

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии  
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Е. И. Шишацкая

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г.

## **БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

Получение высокоаффинных ДНК аптамеров – сенсорных элементов  
аналитической системы по выявлению кардиомаркера тропонина

Руководитель \_\_\_\_\_ профессор, д.б.н.Л. А. Франк

Выпускник \_\_\_\_\_ Н. С. Гончарова

Красноярск 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	8
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1 Аптамеры.....	8
1.1.1 Процесс отбора аптамеров методом SELEX.....	8
1.1.2 Структурные особенности аптамеров.....	11
1.1.3 Преимущества аптамеров.....	12
1.1.4 Применение аптамеров.....	13
1.1.4.1 Аптамеры как биоспецифический элемент в аналитических системах.....	14
1.1.4.2 Применение аптамеров в терапевтических целях.....	15
1.1.4.3 Биосенсоры на основе аптамеров.....	15
1.2 Значение тропонина.....	15
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	18
2.1 Отбор методом SELEX ДНК-аптамеров к тропонину I.....	19
2.2 Получение мутантного варианта рекомбинантного фотопротеина обелина А6С.....	22
2.2.1 Культивирование клеток <i>E. coli</i> .....	22
2.2.2 Выделение и очистка апообелина А6С.....	22
2.2.3 Получение фотопротеина обелина А6С.....	23
2.3 Получение биолюминесцентных репортеров используемых в иммуноанализах.....	24
2.3.1 Синтез конъюгата обелина А6С с антителами к сTnI.....	24

2.3.1.1	Проверка пригодности полученного конъюгата обелина А6С с антителами к сTnI.....	25
2.3.2	Синтез конъюгата обелина А6С с олиготимидилатом.....	25
2.3.3	Получение гибридного белка стрептавидин-обелин.....	26
2.3.3.1	Трансформация клеток <i>E. coli</i> плазмидной ДНК.....	26
2.3.3.2	Культивирование клеток <i>E. coli</i> .....	26
2.3.3.3	Выделение и очистка белка стрептавидин-обелин.....	27
2.3.3.4	Проверка пригодности полученного гибридного белка стрептавидин-обелин.....	28
2.4	Анализ обогащения библиотеки ДНК-аптамеров.....	28
2.5	Анализ нуклеотидных последовательностей с целью выявления последовательностей – кандидатов для дальнейшего исследования.....	29
2.6	Исследование аффинности и специфичности индивидуальных аптамеров биолюминесцентным микроанализом.....	30
2.7	Оптимизация нуклеотидной последовательности аптамера TnAp2.....	31
2.8	Анализ взаимной локализации других аптамеров по сравнению с локализацией TnAp2t1.....	32
2.9	Модельный биолюминесцентный твердофазный анализ сTnI на основе комплекса сэндвич-типа, образованного парой отобранных аптамеров.....	32
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	33
3.1	Селекция аптамеров к тропонину I.....	33
3.2	Получение мутантного варианта фотопротейна обелина (А6С) в высокоочищенном виде.....	35
3.3	Получение биолюминесцентных репортеров используемых в иммуноанализах.....	36

3.3.1 Синтез конъюгатов обелина А6С с антителами к сTnI и с олиготимидилатом.....	36
3.3.2 Проверка полученного конъюгата abTnI-Obe.....	37
3.3.3 Получение гибридного белка стрептавидин-обелин.....	39
3.3.4 Проверка полученного гибридного белка Stavi-Obe.....	40
3.4 Анализ обогащения полученных олигонуклеотидных библиотек.....	40
3.5 Анализ нуклеотидных последовательностей с целью выявления последовательностей – кандидатов для дальнейшего исследования.....	42
3.6 Исследование аффинности и специфичности индивидуальных аптамеров биоломинесцентным микроанализом.....	43
3.7 Оптимизация последовательности аптамера TnAp2.....	47
3.8 Анализ взаимной локализации аптамера TnAp2t1 и других аптамеров на молекуле тропонина I.....	49
3.9 Модельный биоломинесцентный твердофазный анализ сTnI на основе комплекса сэндвич-типа, образованного парой отобранных аптамеров.....	51
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	53
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	55
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	56

## ВВЕДЕНИЕ

Основной функцией нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) долгое время считалось хранение наследственной информации (ДНК) и ее реализация (РНК) [1]. Однако сейчас получены сведения о том, что нуклеиновые кислоты (НК) способны к выполнению в клетке различных функций.

Аптамеры – это короткие (от 30 до 80 н.о.) одноцепочечные молекулы ДНК или РНК, которые способны образовывать уникальные трехмерные структуры в результате взаимодействия комплементарных участков цепи, стэкинг-взаимодействий и пр. [2]. Такие структуры определяют важное свойство аптамеров – высокоспецифичную избирательность при взаимодействии с молекулами-мишенями. Процесс отбора аптамеров, аффинных к выбранной мишени *in vitro* получил название SELEX. Этот метод представляет собой многократно повторяемый цикл, включающий связывание олигонуклеотидов с мишенью, выделение связавшейся фракции олигонуклеотидов и её амплификацию [3]. Стартовые молекулы нуклеиновых кислот (аптамеры) отбираются из огромного набора синтетических случайных нуклеотидных последовательностей (более  $10^{15}$ ), называемого комбинаторной библиотекой [4]. В результате образуется обогащенный вариант библиотеки, содержащий аптамеры с наибольшим сродством к молекуле-мишени.

К настоящему времени проведены многочисленные эксперименты по отбору *in vitro*, которые показали, что аптамеры могут быть получены к самым разным мишеням: нуклеотидам, аминокислотам, лекарствам, к биополимерам, таким как пептиды, белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды, а также к ионам, фосфолипидам, вирусам, бактериям, клеточным фрагментам, целым клеткам и даже тканям [5,6].

Способность специфически связываться с молекулами-мишенями делает аптамеры нуклеотидными аналогами антител. Однако получение аптамеров – процесс значительно более простой и существенно менее дорогостоящий, чем получение антител [7]. Также они являются более стабильными молекулами, а

их небольшой размер обеспечивает лучшее проникновение в органы и ткани. Кроме того, аптамеры не обладают иммуногенностью и токсичностью, поэтому они рассматриваются в качестве перспективной замены антител в лекарственной терапии и в качестве высокоаффинных реагентов в биотехнологии<sup>[8]</sup>. Таким образом, химия аптамеров является перспективным прикладным направлением исследований нуклеиновых кислот для создания новых диагностических систем и лекарственных препаратов.

Целью данной работы является получение высокоаффинных ДНК-аптамеров – сенсорных элементов аналитической системы по выявлению кардиомаркера тропонина I. Этот белок является одним из важнейших высокоспецифических кардиомаркеров, определение концентрации в крови которого используется в ранней диагностике нарушений работы сердца, связанных с повреждением миокарда.

Для достижения этой цели требовалось решить следующие задачи:

1. С помощью технологии SELEX провести обогащение библиотеки одноцепочечных ДНК-олигонуклеотидов последовательностями, аффинными к тропонину I.
2. Получить мутантный вариант фотопротеина обелина (A6C) в высокоочищенном виде и его конъюгаты с антителами к тропонину I и олиготимидилатом, которые являются ключевыми репортерными элементами биоломинесцентного анализа.
3. Получить гибридный белок стрептавидин-обелин в высокоочищенном виде – репортерную молекулу в биоломинесцентном анализе.
4. Предложить способ оценки аффинности и специфичности обогащенных библиотек и отобранных аптамеров на основе биоломинесцентного анализа.
5. Оценить процесс обогащения олигонуклеотидных библиотек с помощью биоломинесцентного твердофазного анализа.

6. Провести исследование аффинности и специфичности аптамеров с помощью билюминесцентного анализа и определить константы диссоциации для наиболее аффинных аптамеров.
7. Провести скрининг аптамеров, связывающихся с разными эпитопами тропонина Ic помощью билюминесцентного твердофазного анализа «сэндвич» формата.

# ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

## 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Аптамеры

Короткие одноцепочечные олигонуклеотиды (ДНК или РНК), связывающиеся с высокой аффинностью и специфичностью с различными мишенями, получили название аптамеры. Сам термин происходит из латинского слова *artus*, что означает «подходящий, прилаженный» и греческого *μέρος* «часть» [9]. Из-за структурных различий рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов наблюдаются различия в структуре и свойствах соответствующих аптамеров, даже при связывании с одной и той же мишенью. К примеру, ДНК является более химически стабильной молекулой с более высокой температурой плавления. А молекулы РНК способны к образованию большего разнообразия пространственных структур, чем ДНК [1].

