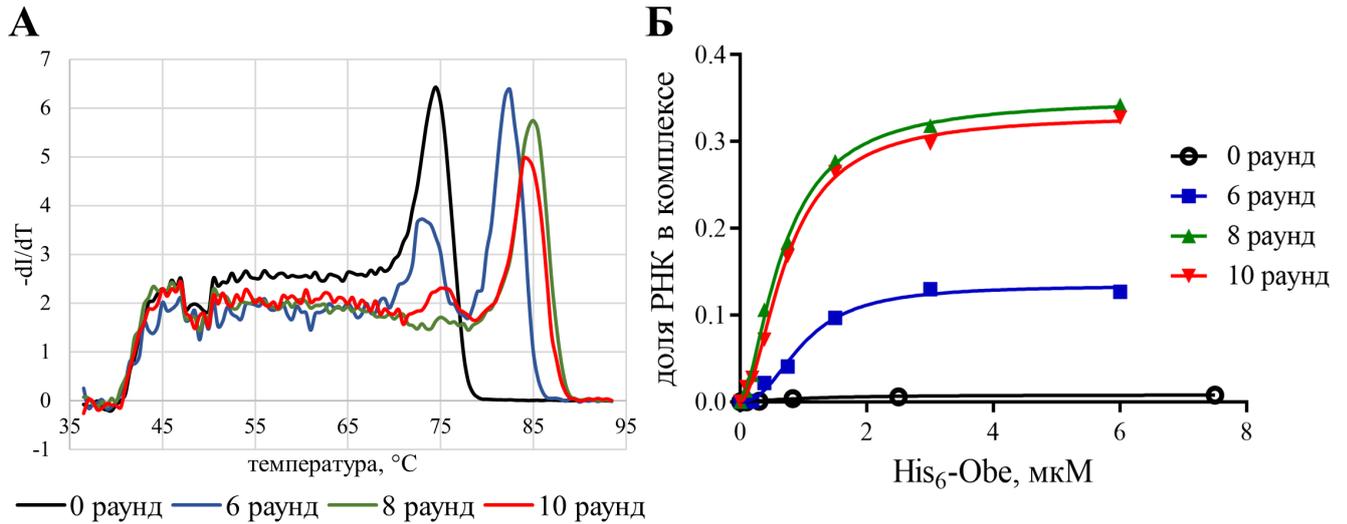


Рисунок 36. Анализ обогащения библиотеки в ходе селекции на His₆-Obe. **А.** Нормализованные дифференциальные кривые плавления исходной и обогащенных дцДНК-библиотек в присутствии SYBR Green I. Анализ был проведен к.х.н., н.с. П. Е. Воробьевым (ЛСБ ИХБФМ СО РАН). **Б.** Кривые связывания радиоактивно меченых исходной и обогащенных 2'-F-РНК-библиотек, полученные методом задержки в геле.

Чтобы выяснить, участвуют ли праймер-связывающие участки обогащенной 2'-F-РНК-библиотеки после 10 раундов отбора в образовании структур, необходимых для связывания His₆-Obe, мы исследовали образование РНК-белковых комплексов в присутствии блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов, комплементарных константным участкам. Анализ связывания библиотеки с мишенью методом задержки в геле показал, что блокирование 3'-константного участка не оказывало заметного влияния на сродство библиотеки к His₆-Obe. В то же время, блокирование 5'-константного или одновременное блокирование 3'- и 5'-константных участков приводило к значительному снижению количества РНК-белковых комплексов (рис. 37).

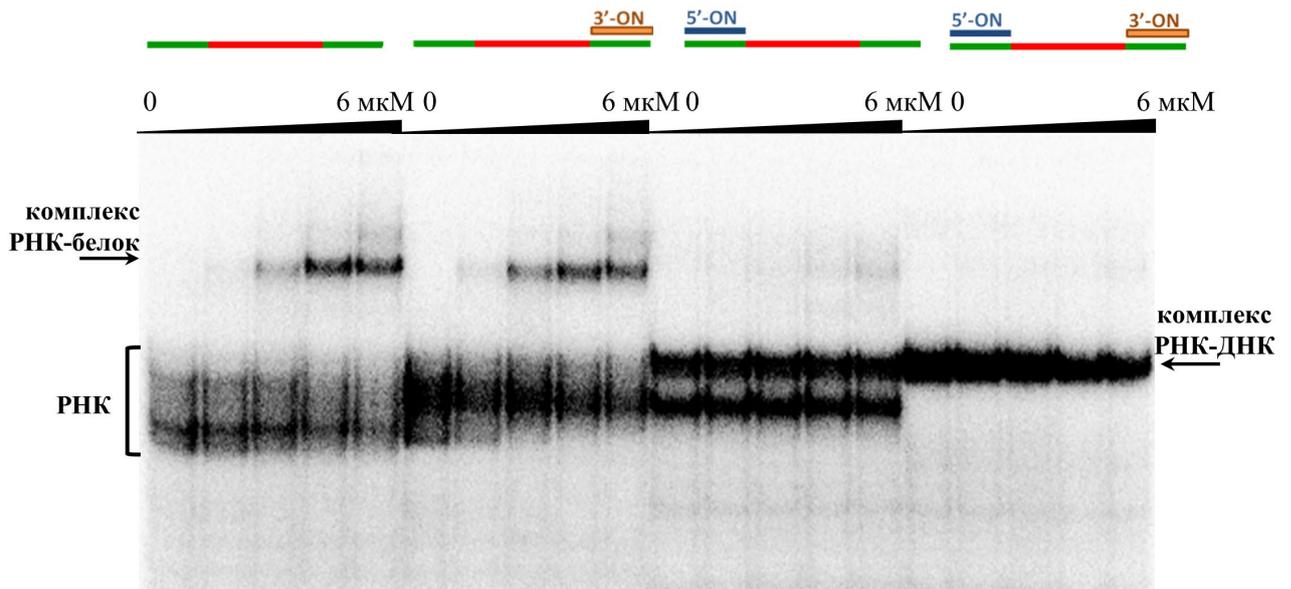


Рисунок 37. Анализ связывания обогащенной 2'-F-РНК-библиотеки с His₆-Obe в присутствии блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов методом задержки в 6 %-ном неденатурирующем ПААГ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для большинства аптамерных 2'-F-РНК в составе обогащенной библиотеки 3'-праймер-связывающий участок не участвует в формировании функционально активных пространственных структур, обеспечивающих связывание с обелином.

Для увеличения сродства 2'-F-РНК-библиотеки к His₆-Обе были проведены два дополнительных раунда селекции. Для удаления последовательностей с низкой аффинностью для промывки после инкубации обогащенной библиотеки с мишенью был использован буферный раствор, содержащий 0.5 М NaCl (11-й раунд) или 0.5 М мочевины (12-й раунд).

Обогащенные библиотеки после 6, 10 и 12 раундов селекции, а также исходную библиотеку переводили в дцДНК-форму и секвенировали на платформе MiSeq (Illumina) в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН. После биоинформатического анализа данных секвенирования ДНК восстанавливали последовательности РНК в составе библиотек. Наиболее часто встречающиеся в обогащенных библиотеках последовательности 2'-F-РНК представлены в табл. 12.

Таблица 12. Нуклеотидные последовательности кандидатных 2'-F-РНК-аптамеров после селекции на обелин.

аптамер	нуклеотидная последовательность рандомизированного участка, 5'-3'	частота встречаемости, %		
		6 раунд	10 раунд	12 раунд
O1	UGUGAAGUCGCAUUUAAUUGCUGGCC <u>CC</u> GUUUACUUGCUC	16.1	4.8	0.0
O2	UGGCGCCACCUAAUGCUCAGUACUUAUUUAUGGCGAACCA	11.8	0.0	0.0
O3	UGUGAAGUCGCA <u>C</u> UUAG <u>U</u> UGCUGGCCG <u>U</u> CGUUUACUUGCUC	6.7	14.2	0.0
O4	CUAGGCUGUGCGCGGUGCCCUAUCUUAUCCGCGCCUCUCU	0.5	12.4	28.0
O5	GUUGUACGCGGUUGGCAAUCCGCGUUGCUUUACGGGUUCC	2.0	8.8	7
O6	GACGUGCGCGGAAAGACCGACGCUCUACCCCUACAAGCUU	2.3	17.0	12.0
O7	AGGGUGCCGCCUAAACACUCUAUUUAUAUGAUCGGCAUACC	5.0	0.0	0.0
O8	UGAGGCUCAGAGGCUACCAUAACCCUUUAUAACGACUAGC	3.3	0.0	0.0
O9	CAGGAUACCAAAACCUUUCAUUAUCUAAUUAUCCGCAGGC	2.9	0.0	0.0
O10	AGAGAAUUGGGGUUCCUGCCCAAGUAUACCAUUUUUGA	3.9	0.0	0.0
O11	CAGGGUGCCUACAUCCGAAUUAUAUCUGCACCCGCGCGC	0.0	3.9	3.8
O12	CGGGGCCAGCAUACCACAUUUCAAUUUACCCCGUUUCUA	1.8	0.0	0.0
O13	GGUGAAGUCGCAUUUGUCAUUCAGCUGCUGGCGUCGUUG	2.2	0.2	0.0
O14	CAGGGUGCCUACAUCCGAAUUAUAUCUGCACCCGCGCGC	1.5	0.0	0.0
O15	GCCUUGGACAAAUGGGGAUAAUUAUAGCCCGCCUUCGCAC	0.0	2.3	0.0
O35	UAGGGUACGCGGACAGCGAUGGGACCGCGUUGCCAGCCCC	0.0	0.6	17.0
O79	UGUGAAGUCGCAUUUAAUUGCUGGCCCGUUUACUUGCUC	2.7	25.2	11.0
O80	GACGUGCGCGGAAAGACCGACGCUCUACCCGAACAAGC	0.1	3.2	0.0
O115	GUGGAAUUAAGUACGCGUGCCUAACCGUGACCUCACCGGU	0.0	0.2	1.2
O257	ACAGCCUUUUGCUGACGGAAUGACCAAUCCGUAUCCACUG	0.0	0.6	1.3

Все C и U - 2'-F-пиримидиновые нуклеотиды. Подчеркиванием выделены нуклеотиды, различающиеся в последовательностях O1, O3 и O79.

Анализ данных секвенирования выявил существенные различия между наиболее представленными последовательностями библиотек после 6, 10 и 12 раундов селекции. Динамика изменения доли аптамеров в обогащенных библиотеках представлена в табл. 12. Как видно из представленных данных, после 10-го раунда селекции 77.6 % от всех последовательностей

составили аптамеры O79 (25.2 %), O6 (17 %), O3 (14.2 %), O4 (12.4 %) и O5 (8.8 %). После двух дополнительных раундов селекции доля последовательности O79 в библиотеке уменьшилась до 11 %, O6 – до 12 %, O3 – до 0 %, O5 – до 7 %, а доля O4 увеличилась более, чем в 2 раза, до 28 %. Интересно отметить, что различия в нуклеотидных последовательностях аптамеров O1, O3 и O79 составляют всего несколько нуклеотидов (выделены подчеркиванием в табл. 12). Кроме того, среди лидирующих в библиотеке после 12 раундов последовательностей 2'-F-РНК был дополнительно выявлен аптамер O35, доля которого увеличилась с 0.6 до 17 % после двух дополнительных раундов селекции. Таким образом, для последующего анализа аффинности были выбраны аптамеры O3, O4, O5, O6, O35 и O79.

3.3.2. Дизайн и синтез укороченных 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих обелин

При исследовании влияния константных участков в составе обогащенной библиотеки после 10-го раунда на связывание белка-мишени было показано, что 3'-константный участок не является необходимым для связывания (см. раздел 3.3.1). На основании этого мы предположили, что у доминирующих в данной библиотеке аптамеров O3, O4, O6 и O79 этот фрагмент может быть удален без существенного влияния на сродство к обелину. Соответственно, нуклеотидные последовательности данных аптамеров были укорочены с 87 до 63–64 нуклеотидов с получением вариантов O3t, O4t, O6t и O79t (табл. 13).

Таблица 13. Нуклеотидные последовательности индивидуальных 2'-F-РНК-аптамеров.

аптамер	нуклеотидная последовательность, 5'-3'	длина, нт
O3t	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAAAUGUGAAGUCGCACUUAGUUGCUGGCGUCGU UUACUUGCUC(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~C ₆ NH ₂	63
O4t	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAACUAGGCUGUGCGCGGUGCCCUAUCUUAUCC GCGCCUCUCCU(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~C ₆ NH ₂	64
O6t	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAAGACGUGCGCGGGAAAGACCGACGCUCUACC CCUACAAGCU(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~C ₆ NH ₂	63
O79t	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAAAUGUGAAGUCGCAUUUAAUUGCUGGCGCCGU UUACUUGCUC(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~C ₆ NH ₂	63
O79	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAAAUGUGAAGUCGCAUUUAAUUGCUGGCGCCGU UUACUUGCUCUUCGACAGGAGGCUCACAACAGGC(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~C ₆ NH ₂	87
O5	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAAGUUGUACGCGGUUGGCAAUCCGCGUUGCUU UACGGGUUCCUUCGACAGGAGGCUCACAACAGGC(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~C ₆ NH ₂	87
O35	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAAUAGGGUACGCGGACAGCGAUGGGACCGCGU UGCCAGCCCUUCGACAGGAGGCUCACAACAGGC(OCH ₂ CH ₂) ₆ p~C ₆ NH ₂	87

Все С и U - 2'-F-пиримидиновые нуклеотиды.

Предполагаемые вторичные структуры всех синтезированных аптамеров, полученные по данным VIENNA RNAfold, представлены на рис. 38.

