

## БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

## Комплексы АТФ-зависимой Lon-протеазы и ДНК-аптамеров с G-квадруплексной структурой как модель для разработки наносенсорной биомагнитной системы безразделительного иммунного анализа

В. А. Спиридонова<sup>1,a</sup>, В. А. Сизов<sup>2</sup>, Е. О. Кузьменко<sup>2</sup>, А. В. Мельничук<sup>1</sup>,  
Е. А. Олейниченко<sup>1</sup>, А. М. Куджаев<sup>3</sup>, Т. В. Ротанова<sup>3</sup>, О. В. Снигирев<sup>4</sup>

*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова:*

<sup>1</sup> НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского.

*Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40;*

<sup>2</sup> химический факультет. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3.

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН.

*Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.*

<sup>4</sup> Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра полупроводников. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.

*E-mail: <sup>a</sup> spiridon@belozersky.msu.ru*

Статья поступила 15.06.2016, подписана в печать 26.09.2016.

Показано, что функционализированные стрептавидином магнитные наночастицы (МНЧ) посредством биотинилированных ДНК-аптамеров с G-квадруплексной структурой специфически связываются с Lon-протеазой и могут быть использованы для выявления присутствия Lon-протеазы в биологических источниках с помощью наносенсорной биомагнитной системы безразделительного иммуноанализа. Авторами отработаны условия связывания целевых аптамеров с функционализированными МНЧ для использования полученных комплексов при конструировании наносенсорной биомагнитной системы иммуноанализа фермента.

*Ключевые слова:* G-квадруплексы, аптамеры, Lon-протеаза, биосенсоры.

УДК: 537.8.029.577.32. PACS: 87.15.-v, 87.83.+a.

### Введение

Настоящая работа выполнена в рамках проекта по созданию диагностической медицинской аппаратуры нового поколения, реализующей безразделительную схему иммуноанализа [1, 2]. В основу схемы положено использование магнитных наночастиц (МНЧ) с присоединенными олигонуклеотидами (ДНК-аптамерами), способными к специфическому образованию прочных комплексов с молекулами белков-маркеров заболеваний разной этиологии. Тестирование образования комплексов аптамер-белок в разрабатываемой биомагнитной системе осуществляется с помощью чувствительного магнитометра, регистрирующего изменение скорости броуновской релаксации МНЧ при связывании иммобилизованных на них аптамеров с белковыми мишенями, как это делается для пары антитело-антиген.

В качестве белка-мишени в настоящей работе использовалась АТФ-зависимая Lon-протеаза. Дополнительным маркером для разработки наносенсорной биомагнитной системы мы выбрали интерлейкин-6 человека (ИЛ-6) [3–5]. АТФ-зависимая Lon-протеаза является ключевым участником системы контроля качества клеточного протеома (совокупности клеточных белков). При нормальных концентрациях Lon-протеаза контролирует уровень множества регу-

ляторных белков и разрушает нефункциональные (мутантные, аномальные или дефектные) клеточные белки. При повышенных концентрациях митохондриальная Lon-протеаза сопровождает развитие ряда раковых заболеваний (таких как гепатома Зайделя и лимфома, аденокарцинома легких и карцинома полости рта, рак молочной железы, толстой кишки или мочевого пузыря) [6–10]. В этой связи Lon-протеаза, так же как ИЛ-6, может служить удобной мишенью для противоопухолевых препаратов [7–9].

Вместе с тем в работах [11, 12] отмечается, что Lon-протеаза и другие белки, связанные с развитием раковых заболеваний, могут не только служить молекулярными терапевтическими мишенями, но и, кроме того, выполнять роль клинических биомаркеров опухолей различных типов. Таким образом, оценка содержания, например, ИЛ-6 и Lon-протеазы в клетках органов, потенциально предрасположенных к развитию онкологических заболеваний, может быть использована для детектирования канцерогенеза.

