БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2020, том 46, № 4, с. 411–417

УДК 577.113.4:577.113.7:577.27

МЕТОД ТЕРМИЧЕСКОЙ ДИССОЦИАЦИИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СЕЛЕКЦИИ ДНК-АПТАМЕРОВ

© 2020 г. С. А. Лапа*, #, В. Е. Шершов*, Г. С. Краснов*, О. С. Волкова*, В. Е. Кузнецова*, С. П. Радько, А. С. Заседателев*, А. В. Чудинов*, ****

**ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32*

***ООО "ИБМХ-ЭкоБиоФарм", Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8*

Поступила в редакцию 18.12.2019 г.
После доработки 25.12.2019 г.
Принята к публикации 29.12.2019 г.

Разработан метод термической диссоциации комплексов ДНК/мишень (ТДА) для отбора аптамеров к альфа-фетопротеину человека. Метод основан на выявлении наиболее специфичных к мишени ДНК-олигонуклеотидов из комбинаторной ДНК-библиотеки, оставшихся в форме комплекса с мишенью после проведения двух стадий: а) отмывки несвязавшихся последовательностей и б) снятия с мишени связавшихся ДНК-последовательностей, но обладающих низким сродством к ней. После этого проводится термическая диссоциация оставшихся наиболее устойчивых комплексов и вовлечение соответствующих олигонуклеотидов в следующие раунды селекции. Показано более интенсивное обогащение библиотеки с использованием предложенного метода по сравнению со стандартной отмывкой. Благодаря созданию более жестких условий отмывки связавшихся с мишенью ДНК-олигонуклеотидов, использование термической диссоциации способно увеличивать эффективность получения высокоспецифичных аптамеров к их молекулярным мишеням.

Ключевые слова: ДНК-аптамеры, альфа-фетопротеин человека, термическая диссоциация аптамеров

DOI: 10.31857/S0132342320040156

ВВЕДЕНИЕ

Аптамеры – одноцепочечные ДНК- или РНК-олигонуклеотиды, способные проявлять аффинное сродство к широкому спектру биомолекул. Это качество позволяет рассматривать их в качестве функциональных аналогов моноклональных антител. Аптамеры находят применение в клинической диагностике, в настоящее время предпринимаются попытки их использования в качестве самостоятельных терапевтических средств [1, 2]. Процесс отбора специфичных к индивидуальной мишени аптамеров из исходной комбинаторной библиотеки олигонуклеотидов называется SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) и представляет собой ряд циклов связывания олигонуклеотидов с мишенью, выделение связавшейся фракции и амплификацию связавшейся фракции [3, 4]. В случае использования ДНК-библиотек, каждый цикл в методологии SELEX можно разбить на несколько стандартных шагов-стадий:

— взаимодействие ДНК-библиотеки, представляющей собой комбинацию из множества индивидуальных ДНК-олигонуклеотидов, с молекулярной мишенью;

— отмывка несвязавшихся с мишенью ДНК-олигонуклеотидов;

— снятие с молекулы-мишени связавшихся ДНК-олигонуклеотидов;

— амплификация связавшихся ДНК-олигонуклеотидов;

— повторное вовлечение связавшихся ДНК-олигонуклеотидов в раунды селекции с молекулярной мишенью с целью обогащения комбинаторной ДНК-библиотеки олигонуклеотидами с последовательностями, наиболее специфичными к заданной мишени.

Проведение селекции аптамеров из комбинаторных библиотек является сложной задачей, требующей комплексного подхода для успешного решения. Каждая из стадий селекции требует тщательного конструирования, и в настоящее время существует множество разновидностей методологии, направленных на оптимизацию процесса с

Сокращения: ТДА – термическая диссоциация аптамеров; АФП – альфа-фетопротеин; dUTP – 2'-дезоксиуридинтрифосфат; NHS – N-гидросисукцинимид; EDC – гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида; MES – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 135-98-00; факс: +7 (495) 135-14-05; эл. почта: lapa@biochip.ru).

учетом выбранной природы исходной библиотеки (ДНК или РНК), мишени (малые молекулы, макромолекулы, живые клетки), применяемых ферментативных реакций (ПЦР, реакция удлинения праймера), доступной приборной базы (различные варианты "микрофлюидик", биологические микрочипы) и др.

