

©Коллектив авторов

ОЦЕНКА РАЗНООБРАЗИЯ КОМБИНАТОРНЫХ ДНК-БИБЛИОТЕК НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ФОРМЫ АМПЛИФИКАЦИОННЫХ КРИВЫХ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЭФФЕКТИВНОСТИ СЕЛЕКЦИИ АПТАМЕРОВ

С.П. Радько^{1,2}, С.А. Лапа^{1,3}, А.В. Чудинов^{1,3}, С.А. Хмельва², М.М. Маннанова², Л.К. Курбатов², Я.Ю. Киселёва⁴, А.С. Заседателев³, А.В. Лисица²*

¹ООО “ИБМХ-ЭкоБиоФарм”,

119435, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: radkos@yandex.ru

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва

³Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, Москва

⁴Российский научный центр рентгенорадиологии, Москва

Используя случайные (комбинаторные) ДНК-библиотеки с различной степенью разнообразия, показано, что их амплификация с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени характеризуется наличием максимума на амплификационных кривых. Установлено, что относительное падение флуоресценции после прохождения максимума прямо пропорциональна логарифму числа вариантов олигонуклеотидных последовательностей в случайной ДНК-библиотеке, если оно лежит в интервале от 1 до 10^4 вариантов, и практически не меняется, если число вариантов лежит в интервале от 10^5 до 10^6 . Полученная зависимость была использована в ходе процедуры SELEX для оценки изменения разнообразия случайных ДНК-библиотек от раунда к раунду при селекции ДНК-аптамеров к рекомбинантному белку SMAD4. Результатом селекции был отбор олигонуклеотидов, содержащих последовательности, формирующие участок взаимодействия ДНК с SMAD4, известный как SBE (SMAD-binding element), что указывает на SMAD4-SBE взаимодействие как доминирующее в процессе селекции ДНК-аптамеров к SMAD4.

Ключевые слова: аптамеры; селекция; амплификационные кривые; SMAD4

DOI: 10.18097/PBMC20196506477

ВВЕДЕНИЕ

Аптамеры, рассматриваемые как синтетические аналоги МАТ, представляют собой молекулы РНК или одноцепочечной ДНК, которые способны сворачиваться с формированием сложных пространственных структур и проявлять сродство к своим молекулярным мишеням, сравнимое со сродством МАТ [1, 2]. Отбор (селекцию) аптамеров к заданной мишени (в качестве которой могут выступать низкомолекулярные соединения, пептиды, белки, вирусы и клетки) проводят в комбинаторных РНК- или ДНК-библиотеках методом SELEX; при этом, как правило, РНК-библиотеки получают на основе ДНК-библиотек [1, 3]. SELEX представляет череду повторяющихся циклов (раундов), каждый из которых включает связывание олигонуклеотидов случайной библиотеки с мишенью, выделение комплексов олигонуклеотид/мишень, амплификацию связавшихся олигонуклеотидов с помощью ПЦР, разделение цепей ДНК (в случае селекции ДНК-аптамеров) для получения новой случайной библиотеки [1, 2]. В ходе селекции происходит обогащение библиотек последовательностями со сродством к мишени. Несмотря на кажущуюся простоту, процедура SELEX является сложным процессом, на конечный результат которого – отбор высокоаффинных олигонуклеотидных

последовательностей – влияют разнообразные факторы, такие как дизайн начальной комбинаторной ДНК-библиотеки, эффективность разделения олигонуклеотидов, связавшихся и не связавшихся с мишенью, оптимизация ПЦР для амплификации олигонуклеотидов, связавшихся с мишенью, выбор соотношения количества олигонуклеотидов и мишени в ходе селекции, число раундов селекции [3-5]. Последние два параметра, как правило, эмпирически выбираются в ходе селекции аптамеров на основе результатов мониторинга изменений сродства олигонуклеотидов (в среднем по библиотеке) к мишени и разнообразия ДНК-библиотек от раунда к раунду [4, 5].

Для оценки эволюции комбинаторной ДНК-библиотеки в ходе селекции в настоящее время используются следующие методы, позволяющие либо качественно, либо количественно оценить разнообразие библиотеки (количество вариантов последовательностей ДНК-олигонуклеотидов): анализ кривых денатурации (плавления) и/или кинетики ренатурации ДНК-библиотек после процедуры амплификации [6-8], ядерный магнитный резонанс (для оценки количества олигонуклеотидов со сложной пространственной конформацией) [9], высокоэффективная жидкостная хроматография в денатурирующих условиях [10], секвенирование нового поколения [11, 12]. Для качественной

Принятые сокращения: МАТ – моноклональные антитела; SBE – SMAD-binding element; SELEX – Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПЦРrv – полимеразная цепная реакция в реальном времени.

МОНИТОРИНГ ЭФФЕКТИВНОСТИ СЕЛЕКЦИИ АПТАМЕРОВ

оценки разнообразия ДНК-библиотек также предложено использовать форму амплификационных кривых, получаемых с помощью ПЦРrv, которые представляют зависимость флуоресценции красителя, интеркалирующего в двуцепочечные молекулы ДНК – как правило, SYBR Green – от числа циклов амплификации [13]. В то время как для ДНК-фрагментов одинаковой нуклеотидной последовательности амплификационные кривые имеют сигмовидную форму, при амплификации комбинаторных ДНК-библиотек флуоресценция проходит через максимум, после которого наблюдается падение с выходом на плато с более низким значением флуоресценции. Такая форма амплификационных кривых наблюдается для комбинаторных ДНК-библиотек как с немодифицированными [13], так и с модифицированными основаниями [14].

