

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СЕЛЕКЦИИ ДНК-АПТАМЕРОВ НА ОСНОВЕ МЕМБРАННОЙ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ КОМПЛЕКСА АПТАМЕР – МИШЕНЬ

Соловаров И.С.,
Хаснатинов М.А.,
Ляпунова Н.А.,
Кондратов И.Г.,
Данчинова Г.А.

ФГБНУ «Научный центр проблем
здоровья семьи и репродукции
человека» (664003, г. Иркутск,
ул. Тимирязева, 16, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Соловаров Иннокентий Сергеевич,
e-mail: keschass@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Аптамеры – небольшие одноцепочечные молекулы ДНК или РНК, обладающие аффинностью к определённой молекуле-мишени. Основным методом получения аптамеров является их отбор с помощью технологии систематической эволюции лигандов с экспоненциальным обогащением (SELEX) к целевой молекуле. Однако способ получения аптамеров зависит от целевого агента и подбирается и оптимизируется каждым исследователем самостоятельно. В данной статье описано получение аптамеров к изоляту вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) сибирского суб-типа с помощью фильтрационных колонок Vivaspin 6 (Sartorius, Германия) с отсекающей массой 100 кДа. Разработанная методика получения аптамеров позволила получить пул аффинных аптамеров к ВКЭ.

Цель исследования. Разработать метод отбора ДНК-аптамеров, пригодный для получения аптамеров к живой, неочищенной вирусной суспензии вируса клещевого энцефалита, получаемой наработкой от клеточной культуры.

Методы. Отбор аптамеров осуществляли на основе модифицированной технологии SELEX с использованием полупроницаемой мембраны. Обогащение специфичного пула аптамеров выполняли с помощью полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени. Расшифровку нуклеотидных последовательностей аптамеров производили с помощью секвенирования по Сенгеру. Прямое вирулицидное действие аптамеров определяли по снижению титра инфекционного вируса после инкубирования с аптамером.

Результаты. Разработан метод проведения отбора аффинных ДНК-аптамеров к ВКЭ с использованием центрифугирования на фильтрационных колонках Vivaspin 6 (Sartorius, Германия) с отсекающей массой 100 кДа. Проверка ингибирующих свойств ДНК-аптамеров против ВКЭ четырёх выбранных последовательностей не показала активности.

Заключение. Описанный метод получения ДНК-аптамеров с использованием колонок Vivaspin может быть успешно применён для получения аптамеров к живой вирусной культуре для вирусов, сопоставимых по размерам с ВКЭ, или крупнее.

Ключевые слова: аптамер, SELEX, вирус клещевого энцефалита, противовирусные средства, мембранная ультрафильтрация

Статья поступила: 14.09.2022

Статья принята: 05.12.2022

Статья опубликована: 29.12.2022

Для цитирования: Соловаров И.С., Хаснатинов М.А., Ляпунова Н.А., Кондратов И.Г., Данчинова Г.А. Разработка подходов к селекции ДНК-аптамеров на основе мембранной ультрафильтрации комплекса аптамер – мишень. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(6): 119-127. doi: 10.29413/ABS.2022-7.6.12

DEVELOPMENT OF DNA APTAMER SELECTION APPROACH BASED ON MEMBRANE ULTRAFILTRATION OF APTAMER/TARGET COMPLEX

Solovarov I.S.,
Khasnatinov M.A.,
Liapunova N.A.,
Kondratov I.G.,
Danchinova G.A.

Scientific Centre for Family Health
and Human Reproduction Problems
(Timiryazeva str. 16, Irkutsk 664003,
Russian Federation)

Corresponding author:
Innokentii S. Solovarov,
e-mail: keschass@mail.ru

ABSTRACT

Background. Aptamers are small single-stranded DNA or RNA molecules that have an affinity for a specific target molecule. The main method of aptamers construction is the technology of systematic evolution of ligands with exponential enrichment (SELEX). However, the exact approach depends on the nature of target molecules, and is selected and optimized by each researcher independently. The article describes the technique of production of aptamers to the tick-borne encephalitis virus (TBEV) using membrane ultrafiltration with a molecular weight cut-off of 100 kDa. As a result, the pool of aptamers with observable affinity for TBEV is successfully selected and enriched.

The aim. To develop the technique suitable for selection of specific DNA aptamers to a live, crude TBEV suspension directly in cell culture supernatant.

Materials and methods. The selection of aptamers was carried out using a modified SELEX DNA aptamer technology in combination with semipermeable membrane ultrafiltration using Vivaspin 6 (Sartorius, Germany) concentrators of molecular weight cut-off of 100 kDa. Enrichment of a specific pool of aptamers was performed using real time polymerase chain reaction. Aptamers were sequenced with automated Sanger sequencing method. The direct virucidal effect of the aptamers was determined by the decrease in the titer of the infectious virus after incubation with the aptamer.

Results. The pool of aptamers to TBEV was selected and enriched. This aptamer pool expressed affinity both to the infectious TBEV and to the TBEV antigen. Sixteen aptamers were sequenced from this pool and four of them were synthesized and tested for antiviral activity against TBEV. No antiviral activity was observed.

Conclusions. The technique developed that can be successfully used to select aptamers to a live virus culture for the viruses comparable in size to TBEV or larger.