Стадия отмывки является одним из наиболее важных этапов процесса. От ее эффективности зависит степень обогащения библиотеки специфическими к мишени олигонуклеотидами. В общепринятом варианте селекции аптамеров принцип отмывки заключается в разбавлении смеси целевой мишени с ДНК-библиотекой специальными буферными растворами. При этом как несвязавшиеся вовсе, так и связавшиеся ДНК-олигонуклеотиды библиотеки, но имеющие низкое сродство к мишени, отмываются.

В настоящее время существует множество форматов проведения селекции аптамеров. Авторы обзорной статьи [5] провели сравнение т.н. классического SELEX и различных современных вариантов, таких как селекция с применением капиллярного электрофореза, магнитных микрочастиц, различных разновидностей формата "микрофлюидик".

Капиллярный электрофорез для отбора аптамеров впервые предложен Mendonsa и соавт. в 2004 году [6]. Работа рассматривает применение капиллярного электрофореза для отбора аптамеров к человеческому иммуноглобулину E (IgE). При этом разделение комплексов от несвязавшихся олигонуклеотидов осуществляется по разнице их подвижности в электрическом поле. Авторы [7] описывают разработанный ими т.н. неравновесный капиллярный электрофорез равновесных смесей (NECEEM), который применим для анализа кинетических и термодинамических параметров пула нуклеиновых кислот. Путем подачи свободного от мишени буфера на вход капилляра мигрирующие комплексы медленно освобождались в зависимости от равновесной константы диссоциации аптамера и констант скорости (k_d и k_{off} соответственно), которые анализировались в электрофореграмме разделения.

В работе [8] предложен метод отмывки связавшихся аптамеров, использующий реакцию вытеснения цепи (strand displacement reaction). Авторы позиционируют предложенный подход вытеснения аптамера как для обнаружения целевых белковых мишеней, так и для повышения эффективности клеточного SELEX (cell-SELEX).

Интересный способ удаления неспецифичных последовательностей предложен в работе [9]. Для удаления несвязавшихся с белковой мишенью олигонуклеотидов использовали обработку нитроцеллюлозных мембран с нанесенным целевым белком и ДНК-библиотекой с помощью ДНКазы I, за которой следовала градиентная отмывка буферами, содержащими мочевину. Метод позволил получать специфичные к выбранной белковой мишени аптамеры за одну стадию селекции.

В настоящей работе предложен метод термической диссоциации обогащенных библиотек аптамеров (ТДА) из электрофорезного геля после образования комплексов ДНК/мишень для увеличения сродства пула олигонуклеотидов обогащенной библиотеки к белковой мишени – альфафетопротеину человека. При этом заведомо неспецифичные ДНК-олигонуклеотиды предварительно отделяются от комплексов методом электрофореза в акриламидном геле, а ДНК-олигонуклеотиды, обладающие недостаточным сродством к мишени, удаляются методом экстракции из геля при разрушении комплексов ДНК/мишень. После этого проводится термическая диссоциация наиболее устойчивых комплексов и вовлечение соответствующих олигонуклеотидов в следующие раунды селекции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целью настоящего исследования явилась разработка способа обогащения ДНК-библиотек для селекции аптамеров с применением термической диссоциации комплексов лиганд – мишень (ТДА) на примере ДНК-библиотек и мишени белковой природы.

В качестве целевого белка использован альфафетопротеин человека (АФП), являющийся маркером пре- и неонатальных заболеваний, а также онкомаркером некоторых видов рака. АФП представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 69 000 Да, состоящий из одной полипептидной цепи, включающей около 600 аминокислот. Эксперимент проводили как с применением немодифицированной (природной) ДНК-библиотеки, так и с введением модифицированного трифосфата дозоксиуридина (mod-dUTP), структура которого приведена на рис. 1.

Для инициирующего обогащения комбинаторных библиотек проводили пять раундов селекции с иммобилизованным на магнитных частицах целевым белком (АФП), включающих стадии: отрицательная селекция к магнитным частицам, образование комплекса с белком, отмывка, амплификация специфичных к белку ДНК-олигонуклеотидов. При амплификации обогащенных в процессе селекции ДНК-библиотек использовали биотинилированный праймер для разделения цепей на магнитных частицах. Для получения целевой цепи использовали праймер, флуоресцентно-меченный цианиновым красителем Cy5. Введение метки позволяло при электрофоретическом разделении достоверно визуализировать полосу, соответствующую цепи аптамера.

