Получение ДНК-аптамеров к интерлейкину-6 человека для создания наносенсорной биомагнитной системы безразделительного иммунного анализа

В. А. Спиридонова[1], Т. М. Новикова[1], О. В. Снигирев[2,a]

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.
[1] НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского.
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40.
[2] физический факультет, кафедра полупроводников.
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.
E-mail: [a] osnig@inbox.ru

Статья поступила 19.08.2015, подписана в печать 02.11.2015.

Для разработки наносенсорной системы безразделительного иммунного анализа на основе магнитных наночастиц и СКВИД-магнитометра использованы аптамеры, являющиеся функциональными аналогами антител. Селекцией получены ДНК-аптамеры к белку интерлейкин-6, сродство которых к белковой мишени охарактеризовано методом поверхностного плазмонного резонанса. Показано, что биотинилированная форма аптамеров связывается с магнитными наночастицами, функционализированными стрептавидином.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, стрептавидин-биотин, ДНК-аптамер, специфические комплексы, первичная структура аптамера, вторичная структура аптамера.

УДК: 537.8, 577.32. PACS: 87.83.+a, 87.15.B–, 87.90.+y.

Введение

Настоящая работа является частью проекта, направленного на создание методик и аппаратуры для реализации безразделительной схемы иммуноанализа с использованием функционализированных магнитных наночастиц (МНЧ) и чувствительного магнитометра. Магнитометр регистрирует изменение скорости броуновской релаксации магнитных наночастиц при связывании их в кластеры аптамерами — небольшими фрагментами ДНК/РНК длиной 15–60 нуклеотидов, как это делается для пары антитело–антиген [1–3].

Разрабатываемая наносенсорная биомагнитная тест-система на основе магнитных наночастиц с иммобилизованными аптамерами к белкам, сопутствующим онкологическим заболеваниям, таким, например, как интерлейкин-6 (ИЛ6), может быть основой нового поколения диагностической медицинской аппаратуры.

В настоящее время в существующих тест-системах, например, ELISA, используются моноклональные антитела (МКА). Альтернативой МКА как в терапевтических целях, так и в создании биосенсоров могут стать аптамеры (от латинского aptus — «подходящий»). Эти молекулы ДНК/РНК имеют высокое сродство к заданной белковой мишени. На сегодняшний день опубликовано большое число обзоров об аптамерах и способах их получения (см., например, [4–10]). Имея принципиально иную, чем антитела, химическую природу, но не уступая по специфичности и аффинности взаимодействия с молекулами-мишенями, аптамеры позволяют развивать новые оригинальные подходы к созданию тест-систем взамен традиционных иммунобиологических методов.

В настоящей работе приведены результаты по получению ДНК-аптамеров к ИЛ6 селекцией на основе комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот (НК), а также результаты поиска условий связывания полученных аптамеров с белком ИЛ6 и с функционализированными стрептавидином МНЧ для конструирования биосенсорной системы.

1. Материалы и методы

Для селекции аптамеров из комбинаторной библиотеки НК был использован метод SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) [11–12]. В основе метода лежит отбор молекул НК, которые обладают каким-либо сродством к белковой мишени.

1.1. Иммобилизация белковой мишени ИЛ6 на нитроцеллюлозных мембранах

Нитроцеллюлозные мембраны размером 5×5 мм инкубировали с раствором белка в фосфатном буфере 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 10 мМ NaH_2PO_4, 1.8 мМ KH_2PO_4, pH = 7.4. Чтобы снизить вероятность неспецифических взаимодействий ДНК исходной библиотеки, не занятые ИЛ6 позиции на нитроцеллюлозных мембранах блокировали фосфатным буфером, содержащим 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА), в течение 20 мин перед каждым циклом связывания. При получении аптамеров была использована комбинаторная библиотека нуклеиновых кислот (КБ), предложенная в работе Эллингтона [13]. Ниже приведены первичные

структуры КБ и комплементарных праймеров для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР):

5′-ATGCATCCACATCTACG–N_{30}–
–TTCACTGCAGACTTGAC-3′

R-праймер 5′-ATGGATCCACATCTACG, L-праймер 5′-GTCAAGTCTGCAGTGAA.

