

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»
Институт биохимии им А.Н. Баха РАН**

На правах рукописи

САМОХВАЛОВ АЛЕКСЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АПТАМЕРОВ С ОХРАТОКСИНОМ
А: КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ И АНАЛИТИЧЕСКОЕ
ПРИМЕНЕНИЕ**

03.01.04 Биохимия

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Научный руководитель:
кандидат биологических
наук

А.В. Жердев

МОСКВА 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ В РОЛИ РЕЦЕПТОРНЫХ МОЛЕКУЛ.....	9
1.1.1 Нуклеиновые кислоты: история исследования и предпосылки к изобретению SELEX метода	9
1.1.2 Получение нуклеиновых кислот с заданными свойствами методом «SELEX» ..	10
1.1.3 Нуклеиновые кислоты в качестве рецепторов. Аптамеры	19
1.1.4 Определение константы взаимодействия аптамер-лиганд.....	23
1.1.5. Области практического применения аптамеров.....	24
1.2. ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛЯРИЗАЦИИ/АНИЗОТРОПИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ: ХАРАКТЕРИСТИКА АПТАМЕР-ЛИГАНДНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И СОЗДАНИЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ	32
1.2.1 Принцип поляризации/анизотропии флуоресценции.	32
1.2.2 Определения константы лиганд-рецепторного взаимодействия методом анизотропии флуоресценции	37
1.2.3. Применение поляризационного флуоресцентного метода для определения низкомолекулярных соединений с использованием аптамеров.....	41
1.3. СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ОХРАТОКСИНА А.....	44
1.3.1 Практическая значимость определения охратоксина А	44
1.3.2 Аптамеры, специфичные к охратоксину А	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
2.1 МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	51
2.2 МЕТОДЫ.....	52
2.2.1 Спектроскопия кругового дихроизма	52
2.2.2 Синтез и очистка охратоксина А, меченного 4'-(аминометил)флуоресцеином. .	52
2.2.3 Определение концентрации ОТА-ФЛУ	53
2.2.4 Определение константы взаимодействия аптамер-ОТА методом анизотропии флуоресценции.....	53
2.2.5 Характеристика взаимодействия аптамер-ОТА методом равновесного диализа	54
2.2.6 Получение флуоресцентных матриц экстинкции-эмиссии комплексов меченого и немеченого охратоксина А с аптамером	54
2.2.7 Синтез конъюгатов аптамеров со стрептавидином и конъюгатов аптамер-стрептавидин-антитело	54
2.2.8 Характеристика комплексов аптамер-белок методом асимметричного проточного фракционирования в поле поперечных сил (AF4).....	55
2.2.9 Получение мелкодисперсных наночастиц золота	56
2.2.10 Характеристика размеров наночастиц и их конъюгатов методом просвечивающей электронной микроскопии.....	57

2.2.11	Динамическое и электрофоретическое рассеивание света.....	57
2.2.12	Синтез стрептавидиновых конъюгатов с наночастицами золота	57
2.2.13	Синтез конъюгатов аптамер-стрептавидин- наночастицы золота	58
2.2.14	Поляризационный флуоресцентный аптамерный анализ.....	58
2.2.15	Подготовка проб вина для определения ОТА.....	59
2.2.16	ПФ аптамерный анализ (ПФАА) охратоксина А в вине.....	59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....		60
3.1 ВЫБОР ОХРАТОКСИН А-СВЯЗЫВАЮЩЕГО АПТАМЕРА.....		60
3.1.1	Сравнительная характеристика ОТА-связывающих аптамеров	60
3.1.2.	Синтез производного ОТА, меченного флуоресцеином.....	61
3.1.3	Характеристика связывающих свойств аптамеров, специфичных к охратоксину А.....	62
3.1.4	Характеристика структуры ОТА-связывающих аптамеров методом кругового дихроизма	64
3.2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АПТАМЕР-ОТА		69
3.2.1	Определение константы взаимодействия методом анизотропии флуоресценции.....	69
3.2.2.	Подтверждение константы связывания методом равновесного диализа.....	82
3.3. ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АПТАМЕР-ОХРАТОКСИН А ПО ИЗМЕНЕНИЮ СОБСТВЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ОХРАТОКСИНА А		85
3.3.1	Анализ матриц экстинкции-эмиссии ОТА в свободном состоянии и в комплексе с аптамером	85
3.3.2.	Зависимость интенсивности флуоресценции ОТА от концентрации аптамера .	88
3.3.3.	Зависимость флуоресценции ОТА в комплексе с аптамером при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм от концентрации ОТА.....	92
3.3.4.	Характеристика взаимодействия ОТА-аптамер по собственной флуоресценции ОТА	96
3.4. РАЗРАБОТКА БЕЛКОВЫХ ЯКОРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ АПТАМЕРНОГО ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА		97
3.4.1	Принцип молекулярных якорей	97
3.4.2	Разработка ПФ аптамерного анализа с использованием якорей на основе белков и сравнение с анализом на основе нативного аптамера.....	100
3.4.3	Выбор оптимального белкового якоря	102
3.4.4	Сравнение предела обнаружения ПФ анализа с нативным аптамером и белковым якорным усилением	105
3.5. РАЗРАБОТКА ПФ АПТАМЕРНОГО АНАЛИЗА ОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЯКОРЯ НА ОСНОВЕ КОНЪЮГАТОВ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА		106
3.5.1	Получение и характеристика наночастиц золота	108
3.5.2	Теоретический расчет количества стрептавидина и аптамера, иммобилизованного на поверхности золотых частиц.....	109

3.5.3 Синтез и характеристика конъюгатов наночастиц золота со стрептавидином и с аптамером	111
3.5.4 Разработка методики ПФ аптамерного определения ОТА.....	115
3.6. АПРОБАЦИЯ РАЗРАБОТАННОЙ АНАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОТА В ПРОБАХ ВИНА	116
3.6.1 Сравнение предложенных подходов для определения ОТА в пробах вина	116
3.6.2. Исследование ОТА-положительных проб вина методом ПФ аптамерного анализа	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФ	– анизотропия флуоресценции
БСА	– бычий сывороточный альбумин
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ДСР	– динамическое светорассеяние
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
дцДНК	– двухцепочечная ДНК
ЗХВК	– золотохлористоводородная кислота
ИФА	– иммуноферментный анализ
КД	– круговой дихроизм
ММ	– молекулярная масса
МЭЭ	– матрицы экстинкции-эмиссии
НК	– нуклеиновая кислота
НЧЗ	– наночастицы золота
ОП	– оптическая плотность
ОТА	– охратоксин А
оцДНК	– одноцепочечная ДНК
ПВП	– поливинилпирролидон
ПДК	– предельно допустимая концентрация
ПФ	– поляризация флуоресценции
ПФАА	– поляризационный флуоресцентный аптамерный анализ
ПЭМ	– просвечивающая электронная микроскопия
ПрО	– предел обнаружения
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РД	– равновесный диализ
РНК	– рибонуклеиновая кислота
ТБ	– 20 мМ Трис-буфер с 120 мМ NaCl; 5 мМ KCl и 20 мМ CaCl ₂ , pH = 8,5
ТСХ	– тонкослойная хроматография
ФЛУ	– 4-(аминометил)флуоресцеин
ЭЛС	– электрофоретическое рассеивание света
СрG	– цитозин фосфат гуаниновые димеры
IC ₅₀	– точка 50%-ного связывания
IgG	– иммуноглобулин G
K _D	– равновесная константа диссоциации
PdI	– индекс полидисперсности

pI – изоэлектрическая точка

SELEX – метод систематической эволюции лигандов при экспоненциальном обогащении

λ_{em} – длина волны возбуждения

λ_{ex} – длина волны испускания

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В последние годы для биоаналитических целей наряду с антителами начали активно применяться новые классы рецепторов, по ряду параметров превосходящие их. Оценка и характеристика таких новых рецепторов является важной задачей. Одни из таких перспективных рецепторов – аптамеры, короткие одноцепочечные олигомеры нуклеиновых кислот, способные селективно и специфично связывать разнообразные молекулярные мишени. Они обладают рядом существенных преимуществ по сравнению с конкурентами: возможность синтеза *in vitro*, простота модификации и введения функциональных групп, полная ренатурация после денатурации под воздействием температуры или высокой концентрации солей [1].

Одним из практически востребованных объектов, требующих определения в крайне низких концентрациях, является охратоксин А (ОТА) – токсичный вторичный метаболит плесневых грибов и распространенный контаминант растительных продуктов питания (ячмень, пшеница, кукуруза, овес, сухофрукты, пряности и др.). ОТА входит в число пищевых контаминантов, контролируемых законодательно на международном уровне [2]. Для его определения преимущественно используются сложные инструментальные методы, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография. Поэтому крайне важна разработка решений для простой и экспрессной детекции ОТА, в том числе основанных на биорецепторных взаимодействиях. Однако применение аптамеров в качестве биоаналитических реагентов, распознающих ОТА, требует проведения всестороннего изучения взаимодействия аптамер – ОТА.

Перспективным средством как для характеристики взаимодействия аптамер – ОТА, так и для регистрации аналитического сигнала при определении ОТА является поляризация/анизотропия флуоресценции (ПФ/АФ). К ее достоинствам относятся возможность проведения взаимодействия в растворе, простота измерений и быстрое получение результатов [3].

Цель настоящей диссертационной работы – количественная характеристика взаимодействия аптамер – ОТА и разработка на этой основе аналитических систем для определения ОТА.

Достижение поставленной цели включало решение ряда **задач**:

1. скрининг перспективных ОТА-специфичных аптамеров и выбор аптамера, обладающего максимальной аффинностью;
2. характеристика особенностей структуры ОТА-специфичного аптамера и его комплекса с ОТА;

3. разработка алгоритма определения равновесной константы взаимодействия аптамера с ОТА;
4. характеристика флуоресцентных свойств комплекса ОТА – аптамер;
5. разработка аналитической системы для определения ОТА на основе регистрации ПФ; изучение факторов, влияющих на её предел обнаружения;
6. апробация разработанной системы для определения ОТА в сложных матриксах.

Научная новизна. В рамках диссертационной работы предложен алгоритм определения константы диссоциации методом АФ применительно к аптамер-лигандным взаимодействиям. Разработан алгоритм для характеристики взаимодействия ОТА – аптамер с помощью флуоресцентной спектроскопии с построением матриц экстинкции-эмиссии (МЭЭ). Охарактеризован ранее неизвестный эффект увеличения флуоресценции ОТА в комплексе с аптамером и показано, что в его основе лежит перенос энергии флуоресценции с аптамера на ОТА.

Впервые предложен подход для повышения чувствительности ПФ аптамерного анализа, основанный на включении аптамера в комплексы с молекулярными якорями – белками и наночастицами золота (НЧЗ). Экспериментально подтверждена эффективность данного подхода на примере определения ОТА.

Научно-практическая ценность. Предложен ПФ аптамерный анализ с усилением для определения ОТА, проведена его апробация при тестировании проб вина. Разработанный анализ позволяет определять ОТА в вине в концентрациях ниже предельно допустимой. Рекомендации по созданию ПФ аптамерного анализа с использованием молекулярных якорей имеют универсальный характер и могут применяться при разработке аналогичных аналитических систем.

Положения, выносимые на защиту:

1. алгоритм определения констант взаимодействия аптамера с меченым и нативным лигандом;
2. применение увеличения флуоресценции ОТА в комплексе с аптамером для характеристики связывания и детекции ОТА;
3. определение оптимального размера аптамерного конъюгата для чувствительного поляризационного флуоресцентного анализа;
4. новые методы поляризационного флуоресцентного анализа, основанные на молекулярных якорях – комплексах аптамер-белок и аптамер-наночастицы золота.

Личный вклад автора. Диссертант выполнил всю экспериментальную часть работы, в том числе получение, математическую обработку и интерпретацию данных, а также подготовил публикации по результатам диссертационного исследования.

Степень достоверности работы. Достоверность представленных в диссертации результатов определяется использованием современных физико-химических методов исследования и статистической обработкой данных, что гарантирует отсутствие субъективных оценок и заключений.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на следующих научных мероприятиях: Международная научно-практическая конференция «Биотехнология в комплексном развитии регионов» (15-17 марта 2016 г., Москва, Россия), Международный симпозиум «Aptamers in Bordeaux 2016» (24-25 июня 2016 г., Бордо, Франция), XXIX зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (7-10 февраля 2017 г., Москва, Россия), XI Международная научно-практическая конференция «Биотехнология в комплексном развитии регионов» (20–22 февраля 2017 г., Москва, Россия), 11-й международный конгресс «Biocatalysis: Fundamentals and Applications» (25-30 июня 2017 г., Истра, Московская обл., Россия), Международная конференция «Aptamers in Bordeaux 2017» (22-23 сентября 2017 г., Бордо, Франция), Юбилейная конференция по микологии и микробиологии (11-12 апреля 2018 г., Москва, Россия).

Исследования, выполнявшиеся в рамках диссертационной работы, в 2017 г. были поддержаны стипендией Правительства Российской Федерации для аспирантов, обучающихся по специальностям, соответствующим приоритетным направлениям модернизации и технологического развития российской экономики.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, соответствующих требованиям ВАК, и 7 тезисов конференций.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Нуклеиновые кислоты в роли рецепторных молекул

1.1.1 Нуклеиновые кислоты: история исследования и предпосылки к изобретению SELEX метода

Использованию нуклеиновых кислот (НК) в качестве рецепторов предшествовал длительный процесс расшифровки их химической структуры и особенностей их фолдинга, а также становление методов синтеза, определения нуклеотидной последовательности и амплификации.

К 60-м годам XX века сложились базовые концепции строения НК: двухцепочечная структура ДНК, одноцепочечная структура РНК с развитой вторичной структурой [4-6]. С расшифровкой процессов передачи информации и открытием генетического кода [7] перед исследователями встал логичный вопрос: как генетический код зародился и как происходила его эволюция? Данный вопрос тесно переплетается с проблемой возникновения жизни. Еще в конце 60-х годов независимо тремя исследователями К. Вёзе, Ф. Криком и Л. Оргелом была высказана гипотеза о том, что в ходе развития жизни именно эволюция самореплицирующихся молекул РНК предшествовала появлению белкового синтеза [8-10]. Экспериментальных доказательств каталитической активности РНК на тот момент еще не существовало, из-за чего эта гипотеза не нашла широкой поддержки.

Второе дыхание гипотеза получила с открытием каталитической активности РНК (рибозимов), ставшей толчком для широкомасштабного обсуждения роли РНК в возникновении жизни [11-13]. Так зародилась гипотеза о существовании «РНК мира» [14]. Суть гипотезы состоит в том, что до «белкового мира» в качестве макромолекулярных катализаторов выступали рибозимы [15].

Стало ясно, что РНК обладает уникальными свойствами, сочетая информационные и каталитические функции, что делает возможным её направленную эволюцию на молекулярном уровне в ходе репликации. Это сделало ее наиболее вероятным кандидатом на главную роль в древнейшей репликационной системе [15]. Соответственно встал логичный вопрос: если отбор РНК по признаку возможен «in vivo», то может ли он быть реализован «in vitro»?

Идея «РНК мира» стала толчком для создания технологии направленного отбора и эволюции нуклеиновых кислот «in vitro» – SELEX. К началу 90-х годов для ее реализации была сформирована вся необходимая методическая база, обеспечивающая проведение амплификации [16], секвенирования [17] и химического синтеза нуклеиновых кислот [18].

Создание метода «in vitro» эволюции и отбора НК, обладающих заданными свойствами, открыло новое направление применения НК, которое ранее не было возможно,

– применение НК в качестве рецепторов для разнообразных классов соединений. До этого НК рассматривались в качестве рецепторов только в случаях, когда было необходимо детектировать другие ДНК [19] или РНК [20] методом гибридизационного анализа.

Еще за 25 лет до создания технологии направленного отбора НК Ж. Кёлером и С. Мильштейном был предложен процесс получения моноклональных антител [21]. Таким образом, еще в процессе становления НК в качестве рецепторов они находились под влиянием жесткой конкуренции со стороны рецепторов на основе антител, методы получения и выделения которых к тому времени уже применялись повсеместно.

1.1.2 Получение нуклеиновых кислот с заданными свойствами методом «SELEX»

SELEX (с англ. Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment – систематическая эволюция лигандов посредством экспоненциального обогащения) – метод направленного отбора последовательностей с заданными свойствами из комбинаторной олигонуклеотидной библиотеки «in vitro».

Впервые метод SELEX был предложен в 1990 г. независимо тремя коллективами авторов. Робертсон и Джойс [22] продемонстрировали возможность проведения направленного отбора и эволюции РНК, обладающих каталитической активностью, Эллингтон и Шостак [23] продемонстрировали получение лиганд-специфичных последовательностей нуклеиновых кислот, связывающих низкомолекулярные красители, из произвольной РНК библиотеки, Турк и Голд [24] продемонстрировали получение белок-специфичных РНК направленным отбором и впервые ввели термин «SELEX».

Общий принцип SELEX заключается в эволюции олигонуклеотидной библиотеки вследствие её насыщения последовательностями с заданными свойствами в ходе направленного отбора и амплификации. SELEX состоит из следующих последовательных стадий: 1) конструирование и предварительная подготовка исходной комбинаторной библиотеки; 2) направленный отбор, включающий взаимодействие библиотеки с мишенью с последующим разделением связавшихся и несвязавшихся олигонуклеотидов; 3) амплификация методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) фракции, выбранной в ходе направленного отбора; 4) выделение олигонуклеотидов с искомыми свойствами, в частности, аффинных к выбранной мишени [25]. Общая схема SELEX представлена на рис. 1.

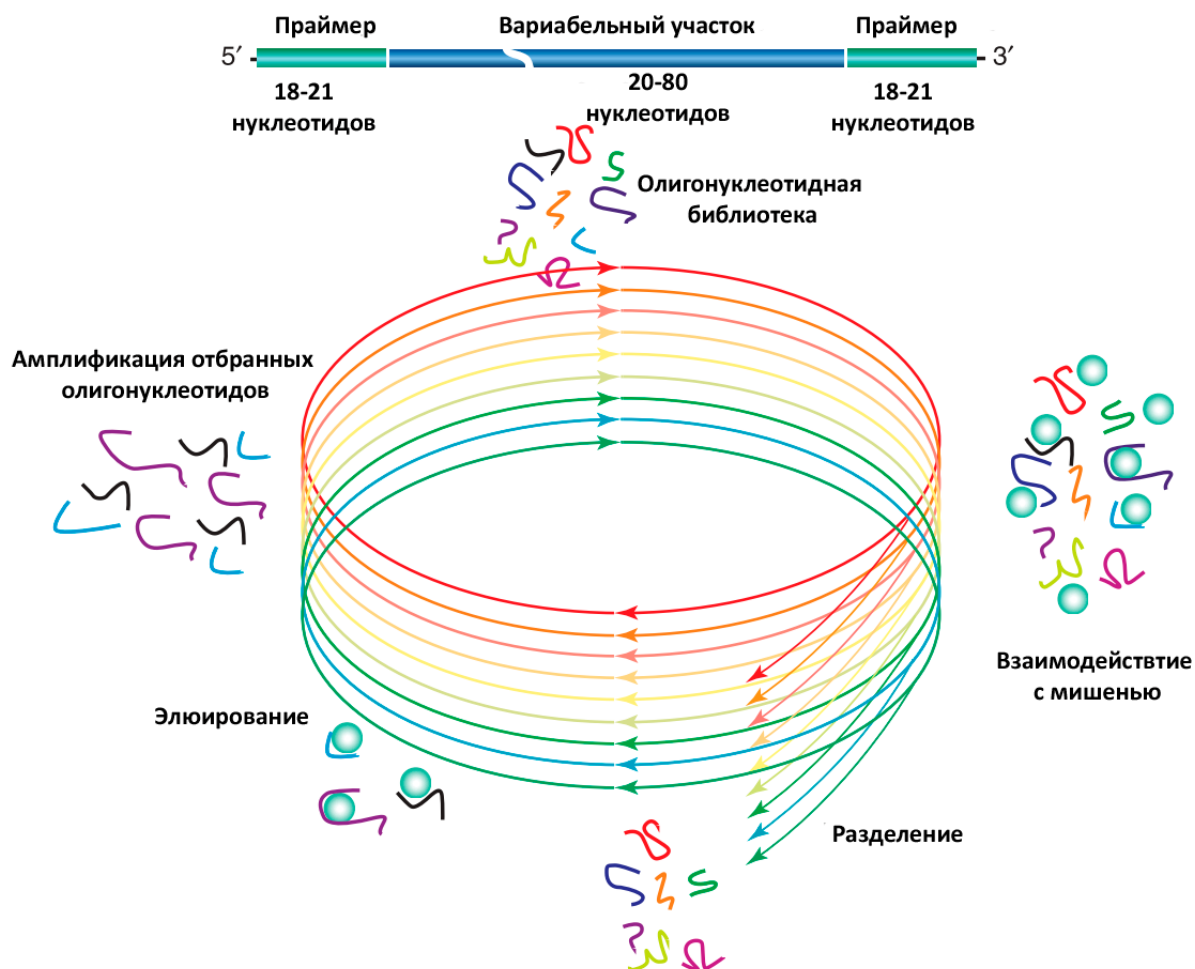


Рисунок 1. Схема системной эволюции лигандов путем экспоненциального обогащения (SELEX) [26]

Первым этапом любого SELEX эксперимента является конструирование олигонуклеотидной библиотеки. SELEX библиотеки могут отличаться по ряду параметров: длине единичного олигомера, длине вариабельного участка, длине и последовательности фланкирующих концевых праймеров, преобладанию тех или иных азотистых оснований в вариабельном участке и химией используемых НК. Классическая комбинаторная библиотека состоит из произвольных одноцепочечных ДНК или РНК, содержащих вариабельный участок заданной длины от 20 до 80 нуклеотидов. Из-за методических ограничений использование вариабельного участка длиной более 80 нуклеотидов не рекомендуется [27]. Вариабельный участок заключен между двумя константными регионами – праймерами, необходимыми для проведения амплификации и выделения аффинных последовательностей – аптамеров.

На стадии направленного отбора ДНК или РНК библиотека инкубируется с мишенью, далее следует этап отмывки несвязавшихся последовательностей и элюирования связавшихся. Простейшим примером разделения специфичных и неспецифичных

последовательностей является использование хроматографической колонки с иммобилизованной мишенью. Элюирование связавшихся последовательностей может проводиться различными методами: за счет нагревания, изменения ионной силы, pH раствора или добавления денатурирующих агентов (например, мочевины, додецилсульфата натрия или этилендиаминтетрауксусной кислоты) [26].

На стадии амплификации используется фракция олигонуклеотидов, выделенная на стадии направленного отбора. Проводится 8-10 циклов амплификации с помощью стандартной ПЦР [28]. В случае получения РНК аптамеров добавляется стадия обратной транскрипции [25]. Помимо классической ПЦР, используются её различные модификации: ассиметричная ПЦР [29], ПЦР в реальном времени (RT-PCR) [30], капельная цифровая ПЦР (qPCR) [31] или альтернативные методы амплификации, например, метод амплификации нуклеиновых кислот «NASBA» [32]. Итогом амплификации является новая библиотека, которая поступает либо на очередную на стадию отбора, либо на стадию выделения аптамеров.

За одну итерацию аффинного взаимодействия и амплификации не удастся добиться насыщения библиотеки последовательностями с нужными свойствами [26]. Поэтому эти итерации циклично повторяют от 6 до 20 раз [27, 33]. Циклы SELEX разделяют на два типа: 1) положительного отбора – библиотека инкубируется с мишенью, отбирается и амплифицируется мишень-специфичная фракция; 2) отрицательного отбора – библиотека взаимодействует с компонентами среды или структурными аналогами мишени, на следующий цикл поступает несвязавшаяся фракция олигонуклеотидов [34]. Отрицательный отбор имеет важное методическое значение. Он нужен, чтобы исключить преобладание в итоговой фракции последовательностей, связывающихся с подложкой или компонентами среды вместо мишени. Отрицательный отбор является важным условием получения аптамеров, обладающих высокой специфичностью, или исключения конкретного ненужного взаимодействия.

Процесс насыщения библиотеки специфичными последовательностями отслеживается посредством количественного анализа мишень-специфичных олигонуклеотидов по отношению к суммарному количеству олигонуклеотидов в библиотеке [27]. Отбор заканчивается, когда в библиотеке осталась только мишень-специфическая фракция либо когда в течение двух – трех последовательных циклов не наблюдается дальнейшего увеличения её процентного отношения к суммарному количеству олигонуклеотидов [26].

SELEX завершается стадией выделения и секвенирования аптамеров из обогащённой библиотеки, полученной на последнем цикле. Выделение индивидуальных

аптамеров проводится либо с помощью клонирования в плазмидный вектор [23, 35] с последующим отбором и секвенированием отдельных клонов, либо с помощью метода секвенирования нового поколения (NGS) [36].

В конце 80-х годов предполагалось, что только молекулы РНК имеют функциональные мотивы и могут выступать в качестве носителя информации [14]. Поэтому первые SELEX эксперименты были проведены с использованием комбинаторных РНК библиотек. В 1992 году Эллингтон и Шостак провели SELEX с использованием комбинаторной библиотеки одноцепочечных ДНК (оцДНК) и показали, что оцДНК также могут использоваться в качестве молекулярных рецепторов [37]. SELEX также позволяет проводить направленный отбор НК по их каталитической активности из комбинаторной библиотеки, что было продемонстрировано как для РНК [38], так и для ДНК [39].

Основным достоинством SELEX является возможность не только проводить комбинаторный отбор, но и контролировать его условия, тем самым осуществляя точную настройку отбираемых параметров и значительно расширяя круг задач, который можно решать с помощью НК.

Основное ограничение SELEX – невозможность одновременной проверки наличия искомого свойства у всех возможных вариантов олигонуклеотидов [40, 41]. Так, для переменного участка олигонуклеотида со случайной длиной «N» и числом альтернативных вариаций нуклеотидов в каждой позиции – «у» теоретически может быть синтезирована олигонуклеотидная библиотека с количеством индивидуальных последовательностей, равным y^N . При длине переменного участка в 40 нуклеотидов возможное число индивидуальных олигомеров на основе четырех стандартных азотистых оснований равно $4^{40} = 1,2 \times 10^{24}$ (≈ 2 моля). Учитывая, что усредненная молекулярная масса одного нуклеотида равна 345 г/моль, масса $1,2 \times 10^{24}$ 40-мерных олигонуклеотидов примерно равна 27,6 кг.

На практике олигонуклеотидная библиотека может содержать до $\sim 10^{16}$ ($\approx 0,016$ мкмоль или ≈ 221 мкг 40-мерного олигонуклеотида) индивидуальных последовательностей. С учетом различных факторов последовательностей будет и того меньше – от 10^{13} до 10^{15} [42]. Экспериментально можно перебрать все возможные комбинации, если длина переменного региона составляет от 22 и менее нуклеотидов. Библиотеки, содержащие переменный участок от 22 до 27 нуклеотидов, потенциально могут отражать все возможные варианты, если не учитывать наличие ошибок при синтезе (от $4^{22} \sim 10^{13}$ до $4^{27} \sim 10^{16}$) [43]. При длине переменного участка больше 27 теоретически возможное число комбинаций на несколько порядков выше количества комбинаций при проведении SELEX эксперимента [27]. Несмотря на это, библиотеки с длинным переменным участком

считаются более функционально разнообразными, так как наличие такого участка может быть необходимым условием образования третичных структур, обеспечивающих наиболее аффинное взаимодействие [42].

На данный момент предложено огромное количество модифицированных вариантов SELEX, отличающихся стадиями отбора, амплификации и выделения аптамеров [44, 45]. Всего выделяют более тридцати модификаций SELEX [46]. В таблице 1 приведена часть из существующих SELEX-методов и дано краткое их описание.

Таблица 1. Различные модификации метода SELEX

Название	Краткий принцип
CE-SELEX [47, 48].	Метод основан на отделении комплексов олигонуклеотид-мишень от несвязавшихся олигонуклеотидов с помощью капиллярного электрофореза по разности их подвижности в постоянном электрическом поле. Основные достоинства метода: отсутствие необходимости в иммобилизации компонентов, быстрое достижение химического равновесия вследствие гомогенного взаимодействия в растворе и повышение эффективности разделения (снижение количества циклов SELEX). Основное ограничение CE-SELEX – электрофоретические подвижности комплексов мишень-аптамер и неспецифичных олигонуклеотидов должны сильно отличаться. Разнообразие вариантов индивидуальных олигонуклеотидов меньше, чем для других методов, и составляет не более $\sim 10^{12}$ вариантов.
Microfluidic SELEX [49-51].	Метод основан на проведении взаимодействия с мишенью и разделении связавшихся и несвязавшихся олигонуклеотидов в каналах проточного микрофлюидного чипа. Также на микрофлюидном чипе могут выполняться стадии подготовки образцов, ПЦР амплификации и скрининг аптамеров по аффинности. Миниатюрность является основным преимуществом данного подхода. Благодаря этому уменьшается расход реагентов и повышается эффективность разделения (снижается необходимое число циклов SELEX).
Cell-SELEX [52] [53]	Метод основан на отборе аптамеров по связыванию с гетерогенными мишенями, несущими определенные детерминаты. В качестве таких мишеней выступают клетки или клеточные фрагменты. Селективность обеспечивается отрицательным отбором относительно клеток, не имеющих интересующие детерминанты на своей поверхности. Это позволяет получать аптамеры на определенные клеточные линии. Наличие искоемых детерминант может определяться косвенно, на основании проявления клетками определенных свойств – патогенности и пр. Таким образом, предварительная информации о строении интересующих детерминант не обязательна, но это ограничивает применение получаемых рецепторов, пока конкретная детерминанта не

	идентифицирована. Cell-SELEX также используется как эффективный метод получения аптамеров на поверхностные мембранные белки, которые проходят значительную посттранскрипционную модификацию и не могут быть получены стандартными методами в нативном состоянии.
Spiegelmer Technology or mirror-image SELEX [54]	Метод основан на получении аптамеров на энантиомер мишени стандартным методом SELEX. После нескольких циклов библиотека, обогащенная аптамерами, секвенируется. Полученные последовательности химически синтезируются с использованием не встречающихся в природе L-нуклеотидов, которые способны связываться уже с нативной формой лиганда. Такие L-олигонуклеотиды проявляют большую устойчивость к нуклеазам, чем природные олигонуклеотиды.
Chimeric SELEX [55]	Метод основан на получении химерного аптамера, состоящего из двух аптамеров, отобранных на разные мишени, и способного одновременно связывать обе эти мишени. Для этого отдельно из двух РНК библиотек получают два аптамера на разные мишени. Далее они транскрибируются в оцДНК и амплифицируются ПЦР. Полученные две библиотеки оцДНК смешиваются и отжигаются. В итоге образуется дцДНК, которая содержит оцДНК с мишень-распознающими участками как из первой, так и из второй библиотеки. Полученная дцДНК транскрибируется в РНК. В РНК библиотеке активность обоих аптамеров сохраняется в пределах одного олигомера – химерной молекулы. Далее библиотека химерных РНК снова проходит цикл направленного отбора и обогащения. В итоге выделяют химерный аптамер, активный по отношению к обоим мишеням.
Toggle-SELEX [56]	Метод разработан для отбора аптамеров, кросс-специфичных к двум гомологичным мишеням. На первом цикле олигонуклеотидная библиотека инкубируется со смесью этих мишеней. Обогащённый пул на следующем цикле взаимодействует с мишенями по отдельности. Вначале пул взаимодействует с первой мишенью, связавшиеся последовательности элюируются и отбираются. Затем пул инкубируется со второй мишенью, связавшиеся

	последовательности также элюируются и отбираются. После тринадцати циклов аптамеры клонируются и секвенируются.
Conditional SELEX [57]	Метод имеет несколько вариантов и применяется для получения аптамеров, связывающих мишень только в присутствии/отсутствии молекул-регуляторов. В первом случае библиотека инкубируется с мишенью в присутствии молекулы-регулятора и отбираются связавшиеся нуклеотиды. Во втором случае вначале пул инкубируется с мишенью в отсутствие молекулы-регулятора, отбираются связавшиеся последовательности. После этого инкубация проводится уже в присутствии регулятора, но отбираются несвязавшиеся последовательности.
Multiplexed massively parallel SELEX [58]	Метод разработан для параллельного скрининга и идентификации большого количества лиганд-связывающих вариантов олигомеров. ДНК библиотека содержит встроенный баркод (длиной 5 нуклеотидов), который позволяет идентифицировать каждую последовательность, содержащуюся в библиотеке. Библиотека инкубируется с целевым белком, иммобилизованным в лунках 96-луночного планшета. После этого идет отмывка, элюирование и ПЦР амплификация связавшихся последовательностей. После пяти циклов амплифицированные ДНК последовательности секвенируются методом параллельного секвенирования единичных молекул, позволяющим одновременно анализировать большое количество олигонуклеотидов и идентифицировать их посредством баркодов. Данный вариант позволяет увеличить пропускную способность SELEX.
MAI-SELEX [59]	Метод разработан для получения аптамеров на определенные субъединицы белков. Он включает стадии аффинного и специфичного отбора. На стадии аффинного отбора библиотека инкубируется с белком, иммобилизованным на магнитных частицах, с последующей магнитной сепарацией (пять циклов). На шестом цикле проводят специфичный отбор: пул взаимодействует с интересующей субъединицей белка. Связанные аптамеры элюируют, несвязанные – снова инкубируют с белком-мишенью, после чего проводят направленный отбор аптамеров уже к другой белковой субъединице.

MARAS [60]	Метод основан на экспрессном отборе специфичных аптамеров под действием электромагнитного поля. Белок-мишень, иммобилизованный на магнитных наночастицах, инкубируется с олигонуклеотидным пулом, после чего магнитные наночастицы подвергаются воздействию внешнего магнитного поля, которое приводит к их вращению. Частота вращения постепенно увеличивается до тех пор, пока связанными с мишенью не остаются только самые высокоаффинные аптамеры. Когда частота достигает 14 кГц, связанные олигонуклеотиды собирают, амплифицируют с помощью ПЦР и направляют на отрицательный отбор с наночастицами, покрытыми стрептавидином. Несвязавшиеся последовательности отбирают, амплифицируют, клонируют и секвенируют. Метод позволяет контролировать аффинность отбираемых аптамеров.
---------------	---

Несколько особняком стоит метод One-Round SELEX. Его основная идея состоит в обеспечении максимальной эффективности разделения олигонуклеотидной библиотеки по аффинности к целевому лиганду, чтобы получать высокоаффинные аптамеры за один цикл SELEX [61-63]. Одностадийный SELEX позволяет существенно упростить получение аптамерных последовательностей, но выбивается из концепции SELEX, так как теряет эволюционную составляющую. Кроме того, эффективное разделение олигонуклеотидов с получением высокоаффинных последовательностей – непростая задача, и в большинстве случаев одного цикла для ее решения недостаточно [26]. Идея One-Round SELEX близка к неравновесному разделению равновесных смесей капиллярным электрофорезом (NECEEM) [64], который позиционируется как не-SELEX-ный метод получения аптамеров. В NECEEM проводится несколько циклов взаимодействия и сепарации без амплификации промежуточных отобранных пулов, что также исключает эволюционную составляющую (см. рис. 2).

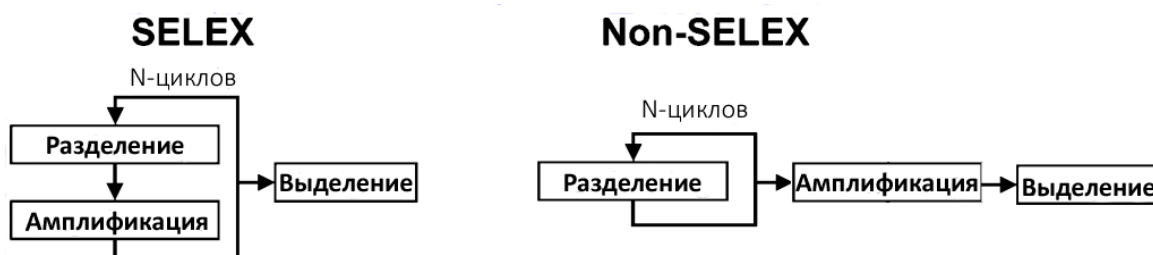


Рисунок 2. Схематичное представление SELEX-ного и не-SELEX-ного методов выделения аптамеров (взято из [64], с модификациями)

Как видим, метод SELEX впервые позволил осуществить одновременный анализ связывания с мишенью большого количества индивидуальных олигонуклеотидов и контролировать показатели аффинности и селективности отбираемых последовательностей [24], что привело к появлению нового вида рецепторных молекул – аптамеров.

1.1.3 Нуклеиновые кислоты в качестве рецепторов. Аптамеры

Аптамеры (термин был впервые предложен в 1990 г. Э. Эллингтоном [23]; от латинского «*aptus*» – подходить и греческого «*meros*» – часть) – одноцепочечные олигомеры нуклеиновых кислот, способные к селективному связыванию разнообразных молекулярных мишеней – от низкомолекулярных органических соединений до высокомолекулярных молекул, например, белков. Связывание аптамеров с лигандами обеспечивается элементами третичной структуры [37, 65]. В их стабилизации и формировании обычно участвуют ионы металлов [66, 67]. В связывании с лигандом могут принимать участие различные структурные элементы: стебли, структурные выпуклости, шпильки, псевдоузлы, триплексы, i-мотивы и квадруплексы [68-70] – см. рис. 3.

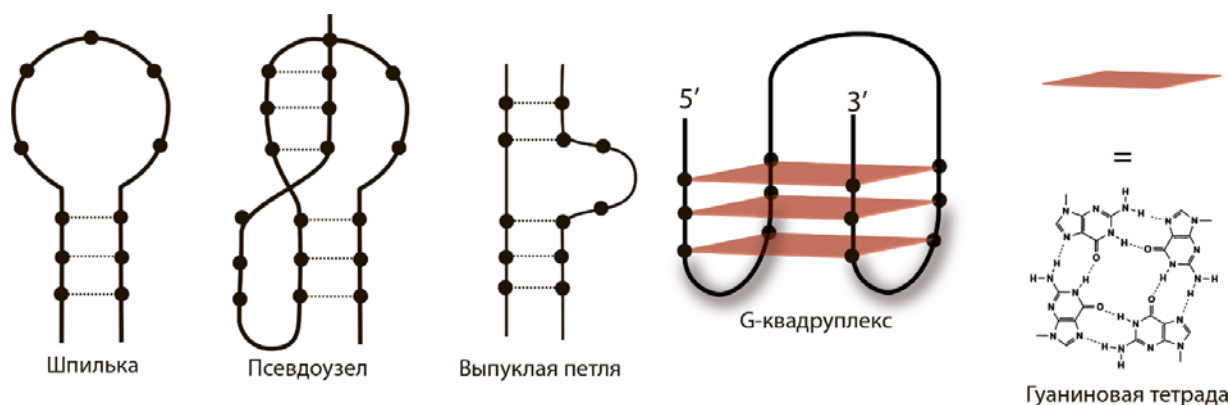


Рисунок 3. Примеры элементов третичной структуры аптамеров

Третичная структура аптамера формируется не только за счет канонических (Уотсон-Криковских), но и неканонических межнуклеотидных взаимодействий, например, Хугстиновских взаимодействий между гуанинами, приводящих к образованию гуаниновых тетрад (см. рис. 3). Несколько гуаниновых тетрад образуют гуаниновый квадруплекс, или G-квадруплекс [71].

Структурные исследования лиганд-связывающих центров аптамеров имеют ключевое значение для понимания факторов, благодаря которым достигается высокая селективность и аффинность аптамеров [72]. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса [73, 74] и рентгеноструктурный анализ [75, 76] – основные методы исследования

структуры и особенностей фолдинга аптамер-лигандных комплексов. Эти методы показали, что большая часть аптамер-лигандных комплексов имеют компактно свернутую структуру, а для комплексов с низкомолекулярными соединениями часто наблюдается полная инкапсуляция лиганда в лиганд-связывающий карман аптамера посредством различных взаимодействий [77]: стекинга планарных элементов, образования водородных связей, гидрофобных и электростатических взаимодействий. Лиганд-связывающий карман образуется элементами третичной структуры аптамера, которые обеспечивают более эффективное взаимодействие с мишенью и стабилизируют аптамер-лигандный комплекс [78]. В частности, при образовании аптамером элементов третичной структуры происходит смещение рКа функциональных групп азотистых оснований аптамера в нейтральную область [72, 79], что приводит к образованию дополнительных водородных связей между аптамером и лигандом. Элементы третичной структуры обеспечивают оптимальное взаимное расположение функциональных групп аптамера и лиганда; таким образом достигается комплементарность лиганда и активного центра аптамера [80].

Примерами инкапсуляции низкомолекулярных лигандов элементами третичной структуры аптамера могут служить трехмерные структуры комплексов аптамеров с аденозинмонофосфатом [81], теофином [82], тиаминпирофосфатом [83], аргинином [84] и другими соединениями. Трехмерные модели комплексов аптамер-тиаминпирофосфат и аптамер-аргинин представлены на рис. 4.

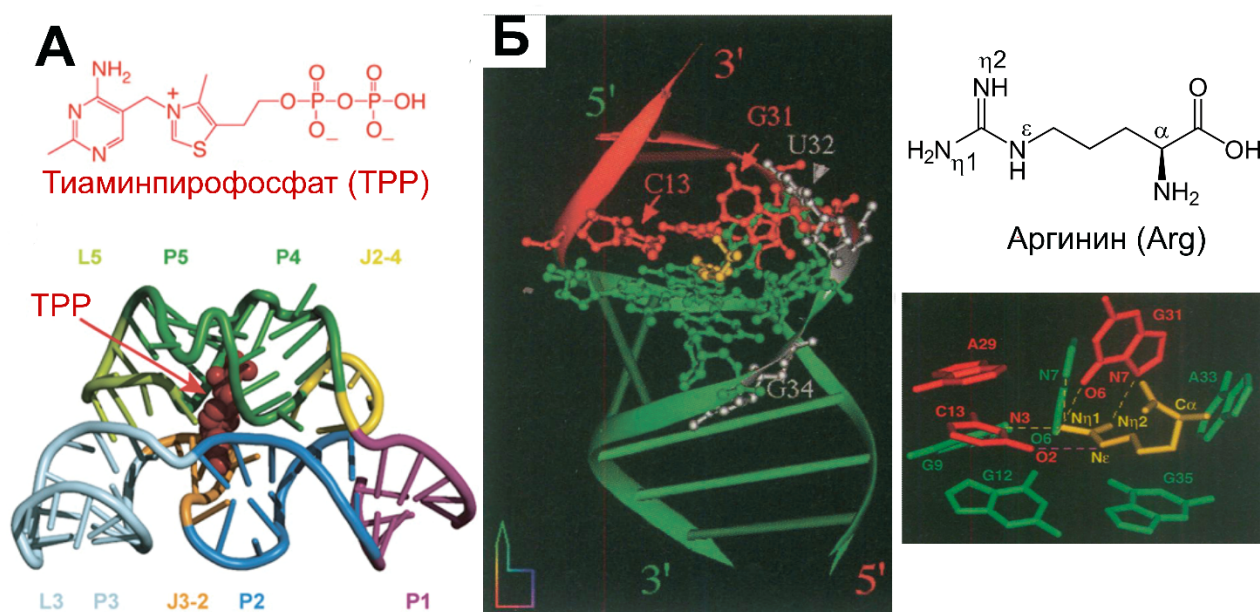


Рисунок 4. (А) Структурная модель комплекса тиаминпирофосфат-РНК аптамер, полученная методом рентгеноструктурного анализа (Protein Data Bank 2GDI) [83]. (Б) Структурная модель комплекса аргинин-РНК аптамер, полученная методом ядерного магнитного резонанса. Основания РНК, образующие лиганд-связывающий карман (G9,

G12, A33, G35 и G30), выделены зеленым, основания, ответственные за селективность аптамера к аргинину (C13, A29 и G31), выделены красным [84]

В отсутствие лиганда аптамеры находятся преимущественно в частично структурированном состоянии, в ряде случаев связывание с лигандом сопровождается значительными структурными перестройками. Образование определенной конформации третичной структуры происходит путем адаптивного фолдинга различных элементов третичной структуры аптамера вокруг молекулы лиганда [77, 80]. При этом стабилизируется лиганд-специфичная конформация третичной структуры [85]. Инкапсуляция лиганда при образовании комплекса с аптамером и наличие адаптивного фолдинга легли в основу гипотезы, что распознавание лиганда происходит по механизму индуцированного соответствия [77].

Связывание аптамера с лигандом не всегда сопровождается значительными структурными перестройками и полной инкапсуляцией лиганда. В качестве альтернативного механизма аптамер-лигандного связывания рассматривают механизм «конформационного отбора». В растворе без лиганда аптамер находится в частично структурированном состоянии и обладает высокой структурной гетерогенностью, формируя ряд различных структур с возможностью перехода из одного конформационного состояния в другое [86, 87]. Механизм «конформационного отбора» основывается на том, что в разнообразии возможных структур с лигандом способна связываться только определенная конформационная популяция [88]. Лиганд, добавленный к аптамеру, преимущественно взаимодействует с лиганд-связывающим конформером. Как следствие, конформационное равновесие разнообразия популяций аптамерных структур сдвигается в сторону преимущественного образования лиганд-связывающей конформации [89]. Схематически связывание аптамера по механизмам «индуцированного соответствия» и «конформационного отбора» представлено на рис. 5.

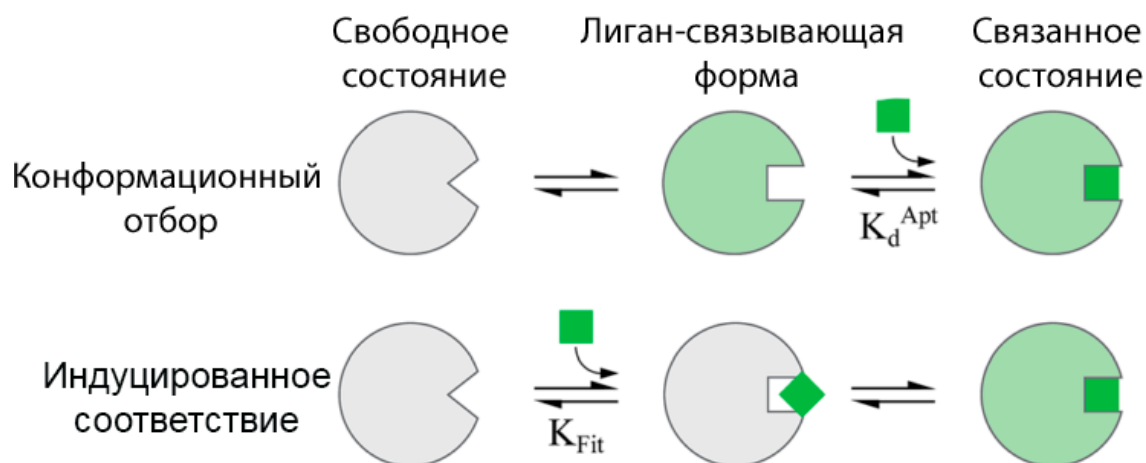


Рисунок 5. Предполагаемые механизмы связывания аптамер-лиганд: сверху – гипотеза «конформационного отбора», снизу – гипотеза «индуцированного соответствия» (взято из [90], с модификациями).

В ряде работ отмечается, что взаимодействие аптамера с лигандом может быть значительно сложнее, объединяя оба вышеуказанных механизма [77, 91, 92]. Механизм, по которому преимущественно протекает связывание, может меняться в зависимости от условий среды, в частности, от концентрации ионов металлов, стабилизирующих третичную структуру аптамера [93].

Что касается нуклеиновой химии аптамеров, то не существует особых предпочтений между использованием оцДНК или РНК библиотек для получения аптамеров. Данные по сравнению распределений констант диссоциации для РНК и ДНК аптамеров позволяют сделать вывод, что их аффинности сопоставимы [94, 95]. Несмотря на это, ДНК библиотеки в последнее десятилетие используют чаще для выделения аптамеров, по сравнению с РНК библиотеками. Возможно, это связано с наличием дополнительной стадии обратной транскрипции при получении РНК аптамеров методом SELEX, что усложняет и делает дороже процесс выделения. Также РНК обладают меньшей химической стабильностью за счет наличия свободного реакционно активного (особенно при щелочном pH) гидроксила в 2' позиции, который может реагировать с соседней фосфорнодиэфирной связью, что приводит к образованию 2'-3' циклофосфатов, сопровождающемуся разрушением структуры НК. Данная реакция катализируется ионами переходных металлов, в особенности ионами свинца и железа, а также некоторыми рибонуклеазами, повсеместно присутствующими в биоматриксах [96]. Для повышения химической стабильности и защиты РНК аптамеров от воздействия нуклеаз проводят пост-SELEX-ную химическую модификацию по 2' гидроксилу рибозы, но такая модификация может отрицательно сказаться на лиганд-связывающих способностях аптамера из-за нарушения его пространственной структуры [96, 97].

Аптамеры имеют ряд преимуществ по сравнению с привычными рецепторами на основе антител. В отличие от них, получение новых аптамеров происходит полностью «*in vitro*» из комбинаторной библиотеки [25]. Исследователь может контролировать процесс отбора и аффинности итоговых аптамеров, изменяя условия взаимодействия на разных его стадиях [98]. При этом аффинность аптамеров не уступают аффинности антител [94]. Любая известная аптамерная последовательность может быть легко воспроизведена химически синтезом, что существенно снижает её себестоимость. Простота структуры

аптамеров позволяет направленно и с минимальными потерями проводить её модификацию необходимыми функциональными группами [98]. Аптамеры, в отличие от антител, могут полностью денатурировать без потери лиганд-связывающих свойств после денатурирующих воздействий – высокой температуры или ионной силы [99].