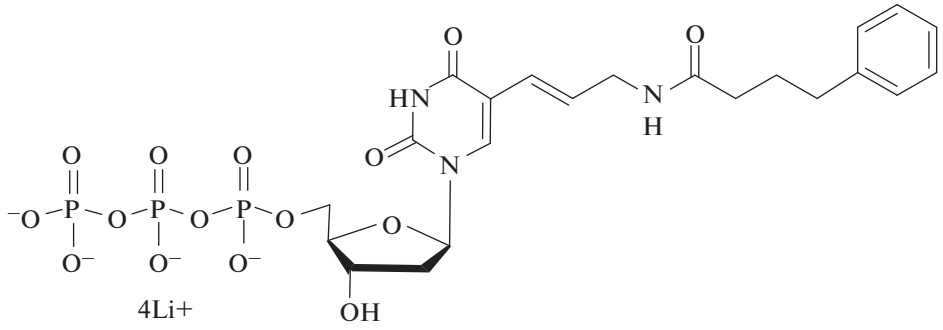

Рис. 1. Производное 5-аминоаллил-2'-дезоксиуридин-5'-трифосфата, модифицированное по аминоаллильному фрагменту фенилмасляной кислотой.

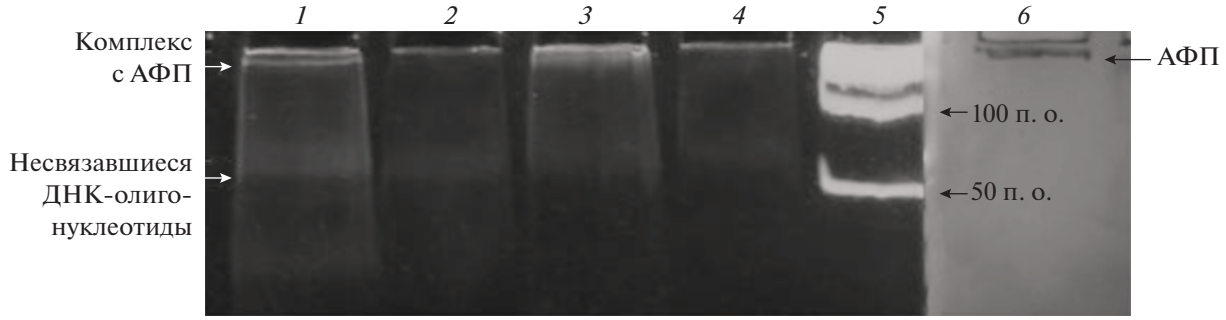

Рис. 2. Электрофореграмма, показывающая разделение комплексов ДНК-олигонуклеотидов с белком от несвязавшихся ДНК-олигонуклеотидов после 5-го раунда селекции до применения ТДА. *1* – комплекс одноцепочечной ДНК-библиотеки (химически модифицированная) с альфа-фетопротеином человека (АФП); *2* – одноцепочечная ДНК-библиотека (химически модифицированная); *3* – комплекс одноцепочечной ДНК-библиотеки (природная) с АФП, *4* – одноцепочечная ДНК-библиотека (природная); *5* — маркер длин ДНК "GeneRuler 50 bp" (Thermo Scientific, США); *6* – АФП. Лунки *1*–*5*, окрашивание SYBR Green I (Invitrogen, США). Лунка *6* – окрашивание "кумасси". В лунки *2* и *4* добавляли в пять раз меньшее количество библиотеки в пересчете на ДНК по сравнению с лунками *1* и *3*, поскольку данные лунки использовались исключительно для оценки подвижности олигонуклеотидов библиотеки (15 пмоль для лунок с комплексом ДНК/АФП и 3 пмоль для свободных библиотек). В качестве электродного буфера использовали 1× TBE-буфер.

