

*На правах рукописи*



**САМОХВАЛОВ АЛЕКСЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ**

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

Специальность 03.01.04 – биохимия

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

МОСКВА 2019

Работа выполнена в лаборатории иммунобиохимии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)

#### **Научный руководитель:**

Кандидат биологических наук **Жердев Анатолий Виталиевич**

#### **Официальные оппоненты:**

Доктор химических наук, доцент **Горячева Ирина Юрьевна**  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Институт химии, профессор кафедры общей и неорганической химии

Доктор биологических наук, доцент **Спиридонова Вера Алексеевна**  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, старший научный сотрудник отдела хроматографического анализа

#### **Ведущая организация**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г. в \_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, строение 1 и на сайте <https://www.fbras.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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 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 высокой температуры или ионной силы.

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. 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.

**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**:

---

**Используемые сокращения и обозначения:** АФ – анизотропия флуоресценции, КД – круговой дихроизм, ММ – молекулярная масса, МЭЭ – матрицы экстинкции-эмиссии, НЧЗ – наночастицы золота, ОТА – охратоксин А, ПВП – поливинилпирролидон, ПрО – предел обнаружения, ПФ – поляризация флуоресценции, РД – равновесный диализ, ТБ – 20 мМ Трис-буфер с 120 мМ NaCl; 5 мМ KCl и 20 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH = 8,5, ФЛУ – аминотетилфлуоресцеин, IC<sub>50</sub> – точка 50%-ного связывания, IgG – иммуноглобулин G.

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 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.

**Методы исследования.** Структурную характеристику аптамеров проводили методом кругового дихроизма (КД). Равновесную константу взаимодействия аптамер–ОТА определяли тремя независимыми методами: анизотропии флуоресценции, флуоресцентной спектроскопии и равновесным диализом. НЧЗ синтезировали методом цитратного восстановления в присутствии стабилизирующего компонента – таниновой кислоты. Размеры полученных НЧЗ характеризовали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). НЧЗ конъюгировали со стрептавидином посредством физической адсорбции. Комплексы аптамера с НЧЗ и с белковыми якорями получали с использованием высокоаффинного взаимодей-

ствия биотина со стрептавидином. Белковые комплексы характеризовали методом проточного фракционирования в поперечном поле, комплексы с НЧЗ – методом динамического лазерного светорассеяния. Предложенные и охарактеризованные аналитические системы для определения ОТА основывались на регистрации поляризации флуоресценции.

**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), ХХІХ зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (7-10 февраля 2017 г., Москва, Россия), ХІ 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.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы (305 источников). Работа изложена на 144 страницах машинописного текста, содержит 49 рисунков и 12 таблиц.

*В первой главе* («Литературный обзор») представлен анализ литературных данных, описывающих свойства аптамеров, методы их получения, применение в аналитической практике, принципы поляризации и анизотропии флуоресценции, создание аналитических систем с аптамерами на их основе и применение аптамеров для детекции ОТА.

*Во второй главе* («Материалы и методы») приведены сведения о реагентах и материалах, используемых в работе, и изложены основные методики.

*В третьей главе* («Результаты и обсуждение») представлены экспериментальные результаты, полученные в рамках диссертационной работы, и дана их интерпретация.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### **Выбор охратоксин А-связывающего аптамера**

Для характеристики связывающей способности ОТА-специфичных аптамеров было получено производное ОТА, меченное 4'-аминометилфлуоресцеином по карбоксильной группе (ОТА-ФЛУ). Проведен анализ литературы, на основании которого выбраны и синтезированы в ООО «Синтол» четыре перспективных ДНК аптамера, специфичных к ОТА, – таблица 1.

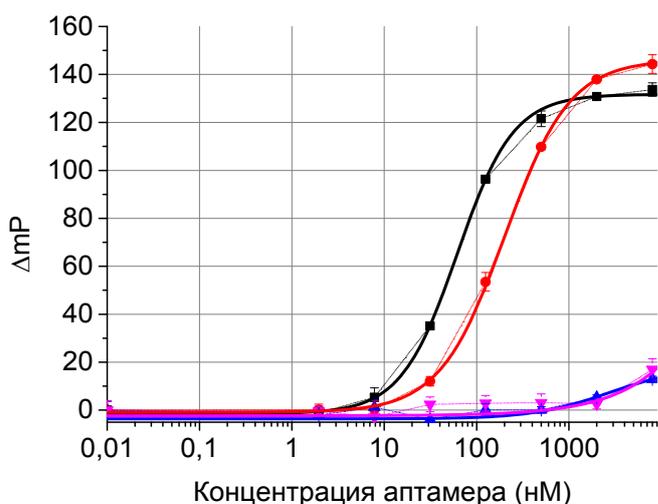
**Таблица 1.** Использованные в работе ОТА-специфичные ДНК аптамеры

Номер	Количество нуклеотидов	Нуклеотидная последовательность
1	36	5'-GAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA -3'
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'
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'
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'

При сравнении реакционных сред для проведения взаимодействия показано, что оптимальные условия взаимодействия и максимальная интенсивность флуоресценции метки достигаются для буфера следующего состава: 20 мМ Трис-HCl; 120 мМ NaCl; 5 мМ KCl и 20 мМ CaCl<sub>2</sub>; pH = 8,5 (ТБ), который и использовался в дальнейших экспериментах.

Взаимодействие аптамеров с меченым производным ОТА проводили в гомогенных условиях, что исключает необходимость иммобилизации и отмывки реагентов, упрощает и ускоряет процедуру. Регистрация ПФ позволяет оценить эффективность связывания токсина с различными аптамерами и выбрать наиболее аффинный из них.

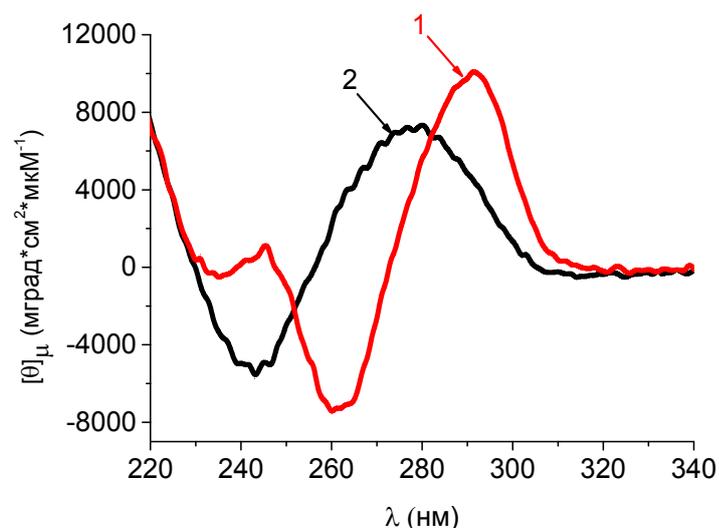
Получена зависимость ПФ ОТА-ФЛУ от концентрации аптамера. Время инкубации составило 15 минут, что достаточно для приближения реакции к равновесному состоянию. Зависимости разности ПФ от концентрации аптамеров, приведенных в таблице 1, представлены на рис. 1. Наилучшее связывание показал аптамер №1, имеющий точку 50%-ного связывания (IC<sub>50</sub>), равную 61,5 нМ. Он был выбран для проведения дальнейших экспериментов.



**Рисунок 1.** Зависимости разности ПФ ( $\Delta mP = mP_{bound} - mP_{free}$ ) свободного и связанного состояния ОТА-ФЛУ от концентрации аптамеров №1 (черная кривая), №2 (красная), №3 (синяя) и №4 (розовая)

Методом кругового дихроизма (КД) охарактеризована структура 3'-биотинилированного производного аптамера №1. КД спектры аптамера в буфере, содержащем и не содержащем 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, существенно отличались. Спектр, полученный в присутствии MgCl<sub>2</sub> (рис. 2, кривая 1), имел 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. Спектр в отсутствии MgCl<sub>2</sub> (рис. 2, кривая 2) с максимумом при 277 нм и минимумом при 243 нм характерен для неструктурированной од-

ноцепочечной ДНК. В отсутствие ионов двухвалентных металлов выбранный аптамер G-квадруплексную структуру не образует.