#### 1.1.1 Процесс отбора аптамеров методом SELEX

Получение последовательностей нуклеиновых кислот с уникальными свойствами достигается направленным отбором *in vitro* из комбинаторных библиотек олигонуклеотидов методом SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) [10]. Данный метод был описан в 1990 году и продемонстрировал способность отобранных аптамеров связывать широкий спектр молекул-мишеней от крупных белков до небольших молекул [11, 12].

Первое десятилетие развития технологии SELEX было отмечено преобладанием РНК-аптамеров. Возможно, это связано с общим мнением, что только молекулы РНК могут образовывать функциональные мотивы. Позже была продемонстрирована способность одноцепочечной ДНК складываться в функциональные пространственные структуры. До 2007 года около 70% всех



экспериментов в области аптамеров пришлось на изучение РНК-аптамеров. Но к 2013 году число публикаций возросло в области изучения ДНК-аптамеров. Было продемонстрировано, что аптамеры ДНК и РНК, полученные для ряда малых молекул, показали сходные результаты. Таким образом, ни РНК, ни библиотеки ДНК не обеспечивают каких-либо системных предпочтений для выделения аптамеров<sup>[13]</sup>.

Процесс SELEX начинается с химически синтезированной библиотеки, которая обычно содержит до  $10^{15}$  различных уникальных последовательностей. Молекулярное разнообразие такой библиотеки зависит от размера рандомизированного района. Эта область фланкирована двумя стандартными последовательностями для связывания праймеров при амплификации. В среднем, длина этой области 20-60нт. В процессе селекции библиотека олигонуклеотидов случайной последовательности инкубируется с целевой мишенью, представляющей интерес в выбранном буфере при данной температуре (рис. 1).

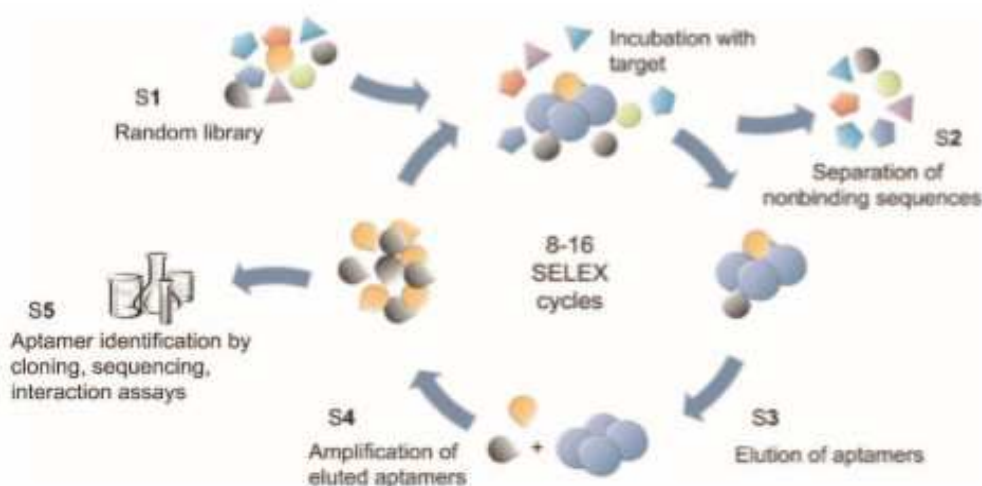


Рисунок 1 – Этапы (S1-S5) SELEX процесса: S1: оптимизированные библиотеки, S2: разделение несвязавшихся последовательностей, S3: элюирование аптамеров, S4: амплификация элюированных аптамеров, S5: высокопроизводительное секвенирование и биоинформационный анализ <sup>[14]</sup>

На этом этапе очень небольшая часть отдельных последовательностей имеет тенденцию взаимодействовать с мишенью, и эти последовательности отделяются от остальной библиотеки посредством любого из методов физического разделения. Как правило, мишени обычно иммобилизуют на твердой подложке и последовательности, которые не взаимодействуют с этой мишенью, могут быть легко удалены простой стадией промывки [6]. Последовательности, связанные с мишенью, выделяются и амплифицируются с помощью ПЦР (ДНК SELEX) или ПЦР с обратной транскрипцией (RNASELEX). Продукты ПЦР, являющиеся новым под-пулом, используются для следующего раунда отбора. После нескольких отборочных раундов обогащенные последовательности секвенируются для получения информации о последовательности каждого аптамера. Как правило, требуется от нескольких недель до нескольких месяцев, чтобы получить семейство конкретных олигонуклеотидов-кандидатов на аптамер<sup>[15]</sup>.

В последние годы технология SELEX продемонстрировала значительный подъем, так как появились новые разработки в области химического синтеза, технического оборудования и методов анализа для улучшения свойств аптамеров и эффективности их разработки<sup>[16]</sup>.

Например, вариант counter SELEX использует аналогичные молекулы-мишени в качестве субъектов инкубации. Этот метод был введен Jenison R.D. в 1994 году для повышения специфичности аптамеров. По сравнению с традиционным SELEX в counterSELEX добавляется дополнительный шаг с использованием структурно-подобных целей в инкубации с аптамерами для эффективного распознавания неспецифических олигонуклеотидов. Эта процедура была применена к другим модифицированным методам SELEX для получения более специфичных аптамеров [10,15,16].

## 1.1.2 Структурные особенности аптамеров

Аптамеры способны образовывать различные вторичные и третичные структуры, благодаря взаимодействиям комплементарных участков цепи.

Наиболее важными для специфического взаимодействия аптамеров с мишенями являются неспаренные участки олигонуклеотида, а участки со стабильной вторичной структурой необходимы для поддержания правильного взаиморасположения элементов узнавания [6]. Взаимодействия между аптамерами и их мишенями определяются пространственным распределением заряженных фосфатных групп и неспаренных оснований, образующих уникальное распределение функциональных групп, способных к различным межмолекулярным взаимодействиям, включая электростатические и ван-дер-ваальсовы взаимодействия и образование водородных связей с соответствующими функциональными группами молекулярной мишени [9].

Наиболее удивительными и активно изучаемыми структурами являются G-богатые структуры, так называемые G-квадруплексы. Многие РНК и ДНК аптамеры, отобранные к специфичным мишеням с помощью селекции *in vitro*, образуют именно квадруплексные структуры.

Поли(G)-нити представляют собой новый тип укладки ДНК – четырехцепочечную спираль, где четыре гуаниновых основания из разных цепей образуют плоскую структуру, удерживаемую G-G-парными взаимодействиями (рис. 2А). Такие структуры отличаются высокой стабильностью и называются гуаниновыми (G)-квартетами, или G-тетрадами. Каждый G-квартет скреплен в сумме восемью водородными связями, образованными взаимодействием Уотсон-Криковской стороны одного гуанинового основания с Хугстиновской стороной другого. Способ стабилизации такой ДНК – формирование внутримолекулярных G-квартетов путем многократного складывания. Такие G-квартетсодержащие структуры называются квадруплексами или тетраплексами (рис. 2Б) [17, 18, 19, 20].

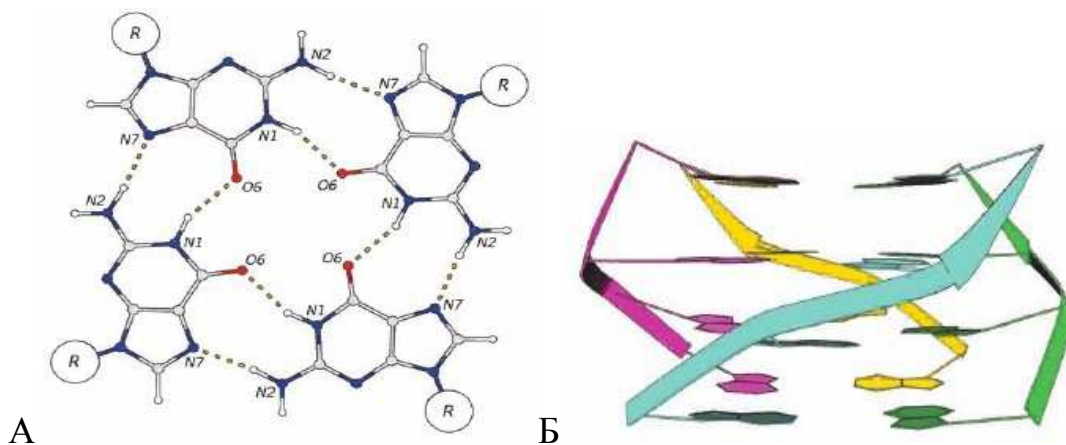


Рисунок 2 – А) Организация G-квартета. Четыре остатка гуанина образуют квадратную компланарную структуру, каждое гетероциклическое основание является донором и акцептором водородной связи: N1 и N2. Б) Четырехтяжевой межмолекулярный параллельный G-квадруплекс [20]

### 1.1.3 Преимущества аптамеров

В последнее время аптамеры привлекают внимание многих ученых, их рассматривают как аналоги моноклональных антител. При этом они имеют ряд преимуществ перед антителами, благодаря своим уникальным свойствам.

