МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

6____

БОДУЛЕВ ОЛЕГ ЛЕОНИДОВИЧ

Методы количественного определения микроРНК с применением хемилюминесцентной детекции

1.5.6. - Биотехнология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор И.Ю. Сахаров

Москва – 2023

оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
Глава 1. Химическая структура и биохимические функции микроРНК	11
Глава 2. Методы детекции микроРНК	13
2.1. Детектирующие системы	
2.2. Аналитические метки в хемилюминесцентном анализе	
2.3. Носители в гетерогенных хемилюминесцентных методах	20
Глава 3. Методы амплификации нуклеиновых кислот в анализе микроРНК	22
3.1. ПЦР	
3.2. МИА, приводящие к повышению аналитического сигнала за счет увели	чения
концентрации аналита	25
3.3. МИА, приводящие к повышению аналитического сигнала без изменени	R
концентрации аналита с использованием ферментов	30
3.4. Бесферментные МИА	
3.5. Каскадные МИА	37
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	39
Реагенты и оборудование	
Методы	40
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	46
Глава 4. Аналитические методы с применением аллостерической активации	
ппДНКзима	46
4.1. Метод определения микроРНК-141, основанный на аллостерической ак	тивации
ппДНКзима	
4.2. Метод определения активности экзонуклеазы III, основанный на	
аллостерической активации ппДНКзима	51
Глава 5. Методы определения микроРНК с применением амплификационной	реакции
каталитической сборки шпилек	58
5.1. Метод определения микроРНК-141, основанный на реакции нКСШ	

5.1.1. Сравнение микропланшета и магнитных частиц в методе определения
микроРНК-141, основанном на гомогенной реакции нКСШ 61
5.1.2. Метод определения микроРНК-141, основанный на гетерогенной реакции
нКСШ
5.2. Методы определения микроРНК-155 и микроРНК-39, основанные на реакции
нКСШ74
5.3. Метод определения микроРНК-155, основанный на реакции КСШВО 79
5.4. Количественное определение микроРНК-141 и микроРНК-155 в образцах
лизатов клеток человека методами, основанными на реакции нКСШ 86
Заключение
ВЫВОДЫ
Список литературы

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

миРНК- микроРНК

ппДНКзим – пероксидаза-подобный ДНКзима

МЧ – магнитные частицы

ИФА – иммуноферментный анализ

ПХ – пероксидаза хрена

ППР – поверхностный плазмонный резонанс

НБ – нозерн-блоттинг

МИА – методы изотермической амплификации

ПЦР – полимеразная цепная реакция

кПЦР – количественная ПЦР

ОТ-кПЦР – кПЦР с обратной транскрипцией

СНП – секвенирование нового поколения

АКК – амплификация катящегося кольца

гАКК – гиперразветвленная АКК

ЭРА – экспоненциальная реакция амплификации

ЦФА – циклический ферментативный метод амплификации

АМПЗ – амплификационный метод с полимеризацией и замещением

РЦГ – реакция цепной гибридизации

Био – биотин

Флу-флуоресцеин

анФлуАт – антифлуоресцеиновые антитела

КСШ – каталитическая сборка шпилек

нКСШ – каталитическая сборка шпилек с некомплементарным противостоянием нуклеотидов

КСШВО – каталитическая сборка шпилек с высвобождением олигонуклеотида

введение

Актуальность и степень разработанности темы исследования

МикроРНК (миРНК) представляют собой класс коротких (18-25 нуклеотидов) молекул РНК, обнаруженных в широком спектре растений, вирусов и млекопитающих [1]. Исследования, проведенные на лабораторных организмах, показали, что миРНК участвуют в регуляции таких важных биологических процессов, как развитие, дифференциация, метаболизм, апоптоз и т.д. [2-3]. Более того, проведенные экспериментальные работы позволили установить взаимосвязь между изменениями в уровне эксперссии миРНК и развитием онкологических [4-5], аутоиммунных [6], неврологических [7] и сердечно-сосудистых [8] заболеваний человека. Один из ключевых подходов, использующийся при исследовании функциональной роли миРНК, состоит в количественной оценке уровней экспрессии зрелых миРНК в конкретных типах тканей или биологических жидкостей на различных стадиях развития заболеваний.

Из вышесказанного очевидно, что требуется создание методов количественного анализа миРНК, предназначенных для определения миРНК в биообразцах, без которых исследования миРНК просто невозможны. Так как концентрация миРНК в норме в биологических объектах очень низкая (в диапазоне фМ-пМ), а при патологических состояниях уровень экспрессии миРНК может не только повышаться, но и снижаться, то для практического применения методы определения миРНК должны быть высокочувствительными, то есть характеризоваться низким пределом обнаружения. Кроме того, такие методы должны характеризоваться высоким значением коэффициента чувствительности (угол наклона зависимости аналитического сигнала от концентрации аналита) так как, во-первых, это повышает точность анализа, и, во-вторых, отличие в концентрациях миРНК при норме и патологии может быть невелико. Не менее важным требованием, предъявляемым к методам обнаружения миРНК, является их высокая специфичность. Это связано с присутствием в живых организмах большого числа миРНК, чьи последовательности имеют достаточно высокую гомологию.

При разработке высокочувствительных методов определения миРНК на распознающем этапе анализа часто используются методы амплификации нуклеиновых кислот. Наиболее широко для этих целей применяется ПЦР. Несмотря на низкий предел обнаружения миРНК, развиваемый методами анализа с применением ПЦР, они характеризуются низкими значениями чувствительности. коэффициента Это лелает анализ менее точным затрудняет И количественную оценку миРНК. Как альтернатива, в анализе миРНК используются изотермические амплификации сочетании высокочувствительными методы В с детектирующими системами. Зачастую такие методы позволяют развивать большую точность

5

определения миРНК. Кроме того, они могут быть более экономичны, так как не требуют проведения термоциклизации и осуществления реакции обратной транскрипции. Часть методов изотермической амплификации проводится без применения каких-либо ферментов, что дополнительно удешевляет анализ. Более того, это уменьшает вероятность появления ложных результатов из-за ингибирования ферментов компонентами анализируемых проб и влияния неспецифических продуктов, образуемых в результате действия полимераз. Наиболее эффективным бесферментным методом изотермической амплификации, согласно литературным данным, является реакция каталитической сборки шпилек (КСШ). Благодаря применению на распознающем этапе реакции КСШ захватывающих зондов шпилечной структуры с ее использованием может быть получена высокая специфичность определения миРНК. Для данного метода разработана модификация, получившая название «КСШ с некомплементарным противостоянием нуклеотидов» (нКСШ). Показано, что применение нКСШ позволяет снизить фоновые сигналы в анализах на основе реакции КСШ и тем самым улучшить аналитические параметры таких методов.

Высокочувствительные детектирующие системы, также как и методы амплификации нуклеиновых кислот, позволяют конструировать анализ с улучшенной чувствительностью. Среди таких детектирующих систем особое место занимают системы, основанные на регистрации хемилюминесценции. Применение усиленной хемилюминесценции, катализируемой пероксидазой нативной хрена, хорошо зарекомендовало себя В иммуноферментном анализе. Кроме того, в литературе описан миметик пероксидазы, названный пероксидаза-подобный ДНКзим (ппДНКзим), измерение активности которого также может осуществляться при помощи хемилюминесцентной реакции.

Таким образом, разработка новых методов количественного определения миРНК с применением хемилюминесцентной детекции представляется актуальной и практически значимой задачей.

Целью работы являлась разработка новых высокочувствительных и высокоспецифичных методов количественного определения миРНК с хемилюминесцентной детекцией, как безамплификационных, так и с применением амплификационной реакции КСШ.

Для достижения цели работы поставлены следующие задачи:

- Оценка возможности и перспектив применения ппДНКзима для определения миРНК. Оптимизация условий проведения, определение и оценка аналитических характеристик гомогенного хемилюминесцентного метода определения миРНК-141, основанного на применении ппДНКзима.

6

- Выработка стратегии гетерогенного определения миРНК с использованием тройной амплификации, основанной на применении бесферментной амплификационной реакции КСШ, конъюгата стрептавидин-полипероксидаза и усиленной хемилюминесценции. Разработка и оптимизация условий проведения, определение и оценка аналитических характеристик методов анализа миРНК-141, миРНК-155 и миРНК-39 (используется в качестве внешнего стандарта при анализе в биоматериалах человека), сконструированных на основе предложенной стратегии.

- Разработка модифицированной реакции КСШ, в процессе протекания которой происходит накопление ДНК олигонуклеотида, «КСШ с высвобождением олигонуклеотида» (КСШВО). Сравнение эффективности КСШВО и нКСШ в анализе миРНК-155.

- Тестирование разработанных методов определения миРНК-141 и миРНК-155 для их количественного анализа в раковых клетках человека.

Научная новизна

Разработан гомогенный безамплификационный метод определения миРНК-141, основанный на аллостерической активации ппДНКзима с хемилюминесцентной детекцией. С применением универсальности данной аналитической платформы сконструирован анализ ферментативной активности экзонуклеазы III. Разработана стратегия гетерогенного определения миРНК с использованием тройной амплификации, основанной на использовании бесферментной изотермической реакции нКСШ, конъюгата стрептавидин-полипероксидаза и хемилюминесценции. На основе указанной vсиленной стратегии развиты метолы количественного определения миРНК-141, миРНК-155 и миРНК-39, впоследствии успешно примененные для анализа миРНК в лизатах культивируемых клеток человека (НерG2, Сасо2, MCF7 и HeLa). Сравнение разработанных гетерогенных методов определения миРНК с применением микропланшета и магнитных частиц выявило преимущества планшетного формата анализа. Обнаружено влияние условий отжига шпилечных зондов реакции нКСШ (концентрации NaCl/MgCl₂ и шпилечного зонда в среде его отжига) на интенсивность фоновой реакции метода определения миРНК, основанного на реакции нКСШ. Предложен и апробирован в анализе миРНК-155 новый бесферментный метод амплификации, названный «КСШ с высвобождением олигонуклеотида» (КСШВО).