Объектами работы служили аптамеры — небольшие фрагменты ДНК размером от 30 до 60 нуклеотидов, способные избирательно и с высоким сродством связываться с различными биомолекулами, в том числе и с белками [13–15]. Исследование

специфичности взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами (НК) как «межмолекулярного комплементарного взаимодействия» послужило причиной создания нового метода SELEX, с помощью которого можно подобрать комплементарного партнера, используя комбинаторную библиотеку НК. Комбинаторика, или комбинаторный подход, получила развитие как научное направление не только в математике, изучающей дискретные объекты, множества, сочетания, перестановки, но и в химико-биологических исследованиях. Использование основ комбинаторной химии нуклеиновых кислот позволило разработать метод иррационального дизайна аптамеров. Последние складываются в сложные трехмерные структуры и обладают высоким сродством к белковой мишени, которое сравнимо с аффинностью пары антиген–антитело. Аптамеры считаются функциональными аналогами моноклональных антител. В отличие от антител, технология производства которых требует использования живых систем, аптамеры получают *in vitro* химико-энзиматическими методами, их производство может быть автоматизировано. Следовательно, аптамеры более технологичны и перспективны, чем традиционные антитела. Более подробно аптамеры и их свойства описаны в обзорах [16–21].

Недавно нами было продемонстрировано, что Lon-протеаза из *E. coli* — фермент, более чем на 65% гомологичный Lon-протеазе человека [22], — образует комплексы с аптамерами, в молекулах которых дуплексные домены сочетаются с G-квадруплексной областью [23]. Интерес к G-квадруплексным структурам, в которых гуаниновые основания связаны хугстиновскими парами, значительно возрос за последние 20 лет, так как такие G-блоки обнаружены в биологически активных зонах геномной ДНК, в теломерах, в промоторных участках [24, 25]. Были выявлены и белки, которые связываются с такими квадруплексными участками, причем некоторые из найденных белков активно участвуют в процессах развития опухолей [26, 27].

В настоящей работе исследована возможность связывания биотинилированных аптамеров, содержащих G-квадруплексы, с Lon-протеазой и с функционализированными стрептавидином магнитными наночастицами с целью последующего выявления присутствия Lon-протеазы в биологических источниках. В связи с этим задача настоящей работы заключалась в изучении условий связывания целевых аптамеров с функционализированными МНЧ для использования полученных комплексов при конструировании наносенсорной биомагнитной системы иммуноанализа фермента.

## 1. Материалы и методы

В работе были использованы биотинилированные ДНК-аптамеры к Lon-протеазе следующей структуры:

ST43 биот	5'биотин-GTGACGTATGGTTGGTGTGG-TTGGGGCGTCAC
ST43 биот5Т	5'биотин-TTTTTGTGACGTATGGTTGG-TGTGGTTGGGGCGTCAC
RE31 биот	5'биотин-GTGACGTAGGTTGGTGTGG-TTGGGGCGTCAC
RE31 биот5Т	5'биотин-TTTTTGTGACGTAGGTTGG-TGTGGTTGGGGCGTCAC

Введение дополнительных 5Т-олигонуклеотидов, называемых линкерами, позволяло «отодвинуть» биотиновую метку от основной структуры молекулы.

Приведенные аптамеры и их немодифицированные формы были синтезированы фирмой «Синтол», Россия. Сродство немодифицированных аптамеров к Lon-протеазе было охарактеризовано ранее в работе [23].

### 1.1. Спектры кругового дихроизма (КД) для исследования структуры аптамеров

Метод КД используют для контроля формирования и конформационных изменений G-квадруплексных структур ДНК. Спектры КД антипараллельных G-квадруплексов имеют характерные положительные максимумы при 294 и 248 нм и отрицательный экстремум при 265 нм [28, 29]. Спектры были получены с помощью спектрометра Chirascan (Applied Photophysics Ltd., UK) в интервале длин волн от 240 до 360 нм при температуре 25 °С в кювете с длиной оптического пути 1 см. Скорость изменения длины волны составляла 1 нм/с. Спектр буфера, не содержащего олигонуклеотидов, был принят в качестве базовой линии. Растворы аптамерных ДНК были приготовлены в ПБС-буфере состава (10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.4, 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl), в следующих концентрациях: ST43 биот — 2.3 мкМ; ST43 биот5Т — 2.0 мкМ; RE31 биот — 2.4 мкМ; RE31 биот5Т — 1.9 мкМ.

### 1.2. Получение комплексов Lon-протеазы с аптамерами

Во избежание возможной самодеградации Lon-протеазы в процессе длительных экспериментов по изучению физико-химических характеристик комплексов фермента с магнитными наночастицами при получении комплексов Lon-протеазы с аптамерами была использована протеолитически неактивная форма фермента Lon-S679A (далее — Lon), несущая замену каталитически активного остатка серина на аланин.