Аптамеры имеют более высокую аффинность и специфичность связывания и могут распознавать как внутриклеточные, так и внеклеточные мишени с константой диссоциации ( $K_d$ ) в микромолярном и наномолярном диапазоне. Они способны различать близкородственные молекулы, а специфика может быть скорректирована с помощью модификаций последовательности. Наличие гибких структур позволяет связываться со скрытыми эпитопами мишени [5].

Аптамеры, полученные однажды, могут быть синтезированы вновь в том же количестве с высокой точностью с помощью химических реакций. Кроме того, они могут быть легко модифицированы различными химическими реакциями для повышения их стабильности и нуклеазной устойчивости. Аптамеры устойчивы к суровым химическим и физическим условиям, способны восстановить свою нативную конформацию после действия высоких

температур и, таким образом, они могут многократно использоваться при определенных условиях [21].

Аптамеры не распознаются иммунной системой и не стимулируют отрицательный иммунный ответ из-за их небольшого размера (около 30 кДа). Благодаря этому, аптамеры способны связываться с вирусами и другими патогенами, которые избегают распознавания иммунной системой. Они легче проникают в ткани и клетки. Их получение значительно проще, дешевле и быстрее, чем получение моноклональных антител [22, 23].

В терапевтических применениях добавление обратных комплементарных олигонуклеотидов может изменить действие аптамера или позволит контролируемое высвобождение лекарственного средства и, таким образом, минимизирует побочные эффекты. Кроме того, аптамеры могут снизить побочные эффекты путем целенаправленного лечения или целенаправленной доставки лекарств. Аптамеры синтезируются и модифицируются *in vitro* и являются относительно быстрыми и недорогими для производства по сравнению с антителами, что позволяет осуществлять крупномасштабное производство [5, 21, 22].

#### **1.1.4 Применение аптамеров**

Аптамеры изучаются как биоматериалы в многочисленных исследованиях, касающихся их использования в качестве диагностического, терапевтического инструмента и биосенсорного датчика, а также в разработке новых лекарств и систем их доставки. Осуществляются поиски аптамеров, которые специфичны к молекулярным мишеням, связанным с различными заболеваниями. На данный момент разработанные аптамеры направлены, в первую очередь, на применение их в качестве диагностического и терапевтического инструмента [15, 24].

#### 1.1.4.1 Аптамеры как биоспецифический элемент в аналитических системах

Ключом к эффективному лечению любого заболевания является ранний и точный диагноз. Использование аптамеров в качестве диагностических средств позволяет идентифицировать разные виды и стадии заболеваний [25]. Поскольку чувствительность сенсоров на основе аптамеров очень высока требуются очень малые количества крови или других биологических жидкостей для определения маркеров заболевания. В области диагностики аптамеры применяются для обнаружения самих инфекционных агентов, антигенов и различных биомаркеров. Разработаны новые методы, способные специфично распознать патогенные для человека бактерии (*Salmonellatyphimurium*, *Salmonellaenteritidis*, *Staphylococcus aureus*)[26, 27]. Аптамеры могут быть сгенерированы против данного конкретного инфекционного агента, такого как вирус, и могут далее использоваться для диагностических целей [28]. На сегодняшний день аптамеры применяют в том числе и в диагностике онкологических заболеваний [29, 30, 31, 32, 33].

В последнее время наблюдается увеличение спроса на обнаружение малых молекул (<900,0 г/моль). Эти молекулы включают токсины, антибиотики, молекулярные маркеры, лекарства, тяжелые металлы и ионы. Фармацевтические и медицинские отрасли требуют быстрого и чувствительного обнаружения небольших молекул, таких как молекулярные маркеры болезней, лекарств или ионов металлов, необходимых для мониторинга состояния здоровья человека и животных. Сельскохозяйственная промышленность требует измерения уровня микотоксинов и тяжелых металлов для обеспечения безопасности пищевых продуктов. Поскольку возрастает потребность в детектировании малых молекул, разрабатываются датчики на основе аптамеров, которые становятся многообещающей альтернативой обычным методам обнаружения малых молекул [34].

#### **1.1.4.2 Применение аптамеров в терапевтических целях**

Одно из самых важных применений аптамеров – это их использование в качестве лекарственных средств. Создан ДНК-аптамер, связывающий и ингибирующий тромбин, который является перспективным кандидатом для создания нового поколения антикоагулянтов прямого действия [35]. В настоящее время несколько лекарств на основе аптамеров проходят клинические испытания, и уже одобрен первый аптамер, называемый Масиген. Это первый лекарственный препарат на основе аптамера к фактору роста сосудистого эндотелия, который был разрешен в США к применению при склеротической дегенерации сетчатки [2].

Аптамер также может быть использован в качестве элемента доставки лекарства. Высокая связывающая способность и специфичность, низкая иммуногенность и легко модифицируемая химическая структура, делают аптамеры пригодными для направленного транспорта лекарственного вещества [36].

#### **1.1.4.3 Биосенсоры на основе аптамеров**

Биосенсоры, в которых в качестве узнающего элемента используются аптамеры названы аптасенсорами. Возможность создания таких устройств открывает новую страницу в создании эффективных методов экспресс-диагностики. Чувствительность аптасенсоров очень высока и зависит от типа мишени. С помощью такого аптасенсора можно определить место локализации опухоли и воспалительного процесса [37].

### **1.2 Значение тропонина**

Тропониновый комплекс имеет важное медицинское значение. Так, например, тропонин является мишенью для кардиотонических лекарственных

средств, используемых при терапии сердечной недостаточности. Ряд мутаций в генах белков тропонинового комплекса приводит к развитию различных типов кардиомиопатий. На протяжении последних 25 лет специфичные для сердечной ткани изоформы TnI и TnT используются для диагностики патологий, связанных с некрозом кардиомиоцитов (инфаркт миокарда, травматическое повреждение миокарда и др.) [38].

Тропонин– специфический регуляторный комплекс, который участвует в процессе мышечного сокращения. Содержится в скелетных мышцах и сердечной мышце, но не содержится в гладкой мускулатуре. Этот комплекс состоит из трех субъединиц, тропонинов C, T и I, названных в соответствии с их функциями. Тропонин C – высококонсервативная субъединица, отвечающая за связь с ионами кальция, тропонин I –ингибиторная субъединица актомиозиновой АТФазы, которая связывается с актином, препятствуя взаимодействию актина и миозина, когда ионы кальция не связаны с тропонином C. Наконец, тропонин T – субъединица, взаимодействующая с тропомиозином, удерживая весь комплекс [39, 40].

Развитие острого инфаркта миокарда (ОИМ) сопровождается обширным разрушением кардиомиоцитов и, следовательно, большим выбросом в кровь специфичных для миокарда белков.

Для ОИМ сердечный тропонин T и сердечный тропонин I считаются более чувствительными и специфичными, чем другие сердечные биомаркеры, такие как миоглобин и креатинкиназа. Тропонин I (TnI) существует в трех уникальных по структуре изоформах для каждого типа поперечно-полосатых мышц (быстрых, медленных и сердечных). Сердечная изоформа тропонина I (сTnI) существенно отличается от других изоформ TnI, локализующихся в скелетной мускулатуре, поскольку содержит дополнительный N-концевой полипептид, состоящий из тридцати одного аминокислотного остатка. Таким образом, сTnI можно считать абсолютно специфичным кардиомаркером [41].

При разрушении кардиомиоцитов тропонины попадают в периферический кровоток в течение 2-4 часов. В кровотоке остаются около 10



дней. Длительное нахождение в крови этих биомаркеров способствует диагностированию различных сердечных заболеваний. У здоровых людей уровень концентрации тропонина I составляет около 0,001 мкг/л, у пациентов с ОИМ он увеличивается до 100 мкг/л. Даже концентрация 0,01 мкг/л свидетельствует о нарушениях сердечной функции и необходимости детального обследования по поводу ОИМ [42].