Практическая и теоретическая значимость работы.

Как показали результаты количественного определения миРНК в лизатах культивированных клеток человека, разработанные гетерогенные хемилюминесцентные методы определения миРНК с использованием тройной амплификации могут успешно применяться в научно-исследовательской и медицинской практике для оценки экспрессии миРНК в клетках и тканях. Следует отметить, что за счет использования в этих методах мультилуночного микропланшета в качестве носителя разработанные методы легко роботизируются с применением биоанализаторов для иммуноферментного анализа. Данный факт позволяет использовать их для массовых исследований. Анализ принципов данных методов показывает, что сформулированные в диссертационной работе подходы имеют универсальный характер и могут быть применены не только в анализе различных миРНК, но также и других РНК- и ДНК- олигонуклеотидов. В ходе разработки данных методов показана зависимость фоновой реакции нКСШ от условий отжига шпилечных зонда метода и продемонстрировано, что оптимизация данного этапа способна улучшить аналитические параметры определения миРНК. Полученный результат указывает на значимость оптимизации условий отжига в методах с применением олигонуклеотидов шпилечных структур. Предложена оригинальная бесферментная амплификационная реакция КСШВО, являющаяся модификацией реакции КСШ, где в процессе протекания происходит не только амплификация аналитического сигнала, но и накопление одноцепочечного олигонуклеотида, который далее может быть использован для инициирования последующей амплификации. Установлено, что замена нКСШ на разработанной нами КСШВО в анализе миРНК не влияет на параметры данного аналитического метода. Полученный результат открывает перспективы к разработке каскадных методов амплификации. Разработанный гомогенный хемилюминесцентный метод определения экзонуклеазы III на основе аллостерической активации ппДНКзима может применяться в научно-исследовательских и промышленных лабораториях для оценки активности препаратов данного фермента.

Методология и методы исследования.

Экспериментальные исследования проводились с использованием современных методов молекулярной биологии, физической химии и аналитической биотехнологии. Основные методы исследования, задействованные в работе: иммобилизация олигонуклеотидов на полистироле с применением антител и антиген-антительного взаимодействия; проведение отжига нуклеиновых кислот и реакций их гибридизации; анализ олигонуклеотидов методом электрофореза в полиакриламидном геле; моделирование схем биоанализа миРНК и структур используемых в них зондов; спектроскопия кругового дихроизма; детекция пероксидазной активности хемилюминесцентным методом с/без усилителей; синтез коньюгатов антител с магнитными частицами карбодиимидным методом; выделение миРНК из культивируемых клеток.

8

Положения диссертационной работы, выносимые на защиту:

1. Применение аллостерической активации ппДНКзима позволяет проводить простое, быстрое и точное количественное определение миРНК и каталитически активной экзонуклеазы III.

2. Оригинальная стратегия гетерогенного определения миРНК с помощью тройной амплификации, основанной на применении бесферментной амплификационной реакции нКСШ, коньюгата стрептавидин-полипероксидаза и усиленной хемилюминесценции, является высокочувствительной и высокоспецифичной и универсальна для развития гетерогенных методов определения миРНК.

3. Оптимизация условий отжига шпилечных зондов (концентрации NaCl/MgCl₂ и зондов в среде их отжига), используемых для определения миРНК гетерогенным методом с применением реакции нКСШ, позволяет понизить интенсивность фоновой реакции зондов и, тем самым, улучшить аналитические параметры метода.

4. Разработанная нами оригинальная бесферментная амплификационная реакция КСШВО позволяет проводить гетерогенное определение миРНК с эффективностью, равной нКСШ.

5. Разработанные нами гетерогенные хемилюминесцентные методы определения миРНК с применением реакции нКСШ позволяют проводить количественный анализ миРНК в лизатах культивируемых клеток человека (HepG2, Caco2, MCF7 и HeLa).

Личный вклад автора.

Представленные в работе данные получены лично при автором или его непосредственном участии на всех этапах исследований под руководством профессора, д.х.н. И.Ю. Сахарова. Автор самостоятельно изучил современные литературные данные по теме исследования и подготовил обзор литературы. Автором самостоятельно или при непосредственном его участии были выполнены все эксперименты, произведен сбор, обработка и анализ полученных данных. Автором проведена значительная работа над текстом статей и их представлением. Автор участвовал в переписке с редакторами и рецензентами. В работах, опубликованных в соавторстве, значительный вклад (более 30%) принадлежит автору. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя была определяющей.

Работа по анализу миРНК с применением магнитных частиц выполнялась совместно с к.х.н. И.В. Сафенковой (Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Москва, Россия). Работа по анализу миРНК в лизатах клеток выполнялась совместно с к.б.н. О.Ю. Плетюшкиной и к.х.н. И.И. Галкиным (НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия).

9

Степень достоверности и апробация работы.

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием высокоточного оборудования, а также статистической обработкой полученных результатов. Результаты работы представлены на Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018» (Москва, Россия 2018), «Ломоносов-2019» (Москва, Россия 2019) и «Ломоносов-2020» (Москва, Россия 2020); Международных форумах «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни» (Москва, Россия 2018) и «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни» (Москва, Россия 2019); Международной конференции «1st Innovations in food analytics» (Эрдинг, Германия, 2018); Международной конференции «Euroanalysis» (Стамбул, Турция, 2019); Международной конференции «UK-Russia Young Medics Conference» (Москва, Россия 2019); Всероссийской конференции «IV Съезд аналитиков России» (Москва, Россия 2022); Международной конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (Екатеринбург, Россия 2022).

Публикации.

По материалам диссертационной работы опубликовано 8 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Scopus/Web of Science, и 13 тезисов докладов на международных и российских научных конференциях.

Связь работы с государственными программами.

Работа выполнена при поддержке МГУ имени М.В. Ломоносова (тема госрегистрации 121041500039-8). Часть результатов получена в рамках грантов РНФ (17-14-0104) и РФФИ (21-54-53007\21).

Объем и структура работы.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы (3 главы), материалов и методов, результатов и обсуждения (2 главы), заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 107 страницах машинописного текста, содержит 5 таблиц и 44 рисунка. Список литературы включает 209 ссылок.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Химическая структура и биохимические функции микроРНК

Гены миРНК обычно располагаются в кластерах, которые транскрибируются как полицистроны. Кроме того, они могут быть локализованы между другими генами (межгенные) или в интронах генов, кодирующих мРНК (миртрон). Первичные транскрипты миРНК, известные как при-миРНК (в основном от 100 до 1000 нуклеотидов длиной), транскрибируются РНК-полимеразами II и III в ядре клетки. Впоследствии при-миРНК расщепляются РНКазой III Drosha с образованием 70–100 нуклеотидных предшественников миРНК шпилечной структуры, называемых пре-миРНК [9]. В настоящее время описано более 38 000 пре-миРНК из 271 организма [10]. Экспортин-5 обеспечивает транспорт пре-миРНК из ядра в цитоплазму. В цитоплазме под действием фермента Dicer из пре-миРНК формируются короткие зрелые миРНК. Длина зрелых миРНК представляет примерно 18–25 нуклеотидов. В настоящее время ~ 49 000 последовательностей миРНК представлены в реестре миРНК (miRBase), в том числе 2 600 миРНК человека [11]. Исследования секвенирования показали, что в биологических образцах зрелые миРНК представляют собой не молекулу со строго определенной последовательностью нуклеотидов, а набор гомологичных молекул различной длины. Показано, что такая модификация может оказывать влияние на стабильность и активность миРНК [12].

Уровень экспрессии зрелых миРНК представляет наибольший интерес лля исследователей, изучающих их биологические функции. Первая публикация с описанием миРНК появилась в 1993 г. [13], однако по прошествии 30 лет интерес к изучению роли миРНК в регуляции генов и функционировании клеточных процессов лишь нарастает. Зрелые миРНК могут регулировать экспрессию генов после их включения в активный РНК-индуцированный комплекс сайленсинга, где они взаимодействуют со специфическими сайтами матричной РНК, вызывая репрессию трансляции, а иногда и деградацию целевой матричной РНК [14]. Как было оценено, среднее количество копий отдельных видов миРНК на клетку ~ 500 и их экспрессия может превышать среднюю экспрессию мРНК. Однако содержание различных миРНК в клетках широко варьируется, и такое различие в концентрации может составлять более четырех порядков. Так, миРНК-1 присутствует в скелетных мышцах в количестве, превышающем 80 000 копий на клетку, тогда как в одной клетке мозга может находиться лишь одна копия миРНК-381 [15].

Проведенные экспериментальные работы позволили установить взаимосвязь между изменениями в уровнях экспрессии миРНК и развитием различных заболеваний человека, в том числе онкологических [4, 6-8]. Сравнительный анализ образцов злокачественных и нормальных

тканей позволил выявить отклонения, при которых уровень экспрессии некоторых миРНК был значительно повышен, в то время как для других миРНК зарегистрировано подавление их экспрессии. Степень изменения концентрации тех или иных миРНК относительно нормы зависела от типа и стадии заболевания, а также от этапа его лечения. Показано, что уровни экспрессии миРНК влияют на скорость роста опухоли и помогают выбрать эффективную стратегию терапевтического лечения пациентов [5].

Для исследования функциональной роли миРНК проводят количественную оценку содержания зрелых миРНК в конкретных типах биоматериала (биологические жидкости, клетки, ткани) на различных стадиях развития заболевания. Определение концентрации миРНК в биообразцах возможно по той причине, что эти молекулы достаточно стабильны в биосредах [16]. Их высокая стабильность связана с тем, что миРНК находятся в образцах не в свободном состоянии, а формируют комплексы с различными биомолекулами, в первую очередь, с белками. Известно, что часть молекул миРНК обнаруживается в везикулах разного типа, что также повышает их стабильность. С учетом данного факта в аналитических исследованиях перед проведением оценки общей концентрации миРНК проводится предобработка образцов с целью выделения миРНК в свободном состоянии.