Образцы нуклеотидов нагревали 2 мин при 100 °С, быстро охлаждали в ледяной бане и инкубировали во льду в течение 1 ч с Lon-S679A в 50 мМ трис-HCl-буфере, pH 7.5, содержащем 140 мМ NaCl и 5 мМ KCl. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл, концентрация аптамера была постоянной (375 нМ); соотношение аптамер:белок варьировали от 1:0.6 до 1:4.5. Затем к образцам добавляли по 10 мкл 20% глицерина и аликвоты

реакционных смесей подвергали гель-электрофорезу в 8% полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях. Для проявления зон, включающих аптамерные ДНК, использовали флуоресцентный краситель SYBR GREEN. Сканирование геля проводили на приборе Fluorescent Image Analyzer (FLA-300 series), Fujifilm.

### 1.3. Имобилизация биотинилированных ДНК-аптамеров на функционализированных стрептавидином МНЧ

В работе использовали магнитные наночастицы размером 50 нм (Ocean Corporation, USA). Препарат содержал МНЧ (1 мг/мл) в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7.4, бычий сывороточный альбумин (БСА, 1 мг/мл) и азид натрия (0.02%). Для удаления БСА из среды частицы несколько раз промывали фосфатным буфером ПБС с последующим центрифугированием (16 000 об/мин, 30 мин, 4 °С).

Для формирования комплекса МНЧ–стрептавидин–аптамер 200 мкл стандартной суспензии МНЧ в рабочем буфере перемешивали (25 °С) с 5 мкл 100 мкМ раствора аптамера в ПБС-буфере и разбавляли тем же буфером до общего объема 1 мл. Затем смесь инкубировали 2 ч (4 °С) и центрифугировали 30 мин (15 000 об/мин, 4 °С). Количество несвязавшегося аптамера, локализованного в надосадочной жидкости, определяли по поглощению раствора при 260 нм, что позволяло нам рассчитывать доли связанного биотинилированного аптамера на МНЧ–стрептавидине.

### 1.4. Связывание Lon-протеазы с комплексами МНЧ–стрептавидин–аптамер

Для оценки содержания Lon-протеазы в анализе с помощью МНЧ к 1 мл суспензии МНЧ с аптамером в буфере на основе 50 мМ трис-НСl, pH 7.5, содержащем 140 мМ NaCl и 5 мМ KCl, добавляли 50 мкл 30 мкМ раствора Lon-протеазы, инкубировали во льду в течение 1 ч. Соотношение аптамер:белок составляло приблизительно 1:10.

### 1.5. Метод динамического светорассеяния (ДСР)

Мы применили ДСР для качественной характеристики изменения размеров МНЧ, функционализированных стрептавидином, в результате присоединения биотинилированных производных аптамеров, а затем и молекул белка. Рассеяние света в образце обусловлено наличием флуктуаций плотности и локальной концентрации вещества в отдельном объеме раствора, возникающих вследствие теплового движения макромолекул или коллоидных частиц. Измерения ДСР проводили при помощи фотометра рассеянного лазерного света Zetasizer Nanoinstrument (Malvern Instruments, Великобритания) с He-Ne-лазером мощностью 4 мВт и длиной волны падающего света 633 нм (25 °С, объем ячейки 0.5 мл).

## 2. Результаты и обсуждение

### 2.1. Характеристика аптамеров спектрами КД

Согласно спектральным исследованиям установлено, что все исследованные аптамеры имеют характеристические положительные экстремумы в области 294 и 248 нм и отрицательный экстремум в районе 265 нм, т.е. они образуют антипараллельные G-квадруплексы. Как видно из рис. 1, амплитуда положительных максимумов мало варьируется в зависимости от способа присоединения биотиновых меток к аптамерам: через линкер (дополнительные 5Т) или непосредственно к олигонуклеотидной последовательности. По результатам сравнения спектров модифицированных и немодифицированных биотином аптамеров можно утверждать, что введение молекулы биотина не нарушает сборку структуры G-квадруплекса, что позволяет использовать данные ДНК-олигонуклеотидные структуры в дальнейшей работе.