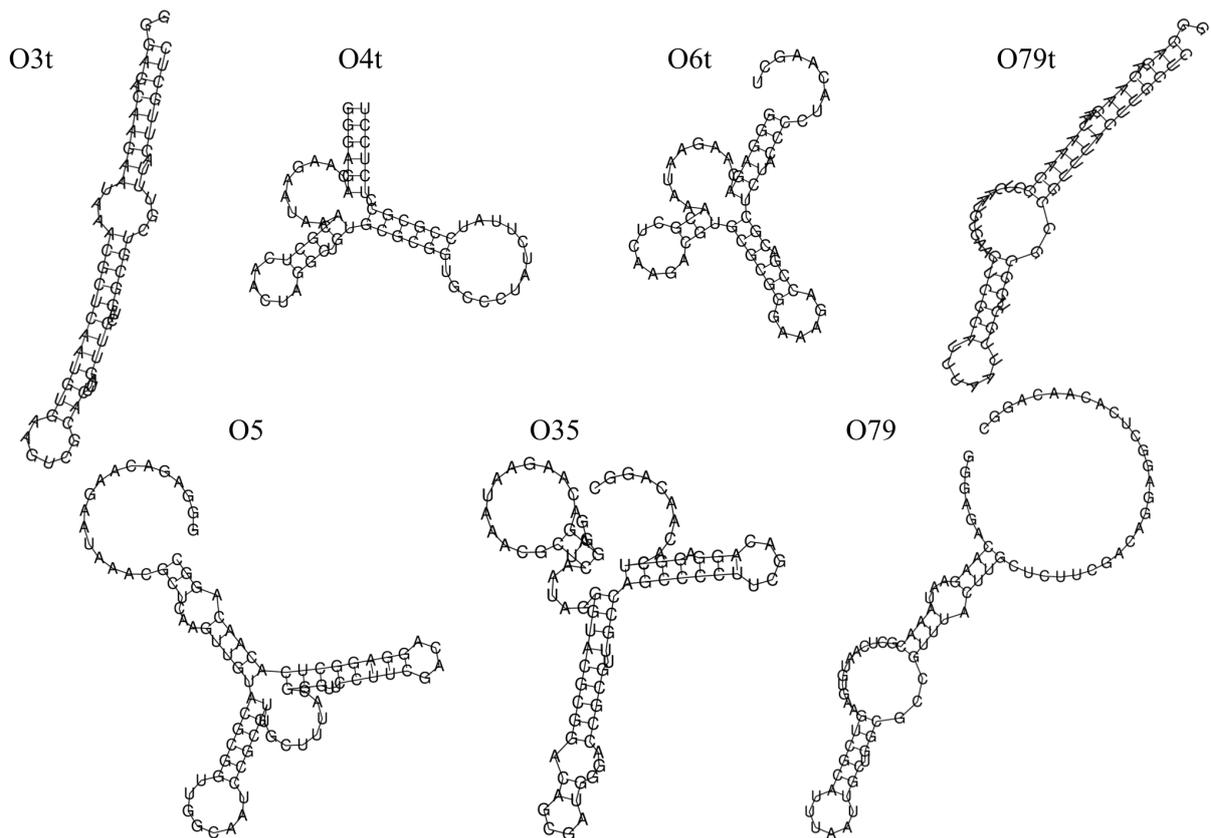


Рисунок 38. Предполагаемые вторичные структуры индивидуальных 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих обелин, полученные по данным программы VIENNA RNAfold.

Все аптамеры были химически синтезированы твердофазным фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе ASM-800. На стадии автоматического синтеза на 3'-конец всех аптамеров была введена аминогруппа для последующей иммобилизации на твердой подложке, а также для синтеза конъюгатов аптамеров с биотином или флуоресцентными красителями. Аминогруппу в состав олигорибонуклеотидов вводили через протяженный линкер, состоящий из 18 атомов (spacer18), чтобы минимизировать потенциальное влияние вводимых функциональных групп на пространственную структуру аптамеров.

3.3.3. Анализ связывания индивидуальных 2'-F-РНК-аптамеров с обелином

Для определения сродства индивидуальных 2'-F-РНК-аптамеров к His₆-Obe был использован метод задержки в геле. При этом РНК-белковые комплексы были хорошо различимы на электрофореграммах в виде полос с четкими границами только для аптамеров O3t и O79t (рис. 39А). Для аптамеров O4t, O6t, O5 и O35 полосы слабой интенсивности, соответствующие РНК-белковым комплексам, наблюдались только при максимальной концентрации белка (рис. 39Б), а в ряде случаев мы вообще не наблюдали РНК-белковых комплексов. Мы предположили, что данные комплексы могут быть неустойчивы в условиях проведения электрофоретического анализа.

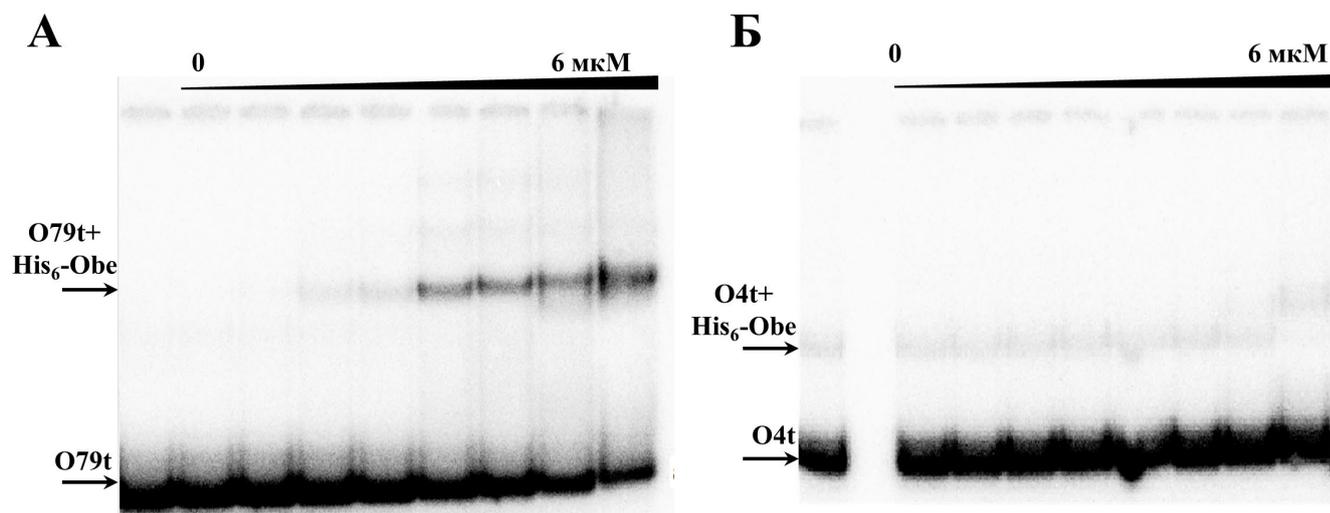


Рисунок 39. Анализ связывания 5'- $[^{32}\text{P}]$ -меченых аптамеров O79t (А) и O4t (Б) с His₆-Obe методом задержки в 6 %-ном неденатурирующем ПААГ.

В качестве альтернативы электрофорезу для исследования формирования комплексов индивидуальных аптамеров с обелином мы использовали метод DRACaLA (Differential Radial Capillary Action of Ligand Assay, анализ дифференциальной радиальной капиллярной подвижности лиганда), основанный на различиях в подвижности свободных $[^{32}\text{P}]$ -меченых нуклеиновых кислот и НК-белковых комплексов после точечного нанесения исследуемого раствора на поверхность сухого нитроцеллюлозного фильтра [166]. Данный метод позволяет детектировать комплексы, нестабильные в условиях электрофоретического разделения. При капиллярной диффузии комплекс нуклеиновой кислоты с белком обладает меньшей подвижностью и за счет этого образует круг меньшего диаметра внутри круга большего диаметра, соответствующего свободной нуклеиновой кислоте. Использование данного метода позволило визуализировать комплексы с His₆-Obe для всех исследуемых аптамеров (рис. 40).

Представляло интерес оценить влияние гексагистидинового фрагмента в составе белка-мишени на связывание аптамеров. Следует отметить, что в подавляющем большинстве работ, описывающих селекцию аптамеров на His₆-содержащие белки, подобный анализ не проводится. Более того, зачастую для характеристики аффинности и селективности аптамер-белковых взаимодействий, а также для тестирования биоаналитических систем на основе аптамеров также используют His₆-модифицированный белок, а не белок дикого типа. В рамках данной работы был проведен анализ связывания индивидуальных аптамеров с обелином дикого типа (wt-Obe) методом DRACaLA. Как видно из данных, приведенных на рис. 40, аптамеры O3t и O79t связываются с обоими белками. При этом значения K_d для аптамер-белковых комплексов, рассчитанные из данных DRACaLA (табл. 14), зависели от типа обелина. В случае wt-Obe наблюдалось двукратное увеличение значения K_d для аптамера O79t и пятикратное – для аптамера O3t. Аптамеры O4t, O6t, O5 и O35 связывались только с His₆-Obe и не формировали

комплексов с wt-Obe во всем исследованном диапазоне концентраций белка (рис. 40, панель «wt-Obe»).

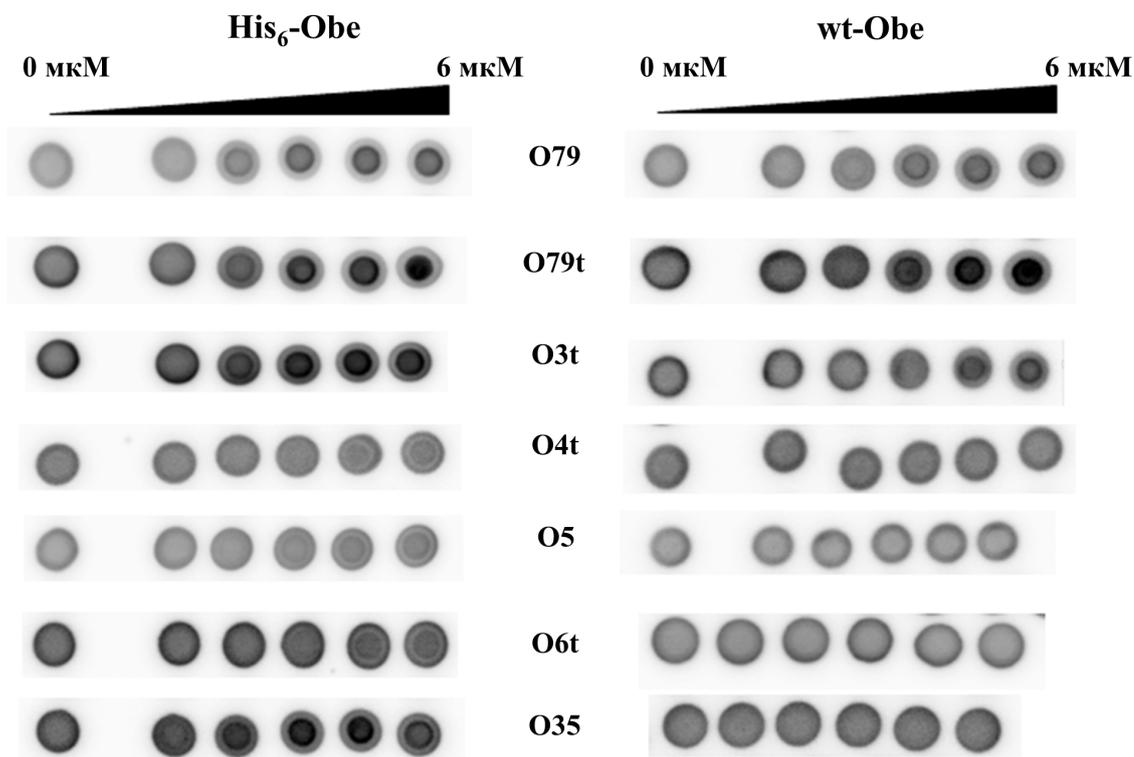


Рисунок 40. Исследование образования комплексов индивидуальных 5'- ^{32}P -меченых 2'-F-РНК-аптамеров с His₆-Obe и wt-Obe методом DRACaLA. Анализ связывания выполнен совместно с к.х.н., н.с. П. Е. Воробьевым (ЛСБ ИХБФМ СО РАН).

Интересно отметить, что похожие результаты были получены Ш. Цудзи [200] в ходе селекции РНК-аптамеров, связывающих фактор ингибирования миграции макрофагов с гексагистиридиновым линкером (His-MIF). Авторами были получены аптамеры, обладающие высокой аффинностью по отношению именно к His₆-содержащему белку, но не к белку дикого типа. Кроме того, было показано, что отобранные аптамеры связывались именно с His₆-фрагментом в составе белковой мишени.

Таблица 14. Значения K_d комплексов индивидуальных аптамеров с His₆-Obe и wt-Obe.

аптамер	K_d , мкМ	
	His ₆ -Obe	wt-Obe
O79	0.28±0.06	0.69±0.09
O79t	0.34±0.06	0.72±0.10
O3t	0.23±0.05	1.37±0.16
O4t	0.58±0.34	нет связывания
O6t	0.94±0.39	нет связывания
O35	0.12±0.04	нет связывания
O5	0.45±0.14	нет связывания

Логично было предположить, что в нашем случае аптамеры, узнающие только His₆-содержащий обелин, также связываются с гексагистидиновым фрагментом. Чтобы проверить это предположение, было проанализировано связывание этих аптамеров с другим His₆-содержащим белком - зеленым флуоресцентным белком (His-GFP). По данным анализа связывания методом DRACaLA, только аптамер O35 связывался с His₆-GFP, при этом значение константы диссоциации комплекса составило 2.2 ± 0.6 мкМ, что говорит о существенно более низком сродстве к His-GFP по сравнению с His₆-Obe (значения констант различаются приблизительно на порядок). Это позволило предположить, что аптамер O35 связывается преимущественно с His₆-фрагментом, но одновременно с этим имеет место дополнительная стабилизация комплекса за счет взаимодействия с другими участками белковой молекулы. В случае же аптамеров O4t, O5 и O6t связывание происходит не только с His₆-линкером, но и с другими аптамопами в составе обелина. При этом, по-видимому, связывание с His₆-линкером является необходимым условием формирования РНК-белкового комплекса. Полученные нами результаты убедительно показывают, что аптамеры, полученные селекцией на гексагистидин-модифицированный белок, могут быть высокопредставленными в обогащенной библиотеке и проявлять высокое сродство к мишени селекции, но при этом не образовывать комплексов с белками дикого типа. Это говорит о необходимости тестирования полученных данным способом аптамеров на способность узнавать природный белок-мишень, и критически важно для тех случаев, когда аптамер предназначен для дальнейшего применения в составе диагностических систем или таргетных терапевтических препаратов.

3.3.4. Влияние связывания с аптамером на биолюминесцентную активность обелина

Для дальнейшего использования полученных 2'-F-РНК-аптамеров в качестве нековалентно связывающих обелин модулей в составе бифункциональных аптамерных конструкций необходимо было выяснить, сохраняет ли обелин способность к биолюминесценции после связывания с аптамером. С этой целью была проведена серия экспериментов по исследованию биолюминесценции обелина в комплексе с аптамерами O3t, O4t, O5, O6t, O35 и O79t, иммобилизованными на поверхности микропланшета. На первом этапе проводили иммобилизацию стрептавидина в лунках микропланшета, после чего в те же лунки вносили растворы биотинилированных аптамеров и обелина. Биолюминесценцию обелина инициировали добавлением ионов Ca²⁺, значение интенсивности биолюминесценции рассчитывали по разнице сигнала образца и соответствующей контрольной лунки без аптамера (рис. 41).