После этого обогащенные библиотеки инкубировали со свободным АФП в микромолярных концентрациях, и полученный комплекс ДНК/белок подвергали электрофоретическому разделению в акриламидном геле для отделения несвязавшихся с белком олигонуклеотидов (рис. 2). Стрелками показаны: комплексы олигонуклеотидов обогащенных библиотек с АФП, несвязавшиеся олигонуклеотиды, свободный АФП без добавления ДНК-библиотеки. Из рисунка видно, что при электрофоретическом разделении визуализируются образовавшиеся комплексы ДНК/белок.

С учетом молекулярной массы АФП и длины модифицированных олигонуклеотидов, входящих в состав библиотеки, был выбран следующий состав геля: 12% акриламид/*бис*-акриламид (19 : 1) в 1× TBE, содержащем 10 mM KCl и 3 mM $MgCl_2$. Наличие в буфере солей калия и магния обусловлено необходимостью стабилизировать неканонические типы вторичной структуры ДНК, которые могут присутствовать в аптамерах: G-квадруплексы и шпилечные структуры ДНК. Разделение проводили при поддерживаемой термостатом температуре 20°C, что предотвращает неконтролируемую термическую диссоциацию комплексов в процессе электрофореза. С этой же целью в электрофоретической ячейке поддерживали относительно невысокое напряжение (порядка 120–150 вольт на 20 см геля).

Затем осуществляли элюцию из соответствующего участка геля связавшихся аптамеров в водный раствор 2%-ного перхлората лития с сохранением микромолярных концентраций аптамеров и их мишени. Это позволило сохранить неразрушенные комплексы наиболее специфичных аптамеров с целевым белком, но удалить аптамеры с низким сродством к мишени. Гель после элюции использовали для проведения термической диссоциации.

Термическая диссоциация представляет собой процесс разложения комплексов лиганд-мишень под воздействием температуры, характеризующий-

ся константой равновесия, или степенью диссоциации. Поскольку диссоциация сопровождается поглощением энергии, в соответствии с принципом Ле Шателье–Брауна нагрев увеличивает степень диссоциации и смещает равновесие в направлении продуктов разложения [10]. Нами предложено использовать это свойство при проведении селекции аптамеров и обогащения библиотек последовательностями олигонуклеотидов, характеризующимися большими показателями сродства к использованной белковой мишени.

Электрофорезный гель после элюции инкубировали при температуре 60°C в течение 20 мин в водном растворе 2%-ного перхлората лития без использования хаотропных агентов и детергентов. Разрушение сохранившихся комплексов приводило к получению фракции наиболее специфичных аптамеров. В случае взаимодействия ДНК/белок, процессы, протекающие при проведении ТДА, характеризуются не только увеличением скорости обратимой равновесной реакции разложения комплексов. Важную роль играют также два процесса – обратимый (разрушение вторичной структуры олигонуклеотидов) и необратимый (термическая денатурация целевого белка). Следует заметить, что для термолабильных белков термическая диссоциация обязательно сопровождается денатурацией белка, что не мешает осуществлению метода. Предположительно, метод может обладать селективностью к определенным типам аптамеров либо их конформаций с более термостабильными вторичными структурами или более высокими энергиями взаимодействия с мишенью. Это отличает предлагаемый метод от классического метода отмывки буферными растворами, где смещение равновесия в изотермических условиях достигается изменением концентрации лиганда и мишени.

ДНК-библиотеки после первого раунда ТДА амплифицировали и подвергали термической диссоциации после инкубации с мишенью еще дважды. В результате получали обогащенные высокоспецифичными аптамерами библиотеки, готовые к проведению секвенирования для определения индивидуальных нуклеотидных последовательностей.

Проводили сравнение эффективности способа термодиссоциации с базовым вариантом селекции аптамеров методом электрофоретического разделения комплексов ДНК/АФП. На рис. 3 представлена электрофореграмма, показывающая образование комплекса обогащенной одноцепочечной ДНК-библиотеки с целевым белком (АФП) после проведения пяти раундов селекции на магнитных частицах и трех раундов ТДА. В качестве контроля использовали библиотеку, обогащенную в восемь раундов без ТДА. В обоих случаях использовали эквимолярные количества АФП и обогащенных ДНК-библиотек. Измеряли интенсивности свечения окрашенных SYBR Green I (Invitrogen, США) целевых полос с помощью программы ImageJ (INH, США). Значение оптической плотности полосы комплекса с библиотекой, полученной методом ТДА, превышало на ~30% значение оптической плотности контрольной полосы. По разнице в оптической плотности образовавшихся комплексов с АФП наблюдали преимущество метода ТДА по сравнению со стандартной отмывкой.