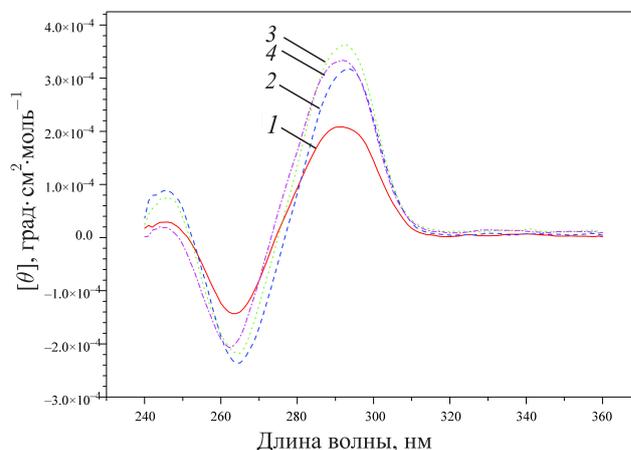


Рис. 1. Спектры КД биотинилированных аптамеров к Lon-протеазе. Сплошная линия 1 соответствует RE31 биот5Т, штриховая 2 — RE31 биот, пунктирная 3 — ST43 биот, штрихпунктирная 4 — ST43 биот5Т

### 2.2. Определение сродства биотинилированных аптамеров к Lon-протеазе в растворе

Сродство аптамеров к белку оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) [23]. Из рис. 2 видно, что с увеличением количества белка в реакционной пробе интенсивность зоны комплекса Lon-S679A/аптамер заметно возрастает. Подвижность зоны комплекса белка с аптамером резко отличается от подвижности индивидуального аптамера. Это позволяет четко разделить зоны комплекса и несвязавшегося аптамера и количественно оценить интенсивность зоны.

Мерой эффективности взаимодействия нуклеиновой кислоты с ферментом в каждом эксперименте служит доля аптамера, связанного с Lon-протеазой, которая определяется как отношение интенсивности флуоресценции зоны комплекса к суммарной флуоресценции комплекса и свободного

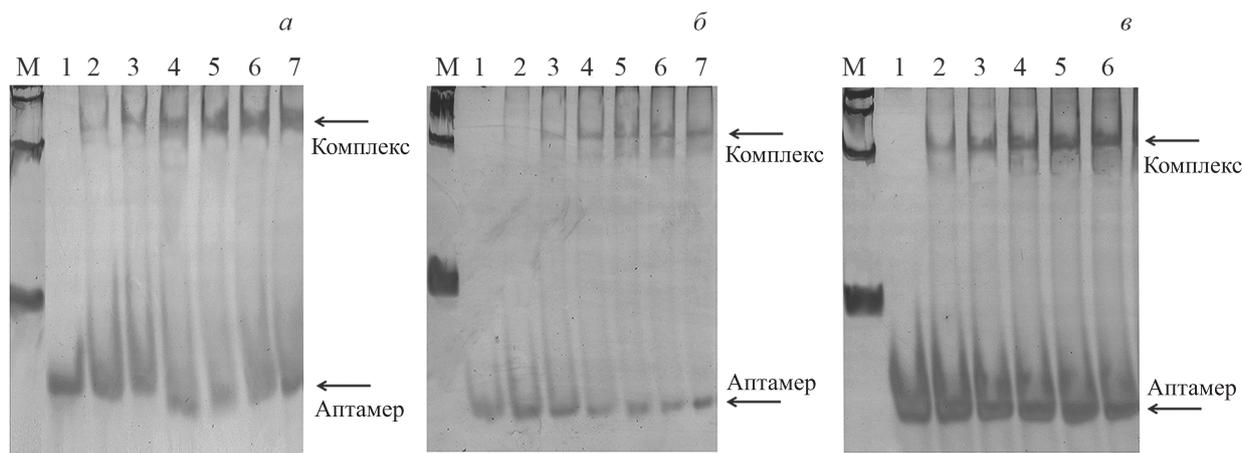


Рис. 2. Образование комплексов Lop-S679A с аптамерами ST43 биот5Т (а), ST43 биот (б) и RE31 биот5Т (в) — (гель-электрофорез в 8% ПААГ). Дорожки: М — нуклеотидные маркеры, 1 — аптамер (контроль), 2–7 — комплексы, полученные инкубацией Lop-S679A и аптамера (4°С, 1 ч) в разных соотношениях (см. табл. 1). На рисунке отмечены зоны комплексов и отдельно аптамеров