Задача определения миРНК осложняется тем, что концентрации данных аналитов в биообразцах могут быть крайне малы (в биологических жидкостях это фМ-пМ диапазон), как и отличия в их концентрациях при норме и патологии. Например показано, что при раке простаты экспрессия миРНК-141 возрастает в 46 раз, тогда как в случае миРНК-143 такое изменение всего в полтора раза [16]. С другой стороны, эффективному анализу миРНК может также препятствовать факт наличия высокогомологичных миРНК, принадлежащих к одному семейству и отличающихся друг от друга лишь несколькими нуклеотидными заменами. Так, миРНК-141 и миРНК-200а принадлежат к одному семейству миРНК-200 и отличаются всего на два нуклеотида.

Глава 2. Методы детекции микроРНК

Методы анализа миРНК, как и прочих олигонуклеотидов, основываются на реакции гибридизации нуклеиновых кислот. Анализируемая молекула комплементарно взаимодействует с захватывающим зондом. На этом этапе для повышения чувствительности определения миРНК часто задействуются методы амплификации нуклеиновых кислот. Одни методы амплификации направлены на увеличение числа копий аналита для образования комплексов с захватывающим зондом, тогда как другие повышают число комплексов захватывающего зонда со вспомогательными мечеными зондами без изменения концентрации аналита [17].

Далее детектируются образованные комплексы, количество которых коррелирует с концентрацией анализируемой миРНК, что и позволяет провести ее количественное определение.

Методы детекции разделяют на гомогенные и гетерогенные. В гетерогенных методах формируемые в присутствии аналита комплексы иммобилизуются на носителе. Посредством отмывки носителя осуществляется отделение комплексов от матрикса анализируемых растворов и от несвязавшихся меченых зондов, что снижает фоновый сигнал. По этой причине становится возможным использование повышенных концентраций таких зондов, что сдвигает равновесие в сторону образования детектируемых комплексов и повышает чувствительность определения. В силу вышеобозначенных факторов гетерогенные методы обычно чувствительнее гомогенных. Вместе с тем важно заметить, что гомогенные методы зачастую экономичней, экспрессней и проще в исполнении.

2.1 Детектирующие системы Электрохимическая детекция

В литературе представлен широкий спектр работ по анализу миРНК с электрохимической детекцией. В этом случае захватывающий зонд иммобилизуется на поверхности электрода [18]. Наиболее распространенный подход к детекции образуемых в присутствии аналита комплексов заключается в окислении/восстановлении на электроде молекул, способных электростатически связываться с ДНК и обладающих различной аффинностью к одноцепочечным и двухцепочечным нуклеиновым кислотам (метиленовый голубой, этидий бромид) [19]. Усиление сигнала достигается благодаря применению ферментов, способных проводить многократную конверсию субстрата в форму, повышающую аналитический сигнал. Наиболее часто для таких целей используется пероксидаза, выделенная из корней хрена (ПХ) [20].

Пределы обнаружения большинства безамплификационных электрохимических биосенсоров находится в пико-наномолярном интервалах и выше [21-23]. Вместе с тем применение методов амплификации нуклеиновых кислот в сочетании с электрохимической детекцией позволяет достигать экстремальных значений детектируемости, вплоть до aM концентраций [24-25]. Данным методам присущи широкие рабочие диапазоны, однако при этом зависимости аналитического сигнала от концентрации аналита характеризуются слабым наклоном. В большинстве работ измеряемый сигнал возрастает максимум в два раза при увеличении концентрации аналита на порядок, что свидетельствует о низком коэффициенте чувствительности. Существенным затруднением применения на практике электрохимических методов является то, что они не предназначены для массовых (скрининговых) анализов [26]. Как альтернатива, бурно развиваются оптические детектирующие системы.

Детекция с применением поверхностного плазмонного резонанса

Высокочувствительные оптические системы могут быть сконструированы с помощью (ППР) [27]. метода поверхностного плазмонного резонанса Детекция комплексов захватывающих зондов с миРНК без привлечения каких-либо меток является низкочувствительной. Это связано со слабой интенсивностью специфичных сигналов в сочетании с высоким фоном, возникающим в связи с неспецифичной сорбцией на подложку. Для усиления специфичных сигналов детектируемые комплексы метят золотыми наночастицами, что резко увеличивает изменение показателя преломления среды и сдвиг измеряемого угла. Для дополнительного усиления сигнала применяют различные подходы к увеличению количества наночастиц на единицу комплекса [28].

Применение метода ППР позволяет создавать В лаборатории отдельные высокочувствительные методы. Пределы обнаружения безамплификационных методов анализа миРНК на основе ППР находятся в пикомолярном диапазоне [29]. В единичных работах достигаются даже пределы обнаружения в фемто- [30] и субфемтомолярных диапазонах [31]. Данный разброс детектируемости характерен также для методов с применением амплификации нуклеиновых кислот, основанных на детекции ППР [32-34]. Вместе с тем следует отметить, что число таких методов весьма ограничено. В целом методы, основанные на ППР, относительно электрохимических методов характеризуются узкими рабочими диапазонами (от двух до пяти порядков концентрации аналита), но более высокими коэффициентами чувствительности. Что же касается практического применения, то неспособность на сегодняшнее время стабильно производить качественные подложки для этой детектирующей системы пока что не позволяет коммерческим фирмам использовать метод ППР. Более простыми и распространенными

системами оптической детекции являются колориметрия, флуоресценция и хемилюминесценция.

Колориметрическая детекция

Большинство работ по определению миРНК с применением колориметрической детекции представлено гомогенными методами. В качестве аналитического сигнала в них часто задействуют изменение поглощения при аналит-зависимой агрегации наночастиц золота с иммобилизованными олигонуклеотидными зондами [35]. Как альтернатива применяют миметик пероксидазы хрена – пероксидаза-подобный ДНКзим (ппДНКзим) (см. Раздел 2.2) [36-38]. В качестве его субстратов часто используют тетраметилбензидин (ТМБ) и диаммониевую соль 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты) (АБТС), интенсивно меняющие окраску раствора при окислении. Преимуществом колориметрической детекции является возможность качественной визуальной оценки результатов анализа без дополнительной аппаратуры. Сочетание колориметрической детекции с методами амплификации нуклеиновых кислот позволяет развивать отдельные чувствительные методы определения миРНК с пределами обнаружения в пМ-фМ диапазоне [39-40]. Вместе с тем такие методы анализа уступают по чувствительности методам с детекцией люминесценции.

Флуоресцентная детекция

Наиболее распространенными в анализе миРНК на сегодняшний день являются флуоресцентные системы. Некоторые органические красители способны самопроизвольно интеркалировать в дуплекс (например, этидий бромид, SYBR Green/Gold). Данное явление используется при визуализации результатов электрофоретического разделения последовательностей нуклеиновых кислот [41]. В альтернативном подходе флуоресцентную метку ковалентно связывают с молекулой нуклеиновой кислоты. В качестве флуоресцентной метки могут быть использованы соединения различной химической природы. Широко используются флуоресцентные органические красители [42]. Как альтернатива органическим молекулам, в качестве флуоресцентных меток при прямой детекции задействуют квантовые точки, наночастицы и нанокластеры [43].

Наиболее ранним и в связи с этим хорошо стандартизированным методом безамплификационного определения миРНК является нозерн-блоттинг (далее ΗБ). Анализируемые образцы электрофоретически разделяют с дальнейшим переносом геля на нитроцеллюлозную мембрану. Детектируются миРНК за счет взаимолействия с комплементарными зондами, мечеными радио- или флуоресцентными метками [44]. Данный метод применялся при идентификации первых миРНК и до сих пор является широко

15

используемым методом анализа профилей экспрессии миРНК. Следует отметить, что чувствительность НБ низка по сравнению с другими подходами (пМ-нМ диапазон), а исполнение трудоемкое и времязатратное [45].

Другим популярным безамплификационным методом анализа миРНК с применением флуоресцентной детекции является технология микрочипов. В процессе определения анализируемой миРНК регистрируется связывание co специфичным ей зондом, Особенностью иммобилизованном на стеклянном чипе. метода является зональная фотолитографическая печать специфичных под определение различных миРНК зондов в целях анализа множества миРНК на одном чипе. В связи с этим метод широко применяется для анализа миРНК в биологических жидкостях (кровь, плазма, сыворотка, моча, слезы), гомогенатов тканей и экзосом [46-47]. Следует отметить, что метод микрочипов является полуколичественным и может быть использован лишь для сравнительной оценки уровней экспрессии микроРНК. Микрочипы имеют более узкий рабочий диапазон по сравнению с иными методами; таким образом, существенные изменения уровней экспрессии могут оставаться незарегистрированными этим методом [48]. Детектируемость, им достигаемая, - в наномолярном и пикомолярном диапазонах, однако в отдельных работах с модификациями метода описаны более низкие пределы обнаружения (30 фМ) [49]. Вместе с тем следует отметить, что несмотря на то, что модификации улучшают чувствительность анализа, они так же увеличивает цену и так дорогостоящего анализа, а узкий рабочий диапазон метода остается неразрешенной проблемой.

Множество методов анализа с применением флуоресцентной детекции в гомогенной фазе используют явление Фёрстеровского резонансного переноса энергии (ФРПЭ). Данное явление основано на переносе энергии от одного флюорофора (донор переноса) к другому (акцептор), сопровождаемое тушением флуоресценции донора и возникновением более длинноволновой флуоресценции акцептора. Условием переноса является близкое расположение (для большинства ФРПЭ-пар 16-60 Å [50]). Если ФРПЭ-пара находится на большом расстоянии друг от друга, при возбуждении донора будет наблюдаться только его собственная флуоресценция. Частным случаем ФРПЭ переноса, когда перенос энергии на акцептор не сопровождается эмиссией последнего, является тушение флуоресценции [51]. Данный принцип получил широкое распространение будучи включенным в основу специфичной детекции в методе количественной ПЦР, позволяющей детектировать экстремально низкие концентрации аналита. О применении данного метода в анализе миРНК речь пойдет ниже (см. Раздел 3.1) [52]. Наиболее распространенными гасителями флуоресценции являются тетраметилродамин (ТАМRА) и 4-[4-(Диметиламино)фенилазо]бензойная кислота (DABCYL), образующие ФРПЭпары с флуоресцеином. В заключение следует отметить, что флуоресцентные методы детекции часто характеризуются высоким значением фонового сигнала, что снижает чувствительность анализа с применением такого рода детекции [53-54].