Низкие диагностические уровни тропонинов предъявляют высокие требования к чувствительности методов для их обнаружения. Предлагается использование биосенсоров для обнаружения и количественного определения молекул-мишеней, участвующих в сердечном взаимодействии. В качестве узнающего элемента биосенсора могут использоваться аптамеры, уже показавшие свои взаимодействия с молекулярными мишенями, связанные с сердечно-сосудистыми заболеваниями. На данный момент, уже опубликованы несколько исследований с использованием аптамеров в качестве биосенсора для обнаружения тропонинов [43, 44].

Проведенный нами анализ литературных данных показывает актуальность цели, сформулированной в данной работе. В перспективе она направлена на создание высокочувствительной аналитической системы на основе ДНК-сенсорных элементов для раннего обнаружения дисфункции сердечной мышцы.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы: дрожжевой экстракт (Medigen, Россия), бакто-триптон Tween-20 (Panreac, Germany), агар (Диам, Россия), ампициллин (ОАО Синтез, Россия), мочевины (AppliChem, США), ТритонХ100, Tris и Bicine (Sigma, США), ЭДТА-натриевая соль (Sigma-Aldrich, США), агароза (Gerbu, Германия). Все остальные использованные реактивы были квалификации не ниже о.с.ч. и х.ч.

Все используемые в работе олигонуклеотиды были синтезированы фирмой Биосан (Россия).

Для твердофазного анализа использовали непрозрачные стриповые планшеты фирмы Costar (США).

Все использованные буферы и среды в методах приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Состав буферных растворов и сред

Название	Состав
Буфер PBS	0,1 МК-На фосфатный буфер pH 7,0; 0,15МNaCl
Буфер TAE (50X)	2М Tris, 50мМ ЭДТА pH 8,0
Буфер TE	10 мМ Tris-HClpH 8,0; 1 мМ ЭДТА
Буфер T	20 мМ Tris-HCl pH 7,0
Буфер для связывания	PBS, 1 мМ MgCl <sub>2</sub>
Промывочный буфер	PBS, 1 мМ MgCl <sub>2</sub> , 0,1% Tween
LB-агар	1,5% агара в LB-среде
LB-среда	20 г/л бакто-триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5-7 г/л NaCl, pH 7,4
SOB-среда	20 г/л бакто-триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,6 г/л NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl <sub>2</sub> , 10 мМ MgSO <sub>4</sub> pH 7,0
SOC-среда	SOB-среда, 20 мМ глюкозы
Буфер А	6 М мочевины, 20 мМ Tris-HCl pH 7,0; 5 мМ CaCl <sub>2</sub>
Буфер В	1М ацетата натрия в буфере А
Кальциевый буфер	0,1М CaCl <sub>2</sub> , 0,1М Tris-HCl pH 8,8
Буфер С	50мМ Bicine pH 8,5; 0,1М NaCl; 5мМ ЭДТА
Буфер для метки	20 мМTris-HClpH 7,0; 5 мМЭДТА; 0,15МNaCl, 0,1% BSA

## 2.1 Отбор методом SELEX ДНК-аптамеров к тропонинуI

Используемая ДНК-библиотека аптамеров синтезирована компанией Sangon Biotech(Китай) и представляет собой набор одноцепочечных ДНК (5'-GGCAGCAGGAAGACAAGACA-N<sub>40</sub>-TGGTTCTGTGGTTGCTCTGT-3'), каждая из которых фланкирована стандартными последовательностями для связывания праймеров при амплификации, а центральные 40 нуклеотидов рандомизированы. Перед каждым раундом селекции оцДНК-библиотеку или ее обогащенный в предыдущем раунде вариант денатурировали нагреванием в течение 5 минут при 90°C в буфере для связывания (таблица 1), после чего ренатурировали при комнатной температуре в течение 15 минут.

В качестве мишени для позитивной селекции использовали рекомбинантный сердечный тропонинI человека (сTnI)(HyTest, Россия), а в качестве негативных мишеней – человеческий сывороточный альбумин (HSA) (Reanal, Венгрия), бычий сывороточный альбумин (BSA)(Sigma-Aldrich, США), рекомбинантный миоглобин человека (Myo) и креатинкиназа MB (СКМВ) (Abcam, Англия), рекомбинантные сердечные тропонинT(сTnT) и тропонин C(сTnC) (HyTest, Россия).

Для каждого раунда селекции использовали соответствующую мишень, иммобилизованную путем инкубации (50 мкл на лунку, 10 мкг/мл в буфере PBS, при 4°C в течение ночи) на поверхности лунки стрипового планшета (Costar, США).

Проведенные раунды селекции представлены в таблице 2. В ходе отбора было проведено 12 раундов селекции, включающих: 1) инкубацию исходной библиотеки аптамеров в первом раунде селекции или ее обогащенный в предыдущем раунде вариант с сTnI при комнатной температуре в буфере для связывания; 2) удаление несвязавшихся аптамеров с помощью отмывок промывочным буфером; 3) трехкратную экстракцию связанных с сTnI аптамеров денатурацией в 50 мкл буфера TE при 95°C в течение 10 минут

(термомиксер Eppendorf, Германия); 4) амплификацию обогащенной библиотеки аптамеров с помощью симметричной и ассиметричной ПЦР.

Для увеличения специфичности отбираемых аптамеров проводили негативную селекцию с помощью HSA (KS1 и KS7), cTnT (KS2 и KS9), cTnC (KS6 и KS10), Myo (KS4), СКМВ (KS5) и BSA (KS3). Для увеличения аффинности отбираемых аптамеров варьировали время инкубации и количество промывок для удаления несвязавшихся аптамеров (см. таблицу 2). В результате отбора происходит постепенное обогащение библиотеки последовательностями, обладающими повышенным сродством к cTnI.

Таблица 2 – Характеристика раундов

№ раунда	ДНК-библиотека аптамеров, нмоль	Мишень	Время инкубации, мин	Количество отмывок промывочным буфером
R1	1	cTnI	60	2X
R2	1	cTnI	60	2X
R3	1	cTnI	60	3X
KS1	0.2	HSA	30	3X
KS2→	0.2	cTnT→	40	
R4		cTnI	45	3X
KS3→	0.23	BSA→	30	
R5		cTnI	45	3X
KS4→	0.38	Myo→	30	
R6		cTnI	45	4X
KS5→	0.3	СКМВ→	30	
R7		cTnI	45	4X
KS6→	0.21	cTnC→	30	
R8		cTnI	30	4X
KS7→	0.48	HSA→	30	
R9		cTnI	30	5X

Окончание таблицы 2

№ раунда	ДНК-библиотека аптамеров, нмоль	Мишень	Время инкубации, мин	Количество отмывок промывочным буфером
KS9→	0.25	cTnT→	30	
R11		cTnI	30	5X
KS10→	0.24	cTnC→	30	
R12		cTnI	30	5X

Аmplификацию обогащенной библиотеки аптамеров проводили с помощью симметричной и ассиметричной ПЦР.

**Проведение симметричной ПЦР:** 5 мкл раствора аптамеров (5-15 нг) в TE буфере смешивали с 45 мкл реакционной смеси, содержащей 1×Taq-буфер (Evrogen, Россия), 0,2 mM dNTPs (СибЭнзим, Россия), 0,3 мкМ прямого праймера (5'-GGCAGCAGGAAGACAAGACA-3'), 0,3 мкМ обратного праймера (Bio-5'-ACAGAGCAACCACAGAACCA-3'), HotStartDNA-полимераза 0,05 ед/мкл (Evrogen, Россия).

**Проведение ассиметричной ПЦР:** 5 мкл симметричного ПЦР продукта смешивали с 45 мкл реакционной смеси: 1×Taq-буфер, 0,2 mM dNTPs, 1 мкМ прямого праймера, 50 нМ обратного праймера, HotStartDNA-полимераза 0,05 ед/мкл.

ПЦР проводили в амплификаторе MJMiniPersonalThermalCycler (BioRad, США) по следующей программе: предварительная денатурация матрицы – 2 мин при 95°C, далее 15 циклов: 30 сек при 95 C, 15 сек при 56°C, 15 сек при 72°C.

Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в камере для горизонтального электрофореза (Bio-Rad, США) с источником постоянного тока ElectrophoresesPowerSupply-EPS 3501 XL (AmershamPharmaciaBiotech, Великобритания). Электрофорез проводили в TAE буфере при напряжении 100V. Полосы ДНК проявляли

окрашиванием бромистым этидием (3,8-диамино-5-этил-6-фенил-фенантридиум бромид, EtBr).