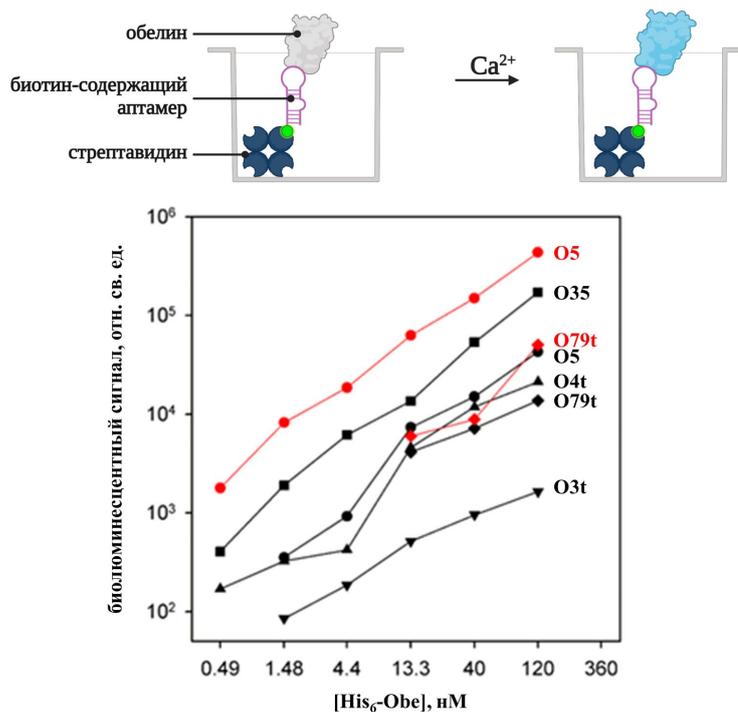


Рисунок 41. Принципиальная схема и результаты исследования биolumинесценции обелина в комплексе с аптамерами. Кривые связывания с His₆-Obe показаны черным цветом, кривые связывания с wt-Obe – красным. Данные получены к.б.н. В.В. Красицкой (ИБФ СО РАН).

Для проведения биolumинесцентного анализа были использованы как гексагистидин-модифицированный обелин His₆-Obe, так и обелин дикого типа wt-Obe. Для всех исследованных аптамеров, кроме аптамера O6, мы наблюдали рост интенсивности биolumинесценции с увеличением концентрации His₆-Obe. В присутствии обелина дикого типа такой эффект наблюдался только для аптамеров O79t и O5.

Суммируя данные по связыванию кандидатных аптамеров с обелином, полученные несколькими способами, можно заключить, что аптамер O79t сохраняет свое сродство к мишени как в условиях гомогенного (DRACaLA, метод задержки в геле), так и в условиях гетерофазного биolumинесцентного анализа. Интересно отметить, что аптамер O5, не связывавший обелин дикого типа по данным DRACaLA, тем не менее продемонстрировал связывание с этой мишенью в гетерофазном формате анализа. Полученные данные позволили рассматривать аптамеры O79t и O5 в качестве аффинных молекул, связывающих оба типа фотопротеина, использованных в данной работе. Важно подчеркнуть, что при связывании аптамера с обелином сохраняется способность белка к биolumинесценции, что позволяет рассматривать полученные аптамеры в качестве основы для создания биolumинесцентных систем детекции белковых молекул.

Поскольку аптамер O79t проявил сродство к обелину во всех экспериментах, и был способен связываться как с использованным в селекции гексагистидин-модифицированным белком, так и с обелином дикого типа, для дальнейшей работы был выбран именно этот аптамер.

3.3.5. Дополнительное укорочение 2'-F-РНК-аптамера O79t

Создаваемые в рамках данной диссертационной работы бифункциональные конструкции на основе двух аптамеров представляют собой единые молекулы 2'-F-РНК, которые необходимо синтезировать химически. В этом контексте минимизация нуклеотидных последовательностей каждого из аптамерных модулей является особенно актуальной. С целью выбора оптимальной длины репортерного обелин-специфичного аптамера была предложена и синтезирована серия минимизированных вариантов аптамера O79t (рис. 42). В случае 44-звенного аптамера O79t1 протяженный двуцепочечный участок был укорочен до 6 пар нуклеотидов, а две терминальных пары нуклеотидов А-У были заменены на пары G-C для общей стабилизации всей структуры. Аптамер O79t2 (19 нт) представлял собой результат ещё более радикального укорочения аптамера O79t с сохранением шпилечного элемента вторичной структуры.

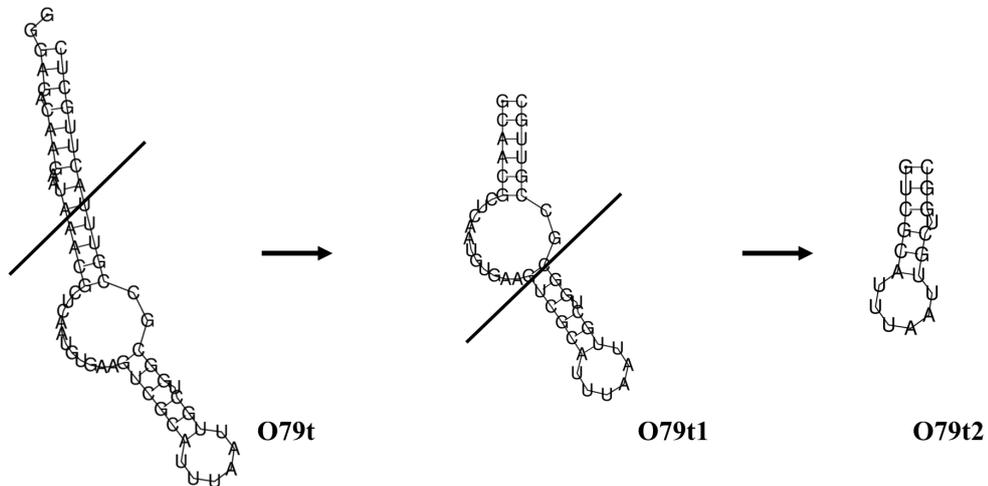


Рисунок 42. Предполагаемая вторичная структура аптамеров O79t, O79t1 и O79t2, полученная с использованием алгоритма Vienna RNAfold. Линиями обозначены границы, в пределах которых удаляли нуклеотиды в составе аптамера.

Исследование связывания аптамеров O79t1 и O79t2 с обелином дикого типа методом DRaCALA показало, что укорочение аптамера O79 до 44 нт привело к увеличению значения K_d примерно в 3 раза (1.9 ± 0.5 мкМ для O79t1 и 0.72 ± 0.10 мкМ для O79), а дальнейшая минимизация привела к полной потере аффинности. Подобное снижение стабильности аптамер-белкового комплекса может быть связано с удалением из состава аптамера нуклеотидных остатков, необходимых для образования специфического комплекса с белком. Можно предположить, что центральный фрагмент аптамера O79t (6 комплементарных пар оснований и соседние неспаренные нуклеотиды) критически важен для связывания обелина.

Таким образом, оптимальным вариантом укорочения аптамера O79 является 44-звенный вариант O79t1, сохраняющий сродство к wt-Obe близкое к сродству полноразмерного аптамера, при значительно меньшей длине олигонуклеотидной цепи.

3.4. Бифункциональные конструкции на основе 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров для детекции гемоглобина человека

3.4.1. Дизайн бифункциональных конструкций

На следующем этапе работы была исследована возможность использования минимизированного аптамера O79t1 для нековалентного связывания обелина в составе бифункциональных конструкций. Предложенные нами в данной работе бифункциональные аптамеры состоят из двух структурных модулей: 1) аптамер, отвечающий за узнавание молекулы-аналита и 2) обелин-специфичный аптамер в качестве модуля, связывающего репортерную молекулу. Основным требованием к таким аптамерным конструкциям является генерация аналитического сигнала только в присутствии аналита. Это означает, что при наличии в образце только обелина бифункциональный аптамер не должен связывать этот белок. Соответственно, необходимо было «замаскировать» в единой структуре молекулы обелин-связывающий модуль таким образом, чтобы он приобретал функциональную активность только после связывания молекулы-аналита. Для решения данной задачи мы использовали рациональный дизайн бифункциональной конструкции, основанный на следующих принципах: в составе бифункциональной конструкции аналит-связывающий аптамер практически не изменяет свою структуру, в то время как фрагмент обелин-связывающего аптамера образует комплементарный комплекс с фрагментом первого модуля или с дополнительным олигонуклеотидным линкером. За счет этого вторичная структура обелин-связывающего аптамера в составе бифункциональной конструкции отличается от структуры свободного аптамера, необходимой для связывания с мишенью. Связывание аналита с соответствующим аптамерным модулем приводит к «переключению» функциональной активности двухаптамерной конструкции - структурным перестройкам всей молекулы, в результате которых обелин-связывающий аптамер приобретает пространственную структуру, необходимую для связывания с обелином. При добавлении обелина в систему происходит его связывание с аптамером, что позволяет регистрировать специфический биолюминесцентный сигнал после добавления ионов Ca^{2+} . Имобилизация бифункциональной конструкции в лунках микропланшета позволяет удалять несвязавшиеся молекулы обелина путем стандартной промывки лунок. Принципиальная схема детекции представлена на рис. 43.

Чтобы проверить предложенную стратегию конструирования бифункциональных аптамеров на практике, в качестве аптамерных модулей мы использовали 2'-F-РНК-аптамеры H9t11 и O79t1 со сродством к суммарному гемоглобину и обелину, соответственно. Оба аптамера характеризуются оптимальным соотношением длины и аффинности по отношению к своим молекулярным мишеням. Теоретически, аптамеры в составе бифункциональных конструкций могут быть соединены напрямую (в разном порядке) или через дополнительный линкер между

аптамерными модулями. Как правило, для соединения аптамерных модулей в составе единой конструкции используют «нейтральные» нуклеотидные последовательности, такие как A₁₀ или (dT)₁₀, или гексаэтиленгликолевый линкер, позволяющие аптамерам одновременно связываться с белковыми мишенями [4]. Однако для бифункциональных конструкций, обеспечивающих последовательное связывание мишеней, нуклеотидная последовательность линкерного фрагмента вносит заметный вклад во вторичную структуру всей конструкции и определяет возможность «переключения» функциональной активности за счет структурных перестроек. Длину олигонуклеотидного линкера выбирали таким образом, чтобы дуплекс с его участием обеспечивал стабильность «выключенной» вторичной структуры обелин-связывающего аптамера, но не фиксировал общую структуру молекулы слишком жестко и давал возможность ее перестройки после связывания гемоглобина с гемоглобин-узнающим аптамером.

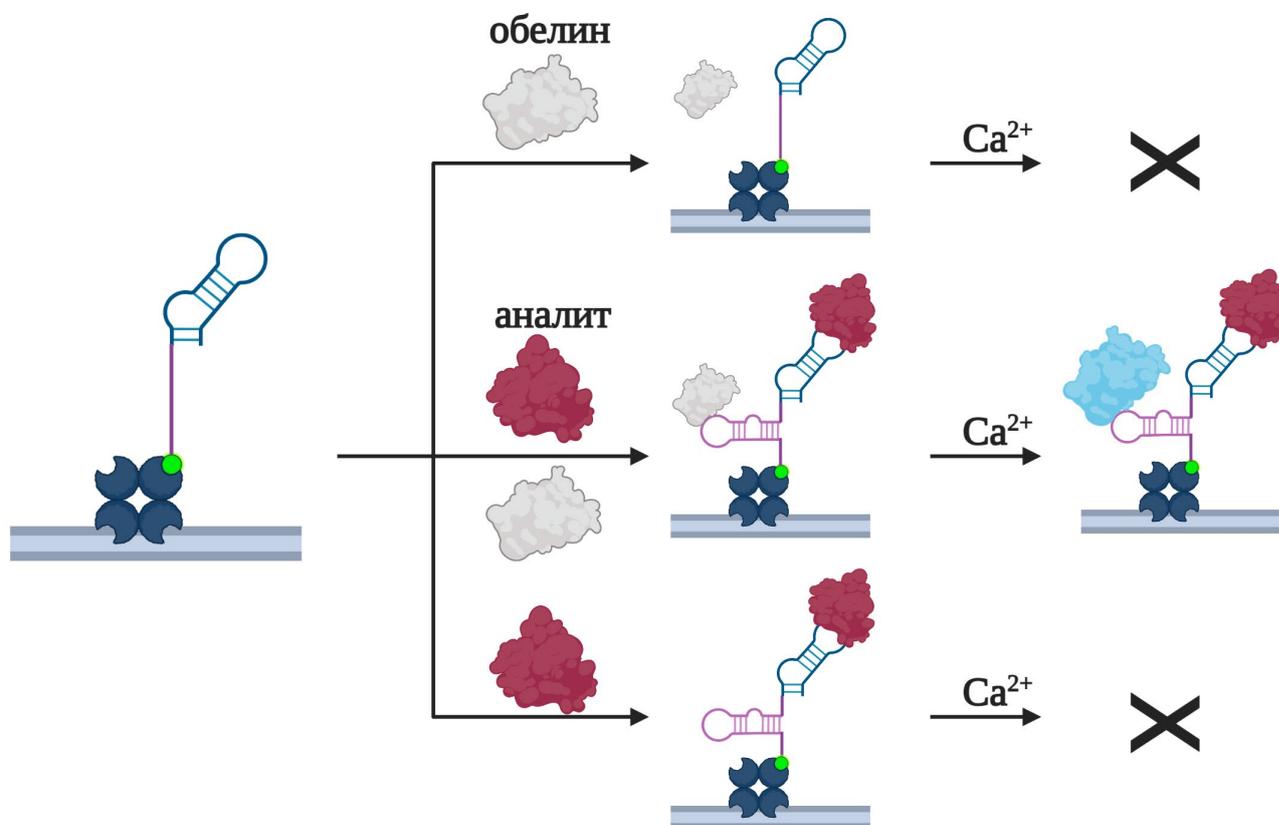


Рисунок 43. Принципиальная схема микропланшетной билюминесцентной детекции аналита с помощью бифункционального аптамера.

На основании анализа предполагаемых вторичных структур для набора вариантов бифункциональных аптамеров мы выбрали три аптамера, соответствующих нашим требованиям (рис. 44). В первом варианте 5'-концевой нуклеотид Hb-связывающего аптамера непосредственно присоединялся к 3'-концевому нуклеотиду Obе-узнающего аптамера (5'-O79t1-H9t11-3'), а во втором варианте аптамеры были соединены гексануклеотидным линкером, соответствующим 3'-концевому фрагменту аптамера O79t1 (5'-H9t11-L-O79t1-3' и 5'-O79t1-L-H9t11-3').