Константные части КБ были основой для создания комплементарных праймеров, с помощью которых был наработан нуклеотидный материал для последующих стадий селекции с помощью ПЦР. Праймеры, КБ, индивидуальные ДНК-аптамеры, биотинилированные формы аптамеров были синтезированы твердофазным способом на синтезаторе AP-380B (applied biosystems) фирмой «Синтол», Россия.

1.2. Получение искомых ДНК-аптамеров

Для получения аптамеров исходную ДНК КБ инкубировали в фосфатном растворе, как и иммобилизованный белок ИЛ6, раздельно в течение часа. Затем нитроцеллюлозные мембраны с иммобилизованным ИЛ6 переносили в раствор ДНК КБ в фосфатном буфере и выдерживали в течение часа при температуре 4°C. После трехкратных промывок мембраны с ИЛ6-буфером для удаления неспецифически адсорбированных молекул смывали специфически связавшиеся искомые аптамеры водой (Millipore Corp.) в термостате при температуре 80°C в течение 5 мин.

Собранную частично обогащенную фракцию аптамеров амплифицировали с помощью ПЦР. Далее с помощью асимметричного ПЦР получали однотяжевую форму ДНК-аптамеров. Пул молекул частично обогащенной однотяжевой ДНК вводили в следующий цикл селекции. Всего провели 5 раундов селекции. Для получения искомых аптамеров обогащенная фракция была клонирована в плазмиду pAL-TA [14]. Из полученных клонов на агаризованной среде выделяли рекомбинантные плазмиды. Для определения первичной структуры было сделано секвенирование искомых аптамеров («Евроген», Россия). Вторичные структуры полученных аптамеров характеризовали спектрами кругового дихроизма (КД) в буфере 20 мМ трис-HCl, pH = 7.2, 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl на спектрометре Chirascan (Applied Photophysics Ltd., UK).

1.3. Связывание искомых аптамеров с ИЛ6

Сродство ДНК-аптамеров к белку характеризовали константой диссоциации получаемого комплекса. Для этого использовали метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР), прибор BiacoreX100 (GJ Healthcare, USA) центра коллективного пользования МГУ. Белок ИЛ6 иммобилизовали на чипе Sensor.

Концентрацию вводимого аптамера варьировали от 0.01 до 0.8 мкМ в буфере 25 мМ MEC-KOH, pH = 6.2, 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl. Скорость ввода пробы в проточную ячейку составляла 10 мкл/мин. Все результаты были получены при вычитании фона базовой линии при использовании данных с ячейки отрицательного контроля. При расчете констант применяли программу BIAevaluation 4.1. с аппроксимацией результатов по модели 1 : 1 (Ленгмюр).

1.4. Связывание индивидуальных аптамеров с магнитными частицами

Для связывания с МНЧ по известной схеме стрептавидин-биотин выбранные аптамеры для дальнейшей работы были синтезированы в виде биотиновых производных («Синтол», Россия). В работе использовались магнитные частицы (МЧ) размером 75 нм с иммобилизованным стрептавидином на их поверхности (фирма Ocean Nano Tech, США), с концентрацией 1 мг/мл, полученные в растворе, содержащем азид натрия и БСА. Для удаления белка БСА, который находился в коммерческом препарате, наночастицы промывали несколько раз фосфатным буфером, используя центрифугирование при 16 000 об/мин в течение 30 мин в настольных центрифугах Эппендорф с охлаждением.

Для контроля чистоты препарата измеряли поглощение в промывных водах на длине волны 280 нм на спектрофотометре Эппендорф. В последних промывных водах поглощение составляло не более 0.002 ед. Реакцию связывания МЧ с ДНК-аптамером проводили в объеме 1 мл. К суспензии МНЧ в буфере добавляли равный объем аптамеров при постоянном перемешивании в течение от 1 до 16 ч. Центрифугированием при охлаждении отделяли раствор не связавшихся биотинилированных аптамеров от МНЧ. За появлением связанных аптамеров на поверхности наночастиц следили по изменению поглощения на длине волны 260 нм, соответствующей максимуму поглощения в спектре нуклеиновых кислот. В среднем связывалось около 15% ДНК-аптамеров от вносимого материала.