В данной работе мы установили количественную зависимость между разнообразием комбинаторной ДНК-библиотеки и таким параметром амплификационной кривой, как величина относительного падения флуоресценции красителя SYBR Green после прохождения максимума. Полученная зависимость была использована для мониторинга селекции ДНК-аптамеров к транскрипционному фактору человека SMAD4, который рассматривается как потенциальная мишень для таргетной терапии ряда онкологических заболеваний [15].

МЕТОДИКА

Синтез и очистка ДНК-олигонуклеотидов

В работе использовали олигонуклеотиды, представленные в таблице 1, включая: комбинаторную ДНК-библиотеку длиной 75 нуклеотидов (нт) со случайной областью длиной 32 нт и фланкирующими её участками с заданными последовательностями длиной 23 нт и 20 нт; олигонуклеотид длиной 75 нт (олиго-С) с заданной последовательностью, имеющей на 5'- и 3'-концах участки, идентичные фланкирующим последовательностям ДНК-библиотеки; прямой и обратный праймеры для амплификации ДНК-библиотеки и олиго-С; ДНК-аптамер (SBE-Apt) и контрольный олигонуклеотид (SBE-Scr), биотинилированные на 3'-конце. Олигонуклеотиды синтезировали

на ДНК-синтезаторе ASM-800 (“Биоссет”, Россия) в соответствии с протоколами производителя. При синтезе случайной области ДНК-библиотеки использовали смесь фосфоамидитов в соотношении А:С:G:Т = 1,5:1,25:1,15:1,0 [16]. Праймеры очищали хроматографией на обращённой фазе, остальные олигонуклеотиды – электрофорезом в полиакриламидном геле (Т=12%, С=5%) в денатурирующих условиях (7 М мочевины). Электрофорез проводили в ТВЕ-буфере. ДНК визуализировали, помещая гель на УФ-трансиллюминатор после окраски флуоресцентным красителем SYBR Green I (“Life Technologies”, США). Полосу геля, представляющую верхнюю часть зоны мигрирующего материала (содержит наиболее медленно мигрирующие молекулы ДНК), вырезали, измельчали и ДНК элюировали, инкубируя кусочки геля в деионизованной воде. ДНК осаждали этанолом в присутствии 0,3 М ацетата натрия, осадок высушивали и растворяли в деионизованной воде. Концентрацию ДНК-библиотеки и праймеров определяли на спектрофотометре NanoDrop-1000 (“Thermo Fisher Scientific”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Молекулярную массу олигонуклеотидов рассчитывали с помощью программы OligoCalculator (<http://mcb.berkeley.edu/labs/krantz/tools/oligocalc.html>), а для случайной области ДНК-библиотеки, – принимая среднюю молекулярную массу нуклеотида равной 325 Да.

Получение и ПЦР-анализ ДНК-библиотек с различной степенью разнообразия

Аликвоту раствора ДНК-библиотеки последовательно разводили деионизованной водой так, чтобы дать серию растворов с 10-кратно различающимися концентрациями от 34 пМ до 3,4 аМ. 5 мкл каждого раствора (что соответствует количеству ДНК от 170 амоль до 0,017 змоль) использовали для проведения ПЦРrv с применением ПЦР-смеси qPCRMix-HS SYBR (“Евроген”, Россия) на амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (“Bio-Rad”, США). Объём ПЦР-пробы составлял 25 мкл; концентрация каждого праймера – 400 нМ. Каждый цикл амплификации включал 45-секундную инкубацию пробы при 95°C, 56°C и 72°C. Реакцию останавливали после

Таблица 1. Последовательности синтезированных олигонуклеотидов

Олигонуклеотид	Последовательность
ДНК-библиотека	5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-N ₃₂ -TTCGACATGAGGCCCGGATC-3'
Олиго-С	5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAACCAGCCCCGTTCTCC CCTTCTATTCACCTCCCTTCGACATGAGGCCCGGATC-3'
Прямой праймер	5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-3'
Обратный праймер	5'-GATCCGGGCCTCATGTTCGAA-3'
«Утяжелённый» обратный праймер	L ₅ -5'-GATCCGGGCCTCATGTTCGAA-3'
SBE-Apt	5'-CGAAGTCTAGACAGCGTTTTTCGCTGTCTAGACTTCGAAA AA-3'-B
SBE-Scr	5'-CGAAGCTTAGCAAGCGTTTTTCGCTGTCTAAGCTTCGAAA AA-3'-B

Примечание: В – биотин; L – гексаэтиленгликолевый линкер. Комплементарные участки олигонуклеотидов SBE-Apt и SBE-Scr выделены подчёркиванием.

прохождения максимального значения флуоресценции SYBR Green. Содержимое ПЦР-пробирки использовали для проведения препаративной ПЦР (25 ПЦР-проб по 100 мкл каждая). 15 циклов препаративной ПЦР проводили на амплификаторе Tetrad 2 thermocycler ("Bio-Rad") с использованием ПЦР-смеси qPCRmix-HS ("Евроген"). Концентрации праймеров и режим циклов амплификации были такими же, как описано выше для ПЦР_{рв}. Продукты препаративной ПЦР концентрировали, используя центрифужные концентраторы Vivaspin 2 ("Sartorius Stedium Biotech", Германия), а затем очищали с помощью электрофореза, как описано выше. Осаждение ДНК этанолом проводили в присутствии гликогена ("Thermo Fisher Scientific"). Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000. Полученные препараты ДНК анализировали с помощью ПЦР_{рв}. В каждую ПЦР-пробу вносили 170 амоль ДНК; условия ПЦР_{рв} – как описано выше.

