

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-58

**СРАВНЕНИЕ СВОЙСТВ ДНК-НАНОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ
РАЗНЫХ АПТАМЕРОВ К КРИСТАЛЛИЧЕСКОМУ ФИОЛЕТОВОМУ****COMPARISON OF THE PROPERTIES OF DNA NANOSENSORS
BASED ON DIFFERENT APTAMERS FOR CRYSTAL VIOLET**Г. А. Бобков^{1,2}, М. С. Рубель¹, Е. И. Степченкова²¹*Институт ИТМО, Санкт-Петербург*²*Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Санкт-Петербург*G. A. Bobkov^{1,2}, M. S. Rubel¹, E. I. Stepchenkova²¹*ITMO University, Saint Petersburg*²*Vavilov Institute of General Genetics RAS, Saint Petersburg*

✉ bobkov@scamt-itmo.ru

Аннотация

В работе проведено сравнение флуоресцентных свойств ДНК-наносенсоров, основанных на трех аптамерах, связывающих кристаллический фиолетовый, с различной вторичной структурой. Определены оптимальные условия, соотношения аптамер — краситель и участки разреза. Данные ДНК-наносенсоры могут использоваться в Point-of-Care решениях.

Abstract

This study compares the fluorescence properties of DNA nanosensors based on three aptamers that bind crystal violet and differ in their secondary structure. These DNA nanosensors can be applied to Point-of-Care solutions for pathogen detection. Optimal buffer conditions, aptamer-to-dye ratios, and cleavage sites were determined to improve signal-to-background ratio.

Аптамеры представляют собой одноцепочечные фрагменты ДНК, способные сворачиваться в структуры, обладающие высокой аффинностью к специфическим мишеням. Одним из направлений их применения является создание флуоресцентных биосенсоров (ДНК-наносенсоров). Кристаллический фиолетовый (CV) — краситель, обладающий крайне низкой флуоресценцией в водных растворах, которая значительно усиливается при связывании с гуанинсодержащими участками ДНК, особенно с G-квадруплексными структурами. В данной работе проведено сравнительное исследование трех различных аптамеров к CV — G-квадруплекса с параллельной топологией, G-квадруплекса с антипараллельной топологией и аптамера CV30S, не формирующего G4-структуру, а также ДНК-наносенсоров на их основе.

На первом этапе была проведена оптимизация буферных условий. В оптимальных условиях для каждого аптамера были определены значения флуоресценции и соотношения сигнал/шум. Для CV30S отношение сигнал/фон составило около 9, при интенсивности флуоресценции ~ 13 900 усл. ед. Для параллельного G4-аптамера отношение составляло ~ 2,5, интенсивность ~ 3 400. Антипараллельный G4-аптамер показал наилучшие характеристики с отношением сигнал/фон ~ 11 и интенсивностью ~ 17 000.

Анализ влияния соотношения аптамер — CV при различных концентрациях показал, что для CV30S максимальное значение сигнал/фон составляло ~ 6,5 при определенном соотношении, аналогично для других аптамеров были подобраны оптимальные условия, обеспечивающие максимальный отклик.

Для создания наносенсоров (рис. 1) аптамеры были расщеплены в различных позициях. Для CV30S были протестированы восемь участков и выявлено, что разрез в позиции 2 обеспечивает наилучший отклик, однако участки 8, 3 и 1 также показали удовлетворительные значения (рис. 2).

Дополнительно были оптимизированы соотношения между arm1, arm2 и arm3 ДНК-наносенсоров. Для каждого из трех типов сенсоров (CV30S, параллельный G4, антипараллельный G4) было определено оптимальное соотношение рукавов, обеспечивающее максимальное значение сигнал/фон.

Таким образом, проведено комплексное сравнение трех аптамеров к кристаллическому фиолетовому и разработанных на их основе ДНК-наносенсоров. Показано, что структура аптамера, участок расщепления и геометрия наносенсора существенно влияют на флуоресцентный отклик системы. Представленные подходы могут быть использованы для создания сенсоров в рамках Point-of-Care диагностики.

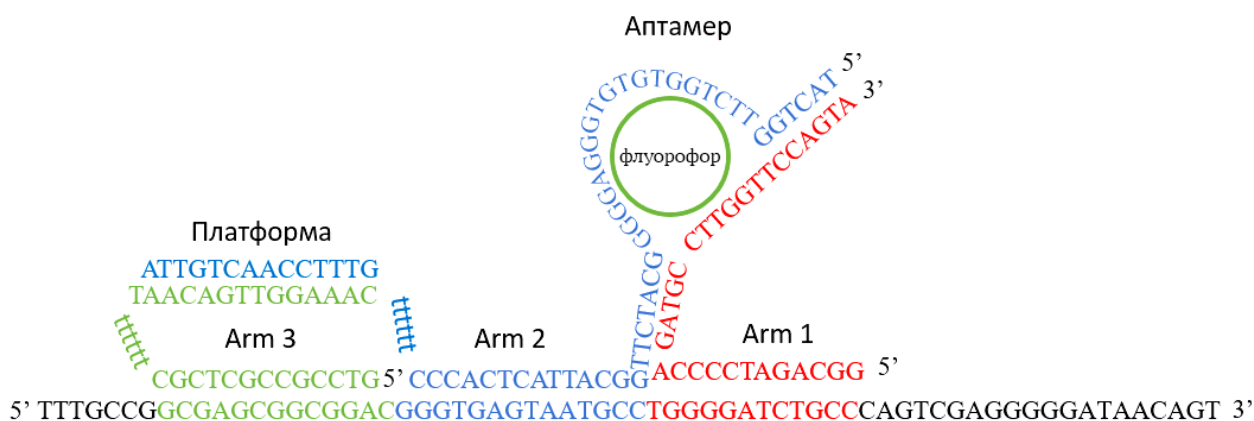


Рис. 1. Схематическое изображение ДНК-наносенсоров с ДНК-переключателем в виде аптамера. Arm 1, Arm 2, Arm 3 — составные компоненты ДНК-наносенсора. Arm 1, Arm 2 также формируют репортерную часть, которая при связывании с исследуемой ДНК формирует необходимую структуру аптамера. Arm 2 и Arm 3 связываются между собой с помощью платформы для увеличения афинности ДНК-наносенсора к детектируемой ДНК последовательности

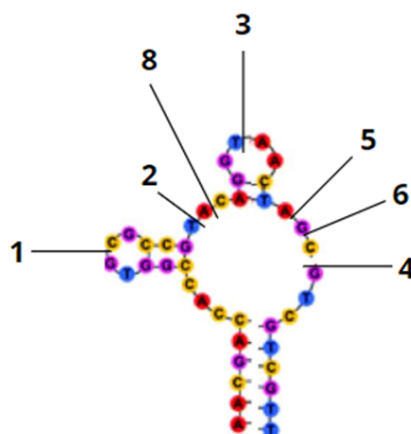


Рис. 2. Изображение структуры аптамера CV30S и точек его разделения для последующего формирования ДНК-наносенсоров