Key words: aptamer, SELEX, tick-borne encephalitis virus, antivirals, membrane ultrafiltration

Received: 14.09.2022
Accepted: 05.12.2022
Published: 29.12.2022

For citation: Solovarov I.S., Khasnatinov M.A., Liapunova N.A., Kondratov I.G., Danchinova G.A. Development of DNA aptamer selection approach based on membrane ultrafiltration of aptamer/target complex. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(6): 119-127. doi: 10.29413/ABS.2022-7.6.12

ОБОСНОВАНИЕ

Аптамеры – короткие фрагменты ДНК или РНК, способные специфично связываться с молекулой-мишенью. С момента открытия метода получения аптамеров в 1990 г. и до настоящего времени опубликовано свыше 14000 статей [1]. Примеры аптамеров известны и в живых системах: так, существуют 5'-НТО элементы РНК, способные специфически связываться с молекулами мишени. Результатом такого взаимодействия может служить изменение конформации нижележащей экспрессионной платформы РНК. В свою очередь, изменение конформации приводит либо к активации (доступности различным белковым факторам, участвующим в транскрипции и трансляции молекулы РНК), либо к инактивации функциональных свойств РНК (переключение). Вследствие этого данные элементы получили название – рибопереклюватели или рибосвитчи [2].

В сравнении с антителами аптамеры имеют ряд преимуществ, которые позволят им стать достойной заменой некоторых антител. Производство и отбор аптамеров происходят *in vitro*, без использования культур клеток и животных. При этом условиями синтеза и отбора аптамеров можно манипулировать так, чтобы получать аптамеры с наиболее удобными свойствами. В отличие от иммуноглобулинов, аптамеры не обладают необратимой денатурацией. Аптамеры неприхотливы к условиям хранения и могут транспортироваться при комнатной температуре (при соблюдении стерильности), не требуя охлаждения. Процедура отбора аптамера к молекуле-мишени занимает меньше времени, чем для антител [3]. Поэтому аптамеры в качестве *in vivo* терапии являются многообещающими аффинными агентами, сопоставимыми с антителами [4–6].

Аптамеры с аффинными свойствами к молекулам мишеням могут стать достойной заменой как в проведении диагностических исследований, так и при решении научных задач. Существуют примеры, показывающие возможность замены иммуноглобулинов на аптамеры в методе иммуноферментного анализа, вестерн-блоттинге, флуоресцентной гибридизации *in situ* [7–9]. Создание чипов для диагностики с одновременной детекцией целевых белков из смеси является вполне перспективной и реализуемой стратегией по замене иммуноглобулинов. К этому можно добавить и возможность аффинной очистки молекул-мишеней, а также специфического ингибирования белков-мишеней [10]. На сегодняшний день только два аптамера получили разрешение от Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA, Food and Drug Administration) на применение в качестве терапевтического средства. Это аптамеры для лечения дегенерации жёлтого пятна и пегапганиб (блокирующий фактор роста эндотелия сосудов, Masugen); другие аптамеры находятся на стадии клинических испытаний [4, 11, 12].

Ранее показано, что на основе аптамеров могут быть получены высокоэффективные и очень специфичные ингибиторы белков-мишеней [13, 14]. В качестве мишеней могут выступать различные факторы роста, гормо-

ны, ферменты, рецепторы на клеточной поверхности, токсины, белки вирусов и патогенных микроорганизмов [15–18].

Метод отбора высокоаффинных молекул к молекуле-мишени разработан двумя независимыми группами в 1990 г. Он получил название «систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении» (SELEX, systematic evolution of ligands by exponential enrichment), а нуклеиновые кислоты, которые селективно связывались с мишенью, стали называть аптамерами [4]. Существует огромное множество разновидностей данного метода по способу контрселекции и проведения разделения связавшихся аптамеров от несвязанных [7, 12, 15]. Кроме того, аффинный аптамер, полученный в процессе отбора, может быть различными методами модифицирован в целях увеличения свойств аффинности или ингибирования функций мишени.

Стандартной процедуры получения аптамеров в настоящее время не существует, поскольку каждая целевая молекула обладает своими определёнными ограничениями в работе. Поэтому каждый исследователь адаптирует процедуру отбора под свои конкретные объекты. Использованный в нашей работе принцип селекции и контрселекции аптамеров основан на проницаемости низкомолекулярных молекул, входящих в состав культуральной среды, через полупроницаемую мембрану центрифужных концентраторов. При этом происходит удаление аффинных аптамеров к низкомолекулярным побочным молекулам, а также аптамеров, не связавшихся с частицами вируса. Поскольку только аффинные к частицам ВКЭ останутся в объёме верхней камеры фильтрационной колонки, остальные молекулы с молекулярным весом ниже 100 кДа будут удалены в нижнюю камеру под действием гравитации через полупроницаемую мембрану. Контрселекцию аптамера к фильтрационной колонке проводили на второй, четвёртой и шестой раунды, перед стадией внесения аптамера к изоляту вируса.

В качестве модельного объекта мы выбрали ВКЭ, который до настоящего времени является актуальной природно-очаговой инфекцией [19, 20]. При этом спектр лекарственных средств для специфического лечения и профилактики КЭ ограничен единственным препаратом – донорским иммуноглобулином человека [21]. Несмотря на доказанную эффективность препаратов иммуноглобулина, они обладают целым рядом критических недостатков [19, 22–24], что обуславливает необходимость разработки альтернативных лекарственных средств. Поэтому аптамеры представляются перспективным объектом исследований в целях разработки новых противовирусных препаратов [25].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка метода отбора ДНК-аптамеров, пригодного для получения аптамеров к живой, неочищенной вирусной суспензии вируса клещевого энцефалита, получаемой наработкой от клеточной культуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Работа основана на использовании метода отбора коротких аффинных молекул ДНК к ВКЭ. Для этого исходную библиотеку инкубировали с вирусной суспензией ВКЭ с последующей отмывкой от не связавшихся последовательностей. Последовательности аптамеров, которые обладали аффинностью к вирусным частицам, амплифицировали посредством метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). После проведения отбора последовательности ДНК расшифровали и оценили на аффинность к молекуле-мишени. Несколько одноцепочечных ДНК-аптамеров проверили на способность к прямому вирулицидному действию на вирус. Исследования проводили в лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (Иркутск), лицензированной для работ с возбудителями инфекционных заболеваний II–IV групп патогенности.

