



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/50 (2020.02); G01N 33/57488 (2020.02); C12N 15/115 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019140693, 10.12.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.12.2019Дата регистрации:
10.06.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.12.2019

(45) Опубликовано: 10.06.2020 Бюл. № 16

Адрес для переписки:

119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8,
комн. 208, Тихоновой Е.Г.

(72) Автор(ы):

Лапа Сергей Анатольевич (RU),
Тимофеев Эдуард Николаевич (RU),
Шершов Валерий Евгеньевич (RU),
Кузнецова Виктория Евгеньевна (RU),
Радько Сергей Павлович (RU),
Лисица Андрей Валерьевич (RU),
Чудинов Александр Васильевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
"ИБМХ-ЭкоБиоФарм" (ООО
"ИБМХ-ЭкоБиоФарм") (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2618872 C1, 11.05.2017. US
20150119285 A1, 30.04.2015. ЦИМБРЕЗ Ф.М. и
др. Аптамеры: новые молекулярные
диагностические маркеры бактериальных и
вирусных инфекций // Инфекционные болезни:
Новости. Мнения. Обучение. 2015. DONG L.
et al. Screening and Identifying a Novel ssDNA
Aptamer against Alpha-fetoprotein Using CE-
SELEX. Sci Rep. 2015;5:15552.

(54) Способ термической диссоциации для проведения селекции ДНК-аптамеров

(57) Реферат:

Изобретение относится к области молекулярной биологии, энзимологии, биотехнологии и медицины и предназначено для получения ДНК-аптамеров. Способ включает: (а) предварительное обогащение комбинаторной ДНК-библиотеки путем образования ее комплекса с иммобилизованной белковой мишенью (альфа-фетопроtein человека; АФП) и проведения раундов селекции; (б) образование комплекса полученной библиотеки с раствором нативного (неиммобилизованного) АФП; (в) отделение комплексов ДНК/АФП от несвязавшихся ДНК-олигонуклеотидов методом акриламидного электрофореза; (г) экстракцию связавшейся с АФП ДНК из акриламидного геля

при 37°C; (д) термическую диссоциацию оставшейся в виде комплекса с АФП ДНК из геля при 60°C; (е) амплификацию ДНК после термической диссоциации. После проведения раундов селекции с использованием термической диссоциации получают обогащенную ДНК-библиотеку, пригодную для секвенирования. Использование термической диссоциации, благодаря созданию более жестких условий отмывки связавшихся с мишенью ДНК-олигонуклеотидов, позволяет повысить эффективность отбора наиболее специфичных аптамеров к белковым мишеням. 2 з.п. ф-лы, 4 ил., 10 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 723 373**⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

G01N 33/50 (2020.02); G01N 33/57488 (2020.02); C12N 15/115 (2020.02)(21)(22) Application: **2019140693, 10.12.2019**(24) Effective date for property rights:
10.12.2019Registration date:
10.06.2020

Priority:

(22) Date of filing: **10.12.2019**(45) Date of publication: **10.06.2020** Bull. № 16

Mail address:

**119121, Moskva, ul. Pogodinskaya, 10, str. 8, komn.
208, Tikhonovoj E.G.**

(72) Inventor(s):

**Lapa Sergej Anatolevich (RU),
Timofeev Eduard Nikolaevich (RU),
Shershov Valerij Evgenevich (RU),
Kuznetsova Viktoriya Evgenevna (RU),
Radko Sergej Pavlovich (RU),
Lisitsa Andrej Valerevich (RU),
Chudinov Aleksandr Vasilevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"IBMKH-EkoBioFarm" (OOO
"IBMKH-EkoBioFarm") (RU)**

(54) THERMAL DISSOCIATION METHOD FOR SELECTION OF DNA-APTAMERS

(57) Abstract:

FIELD: biology.

SUBSTANCE: invention relates to molecular biology, enzymology, biotechnology and medicine and is intended for producing DNA-aptamers. Method includes: (a) pre-enrichment of the combinatorial DNA library by forming a complex thereof with an immobilized protein target (human alpha-fetoprotein; AFP) and conducting selection rounds; (b) forming a complex of the obtained library with a native (non-immobilized) AFP solution; (c) separating DNA / AFP complexes from unbound DNA oligonucleotides by acrylamide electrophoresis; (d) extracting AFP bound

DNA from acrylamide gel at 37 °C; (e) thermal dissociation of the remaining AFP-complexed DNA from gel at 60 °C; (f) amplification of DNA after thermal dissociation. After the selection rounds with the use of thermal dissociation, a rich DNA library suitable for sequencing is obtained.

EFFECT: use of thermal dissociation, due to creation of more stringent washing conditions of DNA-oligonucleotides involved with the target, makes it possible to increase efficiency of selection of the most specific aptamers to protein targets.

3 cl, 4 dwg, 10 ex

1 C
2 7 2 3 3 7 3
RU

RU
2 7 2 3 3 7 3
C 1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области молекулярной биологии, энзимологии, биотехнологии и медицины, и обеспечивает способ термической диссоциации связавшихся с белковой мишенью обогащенных комбинаторных ДНК-библиотек для проведения

5 селекции ДНК-аптамеров.

