

Ca²⁺-регулируемый фотопротеин обелин как инструмент для мониторинга селекса и оценки аффинности ДНК аптамеров

Научный руководитель – Франк Людмила Алексеевна

Гончарова Наталья Сергеевна

Студент (бакалавр)

Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Кафедра медицинской биологии, Красноярск, Россия

E-mail: nsg1202@yandex.ru

Аптамеры - короткие одноцепочечные фрагменты ДНК или РНК, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться с молекулами различной природы. Благодаря их высокой аффинности, специфичности, стабильности и возможности химического синтеза, аптамеры рассматривают как альтернативу антителам при разработке методов молекулярного анализа [1]. Аптамеры получают направленным отбором *in vitro* из комбинаторных библиотек олигонуклеотидов методом SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment). Ключевыми моментами при этом являются эффективный мониторинг обогащения библиотеки последовательностями, аффинными к мишени и определение аффинности индивидуальных аптамеров. Для этого используют ряд методов: высокоэффективную жидкостную хроматографию, круговой дихроизм, поверхностный плазмонный резонанс, анализ сдвига электрофоретической подвижности, иммуоферментный анализ с заменой антител на аптамер с флюоресцентной или колориметрической детекцией сигнала и др. [2].

В настоящей работе для мониторинга процесса обогащения библиотеки, а также оценки аффинности и специфичности индивидуальных аптамеров предложен биолюминесцентный твердофазный анализ, где в качестве репортерной молекулы используется Ca²⁺-регулируемый фотопротеин обелин. Это стабильная молекула (нековалентный комплекс белка, субстрата и кислорода), биолюминесцентный сигнал которой возникает при присоединении ионов кальция и не зависит от присутствия других соединений - кислорода, каких-либо субстратов или кофакторов. Высокий квантовый выход биолюминесцентной реакции и низкий уровень шума обеспечивают высокую чувствительность анализа на основе этого белка в качестве репортера [3]. Разработанный подход использовали при получении ДНК аптамеров, аффинных к сердечному тропонину I (сTnI). сTnI является одним из высокоспецифичных кардиомаркеров, появление которого в периферической крови свидетельствует о повреждении кардиомиоцитов при инфаркте миокарда [4].

С помощью предложенного биолюминесцентного твердофазного анализа контролировали обогащение ДНК библиотеки последовательностями, аффинными к сTnI в ходе отбора; оценивали аффинность отобранных индивидуальных аптамеров, а также их укороченных вариантов: были рассчитаны константы диссоциации комплексов аптамер - сTnI и выбраны аптамеры с наилучшей аффинностью; изучена специфичность выбранных аптамеров; проведен поиск аптамеров, связывающихся с разными эпитопами тропонина I. Предложенный биолюминесцентный анализ позволяет быстро и просто проводить исследования по отбору и характеристике аптамеров и может быть использован для разработки аптамеров к другим мишеням.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, проект №18-38-00531.

Источники и литература

- 1) Radom F, Jurek P.M., et al. *Biotechnol Adv.* 2013, 31(8):1260–1274.

- 2) Jing M., Bowser M.T. Anal. Chim. Acta 2011, 686:9–18.
- 3) Frank L.A., Krasitskaya V.V. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2014, 144:175–197.
- 4) Antman E.M., Tanasijevic M.J., et al. N. Engl. J. Med. 1996, 31, 335(18):1342–1349.