Наиболее критичный недостаток НК в качестве рецепторов – ограничение, связанное с особенностями их строения. Аффинность взаимодействия рецептора с лигандом зависит как от многообразия возможных конформаций, которые может образовывать молекула рецептора, так и от многообразия имеющихся функциональных групп [100]. По сравнению с белками, нуклеиновые кислоты имеют менее разнообразные функциональные группы. В частности, у них нет гидрофобных групп, что негативно влияет на эффективность аффинного взаимодействия аптамеров с лигандами, богатыми гидрофобными участками [101]. Для повышения разнообразия функциональных групп предложено и практически реализовано применение дополнительных пре-SELEX-ных химических модификаций [102-104]. Для проведения SELEX с химически модифицированными нуклеиновыми кислотами используется ряд новых ферментных систем [105, 106].

1.1.4 Определение константы взаимодействия аптамер-лиганд

Важнейшей характеристикой любого лиганд-рецепторного взаимодействия является константа диссоциации (K_D) и её кинетические компоненты. Для любых лиганд-рецепторных взаимодействий кинетические константы и равновесная константа взаимодействия могут быть характеризованы методами, которые можно условно разделить на гетерогенные, т.е. взаимодействие между растворенным компонентом (рецептором или лигандом) и компонентом, иммобилизованным на подложке, и гомогенные – взаимодействие между двумя компонентами в растворе.

Из гетерогенных методов, используемых для определения K_D лиганд-рецепторного взаимодействия, применительно к аптамерам можно выделить: различные виды аффинной хроматографии [107, 108], позволяющие определять K_D до 10^{-9} М [109]; регистрацию поверхностного плазмонного резонанса (K_D до 10^{-12} М) [110], которая позволяет напрямую определять кинетические компоненты константы связывания [111]; различные виды планшетного анализа [112] и анализа с использованием микрочипов (K_D до 10^{-9} М) [44].

Однако гетерогенные методы нельзя признать оптимальными, так как на полученную K_D оказывают влияние конформационные перестройки реагентов в ходе иммобилизации и диффузионные ограничения, накладываемые на взаимодействие между

иммобилизованным компонентом и компонентом, находящимся в растворе. Вследствие чего определение K_D гомогенными методами более предпочтительно.

Гомогенные методы, применяемые для определения константы взаимодействия, можно разделить на две подгруппы. Первая подгруппа – методы с последующим отделением образовавшегося лиганд-рецепторного комплекса от несвязавшихся реагентов. К таким методам относится, например, равновесный диализ (определяемая K_D до 10^{-8}) [108, 113]. К недостаткам таких методов относят долгое время проведения реакции и необходимость использования значительного количества реагентов [108, 114]. Вторая подгруппа состоит из методов, в которых образование лиганд-рецепторного комплекса можно регистрировать по изменению определенного физического параметра (подвижность в растворе, флуоресценция, теплоемкость и др.), например, изотермическая калориметрия (K_D от 10^{-8} до 10^{-9} М), которая также позволяет напрямую определить термодинамические параметры процесса [108, 112, 115], микротермофорез (K_D до 10^{-9} М) [116] [117], капиллярный электрофорез (K_D до 10^{-9} М) [108, 118] и анизотропия/поляризация флуоресценции (K_D до 10^{-9} М) [119-121].

Каждый из данных подходов имеет свои достоинства и недостатки. Проведение изотермической калориметрии не требует дополнительной метки, но характеризуется длительностью проведения и большим расходом реагентов. Для проведения микротермофореза требуется минимальный объем реагентов (несколько микролитров), но необходимо дорогостоящее оборудование [117].

Метод анизотропии флуоресценции представляет интерес для характеристики аптамер-лигандных взаимодействий в связи с рядом достоинств. Он не требует иммобилизации реагентов, прост в исполнении и характеризуется оперативным получением результатов вследствие быстрого достижения химического равновесия при взаимодействии в растворе. Но эффективность метода АФ зависит от различий между подвижностью в растворе лиганда и его комплекса с рецептором [3].

1.1.5. Области практического применения аптамеров

Прежде чем обсуждать области применения аптамеров, важно провести характеристику существующего аптамерного разнообразия. К сожалению, точно указать количество опубликованных в литературе аптамеров и разнообразия их мишеней не представляется возможным. Это связано с отсутствием полной аптамерной базы данных (единственная функционирующая на 2019 год общедоступная база Aptagen является крайне неполной и содержит всего 540 уникальных последовательностей [122]). Существующие же литературные обзоры, посвященные этой теме, содержат уже устаревшие данные.

Последние актуальные цифры приведены на 2013 г., когда количество SELEX-ов, опубликованных в научных работах, составляло более 500, и с их помощью было выделено более 2300 уникальных аптамеров на более чем 600 уникальных мишеней [94, 123]. Если рассматривать публикационную активность по аптамерной тематике (см. ниже по тексту в подразделе 1.1.5.2), то следует констатировать её активный рост. Можно предположить, что к настоящему моменту количество аптамеров и их мишеней значительно увеличилось.

По прогнозам, к 2020 году рынок практического применения аптамерных технологий достигнет 245 миллионов долларов США [124]. По состоянию на 2018 год в него вовлечены около 40 компаний, проводящих активные исследования с целью последующей глобальной коммерциализации аптамеров. Ряд продуктов на основе аптамеров уже коммерчески доступен, тогда как ряд других имеет ощутимый потенциал к выходу на рынок в течение ближайших 5-10 лет. Далее мы разберем практическое применение аптамеров в таких важных направлениях, как создание лекарственных средств и биорецепторный анализ.

1.1.5.1. Применение аптамеров в качестве лекарственных средств

Терапевтическое применение аптамеров основано на их взаимодействии с биологически активными мишенями «in vivo». Терапевтический эффект достигается посредством ингибирования биологических функций мишени либо за счет использования аптамера в качестве носителя для направленной доставки лекарственных средств. Создание коммерческих лекарственных препаратов на основе аптамеров представляет значительный интерес. На данный момент на различных стадиях клинических испытаний находятся одиннадцать аптамеров для терапии различных патологических состояний [124]: макулодистрофии – Pegaptanib sodium/Macugen, E10030 и ARC1905; раковых заболеваний – AS1411 и NOX-A12; диабета – NOX-E36; снятия воспаления – NOX-H94; предотвращения тромбообразования – ARC1779, NU172, BAX499/ARC19499 и REG1 system. Из них полностью прошел клинические испытания препарат для лечения макулодистрофии Pegaptanib sodium/Macugen. Еще два аптамерных препарата (E10030 и REG1 system) находятся на заключительной стадии клинических испытаний [124, 125].

Необходимо отметить, что все аптамеры, находящиеся на стадии клинических испытаний, не являются нативными ДНК или РНК, а представляют их химически модифицированные аналоги, например, Pegaptanib sodium/Macugen – ковалентно связанную с полиэтиленгликолем (40 кДа) 27-нуклеотидную молекулу РНК. Для большей резистентности к воздействию нуклеаз она модифицирована посредством замещения природных нуклеотидов на 2'-фторпиримидиновые и 2'-О-метилпуриновые аналоги. Повышение резистентности является необходимым условием роста периода полураспада

аптамера «in vivo» и пролонгирования терапевтического эффекта [45]. Для обеспечения неиммуногенности лекарственных препаратов на основе аптамеров необходимо проводить модификацию (метилирование) цитозин фосфат гуаниновых димеров (СрG), имеющих в последовательности аптамера. Это связано с тем, что незащищенные СрG являются сайтами связывания Toll-подобных рецепторов и вызывают иммунный ответ [126, 127]. Однако проблема иммуногенности при создании лекарственных препаратов в случае аптамеров не стоит так остро, как в случае антител.

Несмотря на широкий интерес, терапевтическое применение аптамеров осложнено тем, что, помимо получения высокоаффинных последовательностей методом SELEX, необходимо проводить их обязательную пост-SELEX-ю модификацию, так чтобы лиганд-связывающие свойства сохранялись на необходимом уровне. Это значительно усложняет разработку аптамерных лекарственных препаратов. С другой стороны, низкая иммуногенность аптамеров обуславливает их большой потенциал в этом направлении.

1.1.5.2. Применение аптамеров в аналитических системах

Также значительный интерес представляет применение аптамеров в качестве рецепторных молекул в аналитических системах. Востребованность химической модификации имеется и в этой области, но из-за короткой продолжительности анализа проблема стабильности не стоит столь остро, и модификация в большинстве случаев не является обязательной. В связи с этим, нативные РНК и ДНК аптамеры активно применяются для разработки анализов на различные виды мишеней.

Проанализирована база данных научных статей Web of Science с 1992 по 2018 год. За этот период по аптамерам всего опубликовано 12267 статей. Применение аптамеров в аналитических системах упоминается в 3746 статьях. Количество статей по аналитическому применению аптамеров за последние два года превысило отметку в 500 статей в год. Их доля относительно всех «аптамерных» статей постепенно растет, и за последние годы она составила более 35%, см. рис. 6.

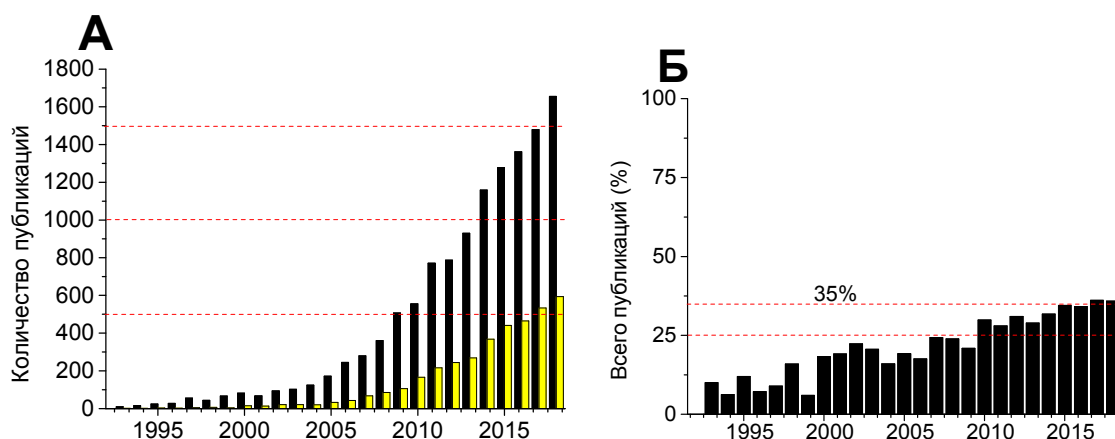


Рисунок 6. (А) Научные статьи по аптамерам (по запросу *aptamer*), опубликованные с 1992 по 2018 год в базе данных Web of Science – черные столбцы; количество статей, посвящённых аналитическому применению аптамеров (по запросу *aptamer + analytic* or assay**), – желтые столбцы. (Б) Процентное соотношение аналитических статей к общему числу публикаций по аптамерам в базе Web of Science за 1992 –2018 годы. Данные получены по базе Web of Science на март 2019 года

Анализ литературы показывает возрастающий интерес к применению аптамеров в аналитических целях. Применение аптамеров открыло возможность разработки уникальных аналитических систем, основанных на особенностях структуры и химии нуклеиновых кислот. Примером этого служат методы, основанные на конформационных перестройках аптамеров в ходе связывания лиганда, – «structure-switching» [128, 129], на лиганд-зависимой гибридизации олигонуклеотидов, – «kissing complex» [130, 131] и на применении каталитически активных аптамеров – аптазимов [132-134].

К настоящему моменту опубликовано большое число методов аптамерного анализа. Исходя из аналитического сигнала, можно выделить ряд крупных направлений (рис. 7) – это системы с регистрацией колориметрического [135, 136], флуоресцентного [137-139] и электрохимического [140] сигнала.

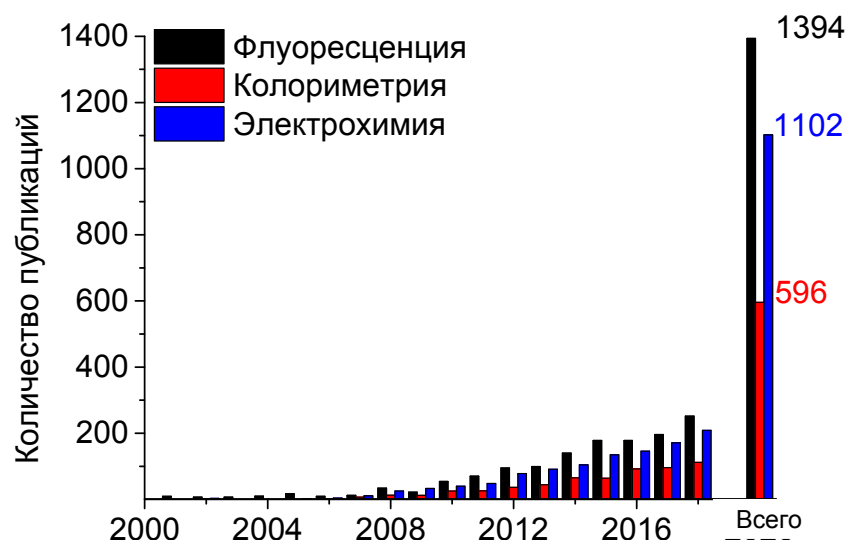


Рисунок 7. Динамика публикационной активности с 2000 по 2018 год по базе Web of Science по аптамерным аналитическим системам с регистрацией флуоресцентного, колориметрического и электрохимического сигнала

В колориметрических аналитических системах связывание аптамера с аналитом регистрируется посредством возникновения окраски или обесцвечивания. Среди данных систем выделить: аптамерный хроматографический анализ на тест-полосках [135], аптамерный аналог иммуноферментного анализа [26] и колориметрический анализ на золотых частицах [26]. Аптамерный колориметрический анализ был предложен для определения низкомолекулярных соединений, таких как микотоксины – охратоксин А [141], зеараленон [142] и др., антибиотики – окситетрациклин [143] тетрациклин [144] и ряд других соединений (рибофлавин [145], аденозинмонофосфат [146], кокаин [147], аденозинтрифосфат [148], 17 бета-эстрадиол [149] и др.).

Также данный анализ был предложен для определения ряда белковых мишеней: тромбин [150], фактор роста тромбоцитов [151], иммуноглобулин Е [152], лизоцим [153], раково-эмбриональный антиген [154], альфа-амилаза [155] и β -конглоутин [156], а также вирусов [157, 158] и бактериальных клеток [159, 160].

Флуоресцентные аптамерные аналитические системы объединяют различные методы, в которых образование комплекса аптамер-лиганд детектируется посредством тушения или генерации флуоресценции. Также к ним можно отнести методы, основанные на регистрации поляризации флуоресценции [161]. Как и колориметрический анализ, данные системы были предложены для детекции низкомолекулярных соединений (микотоксинов, например, фумонизин В1 [162], афлатоксин М1 [163], деоксиваленон [164]) и белковых молекул, среди которых особый интерес представляют белки, связанные с

развитием различных заболеваний (муцин [165], фактор роста эндотелиев сосудов [166], тромбоцитарный фактор роста [167], ангиогенин [168], нейтрофильная эластаза [169] и рецепторная тирозин киназа 7 [170]).

В электрохимических аналитических системах образование комплекса аптамер-лиганд детектируется по изменению электрохимических характеристик системы: тока, потенциала или электрического импеданса [140]. Соответственно, все электрохимические системы, в том числе с использованием аптамеров, можно разделить на амперометрические [171], потенциометрические [140] и импедиметрические [140]. Аптамеры успешно применяются в электрохимических аналитических системах детекции таких важных классов низкомолекулярных соединений, как микотоксины (афлатоксин В1 [172], версиколорин А [173] и др.), антибиотики (канамицин [174], хлорамфеникол [175], ампициллин [176], стрептомицин [177] и др.), лекарственные препараты (прогестерон [178], диклофенак [179]) и пестициды (ацетамиприд [180], хлорпирифос [181], малатион [182]).

Также аптамеры используются при проведении электрохимического определения белков, среди которых важное место занимают маркеры различных заболеваний (интерферон гамма [183], фактор роста эндотелиев сосудов [184], фактор некроза опухоли [185] и С-реактивный белок [186]), а также для анализа бактериальных клеток (*Salmonella typhimurium* [187], *Staphylococcus aureus* [188]).

Как видно, на сегодняшний день накоплен значительный опыт создания различных аналитических систем на основе аптамеров для детекции самых различных мишеней. Особый интерес представляют такие направления, как диагностика рака, определение бактериальных патогенов и низкомолекулярных соединений [124].

Ряд компаний – Neo Ventures Biotechnology, Inc. (Онтарио, Канада), SomaLogic, Inc. (Боулдер, Колорадо, США), Aptamer Sciences, Inc. (Пхохан, Южная Корея), Base Pair (Хьюстон, США) и др. – активно занимается внедрением на рынок аптамерных аналитических систем [124]. В таблице 2 представлены ряд существующие коммерческие аптамерные аналитические системы.

Таблица 2. Примеры коммерческих аптамерных аналитических систем (из [124] с модификациями).

№	Наименование продукта	Компания	Принцип детекции	Область применения	Ограничения

1	AptoCyto	AptSci, Inc.	Проточная цитометрия с аптамерами	Изоляция клеток, содержащих определенные биомаркеры, с использованием магнитных частиц, модифицирован ных аптамерами	Высокая стоимость проточных цитометров
2	AptoPrep		Флуоресцентный анализ и электрофорез в полиакриламидно м геле	Изоляция клеток и белковых биомаркеров с использованием магнитных частиц, модифицирован ных аптамерами	Долгосроч ное хранение возможно только при 4 °C
3	SOMAscan	SomaLogic	Взаимодействие белков с SOMA- мерами, иммобилизованны ми на частицах, с последующим высвобождением SOMA-меров и проведением гибридизационног о ДНК анализа на микрочипах	Анализ белковых биомаркеров	Многостад ийный процесс
4	CibusDx	CibusDx	Электрохимическ ий биосенсор	Определение патогенных микроорганизмо в в продуктах питания	Необходим о приобретен ие

					конкретног о прибора
--	--	--	--	--	-------------------------

Компания Aptamer Science предлагает аналитический набор AptoCyto [189] для быстрого и эффективного выделения клеток, несущих определенные поверхностные детерминанты, из клеточной культуры с использованием проточной цитометрии магнитных наночастиц, модифицированных аптамерами. Утверждается, что данный продукт обеспечивает высокий выход, чистоту и жизнеспособность отбираемой культуры. Доступны наборы для детекции шести биомаркеров (рецептора фактора роста эндотелия сосудов, рецептора эпидермального фактора роста и др.).

Другой продукт данной компании – AptoPrep [190] – представляет собой готовый набор, работающий по аналогичному принципу с иммунопреципитацией и содержащий аптамеры, сорбированные на наночастицах. Набор разработан для выделения и концентрирования белковых биомаркеров из сыворотки крови и других сложных матриц. Утверждается, что набор обеспечивает высокую специфичность выделения и, тем самым, высокую степень чистоты получаемой белковой фракции. Доступны наборы для детекции восьми белковых рецепторов (инсулинового, фактора роста эндотелия и др.).

Компания SomaLogic предлагает платформу SOMAscan [191] с использованием химически модифицированных аптамеров для проведения мультианализа различных белковых маркеров [192, 193]. По данным компании мультиплексная система может быть использована для одновременного скрининга более 5000 белковых мишеней в одном образце. В частности, с помощью данной платформы был продемонстрирован анализ белковых мишеней – плацентарного фактора роста, интерлейкина-17F, фибронектина FN1,4 и FN1,3, секреторного лейкоцитарного ингибитора протеазы, фактора коагуляции XI и др. [192].

Компания CibusDx (США) представила портативный электрохимический аптасенсор [194] для определения ряда патогенных бактерий, контаминирующих продукты питания и питьевую воду. В аптасенсоре применяются полученные компанией Pronucleotein [124] аптамеры, претерпевающие значительные структурные перестройки в ходе аффинного взаимодействия. Структурные перестройки далее трансформируются в детектируемый электрохимический сигнал посредством окислительно-восстановительной метки (метиленового синего или ферроцена). Аптасенсор разработан для определения клеток сальмонелл, листерий, кишечной палочки и вируса синдрома белых пятен.

1.2. Применение поляризации/анизотропии флуоресценции: характеристика аптамер-лигандного взаимодействия и создание аналитических систем

1.2.1 Принцип поляризации/анизотропии флуоресценции.

Метод анизотропии/поляризации флуоресценции представляет интерес как для характеристики рецептор-лигандных взаимодействий, так и для создания аналитических систем на его основе. Гомогенный формат не требует иммобилизации и отмывки реагентов, что позволяет максимально просто и быстро получить необходимые сведения о взаимодействии [3]. Метод получил широкое применение в различных областях, включая клиническую диагностику, разработку лекарственных препаратов, характеристику лиганд-рецепторных взаимодействий, высокопроизводительный скрининг, определение диаметра наночастиц и иммуноанализ [195-197]. Рассмотрим принцип поляризации/анизотропии более подробно.

Принцип поляризации флуоресценции/анизотропии флуоресценции основан на изменении плоскости поляризации (т.е. деполяризации) линейно поляризованного света раствором флуоресцирующих молекул в ходе переизлучения (т.е. флуоресценции) [198, 199]. Поляризация и анизотропия флуоресценции отражают один и тот же физический параметр – способность флуорофора деполяризовать поглощенный линейно поляризованный свет в зависимости от его подвижности в растворе, рис. 8 (А). Схема прибора для измерения АФ/ПФ представлена на рис. 8 (Б).

Поляризация флуоресценции (P) – доля линейно поляризованного света, определяющаяся как отношение разности и суммы параллельно и перпендикулярно поляризованных компонентов флуоресценции относительно плоскости поляризации возбуждающего света [200]:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}, \quad (1)$$

где $I_{\parallel}$ – компонента флуоресценции, возбужденная линейно поляризованным светом, поляризованная параллельно плоскости поляризации возбуждающего света, $I_{\perp}$ – компонента флуоресценции, возбужденная линейно поляризованным светом, поляризованная перпендикулярно плоскости поляризации возбуждающего света.

Анизотропия флуоресценции – отношение разности параллельно и перпендикулярно поляризованных компонентов к общей интенсивности флуоресценции испущенного света, возбужденной плоско-поляризованным светом, где общая интенсивность испущенного света (I) определяется по формуле [201]:

$$I = I_{\parallel} + 2I_{\perp}, \quad (2)$$

Соответственно, анизотропия флуоресценции (r) определяется по формуле:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (3)$$

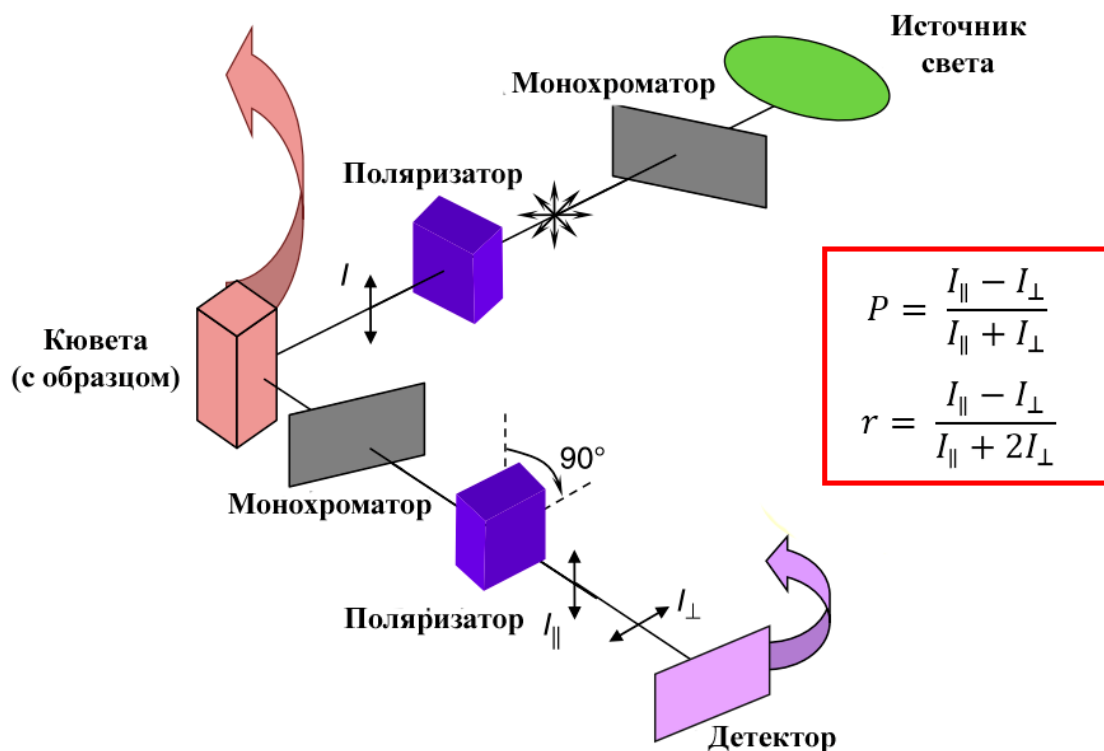
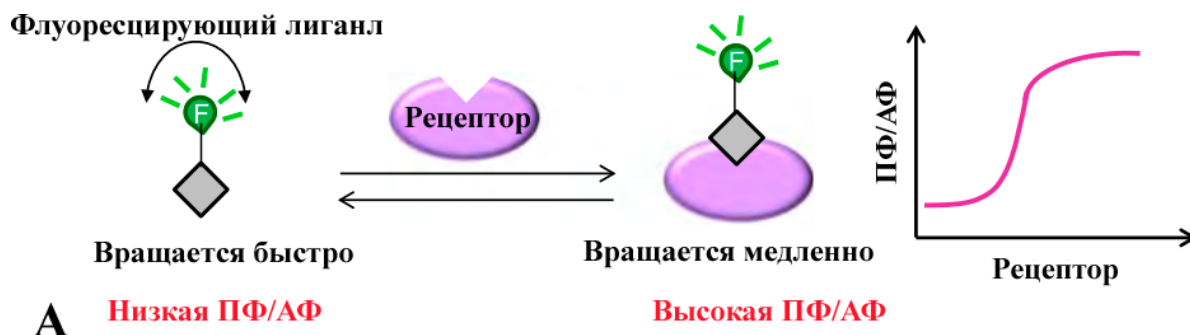


Рисунок 8. (А) Общий принцип метода АФ/ПФ. Флуоресцирующий лиганд характеризуется небольшой АФ/ПФ в сравнении с его комплексом с рецептором. (Б) Схема спектрофлуориметра для проведения АФ/ПФ измерений. Второй поляризатор, расположенный на пути излученного флуорофором света, вращается в параллельном и перпендикулярном направлениях для регистрации $I_{\parallel}$ или $I_{\perp}$, соответственно, и отсекация остальных компонентов света [26]

АФ и ПФ связаны между собой следующей формулой:

$$r = \frac{2P}{3 - P} \quad (4)$$

Для описания физического явления деполяризации линейно поляризованного света, вначале рассмотрим условия, в которых молекулы флуорофора неподвижны. Наблюдаемая в стеклообразном разбавленном растворе анизотропия/поляризация определяется как произведение потери анизотропии/поляризации в ходе фотоотбора и потери анизотропии/поляризации, обусловленное угловым смещением диполей поглощения и испускания флуорофора в плоскости флуорофора [201]. Явление фотоотбора связано с тем, что молекулы флуорофора распределены в растворе случайным образом и их плоскость повернута к плоскости линейно поляризованного света под случайным углом. Точное совпадение плоскости электрического диполя флуорофора и оси поляризации линейно поляризованного света для поглощения этого света не обязательно. Вероятность поглощения поляризованного света зависит от угла наклона плоскости диполя флуорофора к оси поляризации света. Фотоотбор обуславливает деполяризацию $3/5$ светового потока. Угловое смещение диполей поглощения/испускания внутри молекулы флуорофора зависит от химической структуры флуорофора и также приводит к деполяризации света в зависимости от величины угла между этими диполями [201]. Таким образом, даже при условии, что молекулы флуорофора неподвижны, анизотропия/поляризация флуоресценции для любого флуорофора не может равняться 1. Для любого флуорофора, произвольно распределенного в растворе, при однофотонном возбуждении ПФ лежит в диапазоне от 0,333 до 0,50, а АФ от $-0,20$ до 0,40 [201].

Третьим параметром, вносящим существенный вклад в деполяризацию, является подвижность флуорофора в растворе или, по-другому, вращательная диффузия молекул флуорофора, см рис. 9.

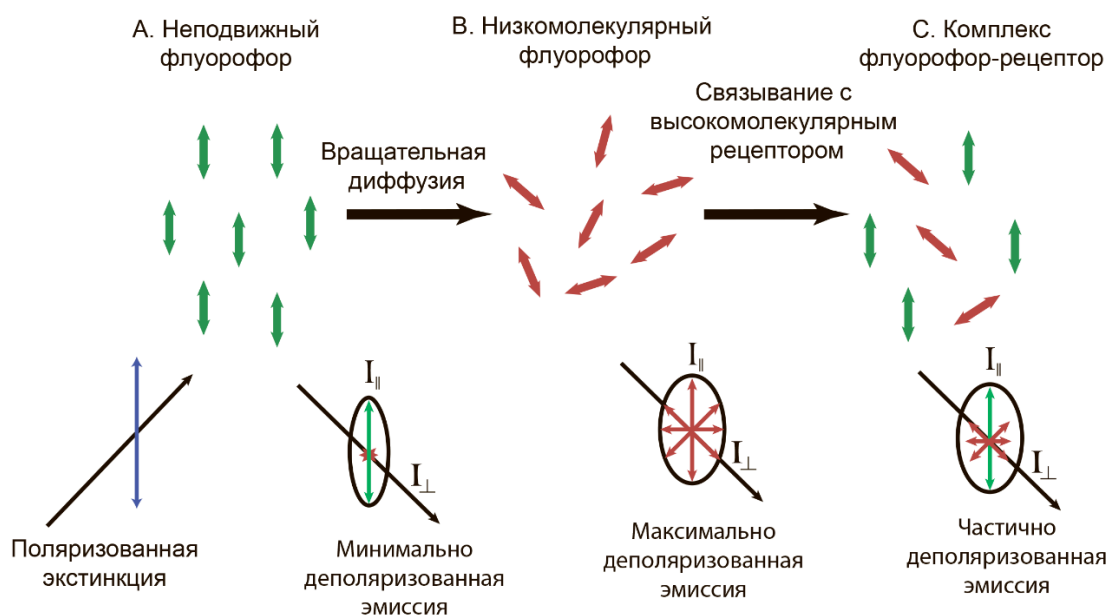


Рисунок 9. Влияние вращательной диффузии на поляризацию эмиссии флуоресценции (из [201] с модификациями): А – неподвижный флуорофор в стеклообразном разбавленном растворе, вращательная диффузия отсутствует, деполаризация обусловлена только фотоотбором и природой флуорофора, поляризация/анизотропия флуоресценции максимальна, В – деполаризация эмиссии низкомолекулярного флуорофора, обладающего высокой подвижностью в растворе, С – деполаризация эмиссии комплекса низкомолекулярного флуорофора с высокомолекулярной молекулой. $I_{\parallel}$ и $I_{\perp}$ – интенсивность перпендикулярно и параллельно (относительно плоскости поляризации возбуждающего света) поляризованных компонентов эмиссии флуоресценции

Именно вращательная диффузия флуорофора чувствительна к процессам комплексообразования. Низкомолекулярные флуорофоры имеют большой коэффициент вращательной диффузии из-за высокой подвижности в растворе и малого размера молекулы. При облучении низкомолекулярного флуорофора плоскополяризованным светом время жизни возбужденного состояния намного больше, чем время, необходимое для изменения ориентации молекулы в пространстве. Вследствие этого молекула успевает изменить ориентацию перед тем, как поглощённый квант света будет переизлучен. В результате параллельно поляризованная составляющая интенсивности излучения убывает ($I_{\parallel}$), а перпендикулярно поляризованная составляющая ($I_{\perp}$) возрастает. Связывание низкомолекулярного флуорофора с высокомолекулярным рецептором приводит к значительному уменьшению скорости его вращения и, соответственно, к увеличению $I_{\parallel}$ и уменьшению $I_{\perp}$, как показано на рис. 9С.

Зависимость поляризации/анизотропии флуоресценции от подвижности молекулы в растворе и от времени жизни возбужденного состояния флуорофора определяется уравнением Перрена. Для поляризации (Р) в общем виде уравнение Перрена имеет вид [201, 202]:

$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\theta}\right), \quad (5)$$

где P_0 – величина ПФ флуорофора в отсутствие вращательной диффузии, когда деполяризация обусловлена только фотоотбором и природой флуорофора; τ – среднее время полужизни возбужденного состояния флуорофора; θ – время вращательной корреляции (среднее время, необходимое для поворота оси флуорофора на угол в один радиан).

Чтобы получить вид уравнения Перрена для анизотропии флуоресценции, достаточно в уравнение (5) подставить уравнение (4).

АФ/ПФ определяется подвижностью флуорофора или его комплекса в растворе и зависит от формы, молекулярной массы и подвижности внутренних структурных элементов флуоресцирующей молекулы или комплекса [201]. Если ввести допущение о том, что флуорофор представляет собой жесткую круглую сферу, то время его вращательной корреляции (θ) будет напрямую зависеть только от его молекулярной массы (ММ) и будет связано с ней следующим уравнением [203, 204]:

$$\theta = \eta MW (V + h) / RT, \quad (6)$$

где η – вязкость среды, MW – молекулярная масса, V – парциальный удельный объем, h – добавочный удельный объем, обусловленный степенью гидратации молекулы, R – универсальная газовая постоянная и T – абсолютная температура в градусах Кельвина.

Уравнение (6) будет верно и для комплекса флуорофор-рецептор, если ввести допущение, что диссоциация комплекса отсутствует. Таким образом, молекулярная масса как самого флуорофора, так и его комплекса с рецептором оказывает прямое влияние на величину их АФ/ПФ. Для чувствительной характеристики комплексообразования методом АФ/ПФ необходимо, чтобы подвижность (молекулярная масса) флуорофора и его комплекса в растворе сильно отличалась. Это является основным критерием для применения методов, основанных на АФ/ПФ, в аналитических целях или для характеристики лиганд-рецепторных взаимодействий. Чем больше разница молекулярной массы флуорофора и его комплекса с рецептором, тем с большей достоверностью и чувствительностью измерение АФ/ПФ позволяет регистрировать процесс лиганд-рецепторного взаимодействия.

Исторически измерение ПФ получило широкое распространение в иммунохимических методах анализа, когда требуется определение как можно более низких

концентраций лиганда [3]. Для определения равновесной константы связывания удобней использовать АФ. Это связано с тем, что ПФ двухкомпонентной смеси, состоящей из свободного и связанного с рецептором флуорофора, аддитивно определяется соотношением этих состояний [205]:

$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3}\right) = \sum_i \frac{f_i}{\left(\frac{1}{P_i} - \frac{1}{3}\right)}, \quad (7)$$

где P – поляризация смеси, P_i – анизотропия i -го компонента смеси, f_i – доля i -го компонента по интенсивности, от суммарной интенсивности смеси.

Для анизотропии данный закон аддитивности выражается более простой математической зависимостью, позволяющей значительно упростить расчеты, и выглядит следующим образом:

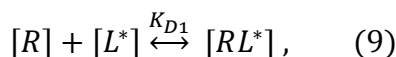
$$r = \sum_i r_i f_i, \quad (8)$$

где r – анизотропия смеси, r_i – анизотропия i -го компонента смеси, f_i – доля i -го компонента по интенсивности, от суммарной интенсивности смеси.

1.2.2 Определения константы лиганд-рецепторного взаимодействия методом анизотропии флуоресценции

На примере лиганд-рецепторного взаимодействия, когда немеченый рецептор образует комплекс с флуоресцирующим лигандом или лигандом, ковалентно связанным с флуоресцентной меткой, рассмотрим общий принцип определения константы диссоциации методом анизотропии флуоресценции.

Для аптамеров, как и для других рецепторов, определение константы методом АФ основывается на общих принципах химической кинетики. Для компонентов, реагирующих в стехиометрическом соотношении 1 к 1, бимолекулярное взаимодействие описывается уравнением:



где $[R]$ – равновесная концентрация рецептора, $[L^*]$ – равновесная концентрация лиганда, обладающего собственной флуоресценцией (или конъюгата лиганда с ковалентно пришитой флуоресцентной меткой), и $[RL^*]$ – равновесная концентрация комплекса рецептор-флуорофор.

Для обеспечения равновесных условий, соотношение реагентов должно быть таковым, что концентрация флуоресцентно меченого лиганда значительно ниже по

отношению к концентрации аптамера ($[L^*] \ll [R]$). В таких условиях константу взаимодействия можно выразить следующим уравнением:

$$K_D = \frac{([L^*]_T - [RL^*])[R]_T}{[RL^*]}, \quad (10)$$

где $[R]_T$ – исходная концентрация рецептора (аптамера), $[L^*]_T$ – исходная концентрация меченого лиганда, K_D – равновесная константа диссоциации рецептора с флуорофором (флуоресцирующим лигандом или лигандом, ковалентно связанным с флуоресцентной меткой).

Когда регистрируемым параметром является АФ, в системе, состоящей из свободного и связанного состояния одного и того же флуорофора, доля связанного с рецептором флуорофора по интенсивности флуоресценции выражается уравнением [201]:

$$f_i^{\text{bound}} = \frac{r_i - r_f}{r_b - r_f}, \quad (11)$$

где r_i – анизотропия i -той точки на кривой зависимости АФ от концентрации рецептора, r_f – анизотропия свободного флуорофора в отсутствие аптамера, r_b – предельное значение анизотропии при концентрации аптамера, которая обеспечивает полный переход меченого лиганда в связанное состояние.

Если связывание с рецептором не вызывает изменения интенсивности флуоресценции (квантового выхода) флуорофора, то доля компонента по концентрации равна доле данного компонента по интенсивности. (Подробно, как влияет изменение флуоресценции на регистрируемые значения АФ и почему это надо учитывать при определении константы, рассмотрено далее в подразделе 1.2.2.1) Уравнение (11) можно преобразовать, заменив АФ на соответствующие концентрации аналитических реагентов:

r_b – АФ, когда весь меченый лиганд находится в связанном состоянии, то есть $([RL^*]_{100\%} = [L^*]_T)$; r_b можно заменить на $[L^*]_T$;

r_f – АФ, когда весь меченый лиганд находится в свободном состоянии, связывание с аптамером отсутствует ($[RL^*]_0 = 0$); r_f можно приравнять к 0;

r_i – АФ, соответствующая i -той концентрации комплекса аптамер-меченый лиганд; r_i можно заменить на $[RL^*]$.

Сделав эти преобразования, получаем уравнение доли связанного меченого лиганда (F_{bound}), выраженное через концентрацию комплекса и исходную концентрацию меченого лиганда:

$$F_{\text{bound}} = \frac{[RL^*]}{[L^*]_T}. \quad (12)$$

Подставив в уравнение (10) значение $[RL^*]$, выраженное через F_{bound} , в соответствии с уравнением (12) получаем уравнение, связывающее константу диссоциации с регистрируемым значением АФ:

$$K_D = \frac{[R]_T}{F_{bound}} - [R]_T. \quad (13)$$

Как следует из уравнения (13), если $F_{bound} = 1/2$, то $K_D = [R]_T$. Таким образом, концентрация рецептора в точке 50%-ного связывания (IC50) на графике зависимости АФ от концентрации рецептора будет соответствовать константе диссоциации комплекса лиганд-рецептор.

1.2.2.1 Влияние изменения флуоресценции в ходе комплексообразования на анизотропию флуоресценции

Если флуоресценция одного и того же количества флуорофора в свободном и связанном состоянии различается, то равенство доли по интенсивности флуоресценции и доли по концентрации не выполняется ($f_{bound} \neq F_{bound}$). Для определения действительного значения F_{bound} необходимо ввести поправочный коэффициент – Q [200, 206]:

$$Q = \frac{I_{bound}}{I_{free}}, \quad (14)$$

где I_{bound} – общая интенсивность флуоресценции флуорофора в полностью связанном состоянии, I_{free} – общая интенсивность флуоресценции флуорофора в отсутствие рецептора.

Рассмотрим бимолекулярное взаимодействие рецептор-флуорофор. Если $Q \neq 1$, то по мере увеличения концентрации рецептора при постоянной концентрации флуорофора будет наблюдаться либо возрастание ($Q > 1$), либо падение ($Q < 1$) общей интенсивности флуоресценции. Это будет приводить к искажению детектируемых значений АФ и точка 50% связывания, полученная аппроксимацией зависимости АФ от концентрации аптамера, не будет соответствовать реальной точке 50% связывания. Для корректного определения концентрационной доли связанного меченого лиганда (F_{bound}) в уравнение (11) вводится поправочный коэффициент Q [200]:

$$F_{bound} = \frac{r_i - r_f}{Q(r_b - r_i) + r_i - r_f}. \quad (15)$$

Уравнение (15) позволяет учесть изменение флуоресценции в ходе комплексообразования и определить действительное значение F_{bound} и, соответственно, K_D .

1.2.2.2 Влияние погрешности измерений анизотропии флуоресценции на воспроизводимость результатов

При оптимальных условиях погрешность измерения не должна оказывать влияния на определение константы связывания. Чтобы оценить влияние погрешности, в работе

Zhang и соавт. [207] был предложен статистический критерий – Z' -фактор, который определяется уравнением:

$$Z' = 1 - \frac{3SD_f + 3SD_b}{r_b - r_f}, \quad (16)$$

где r_b – усредненное значение АФ при бесконечно большой концентрации рецептора (верхняя асимптота) или усредненное значение АФ для связанного состояния меченого лиганда в отсутствие конкурента; r_f – усредненное значение АФ для несвязанного состояния свободного лиганда в отсутствие рецептора; SD_b и SD_f – стандартные отклонения АФ связанного и свободного состояния меченого/флуоресцирующего лиганда, соответственно.

Z' -фактор показывает, насколько рабочий диапазон измерения АФ ($r_b - r_f$) изменяется в зависимости от величины погрешности ($3SD_f + 3SD_b$). Идеальными считаются условия эксперимента, когда Z' -фактор близок к единице ($Z' \approx 1$). Но в реальных системах данное условие труднодостижимо. Было показано [207], что при $Z' \geq 0,5$ погрешности измерения не оказывают существенного влияния на экспериментальный результат и данный фактор можно использовать для оценки достоверности результатов измерений или воспроизводимости анализа [208, 209].

1.2.2.3 Примеры применения метода анизотропии флуоресценции для характеристики аптамер-лигандных взаимодействий

Для лигандов, обладающих выраженными флуоресцентными свойствами, описан аптамерный АФ метод определения константы взаимодействия, основывающийся на изменении собственной АФ лиганда в присутствии аптамера [119, 120]. Для нефлуоресцирующих низкомолекулярных лигандов применяется конкурентная схема метода АФ, основанная на конкуренции меченого флуорофора и немеченого лиганда за связывание с рецептором. Несмотря на то, что такая схема широко применяется для характеристики взаимодействий антиген-антитело [210-212] и для скрининга низкомолекулярных белковых ингибиторов [213-215], ее использование для определения констант связывания аптамеров с низкомолекулярными лигандами распространения не получило. Исключение составляет единственная работа Wang и соавт. [216], опубликованная в 1996 году и посвященная взаимодействию аптамеров с аминогликозидными антибиотиками.

Основным условием применения принципа АФ является значительное изменение АФ при связывании мишени и аптамера. Если в качестве мишени выступает не низкомолекулярный лиганд, а высокомолекулярное соединение (белок), получил распространение альтернативный подход с мечением аптамера [217].

Флуоресцентно меченые аптамеры также применяются для характеристики взаимодействия с низкомолекулярными лигандами на основании АФ [218, 219]. Но принцип данного метода отличается от принципа для высокомолекулярных соединений, и основан на изменении конформации аптамера в ходе связывания с лигандом, приводящем к изменению АФ ковалентно пришитой к нему метки. Этот подход может быть полезным инструментом, но его эффективность существенно зависит от изменения анизотропии флуоресценции, вызванной перестройками в конформации аптамера, наличие и выраженность которой для конкретной пары аптамер-меченый лиганд предсказать крайне затруднительно. Следовательно, измерение константы диссоциации с использованием такой схемы метода АФ представляется нетривиальной задачей.

1.2.3. Применение поляризационного флуоресцентного метода для определения низкомолекулярных соединений с использованием аптамеров

Применение ПФ метода для определения различных низкомолекулярных соединений началось в 60-е годы с работ, посвященных исследованию взаимодействия антиген-антитело [220]. С тех пор регистрация ПФ используется в аналитической практике для определения различных соединений благодаря простоте и высокой скорости получения результатов [221]. К настоящему моменту метод поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА), который основан на конкурентном взаимодействии между лигандом, меченным флуоресцентной меткой, и нативным лигандом за ограниченные сайты связывания антител [3, 196, 197], широко применяется для детекции различных низкомолекулярных соединений (например, пестицидов, антибиотиков и микотоксинов) [3, 197].

На чувствительность ПФ анализа влияют концентрация меченого лиганда и концентрация рецептора. Концентрация меченого лиганда определяет интенсивность детектируемой флуоресценции, которая напрямую влияет на формирование комплекса немеченого лиганда с рецептором и на достоверность измерения ПФ. Оба этих фактора детерминируют предел обнаружения анализа (ПрО). Для достижения минимального ПрО необходимо использовать наименьшую концентрацию меченого лиганда, обеспечивающую достоверные изменения ПФ при проведении конкуренции со свободным лигандом [222]. В ряде литературных источников рекомендуется ориентироваться на фоновую флуоресценцию и брать концентрацию меченого лиганда так, чтобы ее флуоресценция превышала фон в 10-20 раз [223, 224]. Это обеспечивает дополнительный запас при переходе к измерениям в сложном матриксе (поскольку фоновая флуоресценция

матрикса больше, чем буфера) и позволяет избежать повторной оптимизации анализа под матрикс.

В случае конкурентного анализа чем выше концентрация рецептора, тем большая концентрация лиганда необходима для предотвращения образования меченым лигандом комплекса с рецептором, что приводит к ухудшению чувствительности анализа [225]. Соответственно, для достижения максимальной чувствительности необходимо использовать минимальное количество рецептора, обеспечивающее достоверную регистрацию изменения ПФ при переходе меченого лиганда в комплекс с рецептором.

На данный момент отсутствуют работы по определению низкомолекулярных соединений методом ПФ в сложных матриксах с использованием аптамеров по схеме классического ПФИА, но имеется большое количество разных альтернативных схем ПФ аптамерного анализа [161]. Из них можно выделить схемы, в которых в качестве меченого соединения выступает либо сам аптамер, либо короткий меченый олигонуклеотид, комплементарный ему. В работе Cruz-Aguado и соавт. предложена схема анализа ОТА, основанная на конкуренции лиганда и короткого олигонуклеотида, меченного флуоресцеиновой меткой и комплементарного небольшому участку аптамера. Анализ проводился в модельной системе, предел обнаружения ОТА составил 5 нМ [226]. Hafner и соавт. предложили протокол анализа, в основе которого лежит конкурентное взаимодействие между лигандом и меченым аптамером за белковый сайт связывания [227].

Отсутствие систем, использующих традиционный ПФ конкурентный анализ с применением аптамеров, скорее всего, связано с тем, что размер аптамеров существенно меньше размера антител. Длина большинства аптамеров не превышает 60-80 нуклеотидов [94]. Молекулярная масса (ММ) аптамера с длиной цепи 60 нуклеотидов менее 20 кДа, тогда как ММ антител составляет 150 кДа. Таким образом, образование комплекса аптамера с флуорофором будет сопровождаться меньшим изменением подвижности флуорофора и меньшим изменением ПФ, чем образование комплекса того же флуорофора с антителом [228].

Исходя из общей теории поляризации/анизотропии флуоресценции, в соответствии с уравнениями (5) и (6), приведенными в разделе 1.2.1, изменение ПФ/АФ сигнала в ходе комплексообразования зависит от размера флуорофора и от размера рецептора. Чем больше их размеры отличаются, тем более выраженным будет изменение ПФ/АФ флуорофора при его переходе из свободного состояния в связанное. Размер лиганда зависит от выбранной мишени, и сделать что-то с ним не представляется возможным, тогда как изменению размера рецептора или лиганд-рецепторного комплекса принципиально ничего не мешает.

Данная идея нашла отражение в ряде публикаций, посвященных ПФ аптамерному анализу, где с помощью различных манипуляций достигалось дополнительное изменение молекулярной массы меченого компонента в зависимости от наличия/отсутствия лиганда (например, аналит-зависимое расщепление меченого аптамера ДНКазами). Так, Kang и соавт. [229] предложили достаточно сложную схему для ПФ детекции аденозина. Аптамер, меченный по 5'-концевой группе флуоресцентной меткой и биотином, аффинно взаимодействует с аденозином, после чего в раствор добавляется ДНКаза. Связывание с аденозином экранирует аптамер от расщепления ДНКазой, в то время как все несвязавшиеся последовательности расщепляются, высвобождая флуоресцентную метку. После этого добавляется стрептавидин, который связывается с комплексом аптамер-аденозин. На примере измерений в буфере в работе продемонстрировано, что использование стрептавидаина позволяет десятикратно снизить ПрО до 0,5 мкМ.

Изменение массы может также достигаться вследствие лиганд-зависимого отщепления метки ДНКазой от меченого олигонуклеотида, иммобилизованного на наночастицах и частично комплементарного используемому аптамеру [230].