Хемилюминесцентная детекция

В сравнении с флуоресценцией хемилюминесценция демонстрирует чрезвычайно низкие значения фоновой реакции. Современные хемилюминометры не сложны в производстве, не дороги и широко доступны потребителю. В то же время они способны регистрировать практически каждый фотон, т.е. являются чрезвычайно чувствительными измерительными приборами.

В ИФА широко используется реакция окисления люминола пероксидом водорода, катализируемая пероксидазами [55-56]. При реакции окисления люминола происходит образование 3-аминофталата, который при переходе из возбужденного в основное состояние испускает квант света [57]. Спектр испускания довольно широк, оптимум испускания находится при 425 нм [58].

Следует отметить, что ПХ является малоактивным катализатором окисления люминола пероксидом водорода. Для получения высоких значений интенсивности хемилюминесцентного сигнала применяются усилители хемилюминесценции. На сегодняшний день наиболее эффективными усилителями пероксидаза-зависимой хемилюминесценции являются 3-(10'-фенотиазинил)пропан-1-сульфонат (ФТПС) и 3-(10'-фенотиазинил)пропионовая кислота (ФПК). Известно, что усиливающая способность ФТПС и ФПК может быть повышена при введении в реакционную систему 4-диалкиламинопиридинов [59-60]. В отсутствие ФТПС/ФПК 4-диалкиламинопиридины не повышают хемилюминесцентный сигнал, в связи с чем такие соединения получили название вторичных усилителей. Следует отметить, что только ФТПС и ФПК характеризуются наличием вторичных усилителей, для других первичных усилителей вторичные усилители в настоящий момент не описаны.

Наибольшим усиливающим действием среди 4-диалкиламинопиридинов обладает 4морфолинопиридин (МП) [61]. В нашей лаборатории ранее было показано, что использование 3-(фенотиазин-1-ил)пропан-1-сульфоната натрия и 3-(фенотиазин-10-ил)пропионата натрия в комбинации с 4-морфолинопиридином позволяет определять пероксидазу в концентрации вплоть 90 фM [60]. Такая высокая чувствительность реакции ЛО vсиленной хемилюминесценции привела к тому, что многочисленные исследователи и коммерческие фирмы широко применяют хемилюминесцентную детектирующую систему.

Пределы обнаружения миРНК в нескольких описанных хемилюминесцентных методах анализа с применением нативной пероксидазы и амплификации нуклеиновых кислот находятся в фМ диапазоне. Вместе с тем отмечаются высокие коэффициенты чувствительности таких методов (изменение сигнала в 10 раз и выше при изменении концентрации аналита на порядок в области низких концентраций) [62 - 64].

С применением ппДНКзима в сочетании с амплификацией нуклеиновых кислот также описаны хемилюминесцентные методы с детектируемостью в фМ диапазоне [65]. Вместе с тем коэффициент чувствительности таких методов значительно ниже, чем с применением нативной пероксидазы.

Электрохемилюминесцентная детекция

В последние годы появляется все больше публикаций по анализу миРНК с использованием электрохемилюминесцентной детектирующей системы [66]. В процессе электрохемилюминесценции окисленная/восстановленная на электроде молекула оказывается в возбужденном состоянии и релаксирует с высвечиванием квантов хемилюминесценции.

Электрохемилюминесцентная система сочетает в себе контролируемость и селективность (благодаря подбору потенциала) электрохимической детекции и нулевой фон хемилюминесценции. С применением данной детектирующей системы в сочетании с методами амплификации нуклеиновых кислот разрабатываются методы анализа миРНК с экстремально высокой детектируемостью, сопоставимой с электрохимическими методами. Такие методы также характеризуются высокими коэффициентами чувствительности (изменение сигнала в три раза и выше при изменении концентрации аналита на порядок). При этом следует отметить конструктивную сложность электрохемилюминесцентных ячеек, вмещающих два и более электрода. Кроме того, требуется постоянная замена электродов, что делает метод не экономным.

2.2. Аналитические метки в хемилюминесцентных методах

В хемилюминесцентных системах определения нуклеиновых кислот наиболее часто применяются ПХ и ее миметики.

Введение ПХ в детекционную систему может осуществляться как прямым, так и непрямым методами. Прямой метод подразумевает ковалентное связывание молекулы фермента непосредственно с олигонуклеотидным зондом [67-68]. В непрямом, чаще используемом методе введения ферментной метки используются конъюгаты фермента с белками, способными специфично взаимодействовать с метками, введенными в ДНК. Часто

применяется пара биотинилированный детектирующий зонд с конъюгатом стрептавидина с пероксидазой хрена (ПХ) [69]. В данном случае к цепи ДНК-зонда ковалентно присоединяют биотин, а фермент ковалентно связывают со стрептавидином. В настоящее время конъюгаты стрептавидина с ПХ являются коммерчески доступным продуктом. На рынке также представлены ковалентные конъюгаты стрептавидина с полипероксидазой хрена, в которых на одну молекулу стрептавидина приходится восемьдесят молекул ПХ. В нашей лаборатории ранее успешно развита стратегия двойной амплификации сигнала, основанной на применении конъюгата стрептавидина с полипероксидазой и реакции усиленной хемилюминесценции [70].

Наиболее часто используемым миметиком пероксидазы является ппДНКзим. Он представляет собой нековалентный комплекс гемина с его аптамером, структурирующимся в присутствии ионов К+ во внутримолекулярный G-квадруплекс. Данная структура формируется этажами из G - квартетов, в которых каждое гуаниновое основание образует водородные связи с двумя соседними гуанинами (рисунок 1).

Ранее в нашей лаборатории было показано, что наиболее активный ппДНКзим формируется с аптамером EAD2 [72]. Данный аптамер формирует внутримолекулярный G-квадруплекс параллельной ориентации, в котором все четыре цепи квадруплекса идут в одинаковом направлении [73]. Для установления типа структуры G-квадруплекса используется спектроскопия кругового дихроизма (КД) [74]. Спектр КД внутримолекулярного G-квадруплекса параллельной ориентации характеризуется отрицательным и положительным пиками при длине волн 240 и 262 нм, соответственно [75].



Рис. 1. Структура G-квартета. Ионы калия (К+) стабилизируют структуру G-квадруплекса [71].

Гемин образует комплекс с G-квадруплексом посредством *π*-*π* взаимодействия пиррольных колец гемина и одного из крайних гуаниновых квартетов аптамера. Константа

диссоциации комплексов гемина с его аптамерами варьируется в диапазоне 10-100 нМ [76]. Высокое значение константы диссоциации объясняет редкое использование ппДНКзимов при разработке гетерогенных методов анализа, в которых комплекс с аналитической меткой иммобилизуется на твердую фазу-носитель. Однако ппДНКзим часто и успешно применяется при разработке гомогенных методов анализа. Образование комплекса гемин-аптамер, совпровождаемое переходом гемина из димерной в мономерную форму, приводит к значительному повышению каталитической пероксидаза-подобной активности гемина. Это связано с тем, что такая активность димерной формы гораздо ниже, чем мономерной. То, что ппДНКзим представляет из себя комплекс гемина с олигонуклеотидом, позволяет применять инструменты химии нуклеиновых кислот для его ингибирования и аналит-зависимой активации [77].

Следует отметить, что при детекции с помощью миметиков пероксидаз не может быть использована реакция усиленной хемилюминесценции, так как на сегодняшний день для них не найдены усилители.

2.3. Носители в гетерогенных хемилюминесцентных методах

Гетерогенные хемилюминесцентные методы широко представлены в ИФА и описаны для анализа ДНК-олигонуклеотидов [55]. В таких методах определения олигонуклеотидов захватывающая ДНК часто иммобилизуется на частицах. Благодаря относительной легкости разделения наибольшее распространение получили магнитные частицы, покрытые полистироловой оболочкой [78].

Для иммобилизации захватывающей ДНК на поверхность магнитных частиц часто используются частицы, модифицированные карбоксильными Наиболее группами. распространенным методом ковалентной иммобилизации ДНК в таком случае является карбодиимидный метод. Карбоксильные группы активируются карбодиимидом, после чего вводятся во взаимодействие с аминогруппой, специальным образом введенной в ДНК [79-80]. Карбодиимидный метод также может быть задействован для проведения эффективного и функционального покрытия магнитных частиц антителами, что подтверждается широко используемыми протоколами [81]. Далее проводится иммобилизация захватывающего олигонуклеотида, меченого специфическим к данным антителам антигеном. Следует отметить, что трудности разделения, низкие выходы при синтезе, высокая цена и склонность к агрегации ограничивают коммерческое применение частиц в качестве носителей [82].

Альтернативой частицам служат микропланшеты. Будучи широко используемыми носителями в ИФА, планшеты зарекомендовали себя как стандартизированные коммерчески доступные материалы, позволяющие мультиплицировать и автоматизировать анализ. В литературе описаны подходы по их применению в анализе миРНК [62, 83].

Одним из способов иммобилизации зондов на планшет является прямая адсорбция олигонуклеотидов. Однако в данном случае наблюдается низкое отношение сигнала к фону и плохая воспроизводимость, связанная с различной степенью десорбции зонда в зависимости от условий [84]. К тому же в таком случае есть возможность десорбции захватывающего зонда с поверхности при взаимодействии с аналитом. Более распространенным подходом является ковалентная иммобилизация олигонуклеотидов в лунках планшета. Для этой цели поверхность планшетов модифицируется различными функциональными группами, например, амино, карбоксильными и малеиновыми группами [85-87]. Однако высокая цена модифицированных планшетов ограничивает их широкое применение. Альтернативный и более распространенный подход к иммобилизации заключается в адсорбции белков, которые затем способны специфично связывать олигонуклеотиды. Для данной цели могут использоваться стрептавидин или антитела [88-89]. В таком случае захватывающий олигонуклеотид модифицируется биотином или соответствующим антигеном.