Экспрессия и очистка рекомбинантного SMAD4

Рекомбинантный белок SMAD4 (rSMAD4), имеющий на N-конце шесть остатков гистидина (His6-tag), был получен экспрессией в компетентных клетках *E. coli* штамма С41, трансформированных плазмидой рЕТ23а с вставкой, кодирующей белок SMAD4. Клетки трансформированного штамма (далее С41М) были разрушены ультразвуком и клеточный лизат был осветлён центрифугированием (4°C, 10000 g, 40 мин). Очистку rSMAD4 проводили с использованием колонок с сефарозой CL-4В ("Thermo Scientific"), насыщенной ионами кобальта. Лизат пропускали через колонку, связавшиеся белки элюировали градиентом имидазола. Максимум элюции rSMAD4 наблюдали в диапазоне концентраций имидазола 60-80 мМ. Экспрессия rSMAD4 была подтверждена результатами электрофоретического (рис. 1) и масс-спектрометрического (дополнительные материалы, рис. S1 и табл. S1) анализов. Электрофорез белков проводили по Лэммли [17]; гели окрашивали красителем Кумасси G-250 ("Bio-Rad"). Концентрацию белка определяли с помощью колориметрического метода с бичинхониновой кислотой, используя коммерческий набор Pierce BCA Protein Assay Kit ("Thermo Fisher Scientific").

Селекция ДНК-аптамеров к SMAD4

Для проведения селекции rSMAD4 (молекулярная масса 60,5 кДа) был иммобилизован на магнитных микрочастицах Dynabeads His-Tag Isolation & Pulldown ("Life Technologies"). 10 мкл коммерческой суспензии микрочастиц, отмытых и уравновешенных в буфере 10 мМ Трис-НСl (рН 7,9), 500 мМ NaCl, 0,02% Твин-20, смешивали с 150 мкл раствора белка концентрацией 0,1 мг/мл в том же буфере, инкубировали 15 мин, после чего частицы отмывали и ресуспендировали в 50 мкл буфера SB (10 мМ Трис-НСl, рН 7,4, 500 мМ NaCl). Для контр-селекции на магнитных микрочастицах иммобилизовали пептид His-His-His-His-His-His (His6). Суспензию микрочастиц с His6 (SB, 50 мкл) добавляли к раствору ДНК-библиотеки (SB, 1 мл), содержащему

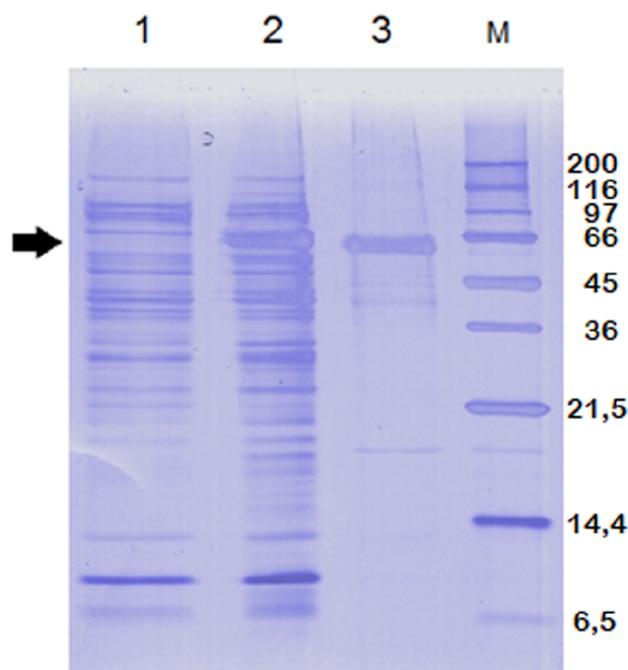


Рисунок 1. Результаты электрофоретического анализа клеточных лизатов штамма *E. coli* С41 (дорожка 1) и С41М (дорожка 2), а также материала, связавшегося с колонкой с насыщенной ионами кобальта сефарозой CL-4В и элюирующегося в диапазоне градиента концентрации имидазола 60-80 мМ (дорожка 3). На дорожке 4 (М) представлены маркеры молекулярной массы (значения молекулярной массы указаны справа). Стрелка указывает положение полосы rSMAD4 на геле.

100 пмоль олигонуклеотидов ($\approx 2,4$ мкг), инкубировали 30 мин при комнатной температуре, собирали микрочастицы на магнитосепараторе и отбирали раствор ДНК-библиотеки. Полученный раствор смешивали с микрочастицами, несущими SMAD4. После 30 мин инкубации при комнатной температуре микрочастицы собирали на магнитосепараторе, удаляли раствор, промывали микрочастицы дважды 200 мкл SB и ресуспендировали в 50 мкл деионизованной воды. Суспензию микрочастиц прогревали 3 мин при 95°C и немедленно помещали на магнитосепаратор. Полученный раствор олигонуклеотидов использовали для препаративной ПЦР, которую проводили, как описано выше, за исключением того, что: для амплификации использовался "утяжелённый" обратный праймер (табл. 1), конъюгированный с пятью молекулами гексаэтиленгликоля на 5'-конце; количество ПЦР-проб варьировали от 40 до 50, а количество циклов амплификации – от 20 до 25. Ампликоны концентрировали, как описано выше. Цепи ДНК разделяли методом электрофореза за счёт разницы их электрофоретической подвижности (дополнительные материалы, рис. S2). Элюцию "лёгкой" цепи из геля, очистку и определение концентрации ДНК проводили, как описано выше для ДНК-библиотек. Полученные олигонуклеотиды анализировали методом ПЦР_{рв}, как описано выше, после чего использовали их для проведения следующего раунда селекции.