SELEX

Для проведения отбора аптамеров на основе технологии SELEX использовали одноцепочечную ДНК (оцДНК) библиотеку аптамеров. Длина исходной молекулы оцДНК составила 80 нуклеотидов. Исходный пул синтетических ДНК-олигонуклеотидов (библиотека) был получен путём прямого химического синтеза (ЗАО Евроген, Москва). Концентрация исходной одноцепочечной библиотеки, взятая в первый раунд отбора, составила 1200 пМоль. Центральный рандомизированный фрагмент длиной 40 нуклеотидных оснований (н. о.) фланкирован адаптерами последовательностями в 20 н. о., под праймеры (Forward Aptamer Primer – 5'-CTCCTCTGACTGTAACCACG-3', Reverse Aptamer Primer – 5'-GGCTTCTGGCTACCTATGC-3'). В качестве мишени для позитивной селекции использовали изолят ВКЭ сибирского субтипа 92М [26]. Перед первым раундом отбора оцДНК библиотеку термически денатурировали в течение 5 мин при 96 °С в фосфатно-солевом буфере, после чего проводили ренатурацию в ледяной бане в течение 5 минут. Перед непосредственной инкубацией с мишенью денатурированную библиотеку ДНК инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин.

Синтетическую библиотеку вырожденных олигонуклеотидов объёмом 24 мкл и концентрацией 50 пМоль/мкл растворяли в 150 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ; pH = 7,4), содержащего 20 мМоль HEPES, 3 мМоль MgCl₂. Далее библиотеку в буфере для инкубации нагревали до 96 °С в течение 3 мин, затем раствор переносили в ледяную баню на 5 мин. Затем следовала инкубация при комнатной температуре в течение 15 мин. Подготовленный раствор пула аптамеров переносили в 1 мл культуральной жидкости RPMI с изолятом ВКЭ 92М. Инкубация протекала 30 мин при 37 °С. После этого получившийся объём переносили в центрифужные концентраты Vivaspin 6 (Sartorius, Германия) с отсекающей массой 100 кДа. Объём смеси доводили до 6 мл 1х раствором ФСБ (pH = 7,4) и центрифугировали при 2700 об./мин на настольной центрифуге ЦЛМН-Р10-01 (Электрон, Россия) в течение 15 мин. Объём верхней камеры доводили

до 6 мл 1х раствором ФСБ (pH = 7,4), пипетировали и проводили центрифугирование. Раунды отмывки/центрифугирования повторяли 6 раз. Итоговый объём концентрата в верхней камере концентрата составлял 150 мкл. Для обогащения пула специфических аптамеров 5 мкл концентрата раститровывали в соотношении 1:20 и использовали в качестве матрицы в ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (рвПЦР). Реакционная смесь объёмом 25 мкл содержала Forward Aptamer Primer и Reverse Aptamer Primer в количестве 0,5 пМоль на реакцию. Условия амплификации включали предварительный прогрев смеси при 96 °С в течение 3 мин с последующими 25 циклами ПЦР: 96 °С в течение 10 с; 50 °С в течение 10 с; 60 °С в течение 1 мин. ПЦР проводили с помощью набора «Encyclo PCR» (ЗАО Евроген, Москва) в объёме 25 мкл в соответствии с инструкцией производителя. По завершении реакции амплификации проводили электрофорез в 2%-м агарозном геле с использованием маркера молекулярного веса (100 bp DNA Ladder, Invitrogen, США), в Трис-борат-ЭДТА буфере (ТБЭ), при напряжении 50 В/см. Фрагмент с ожидаемой длиной 80 н. о. вырезали и использовали в качестве матрицы для наработки одноцепочечного ДНК аптамера. Нарработку оцДНК проводили методом неравновесной ПЦР с 50-кратным преобладанием праймера Forward Aptamer Primer. Фрагмент оцДНК очищали от реакционной смеси с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле и набора для очистки ДНК QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия).

Процедуру SELEX суммарно проводили семь раз. Восьмой раунд отбора проведён к вирусу в колодцах планшета через иммобилизованные моноклональные антитела к ВКЭ (тест-система «ВектоВКЭ-антиген», Вектор-Бест, Новосибирск). Для этого 100 мкл суспензии вируса вносили в лунку и инкубировали 1 ч на термошейкере 400 об./мин при температуре 26 °С. После этого лунки промывали 5 раз 400 мкл буфером для промывок, добавляли 100 мкл оцДНК аптамера, проводили инкубацию с иммобилизованным на планшет вирусом 30 мин при 37 °С и несвязанные последовательности отмывали буфером для промывок. Связавшиеся последовательности аптамера выделяли с планшета с помощью комплекта для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Осадок после выделения нуклеиновых кислот растворяли в 100 мкл diH₂O. Выделенная проба нуклеиновых кислот служила матрицей для амплификации двухцепочечной ДНК (дцДНК) аптамера. Продукт амплификации ПЦР электрофоретически разделяли, а фрагмент дцДНК с необходимой длиной клонировали в вектор.