Глава 3. Методы амплификации нуклеиновых кислот в анализе микроРНК

Как указано выше, концентрации миРНК в биологических образцах низкие, таким образом, невысокая чувствительность безамплификационных методов сильно сужает спектр задач определения миРНК, решаемых их применением. При достижении такими методами высокой чувствительности протоколы зачастую оказываются слишком сложны, что приводит к плохой воспроизводимости и высокой цене. В связи с этим в большинстве случаев методы анализа микроРНК дополняются амплификацией нуклеиновых кислот.

3.1. ПЦР

На настоящий момент наиболее популярным методом амплификации нуклеиновых кислот является полимеразная цепная реакция (ПЦР), которая в случае миРНК дополняется реакцией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) [17]. Для количественного определения миРНК нашёл широкое применение ПЦР в реальном времени или количественная ПЦР (кПЦР) (realtime PCR, quantitative PCR, qPCR). Малый размер молекул миРНК существенно усложняет их определение методом ОТ-кПЦР, так как требуются праймеры меньшего, чем миРНК, размера. Это существенно уменьшает температуру плавления образующихся дуплексов и оказывает серьёзное влияние на эффективность и специфичность метода. Для решения этой задачи применяется стратегия превращения миРНК в более длинную одноцепочечную ДНК, которая далее используется для проведения кПЦР. Для этого последовательность анализируемой миРНК комплементарно взаимодействует с удлинённым с 5'-конца праймером, после чего осуществляется элонгация последнего. В дальнейшем полученный продукт подвергается кПЦР (Рис. 2), при этом используемый праймер может иметь как линейную (Рис. 2 а), так и шпилечную структуру (Рис. 2 б), в которой свободный «хвост» комплементарен анализируемой миРНК. Ранее в группе Guegler проводилось сравнительное исследование кПЦР с использованием указанных типов праймеров [90]. Полученные результаты показали, что при применении праймера шпилечной структуры эффективность амплификации более чем в 100 раз выше в сравнении с линейным аналогом. Следует также отметить, что использование шпилечного праймера повысило способность метода различать зрелые миРНК от их прекурсоров. Повышение эффективности амплификации при использовании шпилечного праймера может быть связано с увеличением термостабильности его комплекса с миРНК благодаря стэкинг-взаимодействиям нуклеотидов в стебле шпильки, тогда как специфичность метода, по-видимому, увеличивается за счёт нахождения большей части некомплементарного миРНК фрагмента праймера не в свободном, а в связанном состоянии. Метод с применением

такого праймера получил название «стебель-петлевая ОТ-кПЦР» (*stem-loop RT-qPCR*) и успешно применяется для оценки уровней экспрессии опухолевых миРНК в образцах биоптатов [91], экзосом [92], сыворотки крови [93] и мочи [94].

Для повышения специфичности определения миРНК был разработан метод, названный «двухвостовая ОТ-кПЦР» (two-tailed RT-qPCR) [95]. В данном подходе используется праймер шпилечной структуры, хвосты которого комплементарны двум концевым последовательностям анализируемой миРНК (Рис. 2 в). Благодаря образованию такого комплекса становится возможным различать изомиры (термин введён для миРНК, чьи последовательности различаются между собой только на один нуклеотид в крайних положениях молекулы). Данный метод способен детектировать миРНК с концентрацией до 2 аМ и рабочим диапазоном в 7 порядков. С его применением был исследован уровень экспрессии трёх миРНК (миРНК let-7a, миРНК-21 и миРНК-193а) в ткани мозжечка мыши. Полученные результаты совпали с результатами анализа, проведённого с применением коммерческого набора ТаqMan.

Известно, что методы, использующие в своих схемах обратную транскриптазу, активность которой довольно чувствительна к компонентам реакционной среды, часто имеют пониженную точность [96]. Этот негативный факт привёл к конструированию метода анализа, получившего в литературе название «лигирующая кПЦР» (ligation qPCR), в котором отсутствует этап обратной транскрипции миРНК. В ланном метоле концевые последовательности двух зондов в присутствии анализируемой миРНК лигируются Т4 РНКлигазой 2 и полученная в результате этого ДНК амплифицируется в qPCR (Рис. 2 г). Основываясь на данной схеме анализа, был разработан флуоресцентный метод определения миРНК let-7a [97]. Предел обнаружения и линейный диапазон составили 0.2 фМ и 0.2 фМ-2 нМ соответственно. Кросс-реактивность метода в отношении миРНК let-7c и миРНК let-7a-3 составила 22 и 0.17% соответственно. Когда же в этом методе для измерения флуоресценции использовалась технология цифровой детекции сигнала, предел обнаружения миРНК let-7a и его линейный диапазон составили 20 aM и 20 aM-200 фM, т.е. все величины сместились в область более низких концентраций [98]. Более того, одновременно повысилась и точность определения аналита. Следует отметить, что ПЦР с цифровой детекцией сигнала становится все более популярной в исследованиях миРНК [99-100].

В настоящее время в анализе миРНК активно применяется секвенирование нового поколения (СНП) (*Next Generation Sequencing, NGS*). На первом этапе СНП к анализируемым молекулам миРНК присоединяют с обоих концов дополнительные олигонуклеотидные последовательности, после чего проводится ОТ-ПЦР. Продукты амплификации секвенируются,

что позволяет определить как последовательность миРНК, так и их концентрацию в образце. В отличие от других методов, СНП может использоваться для определения как известных, так и неизвестных миРНК, в связи с чем в настоящее время этот метод широко используется для создания библиотек миРНК, присутствующих в разных организмах [101]. Вместе с тем проведение метода и обработка полученных данных требует значительного времени, дорогостоящего оборудования, а также высококвалифицированных специалистов [102]. По этой причине метод не целесообразно использовать для количественного определения известных миРНК.



Рис. 2. Схемы модификаций кПЦР для определения миРНК: a) ОТ-кПЦР с использованием линейного праймера, б) Стебель-Петлевая ОТ-кПЦР, в) двухвостовая ОТ-кПЦР, г) лигирующая кПЦР.

Среди методов определения миРНК ОТ-кПЦР считается «золотым стандартом», в связи с чем он часто используется для подтверждения данных, полученных другими методами [103]. Однако он не лишен своих недостатков. В первую очередь следует отметить, что коэффициент чувствительности кПЦР, определяемый как наклон калибровочной кривой в диапазоне рабочего интервала, не высок (изменение сигнала менее чем в два раза на порядок концентрации аналита) и при проведении количественных измерений не позволяет достигать высокой точности. На регистрацию аналитического сигнала в ОТ-кПЦР может оказывать влияние неспецифичная гибридизация праймеров, образование неспецифических продуктов как полимеразы ингибирование Тад-полимеразы результат катализа И компонентами анализируемой пробы, что в конечном счёте может привести к ложноположительным и ложноотрицательным сигналам [104–106]. Помимо вышеобозначенного, за счёт необходимости циклического изменения температуры проведения данный метод анализа требует дорогостоящего оборудования. В связи с этим в последние годы активно развиваются методы детекции миРНК с применением методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот (МИА).

Все известные МИА можно разделить на:

(а) методы амплификации, приводящие к повышению аналитического сигнала за счёт увеличения концентрации аналита, и (б) методы амплификации, приводящие к повышению аналитического сигнала без изменения концентрации аналита. Методы группы (б) следует разделить на использующие ферменты и на бесферментные [17].

3.2. МИА, приводящие к повышению аналитического сигнала за счет увеличения концентрации аналита

Метод амплификации катящегося кольца (АКК) (Rolling-Circle-Amplification, RCA) является одним из наиболее часто применяемых в анализе миРНК МИА первой группы. Этот метод основывается на использовании «замочного» зонда, линейного ДНК-олигонуклеотида, концы которого смыкаются при комплементарном взаимодействии с анализируемой миРНК (Рис. 3 а). Формирование такого комплекса позволяет ферментативно лигировать концы зонда. Впоследствии ДНК-полимераза, обладающая способностью к замещению цепи, элонгирует миРНК, состоящую в дуплексе с полученным кольцевым зондом. Обычно в АКК используются phi-29 или Bst-полимеразы. В результате проведения амплификации осуществляется синтез одноцепочечной ДНК-последовательности с образованием множества копий комплемента зонда в виде конкатемеров. Обычно АКК проводится при температуре 30–37 °C [107–110].



Рис. 3. Схемы методов а) амплификации катящегося кольца (АКК), б) гиперразветвленной амплификации катящегося кольца (гАКК) при определении миРНК.

В работе Kumara et al. [110] описан метод определения миРНК-24 с использованием АКК. В этом методе кроме традиционной смеси dNTP в реакцию АКК добавлялся меченый нафталинимидом dUNTP, что приводило к синтезу флуоресцирующего продукта. Предел обнаружения миРНК составил 3.6 фМ.

Известны также другие варианты АКК. Кроме кольцевого зонда описано применение гантелеобразного зонда шпилечной структуры [111]. В этом случае за счёт наличия шпильки в структуре зонда увеличивается специфичность амплификации и, соответственно, определения миРНК. В другом варианте АКК Li et al. [112] предложили «замочные» зонды с однонуклеотидными заменами в комплементарном аналиту фрагменте, которые призваны повышать специфичность определения миРНК-let-7a по отношению к близкородственным миРНК. В некоторых работах высокомолекулярный продукт амплификации АКК подвергали ферментативной рестрикции [113-114]. На данном принципе Liu et al. [113] сконструировали метод АКК с экспоненциальной амплификацией, где фрагмент зонда, комплементарный анализируемой миРНК, был обособлен сайтами рестрикции. Это приводило к тому, что синтезированный конкатемер после его комплементарного комплексообразования с исходным «замочным» зондом подвергался специфическому расщеплению рестриктазой. В результате этого образовывалось большое число молекул ДНК-олигонуклеотида, последовательность аналогична анализируемой миРНК. Такие молекулы синтезированного которого олигонуклеотида инициировали АКК, так как являлись дополнительными праймерами. В данном исследовании рабочий диапазон при определении миРНК флуоресцентным методом составил 30 aM-30 фМ. Метод был применён для количественной оценки содержания миРНК let-7а в клетках А549 (карцинома лёгких человека).