**Рисунок 2.** Спектры 1,5 мкМ 3'-биотинилированного аптамера в 10 мМ Три-НСl; рН = 7,4; 120 мМ NaCl; 5 мМ KCl, содержащем 20 мМ MgCl<sub>2</sub> (1) и не содержащем ионов двухвалентных металлов (2)

Как было ранее показано, именно G-квадруплексная структура определяет ОТА-связывающие свойства аптамера №1. Поэтому в дальнейших экспериментах использовали состав буфера, обеспечивающий формирование G-квадруплекса.

### **Определение константы взаимодействия ОТА–аптамер методом анизотропии флуоресценции**

Для определения константы взаимодействия был разработан алгоритм, в основе которого лежит измерение АФ в последовательности из двух блоков экспериментов:

1) определение  $K_{D1}$  – константы диссоциации комплекса между аптамером и лигандом, меченным производным флуоресцеина ( $L^*$ ).  $K_{D1}$  определяется 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 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 экспериментов при разных концентрациях аптамера.

В алгоритме учтено влияние изменения флуоресценции на измеряемые значения АФ, оптимизированы концентрации реагентов, введен статистический критерий оценки точности полученных результатов.

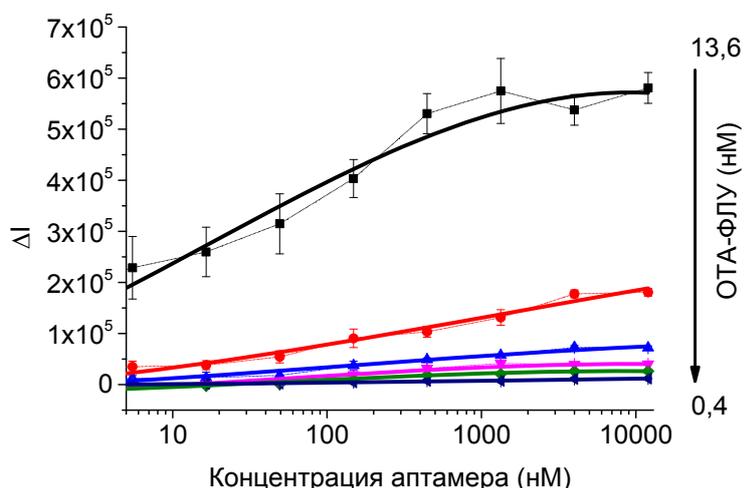
Ниже представлены результаты применения алгоритма для характеристики взаимодействия аптамер – ОТА.

### **Определение константы диссоциации аптамер–ОТА–ФЛУ ( $K_{D1}$ )**

Получено шесть зависимостей АФ и интенсивности флуоресценции ОТА-ФЛУ (взяты ряд концентраций ОТА-ФЛУ от 0,4 до 13,6 нМ) от концен-

трации аптамера. Условия эксперимента были выбраны таким образом, чтобы обеспечить избыток аптамера ( $[R]$ ) по отношению к меченому лиганду  $[L^*]$ . В этом случае  $K_{D1}$  определяется концентрацией рецептора в точке 50%-ного связывания ( $IC_{50}$ ).

Зависимости интенсивности флуоресценции ОТА-ФЛУ (при различной концентрации в диапазоне от 0,4 до 13,6 нМ) от концентрации аптамера представлены на рис. 3.



**Рисунок 3.** Зависимость разности флуоресценции ОТА-ФЛУ ( $\Delta I = I_{\text{комплекса}} - I_{\text{ОТА}}$ ) от концентрации аптамера

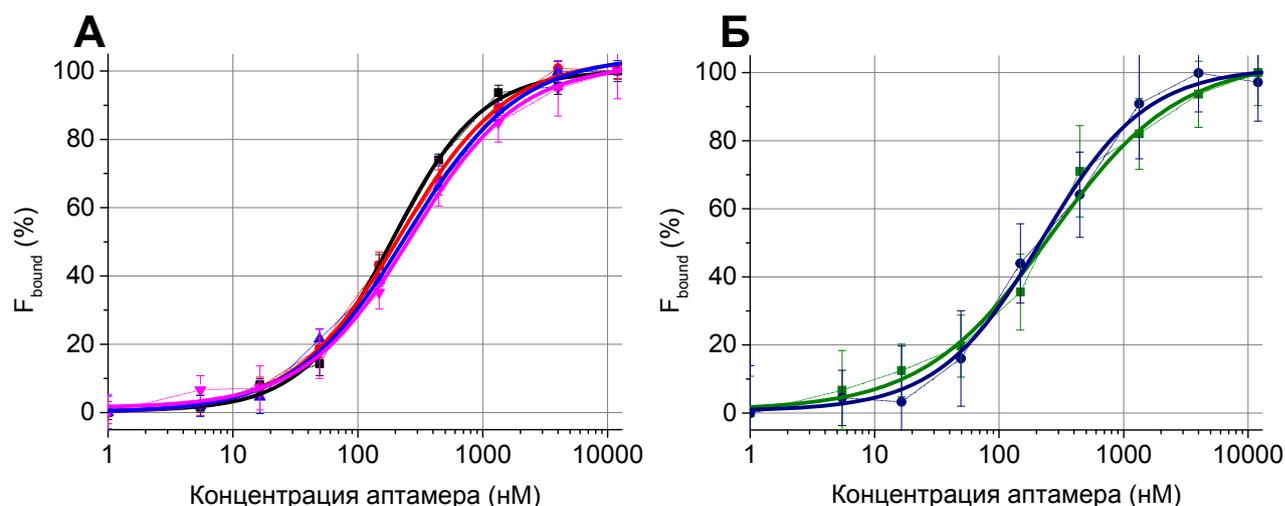
Из рис. 3 видно, что связывание ОТА-ФЛУ с аптамером сопровождается возрастанием флуоресценции метки от 1,5 до 2 раз, в зависимости от концентрации ОТА-ФЛУ. Изменение флуоресценции (квантового выхода) метки приводит к искажению корреляции между АФ и концентрацией комплекса аптамер-ОТА-ФЛУ. Поэтому при определении  $K_{D1}$  взаимодействия аптамер-ОТА с измерением АФ для корректного определения концентрационной доли связанного меченого лиганда ( $F_{\text{bound}}$ ) используется коэффициент  $Q$ , который определяется как отношение флуоресценции метки в связанном и свободном состояниях. С учетом  $Q$  доля связанного ОТА-ФЛУ определяется уравнением:

$$F_{\text{bound}} = \frac{r_i - r_f}{Q(r_b - r_i) + r_i - r_f}, \quad (1)$$

где  $F_{\text{bound}}$  – доля связанного меченого лиганда;  $r_i$  – АФ  $i$ -той точки на зависимости АФ от концентрации рецептора;  $r_f$  – АФ свободного флуорофора в отсутствии аптамера;  $r_b$  – предельное значение АФ при концентрации аптамера, которая обеспечивает полный переход меченого лиганда в связанное состояние.

С учетом поправочного коэффициента вычислены значения  $F_{\text{bound}}$ . Как видим из рис. 4, зависимости  $F_{\text{bound}}$  от концентрации аптамера, полученные при разных концентрациях ОТА-ФЛУ, соответствуют друг другу в пределах ошибки. Это свидетельствует о том, что все выбранные концен-

трации ОТА-ФЛУ удовлетворяют установленному требованию проведения взаимодействия в условиях избытка рецептора.



**Рисунок 4.** Зависимости  $F_{\text{bound}}$  от концентрации аптамера. Слева (А): концентрации ОТА-ФЛУ – 13,6 нМ (черная кривая); 6,8 нМ (красная); 3,4 нМ (синяя) и 1,7 нМ (розовая). Справа (Б): концентрации ОТА-ФЛУ – 0,9 нМ (зеленая) и 0,4 нМ (фиолетовая). ( $n = 4$ )

Чтобы оценить воспроизводимость результатов эксперимента, использовался статистический критерий – Z'-фактор:

$$Z' = 1 - \frac{3SD_f + 3SD_b}{r_b - r_f}, \quad (2)$$

где  $SD_b$  и  $SD_f$  – стандартные отклонения АФ для связанного и свободного состояний меченого лиганда, соответственно.