Клонирование дцДНК и секвенирование аптамеров

Клонирование проводили с помощью набора CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в химически компетентные клетки *E. coli*, 10 мкл лигазной смеси. Для этого к 6,5 мкл очищенного продукта ПЦР добавляли 2 мкл пятикратного буфера для лигирования, далее вносили 1 мкл вектора pJET1.2/blunt и 0,5 мкл фермента лигазы. Реакционную смесь оставляли на 1 ч при ком-

натной температуре, после чего проводили трансформацию клеток. Трансформированные клетки высеивали на чашки с ампициллином, которые оставляли в термостате при 37 °С. Отдельные клоны бактериальных колоний с чашек переносили в 50 мкл 1х ТБЭ. 1 мкл суспензии клонов использовали на 25 мкл ПЦР смеси. Реакцию амплификации проводили с плазмидными праймерами к pJET1.2/blunt (Forward Sequencing Primer – 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3', Reverse Sequencing Primer – 5'-AAGAACATCGATTTCCATGGCAG-3'). Условия амплификации включали предварительный прогрев смеси при 95 °С в течение 3 мин с последующими 34 циклами ПЦР: 95 °С в течение 10 с; 58 °С в течение 20 с; 72 °С в течение 30 с. Полученные от амплификации ПЦР продукты разделяли в 2%-м агарозном геле, ДНК-фрагменты нужной длины вырезали и использовали в качестве матрицы для секвенирования. Для определения нуклеотидной последовательности аптамеров использовали плазмидные праймеры (pJET1.2/blunt), а также набор соответствующих реагентов для секвенирования по методу Сенгера с помощью капиллярного секвенатора Нанофор 05 и набора красителей BigDye (Thermo Fisher Scientific, США). Амплификация включала предварительный прогрев смеси при 95 °С в течение 3 мин с последующими 30 циклами ПЦР: 95 °С в течение 20 с; 60 °С в течение 1 мин. Ампликоны осаждали этанолом в присутствии солей ацетата натрия. Пробы растворяли в 10 мкл SLS-буфера.

Методы регистрации исходов

Детекцию накопления ПЦР ампликона выполняли в режиме реального времени на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США) с детекцией интеркалирующего красителя SYBR Green (Sigma, США) по каналу FAM. Реакцию амплификации осуществляли до насыщения второй раститровки. Учёт значений ОП проводили на спектрофотометре Immunochem 2100 (Вектор-Бест, Новосибирск) при длине волны 450 нм. Оценку результатов проводили в соответствии с инструкцией к тест-системе (АГ ВКЭ, Вектор Бест, Новосибирск).

Определение прямого вирулицидного действия

Оценку вирулицидного действия аптамеров на ВКЭ проводили согласно Э. Голду [27]. Одноцепочечные последовательности выбранных последовательностей тестируемых аптамеров получены с помощью химического синтеза (ЗАО Евrogen, Москва). Концентрация аптамеров в 100 мкл составляла 100 пМоль. Перед непосредственной инкубацией аптамера с вирусом его подвергли термической денатурации в течение 3 мин при 96 °С. По завершении инкубации пробирку с пулом аптамера сразу переносили на лёд на 5 мин, после чего аптамер выдерживали 15 мин при комнатной температуре. Далее 100 мкл суспензии вируса (1×10^5 БОЕ ВКЭ) смешивали со 100 мкл аптамера. В качестве положительного контроля использован донорский иммуноглобулин G человека против ВКЭ (ФГУС «НИЦ Микроген», Томск) в концентрации 1 мг/мл. Стерильная бидистиллированная вода взята в качестве контрольного образца. Смесь ви-

руса и образец инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Культивирование клеточной линии почки эмбриона свиньи СПЭВ (ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург) проводили в течение 3–5 суток в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Поддержание культуры клеток осуществляли на среде RPMI1640 (БиоЛот, Москва), после этого клетки фиксировали 10%-м формалином. Окрашивание монослоя культуры клеток СПЭВ проводили 0,05%-м раствором кристаллического фиолетового. Вирулицидную активность оценивали как разницу титров ВКЭ (в логарифмическом выражении) в референс-образце и в образце, обработанном исследуемым аптамером. Каждый эксперимент проводили в трёх независимых повторах. Для оценки вариабельности наблюдений рассчитывали стандартное отклонение средних значений. Оценку статистической значимости межгрупповых различий между двумя независимыми выборками проводили с помощью U-критерия Манна – Уитни; различия считали значимыми при $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили по методу r Пирсона. Расчёты осуществляли с помощью программы MS Office Excel (Microsoft Corp., 2007), а также программы MaxStat Lite (MaxStat Software, Германия).

Этическая экспертиза

В работе не использовали лабораторных животных или материалы от людей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отбор специфичных аптамеров произведён в ходе восьми раундов процедуры SELEX. Следует отметить, что разработанный метод не требует наличия специальной ультрацентрифуги для предварительной очистки вируса от компонентов суспензии. Нарботанную оцДНК обогащённого пула аптамеров после восьмого раунда проверяли на аффинность к ВКЭ. При проверке аффинности пула аптамеров суспензию 1 мл ВКЭ очищали и концентрировали до объёма ~150 мкл. Раститровки ВКЭ прикрепляли к планшету (тест-система «АГ ВКЭ», Вектор-Бест, Новосибирск) через иммобилизованные иммуноглобулины G. Параллельно эксперименту по проверке аффинности пула аптамеров иммобилизованные в лунки планшета вирусные частицы ВКЭ были проверены на наличие антигеновых детерминант. Вирус вносили в концентрации: 1 – 0 БОЕ; 2 – 1×10^4 БОЕ; 3 – 10^5 БОЕ; 4 – 10^6 БОЕ на одну реакционную лунку планшета. Для контроля успешной иммобилизации вирусных частиц в лунках планшета проводили оценку антигеновых детерминант ВКЭ в параллели раститровок вируса с помощью вышеуказанной тест-системы. Получены следующие значения оптической плотности: 1 – 0,173; 2 – 0,944; 3 – 5,671; 4 – 10,386. Экспериментальные лунки с иммобилизованным в них вирусом инкубировали с подготовленным пулом оцДНК аптамеров. По завершении инкубации лунки с вирусом и аптамером промывали 400 мкл буфера для промывки 15 раз. Выделение нуклеиновых кислот из лунок тестируемого планшета осуществили с помощью набора для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН

ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Выделенные образцы служили матрицей в ПЦР. В результате получены следующие C_q -значения: 1 – 22,62; 2 – 22,54; 3 – 22,25; 4 – 18,63 (рис. 1). Корреляционный анализ выявил сильную обратную корреляцию между концентрацией вирусных частиц и концентрацией молекул аптамера ($r = -0,8$). Это позволяет предположить, что значительная часть аптамеров, составляющих SELEX-обогащенный пул, специфично сорбируется на поверхности вирусных частиц ВКЭ. Коэффициент корреляции по Пирсону составил $r = -0,89$. С ростом концентрации вирусных частиц

в лунке снижается пороговое значение ПЦР, что означает нарастание концентрации аптамеров (рис. 1). Таким образом, нами отмечена пропорциональная зависимость концентрации аптамера, выделенного из лунок полистиролового планшета, от концентрации антигена ВКЭ, иммобилизованных на планшет.

Результаты секвенирования последовательностей пула аптамеров после восьмого раунда отбора представлены на рисунке 2. Всего получено 16 последовательностей аптамеров. По своей структуре все представленные последовательности были разнородны. Общих

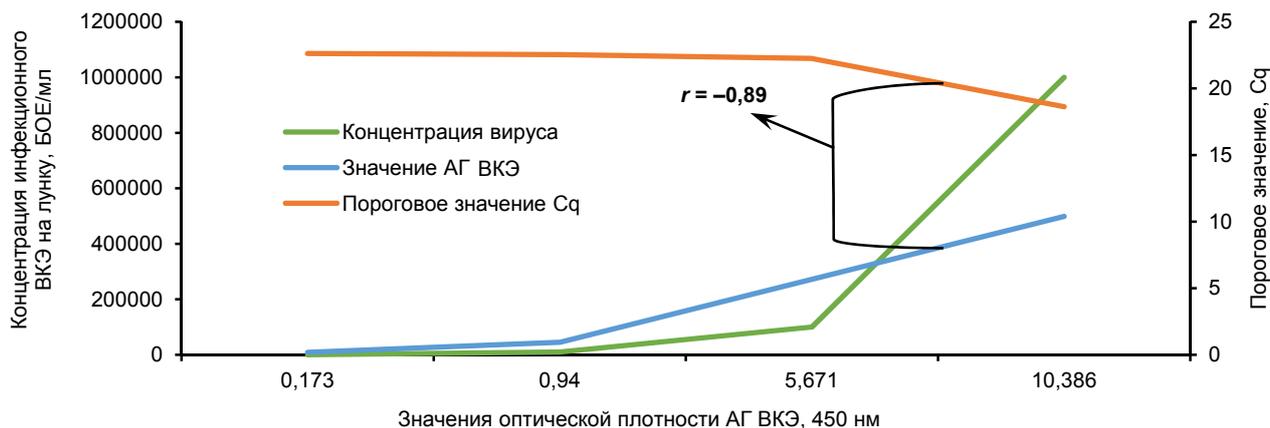


РИС. 1. Диаграмма зависимости концентрации аптамеров (C_q) от концентрации иммобилизованного вируса клещевого энцефалита на полистироловый планшет. По вспомогательной оси отмечены пороговые значения (C_q) и значения оптической плотности (450 нм). Коэффициент корреляции по Пирсону составил $r = -0,89$

FIG. 1. Diagram of the dependence of the concentration of aptamers (C_q) on the concentration of immobilized tick-borne encephalitis virus on a polystyrene plate. The minor axis shows threshold values (C_q) and optical density values (450 nm). Pearson correlation coefficient was $r = -0,89$

