

удк 535.371:577.113.6

КОНКУРЕНТНЫЙ ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АПТАМЕРНЫЙ АНАЛИЗ АФЛАТОКСИНА В1: ВЛИЯНИЕ СОЛЕВОГО СОСТАВА РЕАКЦИОННОЙ СРЕДЫ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

© 2025 г. А. В. Самохвалов¹, А. В. Жердев¹, Б. Б. Дзантиев^{1,*}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва 119071, Россия

*e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 06.04.2025 г.

После доработки 26.04.2025 г.

Принята к публикации 28.04.2025 г.

В работе рассмотрено взаимодействие аптамера (синтетического рецептора на основе одноцепочечной ДНК), имеющего петлевую структуру, со специфическим лигандом — афлатоксином В1 (АФВ1), распространенным токсичным контаминантом пищевых продуктов. Изучено влияние одно- и двухвалентных катионов (Cs^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) в разных концентрациях на реакционную способность аптамера. Регистрировали анизотропию флуоресценции (АФ) меченого флуоресцеином производного АФВ1, отражающую как связывание с аптамером, так и мобильность комплекса аптамер — меченый АФВ1 в данной реакционной среде. Показано, что регистрируемые изменения АФ существенно отличаются в зависимости от присутствующего в реакционной среде катиона и его концентрации. Влияние на АФ одновалентных катионов наблюдалось в диапазоне 400 мМ–2.5 М, для двухвалентных более выражено по амплитуде и соответствовало концентрациям от 6 до 200 мМ. По степени изменений АФ катионы образуют ряды $\text{Cs}^+ \ll \text{K}^+ \leq \text{Li}^+ < \text{Na}^+$ и $\text{Ba}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+}$. Сравнение характеристик конкурентного определения АФВ1 для традиционно используемой реакционной среды и среды с 50-кратным (с 20 мМ до 1.0 М) увеличением концентрации ацетата магния показало 12-кратное снижение предела обнаружения — до 2.5 ± 0.4 нМ. Полученные результаты позволяют рассматривать выбор содержания катионов как эффективный инструмент при создании высокочувствительных аптамерных аналитических систем.

Ключевые слова: аптамеры, катионы металлов, поляризация флуоресценции, круговой дихроизм

DOI: 10.7868/S3034574X25050092

Аптамеры представляют собой синтетические олигонуклеотидные рецепторные молекулы, основными достоинствами которых являются низкая себестоимость, простота модификации, эффективная ренатурация после денатурирующих воздействий [1, 2]. Они активно применяются в биоаналитических системах как иммобилизованные или находящиеся в растворе реагенты, связывание которых с лигандом вызывает изменение регистрируемых свойств: электрохимических, оптических и др. [3, 4].

Вследствие наличия в олигонуклеотидной цепочке множественных фосфатных групп аптамеры

являются полианионами и электростатически взаимодействуют с катионами, содержащимися в среде [5]. Связывание катионов снижает электростатическое отталкивание участков аптамеров и, согласно ряду наблюдений, способствует их компактизации и образованию развитой третичной структуры [6–9]. Данное комплексообразование стабилизирует определенные конформации аптамера и может влиять на аффинность его взаимодействия со специфическим лигандом [10, 11]. Отмечалось, что сродство ионов металлов к нуклеиновым кислотам в значительной степени зависит от их валентности, ионного радиуса и координационной геометрии [12, 13]. Например,

аптамер, специфичный к охратоксину А, приобретает лиганд-связывающие свойства только при наличии стабилизирующего двухвалентного катиона — Mg^{2+} или Ca^{2+} , что коррелирует с образованием G-квадруплексной антипараллельной структуры [14]. Влияние катионов на лиганд-связывающие свойства описывалось и для других аптамеров, в том числе связывающих тетрациклин, фактор роста эндотелия сосудов, иммуноглобулин Е [15–17]. Однако большинство исследований ограничивалось минимальным числом катионов и априорно выбранными их концентрациями. В результате общая концепция, объясняющая особенности влияния разных катионов на структуру и связывающие свойства аптамеров, на сегодняшний день отсутствует.

Для сравнительной оценки одно- и двухвалентных катионов, используемых в разных концентрациях, в данной работе использовался ДНК аптамер, специфичный к афлатоксину В1 (АФВ1) — синтезируемому грибами рода *Aspergillus*, низкомолекулярному токсичному контаминанту пищевых продуктов. Данный аптамер с нуклеотидной последовательностью 5'-GTT GGG CAC GTG TTG TCT CTC TGT GTC TCG TGC CCA AC-3', впервые рассмотренный в работе [18], имеет так называемую шпильчатую структуру: 10-нуклеотидный дуплексный участок, фиксирующий 18-нуклеотидную петлю. Указанная структура, следующая из комплементарности нуклеотидов, подтверждена экспериментально методом ЯМР при изучении несколько укороченного варианта данного аптамера [19]. ЯМР-исследования также показали, что с АФВ1 взаимодействует петля, а дуплексный регион обеспечивает ее стабилизацию. Установлено [18, 20], что катион Mg^{2+} повышает аффинность аптамера к АФВ1. Этот эффект описан для концентраций катиона до 0.1 М без развернутого сопоставления с другими катионами. Для работы с данным аптамером традиционно рекомендуется реакционная среда следующего состава: 20 мМ трис-ацетат, 100 мМ ацетат Na^+ и 20 мМ ацетат Mg^{2+} , pH 8.5 (далее — рабочий буфер, РБ).