Таблица 1

**Эффективность взаимодействия аптамеров с Lop-S679A-протеазой**

Аптамер, [Apt], нМ	Дорожка на рис. 2	Lop-S679A, нМ	[Apt]: [Lop-S679A]	Доля Apt <sub>связ</sub> *	Относительная эффективность связывания (a <sub>n</sub> : a <sub>n</sub> , б <sub>n</sub> : a <sub>n</sub> или в <sub>n</sub> : a <sub>n</sub> ), %
(а) ST43 биот5Т, 375 нМ	1	—	—	—	—
	2	225.0	1:0.6	0.358	100.0
	3	337.5	1:0.9	0.460	100.0
	4	562.5	1:1.5	0.673	100.0
	5	787.5	1:2.1	0.779	100.0
	6	1125.0	1:3.0	0.820	100.0
	7	1687.5	1:4.5	0.908	100.0
					Среднее значение 100.0
(б) ST43 биот, 375 нМ	1	—	—	—	—
	2	225.0	1:0.6	0.034	9.50
	3	337.5	1:0.9	0.298	64.8
	4	562.5	1:1.5	0.571	84.8
	5	787.5	1:2.1	0.714	91.7
	6	1125.0	1:3.0	0.800	97.6
					Среднее значение 69.7
(в) RE31 биот5Т, 375 нМ	1	—	—	—	—
	2	225.0	1:0.6	0.261	72.9
	3	337.5	1:0.9	0.433	94.1
	4	562.5	1:1.5	0.669	99.4
	5	787.5	1:2.1	0.686	88.1
	6	1125.0	1:3.0	0.750	91.4
					Среднее значение 89.2

\* Apt<sub>связ</sub> — аптамер, связанный с ферментом.

аптамера на соответствующей дорожке электрофореграммы (рис. 2). Сопоставление этих характеристик для разных аптамеров, образующих комплексы с ферментом, при одинаковых концентрациях позволяет сравнить сродство аптамеров к Lop-протеазе. Эффективность взаимодействия аптамеров с Lop-S679A-протеазой приведена в табл. 1, из ко-

торой следует, что максимальные значения доли связанного аптамера при любых соотношениях аптамер:Lop-протеаза получены для ST43 биот5Т, т.е. этот аптамер наиболее эффективно связывается с ферментом. Близкую аффинность к Lop-протеазе (около 90% по сравнению с аффинностью ST43 биот5Т) проявляет также RE31 биот5Т,

в то время как способность ST43 биот к связыванию с ферментом заметно понижена. Из представленных результатов следует, что введение линкера приводит к возрастанию способности аптамера к связыванию с белком (предположительно за счет преодоления стерических затруднений).

### 2.3. Иммунизация биотинилированных ДНК-аптамеров на магнитных частицах, функционализированных стрептавидином

Стрептавидин, фиксированный на поверхности МЧ, представляет собой вырабатываемый бактериями *Streptomyces avidinii* гомотетрамерный белок с молекулярной массой 52.8 кДа. Стрептавидин образует прочный комплекс с биотиновой молекулой с  $K_d \sim 10^{-14}$  М.

В экспериментах по оптимизации пришивки специфических аптамерных ДНК к магнитным наночастицам использовали растворы аптамеров различной концентрации, полученные как при отсутствии, так и в присутствии солей. Реакцию проводили в фосфатном буфере ПБС, контролируя оптическое поглощение растворов при 260 нм (длина волны, соответствующая максимальному поглощению растворов нуклеиновых кислот) до начала и после окончания процесса комплексообразования.

Согласно протоколу фирмы Rockland Immunochemicals Inc. оптимальными условиями образования комплекса стрептавидин–биотин в растворе являются 0.2 М фосфатный буфер (рН 7.0–7.5), температура 5 °С и избыток биотина. Эти условия были выбраны в качестве базовых при пришивке специфических аптамерных ДНК к магнитным наночастицам.

Было исследовано влияние солей на эффективность образования комплексов МНЧ–стрептавидин–аптамер. Показано, что изменение концентрации хлористого натрия в среде как в сторону увеличения, так и уменьшения снижает уровень посадки аптамеров на МЧ–стрептавидин. При введении в состав буфера двухвалентных ионов (кальция или

никеля) связывание аптамера с наночастицами резко уменьшалось.