Для каждого следующего раунда отбора аптамеры очищали с помощью центрифужной фильтрационной ячейки для концентрирования Amicon Ultra-0,5 10K Centrifugal Filter Devices (Merk Millipore, Германия).

Концентрацию оцДНК-аптамеров определяли спектрофотометрически (NanoProp Lite Spectrophotometer, ThermoScientific, США). Величина коэффициента экстинкции для используемой ДНК-аптамерной библиотеки составляет  $\epsilon_{260} = 770675 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## **2.2 Получение мутантного варианта рекомбинантного фотопротеина обелина А6С**

### **2.2.1 Культивирование клеток *E. coli***

Штамм-продуцент *E. coli*, экспрессирующий мутантный вариант апообелина А6С был получен ранее в лаборатории фотобиологии ИФБ СО РАН.

Клетки *E. coli* культивировали в LB-среде, содержащей ампициллин (200 мкг/мл), с постоянным перемешиванием при 37°C до плотности  $OD_{590\text{nm}} = 0,8$ . Индукцию синтеза белка проводили добавлением 1 mM ИПТГ (изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид, Fermentas, США) и культивировали еще в течение 3-х часов в тех же условиях. Клетки осаждали центрифугированием (5000g, 15 мин., 4°C). Полученную биомассу использовали для выделения белка.

### **2.2.2 Выделение и очистка апообелина А6С**

Выделение рекомбинантного апообелина А6С из телец включения проводили по способу, разработанному в лаборатории фотобиологии ИФБ СО РАН для рекомбинантного обелина дикого типа [45]. Полученную клеточную

массу ресуспендировали в пятикратном (г/мл) объеме буфера Т и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора UD-20 («Teschpan», Польша) 8 раз по 20 секунд на льду. Затем образец центрифугировали (10000g, 10 мин., 4°C), полученный осадок промывали, последовательно ресуспендируя в буфере Т, содержащем 0,15M NaCl, затем в буфере Т с добавлением 0,1% Тритона X-100 и с добавлением 5 mM CaCl<sub>2</sub>, отделяя осадок центрифугированием (10000g, 10 мин) после каждой промывки. Финальный осадок растворяли 6M раствором мочевины, содержащей 20 mM Tris-HCl pH 7,0 и 5mM CaCl<sub>2</sub> (4°C, в течение ночи), затем снова центрифугировали. Супернатант хроматографировали на колонке HiTrap DEAE FF (GE Healthcare) с помощью хроматографической системы BioLogic LP (Bio-Rad, США). Элюцию веществ с колонки проводили буфером А в градиенте концентраций ацетата натрия от 0 до 0,5M. Скорость элюции составляла 2 мл/мин. Полученный апообелин концентрировали с помощью центрифугирования в фильтрационной ячейке Amicon Ultra-15 (Millipore, Германия).

Концентрацию апообелина определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент экстинкции  $\epsilon_{280} = 40450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Перед определением аликвоту апообелина переводили в буфер Т с помощью гель-фильтрации на колонке HiTrap Desalting Columns, уравновешенной буфером Т на хроматографической системе АКТА purifier (GE Healthcare, Великобритания). При расчете концентрации белка учитывали все разведения.

### **2.2.3 Получение фотопротеинаобелина А6С**

Аликвоту раствора апообелина А6С после хроматографии разводили 10-кратным объемом буфера ТЕ, содержащем 10mM дитиотреитола (ThermoScientific, США), добавляли 1,2-кратный молярный избыток целентеразина (ProlumeLtd. Pinetop, США), и инкубировали при 4°C в течение суток. Активированный обелин отделяли от апообелина с помощью ионообменной хроматографии на колонке Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare) с

помощью хроматографической системы АКТА purifier (GE Healthcare, Великобритания). Элюцию белков с колонки проводили градиентом NaCl (0-0,35 M) в буфере TE со скоростью 1 мл/мин.

Концентрацию обелина определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент экстинкции для 2-гидропероксицелентеразина, связанного с акворином ( $\epsilon_{460} = 1815 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Биолюминесцентный сигнал фотопротеинов измеряли с помощью кюветного люминометра (модель БЛМ 8802, СКБ Наука, Красноярск). Сигнал регистрировали с помощью самописца (модель 2210, ЛКВ, Швеция). Измерения проводили в 0,1M Tris-HCl pH 8,8, содержащем 10мM ЭДТА, сразу после добавления кальциевого буфера.

## **2.3 Получение биолюминесцентных репортеров используемых в иммуноанализах**

### **2.3.1 Синтез конъюгата обелина А6С с антителами к сTnI**

Конъюгат обелина А6С с иммуноглобулином получали по аналогии с методом, описанным в [46]. Моноклональные антитела к сTnI (abTnI) (клон 19С7, Abcam, Великобритания), переводили в буфер С на колонке HiTrapDesaltingColumns, добавляли 50-кратный молярный избыток сукцинимидного эфира 4-(N-малеимидометил-) циклогексановой кислоты (SMCC, ThermoFisher Scientific, США), растворенном в диметилсульфоксиде (MP Biomedicals, США) и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Избыток реагента отделяли гель-фильтрацией на колонке HiTrapDesaltingColumns, уравновешенной буфером TE.

Обелин А6С и SMCC-активированное антитело смешивали в молярном соотношении 10:1 и инкубировали при 4°C в течение ночи. Полученный конъюгат выделяли гель-фильтрацией на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной буфером TE с добавлением



0,15 М NaCl. Полученные фракции анализировали по биолюминесцентной фотопротеиновой активности. Полученный конъюгат хранили в замороженном виде в TE буфере, содержащем 0,1 % BSA и 0,15 М NaCl.

### **2.3.1.1 Проверка пригодности полученного конъюгата обелина А6С с антителами к сТnI**

В лунки планшета вносили по 50 мкл раствора антител к тропонину I(abTnI) (клон IC19, Биалекса, Россия) в PBS и инкубировали в течение ночи при 4°C. После промывки, в лунки добавляли 1% BSA в PBS, инкубировали в течение 1 ч при 37°C со встряхиванием и снова промывали. Далее в лунки вносили по 50 мкл растворов сТnI (2000; 400; 80; 16; 3,2; 0,64; 0,128 нМ) в PBS и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки в лунки вносили конъюгат обелина с антителом к тропонину I(abTnI-Obe) в буфере для метки (таблица 1) активностью 100 отн.ед., инкубировали 40 мин при комнатной температуре и вновь промывали. Биолюминесцентный сигнал связавшегося на поверхности конъюгата обелина измеряли с помощью планшетного люцинометра LB 940 Multimode Reader Mithras (Berthold, Германия) сразу после впрыска раствора 0,1М CaCl<sub>2</sub> в 0,1М Tris-HCl рН 8,8. Сигнал интегрировали в течение 5 секунд без светофильтра.

### **2.3.2 Синтез конъюгата обелина А6С с олиготимидилатом**

Конъюгат обелина с олиготимидилатом, несущим аминоксаметильную группу 5'-NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-p-T<sub>30</sub>, (NH<sub>2</sub>-dT<sub>30</sub>), получали, как описано в работе [47]. 5'-амино-олиготимидилат (Биосан, Россия) модифицировали 100-кратным избытком SMCC, растворенном в диметилсульфоксиде (2 ч при комнатной температуре в 0,1 М NaHCO<sub>3</sub>).

Обелин А6С и SMCC-активированный олиготимидилат инкубировали в молярном соотношении 4:1 при 4°C в течение ночи. Полученный конъюгат

выделяли с помощью анион-обменной хроматографии на колонке Mono Q 5/50 GL. Элюцию белков с колонки проводили градиентом NaCl в буфере TE со скоростью 1 мл/мин. Полученные фракции анализировали по биолюминесцентной фотопротеиновой активности обелина.

### **2.3.3 Получение гибридного белка стрептавидин-обелин**

#### **2.3.3.1 Трансформация клеток *E. coli* плазмидной ДНК**

Компетентные клетки BL21(DE3) Codon Plus (RIPL) брали в объеме 45 мкл клеток на 5 мкл плазмидной ДНК и инкубировали при 0°C в течение 30 мин. Затем проводили «тепловой шок»: клетки нагревали до 42°C в течение 30 сек, затем клетки снова переносили в лед на 2 мин. После этого в пробирку добавляли 450 мкл среды SOC, инкубировали 1 час при 37°C, высевали на LB-агар, содержащий ампициллин (200 мкг/мл), и растили при 37°C.