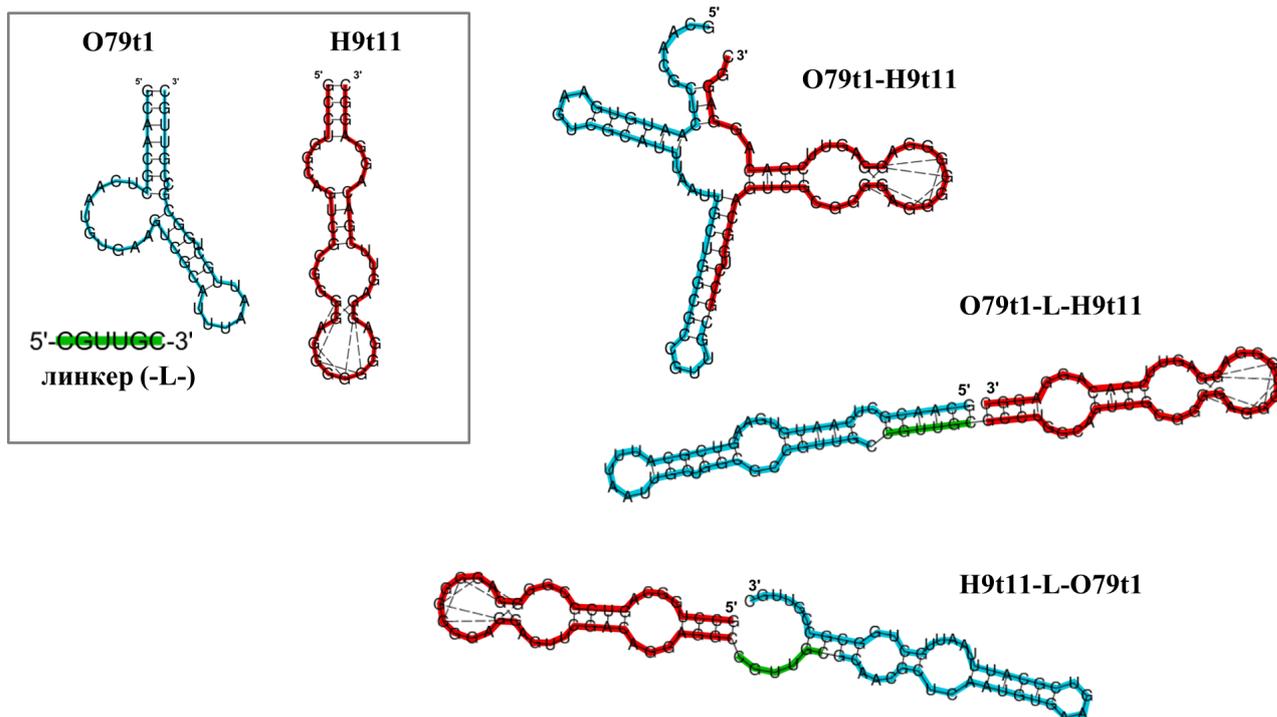


Рисунок 44. Предполагаемые вторичные структуры бифункциональных 2'-F-РНК-аптамеров, полученные по данным Vienna RNAfold. Обелин-связывающий аптамер отмечен синим цветом, гемоглобин-связывающий аптамер – красным цветом, зеленым цветом обозначен гексануклеотидный линкер, соединяющий два аптамерных модуля. Пунктирными линиями соединены остатки гуанозина, участвующие в формировании G4.

Все три варианта бифункциональных аптамеров были химически синтезированы на автоматическом синтезаторе. Для иммобилизации аптамеров на подложке на 3'-конец всех последовательностей вводили аминогруппу для последующего конъюгирования с биотином.

3.4.2. Гетерофазный биолюминесцентный анализ связывания бифункциональных аптамеров с гемоглобином

Созданные бифункциональные аптамеры были использованы для биолюминесцентной детекции гемоглобина в микропланшетном формате. Для этого биотинилированные производные аптамеров иммобилизовали в лунках микропланшета с предварительно сорбированным стрептавидином и инкубировали с различными концентрациями гемоглобина в присутствии постоянной концентрации обелина (100 нМ). После добавления раствора CaCl_2 измеряли интенсивность биолюминесцентного сигнала (схема на рис. 45).

Для всех трех бифункциональных аптамеров при добавлении гемоглобина в систему регистрировали увеличение интенсивности биолюминесцентного сигнала, пропорциональное концентрации аналита (рис. 45). Зависимости величины сигнала от концентрации гемоглобина характеризовались небольшими отличиями. Так, линейное возрастание интенсивности сигнала для аптамера O79t1-L-H9t11 наблюдалось в диапазоне концентраций от 1.6 до 50 нМ, для

аптамера H9t11-L-O79t1 в диапазоне от 3.1 до 50 нМ, для аптамера O79t1-H9t11 в диапазоне от 6.25 до 50 нМ.

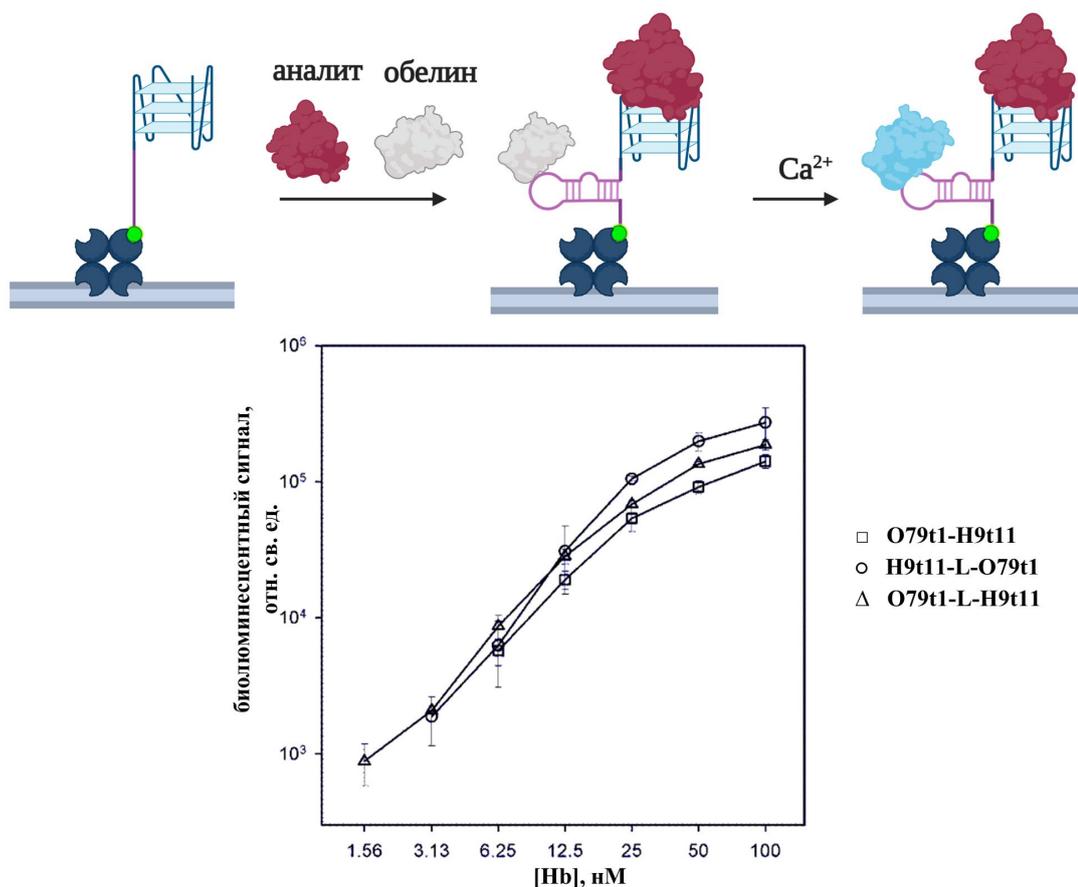


Рисунок 45. Биолуминесцентная детекция суммарного гемоглобина с помощью бифункциональных аптамеров при одновременном добавлении обелина (100 нМ) и суммарного гемоглобина (1.56–100 нМ). Данные получены к.б.н. В. В. Красицкой (ИБФ СО РАН).

Созданные бифункциональные конструкции позволяют генерировать специфический биолуминесцентный сигнал при связывании гемоглобина в диапазоне наномолярных концентраций белка. Таким образом, чувствительность предложенного метода сопоставима с чувствительностью ранее описанных в литературе аптасенсоров с другими типами аналитического сигнала (см. раздел 1.5.6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящей диссертационной работы методом селекции *in vitro* были получены 2'-F-РНК-аптамеры, способные специфично связывать суммарный и/или гликированный гемоглобины человека. Ранее в литературе был описан ряд ДНК-аптамеров к гемоглобинам. Учитывая более высокую биологическую устойчивость 2'-F-РНК-аптамеров, они могут стать более перспективной альтернативой ДНК-аналогам для создания диагностических систем. Минимизация нуклеотидных последовательностей полученных аптамеров позволила сократить их длину с 87 до 43-44 нуклеотидов с сохранением аффинности по отношению к белковым мишеням. Анализ вторичной структуры 2'-F-РНК-аптамеров к гемоглобину показал, что наиболее вероятной структурой в их составе является параллельный G-квадруплекс. Следует отметить, что в литературе по НК-квадруплексам преобладают работы по квадруплексным структурам в составе ДНК. Примеров РНК-квадруплексов и характеристики их структуры описано значительно меньше, причем в силу структурных особенностей РНК-квадруплексов установление их строения является более сложной задачей.

Полученных 2'-F-РНК-аптамеров были протестированы в качестве узнающих элементов в составе биоаналитических систем с оптическим типом детекции для определения суммарного гемоглобина. Показано их успешное использование для колориметрического анализа в системе с прямой иммобилизацией белка-аналита в лунки микропланшета, а также в сэндвич-формате с использованием антител для иммобилизации аналита. Отметим, что использование пары аптамеров для конструирования системы детекции гемоглобина в сэндвич-формате давало высокий неспецифический сигнал, что может быть связано с образованием комплексов между аптамерами независимо от наличия в пробе молекулы-аналита. Подобную возможность следует всегда учитывать при конструировании сэндвич-систем детекции на основе двух аптамеров.

В данной работе были получены как аптамер, узнающий гликированный и негликированный гемоглобин, так и аптамер, селективно связывающий только гликированный белок. Это позволило нам создать систему билюминесцентной гетерофазной детекции для определения относительного уровня гликированного гемоглобина (3.75-15 %) в образцах с преобладанием негликированного белка. Данная система детекции пока опробована только в модельных растворах. Её использование для анализа реальных клинических образцов требует дополнительной оптимизации (концентраций компонентов системы, буферных растворов, температура и время инкубации на отдельных стадиях протокола).

Для создания принципиально новых билюминесцентных систем детекции с нековалентным связыванием репортерного фотопротейна обелина получены соответствующие 2'-F-РНК-аптамеры. В данном случае при селекции аптамеров в качестве мишени использовали рекомбинантный обелин, содержащий концевой гексагистидиновый фрагмент для

иммобилизации на Ni-содержащий носитель. Характеризация индивидуальных аптамеров после отбора показала, что в ходе селекции происходит значительное обогащение библиотеки не только аптамерами, узнающими в основном белок-мишень, но и аптамерами, которым для связывания с мишенью строго необходим His₆-фрагмент. На данный момент селекция на His₆-модифицированные белки является одним из наиболее популярных способов получения аптамеров, причем для их характеристики в большинстве случаев используют тот же самый белок, что и при отборе. Полученные нами результаты указывают на необходимость тестирования аптамеров, полученных данным способом, на способность узнавать природный белок-мишень. Это особенно важно для тех случаев, когда аптамер предназначен для дальнейшего применения в составе диагностических систем или адресных терапевтических препаратов.

Наиболее удачный 2'-F-РНК-аптамер к обелину был использован для создания бифункциональных аптамеров с двойной специфичностью гемоглобин/обелин и переключаемой функциональной активностью. Была продемонстрирована принципиальная возможность использования таких аптамеров для биолюминесцентной детекции суммарного гемоглобина с иммобилизацией бифункционального аптамера в лунках микропланшета. К достоинствам этого метода детекции можно отнести сокращение числа стадий анализа за счет одновременного добавления анализируемого и репортерного белков, возможность использования свободного обелина без каких-либо дополнительных модификаций, а также возможность ренатурации аптамерной молекулы в режиме «нагрев-охлаждение» перед началом анализа без риска термической денатурации репортерного белка.

Предложенная в данной работе стратегия конструирования бифункциональных обелин-связывающих аптамеров с переключаемой активностью по своей сути является универсальной и, предположительно, может быть в дальнейшем адаптирована для создания систем детекции других белковых мишеней.

* * *

Работа выполнена совместно с лабораторией фотобиологии Института биофизики СО РАН (ФИЦ «Красноярский научный центр»).

Исследования выполнялись в рамках проекта РФФИ № 16-14-10296 и проектов базового бюджетного финансирования ИХБФМ СО РАН № АААА-А17-117020210021-7 и ИБФ СО РАН № АААА-А19-119031890015-0.