Таким образом, показано обогащение ДНК-библиотек с помощью разработанного метода и возможность его применения для проведения SELEX к белковым мишеням, в том числе с использованием модифицированных нуклеотидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Комбинаторные ДНК-библиотеки и праймеры

Последовательности использованных в работе комбинаторных библиотек, праймеров для их амплификации и особенности их твердофазного синтеза описаны ранее в [11].

Полимеразная цепная реакция

Амплификацию ДНК-библиотек после каждого цикла SELEX производили методом ПЦР. Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) и 2.5 единицы (на реакционный объем 50 мкл) Taq ДНК-полимеразы (ThermoFisher, США) для немодифицированных библиотек либо 0.5 единиц Vent (exo-) полимеразы (NEB, США) в случае модифицированных библиотек. Смесь содержала трифосфаты (dATP, dCTP, dGTP и dTTP) в концентрации 0.2 mM каждого. В случае модифицированных библиотек смесь вместо dTTP содержала модифицированный трифосфат дезоксиуридина (рис. 1). Рабочая концентрация праймеров составляла 100 nM каждого. Один из праймеров был окрашен цианиновым красителем Cy5 для формирования окрашенной цепи аптамера, второй праймер нес биотиновую метку. Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе Dyad (Bio-Rad, США) по следующей программе: 4 мин при 95°C; 20 циклов по 30 с при 95°C, 30 с при 66°C и 40 с при 72°C; завершали реакцию инкубированием в течение 3 мин при 72°C.

Разделение цепей ДНК на магнитных частицах

Для получения однонитевой ДНК с красителем Cy5 на 5'-конце проводили разделение цепей на магнитных частицах Dynabeads™ M-270 Streptavidin (Invitrogen Dynal AS, Norway). Биотинилированную по 5'-концу двухцепочечную ДНК (ПЦР-

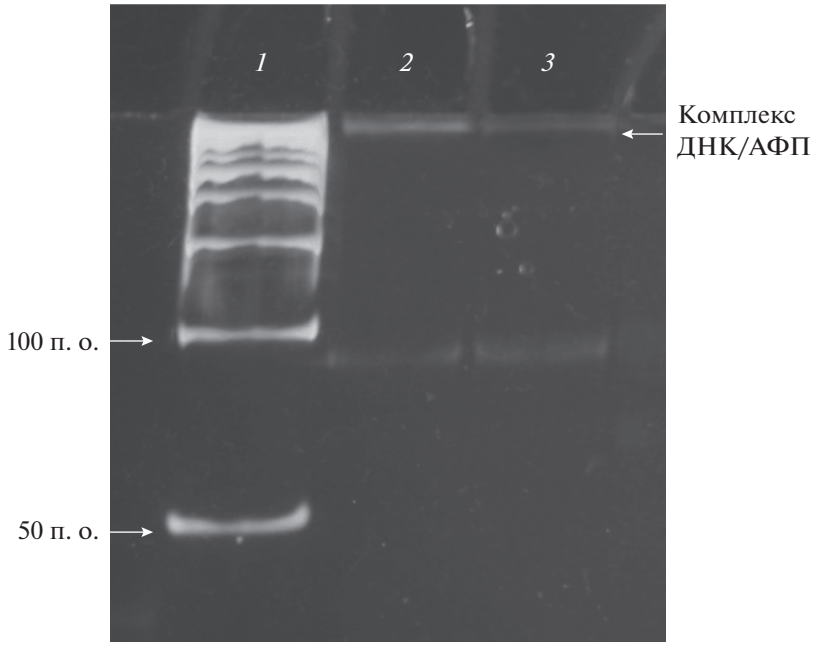

Рис. 3. Электрофореграмма комплексов АФП с ДНК-библиотеками. Лунка № *1* – молекулярный маркер длин ДНК “GeneRuler 50bp” (Thermo Scientific, США), лунка № *2* – обогащенная ДНК-библиотека, полученная с применением способа термической диссоциации (15 пмоль) после инкубации с АФП (15 пмоль), лунка № *3* – обогащенная ДНК-библиотека, полученная без применения способа термической диссоциации (15 пмоль) после инкубации с АФП (15 пмоль). Видно, что оптическая плотность комплекса ДНК/АФП выше в лунке № *2*. В качестве электродного буфера использовали 1× SELEX-буфер.