Более распространённая модификация АКК. позволяющая осуществлять экспоненциальную амплификацию, основывается на использовании дополнительных праймеров, комплементарных высокомолекулярному продукту АКК. Данная модификация получила название «гиперразветвлённая АКК» (гАКК) (Hyperbranched RCA, HRCA) (Рис. 3 б). При определении миРНК-21 с помощью гАКК достигнут предел обнаружения, равный 10 аМ. Рабочий диапазон данного метода не был широк (до 100 фМ), однако при этом величина сигнала в пределах рабочего диапазона повышалась более чем в 90 раз [115]. Последний факт указывает на высокое значение коэффициента чувствительности, что позволило оценить концентрацию аналита с высокой точностью. Разработанный метод применялся для анализа уровня экспрессии миРНК-21 в ткани печени пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой. Таким образом, методы, основанные на экспоненциальных модификациях АКК, обладают экстремально высокой чувствительностью.

Выше отмечалось, что рабочий диапазон метода с применением гАКК недостаточно широк по сравнению с большинством описанных методов для миРНК. Однако этот факт ни в коем случае не следует относить к недостаткам метода. Методы анализа миРНК с широким рабочим диапазоном предпочтительно использовать при оценке их экспрессии в неописанных образцах или при количественном определении определённых миРНК, концентрация которых в норме и патологии сильно отличается. Однако если различие в концентрации миРНК в образцах здоровых людей и пациентов не велико [116–117], то предпочтительно использование методов с более узким рабочим диапазоном, но максимально возможным коэффициентом чувствительности. Таким образом, методы анализа миРНК как с широким, так и с узким рабочими диапазонами представляют интерес для диагностической медицины.

В научной литературе отмечены и недостатки АКК, связанные с протеканием фоновой амплификации (в отсутствие аналита), что в конечном счёте ухудшает аналитические параметры метода определения миРНК. Аналогичный вопрос в равной степени относится и к другим методам амплификации. В случае методов амплификации с применением полимераз (в частности, АКК) данный процесс связывают с межмолекулярными взаимодействиями молекул зонда и их дальнейшей элонгацией, взаимодействием их с дополнительно используемыми праймерами, присутствием в анализируемых образцах дополнительных нуклеиновых кислот, а также побочными активностями используемых полимераз [118]. Для элиминирования влияния фоновых реакций на определение миРНК следует применять методы детекции, специфичные к продуктам основной (аналит-зависимой) реакции.

Экспоненииальная реакиия амплификации (ЭРА) (EXPonential Amplification Reaction, **EXPAR**) является ещё одним широко используемым при определении миРНК методом из группы МИА, приводящим к повышению аналитического сигнала за счёт увеличения концентрации аналита. В ЭРА применяется зонд, представляющий из себя две полностью комплементарные аналиту ДНК-последовательности, связанные друг с другом одной из цепей сайта рестрикции никазы (Рис. 4 а). При взаимодействии аналита с 3'- и 5'- концами зонда образуются дуплексы. Тот дуплекс, в котором аналит гибридизован с 3'-концом зонда, удлиняется ДНК-полимеразой с отсутствием (3'→5')-экзонуклеазной активности (полимераза phi 29, фрагмент Кленова, полимеразы Vent и Bst). В результате этого наблюдается формирование сайта рестрикции никазы, вследствие чего происходит ферментативный гидролиз комплементарной зонду последовательности, после чего образуемая последовательность аналита элонгируется вновь [119].

В пионерской работе по применению метода ЭРА в анализе миРНК предел обнаружения миРНК let-7a с использованием флуоресцентной детекции составил 0.1 фМ. Его рабочий диапазон покрывал 10 порядков концентрации аналита. В то же время следует отметить, что аналитический сигнал при этом изменялся лишь в 6 раз, что указывает на низкое значение коэффициента чувствительности метода. Для наиболее структурно близких аналиту миРНК let-7е и миРНК let-7f кросс-реактивность составила 17.6 и 0.6% соответственно [120]. Для повышения специфичности ЭРА были применены «арочные» зонды. Как видно на Рис. 4 б, в таком подходе используется комплекс основного зонда и дополнительного зонда-блокатора, при этом концы последовательности блокатора комплементарны концам основного зонда. Так как фрагмент основного зонда, вступающий в реакцию с аналитом, частично находится в дуплексе, метод характеризуется повышенной специфичностью. Данная стратегия успешно применена Wu et al. [121] для определения миРНК-141. Кросс-реактивность миРНК-200а, наиболее структурно близкой к анализируемой миРНК-141, составила всего 3%. С флуоресцентной детекцией образуемых на подложке продуктов амплификации нанокластеров серебра был получен предел обнаружения 1 фМ при довольно узком рабочем диапазоне (до 500 φM).

Серьёзной проблемой, ограничивающей чувствительность методов с применением EXPAR, является интенсивная неспецифическая реакция, протекающая при отсутствии аналита. В случае ЭРА данная проблема усугубляется использованием зондов (превышающих как минимум в два раза последовательность аналита по длине) в высокой концентрации. Для уменьшения димеризации зондов и снижения эффекта побочных активностей используемых

полимераз рекомендуется проводить ЭРА при повышенной температуре (55 °C) с использованием термофильных ферментов [122]. Следует заметить, что данный подход не решает полностью указанную проблему.



Рис. 4. Схемы а) метода экспоненциальной реакции амплификации (ЭРА), б) ЭРА с "арочным" зондом и в) метода "симметричной" ЭРА, используемых при определении миРНК.

Интересная модификация метода, позволяющая элиминировать развитие фоновой реакции вследствие образования димеров зондов и их дальнейшей элонгации и названная «симметричная» ЭРА (*Symmetric EXPAR*), предложена Chen et al. [123]. Зонд в данном методе представляет из себя гантелеобразную замкнутую последовательность, содержащую два комплементарных аналиту домена. При этом часть каждого из доменов находится в стебле

шпильки, а домены связаны между собой сайтом рестрикции никазы (Рис. 4 в). При связывании миРНК с зондом в присутствии полимеразы осуществляется ее элонгация, при этом, как только происходит формирование сайта рестрикции, элонгируемая последовательность подвергается ферментативному гидролизу и впоследствии вытесняется. Именно благодаря замкнутой геометрии зонда предотвращается протекание фоновой реакции, вызванной взаимодействием зондов. Шпилечная структура доменов зонда, связывающих аналит, призвана повысить специфичность формирования комплекса миРНК–зонд. При использовании флуоресцентного метода детекции с применением "симметричной" ЭРА получен экстремально низкий предел обнаружения миРНК let-7a, который составил 1 аМ. Верхний предел рабочего диапазона этого метода равен 1 нМ, т.е. рабочий концентрационный диапазон метода составил 9 порядков. Кроме того, авторами продемонстрирована чрезвычайно низкая кросс-реактивность с миРНК let-7e (ближайшим гомологом), которая была менее чем 3-10 %, тогда как в случае применения классического варианта ЭРА эта величина равнялась 13.2%. Впоследствии метод был успешно применён для анализа миРНК let-7a в тканях и сыворотке крови человека, при этом показав бо́льшую точность, чем ОТ-кПЦР.

3.3. МИА, приводящие к повышению аналитического сигнала без изменения концентрации аналита с использованием ферментов

Циклический ферментативный метод амплификации (ЦФА) (Circle-Enzymatic-Amplification, CEAM) стал одним из первых методов изотермической амплификации, приводящих к повышению аналитического сигнала без изменения концентрации аналита и нашедших применение в анализе миРНК. Известно большое число публикаций с описанием методов определения миРНК, основанных на ЦФА. В этом методе амплификации последовательность распознающего зонда после его комплексообразования с миРНК подвергается ферментативному расщеплению. Для этого могут быть применены различные ферменты: дуплекс-специфическая нуклеаза [127–129], экзонуклеазы [130–137] и эндонуклеазы [138–140]. В результате гидролиза зонда происходит диссоциация модифицированного дуплекса, а освободившаяся последовательность миРНК взаимодействует со следующей молекулой зонда (Рис. 5 а).

Опубликован ряд работ, описывающих методы определения миРНК на основе ЦФА с использованием эндонуклеазы. В большинстве таких методов формируются олигонуклеотидные структуры Y-формы [138-139]. В работе Miao et al. [138] на поверхности углеродного электрода через золотые наночастицы иммобилизован ДНК-олигонуклеотид,

связанный с электроактивной меткой (зонд 1). При специфическом взаимодействии миРНК, зонда 1 и дополнительного зонда (зонда 2) происходило формирование Y-комплекса, причём на одной из ветвей Y-комплекса, образованной зондами 1 и 2, формировался сайт рестрикции эндонуклеазы Nb.BbvCl. После расщепления эндонуклеазой Y-комплекс распадался, благодаря чему электрохимическая метка диффундировала в раствор, что приводило к понижению регистрируемого сигнала, а освободившаяся миРНК инициировала следующий цикл амплификации.

Базируясь на данной схеме, при определении миРНК был достигнут низкий предел обнаружения (30 aM) и широкий рабочий диапазон (100 aM–1 нM). Кросс-реактивность метода, оценённая в отношении изомиров, составила 4%. Высокая чувствительность метода позволила провести анализ миРНК-21 в образцах сыворотки пациентов с раком груди.



Рис. 5. Схема реакций изотермической амплификации, приводящих к повышению аналитического сигнала без изменения концентрации аналита и проводимых с применением ферментов, при определении миРНК: а) циклический ферментативный метод амплификации (ЦФА), б) амплификационный метод с полимеризацией и замещением (АМПЗ).