Как альтернативы каталитическому расщеплению, предлагаются различные схемы, основанные на лиганд-зависимом вытеснении меченого аптамера/метки из высокомолекулярных комплексов с белками или наночастицами. Zhu и соавт. [231] предложили схему анализа, основанную на вытеснении аденозином флуоресцентно меченого анти-аденозинового аптамера из комплекса с белком, связывающего одноцепочечные ДНК и имеющего ММ = 19 кДа. Описаны также схемы, основанные на лиганд-зависимом включении меченого аптамера в высокомолекулярные комплексы с белками или наночастицами. Cui и соавт. [228] предложили схему прямого ПФ анализа аденозина и кокаина с помощью меченого флуоресцентной меткой химерного аптамера, состоящего из кокаин/аденозин- и тромбин- распознающих участков. Химерные аптамеры спроектированы таким образом, что при связывании аденозина или кокаина высвобождается тромбин-распознающий участок. Это приводит к связыванию аптамера с тромбином (ММ = 40 кДа), которое сопровождается значительным изменением ПФ метки. Huang и соавт. предложили схему определения аденозина с использованием меченого флуоресцеином химерного аптамера. Принцип определения основан на том, что в присутствии аденозина конформация меченого химерного аптамера меняется, и он может специфически гибридизироваться с комплементарной последовательностью, иммобилизованной на наночастицах оксида кремния, тем самым вызывая значительное изменение ПФ метки [232].

Известные методы ПФ аптамерного анализа представлены сложными многостадийными схемами либо требуют решения нетривиальных задач, например, конструирование химерных аптамеров, проявляющих определенные свойства в присутствии лиганда. Большая часть представленных в литературе схем не была апробирована для реальных матриц.

1.3. Структура, свойства и методы обнаружения охратоксина А

1.3.1 Практическая значимость определения охратоксина А

Микотоксины (от греческих слов *mykes* – гриб и *toxikon* – яд) представляют собой вторичные метаболиты плесневых грибов. На сегодняшний день известно около 300–400 микотоксинов, 20 из них обнаружены в продуктах питания и кормах в количествах, достаточных для негативного воздействия на человека или животных. В число наиболее распространенных из них входит охратоксин А [2, 233].

Охратоксин А (ОТА) – токсичный вторичный низкомолекулярный метаболит (молекулярная масса 404 Да) плесневых грибов родов *Aspergillus* and *Penicillium* [234]. ОТА состоит из замещенной дегидроизокумариновой группы, связанной амидной связью с L-фенилаланином (рис. 10) и представляет собой бесцветные кристаллы, хорошо растворимые в полярных органических растворителях (до 100 мг/мл в диметилсульфоксиде, до 10-50 мг/мл в метаноле или этаноле) и плохо растворимые в воде (менее 1 мг/мл) [235]. ОТА является слабой кислотой, $pK_a = 4,4$ для карбоксильной группы остатка фенилаланина и $pK_a = 7,3$ для фенольной гидроксильной группы [236]. ОТА обладает выраженными флуоресцентными свойствами в видимой области спектра [237, 238] с максимумом экстинкции при длине волны возбуждения (λ_{ex}), равной 336 нм для непротонированной (при pH = 6 и ниже) и 380 нм для протонированной формы ОТА (при pH = 8 и выше) [239, 240].

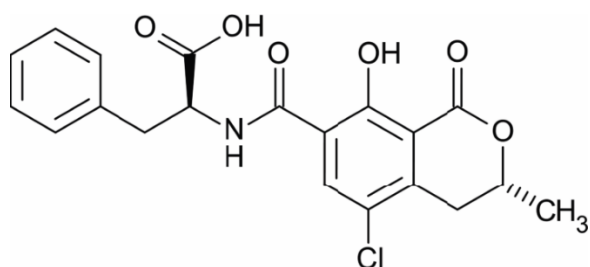


Рисунок 10. Структурная формула охратоксина А

ОТА оказывает нейротоксичное действие как на людей, так и на животных [241-243]. Механизм его токсичности связан со структурным сходством данного микотоксина с фенилаланином и ингибированием метаболических процессов с участием данной аминокислоты [243]. Токсин – повсеместно распространенный контаминант продуктов питания растительного происхождения: зерновые культуры, специи, кофе и какао-бобы, орехи и сушеные фрукты [2].

Предельно допустимая концентрация (ПДК) ОТА в продуктах питания регламентирована на законодательном уровне многими государствами, в том числе Россией и странами Евросоюза. В Российской Федерации в соответствии с СанПиН 2.3.2.1078-01 предельно допустимая концентрация ОТА в продуктах питания, получаемых из зерновых культур, составляет 5 мкг/кг [244]. В Евросоюзе предельно допустимый уровень ОТА в зависимости от продукта питания варьируется от 0,5 до 10 мкг/кг [245]. Токсин термостабилен и не разлагается в процессе обычной обработки сырья, поэтому, попав в него, он сохраняется вплоть до конечного продукта [246, 247]. В связи с этим встает проблема мониторинга ОТА на всех этапах производства.

Для определения охратоксина А применяются различные хроматографические методы. Чаще всего используют высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) с флуоресцентной или масс-спектрометрической детекцией, а также тонкослойную хроматографию (ТСХ). ТСХ широко используется для скрининга, тогда как ВЭЖХ является востребованным методом, когда требуется высокая чувствительность, точность и производительность [248, 249]. ОТА не может быть проанализирован напрямую с использованием метода газожидкостной хроматографии, поскольку он не является летучим соединением. Для проведения такого анализа ОТА сначала с помощью химической дериватизации переводят в О-метилохратоксин А метиловый эфир [246].

С получением первых поликлональных [250] и моноклональных [251] антител против охратоксина А широкое распространение получили иммунохимические методы его определения, основанные на высокоспецифичном взаимодействии антиген-антитело. В силу невысокой себестоимости и относительной простоты иммуноанализ эффективен для проведения количественного или качественного скрининга множества образцов за короткое время или в случаях, когда необходимо проводить анализ во внелабораторных условиях.

На данный момент для определения ОТА разработаны различные иммунохимические методы: иммуноафинная экстракция в сочетании с ВЭЖХ и флуоресцентной детекцией [252], иммуноферментный анализ (ИФА) [253], иммунохроматографический анализ [254], поляризационный флуоресцентный

иммуноанализ [255], сенсоры, основанные на явлении поверхностного плазмонного резонанса [256], электрохимические иммуносенсоры [257] и др.

С появлением аптамерных рецепторов все больше внимания стало уделяться разработке аналитических методов на их основе, в том числе и для определения ОТА.

1.3.2 Аптамеры, специфичные к охратоксину А

Получение аптамеров, специфичных к охратоксину А, методом SELEX описано всего в трех работах. Первой из них была работа Cruz-Aguado и Penner [258]. Они опубликовали SELEX с использованием разделения связавшихся олигонуклеотидов от несвязавшихся методом аффинной хроматографии. Олигомеры ДНК, находящиеся в растворе, взаимодействовали с ОТА, ковалентно связанным с агарозной смолой через карбоксильную группу. По результатам SELEX был отобран аптамер под индексом 1.12.2 (5'-GAT-CGG-GTG-TGG-GTG-GCG-TAA-AGG-GAG-CAT-CGG-ACA-3'). Наличие охратоксин-связывающих свойств было подтверждено равновесным диализом [258] и поляризацией флуоресценции [226].

Получению новых аптамеров для детекции ОТА методом SELEX были посвящены также работы Barthelmebs и соавт. [141] и McKeague и соавт. [259].

В работе Barthelmebs и соавт. [141] SELEX также проводился с использованием аффинной хроматографии, но в качестве носителя использовали магнитные наночастицы с ОТА, иммобилизованным посредством взаимодействия биотин-стрептавидин. Для иммобилизации ОТА предварительно модифицировался по карбоксильной группе биотинилирующим агентом. Олигомеры ДНК, находящиеся в растворе, взаимодействовали с ОТА на поверхности магнитных частиц. Проверка лиганд-рецепторного связывания проводилась с помощью аффинной хроматографии с использованием флуоресцентно меченного аптамера и микропланшетным методом с ферментной меткой. Были отобраны два аптамера под индексами Н8 (5'-CTG-GGT-GTG-GGG-TGA-TCA-AGG-GAG-TAG-ACT-3') и Н12 (5'-CGG-GTG-TGG-GTG-CCT-TGA-TCC-AGG-GAG-TCT-3').

В работе McKeague и соавт. [259] также использовалась аффинная хроматография на магнитных частицах. В отличие от работы Barthelmebs и соавт., ОТА иммобилизовался на поверхности магнитных частиц, содержащих на поверхности свободные аминогруппы. ОТА иммобилизовался карбодиимидным методом ковалентно, через карбоксильную группу. Лиганд-связывающую активность полученных аптамеров проверяли методом аффинной хроматографии и флуоресцентным методом с использованием интеркалирующего флуорофора SYBR green. Были отобраны два аптамера под индексами

A08 (5'-GGC-AGT-GTG-GGC-GAA-TCT-ATG-CGT-ACC-GTT-CGA-TAT-CGT-G-3') и B08 (5'-GGC-GCA-TGA-TCA-TTC-GGT-GGG-TAA-GGT-GGT-GGT-AAC-GTT-G-3').

Отметим, что используемые методы отбора аффинных последовательностей и определения константы аптамер-лигандного взаимодействия напрямую влияют на выбор перспективного аптамера из сотен вариантов, получаемых по итогам SELEX.

Несмотря на то, что все аптамеры были получены на охратоксин А, модифицированный по карбоксильной группе (см. структурную формулу ОТА на рис. 6), с использованием аффинной хроматографии, их свойства различаются. Такой вывод можно сделать на основании исследования их аффинности проведенного с использованием различных методов: аффинная хроматография, равновесный диализ, ультрафильтрация, собственная поляризация флуоресценции ОТА, поверхностный плазмонный резонанс, ДНКазное расщепление, флуоресцентный анализ с использованием интеркалирующего флуорофора SYBR green и колориметрический метод, основанный на агрегации золотых наночастиц [119].

Методом аффинной хроматографии были определены константы диссоциации для всех указанных выше аптамеров, см. таблицу 3. Интересно, что при использовании других методов для определения константы связывания этих аптамеров возникли проблемы. Так, связывание между ОТА и аптамерами, отобранными в работе [259], не удалось зафиксировать методами равновесного диализа, ультрафильтрации, поляризации флуоресценции и поверхностного плазмонного резонанса, см. таблицу 3. Для аптамеров, отобранных в работе [141], связывание выявлялось еще меньшим количеством методов, только аффинной хроматографией и ДНКазным анализом.

Таблица 3. Определения констант диссоциации ОТА-связывающих аптамеров различными методами (из [119] с модификациями)

Константа диссоциации комплекса аптамер-ОТА, измеренная разными методами (нМ)								
Апта мер	РД	Ультраф ильтрац ия	АХ ¹	Прямая ПФ	ППР ²	ДНКазны й анализ	SG ³	К _Д (опубли кованна я), нМ
1.12.2	287±56	255 ±49	375±255	125±23	163±15	НС	146±4 3	200
A08	CH*	CH	286±149	CH	CH	200±157	108±6 1	290±150

A08 min	НП**	НП	406±166	НП	СН	НС	169±5 2	НП
B08	НП	НП	125±44	НП	СН	670±331	17±5	110±50
H8	СН	СН	14±7	СН	СН	54±23	НС	130
H12	СН	СН	40±14	СН	СН	270±201	НС	96

¹АХ - аффинная хроматография

*СН – связывания не наблюдается

²ППР – поверхностный плазмонный резонанс

**НП – не проверялось

³SG – флуоресцентный анализ с использованием интеркалирующего флуорофора SYBR green

Аптамерная последовательность, проявляющая хорошие лиганд-связывающие свойства в одном методе, не гарантирует работоспособности в другом методе. Данная особенность, связанная с недостаточной характеристикой нуклеиновых рецепторов, отобранных по итогам SELEX-эксперимента, приводит к публикации последовательностей, не способных проявлять заявленные лиганд-связывающие свойства – таких, как, например, H8 и H12 из таблицы 3.

Существует большое количество работ, посвященных созданию аптамерных аналитических систем для определения микотоксинов, и ОТА не является исключением. Разнообразие имеющихся аптамерных аналитических систем суммировано в ряде последних обзоров [260-262].

Анализ, основанный на поляризации/анизотропии флуоресценции, описывают четыре опубликованные работы. В них предлагается ряд схем для реализации ПФ аптамерного анализа ОТА. Основные аналитические параметры данных работ суммированы в таблице 4.

Таблица 4. Основные характеристики существующих схем ПФ аптамерного анализа ОТА

	Принцип амплификации	Время анализа, мин.	Среда	ПрО, нМ (мкг/кг)	Ссылка
1	Без амплификации (конкуренция с меченым олигонуклеотидом, комплементарным участку аптамера)	5	Буфер	5 (2)	[226]

2	Экранирование ферментного расщепления аптамера	55	Буфер	70 (28,2)	[263]
3	Без амплификации (принцип изменения конформации аптамера при связывании ОТА)	< 5	Буфер 10-кратно разведенная моча 50-кратно разведенное красное вино	3 (1,2) 12 (4,8) 12 (4,8)	[218]
4	Ферментативное каскадное отщепление флуоресцентной метки с поверхности наночастиц в присутствии ОТА	60	Буфер	0,0252 (0,01)	[230]

Как видно из таблицы, предел обнаружения (ПрО) для трех из четырех представленных методов ниже чем ПДК ОТА для ряда продуктов как в России (не более 5 мкг/кг (12,4 нМ)) [244], так и странах Европы (от 0,5 мкг/кг (1,25 нМ) до 10 мкг/кг (25 нМ)) [245]. Рекордный ПрО опубликован Huang и соавт. [230] и составляет 0,0252 нМ в буфере; однако предлагаемая система представляет собой многостадийный анализ, основанный на каскадном ферментном усилении. В обмен на рекордный ПрО метод получился сложным и длительным.

Из имеющихся методов только Zhao и соавт. [218] рассматривали ПФ аптамерный анализ в контексте измерений содержания ОТА в сложных матриксах, в частности, в 50-кратно разбавленном красном вине и 10-кратно разбавленной моче. Данный анализ был основан на переносе энергии между флуоресцентной меткой (тетраметилпроламином) и гуаниновыми основаниями аптамера, эффективность которого зависела от конформации аптамера. В соответствии с работой аптамер претерпевает значительные конформационные перестройки при связывании ОТА. При переходе от буфера к сложным матриксам наблюдается ухудшение ПрО в 4 раза – с 3 до 12 нМ.

В связи с тем, что в ходе ПФ анализа, в отличие от твердофазных аналитических систем (иммуоферментного и иммунохроматографического анализов) не происходит отмывки мешающих компонентов матрикса, наличие сторонних примесей может привести к ухудшению аналитических показателей метода, в частности ПрО. Из обзора

предложенных ПФ аптамерных систем на ОТА видно, что разработка чаще всего заканчивалась на проведении взаимодействия в буфере. Только одна система тестировалась в сложных матриксах, но для этого использовались многократно (до 50 раз) разбавленные пробы. Поэтому из литературных данных неясно, насколько перспективны для проведения ПФ анализа существующие ОТА-специфичные аптамеры.

* * *

Представленный анализ литературы позволяет сделать вывод об актуальности изучения взаимодействия аптамеров с низкомолекулярными лигандами, в том числе их количественной характеристики, и создания аптамерных аналитических систем для детекции пищевых контаминантов. Аптамеры представляются интересными нуклеиновыми аналогами антител. Их применение имеет ряд преимуществ – получение химическим синтезом, относительная дешевизна, стабильность, высокая специфичность и селективность, что особенно важно для детекции низкомолекулярных слабо иммуногенных соединений.

Необходимо тщательное изучение, связывающей способности аптамерных последовательностей, специфичных к охратоксину А, и характеристика их структуры. В рамках характеристики связывания следует определить константу связывания аптамер-ОТА и подтвердить полученную константу с помощью референсного метода. Величина равновесной константы взаимодействия важна для оценки перспективности применения аптамерного рецептора при создании аналитических систем. С практической точки зрения выбор оптимального аптамерного рецептора является важным этапом разработки высокочувствительной аналитической системы для охратоксина А.

В следующих главах диссертации представлены результаты, полученные в ходе решения поставленных задач.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы и оборудование

2.1.1. Материалы

Олигонуклеотиды 5'-GAT-CGG-GTG-TGG-GTG-GCG-TAA-AGG-GAG-CAT-CGG-ACA-3' [258], его 3'-биотинилированное производное, 5' -TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TGA-TCG-GGT-GTG-GGT-GGC-GTA-AAG-GGA-GCA-TCG-GAC-ATT-T- 3' [120], 5'-AGC-CTC-GTC-TGT-TCT-CCC-GGC-AGT-GTG-GGC-GAA-TCT-ATG-CGT-ACC-GTT-CGA-TAT-CGT-GGG-GAA-GAC-AAG-CAG-ACG-T-3' [259], 5'- AGC-CTC-GTC-TGT-TCT-CCC-GGC-GCA-TGA-TCA-TTC-GGT-GGG-TAA-GGT-GGT-GGT-AAC-GTT-GGG-GAA-GAC-AAG-CAG-ACG-T-3' были синтезированы и очищены фирмой Синтол (Россия).

В работе использовали аналитические стандарты ОТА (Хромресурс, Россия) и реактивы 4'-(аминометил)флуоресцеин гидрохлорид (Thermo Fisher Scientific, США), стрептавидин из *Streptomyces avidinii* (ИМТЕК, Россия); золотохлористоводородную кислоту, таниновую кислоту (Fluka, Германия); трис(гидроксиметил)аминометан, диметилсульфоксид (ДМСО), флуоресцеин изотиоцианат, бычий сывороточный альбумин (БСА), *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид, *N,N*-диметилформамид, *N*-гидроксисукцинимидиновый эфир биотин амидогексаноил-6-аминогексаноиновой кислоты, поливинилпирролидон (ПВП-К30), цитрат натрия (Sigma-Aldrich, США).

Все кислоты, щелочи, соли и растворители приобретены в компании Химмед (Россия). Все реактивы, используемые для приготовления буферных смесей, имели степень чистоты не ниже ЧДА и ХЧ. Также в работе использовали мышинные моноклональные антитела против вируса шарки сливы (ФИЦ биотехнологии РАН). Белое сухое вино (2015 г., 12,5% содержания алкоголя) было куплено в розничной торговле.

2.1.2 Оборудование

Деионизованную воду для приготовления растворов получали с помощью системы очистки воды Simplicity Milli-Q (Millipore, Германия). Для проведения тонкослойной хроматографии применяли пластины TCL Silica gel 60 F254 (Merck, Германия). Спектры флуоресценции ОТА и его меченого производного были получены при помощи спектрофлуориметра RF-6000 (Shimadzu, Япония) в 2D и 3D режимах измерений. Черные, несорбционные 96-луночные микротитровальные планшеты (Thermo Scientific NUNC, Дания) использовали при измерениях анизотропии/поляризации флуоресценции на многофункциональном ридере Zenyth 3100 (Anthos Labtec Instruments, Австрия) со следующими настройками: экстинкция 485 нм, эмиссия 535 нм, время интеграции 4 с и G-коэффициент – 0,62. Флуоресценцию ОТА измеряли с помощью мультимодального

микропланшетного ридера 2300 EnSpire (PerkinElmer, США) со следующими настройками: экстинкция 375 нм, эмиссия 430 нм. Для определения оптической плотности и спектров поглощения аптамеров, белков, наночастиц золота и их конъюгатов использовали спектрофотометр Libra S80 (Biochrom, Великобритания). Для получения спектров кругового дихроизма (КД) аптамера и комплекса аптамер-ОТА применяли оборудование спектроскопического кабинета ФИЦ биотехнологии РАН – КД спектрофотометр Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания).

2.2 Методы

2.2.1 Спектроскопия кругового дихроизма

Растворы готовили в трисовом буфере (ТБ) (20 mM Tris-HCl; 120 mM NaCl; 5 mM KCl и 20 mM CaCl₂, pH = 8,5). В сантиметровую кювету вносили 2 мл раствора биотинилированного аптамера или ОТА, или их комплекса в эквимольном соотношении. Для получения спектров кругового дихроизма измеряли разницу поглощения (ΔA) [мград.] лево- и правовращающих компонентов кругового поляризованного света в диапазоне от 220 до 340 нм с использованием программного обеспечения Pro-Data Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания). Измерения проводили при комнатной температуре. Полученные значения ΔA пересчитывали в молярную эллиптичность (θ_μ) [град. см² мкМ⁻¹] аптамера по формуле [264]:

$$\theta_\mu = \frac{3298 * \Delta A}{C \times l}, \quad (17)$$

где ΔA – дифференциальное поглощение, C – молярная концентрация аптамера, l – длина кюветы в сантиметрах.

Спектральные зависимости θ_μ от длины полного поглощаемого света строили с использованием программы OriginPro 9.0 (Origin Lab, США).

2.2.2 Синтез и очистка охратоксина А, меченного 4'-(аминометил)флуоресцеином.

ОТА конъюгировали с 4'-(аминометил)флуоресцеином (ОТА-ФЛУ) карбодиимидным методом, описанным в работах [255, 265], с модификациями. 4 мг ОТА растворяли в 0,2 мл диметилформамида, который содержал 3 мг N-гидросукцинимид и 5 мг N'-дициклогексилкарбодиимида. Полученный раствор перемешивали и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. После инкубации к раствору добавляли 4'-(аминофенил)флуоресцеин в количестве 5 мг. Далее смесь инкубировали в течение 2 часов в темноте, после чего конъюгат отделяли от непрореагировавших компонентов с помощью ТСХ с использованием в качестве элюента смеси хлороформ-метанол в соотношении 4:1.

С покрытой силикагелем ТСХ пластинки собирали область, содержащую основной окрашенный пик ОТА-ФЛУ ($R_f = 0.9$). ОТА-ФЛУ с поверхности силикагеля смывали метанолом. Полученный раствор ОТА-ФЛУ хранили при 4°C в темноте.

2.2.3 Определение концентрации ОТА-ФЛУ

Для приготовления калибровочного раствора 5 мг навески флуоресцеин изотиоцианата растворяли в этаноле до конечной концентрации 1 мг/мл. На основании приготовленного стока с известной концентрацией готовили ряд последовательных разведений в ТБ в диапазоне концентраций от 0,003 до 1600 нМ. Параллельно в ТБ готовили растворы синтезированного препарата ОТА-ФЛУ в разведениях от 100 до $16 \cdot 10^5$ раз. После этого в 96-луночном черном микропланшете проводили параллельное измерение интенсивности флуоресценции (экстинкция 485 нм и эмиссия 535 нм) для разведений контрольного раствора и ОТА-ФЛУ. Объем пробы в каждой лунке составлял 100 мкл. Концентрацию ОТА-ФЛУ вычисляли с помощью градуировочной зависимости.

2.2.4 Определение константы взаимодействия аптамер-ОТА методом анизотропии флуоресценции

1) Характеристика взаимодействия аптамер–ОТА. Готовили разведения аптамера в диапазоне концентраций от 8 мкМ до 2 нМ в ТБ. В лунки 96-луночного черного микропланшета добавляли по 100 мкл разведения аптамера и ОТА-ФЛУ в концентрации, равной 27,2; 13,6; 6,8; 3,4; 1,7 или 0,9 нМ (в рамках одной зависимости концентрация ОТА-ФЛУ постоянна). Далее микропланшет осторожно встряхивали и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. АФ измерили при эмиссии 485 нм и экстинкции 535 нм. Значение разности анизотропии флуоресценции в каждой точке определяли, как

$$\Delta r = r_i - r_f,$$

где r_f – АФ несвязанного состояния ОТА-ФЛУ и r_i – АФ связанного состояния ОТА-ФЛУ при i -той концентрации аптамера.

2) Проведение конкурентного взаимодействия аптамер–ОТА. Готовили ряд разведений аптамера (в концентрациях 4800, 2400, 1200, 800, 600, 480 или 200 нМ), ОТА (от 10 мкМ до 0,4 нМ) и раствор ОТА-ФЛУ в ТБ с концентрацией 12 нМ. Затем в лунки микропланшета вносили по 100 мкл ОТА с концентрацией от 15 мкМ до 0,2 нМ, по 50 мкл 12 нМ ОТА-ФЛУ, и по 50 мкл раствора аптамера (в рамках одной зависимости концентрация аптамера постоянна). Пробы, содержащие 100 мкл ТБ с 50 мкл ОТА-ФЛУ и 50 мкл аптамера либо 150 мкл ТБ с 50 мкл ОТА-ФЛУ, использовали для определения максимальной и минимальной анизотропии флуоресценции, соответственно.

2.2.5 Характеристика взаимодействия аптамер-ОТА методом равновесного диализа

Диализ проводили в соответствии с протоколом, описанным Cruz-Aguado [258] и McKeague [119], с небольшими модификациями. Вначале готовили разведения аптамера от 24 мкМ до 11 нМ в ТБ. Из каждого разведения отбирали аликвоту объемом 150 мкл и смешивали с таким же объемом 240 нМ раствора ОТА в ТБ. В загрузочную камеру диализатора помещали 300 мкл полученной смеси, а в приемную камеру – такой же объем ТБ. Камеры диализатора разделили мембраной из ацетата нитроцеллюлозы с отсечением по молекулярной массе, равным 10 кДа (Harvard Apparatus, Великобритания). Диализатор инкубировали в течение 48 ч при комнатной температуре и легком перемешивании. Затем из обеих камер отбирали по 100 мкл и переносили в лунки микропланшета, после чего добавляли по 100 мкл ТБ. Измеряли интенсивность флуоресценции ОТА при экстинкции 375 нм и эмиссии 430 нм.

2.2.6 Получение флуоресцентных матриц экстинкции-эмиссии комплексов меченого и немеченого охратоксина А с аптамером

Измерения проводили в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. В ТБ были приготовлены стоки 480 нМ ОТА, 12 нМ ОТА-ФЛЮ и 2000 нМ аптамера. В кювету помещали 1500 мкл 480 нМ ОТА или 12 нМ ОТА-ФЛЮ или 2 мкМ раствора аптамера и 1500 мкл ТБ или 2 мкМ раствора аптамера. Измерения проводили с использованием спектофлуориметра Shimadzu RF-6000 (в режиме «3D spectrum») и программного обеспечения LabSolutions, Shimadzu при следующих значениях параметров: ширина щели экстинкции и эмиссии 5 нм; возбуждение образца проводили светом в диапазоне длин волн от 250 до 800 нм; эмиссию детектировали в диапазоне длин волн от 300 до 800 нм. Трехмерные матрицы экстинкции-эмиссии строили с помощью программы OriginPro 9 (Origin Lab, США).

2.2.7 Синтез конъюгатов аптамеров со стрептавидином и конъюгатов аптамер-стрептавидин-антитело

1) В ТБ готовили растворы 3'-биотинилированного аптамера с концентрацией 10 мкМ, которые инкубировали 15 минут при 90 °С, а затем охлаждали 10 минут при +4 °С.

2) Подготовленный раствор биотинилированного аптамера смешивали с равным объемом раствора стрептавида в мольных соотношениях 2:1; 1:1 и 1:2. Полученную смесь, содержащую 5 мкМ аптамера, инкубировали в течение часа при комнатной температуре.

3) Неспецифичные к ОТА моноклональные антитела (антитела к вирусу шарки сливы) диализовали 16 часов при комнатной температуре против 2000-кратного объема 50 мМ калий-фосфатного буфера, содержащего 0,1 М NaCl, pH 7,4. Концентрацию диализованных антител определяли по оптической плотности при 280 нм. В 1 мл ДМСО растворяли 10 мг N-гидроксисукцинимидного эфира биотинамидогексанол-6-аминогексановой кислоты и смешивали с раствором антител в мольном соотношении 20:1 в соответствии с рекомендацией Hermanson [266]. Полученную смесь инкубировали в течение часа при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Для удаления непрореагировавшего производного биотина смесь диализовали против 2000-кратного избытка ТБ в течение 16 часов при комнатной температуре и постоянном перемешивании.

Полученный препарат биотинилированных антител смешивали с двукратным избытком стрептавидина и инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Далее в раствор добавляли аптамер так, чтобы его мольное соотношение к IgG равнялось 1 к 1. Полученную смесь инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Конечная концентрация аптамера в полученном комплексе составила 2 мкМ.

2.2.8 Характеристика комплексов аптамер-белок методом асимметричного проточного фракционирования в поле поперечных сил (AF4)

Фракционирование комплексов аптамер-белок, препаратов аптамера, стрептавидина и моноклональных антител проводили методом AF4 с использованием сепарационной системы Wyatt Eclipse 3+ (Wyatt Technology, США) с автосемплером и насосом (Agilent Technologies, США) в канале длиной 275 мм и высотой 350 мкм (Wyatt Technology, США) и целлюлозной мембраной с отсечением по молекулярной массе 5 кДа (Microdyn-Nadir, Германия). Канал последовательно соединяли с УФ-детектором (Agilent Technologies, США), мультиугловым детектором светорассеяния Dawn HELEOS II и рефрактометром Optilab T-Rex (оба от Wyatt Technology, США). Эксперименты проводили с использованием оборудования ЦКП «Промышленная биотехнология» ФИЦ биотехнологии РАН.

В систему AF4-фракционирования последовательно вводили со скоростью 0,2 мл/мин по 80 мкл 2 мкМ растворов аптамера, белка (стрептавидина или биотинилированного антитела) и аптамер-белкового комплекса (аптамер-стрептавидин или аптамер-стрептавидин-антитело) в ТБ. Далее в течение 6 мин. фокусировали введенные препараты в растворе, используя противоток основного и фокусирующего потока (1 мл/мин). Рабочий буфер для фракционирования – ТБ. Сепарацию проводили при линейном понижении скорости поперечного потока с 1,6 до 0,4 мл/мин (в течение 5 минут) и далее

при постоянной скорости 0,4 мл/мин (в течение 10 минут). Программа изменения скорости потока представлена в таблице 5.

Экспериментальные данные анализировали с использованием программ ChemStation v.B.04.03 (Agilent Technologies, США) и Astra v.6.1.1.17 (Wyatt Technology, США).

Таблица 5. Программа изменения скорости поперечного потока жидкости при AF4-фракционировании

Шаг	Режим	Продолжительность, мин.	Поперечный поток, мл/мин
1	Элюирование	2	1,6
2	Фокусировка	2	-----
3	Фокусировка + инъекция	2	-----
4	Фокусировка	6	-----
5	Элюирование	5	1,6
6	Градиентное элюирование	5	От 1,6 до 0,4
7	Элюирование	10	0,4
8	Градиентное элюирование	3	От 0,4 до 0,1
9	Элюирование	3	0,0
10	Элюирование	3	1,6

2.2.9 Получение мелкодисперсных наночастиц золота

Синтез частиц золота с диаметром менее 10 нм осуществляли в соответствии с методикой, описанной Piella и соавт. [267], с модификациями. Все растворы реактивов предварительно фильтровали с помощью шприцевого фильтра с диаметром пор 0,22 мкм. К 79 мл деионизированной воды добавляли 1 мл 1%-ого раствора золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК), после чего раствор нагревали до 60 °С. Раствор, содержащий 4 мл 1%-ного цитрата натрия, 0,5 мл 1%-ной таниновой кислоты, 0,5 мл 25 мМ и 15 мл деионизированной воды, также нагревали до 60 °С. Растворы смешивали и кипятили с обратным холодильником при перемешивании в течении 30 минут, что достаточно для полного восстановления ЗХВК. Полученный препарат наночастиц золота (НЧЗ) хранили при 4–6°С без доступа прямых солнечных лучей.

2.2.10 Характеристика размеров наночастиц и их конъюгатов методом просвечивающей электронной микроскопии

Размер и морфологию НЧЗ определяли с использованием просвечивающего электронного микроскопа (Jeol CX-100, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении, равном 3,300,000–25,000,000. Препараты НЧЗ наносили на покрытые формоваром медные сеточки (300 меш., Pelco International, США). Сорбцию проводили в течение 15 минут, затем излишек жидкости удаляли фильтровальной бумагой. Полученные снимки переводили в цифровой формат и анализировали с помощью программы UTHSCSA Image Tool (University of Texas Health Science Center in San Antonio, США). Для построения гистограмм распределения частиц по размерам использовали программу OriginPro 9.0 (Origin Lab, США).

2.2.11 Динамическое и электрофоретическое рассеивание света

Все измерения проводили при помощи прибора Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments, Великобритания), с 4 мВ He-Ne лазером (633 нм). Температура 25°C, угол светорассеивания 173°. Количество повторов для каждого измерения – не менее 80.

Гидродинамический диаметр конъюгатов НЧЗ со стрептавидином измеряли методом динамического светорассеивания (ДСР). Для измерений применяли одноразовые кюветы (DTS0012; Malvern Instruments, Великобритания). Индекс полидисперсности (Pdl) вычисляли как

$$Pdl = \left(\frac{\text{стандартное отклонение}}{\text{среднее значение диаметра}} \right)^2. \quad (18)$$

Для определения изоэлектрической точки стрептавида (pI) измеряли его дзета потенциал при различных pH (4,0; 5,0; 6,0 и 7,0) методом электрофоретического светорассеивания (ЭЛС) в соответствии с рекомендациями от Malvern Instruments [268]. Для измерения ЭЛС препарат помещали в кюветы (DTS1060; Malvern Instruments, Великобритания). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Malvern версия 7.11 (Malvern Instruments, Великобритания).

2.2.12 Синтез стрептавидиновых конъюгатов с наночастицами золота

pH раствора НЧЗ с диаметром 8,7 нм доводили до 9, после чего добавляли стрептавидин до концентрации 40 мкг/мл. Полученный раствор инкубировали 1 час при комнатной температуре без перемешивания, добавляли 100 мкг/мл БСА, инкубировали еще 15 минут при комнатной температуре и проводили центрифугирование при 73300 g в течение 30 минут.

Получившийся осадок конъюгата НЧЗ перерастворяли в 10 mM Трис-HCl буфере, содержащий 1% сахарозы, 0,03% азида натрия, pH 8,5. Далее измеряли поглощение света в

диапазоне длин волн от 300 до 600 нм. Полученный препарат хранили при +4°C без доступа света.

2.2.13 Синтез конъюгатов аптамер-стрептавидин- наночастицы золота

Исходный раствор 3'-биотинилированного аптамера с концентрацией 400 мкМ использовали для приготовления 12 мкМ раствора аптамера в буфере 10 мМ Трис –HCl, pH 8,5 без добавления солей, 20 мкл которого смешивали с 2 мл конъюгата НЧЗ-стрептавидин с концентрацией НЧЗ (диаметр 8,7 нм), равной 12,5 нМ (с оптической плотностью (ОП) при 520 нм, равной 0,87). Конечная концентрация аптамера составила 600 нМ.

Конъюгат инкубировали при комнатной температуре и интенсивном перемешивании в течение часа. Несвязавшийся аптамер отделяли от аптамерного конъюгата НЧЗ центрифугированием с использованием центриконов AmiconUltra с мембраной 100 кДа. Для этого помещали в центрикон 500 мкл препарата, проводили центрифугирование при 4500 g в течение 10 минут, полученный надосажок отделяли, а осадок перерастворяли в 10 мМ Трис-HCl, pH=8,5. Отделение конъюгата от несвязавшегося аптамера центрифугированием проводили двукратно. Для дальнейшего использования ОП₅₂₀ конъюгатов аптамер-стрептавидин-НЧЗ доводили до 2 единиц.

2.2.14 Поляризационный флуоресцентный аптамерный анализ

Конкурентный ПФ аптамерный анализ проводили в 96-луночных черных полистироловых микропланшетах, общий объем реакционной смеси в лунке равнялся 200 мкл. Были приготовлены разведения ОТА с концентрациями от 20 мкМ до 0,8 нМ. В лунку микропланшета переносили по 50 мкл раствора ОТА, добавляли по 100 мкл 8 нМ раствора ОТА-ФЛУ и по 50 мкл раствора рецептора (4000 мкМ аптамера, либо 2 мкМ комплекса аптамер-стрептавидин, либо 800 нМ комплекса аптамер-стрептавидин-IgG, либо 160 нМ конъюгата аптамер-стрептавидин-НЧЗ).

Для определения ПФ, которое соответствует нулевой концентрации аптамера, использовали смесь 50 мкл раствора ОТА-ФЛУ и 150 мкл ТБ. Для определения ПФ, которое соответствует полному переходу ОТА-ФЛУ в комплекс с аптамером, использовали смесь 50 мкл раствора ОТА-ФЛУ, 50 мкл раствора рецептора и 100 мкл ТБ.

Микропланшеты осторожно встряхивали и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. После этого проводили измерение ПФ и строили график зависимости ПФ от концентрации ОТА. Предел обнаружения (ПрО) определяли как концентрацию ОТА, при которой происходит 10%-ное вытеснение ОТА-ФЛУ из комплекса с аптамером в ходе конкурентного взаимодействия [269].

2.2.15 Подготовка проб вина для определения ОТА

Подготовку проб белого сухого вина проводили в соответствии с протоколом, предложенным Priesto-Simon и соавт. [270], с модификациями. К 1 мл вина добавляли навеску 10 мг ПВП-К30, которую растворяли при перемешивании в течении 10 минут. Полученный раствор вносили в центриконы Amicon Ultra-15 объемом 5 мл с мембраной с отсечением по молекулярной массе 3 кДа и отфильтровывали центрифугированием (30 минут при 7000 g).

Добавление ПВП и фильтрацию проводили два раза. Полученный бесцветный фильтрат отбирали и доводили его pH до 8,5 раствором 1 М КОН. Затем добавляли 1 М CaCl_2 до конечной концентрации 20 мМ, смесь инкубировали в течение ночи при 4°C до полного выпадения органических солей кальция, после чего отбирали надосады и использовали для анализа.

2.2.16 ПФ аптамерный анализ (ПФАА) охратоксина А в вине

ОТА вносили в подготовленные пробы вина, финальное содержание ОТА в пробах варьировалось от 12 мкМ до 16 нМ. Аптамерный анализ проводили в соответствии с п. 2.2.14, вместо раствора ОТА в ТБ использовали ОТА в пробах. Исходя из известного содержания ОТА в пробах вина, строили градуировочную зависимость.

Для изучения полноты выявления ОТА методом ПФАА готовили девять образцов вина, содержащих ОТА в концентрациях от 375 до 20 нМ. Для каждого образца ставили ПФАА, строили градуировочную кривую по набору известных концентраций и в четырех повторях проводили измерение ПФ в каждом из образцов. Концентрацию ОТА в образце рассчитывали по величинам ПФ на основе полученной градуировочной зависимости и сравнивали с исходной добавленной концентрацией.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Выбор охратоксин А-связывающего аптамера

3.1.1 Сравнительная характеристика ОТА-связывающих аптамеров

На основании литературного обзора был выбран ряд перспективных ДНК аптамеров, специфичных к охратоксину А (ОТА) – таблица 6.

Таблица 6. Используемые в работе ДНК аптамеры, специфичные к охратоксину А

Номер	Число нуклеотидов	Нуклеотидная последовательность	Источник
1	36	5'-GAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA -3'	[258]
2	60	5' –TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGA TCG GGT GTG GGT GGC GTA AAG GGA GCA TCG GAC ATT T- 3'	[120]
3	76	5' –AGC CTC GTC TGT TCT CCC GGC AGT GTG GGC GAA TCT ATG CGT ACC GTT CGA TAT CGT GGG GAA GAC AAG CAG ACG T-3'	[259]
4	76	5'- AGC CTC GTC TGT TCT CCC GGC GCA TGA TCA TTC GGT GGG TAA GGT GGT GGT AAC GTT GGG GAA GAC AAG CAG AC GT-3'	[259]

Для сравнения аптамеров мы провели оценку аффинности их взаимодействия с меченым производным ОТА. Для этого была использована гомогенная система, что позволяет исключить стадии иммобилизации и отмывки, упростить процедуру и сократить длительность тестирования. Применение гомогенной системы позволяет напрямую детектировать связывание нативного лиганда с нативным рецептором. Химическое равновесие для гомогенных взаимодействий достигается быстрее, чем для гетерогенных. Для характеристики аффинности ОТА-специфичных аптамеров идеально подходит метод, основанный на регистрации поляризации флуоресценции (ПФ). Его применение позволяет оценить эффективность связывания аптамерных рецепторов и выбрать наиболее аффинный из них для дальнейшего использования.

3.1.2. Синтез производного ОТА, меченного флуоресцеином

Для характеристики связывающей способности аптамеров против ОТА методом ПФ было получено его производное, меченное 4'-аминометилфлуоресцеином. ОТА имеет свободную карбоксильную группу, которая легко подвергается функционализации. Следует отметить, что все аптамеры получили к ОТА, который был предварительно иммобилизован на носителе через карбоксильную группу [141, 258, 259]. Таким образом, модификация ОТА по свободной карбоксильной группе не должна существенно влиять на его связывание аптамерами.

Конъюгат охратоксин А с аминотетилфлуоресцеином (ОТА-ФЛУ) был получен карбодиимидным методом: с карбоксильной группой ОТА ковалентно связывалась аминогруппа аминотетилфлуоресцеина, рис. 11.

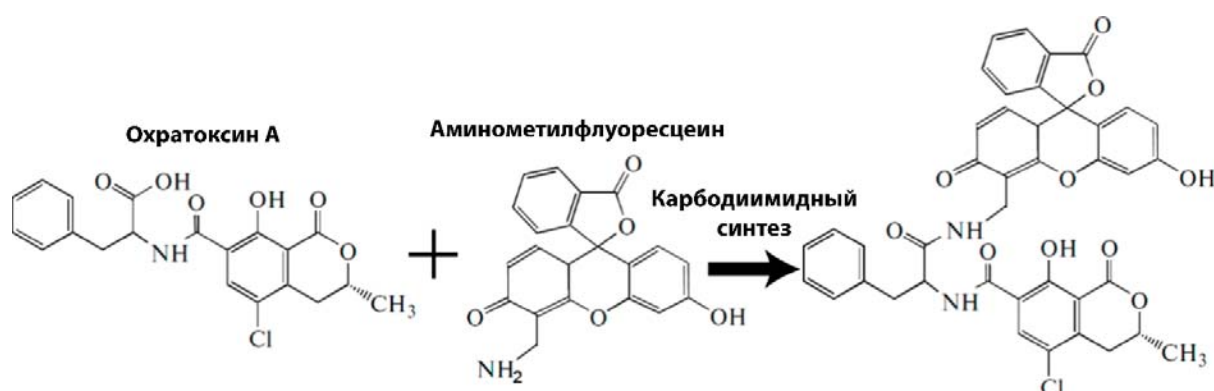


Рисунок 11. Схема синтеза флуоресцентно меченого производного охратоксина А

Полученный конъюгат очищали от непрореагировавшего ОТА и аминотетилфлуоресцеина с помощью тонкослойной хроматографии (см. «Материалы и методы», п 2.2.2). Образование комплекса ОТА-ФЛУ было подтверждено совместно с Бородулевой А.Ю. (МГУ имени М.В. Ломоносова) методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией в режиме ионизации путем распыления в электрическом поле.

Концентрацию ОТА-ФЛУ определяли методом флуоресцентной спектроскопии: сравнением с градуировочной кривой для свободного флуоресцеина (рис. 12). При этом принималось допущение, что конъюгирование не влияет на интенсивность флуоресценции флуоресцеина. Концентрация исходного раствора ОТА-ФЛУ составила 5,1 мкМ.

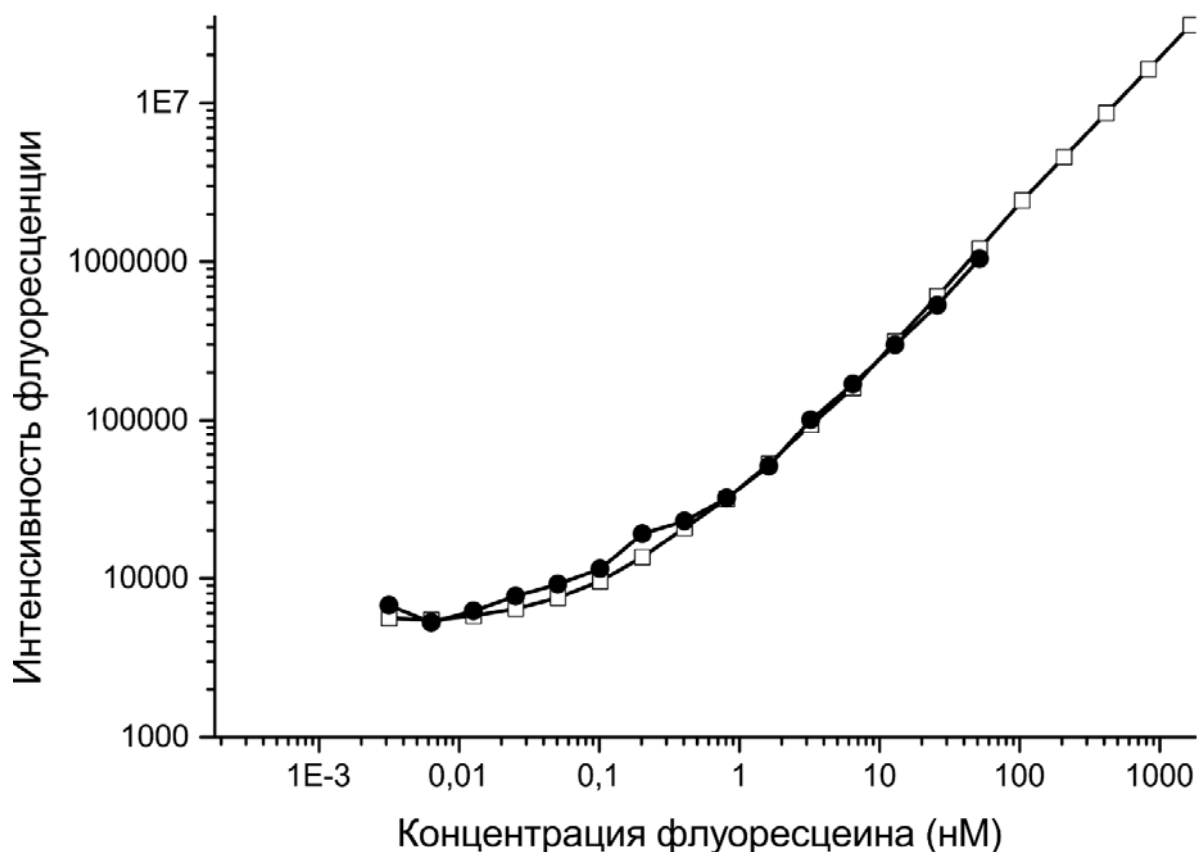


Рисунок 12. Зависимость флуоресценции при длине волны испускания ($\lambda_{\text{ем}}$), равной 535 нм, при облучении светом с длиной волны 485 нм от концентрации флуоресцеина (□) и ОТА-ФЛУ (●). ($n=2$)

3.1.3 Характеристика связывающих свойств аптамеров, специфичных к охратоксину А

Условия проведения ПФ экспериментов для сравнения связывания аптамеров были выбраны, исходя из литературных рекомендаций. Известно, что тип и концентрация моно- и бивалентных ионов металлов оказывает влияние на сродство аптамеров и участвует в стабилизации третичной структуры аптамера [120, 258]. Для проведения взаимодействия был выбран ТБ. Концентрации ионов одновалентных металлов (натрия – 120 мМ и калия – 5 мМ) и двухвалентных металлов (кальция – 20 мМ) выбирались, исходя из литературных рекомендаций [119, 120, 258]. Чтобы обеспечить максимальную интенсивность флуоресценции флуоресцеиновой метки при длине волны возбуждающего света (λ_{ex}), равной 485 нм, для взаимодействия была выбрана щелочная среда – pH = 8,5 [271]. 15-минутная продолжительность инкубации была достаточной для достижения химического равновесия.

Получены зависимости поляризации флуоресценции ОТА-ФЛУ от концентрации каждого из аптамеров, представленного в таблице 6. Для сравнения аффинности разных аптамеров данные зависимости были преобразованы: из регистрируемой величины ПФ была вычтена ПФ для ОТА-ФЛУ в отсутствие аптамера (рис. 13). Как видно из рисунка, наилучшее связывание показал аптамер №1 (точка 50%-ного связывания (IC_{50}) = 61,5 нМ). Аптамер №2 является модифицированным аналогом №1. Согласно данным [120], наращивание цепи аптамера №1 посредством добавления поли-Т последовательностей с обоих концов повышало его аффинность. В нашей работе это свойство не подтвердилось. Хотя максимальный ПФ для аптамера №2 несколько выше, чем для аптамера №1, IC_{50} для аптамера №2 составляет 201 нМ, что почти в три раза хуже, чем для исходной последовательности.