2. Результаты и обсуждение

С помощью метода селекции SELEX было выполнено пять раундов селекции. В первых двух раундах было использовано соотношения белок : ДНК = 4 : 1. Далее условия селекции ужесточали изменением соотношения белок-ДНК в пользу ДНК, тем самым создавали дополнительную конкуренцию аптамеров за связывание с белковой мишенью. Обогащенную фракцию аптамеров успешно клонировали в бактериальную систему вектор–хозяин по протоколам [14].

Было получено более трех десятков клонов. Для дальнейшей работы был выбран клон № 12: 5′-GGTGGCAGGAGGACTATTTATTTGCTTTTCT, так как он был обогащен GG-трактами, повторяющимися четыре раза, что, возможно, позволит подобрать условия для сборки G-квадруплексных структур [15–17].

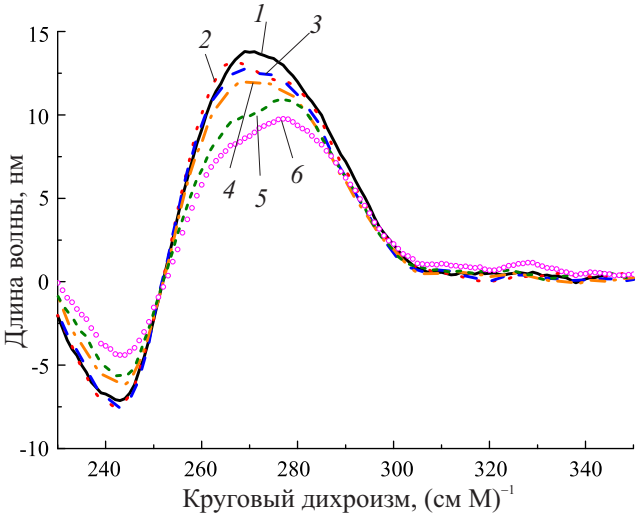

Рис. 1. Температурная зависимость спектра кругового дихроизма аптамера № 12. Представлены спектры с понижением интенсивности при 5°С (*1*), 10°С (*2*), 15°С (*3*), 20°С (*4*), 25°С (*5*), 30°С (*6*)

Вторичная структура аптамера № 12 была охарактеризована спектрами кругового дихроизма (КД). На рис. 1 приведены спектры КД, полученные в интервале от 360 до 240 нм при постепенном повышении температуры с шагом в 5°С. В спектрах аптамера № 12 наблюдаются отрицательный сигнал при 240 нм и положительный сигнал при 275 нм. Длины волн пиков не соответствует известным значениям длин волн резонансов антипараллельного или параллельного G-квадруплексов, а также дуплексов. Скорее всего, это обусловлено присутствием в растворе набора конформеров.

Далее изучали связывание ДНК-аптамера № 12 с белком ИЛ6 человека. Исследовали связывание, как с полноразмерной последовательностью (12Д GGTGGCAGGAGGACTATTTATTTGCTTTTCT), так и с укороченным вариантом (12К GGTGGCAGGAGGACTA). Устойчивость комплексов ИЛ6 с 12Д и 12К-аптамерами была характеризована с помощью метода ППР.

На рис. 2 представлена сенсограмма взаимодействия аптамера 12К с белком ИЛ6. Наблюдается выход кривых на плато, а также резкое понижение, что свидетельствует о быстрых процессах ассоциации–диссоциации в системе. Данные ППР позволяют определить кинетические константы ассоциации и диссоциации комплексов аптамеров с интерлейкином 6, которые представлены в таблице.

Сравнивая сродство короткого аптамера к белковой мишени и полноразмерного аптамера, можно отметить, что длинная олигонуклеотидная последовательность имеет большее сродство к белковой мишени, что подтверждается также равновесными константами диссоциации. Для аптамера 12 К равновесная константа диссоциации комплекса с ИЛ6 составила 190 нМ. Полноразмерный аптамер 12Д связывался с ИЛ6, иммобилизованным на чипе с равновесной константой диссоциации 17 нМ (рис. 3).

Исходя из этих данных можно констатировать, что оба аптамера образуют комплекс с ИЛ6 с высокой аффинностью. Выше было отмечено, что в растворе могут присутствовать различные конформеры.