Гораздо реже в методе ЦФА используется Т7-экзонуклеаза. В этом случае после взаимодействия миРНК с распознающим зондом последовательность зонда в образовавшемся комплексе подвергается ферментативному гидролизу в (5'→3')-направлении, в результате чего миРНК высвобождается и формирует дуплекс с другой молекулой-зондом. Чувствительность таких методов сильно зависит от используемых методов детекции. Так, при использовании электрохимической детекции предел обнаружения часто лежит в фемтомолярном диапазоне [132–134]. В случае применения оптических методов детектируемость миРНК ниже; их пределы обнаружения находятся в пикомолярном диапазоне [130-131]. Описаны единичные работы по применению в данном методе экзонуклеазы III, гидролизующей последовательность зонда в дуплексе с аналитом в $(3' \rightarrow 5')$ -направлении [135–137]. Малое число таких работ может быть связано с побочной активностью экзонуклеазы III, которая способна подвергать расщеплению одноцепочечные молекулы нуклеиновых кислот, включая и миРНК.

Амплификационный метод с полимеризацией и замещением (АМПЗ) (Isothermal Circular Strand Displacement Polymerization, ICSDP) несмотря на свою высокую эффективность является на сегодняшний день относительно редко используемым в анализе миРНК МИА, приводящим к повышению аналитического сигнала без изменения концентрации аналита. В этом методе анализируемая миРНК специфически взаимодействует с зондом шпилечной структуры, в результате чего последний раскрывается, что приводит к высвобождению из стебля шпильки фрагмента, комплементарного праймеру (Рис. 5 б). Это позволяет праймеру гибридизоваться с зондом, после чего праймер элонгируется полимеразой. Чаще других для этих целей используется фрагмент Кленова, а элонгация проводится при низких температурах. В процессе удлинения праймера одновременно происходит замещение последовательности миРНК. Высвобожденный из комплекса аналит вступает в реакцию с другой молекулой зонда. Концентрация миРНК соответствует количеству образовавшегося дуплекса, который определяется такими методами, как флуоресценция [141-142], электрохимия [143]. хемилюминесценция [144-145]. Таким образом, в АМПЗ молекула миРНК выполняет роль катализатора реакции раскрытия шпилечного зонда. Недавно описан гетерогенный метод определения миРНК-39, в котором для амплификации сигнала применён АМПЗ [145]. В этом методе использовался биотинилированный праймер, в связи с чем образованный в процессе гетерогенной амплификации продукт также содержал биотин, который впоследствии эффективно взаимодействовал с конъюгатом стрептавидина и полипероксидазы. Сигнал детектировался методом усиленной хемилюминесценции с использованием фенотиазиновых усилителей. Предел обнаружения составил 400 фМ, при этом получено высокое значение коэффициента чувствительности метода (в пределах рабочего диапазона сигнал возрастал более чем в 500 раз). При определении миРНК-39 в образцах коротких РНК, полученных из лизатов клеточных линий, показано отсутствие матричного эффекта, что позволило использовать буферные растворы миРНК в качестве калибраторов. Так как миРНК-39 обнаруживается в

нематоде Caenorhabditis elegans и отсутствует в организме человека, данный метод предложено использовать для оценки эффективности выделения миРНК из биоматериала человека [138, 143].

В методах определения миРНК с АМПЗ используются и другие детектирующие системы. Так, в работе Wang et al. [142] шпилечный зонд мечен флуоресцентной меткой, в то время как праймер предварительно иммобилизовался на поверхности наночастиц золота. При образовании в процессе амплификации дуплексов флуоресцентные метки сближались с поверхностью наночастиц, что приводило к тушению флуоресценции. Предел обнаружения метода, разработанного для определения миРНК-21, и его линейный диапазон составили 1.5 фМ и 10 фМ–10 нМ соответственно. Кроме того, продемонстрирована способность метода к выявлению однонуклеотидных замен. Метод был использован для определения миРНК-21 в экзосомах, секретируемых клетками HeLa.

3.4. Бесферментные МИА

В отличие от вышеописанных МИА для проведения *реакции цепной гибридизации* (*РЦГ*) (*hybridization chain reaction, HCR*) не требуется участия какого-либо фермента. Понятно, что такие методы менее дорогостоящие и им не присущи недостатки, связанные с применением ферментов. РЦГ основана на комплементарном взаимодействии двух зондов шпилечной структуры, катализируемом последовательностью олигонуклеотида, в частности миРНК (Рис. 6). При взаимодействии миРНК с первым зондом происходит высвобождение домена, способного раскрыть шпилечную структуру второго. В свою очередь, при раскрытии второго зонда в нём из дуплекса освобождается фрагмент последовательности, способный раскрыть шпилечную структуру первого зонда. Таким образом, в присутствии аналита формируется цепная дуплексная структура, состоящая из используемых зондов. Правила моделирования используемых в РЦГ шпилек сформулированы в работе Ang и Yung [146]. Если один или оба зонда содержат в своей структуре аналитическую метку, то полимеризация зондов приводит к амплификации регистрируемого сигнала.

С использованием РЦГ разработано большое количество методов определения миРНК, часть из которых являются высокочувствительными и способны детектировать аналиты в фемто- и даже аттомолярных концентрационных диапазонах [147–150].

Как и для большинства других методов амплификации, в случае применения РЦГ наблюдается повышенный фоновый сигнал, обусловленный спонтанной (при отсутствии аналита) полимеризацией зондов. Недавно описан подход понижения фонового сигнала, основанный на обработке экзонуклеазой I захватывающего зонда-шпильки, предварительно иммобилизованного на поверхности электрода. В результате действия фермента удалялись шпилечные последовательности, имеющие дефекты в их вторичной структуре [151]. После такой обработки предел обнаружения миРНК-122 составил 100 aM с рабочим диапазоном до 100 нМ. Разработанный метод показал свою эффективность при определении миРНК-122 в экзосомах раковых клеток HepG2 и SCF-7. Для дополнительного повышения эффективности данного метода амплификации разработана разветвлённая РЦГ, где образуемый дуплекс содержит фрагмент одного из зондов, свободный от какого-либо взаимодействия, который, в свою очередь, является инициатором полимеризации другой пары зондов (зондов 3 и 4). В происходит образование разветвлённой конечном счёте структуры, состоящей ИЗ последовательностей четырёх зондов.



Рис. 6. Схема реакции цепной гибридизации (РЦГ), используемой при определении миРНК.

С применением разветвлённой РЦГ разработан ряд методов определения миРНК [152– 155]. Следует отметить, что сравнение аналитических параметров методов определения миРНК, созданных на основе базовой и разветвлённой РЦГ, не выявило в явной форме каких-либо преимуществ одного метода амплификации перед другим. Справедливости ради остаётся отметить, что данное заключение сделано при сравнении данных, полученных в различных лабораториях при определении различных миРНК, а не на основании прямого сравнения указанных методов амплификации в одной и той же работе.

Еще более широко, чем РЦГ, при разработке методов определения миРНК используется *метод каталитической сборки шпилек (КСШ) (Catalytic Hairpin Assembly, СНА)*. Для проведения данной амплифицирующей реакции так же, как и в случае РЦГ, не требуется присутствия каких-либо ферментов. КСШ основывается на аналит-зависимом взаимодействии двух комплементарных друг другу шпилечных зондов (Рис. 7 а). Так как используемые зонды находятся в шпилечной (закрытой) форме, их спонтанная гибридизация затруднена. На первом этапе аналит гибридизуется с первым зондом (зонд 1). Появление одноцепочечного фрагмента в образованном дуплексе является инициирующим центром для взаимодействия с зондом 2. По завершении амплификационного цикла формируется комплекс зондов 1 и 2 и молекула миРНК в свободном состоянии, что позволяет ей вступать в реакцию со следующей молекулой зонда 1. Таким образом, одна молекула аналита способна катализировать образование большего числа дуплексов зондов 1 и 2.

На настоящий момент среди МИА, используемых в методах анализа миРНК, КСШ является наиболее популярным. В данных методах КСШ успешно сочетается с различными методами детекции. Хотя для таких методов наблюдается большой разброс значений предела обнаружения (от пикомолярных до субфемтомолярных концентраций) [156-158], что требует исследования, способность с помощью отдельного данного типа изотермической амплификации конструировать ультрачувствительные методы анализа указывает на перспективность КСШ

Недавно Jin и Xu [159] описали микрочип на стекле, функционирующий с применением КСШ. Для данного чипа с флуоресцентной детекцией предел обнаружения миРНК-21 и миРНК-155 был одинаков и составил 1.3 фМ. Полученные значения были очень низкими по сравнению с аналогичными величинами, обычно характерными для микрочипов. Разработанный чип также был высокоспецифичен в отношении исследуемых миРНК. Следует отметить, что высокая специфичность в целом характерна для методов, основанных на КСШ [157, 160–162].

Кроме базового варианта КСШ с участием двух зондов, описаны методы анализа миРНК с применением трёх шпилечных зондов, из которых в конечном счёте образуются Y-структуры. В электрохимическом методе анализа миРНК-181 [162] итоговые биотинилированные Yструктуры формировались вблизи поверхности электрода и впоследствии реагировали с коньюгатом стрептавидина и щелочной фосфатазы (Рис. 7 а). Определение ферментативной активности фосфатазы вольтамперометрическим методом позволило получить предел обнаружения миРНК-181, равный 7 фМ. Рабочий диапазон данного метода лежал в интервале 10 фМ–100 нМ, т.е. был достаточно широким. С помощью разработанного метода успешно проведены определения миРНК-181 в экзосомах сывороток крови больных с ишемической болезнью сердца и здоровых людей.



Рис. 7. а) Схема реакции каталитической сборки шпилек (КСШ) и б) схема реакции КСШ с образованием У-структур, используемых при определении миРНК.