Z'-фактор показывает, насколько рабочий диапазон изменения сигнала ( $r_b - r_f$ ) изменяется в зависимости от величины погрешности ( $3SD_f + 3SD_b$ ). Условия эксперимента оптимальны, когда Z'-фактор близок к единице. Но с учетом свойств реальных систем в качестве допустимого порога принимается  $Z' \geq 0,5$ .

Точка 50%-ного связывания аптамера с ОТА была определена аппроксимацией полученных зависимостей (таблица 2). Для всех зависимостей установлены коэффициент Q и Z'-фактор; полученные результаты суммированы в таблице 2.

**Таблица 2.** Параметры взаимодействия аптамер–ОТА-ФЛУ

Концентрация ОТА-ФЛУ (нМ)	Q	Z'-фактор	Концентрация аптамера в IC50 (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

Кривые взаимодействия, не удовлетворяющие условию  $Z' < 0,5$  (при концентрациях ОТА-ФЛУ 0,4 и 0,9 нМ), представлены на рис. 4 (Б). Значения  $IC_{50}$ , вычисленные для этих кривых, были исключены из дальнейших расчетов. Зависимость, полученная при 13,6 нМ ОТА-ФЛУ, была также исключена, т.к. для нее  $Q$  и  $IC_{50}$  статистически достоверно отличались от вариантов с меньшими концентрациями ОТА-ФЛУ.

Для определения  $K_{D1}$  были усреднены оставшиеся три значения  $IC_{50}$  при концентрациях ОТА-ФЛУ 1,7; 3,4 и 6,8 нМ. Полученная  $K_{D1}$  равна  $245 \pm 33$  нМ.

### **Определение константы диссоциации аптамер-ОТА ( $K_{D2}$ )**

Далее проводили измерение константы взаимодействия аптамер – меченый лиганд ( $K_{D2}$ ) с использованием системы, состоящей из аптамера, меченого лиганда и немеченого лиганда. Для каждой конкурентной зависимости концентрации аптамера и ОТА-ФЛУ были постоянными, а концентрация ОТА варьировалась.

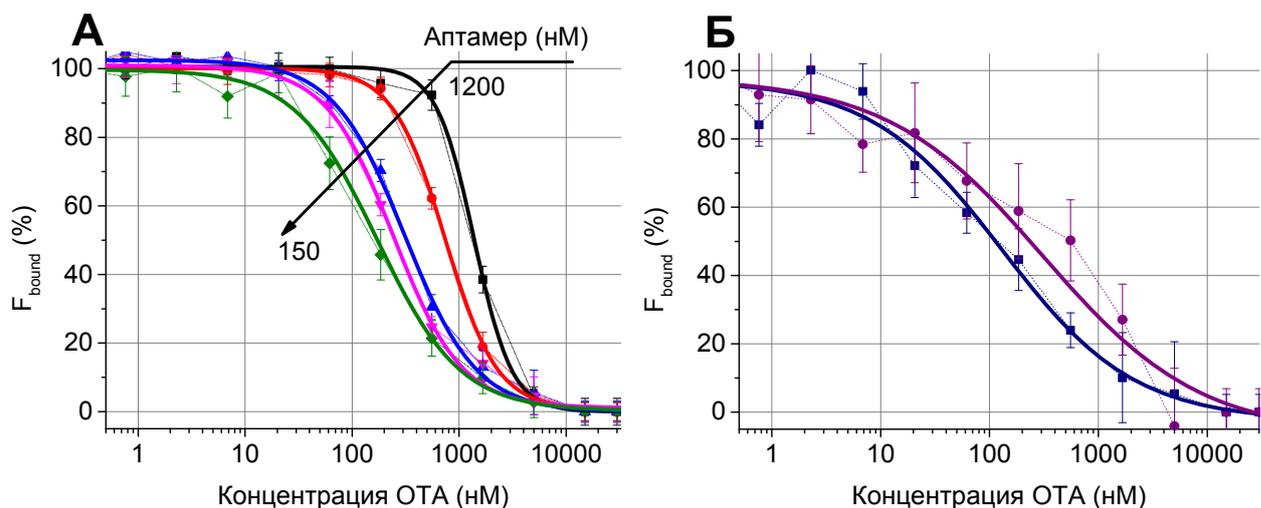
Для определения  $K_{D2}$  необходимо рассмотреть два состояния системы – при 50%-ной конкуренции и в отсутствие конкуренции. Итоговое уравнение будет иметь вид:

$$K_{D2} = \frac{K_{D1}[L]_{50}}{[L^*]_{50} + [R]_0 + K_{D1}}, \quad (3)$$

где  $[L]_{50}$  – равновесная концентрация немеченого лиганда, которая ведет к 50%-ному снижению концентрации комплекса аптамер-меченый лиганд в ходе конкуренции;  $[R]_0$  – равновесная концентрация аптамера в отсутствие конкурента;  $[L^*]_{50}$  – равновесная концентрация меченого лиганда при условии 50%-ной конкуренции.

Для определения  $K_{D2}$  были получены семь зависимостей АФ от концентрации ОТА при разных концентрациях аптамера – от 1200 до 50 нМ (рис. 5). Как и в предыдущем эксперименте, был введен поправочный коэффициент, отражающий изменение флуоресценции метки. В данной серии экспериментов для всех выбранных концентраций аптамера значение  $Q$  находилось в диапазоне от 1,2 до 1,3, за исключением наименьших концентраций 75 и 50 нМ, для которых  $Q \approx 1$ .

В соответствии с уравнением (3) значения АФ для каждой кривой были пересчитаны в  $F_{bound}$  и построены зависимости  $F_{bound}$  от концентрации аптамера (рис. 5).



**Рисунок 5.** Зависимости  $F_{bound}$  от концентрации ОТА при концентрациях аптамера, равных 1200 нМ (А, черная кривая); 600 нМ (А, красная); 300 нМ (синяя); 200 нМ (А, розовая), 150 нМ (А, зеленая), 75 нМ (Б, темно-синяя) и 50 нМ (Б, фиолетовая). ( $n = 4$ )

Для каждой конкурентной кривой были определены  $Z'$ -фактор и точка 50%-ного ингибирования связывания меченого лиганда (50%-ой конкуренции). По уравнению (3) для каждой зависимости определена предполагаемая константа связывания. Все результаты представлены в таблице 3.

На основании полученных значений  $Z'$ -фактора при определении итоговой  $K_{D2}$  исключены зависимости при концентрациях аптамера 75 и 50 нМ. Итоговая константа, полученная усреднением констант связывания для оставшихся пяти концентраций аптамера (1200, 600, 300, 200 и 150 нМ), составила  $63 \pm 18$  нМ.

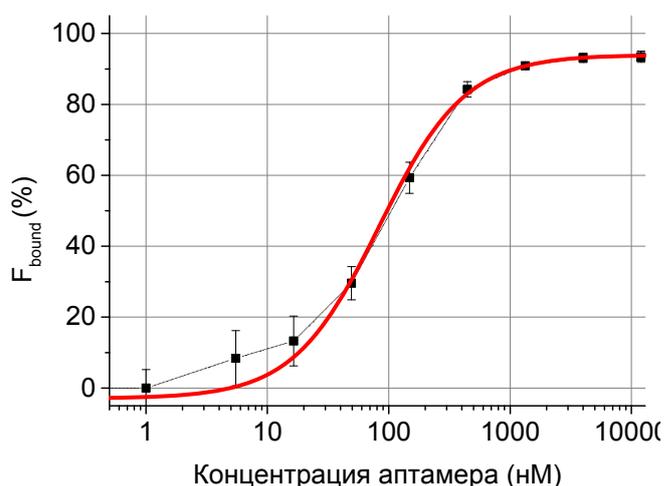
**Таблица 3.** Параметры конкурентного взаимодействия ОТА-ФЛУ и ОТА с аптамером

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

### **Подтверждение константы взаимодействия методом равновесного диализа**

Для подтверждения константы  $K_{D2}$ , полученной методом АФ, в качестве референсного метода был использован равновесный диализ (РД) как стандартный метод характеристики лиганд-рецепторных взаимодействий. Долю связанного ОТА определяли по его собственной флуоресценции (возбуждение – 375 нм, эмиссия – 430 нм). При определении константы диссоциации комплекса аптамер–ОТА методом РД учитывали изменение флуоресценции ОТА, обусловленное его переходом из свободного в связанное состояние.