ВЫВОДЫ

1. Методом селекции *in vitro* получены новые 2'-F-РНК-аптамеры, способные связывать суммарный гемоглобин человека либо только гликированный гемоглобин HbA1c. Оптимизированы нуклеотидные последовательности аптамеров, охарактеризовано их сродство к мишеням. Полученные аптамеры могут быть использованы для билюминесцентной микропланшетной детекции гликированного и суммарного гемоглобина.
2. Наиболее вероятной структурой в составе гемоглобин-связывающих аптамеров H5t11, H9t11 и gH8t является параллельный G-квадруплекс.
3. Аптамер H9t1 может быть использован для колориметрической микропланшетной детекции суммарного гемоглобина как в системе с прямой иммобилизацией анализируемого белка, так и в сэндвич-формате с применением специфических антител.
4. Впервые методом селекции *in vitro* получены 2'-F-РНК-аптамеры, способные связывать фотопротеин обелин. Охарактеризовано их сродство к гексагистидин-содержащему обелину и обелину дикого типа. За счет оптимизации нуклеотидной последовательности аптамер O79 укорочен с 87 до 44 нуклеотидных звеньев с сохранением высокой аффинности к мишени.
5. Впервые предложена стратегия нековалентного связывания обелина через соответствующий аптамер при создании билюминесцентных систем детекции. Создана серия новых бифункциональных конструкций с переключаемой активностью, содержащих в одной молекуле гемоглобин-связывающий и обелин-связывающий аптамерные модули. Показана принципиальная возможность их использования для билюминесцентной микропланшетной детекции гемоглобина.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Vorobyeva M. A., Davydova A. S., Vorobjev P.E., Pyshnyi D. V. and Venyaminova A. G. Key aspects of nucleic acid library design for in vitro selection // Int. J. Mol. Sci. - 2018. - V. 19. – P. 470. (обзор).
2. Красицкая В. В., Давыдова А. С., Воробьева М. А., Франк Л. А. Ca²⁺-регулируемый фотопротейн обелин как мишень для отбора РНК-аптамеров // Биоорг. химия. - 2018. - Т. 44. - С. 287–293.
3. Davydova A. S., Krasheninina O. A., Tupikin A. E., Kabilov M. R., Venyaminova A. G., and Vorobyeva M. A. Synthesis of random DNA libraries for in vitro selection and analysis of their nucleotide composition // Russ. J. Bioorg. Chem. - 2019. - V. 45. - P. 655–660.
4. Davydova A., Vorobyeva M., Bashmakova E., Vorobjev P., Krasheninina O., Tupikin A., Kabilov M., Krasitskaya V., Frank L., Venyaminova A. Development and characterization of novel 2'-F-RNA aptamers specific to human total and glycosylated hemoglobins // Anal. Biochem. - 2019.- V. 570. - P. 43-50.
5. Davydova A. S., Timoshenko V. V., Lomzov A. A., Pyshnyi D. V., Venyaminova A. G., Vorobyeva M. A. G-quadruplex 2'-F-modified RNA aptamers targeting hemoglobin: structure studies and colorimetric assays // Anal. Biochem. - 2020. - V. 611. – P. 113886.
6. Davydova A., Krasitskaya V., Vorobjev P., Timoshenko V., Tupikin A., Kabilov M., Frank L., Venyaminova A. and Vorobyeva M. Reporter-recruiting bifunctional aptasensor for bioluminescent analytical assays // RSC Adv. - 2020. - V. 10. – P. 32393.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang C.G., Chang S.J., Settu K., Chen C.J., Liu J.T. High-sensitivity glycated hemoglobin (HbA1c) aptasensor in rapid-prototyping surface plasmon resonance // *Sens. Actuators B Chem.* - 2019. - V. 279. - N 19. - P. 267–273.
2. Zhang Y., Lai B.S., Juhas M. Recent advances in aptamer discovery and applications // *Molecules.* - 2019. - V. 24. - N 5. – Article No. 941.
3. Hasegawa H., Savory N., Abe K., Ikebukuro K. Methods for improving aptamer binding affinity // *Molecules.* - 2016. - V. 21. - N 4. – Article No. 421.
4. Vorobyeva M., Vorobjev P., Venyaminova A. Multivalent aptamers: versatile tools for diagnostic and therapeutic applications // *Molecules.* - 2016. - V. 21. - N 12. -Article No. 1613.
5. Adachi T., Nakamura Y. Aptamers: a review of their chemical properties and modifications for therapeutic application // *Molecules.* - 2019. - V. 24. - N 23. – Article No. 4229.
6. Kulabhusan P.K., Hussain B. Current perspectives on aptamers as diagnostic tools and therapeutic agents // *Pharmaceutics.* - 2020. - V. 12. - N 7. – Article No. 646.
7. Kilpatrick E.S. Haemoglobin A1c in the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus // *J. Clin. Pathol.* - 2008. - V. 61. - N 9. - P. 977–982.
8. Bordeaux J., Welsh A.W., Agarwal S., Killiam E., Baquero M.T., Hanna J.A., Anagnostou V.K., Rimm D.L. Antibody validation // *Biotechniques.* - 2010. - V. 48. - N 3. - P. 197–209.
9. Little R.R., Rohlfing C.L. The long and winding road to optimal HbA1c measurement // *Clin. Chim. Acta.* - 2013. - V. 418. - P. 63–71.
10. Eissa S., Zourob M. Aptamer-based label-free electrochemical biosensor array for the detection of total and glycated hemoglobin in human whole blood // *Sci. Rep.* - 2017. - V. 7. – Article No. 1016.
11. Lin H.I., Wu C.C., Yang C.H., Chang K.W., Lee G.B, Shiesh, S.C. Selection of aptamers specific for glycated hemoglobin and total hemoglobin using on-chip SELEX // *Lab Chip.* - 2015. V. 15. - N 2. - P. 486–494.
12. Lin M., Li W., Wang Y., Yang X., Wang K., Wang Q., Wang P., Chang Y., Tan Y. Discrimination of hemoglobins with subtle differences using an aptamer based sensing array // *Chem. Commun.* - 2015. - V. 51. - N 39. - P. 8304–8306.
13. Shekari Z., Zare H.R., Falahati A. An ultrasensitive aptasensor for hemin and hemoglobin based on signal amplification via electrocatalytic oxygen reduction // *Anal. Biochem.* - 2017. - V. 518. - P. 102–109.
14. Robertson D.L., Joyce G.F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA // *Nature.* - 1990. - V. 344. - N 6265. - P. 467–468.

15. Ellington A.D., Szostak J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands // *Nature*. - 1990. - V. 346. - N 6287. - P. 818–822.
16. Tuerk C., Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase // *Science*. - 1990. - V. 249. - N 4968. - P. 505–510.
17. Ni S., Yao H., Wang L., Lu J., Jiang F., Lu A., Zhang G. Chemical modifications of nucleic acid aptamers for therapeutic purposes // *Int. J. Mol. Sci.* - 2017. - V. 18. - N 8. – Article No. 1683.
18. Nimjee S.M., White R.R., Becker R.C., Sullenger B.A. Aptamers as therapeutics // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 2017. - V. 57. - P. 61–79.
19. Komarova N., Kuznetsov A. Inside the black box: what makes selex better? // *Molecules*. - 2019. - V. 24. - N 19. – Article No. 3598.
20. Bayat P., Nosrati R., Alibolandi M., Rafatpanah H., Abnous K., Khedri M., Ramezani M. SELEX methods on the road to protein targeting with nucleic acid aptamers // *Biochimie*. - 2018. - V. 154. - P. 132–155
21. Vorobyeva M.A., Davydova A.S., Vorobjev P.E., Pyshnyi D.V., Venyaminova A.G. Key aspects of nucleic acid library design for in vitro selection // *Int. J. Mol. Sci.* - 2018. - V. 19. - N 2. – Article No. 470.
22. Pobanz K., Lupták A. Improving the odds: influence of starting pools on in vitro selection outcomes // *Methods*. - 2016. - V. 106. - P. 14–20.
23. Cowperthwaite M.C., Ellington A.D. Bioinformatic analysis of the contribution of primer sequences to aptamer structures // *J. Mol. Evol.* - 2008. - V. 67. - N 1. - P. 95–102.
24. Takahashi M., Wu X., Ho M., Chomchan P., Rossi J.J., Burnett J.C., Zhou J. High throughput sequencing analysis of RNA libraries reveals the influences of initial library and PCR methods on SELEX efficiency // *Sci. Rep.* - 2016. - V. 6. – Article No. 33697.
25. Blind M., Blank M. Aptamer selection technology and recent advances // *Mol. Ther. Nucleic Acids*. - 2015. - V. 4. - N 1. – Article No. e223.
26. Hall B., Micheletti J.M., Satya P., Ogle K., Pollard J., Ellington A.D. Design, synthesis, and amplification of DNA pools for in vitro selection // *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* - 2009. - V. 9. - N 9.2.
27. Blank M. Next-generation analysis of deep sequencing data: bringing light into the black box of SELEX experiments // *Methods Mol. Biol.* - 2016. - V. 1380. - P. 85–95.
28. Gevertz J., Gan H.H., Schlick T. In vitro RNA random pools are not structurally diverse: a computational analysis // *RNA*. - 2005. - V. 11. - N 6. - P. 853–863.
29. Thiel W.H., Bair T., Wyatt Thiel K., Dassie J.P., Rockey W.M., Howell C.A., Liu X.Y., Dupuy A.J., Huang L., Owczarzy R., Behlke M.A., McNamara II, J.O., Giangrande, P.H. Nucleotide bias

- observed with a short SELEX RNA aptamer library // *Nucleic Acid Ther.* - 2011. - V. 21. - N 4. - P. 253–263.
30. Meek K.N., Rangel A.E., Heemstra J.M. Enhancing aptamer function and stability via in vitro selection using modified nucleic acids // *Methods.* - 2016. - V. 106. - P. 29–36.
 31. Diafa S., Hollenstein M. Generation of aptamers with an expanded chemical repertoire // *Molecules.* - 2015. - V. 20. - N 9. - P. 16643–16671.
 32. Lipi F., Chen S., Chakravarthy M., Rakesh S., Veedu R.N. In vitro evolution of chemically-modified nucleic acid aptamers: pros and cons, and comprehensive selection strategies // *RNA Biol.* - 2016. - V. 13. - N 12. - P. 1232–1245.
 33. Lapa S.A., Chudinov A. V., Timofeev E.N. The toolbox for modified aptamers // *Mol. Biotechnol.* - 2016. - V. 58. - N 2. - P. 79–92.
 34. Lin Y., Qiu Q., Gill S.C., Jayasena S.D. Modified RNA sequence pools for in vitro selection // *Nucleic Acids Res.* - 1994. - V. 22. - N. 24. - P. 5229–5234.
 35. Fitzwater T., Polisky B. A SELEX primer // *Methods Enzymol.* - 1996. - V. 267. - P. 275–301.
 36. Stovall G.M., Bedenbaugh R.S., Singh S., Meyer A.J., Hatala P.J., Ellington A.D., Hall B. In vitro selection using modified or unnatural nucleotides // *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* - 2014. - V. 56. - N 9.6.1.
 37. Lauridsen L.H., Rothnagel J.A., Veedu R.N. Enzymatic recognition of 2'-modified ribonucleoside 5'-triphosphates: towards the evolution of versatile aptamers // *Chembiochem.* - 2012. - V. 13. - N 1. - P. 19–25.
 38. Han J., Gao L., Wang J., Wang J. Application and development of aptamer in cancer: from clinical diagnosis to cancer therapy // *J. Cancer.* - 2020. - V. 11. - N 23. - P. 6902–6915.
 39. Ascoët S., De Waard M. Diagnostic and therapeutic value of aptamers in envenomation cases // *Int. J. Mol. Sci.* - 2020. - V. 21. – Article No. 3565.
 40. Cesarini V., Scopa C., Silvestris D.A., Scafidi A., Petrera V., Del Baldo G., Gallo A. Aptamer-based in vivo therapeutic targeting of glioblastoma // *Molecules.* - 2020. - V. 25. - N 18. – Article No. 4267.
 41. Thevendran R., Sarah S., Tang T.H., Citartan M. Strategies to bioengineer aptamer-driven nanovehicles as exceptional molecular tools for targeted therapeutics: a review // *J. Control. Release.* - 2020. - V. 323. - P. 530–548.
 42. Bukari B., Samarasinghe R.M., Noibanchong J., Shigdar S.L. Non-invasive delivery of therapeutics into the brain: the potential of aptamers for targeted delivery // *Biomedicines.* - 2020. - V. 8. – Article No. 120.
 43. Zhao Q., Wu M., Le, X.C, Li, X.F. Applications of aptamer affinity chromatography // *Trends Anal. Chem.* - 2012. - V. 41. - P. 46–57.

44. Filippi L., Bagni O., Nervi C. Aptamer-based technology for radionuclide targeted imaging and therapy: a promising weapon against cancer // *Expert Rev. Med. Devices.* - 2020. - V. 17. - N 8. - P. 751-758.
45. Koudrina A., Derosa M.C. Advances in medical imaging: aptamer- and peptide-targeted MRI and CT contrast agents // *ACS Omega.* - 2020. - V. 5. - N 36. - P. 22691–22701.
46. Berezovski M. V., Lechmann M., Musheev M.U., Mak T.W., Krylov S.N. Aptamer-facilitated biomarker discovery (AptaBiD) // *J. Am. Chem. Soc.* - 2008. - V. 130. - N 28. - P. 9137–9143.
47. Yan S.R., Foroughi M.M., Safaei M., Jahani S., Ebrahimpour N., Borhani F., Rezaei Zade Baravati N., Aramesh-Boroujeni Z., Foong L.K. A review: recent advances in ultrasensitive and highly specific recognition aptasensors with various detection strategies // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2020. - V. 155. - P. 184–207.
48. Ilgu M., Nilsen-Hamilton M. Aptamers in analytics // *Analyst.* - 2016. - V. 141. - N 5. - P. 1551–1558.
49. Ning Y., Hu J., Lu F. Aptamers used for biosensors and targeted therapy // *Biomed. Pharmacother.* - 2020. - V. 132. - N 110902.
50. Kou X., Zhang X., Shao X., Jiang C., Ning L. Recent advances in optical aptasensor technology for amplification strategies in cancer diagnostics // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2020. - V. 412. - N 25. - P. 6691-6705.
51. Pirzada M., Altintas Z. Recent progress in optical sensors for biomedical diagnostics // *Micromachines.* - 2020. - V. 11. - N 356.
52. Xu Y., Cheng G., He P., Fang Y. A review: electrochemical aptasensors with various detection strategies // *Electroanalysis.* - 2009. - V. 21. - N 11. - P. 1251–1259.
53. Han K., Liu T., Wang Y., Miao P. Electrochemical aptasensors for detection of small molecules, macromolecules, and cells // *Rev. Anal. Chem.* - 2016. - V. 35. - N 4. - P. 201–211.
54. Kulasingam V., Diamandis E.P. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies // *Nat. Clin. Pract. Oncol.* - 2008. - V. 5. - N 10. - P. 588–599.
55. Sharma T.K., Bruno J.G., Dhiman A. ABCs of DNA aptamer and related assay development // *Biotechnol. Adv.* - 2017. - V. 35. - N 2. - P. 275–301.
56. Dong J., He L., Wang Y., Yu F., Yu S., Liu L., Wang J., Tian Y., Qu L., Han R., Wang Z., Wu Y. A highly sensitive colorimetric aptasensor for the detection of the vascular endothelial growth factor in human serum // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* - 2020. - V. 226. – Article No. 117622.
57. Freeman R., Girsh J., Fang-Ju Jou A., Ho J.A.A., Hug T., Dervedde J., Willner I. Optical aptasensors for the analysis of the vascular endothelial growth factor (VEGF) // *Anal. Chem.* - 2012. V. 84. - N 14. - P. 6192–6198.