Аптамерами называют специальным образом отобранные фрагменты нуклеиновых кислот (олигонуклеотиды), проявляющие аффинность к индивидуальным молекулярным мишеням, что позволяет рассматривать такие молекулы как функциональные аналоги

10 моноклональных антител. Совокупность молекулярно-биологических методов, позволяющих производить отбор высокоспецифичных аптамеров к их молекулярным мишеням, носит название SELEX. В общем случае, методологию SELEX можно разбить на несколько стандартных этапов:

- взаимодействие ДНК-библиотеки, представляющей собой комбинацию из множества индивидуальных ДНК-олигонуклеотидов с различными последовательностями, с

15 молекулярной мишенью;

- отмывка несвязавшихся с мишенью ДНК-олигонуклеотидов;

- снятие с молекулы-мишени связавшихся ДНК-олигонуклеотидов;

- амплификацию связавшихся ДНК-олигонуклеотидов;

- повторное вовлечение связавшихся ДНК-олигонуклеотидов в раунды селекции с

20 молекулярной мишенью с целью обогащения комбинаторной ДНК-библиотеки олигонуклеотидами с последовательностями, наиболее специфичными к заданной мишени.

В общепринятом варианте селекции аптамеров принцип отмывки заключается в разбавлении раствора целевой мишени и ДНК-библиотеки специальными буферными

25 растворами. При этом как несвязавшиеся вовсе, так и связавшиеся ДНК-олигонуклеотиды библиотеки, но имеющие низкое сродство к мишени, отмываются.

Настоящее изобретение рассматривает метод удаления молекул ДНК комбинаторной библиотеки с целевой мишени после стадий отмывки и снятия с мишени специфичных

30 ДНК-олигонуклеотидов, и проведение дополнительного этапа - термической диссоциации комплексов ДНК/мишень. Проведение термической диссоциации позволяет выявить высокоспецифичные к мишени ДНК-олигонуклеотиды, оставшиеся в форме комплекса с мишенью после проведения стадии отмывки и стадии снятия с мишени специфичных ДНК-последовательностей. Выявленная совокупность высокоспецифичных

35 ДНК-олигонуклеотидов, полученных методом термодиссоциации, может быть использована для дальнейших раундов селекции.

Уровень техники

Аптамеры являются одним из вариантов биодетекторов, их применение основано на способности фрагментов нуклеиновых кислот взаимодействовать с субстратом (мишенью) за счет образования трехмерных структур, проявляющих сродство к

40 определенным пространственным формам различных белков или других макромолекул (а также низкомолекулярных соединений) путем образования водородных связей, электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий [1]. Таким образом, аптамеры на основе нуклеиновых кислот являются функциональными аналогами белковых антител, но характеризуются рядом преимуществ, такими как: возможность применения

45 рутинных методов получения аптамеров без использования лабораторных животных; возможность автоматизации процесса получения аптамеров; сравнительная дешевизна; уникальные физико-химические характеристики, такие как возможность многократной денатурации-ренатурации [2].

Метод селекции из библиотеки олигонуклеотидов различных последовательностей аптамеров, имеющих сродство к определенному субстрату, получил название SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) и в упрощенном виде представляет собой ряд циклов связывания олигонуклеотидов с мишенью, выделение связавшейся фракции и амплификацию связавшейся фракции [3, 4].

Стадия отмывки несвязавшихся с субстратом аптамеров весьма важна, потому что от корректности ее проведения зависит эффективность обогащения библиотеки высокоспецифичными аптамерами.

Приведено описание и сравнение различных техник, основанных на методе капиллярного электрофореза для селекции аптамеров в формате «микрофлюидик» [5]. В работе [6] описано применение капиллярного электрофореза для отбора аптамеров к человеческому иммуноглобулину E (IgE). Описано разделение комплексов от несвязавшихся олигонуклеотидов по разнице в подвижности в электрическом поле.

Авторы [7] описывают разработанный ими 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.

Авторами [8] предложен электрохимический метод селекции аптамеров. Отбор проводили с использованием золотого электрода в качестве твердой матрицы для иммобилизации белковой мишени (DOCK8). Это позволило проводить вольтамперометрический мониторинг связанной ДНК после каждого цикла отбора. После восьми раундов отбора аптамеры ДНК с высоким сродством для DOCK8 были идентифицированы с константами диссоциации в диапазоне от 3,3 до 66 нМ.

В работе [9] предложен интересный 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).

Описан способ быстрого отбора аптамеров с использованием магнитного поля (MARAS) для скрининга ДНК-аптамеров (патент на изобретение США №20150119285). Описанный способ MARAS способен эффективно генерировать аптамеры с высокой аффинностью и специфичностью. Вращающееся магнитное поле или переменное магнитное поле использовали в сочетании с магнитными микрочастицами или наночастицами, связанными с мишенью, для отбора аптамеров ДНК, обладающих искомой степенью сродства и специфичности к мишени и разделения таковых от олигонуклеотидов, не обладающих требуемым сродством к мишени.

Способ по патенту на изобретение США №7745607 обеспечивает выбор аптамеров посредством иммобилизации каждого олигонуклеотида библиотеки путем образования дуплекса с иммобилизованным антисмысловым олигонуклеотидом, реакцию дуплексной молекулы с мишенью и сбор олигонуклеотидных молекул, которые диссоциируют от дуплексной структуры благодаря переходу в более энергетически выгодную форму комплекса с мишенью. Таким образом осуществляется отмывка специфичных аптамеров, при этом аптамеры, не обладающие достаточным сродством к мишени, остаются в иммобилизованной фазе.