Для оценки влияния катионов на лиганд-связывающие свойства аптамера и возможности его аналитического применения в работе рассматривалась система с регистрацией анизотропии флуоресценции (АФ), индуцированной плоскополяризованным возбуждающим светом. Измерения АФ для меченного флуоресцеином АФВ1 позволяют регистрировать связывание аптамер — лиганд и быстро производительно сопоставлять протекание этого процесса в разных реакционных средах.

Цель работы — характеристика влияния солей одновалентных (Cs^+ , Li^+ , Na^+ , K^+) и двухвалентных (Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) катионов на взаимодействие АФВ1 — аптамер, изменения регистрируемых величин АФ, а также оценка возможностей выбора

ионного состава реакционной среды как средства снижения предела обнаружения аптамерных аналитических систем.

МЕТОДИКА

Реагенты. Для проведения работ использовали АФВ1, ацетат натрия, хлорид калия, ацетат магния, хлорид кальция (“Sigma-Aldrich”, США); хлорид цезия, хлорид лития, хлорид стронция и хлорид бария (“Вектон”, Россия), трис(гидроксиэтил)амин и уксусную кислоту (“Химмед”, Россия); степень чистоты х.ч. или выше. Система Simplicity Milli-Q® (“Millipore”, Германия) использовалась для получения бидистиллированной воды. Специфичный к АФВ1 ДНК-аптамер синтезирован и очищен фирмой “Синтол” (Россия). Концентрации используемых растворов аптамера контролировали по поглощению при 260 нм с помощью микрообъемного спектрофотометра NanoDrop2000 (“Thermo Scientific”, США). Конъюгат АФВ1 с флуоресцеином (АФВ1-Флу), любезно предоставленный проф. С.А. Ереминым (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова), был получен согласно [21].

Характеристика конформации аптамера методом кругового дихроизма (КД). Стоки реактивов готовили в РБ. Далее в кварцевой кювете, 1 см (“Hellma Analytics”, Германия), с окном 4 мм смешивали по 500 мкл 2 мкМ аптамера и РБ, или 20 мкМ АФВ1 и РБ, или 20 мкМ АФВ1 и 2 мкМ аптамера. Измерения проводили с использованием спектрометра Chirascan (“Applied Photophysics”, Великобритания) с термостатируемой ячейкой при следующих параметрах: щель пропускания — 1 нм, временная постоянная — 3 с, шаг — 3 нм, спектральный диапазон — от 190 до 320 нм, температура — 20°C. Полученные спектры обрабатывали с помощью программ Pro-Data Chirascan (“Applied Photophysics”, Великобритания) и OriginPro 9.1 (“Origin Lab”, США). КД-спектроскопию проводили в ЦКП “Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН.

Влияние катионов на взаимодействие аптамер — лиганд с регистрацией анизотропии флуоресценции. Стоковые растворы хлоридов изучаемых катионов готовили в бидистиллированной воде. Разведения аптамера от 4 мкМ до 6.4 нМ и стоковый раствор АФВ1-Флу с концентрацией 20 нМ готовили в 2-кратном буфере (20 мМ трис-ацетат, pH 8.4). В лунках 96-луночного черного микропланшета Nunc (“ThermoFisher”, США) готовили разведения катионов в бидистиллированной воде (по 50 мкл в лунке), далее добавляли по 25 мкл АФВ1-Флу и по 25 мкл одного из разведений аптамера (в контрольные лунки вместо аптамера добавляли РБ). Микропланшет помещали в мультимодальный ридер CLARIOstar (“BMG Labtech”,

Германия), встряхивали 30 с при 300 rpm и через 25 мин (после достижения равновесия) при 25°C измеряли АФ и флуоресценцию. Использовали фильтры возбуждения/испускания $490 \pm 10/520 \pm \pm 10$ нм с дихроичным зеркалом 504 нм. Результаты измерений анализировали с использованием программного обеспечения CLARIOstar MARS (“BMG Labtech”, Германия).

Конкурентное связывание АФВ1-Флу и АФВ1 с аптамером с регистрацией анизотропии флуоресценции. В бидистиллированной воде готовили разведения АФВ1 в диапазоне концентраций от 6000 до 0.3 нМ и вносили по 50 мкл в лунки 96-луночного черного микропланшета Nunc (“ThermoFisher”, США). Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл АФВ1-Флу (20 нМ) и 25 мкл аптамера (480 или 100 нМ), приготовленных в 2-кратном РБ. После 25 мин инкубации при 25°C регистрировали АФ и флуоресценцию, как описано выше.