продукт, объем 50 мкл) смешивали с эквивалентным объемом 10× ПЦР-буфера для Taq-полимеразы (Thermo Scientific, США), pH 8.8, нагревали до 95°C, инкубировали 3 мин и охлаждали до комнатной температуры. Связывание ПЦР-продукта с магнитными частицами проводили в 5× ПЦР-буфере при 25°C в течение 30 мин при постоянном перемешивании. С помощью магнитосепаратора магнитные частицы с иммобилизованной на них двухцепочечной ДНК отделяли от реакционной смеси и промывали трижды 5× буфером.

Небиотинилированную цепь элюировали добавлением к магнитным частицам 20% раствора гидроксида аммония, инкубировали 2 мин, затем частицы отделяли на магнитном сепараторе, элюат переносили в чистую пробирку и переосаждали спиртовым раствором, содержащим 0.125 M ацетата аммония и 70% этанола. Одноцепочечную небиотинилированную ДНК осаждали цетрифугированием (16000 *g*, 2 мин). Осадок промывали спиртовым раствором ацетата аммония, затем 96% этиловым спиртом и высушивали на воздухе. К высушенному осадку добавляли 20 мкл деионизованной воды (MQ-H_2O) и определяли концентрацию ДНК на спектрофотометре NanoDrop 1000.

Магнитные частицы с биотинилированной цепью промывали 20% гидроксидом аммония 1 мин при комнатной температуре, затем супернатант удаляли, а частицы инкубировали с 50 мкл 30% гидроксида аммония при 60°C при эпизодическом ручном перемешивании в течение 8 мин. Элюат переносили в чистую пробирку, где переосаждали биотинилированную цепь добавлением 5 объемов спиртового раствора ацетата аммония, содержащего 0.125 M ацетата аммония и 70% этанола. Осадок промывали спиртовым раствором ацетата аммония, затем 96% этиловым спиртом и высушивали на воздухе. К высушенному осадку добавляли 20 мкл деионизованной (MQ) H_2O и определяли концентрацию ДНК на спектрофотометре NanoDrop 1000. Эффективность разделения цепей определяли электрофоретическим методом.

Эффективность элюции ДНК контролировали, добавляя к магнитным частицам 40 мкл раствора, содержащего 8 M мочевины и 2 M тиомочевины, что приводило к элюции всей ДНК, оставшейся на магнитных частицах. Элюат анализировали методом ПААГ-электрофореза.

Приготовление иммобилизованного препарата АФП

Препараты водных растворов АФП были охарактеризованы с помощью иммуноферментного анализа с использованием набора АФП-ИФА (Хема, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Для иммобилизации АФП использовали магнитные частицы Dynabeads MyOne Carboxylic acid (ThermoFisher, США). Иммобилизацию проводили с использованием двухступенчатого протокола на основе N-гидросисукцинимида (NHS) и гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC). Частицы промывали дважды 25 mM MES pH 6 порциями по 300 мкл в течение 10 мин при перемешивании пипеткой. Готовили свежие растворы EDC и NHS в холодном растворе MES концентрацией 50 мг/мл. Смешивали по 50 мкл растворов EDC и NHS с промытыми частицами Dynabeads и инкубировали при комнатной температуре 30 мин при медленном вращении. После инкубации проводили отделение частиц от раствора с помощью магнитного сепаратора и промывали частицы дважды холодным раствором MES порциями по 300 мкл. Добавляли АФП в 100 мкл раствора MES и инкубировали при комнатной температуре 1 ч при медленном вращении. Отделяли частицы от раствора на магнитном сепараторе и проводили кэпирование в 50 mM Tris HCl pH 7.4 в течение 15 мин. Готовые к использованию частицы хранили до 3 недель при 4°C в 25 mM Tris HCl pH 7.4, либо до 3 месяцев в том же буфере в 50% глицерине при –20°C. Растворы содержали 0.02% азида натрия.

Определение нагрузки магнитных частиц по АФП проводили с помощью набора АФП-ИФА (Хема, Россия).