Отечественное изобретение (патент на изобретение РФ № RU 2618872) описывает

способ направленного истощения олигонуклеотидных библиотек в отношении водорастворимых белковых мишеней глутатион-S-трансферазы и стрептавидина. После связывания мишени с подготовленным пулом исходной олигонуклеотидной библиотеки проводят разделение полученной смеси нуклеиновая кислота/белок-мишень гель-5
5
фильтрационной хроматографией на фракции. Изобретение позволяет элиминировать из пула олигонуклеотидов максимально возможное количество аффинных к заданной мишени молекул, а повторение раундов такой селекции гарантирует отсутствие в финальном пуле молекул олигонуклеотидов, имеющих значимую для дальнейшего применения аффинность к мишени.

10
10
Изобретение (патент на изобретение РФ № RU 2518368) относится к области биохимии, в частности к способу селекции аптамеров к клеточным рецепторам и поверхностным белкам, который включает проведение раундов селекции, каждый из которых включает стадии: позитивной селекции с дальнейшим удалением несвязавшаяся ДНК; негативной селекции с последующим отделением связавшихся с негативной 15
15
мишенью последовательностей; амплификацию полученных в ходе селекции аптамеров с получением ПЦР-продукта. Второй и все последующие раунды селекции начинают с негативной селекции аптамеров, в четвертом раунде селекции после проведения стадий негативной и позитивной селекции аптамеров к комплексам аптамер-клетка добавляют избыток моноклональных антител, специфичных к белковой мишени на поверхности 20
20
клетки. Аптамеры, перешедшие в раствор, отделяют и амплифицируют. Изобретение позволяет получать аптамеры, специфичные к нативным белкам.

Российский патент на изобретение РФ № RU 2699522 описывает способ ферментативного получения модифицированных ДНК для создания реагентов, специфично связывающихся с гидрофобными участками высокомолекулярных 25
25
органических соединений. Изобретение ориентировано на получение высокоспецифичных модифицированных аптамеров к белковым мишеням. В описанном способе используется стандартный вариант отмывки несвязавшихся олигонуклеотидов от целевой мишени.

Заявляемое изобретение отличается от вышеописанных аналогов тем, что 30
30
разработанный способ отбора специфичных к мишени аптамеров заключается в применении термодиссоциации образующихся комплексов ДНК/мишень. 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 35
35
геля перед проведением термической диссоциации.

Раскрытие сущности изобретения

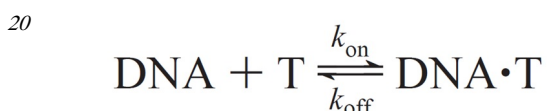
Проведение селекции ДНК-аптамеров из комбинаторных библиотек является сложной задачей, требующей комплексного подхода для успешного решения. Каждая из стадий селекции требует тщательного конструирования, и в настоящее время существует 40
40
множество разновидностей методологии, направленных на оптимизацию процесса с учетом выбранной природы исходной библиотеки (ДНК или РНК), мишени (малые молекулы, макромолекулы, живые клетки), применяемых ферментативных реакций (ПЦР, реакция удлинения праймера), доступной приборной базы и др.

Целью настоящего изобретения явилась разработка способа обогащения ДНК- 45
45
библиотек для селекции аптамеров с применением термической диссоциации комплексов лиганд - мишень на примере ДНК-библиотек и мишеней белковой природы.

Поставленная цель достигается методом термической диссоциации обогащенных библиотек аптамеров (ТДА) из электрофорезного геля после конъюгации с их белковой

мишенью. В качестве целевого белка используется альфа-фетопроtein человека, являющийся маркером пре- и неонатальных заболеваний, а также онкомаркером некоторых видов рака. В предлагаемом методе изначально проводится пять раундов селекции с иммобилизованным целевым белком (альфа-фетопроteinом), включающих 5 стадии: образование комплекса с белком, отмывка, амплификация специфичных к белку ДНК-олигонуклеотидов. После этого обогащенная библиотека смешивается со свободным целевым белком в микромолярных концентрациях и полученный комплекс подвергается электрофоретическому разделению в акриламидном геле. Данный этап позволяет исключить несвязавшиеся с белком аптамеры. Затем осуществляется элюция 10 из соответствующего участка геля связавшихся аптамеров в водный раствор 2%-ного перхлората лития с сохранением микромолярных концентраций аптамеров и их мишени. Это позволяет сохранить неразрушенные комплексы наиболее специфичных аптамеров с целевым белком, но удалить аптамеры с низким сродством к мишени. После этого производится термическая диссоциация комплексов при температуре 60°C и 15 последующая элюция наиболее высокоспецифичных аптамеров. Обогащенная библиотека амплифицируется и подвергается термической диссоциации после образования комплекса с мишенью еще дважды.

В состоянии равновесия диссоциация комплексов ДНК и мишени (Т) описывается как уравнение химического равновесия:



Где k_{on} и k_{off} - константы скорости связывания и диссоциации, соответственно. Эти 25 две константы скорости определяют равновесную константу диссоциации как $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. С ростом температуры равновесная константа диссоциации эндотермической реакции всегда увеличивается, следовательно, увеличивается степень диссоциации. Нами предложено использовать это свойство при проведении селекции аптамеров и обогащения библиотек последовательностями олигонуклеотидов, характеризующимися 30 большими показателями сродства к использованной белковой мишени.

