DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-126

ДНК-АПТАМЕРЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ: ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ СТРУКТУРЫ И АФФИННОСТИ И АНАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ *

DNA APTAMERS BINDING SMALL MOLECULES: STUDIES OF STRUCTURE-AFFINITY RELATIONSHIPS AND ANALYTICAL APPLICATIONS

А. В. Самохвалов, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А. Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

A. V. Samokhvalov, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology RAS, Moscow

✉ alvlsamokh@yandex.ru

Аннотация

Работа посвящена изучению структурных особенностей аптамеров для обеспечения их высокой аффинности к целевым лигандам. Охарактеризованы панели аптамеров, отличающиеся по составу участка, стабилизирующего их третичную структуру. Выявлены наиболее аффинные аптамеры, специфичные к антибиотикам (канамицин, хлорамфеникол) и микотоксинам (афлатоксин B1, охратоксин A). Рассмотрено их применение в биоаналитических системах.

Abstract

The work is devoted to the study of structural features of aptamers to ensure their high affinity to target ligands. Panels of aptamers differing in the composition of the region stabilizing their tertiary structure are characterized. The most affinity aptamers specific to antibiotics (kanamycin, chloramphenicol) and mycotoxins (aflatoxin B1, ochratoxin A) are identified. Their application in bioanalytical systems is considered.

Перспективным классом синтетических рецепторных молекул являются одноцепочечные олигонуклеотиды — аптамеры. Их конкурентный потенциал определяется простотой синтеза и модификации, возможностью эффективной ренатурации, сочетающимися с высокой аффинностью и селективностью. Несмотря на значительное число описанных аптамеров, распознающих разнообразные практически значимые лиганды, их аналитическое применение сопровождается рядом сложностей и требует дополнительного дизайна молекул, объединяющего обоснованный выбор лиганд-связывающих и стабилизирующих элементов структуры. Востребованность этих разработок определило цель проведенного исследования, направленного на изучение изменений аффинности аптамеров к различным низкомолекулярным лигандам при варьировании их структуры.

В работе были рассмотрены ДНК-аптамеры, связывающие антибиотики канамицин и хлорамфеникол, а также микотоксины афлатоксин B1 и охратоксин A. С использованием программных средств NUPACK (https://www.nupack.org/) и RNAfold (http://rna.tbi.univie.ac.at/) охарактеризованы варианты данных аптамеров с различными участками вне лиганд-связывающих сайтов. Проведена теоретическая оценка формирования элементов вторичной структуры — петли, шпильки, неспаренные хвосты и др. На основании расчетных данных об энергии Гиббса вторичной структуры и сайтах уотсон-криковских взаимодействий выбраны и синтезированы панели аптамеров, реализующих разные способы стабилизации лиганд-связывающих сайтов.

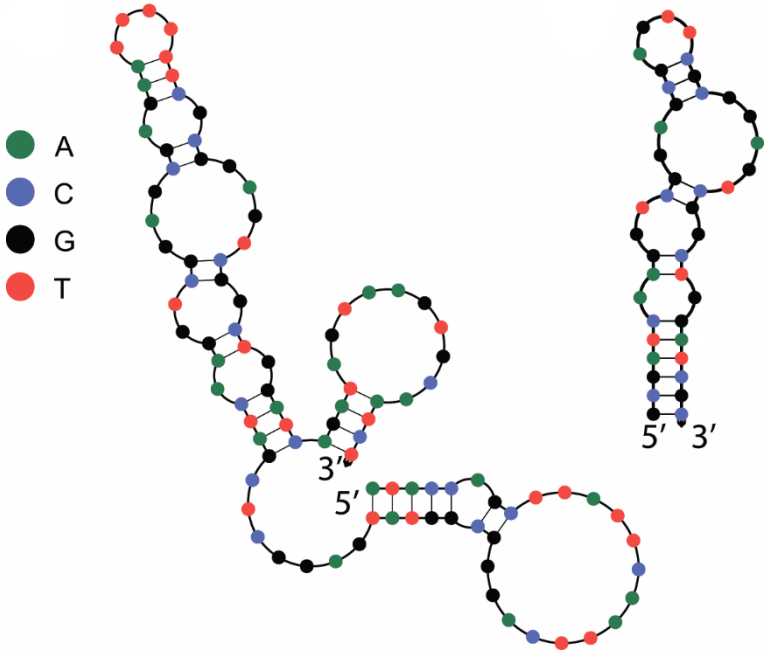
Проведена экспериментальная характеристика констант диссоциации (K_D) комплексов полученных аптамеров при взаимодействии с нативными и флуоресцентно меченными лигандами. Взаимодействия изучались методами изотермической калориметрии, микротермофореза и регистрации анизотропии флуоресценции. Установлены величины K_D для взаимодействий в средах, отличавшихся по pH и ионной силе, а также при варьировании температурного режима.

В частности, сопоставлено восемь вариантов канамицин-связывающего аптамера. Сокращение длины олигонуклеотидной цепи с 93 до 43 звеньев и рост числа водородных связей с 10 до 19 в комплементарном участке, стабилизирующем предполагаемый сайт связывания (см. рисунок), привели к четырехкратному росту аффинности — изменению K_D с 904 ± 104 до 228 ± 55 нМ. Оптимальный буфер для взаимодействия аптамера с канамици-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-14-00421).

© А. В. Самохвалов, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев, 2025

ном — 10 мМ Трис-ацетат, 50 мМ NaCl, 3 мМ ацетат магния, pH 7,4. Сконструированный рецептор превосходит по аффинности ранее описанные аптамеры, специфичные к канамицину. Реализованные подходы представляются перспективными для дизайна других аптамеров, связывающих низкомолекулярные лиганды.



2D-структуры аптамеров к канамицину (NUPACK) при 24 °C в среде с 0,1 М Na^+, 0,01 М Mg^{2+}: *а* — исходный аптамер, *б* — выбранный аптамер с оптимизированной структурой

Охарактеризованные аптамеры применены в гомогенных конкурентных аналитических системах, основанных на регистрации анизотропии флуоресценции либо на фёрстеровском резонансном переносе энергии. Изучено использование в аналитических целях лиганд-индуцированного высвобождения коротких комплементарных олигонуклеотидов из комплексов с аптамерами. Показана возможность выявления афлатоксина B1 и охратоксина А в концентрациях до 3 нМ при одностадийном тестировании с продолжительностью не более 15 мин. Рассматриваются возможности увеличения чувствительности при использовании сконструированных вариантов аптамеров со стабилизированной структурой.