#### **2.3.3.2 Культивирование клеток *E. coli***

Клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus (RIPL), содержащие целевую плазмиду, культивировали в LB-среде, содержащей ампициллин (200 мг/мл) с постоянным перемешиванием при 37°C до плотности  $OD_{590nm} = 0,8$ . Индукцию синтеза белка проводили добавлением в культуральную среду ИПТГ в конечной концентрации 1 мМ, и культивировали еще в течение 3-х часов в тех же условиях. Клетки осаждали центрифугированием (5000g, 20 мин, 4°C). Супернатант отбрасывали, а полученную клеточную биомассу использовали для выделения белка.

### 2.3.3.3 Выделение и очистка белка стрептавидин-обелин

Выделение рекомбинантного гибридного белка стрептавидин-обелин (Stavi-Obe) из телец включения проводили по способу, разработанному в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН [48]. Полученную клеточную массу ресуспендировали в пятикратном (г/мл) объеме буфера Т и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора UD-20 8 раз по 20 секунд на льду. Затем образец центрифугировали (7000g, 15 мин., 4°C), полученный осадок промывали, последовательно ресуспендируя в буфере Т, содержащем 0,15M NaCl, затем в буфере Т с добавлением 0,1% Тритона X-100 и с добавлением 5 mM CaCl<sub>2</sub>, отделяя осадок центрифугированием (7000g, 15 мин) после каждой промывки. Конечный осадок растворяли в 6 M раствором мочевины, содержащей 20 mM Tris-HCl pH 7,0 в течение 2 ч комнатной температуры, затем снова центрифугировали.

Для удаления мочевины аликвоту апобелка переводили в буфер Т с помощью гель-фильтрации на колонке HiTrap Desalting Columns, уравновешенной буфером Т на хроматографической системе АКТА purifier.

Концентрацию апобелка определяли по методу Лоури спектрофотометрически с использованием набора DC Protein Assay (Bio-Rad, США). В качестве калибровочного образца использовали буфер Т.

Активацию проводили 1,2-кратным молярным избытком целентеразина в буфере TE, содержащем 10 mM ДТТ, при 4°C в течение суток. Активированный белок отделяли от незаряженного апобелка с помощью гель-фильтрации на колонке Superdex 200 10/300 GL, уравновешенной буфером TE с добавлением 0,15M NaCl.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури спектрофотометрически, как указано выше.

Биолюминесцентный сигнал Stavi-Obe измеряли как описано в п. 2.2.3. Полученный белок хранили в замороженном виде в TE буфере, содержащем 0,1% BSA.

### **2.3.3.4 Проверка пригодности полученного гибридного белка стрептавидин-обелин**

В лунки планшета вносили по 50 мкл растворов BSA-Bio (1000; 500; 250; 50; 10; 2; 0,4 нг/мл), полученного ранее в лаборатории фотобиологии ИФБ СО РАН, в буфере, содержащем 0,1М NaHCO<sub>3</sub> и 5мМ ЭДТА и инкубировали 1ч при 37°C. После промывки, в лунки добавляли 1% BSA в PBS pH 7,0 с 5мМ ЭДТА, инкубировали в течение 1 ч со встряхиванием и снова промывали. Далее в лунки вносили Stavi-Obев буфере для метки с активностью 100 отн.ед., инкубировали 40 мин при комнатной температуре и вновь промывали. Биолюминесцентный сигнал связавшегося на поверхности белка Stavi-Obе измеряли как описано в п. 2.3.1.1.

### **2.4 Анализ обогащения библиотеки ДНК-аптамеров**

Для проведения анализа были отобраны алиquotы исходной библиотеки и обогащенных после 8, 10 и 12 раундов селекции аптамерных библиотек и амплифицированы с использованием праймера, комплементарного 5'-константному участку ДНК-библиотеки, помеченным биотином (Bio-5'-GGCAGCAGGAAGACAAGACA-3').

В лунки планшета вносили по 75 мкл раствора стрептавидина (Sigma-Aldrich, США), 10 мкг/мл, в PBS pH 7,5, инкубировали в течение ночи при 4°C и промывали. Затем вносили по 50 мкл растворов биотинилированных исходной либо обогащенных после 8, 10 и 12 раундов селекции аптамерных библиотек в буфере для связывания (таблица 1) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки в лунки вносили по 50 мкл раствора тропонина I (1250; 250; 50; 10; 2; 0,4; 0,08 нМ) в буфере для связывания, инкубировали 1 ч при комнатной температуре и снова промывали. Далее в лунки вносили раствор конъюгата обелин-антитело к тропонину I в буфере для метки с биолюминесцентной активностью 50 отн. ед., инкубировали

40 мин при комнатной температуре и вновь промывали. Билюминесцентный сигнал связавшегося на поверхности обелина измеряли как описано в п. 2.3.1.1.

Полученные в результате билюминесцентного анализа кривые связывания использовали для расчета константы диссоциации ( $K_d$ ) комплексов аптамерная библиотека/аптамер – сTnI. Расчет константы диссоциации комплексов аптамер-тропонин I проводили нелинейной регрессией экспериментальных данных с использованием математического пакета SigmaPlot 2000 по следующей формуле:

$$B = \frac{x + R + \frac{1}{k} - \sqrt{\left(x + R + \frac{1}{k}\right)^2 - 4xR}}{2R} \quad [49],$$

где  $B = L/L_{\max}$ ; отношение пика интенсивности сигнала от образца ( $L$ ) к сигналу от образца с насыщающей концентрацией тропонина I ( $L_{\max}$ );

$R$  – концентрация аптамерной библиотеки к тропонину I или концентрация аптамера к тропонину I;

$x$  – концентрация тропонина I в образцах, вносимых в лунки;

$k$  – константа аффинности.

## **2.5 Анализ нуклеотидных последовательностей с целью выявления последовательностей – кандидатов для дальнейшего исследования**

Для определения первичных последовательностей индивидуальных аптамеров был использован метод высокопроизводительного ДНК-секвенирования. Библиотеку после 12 раунда селекции секвенировали на платформе Miseq (Illumina) в ЦКП «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск).

После первичной биоинформатической обработки результатов были получены выборки уникальных последовательностей и рассчитана частота

встречаемости индивидуальных аптамерных последовательностей. Был получен список первых 10 самых частых аптамеров.

Для скрининга аффинности и специфичности индивидуальных аптамеров к сTnI биолюминесцентным твердофазным анализом были выбраны следующие аптамеры: TnAp1, TnAp2, TnAp4, TnAp5, TnAp10, TnAp12, TnAp13 и TnAp14. Для этого были синтезированы биотинилированные производные аптамеров (Биосан, Новосибирск).

## **2.6 Исследование аффинности и специфичности индивидуальных аптамеров биолюминесцентным микроанализом**

Перед использованием каждый аптамер подвергали рефолдингу путем нагревания до 90°C в течение 5 минут в буфере для связывания с последующим охлаждением при комнатной температуре в течение 15 минут.

В лунки планшета, предварительно активированные стрептавидином как описано в п. 2.4, вносили по 50 мкл раствора биотинилированного аптамера в буфере для связывания, инкубировали со встряхиванием в течение 30 минут при комнатной температуре и промывали. Затем в лунки вносили по 50 мкл раствора сTnI (1250; 250; 50; 10; 2; 0,4; 0,08 нМ) в буфере для связывания в двух повторах, а в контрольные лунки вносили по 50 мкл этого же буфера. Инкубировали 1 час при комнатной температуре со встряхиванием и вновь промывали. Далее в лунки вносили раствор конъюгата обелин-антитело к тропонинуI в буфере для метки с биолюминесцентной активностью 50 отн. ед., инкубировали в течение 40 минут при комнатной температуре и вновь промывали. Биолюминесцентный сигнал связавшегося на поверхности обелина измеряли как описано в п. 2.3.1.1. Из полученных сигналов вычитали усредненный сигнал (два повтора) от контрольных лунок.

Для исследования специфичности аптамеров в качестве неспецифических белков использовали белки плазмы крови: HSA и человеческие иммуноглобулины G (Sigma), а также белки тропонинового комплекса (сTnT и

cTnC), которые были адсорбированы на поверхность лунок микропланшета (50 мкл, 10 мкг/мл, PBS, ночь при 4°C). После инкубации с биотинилированным аптамером (100 нМ в буфере для связывания, 1 час) формирующийся на поверхности комплекс выявляли гибридным белком стрептавидин-обелин (50 нг/мл в буфере для связывания). Биолюминесценцию обелина инициировали и измеряли как описано в п. 2.3.1.1.