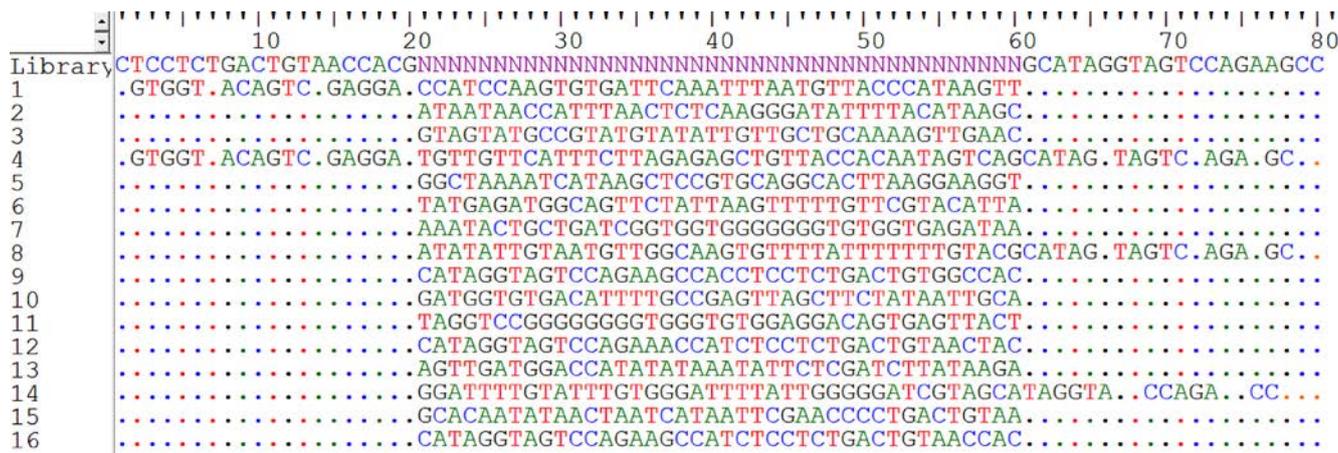


РИС. 2. Нуклеотидная структура аптамеров, полученных в результате отбора к вирионам вируса клещевого энцефалита. Forward Primer – 5'-CTCCTCTGACTGTAACCACG-3' (позиция с 1 по 20 н. о.); Reverse Primer – 5'-GCATAGGTAGTCCAGAAGCC-3' (позиция с 60 по 80 н. о.). Позиции варибельного региона исходной библиотеки аптамеров обозначены символом «N»; точками отмечены нуклеотиды, идентичные структуре исходной библиотеки

FIG. 2. Nucleotide sequence of aptamers selected to tick-borne encephalitis virus virions. The forward primer sequence is 5'-CTCCTCTGACTGTAACCACG-3' (1 to 20 nt); the reverse primer sequence is 5'-GCATAGGTAGTCCAGAAGCC-3' (60 to 80 nt). The variable region of the original library of aptamers is indicated with 40-N sequence (20 to 60 nt). The nucleotides identical to the structure of the original library are replaced by dots in the alignment

структур или последовательностей внутри центрального региона аптамера не отмечено. У большинства секвенированных последовательностей количество нуклеотидных оснований внутри центрального региона сохранилось (40 н. о.). При этом у двух клонов – № 3 и № 6 – центральный регион составил 39 пар нуклеотидов. Ещё у одного клона – № 12 – центральный регион составил 37 н. о. Праймерные регионы аптамеров 1, 4, 8 и 14 оказались отличными от праймерных регионов исходной библиотеки.

Из 16 полученных последовательностей ДНК-аптамеров нами были выбраны 4 последовательности, которые были проверены на ингибирующую активность в отношении ВКЭ. Результаты проверки не выявили прямого ингибирования в отношении ВКЭ (рис. 3).

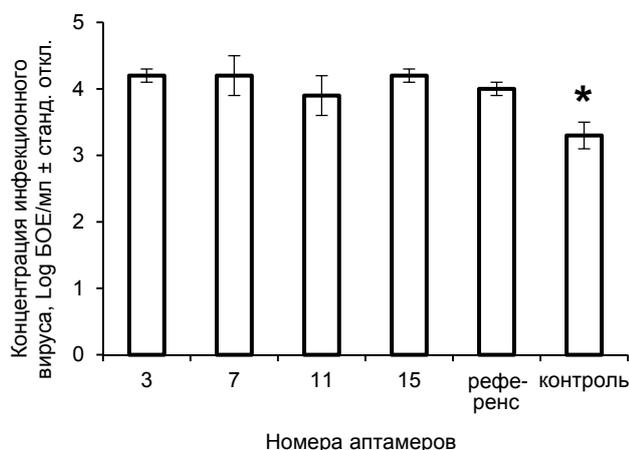


РИС. 3.

Прямое вирулицидное действие аптамеров 3, 7, 11, 15 на ВКЭ. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трёх независимых воспроизведений. Референс – стерильная бидистиллированная вода; контроль – иммуноглобулин человека против ВКЭ (ФГУС «НИЦ Микроген», Томск) в концентрации 1 мг/мл. Вирулицидное действие определяли по снижению инфекционной активности в сравнении с референс-образцом. * – статистически значимые отличия от референс-образца ($p < 0,05$).

FIG. 3.

Direct virucidal action of aptamers 3, 7, 11, 15 on TBEV. Error bars reflect the standard deviation based on the results of 3 independent reproductions. Референс (reference) – sterile bidistilled water; контроль (control) – human immunoglobulin against TBEV (Research Center Microgen, Tomsk) at a concentration of 1 mg/ml. The virucidal effect was determined by the decrease in infectious activity in comparison with the reference sample. * – statistically significant differences from the reference sample ($p < 0.05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования на модели ВКЭ была оптимизирована методика получения аффинных аптамеров к вирусным частицам диаметром 40–65 нм на основе технологии SELEX в сочетании с технологией мембранной ультрафильтрации и контрселекции к низкомолеку-

лярным компонентам культуральной среды. Использование разработанной методики позволило сформировать пул аптамеров, способных специфично связываться с вирионами ВКЭ.

Выражение признательности

В работе использовано оборудование ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека».

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990; 249(4968): 505-510. doi: 10.1126/science.2200121
2. Garst AD, Edwards AL, Batey RT. Riboswitches: Structures and mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011; 3(6): a003533. doi: 10.1101/cshperspect.a003533
3. Jellinek D, Green LS, Bell C, Janjic N. Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor. *Biochemistry*. 1994; 33(34): 10450-10456. doi: 10.1021/bi00200a028
4. Kaur H, Bruno JG, Kumar A, Sharma TK. Aptamers in the therapeutics and diagnostics pipelines. *Theranostics*. 2018; 8(15): 4016-4032. doi: 10.7150/thno.25958
5. Jain RK. The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nat Med*. 1998; 4(6): 655-657. doi: 10.1038/nm0698-655
6. Winkler J. Therapeutic oligonucleotides with polyethylene glycol modifications. *Future Med Chem*. 2015; 7(13): 1721-1731. doi: 10.4155/fmc.15.94
7. Huang Y, Zhang L, Li Z, Gopinath SCB, Chen Y, Xiao Y. Aptamer-17 β -estradiol-antibody sandwich ELISA for determination of gynecological endocrine function. *Biotechnol Appl Biochem*. 2020; 68(4): 881-888. doi: 10.1002/bab.2008.
8. Lobigs M, Lee E, Ng ML, Pavy M, Lobigs P. A flavivirus signal peptide balances the catalytic activity of two proteases and thereby facilitates virus morphogenesis. *Virology*. 2010; 401(1): 80-89. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.008
9. Wang Y, Li Z, Yu H. Aptamer-based western blot for selective protein recognition. *Front Chem*. 2020; 8: 570528. doi: 10.3389/fchem.2020.570528
10. Пеньевская Н.А. Этиотропные препараты для экстренной профилактики клещевого энцефалита: перспективные разработки и проблемы эпидемиологической оценки эффективности. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 1(50): 39-45.
11. Eyetech Study Group. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: Phase II study results. *Ophthalmology*. 2003; 110(5): 979-986. doi: 10.1016/S0161-6420(03)00085-X