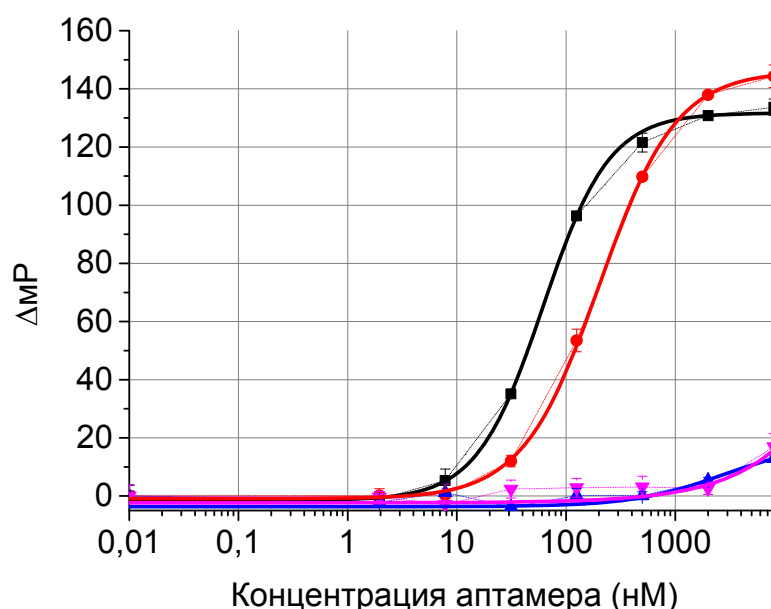


Рисунок 13. Зависимости разности поляризации флуоресценции ($\Delta MP = MP_{bound} - MP_{free}$) свободного и связанного состояния ОТА-ФЛУ от концентраций аптамеров №1 (черная кривая), №2 (красная), №3 (синяя) и №4 (розовая)

В работе MacKeague и соавт. для аптамеров №3 и 4 по данным регистрации собственной ПФ связывание ОТА не наблюдалось [119]. Показано, что связывание с меченым ОТА данных аптамеров происходит, но только в микромолярном диапазоне концентраций. На основании проведенного сравнения для дальнейшей работы был выбран аптамер №1.

Одновременно с ПФ в ходе экспериментов регистрировались параллельно и перпендикулярно поляризованные компоненты флуоресценции (раздел 1.2.1). Сумма этих компонентов, в соответствии с уравнением (2), есть общая интенсивность флуоресценции ОТА-ФЛУ. Концентрационные зависимости разности флуоресценции ОТА-ФЛУ в комплексе с аптамером и свободного ОТА-ФЛУ (рис. 14) показывают, что связывание всех аптамеров приводит к изменению флуоресценции метки. Зависимости изменения интенсивности и поляризации флуоресценции (рис. 13 и 14) для одного и того же аптамера сходны друг с другом.

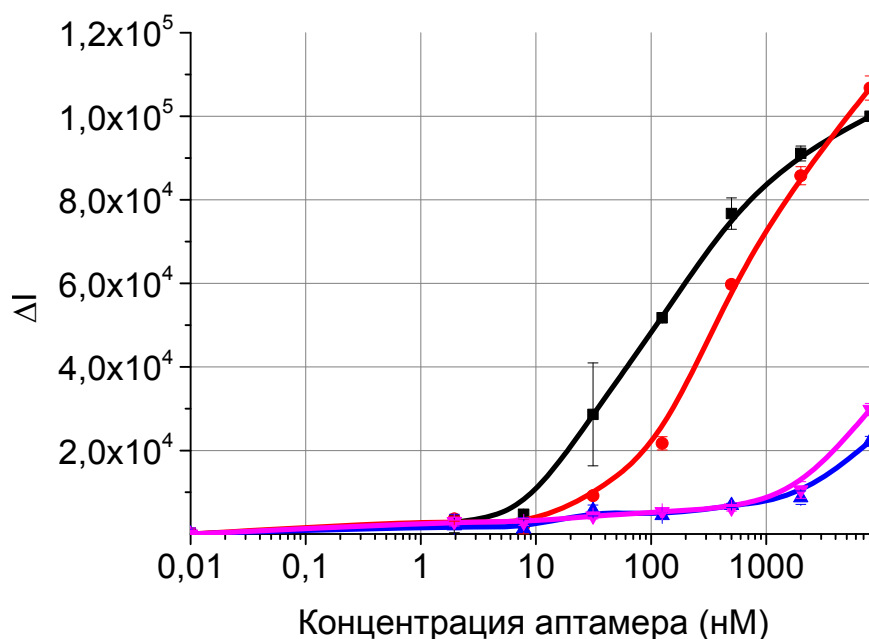


Рисунок 14. Зависимости разности флуоресценции ОТА-ФЛУ ($\Delta I = I_{\text{bound}} - I_{\text{free}}$) от концентрации аптамера №1 (черная кривая), №2 (красная), №3 (синяя) и №4 (розовая)

3.1.4 Характеристика структуры ОТА-связывающих аптамеров методом кругового дихроизма

Чтобы обеспечить возможность включения аптамера №1 в более сложные комплексы, в работе использовали его производное, модифицированное биотиновой меткой на 3'-конце. По литературным данным [258, 272], аптамер №1 (далее – просто аптамер) образует третичную структуру, известную как антипараллельный G-квадруплекс – рис. 15. Наличие подобной структуры характерно для многих аптамеров [273].

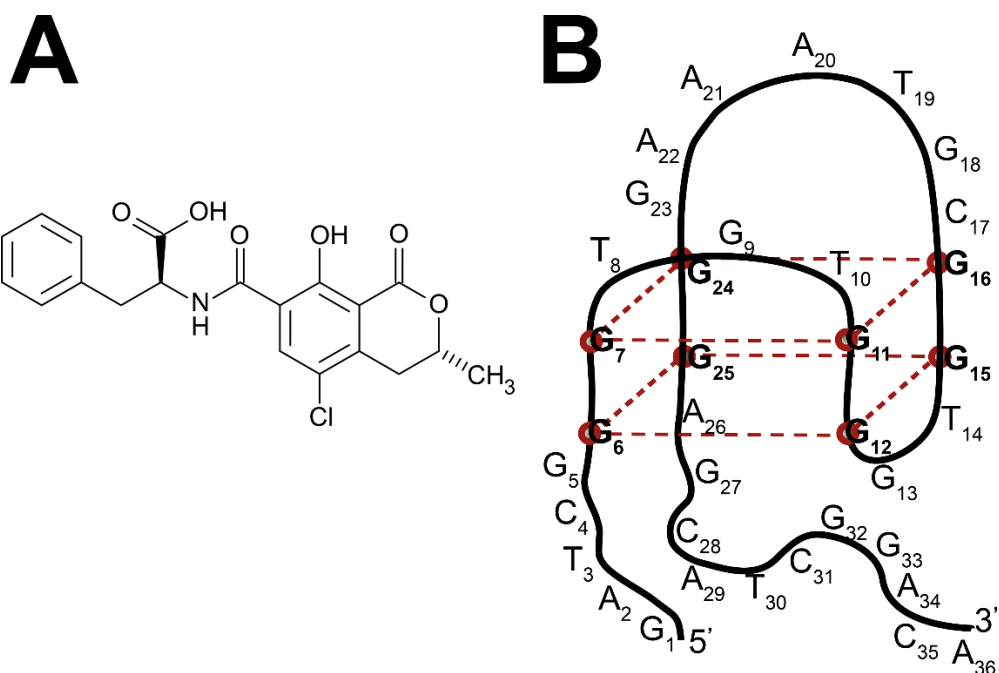


Рисунок 15. (А) Химическая структура ОТА. (Б) Модель структуры ОТА-связывающего G-квадруплексного аптамера, предсказанная в работе Fadok и соавт. [274]

Эффективным инструментом для определения структур биополимеров является спектроскопия кругового дихроизма. В частности, данный метод широко используется для выявления G-квадруплексных структур ДНК [275, 276]. Для проверки того, что выбранная модификация аптамера №1 не приводит к каким-либо серьезным изменениям структуры, мы провели ее изучение методом КД.

Первым этапом было получение спектра кругового дихроизма 3 мкМ аптамера в ТБ. Полученный спектр (рис. 16) имеет два минимума при 233 и 260 нм и два максимума при 243 и 294 нм. Данные значения экстремумов характерны для КД-спектра одноцепочечной ДНК, образующей антипараллельную G-квадруплексную структуру типа корзина [275]. Такие же экстремумы характерны и для нативного аптамера, исходя из результатов, опубликованных Yang и соавт. [272].

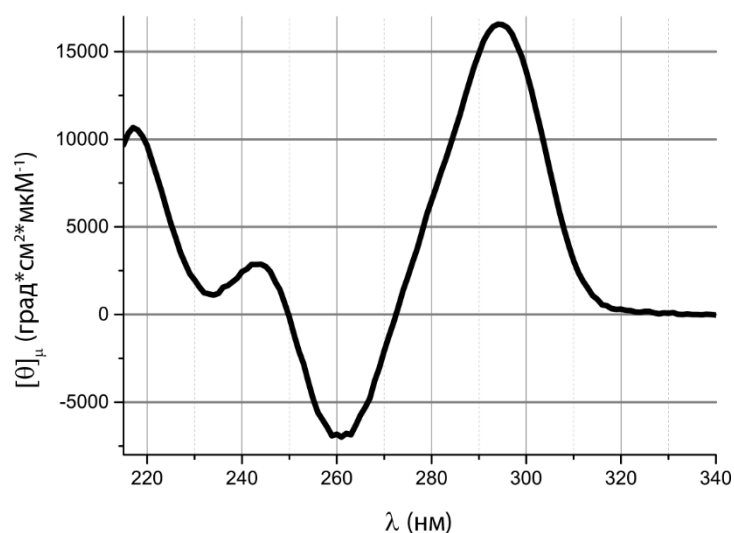


Рисунок 16. Спектр кругового дихроизма 3'-биотинилированного аптамера №1 (3 мкМ в ТБ)

Показано, что в отсутствии ионов двухвалентным металлов данный аптамер G-квадруплексную структуру не образует, и его спектр кругового дихроизма (рис. 17) соответствует типичному спектру одноцепочечной ДНК [275] с отрицательным экстремумом при 243 нм и положительным при 277 нм.

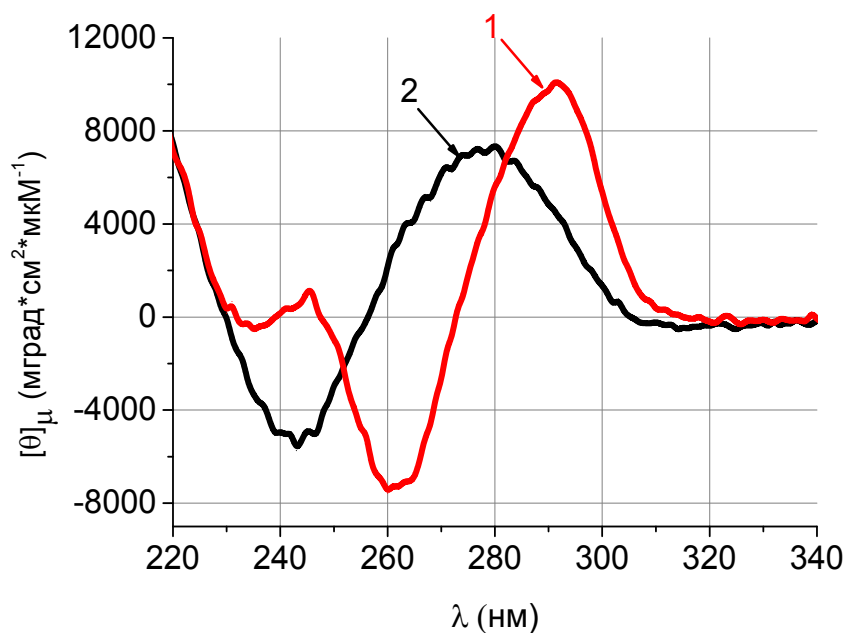


Рисунок 17. Спектры 1,5 мкМ 3'-биотинилированного аптамера в 10 мМ Трис-НCl; pH = 7,4; 120 мМ NaCl; 5 мМ KCl, содержащем 20 мМ MgCl₂ (1) и не содержащем ионов двухвалентных металлов (2)

Отсутствие квадруплексной структуры без ионов двухвалентных металлов хорошо коррелирует с литературными данными, в соответствии с которыми данный аптамер в отсутствие ионов двухвалентных металлов не проявляет ОТА-связывающих свойств [258]. В работе Fadock и соавт. изучался аналог аптамера №1, имеющий на 5 нуклеотидов меньше с 3'-конца. Авторами на основании данных КД-спектроскопии и флуоресцентной спектроскопии, полученных при встраивании в аптамер флуоресцентно меченых гуаниновых оснований, была выдвинута гипотеза, что ОТА встраивается между основаниями G-тетрады G24 и G25, тогда как пространственно удаленные гуаниновые основания G6, G11 и G13 во взаимодействии с ОТА напрямую не участвуют [274]. Cruz-Aguado и Penner [258] показали, что в связывании ОТА участвуют 3'- и 5'-концевые нуклеотиды аптамера, см. рис. 15.

Можно сделать вывод, что именно G-квадруплексная структура определяет аффинность аптамера к ОТА. Соответственно, стабильность G-квадруплекса будет влиять на лиганд-связывающие свойства аптамера. Результаты КД-спектроскопии показали, что ОТА не требуется для формирования аптамером G-квадруплексной структуры.

Отметим, что аптамеры №3 и №4, проявляющие значительно меньшее сродство к ОТА, G-квадруплексной структуры не образуют, в том числе и в присутствии ионов двухвалентных металлов (магния и кальция), и их спектры кругового дихроизма сходны со спектром одноцепочечной ДНК.

Следующим этапом было изучение структурных изменений аптамера в ходе образования комплекса с ОТА. Для этого были получены КД-спектры ОТА, свободного аптамера и их комплекса (с мольным соотношением 1:1), см. рис. 18.

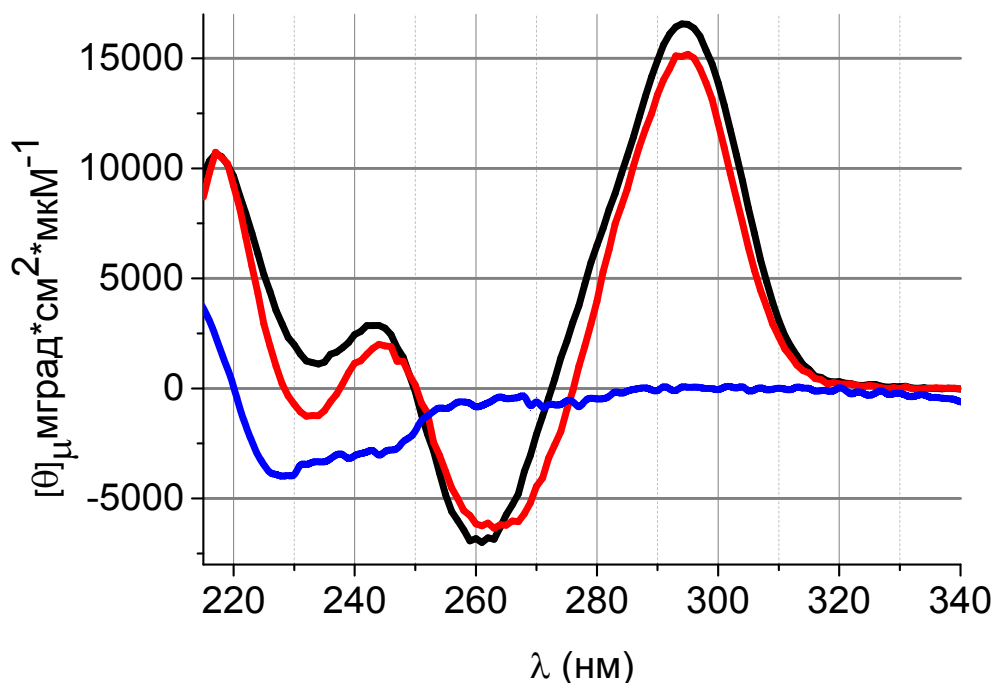


Рисунок 18. Спектры кругового дихроизма 3 мкМ биотинилированного аптамера (черная кривая), 3 мкМ ократоксина А (синяя кривая) и их комплекса (красная кривая)

В работе Yang и соавт. [272] было предположено, что связывание с ОТА сопровождается сильными перестройками и именно оно приводит к образованию аптамером №1 G-квадруплексной структуры. Исследование проводилось в 10 мМ фосфатном буфере, pH 8.5, содержащим 20 мМ ионов магния и 150 мМ ионов калия. Однако в наших экспериментах эти данные не подтвердились. Аптамер образует G-квадруплекс независимо от наличия ОТА. Что касается структурных перестроек, на рис. 18 виден пик КД ОТА в диапазоне от 220 до 250 нм. Наложение спектров ОТА и аптамера затрудняет анализ КД спектра комплекса. Также выяснилось, на КД спектр аптамера влияет присутствие органического растворителя. В частности, добавление ацетонитрила к аптамеру изменяет амплитуды всех характерных экстремумов квадруплекса. Органический растворитель попадает в пробу вместе с ОТА, так как ОТА мало растворим в воде и его стандарты готовятся в органических растворителях (смесь бензол-уксусная кислота 99:1 (ГСО 7941-2001) либо ацетонитрил (СОП 0015-97)).

Все это затрудняет характеристику комплекса ОТА–аптамер методом КД спектроскопии и не позволяет, ограничиваясь этим методом, достоверно оценить перестройки третичной структуры аптамера, происходящие в ходе связывания с ОТА.

3.2 Определение константы взаимодействия аптамер-ОТА

3.2.1 Определение константы взаимодействия методом анизотропии флуоресценции

Следующим этапом работы было определение равновесной константы диссоциации комплекса между выбранным аптамером №1, показавшим наилучшее связывание, и ОТА. Характеристика проводилась методами регистрации анизотропии флуоресценции и равновесного диализа. ОТА и аптамер №1 взаимодействуют в соотношении один к одному [258], поэтому реакция подчиняется общим принципам, приведенным в разделе 1.2.2.

Конкурентный подход, аналогичный описанному Friquet и соавт. [277] для иммуноферментного анализа, широко применяется для определения констант взаимодействия [278, 279]. Он основан на конкуренции между нативным лигандом, находящимся в растворе, и его производным, конъюгированным с носителем и иммобилизованным на подложке, за связывание с антителами, находящимися в растворе. Для корректного определения констант в ИФА Friquet и соавт. предложили специальный протокол, учитывающий иммобилизацию реагентов.

Однако для определения констант связывания аптамеров конкурентная схема с меченым лигандом и детектированием анизотропии флуоресценции распространения не получила. Единственная работа, в которой она рассматривалась, была опубликована Wang и соавт. [216] и описывала свойства аптамеров, специфичных к аминогликозидным антибиотикам. Однако разработка Wang и соавт. нуждается в дальнейшем методическом усовершенствовании. Авторы не рассматривали изменения собственной флуоресценции метки в ходе комплексообразования и связанные с этим погрешности измерений. Выбор концентраций реагентов для проведения экспериментов не был аргументирован. Оба этих вопроса были нами подробно рассмотрены при составлении алгоритма экспериментального определения константы диссоциации методом АФ.

Предлагаемый алгоритм основан на последовательности из двух блоков экспериментов:

- 1) определение K_{D1} – константы диссоциации комплекса между аптамером и лигандом, меченным производным флуоресцеина (L^*), K_{D1} находится на основании изменения АФ при взаимодействии L^* с аптамером. Протокол предусматривает получение нескольких зависимостей АФ от концентрации аптамера при разных концентрациях L^* .

- 2) определение K_{D2} – константы диссоциации комплекса аптамера и нативного немеченого лиганда (L). Для нахождения K_{D2} регистрируется АФ в системе с конкуренцией между L^* (фиксированная концентрация) и L (варьируемая концентрация) за связывание с аптамером. Проводится несколько конкурентных экспериментов при разных концентрациях аптамера.

Также мы рассмотрели влияние изменения флуоресценции на экспериментальные результаты измерения АФ, ввели статистический критерий оценки полученных результатов и оптимизировали концентрации реагентов (для этого был получен ряд зависимостей при разных фиксированных концентрациях меченого лиганда или аптамера). Предложенный алгоритм можно представить в виде следующей блок-схемы – рис. 19.

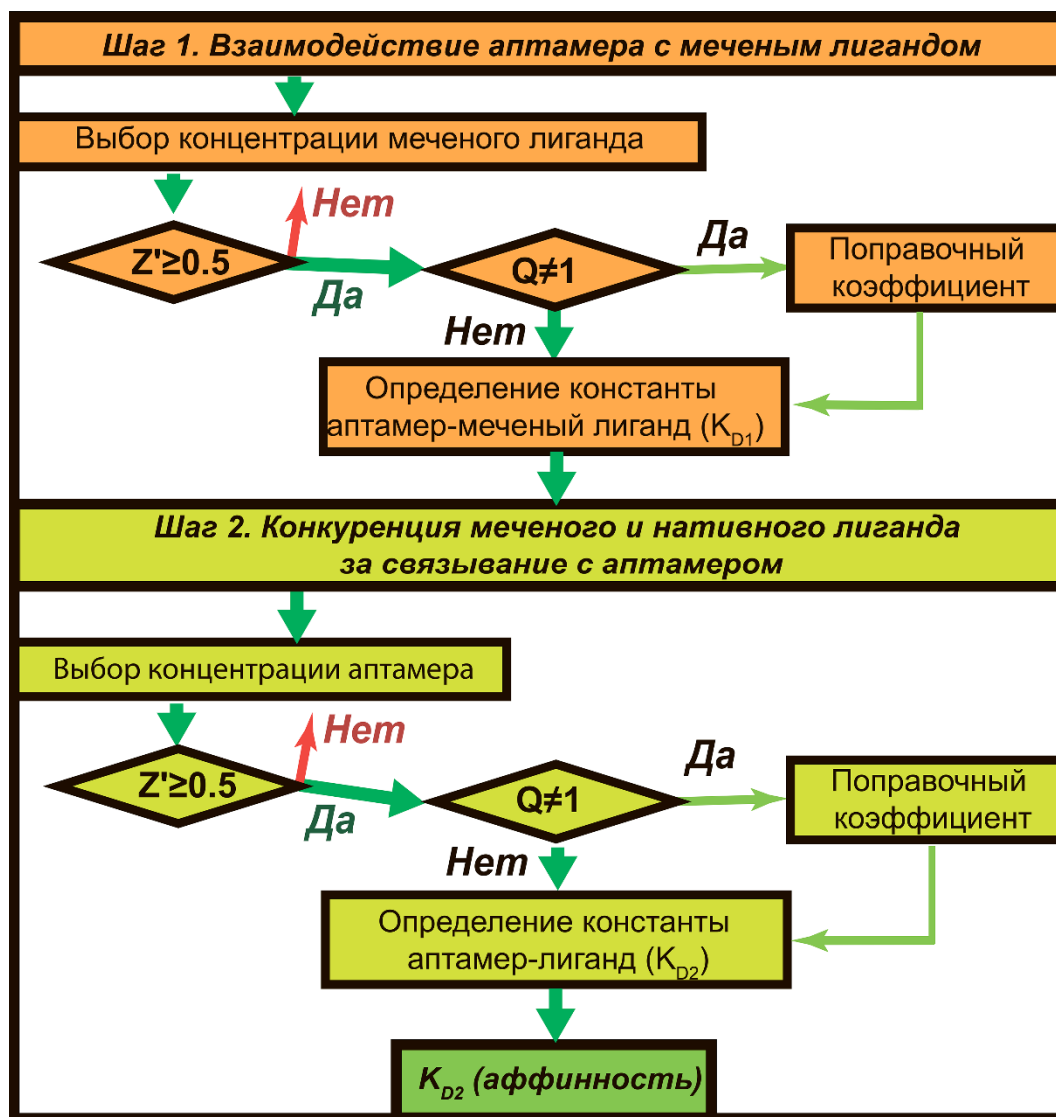


Рисунок 19. Блок-схема предложенного алгоритма определения константы взаимодействия аптамер-лиганд по конкурентной схеме с измерением АФ

3.2.1.1 Изучение влияния образования комплекса с аптамером на флуоресценцию флуоресцеина, ковалентно связанного с охратоксином А

Перед тем как измерить константу связывания аптамера с охратоксином А, нами были охарактеризованы флуоресцентные свойства выбранного меченого производного –

ОТА-ФЛУ. Из теории (см. раздел 1.2.2.1) следует, что изменение флуоресценции метки (т.е. флуоресцеина, ковалентно связанного с охратоксином А) при образовании комплекса с аптамером будет влиять на регистрируемую величину анизотропии флуоресценции. Чтобы определить корректное значение АФ, долю концентрации связанного меченого лиганда и действительную константу связывания, данный эффект должен быть учтен.

Вначале были получены флуоресцентные спектры в диапазоне длин волн испускания (λ_{em}) от 500 до 650 нм для аптамера, ОТА-ФЛУ и их комплекса. Как видно из рис. 20, связывание ОТА-ФЛУ с аптамером (который сам по себе не флуоресцирует) оказывает влияние на интенсивность флуоресценции метки. При выбранном соотношении аптамер – ОТА-ФЛУ интенсивность максимума флуоресценции возрастает на 28% и не сопровождается спектральным сдвигом.

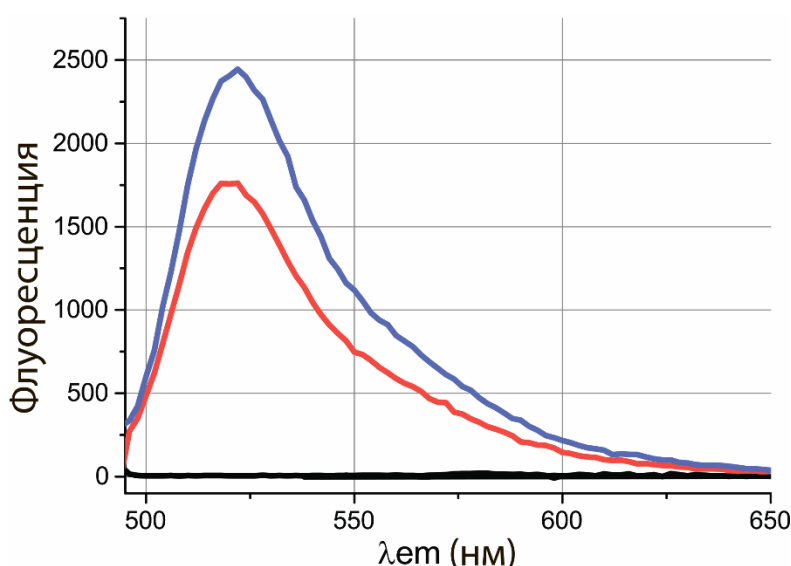


Рисунок 20. Спектр флуоресценции 1 мкМ аптамера (черная линия), 3,5 нМ ОТА-ФЛУ (красная линия) и их комплекса (синяя линия) при длине волны возбуждающего света 485 нм

Для подтверждения полученного эффекта сравнивали флуоресценцию ОТА в свободном состоянии и в комплексе с аптамером на основании матриц экстинкции-эмиссии – представлении спектров флуоресценции при разных длинах волн эмиссии и экстинкции в виде трехмерной поверхности [280, 281]. Из полученных МЭЭ для ОТА-ФЛУ и его комплекса (рис. 21) видно, что интенсивность максимума флуоресценции флуоресцеина в связанном состоянии больше, чем в свободном. Этот результат подтверждает, что связывание ОТА-ФЛУ с аптамером влияет на интенсивность флуоресценции метки.

Поэтому при определении константы взаимодействия необходимо внести соответствующую поправку.

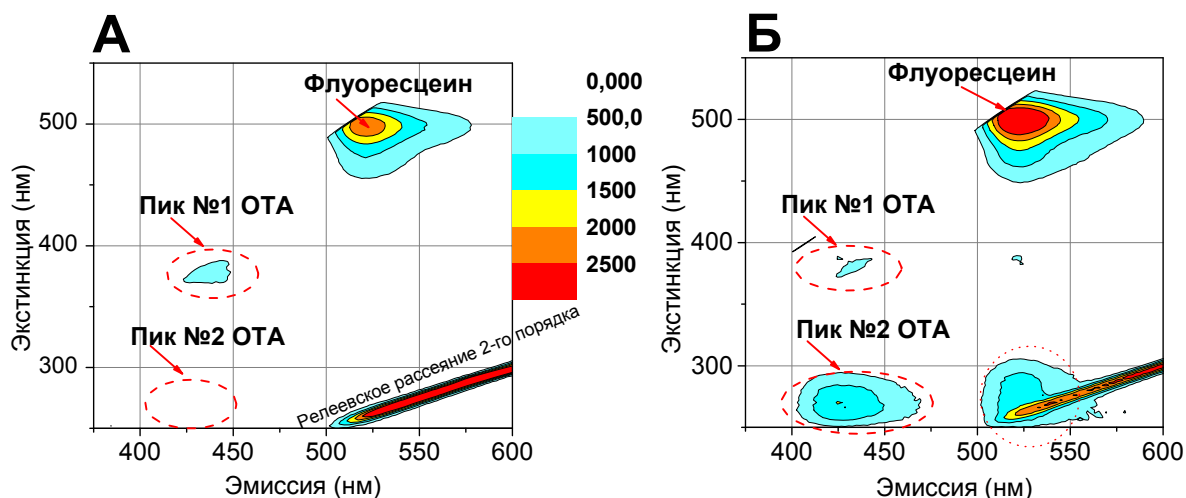


Рисунок 21. Матрицы экстинкции-эмиссии 6 нМ ОТА-ФЛУ (А) и 6 нМ ОТА-ФЛУ в присутствии 1000 нМ аптамера (Б)

Помимо флуоресценции метки, представленные матрицы охватывают также область экстинкции-эмиссии, характерной для охратоксина А, $\lambda_{ex}=375$ нм – основной пик флуоресценции (№1), $\lambda_{ex}=266$ нм – дополнительный пик флуоресценции ОТА (№2). Сравнение матрицы ОТА-ФЛУ и комплекса (рис. 21) показало, что связывание с аптамером также влияет на флуоресцентные свойства ОТА. Ранее подобный эффект был продемонстрирован для основного пика ОТА ($\lambda_{ex}=375$ нм) [274, 282]. Мы обнаружили, что связывание оказывает наибольший эффект на флуоресценцию в области минорного пика ОТА ($\lambda_{ex}=266$ нм и $\lambda_{em}=426$ нм), увеличивая её интенсивность. Данный эффект рассмотрен подробно в главе 3.3.

3.2.1.2 Определение константы диссоциации аптамер–ОТА-ФЛУ (K_{DI})

Было построено шесть зависимостей АФ и общей интенсивности флуоресценции ОТА-ФЛУ от концентрации аптамера (с использованием ряда концентраций ОТА-ФЛУ от 0,4 до 13,6 нМ).

Для более точного измерения K_{DI} точка 50%-ного связывания определялась посредством обработки массива экспериментальных данных с помощью четырехпараметрического сигмоидного фитинга зависимости АФ от концентрации аптамера в соответствии с уравнением:

$$r_i = r_f + \frac{r_b - r_f}{1 + (x/x_0)^p}, \quad (19)$$

где r_i – АФ i -той точки на кривой взаимодействия; x – концентрация аналитического реагента, расположенного на оси абсцисс в i -той точке (в данном случае рецептора – аптамера); r_b – АФ при бесконечно большой концентрации рецептора (верхняя асимптота); r_f – АФ при бесконечно малой концентрации рецептора (нижняя асимптота); x_0 – концентрация аналитического реагента в точке перегиба (в данном случае точка 50%-ного связывания); p – наклон кривой в точке перегиба.

В соответствии с ранее полученными МЭЭ, из рис. 22, можно сделать вывод о том, что связывание ОТА-ФЛУ с аптамером сопровождается возрастанием флуоресценции метки, $Q \neq 1$. Поэтому при определении K_{D1} взаимодействия аптамер-ОТА с помощью анизотропии флуоресценции использовался поправочный коэффициент Q [200, 206]. Полное связывание ОТА-ФЛУ аптамером приводит к повышению интенсивности флуоресценции от 1,5 до 2 раз, в зависимости от концентрации ОТА-ФЛУ. В соответствии с уравнением (14) для всех полученных зависимостей были установлены значения коэффициента Q . Также на основании уравнения (16) были рассчитаны значения Z' -фактора. Все полученные результаты суммированы в таблице 7.

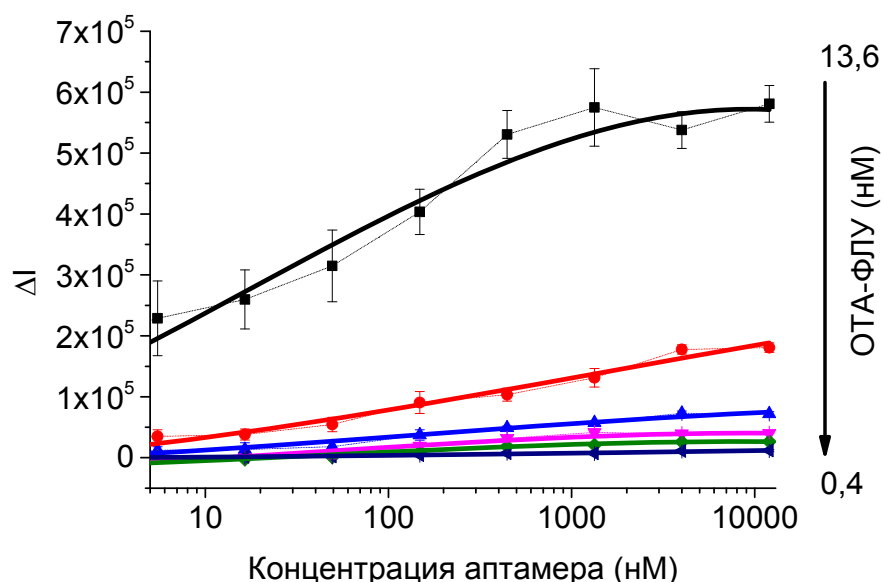
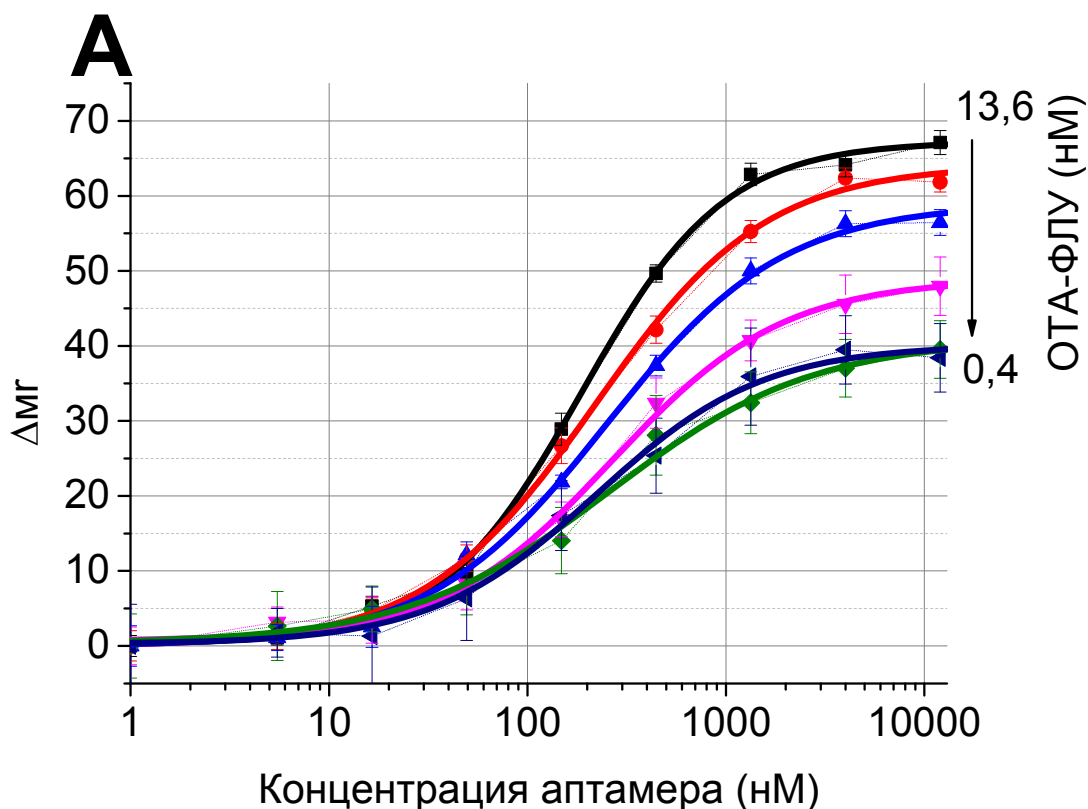


Рисунок 22. Зависимости разности общей флуоресценции ОТА-ФЛУ ($\Delta I = I_{bound} - I_{free}$) от концентрации аптамера

Таблица 7. Параметры взаимодействия аптамер–ОТА-ФЛУ

Концентрация ОТА-ФЛУ (нМ)	Q	Z'-фактор	Концентрация аптамера в точке 50%-ного связывания (нМ)
13,6	2,08	0,87	187±11
6,8	1,78	0,84	217±14
3,4	1,73	0,76	248±16
1,7	1,68	0,60	268±30
0,9	1,73	0,38	259±44
0,4	1,43	0,22	222±26

Чтобы учесть изменение флуоресценции метки в ходе комплексообразования, зависимости АФ от концентрации аптамера (рис. 23 (А)) были преобразованы, в соответствии с уравнением (15), в зависимости F_{bound} от концентрации аптамера (см. раздел 1.2.2.1). Полученные зависимости представлены на рис. 23 (Б, В). Аппроксимацией данных зависимостей были определены значения точки 50%-ного связывания для каждой кривой – см. таблицу 7.



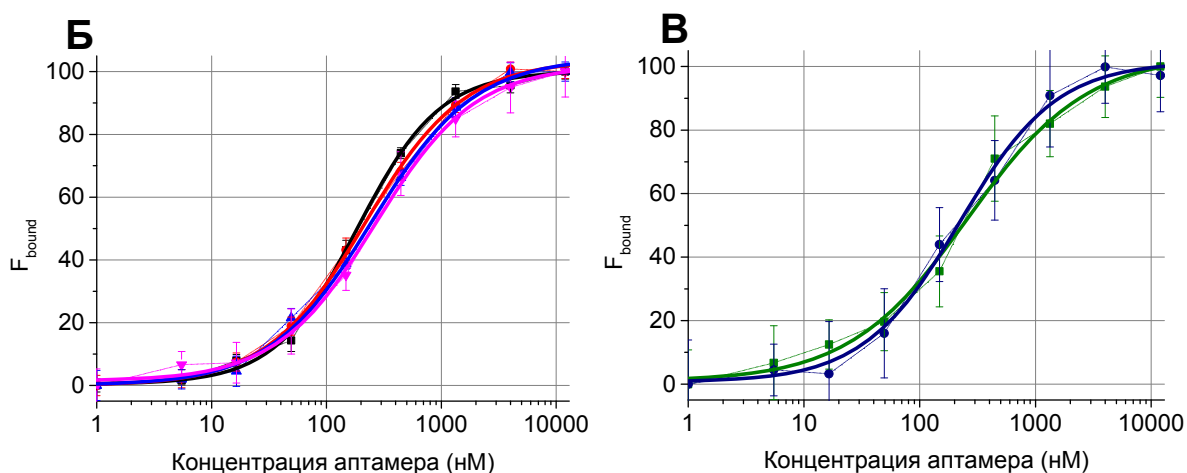


Рисунок 23. (А) Зависимости разности анизотропии ОТА-ФЛУ от концентрации аптамера для ряда концентраций ОТА-ФЛУ. (Б) Зависимости F_{bound} от концентрации аптамера при концентрации ОТА-ФЛУ – 13,6 нМ (черная кривая); 6,8 нМ (красная); 3,4 нМ (синяя); и 1,7 нМ (розовая). (В) Зависимости F_{bound} от концентрации аптамера при концентрации ОТА-ФЛУ, равной 0,9 нМ (зеленая кривая); и 0,4 нМ (фиолетовая). ($n = 4$)

Чтобы ошибки измерения не оказывали значительного влияния при определении константы связывания, Z' -фактор должен быть больше 0,5. Зависимости, не удовлетворяющие данному условию (при концентрациях ОТА-ФЛУ 0,9 и 0,4 нМ), представлены на рис. 23 (В). Полученные значения точки 50%-ного связывания для этих кривых были исключены из дальнейших расчетов. Из оставшихся четырех кривых связывания (рис. 23 (Б)), зависимость, полученная при 13,6 нМ ОТА-ФЛУ, была также исключена, т.к. её значение Q и точки 50%-ного связывания сильно отличались от величин, полученных для трех оставшихся кривых.

Отметим, что в соответствии с разделом 1.2.2, все концентрации ОТА-ФЛУ, использованные в эксперименте, удовлетворяют условию $[L^*] \ll [R]$. Следовательно, в соответствии с уравнениями (10) и (13), концентрация $[L^*]_T$ не оказывает влияния на константу диссоциации, и константа диссоциации соответствует точке 50%-ного связывания. Данные рис. 23 и табл. 7 подтверждают эту закономерность. Зависимости, полученные при разных концентрациях $[L^*]_T$, соответствуют друг другу в пределах ошибки. На основании этого становится возможным усреднение результатов для разных концентраций $[L^*]_T$.

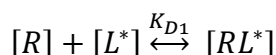
Для определения K_{D1} было проведено усреднение оставшихся трех значений точки 50%-ного связывания, полученных при концентрациях ОТА-ФЛУ 1,7; 3,4 и 6,8 нМ. Установленная величина K_{D1} равна 245 ± 33 нМ.

Данный эксперимент позволяет также выбрать концентрацию ФЛУ-ОТА для проведения конкурентного взаимодействия, основываясь на значениях Z' -фактора, рассчитанных для разных концентраций (см. раздел 1.2.2.2). Определив значения Z' -фактора, мы можем найти минимальную концентрацию флуорофора, удовлетворяющую условию $Z' \geq 0,5$, и отсеять недостоверные результаты с плохой воспроизводимостью. Для проведения дальнейших экспериментов была выбрана концентрация ОТА-ФЛУ, равная 3 нМ.

3.2.1.3 Анализ уравнения для определения константы диссоциации рецептор-немеченый лиганд (K_{D2}) в случае конкурентного взаимодействия

С учетом анализа, проведенного в работе [283], была рассмотрена процедура определения K_{D2} применительно к особенностям предложенной нами последовательности экспериментов. Для нахождения константы лиганд-рецепторного взаимодействия с помощью конкурентного анализа, рассмотрим два состояния, в которых может находиться система – при 50%-ной конкуренции и в отсутствии конкуренции. Соответственно, вывод уравнения для определения K_{D2} разбит на три основных шага:

Шаг №1. Рассмотрим условия, при которых взаимодействие между меченым лигандом ($[L^*]$) и рецептором ($[R]$) происходит в отсутствии конкурента $[L]$. В данных условиях взаимодействие будет описываться так же, как неконкурентное взаимодействие, рассмотренное в разделе 1.2.2.1, согласно уравнению (9):



Исходная концентрация рецептора $[R]_T$ и концентрация рецептора $[R]$ определяются как:

$$[R]_T = [R] + [RL^*], (20)$$

$$[R] = \frac{K_{D1}[RL^*]}{[L^*]}. (21)$$

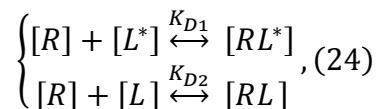
Подставляя уравнение (21) в уравнение (20), получим:

$$[R]_T = \frac{K_{D1}[RL^*]}{[L^*]} + [RL^*] = [RL^*] \left(\frac{K_{D1}}{[L^*]} + 1 \right), (22)$$

Проведя дальнейшие преобразования уравнения (22), получим зависимость концентрации комплекса рецептор-меченый лиганд ($[RL^*]$) от константы диссоциации (K_{D1}) при условии отсутствия конкурента:

$$[RL^*] = [R]_T / \left(\frac{K_{D1}}{[L^*]} + 1 \right). (23)$$

Шаг №2. Теперь рассмотрим условия конкурентного взаимодействия меченого лиганда ($[L^*]$) и немеченого лиганда ($[L]$) с рецептором ($[R]$). Взаимодействия в системе описываются следующей схемой:



где $[R]$ – равновесная концентрация аптамера; $[L]$ – равновесная концентрация лиганда; $[RL]$ – равновесная концентрация комплекса аптамер-лиганд; $[L^*]$ – равновесная концентрация меченого лиганда, $[RL^*]$ – равновесная концентрация комплекса аптамер-меченый лиганд.

Соответственно, исходная концентрация рецептора $[R]_T$ и концентрация рецептора $[R]$ зависят от концентрации комплекса лиганд-рецептор следующим образом:

$$[R]_T = [R] + [RL^*] + [RL], (25)$$

$$[R] = \frac{K_{D2}[RL]}{[L]}. (26)$$

Подставляя уравнения (21) и (26) в уравнение (25), получим:

$$[R]_T = \frac{K_{D1}[RL^*]}{[L^*]} + \frac{K_{D1}[RL^*][L]}{[L^*]K_{D2}} + [RL^*]. (27)$$

Проведем дальнейшее преобразование уравнения (27):

$$[R]_T = [RL^*] \left(\frac{K_{D1}}{[L^*]} + \frac{K_{D1}[L]}{[L^*]K_{D2}} + 1 \right) = [RL^*] \left(1 + \frac{K_{D1}}{[L^*]} \left(\frac{[L]}{K_{D2}} + 1 \right) \right). (28)$$

Преобразовав уравнение (28) относительно $[RL^*]$, получим следующую зависимость:

$$[RL^*] = \frac{[R]_T}{\left(1 + \frac{K_{D1}}{[L^*]} \left(\frac{[L]}{K_{D2}} + 1 \right) \right)}. (29)$$

(индекс Т, как и в предыдущем разделе, относится к исходным концентрациям реагентов).

Уравнение (29) связывает концентрацию комплекса рецептор-меченый лиганд ($[RL^*]$) с константами диссоциации (K_{D1} , K_{D2}) в условиях конкуренции меченого ($[L^*]$) и немеченого лиганда ($[L]$) за связывание с рецептором ($[R]$).

Шаг №3. Выразим K_{D2} , используя уравнения (23) и (29). Рассмотрим измерение анизотропии флуоресценции в двух случаях – при использовании одинаковых концентраций меченого лиганда и одинаковых концентраций рецептора:

- первый случай: в отсутствии конкурента ($[L]$);
- второй случай: в присутствии концентрации конкурента, приводящей к 50%-ому уменьшению концентрации комплекса рецептор-меченый лиганд $[RL^*]$.

В первом случае концентрация $[RL^*]$ описывается следующим уравнением (см. шаг №1):

$$[RL^*] = [RL^*]_0 = [R]_T / \left(\frac{K_{D1}}{[L^*]_0} + 1 \right)$$

где индекс 0 обозначает отсутствие конкурента в системе, концентрация комплекса $[RL^*]$ максимальна (условия 0% конкуренции).

Для второго случая концентрация $[RL^*]$ описывается уравнением (см. шаг №2):

$$[RL^*] = [RL^*]_{50} = [R]_T / \left(1 + \frac{K_{D1}}{[L^*]_{50}} \left(\frac{[L]_{50}}{K_{D2}} + 1 \right) \right)$$

где индекс 50 обозначает наличие конкурента в системе в концентрации, приводящей к снижению концентрации комплекса $[RL^*]$ на 50% (условия 50%-ой конкуренции).

Отсюда будет верно следующее равенство,

$$[RL^*]_{50} = \frac{1}{2} * [RL^*]_0. (30)$$

Подставив в уравнение (30) уравнения (23) и (29), получим:

$$[R]_T / \left(1 + \frac{K_{D1}}{[L^*]_{50}} \left(\frac{[L]_{50}}{K_{D2}} + 1 \right) \right) = \frac{1}{2} * [R]_T / \left(\frac{K_{D1}}{[L^*]_0} + 1 \right). (31)$$

Проведем дальнейшие преобразования уравнения (31):

$$[R]_T \left(\frac{K_{D1}}{[L^*]} + 1 \right) = \frac{1}{2} * [R]_T \left(1 + \frac{K_{D1}}{[L^*]_{50}} \left(\frac{[L]_{50}}{K_{D2}} + 1 \right) \right), (232)$$

$$(C4) \frac{[L^*]_{50}}{K_{D1}} + 2 * \frac{[L^*]_{50}}{[L^*]_0} - 1 = \frac{[L]_{50}}{K_{D2}}, (33)$$

$$(C5) K_{D2} = \frac{[L]_{50}}{\frac{[L^*]_{50}}{K_{D1}} + 2 * \frac{[L^*]_{50}}{[L^*]_0} - 1}. (34)$$

Концентрация меченого лиганда в ПФ/АФ эксперименте обычно намного ниже, чем концентрация рецептора ($[L^*] \ll [R]$). Преобразуем уравнение (34) таким образом, чтобы K_{D2} была менее зависима от концентрации меченого лиганда и погрешности, связанной с точностью её определения. Для этого выразим $[L^*]_0$ через концентрацию рецептора $[R]_0$:

$$(C6) K_{D2} = \frac{[L]_{50}}{\frac{[L^*]_{50}}{K_{D1}} + \frac{2 * ([L^*]_{50} - [L^*]_0)}{[L^*]_0} + 1}. (35)$$

Так как $[L^*] = [L^*]_T - [RL^*]$, получим:

$$(C7) K_{D2} = \frac{[L]_{50}}{\frac{[L^*]_{50}}{K_{D1}} + \frac{2 * (([L^*]_T - [RL^*]_{50}) - ([L^*]_T - [RL^*]_0))}{[L^*]_0} + 1}, (36)$$

$$(C8) K_{D2} = \frac{[L]_{50}}{\frac{[L^*]_{50}}{K_{D1}} + \frac{2 * ([RL^*]_0 - [RL^*]_{50})}{[L^*]_0} + 1}, (37)$$

$$(C9) K_{D2} = \frac{[L]_{50}}{\frac{[L^*]_{50}}{K_{D1}} + \frac{2 * ([RL^*]_0 - \frac{1}{2} * [RL^*]_0)}{[L^*]_0} + 1}, (38)$$

$$(C10) K_{D2} = \frac{[L]_{50}}{\frac{[L^*]_{50}}{K_{D1}} + \frac{[RL^*]_0}{[L^*]_0} + 1}. (39)$$

В соответствии с уравнением (21) будет верно:

$$\frac{1}{[L^*]_0} = \frac{[R]_0}{[RL^*]_0 K_{D1}} (40)$$

Таким образом, получаем окончательный вид уравнения для определения K_{D2} в случае конкурентного взаимодействия:

$$K_{D2} = \frac{[L]_{50}}{\frac{[L^*]_{50}}{K_{D1}} + \frac{[R]_0}{K_{D1}} + 1} \text{ или } K_{D2} = \frac{K_{D1}[L]_{50}}{[L^*]_{50} + [R]_0 + K_{D1}}, (41)$$

где $[L]_{50}$ – равновесная концентрация немеченого лиганда, которая вызывает 50%-е вытеснение меченого лиганда из комплекса с аптамером в ходе конкуренции; $[R]_0$ – равновесная концентрация аптамера в отсутствие конкурента; $[L^*]_{50}$ – равновесная концентрация меченого лиганда при 50%-ной конкуренции.