После последнего раунда селекции ПЦР-продукты клонировали с помощью набора Quick-TA kit (“Евроген”) в соответствии с рекомендациями производителя и отбирали 10 клонов для секвенирования. Секвенирование проведено компанией “Евроген”.

Анализ связывания ДНК-аптамера с rSMAD4

Олигонуклеотиды SBE-Apt и SBE-Scr (табл. 1), биотинилированные на 3'-конце в процессе их синтеза, иммобилизовали на стрептавидин-несущих магнитных микрочастицах Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (“Thermo Scientific”), следуя рекомендациям производителя. Микрочастицы смешивали с осветлённым клеточным лизатом штамма С41М, содержащим экспрессированный rSMAD4, инкубировали 30 мин в буфере SB при комнатной температуре с постоянным перемешиванием и изолировали с помощью магнитосепаратора. Материал, связавшийся с магнитными микрочастицами, элюировали их инкубацией в буфере для электрофореза (содержащем 2% Na-додецилсульфата), после чего проводили электрофоретический анализ элюата как указано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ПЦР-анализ ДНК-библиотек различной степени разнообразия

Использованные в работе ДНК-библиотеки являются “вырожденными”, то есть количество присутствующих вариантов последовательностей нуклеотидов меньше теоретически возможного [1, 3]. Действительно, количество комбинаций четырёх типов нуклеотидов при длине случайной области 32 нт составляет $4^{32} \approx 1,8 \cdot 10^{19}$ вариантов, тогда как 100 пмоль ($\approx 2,4$ мкг) использованной в работе ДНК-библиотеки содержат всего $6 \cdot 10^{13}$ молекул ДНК. Соответственно, 170 амоль будет содержать 10^8 молекул ДНК, а 0,017 змоль – 10 молекул ДНК,

каждая из которых будет представлена своей последовательностью случайной области. ПЦР-амплификация этих ДНК-олигонуклеотидов многократно увеличит их количество без существенного изменения числа вариантов последовательностей, позволяя таким образом получить ДНК-библиотеки, различающиеся по разнообразию представленных вариантов нуклеотидных последовательностей – от 10^8 до 10^1 . На рисунке 2 представлены результаты анализа таких библиотек методом ПЦР-рв. В то время как при амплификации ДНК-олигонуклеотидов с одинаковой последовательностью (олиго-С) форма амплификационной кривой имеет ожидаемую сигмоидную форму (рис. 2А), амплификация ДНК-библиотек характеризуется наличием максимума на амплификационной кривой, причём относительное падение флуоресценции красителя SYBR Green после его достижения отличается для библиотек с различной степенью разнообразия (рис. 2Б).

В качестве количественной меры падения флуоресценции мы использовали величину $\Delta F_r = (F_m - F_{35}) / F_m$, где F_m и F_{35} – максимальное значение флуоресценции на амплификационной кривой и значение флуоресценции на 35-м цикле ПЦР-рв соответственно. Как видно из рисунка 3, ΔF_r меняется незначительно, когда разнообразие библиотеки снижается с 10^8 до 10^3 вариантов последовательностей. Однако при дальнейшем снижении разнообразия ΔF_r начинает быстро уменьшаться. Если при разнообразии 1 (ДНК-олигонуклеотиды с одинаковой последовательностью) значение ΔF_r принять равным нулю (рис. 2А), то в интервале $1-10^4$ вариантов последовательностей зависимость ΔF_r от степени разнообразия может быть хорошо аппроксимирована функцией $\Delta F_r = 0,126 \cdot \lg N$, где N – ожидаемое число вариантов последовательностей в ДНК-библиотеке (рис. 3; показанная линейная зависимость в интервале $1-10^4$ получена методом линейной регрессии, коэффициент корреляции Пирсона равен 0,987). Нельзя исключить, что полученное

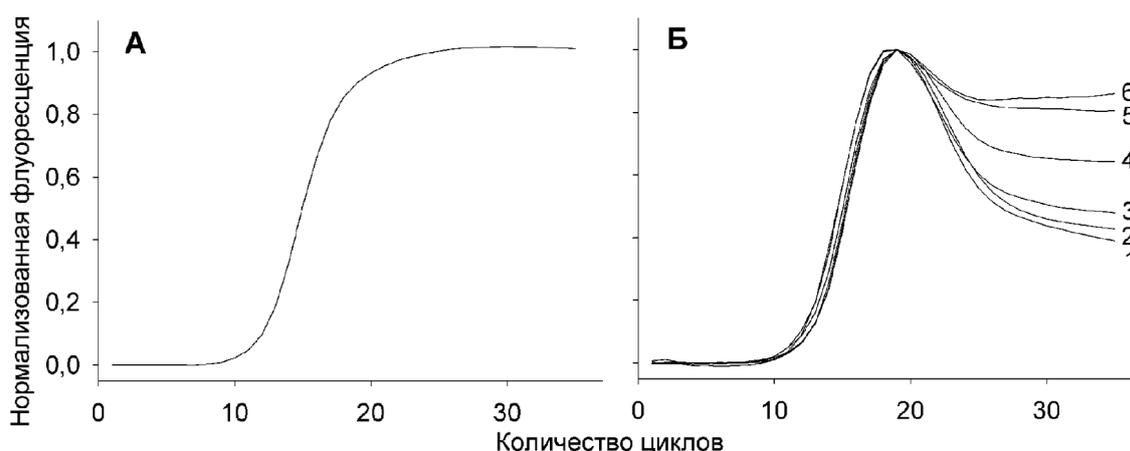


Рисунок 2. Амплификационные кривые, представленные как нормализованные значения флуоресценции интеркалирующего красителя SYBR Green при различных циклах амплификации. А – олиго-С; Б – ДНК-библиотеки различной степени разнообразия (количество вариантов последовательностей): 1 – 10^8 , 2 – 10^6 , 3 – 10^4 , 4 – 10^3 , 5 – 10^2 , 6 – 10^1 . Нормализацию амплификационных кривых проводили делением значений флуоресценции красителя SYBR Green на её значение на 35-м цикле для олиго-С (А) и на максимальное значение флуоресценции для ДНК-библиотек (Б). Количество ДНК в ПЦР-пробе – 170 амоль. ПЦР в реальном времени, каждый цикл включает 45-секундную инкубацию при 95°C, 56°C и 72°C; концентрация праймеров – 400 нМ.