В результате получается обогащенная высокоспецифичными аптамерами библиотека, готовая к проведению секвенирования для определения индивидуальных нуклеотидных последовательностей. Разработанный способ применим для проведения SELEX к 35 белковым мишеням, в том числе с использованием модифицированных нуклеотидов.

Краткое описание фигур и таблиц

Фиг 1. - Электрофореграмма, показывающая разделение комплексов ДНК-олигонуклеотидов с белком от несвязавшихся ДНК-олигонуклеотидов.

1 - комплекс одноцепочечной ДНК-библиотеки №1 (химически модифицированная) с альфа-фетопроteinом человека (АФП);

40 2 - одноцепочечная ДНК-библиотека №1;

3 - комплекс одноцепочечной ДНК-библиотеки №2 (природная) с АФП,

4 - одноцепочечная ДНК-библиотека №2;

5 - маркер длин ДНК «GeneRuler 50 bp»;

45 6 - АФП. Лунки 1-5, окрашивание бромидом этидия. Лунка 6 - окрашивание «кумасси блю».

Фиг 2. - Спектр поглощения флуоресцентно-меченных ДНК-олигонуклеотидов после термической диссоциации комплексов ДНК/АФП.

Фиг 3. - Производное 5-аминоаллил-2'-дезоксисуридин-5'-трифосфата,

модифицированное по аминокислотному фрагменту фенилпропионовой кислотой.

Фиг 4. - Электрофореграмма комплексов АФП с ДНК-библиотеками.

Лунка №1 - молекулярный маркер длин ДНК «GeneRuler 50bp», лунка №2 - обогащенная ДНК-библиотека, полученная с применением способа термической диссоциации, лунка №3 - обогащенная ДНК-библиотека, полученная без применения способа термической диссоциации. Видно, что оптическая плотность комплекса ДНК/АФП выше в лунке №2.

Осуществление изобретения

В работе использованы полимеразы Taq ДНК («Евроген», Россия) и Deep Vent («BioLabs», Великобритания) с буферными растворами соответствующих производителей; трифосфаты дезоксинуклеозидов производства «Fermentas» (США); флуоресцентный краситель SYBR Green («Thermo Scientific», США); магнитные частицы MagnaBind Streptavidin Beads («Thermo Scientific», США). Остальные реактивы и растворители марок "ОСЧ", "ХЧ" или "ЧДА" приобретены в фирмах Aldrich, Alfa Aesar, Fluka, Химмед. Воду для приготовления растворов получали на установке Milli-Q (EMD Millipore, США).

Аmplification ДНК-библиотек после каждого цикла SELEX производили методом ПЦР. Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 1,5 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3) и 2,5 единицы (на реакционный объем 50 мкл) TaqDNA полимеразы (ThermoFisher) для немодифицированных библиотек либо 0,5 единиц Vent (exo-) полимеразы (NEB) в случае модифицированных библиотек. Смесь содержала трифосфаты (dATP, dCTP, dGTP и dTTP) в концентрации 0,2 мМ каждого. В случае модифицированных библиотек смесь вместо dTTP содержала модифицированный трифосфат дезоксиуридина. Рабочая концентрация праймеров составляла 100 нМ каждого. Один из праймеров был окрашен цианиновым красителем Cy5 для формирования окрашенной цепи аптамера, второй праймер нес биотинную метку. Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе Rotor-Gene Q5 plex HRM по следующей программе: 4 мин при 95°C; 20 циклов по 30 сек при 95°C, 30 сек при 66°C и 40 сек при 72°C; завершали реакцию инкубированием в течение 3 мин при 72°C.

Полученную в результате амплификации двухцепочечную ДНК (дцДНК) использовали для разделения на магнитных стрептавидиновых частицах. ПЦР-продукт (50 мкл) смешивали с эквивалентным объемом 10x ПЦР-буфера, инкубировали при 95°C в течение 3 мин. Полученную смесь добавляли к магнитным частицам, предварительно суспендированным в 10x ПЦР-буфере, инкубировали при комнатной температуре 30 мин. За это время биотинилированная цепь ДНК ковалентно связывается со стрептавидином. Магнитные частицы трижды промывали буфером, а затем инкубировали 2 мин с 20% раствором гидроксида аммония при комнатной температуре. Далее супернатант сливали в чистую пробирку и пересаждали 5-ю объемами спиртового раствора ацетата аммония. Осадок промывали 96% этиловым спиртом, высушивали и растворяли в деионизованной воде (MQ-H₂O).

Магнитные частицы промывали гидроксидом аммония, а затем инкубировали с ним в течение 8 мин при 60°C. Полученный раствор сливали в пробирку и пересаждали биотинилированную цепь спиртовым раствором ацетата аммония. Осадок промывали 96% этиловым спиртом, высушивали от спирта и растворяли в MQ-H₂O.