Константа диссоциации ( $K_D$ ) определялась так же, как в случае взаимодействия аптамер–ОТА–ФЛУ – по  $IC_{50}$ . На основании скорректированной зависимости  $F_{bound}$  от концентрации аптамера (рис. 6) вычислили величину  $K_D$ , равную  $80 \pm 9$  нМ.



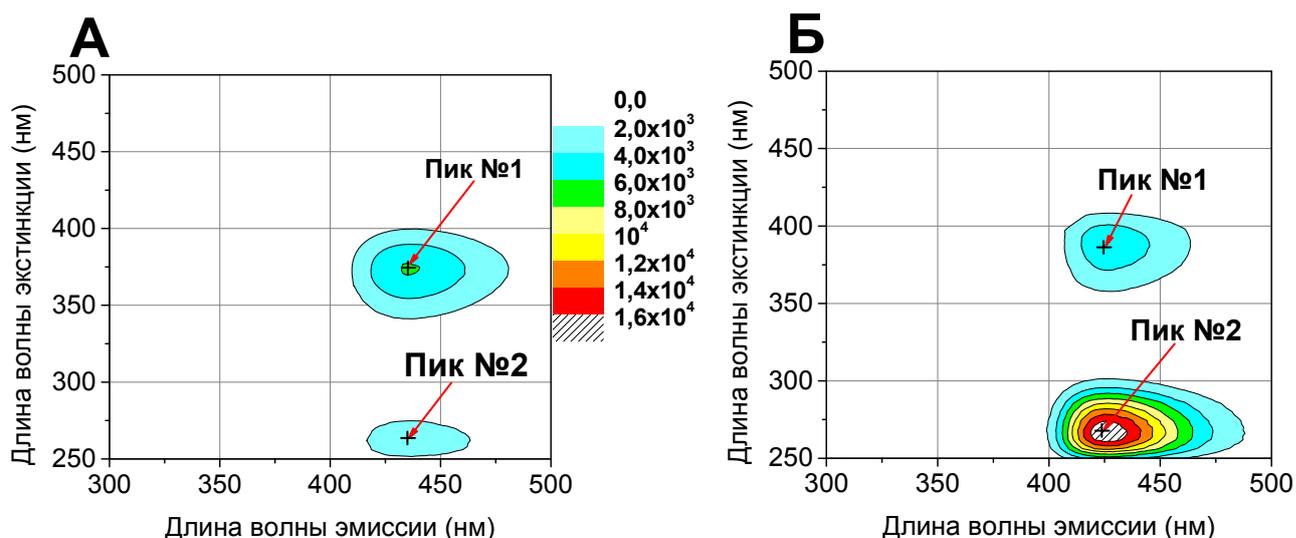
**Рисунок 6.** Скорректированная зависимость доли связанного ОТА от концентрации аптамера. ( $n = 4$ )

Разница между константами, полученными методом регистрации АФ ( $63 \pm 18$  нМ) и равновесным диализом ( $80 \pm 9$  нМ), находится в пределах ошибки. Таким образом, методом равновесного диализа подтверждено значение константы диссоциации, установленное методом регистрации анизотропии флуоресценции.

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

Флуоресценцию ОТА в свободном состоянии и в комплексе с аптамером сравнивали на основании матриц экстинкции–эмиссии. Полученные МЭЭ флуоресценции аптамера, ОТА без аптамера и комплекса ОТА–аптамер представлены на рис. 7, 8. На МЭЭ ОТА (рис. 7 (А)) наблюдаются два пика флуоресценции. Первый пик характеризуется максимумом при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 376/432$  нм (пик №1). Флуоресценция ОТА при  $\lambda_{ex} = 376$  нм характерна для депротонированной формы ОТА (дианиона), преобладающей в выбранных условиях – при  $pH = 8,5$ . Второй пик, представленный на МЭЭ,

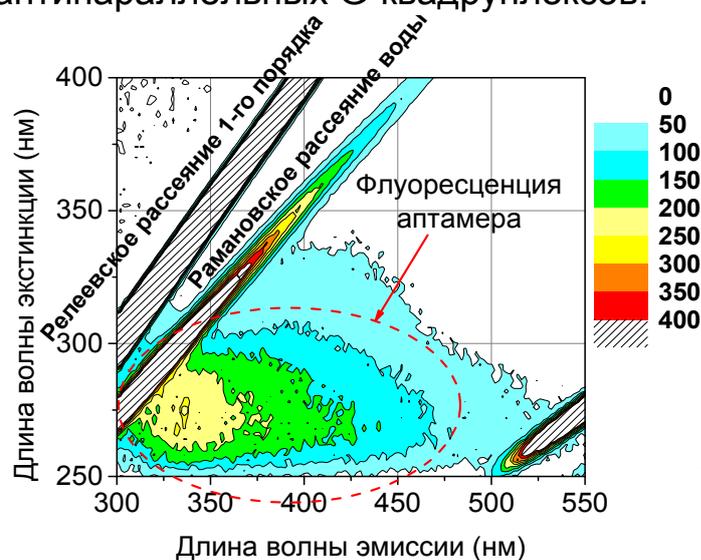
характеризуется максимумом флуоресценции при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 262/432$  нм (пик №2).



**Рисунок 7.** Матрицы экстинкции-эмиссии 240 нм ОТА (А) и 240 нм ОТА в присутствии 1000 нм аптамера (Б)

Из сравнения рис. 7 (А) и (Б) видно, что добавление аптамера вызвало значительное увеличение пика №2 (в 5,3 раза). Наличие максима флуоресценции ОТА при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 262/432$  нм и эффект его увеличения в комплексе с аптамером ранее описаны не были.

При более детальном рассмотрении МЭЭ (рис. 8) обнаружено, что аптамер обладает собственной флуоресценцией (в 24 раза слабее, чем флуоресценция 240 нм 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. Данная флуоресценция является характерной особенностью антипараллельных G-квадруплексов.

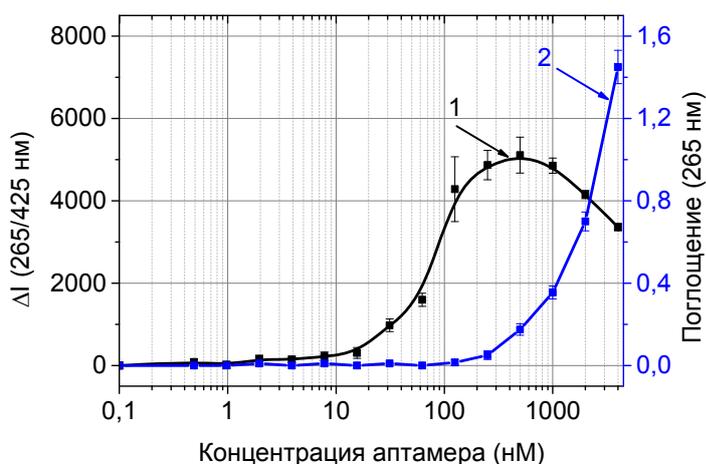


**Рисунок 8.** Матрица экстинкции-эмиссии 1 мкМ G-квадруплексного аптамера №1

Проанализировав МЭЭ ОТА и аптамера, мы сделали вывод, что при возбуждении светом с  $\lambda_{ex}=265$  нм спектр эмиссии (320 – 425 нм) аптамера

перекрывает максимум экстинкции для пика №1 (376 нм) ОТА. Показано, что благодаря перекрыванию происходит резонансный перенос энергии от аптамера к ОТА при образовании комплекса. Это объясняет наблюдаемое пятикратное увеличение флуоресценции ОТА при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$  нм, которое не может обеспечиваться увеличением квантового выхода (в водных растворах он составляет 0,39 для моноаниона и 0,49 для дианиона).

Для определения влияния концентрации аптамера на МЭЭ построена зависимость модулированной флуоресценции (увеличение флуоресценции связанного по сравнению со свободным ОТА при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$  нм) пика №2 от концентрации аптамера для 30 нМ ОТА, рис. 9 (кривая 1).