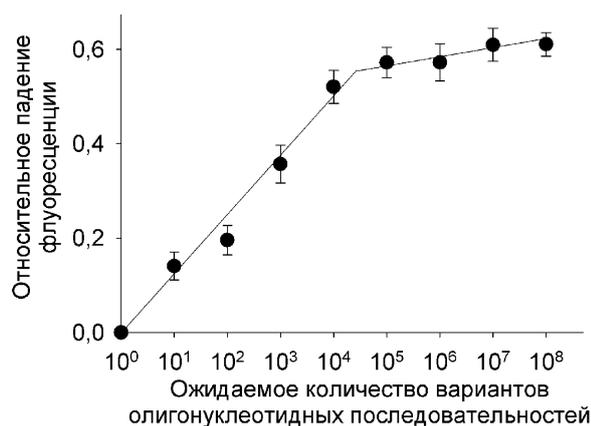


Рисунок 3. Относительное падение флуоресценции красителя SYBR Green, вычисляемое как $\Delta F_r = (F_m - F_{35})/F_m$, где F_m и F_{35} – максимальное значение флуоресценции на амплификационной кривой и значение флуоресценции на 35-м цикле ПЦР, как функция разнообразия (ожидаемое количество вариантов последовательностей) ДНК-библиотеки. Прямая линия, показанная для значений количества вариантов последовательностей от 10^0 до 10^4 , получена методом линейной регрессии (коэффициент корреляции Пирсона $r=0,987$); зависимость описывается уравнением $\Delta F_r = 0,126 \cdot \lg N$, где N – ожидаемое число вариантов последовательностей в ДНК-библиотеке. Все измерения проводили в трипликатах. Показаны средние значения и среднеквадратичные отклонения для трипликатов.

значение коэффициента пропорциональности может относиться только к данной ДНК-библиотеке (длиной 75 нт, со случайной областью 32 нт) и будет другим при изменении соотношения между длиной случайной области и суммарной длиной фланкирующих последовательностей.

Вероятно, необычная форма кривых амплификации в случае ДНК-библиотек связана с тем, что все, или значительная часть, оснований в области со случайной последовательностью не спарены. Действительно, измерение флуоресценции в ПЦР-пробах происходит после окончания этапа элонгации праймеров (проходит при 72°C), когда в случае ДНК-олигонуклеотидов с одинаковой последовательностью все они находятся в форме дуплексов с полностью спаренными основаниями. По мере нарастания количества комплементарных олигонуклеотидов в процессе амплификации, они начинают конкурировать с праймерами, приводя к замедлению и, в конечном итоге, полному ингибированию амплификации. Однако при этом образуются фрагменты дуплексной ДНК с полностью комплементарными основаниями, что выражается амплификационной кривой классической сигмоидной формы (рис. 2А). В случае ДНК-библиотек, с праймерами начинают конкурировать фланкирующие участки олигонуклеотидов, тогда как случайные области образующихся дуплексных ДНК оказываются некомплементарными и представляют одонитевые участки. В результате, начиная с некоторого цикла амплификации, количество полностью дуплексных молекул ДНК, получаемых в результате элонгации праймера (и, соответственно, количество интеркалированных между парами оснований молекул

SYBR Green), начинает уменьшаться, что приводит к падению уровня флуоресценции и появлению максимума на амплификационных кривых (рис. 2Б). Очевидно, что по мере уменьшения разнообразия ДНК-библиотеки вероятность формирования полностью комплементарных ДНК-дуплексов возрастает, и максимум на амплификационных кривых становится менее выраженным (рис. 2, 3).

Селекция ДНК-аптамеров к rSMAD4

Белок SMAD4 является общим партнёром для белков группы R-SMAD при образовании транскрипционно-активных комплексов, индуцируемых трансформирующим ростовым фактором бета (TGF- β) [15]. SMAD4 состоит из двух доменов, МН1 и МН2, первый из которых связывается с геномной ДНК, а второй – с одним из белков R-SMAD [18]. Домен МН1 специфически связывается с дуплексом, формируемым последовательностью 5'-GTCT-3' и её комплементом 5'-AGAC-3', известным как SBE (SMAD-binding element) [18, 19].

