

УДК 577.113.7; 577.112.7

НОВЫЙ МЕТОД ТЕРМИЧЕСКОЙ ДИССОЦИАЦИИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СЕЛЕКЦИИ ДНК-АПТАМЕРОВ**С.А. Лапа, Э.Н. Тимофеев, Г.С. Краснов, А.В. Чудинов***Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия*

Аптамеры – одноцепочечные ДНК- и РНК-олигонуклеотиды, функциональные аналоги моноклональных антител, способные проявлять аффинное сродство к широкому спектру биомолекул. Аптамеры находят применение в клинической диагностике, в настоящее время предпринимаются попытки их использования в качестве самостоятельных терапевтических средств. Процесс отбора специфичных к индивидуальной мишени аптамеров из исходной комбинаторной ДНК-библиотеки именуется SELEX и представляет собой несколько повторяющихся раундов, состоящих из последовательных шагов: взаимодействие библиотеки одноцепочечных аптамеров с молекулярной (или клеточной) мишенью, отмывка несвязавшихся аптамеров, отбор связавшихся аптамеров, их амплификация и обратный перевод в одноцепочечную форму. Обогащенная таким образом библиотека вовлекается в следующий раунд селекции. Обычно в результате проведения раундов селекции получают несколько индивидуальных олигонуклеотидных последовательностей, специфичных к выбранной молекулярной мишени.

Существует несколько общепринятых методов проведения этапа взаимодействия библиотеки аптамеров с белковой мишенью: иммобилизация целевого белка на магнитных частицах, микрофлюидные технологии, разделение конъюгата аптамеров с белком методом электрофореза и другие.

Нами разработан метод термической диссоциации обогащенных библиотек аптамеров (ТДА) из электрофорезного геля после конъюгации с их белковой мишенью. В качестве целевого белка использован альфа-фетопроtein человека, являющийся маркером пре- и неонатальных заболеваний, а также онкомаркером некоторых видов рака. В предлагаемом методе изначально проводится от пяти до десяти раундов селекции с иммобилизованным целевым белком (альфа-фетопроteinом). После этого обогащенная библиотека конъюгируется со свободным целевым белком в микромолярных концентрациях и полученный конъюгат подвергается электрофоретическому разделению в акриламидном геле. Данный этап позволяет исключить несвязавшиеся с белком аптамеры. Затем осуществляется элюция 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 элюция наиболее высокоспецифичных аптамеров. Обогащенная библиотека амплифицируется и подвергается термической диссоциации после конъюгации с мишенью еще дважды. В результате получается обогащенная высокоспецифичными аптамерами библиотека, готовая к проведению секвенирования для определения индивидуальных нуклеотидных последовательностей.

На рис. 1 представлена электрофореграмма, показывающая образование конъюгата обогащенной одноцепочечной ДНК-библиотеки (оцДНК-библиотека) с целевым белком – альфа-фетопроteinом человека (АФП) после проведения пяти раундов селекции на магнитных частицах и трех раундов ТДА. В эксперименте были использованы модифицированные библиотеки аптамеров, с введенными по 5-положению пиримидинового цикла различными заместителями (обозначены как dUTP₃ и dUTP₆) [1].

После обогащения библиотек было проведено их секвенирование методом NGS и получены индивидуальные последовательности аптамеров. С помощью программы FASTQC проведена оценка качества полученных прочтений, из анализа были удалены последовательности некорректной длины и последовательности, содержащие «мисматчи» в более чем одной букве в области региона, связывающегося с праймером. Фланкирующие последовательности праймеров удаляли с помощью программы Trimmomatic [2]. Компьютерный биоинформатический анализ результатов секвенирования проводили, используя программу FASTAptamer [3]. С помощью подхода FASTAptamer-Enrich проводили обогащение последовательностей, присутствующих во всех образцах технических повторов. Кластеры «родственных» последовательностей получали с помощью алгоритма FASTAptamer-Cluster для k-меров различной длины (от 6 до 14 нт).