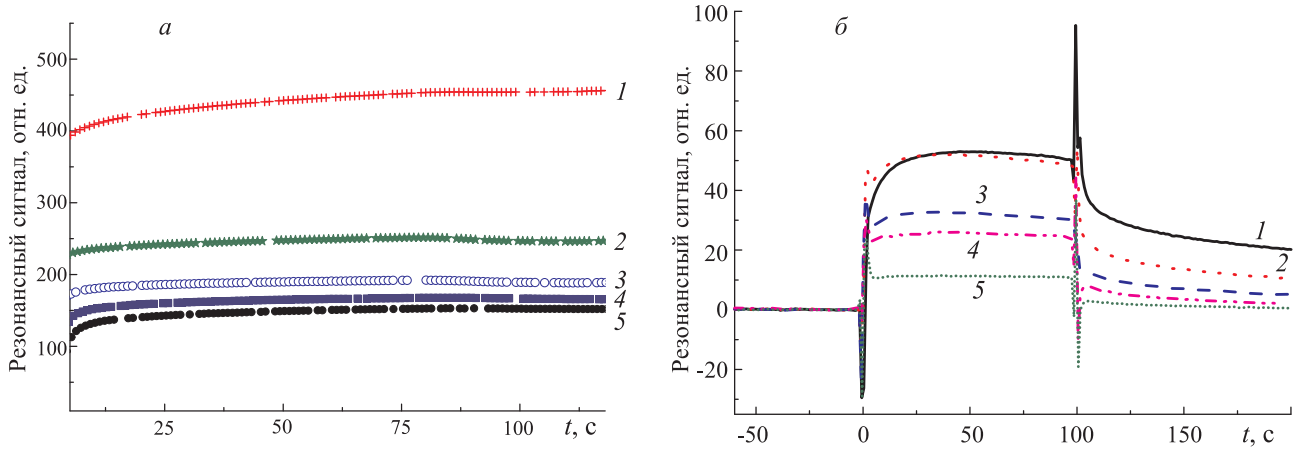

Рис. 2. а — сенсограммы связывания аптамера 12К с ИЛ6, иммобилизованным на чипе СМ5: кривая *1* — 800 мкМ, *2* — 400 мкМ, *3* — 200 мкМ, *4* — 100 мкМ, *5* — 50 мкМ. По оси абсцисс отложено время в секундах, по оси ординат — значения резонансного сигнала; *б* — сенсограммы связывания аптамера 12Д с ИЛ6, иммобилизованным на чипе СМ5: кривая *1* — 50 мкМ, *2* — 25 мкМ, *3* — 10 мкМ, *4* — 5 мкМ, *5* — 1 мкМ

Кинетические константы ассоциации и диссоциации 12К- и 12Д-аптамеров к интерлейкину-6

Аптамер	K_a, М$^{-1}$с$^{-1}$	Стандартное отклонение, М$^{-1}$с$^{-1}$	K_d, с$^{-1}$	Стандартное отклонение, с$^{-1}$
12К	$9.8 \cdot 10^4$	$0.5 \cdot 10^4$	$1.9 \cdot 10^{-2}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$
12Д	$3.5 \cdot 10^5$	$0.5 \cdot 10^5$	$5.9 \cdot 10^{-3}$	$0.3 \cdot 10^{-3}$

В дальнейшем будет исследовано, какой из конформеров имеет большее сродство к белку ИЛ6.

С использованием высокого сродства белка к полученным аптамерам было проведено связывание биотинилированных аптамеров с магнитными частицами, фунционализированными стрептавидином. Были отработаны условия посадки биотинилированного аптамера на МНЧ при различных концентрациях от 20 пкмоль/мкл до 400 пкмоль/мкл. При этом варьировали время инкубации МНЧ с аптамерами от 1 ч до 16 ч при комнатной температуре. Степень посадки оценивали спектрофотометрически на длине волны 260 нм, так как это соответствует максимуму поглощения нуклеиновых кислот. Иммобилизация аптамеров на МНЧ происходила при непрерывном перемешивании растворов и составила 10–15 %, независимо от исходной концентрации аптамера, вносимого в реакцию.

Заключение

Для создания методики и аппаратуры по реализации безразделительной схемы иммуноанализа с использованием функционализированных магнитных наночастиц (МНЧ) с помощью метода SELEX были получены однотяжевые ДНК-аптамеры к белку ИЛ6 человека. Выбранные ДНК аптамеры 12Д и 12К были характеризованы спектрами КД, а также константами диссоциации их комплексов с белком ИЛ6 человека.