Ход селекции ДНК-аптамеров к rSMAD4 контролировали, оценивая разнообразие ДНК-библиотек от раунда к раунду. Как видно из рисунка 4, максимум на амплификационных кривых становится менее выраженным по мере возрастания числа раундов селекции. Сравнение данных рисунка 3 и рисунка 5 показывает, что после первых двух раундов селекции разнообразие библиотеки остаётся относительно высоким – не менее 10^6 вариантов. После третьего раунда селекции разнообразие снижается до приблизительно 10^4 вариантов, а после четвёртого – лежит в интервале 10^3 – 10^4 вариантов и практически не изменяется после пятого раунда. На этом этапе в процедуру SELEX было внесено изменение – количество микрочастиц с rSMAD4, добавляемых к ДНК-библиотеке, было снижено в 10 раз. Как видно из рисунков 4 и 5, это привело к значительному изменению разнообразия библиотеки после шестого раунда – между 10^2 – 10^3 вариантов последовательностей (рис. 3 и 5). После восьмого раунда селекции разнообразие стало не более 100 вариантов последовательностей (рис. 3 и 5) и на этом этапе было принято решение о клонировании и секвенировании фрагментов ДНК с целью анализа последовательностей, представленных в ДНК-библиотеке. Анализ показал, что среди десяти секвенированных последовательностей ПЦР-продуктов (табл. 2), две имели в своём составе последовательности 5'-GTCT-3' и 5'-AGAC-3' и были способны формировать шпильчатую структуру, дуплексная часть которой включает SBE, а одна последовательность содержала по две последовательности 5'-GTCT-3' и 5'-AGAC-3', способные формировать два SBE в дуплексной части ДНК-шпильки (последовательность №9, табл. 2). Схематическое изображение трёхмерной структуры, образуемой этой последовательностью, представлено на рисунке 6 (структура получена с помощью программы Mfold [20]).

Полученные результаты были положены в основу конструирования ДНК-аптамера SBE-Apt, последовательность которого приведена в таблице 1.

МОНИТОРИНГ ЭФФЕКТИВНОСТИ СЕЛЕКЦИИ АПТАМЕРОВ

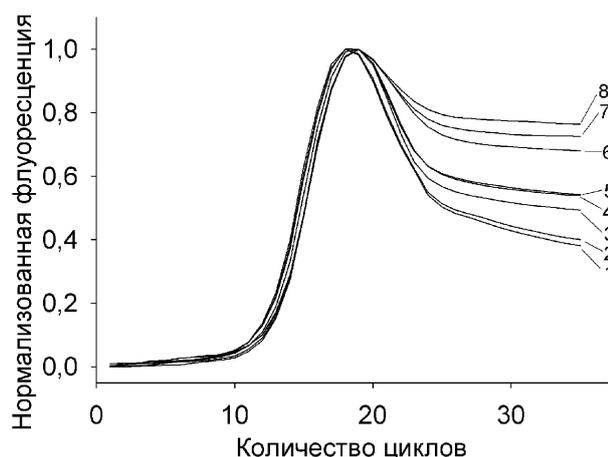


Рисунок 4. Амплификационные кривые (нормализованные значения флуоресценции интеркалирующего красителя SYBR Green при различных циклах амплификации) для ДНК-библиотек, получаемых после раундов селекции аптамеров к *rSMAD4*. Цифрами указаны раунды селекции.

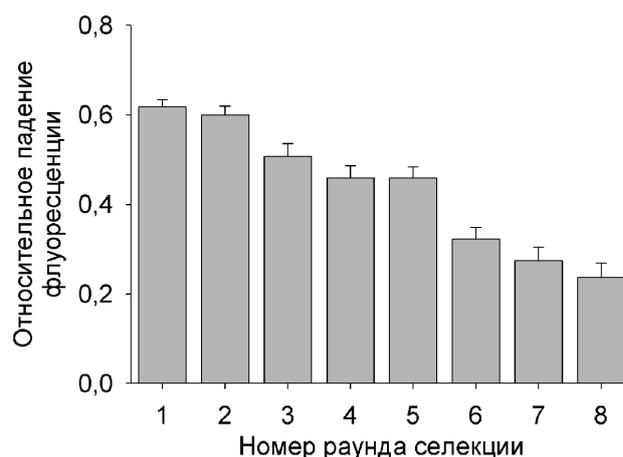


Рисунок 5. Относительное падение флуоресценции ($\Delta F_r = (F_m - F_{35})/F_m$, как на рис. 2) для ДНК-библиотек, получаемых на различных раундах селекции аптамеров к *rSMAD4*. Все измерения проводили в трипликатах. Показаны средние значения и среднеквадратичные отклонения для трипликатов.

Таблица 2. Последовательности клонированных ДНК-фрагментов

№№	Последовательности олигонуклеотидов
1	5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAATCTACTCGTCCCTCCTATTTCTTTTCTCTTTCTCGA CATGAGGCCCGGATC-3'
2	5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAACTGCCGCTTTCACCCACATCACCTTTCTACTGTTCTCGA CATGAGGCCCGGATC-3'
3	5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAATGCCGCTTTCACCCACATCACCTTTCTACTGTTCTCGA CATGAGGCCCGGATC-3'
4	5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTCATACGTCCATTGTTTCCCCCTCCATATTTCTCGA CATGAGGCCCGGATC-3'
5	5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAATCTTGTCCCGGTTCCCTATAGTACTTTATGATTTCTCGA CATGAGGCCCGGATC-3'
6	5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAATCATCCACTTACTTGACACCCTTCTTGGCCCTTCTCGA CATGAGGCCCGGATC-3'
7	5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAAAATATTGTACTCTCCACCTTTAAATACCTTCTCGA CATGAGGCCCGGATC-3'
8	5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAATCATCCACTTACTTGACACCCTTCTTGGCCCTTCTCGA CATGAGGCCCGGATC-3'
9	5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAAGAAGTCTGAGACAGCTCTTGCTGTCTCTAGACTTCTCGA CATGAGGCCCGGATC-3'
10	5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAATGCTTACGCAAGACCTTTCTGGTCTTGCTTCTCTCGA CATGAGGCCCGGATC-3'

Примечание. Участки 5'-GTCT-3' и 5'-AGAC-3', способные формировать SBE при образовании шпильчатой структуры, выделены жирным шрифтом. Комплементарные участки показаны подчёркиванием.