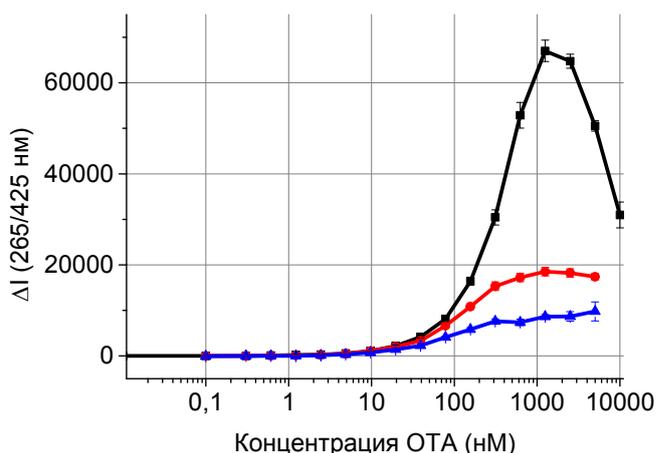


**Рисунок 9.** Зависимость интенсивности модулируемой флуоресценции 30 нМ ОТА при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$  нм (где  $\Delta I = I_{\text{комплекса}} - I_{\text{ОТА}}$ ) от концентрации аптамера (1) и поглощения аптамера при 265 нм от его концентрации (2). ( $n=3$ )

Флуоресценция при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$  нм возрастает с увеличением концентрации аптамера, достигая максимума при концентрации, равной 400–500 нМ. Дальнейшее повышение концентрации аптамера приводит к снижению флуоресценции. Причиной отсутствия верхнего плато при концентрации аптамера более 500 нМ, как видно из рис. 9 (кривая 2), является поглощение аптамера при 265 нм, снижающее интенсивность возбуждающего света по мере его прохождения через раствор.

#### **Характеристика образования комплекса ОТА-аптамер по флуоресценции при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$ нм**

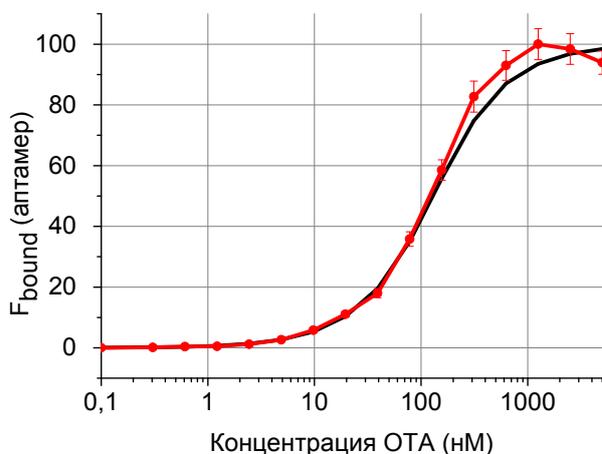
Построены зависимости модулируемой флуоресценции  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$  нм (пик №2) от концентрации ОТА (от 5000 до 0,1 нМ) для трех концентраций аптамера (400, 100 и 50 нМ) – рис. 10.



**Рисунок 10.** Зависимости модулируемой флуоресценции при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$  нм при связывании ОТА с 400 (черная кривая), 100 (красная) и 50 нМ (синяя) аптамера от концентрации ОТА. (n=4)

Для 100 и 50 нМ аптамера концентрационные зависимости модулируемой флуоресценции, построенные в полулогарифмических координатах, имеют форму сигмоиды. Для концентрации аптамера 400 нМ наблюдается снижение флуоресценции при высоких концентрациях ОТА, обусловленное поглощением аптамера, тогда как при концентрациях 100 и 50 нМ аптамер практически не поглощает свет (см. рис. 9 (кривая 2)). Таким образом, для характеристики взаимодействия высокие концентрации аптамера использовать не рекомендуется.

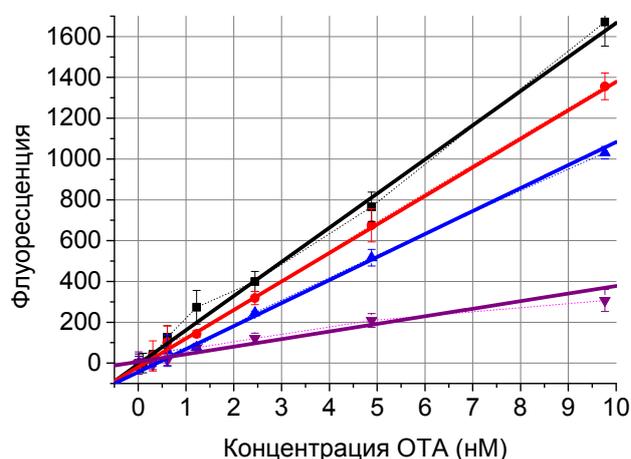
Концентрационные зависимости модулируемой флуоресценции были сопоставлены с теоретическим расчетом, использовавшим установленную ранее  $K_D$  взаимодействия аптамер–ОТА, равную 63 нМ. Экспериментальная зависимость для аптамера с концентрацией 100 нМ, перестроенная как зависимость доли связанного аптамера от концентрации ОТА, и теоретическая кривая представлены на рис. 11.



**Рисунок 11.** Сравнение теоретической (черная кривая) и экспериментальной (красная) зависимости доли связанного аптамера от концентрации ОТА при 100 нМ аптамера

Из рис. 11 видно, что отличия между теоретической и экспериментальной кривыми находятся в пределах погрешности измерений. Это доказывает, что модулируемая флуоресценция корректно отражает образование

комплекса аптамер–ОТА. Кроме того, показано, что использование флуоресценции ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$  нм) ОТА в комплексе с аптамером позволяет детектировать ОТА в низких концентрациях. На рис. 12 представлены линейаризации зависимостей в диапазоне концентраций ОТА от 0 до 10 нМ для флуоресценции свободного ОТА при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 380/430$  нм и ОТА в комплексе с аптамером при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$  нм.



**Рисунок 12.** Линейаризации зависимостей флуоресценции ОТА при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265/425$  нм от его концентрации в комплексе с 400 нМ (черная кривая); 100 нМ (красная) и 50 нМ (синяя) аптамера и флуоресценции свободного ОТА при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 380/430$  нм (фиолетовая)

На основании экстраполяции концентрационных зависимостей с учетом трех стандартных отклонений ( $3\sigma$ ) флуоресценции раствора в отсутствие ОТА были установлены следующие значения предела обнаружения (PrO) ОТА – 6,5 нМ (фиолетовая кривая – пик №1; без аптамера), 2,0 нМ (синяя – пик №2; 50 нМ аптамера), 1,5 нМ (красная – пик №2; 100 нМ аптамера) и 1,2 нМ (черная – пик №2; 400 нМ аптамера). Регистрация флуоресценции пика №2 ОТА в комплексе с аптамером позволяет детектировать ОТА в  $6,5/1,2 = 5,4$  раза чувствительнее, чем регистрация флуоресценции пика №1 ОТА.

### **Разработка белковых якорных систем для аптамерного поляризационного флуоресцентного анализа**

Поляризация и анизотропия флуоресценции зависят от подвижности флуорофора или его комплекса в растворе в соответствии с уравнением Перрена:

$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\theta}\right), \quad (4)$$

где  $P_0$  – величина ПФ флуорофора в в отсутствие вращательной диффузии;  $\tau$  – среднее время полужизни возбужденного состояния флуорофора;  $\theta$  – время вращательной корреляции (среднее время, необходимое для поворота оси флуорофора на один радиан).

Молекулярная масса (ММ) аптамеров существенно меньше, чем ММ антител – стандартного биоаналитического рецептора, что обуславливает

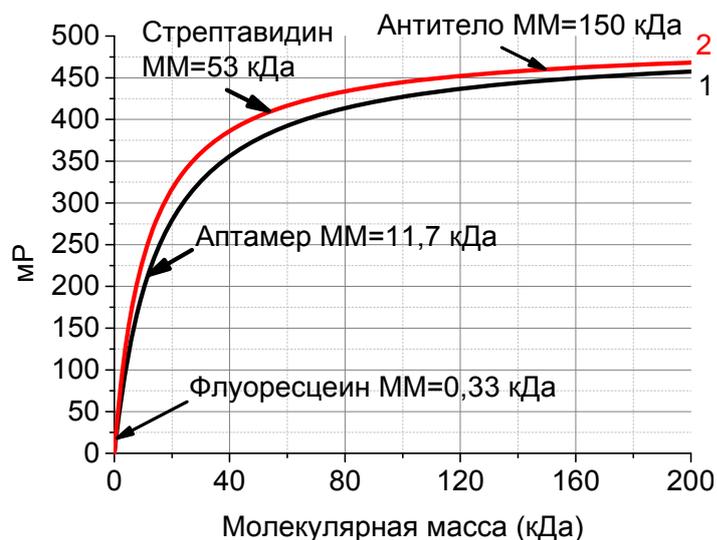
необходимость дополнительной их характеристики применительно к анализу с регистрацией АФ/ПФ.