Первые пять раундов образования комплекса проводили с использованием иммобилизованного препарата альфа-фетопротейна (АФП), гликопротеина с молекулярным весом около 69000 Да, состоящего из одной полипептидной цепи, включающей около 600 аминокислот. 220 pmol библиотеки инкубировали с необходимым

количеством иммобилизованного препарата АФП. Одноцепочечную библиотеку нагревали до 95°C в течение 2 мин и медленно охлаждали до 37°C. АФП, иммобилизованный на магнитных частицах с концентрацией 15 пмоль/мг, промывали 1x SELEX-буфером, приготовленном из 2x SELEX-буфера, имеющего pH 7.5 и содержащего 0.30 M NaCl, 60 mM HEPES, 20 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 0.1% TWEEN-20. Частицы разбавляли в 100 мкл 2x SELEX-буфере. Добавляли 100 мкл одноцепочечной библиотеки. Инкубировали 1 час при 37°C, перемешивая. Отбирали супернатант - несвязавшиеся олигонуклеотиды. Микрочастицы, содержащие АФП со связавшимися последовательностями, промывали 1x SELEX-буфером при комнатной температуре, растворяли в 100 мкл H₂O качества MQ и инкубировали 10 мин при 95°C, супернатант отделяли, определяли его концентрацию на спектрофотометре NanoDrop 1000 и использовали в дальнейших раундах SELEX.

Допустимо производить пять предварительных раундов селекции без использования магнитных частиц, путем создания комплексов ДНК/АФП в растворе (с нативным неиммобилизованным АФП) с их последующим разделением методом электрофореза и элюцией связавшихся с мишенью ДНК-олигонуклеотидов из геля.

Последующие три цикла образования комплекса проводили в буфере с нативным неиммобилизованным АФП при 37°C в течение 60 мин в 1x SELEX-буфере, затем производили электрофоретическое разделение комплекса от несвязавшихся ДНК-олигонуклеотидов и последующую термическую диссоциацию.

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 1x TBE, содержащий 10 mM KCl и 3 mM MgCl₂. 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. Анализ проводили при контролируемой 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). Контроль миграции связанной и несвязанной ДНК осуществляли с использованием 45-мерного флуоресцентно-меченного олигонуклеотида. Длина пробега олигонуклеотидного контроля составляла 5-7 см. Гель визуализировали окрашиванием SYBR Gold I. Результаты электрофореза представлены на Фиг. 1.

По электрофоретической картине оценивали количество связавшейся с АФП и несвязавшейся ДНК.

Связавшуюся ДНК в комплексе с АФП вырезали из геля и элюировали 100 мкл раствора LiClO₄ в H₂O в течение 60 мин при 37°C. В классическом варианте SELEX именно такая связавшаяся ДНК вовлекается в последующие раунды селекции. В предлагаемом варианте полученный элюат не используется.

После проведения элюции при 37°C проводили термическую диссоциацию оставшихся комплексов. Для этого к гелю добавляли 100 мкл 1x SELEX-буфера, нагревали до 60°C и инкубировали в течение 20 мин. Супернатант отделяли, определяли концентрацию ДНК на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Фиг. 2) и использовали в дальнейших (дополнительных двух) раундах SELEX с последующей термической диссоциацией.

Теоретически допустимо проведение термодиссоциации с использованием магнитных частиц и иммобилизованного АФП.

Получали как библиотеку с применением природных нуклеотидов, так и с

модифицированным производным дезоксиуридина, структура которого приведена на Фиг. 3. После проведения трех раундов селекции с применением термической диссоциации - получали обогащенную высокоспецифичными аптамерами ДНК-библиотеку, готовую к проведению секвенирования для определения индивидуальных нуклеотидных последовательностей аптамеров.

Сравнивали эффективность способа термодиссоциации с базовым вариантом селекции аптамеров методом электрофоретического разделения комплексов ДНК/АФП (Фиг. 4). Видно, что оптическая плотность больше в случае обогащения библиотеки способом термической диссоциации.

Примеры

Пример 1. Получение биотинилированного праймера

Для последующего разделения цепей комбинаторной ДНК-библиотеки в одну из образующихся в ходе ПЦР цепей вводили биотин путем применения биотинилированного праймера. Праймер синтезировали, используя С6-аминомодификатор со свободной NH₂-группой по 5'-концу с последующим введением биотиновой метки. К раствору гидоксисукцинимидного эфира биотина (2,0 мг) в ДМФА (590 мкл) добавляли праймер в соотношении 10/1 соответственно. Реакция проходила в течение 30 минут при комнатной температуре. Далее проводили хроматографическую очистку полученного продукта в градиенте ацетонитрила.

Пример 2. Получение праймера, меченного цианиновым красителем Cy5

Праймер синтезировали со свободной NH₂-группой по 5'-концу. Краситель Cy5 в виде гидроксисукцинимидного эфира в ДМСО добавляли к праймеру в соотношении 10/1. Проводили инкубацию 2 часа при комнатной температуре. Далее проводили хроматографическую очистку полученного продукта в градиенте ацетонитрила.

Пример 3. Полимеразная цепная реакция для амплификации комбинаторных (вырожденных) ДНК-библиотек

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 1,5 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3) и 2,5 единицы (на реакционный объем 50 мкл) Taq DNA полимеразы (ThermoFisher) для немодифицированных библиотек либо 0,5 единиц Vent (exo-) полимеразы (NEB) в случае модифицированных библиотек, трифосфаты (dATP, dCTP, dGTP, а также dTTP для немодифицированных библиотек или модифицированное производное дезоксиуридинтрифосфата в концентрации 2 мМ (Фиг. 3) в случае модифицированных библиотек. Использовали праймеры: прямой биотинилированный и обратный флуоресцентно-меченный, рабочая концентрация каждого праймера составляла 10 мМ. В качестве матрицы использовали синтетическую вырожденную комбинаторную ДНК-библиотеку с последовательностью

СТGTCAGCTCCATACTGGTAGCC-(N)40-GCGTTCGAATCTAGACGGTACGA,
где N - комбинация нуклеотидов А, Т, G, С.

Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе MiniCycler (MJResearch, Waltham, Mass.) по следующей программе:

- 1) 4 мин при 95°C,
- 2) 30 сек при 95°C,
- 3) 30 сек при 66°C,
- 4) 40 сек при 72°C,
- 5) повтор с 2 пункта по 4 пункт 19 раз,
- 6) завершали реакцию инкубированием в течение 3 мин при 72°C.

При использовании в качестве субстратов модифицированного производного

дезоксириндифосфата при необходимости температурно-временной профиль ПЦР, а также состав реакционной смеси модифицировали (оптимизировали) с целью увеличения выхода целевого продукта реакции. Результат прохождения ПЦР оценивали визуально, электрофоретически.

5 Пример 4. Разделение биотинилированной и небитинилированной цепей ДНК-библиотеки после проведения ПЦР с использованием магнитных частиц

Для получения однонитевой ДНК с красителем Cy5 на 5'-конце проводили разделение цепей на магнитных частицах Dynabeads™ M-270 Streptavidin (InvitrogenDynaLIS, Norway) с ковалентно пришитыми к их поверхности молекулами стрептавидина. Магнитные
10 частицы промывали три раза буфером 10x (pH 8.8 при 25°C), содержащим 100 mM Трис-НСl и 500 mM KCl, и ресуспендировали в растворе, содержащем 100 мкл 5x ПЦР-буфер. Биотинилированную по 5'-концу двухцепочечную ДНК (ПЦР-продукт, объем 50 мкл) смешивали с эквивалентным объемом 10x ПЦР-буфера, нагревали до 95°C, инкубировали 3 мин и охлаждали до комнатной температуры, после чего смешивали
15 с подготовленными магнитными частицами. Иммунизацию проводили при комнатной температуре 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 5X буфером, содержащим Трис-НСl и KCl.

20 Небитинилированную цепь элюировали добавлением к магнитным частицам 20% раствора гидроксида аммония, инкубировали 2 мин, затем частицы отделяли на магнитном сепараторе, а элюат переносили в чистую пробирку, где к нему добавляли 5 объемов спиртового раствора ацетата аммония, содержащего 0,125 M ацетата аммония и 70% этанола. Одноцепочечную небитинилированную ДНК осаждали
25 центрифугированием (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-H₂O) и определяли концентрацию ДНК на спектрофотометре NanoDrop 1000.

30 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 пересаждали биотинилированную цепь добавлением 5 объемов спиртового раствора ацетата аммония, содержащего 0,125 M ацетата аммония и 70% этанола. Осадок промывали спиртовым
35 раствором ацетата аммония, затем 96% этиловым спиртом и высушивали на воздухе. К высушенному осадку добавляли 20 мкл деионизованной (MQ) H₂O и определяли концентрацию ДНК на спектрофотометре NanoDrop 1000. Эффективность разделения цепей определяли электрофоретическим методом.

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

Пример 5. Образование комплекса одноцепочечной ДНК-библиотеки с альфа-фетопротейном (АФП) в иммобилизованной фазе

45 Модифицированную одноцепочечную библиотеку нагревали до 95°C в течение 2 мин и охлаждали до 37°C. АФП, иммобилизованный на магнитных частицах с концентрацией 15 пмоль/мг, промывали 1x SELEX-буфером, приготовленном из 2x SELEX-буфера, имеющего pH 7.5 и содержащего 0.30 M NaCl, 60 mM HEPES, 20 mM

KCl, 20 mM MgCl₂, 0.1% TWEEN-20. Магнитные частицы разбавляли в 100 мкл 2x SELEX-буфера. Добавляли 100 мкл модифицированной одноцепочечной библиотеки. Инкубировали 1 час при перемешивании, 37°C. Отбирали супернатант - несвязавшиеся олигонуклеотиды. Магнитные частицы, содержащие АФП со связавшимися последовательностями, промывали 1x SELEX-буфером при комнатной температуре, растворяли в 100 мкл H₂O качества MQ и инкубировали 10 мин при 95°C, супернатант отделяли, определяли его концентрацию на спектрофотометре NanoDrop 1000 и использовали в дальнейших раундах SELEX.

Пример 6. Образование комплекса одноцепочечной ДНК-библиотеки с альфа-фетопротейном (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 2x SELEX-буфера. Добавляли 100 мкл модифицированной одноцепочечной библиотеки. Инкубировали 1 час при перемешивании при 37°C.

Пример 7. Электрофоретическое разделение комплексов ДНК/АФП и не связавшихся олигонуклеотидов

Готовили электрофорезный гель следующего состава: 12% акриламид/бис-акриламид (19:1) в 1x TBE, содержащий 10 mM KCl и 3 mM MgCl₂. В лунки вносили по 20 мкл комплекса ДНК/АФП, свободную библиотеку, а также контроли. Электрофорез проводили при контролируемой температуре 20°C для предотвращения неконтролируемой термической диссоциации комплексов. С этой же целью в электрофоретической ячейке поддерживали относительно невысокое напряжение (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, ДНК-лестница GeneRuler 50bp (ThermoFisher, США) и АФП и/или белковый маркер. Визуализацию полос в геле проводили с использованием SYBR Gold I для ДНК и кумасси для белков. Результаты электрофореза представлены на Фиг. 1.

По электрофоретической картине оценивали количество связавшейся с АФП и несвязавшейся ДНК.