## **2.7 Оптимизация нуклеотидной последовательности аптамера TnAp2**

В ходе анализа последовательностей было проведено предсказание вторичной структуры аптамеров при помощи веб-сервера Vienna RNAfold [50]. В соответствии с условиями отбора было применено масштабирование энергетических параметров ДНК [51] до 25°C и включено образование G-квадруплекса в алгоритм прогнозирования структуры.

Основываясь на полученные данные предполагаемой вторичной структуры аптамера TnAp2, была проведена оптимизация его нуклеотидной последовательности. Укороченные версии аптамера включали: 40-нт последовательность без праймерных областей (TnAp2t1), 54-нт последовательность в которой удалены нуклеотиды, не участвующие в образовании элементов вторичной структуры (TnAp2t2) и 27-нт последовательность, формирующая только G-квадруплексный мотив (TnAp2t3).

Для оценки аффинности укороченных вариантов также применялся разработанный анализ на основе биолюминесценции, как описано в п. 2.6. Для этого были синтезированы их 5'-биотинилированные производные.

Одновременно был также получен вариант TnAp13 без праймерных последовательностей (TnAp13t).

## **2.8 Анализ взаимной локализации других аптамеров по сравнению с локализацией TnAp2t1**

Аликвоты биотинилированных аптамеровс концентрацией 50 нМ (TnAp1, TnAp2, TnAp4, TnAp5, TnAp10, TnAp12, TnAp13, TnAp14, TnAp13t и TnAp2t1) в буфере для связывания помещали в лунки, активированные стрептавидином, и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После промывки вносили 50 нМ раствор сTnI в буфере для связывания и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывания в лунки добавляли 50 нМ раствор TnAp2t1-(dA)<sub>20</sub>, ранее химически синтезированный, инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре и промывали. Затем добавляли по 50 мкл конъюгата Obe-dT<sub>30</sub> в буфере для метки, инкубировали в течение 40 минут при комнатной температуре и затем промывали. Биоломинесценцию обелина измеряли, как описано в п. 2.3.1.1.

## **2.9 Модельный биоломинесцентный твердофазный анализ сTnI на основе комплекса сэндвич-типа, образованного парой отобранных аптамеров**

Поверхность лунок активировали с помощью BSA-dT<sub>30</sub>, полученного ранее сотрудниками в лаборатории фотобиологии ИФБ СО РАН (50 мкл, 10 мкг/мл, PBS pH 7,0, в течение ночи при 4°C). Затем вносили 100 нМ TnAp2t1-(dA)<sub>30</sub> в буфере для связывания и инкубировали 1 ч при комнатной температуре, после лунки промывали. Затем аликвоты по 50 мкл сTnI (83,3-0,11 нМ) в буфере для связывания добавляли в лунки и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После промывки добавляли 100 нМ биотинилированного укороченного аптамера TnAp13t, инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре и промывали. Затем добавляли Stavi-Obe (0,5 мкг/мл в буфере для связывания), инкубировали в течение 40 минут при комнатной температуре и затем промывали. Биоломинесценцию обелина измеряли, как описано в п. 2.3.1.1.



### **3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

нт –нуклеотиды

но – нуклеотидные основания

SELEX–систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК –рибонуклеиновая кислота

ПЦР –полимеразная цепная реакция

dNTP– дезоксинуклеозидтрифосфат

ОИМ – острый инфаркт миокарда

ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид

SMCC– сукцинимидный эфир 4-(N-малеимидометил-) циклогексановой кислоты

BSA – бычий сывороточный альбумин

HSA – человеческий сывороточный альбумин

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ТАЕ – трис-ацетатный буфер

PBS – 50 mMК-Na фосфатном буфере pH 7.0, 0,15MNaCl

ДТТ – дитиотреитол

$K_d$ – константа диссоциации

ab– антитела

cTnI – сердечный тропонинI

Obe – обелин

Obe-SH – вариант обелина с уникальным остатком цистеина

## **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

- <sup>1</sup>. Рудченко, М.Н. Перспективы применения самособирающихся структур на основе нуклеиновых кислот / М.Н. Рудченко, А.А. Замятнин (мл.) // Биохимия. – 2015. – Т.80, вып.4. – С. 461–471.
- <sup>2</sup>. Радько, С. П. Аптамеры как перспективные аффинные реагенты для клинической протеомики / С. П. Радько, С. Ю. Рахметова, Н. В. Бодоев // Биомедицинская химия. – 2007. – Т. 53, вып. 1. – С. 5–24.
- <sup>3</sup>. Qin, S.Y. Application of Nucleic Acid Aptamers in Polypeptides Researches / S.Y. Qin, N.D. Chen, Q. Wang and et al. // Chinese Journal of Analytical Chemistry. – 2017. – V. 45(12). – P. 1795–1803.
- <sup>4</sup>. Спиридонова, В. А. Молекулярные узнающие элементы – ДНК-/РНК-аптамеры к белкам / В. А. Спиридонова // Биомедицинская химия. – 2010. – Т.56, вып. 6. – С. 639–656.
- <sup>5</sup>. Groff, K. Modern affinity reagents: Recombinant antibodies and aptamers / K. Groff, J. Brown, A.J. Clippinger // Biotechnology Advances. – 2015. – V. 33. – P.1787–1798.
- <sup>6</sup>. Кульбачинский, А. В. Методы отбора аптамеров к белковым мишеням / А. В. Кульбачинский // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 193–224.
- <sup>7</sup>. Jaysena, S.D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics / S.D. Jaysena // Clin Chem. – 1999. – V. 45(9). – P. 1628–1650.
- <sup>8</sup>. Щербинин, Д. С. Конструирование аптамеров белков методами компьютерного моделирования: автореф. дис. ... канд. биол. наук. 03.01.09 /Щербинин Дмитрий Сергеевич. – Москва, 2013 – 22 с.
- <sup>9</sup>. Chandola, C. Application of aptamers in diagnostics, drug-delivery and imaging/ C. Chandola, S. Kalme, M.G. Casteleijn and et al. // J. Biosci. – 2016. – V. 41(3). – P. 535–561.
- <sup>10</sup>. Dua, P. Nucleic acid aptamers targeting cell-surface proteins / P. Dua, S. Kim, D. Lee // Methods. – 2011. – V. 54(2). – P. 215–225.
- <sup>11</sup>. Ellington A.D. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands / A.D. Ellington, J.W. Szostak // Nature. – 1990. – Т. 346, № 6287. – С. 818–22.

<sup>12</sup>. Tuerk, C. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase / C. Tuerk, L. Gold // *Science*. – 1990. – Т. 249, № 4968. – С. 505–10.

<sup>13</sup>. Vorobyeva, M.A. Key aspects of nucleic acid library design for in vitro selection / M.A. Vorobyeva, A.S. Davydova, P.E. Vorobjev, D.V. Pyshnyi // *Int. J. Mol. Sc.* – 2018. – V. 19(2), 470.

<sup>14</sup>. Blind, M. Aptamer selection technology and recent advances / M. Blind, M. Blank // *Mol. Ther.—Nucleic Acids*. – 2015. – V. 4. – P. 151–174.

<sup>15</sup>. Zhuo, Z. Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine / Z. Zhuo, Y. Yu, M. Wang, J. Li and et al. // *Int. J. Mol. Sc.* – 2017. – V. 18. – P. 253–272.

<sup>16</sup>. Darmostuk, M. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology / M. Darmostuk, S. Rimpelova, H. Gbelcova, T. Ruml // *Biotechnology Advances*. – 2015. – V. 33. – P. 1141–1161.

<sup>17</sup>. Юминова, А. В. Структура G-квадруплексного ДНК-аптамера к тромбину RA36 / А. В. Юминова, И. Г. Смирнова, А. М. Арутюнян и др. // *Вест. Моск. ун-та*. – 2015. – Т. 56, № 1. – С. 51–55.

<sup>18</sup>. Решетников, Р. В. Влияние петель на G-квадруплексные ДНК: геометрия, молекулярная динамика и взаимодействие с катионами: автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. 03.01.02 / Решетников Роман Владимирович. – Москва, 2011 – 26 с.

<sup>19</sup>. Долинная, Н. Г. Структура, свойства и биологическое значение G-квадруплексов ДНК и РНК. Взгляд через 50 лет после их открытия / Н. Г. Долинная, А. М. Оглоблина, М. Г. Якубовская // *Успехи биологической химии*. – 2016. – Т. 56. – С. 53–154.

<sup>20</sup>. Решетников, Р. В. Классификация G-квадруплексных ДНК по углу вращения квадруплекса и планарности G-квартетов / Р. В. Решетников, А. М. Копылов, А. В. Головин // *Acta Naturae*. – 2010. – Т. 2, № 4(7). – С. 80–89.