12. Nimjee SM, White RR, Becker RC, Sullenger BA. Aptamers as therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2017; 57: 61-79. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558

13. Gold L, Polisky B, Uhlenbeck O, Yarus M. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem.* 1995; 64: 763-797. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.003555

14. Thomas M, Chédin S, Carles C, Riva M, Famulok M, Sentenac A. Selective targeting and inhibition of yeast RNA polymerase II by RNA aptamers. *J Biol Chem.* 1997; 272(44): 27980-27986. doi: 10.1074/jbc.272.44.27980

15. Brody EN, Gold L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *J Biotechnol.* 2000; 74(1): 5-13. doi: 10.1016/s1389-0352(99)00004-5

16. Nimjee SM, Rusconi CP, Harrington RA, Sullenger BA. The potential of aptamers as anticoagulants. *Trends Cardiovasc Med.* 2005; 15(1): 41-45. doi: 10.1016/j.tcm.2005.01.002

17. Proske D, Blank M, Buhmann R, Resch A. Aptamers-basic research, drug development, and clinical applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005; 69(4): 367-374. doi: 10.1007/s00253-005-0193-5

18. Zhang Z, Blank M, Schluesener HJ. Nucleic acid aptamers in human viral disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2004; 52(5): 307-315.

19. Болотова Н.А., Хаснатинов М.А., Ляпунов А.В., Манзарова Э.Л., Соловаров И.С., Данчинова Г.А. Многолетние тенденции изменения поражаемости населения Прибайкалья иксодовыми клещами. *Acta biomedica scientifica.* 2017; 2(1): 89-93. doi: 10.12737/article_5955e6b5c91407.50206187

20. Suss J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – The epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill.* 2008; 13(26): 18916.

21. Dörrbecker B, Dobler G, Spiegel M, Hufert FT. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Med Infect Dis.* 2010; 8(4): 213-222. doi: 10.1016/j.tmaid.2010.05.010

22. Лучинина С.В., Семенов А.И., Степанова О.Н., Погодина В.В., Герасимов С.Г., Щербинина М.С., и др. Вакцинопрофилактика клещевого энцефалита в Челябинской области: масштабы вакцинации, популяционный иммунитет, анализ случаев заболевания привитых. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2016; 1(86): 67-76.

23. Погодина В.В., Левина Л.С., Скрынник С.М., Травина Н.С., Карань Л.С., Колясникова Н.М., и др. Клещевой энцефалит с молниеносным течением и летальным исходом у многократно вакцинированного пациента. *Вопросы вирусологии.* 2013; 58(2): 33-37.

24. Субботин А.В., Семенов В.А., Смирнов В.Д., Щербинина М.С., Погодина В.В. Случай развития хронического клещевого энцефалита у вакцинированного пациента. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2014; 3: 76.

25. Соловаров И.С., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Ляпунов А.В., Болотова Н.А., Манзарова Э.Л., и др. Оценка вируснейтрализующих свойств ДНК-аптамеров и экстрактов лекарственных растений в отношении вируса клещевого энцефалита. *Acta biomedica scientifica.* 2017; 2(1): 84-88. doi: 10.12737/article_5955e6b5aad2e3.30269730

26. Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Злобин В.И., Ляпунов А.В., Арбатская Е.В., Чапоргина Е.А., и др. Вирус клещевого энцефалита в Монголии. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск).* 2012; 111(4): 9-12.

27. Gould EA, Clegg JCS. Growth, titration and purification of togaviruses. In: Mahy BWJ (ed.). *Virology: A practical approach.* Oxford; 1985: 43-48.

REFERENCES

1. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 1990; 249(4968): 505-510. doi: 10.1126/science.2200121

2. Garst AD, Edwards AL, Batey RT. Riboswitches: Structures and mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3(6): a003533. doi: 10.1101/cshperspect.a003533

3. Jellinek D, Green LS, Bell C, Janjić N. Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor. *Biochemistry.* 1994; 33(34): 10450-10456. doi: 10.1021/bi00200a028

4. Kaur H, Bruno JG, Kumar A, Sharma TK. Aptamers in the therapeutics and diagnostics pipelines. *Theranostics.* 2018; 8(15): 4016-4032. doi: 10.7150/thno.25958

5. Jain RK. The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nat Med.* 1998; 4(6): 655-657. doi: 10.1038/nm0698-655

6. Winkler J. Therapeutic oligonucleotides with polyethylene glycol modifications. *Future Med Chem.* 2015; 7(13): 1721-1731. doi: 10.4155/fmc.15.94

7. Huang Y, Zhang L, Li Z, Gopinath SCB, Chen Y, Xiao Y. Aptamer-17 β -estradiol-antibody sandwich ELISA for determination of gynecological endocrine function. *Biotechnol Appl Biochem.* 2020; 68(4): 881-888. doi: 10.1002/bab.2008.