Для определения K_{D2} подставим в уравнение (41) концентрацию аптамера в отсутствие конкурента и концентрацию меченого и немеченого лиганда при 50%-ной конкуренции.

Равновесная концентрация аптамера в отсутствие конкурента (нативный лиганд) определяется по уравнению [283]:

$$[R]_0^2 + [R]_0(K_{D1} + [L^*]_t) - [R]_t = 0. (42)$$

Концентрация меченого лиганда при 50%-ной конкуренции ($[L^*]_{50}$) определяется как:

$$[L^*]_{50} = [L^*]_t - [RL^*]_{50} = [L^*]_t - \frac{[RL^*]_0}{2}. (43)$$

$[L]_{50}$ определяется экспериментально и соответствует точке IC50 на конкурентной кривой.

3.2.1.4 Определение константы диссоциации аптамер-ОТА (K_{D2})

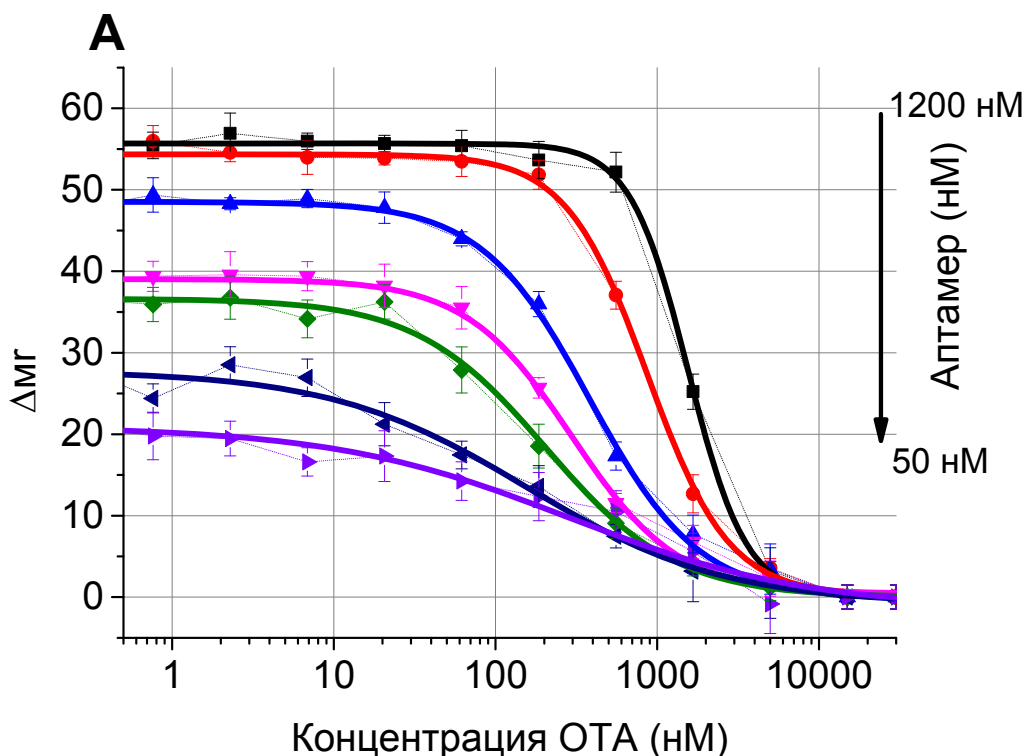
Определив K_{D1} , перешли к измерению константы взаимодействия аптамер – немеченый лиганд (K_{D2}) с использованием системы, состоящей из аптамера, меченого и

немеченого лиганда. При проведении конкурентных экспериментов концентрация аптамера и ОТА-ФЛУ были постоянными, а концентрация ОТА варьировалась. Используемая продолжительность инкубации (5 мин) обеспечивала достижение химического равновесия.

Для определения константы диссоциации получили семь конкурентных зависимостей АФ от концентрации ОТА при разных концентрациях аптамера от 1200 до 50 нМ (рис. 20 (А)). Как и в предыдущем эксперименте, ввели поправочный коэффициент на изменение флуоресценции метки в ходе связывания. В данной серии экспериментов для всех выбранных концентраций аптамера значения Q-фактора лежали в диапазоне от 1,2 до 1,3, за исключением наименьших концентраций 75 и 50 нМ, для которых $Q \approx 1$.

При рассмотрении конкурентного взаимодействия применялся такой же порядок действий, как и в предыдущем пункте. Чтобы учесть влияние изменения флуоресценции, строили зависимость F_{bound} от концентрации немеченого лиганда и определяли точку 50%-ного снижения связывания меченого лиганда.

В соответствии с уравнением (15), все зависимости, приведенные на рис. 20 (А), были перестроены в координатах F_{bound} от концентрации аптамера, рис. 24 (В, С). Концентрация ОТА, соответствующая 50%-ной конкуренции, определена аппроксимацией зависимостей, представленных на рис. 20 (В).



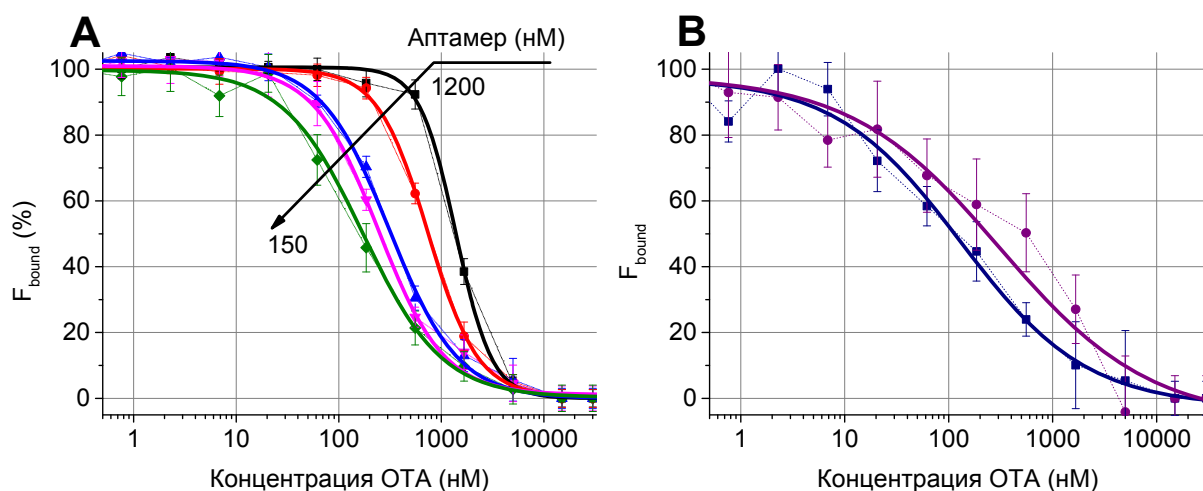


Рисунок 24. (А) Конкурентные зависимости АФ ОТА-ФЛУ от концентрации ОТА при разных концентрациях аптамера. (Б) Конкурентные зависимости F_{bound} от концентрации ОТА при концентрации аптамера, равной 1200 нМ (черная кривая); 600 нМ (красная); 300 нМ (синяя); 200 нМ (розовая) и 150 нМ (зеленая). (В) Конкурентные зависимости F_{bound} от концентрации ОТА при 75 нМ (темно-синий) и 50 нМ (фиолетовый) аптамера. ($n = 4$)

Для каждой концентрации аптамера рассчитали предполагаемую константу связывания по уравнению (41). Все результаты, включая значения Z' -фактора, представлены в таблице 8.

Таблица 8. Параметры конкурентного взаимодействия ОТА-ФЛУ и ОТА с аптамером.

Аптамер (нМ)	Концентрация ОТА в точке 50%-ой конкуренции (нМ)	Предполагаемая K_D аптамер-ОТА (нМ)	Z' -фактор
1200	1383±42	61±4	0,8
600	741±32	80±16	0,83
300	312±18	47±11	0,76
200	244±12	63±10	0,70
150	172±20	67±15	0,62
75	131±33	49±28	0,47
50	311±115	234±110	0,38

На основании полученных значений Z' -фактора, при определении итоговой K_{D2} исключили кривые, полученные при концентрациях аптамера 50 и 75 нМ. Константа

определена усреднением предполагаемых констант связывания для оставшихся пяти концентраций аптамера: 1200, 600, 300, 200 и 150 нМ. Она составила 63 ± 18 нМ.

3.2.2. Подтверждение константы связывания методом равновесного диализа

Для подтверждения K_D , полученной методом анизотропии флуоресценции, в качестве референсного метода выбрали равновесный диализ (РД) как стандартный метод характеристики лиганд-рецепторных взаимодействий. Для корректного сравнения констант РД провели в тех же условиях, что и измерение АФ. Долю связанного ОТА определяли по его собственной флуоресценции (возбуждение – 375 нм, эмиссия – 430 нм).

При обработке данных РД учитывали изменение флуоресценции ОТА, связанное с его переходом из свободного в связанное состояние. Доля связанного ОТА (F_{bound}) рассчитывалась по уравнению:

$$F_{bound} = \frac{Fl - Fr}{Fl} * 100, \quad (44)$$

где Fl и Fr – интенсивности флуоресценции ОТА в загрузочной и приемной камере диализатора, соответственно.

Константа диссоциации (K_D) определялась по уравнению:

$$K_D = \frac{[R]_T}{F_{bound}} - [R]_T, \quad (45)$$

где $[R]_T$ – исходная концентрация аптамера.

Чтобы учесть изменение флуоресценции ОТА при образовании комплекса, была рассмотрена зависимость суммы флуоресценции в двух камерах микродиализатора от концентрации аптамера. Как видно из рис. 25, по мере увеличения концентрации аптамера и образования его комплекса с ОТА наблюдается снижение суммарной флуоресценции ОТА. При полном переходе ОТА из свободного состояния в связанное его флуоресценция снижается почти в 1,6 раз. Тушению подвергается только флуоресценция ОТА в загрузочной камере (Fl), так как, в отличие от ОТА, аптамер не может пройти сквозь мембрану в приемную камеру.

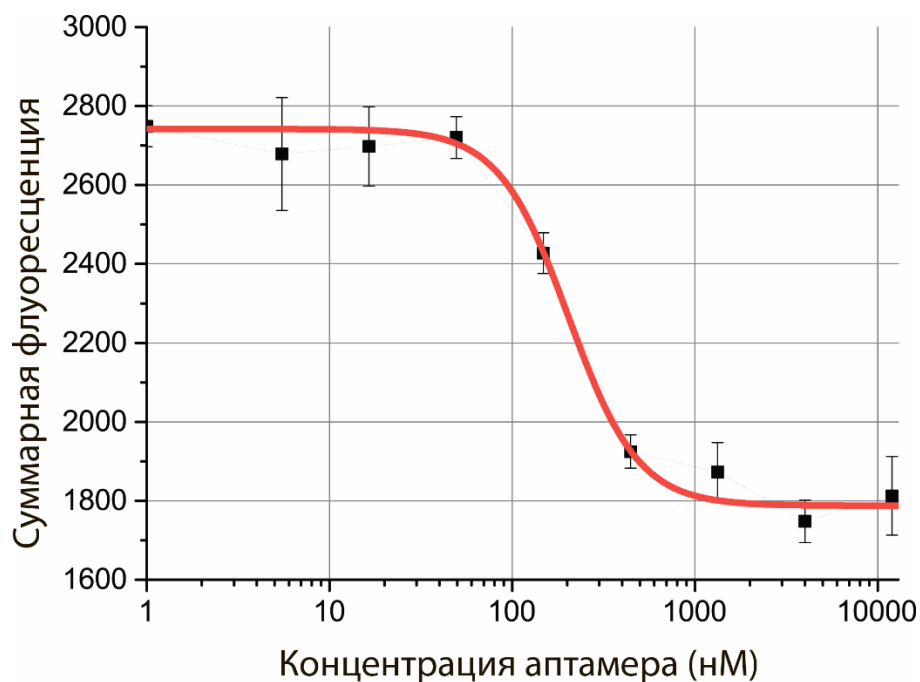


Рисунок 25. Зависимость суммарной флуоресценции ОТА ($F_l + F_r$), регистрируемой после равновесного диализа, от концентрации аптамера

Чтобы вычислить, насколько падает интенсивность флуоресценции в загрузочной камере диализатора, была определена суммарная флуоресценция ОТА (F_{total}) при нулевой концентрации аптамера, когда тушение флуоресценции отсутствует. Флуоресценцию, потерянную в ходе тушения, в i -той точке можно определить как:

$$F_i = F_{total}^0 - F_{total}^i, \quad (46)$$

где F_{total}^i – суммарная флуоресценция в i -той точке, F_{total}^0 – суммарная флуоресценция ОТА при нулевой концентрации аптамера, F_i – потеря флуоресценции в i -той из-за тушения.

Добавление F_i к F_l в каждой точке корректирует значения флуоресценции в загрузочной камере. Полученные значения могут наблюдаться экспериментально в отсутствии тушения. Подстановка скорректированного значения F_l в уравнение (44) позволяет вычислить действительные значения F_{bound} .

Используя скорректированную зависимость F_{bound} от концентрации аптамера, определили K_D по уравнению (13) как точку 50%-ного связывания аптамера. Согласно приведенным на рис. 26 данным, K_D равняется 80 ± 9 нМ.

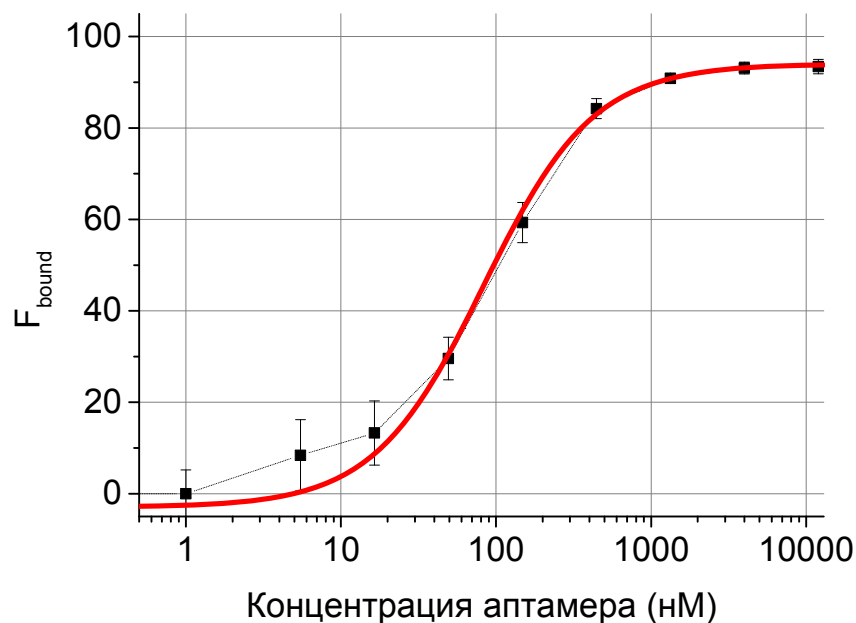


Рисунок 26. Скорректированная зависимость доли связанного ОТА от концентрации аптамера. ($n = 4$)

Разница между константами, полученными регистрацией анизотропии флуоресценции (63 ± 18 нМ) и равновесным диализом (80 ± 9 нМ), находится в пределах ошибки. Таким образом, метод равновесного диализа подтверждает значение константы диссоциации, полученное методом регистрации АФ.

Установлены значения констант не противоречат литературным данным. Опубликованные константы для этой пары лежат в диапазоне от 50 до 300 нМ, что может быть связано как с различием условий взаимодействия (в частности, солевого состава буфера), так и с особенностями использованных методов. Так, K_D для АФ метода с регистрацией собственной поляризации флуоресценции ОТА лежит в диапазоне от 55 [120] до 125 нМ [119]. Для константы, полученной методом равновесного диализа, соответствующий диапазон несколько шире – от 49 [258] до 280 нМ [119].

* * *

В данном разделе предложен алгоритм применения регистрации АФ для характеристики аптамер-лигандного взаимодействия и на примере ОТА рассмотрено его использование. Описанный алгоритм обеспечивает исключение плохо воспроизводимых результатов и устанавливает критерии выбора концентраций используемых реагентов. Константа, полученная по предложенному алгоритму, подтверждена стандартным методом – равновесным диализом.

3.3. Характеристика взаимодействия аптамер-охратоксин А по изменению собственной флуоресценции охратоксина А

3.3.1 Анализ матриц экстинкции-эмиссии ОТА в свободном состоянии и в комплексе с аптамером

Отмеченное выше влияние комплексообразования с аптамером на собственную флуоресценцию ОТА позволяет использовать данный параметр как средство характеристики взаимодействия ОТА-аптамер. Преимущество этого параметра – возможность регистрации комплексообразования без введения дополнительной метки. При этом для обеспечения достоверности результатов собственная флуоресценция ОТА должна претерпевать существенные изменения при образовании комплекса с аптамером.

В разделе 3.2.1 было показано, что включение конъюгата ОТА-ФЛУ в состав комплекса с аптамером индуцирует изменение его оптических свойств как в области флуоресценции флуоресцеиновой метки, так и в области флуоресценции ОТА. На основании этого было выдвинуто предположение, что спектр флуоресценции будет изменяться и при взаимодействии с аптамером немодифицированного ОТА.

Были получены МЭЭ аптамера, ОТА и комплекса ОТА-аптамер в ТБ. Для выявления возможных дополнительных пиков флуоресценции ОТА МЭЭ регистрировали в широком диапазоне длин волн экстинкции и эмиссии (см. рис 27 (А и Б)). Основываясь на проведенной ранее количественной характеристике образования комплекса аптамер-ОТА (раздел 3.2.1.4), выбрали концентрацию аптамера, равную 1000 нМ, при которой более чем 90% молекул ОТА переходит в связанное состояние. Рассмотрение комплексообразования в этих условиях позволяет зарегистрировать отличия флуоресценции свободного и связанного ОТА.

На МЭЭ ОТА (рис. 27 (А)) наблюдается два пика флуоресценции. Первый пик соответствует $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 376/432$ нм. Наблюдаемая флуоресценция при $\lambda_{ex} = 376$ нм характерна для депротонированной формы ОТА (дианиона), преобладающей в выбранных условиях – при $pH = 8,5$ [239, 284, 285]. Этот пик соответствует общепринятой флуоресценции ОТА и активно применяется для его идентификации [119, 120, 286, 287]; далее он будет обозначаться как пик флуоресценции ОТА №1. Второй пик, представленный на МЭЭ, соответствует $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 262/432$ нм. Обозначим его как пик №2. Из рис. 23 (В) видно, что интенсивность пика №2 на 45% меньше, чем пика №1.

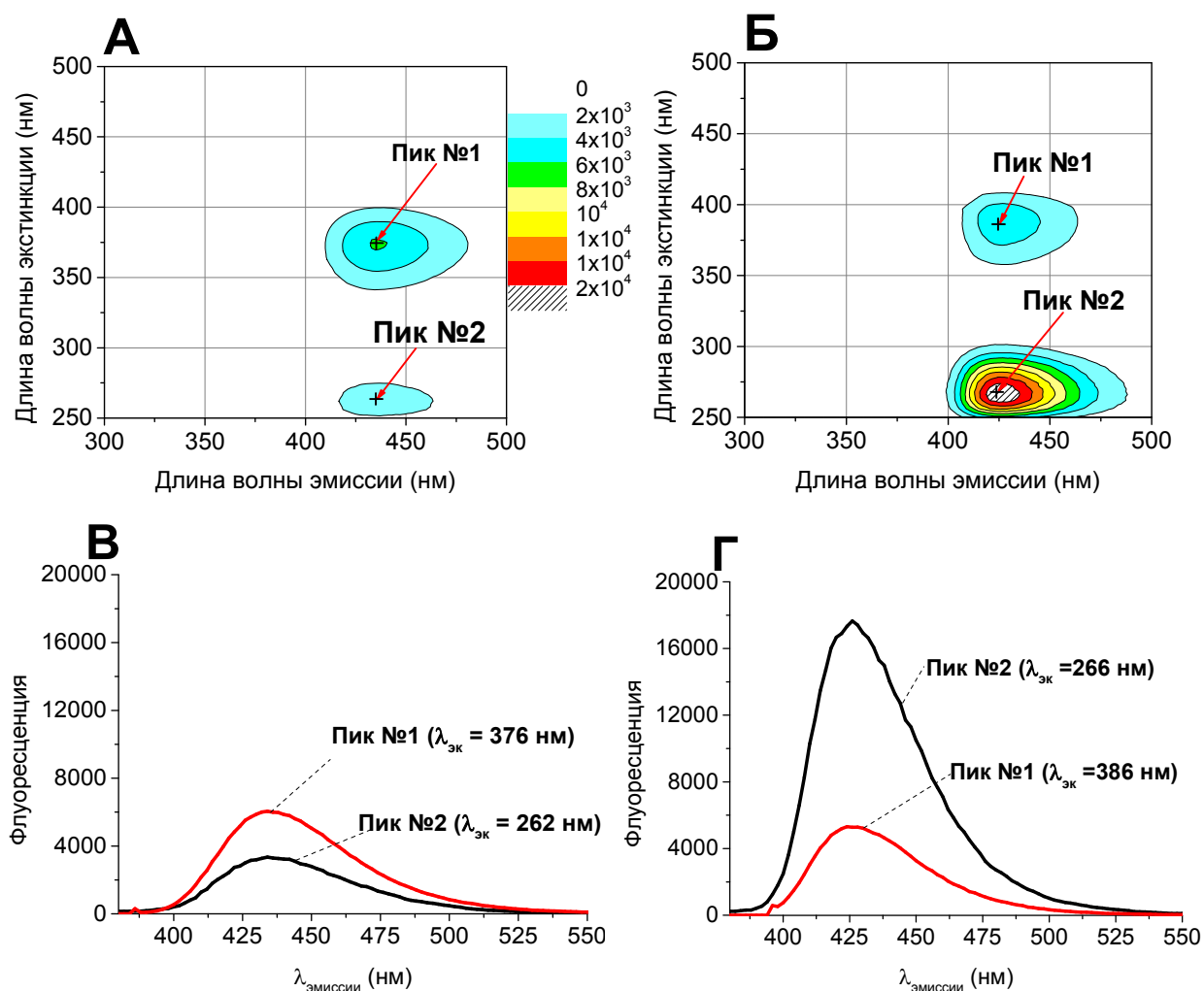


Рисунок 27. Матрицы экстинкции-эмиссии 240 нМ ОТА (А) и 240 нМ ОТА в присутствии 1000 нМ аптамера (Б). (В) Спектры флуоресценции при λ_{ex} 376 и 262 нм, извлеченные из матрицы на рис. (А) и соответствующие пикам №1 и №2. (Г) Спектры флуоресценции при λ_{ex} 386 и 266 нм, извлеченные из матрицы на рис. (Б) и соответствующие пикам №1 и №2

На рис. 27 (Б) представлена МЭЭ комплекса ОТА с аптамером. Матрица отражает смещение пика №1 к $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 386/424$ нм, а пика №2 – к $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 266/424$ нм. Из сравнения рис. 27 (Б и Г) видно, что добавление аптамера вызывает значительное увеличение пика №2. Он стал превосходить пик №1 по интенсивности в 3,3 раза. Сравнение двумерных спектров, извлеченных из МЭЭ (рис. 27 (В и Г)), показывает, что в данных условиях при переходе от свободного к связанному состоянию ОТА пик №1 снижается на 13%. Снижение амплитуды пика №1, сопровождающееся небольшим сдвигом его положения вследствие перехода ОТА в комплекс с аптамером, было описано в ряде работ [274, 282] и подтверждается нашими экспериментами.

Более интересным представляется ранее неизвестный рост пика №2, который увеличивается в 5,3 раза при переходе ОТА из свободного состояния в комплекс.

Квантовый выход флуоресценции ОТА в водных растворах по литературным данным [240] составляет 0,39 (для моноаниона) и 0,49 (для дианиона), что не оставляет резерва для такого роста. Чтобы понять, откуда берётся энергия для 5-кратного увеличения флуоресценции, спектр флуоресценции аптамера был рассмотрен более подробно.

Использованный в работе аптамер образует жёсткую структуру – антипараллельный G-квадруплекс. Характерная особенность этой структуры – флуоресценция при $\lambda_{ex} = 260$ нм с эмиссией в области от 300 до 450 нм [288]. Квантовый выход флуоресценции G-квадруплексов может составлять 10^{-3} [288]. Наличие флуоресцентных свойств у аптамера демонстрирует МЭЭ, приведенная на рис. 28.

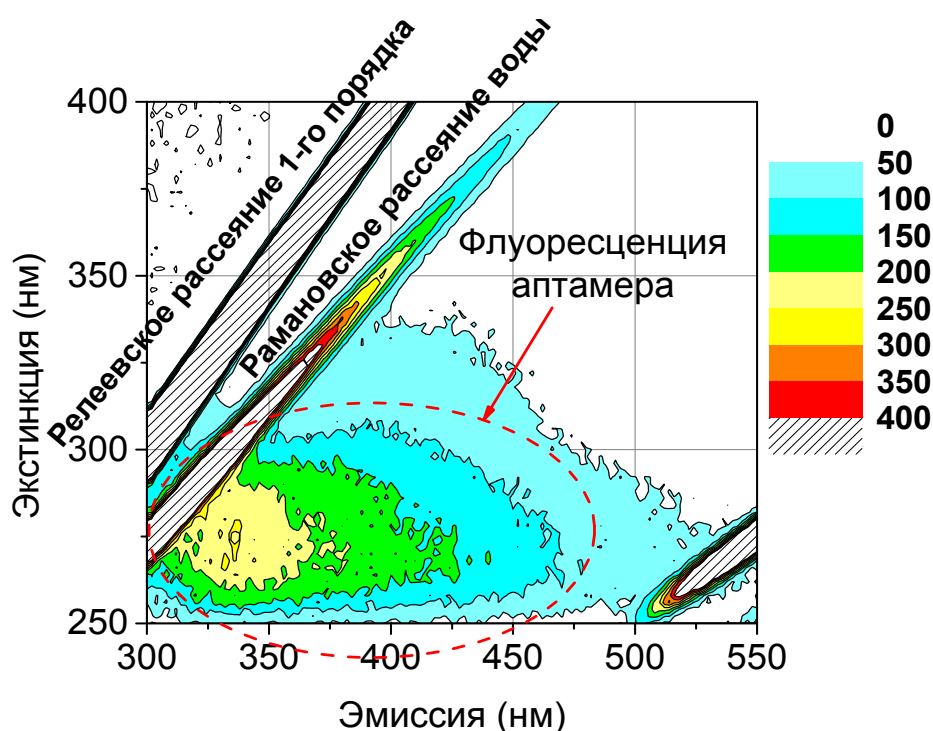


Рисунок 28. Матрица экстинкции-эмиссии G-квадруплексного аптамера (концентрация 1 мкМ)

Как видим, аптамер №1 действительно обладает слабой собственной флуоресценцией (в 24 раза меньше, чем флуоресценция ОТА при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 376/432$ нм) с максимумом экстинкции в районе 270 нм и широким спектром эмиссии в диапазоне от 320 до 425 нм.

Отметим, что 5-кратное увеличение флуоресценции ОТА в комплексе с аптамером наблюдается при облучении светом, который возбуждает как флуоресценцию ОТА, так и флуоресценцию аптамера. Это связано с тем, что спектр эмиссии G-квадруплексного аптамера (от 320 до 425 нм) при возбуждении светом с $\lambda_{ex} = 265$ нм частично перекрывается

со спектром поглощения пика №1 ОТА (см. рис. 27 (Б)). Это вызывает увеличение эмиссии ОТА при 425 нм. Из-за перекрывания спектров поглощения ОТА и эмиссии аптамера происходит резонансный перенос энергии от аптамера к ОТА при образовании комплекса [201]. Этот процесс и может рассматриваться как потенциальный источник энергии для модуляции флуоресценции ОТА при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм.

3.3.2. Зависимость интенсивности флуоресценции ОТА от концентрации аптамера

Чтобы показать, что выявленные различия МЭЭ ОТА с аптамером и без него зависят от его концентрации, мы построили ряд зависимостей флуоресценции ОТА №1 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 380/430$ нм) и №2 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм) от концентрации аптамера для 30, 10 и 3,3 нМ ОТА (рис. 29 (А)).

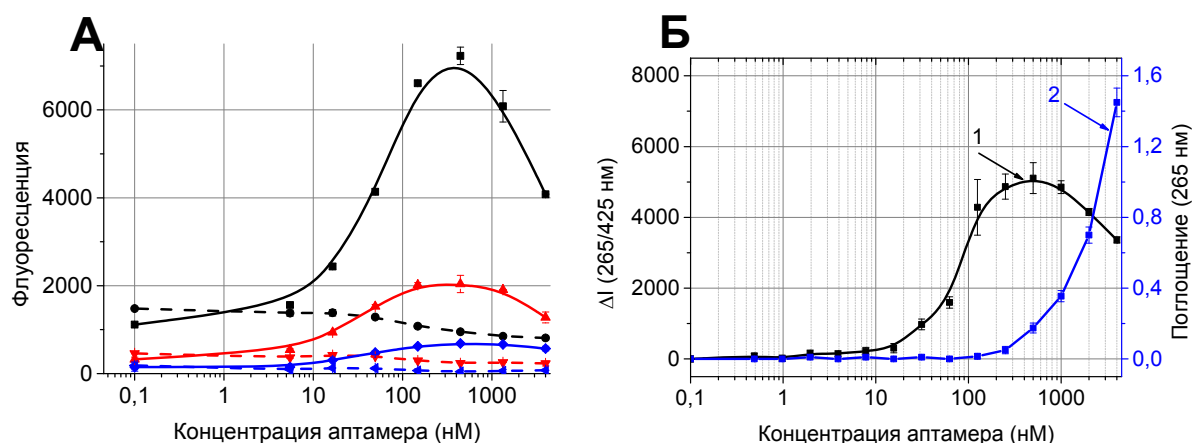


Рисунок 29. (А) Зависимости интенсивности флуоресценции ОТА при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм от концентрации аптамера (сплошные линии) и при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 380/430$ нм (пунктирные линии) при концентрациях ОТА, равных 30, 10 и 3,3 нМ (черная, красная и синяя линии). $n=3$. (Б) Зависимость интенсивности модулируемой флуоресценции 30 нМ ОТА при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм (где $\Delta I = I_{\text{комплекса}} - I_{\text{ОТА}}$) от концентрации аптамера (1) и поглощения аптамера при 265 нм от его концентрации (2). ($n=3$)

Переход ОТА из свободного состояния в комплекс с аптамером (рис. 29 (А)) сопровождается уменьшением флуоресценции при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 380/430$ нм (рис. 29 (А – пунктирные линии)). В частности, для 30 нМ ОТА уменьшение составляет 45%, а для 10 нМ – 50%. Для 3,3 нМ ОТА падение флуоресценции находится в пределах ошибки из-за низкой интенсивности. Флуоресценция при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм с ростом концентрации аптамера вначале возрастает. Ее максимум наблюдается при концентрации аптамера, равной 400-500 нМ. Данный максимум флуоресценции для 30, 10 и 3,3 нМ ОТА соответственно в 6,5; 6,3 и 4,6 раза больше, чем флуоресценция свободного ОТА при $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$

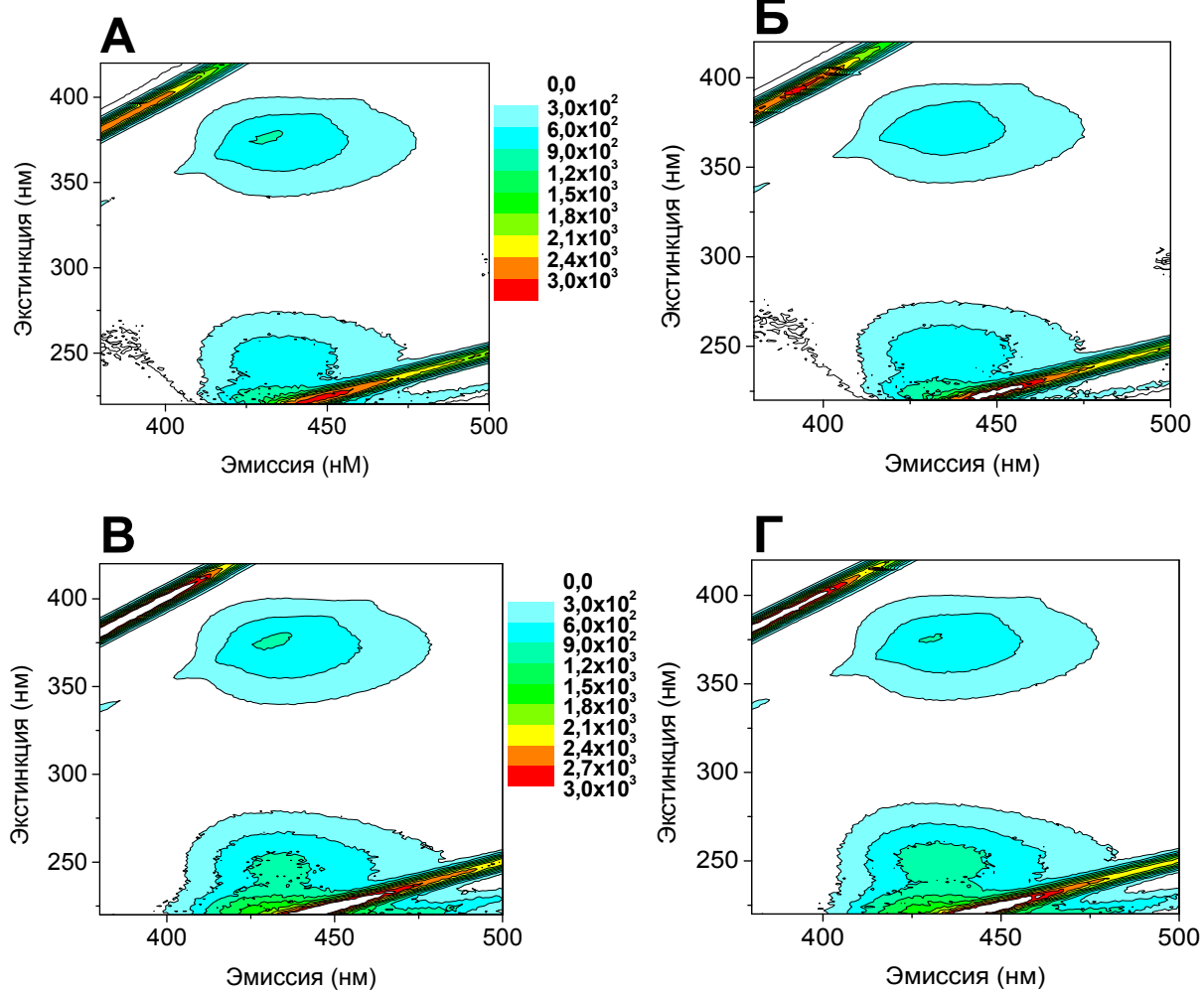
= 265/425 нм. Концентрация аптамера более 500 нМ приводит к снижению флуоресценции при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм.

На основании рис. 29 (А) можно сделать два вывода. Первый: комплексообразование ОТА-аптамер сопровождается модуляцией флуоресценции при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм. Второй: вследствие большей интенсивности модулируемая флуоресценция (разность между флуоресценцией ОТА в комплексе и флуоресценцией свободного ОТА) при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм позволяет точнее характеризовать образование комплекса ОТА-аптамер, чем падение флуоресценции при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 380/430$ нм.

Отсутствие верхнего плато при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм на рис. 29 (А) не соответствует ни теоретическим кривым, характерным для бимолекулярного взаимодействия, ни экспериментальным данным, полученным нами для комплексообразования ОТА-аптамер другими методами – регистрацией анизотропии флуоресценции и равновесным диализом (см. главу 3.2).

Чтобы понять причину снижения флуоресценции, зависимость флуоресценции 30 нМ ОТА от концентрации аптамера сравнили с зависимостью оптической плотности аптамера при 265 нм. Как видно из рис. 29 (Б), падение интенсивности флуоресценции при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм связано с поглощением аптамера при данной длине волны. Это приводит к снижению интенсивности возбуждающего света по мере его прохождения через раствор (в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера). Данное явление, известное как «inner filter effect» – эффект внутреннего фильтра [289], объясняет падение флуоресценции ОТА при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм для высоких концентраций аптамера (более 500 нМ).

Для более детального анализа влияния аптамера на флуоресцентные свойства ОТА были построены МЭЭ серии комплексов 30 нМ ОТА с разными концентрациями аптамера – от 4000 до 0 нМ. МЭЭ для восьми концентраций представлены на рис. 30.



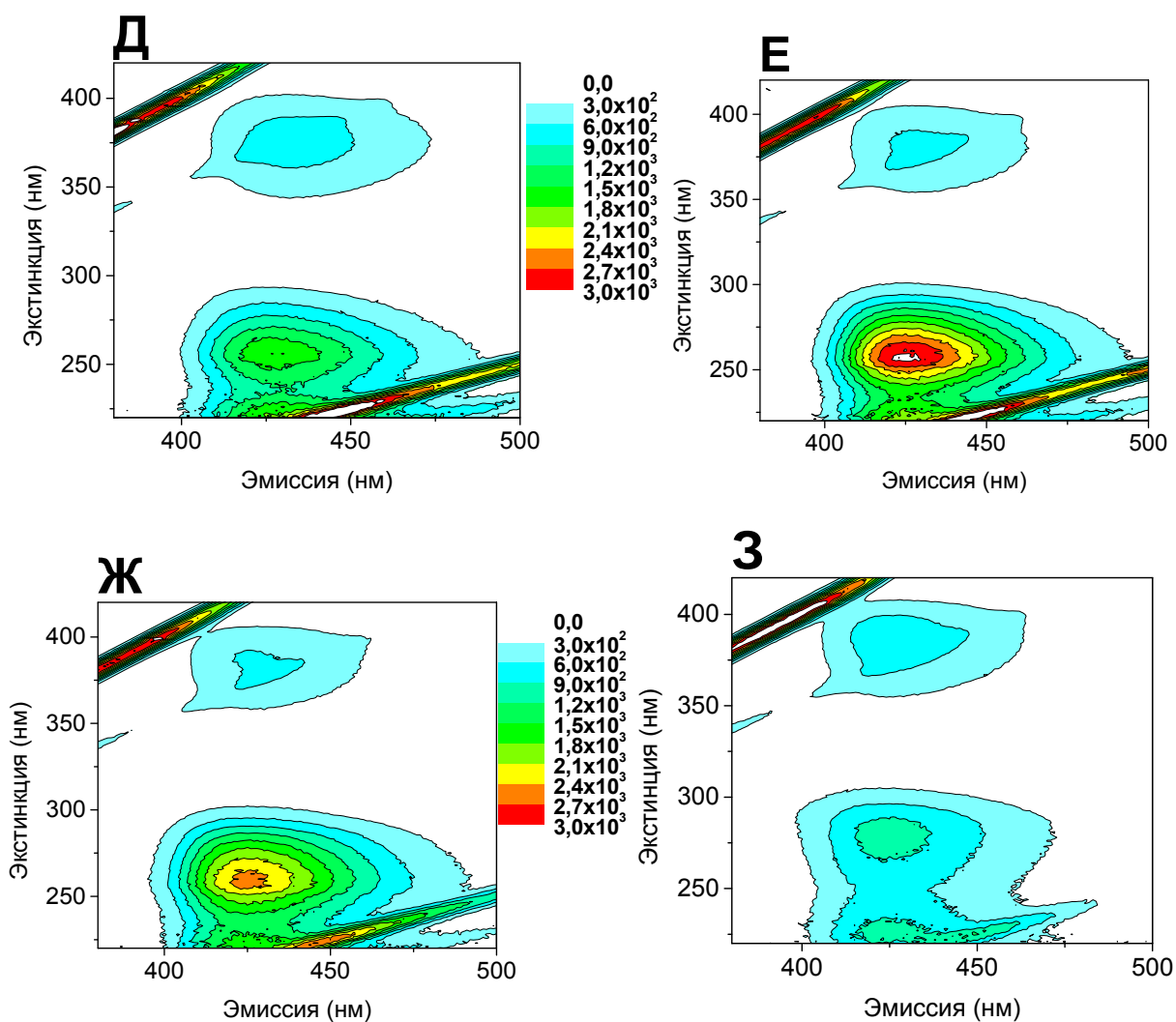


Рисунок 30. Матрицы экстинкции-эмиссии 30 нМ ОТА с добавлением разных концентраций аптамера: (А) – 0 нМ; (Б) – 1 нМ; (В) – 4 нМ; (Г) – 15,6 нМ; (Д) – 62,5 нМ; (Е) – 250 нМ; (Ж) – 1 мкМ и (З) – 4 мкМ

На основании полученных МЭЭ были построены зависимости положения максимума эмиссии пика №2 и его интенсивности от концентрации аптамера (рис. 31). Как видим, образование комплекса сопряжено не только с изменением интенсивности пика №2, но и со смещением его максимума в область меньших длин волн – с 433 до 425 нм.

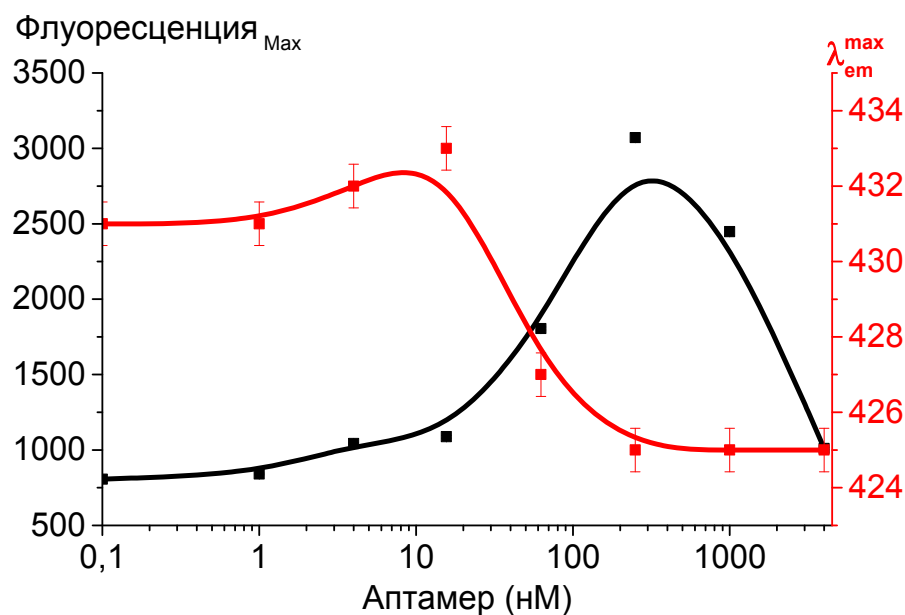


Рисунок 31. Зависимости положения максимума эмиссии (красная линия) и его интенсивности (черная линия) ОТА (30 нМ) от концентрации аптамера

Характеристика дополнительного максимума флуоресценции ОТА при $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 262/432 нм (пика №2) ранее не проводилась, хотя исходные данные, подтверждающие его наличие, опубликованы, например, в работе [287]. Гипсохромный (синий) сдвиг пика №2 может объясняться переходом ОТА в более неполярную среду при образовании комплекса. Данную причину Fadock и соавт. [274] указывают для пика ОТА №1, для которого комплексообразование также вызывает гипсохромный сдвиг [274]).

3.3.3. Зависимость флуоресценции ОТА в комплексе с аптамером при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм от концентрации ОТА

Чтобы характеризовать взаимодействие ОТА-аптамер, исключив влияние поглощения аптамера, модулируемую флуоресценцию $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм (пик №2) детектировали при постоянной концентрации аптамера (400, 100, 50 либо 0 нМ) и варьировали концентрацию ОТА, от 5000 до 0 нМ (рис. 32 (А)). Параллельно в этой серии экспериментов также детектировали флуоресценцию пика №1 при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 380/430$ нм (рис. 32 (Б)).

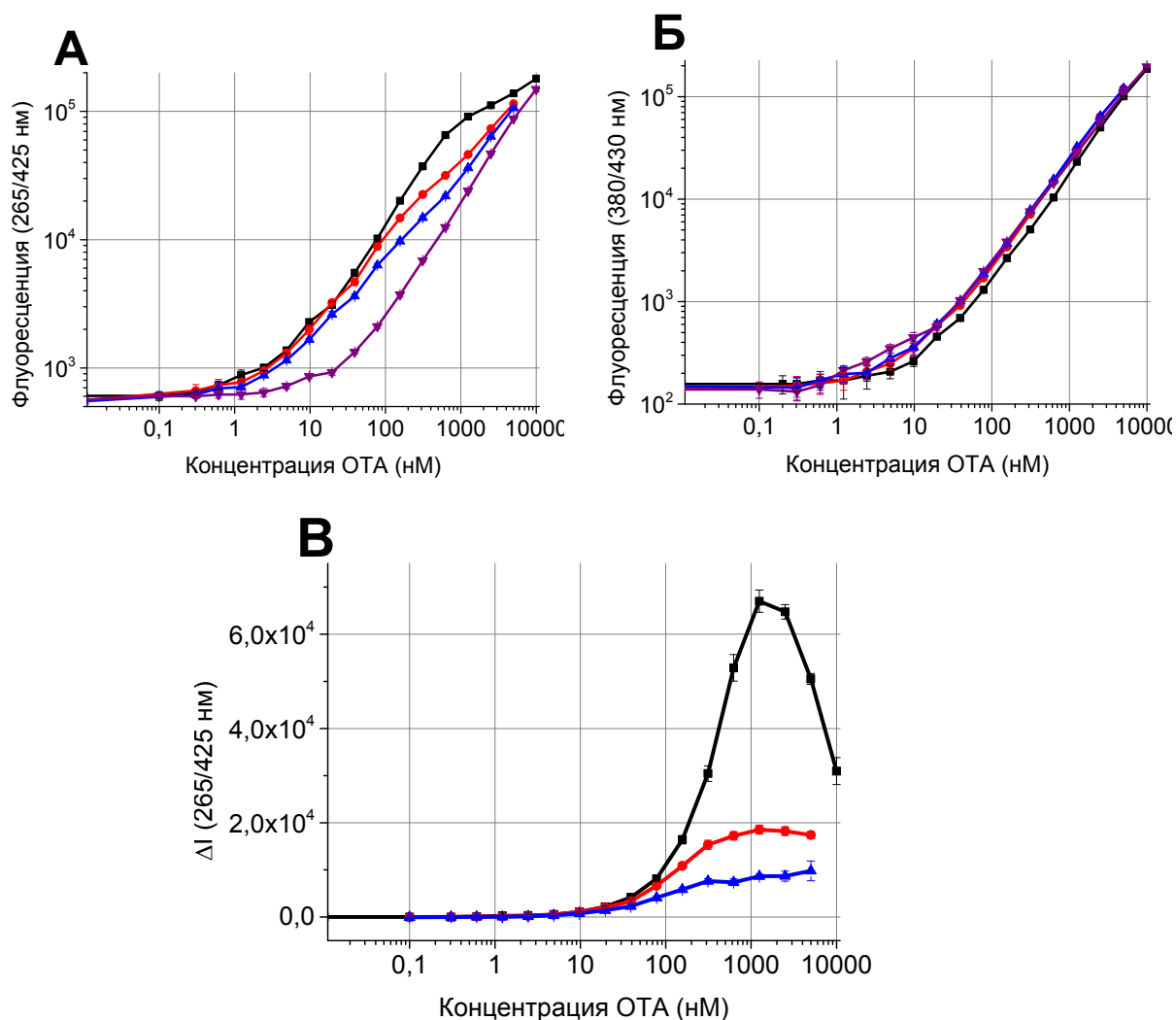


Рисунок 32. (А) Зависимости интенсивности флуоресценции ОТА ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 265/425$ нм) от его концентрации при постоянной концентрации аптамера, равной 400 нМ (черная кривая); 100 нМ (красная кривая); 50 нМ (синяя кривая) и 0 нМ (фиолетовая кривая). (Б) Те же зависимости, что и на рис. А, но при $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} 380/430$ нм. (В) Зависимости модулируемой флуоресценции при $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 265/425$ нм при связывании ОТА с 400 (черная кривая), 100 (красная) и 50 нМ (синяя) аптамера от концентрации ОТА. ($n=4$)

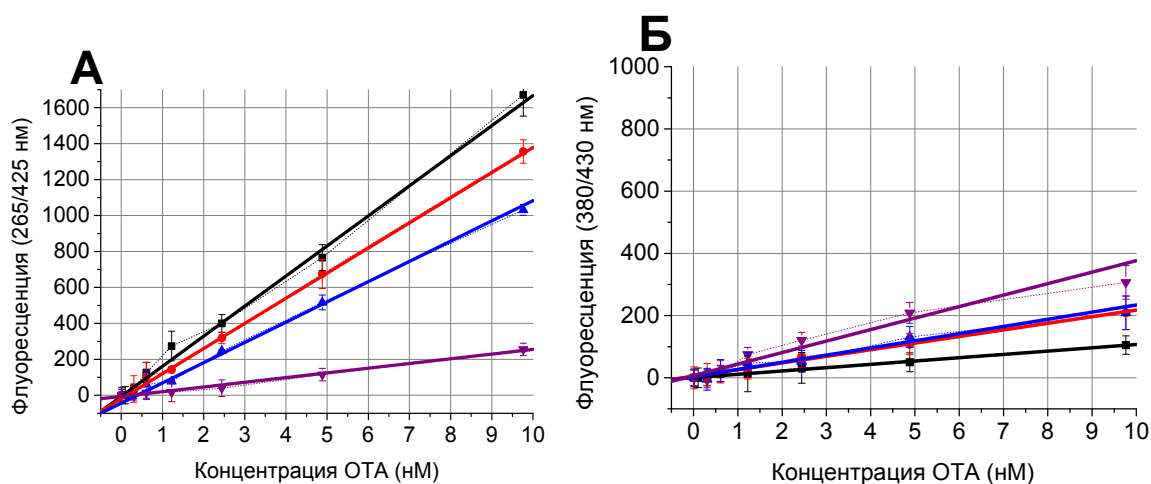
Интерпретация рис. 32 (А), затруднена тем, что регистрируемая флуоресценция складывается из собственной флуоресценции ОТА и флуоресценции, модулируемой при образовании комплекса. Чтобы определить величину модулируемой флуоресценции, флуоресценцию ОТА в отсутствии аптамера (фиолетовая кривая) вычитали из флуоресценции комплекса, измеренной при концентрациях аптамера, равных 400, 100 и 50 нМ. Результаты расчетов представлены на рис. 32 (В). Для 100 и 50 нМ аптамера концентрационные зависимости модулируемой флуоресценции, построенные в

полулогарифмических координатах, имеют форму сигмоиды, что типично для бимолекулярного взаимодействия.