Образование комплекса одноцепочечной ДНК-библиотеки с иммобилизованным АФП

Первые пять раундов селекции проводили с использованием иммобилизованного препарата АФП. Модифицированную одноцепочечную библиотеку нагревали до 95°C в течение 2 мин и охлаждали до 37°C. Проводили раунд контр-селекции на магнитных частицах, не содержащих иммобилизованный АФП в 1× SELEX-буфере, приготовленном из 2× SELEX-буфера, имеющего pH 7.5 и содержащего 0.30 M NaCl, 60 mM HEPES, 20 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, 0.1% TWEEN-20. АФП, иммобилизированный на магнитных частицах с концентрацией 15 пмоль/мг, промывали 1× SELEX-буфером. Магнитные частицы разбавляли в 100 мкл 2× SELEX-буфера. Добавляли 100 мкл модифицированной одноцепочечной библиотеки, создавая молярное соотношении 5 : 1 к количеству иммобилизованного белка. Инкубировали 1 час при перемешивании, 37°C. Отбирали супернатант – несвязавшиеся олигонуклеотиды. Магнитные частицы, содержащие АФП со связавшимися последовательностями, промывали 1× SELEX-буфером при комнатной температуре, растворяли в 100 мкл H_2O качества MQ и инкубировали 10 мин при 95°C, супернатант отделяли, определяли его концентрацию на спектрофотометре NanoDrop 1000 и использовали в дальнейших раундах SELEX.

Образование комплекса одноцепочечной ДНК-библиотеки с АФП в растворе

Модифицированную одноцепочечную библиотеку нагревали до 95°C в течение 2 мин и медленно охлаждали до 37°C. К 50 мкл водного раствора АФП с концентрацией 30 пмоль/мкл добавляли 50 мкл 2× SELEX-буфера. Добавляли 100 мкл модифицированной одноцепочечной библиотеки с концентрацией 15 пмоль/мкл. Инкубировали 1 час при перемешивании при 37°C.

Электрофоретическое разделение комплексов ДНК/АФП и несвязавшихся олигонуклеотидов

Метод применяли в качестве одного из трех циклов SELEX с использованием ТДА. Электрофорез проводили на термостатируемом приборе Protean II xi Cell (Bio-Rad, США).

Готовили электрофорезный гель следующего состава: 12% акриламид/бис-акриламид (19 : 1) в 1× TBE, содержащий 10 mM KCl и 3 mM $MgCl_2$. В лунки вносили по 20 мкл комплекса ДНК/АФП, свободную библиотеку, а также контроли. Электрофорез проводили при контролируемой температуре 20°C при напряжении порядка 120–150 вольт на 20 см геля. Контроль миграции связанной и несвязанной ДНК осуществляли с использованием 45-мерного флуоресцентно-меченного олигонуклеотида. Электрофорез проводили до длины пробега олигонуклеотидного контроля – 5–7 см. В качестве дополнительных контролей были использованы: несвязанная с АФП модифицированная библиотека после 5-го раунда, маркер длин ДНК GeneRuler 50bp (Thermo Scientific, США) и АФП и/или белковый маркер Precision Plus Protein 10–250 кДа (Bio-Rad, США).

Визуализацию полос в геле проводили с использованием SYBR Green I (Invitrogen, США) для ДНК и Кумасси для белков. По электрофоретической картине оценивали количество связавшейся с АФП и несвязавшейся ДНК.

Элюция ДНК из геля

Полосы геля, содержащие комплекс ДНК/АФП, вырезали, помещали в пробирку объемом 1.5 мл и проводили элюцию связавшихся с белком ДНК-олигонуклеотидов, с помощью 100 мкл раствора $LiClO_4$ в H_2O (Milli-Q). Смесь инкубировали 60 мин при 37°C, центрифугировали пробирки при 2000 об./мин в течение 2 мин, супернатант отбирали и измеряли концентрацию ДНК на спектрофотометре NanoDrop 1000. ДНК, содержащуюся в полученном супернатанте, не использовали для дальнейших раундов селекции. Оставшийся в

пробирках гель использовали для проведения термической диссоциации ДНК-олигонуклеотидов, обладающих повышенным сродством к АФП.