Обработка результатов измерения анизотропии флуоресценции. Для сопоставимости результатов в каждой серии опытов вычисляли изменение АФ при взаимодействии ($\Delta\text{АФ}$), вычитая из регистрируемых величин значение АФ АФВ1-Флу в отсутствии аптамера. Зависимость сигнала – $\Delta\text{АФ}$ (y) – от концентрации аптамера (эксперименты по связыванию) или АФВ1 (конкуренция) – (x) – аппроксимировали с помощью программы Origin (“OriginLab”, США) с использованием четырехпараметрической сигмоидной функции:

$$y = (a - b) / [1 + (x/c)^d] + b,$$

где a – сигнал при нулевом x , b – предельный сигнал при росте x , c – точка перегиба (в конкурентных опытах $c = IC_{50}$, концентрация лиганда, ингибирующая 50% связывания аптамер – меченый лиганд), d – наклон кривой в точке c .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Принцип измерений связывания и проведения конкурентного анализа. В работе регистрировали анизотропию флуоресценции, индуцированной плоскополяризованным возбуждающим светом. За время между возбуждением и излучением под действием Броуновского движения молекул в растворе происходит вращение флуорофора, изменяющее плоскость поляризации излучаемого света. Выраженность этого вращения зависела от состояния флуорофора, она была значительной для свободных молекул малых размеров, но снижалась при их включении в комплексы с крупными молекулами [22].

Соответственно, включение АФВ1-Флу в комплекс с аптамером увеличивало анизотропию его флуоресценции. Эти изменения позволяли характеризовать процессы комплексообразования,

а также выявлять свободный АФВ1 по конкуренции с АФВ1-Флу за связывание с аптамером.

Характеристика аптамера методом кругового дихроизма. Для оценки структурного состояния аптамера проведена регистрация его спектров КД в свободном состоянии и в комплексе с АФВ1 (рис. 1). В спектре отсутствовали нехарактерные для тотальной ДНК пики [23], а положение пиков соответствовало литературным данным об аптамерах со шпильчатой структурой [19, 20]. Связывание АФВ1 приводило к перестройке конформации аптамера при соотношении аптамер : АФВ1 1 : 10, при этом увеличивался пик при 277 нм, а отрицательный экстремум сдвигался с 252 до 235 нм (рис. 1).

Изучение взаимодействия аптамера с АФВ1-Флу в присутствии различных катионов. Получены зависимости АФ АФВ1-Флу от концентрации аптамера в присутствии одно- (Cs^+ , Li^+ , Na^+ , K^+) и двухвалентных (Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) катионов, добавляемых к 20 мМ трис-ацетатному буферу, рН 8.5, в разных концентрациях. Для всех катионов в концентрациях выше 0.75 М наблюдалось увеличение АФ свободного АФВ1-Флу. Для сопоставления получаемых зависимостей в каждом эксперименте рассчитывали $\Delta\text{АФ}$, вычитая величину АФ АФВ1-Флу при соответствующих концентрациях солей. Полученные зависимости $\Delta\text{АФ}$ от концентрации аптамера представлены на рис. 2 для одновалентных и на рис. 3 – для двухвалентных катионов. Для сопоставления такая же зависимость была получена для РБ. Измерения проводили после 25 мин инкубации; как было показано, это время обеспечивало достижение равновесия.

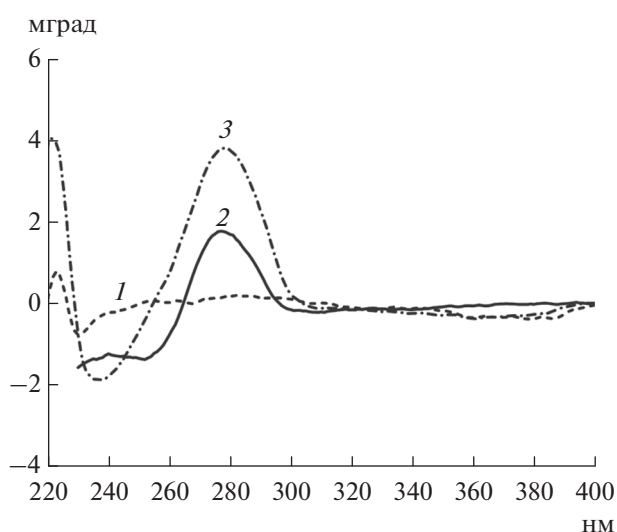


Рис. 1. Спектры кругового дихроизма 10 мкМ АФВ1 (1), 1 мкМ аптамера (2) и их комплекса в соотношении 10 : 1 (3) в буфере 20 мМ трис-ацетат, 100 мМ ацетат натрия, 20 мМ ацетат магния, рН 8.5.