58. Zhang H., Peng L., Li M., Ma J., Qi S., Chen H., Zhou L., Chen X. A label-free colorimetric biosensor for sensitive detection of vascular endothelial growth factor-165 // *Analyst*. - 2017. - V. 142. - N 13. - P. 2419–2425.
59. Wu D., Gao T., Lei L., Yang D., Mao X., Li G. Colorimetric detection of proteins based on target-induced activation of aptazyme // *Anal. Chim. Acta*. - 2016. - V. 942. - P. 68–73.
60. Chang C.C., Chen C.Y., Chuang T.L., Wu T.H., Wei S.C., Liao H., Lin C.W. Aptamer-based colorimetric detection of proteins using a branched DNA cascade amplification strategy and unmodified gold nanoparticles // *Biosens. Bioelectron.* - 2016. - V. 78. - P. 200–205.
61. Jiang Y., Shi M., Liu Y., Wan S., Cui C., Zhang L., Tan W. Aptamer/AuNP biosensor for colorimetric profiling of exosomal proteins // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2017. - V. 56. - N 39. - P. 11916–11920.
62. Zhang Y., Wang D., Yue S., Lu Y., Yang C., Fang J., Xu Z. Sensitive multicolor visual detection of exosomes via dual signal amplification strategy of enzyme-catalyzed metallization of Au nanorods and hybridization chain reaction // *ACS Sensors*. - 2019. - V. 4. - N 12. - P. 3210–3218.
63. Xu L., Chopdat R., Li D., Al-Jamal K.T. Development of a simple, sensitive and selective colorimetric aptasensor for the detection of cancer-derived exosomes // *Biosens. Bioelectron.* - 2020. - V. 169. – Article No. 112576.
64. Xia Y., Liu M., Wang L., Yan A., He W., Chen M., Lan J., Xu J., Guan L., Chen J. A visible and colorimetric aptasensor based on DNA-capped single-walled carbon nanotubes for detection of exosomes // *Biosens. Bioelectron.* - 2017. - V. 92. - P. 8–15.
65. Wang Y.M., Liu J.W., Adkins G.B., Shen W., Trinh M.P., Duan L.Y., Jiang J.H., Zhong W. Enhancement of the intrinsic peroxidase-like activity of graphitic carbon nitride nanosheets by ssDNAs and its application for detection of exosomes // *Anal. Chem.* - 2017. - V. 89. - N 22. - P. 12327–12333.
66. Cheng N., Song Y., Shi Q., Du D., Liu D., Luo Y., Xu W., Lin Y. Au@Pd nanopopcorn and aptamer nanoflower assisted lateral flow strip for thermal detection of exosomes // *Anal. Chem.* - 2019. - V. 91. - N 21. - P. 13986–13993.
67. Yu Q., Zhao Q., Wang S., Zhao S., Zhang S., Yin Y., Dong Y. Development of a lateral flow aptamer assay strip for facile identification of theranostic exosomes isolated from human lung carcinoma cells // *Anal. Biochem.* - 2020. - V. 594. – Article No. 113591.
68. Ferreira C.S.M., Papamichael K., Guilbault G., Schwarzacher T., Garipey J., Missailidis S. DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2008. - V. 390. - N 4. - P. 1039–1050.

69. Liu S., Xu N., Tan C., Fang W., Tan Y., Jiang Y. A sensitive colorimetric aptasensor based on trivalent peroxidase-mimic DNAzyme and magnetic nanoparticles // *Anal. Chim. Acta.* - 2018. - V. 1018. - P. 86–93.
70. Zhou Y., Xu H., Wang H., Ye B.C. Detection of breast cancer-derived exosomes using the horseradish peroxidase-mimicking DNAzyme as an aptasensor // *Analyst.* - 2020. - V. 145. - N 1. - P. 107–114.
71. Luo C., Wen W., Lin F., Zhang X., Gu H., Wang S. Simplified aptamer-based colorimetric method using unmodified gold nanoparticles for the detection of carcinoma embryonic antigen // *RSC Adv.* - 2015. - V. 5. - N 15. - P. 10994–10999.
72. Liang K., Zhai S., Zhang Z., Fu X., Shao J., Lin Z., Qiu B., Chen G.N. Ultrasensitive colorimetric carcinoembryonic antigen biosensor based on hyperbranched rolling circle amplification // *Analyst.* - 2014. - V. 139. - N 17. - P. 4330–4334.
73. Shahbazi N., Hosseinkhani S., Ranjbar B. A facile and rapid aptasensor based on split peroxidase DNAzyme for visual detection of carcinoembryonic antigen in saliva // *Sens. Actuators B Chem.* - 2017. - V. 253. - P. 794–803.
74. Shayesteh O.H., Ghavami R. A novel label-free colorimetric aptasensor for sensitive determination of PSA biomarker using gold nanoparticles and a cationic polymer in human serum // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* - 2020. - V. 226. – Article No. 117644.
75. Ranganathan V., Srinivasan S., Singh A., DeRosa M.C. An aptamer-based colorimetric lateral flow assay for the detection of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) // *Anal. Biochem.* - 2020. - V. 588. – Article No. 113471.
76. Zhou Y., Li W., Tseng Y., Zhang J., Liu J. Developing slow-off dickkopf-1 aptamers for early-diagnosis of hepatocellular carcinoma // *Talanta.* - 2019. - V. 194. - P. 422–429.
77. Park H., Paeng I.R. Development of direct competitive enzyme-linked aptamer assay for determination of dopamine in serum // *Anal. Chim. Acta.* - 2011. - V. 685. - N 1. - P. 65–73.
78. Kim E., Paeng I.R. Advantageous sensitivity in the dna homolog of the RNA dopamine aptamer // *J. Immunoass. Immunochem.* - 2014. - V. 35. - N 1. - P. 83–100.
79. Zheng Y., Wang Y., Yang X. Aptamer-based colorimetric biosensing of dopamine using unmodified gold nanoparticles // *Sens. Actuators B Chem.* - 2011. - V. 156. - N 1. - P. 95–99.
80. Zhang Y., Qi S., Liu Z., Shi Y., Yue W., Yi C. Rapid determination of dopamine in human plasma using a gold nanoparticle-based dual-mode sensing system // *Mater. Sci. Eng. C.* - 2016. - V. 61. - P. 207–213.
81. Lin T.Y., Wei K.C., Ju S.P., Huang C.Y., Yang H.W. Diagnosis by simplicity: an aptachip for dopamine capture and accurate detection with a dual colorimetric and fluorometric system // *J. Mater. Chem. B.* - 2018. - V. 6. - N 20. - P. 3387–3394.

82. Dalirirad S., Steckl A.J. Lateral flow assay using aptamer-based sensing for on-site detection of dopamine in urine // *Anal. Biochem.* - 2020. - V. 596. – Article No. 113637.
83. Sun K., Xia N., Zhao L., Liu K., Hou W., Liu L. Aptasensors for the selective detection of alpha-synuclein oligomer by colorimetry, surface plasmon resonance and electrochemical impedance spectroscopy // *Sens. Actuators B Chem.* - 2017. - V. 245. - P. 87–94.
84. Martin J.A., Chávez J.L., Chushak Y., Chapleau R.R., Hagen J., Kelley-Loughnane N. Tunable stringency aptamer selection and gold nanoparticle assay for detection of cortisol // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2014. - V. 406. - N 19. - P. 4637–4647.
85. Bao X., Huo G., Li L., Cao X., Liu Y., Lakshmipriya T., Chen Y., Hariri F., Gopinath S.C.B. Coordinated dispersion and aggregation of gold nanorod in aptamer-mediated gestational hypertension analysis // *J. Anal. Methods Chem.* - 2019. - V. 2019. – Article No. 5676159.
86. Dalirirad S., Steckl A.J. Aptamer-based lateral flow assay for point of care cortisol detection in sweat // *Sens. Actuators B Chem.* - 2019. - V. 283. - P. 79–86.
87. Xie J., Tang M.Q., Chen J., Zhu Y.H., Lei C.B., He H.W., Xu X.H. A sandwich ELISA-like detection of C-reactive protein in blood by citicoline-bovine serum albumin conjugate and aptamer-functionalized gold nanoparticles nanozyme // *Talanta.* - 2020. - V. 217. – Article No. 121070.
88. António M., Ferreira R., Vitorino R., Daniel-da-Silva A.L. A simple aptamer-based colorimetric assay for rapid detection of C-reactive protein using gold nanoparticles // *Talanta.* - 2020. - V. 214. – Article No. 120868.
89. Jeon J., Jo H., Her J., Youn H., Park J., Jo J., Lee J., Chang C.L., Ban C. A rapid colorimetric sensor for soluble interleukin-2 receptor α , based on aptamer-adsorbed AuNP // *Chembiochem.* - 2019. - V. 20. - N 17. - P. 2236–2240.
90. Giorgi-Coll S., Marín M.J., Sule O., Hutchinson P.J., Carpenter K.L.H. Aptamer-modified gold nanoparticles for rapid aggregation-based detection of inflammation: an optical assay for interleukin-6 // *Microchim. Acta.* - 2020. - V. 187. – Article No. 13.
91. Cheng L., Zhao Q. Aptamer-capture based assays for human neutrophil elastase // *Talanta.* - 2013. - V. 106. - P. 315–320.
92. Torrini F., Palladino P., Brittolli A., Baldoneschi V., Minunni M., Scarano S. Characterization of troponin T binding aptamers for an innovative enzyme-linked oligonucleotide assay (ELONA) // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2019. - V. 411. - P. 7709–7716.
93. Gopinathan P., Sinha A., Chung Y. D., Shiesh S.C., Lee G. B. Optimization of an enzyme linked DNA aptamer assay for cardiac troponin I detection: synchronous multiple sample analysis on an integrated microfluidic platform // *Analyst.* - 2019. - V. 144. - N 16. - P. 4943–4951.

94. Wang Q.L., Huang W.X., Zhang P.J., Chen L., Lio C.K., Zhou H., Qing L. S., Luo P. Colorimetric determination of the early biomarker hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) in circulating exosomes by using a gold seed-coated with aptamer-functionalized Au@Au core-shell peroxidase mimic // *Microchim. Acta.* - 2020. - V. 187. – Article No. 61.
95. Ji K., de Carvalho L.P., Bi X., Seneviratnankn A., Bhakoo K., Chan M., Yau Li S.F. Highly sensitive and quantitative human thrombospondin-1 detection by an M55 aptasensor and clinical validation in patients with atherosclerotic disease // *Biosens. Bioelectron.* - 2014. - V. 55. - P. 405–411.
96. Chang K., Li J., Yang C., Shiesh S., Lee G. An integrated microfluidic system for measurement of glycated hemoglobin Levels by using an aptamer – antibody assay on magnetic beads // *Biosens. Bioelectron.* - 2015. - V. 68. - P. 397–403.
97. Li J., Chang K.W., Wang C.H., Yang C.H., Shiesh S.C., Lee G.B. On-chip, aptamer-based sandwich assay for detection of glycated hemoglobins via magnetic beads // *Biosens. Bioelectron.* - 2016. - V. 79. - P. 887–893.
98. Moon J.M., Kim D.M., Kim M.H., Han J.Y., Jung D.K., Shim Y.B. A disposable amperometric dual-sensor for the detection of hemoglobin and glycated hemoglobin in a finger prick blood sample // *Biosens. Bioelectron.* - 2017. - V. 91. - P. 128–135.
99. Singh V., Nerimetla R., Yang M., Krishnan S. Magnetite-quantum dot immunoarray for plasmon-coupled-fluorescence imaging of blood insulin and glycated hemoglobin // *ACS Sensors.* - 2017. - V. 2. - N 7. - P. 909–915.
100. Duanghathaipornsuk S., Reaver N.G.F., Cameron B.D., Kim D. Adsorption kinetics of glycated hemoglobin on aptamer microarrays with antifouling surface modification // *Langmuir.* - 2021. – V. 37. - N 15. – P. 4647–4657.
101. Shajaripour Jaber S.Y., Ghaffarinejad A., Omidinia E. An electrochemical paper based nanogenosensor modified with reduced graphene oxide-gold nanostructure for determination of glycated hemoglobin in blood // *Anal. Chim. Acta.* - 2019. - V. 1078. - P. 42–52.
102. Almusharraf A.Y., Eissa S., Zourob M. Truncated aptamers for total and glycated hemoglobin, and their integration into a graphene oxide-based fluorometric method for high-throughput screening for diabetes // *Microchim. Acta.* - 2018. - V. 185. – Article No. 256.
103. Eissa S., Almusharraf A.Y., Zourob M. A comparison of the performance of voltammetric aptasensors for glycated haemoglobin on different carbon nanomaterials-modified screen printed electrodes // *Mater. Sci. Eng. C.* - 2019. - V. 101. - P. 423–430.
104. Rafati A., Zarrabi A., Abediankenari S., Aarabi M., Gill P. Sensitive colorimetric assay using insulin G-quadruplex aptamer arrays on DNA nanotubes coupled with magnetic nanoparticles // *R. Soc. Open Sci.* - 2018. - V. 5. – Article No. 171835.

105. Tan F., Wang Z., Yang Y., Xie X., Hua X., Yang X., Huang H. Facile preparation of peroxidase-like core-shell nanorods and application as platform for colorimetric determination of glucose, insulin and glucose/insulin ratio // *Talanta*. - 2019. - V. 204. - P. 285–293.
106. Lee S.J., Park J.W., Kim I.A., Youn B.S., Gu M.B. Sensitive detection of adipokines for early diagnosis of type 2 diabetes using enzyme-linked antibody-aptamer sandwich (ELAAS) assays // *Sens. Actuators B Chem.* - 2012. - V. 168. - P. 243–248.
107. Torabi R., Ghourchian H. Ultrasensitive nano-aptasensor for monitoring retinol binding protein 4 as a biomarker for diabetes prognosis at early stages // *Sci. Rep.* - 2020. - V. 10. – Article No. 594.
108. Ahmad Raston N.H., Nguyen V.T., Gu M.B. A new lateral flow strip assay (LFSA) using a pair of aptamers for the detection of vaspin // *Biosens. Bioelectron.* - 2017. - V. 93. - P. 21–25.
109. Otrrock Z.K., Makarem J.A., Shamseddine A.I. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review // *Blood Cells Mol. Dis.* - 2007. - V. 38. - N 3. - P. 258–268.
110. Plate K.H., Breier G., Weich H.A., Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo // *Nature*. - 1992. - V. 359. - N 6398. - P. 845–848.
111. Storkebaum E., Lambrechts D., Carmeliet P. VEGF: Once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection // *Bioessays*. - 2004. - V. 26. - N 9. - P. 943–954.
112. Tarkowski E., Issa R., Sjögren M., Wallin A., Blennow K., Tarkowski A., Kumar P. Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF- β in Alzheimer's disease and vascular dementia // *Neurobiol. Aging*. - 2002. - V. 23. - N 2. - P. 237–243.
113. Nakahara H., Song J., Sugimoto M., Hagihara K., Kishimoto T., Yoshizaki K., Nishimoto N. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* - 2003. - V. 48. - N 6. - P. 1521–1529.
114. Lee Y.H., Bae S.C. Correlation between circulating VEGF levels and disease activity in rheumatoid arthritis: a meta-analysis // *Z. Rheumatol.* - 2018. - V. 77. - N 3. - P. 240–248.
115. Detmar M. Evidence for vascular endothelial growth factor (VEGF) as a modifier gene in psoriasis // *J. Invest. Dermatol.* - 2004. V. 122. - N 1. - P. xiv–xv.
116. Ruckman J., Green L.S., Beeson J., Waugh S., Gillette W.L., Henninger D.D., Claesson-Welsh L., Janjic N. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165) // *J. Biol. Chem.* - 1998. - V. 273. - N 32. - P. 20556–20567.
117. Nonaka Y., Sode K., Ikebukuro K. Screening and improvement of an anti-VEGF DNA aptamer // *Molecules*. - 2010. - V. 15. - N 1. - P. 215–225.
118. Hasegawa H., Sode K., Ikebukuro K. Selection of DNA aptamers against VEGF165 using a protein competitor and the aptamer blotting method // *Biotechnol. Lett.* - 2008. - V. 30. - N 5. - P. 829–834.