Константы диссоциации комплексов аптамеров с белком, полученные с помощью ППР, имели наномолярный уровень, что соответствует константам диссоциации природных специфических комплексов антиген–антитело. Полученные биотинилированные формы ДНК-аптамеров показали способность связывания с МНЧ активированными стрептавидином, что позволяет перейти к созданию наносенсорной биомагнитной системы безразделительного иммунного анализа.

Работы проводились при поддержке Минобрнауки РФ (соглашение № 14.616.21.0011, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61614X0011).

Список литературы

1. *Öisöen F., Schneiderman J.F., Zaborowska M.* et al. // IEEE Trans. Appl. Supercond. 2009. **19**, N 3. P. 848.
2. *Astalan A.P., Ahrentorp F., Johansson C.* et al. // Biosens. Bioelectr. 2004. **19**, P. 945.
3. *Ferguson R.W., Khandhar A.P., Johansson C.* et al. // IEEE Trans. Appl. Supercond. 2013. **49**, N 7. P. 3441.
4. *Breaker R.R., Joyce G.F.* // TIBTECH. 1994. **12**. P. 268.
5. *Gold L., Polisky B., Uhlenbeck O.* et al. // Ann. Rev. Biochem. 1995. **64**. P. 763.
6. *Eaton B.E., Gold L., Hicke B.J.* et al. // Bioorg. Med. Chem. 1997. **5**. P. 1087.
7. *Osborne S.E., Matsumura I., Ellington A.D.* // Curr. Opin. Chem. Biol. 1997. **1**. P. 5.
8. *Копылов А.М., Спиридонова В.А.* // Молекулярная биология. 2000. **34**. С. 1097.
9. *Кульбачинский А.В.* // Биохимия. 2006. **46**. С. 193.
10. *Спиридонова В.А.* // Биомедицинская химия. 2010. **56**, № 6. С. 639.
11. *Tuerk C., Gold L.* // Science. 1990. **249**. P. 505.
12. *Ellington A.D., Szostak J.W.* // Nature. 1990. **346**. P. 818.
13. *Conrad R.C., Baskerville S., Ellington A.D.* // Mol. Divers. 1995. **1**, N 1. P. 69.
14. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д.* Молекулярное клонирование / Под ред. А. А. Баева. М., 1984.
15. *Qin Y., Hurley L.H.* // Biochimie. 2008. **90**. P. 1149.
16. *Neidle S.* // FEBS J. 2010. **277**. P. 1118.
17. *Bidzinska J., Cimino-Reale G., Zaffaroni N.* et al. // Molecules. 2013. **18**. P. 12368.

Obtaining DNA aptamers to human interleukin-6 for biomagnetic immunoassay nanosensor

V. A. Sprirdonova[1], T. M. Novikova[1], O. V. Snigirev[2,a]

[1] *A. N. Belozersky Institute Of Physico-Chemical Biology.*
[2] *Department of Atomic Physics, Physics of Plasma, and Microelectronics, Faculty of Physics. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.*
E-mail: [a] osnig@inbox.ru.

We used aptamers, which are functional equivalents of antibodies, in order to develop a nanosensor immunoassay system based on magnetic nanoparticles and a SQUID magnetometer. Selection was used to obtain DNA aptamers to interleukin-6; their affinity to the target protein was characterized by surface plasmon resonance. It was shown that the biotinylated aptamer binds to magnetic nanoparticles that were functionalized with streptavidin.

Keywords: magnetic nanoparticles, streptavidin-biotin, DNA aptamer, aptamer primary structure, aptamer secondary structure.
PACS: 87.83.+a, 87.15.B–, 87.90.+y.
Received 19 August 2015.

English version: *Moscow University Physics Bulletin.* 2016. **71**, No. 1. Pp. 135–138.

Сведения об авторах

1. Спиридонова Вера Алексеевна — доктор биол. наук, ст. науч. сотрудник; тел.: (495) 939-31-96, e-mail: spiridon@belozersky.msu.ru.
2. Новикова Татьяна Михайловна — канд. биол. наук, науч. сотрудник; тел.: (495) 939-32-04, e-mail: tnovikova58@mail.ru.
3. Снигирев Олег Васильевич — доктор физ.-мат. наук, профессор; тел.: (495) 939-30-00, e-mail: osnig@inbox.ru.