Влияние размера олигонуклеотида, включающего биотиновую метку, на связывание аптамера с МНЧ также ранее не рассматривалось. В связи с этим было проведено сравнение эффективности взаимодействия с частицами МНЧ–стрептавидина аптамеров, связанных непосредственно с биотином или отделенных от метки линкерным фрагментом, состоящим из пяти Т-нуклеотидов. В табл. 2 представлены результаты экспериментов, из которых следует, что введение линкера мало влияет на связывание аптамера с МНЧ: можно отметить лишь незначительное увеличение (около 10%) эффективности связывания линкерсодержащих аптамеров.

### 2.4. Характеристика размера комплексов МНЧ–стрептавидин–биотинилированный аптамер методом динамического светорассеяния

Для подтверждения иммобилизации аптамеров на МНЧ был использован метод динамического светорассеяния (ДСР), который позволил визуализировать изменение размеров используемых частиц. Метод ДСР основан на эффекте рассеяния части света, проходящего через жидкую среду, и позволяет определять размер частиц в растворе и дзета-потенциал их поверхности. Размер МНЧ с аптамерами увеличивался до 105 нм (рис. 3, а, б).

### 2.5. Связывание Lon-протеазы с МНЧ, функционализированными биотинилированными аптамерами

В экспериментах светорассеяния изучены взаимодействия Lon-протеазы с магнитными частицами, несущими аптамеры. Показано, что белок связывается с МНЧ–аптамером (рис. 3, а, б). При этом в образцах обнаруживается присутствие частиц увеличенного размера, что свидетельствует об образовании комплексов на магнитных частицах. В качестве контрольного эксперимента проводили связывание Lon-протеазы с МНЧ, функционализированными стрептавидином и ненагруженными аптамером (рис. 3, в). Установлено, что при отсутствии аптамеров Lon-протеаза не связывается с препаратом МНЧ–стрептавидин. Размер исходных частиц составлял 68 нм как отдельно при отсутствии, так и при наличии фермента.

Следует отметить, что взаимодействие с белком обуславливает значительное увеличение размера МНЧ. Кроме того, сопоставление графиков на рис. 3, а, б показывает, что наличие линкера, т.е. дополнительных 5Т-нуклеотидов, в биотинилированном аптамере приводит к выраженному увеличению диаметра комплекса МНЧ–стрептавидин–аптамер–белок. По-видимому, присутствие линкера, когда биотиновая метка отделена от структуры аптамера на пять нуклеотидов (приблизительно 1.5 нм), вносит свой вклад в размер получаемых МНЧ с белком.

Таблица 2

**Эффективность иммобилизации биотинилированных аптамеров к Lon-протеазе на магнитных частицах, функционализированных стрептавидином, в ПБС-буфере**

Аптамер	$C_{\text{апт}}^*$ , мкМ	Поглощение супернатанта при 260 нм, $A_{260}$		Степень связывания, %
		до связывания	после связывания	
ST43 биот	0.31	0.95	0.74	22
ST43 биот5Т	0.36	1.20	0.90	25
RE31 биот	0.35	1.10	0.86	22
RE31 биот5Т	0.36	1.24	0.94	24

\*  $C_{\text{апт}}$  — концентрация аптамера.