Чтобы оценить влияние массы рецептора на ПФ комплекса рецептор-лиганд, были приняты допущения: 1) флуорофор образует недиссоциирующий комплекс с рецептором, 2) данный комплекс представляет собой жесткую сферу. Соответственно, подвижность такого комплекса связана с массой следующим уравнением:

$$\theta = \eta MW (V + h) / RT, \quad (5)$$

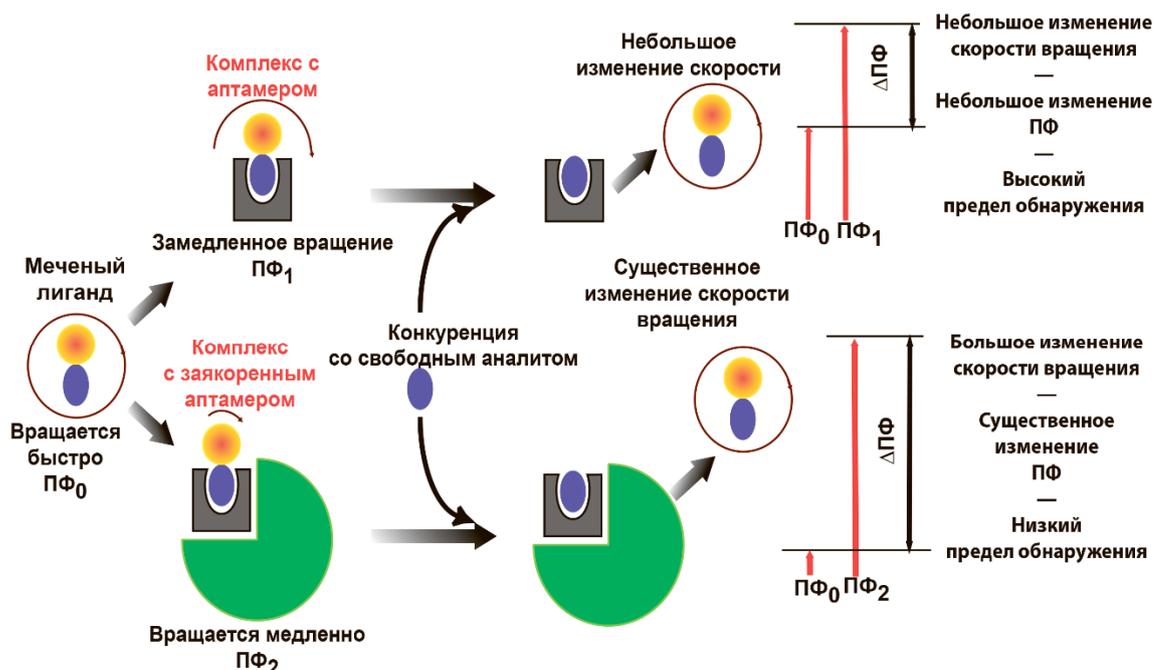
где  $\eta$  – вязкость среды,  $MW$  – молекулярная масса,  $V$  – парциальный удельный объем,  $h$  – добавочный удельный объем, обусловленный степенью гидратации молекулы,  $R$  – универсальная газовая постоянная и  $T$  – абсолютная температура в градусах Кельвина.

На основании уравнений (4) и (5) построена теоретическая зависимость ПФ комплекса флуоресцеиновой метки с G-квадруплексными аптамерами и белками от их молекулярных масс – рис. 13.



**Рисунок 13.** Зависимость ПФ комплекса флуоресцеиновой метки с G-квадруплексными аптамерами (1) и белками (2) от их молекулярных масс

На основании зависимости, представленной на рис. 13, сделан вывод, что аптамер обладает большой подвижностью в растворе и не обеспечивает максимальной ПФ комплекса. Предложен новый способ усиления ПФ – принцип молекулярных якорей, основанный на включении аптамеров в комплексы с высокомолекулярными соединениями. Таким образом, в комплексе обеспечивается значительное снижение подвижности метки и увеличение её ПФ. Для достижения одного и того же изменения ПФ при переходе метки из свободного состояния в связанное нужна меньшая концентрация утяжеленного аптамера по сравнению с нативным. Это позволяет использовать меньшую концентрацию аптамера в анализе и тем самым снизить предел обнаружения. Принципиальная схема подхода, основанного на использовании молекулярных якорей, представлена на рис. 14.



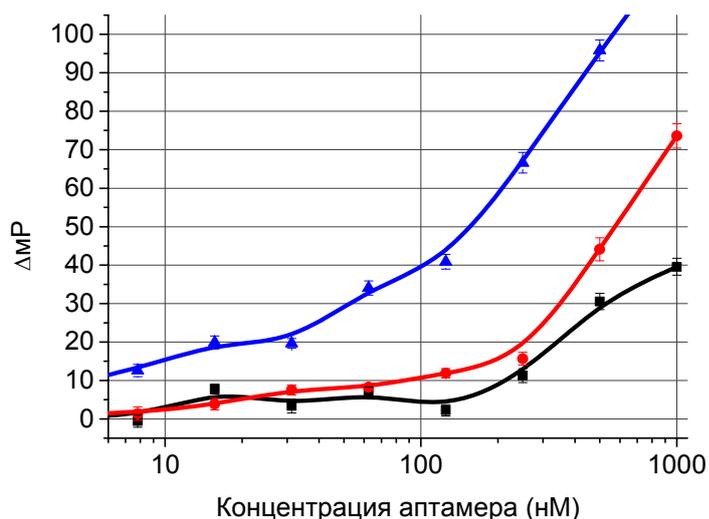
**Рисунок 14.** Схема снижения предела обнаружения ПФ аптамерного анализа с применением молекулярных якорей.  $\text{ПФ}_0$  – поляризация меченого лиганда;  $\text{ПФ}_1$  – ПФ комплекса с аптамером;  $\text{ПФ}_2$  – ПФ аптамерного комплекса с молекулярным якорем (молекулой белка, наночастицей и др.)

На основании представленной теоретической зависимости можно сделать предположение, что оптимальным белковым якорем, позволяющим достичь максимально возможную ПФ, будет носитель, имеющий ММ, близкую к иммуноглобулину G (IgG) или превышающую её. Дальнейшее увеличение массы комплекса не вызовет значительного прироста ПФ.

Предложенный принцип повышения предела обнаружения реализован с использованием белков – стрептавидина (53 кДа) и комплекса стрептавидин-IgG (203 кДа). Для связывания с белками и их комплексами в работе использовали 3'-биотинилированное производное аптамера (11,7 кДа). Для проведения экспериментов была выбрана концентрация ОТА-ФЛУ, равная 4 нМ, что обеспечивает выполнение условий:  $Z' > 0,5$  и флуоресценция больше фоновой в 10-20 раз.

### ***Поляризационный флуоресцентный анализ с использованием белковых якорей***

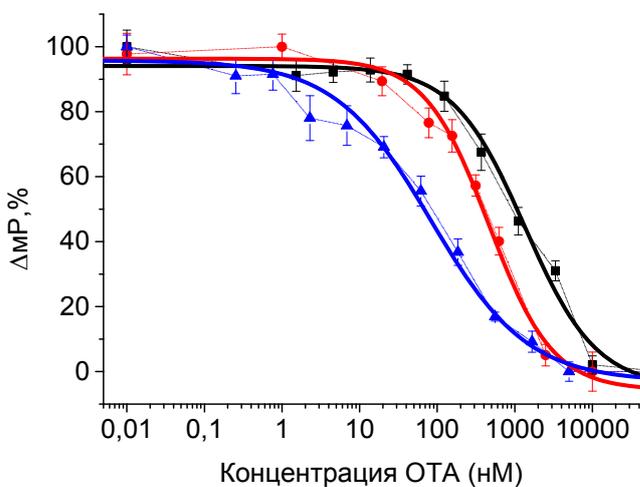
Синтезированы белковые комплексы биотинилированный аптамер–стрептавидин в соотношении 1:2 и аптамер–стрептавидин–IgG в соотношении 1:2:1, обеспечивающие максимальные изменения ПФ ОТА-ФЛУ. Зависимости ПФ ОТА-ФЛУ от концентрации аптамера и его белковых комплексов представлены на рис. 15.