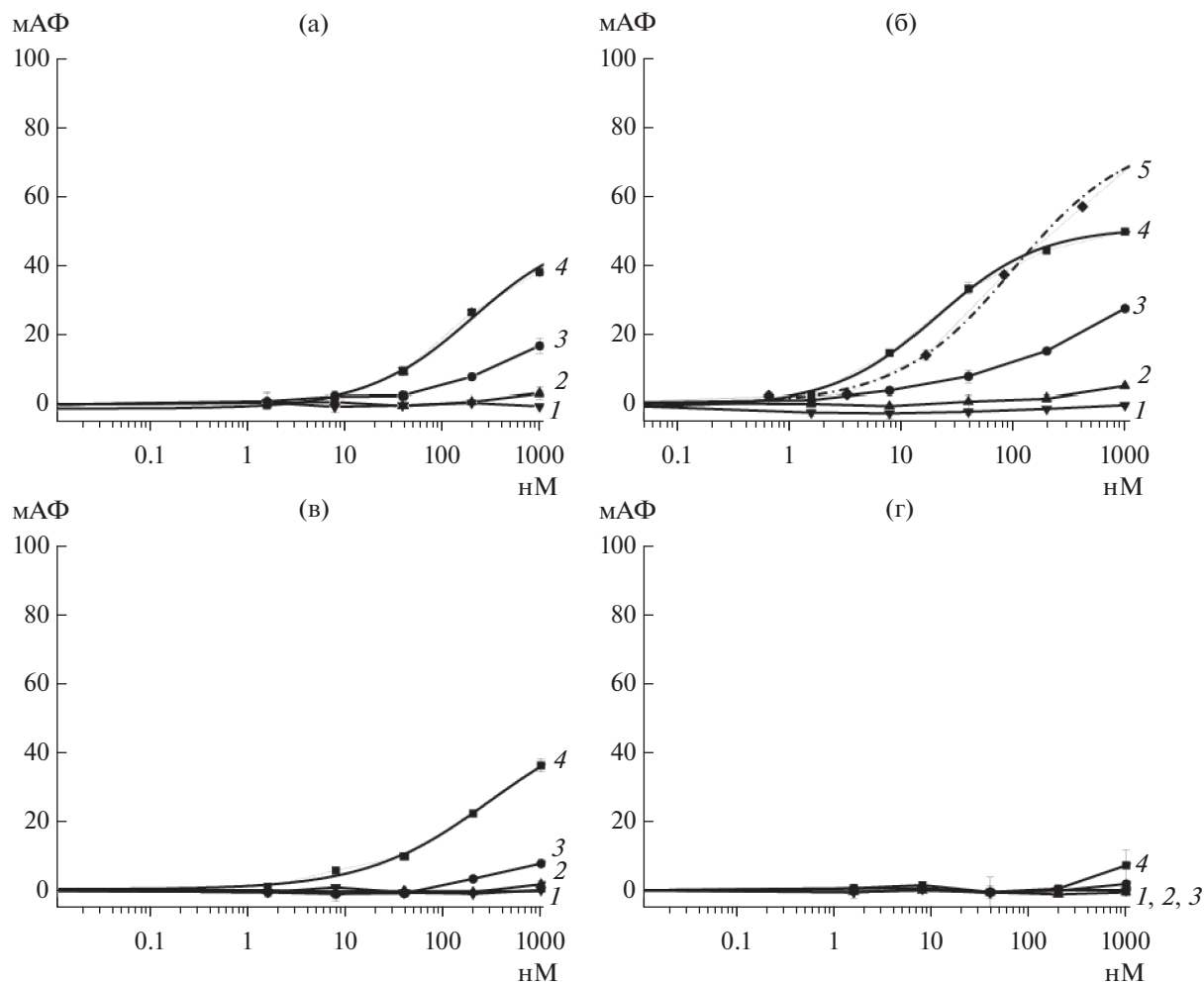


Рис. 2. Зависимости ΔAF (в милли единицах анизотропии – мАФ) АФВ1-Флу от концентрации аптамера в присутствии: хлорида лития (а); ацетата натрия (б); хлорида калия (в); хлорида лития (г); кривые 1–4 – 16, 80, 400 и 2000 мМ КСl соответственно, для остальных солей кривые 1–4 – 20, 100, 500 и 2500 мМ). На рис. (б) кривая 5 – зависимость в среде РБ.

Как показано на рис. 2, ΔAF возрастала с увеличением концентрации одновалентных катионов от 400 мМ до 2.5 М. По выраженности сигнала катионы образовывали ряд $\text{Cs}^+ \ll \text{K}^+ \leq \text{Li}^+ < \text{Na}^+$. Для двухвалентных катионов в целом наблюдались более высокие значения ΔAF , увеличивающиеся в диапазоне концентраций от 6 мМ до 150 мМ (рис. 3). Величины ΔAF возрастали с уменьшением размера катиона: $\text{Ba}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+}$. При этом от концентрации Mg^{2+} увеличение ΔAF зависит монотонно, а в остальных трех случаях наблюдается максимум в диапазоне 150–200 мМ, соответствующий изменению АФ самой метки в отсутствие аптамера.

