

**Влияние количества аптамерных ядер на флуоресценцию и константу диссоциации аптамерного комплекса малахитового зеленого**

**Научный руководитель – Бобков Глеб Алексеевич**

***Синичкина Татьяна Богдановна***

*Студент (бакалавр)*

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: sinichkiwt@mail.ru*

**Введение.** Аптамеры - короткие одноцепочечные ДНК/РНК, специфично связывающиеся с целевыми молекулами. Наибольший интерес представляют «вспыхивающие» аптамеры, усиливающие флуоресценцию флуорофора при их связывании. Малахитовый зеленый является одним из флуорофоров, который увеличивает флуоресцентное свечение при связывании со специфичным к нему аптамером. Предполагается, что увеличение количества аптамерных ядер в единой цепи приведет к снижению константы диссоциации комплекса флуорофор-аптамер ( $K_d$ ), то есть к повышению стабильности комплекса аптамер–мишень.

Изучение подобных комплексов позволит в дальнейшем снизить предел детекции диагностических систем на основе многоядерных аптамеров.

Цель работы: исследование влияния количества аптамерных ядер и их ориентации, а также длины линкеров между ядрами, на константу диссоциации и интенсивность флуоресценции аптамерного комплекса. Были выполнены следующие задачи: (1) подобраны последовательности и длины линкеров между аптамерными ядрами; (2) сконструированы многоядерные аптамеры с разной ориентацией ядер – параллельной и антипараллельной (параллельные ядра ориентированы в одном направлении в одной цепи, антипараллельные - в противоположных); (3) определены  $K_d$  комплексов; (4) оптимизированы условия реакции и оценена флуоресценция аптамерных комплексов.

**Материалы и методы.** Для определения  $K_d$  концентрацию флуорофора MG фиксировали, а концентрацию аптамера варьировали по достижению плато флуоресценции. Строили график интенсивности флуоресценции от концентрации аптамера и вычисляли  $K_d$ , как половину от флуоресценции максимальной для этого аптамера.

Для оптимизации условий реакции подбирали концентрацию аптамера и флуорофора, порядок их внесения в реакцию и температурно-временной режим инкубации пробы. Измерения проводили при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 617/662$  нм на спектрофлуориметре Tecan, Spark.

**Результаты.** Увеличение числа ядер снижает  $K_d$  и усиливает флуоресценцию. Для коротких линкеров (5 п.н.)  $K_d$  понизился с 668,2 до 340,5 нМ (для параллельной ориентации ядер) и до 379,2 нМ (для антипараллельной); флуоресценция выросла с 2200 до больше, чем 8200 у.е. Для длинных линкеров (10 п.н.)  $K_d$  снизился с 2340,0 до 264,6 нМ (для параллельной) и до 309,0 нМ (для антипараллельной); сигнал увеличился с 2600–3300 до 4500–6700 у.е. Максимальную эффективность показали конструкции с короткими линкерами, действующие до пяти ядер благодаря жесткой организации аптамера. Удлинение линкера вызывало избыточную гибкость аптамера, нарушало кооперативность и ограничивало число рабочих ядер тремя-четырьмя в зависимости от ориентации.

**Заключение.** Многоядерные аптамеры с короткими линкерами и антипараллельной ориентацией оптимальны для повышения чувствительности ДНК-сенсоров на основе аптамеров. Снижение  $K_d$  и усиление сигнала без увеличения сигнала в отрицательных контролях позволяют сделать выводы, что сенсоры на базе многоядерных аптамеров будут обладать меньшим пределом детекции, чем одноядерные аптамеры.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 25-26-00247.