**Рисунок 15.** Зависимости разности ПФ ОТА-ФЛУ от концентрации аптамера (1), комплексов аптамер-стрептавидин (2) и аптамер-стрептавидин-IgG (3). (n=4)

ПФ возрастает в ряду: аптамер → комплекс аптамер-стрептавидин → тройной комплекс. Оптимальная концентрация для проведения конкурентного анализа, обеспечивающая  $\Delta MP = 50$ , составила 1000 нМ для свободного аптамера, 500 нМ для комплекса аптамер-стрептавидин и 200 нМ для тройного комплекса.

Полученные конкурентные зависимости ОТА для аптамера и его комплексов с якорями представлены на рис. 16.

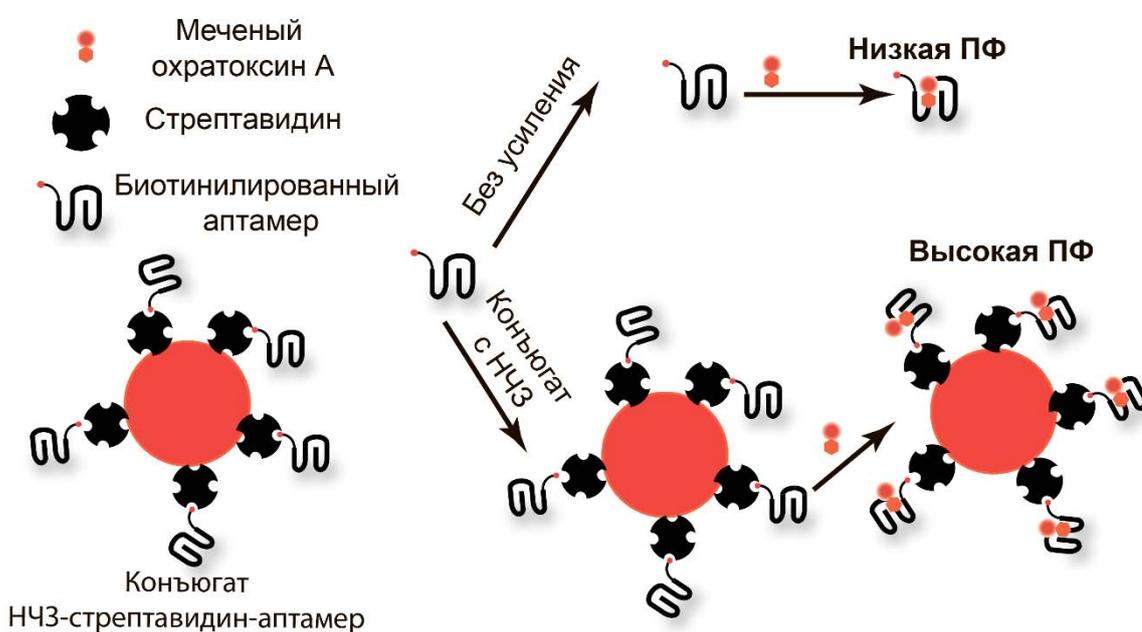


**Рисунок 16.** Конкурентные зависимости ПФ ОТА-ФЛУ от концентрации ОТА для: (1) свободного аптамера, (2) комплекса аптамер-стрептавидин, (3) комплекса аптамер-стрептавидин-IgG. (n = 4)

Для свободного аптамера, комплекса аптамер-стрептавидин и комплекса аптамер-стрептавидин-IgG  $PrO$  и  $IC_{50}$  составили 130 и 1340 нМ; 43 и 533 нМ; 3,6 и 98 нМ, соответственно. Таким образом, включение аптамера в комплекс со стрептавидином снижает предел обнаружения в 3 раза, а включение в тройной комплекс – в 40 раз по сравнению со свободным аптамером. Достигнутый эффект снижения  $PrO$  охратоксина А с белковым якорным усилением свидетельствует о перспективности применения предложенного принципа для определения ОТА в сложных матриксах.

## Разработка системы с использованием наночастиц золота в качестве якоря

В отличие от белков, наночастицы золота (НЧЗ) имеют жесткую структуру и высокую плотность, вследствие чего масса одной частицы даже небольшого размера ( $\approx 5$  нм) значительно превосходит ММ иммуноглобулина G. Применение НЧЗ в качестве якоря обеспечивает достижение максимального замедления метки и максимальное значение ПФ связанного состояния, не требуя синтеза белковых конъюгатов, стехиометрия которых неоднозначна. Принципиальная схема усиления ПФ анализа с использованием аптамерных комплексов с НЧЗ, модифицированными стрептавидином, представлена на рис. 17.



**Рисунок 17.** Схема усиления ПФ аптамерного анализа с помощью якоря на основе наночастиц золота

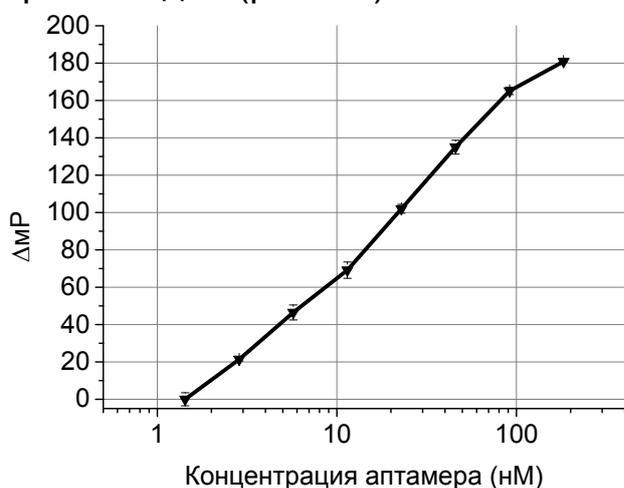
Для синтеза монодисперсных НЧЗ с диаметром до 10 нм использовано цитратное восстановление в присутствии стабилизирующего компонента – таниновой кислоты. Методом просвечивающей электронной микроскопии подтверждена монодисперсность препарата НЧЗ и определен диаметр частиц, равный  $8,7 \pm 1,4$  нм.

Определены следующие условия синтеза стабильного конъюгата НЧЗ–стрептавидин: рН = 9,0, концентрация стрептавидина – 40 мкг/мл. Для синтеза аптамерного конъюгата использовали мольное соотношение концентраций аптамера и НЧЗ, равное 48:1.

Количество аптамера, иммобилизованное на поверхности НЧЗ, было экспериментально установлено методом ПФ посредством определения количества аптамера, не связавшегося с НЧЗ. Показано, что на одну НЧЗ

приходится 14-15 молекул аптамера, что свидетельствует о том, что для связывания аптамера остались свободными только два центра связывания стрептавидина.

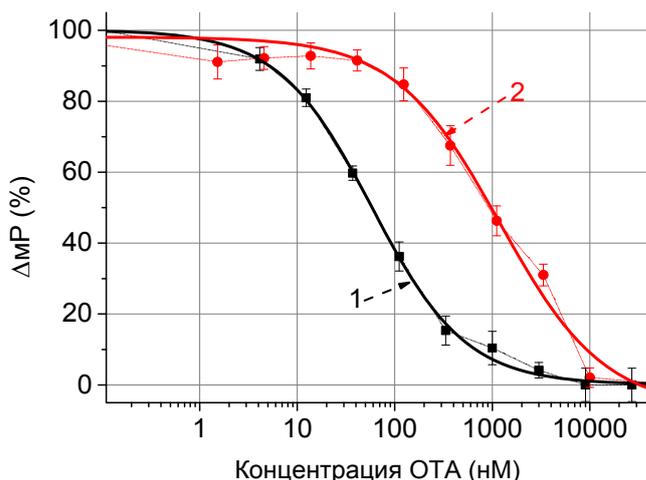
Зная количество аптамеров, иммобилизованных на НЧЗ, построили зависимость ПФ от концентрации аптамера в препарате конъюгата НЧЗ-стрептавидин (рис. 18).