Взаимодействия аптамер – АФВ1-Флу были проанализированы более подробно для РБ и для двух вариантов концентраций солей с наиболее выраженным ростом ΔAF , а именно для 2.5 М Na^+ и 1.0 М Mg^{2+} . С этой целью, исходя из аппроксими-

рующих функций, значения АФ были пересчитаны как доля связанного АФВ1-Флу (F_{bound}). Полученные результаты (рис. 4) отражают существенные различия степени связывания. Точки, соответствующие 50%-ному связыванию, в солевых растворах по сравнению с РБ сдвигались почти в 5 раз в сторону меньших концентраций аптамера.

Одновременное влияние различных катионов изучали, изменяя концентрации одновалентных катионов в присутствии 5 мМ Mg^{2+} . На рис. 5 отражена корреляция выраженности эффектов для разных катионов в экспериментах с Mg^{2+} и без него. При этом добавление K^+ (в концентрациях между 16 мМ и 2 М) либо Cs^+ снижало ΔAF по сравнению со средой, содержащей только катион магния.

Характеристика системы с конкуренцией АФВ1 и АФВ1-Флу за связывание с аптамером. На основании проведенных экспериментов вариант реакционной среды, содержащей 1.0 М Mg^{2+} , выбран как

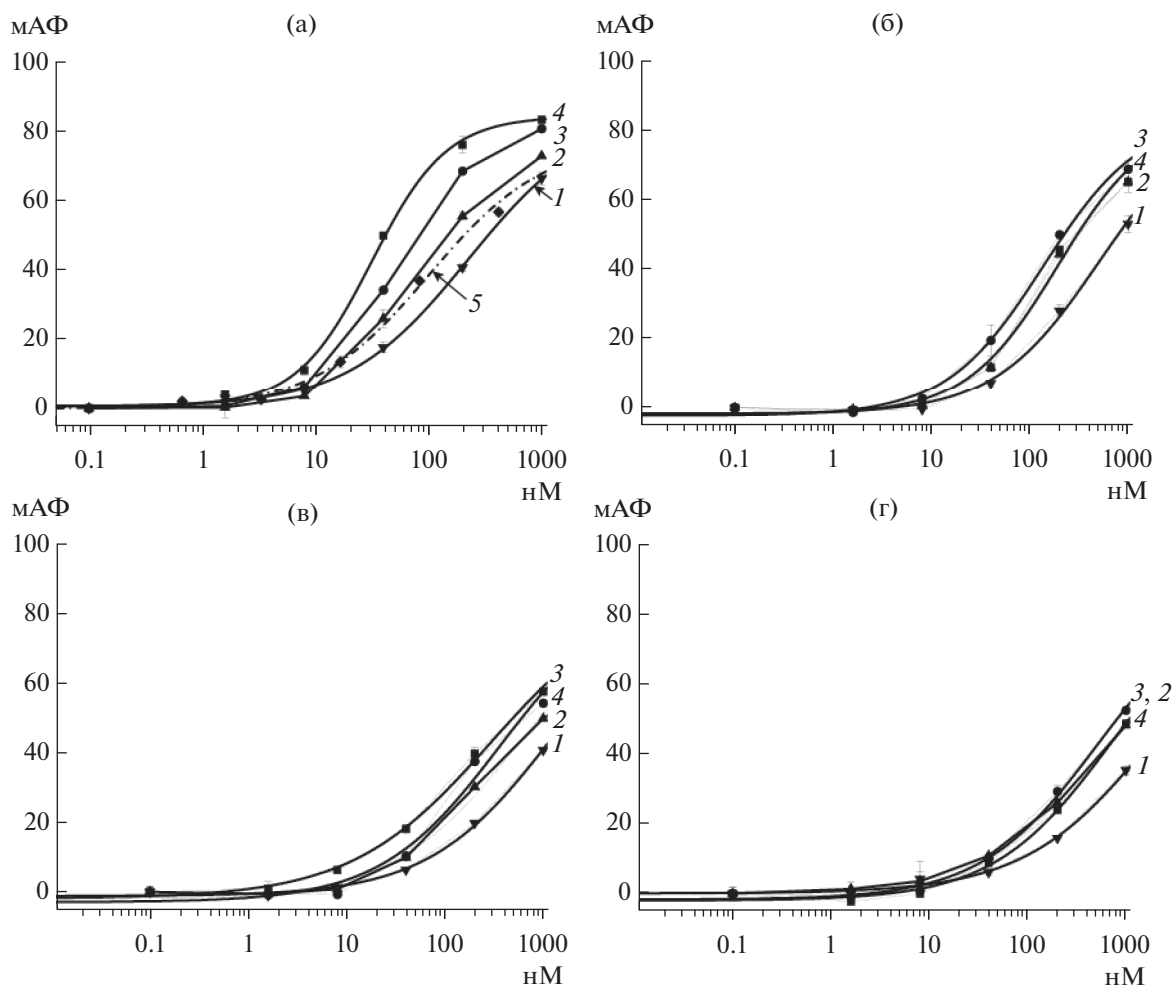


Рис. 3. Зависимости ΔAF (мАФ) АФВ1-Флу от концентрации аптамера в присутствии: ацетата магния (а), хлорида кальция (б), хлорида бария (в) и хлорида стронция (г): кривые 1–4 – 6, 30, 150 и 750 мМ $BaCl_2$, для остальных солей кривые 1–4 – 8, 40, 200 и 1000 мМ соответственно. На рис. (а) кривая 5 – зависимость в среде РБ.