Пример 8. Элюция ДНК из геля

Полосы геля, содержащие комплекс ДНК/АФП вырезали с помощью хирургического скальпеля, помещали в пробирку типа «Эппендорф» объемом 1.5 мл и проводили элюцию связавшихся с белком ДНК-олигонуклеотидов, с помощью 100 мкл раствора LiClO₄ в H₂O (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.

Пример 9. Термическая диссоциация ДНК-олигонуклеотидов, обладающих повышенным сродством к АФП

К гелю после элюции добавляли 100 мкл 1x SELEX-буфера, нагревали до 60°C и инкубировали в течение 20 мин. Супернатант отделяли, определяли концентрацию ДНК

на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Фиг. 2). 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.

Пример 10. Электрофорез комплексов АФП с ДНК-библиотеками, полученными с применением способа термической диссоциации и без него.

Электрофоретическое разделение проводили аналогично тому, как описано в Примере 7. Эффективность связывания ДНК с АФП оценивали визуально по оптической плотности полосы, соответствующей образовавшемуся комплексу ДНК/АФП (Фиг. 4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Patel D.J., Suri A.K. Structure, recognition and discrimination in RNA aptamer complexes with cofactors, amino acids, drugs and aminoglycoside antibiotics. *J. Biotechnol.* 2000. V. 74. №1. P. 39-60.

2. Радько С.П., Рахметова С.Ю., Бодоев Н.В., Арчаков А.Н. Аптамеры как перспективные аффинные реагенты для клинической протеомики. *Биомедицинская химия.* 2007. Т. 53. №1. с. 5-24.

3. Tuerk C., Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 1990. V. 249. №4968. P. 505-510.

4. Ellington A.D., Szostak J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 1990. V. 346. №6287. P. 818-822.

5. Dembowski SK, Bowser MT. Microfluidic methods for aptamer selection and characterization. *Analyst.* 2017. V 143. №1. P. 21-32.

6. Mendonsa SD, Bowser MT. In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *J Am Chem Soc.* 2004. V 126. №1. P 20-21.

7. Berezovski M1, Drabovich A, Krylova SM, Musheev M, Okhonin V, Petrov A, Krylov SN. Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures: a universal tool for development of aptamers. *J Am Chem Soc.* 2005. V 127. №9. P 3165 - 3171.

8. Eissa S, Siddiqua A, Chinnappan R, Zourob M. Electrochemical selection of a DNA aptamer, and an impedimetric method for determination of the dedicator of cytokinesis 8 by self-assembly of a thiolated aptamer on a gold electrode. *Mikrochim Acta.* 2019. V 186. P. 828.

9. Li L, Chen X, Cui C, Pan X, Li X, Yazd HS, Wu Q, Qiu L, Li J, Tan W. Aptamer Displacement Reaction from Live-Cell Surfaces and Its Applications. *J Am Chem Soc.* 2019. V 141. №. 43. P. 17174-17179.

(57) Формула изобретения

1. Способ термической диссоциации для получения ДНК-аптамеров, включающий последовательные стадии:

(а) - предварительное обогащение комбинаторной ДНК-библиотеки путем образования ее комплекса с белковой мишенью - иммобилизованным альфа-фетопротеином человека (АФП) - и проведения раундов селекции, где в качестве лиганда выступает комбинаторная ДНК-библиотека, а в качестве субстрата - АФП;

(б) - образование комплекса предварительно обогащенной ДНК-библиотеки с раствором нативного (неиммобилизованного) АФП;

(в) - электрофоретическое разделение конъюгатов ДНК/АФП от несвязавшихся ДНК-олигонуклеотидов методом акриламидного электрофореза;

(г) - экстракция связавшейся с АФП ДНК из акриламидного геля при 37°C;

(д) - термическая диссоциация оставшейся в виде комплекса с АФП ДНК из геля при 60°C;

(е) - амплификация ДНК после термической диссоциации;

5 (ж) - образование комплекса ДНК после термической диссоциации с раствором нативного (неиммобилизованного) АФП;

(з) - двукратный повтор пунктов (в)-(е);

(к) - установление первичной последовательности полученных высокоспецифичных к АФП ДНК-олигонуклеотидов (аптамеров).

10 2. Способ по п. 1, в котором в качестве лигандов используются немодифицированные (природные) ДНК-библиотеки.

3. Способ по п. 1, в котором в качестве лигандов используются химически модифицированные ДНК-библиотеки, для ферментативного получения которых в реакции ПЦР дезоксиридинтрифосфат полностью замещен на производное 5-аминоаллил-2'-дезоксиуридин-5'-трифосфата, модифицированное по аминокаллильному
15 фрагменту фенилпропионовой кислотой.