В присутствии 400 нМ аптамера модулируемая флуоресценция комплекса уменьшается при высоких (>1000 нМ) концентрациях ОТА. Этот эффект связан с тем, что при высоких концентрациях ОТА и аптамера зависимость общей флуоресценции от концентрации ОТА перестает быть линейной вследствие эффекта внутреннего фильтра [289]. Снижение концентрации аптамера ведет к уменьшению: 1) общей интенсивности флуоресценции; 2) поглощения аптамера при 265 нм (рис. 29 (Б)). Благодаря снижению поглощения аптамера минимизируется эффект внутреннего фильтра (рис. 32 (В)) и становится возможной работа с разностью двух флуоресценций без дополнительных допущений.

Учитывая, что интенсивность пика №1 рассматривается как параметр, позволяющий выявлять ОТА и оценивать его содержание в различных многокомпонентных пробах [286, 287, 290], представляет интерес сопоставление флуоресценции пика №1 с новым параметром – флуоресценцией пика №2.

Чтобы оценить возможности обнаружения ОТА по собственной флуоресценции при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 380/430$ нм (для свободного ОТА) и при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм (для комплекса ОТА с аптамером), зависимости флуоресценции ОТА от его концентрации (рис. 32 (А и Б)) были линеаризованы (рис. 33 (А и Б)).



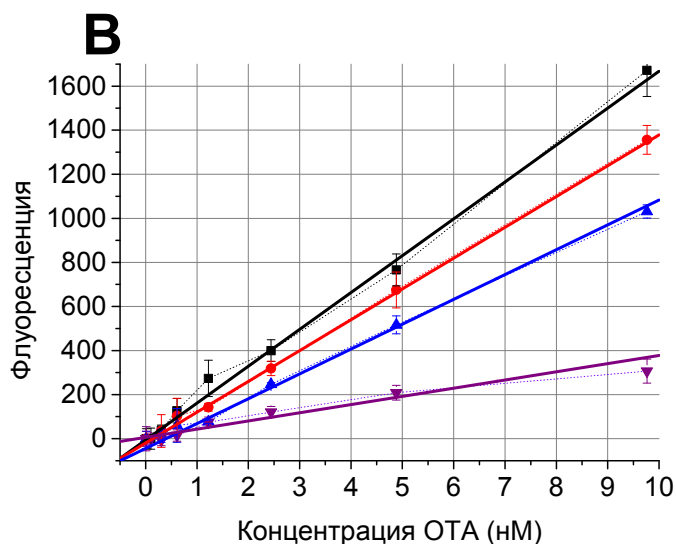


Рисунок 33. Линеаризация зависимостей флуоресценции ОТА в комплексе с 400 нМ (черная кривая), 100 нМ (красная кривая), 50 нМ (синяя кривая) и без аптамера (фиолетовая кривая) при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм (А) и $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 380/430$ нм (Б). (В) Линеаризация зависимостей флуоресценции ОТА при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм от его концентрации в комплексе с 400 нМ (черная кривая); 100 нМ (красная кривая) и 50 нМ (синяя кривая) аптамера и флуоресценции свободного ОТА при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 380/430$ нм его концентрации (фиолетовая кривая). ($n = 4$)

При $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм зависимости флуоресценции ОТА от его концентрации имеют линеаризации:

$$y = -6 + 167,3 * x \text{ для } 400 \text{ нМ аптамера};$$

$$y = -19,5 + 139,8 * x \text{ для } 100 \text{ нМ аптамера};$$

$$y = -44,1 + 112,7 * x \text{ для } 50 \text{ нМ аптамера и}$$

$$y = -6,2 + 26,1 * x \text{ без аптамера.}$$

При $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 380/430$ нм получаем следующие линеаризации:

$$y = 0,6 + 10,6 * x \text{ для } 400 \text{ нМ аптамера};$$

$$y = 5,3 + 21,2 * x \text{ для } 100 \text{ нМ аптамера};$$

$$y = 3,7 + 23 * x \text{ для } 50 \text{ нМ аптамера и}$$

$$y = 7,3 + 36,9 * x \text{ без аптамера.}$$

На основании экстраполяции концентрационных зависимостей с учетом трех стандартных отклонений (3σ) флуоресценции раствора в отсутствие ОТА были установлены пределы обнаружения ОТА. Из полученного массива данных были выбраны зависимости, соответствующие пику №1 в отсутствии аптамера и пику №2 в присутствии 400, 100 и 50 нМ аптамера – см. рис. 33 (В). Значение ПрО составило 6,5 нМ (пик №1; без

аптамера), 2,0 нМ (пик №2; 50 нМ аптамера), 1,5 нМ (пик №2; 100 нМ аптамера) и 1,2 нМ (пик №2; 400 нМ аптамера), соответственно.

Таким образом, регистрация флуоресценции пика №2 в комплексе с аптамером позволяет детектировать ОТА в $6,5/1,2 = 5,4$ раза чувствительнее, чем регистрация флуоресценции пика №1.

3.3.4. Характеристика взаимодействия ОТА-аптамер по собственной флуоресценции ОТА

Чтобы показать, что продемонстрированная модулируемая флуоресценция адекватно отражает количество образующихся комплексов, экспериментальные зависимости, приведенные на рис. 32 (В) для 100 и 50 нМ аптамера, были сопоставлены с теоретическим расчетом, использовавшим установленную ранее в разделе 3.2 равновесную константу диссоциации (K_D) комплекса аптамер-ОТА, равную 63 нМ.

Расчет основывался на стандартном уравнении для бимолекулярного взаимодействия:

$$[R] + [L] \leftrightarrow [RL], \quad (47)$$

где $[R]$ – равновесная концентрация рецептора (аптамера), $[L]$ – равновесная концентрация лиганда (ОТА), $[RL]$ – равновесная концентрация их комплекса.

Для зависимостей, приведенных на рисунке 32 (Б), концентрации аптамера и лиганда сопоставимы, допущение ($[L^*] \ll [R]$), введенное в разделе 1.2.2, не выполняется. Поэтому константа диссоциации определяется по уравнению:

$$K_D = \frac{([L]_T - [RL])([R]_T - [RL])}{[RL]}, \quad (48)$$

где $[R]_T$ – исходная концентрация аптамера, $[L]_T$ – исходная концентрация ОТА.

Преобразуя это уравнение, получаем следующее уравнение для концентрации комплекса ОТА–аптамер:

$$[RL]^2 - [RL](K_{D1} + [R]_T + [L]_T) + [R]_T[L]_T = 0, \quad (49)$$

Чтобы сравнить экспериментальные кривые с теоретическими расчётами, полученные значения модулируемой флуоресценции для 50 и 100 нМ аптамера пересчитали в доли связанного аптамера. Максимум модулируемой флуоресценции соответствует переходу всего аптамера в комплекс с ОТА, когда дальнейшее добавление ОТА не приводит к увеличению флуоресценции. Иначе говоря, когда модулируемая флуоресценция достигает верхнего плато, доля связанного аптамера составляет 100%. В остальных точках доля связанного ОТА – процентное отношение модулируемой флуоресценции ОТА в этих

точках к модулируемой флуоресценции, соответствующей выходу кривой на верхнее плато.

Из рис. 34 видно, что отличия между теоретическими (черные кривые) и экспериментальными (красные кривые) зависимостями находятся в пределах погрешности измерений. Отметим, что при более высоких концентрациях аптамера его поглощение при 265 нм осложняет построение и интерпретацию концентрационных зависимостей.

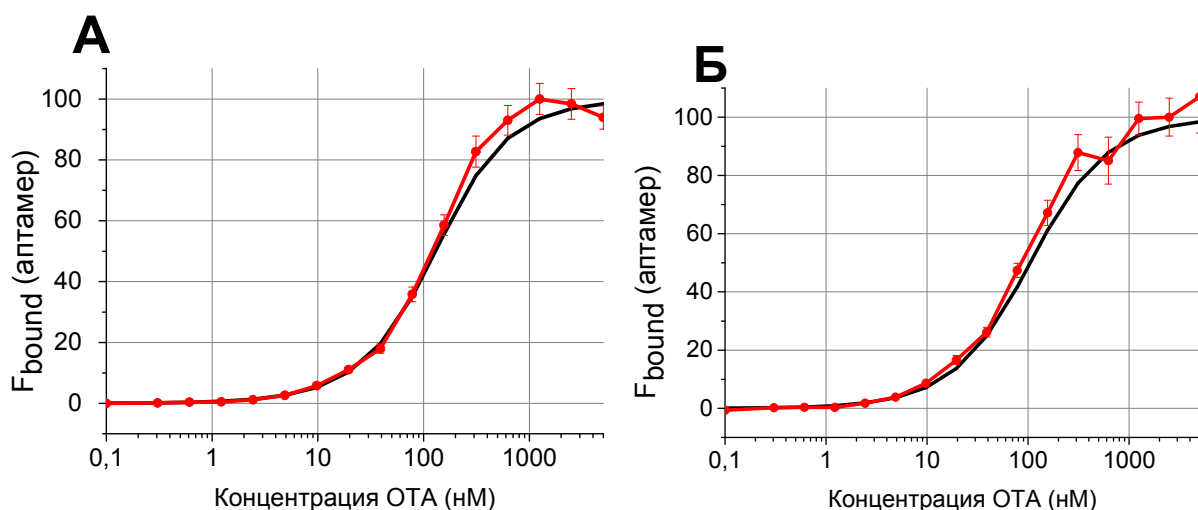


Рисунок 34. Сравнение теоретических (черные кривые) и экспериментальных (красные) зависимостей доли связанного аптамера от концентрации ОТА. **А** – при 100 нМ аптамера, **Б** – при 50 нМ аптамера

Таким образом, регистрируя флуоресценцию при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм, можно охарактеризовать взаимодействие аптамер-ОТА без введения дополнительных меток [218, 291].

3.4. Разработка белковых якорных систем для аптамерного поляризационного флуоресцентного анализа

3.4.1 Принцип молекулярных якорей

Охарактеризовав взаимодействие ОТА-аптамер, перейдем к применению полученной информации для разработки аналитических систем. Из существующего разнообразия наибольший интерес представляет описанный в разделе 1.2.3 формат анализа, основанный на регистрации поляризации флуоресценции, аналогичный широко применяемому ПФИА с использованием антител.

Применение в данном анализе аптамеров в качестве рецепторных молекул имеет особенности, которые необходимо учитывать. Молекулярная масса (ММ) аптамеров

существенно меньше, чем ММ антител. В соответствии с уравнением Перрена (см. раздел 1.2.1, уравнение 5) ПФ зависит от подвижности флуорофора или его комплекса в растворе, т.е. чувствительна к ММ рецептора.

Чтобы оценить влияние массы рецептора на поляризацию флуоресценции комплекса рецептор-лиганд, мы установили теоретическую зависимость ПФ комплекса от его молекулярной массы, приняв следующие допущения: 1) флуорофор образует ковалентный комплекс с рецептором; 2) данный комплекс представляет собой жесткую сферу и его подвижность связана с массой в соответствии с уравнением (6); 3) степень гидратации комплекса равна нулю. Объединив уравнения (5) и (6), получаем:

$$P = \frac{1}{\frac{1}{P_0} + \frac{RT\tau}{\eta MWV} \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right)}, \quad (50)$$

Для расчета зависимости ПФ флуоресцеина от молекулярной массы подставим в уравнение (32) следующие постоянные параметры флуоресцеина: время полужизни возбужденного состояния (τ) – 4 нс [292], поляризация флуоресценции в отсутствии вращательной диффузии (P_0) – 0,5 [292]. Парциальный удельный объем для G-квадруплексной одноцепочечной ДНК равен 0,53 мл/г [293], а для белков – 0,73 мл/г [294, 295]. Подставив эти параметры, получаем уравнение зависимости ПФ от ММ для квадруплексных ДНК:

$$P = \frac{MW}{2.11 * MW + 2.99 * 10^4}, \quad (51)$$

и уравнение зависимости ПФ от ММ для белков:

$$P = \frac{MW}{2.11 * MW + 2.21 * 10^4}. \quad (52)$$

Как видим, зависимость ПФ от молекулярной массы является гиперболической. С увеличением ММ значение ПФ также увеличивается и все больше приближается к P_0 , но никогда не достигает его. Важным свойством полученной зависимости является то, что ее тангенс угла наклона (скорость изменения ПФ) уменьшается с ростом ММ.

Модель не учитывает влияния ряда факторов: (а) степени гидратации молекулы, которая будет отличаться в зависимости от свойств раствора, (б) внутренней подвижности молекулы, (в) формы молекулы, (г) локальной подвижности флуорофора, (д) наличия переноса энергии и (е) диссоциации комплекса флуорофор-белок (или флуорофор-ДНК) [201, 292].

На рис. 35 представлены зависимости ПФ флуоресцеина, включенного в ковалентный комплекс с G-квадруплексом (кривая 1) и белковой молекулой (кривая 2), от молекулярной массы данного комплекса. Как видно из графиков, при одинаковой

молекулярной массе поляризация флуоресценции белкового комплекса выходит на верхнее плато быстрее, чем комплекса с G-квадруплексом (в т.ч. и с аптамером).

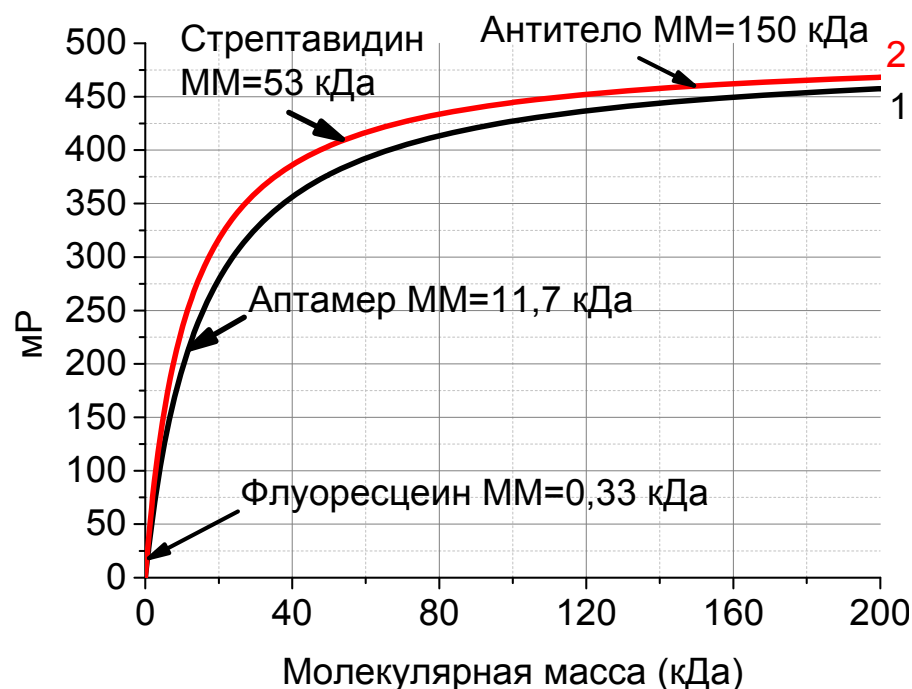


Рисунок 35. Зависимости ПФ флуоресцеина от массы образующегося комплекса с G-квадруплексной ДНК (1) и с белковой молекулой (2)

Рассмотрим рис. 35 более подробно. Отметим на кривых (1) и (2) массы ОТА-специфичного квадруплексного аптамера [258] и потенциальных якорных белковых молекул (стрептавидина и иммуноглобулина G). Представленные зависимости позволяют сделать следующие выводы:

- комплекс флуоресцеина с 36-нуклеотидным аптамером лежит в области наибольшего влияния ММ на ПФ; связывание увеличивает ПФ приблизительно в ~9 раз;
- комплекс флуоресцеина со стрептавидином располагается в начале области выхода кривой на плато; его ПФ в ~15 раз превышает ПФ флуоресцеина;
- комплекс флуоресцеина с IgG располагается в области минимального влияния ММ на ПФ (практически плато); его ПФ в ~18 раз превышает ПФ флуоресцеина, и дальнейшее увеличение массы не будет вызывать значимого прироста ПФ.

На основании рассматриваемой теоретической зависимости мы предложили новый метод усиления ПФ комплекса аптамер-меченый лиганд, основанный на принципе,

названном «принцип молекулярных якорей». Предлагается включение аптамеров в комплексы с высокомолекулярными соединениями для снижения подвижности и, соответственно, увеличения ПФ метки, связываемой таким утяжеленным аптамером. Принципиальная схема применения молекулярных якорей представлена на рис. 36.

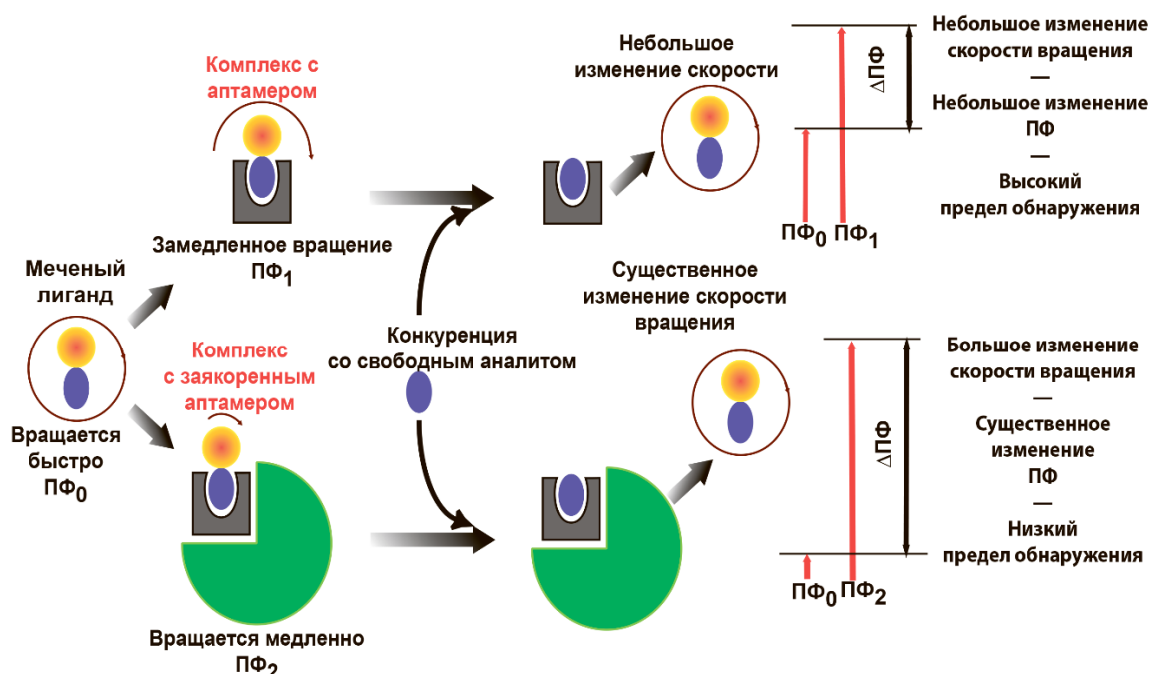


Рисунок 36. Схема повышения предела обнаружения ПФ аптамерного анализа с применением молекулярных якорей. $ПФ_0$ – поляризация меченого лиганда; $ПФ_1$ – ПФ комплекса с аптамером; $ПФ_2$ – ПФ аптамерного комплекса с молекулярным якорем (молекулой белка, наночастицей и др.)

Исходя из рассмотренного выше теоретического анализа, оптимальным белковым якорем, обеспечивающим максимально возможную ПФ, будет якорь с ММ 100 кДа и более. Дальнейшее увеличение массы комплекса не будет вызывать значимого прироста ПФ.

Для реализации этой идеи был разработан ПФ аптамерный анализ, основанный на классической схеме конкурентного ПФИА, но с применением молекулярных якорей.

3.4.2 Разработка ПФ аптамерного анализа с использованием якорей на основе белков и сравнение с анализом на основе нативного аптамера

Аналитическая система для определения ОТА была реализована с использованием белков в качестве молекулярных якорей и сопоставлена с системой, основанной на использовании нативного аптамера. В качестве белковых якорных модулей были выбраны

стрептавидин (53 кДа) и комплекс стрептавидин-иммуноглобулин G (IgG) (примерно 203 кДа). Для связывания с белковыми комплексами использовалось 3'-биотинилированное производное аптамера, взаимодействующее с сайтами высокоаффинного связывания стрептавидина [296]. Принципиальная схема анализа представлена на рис. 37.

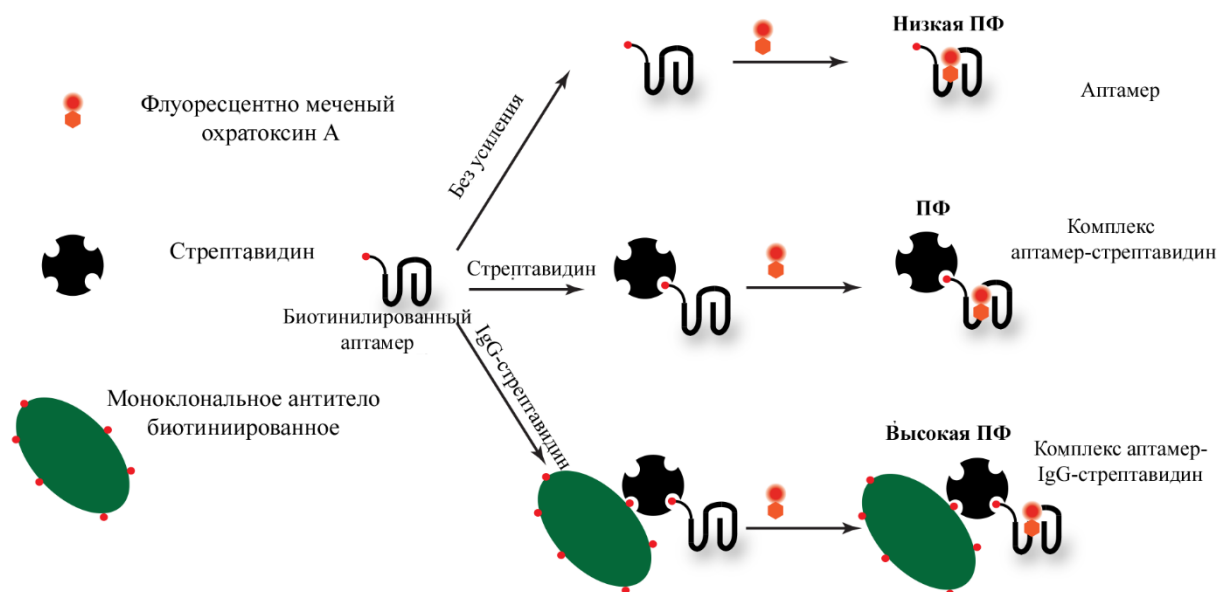


Рисунок 37. Схема ПФ аптамерного анализа со свободным аптамером и комплексами аптамера с молекулярными якорями (стрептавидин; стрептавидин-IgG)

Концентрация ОТА-ФЛУ для анализа была выбрана в соответствии с результатами, представленными в разделе 3.2.1.2 (см. рис. 23, табл. 7). Концентрация ОТА-ФЛУ определяет интенсивность флуоресценции и распределение реагентов при конкурентном взаимодействии, таким образом влияя на воспроизводимость и чувствительность анализа. Для обеспечения наименьшего предела обнаружения необходимо использовать наименьшую концентрацию меченого лиганда, обеспечивающую достоверное изменение сигнала в ходе конкурентного взаимодействия [222]. Исходя из таблицы 7, этому требованию удовлетворяет концентрация ОТА-ФЛУ 1,7 нМ, для которой Z'-фактор равен 0,6.

Так как ПФ анализ планируется проводить в сложных матриксах, то чтобы избежать дополнительного выбора условий с учетом влияния матрикса, мы руководствовались рекомендацией [223, 224], в соответствии с которой концентрация ОТА-ФЛУ должна обеспечивать флуоресценцию в 10-20 раз больше, чем фоновая флуоресценция рабочего буфера. С учетом этого требования для экспериментов с якорным усилением была выбрана концентрация ОТА-ФЛУ, равная 4 нМ.

3.4.3 Выбор оптимального белкового якоря

Работы были начаты с получения и характеристики комплекса биотинилированного аптамера (11,7 кДа) со стрептавидином. Данный комплекс может образовываться в различных стехиометрических соотношениях, так как стрептавидин имеет четыре биотин-связывающих сайта. Для выбора соотношения аптамер-стрептавидин, которое обеспечивает наибольшую ПФ ОТА-ФЛУ, было получено три препарата: 1:2 (избыток стрептавидаина); 1:1 (оценочная ММ комплекса 65 кДа) и 2:1 (избыток аптамера, ММ = 77 кДа). Зависимости ПФ ОТА-ФЛУ от концентрации этих препаратов приведены на рис. 38.

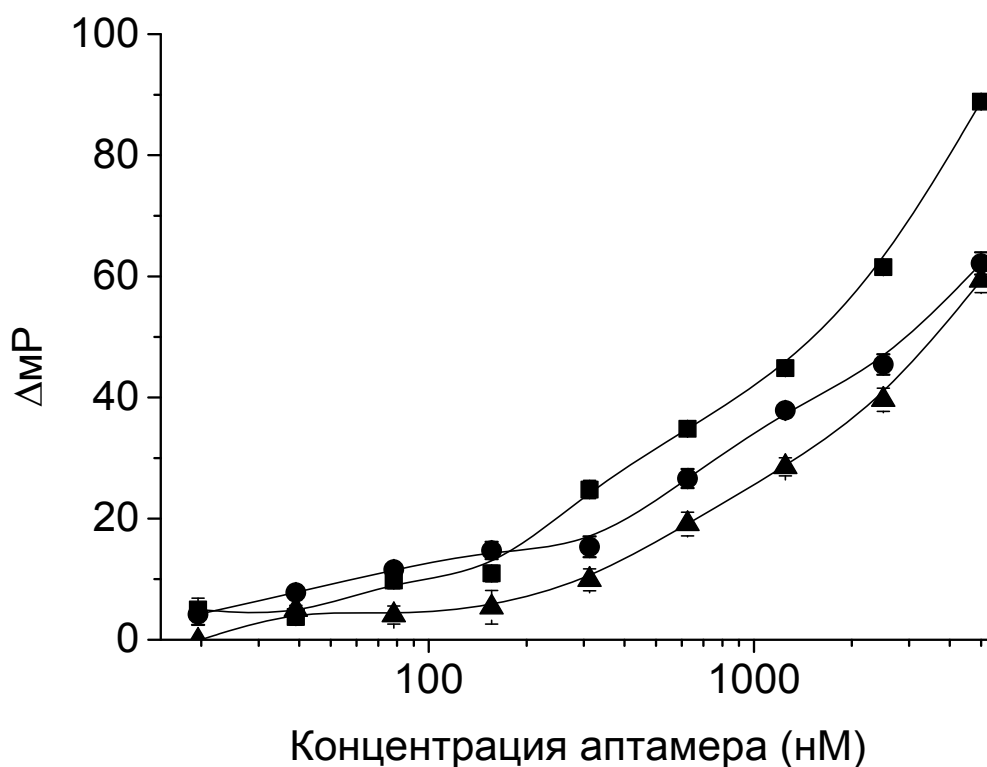


Рисунок 38. Зависимости разности ПФ ОТА-ФЛУ от концентрации аптамера для препаратов аптамер-стрептавидин с мольными соотношениями 1:2 (■); 1:1 (●) и 2:1 (▲). (n=4)

Наибольший прирост ПФ наблюдался для комплекса с соотношением 1:2, который и был выбран для последующих экспериментов. Для подтверждения образования комплекса аптамер-стрептавидин был использован метод асимметричного проточного фракционирования в силовом поле в поперечном потоке (AF4). Фрактограммы, представленные на рис. 39, демонстрируют, что время удержания в ряду аптамер → стрептавидин → комплекс стрептавидин-аптамер увеличивается. Поскольку известно, что

в AF4 время удержания тем больше, чем больше ММ, данные результаты подтверждают формирование комплекса аптамер-стрептавидин.

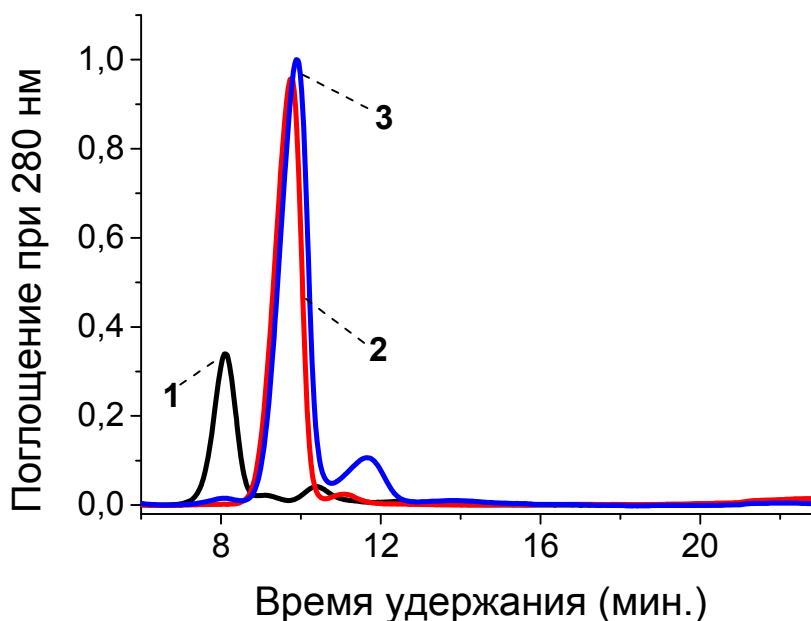


Рисунок 39. AF4 фрактограммы биотинилированного аптамера (1), стрептавида (2) и комплекса биотинилированного аптамера со стрептавидином в соотношении 1:2 (3)

Далее был получен и охарактеризован тройной комплекс аптамер-стрептавидин-IgG (~ 215 кДа). Мольное соотношение реагентов 1:2:1 было выбрано, исходя из установленного оптимума для двойного комплекса. Методом AF4 были сопоставлены времена удержания комплекса аптамер-стрептавидин-IgG и его компонентов. Установленное (рис. 40) увеличение времени удержания в ряду аптамер → стрептавидин → IgG → комплекс аптамер-стрептавидин-IgG подтверждает процесс комплексообразования.

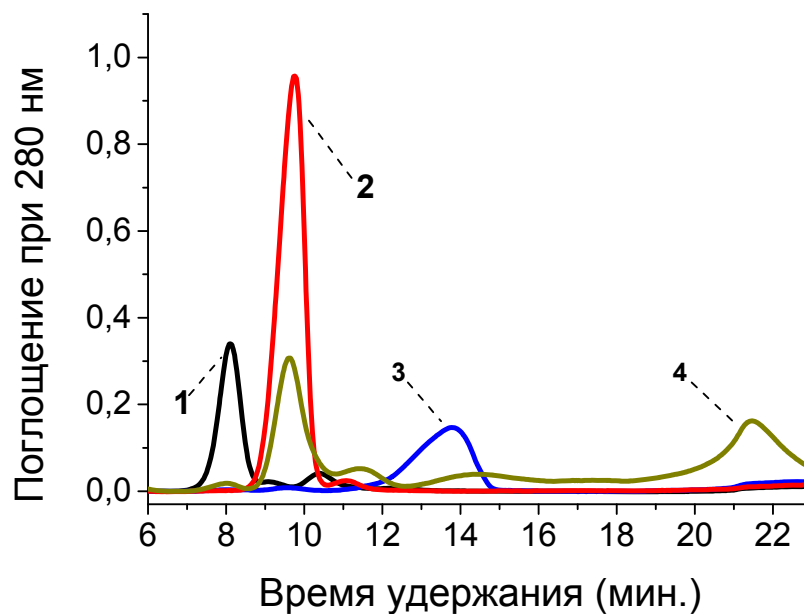


Рисунок 40. AF4 фрактограммы биотинилированного аптамера (1), стрептавидина (2), биотинилированного IgG (3) и тройного комплекса аптамер-стрептавидин-биотинилированные IgG (неспецифичные к ОТА) (4)

Следующим этапом работы стало сравнение ПФ меченого ОТА при взаимодействии с различными вариантами аптамерного рецептора. Полученные зависимости ПФ ОТА-ФЛУ от концентрации аптамера и двух его белковых комплексов представлены на рис. 41.

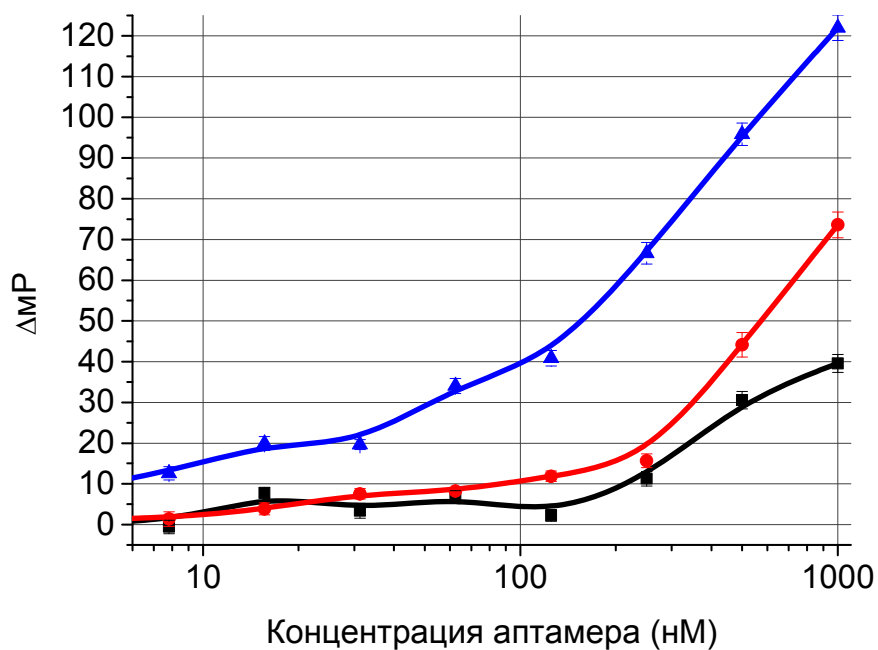


Рисунок 41. Зависимости разности ПФ ОТА-ФЛУ от концентрации аптамера (черная кривая) и его комплексов со стрептавидином (красная кривая) и комплексом стрептавидин-IgG (синяя кривая). (n=4)

Как видно, ПФ возрастает в ряду: аптамер → комплекс аптамер-стрептавидин → тройной комплекс аптамер-стрептавидин-IgG. Это подтверждает увеличение ПФ связанного состояния ОТА-ФЛУ при включении аптамера в белковые комплексы и соответствует сделанному предположению о том, что размер белковых якорей массой до 100 кДа недостаточен для достижения максимального ПФ связанного состояния ОТА-ФЛУ.

Для конкурентного анализа справедливо следующее: чем большая концентрация рецептора взята, тем большая концентрация лиганда необходима для вытеснения меченого лиганда, что ухудшает чувствительность анализа [225, 297]. Соответственно, для достижения максимальной чувствительности анализа необходимо использовать минимальное количество аптамера, обеспечивающее достоверное изменение выбранного сигнала. В качестве компромисса между воспроизводимостью и чувствительностью анализа были выбраны концентрации рецепторов, при которых разница ПФ между свободным и связанным состоянием ОТА-ФЛУ составляет 50 единиц: 1000 нМ для аптамера, 500 нМ для стрептавидинового комплекса и 200 нМ для тройного комплекса (см. рис. 41). Таким образом, обеспечение такого же изменения ПФ, как и для свободного аптамера, требует вдвое меньшей концентрации аптамера в комплексе со стрептавидиновым якорем и в пять раз меньшей – в комплексе с якорем стрептавидин-IgG.

3.4.4 Сравнение предела обнаружения ПФ анализа с нативным аптамером и белковым якорным усилением

Чувствительности трех предложенных систем были сопоставлены на основании полученных конкурентных кривых определения ОТА (рис. 42). Для аптамерного рецептора (кривая 1) PrO и IC_{50} составили 130 и 1340 нМ, соответственно.

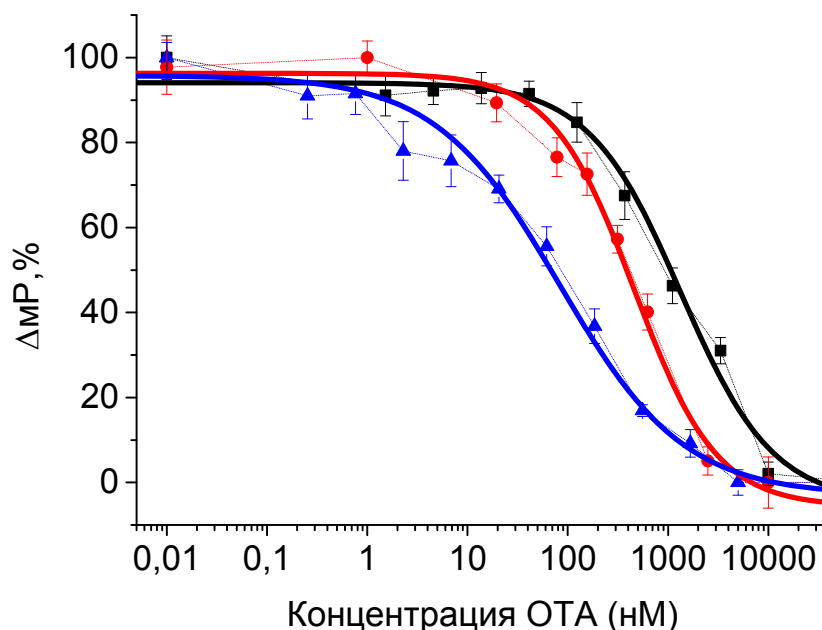


Рисунок 42. Конкурентные зависимости ПФ аптамерного анализа для свободного аптамера (1); аптамера в комплексе со стрептавидином (2); комплекса аптамер-стрептавидин-IgG (3). (n = 4)

Для комплекса аптамер-стрептавидин (кривая 2) ПрО и IC50 равнялись 43 и 533 нМ соответственно; ПрО снизился в три раза.

Для комплекса аптамер-стрептавидин-IgG (кривая 3) были достигнуты значения ПрО и IC50, равные 3,6 и 98 нМ. По сравнению со свободным аптамером ПрО снизился в 40 раз.

Полученный ПрО ОТА для системы с тройным комплексом при пересчете в массовую концентрацию равняется 1,45 мкг/кг. Это меньше, чем предельно допустимая концентрация (ПДК) ОТА в ряде продуктов питания. Согласно международным нормативам, предел обнаружения ОТА составляет от 0,5 мкг/кг до 10 мкг/кг, в зависимости от продукта питания, в котором осуществляется его контроль [244, 245]. Таким образом, якорное усиление позволило достигнуть аналитически значимого ПрО ОТА.

3.5. Разработка ПФ аптамерного анализа ОТА с использованием якоря на основе конъюгатов наночастиц золота

В качестве молекулярных якорей были также рассмотрены наночастицы золота. В отличие от белков, для многих наночастиц характерна форма, близкая к сферической, и жесткая структура, поэтому уравнение Перрена (6) точнее описывает связывание

флуорофора с такими структурами. При этом, вследствие высокой плотности, частицы даже небольших размеров будут иметь массу много больше 100 кДа. Это создает возможность достижения максимальных значений ПФ связанной флуоресцеиновой метки, не прибегая к синтезу белковых конъюгатов, стехиометрия которых неоднозначна. Так, плотность НЧЗ 19300 кг/м³, при диаметре 5 нм её объем равен $6,54 \cdot 10^{-26}$ м³, а масса одной частицы – $1,26 \cdot 10^{-18}$ г, что соответствует 760 кДа. Имеются детально изученные методики синтеза гомогенных препаратов НЧЗ определенного размера. Диаметр НЧЗ может быть подтвержден методами ПЭМ и ДСР. Все это делает наночастицы золота перспективным якорем для применения в ПФ анализе.

Учитывая высокую плотность золота и представленные выше расчеты массы единичной наночастицы, в качестве якоря было выбрано высокодисперсное золото (диаметр – менее 10 нм). Для обеспечения большей стабильности конъюгатов иммобилизацию аптамера на поверхности НЧЗ проводили, используя стрептавидин-биотиновое взаимодействие. Принципиальная схема усиления сигнала для предложенного ПФ анализа представлена на рис. 43.

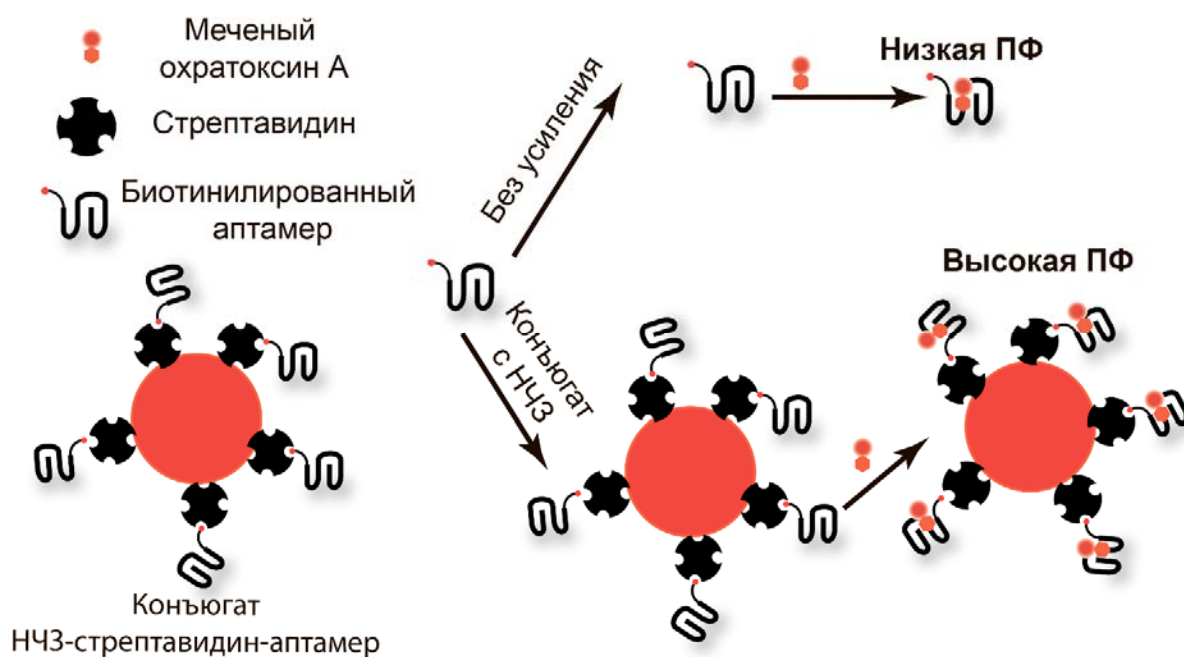


Рисунок 43. Схема усиления поляризационного флуоресцентного аптамерного анализа с использованием якоря на основе наночастиц золота

3.5.1 Получение и характеристика наночастиц золота

Для синтеза монодисперсных стабильных НЧЗ диаметром 5-10 нм в качестве восстановителя и стабилизирующего агента применяли цитрат натрия и таниновую кислоту [298, 299].

Полученный препарат НЧЗ охарактеризован спектрофотометрически (рис 40 (А)). Пик поглощения наночастиц наблюдался при длине волны 520 нм и был равен 0,867. Методом просвечивающей электронной микроскопии определены размеры частиц в полученном препарате и проведен анализ их распределения по диаметру (рис. 44 (Б, В)).

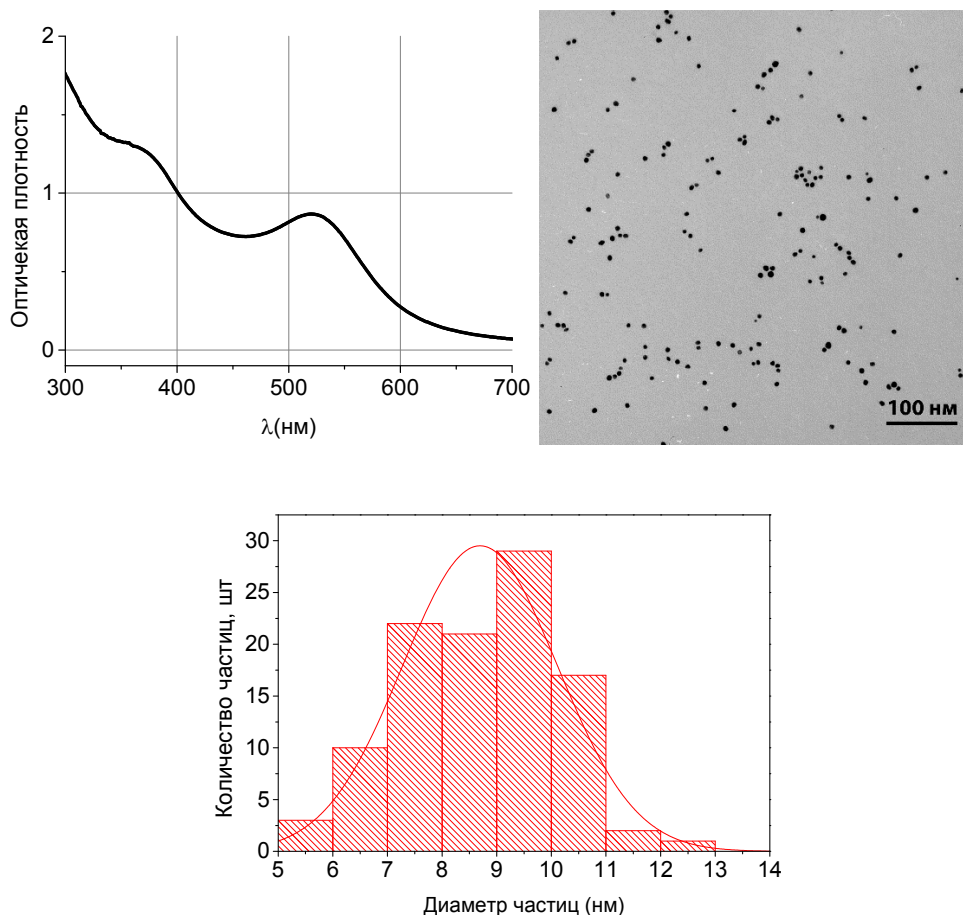


Рисунок 44. (А) Спектр поглощения препарата НЧЗ. (Б) Электронная микрофотография НЧЗ, синтезированных цитрат-таниновым методом. (В) Распределение синтезированных НЧЗ по диаметру

Согласно полученным результатам, синтезированный препарат НЧЗ имеет узкое распределение по размерам со средним диаметром частиц $8,7 \pm 1,4$ нм.

3.5.2 Теоретический расчет количества стрептавидина и аптамера, иммобилизованного на поверхности золотых частиц.

Принимая во внимание размер молекулы стрептавидина (5,6 нм [300, 301]) и средний диаметр полученных НЧЗ (8,7 нм), был проведен подсчет максимально возможного количества стрептавидина, которое может сорбироваться на поверхность НЧЗ в условиях образования монослоя, и соответствующего количества биотинилированного аптамера, способного связаться с иммобилизованным стрептавидином.

Площадь поверхности НЧЗ, с учетом принятого допущения о ее идеальной сферической форме, определяется по формуле:

$$S_q = \pi d^2 \quad (53),$$

где S_q – площадь НЧЗ, d – диаметр НЧЗ.