Аптамер SBE-Apt был способен селективно связывать *rSMAD4* в лизатах *E. coli* (рис. 7). В то же время олигонуклеотид SBE-Scr, образующий идентичную ДНК-шпильку, но без формирования SBE в силу того, что нуклеотиды в соответствующих участках были случайным образом перемешаны, не показывал существенного взаимодействия с *rSMAD4* (рис. 7). Вероятно, сайт взаимодействия домена МН1 белка *rSMAD4* с SBE является доминирующим местом связывания с ДНК, что и определило отбор в ДНК-библиотеках олигонуклеотидов, формирующих шпильчатые структуры, в дуплексной части которых присутствуют SBE.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере комбинаторной ДНК-библиотеки длиной 75 нт со случайной областью длиной 32 нт показано, что относительное падение флуоресценции после прохождения максимума прямо пропорционально логарифму числа вариантов олигонуклеотидных последовательностей в интервале от 1 до 10^4 и практически не меняется, если число вариантов лежит в интервале от 10^5 до 10^8 . Полученная зависимость была использована в ходе процедуры SELEX для оценки изменения разнообразия случайных ДНК-библиотек от раунда к раунду

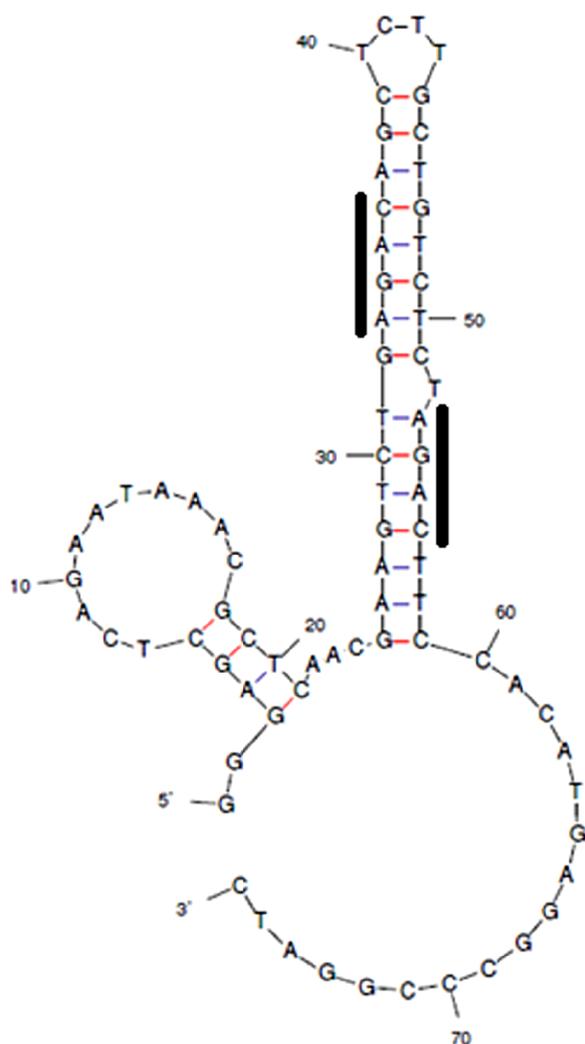


Рисунок 6. Структура, формируемая олигонуклеотидом №9 из таблицы 2. Структура получена с использованием программы Mfold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>). Жирные линии указывают положение SBE.

при селекции ДНК-аптамеров к рекомбинантному белку SMAD4. Результатом селекции был отбор олигонуклеотидов, содержащих последовательности, формирующие участок взаимодействия ДНК с SMAD4, известный как SBE.

БЛАГОДАРНОСТИ

Эксперименты выполнены с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ). Авторы благодарны А.А. Мойса (лаборатория системной биологии ИБМХ) за синтез и очистку пептида His6.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение №14.576.21.0096, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57617X0096).