Термическая диссоциация ДНК-олигонуклеотидов, обладающих повышенным сродством к АФП

К гелю после элюции добавляли 100 мкл 1× SELEX-буфера, нагревали до 60°C и инкубировали в течение 20 мин. Супернатант отделяли, определяли концентрацию ДНК на спектрофотометре NanoDrop 1000. Элюат после термической диссоциации вовлекали в последующий из трех раундов селекции, в состав которого входит этап термической диссоциации. После проведения трех раундов SELEX с термической диссоциацией получали обогащенную ДНК-библиотеку, пригодную для определения индивидуальных последовательностей олигонуклеотидов, входящих в ее состав.

Для оценки эффективности обогащения библиотек методом ТДА проводили инкубацию библиотек с АФП (15 пмоль) и последующий электрофорез комплексов АФП с ДНК-библиотеками аналогично тому, как описано выше. Эффективность связывания ДНК с АФП оценивали по разнице оптической плотности полос, соответствующих образовавшемуся комплексу ДНК/АФП. Измерения оптической плотности проводили с помощью программы ImageJ (NIH, США).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы" (соглашение № 14.576.21.0096, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57617X0096).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты проводились *in vitro*. Работа не содержит исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zhu G., Chen X.* // Adv. Drug Deliv. Rev. 2018. V. 134. P. 65–78.
2. *Adachi T., Nakamura Y.* // Molecules. 2019. V. 24 (23). pii: E4229.
3. *Tuerk C., Gold L.* // Science. 1990. V. 249. P. 505–510.
4. *Ellington A.D., Szostak J.W.* // Nature. 1990. V. 346. P. 818–822.
5. *Dembowski S.K., Bowser M.T.* // Analyst. 2017. V. 143. P. 21–32.
6. *Mendonsa S.D., Bowser M.T.* // J. Am. Chem. Soc. 2004. V. 126. P. 20–21.
7. *Berezovski M.L., Drabovich A., Krylova S.M., Musheev M., Okhonin V., Petrov A., Krylov S.N.* // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 3165–3171.
8. *Li L., Chen X., Cui C., Pan X., Li X., Yazd H.S., Wu O., Qiu L., Li J., Tan W.* // J. Am. Chem. Soc. 2019. V. 141. P. 17174–17179.
9. *Liu Y., Wang C., Li F., Shen S., Tyrrell D.L., Le X.C., Li X.F.* // Anal. Chem. 2012. V. 84. P. 7603–7606.
10. *Le Chatelier H., Boudouard O.* // Bulletin de la Société Chimique de France. 1898. V. 19. P. 483–488.
11. *Лапа С.А., Ромашова К.С., Спицын М.А., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Гусейнов Т.О., Заседателева О.А., Радько С.П., Тимофеев Э.Н., Лисица А.В., Чудинов А.В.* // Молек. биол. 2018. Т. 52. С. 984–996.

Method of Thermal Dissociation for the Selection of DNA-Aptamers

S. A. Lapa*, #, V. E. Shershov*, G. S. Krasnov*, O. S. Volkova*, V. E. Kuznetsova*, S. P. Radko, A. S. Zasedatelev*, and A. V. Chudinov*, ****

#Phone: +7 (495) 135-98-00; fax: +7 (495) 135-14-05; e-mail: lapa@biochip.ru

**Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia*

***IBMC-EcoBioPharm Ltd., ul. Pogodinskaya 10, str. 8, Moscow, 119121 Russia*

A method of thermal dissociation of DNA/target complexes (TDA) for selection of aptamers to human alpha-fetoprotein has been developed. The method is based on the identification of the most target-specific DNA oligonucleotides from the combinatorial DNA library, remaining in the form of a complex with the target after two stages: (a) washing of unbound sequences and (b) removal of bound DNA sequences from the target, but having low affinity for it. After that, the thermal dissociation of the remaining most stable complexes and the involvement of the corresponding oligonucleotides in the next rounds of selection are carried out. A more intensive enrichment of the library using the proposed method is shown in comparison with the standard wash. Due to the creation of more stringent conditions for washing the target-bound DNA oligonucleotides, the use of thermal dissociation can increase the efficiency of selection of highly specific aptamers for their molecular targets.

Keywords: DNA aptamers, human alpha-fetoprotein, thermal dissociation of aptamers