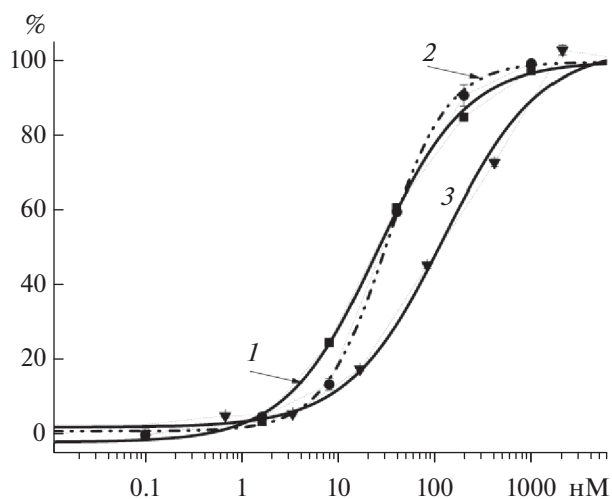


Рис. 4. Зависимости доли связанного АФВ1-Флу (%) от концентрации аптамера в присутствии: 2500 мМ ацетата натрия (1); 1000 мМ ацетата магния (2) и РБ (3).

наиболее перспективный для усиления сигнала и потенциального увеличения чувствительности анализа. В этих условиях было проведено конкурентное взаимодействие с аптамером АФВ1 и АФВ1-Флу. Из рис. 6 видно, что переход от РБ к 1.0 М Mg^{2+} позволил существенно увеличить чувствительность детекции АФВ1 за счет того, что для обеспечения одного и того же изменения АФ требуются разные концентрации аптамера. Так, для изменения АФ на 40 миллиединиц (мАФ) в РБ требуется ~ 120 нМ аптамера, а в выбранной солевой среде – всего 25 нМ. Снижение концентрации рецептора в 5 раз привело к снижению предела обнаружения АФВ1 с 30.8 ± 5.8 нМ до 2.5 ± 0.4 нМ, то есть в ~ 12 раз. Отметим, что достигаемый при этом предел обнаружения (2.5 нМ = 0.78 нг/мл) позволил контролировать в жидких пробах превышения предельно допустимых уровней контаминации АФВ1, составляющих для разных видов пищевых продуктов от 2 до 10 нг/г.