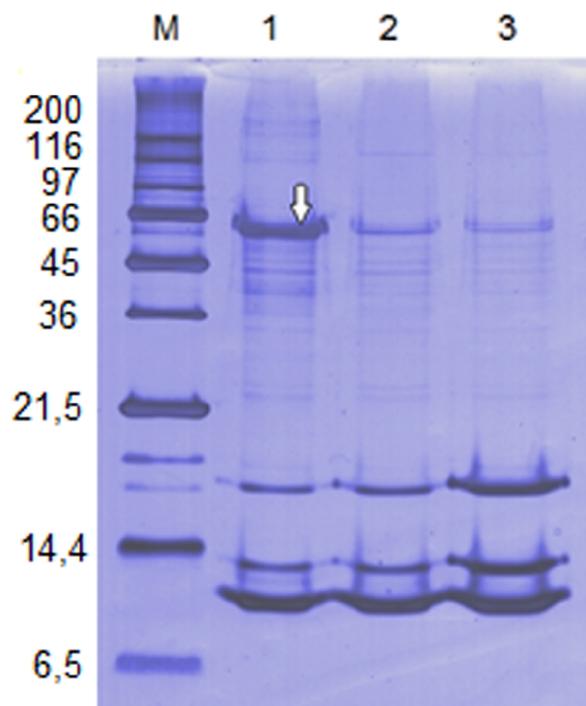


Рисунок 7. Результаты электрофоретического анализа связывания rSMAD4 с ДНК-аптамером SBE-Apt, иммобилизованном на магнитных микрочастицах. М – маркёры молекулярного веса (указан слева); 1 – микрочастицы с иммобилизованным SBE-Apt; 2 – микрочастицы с иммобилизованным контрольным олигонуклеотидом SBE-Scr (табл. 1); 3 – микрочастицы без иммобилизованных олигонуклеотидов. Стрелка указывает положение полосы rSMAD4 на геле. Нижние жирные полосы – мономеры стрептавидина.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или с использованием животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Radko S.P., Rakhmetova S.Yu., Bodoev N.V., Archakov A.I. (2007) Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomed. Chem., **1**, 198-209.
2. Zhang Y., Lai B.S., Juhas M. (2019) Molecules, **24**, E941. DOI: 10.3390/molecules24050941
3. Komarova N., Kuznetsov A. (2019) Molecules, **24**, E3598. DOI: 10.3390/molecules24193598
4. Wang T., Chen C., Larcher L.M., Barrero R.A., Veedu R.N. (2019) Biotechnol. Adv., **37**, 28-50.
5. Mencin N., Smuc T., Vranicar M., Mavri J., Hren M., Galesa K., Krkoc P., Ulrich H., Solar B. (2014) J. Pharm. Biomed. Anal., **91**, 151-159.
6. Vanbrabant J., Leirs K., Vanschoenbeek K., Lammertyn J., Michiels L. (2014) Analyst, **139**, 589-595.
7. Charlton J., Smith D. (1999) RNA, **5**, 1326-1332.

8. Schutze T., Arndt P.F., Menger M., Wochner A., Vingron M., Erdmann V.A., Lehrach H., Kaps C., Glokler J. (2010) *Nucleic Acids Res.*, **38**, e23. DOI: 10.1093/nar/gkp1108
9. Amano R., Aoki K., Miyakawa S., Nakamura Y., Kozu T., Kawai G., Sakamoto T. (2017) *Sci. Rep.*, **7**, 283.
10. Muller J., El-Maarri O., Oldenburg J., Potzsch B., Mayer G. (2008) *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 1033-1037.
11. Schutze T., Wilhelm B., Greiner N., Braun H., Peter F., Morl M., Erdmann V.A., Lehrach H., Konthur Z., Menger M., Arndt P.F., Glokler J. (2011) *PLoS One*, **6**, e29604. DOI: 10.1371/journal.pone.0029604
12. Gu G., Wang T., Yang Y., Xu X., Wang J. (2013) *PLoS One*, **8**, e76109. DOI: 10.1371/journal.pone.0076109
13. Luo Z., He L., Wang J., Fang X., Zhang L. (2017) *Analyst*, **142**, 3136-3139.
14. Лана С.А., Павлов А.С., Кузнецова В.Е., Шершов В.Е., Спицин М.А., Гусейнов Т.О., Радько С.П., Заседателев А.С., Лисица А.В., Чудинов А.В. (2019) *Молекулярная биология*, **53**, 513-523. [Lapa S.A., Pavlov A.S., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Radko S.P., Zasedatelev A.S., Lisitsa A.V., Chudinov A.V. (2019) *Molecular Biology (Moscow)*, **53**, 460-469.
15. Ullah I., Sun W., Tang L., Feng J. (2018) *J. Cancer*, **9**, 4018-4028.
16. Лана С.А., Ромашиова К.С., Спицин М.А., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Гусейнов Т.О., Заседателев А.С., Радько С.П., Тимофеев Э.Н., Лисица А.В., Чудинов А.В. (2018) *Молекулярная биология*, **52**, 984-996. [Lapa S.A., Romashova K.S., Spitsyn M.A., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Guseinov T.O., Zasedatelev A.S., Radko S.P., Timofeev E.N., Lisitsa A.V., Chudinov A.V. (2018) *Molecular Biology (Moscow)*, **52**, 854-864.
17. Laemmli U.K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
18. Zawal L., Dai J.L., Buckhaults P., Zhou S., Kinzler K.W., Vogelstein B., Kern S.E. (1998) *Mol. Cell*, **1**, 611-617.
19. Shi Y., Wang Y.F., Jayaraman L., Yang H., Massague J., Pavletich N.P. (1998) *Cell*, **94**, 585-594.
20. Zuker M. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3406-3415.

Поступила в редакцию: 11. 11. 2019.
 После доработки: 27. 11. 2019.
 Принята к печати: 29. 11. 2019.

EVALUATION OF THE DIVERSITY OF RANDOM DNA-LIBRARIES BY THE SHAPE OF AMPLIFICATION CURVES FOR ESTIMATION OF THE EFFICIENCY OF APTAMER SELECTION

S.P. Radko^{1,2*}, S.A. Lapa^{1,3}, A.V. Chudinov^{1,3}, S.A. Khmeleva², M.M. Mannanova², L.K. Kurbatov², Y.Y. Kiseleva⁴, A.S. Zasedatelev³, A.V. Lisitsa²

¹IBMC-EcoBioPharm Ltd.,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: radkos@yandex.ru

²Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

³Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Moscow, Russia

Using random (combinatorial) DNA-libraries with various degrees of diversity, it was shown that their amplification by polymerase chain reaction in real time resulted in appearance of a maximum on amplification curves. The relative decrease of fluorescence after passing the maximum was directly proportional to the logarithm of the number of oligonucleotide sequence variants in the random DNA-library provided that this number was within the interval from 1 to 10⁴ and remained practically unaltered when the number of variants was in the interval from 10⁵ to 10⁸. The obtained dependence was used in the course of SELEX to evaluate changes in the diversity of random DNA-libraries from round to round in selection of DNA-aptamers to the recombinant SMAD4 protein. As a result, oligonucleotides containing sequences able to form a site of SMAD4-DNA interactions known as SBE (SMAD-binding element) have been selected thus indicating that the SMAD4-SBE interaction dominates the aptamer selection.

Key words: combinatorial libraries; amplification curves; aptamers; SELEX

Funding. The research was carried out with the support of the Russian Scientific Foundation (agreement No. 14.576.21.0096, project unique identifier RFMEFI57617X0096).

Received: 11.11.2019, revised: 27.11.2019, accepted: 29.11.2019.