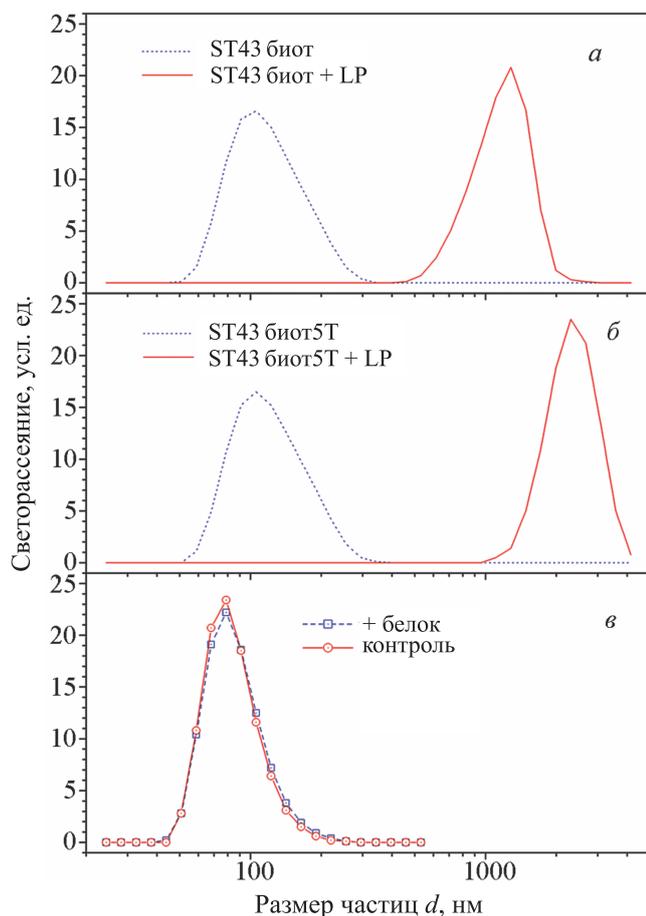


Рис. 3. Связывание Lon-протеазы с иммобилизованными на препарате МНЧ-стрептавидин аптамерами ST43 биот (а) и ST43 биот5Т (б). Штриховыми линиями показаны графики объемов, занимаемых препаратами МНЧ-аптамер. Сплошными линиями — графики распределения аптамер-содержащих МНЧ, связавших Lon-протеазу (LP) (в). Представлено отсутствие связывания Lon-протеазы с функционализированными МЧ-стрептавидин без аптамера

В реакции связывания были взяты одинаковые количества белка и одинаковое количество частиц в расчете на аптамер. Количество связавшегося белка заметно больше при использовании аптамера с линкером. Это еще раз подчеркивает важную роль стерической доступности всего объема молекулы аптамера для связывания с белком.

### Заключение

Проведение испытаний по связыванию магнитных частиц с белковыми мишенями посредством биотинилированных аптамеров показало, что белки активно связываются со своими аптамерами, причем наблюдается последовательное увеличение диаметра МНЧ (68 нм для исходных МНЧ, 105 нм для МНЧ-аптамер и более 1000 нм для МНЧ-аптамер-белок), что свидетельствует об образовании специфических комплексов белка с аптамером в растворе.

Таким образом, мы нашли условия образования комплексов МНЧ-аптамеров с белком Lon-проте-

азой, что позволяет использовать эти объекты при настройке и характеристике разрабатываемой биомангнитной тест-системы на основе сверхпроводящих квантовых интерферометров [30], реализующей безразделительную схему иммуноанализа.

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

### Список литературы

1. Ferguson R.M., Khandhar A.P. et al. // IEEE Trans. Magn. 2013. **49**, N 7. P. 3441.
2. Спиридонова В.А., Новикова Т.М., Снигирев О.В. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2016. № 1. С. 113. (Spiridonova V.A., Novikova T.M., Snigirev O.V. // Moscow University Physics Bulletin. 2016. **71**, N 1. P. 135.)
3. Kawano M., Hirano T., Matsuda T. et al. // Nature. 1988. **332**, N 6159. P. 83.
4. Ataie-Kachoe P., Pourgholami M.H. et al. // J. Clin. Pathol. 2014. **67**, N 11. P. 932.
5. Ghandadi M., Sahebkar A. // Curr. Pharm. Des. 2016. **22**, N 5. P. 518.
6. Luciakova K., Sokolikova B. et al. // FEBS Lett. 1999. **444**. P. 186.
7. Bernstein S.H., Venkatesh S. et al. // Blood. 2012. **119**, N 14. P. 3321.
8. Wang H.M., Cheng K.C. et al. // Cancer Sci. 2012. **101**, N 12. P. 2612.
9. Liu Y., Lan L., Huang K. et al. // Oncotarget. 2014. **5**, N 22. P. 11209.
10. Cheng C.W., Kuo C.Y., Fan C.C., Fang W.C. et al. // Cell Death Dis. 2013. **4**. P. e681.
11. Khalil A.A., Kabary N.F. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. **1816**, N 2. P. 89.
12. Bulteau A.L., Bayot A. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. **1807**. P. 595.
13. Tuerk C., Gold L. // Science. 1990. **249**. P. 505.
14. Ellington A.D., Szostak J.W. // Nature. 1990. **346**. P. 818.
15. Stoltenburg R., Reinemann C., Strehlitz B. // Biomol. Eng. 2007. **24**, N 4. P. 381.
16. Missailidis S., Hardy A. // Expert Opin. Ther. Pat. 2009. **19**, N 8. P. 1073.
17. Спиридонова В.А. // Биомедицинская химия. 2010. **56**, N 6. С. 639.
18. Santosh B., Yadava P.K. // Biomed. Res. Int. 2014. **540**. P. 451.
19. Xiang D., Shigdar S., Qiao G. et al. // Theranostics. 2015. **5**, N 1. P. 23.
20. Wu X., Chen J., Wu M., Zhao J.X. // Theranostics. 2015. **5**, N 4. P. 322.
21. Hernandez L.I., Machado I. et al. // Curr. Top Med. Chem. 2015. **15**, N 12. P. 1066.
22. Ротанова Т.В., Дергоусова Н.И. и др. // Биоорганическая химия. 2013. **39**. С. 309.
23. Спиридонова В.А., Куджаев А.М. и др. // Биоорганическая химия. 2016. **41**, N 6. С. 696.
24. De Cian A., Lacroix L. et al. // Biochimie. 2008. **90**. P. 131.
25. Siddiqui-Jain A., Grand C.L. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. **99**. P. 11593.