119. Shao H., Chung J., Balaj L., Charest A., Bigner D.D., Carter B.S., Hochberg F.H., Breakefield X.O., Weissleder R.; Lee H. Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy // *Nat. Med.* - 2012. - V. 18. - N 12. - P. 1835–1840.
120. Roy L.D., Sahraei M., Subramani D.B., Besmer D., Nath S., Tinder T.L., Bajaj E., Shanmugam K., Lee Y.Y., Hwang S.I.L., Gendler S.J., Mukherjee P. MUC1 enhances invasiveness of pancreatic cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition // *Oncogene.* - 2011. - V. 30. - N 12. - P. 1449–1459.
121. Lakshmanan I., Ponnusamy M.P., Macha M.A., Haridas D., Majhi P.D., Kaur S., Jain M., Batra S.K., Ganti A.K. Mucins in lung cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications // *J. Thorac. Oncol.* - 2015. - V. 10. - N 1. - P. 19–27.
122. Xiang W., Lv Q., Shi H., Xie B., Gao L. Aptamer-based biosensor for detecting carcinoembryonic antigen // *Talanta.* - 2020. - V. 214. – Article No. 120716.
123. Duffy M.J. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? // *Clin. Chem.* - 2001. - V. 47. - N 4. - P. 624–630.
124. Ludovini V., Gori S., Colozza M., Pistola L., Rulli E., Floriani I., Pacifico E., Tofanetti F.R., Sidoni A., Basurto C., Rulli A., Crino, L. Evaluation of serum HER2 extracellular domain in early breast cancer patients: correlation with clinicopathological parameters and survival // *Ann. Oncol.* - 2008. - V. 19. - N 5. - P. 883–890.
125. Kienast T., Heinz A. Dopamine and the diseased brain // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* - 2006. - V. 5. - N 1. - P. 109–131.
126. Mannironi C., Di Nardo A., Fruscoloni P., Tocchini-Valentini G.P. In vitro selection of dopamine RNA ligands // *Biochemistry.* - 1997. - V. 36. - N 32. - P. 9726–9734.
127. Walsh R., DeRosa M.C. Retention of function in the DNA homolog of the RNA dopamine aptamer // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2009. - V. 388. - N 4. - P. 732–735.
128. Nakatsuka N., Yang K.A., Abendroth J.M., Cheung K.M., Xu X., Yang H., Zhao C., Zhu B., Rim Y.S., Yang Y., Weiss P.S., Stojanović M.N., Andrews A.M. Aptamer-field-effect transistors overcome Debye length limitations for small-molecule sensing // *Science.* - 2018. - V. 362. - N 6412. - P. 319–324.
129. Mukaetova-Ladinska E.B. Parkinson's disease: diagnostic relevance of elevated levels of soluble α -synuclein oligomers in cerebrospinal fluid // *Future Neurol.* -2011. - V. 6. - N 2. - P. 159–163.
130. Roberts R.F., Wade-Martins R., Alegre-Abarategui J. Direct visualization of alpha-synuclein oligomers reveals previously undetected pathology in Parkinson's disease brain // *Brain.* - 2015. - V. 138. - N 6. - P. 1642–1657.

131. Tsukakoshi K., Abe K., Sode K., Ikebukuro K. Selection of DNA aptamers that recognize α -synuclein oligomers using a competitive screening method // *Anal. Chem.* - 2012. - V. 84. - N 13. - P. 5542–5547.
132. Gatti R., Antonelli G., Prearo M., Spinella P., Cappellin E., De Palo E.F. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids // *Clin. Biochem.* - 2009. - V. 42. - N 12. - P. 1205–1217.
133. Morgan C.A., Rasmusson A.M., Wang S., Hoyt G., Hauger R.L., Hazlett G. Neuropeptide-Y, cortisol, and subjective distress in humans exposed to acute stress: replication and extension of previous report // *Biol. Psychiatry.* - 2002. - V. 52. - N 2. - P. 136–142.
134. Kapczynski F., Vieta E., Andreazza A.C., Frey B.N., Gomes F.A., Tramontina J., Kauer-Sant'Anna M., Grassi-Oliveira R., Post R.M. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment // *Neurosci. Biobehav. Rev.* - 2008. - V. 32. - N 4. - P. 675–692.
135. Pearson T.A., Mensah G.A., Alexander R.W., Anderson J.L., Cannon R.O., Criqui M., Fadl Y.Y., Fortmann S.P., Hong Y., Myers G.L., Rifai N., Smith Jr S.C., Taubert K., Tracy R.P., Vinicor F. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association // *Circulation.* - 2003. - V. 107. - N 3. - P. 499–511.
136. Lis-Święty A., Widuchowska M., Brzezińska-Wcisło L., Kucharz E. High acute phase protein levels correlate with pulmonary and skin involvement in patients with diffuse systemic sclerosis // *J. Int. Med. Res.* - 2018. - V. 46. - N 4. - P. 1634–1639.
137. Wu B., Jiang R., Wang Q., Huang J., Yang X., Wang K., Li W., Chen N., Li Q. Detection of C-reactive protein using nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance using an aptamer-antibody sandwich assay // *Chem. Commun.* - 2016. - V. 52. - N 17. - P. 3568–3571.
138. Caruso C., Candore G., Cigna D., Colucci A.T., Modica M.A. Biological significance of soluble IL-2 receptor // *Mediators Inflamm.* - 1993. - V. 2. - N 1. - P. 3–21.
139. Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2011. - V. 1813. - N 5. - P. 878–888.
140. Korkmaz B., Horwitz M.S., Jenne D.E., Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases // *Pharmacol. Rev.* - 2010. - V. 62. - N 4. - P. 726–759.
141. Lin Y., Padmapriya A., Morden K.M., Jayasena S.D. Peptide conjugation to an in vitro-selected DNA ligand improves enzyme inhibition // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1995. - V. 92. - N 24. - P. 11044–11048.

142. Daubert M.A., Jeremias A. The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings // *Vasc. Health Risk Manag.* - 2010. - V. 6. - P. 691–699.
143. Sinha A., Gopinathan P., Chung Y., Lin H.Y., Li K.H., Ma H.P., Huang P.C., Shiesh S.C., Lee G. An integrated microfluidic platform to perform uninterrupted SELEX cycles to screen affinity reagents specific to cardiovascular biomarkers // *Biosens. Bioelectron.* - 2018. - V. 122. - P. 104–112.
144. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease // *Annu. Rev. Physiol.* - 2014. - V. 76. - P. 39–56.
145. Sezaki S., Hirohata S., Iwabu A., Nakamura K., Toeda K., Miyoshi T., Yamawaki H., Demircan K., Kusachi S., Shiratori Y., Ninomiya Y. Thrombospondin-1 is induced in rat myocardial infarction and its induction is accelerated by ischemia/reperfusion // *Exp. Biol. Med.* - 2005. - V. 230. - N 9. - P. 621–630.
146. Chavez R.J., Haney R.M., Cuadra R.H., Ganguly R., Adapala R.K., Thodeti C.K., Raman P. Upregulation of thrombospondin-1 expression by leptin in vascular smooth muscle cells via JAK2- and MAPK-dependent pathways // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* - 2012. - V. 303. - N 2. - P. 179–191.
147. Deshpande A.D., Harris-Hayes M., Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications // *Phys. Ther.* - 2008. - V. 88. - N 11. - P. 1254-1264.
148. Kojić Damjanov S., Derić M., Eremić Kojić N. Glycated hemoglobin A1c as a modern biochemical marker of glucose regulation // *Med Pregl.* - 2014. - V. 67. - N 9-10. - P. 339–344.
149. Lyons T.J., Basu A. Biomarkers in diabetes: hemoglobin A1c, vascular and tissue markers // *Transl. Res.* - 2012. - V. 159. - N 4. - P. 303–312.
150. Pat. US 2014/0335630. Methods and devices for detection and measurement of analytes / Cameron B.D., Kim D.; - 13.11.2014, The University of Toledo - 31 pp.
151. Reaver N.G.F., Zheng R., Kim D.-S., Cameron B.D. Aptamer-based surface plasmon resonance sensing of glycated human blood proteins // *Plasmon. Biol. Med. X.* - 2013. - V. Proc. SPIE. – Article No. 85970G.
152. Kaur J., Jiang C., Liu G. Different strategies for detection of HbA1c emphasizing on biosensors and point-of-care analyzers // *Biosens. Bioelectron.* – 2019. – V. 123. – P. 85 –100.
153. Jeppsson J.O., Kobold U., Barr J., Finke A., Hoelzel W., Hoshino T., Miedema K., Mosca A., Mauri P., Paroni R., Thienpont L., Umemoto, M., Weykamp C. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2002. -V. 40. – N 1. – P. 78–89.

154. Chang J., Hoke C., Ettinger B., Penerian G. Evaluation and interference study of hemoglobin A(1c) measured by turbidimetric inhibition immunoassay // *Am. J. Clin. Pathol.* -1998. – V. 109. – N 3. – P. 274–278.
155. Markova S. V., Vysotski E.S., Blinks J.R., Burakova L.P., Wang B.C., Lee J. Obelin from the bioluminescent marine hydroid *Obelia geniculata*: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca²⁺-regulated photoproteins // *Biochemistry.* – 2002. – V. 41. – N 7. - P. 2227–2236.
156. Liu Z.-J., Vysotski E.S., Chen C.J., Rose J.P., Lee J., Wang, B.C. Structure of the Ca²⁺-regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure // *Protein Sci.* - 2000. - V. 9. - N 11. - P. 2085–2093.
157. Eremeeva E. V., Vysotski E.S. Exploring bioluminescence function of the Ca²⁺-regulated photoproteins with site-directed mutagenesis // *Photochem. Photobiol.* – 2019. – V. 95. – N 1. -P. 8–23.
158. Frank L.A. Ca²⁺-regulated photoproteins: effective immunoassay reporters // *Sensors.* - 2010. - V. 10. - N 12. - P. 11287–11300.
159. Bashmakova E.E., Krasitskaya V. V., Kudryavtsev A.N., Grigorenko V.G., Frank L.A. Hybrid minimal core streptavidin–obelin as a versatile reporter for bioluminescence-based bioassay // *Photochem. Photobiol.* - 2017. - V. 93. - N 2. - P. 548–552.
160. Krasitskaya V. V., Burakova L.P., Komarova A.A., Bashmakova E.E., Frank L.A. Mutants of Ca²⁺-regulated photoprotein obelin for site-specific conjugation // *Photochem. Photobiol.* - 2017. - V. 93. - N 2. - P. 553–557.
161. Bashmakova E.E., Krasitskaya V. V., Bondar A.A., Eremina E.N., Slepov E.V., Zukov R.A., Frank L.A. Bioluminescent SNP genotyping technique: development and application for detection of melanocortin 1 receptor gene polymorphisms // *Talanta.* - 2018. - V. 189. - P. 111–115.
162. Bashmakova E.E., Krasitskaya V.V., Zamay G.S., Zamay T.N., Frank L.A. Bioluminescent aptamer-based solid-phase microassay to detect lung tumor cells in plasma // *Talanta.* - 2019. - V. 199. - P. 674–678.
163. Frank L.A., Krasitskaya V.V. Application of enzyme bioluminescence for medical diagnostics // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* - 2014. - V. 144. - P. 175–197.
164. Krasitskaya V.V., Chaukina V.V., Abroskina M.V., Vorobyeva M.A., Ilminskaya A.A., Kabilov M.R., Prokopenko S.V., Nevinsky G.A., Venyaminova A.G., Frank L.A. Bioluminescent aptamer-based sandwich-type assay of anti-myelin basic protein autoantibodies associated with multiple sclerosis // *Anal. Chim. Acta.* - 2019. - V. 1064. - P. 112–118.
165. Krasitskaya V.V., Goncharova N.S., Biriukov V.V., Bashmakova E.E., Kabilov M.R., Baykov I.K., Sokolov A.E., Frank L.A. The Ca²⁺-regulated photoprotein obelin as a tool for SELEX

- monitoring and DNA aptamer affinity evaluation // *Photochem. Photobiol.* - 2020. - V. 96. - N 5. - P. 1041–1046.
166. Schütze T., Arndt P.F., Menger M., Wochner A., Vingron M., Erdmann V.A., Lehrach H., Kaps C., Glökler J. A calibrated diversity assay for nucleic acid libraries using DiStRO - a Diversity Standard of Random Oligonucleotides // *Nucleic Acids Res.* - 2009. - V. 38. - N 4. – Article No. e23.
167. Donaldson G.P., Roelofs K.G., Luo Y., Sintim H.O., Lee V.T. A rapid assay for affinity and kinetics of molecular interactions with nucleic acids // *Nucleic Acids Res.* - 2012. - V. 40. - N 7. – Article No. e48.
168. Kato T., Shimada I., Kimura R., Hyuga M. Light-up fluorophore-DNA aptamer pair for label-free turn-on aptamer sensors // *Chem. Commun.* - 2016. - V. 52. - P. 4041–4044.
169. Chang C.C., Lin S., Lee C.H., Chuang T.L., Hsueh P.R., Lai H.C., Lin C.W. Amplified surface plasmon resonance immunosensor for interferon-gamma based on a streptavidin-incorporated aptamer // *Biosens. Bioelectron.* - 2012. - V. 37. - N 1. - P. 68–74.
170. Bing T., Liu X., Cheng X., Cao Z., Shangguan D. Bifunctional combined aptamer for simultaneous separation and detection of thrombin // *Biosens. Bioelectron.* - 2010. - V. 25. - N 6. - P. 1487–1492.
171. Moutsiopoulou A., Broyles D., Joda H., Dikici E., Kaur A., Kaifer A., Daunert S., Deo S.K. Bioluminescent protein-inhibitor pair in the design of a molecular aptamer beacon biosensing system // *Anal. Chem.* - 2020. - V. 92. - N 11. - P. 7393–7398.
172. Vorobjeva M.A., Krasitskaya V.V., Fokina A.A., Timoshenko V.V., Nevinsky G.A., Venyaminova A.G., Frank L.A. RNA aptamer against autoantibodies associated with multiple sclerosis and bioluminescent detection probe on its basis // *Anal. Chem.* - 2014. - V. 86. - N 5. - P. 2590–2594.
173. Neubacher S., Hennig, S. RNA structure and cellular applications of fluorescent light-up aptamers // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2019. - V. 58. - N 5. - P. 1266–1279.
174. Shui B., Ozer A., Zipfel W., Sahu N., Singh A., Lis J.T., Shi H., Kotlikoff M.I. RNA aptamers that functionally interact with green fluorescent protein and its derivatives // *Nucleic Acids Res.* - 2012. - V. 40. - N 5. – Article No. e39.
175. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика - Мир: Москва, 1991.
176. Aird D., Ross M.G., Chen W.S., Danielsson M., Fennell T., Russ C., Jaffe D.B., Nusbaum C., Gnirke A. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries // *Genome Biol.* - 2011. - V. 12. – Article No. R18.
177. Bouvet P. Identification of nucleic acid high-affinity binding sequences of proteins by SELEX // *Methods Mol. Biol.* - 2009. - V. 543. - P. 139–150.