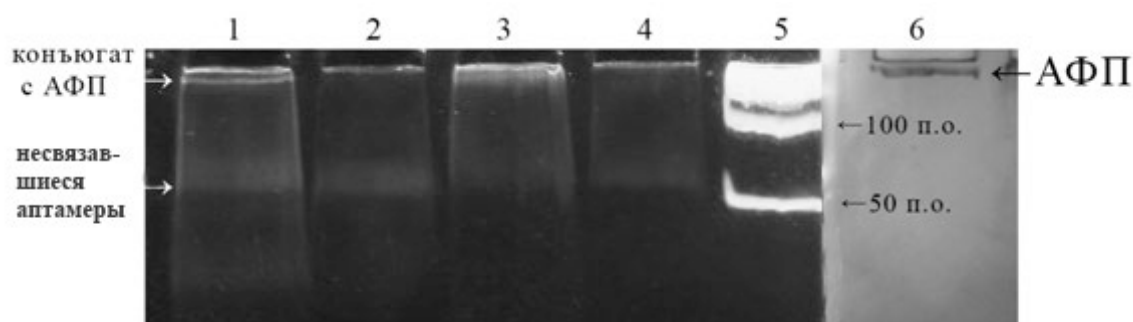


Рисунок 1. – Электрофореграмма, показывающая разделение конъюгатов аптамеров с белком от несвязавшихся аптамеров. 1 – конъюгат оцДНК-библиотеки (dUTP3) с АФП; 2 – оцДНК-библиотека (dUTP3); 3 – конъюгат оцДНК-библиотеки (dUTP6) с АФП; 4 – оцДНК-библиотека (dUTP6); 5 – маркер длин ДНК «GeneRuler 50 bp»; 6 – АФП. Лунки 1 – 5, окрашивание бромидом этидия. Лунка 6 – окрашивание «кумасси блю»

На основе этих данных выбирали индивидуальные последовательности с функционально-значимыми мотивами. Показана отчетливая кластеризация отобранных аптамеров с применением метода ТДА. Полученные кластеры аптамеров приведены на рис. 2.

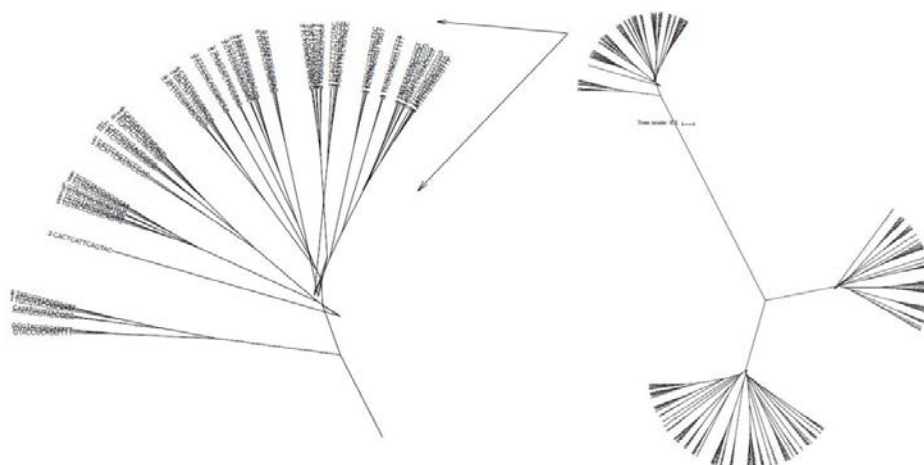


Рисунок 2. – Применение методов биоинформатики для поиска функционально-значимых консервативных мотивов, присутствующих в высокоспецифичных аптамерах

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.

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 RFMEFI57617 x 0096).

ЛИТЕРАТУРА

1. Лапа С.А. и др. Получение модифицированных комбинаторных ДНК-библиотек методом ПЦР в обратной эмульсии с последующим разделением цепей. Молек. биол. (2018) 52, 984–996.
2. A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics (2014) 30, 2114–2120.
3. K.K. Alam, J.L. Chang, D.H. Burke. FASTAptamer: A Bioinformatic Toolkit for High-throughput Sequence Analysis of Combinatorial Selections. Mol. Ther. Nucleic Acids (2015) 4, e230.