

## ВЛИЯНИЕ КОЛИЧЕСТВА АПТАМЕРНЫХ ЯДЕР НА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ АПТАМЕРНОГО КОМПЛЕКСА МАЛАХИТОВОГО ЗЕЛЕНОГО

Синичкив Т. Б.<sup>1</sup>, Попышева Т. Д.<sup>1</sup>, Бобков Г. А.<sup>1</sup>

Научный руководитель – м.н.с Бобков Г.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

Работа выполнена в рамках темы НИР № 15040 «Развитие фундаментальных основ молекулярной диагностики для разработки новых аналитических систем на основе ДНК-нанотехнологии».

### Введение

Медицина развивается и переходит на персонализированный подход, это побуждает спрос на новые, быстрые, чувствительные и недорогие методы диагностики заболеваний на ранних стадиях их развития.

Традиционные методы, ПЦР, секвенирование, ДНК-микрочипы, флуоресцентная гибридизация *in situ*, обладают рядом преимуществ, но также имеют некоторые недостатки: высокая стоимость оборудования и проведения анализа, необходимость в высококвалифицированном персонале, низкая скорость проведения анализа и последующая обработка результатов.

Для устранения данных сложностей развиваются новые методы молекулярной диагностики, например ДНК-наносенсоры на основе аптамеров, которые будут не заменой традиционных методов, а их дополнением.

Аптамеры - это короткие одноцепочечные олигонуклеотиды РНК или ДНК, способные связываться с анализируемой молекулой-мишенью (например флуорофором) с высокой аффинностью и специфичностью, как антиген-антитело. ДНК-наносенсоры - это молекулярные системы, которые способны обнаруживать анализируемую последовательность ДНК. Наибольший интерес представляю «вспыхивающие» аптамеры, при их связывании с флуорофором происходит увеличение/появление флуоресценции, однако когда комплекс аптамер-флуорофор не образуется, то и усиление/появления флуоресценции мы увидим [1]. Примером «вспыхивающих» аптамером служит аптамер малахитового зеленого (MG), связывающий трифенилметановый краситель MG [2].

### Основная часть

Для создания высокочувствительных методов молекулярной диагностики необходимо снизить предел детекции мутаций, это приведет к тому, что ДНК-наносенсоры на основе аптамером можно будет использовать без предварительной амплификации анализируемой последовательности ДНК, это уменьшит количество возможных ошибок, а время анализа снизится в два раза [3].

Для снижения лимита детекции и усиления флуоресценции можно использовать кооперативный эффект, который заключается в том, что ядра аптамера будут последовательно закреплены между собой с помощью линкеров, это приведет к тому, что общая флуоресценция системы значительно увеличится в сравнении с аптамером, у которого только одно ядро для связывания с флуорофором.

Экспериментально было проверено два варианта длины линкеров между ядрами короткие - 5 пар нуклеотидов (п. н.) и длинные - 10 пар нуклеотидов. Также имеется два варианта расположения ядер в аптамере - параллельно и антипараллельно. Для каждого из варианта аптамеров были оптимизированы протоколы и получены следующие результаты. Аптамеры с короткими линкерами между ядрами с антипараллельной ориентацией ядер имеют равномерный рост до 5 ядер, с параллельной ориентацией –

практически равномерный рост до 5 ядер, однако наблюдается падение флуоресценции аптамеров с 1 ядром и 2 ядрами. Для аптамеров с длинными линкерами между ядрами и с антипараллельной ориентацией наблюдается равномерный рост флуоресценции до 4 ядер, для параллельной ориентации ядер в аптамере - рост до 3 ядер.

Предложенный вариант решения проблемы экономически выгоден: он не требует дорогого и сложного оборудования, дорогостоящих реагентов, кроме того, этот метод прост в обработке и незамедлительном получении результатов. Он открывает новые возможности для усиления сигнала ДНК-наносенсоров на основе аптамеров при минимальных затратах.

### **Выводы**

Экспериментально было подтверждено, что благодаря увеличению количества аптамерных ядер можно увеличить флуоресценцию аптамерной системы малахитового зеленого. Наибольшую эффективность демонстрируют конструкции с короткими линкерами и антипараллельной ориентацией ядер, обеспечивающие равномерный рост сигнала до 5 ядер. Увеличение длины линкера с 5 п. н. до 10 п. н. ограничивает количество функциональных ядер (до 4 для антипараллельной и до 3 для параллельной ориентации), что может быть связано с чрезмерной гибкостью аптамера, что вероятно приводит к нарушению кооперативного взаимодействия между ядрами.

Предложенный вариант диагностики заболеваний является доступным для внедрения методом в лабораторную практику и перспективным для разработки чувствительных диагностических платформ детекции мутаций и однонуклеотидных замен.

### **Литература**

1. O'Steen M. R., Kolpashchikov D. M. A self-assembling split aptamer multiplex assay for SARS-COVID19 and miniaturization of a malachite green DNA-based aptamer //Sensors and Actuators Reports. – 2022. – Т. 4. – С. 100125.
2. Wang H. et al. Selection and characterization of malachite green aptamers for the development of light-up probes //ChemistrySelect. – 2016. – Т. 1. – №. 8. – С. 1571-1574.
3. Kolpashchikov D. M. Evolution of hybridization probes to DNA machines and robots //Accounts of chemical research. – 2019. – Т. 52. – №. 7. – С. 1949-1956.