Площадь поверхности НЧЗ диаметром 8,7 нм, в соответствии с уравнением (53), равна $7,85 \cdot 10^{-17} \text{ м}^2$. Соответственно, максимальное количество молекул стрептавидина, помещающихся на одной НЧЗ, определяется зависимостью:

$$n_{str} = \frac{S_q}{S_{str}} * 0,74 \quad (54),$$

где n_{str} – количество молекул стрептавидина на одной частице НЧЗ, S_q – площадь поверхности НЧЗ, S_{str} – площадь поперечного сечения молекулы стрептавидина ($S_{str} = \pi r^2$), коэффициент 0,74 учитывает максимальную плотность упаковки сфер [302].

По результатам вычислений по уравнению (54), получили, что количество молекул стрептавидина на одной частице НЧЗ равно 7. Зная концентрацию соли золота, использованную для синтеза, и размеры полученных НЧЗ, мы определили молярную концентрацию НЧЗ в синтезированном препарате:

$$C_{нчз} = \frac{M \cdot M_g}{\frac{4}{3} \pi \rho r^3 N_A} * 10^9 \quad (55)$$

где $C_{нчз}$ – концентрация НЧЗ (нМ), M – молярность раствора ЗХВК (0,000254 моль/л), M_g – молярная масса золота (197 г/моль), ρ – плотность золота (19300 кг/м³), r – радиус НЧЗ, N_A – число Авогадро.

Вычисленная концентрация НЧЗ составила 12,5 нМ.

Зная количество молекул стрептавидина, которое может поместиться на одной НЧЗ, и концентрацию НЧЗ в синтезированном препарате, можно определить емкость раствора НЧЗ по стрептавидину – концентрацию стрептавидина, для которой достигается полное покрытие поверхности всех НЧЗ в препарате:

$$C_{str} = n_{str} * C_{нчз} \quad (56),$$

где C_{str} – концентрация стрептавидина, $C_{нчз}$ – концентрация НЧЗ.

Подставив известные величины, за исключением радиуса НЧЗ, в уравнение (56), получаем:

$$C_{str} = 3,72 \cdot 10^{17} \cdot \frac{1}{r^3} \quad (57).$$

Пересчет молярной концентрации раствора стрептавидина в массовую (мкг/мл) осуществлялся по формуле:

$$C_{str} \left(\frac{\text{мкг}}{\text{мл}} \right) = 1000 \cdot M_{str} \cdot C_{str}(\text{нМ}) \quad (58),$$

где M_{str} – молярная масса стрептавидина, равная 53000 г/моль.

В таблице 9 суммированы полученные данные. Помимо синтезированного препарата НЧЗ с диаметром 8,7 нМ, в ней рассмотрены теоретические возможности применения в качестве якорей более крупных наночастиц золота. Расчеты основывались на допущении того, что для синтеза НЧЗ разного размера использовали растворы с равным содержанием золота (что соответствует общепринятой практике применения методики Френса-Туркевича). Зная, что валентность стрептавидина по биотину равна 4 [296], мы исходили из версии об экранировании одного сайта связывания при иммобилизации, т.е. наличии трех остаточных валентностей для связывания биотинилированного аптамера.

Таблица 9. Теоретические количества стрептавидина и аптамера, которые могут быть иммобилизованы на НЧЗ разного диаметра

	НЧЗ			
Диаметр, нм	8,7	15	25	40
n_{str} , шт.	7	21	58	151
$C_{НЧЗ}$, нМ	12,5	2,43	0,53	0,12
C_{str} , нМ	101	51,1	30,5	19,4
C_{str} , мкг/мл	4,63	2,71	1,61	1,03
$C_{ап}$, если валентность $str = 3$, нМ	262	153	91	58

Как видно из таблицы 9, концентрация НЧЗ тем меньше, чем больше их диаметр. Хотя с ростом диаметра НЧЗ количество молекул аптамера, которые потенциально могут сорбироваться на одну частицу, возрастает, итоговая емкость препаратов НЧЗ по аптамеру снижается. Изменение диаметра НЧЗ с 8,7 до 40 нм соответствует падению емкости по аптамеру с 262 до 58 нМ. Таким образом, НЧЗ с диаметром 8,7 нм (в соответствии с разделом 3.4.1) обеспечивают достижение максимального выигрыша в ПФ, а увеличение диаметра снижает концентрацию иммобилизуемого аптамера. В связи с этим, для

реализации применения НЧЗ в качестве якоря в ПФ аптамерном анализе мы остановились на использовании высокодисперсного (диаметр 8,7 нм) препарата.

Исходя из таблицы 9, теоретически для полного покрытия поверхности НЧЗ диаметром 8,7 нм с концентрацией 12,5 нМ достаточно концентрации стрептавидина, равной 5,3 мкг/мл. Этими расчетами мы и руководствовались далее при получении реагентов для анализа.

3.5.3 Синтез и характеристика конъюгатов наночастиц золота со стрептавидином и с аптамером

Для синтеза конъюгатов использовался нативный стрептавидин из *Streptomyces avidinii*, не содержащий углеводов и имеющий изоэлектрическую точку в кислой области рН [296]. Точное значение pI, равное 5,2, было измерено методом ЭЛС [268] на основании регистрации дзета-потенциала при разных рН. Поскольку стрептавидин обладает симметричной тетрамерной структурой [296], вероятность множественной блокировки биотин-связывающих сайтов при иммобилизации белка в отсутствие дополнительных денатурирующих воздействий невелика. В соответствии с рекомендациями [303], при функционализации НЧЗ рН среды должна быть как минимум на 0,5 единиц выше, чем pI иммобилизуемого белка.

Для выбора оптимального препарата было получено 12 вариантов конъюгата НЧЗ-стрептавидин с использованием для иммобилизации рН 6,5; 7,4 и 9,0 и с концентрациями стрептавидина, равными 20, 40, 60 и 80 мкг/мл. Меньшие концентрации стрептавидина (5 – 15 мкг/мл) в ряде случаев были недостаточны для получения стабильных коллоидных препаратов и поэтому далее не рассматриваются. Свойства полученных препаратов оценивали методом динамического светорассеяния. Метод позволяет определить средний гидродинамический диаметр наночастиц, их распределение по размерам и выявить присутствие агрегатов. Изменения проводили после 60-минутной инкубации НЧЗ со стрептавидином до и после центрифугирования (отделения несвязавшегося стрептавидина). Полученные распределения по гидродинамическим диаметрам представлены на рис. 45, а результаты их обработки – в таблице 11.

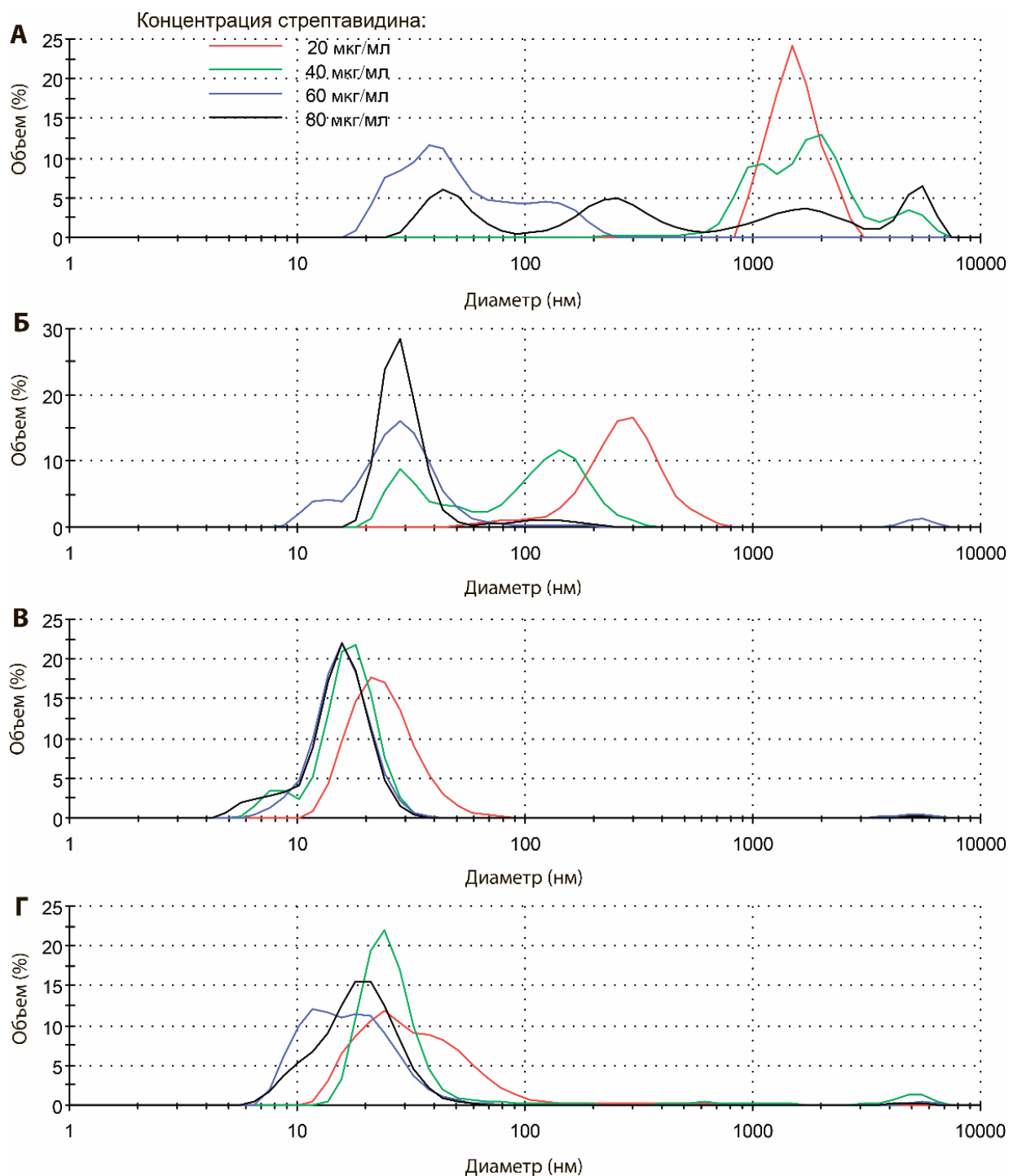


Рисунок 45. Распределения измеренного методом ДСР гидродинамического диаметра конъюгатов стрептавидина с НЧЗ, полученные до центрифугирования (синтез при pH 6.5 (А), 7.4 (Б), 9.0 (В)) и после центрифугирования (синтез при pH 9.0 (Г))

Как видим, pH среды оказывает критическое влияние на распределение синтезированных конъюгатов по размерам. При pH 6,5 для всех конъюгатов наблюдается формирование преципитатов и высокие значения индекса полидисперсности (PdI – см. табл. 11). При pH 7,4 образование преципитатов менее выражено, а при высоких

концентрациях стрептавицина размеры преципитатов уменьшаются или они совсем отсутствуют. При pH 9,0 крупные преципитаты отсутствуют при всех концентрациях, и увеличение концентрации стрептавицина от 20 до 80 мкг/мл сопровождается снижением гидродинамического диаметра с 25 до 15,6 нм.

Таблица 10. Размерные характеристики конъюгатов НЧЗ со стрептавицином

рН синтеза конъюгатов	Стрептавицин, мкг/мл	Диаметр по ДСР (%объем), нм	PdI	Преципитаты*
pH 6,5	20	1570 (100%)	0,316	Да
	40	1990 (37,4%), 1020 (45,4%), 257 (1%)	0,507	Да
	60	1727 (26,3%), 264,9 (31%), 48 (25,4%)	0,422	Да
	80	44,5 (77,3%), 131,8 (22,7%)	0,269	Нет
pH 7,4	20	283,9 (100%)	0,254	Да
	40	143,5 (63,8%), 36,8 (36,2%)	0,197	Нет
	60	30,6 (82%), 13 (13,5%)	0,268	Нет
	80	28,9 (93,1%)	0,296	Нет
pH 9,0	20	25 (98,3%)	0,207	Нет
	40	17,8 (87,8%), 8,3 (10,6%)	0,306	Нет
	60	16,5 (98%)	0,308	Нет
	80	15,6 (99,1%)	0,304	Нет

* – появление фракции с диаметром, превышающим 200 нм, трактовали как преципитацию

Основной интерес представляли наиболее стабильные конъюгаты, синтезированные при pH 9,0. Их отделяли от несвязавшегося стрептавицина с помощью центрифугирования. Как видно из рис. 45 (Г), ДСР профили конъюгатов после центрифугирования не претерпели серьезных изменений. Таким образом, показано, что при pH 9,0 обеспечивается получение монодисперсных и агрегативно устойчивых конъюгатов, при этом узкие распределения продуктов по размерам получены для конъюгатов, синтезированных при концентрации стрептавицина от 40 мкг/мл и более.

Формирование агрегатов в стрептавициновых конъюгатах НЧЗ было дополнительно оценено методом ПЭМ. Рис. 46 (А) подтверждает наличие макроразмерных агрегатов НЧЗ при синтезе с pH 6,5, что соответствует данным ДСР. Фракция олигомерных НЧЗ, скорее всего, формируется посредством связывания через адсорбируемые молекулы

стрептавидина, тогда как при pH 9 конъюгат состоит из отдельных частиц (рис. 46 (Б)). Неравномерность же распределения частиц на микрофотографии обусловлена особенностями из нанесения на сетки при пробоподготовке к измерениям методом ПЭМ.

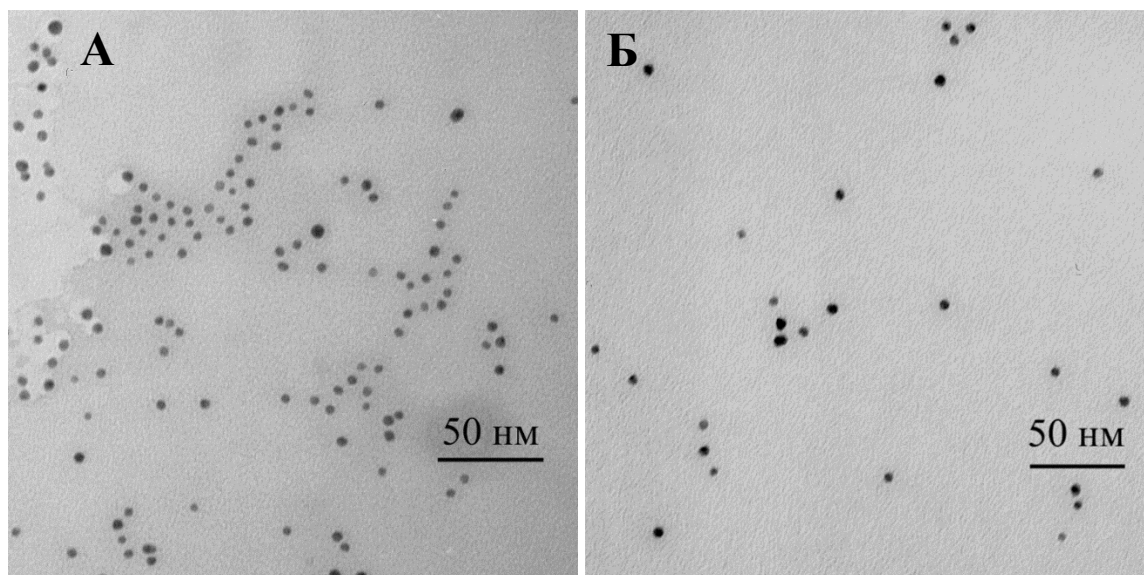


Рисунок 46. ПЭМ микрофотографии конъюгатов НЧЗ со стрептавидином до центрифугирования: (А) – pH=6,5, концентрация стрептавидина – 60 мкг/мл; (Б) – pH=9,0, концентрация стрептавидина – 80 мкг/мл

На основании проведенного анализа были выбраны следующие условия для синтеза конъюгатов НЧЗ-стрептавидин: pH = 9,0; концентрация стрептавидина, равная 40 мкг/мл.

Чтобы иммобилизовать на поверхности НЧЗ максимально возможное количество аптамера, была взята избыточная (исходя из теоретических расчетов) концентрация биотинилированного аптамера. К раствору НЧЗ с концентрацией 12,5 нМ добавляли 600 нМ биотинилированного аптамера (мольное соотношение 1:48). Для связывания с аптамером использовали бессолевой буфер 10 мМ Трис-HCl, pH 8,5.

Аптамер, связавшийся с конъюгатом стрептавидин-НЧЗ, был отделен от несвязавшегося центрифугированием. Полученный осадок перерастворяли в 10 мМ Трис-HCl, pH 8,5. Для определения количества связанного аптамера использовали исходный раствор добавляемого аптамера и надосадочный препарат, тестируя их связывание с ОТА-ФЛУ методом поляризации флуоресценции.

Показано, что концентрация аптамера, связавшегося с поверхностью наночастиц, составила 183 ± 35 нМ, соответствуя связыванию с иммобилизованным стрептавидином в соотношении 2:1.

3.5.4 Разработка методики ПФ аптамерного определения ОТА

Для выбора условий ПФ аптамерного анализа с использованием НЧЗ вначале получили зависимость ПФ от концентрации аптамера, сорбированного на поверхности НЧЗ – см. рис. 47.

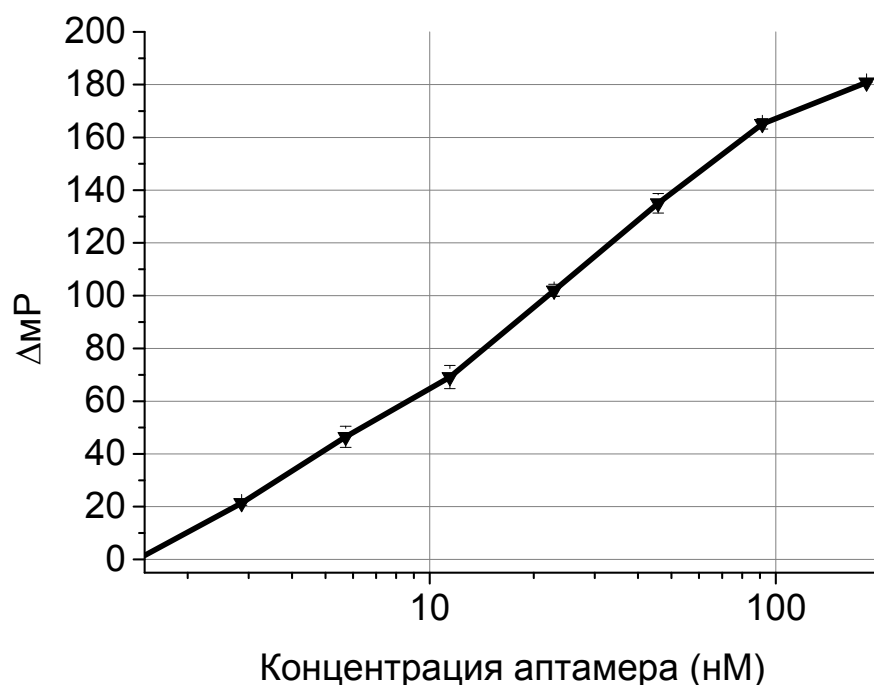


Рисунок 47. Зависимость изменения ПФ ОТА-ФЛУ от концентрации биотинилированного аптамера, связанного с конъюгатом стрептавидин-НЧЗ. (n=3)

Концентрация конъюгата аптамер-стрептавидин-НЧЗ с оптической плотностью 0,2 (соответствующая концентрации аптамера 40 нМ) была выбрана для конкурентного эксперимента. Далее была получена конкурентная зависимость от концентрации ОТА с использованием НЧЗ в качестве якоря и сопоставлена с конкурентной зависимостью для свободного аптамера (концентрация 800 нМ) – см. рис. 48.

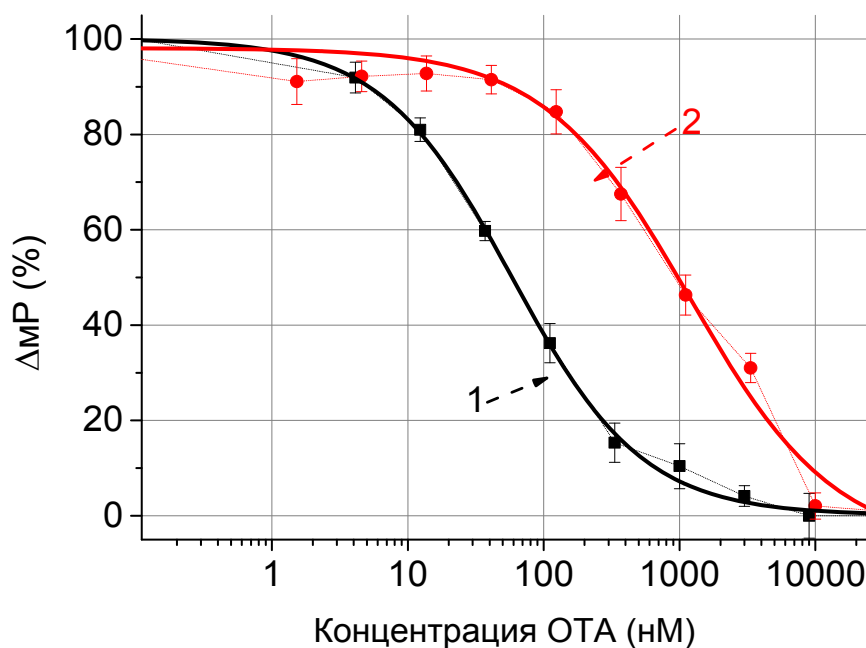


Рисунок 48. Конкурентные зависимости ПФ аптамерного определения ОТА с использованием комплекса аптамер-стрептавидин-НЧЗ (1) и свободного аптамера (2). (n=2)

ПрО определялся как концентрация ОТА, приводящая в ходе конкуренции к снижению концентрации комплекса аптамер-ОТА-ФЛУ на 10%. Согласно рис. 48, ПрО равен 2,9 нМ для анализа с конъюгатом аптамера и 80 нМ для анализа со свободным аптамером. Таким образом, связывание аптамера с конъюгатом стрептавидин-НЧЗ снижает предел обнаружения в 27 раз. Согласно международным нормативам, предельно допустимая концентрация ОТА в продуктах питания варьирует от 0,5 до 10 мкг/кг [244, 245]. Достигнутое снижение предела обнаружения делает перспективной апробацию разработанной системы с якорным усилением НЧЗ для контроля ОТА в сложных матриксах.

3.6. Апробация разработанной аналитической системы для определения ОТА в пробах вина

3.6.1 Сравнение предложенных подходов для определения ОТА в пробах вина

Предложенные способы снижения ПрО конкурентного ПФ аптамерного анализа с помощью белков и НЧЗ в качестве якорных структур были применены для выявления ОТА в сложном матриксе – белом вине – после предварительной пробоподготовки. Выбор вина в качестве объекта обусловлен его частой контаминацией ОТА [248, 304].

Пробоподготовка – двухстадийное обесцвечивание вина с использованием ПВП-30 удаляет полифенолы и другие мешающие проведению анализа компоненты матрикса [270, 305]. В ходе пробоподготовки pH среды изменяли с исходных 3 единиц до 8,5, а также добавляли 20 мМ CaCl₂. Тем самым обеспечивались условия максимальной функциональности метки (высокий квантовый выход флуоресцеина) и рецептора (эффективное связывание ОТА G-квадруплексной структурой аптамера).

Для сравнения предложенных вариантов ПФ анализа были получены калибровочные кривые: (1) с аптамером, (2) с комплексом аптамер-стрептавидин-IgG и (3) с конъюгатом аптамер-стрептавидин-НЧЗ. При этом использовались ранее выбранные оптимальные концентрации препаратов рецепторов, составлявшие по аптамеру 100, 200 и 40 нМ для вариантов (1)-(3), соответственно.

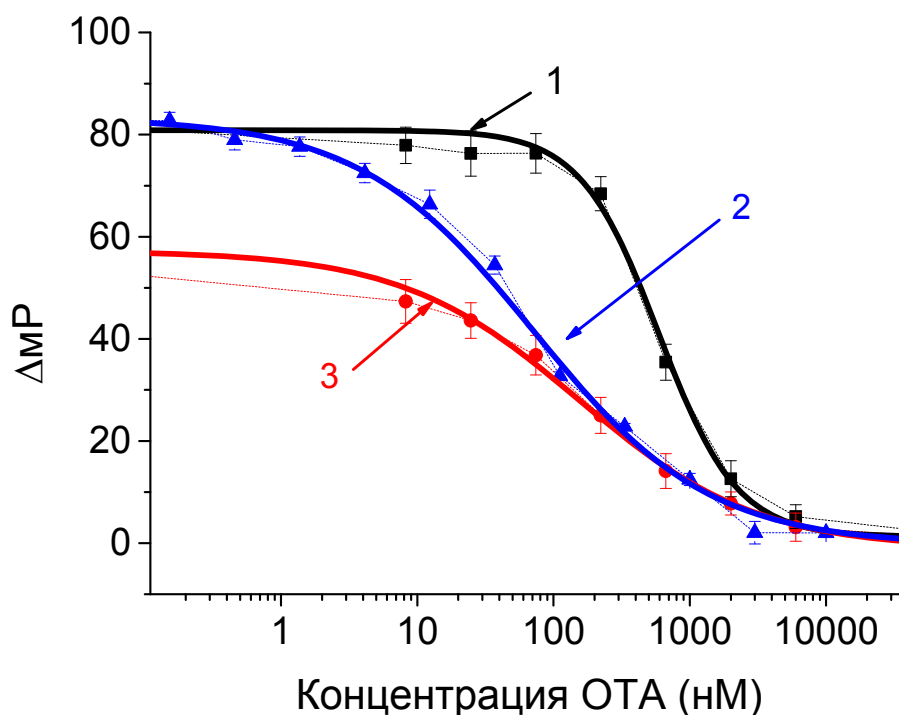


Рисунок 49. Калибровочные зависимости ПФ от концентрации ОТА в вине с использованием в качестве рецептора свободного аптамера (1), комплекса аптамер-стрептавидин-IgG (2) и конъюгата аптамер-стрептавидин-НЧЗ (3)

По представленным на рис. 49 кривым были рассчитаны пределы обнаружения. При использовании в качестве рецептора свободного аптамера был получен наихудший ПрО – 151,4 нМ (61,1 мкг/кг). Для комплекса аптамер-стрептавидин-НЧЗ ПрО составил 5,6 нМ (2,3 мкг/кг), т.е. в 27 раз меньше. Наиболее чувствительным был анализ с применением тройного аптамер-белкового комплекса; ПрО равнялся 2,8 нМ (1,1 мкг/кг), т.е. был в 54 раза

ниже, чем ПрО анализа со свободным аптамером. Значения ПрО для анализа ОТА в вин, согласуются с величинами, ранее полученными в буферном растворе.

3.6.2. Исследование ОТА-положительных проб вина методом ПФ аптамерного анализа

Чтобы подтвердить практическую применимость предложенного ПФ аптамерного анализа, были подготовлены пробы с введением известного количества ОТА в вино, не содержащее ОТА. Содержание ОТА в этих пробах определялось по градуировочной зависимости ПФ аптамерного анализа с использованием тройного аптамер-белкового комплекса.

Таблица 12. Исследование содержания ОТА в ОТА-положительных пробах вина методом ПФ с использованием тройного аптамерного комплекса аптамер-белок. (n = 4)

Добавлено, нМ	Выявлено, нМ	Доля выявленного ОТА, %
375	328,6	87,6
200	213	106,5
187	160,2	85,7
175	194,9	111,4
100	109,3	109,3
93	77,6	83,4
50	54,3	108,6
44	48,4	110,0
25	28,2	112,7

Результаты выявления ОТА представлены в таблице 12. Доля выявленного ОТА варьирует от 83% до 113%. Таким образом, предлагаемый анализ обладает высокой степенью достоверности и может применяться для определения концентраций ОТА ниже ПДК в пробах белого вина.

* * *

Показано, что аптамерный рецептор может быть использован в чувствительной ПФ аналитической системе и такая система пригодна для характеристики в сложных матриксах. Предложенный якорный подход обеспечивает значительный выигрыш в пределе обнаружения и может стать эффективным решением для выявления низкомолекулярных контаминантов с помощью конкурентного ПФ аптамерного анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты исследований позволяют сделать следующие выводы:

1. Показано, что образование G-квадруплексной структуры аптамера к охратоксину А стабилизируется ионами двухвалентных металлов кальция и магния. Наличие у аптамера G-квадруплексной структуры в присутствии ионов двухвалентных металлов коррелирует с охратоксин А-связывающей активностью.

2. Разработан алгоритм определения равновесной константы реакции аптамер-лиганд, основанный на регистрации анизотропии флуоресценции. Для комплекса аптамера с охратоксином А определена константа диссоциации, равная 63 ± 11 нМ. Данная величина в пределах ошибки измерений соответствует константе, полученной референсным методом – равновесным диализом.

3. Впервые показано, что связывание охратоксина А с аптамером сопровождается резонансным переносом энергии, приводящим к увеличению собственной флуоресценции охратоксина А в комплексе с аптамером при длинах волн экстинкции/эмиссии 265/425 нм. Предложен способ характеристики взаимодействия аптамер-охратоксин А, основанный на детекции изменений собственной флуоресценции охратоксина А.

4. Предложен новый подход для снижения предела обнаружения поляризационного флуоресцентного аптамерного анализа, основанный на применении молекулярных якорей – включении аптамера в комплексы с белками и наночастицами.

5. Проведена апробация разработанной поляризационной флуоресцентной аптамерной системы для детекции охратоксина А в пробах вина. Показано, что якорное усиление снижает предел обнаружения в 54 раза и позволяет определять охратоксин А в концентрациях до 1,1 мкг/кг, что ниже его предельно допустимой концентрации в вине.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mairal T., Ozalp V. C., Sanchez P. L., Mir M., Katakis I., O'Sullivan C. K. Aptamers: molecular tools for analytical applications // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2008. — Vol. 390, № 4. — P. 989-1007.
2. JECFA, Safety Evaluations of Certain Food Additives and Contaminants. Ochratoxin A (addendum). — In WHO Food Additive Series 59. — Switzerland, Geneva: IPCS. — 2008. — P. 357-429.
3. Smith D. S., Eremin S. A. Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2008. — Vol. 391, № 5. — P. 1499-1507.
4. Watson J. D., Crick F. H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid // *Nature*. — 1953. — Vol. 171, № 4356. — P. 737-738.
5. Spirin A. S. On macromolecular structure of native high-polymer ribonucleic acid in solution // *Journal of Molecular Biology*. — 1960. — Vol. 2, № 6. — P. 436-446.
6. Doty P., Boedtker H., Fresco J. R., Hall B. D., Haselkorn R. Configurational studies of polynucleotides and ribonucleic acid // *Annals of the New York Academy of Sciences*. — 1959. — Vol. 81. — P. 693-708.
7. Crick F. Central dogma of molecular biology // *Nature*. — 1970. — Vol. 227, № 5258. — P. 561-563.
8. Crick F. H. The origin of the genetic code // *Journal of Molecular Biology*. — 1968. — Vol. 38, № 3. — P. 367-379.
9. Orgel L. E. Evolution of the genetic apparatus // *Journal of Molecular Biology*. — 1968. — Vol. 38, № 3. — P. 381-93.
10. Woese C. R. The genetic code: the molecular basis for genetic expression. — New York: Harper & Row. 1967. — 200 p.
11. Kruger K., Grabowski P. J., Zaug A. J., Sands J., Gottschling D. E., Cech T. R. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena* // *Cell*. — 1982. — Vol. 31, № 1. — P. 147-157.
12. Sharp P. A. On the origin of RNA splicing and introns // *Cell*. — 1985. — Vol. 42, № 2. — P. 397-400.
13. Pace N. R., Marsh T. L. RNA catalysis and the origin of life // *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. — 1985. — Vol. 16, № 2. — P. 97-116.
14. Gilbert W. Origin of Life - the Rna World // *Nature*. — 1986. — Vol. 319, № 6055. — P. 618.
15. Joyce G. F. RNA evolution and the origins of life // *Nature*. — 1989. — Vol. 338. — P. 217.

16. Mullis K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction // *Scientific American*. — 1990. — Vol. 262, № 4. — P. 56-61, 64-65.
17. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1977. — Vol. 74, № 12. — P. 5463-5467.
18. Beaucage S. L., Iyer R. P. Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach // *Tetrahedron*. — 1992. — Vol. 48, № 12. — P. 2223-2311.
19. Fitts R., Diamond M., Hamilton C., Neri M. DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1983. — Vol. 46, № 5. — P. 1146.
20. Midthun K., Valdesuso J., Hoshino Y., Flores J., Kapikian A. Z., Chanock R. M. Analysis by RNA-RNA hybridization assay of intertypic rotaviruses suggests that gene reassortment occurs in vivo // *Journal of Clinical Microbiology*. — 1987. — Vol. 25, № 2. — P. 295-300.
21. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature*. — 1975. — Vol. 256, № 5517. — P. 495-497.
22. Robertson D. L., Joyce G. F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA // *Nature*. — 1990. — Vol. 344, № 6265. — P. 467-468.
23. Ellington A. D., Szostak J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands // *Nature*. — 1990. — Vol. 346, № 6287. — P. 818-822.
24. Tuerk C., Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase // *Science*. — 1990. — Vol. 249, № 4968. — P. 505-510.
25. Klug S. J., Famulok M. All you wanted to know about SELEX // *Molecular Biology Reports*. — 1994. — Vol. 20, № 2. — P. 97-107.
26. Dong Y. *Aptamers for Analytical Applications: Affinity Acquisition and Method Design* — Weinheim: Wiley-VCH. 2018. — 432 p.
27. Ozer A., Pagano J. M., Lis J. T. New technologies provide quantum changes in the scale, speed, and success of SELEX methods and aptamer characterization // *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. — 2014. — Vol. 3. — P. e183.
28. Sefah K., Shangguan D., Xiong X., O'Donoghue M. B., Tan W. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX // *Nature Protocols*. — 2010. — Vol. 5. — P. 1169.
29. Yan W. L., Gu L. D., Liu S., Ren W., Lyu M. S., Wang S. J. Identification of a highly specific DNA aptamer for *Vibrio vulnificus* using systematic evolution of ligands by exponential enrichment coupled with asymmetric PCR // *Journal of Fish Diseases*. — 2018. — Vol. 41, № 12. — P. 1821-1829.

30. Zimmermann B., Gesell T., Chen D., Lorenz C., Schroeder R. Monitoring genomic sequences during SELEX using high-throughput sequencing: neutral SELEX // *PloS one*. — 2010. — Vol. 5, № 2. — P. e9169.
31. Takahashi M., Wu X. W., Ho M., Chomchan P., Rossi J. J., Burnett J. C., Zhou J. H. High throughput sequencing analysis of RNA libraries reveals the influences of initial library and PCR methods on SELEX efficiency // *Scientific Reports*. — 2016. — Vol. 6.
32. Boese B. J., Corbino K., Breaker R. R. In vitro selection and characterization of cellulose-binding RNA aptamers using isothermal amplification // *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*. — 2008. — Vol. 27, № 8. — P. 949-966.
33. Gopinath S. C. B. Aptamers // *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. — 2011. — URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470027318.a1402.pub2> (дата обращения: 20.03.2019).
34. Jenison R. D., Gill S. C., Pardi A., Polisky B. High-resolution molecular discrimination by RNA // *Science*. — 1994. — Vol. 263, № 5152. — P. 1425-1429.
35. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edition. — New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989. — 1546 p.
36. Schütze T., Wilhelm B., Greiner N., Braun H., Peter F., Mörl M., Erdmann V. A., Lehrach H., Konthur Z., Menger M., Arndt P. F., Glöckler J. Probing the SELEX process with next-generation sequencing // *PloS one*. — 2011. — Vol. 6, № 12. — P. e29604.
37. Ellington A. D., Szostak J. W. Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures // *Nature*. — 1992. — Vol. 355, № 6363. — P. 850-852.
38. Bartel D. P., Szostak J. W. Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences [see comment] // *Science*. — 1993. — Vol. 261, № 5127. — P. 1411.
39. Breaker R. R., Joyce G. F. A DNA enzyme that cleaves RNA // *Chemistry & Biology*. — 1994. — Vol. 1, № 4. — P. 223-229.
40. Gopinath S. C. B. Methods developed for SELEX // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2007. — Vol. 387, № 1. — P. 171-182.
41. Pobanz K., Luptak A. Improving the odds: Influence of starting pools on in vitro selection outcomes // *Methods*. — 2016. — Vol. 106. — P. 14-20.
42. Zhou J. H., Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges // *Nature Reviews Drug Discovery*. — 2017. — Vol. 16, № 3. — P. 181-202.
43. Marshall K. A., Ellington A. D. In vitro selection of RNA aptamers // *Rna-Ligand Interactions, Part B*. — 2000. — Vol. 318. — P. 193-214.
44. Cho M., Soo Oh S., Nie J., Stewart R., Eisenstein M., Chambers J., Marth J. D., Walker F., Thomson J. A., Soh H. T. Quantitative selection and parallel characterization of aptamers //

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2013. — Vol. 110, № 46. — P. 18460-18465.
45. Wang T., Chen C. Y., Larcher L. M., Barrero R. A., Veedu R. N. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development // *Biotechnology Advances*. — 2019. — Vol. 37, № 1. — P. 28-50.
46. Darmostuk M., Rimpelova S., Gbelcova H., Ruml T. Current approaches in SELEX: an update to aptamer selection technology // *Biotechnology Advances*. — 2015. — Vol. 33, № 6, Part 2. — P. 1141-1161.
47. Mendonsa S. D., Bowser M. T. In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis // *Journal of the American Chemical Society*. — 2004. — Vol. 126, № 1. — P. 20-21.
48. Yang J., Bowser M. T. Capillary electrophoresis-SELEX selection of catalytic DNA aptamers for a small-molecule porphyrin target // *Analytical Chemistry*. — 2013. — Vol. 85, № 3. — P. 1525-1530.
49. 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 on a Chip*. — 2015. — Vol. 15, № 2. — P. 486-494.
50. Oh S. S., Ahmad K. M., Cho M., Kim S., Xiao Y., Soh H. T. Improving aptamer selection efficiency through volume dilution, magnetic concentration, and continuous washing in microfluidic channels // *Analytical Chemistry*. — 2011. — Vol. 83, № 17. — P. 6883-6889.
51. Lin H., Zhang W., Jia S., Guan Z., Yang C. J., Zhu Z. Microfluidic approaches to rapid and efficient aptamer selection // *Biomicrofluidics*. — 2014. — Vol. 8, № 4.
52. Guo K. T., Paul A., Schichor C., Ziemer G., Wendel H. P. CELL-SELEX: Novel perspectives of aptamer-based therapeutics // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2008. — Vol. 9, № 4. — P. 668-678.
53. Barman J. Targeting cancer cells using aptamers: cell-SELEX approach and recent advancements // *RSC Advances*. — 2015. — Vol. 5, № 16. — P. 11724-11732.
54. Klussmann S., Nolte A., Bald R., Erdmann V. A., Furste J. P. Mirror-image RNA that binds D-adenosine // *Nature Biotechnology*. — 1996. — Vol. 14, № 9. — P. 1112-1115.
55. Burke D. H., Willis J. H. Recombination, RNA evolution, and bifunctional RNA molecules isolated through chimeric SELEX // *RNA*. — 1998. — Vol. 4, № 9. — P. 1165-1175.
56. White R., Rusconi C., Scardino E., Wolberg A., Lawson J., Hoffman M., Sullenger B. Generation of species cross-reactive aptamers using "toggle" SELEX // *Molecular therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*. — 2001. — Vol. 4, № 6. — P. 567-573.

57. Smith J. D., Gold L. Conditional-SELEX. Patent US 6.706.482 C12N 15/1048 (20130101). 2004.
58. Jolma A., Kivioja T., Toivonen J., Cheng L., Wei G., Enge M., Taipale M., Vaquerizas J. M., Yan J., Sillanpaa M. J., Bonke M., Palin K., Talukder S., Hughes T. R., Luscombe N. M., Ukkonen E., Taipale J. Multiplexed massively parallel SELEX for characterization of human transcription factor binding specificities // *Genome Research*. — 2010. — Vol. 20, № 6. — P. 861-873.
59. Gong Q., Wang J., Ahmad K. M., Csordas A. T., Zhou J., Nie J., Stewart R., Thomson J. A., Rossi J. J., Soh H. T. Selection strategy to generate aptamer pairs that bind to distinct sites on protein targets // *Analytical Chemistry*. — 2012. — Vol. 84, № 12. — P. 5365-5371.
60. Lai J.-C., Hong C.-Y. Magnetic-assisted rapid aptamer selection (MARAS) for generating high-affinity DNA aptamer using rotating magnetic fields // *ACS Combinatorial Science*. — 2014. — Vol. 16, № 7. — P. 321-327.
61. Nitsche A., Kurth A., Dunkhorst A., Panke O., Sielaff H., Junge W., Muth D., Scheller F., Stocklein W., Dahmen C., Pauli G., Kage A. One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX // *BMC Biotechnology*. — 2007. — Vol. 7, № 1. — P. 48.
62. Hirose K., Tsuchida M., Asakura H., Wakui K., Yoshimoto K., Iida K., Sato M., Shibukawa M., Suganuma M., Saito S. A single-round selection of selective DNA aptamers for mammalian cells by polymer-enhanced capillary transient isotachophoresis // *Analyst*. — 2017. — Vol. 142, № 21. — P. 4030-4038.
63. Arnold S., Pampalakis G., Kantiotou K., Silva D., Cortez C., Missailidis S., Sotiropoulou G. One round of SELEX for the generation of DNA aptamers directed against KLK6 // *Biological Chemistry*. — 2012. — Vol. 393, № 5. — P. 343-353.
64. Berezovski M., Musheev M., Drabovich A., Krylov S. N. Non-SELEX selection of aptamers // *Journal of the American Chemical Society*. — 2006. — Vol. 128, № 5. — P. 1410-1411.
65. Kong H. Y., Byun J. Nucleic Acid Aptamers: New Methods for Selection, Stabilization, and Application in Biomedical Science // *Biomolecules & Therapeutics*. — 2013. — Vol. 21, № 6. — P. 423-434.
66. Yu Z., Gaerig V., Cui Y., Kang H., Gokhale V., Zhao Y., Hurley L. H., Mao H. Tertiary DNA structure in the single-stranded hTERT promoter fragment unfolds and refolds by parallel pathways via cooperative or sequential events // *Journal of the American Chemical Society*. — 2012. — Vol. 134, № 11. — P. 5157-5164.
67. Schroeder R., Barta A., Semrad K. Strategies for RNA folding and assembly // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. — 2004. — Vol. 5, № 11. — P. 908-919.
68. Wilson D. S., Szostak J. W. In vitro selection of functional nucleic acids // *Annual Review of Biochemistry*. — 1999. — Vol. 68. — P. 611-647.

69. Zhou J., Battig M. R., Wang Y. Aptamer-based molecular recognition for biosensor development // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2010. — Vol. 398, № 6. — P. 2471-2480.
70. Day H. A., Pavlou P., Waller Z. A. E. i-Motif DNA: Structure, stability and targeting with ligands // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. — 2014. — Vol. 22, № 16. — P. 4407-4418.
71. Gatto B., Palumbo M., Sissi C. Nucleic Acid Aptamers Based on the G-Quadruplex Structure: Therapeutic and Diagnostic Potential // *Current Medicinal Chemistry*. — 2009. — Vol. 16, № 10. — P. 1248-1265.
72. Serganov A., Patel D. J. Metabolite recognition principles and molecular mechanisms underlying riboswitch function // *Annual Review of Biophysics*. — 2012. — Vol. 41. — P. 343-370.
73. Flinders J., Dieckmann T. NMR spectroscopy of ribonucleic acids // *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. — 2006. — Vol. 48, № 2. — P. 137-159.
74. Huang S., Liang Y., Cui J. G., Xie J. N., Liu Y., Hu B. Q., Xiao Q. Comparative investigation of binding interactions with three steroidal derivatives of d(GGGT)(4) G-quadruplex aptamer // *Steroids*. — 2018. — Vol. 132. — P. 46-55.
75. Ruigrok V. J. B., Levisson M., Hekelaar J., Smidt H., Dijkstra B. W., van der Oost J. Characterization of aptamer-protein complexes by X-ray crystallography and alternative approaches // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2012. — Vol. 13, № 8. — P. 10537-10552.
76. Stagno J. R., Bhandari Y. R., Conrad C. E., Liu Y., Wang Y. X. Real-time crystallographic studies of the adenine riboswitch using an X-ray free-electron laser // *FEBS Journal*. — 2017. — Vol. 284, № 20. — P. 3374-3380.
77. Uhm H., Hohng S. Ligand Recognition Mechanism of Thiamine Pyrophosphate Riboswitch Aptamer // *Bulletin of the Korean Chemical Society*. — 2017. — Vol. 38, № 12. — P. 1465-1473.
78. Battig M. R., Wang Y. Chapter 17: Nucleic acid aptamers for biomaterials development // *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* / Kumbar S. G. и др. — San Diego: Elsevier Science, 2014. — P. 287-299.
79. Wolter A. C., Weickhmann A. K., Nasiri A. H., Hantke K., Ohlenschläger O., Wunderlich C. H., Kreutz C., Duchardt-Ferner E., Wöhnert J. A stably protonated adenine nucleotide with a highly shifted pKa value stabilizes the tertiary structure of a GTP-binding RNA aptamer // *Angewandte Chemie International Edition*. — 2017. — Vol. 56, № 1. — P. 401-404.
80. Hermann T., Patel D. J. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers // *Science*. — 2000. — Vol. 287, № 5454. — P. 820-825.

81. Jiang F., Kumar R. A., Jones R. A., Patel D. J. Structural basis of RNA folding and recognition in an AMP-RNA aptamer complex // *Nature*. — 1996. — Vol. 382, № 6587. — P. 183-186.
82. Zimmermann G. R., Jenison R. D., Wick C. L., Simorre J. P., Pardi A. Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA // *Nature Structural Biology*. — 1997. — Vol. 4, № 8. — P. 644-649.
83. Serganov A., Polonskaia A., Phan A. T., Breaker R. R., Patel D. J. Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch // *Nature*. — 2006. — Vol. 441. — P. 1167.
84. Yang Y., Kochoyan M., Burgstaller P., Westhof E., Famulok M. Structural basis of ligand discrimination by two related RNA aptamers resolved by NMR spectroscopy // *Science*. — 1996. — Vol. 272, № 5266. — P. 1343-1347.
85. Greenleaf W. J., Frieda K. L., Foster D. A. N., Woodside M. T., Block S. M. Direct observation of hierarchical folding in single riboswitch aptamers // *Science* — 2008. — Vol. 319, № 5863. — P. 630-633.
86. Al-Hashimi H. M., Walter N. G. RNA dynamics: it is about time // *Current Opinion in Structural Biology*. — 2008. — Vol. 18, № 3. — P. 321-329.
87. Cordero P., Das R. Rich RNA structure landscapes revealed by mutate-and-map analysis // *PLoS Computational Biology*. — 2015. — Vol. 11, № 11. — P. e1004473.
88. Liberman J. A., Wedekind J. E. Riboswitch structure in the ligand-free state // *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*. — 2012. — Vol. 3, № 3. — P. 369-384.
89. Xia T., Yuan J. H., Fang X. H. Conformational dynamics of an ATP-binding DNA aptamer: a single-molecule study // *Journal of Physical Chemistry B*. — 2013. — Vol. 117, № 48. — P. 14994-15003.
90. Munzar J. D., Ng A., Corrado M., Juncker D. Complementary oligonucleotides regulate induced fit ligand binding in duplexed aptamers // *Chemical Science*. — 2017. — Vol. 8, № 3. — P. 2251-2256.
91. Warfield B. M., Anderson P. C. Molecular simulations and Markov state modeling reveal the structural diversity and dynamics of a theophylline-binding RNA aptamer in its unbound state // *PloS one*. — 2017. — Vol. 12, № 4. — P. e0176229.
92. Ottink O. M., Rampersad S. M., Tessari M., Zaman G. J. R., Heus H. A., Wijmenga S. S. Ligand-induced folding of the guanine-sensing riboswitch is controlled by a combined predetermined induced fit mechanism // *RNA*. — 2007. — Vol. 13, № 12. — P. 2202-2212.
93. Rode A. B., Endoh T., Sugimoto N. Crowding shifts the FMN recognition mechanism of riboswitch aptamer from conformational selection to induced fit // *Angewandte Chemie*. — 2018. — Vol. 57, № 23. — P. 6868-6872.