20

25

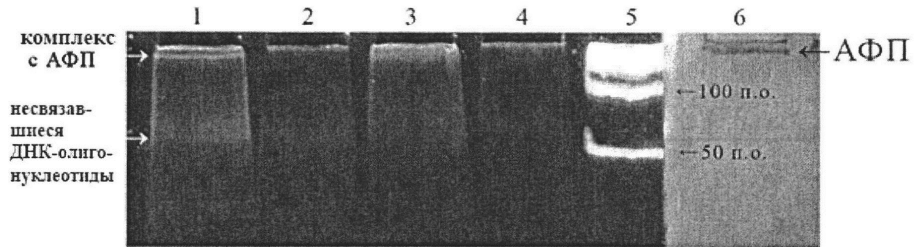
30

35

40

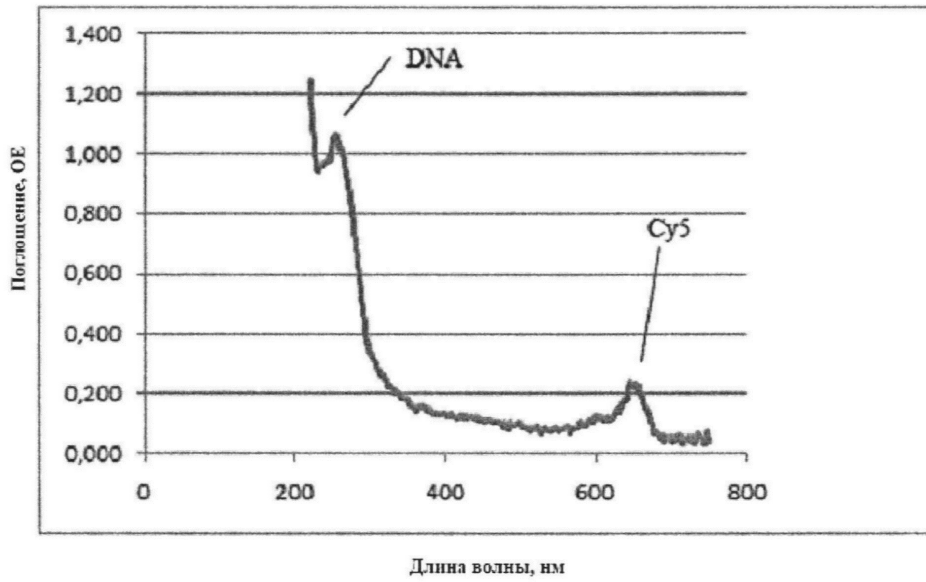
45

1

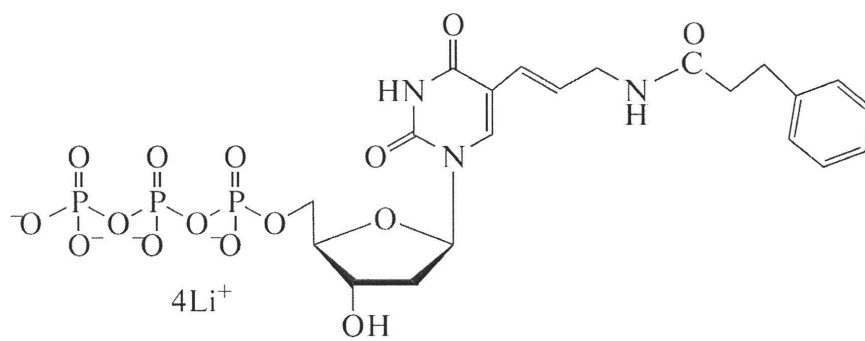


Фиг. 1

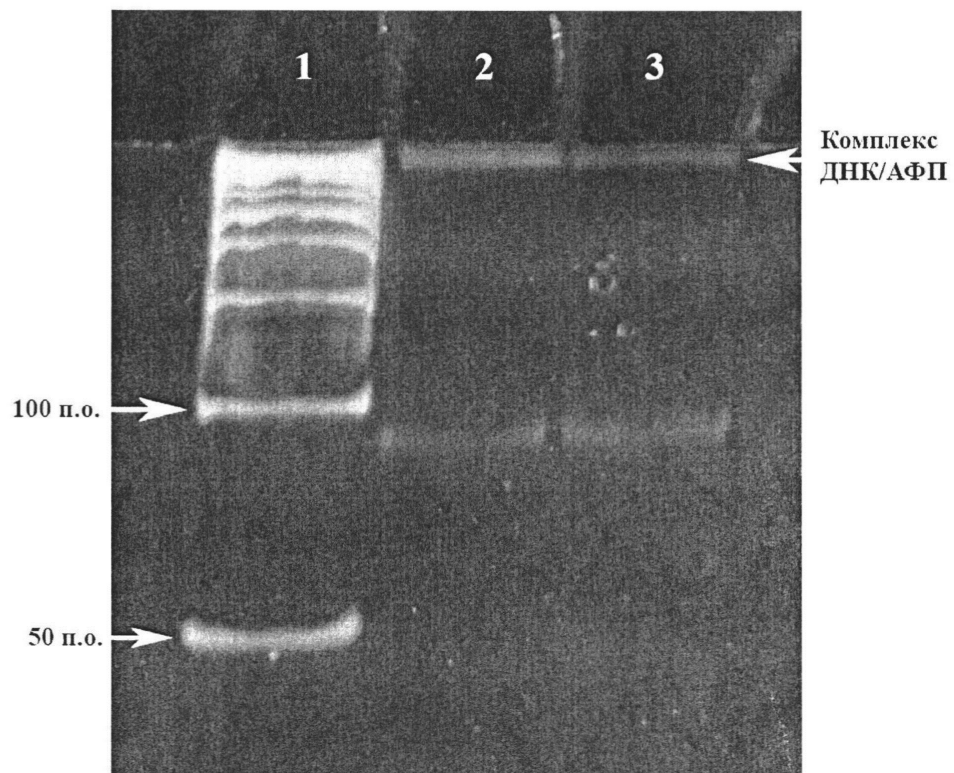
2



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4