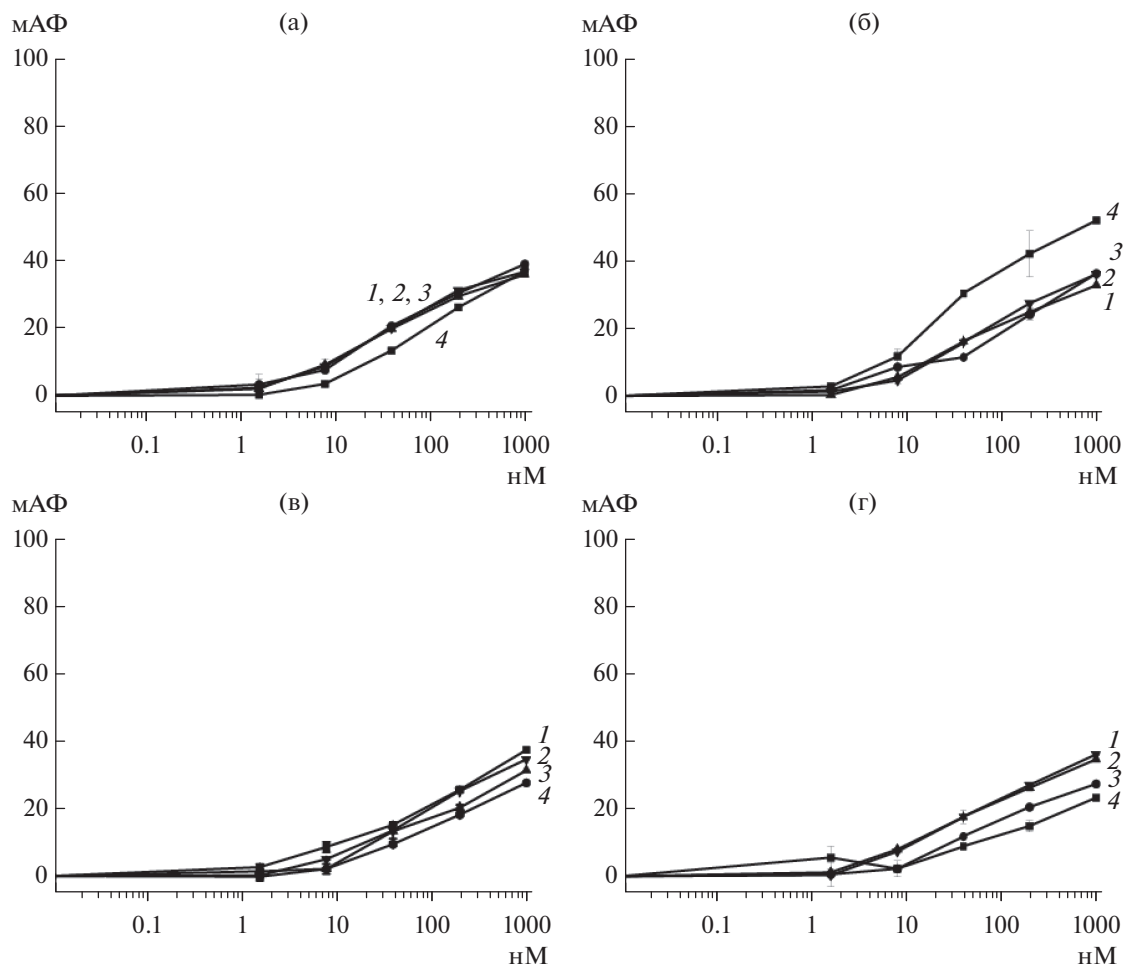


Рис. 5. Зависимости АФ (МАФ) АФВ1-Флу от концентрации аптамера в присутствии 5 мМ Mg^{2+} и хлорида лития (а), ацетата натрия (б), хлорида калия (в) и хлорида цезия (г): кривые 1–4 – 16, 80, 400 и 2000 мМ КСl, для остальных солей кривые 1–4 – 20, 100, 500 и 2500 мМ соответственно.

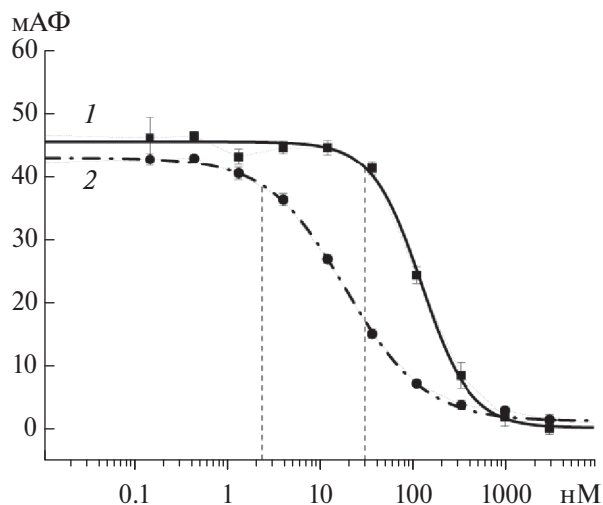


Рис. 6. Конкурентные зависимости АФ (МАФ) АФВ1-Флу от концентрации АФВ1 (нМ) в присутствии 120 нМ аптамера (1) в РБ и в присутствии 25 нМ аптамера в среде с 1.0 М Mg^{2+} (2).