**Рисунок 18.** (А) Зависимость изменения ПФ ОТА-ФЛУ от концентрации аптамера, иммобилизованного на конъюгате стрептавидин-НЧЗ. (n=3)

Для конкурентного эксперимента с ОТА выбрана оптическая плотность ( $OP_{520}$ ) конъюгата аптамер–стрептавидин–НЧЗ, равная 0,2 единицы, при которой концентрация аптамера равна 40 нМ.

Далее построили конкурентные зависимости для определения ОТА с использованием конъюгата аптамер–НЧЗ и свободного аптамера (концентрация 800 нМ), рис. 19.



**Рисунок 19.** Конкурентные зависимости ПФ ОТА-ФЛУ от концентрации ОТА с использованием аптамера, иммобилизованного на НЧЗ (1), и свободного аптамера (2). (n=2)

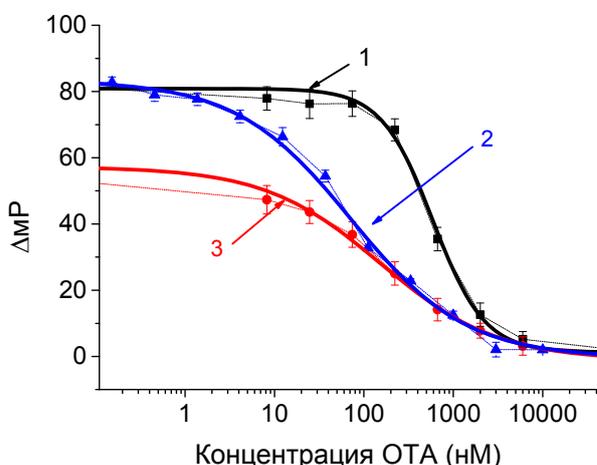
PrO равен 2,9 нМ (1,2 мкг/л) для конъюгата аптамер–НЧЗ (рис. 19, кривая 1) и 79,6 нМ (32,1 мкг/л) для свободного аптамера (рис. 19, кривая 2). Использование усиления на основе НЧЗ для аптамерного поляризационного флуоресцентного анализа позволило снизить предел обнаружения

в 50 раз, что свидетельствует о перспективности его апробации в сложных матриксах.

### **Сравнение предложенных подходов для определения ОТА в сложных матриксах**

В качестве характеризующего матрикса было выбрано белое вино как один из часто контаминируемых ОТА продуктов. Перед определением ОТА проводили пробоподготовку вина, которая заключалась в двухстадийном обесцвечивании с использованием поливинилпирролидона (ПВП-30), повышении pH от 3,0 до 8,5 и добавлении 20 мМ хлорида кальция.

Были построены конкурентные зависимости определения ОТА с: (1) аптамером в концентрации 1000 нМ, (2) комплексом аптамер–стрептавидин–IgG в концентрации 200 нМ и (3) комплексом аптамер–стрептавидин–НЧЗ (ОП<sub>520</sub> = 0,2) с концентрацией аптамера 40 нМ (рис. 20).



**Рисунок 20.** Конкурентные зависимости ПФ ОТА-ФЛУ от концентрации ОТА в вине со свободным аптамером (1); комплексом аптамер–стрептавидин–IgG (2) и комплексом аптамер–стрептавидин–НЧЗ (3)

При использовании свободного аптамера в качестве рецептора был получен наихудший ПрО – 151,4 нМ (61 мкг/л). При использовании комплекса аптамер–стрептавидин–НЧЗ ПрО составил 5,6 нМ (2,3 мкг/л), что в 27 раз ниже, чем для свободного аптамера. Лучший ПрО достигнут для комплекса аптамер–стрептавидин–IgG – 2,8 нМ (1,1 мкг/л), что в 54 раза ниже, чем со свободным аптамером. Значения ПрО, полученные для определения ОТА в вине, близки к величинам для буферного раствора.

Предельно допустимая концентрация ОТА в вине составляет 2 мкг/мл. Таким образом, применение принципа молекулярных якорей позволяет выявлять пробы, в которых нормативно установленный предел контаминации превышен.

Проведена апробация ПФ аптамерного анализа ОТА с комплексом аптамер–стрептавидин–IgG при тестировании проб вина. ОТА-положительные пробы были приготовлены введением в вино известных количеств ОТА; содержание ОТА в этих пробах определяли по градуировочной кривой. Полученные результаты представлены в таблице 4. Доля выявленного ОТА составляет от 83% до 113%. Соответственно, предлага-

емый конкурентный ПФ аптамерный анализ с якорным усилением характеризуется высокой степенью достоверности и может применяться для определения концентрации ОТА в вине в количествах ниже ПДК.

**Таблица 4.** Определение содержания ОТА в ОТА-положительных пробах вина методом ПФ аптамерного анализа с использованием комплекса аптамер-стрептавидин-IgG. (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

## 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  $63 \pm 11$  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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи**

1. **Samokhvalov A.V.**, Safenkova I.V., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Use of anchor protein modules in fluorescence polarisation aptamer assay for ochratoxin A determination. *Analytica Chimica Acta*, 2017, v. 962, p. 80-87.

2. **Samokhvalov A.V.**, Safenkova I.V., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Measurement of (aptamer – small target) KD using the competition between fluorescently labeled and unlabeled target and the detection of fluorescence anisotropy. *Analytical Chemistry*, 2018, v. 90, N. 15, p. 9189-9198.

3. **Samokhvalov A.V.**, Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. The registration of aptamer–ligand (ochratoxin A) interactions based on ligand fluorescence changes. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 2018, v. 505, N 2, p. 536-541.

### **Материалы научных конференций**

1. **Самохвалов А.В.**, Сафенкова И.В., Берлина А.Н., Жердев А.В., Гаур М.С., Дзантиев Б.Б. Применение аптамеров для детекции низкомолекулярных токсичных контаминант окружающей среды и пищевой продукции. Тезисы докладов Международной научно-практической конференции «Биотехнология в комплексном развитии регионов». 15-17 марта 2016 г., Москва, сс. 95-96.

2. Safenkova I.V., **Samokhvalov A.V.**, Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Strategy of enhanced fluorescence polarization based on aptamer – protein anchor complexes for sensitive and rapid detection of ochratoxin A. *Book of Abstracts of the 8th Bordeaux RNA Club Meeting Symposium*, June 24-25, 2016., Bordeaux, France. Th. P67.

3. **Самохвалов А.В.**, Сафенкова И.В., Еремин С.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Разработка аптамерного поляризационного флуоресцентного анализа

для определения охратоксина А. Сборник материалов XXIX зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 7-10 февраля 2017 г. М.: Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, с. 145.

4. **Самохвалов А.В.** Аптамерный поляризационный флуоресцентный анализ с усилением сигнала для определения охратоксина А. Материалы IX Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». 20-22 февраля 2017 г., Москва, т. 2, сс. 528-529.

5. **Samokhvalov A.V.**, Safenkova I.V., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Using anchor constructions to increase sensitivity of fluorescent polarisation aptamer assay: A case study for ochratoxin A. Biocatalysis–2017: Abstracts of 11th International Conference “Biocatalysis: Fundamentals and Applications”. June 25-30, 2017, Moscow region, Russian Federation. P. 194-195.

6. **Samokhvalov A.V.**, Safenkova I.V., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Using aptamer-gold nanoparticles conjugates for rapid ochratoxin A detection by fluorescent polarization. Book of Abstracts of the Aptamers in Bordeaux 2017 Conference, September 22-23, 2017, Bordeaux, France. P. 50.

7. **Самохвалов А.В.**, Сафенкова И.В., Еремин С.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Экспрессная детекция охратоксина А, основанная на использовании аптамеров в качестве рецепторных молекул и регистрации поляризации флуоресценции. Тезисы Юбилейной конференции по микологии и микробиологии. Москва, 11-12 апреля 2018 г. Успехи медицинской микологии, 2018, т. 19, с. 326-328.