<sup>21</sup>. Song, K. M. Aptamers and their biological applications / K. M. Song, S. Lee, C. Van // *Sensors*. – 2012. – V. 12. – P. 612–631.

<sup>22</sup>. Кушниров, В.В. Аптамеры и их использование в биологии и медицине / В.В.Кушниров, О.В.Митькевич, В.Н.Ураков, М.Д.Тер-Аванесян// Успехи современного естествознания. – 2013. – № 3. – С. 40–43.

<sup>23</sup>. Yu, Y. Molecular Selection, Modification and Development of Therapeutic Oligonucleotide Aptamers / Y. Yu, C. Liang, Q. Lv and et al. // Int. J. Mol. Sc. – 2016. – V. 17(3), 358.

<sup>24</sup>. Keefe, A. D. Aptamers as therapeutics / A. D. Keefe, S. Pai, A. Ellington // Nature Reviews. – 2010. – V. 9. – P. 537–550.

<sup>25</sup>. Jo, H. Aptamer–nanoparticle complexes as powerful diagnostic and therapeutic tools / H. Jo, C. Ban // Experimental and Molecular Medicine. – 2016. – V. 48(5). – P. 1–9.

<sup>26</sup>. Chang, Y. C. Rapid single cell detection of Staphylococcus aureus by aptamer-conjugated gold nanoparticles / C. Y. Chang, C. Y. Yang, R. L. Sun and et al. // Scientific Reports. – 2013. – V. 3, 1863.

<sup>27</sup>. Замай, Т. Н. Новый перспективный способ идентификации возбудителя сальмонеллеза / Т. Н. Замай, А. Б. Салмина, О. С. Замай // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – №4. – С. 36–39.

<sup>28</sup>. Gonzalez, V.M. Use of Aptamers as Diagnostics Tools and Antiviral Agents for Human Viruses / V.M. Gonzalez, M.E. Martín, G. Fernandez, A. García-Sacristan // Pharmaceuticals. – 2016. – V. 9, 78.

<sup>29</sup>. An, Y. Selection and application of DNA aptamer against oncogene amplified in breast cancer 1 / Y. An, J. Wu, B. Yang and et al. // J. Mol. Evol. – 2015. – V. 81. – P. 179–185.

<sup>30</sup>. Wan, Y. Surface-immobilized aptamers for cancer cell isolation and microscopic cytology / Y. Wan, Y. T. Kim, N. Li and et al. // Cancer Res.– 2010. – V. 70. – P. 9371–9380.

<sup>31</sup>. Замай, Г. С. Разработка технологии идентификации биомаркеров с помощью аптамеров на примере плоскоклеточного рака легкого и аденокарциномы / Г. С. Замай, О. С. Коловская, Ю. Е. Глазырин и др. // Сибирское медицинское обозрение. – 2012. – №6(78). – С.9–14.

<sup>32</sup>. Замай, Г.С. Селекция ДНК-аптамеров для диагностики рака молочной железы / Г.С. Замай, И.В. Беянина, А.С. Замайи др. // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 62. – №4. – С. 411–417.

<sup>33</sup>. Parashar, A. Aptamers in Therapeutics / A. Parashar // Journal of Clinical and Diagnostic Research. – 2016. – V. 10(6). – P. 1–6.

<sup>34</sup>. Ruscito, A. Small-Molecule Binding Aptamers: Selection Strategies, Characterization, and Applications / A. Ruscito, M. C. DeRosa // Front. Chem. – 2016. – V. 4, 14. – P. 1–14.

<sup>35</sup>. Решетников, Р. В. Сравнение моделей 15-звенного ДНК-аптамера к тромбину с помощью симуляции молекулярной динамики / Р. В. Решетников, А. В. Головин, А. М. Копылов // Биохимия. – 2010. – Т. 75, №8. – С. 1124–1132.

<sup>36</sup>. Ray, P. Aptamers for Targeted Drug Delivery / P. Ray, R. R. White // Pharmaceuticals. – V. 3(6). – P. 1761–1778.

<sup>37</sup>. Zhang, J. Aptasensors / J. Zhang, Y. Cao // Nano-Inspired Biosensors for Protein Assay with Clinical Applications. – 2019. – P. 139–166.

<sup>38</sup>. Катруха, И. А. Тропониновый комплекс сердца человека. Структура и функции / И. А. Катруха // Успехи биологической химии. – 2013. – Т. 53. – С. 149–194.

<sup>39</sup>.Бражник, В.А. Использование биомаркеров некроза для ранней диагностики инфаркта миокарда в современных условиях / В.А. Бражник, Д.А. Затейщиков // Кардиология. – 2016. – Т. 56. – №1. – С. 93–98.

<sup>40</sup>. Cheng, Y. Cardiac Troponin Structure-Function and the Influence of Hypertrophic Cardiomyopathy Associated Mutations on Modulation of Contractility / Y.Cheng, M. Regnier //Arch BiochemBiophys. – 2016. – V. 601. – P. 11–21.

<sup>41</sup>. Яковлева, Е. А. Латеральный проточный иммуноанализ тропонина-I / Е. А. Яковлева, И. П. Андреева, В. Г. Григоренко и др. // Вестн. Моск. ун-та. – 2012. – Т. 53, № 6. – С. 363–368.

<sup>42</sup>. Fathil, M.F.M. Diagnostics on acute myocardial infarction: Cardiac Troponin biomarkers / M.F.M. Fathil, M.K. Md Arshad, C.B. Gopinath and et al. // Biosensors and Bioelectronics. – 2015. – V. 70. – P. 209–220.

<sup>43</sup>. Dorraj, G.S. Selection of DNA aptamers against Human Cardiac Troponin I for colorimetric sensor based dot blot application / G.S. Dorraj, M.J. Rassae, A.M. Latifi and et al. // *Journal of Biotechnology*. – 2015. – V. 208. – P. 80–86.

<sup>44</sup>. Jo, H. Highly sensitive amperometric detection of cardiac troponin I using sandwich aptamers and screen-printed carbon electrodes / H. Jo, J. Her, H. Lee and et al. // *Talanta*. – 2017. – V. 165. – P. 442–448.

<sup>45</sup>. Markova, S.V. Obelin from the bioluminescent marine hydroid *Obelia geniculata*: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca<sup>2+</sup>- regulated photoproteins / S.V. Markova, E.S. Vysotski, J.R. Blinks and et al. // *Biochemistry*. – 2002. – V. 41. – P. 2227– 2236.

<sup>46</sup>. Krasitskaya, V.V. Mutantsof Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteinobelin for site-specific conjugation / V.V. Krasitskaya, L.P. Burakova, A.A. Komarova and et al. // *Photochem. Photobiol.* – 2017. – V. 93, № 2. – P. 553–557.

<sup>47</sup>. Krasitskaya, V. V. Obelin mutants as reporters in bioluminescent dual-analyte binding assay / V. V. Krasitskaya, A. N. Kudryavtsev, O. Shimomura, L. A. Frank // *Anal. Methods*. – 2013. – N. 5. – P. 636-640.

<sup>48</sup>. Bashmakova E. E.Hybrid minimal core streptavidin-obelin as a versatile reporter for bioluminescence-based bioassay / E. E. Bashmakova, V. V, Krasitskaya, A. N. Kudryavtsev and et al. // *Photochem Photobiol.* – 2017. – V. 93(2). – C. 548-52.

<sup>49</sup> Beatty J. D. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay / J. D. Beatty, B. G. Beatty, W. G. Vlahos // *J Immunol Meth.* – 1987. – V. 100. – P. 173–179.

<sup>50</sup>. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction / *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31(13). – C. 3406-15. Режимдоступа: <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>.

<sup>51</sup>. Lorenz, R. ViennaRNA Package 2.0 / R. Lorenz, S. Bernhart, C. Höner zu Siederdisen and et al. // *Algorithms for Molecular Biology*. – 2011. – V. 6(1):26. Режим лоступа: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>



Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии  
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ



Заведующий кафедрой

Е. И. Шишацкая

« 6 » июня 2019 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

Получение высокоаффинных ДНК аптамеров – сенсорных элементов  
аналитической системы по выявлению кардиомаркера тропонина

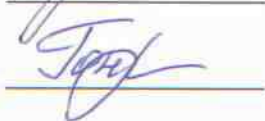
Руководитель



профессор, д.б.н.

Л. А. Франк

Выпускник



Н. С. Гончарова