Полученные результаты отражают эффективность катионов металлов в высоких концентрациях как модуляторов сигнала и чувствительности аналитических систем на основе аптамеров с регистрацией анизотропии флуоресценции. Достигнутое снижение предела обнаружения более чем на порядок свидетельствует о перспективности этого подхода и для других биоаналитических разработок.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-74-01080).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Adachi T., Nakamura Y.* // *Molecules*. 2019. V. 24. № 23. Article 4229.
<https://doi.org/10.3390/molecules24234229>
2. *Ilgu M., Nilsen-Hamilton M.* // *Analyst*. 2016. V. 141. № 5. P. 1551–1568.
<https://doi.org/10.1039/c5an01824b>
3. *Sharma A., Khan R., Catanante G., Sherazi T.A., Bhand S., Hayat A., Marty J. L.* // *Toxins*. 2018. V. 10. № 5. Article 197.
<https://doi.org/10.3390/toxins10050197>
4. *Musumeci D., Platella C., Riccardi C., Moccia F., Montesarchio D.* // *Cancers*. 2017. V. 9. № 12. Article 174.
<https://doi.org/10.3390/cancers9120174>
5. *Lipfert J., Doniach S., Das R., Herschlag D.* // *Annu. Rev. Biochem.* 2014. V. 83. № 1. P. 813–841.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060409-092720>
6. *Bloomfield V.A.* // *Biopolymers*. 1997. V. 44. № 3. P. 269–282.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1997\)44:3<269::AID-BIP6>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1997)44:3<269::AID-BIP6>3.0.CO;2-T)
7. *Bosco A., Camunas-Soler J., Ritort F.* // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № 3. P. 2064–2074.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1089>
8. *Kim S.E., Hong S.-C.* // *J. Phys. Chem. B*. 2023. V. 127. № 9. P. 1932–1939.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c07069>
9. *Luo Y., Granzhan A., Marquevielle J., Cucchiaroni A., Lacroix L., Amrane S. et al.* // *Biochimie*. 2023. V. 214. Part A. P. 5–23.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.12.019>
10. *Nakatsuka N., Abendroth J.M., Yang K.-A., Andrews A.M.* // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2021. V. 13. № 8. P. 9425–9435.
<https://doi.org/10.1021/acsami.0c17535>
11. *Samokhvalov A.V., Safenkova I.V., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // *Anal. Chim. Acta*. 2017. V. 962. P. 80–87.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01699>
12. *Shamsi M.H., Kraatz H.-B.* // *J. Inorg. Organometall. Polymers Materials*. 2013. V. 23. № 1. P. 4–23.
<https://doi.org/10.1007/s10904-012-9694-8>
13. *Bhattacharyya D., Mirihana Arachchilage G., Basu S.* // *Front. Chem.* 2016. V. 4. Article 38.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00038>
14. *Cruz-Aguado J.A., Penner G.* // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. № 22. P. 10456–10461.
<https://doi.org/10.1021/jf801957h>
15. *Wang X., Hao Z., Olsen T.R., Zhang W., Lin Q.* // *Nanoscale*. 2019. V. 11. № 26. P. 12573–12581.
<https://doi.org/10.1039/C9NR02797A>
16. *Hetzke T., Vogel M., Gophane D.B., Weigand J.E., Suess B., Sigurdsson S.T., Prisner T.F.* // *RNA*. 2019. V. 25. № 1. P. 158–167.
<https://doi.org/10.1261/rna.068684.118>
17. *Potty A.S., Kourentzi K., Fang H., Jackson G.W., Zhang X., Legge G.B., Willson R.C.* // *Biopolymers*. 2009. V. 91. № 2. P. 145–156.
<https://doi.org/10.1002/bip.21097>
18. *Le L.C., Cruz-Aguado J.A., Penner G.A.* DNA Ligands for Aflatoxin and Zearalenone. 2011. Международный патент № PCT/CA2010/001292.
19. *Xu G., Wang C., Yu H., Li Y., Zhao Q., Zhou X., Li C., Liu M.* // *Nucleic Acids Res.* 2023. V. 51. № 14. P. 7666–7674.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkad541>
20. *Sun L., Zhao Q.* // *Talanta*. 2018. V. 189. P. 442–450.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.036>
21. *Sheng Y.J., Eremin S., Mi T.J., Zhang S.X., Shen J.Z., Wang Z.H.* // *Biomed. Environ. Sci.* 2014. V. 27. № 2. P. 126–129.
<https://doi.org/10.3967/bes2014.027>
22. *Lakowicz J.R.* Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer. 2006. P. 353–370.
23. *Vorlickova M., Kejnovska I., Bednarova K., Rencuk D., Kypr J.* // *Chirality*. 2012. V. 24. № 9. P. 691–698.
<https://doi.org/10.1002/chir.22064>

Competitive Polarization Fluorescence Aptamer Analysis of Aflatoxin B1: Influence of Salt Composition of the Reaction Medium on the Interaction of Reagents and Detection Limit

A. V. Samokhvalov^a, A. V. Zherdev^a, and B. B. Dzantiev^{a, *}

^a*Bach Institute of Biochemistry, of Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru*

The work examines the interaction of an aptamer (a synthetic receptor based on single-stranded DNA) having a loop structure with a specific ligand – aflatoxin B1 (AFB1), a common toxic contaminant of food products. The effects of mono- and divalent cations (Cs⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺) in different concentrations on the reactivity of the aptamer were studied. The fluorescence anisotropy (FA) of the fluorescein-labeled AFB1 derivative was recorded, reflecting both binding to the aptamer and the mobility of the aptamer – labeled AFB1 complex in a given reaction medium. It was shown that the recorded changes in FA differ significantly depending on the cation present in the reaction medium and its concentration. The effect on FA of monovalent cations was observed in the range of 400 mM–2.5 M, for divalent cations it is more pronounced and corresponds to concentrations from 6 to 200 mM. According to the degree of FA changes, the cations form the rows Cs⁺ << K⁺ <= Li⁺ < Na⁺ and Ba²⁺ < Sr²⁺ < Ca²⁺ < Mg²⁺. Comparison of the characteristics of the competitive determination of AFB1 for the traditional reaction medium and the medium with a 50-fold (from 20 mM to 1.0 M) increase in the concentration of magnesium acetate demonstrated that the given increase caused a 12-fold decrease in the detection limit – to 2.5 ± 0.4 nM. The results obtained allow considering choice of cation content as an effective tool for creating highly sensitive aptamer-based analytical systems.

Keywords: aptamers, metal cations, fluorescence polarization, circular dichroism