8. Lobigs M, Lee E, Ng ML, Pavy M, Lobigs P. A flavivirus signal peptide balances the catalytic activity of two proteases and thereby facilitates virus morphogenesis. *Virology.* 2010; 401(1): 80-89. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.008

9. Wang Y, Li Z, Yu H. Aptamer-based western blot for selective protein recognition. *Front Chem.* 2020; 8: 570528. doi: 10.3389/fchem.2020.570528

10. Penievskaya NA. Etiotropic preparations for post-exposure tick-borne encephalitis prevention: perspective development and problems of epidemiological effectiveness evaluation. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2010; 1(50): 39-45. (In Russ.).

11. Eyetech Study Group. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: Phase II study results. *Ophthalmology.* 2003; 110(5): 979-986. doi: 10.1016/S0161-6420(03)00085-X

12. Nimjee SM, White RR, Becker RC, Sullenger BA. Aptamers as therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2017; 57: 61-79. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558

13. Gold L, Polisky B, Uhlenbeck O, Yarus M. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem.* 1995; 64: 763-797. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.003555

14. Thomas M, Chédin S, Carles C, Riva M, Famulok M, Sentenac A. Selective targeting and inhibition of yeast RNA polymerase II by RNA aptamers. *J Biol Chem.* 1997; 272(44): 27980-27986. doi: 10.1074/jbc.272.44.27980

15. Brody EN, Gold L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *J Biotechnol.* 2000; 74(1): 5-13. doi: 10.1016/s1389-0352(99)00004-5

16. Nimjee SM, Rusconi CP, Harrington RA, Sullenger BA. The potential of aptamers as anticoagulants. *Trends Cardiovasc Med*. 2005; 15(1): 41-45. doi: 10.1016/j.tcm.2005.01.002
17. Proske D, Blank M, Buhmann R, Resch A. Aptamers-basic research, drug development, and clinical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005; 69(4): 367-374. doi: 10.1007/s00253-005-0193-5
18. Zhang Z, Blank M, Schluesener HJ. Nucleic acid aptamers in human viral disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2004; 52(5): 307-315.
19. Bolotova NA, Khasnatinov MA, Liapunov AV, Manzarova EL, Solovarov IS, Danchinova GA. Long-term trends of changes in infestation rate of the Baikal region population by ixodic ticks. *Acta biomedica scientifica*. 2017; 2(1): 89-93. (In Russ.). doi: 10.12737/article_5955e6b5c91407.50206187
20. Suss J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – The epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill*. 2008; 13(26): 18916.
21. Dörrbecker B, Dobler G, Spiegel M, Hufert FT. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Med Infect Dis*. 2010; 8(4): 213-222. doi: 10.1016/j.tmaid.2010.05.010
22. Luchinina SV, Semenov AI, Stepanova ON, Pogodina VV, Gerasimov SG, Shcherbinina MS, et al. Vaccinal prevention of tick-borne encephalitis in Chelyabinsk region: Dynamics of vaccination, population immunity, analysis of TBE cases in vaccinated persons. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2016; 1(86): 67-76. (In Russ.).
23. Pogodina VV, Levina LS, Skrynnik SM, Travina NS, Karan LS, Kolyasnikova NM et al. Tick-borne encephalitis with fulminant course and lethal outcome in patients after plural vaccination. *Problems of Virology*. 2013; 58(2): 33-37. (In Russ.).
24. Subbotin AV, Semenov VA, Smirnov VD, Shcherbinina MS, Pogodina VV. A case of chronic tick-borne encephalitis in vaccinated person. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2014; 3: 76. (In Russ.).
25. Solovarov IS, Khasnatinov MA, Danchinova GA, Liapunov AV, Bolotova NA, Manzarova EL, et al. Assessment of neutralizing properties of DNA-aptamers and extracts of medicinal herbs against the tick-borne encephalitis virus. *Acta biomedica scientifica*. 2017; 2(1): 84-88. (In Russ.). doi: 10.12737/article_5955e6b5aad2e3.30269730
26. Khasnatinov MA, Danchinova GA, Zlobin VI, Liapunov AV, Arbatskaya EV, Tchaporgina EA. Tick-borne encephalitis virus in Mongolia. *Siberian Medical Journal (Irkutsk)*. 2012; 111(4): 9-12. (In Russ.).
27. Gould EA, Clegg JCS. Growth, titration and purification of togaviruses. In: Mahy BWJ (ed.). *Virology: A practical approach*. Oxford; 1985: 43-48.

Сведения об авторах

Соловаров Иннокентий Сергеевич – младший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: keschass@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9936-5330>

Хаснатинов Максим Анатольевич – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: khasnatinov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8441-3640>

Лиapunova Наталья Андреевна – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: nataly2193@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6039-0854>

Кондратов Илья Геннадьевич – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально значимых инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: kondratovig@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

Данчинова Галина Анатольевна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: dan-chin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6705-3970>

Information about the authors

Innokentii S. Solovarov – Junior Research Officer at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: keschass@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9936-5330>

Maxim A. Khasnatinov – Dr. Sc. (Biol.), Leading Research Officer at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: khasnatinov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8441-3640>

Natalia A. Liapunova – Cand. Sc. (Biol.), Junior Research Officer at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: nataly2193@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6039-0854>

Ilya G. Kondratov – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory of Epidemiologically and Socially Significant Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: kondratovig@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

Galina A. Danchinova – Dr. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: dan-chin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6705-3970>