94. McKeague M., McConnell E. M., Cruz-Toledo J., Bernard E. D., Pach A., Mastronardi E., Zhang X. R., Beking M., Francis T., Giamberardino A., Cabecinha A., Ruscito A., Aranda-Rodriguez R., Dumontier M., DeRosa M. C. Analysis of in vitro aptamer selection parameters // *Journal of Molecular Evolution*. — 2015. — Vol. 81, № 5-6. — P. 150-161.
95. McKeague M., Derosa M. C. Challenges and opportunities for small molecule aptamer development // *Journal of Nucleic Acids*. — 2012. — Vol. 2012. — P. 748913.
96. Pieken W. A., Olsen D. B., Benseler F., Aurup H., Eckstein F. Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes // *Science*. — 1991. — Vol. 253, № 5017. — P. 314-317.
97. Williams D. M., Benseler F., Eckstein F. Properties of 2'-fluorothymidine-containing oligonucleotides: interaction with restriction endonuclease EcoRV // *Biochemistry*. — 1991. — Vol. 30, № 16. — P. 4001-4009.
98. Luzi E., Minunni M., Tombelli S., Mascini M. New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding // *Trends in Analytical Chemistry*. — 2003. — Vol. 22, № 11. — P. 810-818.
99. Nakamura Y. Aptamer: Biology to Applications // *Nucleic Acid Drugs* / Murakami A. — Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. — P. 135-152.
100. Antipova O. M., Zavyalova E. G., Golovin A. V., Pavlova G. V., Kopylov A. M., Reshetnikov R. V. Advances in the application of modified nucleotides in SELEX technology // *Biochemistry (Moscow)*. — 2018. — Vol. 83, № 10. — P. 1161-1172.
101. Alexander-Bryant A. A., Vanden Berg-Foels W. S., Wen X. Chapter One - Bioengineering strategies for designing targeted cancer therapies. // *Advances in Cancer Research* / Tew K. D., Fisher P. B. — New York: Academic Press, 2013. — P. 1-59.
102. Ilgu M., Nilsen-Hamilton M. Aptamers in analytics // *Analyst*. — 2016. — Vol. 141, № 5. — P. 1551-1568.
103. Nezlin R. Use of aptamers in immunoassays // *Molecular Immunology*. — 2016. — Vol. 70. — P. 149-154.
104. Pfeiffer F., Mayer G. Selection and Biosensor Application of Aptamers for Small Molecules // *Frontiers in Chemistry*. — 2016. — Vol. 4. — P. 25.
105. Sefah K., Yang Z. Y., Bradley K. M., Hoshika S., Jimenez E., Zhang L. Q., Zhu G. Z., Shanker S., Yu F. H., Turek D., Tan W. H., Benner S. A. In vitro selection with artificial expanded genetic information systems // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2014. — Vol. 111, № 4. — P. 1449-1454.
106. Biondi E., Lane J. D., Das D., Dasgupta S., Piccirilli J. A., Hoshika S., Bradley K. M., Krantz B. A., Benner S. A. Laboratory evolution of artificially expanded DNA gives redesignable

- aptamers that target the toxic form of anthrax protective antigen // *Nucleic Acids Research*. — 2016. — Vol. 44, № 20. — P. 9565-9577.
107. Zheng X., Li Z., Beeram S., Podariu M., Matsuda R., Pfaunmiller E. L., White C. J., 2nd, Carter N., Hage D. S. Analysis of biomolecular interactions using affinity microcolumns: a review // *Journal of chromatography. B*. — 2014. — Vol. 968. — P. 49-63.
108. Jing M., Bowser M. T. Methods for measuring aptamer-protein equilibria: a review // *Analytica Chimica Acta*. — 2011. — Vol. 686, № 1-2. — P. 9-18.
109. Šmuc T., Ahn I.-Y., Ulrich H. Nucleic acid aptamers as high affinity ligands in biotechnology and biosensorics // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. — 2013. — Vol. 81-82. — P. 210-217.
110. Jia W. C., Lu Z. Y., Yang H., Li H., Xu D. K. Elimination terminal fixed region screening and high-throughput kinetic determination of aptamer for lipocalin-1 by surface plasmon resonance imaging // *Analytica Chimica Acta*. — 2018. — Vol. 1043. — P. 158-166.
111. Tsuji S., Tanaka T., Hirabayashi N., Kato S., Akitomi J., Egashira H., Waga I., Ohtsu T. RNA aptamer binding to polyhistidine-tag // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2009. — Vol. 386, № 1. — P. 227-231.
112. Bayrac C., Oktem H. A. Evaluation of *Staphylococcus aureus* DNA aptamer by enzyme-linked aptamer assay and isothermal titration calorimetry // *Journal of Molecular Recognition*. — 2017. — Vol. 30, № 2. — P. e2583.
113. Martin J. A., Chavez J. L., Chushak Y., Chapleau R. R., Hagen J., Kelley-Loughnane N. Tunable stringency aptamer selection and gold nanoparticle assay for detection of cortisol // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2014. — Vol. 406, № 19. — P. 4637-4647.
114. Valenzano S., De Girolamo A., DeRosa M. C., McKeague M., Schena R., Catucci L., Pascale M. Screening and identification of DNA aptamers to tyramine using in vitro selection and high-throughput sequencing // *ACS Combinatorial Science*. — 2016. — Vol. 18, № 6. — P. 302-313.
115. Zhang Z., Oni O., Liu J. New insights into a classic aptamer: binding sites, cooperativity and more sensitive adenosine detection // *Nucleic Acids Research*. — 2017. — Vol. 45, № 13. — P. 7593-7601.
116. Moon M. H., Hilimire T. A., Sanders A. M., Schneekloth J. S. Measuring RNA-Ligand Interactions with Microscale Thermophoresis // *Biochemistry*. — 2018. — Vol. 57, № 31. — P. 4638-4643.
117. Jerabek-Willemsen M., Andre T., Wanner R., Roth H. M., Duhr S., Baaske P., Breitsprecher D. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond // *Journal of Molecular Structure*. — 2014. — Vol. 1077. — P. 101-113.

118. Drabovich A. P., Berezovski M., Okhonin V., Krylov S. N. Selection of smart aptamers by methods of kinetic capillary electrophoresis // *Analytical Chemistry*. — 2006. — Vol. 78, № 9. — P. 3171-3178.
119. McKeague M., De Girolamo A., Valenzano S., Pascale M., Ruscito A., Velu R., Frost N. R., Hill K., Smith M., McConnell E. M., DeRosa M. C. Comprehensive analytical comparison of strategies used for small molecule aptamer evaluation // *Analytical Chemistry*. — 2015. — Vol. 87, № 17. — P. 8608-8612.
120. Geng X., Zhang D., Wang H., Zhao Q. Screening interaction between ochratoxin A and aptamers by fluorescence anisotropy approach // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2013. — Vol. 405, № 8. — P. 2443-2449.
121. Perrier S., Ravelet C., Guieu V., Fize J., Roy B., Perigaud C., Peyrin E. Rationally designed aptamer-based fluorescence polarization sensor dedicated to the small target analysis // *Biosensors & Bioelectronics*. — 2010. — Vol. 25, № 7. — P. 1652-1657.
122. Aptagen's Aptamer Index Database [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.aptagen.com/aptamer-index> (дата обращения: 21.03.2019).
123. Cruz-Toledo J., McKeague M., Zhang X., Giamberardino A., McConnell E., Francis T., DeRosa M. C., Dumontier M. Aptamer base: a collaborative knowledge base to describe aptamers and SELEX experiments // *Database*. — 2012. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3308162/> (дата обращения: 20.03.2019).
124. Kaur H., Bruno J. G., Kumar A., Sharma T. K. Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines // *Aptamers in the therapeutics and diagnostics pipelines*. — 2018. — Vol. 8, № 15. — P. 4016-4032.
125. 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. — Vol. 154. — P. 132-155.
126. Avci-Adali M., Steinle H., Michel T., Schlensak C., Wendel H. P. Potential capacity of aptamers to trigger immune activation in human blood // *PLoS One*. — 2013. — URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068810> (дата обращения: 19.03.2019).
127. Mena A., Nichani A. K., Popowych Y., Godson D. L., Dent D., Townsend H. G., Mutwiri G. K., Hecker R., Babiuk L. A., Griebel P. Innate immune responses induced by CpG oligodeoxyribonucleotide stimulation of ovine blood mononuclear cells // *Immunology*. — 2003. — Vol. 110, № 2. — P. 250-257.
128. Chen J. H., Fang Z. Y., Liu J., Zeng L. W. A simple and rapid biosensor for ochratoxin A based on a structure-switching signaling aptamer // *Food Control*. — 2012. — Vol. 25, № 2. — P. 555-560.

129. Nutiu R., Li Y. F. Structure-switching signaling aptamers // *Journal of the American Chemical Society*. — 2003. — Vol. 125, № 16. — P. 4771-4778.
130. Durand G., Dausse E., Goux E., Fiore E., Peyrin E., Ravelet C., Toulme J. J. A combinatorial approach to the repertoire of RNA kissing motifs; towards multiplex detection by switching hairpin aptamers // *Nucleic Acids Research*. — 2016. — Vol. 44, № 9. — P. 4450-4459.
131. Goux E., Lisi S., Ravelet C., Durand G., Fiore E., Dausse E., Toulme J. J., Peyrin E. An improved design of the kissing complex-based aptasensor for the detection of adenosine // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2015. — Vol. 407, № 21. — P. 6515-6524.
132. Robertson M. P., Ellington A. In vitro selection of an allosteric ribozyme that transduces analytes to amplicons // *Nature Biotechnology*. — 1999. — Vol. 17. — P. 62.
133. Achenbach J. C., Nutiu R., Li Y. F. Structure-switching allosteric deoxyribozymes // *Analytica Chimica Acta*. — 2005. — Vol. 534, № 1. — P. 41-51.
134. Burgstaller P., Jenne A., Blind M. Aptamers and aptazymes: accelerating small molecule drug discovery // *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. — 2002. — Vol. 5, № 5. — P. 690-700.
135. Schuling T., Eilers A., Scheper T., Walter J. Aptamer-based lateral flow assays // *AIMS Bioengineering*. — 2018. — Vol. 5, № 2. — P. 78-102.
136. Yazdian-Robati R., Hedayati N., Ramezani M., Abnous K., Taghdisi S. M. Colorimetric gold nanoparticles-based aptasensors // *Nanomedicine Journal*. — 2018. — Vol. 5, № 1. — P. 1-5.
137. Musumeci D., Platella C., Riccardi C., Moccia F., Montesarchio D. Fluorescence sensing using DNA aptamers in cancer research and clinical diagnostics // *Cancers*. — 2017. — Vol. 9, № 12. — P. 43.
138. Sharma A., Khan R., Catanante G., Sherazi Vol. A., Bhand S., Hayat A., Marty J. L. Designed strategies for fluorescence-based biosensors for the detection of mycotoxins // *Toxins*. — 2018. — Vol. 10, № 5. — P. 197.
139. Wang R. E., Zhang Y., Cai J., Cai W., Gao T. Aptamer-based fluorescent biosensors // *Current Medicinal Chemistry*. — 2011. — Vol. 18, № 27. — P. 4175-4184.
140. Li F., Yu Z., Han X., Lai R. Y. Electrochemical aptamer-based sensors for food and water analysis: A review // *Analytica Chimica Acta*. — 2019. — Vol. 1051. — P. 1-23.
141. Barthelmebs L., Jonca J., Hayat A., Prieto-Simon B., Marty J. L. Enzyme-linked aptamer assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of ochratoxin A in wine // *Food Control*. — 2011. — Vol. 22, № 5. — P. 737-743.
142. Wu S. J., Liu L. H., Duan N., Li Q., Zhou Y., Wang Z. P. Aptamer-based lateral flow test strip for rapid detection of zearalenone in corn samples // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2018. — Vol. 66, № 8. — P. 1949-1954.

143. Kim Y. S., Kim J. H., Kim I. A., Lee S. J., Jurng J., Gu M. B. A novel colorimetric aptasensor using gold nanoparticle for a highly sensitive and specific detection of oxytetracycline // *Biosensors & Bioelectronics*. — 2010. — Vol. 26, № 4. — P. 1644-1649.
144. Wang S., Yong W., Liu J., Zhang L., Chen Q., Dong Y. Development of an indirect competitive assay-based aptasensor for highly sensitive detection of tetracycline residue in honey // *Biosensors & Bioelectronics*. — 2014. — Vol. 57. — P. 192-198.
145. Chávez J. L., MacCuspie R. I., Stone M. O., Kelley-Loughnane N. Colorimetric detection with aptamer–gold nanoparticle conjugates: effect of aptamer length on response // *Journal of Nanoparticle Research*. — 2012. — Vol. 14, № 10. — P. 1166.
146. Zhao W., Brook M. A., Li Y. F. Design of gold nanoparticle□based colorimetric biosensing assays // *ChemBioChem*. — 2008. — Vol. 9, № 15. — P. 2363-2371.
147. Liu J. W., Mazumdar D., Lu Y. A simple and sensitive "dipstick" test in serum based on lateral flow separation of aptamer-linked nanostructures" // *Angewandte Chemie*. — 2006. — Vol. 118, № 47. — P. 8123-8127.
148. Zhu C., Zhao Y., Yan M. M., Huang Y. F., Yan J., Bai W. H., Chen A. L. A sandwich dipstick assay for ATP detection based on split aptamer fragments // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2016. — Vol. 408, № 15. — P. 4151-4158.
149. Alsager O. A., Kumar S., Hodgkiss J. M. Lateral flow aptasensor for small molecule targets exploiting adsorption and desorption interactions on gold nanoparticles // *Analytical Chemistry*. — 2017. — Vol. 89, № 14. — P. 7416-7424.
150. Peng Y., Li L., Mu X., Guo L. Aptamer-gold nanoparticle-based colorimetric assay for the sensitive detection of thrombin // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2013. — Vol. 177. — P. 818-825.
151. Huang C. C., Huang Y. F., Cao Z., Tan W., Chang H. T. Aptamer-modified gold nanoparticles for colorimetric determination of platelet-derived growth factors and their receptors // *Analytical Chemistry*. — 2005. — Vol. 77, № 17. — P. 5735-5741.
152. Adhikari M., Strych U., Kim J., Goux H., Dhamane S., Poongavanam M. V., Hagstrom A. E. V., Kourentzi K., Conrad J. C., Willson R. C. Aptamer-phage reporters for ultrasensitive lateral flow assays // *Analytical Chemistry*. — 2015. — Vol. 87, № 23. — P. 11660-11665.
153. Fischer C., Wessels H., Paschke-Kratzin A., Fischer M. Aptamers: universal capture units for lateral flow applications // *Analytical Biochemistry*. — 2017. — Vol. 522. — P. 53-60.
154. Qin C. Y., Gao Y., Wen W., Zhang X. H., Wang S. F. Visual multiple recognition of protein biomarkers based on an array of aptamer modified gold nanoparticles in biocomputing to strip biosensor logic operations // *Biosensors & Bioelectronics*. — 2016. — Vol. 79. — P. 522-530.

155. Minagawa H., Onodera K., Fujita H., Sakamoto T., Akitomi J., Kaneko N., Shiratori I., Kuwahara M., Horii K., Waga I. Selection, characterization and application of artificial DNA aptamer containing appended bases with sub-nanomolar affinity for a salivary biomarker // *Scientific Reports*. — 2017. — Vol. 7. — P. 42716.
156. Jauset-Rubio M., Svobodová M., Mairal T., McNeil C., Keegan N., El-Shahawi M. S., Bashammakh A. S., Alyoubi A. O., O'Sullivan C. K. Aptamer lateral flow assays for ultrasensitive detection of β -conglutinin combining recombinase polymerase amplification and tailed primers // *Analytical Chemistry*. — 2016. — Vol. 88, № 21. — P. 10701-10709.
157. Le T. T., Chang P., Benton D. J., McCauley J. W., Iqbal M., Cass A. E. G. Dual recognition element lateral flow assay toward multiplex strain specific influenza virus detection // *Analytical Chemistry*. — 2017. — Vol. 89, № 12. — P. 6781-6786.
158. Bruno J. G., Carrillo M. P., Richarte A. M., Phillips T., Andrews C., Lee J. S. Development, screening, and analysis of DNA aptamer libraries potentially useful for diagnosis and passive immunity of arboviruses // *BMC Research Notes*. — 2012. — Vol. 5. — P. 633.
159. Wu W., Zhao S., Mao Y., Fang Z., Lu X., Zeng L. A sensitive lateral flow biosensor for *Escherichia coli* O157:H7 detection based on aptamer mediated strand displacement amplification // *Analytica Chimica Acta*. — 2015. — Vol. 861. — P. 62-68.
160. Fang Z., Wu W., Lu X., Zeng L. Lateral flow biosensor for DNA extraction-free detection of *Salmonella* based on aptamer mediated strand displacement amplification // *Biosensors & Bioelectronics*. — 2014. — Vol. 56. — P. 192-197.
161. Zhao Q., Tao J., Uppal J. S., Peng H., Wang H., Le X. C. Nucleic acid aptamers improving fluorescence anisotropy and fluorescence polarization assays for small molecules // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. — 2019. — Vol. 110. — P. 401-409.
162. Wu S., Duan N., Ma X., Xia Y., Wang H., Wang Z., Zhang Q. Multiplexed fluorescence resonance energy transfer aptasensor between upconversion nanoparticles and graphene oxide for the simultaneous determination of mycotoxins // *Analytical Chemistry*. — 2012. — Vol. 84, № 14. — P. 6263-6270.
163. Sharma A., Catanante G., Hayat A., Istamboulie G., Ben Rejeb I., Bhand S., Marty J. L. Development of structure switching aptamer assay for detection of aflatoxin M1 in milk sample // *Talanta*. — 2016. — Vol. 158. — P. 35-41.
164. Yugender Goud K., Hayat A., Satyanarayana M., Sunil Kumar V., Catanante G., Vengatajalabathy Gobi K., Marty J. L. Aptamer-based zearalenone assay based on the use of a fluorescein label and a functional graphene oxide as a quencher // *Microchimica Acta*. — 2017. — Vol. 184, № 11. — P. 4401-4408.

165. He Y., Lin Y., Tang H., Pang D. A graphene oxide-based fluorescent aptasensor for the turn-on detection of epithelial tumor marker mucin 1 // *Nanoscale*. — 2012. — Vol. 4, № 6. — P. 2054-2059.
166. Wang S. E., Si S. A fluorescent nanoprobe based on graphene oxide fluorescence resonance energy transfer for the rapid determination of oncoprotein vascular endothelial growth factor (VEGF) // *Applied Spectroscopy*. — 2013. — Vol. 67, № 11. — P. 1270-1274.
167. Wei Y., Zhou W., Liu J., Chai Y., Xiang Y., Yuan R. Label-free and homogeneous aptamer proximity binding assay for fluorescent detection of protein biomarkers in human serum // *Talanta*. — 2015. — Vol. 141. — P. 230-234.
168. Li W., Wang K., Tan W., Ma C., Yang X. Aptamer-based analysis of angiogenin by fluorescence anisotropy // *Analyst*. — 2007. — Vol. 132, № 2. — P. 107-113.
169. He J.-L., Wu Z.-S., Zhang S.-B., Shen G.-L., Yu R.-Q. Fluorescence aptasensor based on competitive-binding for human neutrophil elastase detection // *Talanta*. — 2010. — Vol. 80, № 3. — P. 1264-1268.
170. Wang Y. M., Wu Z., Liu S. J., Chu X. Structure-switching aptamer triggering hybridization chain reaction on the cell surface for activatable theranostics // *Analytical Chemistry*. — 2015. — Vol. 87, № 13. — P. 6470-6474.
171. Sassolas A., Blum L. J., Leca-Bouvier B. D. Electrochemical Aptasensors // *Electroanalysis*. — 2009. — Vol. 21, № 11. — P. 1237-1250.
172. Evtugyn G., Porfireva A., Stepanova V., Sitdikov R., Stoikov I., Nikolelis D., Hianik T. Electrochemical aptasensor based on polycarboxylic macrocycle modified with neutral red for aflatoxin B1 detection // *Electroanalysis*. — 2014. — Vol. 26, № 10. — P. 2100-2109.
173. Jiang H.-L., Liu X.-Y., Qiu Y.-x., Yao D.-S., Xie C.-F., Liu D.-L. Development of an aptasensor for the fast detection of Versicolorin A // *Food Control*. — 2015. — Vol. 56. — P. 202-210.
174. Zhu Y., Chandra P., Song K. M., Ban C., Shim Y. B. Label-free detection of kanamycin based on the aptamer-functionalized conducting polymer/gold nanocomposite // *Biosensors & Bioelectronics*. — 2012. — Vol. 36, № 1. — P. 29-34.
175. Yan L., Luo C., Cheng W., Mao W., Zhang D., Ding S. A simple and sensitive electrochemical aptasensor for determination of Chloramphenicol in honey based on target-induced strand release // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. — 2012. — Vol. 687. — P. 89-94.
176. Wang H., Wang Y., Liu S., Yu J., Xu W., Guo Y., Huang J. Target-aptamer binding triggered quadratic recycling amplification for highly specific and ultrasensitive detection of antibiotics at the attomole level // *Chemical Communications*. — 2015. — Vol. 51, № 39. — P. 8377-8380.

177. Mohammad Danesh N., Ramezani M., Sarreshtehdar Emrani A., Abnous K., Taghdisi S. M. A novel electrochemical aptasensor based on arch-shape structure of aptamer-complimentary strand conjugate and exonuclease I for sensitive detection of streptomycin // *Biosensors & Bioelectronics*. — 2016. — Vol. 75. — P. 123-128.
178. Contreras Jiménez G., Eissa S., Ng A., Alhadrami H., Zourob M., Siaj M. Aptamer-based label-free impedimetric biosensor for detection of progesterone // *Analytical Chemistry*. — 2015. — Vol. 87, № 2. — P. 1075-1082.
179. Okoth O. K., Yan K., Feng J., Zhang J. Label-free photoelectrochemical aptasensing of diclofenac based on gold nanoparticles and graphene-doped CdS // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2018. — Vol. 256. — P. 334-341.
180. Li H., Qiao Y., Li J., Fang H., Fan D., Wang W. A sensitive and label-free photoelectrochemical aptasensor using Co-doped ZnO diluted magnetic semiconductor nanoparticles // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2016. — Vol. 77. — P. 378-384.
181. Jiao Y., Jia H., Guo Y., Zhang H., Wang Z., Sun X., Zhao J. An ultrasensitive aptasensor for chlorpyrifos based on ordered mesoporous carbon/ferrocene hybrid multiwalled carbon nanotubes // *RSC Advances*. — 2016. — Vol. 6, № 63. — P. 58541-58548.
182. Prabhakar N., Thakur H., Bharti A., Kaur N. Chitosan-iron oxide nanocomposite based electrochemical aptasensor for determination of malathion // *Analytica Chimica Acta*. — 2016. — Vol. 939. — P. 108-116.
183. Liu Y., Tuleouva N., Ramanculov E., Revzin A. Aptamer-based electrochemical biosensor for interferon gamma detection // *Analytical Chemistry*. — 2010. — Vol. 82, № 19. — P. 8131-8136.
184. Zhao S., Yang W., Lai R. Y. A folding-based electrochemical aptasensor for detection of vascular endothelial growth factor in human whole blood // *Biosensors & Bioelectronics*. — 2011. — Vol. 26, № 5. — P. 2442-2447.
185. Liu Y., Zhou Q., Revzin A. An aptasensor for electrochemical detection of tumor necrosis factor in human blood // *Analyst*. — 2013. — Vol. 138, № 15. — P. 4321-4326.
186. Centi S., Bonel Sanmartin L., Tombelli S., Palchetti I., Mascini M. Detection of C reactive protein (CRP) in serum by an electrochemical aptamer-based sandwich assay // *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*. — 2009. — Vol. 21, № 11. — P. 1309-1315.
187. Ma X., Jiang Y., Jia F., Yu Y., Chen J., Wang Z. An aptamer-based electrochemical biosensor for the detection of Salmonella // *Journal of Microbiological Methods*. — 2014. — Vol. 98. — P. 94-98.

188. Zelada-Guillen G. A., Sebastian-Avila J. L., Blondeau P., Riu J., Rius F. X. Label-free detection of *Staphylococcus aureus* in skin using real-time potentiometric biosensors based on carbon nanotubes and aptamers // *Biosensors & Bioelectronics*. — 2012. — Vol. 31, № 1. — P. 226-32.
189. Cell separation kit (AptoCyto™) [Электронный ресурс]. — URL: http://www.aptsci.com/product/product_1.html. (дата обращения: 21.03.2019).
190. Protein isolation kit (AptoPrep™) [Электронный ресурс]. — URL: http://www.aptsci.com/product/product_2.html (дата обращения: 21.03.2019).
191. The SOMA scan Platform [Электронный ресурс]. — URL: <https://somalogic.com/technology/our-platform/> (дата обращения: 25.03.2019).
192. Sattlecker M., Kiddle S. J., Newhouse S., Proitsi P., Nelson S., Williams S., Johnston C., Killick R., Simmons A., Westman E., Hodges A., Soininen H., Kłoszewska I., Mecocci P., Tsolaki M., Vellas B., Lovestone S., Dobson R. J. B. Alzheimer's disease biomarker discovery using SOMAscan multiplexed protein technology // *Alzheimer's & Dementia*. — 2014. — Vol. 10, № 6. — P. 724-734.
193. Russell T. M., Green L. S., Rice T., Kruh-Garcia N. A., Dobos K., De Groote M. A., Hraha T., Sterling D. G., Janjic N., Ochsner U. A. Potential of high-affinity, slow off-rate modified aptamer reagents for *Mycobacterium tuberculosis* proteins as tools for infection models and diagnostic applications // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2017. — Vol. 55, № 10. — P. 3072-3088.
194. CibusDx Portabl Food Pathogen Detection System Basics [Электронный ресурс]. — URL: <https://cibusdx.com/cibusdx-basics/> (дата обращения: 20.03.2019).
195. Hayashi T., Ishizaki Y., Michihata M., Takaya Y., Tanaka S. I. Nanoparticle sizing method based on fluorescence anisotropy analysis // *Measurement*. — 2015. — Vol. 59. — P. 382-388.
196. Lippolis V., Maragos C. Fluorescence polarisation immunoassays for rapid, accurate and sensitive determination of mycotoxins // *World Mycotoxin Journal*. — 2014. — Vol. 7, № 4. — P. 479-489.
197. Maragos C. Fluorescence polarization immunoassay of mycotoxins: a review // *Toxins* — 2009. — Vol. 1, № 2. — P. 196-207.
198. Dandliker W. B., Kelly R. J., Dandliker J., Farquahar J., Levin J. Fluorescence polarization immunoassay. Theory and experimental method // *Immunochemistry*. — 1973. — Vol. 10, № 4. — P. 219-227.
199. Owicki J. C. Fluorescence polarization and anisotropy in high throughput screening: perspectives and primer // *Journal of Biomolecular Screening*. — 2000. — Vol. 5, № 5. — P. 297-306.

200. Roehrl M. H., Wang J. Y., Wagner G. A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitors of protein-protein interactions by fluorescence polarization // *Biochemistry*. — 2004. — Vol. 43, № 51. — P. 16056-16066.
201. Lakowicz J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. — New York: Springer US. 2006. — 954p.
202. Weber G. Rotational Brownian motion and polarization of the fluorescence of solutions // *Advances in Protein Chemistry*. — 1953. — Vol. 8. — P. 415-459.
203. Szmecinski H., Terpetschnig E., Lakowicz J. R. Synthesis and evaluation of Ru-complexes as anisotropy probes for protein hydrodynamics and immunoassays of high-molecular-weight antigens // *Biophysical Chemistry*. — 1996. — Vol. 62, № 1-3. — P. 109-120.
204. Weber G. Polarization of the fluorescence of solutions // *Fluorescence and phosphorescence analysis: principles and applications* / D.M. H. — New York: Interscience Publishers, 1966.
205. Weber G. Polarization of the fluorescence of macromolecules. I. Theory and experimental method // *The Biochemical Journal*. — 1952. — Vol. 51, № 2. — P. 145-155.
206. Pope A. J., Haupts U. M., Moore K. J. Homogeneous fluorescence readouts for miniaturized high-throughput screening: theory and practice // *Drug Discovery Today*. — 1999. — Vol. 4, № 8. — P. 350-362.
207. Zhang J. H., Chung T. D., Oldenburg K. R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays // *Journal of Biomolecular Screening*. — 1999. — Vol. 4, № 2. — P. 67-73.
208. Reiner D., Stark H. Ligand binding kinetics at histamine H3 receptors by fluorescence-polarization with real-time monitoring // *European Journal of Pharmacology*. — 2019. — Vol. 848. — P. 112-120.
209. Fang E. F., Hou Y., Palikaras K., Adriaanse B. A., Kerr J. S., Yang B., Lautrup S., Hasan-Olive M. M., Caponio D., Dan X., Rocktäschel P., Croteau D. L., Akbari M., Greig N. H., Fladby T., Nilsen H., Cader M. Z., Mattson M. P., Tavernarakis N., Bohr V. A. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease // *Nature Neuroscience*. — 2019. — Vol. 22, № 3. — P. 401-412.
210. Choi J. W., Kang D. K., Park H., deMello A. J., Chang S. I. High-throughput analysis of protein-protein interactions in picoliter-volume droplets using fluorescence polarization // *Analytical Chemistry*. — 2012. — Vol. 84, № 8. — P. 3849-3854.
211. Barbero N., Napione L., Quagliotto P., Pavan S., Barolo C., Barni E., Bussolino F., Viscardi G. Fluorescence anisotropy analysis of protein-antibody interaction // *Dyes and Pigments*. — 2009. — Vol. 83, № 2. — P. 225-229.

212. Tetin S. Y., Swift K. M., Matayoshi E. D. Measuring antibody affinity and performing immunoassay at the single molecule level // *Analytical Biochemistry*. — 2002. — Vol. 307, № 1. — P. 84-91.
213. Brough P. A., Baker L., Bedford S., Brown K., Chavda S., Chell V., D'Alessandro J., Davies N. G., Davis B., Le Strat L., Macias A. T., Maddox D., Mahon P. C., Massey A. J., Matassova N., McKenna S., Meissner J. W., Moore J. D., Murray J. B., Northfield C. J., Parry C., Parsons R., Roughley S. D., Shaw T., Simmonite H., Stokes S., Surgenor A., Stefaniak E., Robertson A., Wang Y., Webb P., Whitehead N., Wood M. Application of off-rate screening in the identification of novel pan-isoform inhibitors of pyruvate dehydrogenase kinase // *Journal of Medicinal Chemistry*. — 2017. — Vol. 60, № 6. — P. 2271-2286.
214. Marholz L. J., Wang W., Zheng Y., Wang X. A fluorescence polarization biophysical assay for the naegleria DNA hydroxylase Tet1 // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. — 2016. — Vol. 7, № 2. — P. 167-171.
215. Ansideri F., Lange A., El-Gokha A., Boeckler F. M., Koch P. Fluorescence polarization-based assays for detecting compounds binding to inactive c-Jun N-terminal kinase 3 and p38alpha mitogen-activated protein kinase // *Analytical Biochemistry*. — 2016. — Vol. 503. — P. 28-40.
216. Wang Y., Killian J., Hamasaki K., Rando R. R. RNA molecules that specifically and stoichiometrically bind aminoglycoside antibiotics with high affinities // *Biochemistry*. — 1996. — Vol. 35, № 38. — P. 12338-12346.
217. Gokulrangan G., Unruh J. R., Holub D. F., Ingram B., Johnson C. K., Wilson G. S. DNA aptamer-based bioanalysis of IgE by fluorescence anisotropy // *Analytical Chemistry*. — 2005. — Vol. 77, № 7. — P. 1963-1970.
218. Zhao Q., Lv Q., Wang H. Identification of allosteric nucleotide sites of tetramethylrhodamine-labeled aptamer for noncompetitive aptamer-based fluorescence anisotropy detection of a small molecule, ochratoxin A // *Analytical Chemistry*. — 2014. — Vol. 86, № 2. — P. 1238-1245.
219. Liu Y., Zhao Q. Direct fluorescence anisotropy assay for cocaine using tetramethylrhodamine-labeled aptamer // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2017. — Vol. 409, № 16. — P. 3993-4000.
220. Dandliker W. B., Feigen G. A. Quantification of the antigen-antibody reaction by the polarization of fluorescence // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 1961. — Vol. 5. — P. 299-304.
221. Eremin S. A. Polarization flouoroimmunoassay for rapid, specific detection of pesticides // *Immunoanalysis of Agrochemicals*. — 1995. — Vol. 586. — P. 223-234.

222. Choi M. J., Lee J. R., Eremin S. A. Development of single reagent for fluorescence polarization immunoassay of atrazine // *Food and Agricultural Immunology*. — 2002. — Vol. 14, № 2. — P. 107-120.
223. Onnerfjord P., Eremin S., Emneus J., Marko-Varga G. Fluorescence polarisation for immunoreagent characterisation // *Journal of Immunological Methods*. — 1998. — Vol. 213, № 1. — P. 31-39.
224. Kolosova A. Y., Park J. H., Eremin S. A., Kang S. J., Chung D. H. Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of the organophosphorus pesticide parathion-methyl // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2003. — Vol. 51, № 5. — P. 1107-1114.
225. Crowther J. R. The ELISA guidebook. 2nd edition // *Methods in Molecular Biology*. — New York: Humana Press. 2009. — 574 p.
226. Cruz-Aguado J. A., Penner G. Fluorescence polarization based displacement assay for the determination of small molecules with aptamers // *Analytical Chemistry*. — 2008. — Vol. 80, № 22. — P. 8853-8855.
227. Hafner M., Vianini E., Albertoni B., Marchetti L., Grune I., Gloeckner C., Famulok M. Displacement of protein-bound aptamers with small molecules screened by fluorescence polarization // *Nature Protocols*. — 2008. — Vol. 3, № 4. — P. 579-587.
228. Cui L., Zou Y., Lin N., Zhu Z., Jenkins G., Yang C. J. Mass amplifying probe for sensitive fluorescence anisotropy detection of small molecules in complex biological samples // *Analytical Chemistry*. — 2012. — Vol. 84, № 13. — P. 5535-5541.
229. Kang L., Yang B., Zhang X., Cui L., Meng H., Mei L., Wu C., Ren S., Tan W. Enzymatic cleavage and mass amplification strategy for small molecule detection using aptamer-based fluorescence polarization biosensor // *Analytica Chimica Acta*. — 2015. — Vol. 879. — P. 91-96.
230. Huang Y., Liu X., Shi M., Zhao S., Hu K., Chen Z. F., Liang H. Ultrasensitive fluorescence polarization aptasensors based on exonuclease signal amplification and polystyrene nanoparticle amplification // *Chemistry—An Asian Journal*. — 2014. — Vol. 9, № 10. — P. 2755-2760.
231. Zhu Z., Ravelet C., Perrier S., Guieu V., Fiore E., Peyrin E. Single-stranded DNA binding protein-assisted fluorescence polarization aptamer assay for detection of small molecules // *Analytical Chemistry*. — 2012. — Vol. 84, № 16. — P. 7203-7211.
232. Huang Y., Zhao S., Chen Z. F., Shi M., Liang H. Amplified fluorescence polarization aptasensors based on structure-switching-triggered nanoparticles enhancement for bioassays // *Chemical Communications*. — 2012. — Vol. 48, № 60. — P. 7480-7482.
233. Bennett J. W., Klich M. Mycotoxins // *Clinical Microbiology Reviews*. — 2003. — Vol. 16, № 3. — P. 497-516.

234. Varga J., Rigo K., Teren J., Mesterhazy A. Recent advances in ochratoxin research - I. Production, detection and occurrence of ochratoxins // *Cereal Research Communications*. — 2001. — Vol. 29, № 1-2. — P. 85-92.
235. Pohland A. E., Schuller P. L., Steyn P. S., Van Egmond H. P. Physicochemical data for some selected mycotoxins // *Pure and Applied Chemistry*. — 1982. — Vol. 54, № 11. — P. 2219-2284.
236. Uchiyama S., Saito Y., Uchiyama M. Protein-binding of ochratoxin A and its extractability from proteinous food // *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*. — 1985. — Vol. 26, № 6. — P. 651-657_1.
237. Chu F. S. Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. — 1971. — Vol. 147, № 2. — P. 359-366.
238. Gillman I. G., Clark T. N., Manderville R. A. Oxidation of ochratoxin A by an Fe-porphyrin system: model for enzymatic activation and DNA cleavage // *Chemical Research in Toxicology*. — 1999. — Vol. 12, № 11. — P. 1066-1076.
239. Hashemi J., Alizadeh N. Investigation of solvent effect and cyclodextrins on fluorescence properties of ochratoxin A // *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. — 2009. — Vol. 73, № 1. — P. 121-126.
240. Il'ichev Y. V., Perry J. L., Manderville R. A., Chignell C. F., Simon J. D. The pH-dependent primary photoreactions of ochratoxin A // *Journal of Physical Chemistry B*. — 2001. Nov 15. — Vol. 105, № 45. — P. 11369-11376.
241. Malir F., Ostry V., Novotna E. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data // *Toxin Reviews*. — 2013. — Vol. 32, № 2. — P. 19-33.
242. Marin D. E., Taranu I. Ochratoxin A and its effects on immunity // *Toxin Reviews*. — 2015. — Vol. 34, № 1. — P. 11-20.
243. World Health Organization. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. 1993. — 599 p.
244. Санитарно-эпидемиологические правила и нормы 2.3.2.1078 01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов [Электронный ресурс]. — URL: <http://docs.cntd.ru/document/901806306> (дата обращения: 25.03.2018).
245. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. 2006.
246. Valenta H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids // *Journal of Chromatography A*. — 1998. — Vol. 815, № 1. — P. 75-92.
247. Urusov A. E., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Immunochemical methods of mycotoxin analysis // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2010. — Vol. 46, № 3. — P. 253-266.

248. Belli N., Marin S., Sanchis V., Ramos A. J. Review: Ochratoxin A (OTA) in wines, musts and grape juices: Occurrence, regulations and methods of analysis // *Food Science and Technology International*. — 2002. — Vol. 8, № 6. — P. 325-335.
249. Monaci L., Palmisano F. Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2004. — Vol. 378, № 1. — P. 96-103.
250. Chu F. S., Chang F. C., Hinsdill R. D. Production of antibody against ochratoxin A // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1976. — Vol. 31, № 6. — P. 831-835.
251. Candlish A. A., Stimson W. H., Smith J. E. Determination of ochratoxin A by monoclonal antibody-based enzyme immunoassay // *Journal - Association of Official Analytical Chemists*. — 1988. — Vol. 71, № 5. — P. 961-964.
252. Hajok I., Kowalska A., Piekut A., Cwiela-Drabek M. A risk assessment of dietary exposure to ochratoxin A for the Polish population // *Food Chemistry*. — 2019. — Vol. 284. — P. 264-269.
253. Garcia-Fonseca S., Ballesteros-Gomez A., Rubio S. Restricted access supramolecular solvents for sample treatment in enzyme-linked immuno-sorbent assay of mycotoxins in food // *Analytica Chimica Acta*. — 2016. — Vol. 935. — P. 129-135.
254. Anfossi L., Di Nardo F., Giovannoli C., Passini C., Baggiani C. Increased sensitivity of lateral flow immunoassay for ochratoxin A through silver enhancement // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2013. — Vol. 405, № 30. — P. 9859-9867.
255. Shim W. B., Kolosova A. Y., Kim Y. J., Yang Z. Y., Park S. J., Eremin S. A., Lee I. S., Chung D. H. Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of ochratoxin A // *International Journal of Food Science and Technology*. — 2004. — Vol. 39, № 8. — P. 829-837.
256. Urusov A. E., Kostenko S. N., Sveshnikov P. G., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Ochratoxin A immunoassay with surface plasmon resonance registration: Lowering limit of detection by the use of colloidal gold immunoconjugates // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2011. — Vol. 156, № 1. — P. 343-349.
257. Hou S.-l., Ma Z.-e., Meng H., Xu Y., He Q.-h. Ultrasensitive and green electrochemical immunosensor for mycotoxin ochratoxin A based on phage displayed mimotope peptide // *Talanta*. — 2019. — Vol. 194. — P. 919-924.
258. Cruz-Aguado J. A., Penner G. Determination of ochratoxin a with a DNA aptamer // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2008. — Vol. 56, № 22. — P. 10456-10461.
259. McKeague M., Velu R., Hill K., Bardoczy V., Meszaros T., DeRosa M. C. Selection and characterization of a novel DNA aptamer for label-free fluorescence biosensing of ochratoxin A // *Toxins*. — 2014. — Vol. 6, № 8. — P. 2435-2452.

260. Peltomaa R., Benito-Pena E., Moreno-Bondi M. C. Bioinspired recognition elements for mycotoxin sensors // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2018. — Vol. 410, № 3. — P. 747-771.
261. Xu L., Zhang Z. W., Zhang Q., Li P. W. Mycotoxin determination in foods using advanced sensors based on antibodies or aptamers // *Toxins*. — 2016. — Vol. 8, № 8. — P. 239.
262. Rhouati A., Bulbul G., Latif U., Hayat A., Li Z. H., Marty J. L. Nano-aptasensing in mycotoxin analysis: Recent updates and progress // *Toxins*. — 2017. — Vol. 9, № 11. — P. 349.
263. Kidd A., Guieu V., Perrier S., Ravelet C., Peyrin E. Fluorescence polarization biosensor based on an aptamer enzymatic cleavage protection strategy // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2011. — Vol. 401, № 10. — P. 3229-3234.
264. Woody R. W. Circular dichroism // *Methods in Enzymology*. — 1995. — Vol. 246. — P. 34-71.
265. Zezza F., Longobardi F., Pascale M., Eremin S. A., Visconti A. Fluorescence polarization immunoassay for rapid screening of ochratoxin A in red wine // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2009. — Vol. 395, № 5. — P. 1317-1323.
266. Hermanson G. T. *Bioconjugate Techniques*. 2nd Edition. — San Diego: Elsevier Academic Press Inc. 2008. — 1323 p.
267. Piella J., Bastus N. G., Puentes V. Size-controlled synthesis of sub-10-nanometer citrate-stabilized gold nanoparticles and related optical properties // *Chemistry of Materials*. — 2016. — Vol. 28, № 4. — P. 1066-1075.
268. Malvern Application Note AN110708. Improving protein Zeta potential measurements utilizing a novel diffusion barrier technique. — Malvern Instruments Limited, Worcestershire, UK. 2016.
269. Sittampalam G. S., Smith W. C., Miyakawa T. W., Smith D. R., McMorris C. Application of experimental design techniques to optimize a competitive ELISA // *Journal of immunological methods*. — 1996. — Vol. 190, № 2. — P. 151-161.
270. Prieto-Simon B., Campas M., Marty J. L., Noguera T. Novel highly-performing immunosensor-based strategy for ochratoxin A detection in wine samples // *Biosensors & Bioelectronics*. — 2008. — Vol. 23, № 7. — P. 995-1002.
271. Martin M. M., Lindqvist L. Ph-Dependence of Fluorescein Fluorescence // *Journal of Luminescence*. — 1975. — Vol. 10, № 6. — P. 381-390.
272. Yang C., Wang Y., Marty J. L., Yang X. Aptamer-based colorimetric biosensing of Ochratoxin A using unmodified gold nanoparticles indicator // *Biosensors & Bioelectronics*. — 2011. — Vol. 26, № 5. — P. 2724-2727.

273. Tucker W. O., Shum K. T., Tanner J. A. G-quadruplex DNA Aptamers and their Ligands: Structure, Function and Application // *Current Pharmaceutical Design*. — 2012. — Vol. 18, № 14. — P. 2014-2026.
274. Fadock K. L., Manderville R. A. DNA aptamer-target binding motif revealed using a fluorescent guanine probe: implications for food toxin detection // *ACS Omega*. — 2017. — Vol. 2, № 8. — P. 4955-4963.
275. Vorlickova M., Kejnovska I., Bednarova K., Renciuik D., Kypr J. Circular dichroism spectroscopy of DNA: from duplexes to quadruplexes // *Chirality*. — 2012. — Vol. 24, № 9. — P. 691-698.
276. Dapic V., Abdomerovic V., Marrington R., Peberdy J., Rodger A., Trent J. O., Bates P. J. Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides // *Nucleic Acids Research*. — 2003. — Vol. 31, № 8. — P. 2097-2107.
277. Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay // *Journal of Immunological Methods*. — 1985. — Vol. 77, № 2. — P. 305-319.
278. Underwood P. A. Problems and pitfalls with measurement of antibody affinity using solid phase binding in the ELISA // *Journal of Immunological Methods*. — 1993. — Vol. 164, № 1. — P. 119-130.
279. Weng Z. S., Zhao Q. J. Utilizing ELISA to monitor protein-protein interaction // *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications, 2nd Edition* / Meyerkord C. L., Fu H. — New York: Humana Press 2015. — P. 341-352.
280. Rinnan A., Andersen C. M. Handling of first-order Rayleigh scatter in PARAFAC modelling of fluorescence excitation-emission data // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. — 2005. — Vol. 76, № 1. — P. 91-99.
281. Escandar G. M., Faber N. K. M., Goicoechea H. C., de la Pena A. M., Olivieri A. C., Poppi R. J. Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications // *Trends in Analytical Chemistry*. — 2007. — Vol. 26, № 7. — P. 752-765.
282. McKeague M., Velu R., De Girolamo A., Valenzano S., Pascale M., Smith M., DeRosa M. C. Comparison of in-solution biorecognition properties of aptamers against ochratoxin A // *Toxins*. — 2016. — Vol. 8, № 11. — P. 336.
283. Nikolovska-Coleska Z., Wang R. X., Fang X. L., Pan H. G., Tomita Y., Li P., Roller P. P., Krajewski K., Saito N. G., Stuckey J. A., Wang S. M. Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization // *Analytical Biochemistry*. — 2004. — Vol. 332, № 2. — P. 261-273.

284. Verrone R., Catucci L., Cosma P., Fini P., Agostiano A., Lippolis V., Pascale M. Effect of β -cyclodextrin on spectroscopic properties of ochratoxin A in aqueous solution // *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. — 2007. — Vol. 57, № 1-4. — P. 475-479.
285. Bazin I., Faucet-Marquis V., Monje M. C., El Khoury M., Marty J. L., Pfohl-Leszkowicz A. Impact of pH on the stability and the cross-reactivity of ochratoxin A and citrinin // *Toxins* — 2013. — Vol. 5, № 12. — P. 2324-2340.
286. Li T., Jo E. J., Kim M. G. A label-free fluorescence immunoassay system for the sensitive detection of the mycotoxin, ochratoxin A // *Chemical communications*. — 2012. — Vol. 48, № 17. — P. 2304-2306.
287. Rodriguez M. C., Sanchez G. H., Sobrero M. S., Schenone A. V., Marsili N. R. Determination of mycotoxins (aflatoxins and ochratoxin A) using fluorescence emission-excitation matrices and multivariate calibration // *Microchemical Journal*. — 2013. — Vol. 110. — P. 480-484.
288. Dao N. T., Haselsberger R., Michel-Beyerle M.-E., Phan A. T. Following G-quadruplex formation by its intrinsic fluorescence // *FEBS Letters*. — 2011. — Vol. 585, № 24. — P. 3969-3977.
289. Fonin A. V., Sulatskaya A. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. Fluorescence of dyes in solutions with high absorbance. Inner filter effect correction // *PLoS ONE*. — 2014. — Vol. 9, № 7. — P. e103878.
290. Zimmerli B., Dick R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. — 1995. — Vol. 666, № 1. — P. 85-99.
291. Zhao Q., Geng X., Wang H. Fluorescent sensing ochratoxin A with single fluorophore-labeled aptamer // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2013. — Vol. 405, № 19. — P. 6281-6286.
292. Jameson D. M., Ross J. A. Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging // *Chemical Reviews*. — 2010. — Vol. 110, № 5. — P. 2685-708.
293. Le H. T., Buscaglia R., Dean W. L., Chaires J. B., Trent J. O. Calculation of hydrodynamic properties for G-quadruplex nucleic acid structures from in silico bead models // *Quadruplex Nucleic Acids*. — 2012. — Vol. 330. — P. 179-210.
294. Hanson D. C., Yguerabide J., Schumaker V. N. Segmental flexibility of immunoglobulin G antibody molecules in solution: a new interpretation // *Biochemistry*. — 1981. — Vol. 20, № 24. — P. 6842-52.

295. Yguerabide J. Nanosecond fluorescence spectroscopy of macromolecules // *Methods in Enzymology*. — 1972. — Vol. 26. — P. 498-578.
296. Weber P. C., Ohlendorf D. H., Wendoloski J. J., Salemme F. R. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin // *Science*. — 1989. — Vol. 243, № 4887. — P. 85-88.
297. Егоров А.М. О. А. П., Дзантиев Б.Б, Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. — М.: Высшая школа. 1991. — 288 с.
298. Ahmad Vol. Reviewing the tannic acid mediated synthesis of metal nanoparticles // *Journal of Nanotechnology*. — 2014. — Vol. 2014. — P. 1-11.
299. Wuithschick M., Birnbaum A., Witte S., Sztucki M., Vainio U., Pinna N., Rademann K., Emmerling F., Kraehnert R., Polte J. Turkevich in new robes: key questions answered for the most common gold nanoparticle synthesis // *ACS Nano*. — 2015. — Vol. 9, № 7. — P. 7052-7071.
300. Williams E. H., Davydov A. V., Motayed A., Sundaresan S. G., Bocchini P., Richter L. J., Stan G., Steffens K., Zangmeister R., Schreifels J. A., Rao M. V. Immobilization of streptavidin on 4H-SiC for biosensor development // *Applied Surface Science*. — 2012. — Vol. 258, № 16. — P. 6056-6063.
301. Kuzuya A., Numajiri K., Kimura M., Komiyama M. Single-molecule accommodation of streptavidin in nanometer-scale wells formed in DNA nanostructures // *Nucleic Acids Symposium Series*. — 2008. — Vol. 52, № 1. — P. 681-682.
302. Hales T. C. A proof of the Kepler conjecture // *Annals of Mathematics*. — 2005. — Vol. 162, № 3. — P. 1065-1185.
303. Geoghegan W. D., Ackerman G. A. Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. — 1977. — Vol. 25, № 11. — P. 1187-1200.
304. Bellver Soto J., Fernandez-Franzon M., Ruiz M. J., Juan-Garcia A. Presence of ochratoxin A (OTA) mycotoxin in alcoholic drinks from southern European countries: wine and beer // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2014. — Vol. 62, № 31. — P. 7643-7651.
305. Castellari M., Versari A., Fabiani A., Parpinello G. P., Galassi S. Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2001. — Vol. 49, № 8. — P. 3917-3921.