178. Proske D., Gilch S., Wopfner F., Schätzl H.M., Winnackera E.-L., Famulok M. Prion-protein-specific aptamer reduces PrP Sc formation // *Chembiochem.* - 2002. - V. 3. - N 8. - P. 717–725.
179. Mashima T., Nishikawa F., Kamatari Y.O., Fujiwara H., Saimura M., Nagata T., Kodaki T., Nishikawa S., Kuwata K., Katahira M. Anti-prion activity of an RNA aptamer and its structural basis // *Nucleic Acids Res.* - 2013. - V. 41. - N 2. - P. 1355–1362.
180. Szameit K., Berg K., Kruspe S., Valentini E., Magbanua E., Kwiatkowski M., Chauvot de Beauchêne I., Krichel B., Schamoni K., Uetrecht C., Svergun D.I., Schluter H., Zacharias M., Hahn U. Structure and target interaction of a G-quadruplex RNA-aptamer // *RNA Biol.* - 2016. - V. 13. - N 10. - P. 973–987.
181. Meyer C., Eydeler K., Magbanua E., Zivkovic T., Piganeau N., Lorenzen I., Grötzinger J., Mayer G., Rose-John S., Hahn U. Interleukin-6 receptor specific RNA aptamers for cargo delivery into target cells // *RNA Biol.* - 2012. - V. 9. - N 1. - P. 67–80.
182. Meyer C., Berg K., Eydeler-Haeder K., Lorenzen I., Grötzinger J., Rose-John S., Hahn U. Stabilized interleukin-6 receptor binding RNA aptamers // *RNA Biol.* - 2014. - V. 11. - N 1. - P. 57–65.
183. Yamaoki Y., Nagata T., Mashima T., Katahira M. Development of an RNA aptamer that acquires binding capacity against HIV-1 Tat protein via G-quadruplex formation in response to potassium ions // *Chem. Commun.* - 2017. - V. 53. - N 52. - P. 7056–7059.
184. Huang H., Suslov N.B., Li N.-S., Shelke S.A., Evans M.E., Koldobskaya Y., Rice P.A., Piccirilli J.A. A G-quadruplex-containing RNA activates fluorescence in a GFP-like fluorophore // *Nat. Chem. Biol.* - 2014. - V. 10. - N 8. - P. 686–691.
185. Lorenz R., Bernhar S.H., Höner zu Siederdisen C., Tafer H., Flamm C., Stadler P.F., Hofacker I.L. ViennaRNA package 2.0. algorithms // *Mol. Biol.* - 2011. - V. 6. – Article No. 26.
186. Platella C., Riccardi C., Montesarchio D., Roviello G.N., Musumeci D. G-quadruplex-based aptamers against protein targets in therapy and diagnostics // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2017. - V. 1861. - N 5. - P. 1429–1447.
187. Krasitskaya V.V., Bashmakova E.E., Frank L.A. Coelenterazine-dependent luciferases as a powerful analytical tool for research and biomedical applications // *Int. J. Mol. Sci.* - 2020. - V. 21. – Article No. 7465.
188. Stoltenburg R., Krafčíková P., Víglašký V., Strehlitz B. G-quadruplex aptamer targeting protein A and its capability to detect *Staphylococcus aureus* demonstrated by ELONA // *Sci. Rep.* - 2016. - V. 6. – Article No. 33812.
189. Agarwala P., Pandey S., Maiti S. The tale of RNA G-quadruplex // *Org. Biomol. Chem.* - 2015. - V. 13. - N 20. - P. 5570–5585.

190. Szabat M., Kierzek R. Parallel-stranded DNA and RNA duplexes – structural features and potential applications // *FEBS J.* - 2017. - V. 284. - N 23. - P. 3986–3998.
191. Kypr J., Kejnovská I., Renčiuk D., Vorlíčková M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA // *Nucleic Acids Res.* - 2009. - V. 37. - N 6. - P. 1713–1725.
192. Murakami K., Zhao J., Yamasaki K., Miyagishi M. Biochemical and structural features of extracellular vesicle-binding RNA aptamers // *Biomed. Rep.* - 2017. - V. 6. - N 6. - P. 615–626.
193. Chen Y.L., Pollack L. Salt dependence of A-form RNA duplexes: structures and implications // *J. Phys. Chem. B.* - 2019. - V. 123. - N 46. - P. 9773–9785.
194. Xu Y., Kaminaga K., Komiyama M. G-quadruplex formation by human telomeric repeats-containing RNA in Na⁺ solution // *J. Am. Chem. Soc.* - 2008. - V. 130. - N 33. - P. 11179–11184.
195. Renaud de la Faverie A.R., Guédin A., Bedrat A., Yatsunyk L.A., Mergny J.L. Thioflavin T as a fluorescence light-up probe for G4 formation // *Nucleic Acids Res.* - 2014. - V. 42. - N 8. – Article No. e65.
196. Xu S., Li Q., Xiang J., Yang Q., Sun H., Guan A., Wang L., Liu Y., Yu L., Shi Y., Chen H., Tang Y. Thioflavin T as an efficient fluorescence sensor for selective recognition of RNA G-quadruplexes // *Sci. Rep.* - 2016. - V. 6. – Article No. 24793.
197. Murphy M.B. An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification // *Nucleic Acids Res.* - 2003. - V. 31. - N 18. – Article No. e110.
198. Красицкая В.В., Давыдова А.С., Воробьева М.А., Франк Л.А. Ca²⁺-Регулируемый фотопроtein обелин как мишень для отбора РНК-аптамеров // *Биоорган. Химия.* - 2018. - Т. 44. - N 3. - С. 287–293.
199. Nastasijevic B., Becker N.A., Wurster S.E., James Maher L. Sequence-specific binding of DNA and RNA to immobilized Nickel ions // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2008. - V. 366. - N 2. - P. 420–425.
200. Tsuji S., Tanaka T., Hirabayashi N., Kato S., Akitomi J., Egashira H., Waga I., Ohtsu T. RNA aptamer binding to polyhistidine-tag // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2009. V. 386. - N 1. - P. 227–231

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Условия *in vitro* селекции 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих суммарный гемоглобин.

раунд	негативная селекция	позитивная селекция
1		1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.5 мг Нв-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА, в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 3×200 мкл буфера В
2	0.5 мг магнитных частиц, блокированных Твин-20, в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.5 мг Нв-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА, в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 4×200 мкл буфера В
3	0.5 мг магнитных частиц, блокированных Твин-20, в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.3 мг Нв-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА, в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 4×200 мкл буфера В
4	0.5 мг магнитных частиц, блокированных Твин-20, в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.3 мг Нв-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 6×200 мкл буфера В
5	0.5 мг магнитных частиц, блокированных Твин-20, в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.15 мг Нв-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 6×400 мкл буфера В
6	0.5 мг магнитных частиц, блокированных Твин-20, в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании 0.5 мг ЧСА-содержащих магнитных частиц в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.15 мг Нв-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 6×500 мкл буфера В
7	0.5 мг ЧСА-содержащих магнитных частиц в буфере В, содержащем 0.1	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.1 мг Нв-содержащих магнитных частиц

	<p>мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании</p>	<p>Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 6×500 мкл буфера В</p>
8	<p>0.5 мг ЧСА-содержащих магнитных частиц в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании</p>	<p>1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.1 мг Нв-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 45 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 7×500 мкл буфера В, содержащего 0.5 М NaCl</p>
9	<p>0.5 мг ЧСА-содержащих магнитных частиц в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании</p>	<p>1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.05 мг Нв-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 45 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 9×500 мкл буфера В, содержащего 0.5 М NaCl</p>
10	<p>0.5 мг ЧСА-содержащих магнитных частиц в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании</p>	<p>1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.05 мг Нв-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 30 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 10×500 мкл буфера В, содержащего 0.5 М мочевины</p>

Приложение 2. Условия *in vitro* селекции 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих гликированный гемоглобин.

раунд	негативная селекция	позитивная селекция
1	0.5 мг магнитных частиц, блокированных Твин-20, в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.5 мг gHb-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА, в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 3×250 мкл буфера В
2	0.5 мг магнитных частиц, блокированных Твин-20, в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.5 мг gHb-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА, в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 4×250 мкл буфера В
3	0.5 мг магнитных частиц, блокированных Твин-20, в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.5 мг gHb-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА, в течение 45 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 5×500 мкл буфера В
4	0.5 мг магнитных частиц, блокированных Твин-20, в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.5 мг gHb-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 45 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 5×500 мкл буфера В
5	0.5 мг магнитных частиц, блокированных Твин-20, в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.5 мг gHb-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 45 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 5×500 мкл буфера В
6	0.5 мг магнитных частиц, блокированных Твин-20, в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.3 мг gHb-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 45 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 6×500 мкл буфера В
7	0.5 мг магнитных частиц, блокированных Твин-20, в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.3 мг gHb-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 45 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 7×500 мкл буфера В

8	0.5 мг Нв-содержащих магнитных частиц в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.3 мг gНв-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 45 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 8×500 мкл буфера В
9	0.5 мг Нв-содержащих магнитных частиц буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.3 мг gНв-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 45 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 9×500 мкл буфера В
10	0.5 мг Нв-содержащих магнитных частиц буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.3 мг gНв-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 30 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 10×500 мкл буфера В
11	0.5 мг Нв-содержащих магнитных частиц буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.2 мг gНв-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 30 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 10×500 мкл буфера В
12	0.5 мг Нв-содержащих магнитных частиц буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК Инкубация 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки 0.2 мг gНв-содержащих магнитных частиц Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл ЧСА и 0.1 мг/мл суммарной дрожжевой РНК, в течение 30 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 10×500 мкл буфера В, содержащего 0.5 М NaCl

Приложение 3. Условия *in vitro* селекции 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих фотопроtein обелин.

раунд	негативная селекция	позитивная селекция
1	5 мкл Ni-сефарозы в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл суммарной тРНК <i>E. coli</i> , 0.01 % БСА Инкубация в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки ~130 пмоль His ₆ -Obe, иммобилизованного на Ni-сефарозе (5 мкл) Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл суммарной тРНК <i>E. coli</i> , 0.01 % БСА, в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 3x150 мкл буфера В
2	5 мкл Ni-сефарозы в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл суммарной тРНК <i>E. coli</i> , 0.01 % БСА Инкубация в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки ~130 пмоль His ₆ -Obe, иммобилизованного на Ni-сефарозе (5 мкл) Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл суммарной тРНК <i>E. coli</i> , 0.01 % БСА, в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 4x150 мкл буфера В
3	5 мкл Ni-сефарозы в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл суммарной тРНК <i>E. coli</i> , 0.01 % БСА Инкубация в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки ~130 пмоль His ₆ -Obe, иммобилизованного на Ni-сефарозе (5 мкл) Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл суммарной тРНК <i>E. coli</i> , 0.01 % БСА, в течение 45 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 5x150 мкл буфера В
4	5 мкл Ni-сефарозы в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл суммарной тРНК <i>E. coli</i> , 0.01 % БСА Инкубация в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании	0.8 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки ~70 пмоль His ₆ -Obe, иммобилизованного на Ni-сефарозе (5 мкл) Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл суммарной тРНК <i>E. coli</i> , 0.01 % БСА, в течение 45 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 5x150 мкл буфера В
5	5 мкл Ni-сефарозы в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА Инкубация в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки ~70 пмоль His ₆ -Obe, иммобилизованного на Ni-сефарозе (5 мкл) Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА, в течение 30 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 5x150 мкл буфера В
6	5 мкл Ni-сефарозы в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА Инкубация в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки ~70 пмоль His ₆ -Obe, иммобилизованного на Ni-сефарозе (5 мкл) Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА, в течение

		30 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 7x150 мкл буфера В
7	10 мкл Ni-сер магнитных частиц в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА Инкубация в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки ~130 пмоль His ₆ -Obe, иммобилизованного на Ni-сер магнитных частицах (10 мкл) Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА, в течение 30 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 7x150 мкл буфера В
8	10 мкл Ni-сер магнитных частиц в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА Инкубация в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки ~70 пмоль His ₆ -Obe, иммобилизованного на Ni-сер магнитных частицах (10 мкл) Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА, в течение 30 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 8x150 мкл буфера В
9	10 мкл Ni-сер магнитных частиц в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА Инкубация в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании	1 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки ~35 пмоль His ₆ -Obe, иммобилизованного на Ni-сер магнитных частицах (10 мкл) Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА, в течение 30 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 9x150 мкл буфера В
10	10 мкл Ni-сер магнитных частиц в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА Инкубация в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании	0.4 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки ~35 пмоль His ₆ -Obe, иммобилизованного на Ni-сер магнитных частицах (10 мкл) Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА, в течение 30 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 10x150 мкл буфера В
11	5 мкл Ni-сер магнитных частиц в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА Инкубация в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании	0.4 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки ~35 пмоль His ₆ -Obe, иммобилизованного на Ni-сер магнитных частицах (5 мкл) Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА, в течение 30 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 10x150 мкл буфера В, содержащего 0.5 М NaCl
12	5 мкл Ni-сер магнитных частиц в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА Инкубация в течение 60 мин при 25 °С и перемешивании	0.4 нмоль 2'-F-РНК-библиотеки ~35 пмоль His ₆ -Obe, иммобилизованного на Ni-сер магнитных частицах (5 мкл) Инкубация в буфере В, содержащем 0.1 мг/мл полиА, 0.01 % БСА, в течение 30 мин при 25 °С и перемешивании Промывка 10x150 мкл буфера В, содержащего 0.5 М мочевины