26. *Cogoi, S., Xodo L.E.* // *Nucleic Acids Res.* 2006. **34**. P. 2536.
27. *Indig FE., Rybanska I., Karmaker P.* et al. // *PLoS One.* 2012. **7**, N 6. P. e35229.
28. *Kumar N., Maiti S.* // *BBRC.* 2004. **319**. P. 759.
29. *Kankia B.I., Marky L.A.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. **123**. P. 10799.
30. *Soloviev I.I., Klenov N.V., Schegolev A.E.* et al. // *Supercond. Science and Techn.* 2016. **29**, N 9. P. 094005.

**Complexes of the ATP-dependent Lonprotease and DNA aptamers with G-quadruplexes as a model for developing a nanosensor biomagnetic immunoassay system**

**V. A. Spiridonova<sup>1</sup>, V. A. Sizov<sup>2</sup>, E. O. Kuzmenko<sup>2</sup>, A. V. Melnichuk<sup>1</sup>, E. A. Oleinichenko<sup>1</sup>, A. M. Kudzhaev<sup>3</sup>, T. V. Rotanova<sup>3</sup>, O. V. Snigirev<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University. Moscow 119991, Russia.*

<sup>2</sup>*Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University. Moscow 119991, Russia.*

<sup>3</sup>*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences. Moscow 117997, Russia.*

<sup>4</sup>*Department of Semiconductors, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. Moscow 119991, Russia.*

*E-mail: <sup>a</sup>spiridon@belozersky.msu.ru.*

The binding to Lon protease through biotinylated aptamers whose structures contain G-quadruplex fragments with magnetic nanoparticles (MNPs) functionalized by streptavidin was investigated. The conditions of binding of target aptamers to MNPs are met. The resulting complexes are proposed for detection of Lon protease in different biological sources and for constructing a novel biomagnetic nanosensor immunoassay system.

*Keywords:* magnetic nanoparticles, streptavidin-biotin, DNA aptamers, Lon protease.

PACS: 87.15.-v, 87.83.+a.

*Received 15 June 2016.*

English version: *Moscow University Physics Bulletin.* 2017. **72**, No. 4. Pp. 376–382.

**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. Сизов Василий Алексеевич — студент; тел.: (495) 939-31-96, e-mail: mr.vasily-sizov@mail.ru.
3. Кузьменко Евгений Олегович — студент; тел.: (495) 939-31-96, e-mail: kuzmenko\_zhenia@mail.ru.
4. Мельничук Анастасия Владимировна — инженер; тел.: (495) 939-31-96, e-mail: melnichukanast@gmail.com.
5. Олейниченко Елена Андреевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотрудник; тел.: (495)-939-55-07.
6. Куджаев Арсен Мизамудинович — аспирант; тел.: (495) 335-42-22, e-mail: kudzhaev\_arsen@mail.ru.
7. Ротанова Татьяна Васильевна — доктор хим. наук, профессор; тел.: (495) 335-42-22, e-mail: tatyana.rotanova@ibch.ru.
8. Снигирев Олег Васильевич — доктор физ.-мат. наук, профессор, зав кафедрой; тел.: (495) 939-59-34, e-mail: osnig@inbox.ru.