Существенным фактором, ограничивающим чувствительность методов с использование КСШ, является фоновая реакция зондов в отсутствие аналита. Для понижения степени протекания данной реакции были предложены различные стратегии. Одной из первых была предложена стратегия использования одного из зондов с одним или двумя нуклеотидами не комплементарными другому зонду. Это понизило вероятность гибридизации шпилек, находящихся в динамическом равновесии между открытой и закрытой формами [163]. Jiang et al. [163] назвали данный метод КСШ с некомплементарным противостоянием нуклеотидов (нКСШ) (*Mismatched Catalytic Hairpin Assembly, mCHA*). Применение нКСШ позволяет значительно понизить интенсивность фоновой реакции, однако полностью её подавить не способно.
3.5. Каскадные МИА

В целях улучшения аналитических параметров определения миРНК исследователями все чаще задействуются каскадные методы амплификации, сочетающие две [164-165] или, в редких случаях, даже три [166] амплификации различных типов. В таких методах аналит запускает первый тип амплификации, а образующийся в ней продукт является инициатором для последующей амплификации.

Распространены подходы, в которых на первом этапе выступают МИА, приводящие к повышению аналитического сигнала за счёт повышения концентрации аналита, а на втором -МИА, приводящие к повышению аналитического сигнала за счёт многократного реагирования одних и тех же молекул аналита. В частности, описано успешное применение каскадных подходов с применением на первом этапе АКК [167] или ЭРА [168], продуктами амплификационных реакций которых выступают одноцепочечные ДНК, инициирующие далее КСШ. В таком случае КСШ выступает элементом детектирующей системы, осуществляющим дополнительную амплификацию сигнала. Так, ранее отмечалось, что при использовании ЭРА образуется большое количество неспецифических продуктов, что, в свою очередь, приводит к ложноположительным сигналам. Для устранения этого недостатка Liu et al. [168] предложили метод с каскадной амплификацией, где в целях специфической детекции миРНК-зависимого продукта ЭРА использовался КСШ.

Перспективным выглядит применение полностью бесферментных каскадных амплификаций, так как второй этап может повысить относительно невысокую эффективность бесферментной амплификации, сохранив ее экономичность. В литературе представлены публикации с применением в анализе миРНК сочетаний, в которых в качестве амплификации первого этапа выступает КСШ [169-171]. Одни такие методы показывают очень высокую детектируемость и чувствительность [169], тогда как другие демонстрируют аналитические параметры не лучше указанных в публикациях с одним КСШ и похожими детектирующими системами [170-171]. В первую очередь это может быть связано с тем, что такие работы делались в разных лабораториях. Зачастую даже не каскадные методы с одинаковой амплификацией детектирующими И близкими системами описываются разными исследователями с большим разбросом аналитических параметров.

С другой стороны, в случае применения бесферментных каскадных амплификаций может присутствовать дополнительный фактор. В связи с тем, что все бесферментные изотермические амплификации запускаются одноцепочечным олигонуклеотидом, для создания каскадной амплификации продукт первого амплификационного этапа должен являться

одноцепочечным олигонуклеотидом или содержать в себе такой фрагмент. Вместе с тем в оригинальных бесферментных амплификационных схемах продуктами выступают дуплексы, не содержащие одноцепочечных фрагментов. Чтобы это исправить, зонды первого этапа амплификации модифицируют, часто проводится удлинение зондов [172-174].

При разработке каскадных методов амплификации некоторые исследователи показали, что внесение в схему второго этапа повышает эффективность первого, являющегося модификацией оригинального метода [169]. Однако сравнения модификации первого этапа, потенциально способной ухудшить его эффективность, с немодифицированным методом не проводится. В нашей лаборатории было показано (не опубликованные данные), что удлинение второго зонда реакции КСШ приводит к понижению эффективности реакции. В связи с этим мы полагаем, что модификации первого этапа негативно влияют на его эффективность.

Анализ литературы показывает, что с каждым годом разрабатывается всё больше новых методов определения миРНК. Многие из них позволяют успешно оценивать уровень миРНК в различных биологических образцах человека. Вместе с тем пока внимание большинства исследователей акцентировано на оценках предела обнаружения, рабочего диапазона и специфичности разрабатываемых методов, за скобками оставляют такой важный аналитический параметр, как коэффициент чувствительности, часто являющийся ключевым при регистрации отклонений в уровне экспрессии миРНК в образцах пациентов с различными патологиями. Для повышения чувствительности анализа миРНК используются разнообразные методы амплификации. В последние годы из-за простоты проведения большой интерес исследователей привлекают МИА. Особенно заманчиво выглядит перспектива создания методов анализа на основе бесферментных МИА, что позволит, с одной стороны, преодолеть проблему синтеза неспецифических продуктов полимеразами и ингибирования ферментов, а с другой стороны, понизить стоимость определения миРНК. Кроме повышения чувствительности, за счёт применения методов амплификации улучшается и специфичность методов определения миРНК, что чрезвычайно важно, учитывая высокое разнообразие миРНК в биологических объектах.

Большое внимание специалистов привлекают не только аналитические параметры методов анализа миРНК, но также их технологичность, стоимость производства и лёгкость автоматизации. Не последнее место среди этих требований занимает и производительность метода анализа. С учётом сказанного, в первую очередь проявляется интерес к оптическим методам анализа миРНК, в частности хемилюминесцентным методам.

38

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты и оборудование

Реагенты

В работе использовали следующие реактивы: люминол, трис (гидроксиметил) азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая аминометан, 2,2'кислота) (АБТС), этаноламин-HCl, NaCl, KCl, гемин, 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимид (ЭДК), сахароза, 2-(N-морфолино)-этансульфоновая кислота (МЭК), сульфо-N-гидроксисукцинимид, казеин, твин-20, ЭДТА, 4-морфолинопиридин (МП), этидий бромид («Sigma», США), карбоксилированные магнитные частицы (МЧ) (0.44 мкм) («Magsphere», США), конъюгат антимышиных (IgG) антител с пероксидазой хрена («Jackson Immuno Research Labs», США), конъюгат стрептавидин-полипероксидаза («SDT GmbH», Германия), экзонуклеазу Ш («Сибэнзим», Россия), моноклональные антифлуоресцеиновые антитела (IgG) («Биалекса», Россия), Тад-ДНК полимеразу, буфер для проведения ПЦР («Евроген», Россия), H₂O₂ (30%) («ХимМед», Россия). Концентрацию пероксида водорода определяли спектрофотометрически с использованием $\varepsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. 3-(10'-фенотиазинил)пропионовую кислоту (ФПК) синтезировали, как описано в [175]. 96- луночные плашеты «High Binding» были получены из «Thermo Fisher Scientific» (CША).

Использованные в работе человеческие клетки линий MCF-7, HeLa, Caco2, и HepG2 получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт Цитологии, Санкт-Петербург, Россия). Для выделения коротких РНК использовали коммерческий набор LRU-100-50 («БиоЛабМикс», Россия). Для выделения ДНК использовали набор для экстракции ДНК («Евроген», Россия).

Олигонуклеотиды, биотинилированные олигонуклеотиды, флуоресцеин-меченые олигонуклеотиды синтезированы компанией «Синтол» (Россия). Все рабочие растворы были приготовлены с использованием бидистиллированной воды.

Оборудование

Для проведения бидистилляции воды применяли систему высокой очистки воды I типа «Millipore» («Merck», США). Навески реагентов взвешивали на электронных весах «Mettler Toledo» (Швейцария) с точностью до 0,1 мг. Измерение рН проводили на pH-метре «Mettler Toledo» (Швейцария) с точностью 0,02 ед. рН. Центрифугирование проводили на центрифугах miniSpin и 5810R («Eppendorf», США), облучение ультрафиолетом проводили на УФ-трансиллюминаторе «VilberLourmat» (Германия). Для перемешивания содержимого эппендорфов применяли «Intelli-Mixer RM-1L» («ELMI», Латвия). Спектры кругового

дихроизма регистрировали с использованием спектрополяриметра «JASCO J-815» (США). Хемилюминесценцию измеряли на люминометрах «Spectra Max L» («Molecular Devices», США) и «Zenyth 3100» («Anthos Labtec Instruments», Австрия). Для нагрева олигонуклеотидов применяли амплификатор «Терцик» (Россия). Для визуализации олигонуклеотидов в полиакриламидном геле использовали комплект оборудования для вертикального гельэлектрофореза («Bio Rad», США). Для проведения ПЦР использовали амплификатор «BioRad T100 Thermal Cycler» (США). Концентрация ДНК измерялась с помощью «NanoDrop2000» («Thermo Fisher», США). Для моделирования структур олигонуклеотидов и получения изображения их моделей использовалась программа Oligoanalyzer 3.1.

Методы исследований

Буферные растворы

Для приготовления буферных растворов навеску кристаллического компонента буфера растворяли в соответствующем объеме воды, до получения необходимой молярной концентрации. Для получения нужного pH добавляли по каплям, соответственно, 30% HCl, ледяной укусусной кислоты, 30% KOH или 30% NaOH.

В работе использовали следующие стандартные буферные растворы:

ТБ: 10 мМ трис-HCl, pH 7.2

ТБС : 10 мМ трис-HCl, pH 7.2 с 300 мМ NaCl

ТБСТ : 10 мМ трис-HCl, pH 7.2 с 300 мМ NaCl и 0.05% Твин-20

ХЛСС : 100 мМ трис-HCl, pH 8.3, содержащий 1 мМ люминол, 5.2 мМ ФПК, 9.3 мМ МП и 3 мМ H₂O₂

МЕСБ : 50 мМ МЕС буфер, pH 6.0

Отжиг олигонуклеотидов

Для проведения отжига раствор олигонуклеотида нагревался до 88 °C в течение 15 минут, после чего в течение часа охлаждался при комнатной температуре.

Определение микроРНК-141 методом, основанным на аллостерической активации ппДНКзима

Отжиг зонда, растворенного в воде, проводили стандартно, после чего смешивали данные растворы зонда с конечной концентрацией 6.25-50 нМ и 0-100 нМ микроРНК-141 в 25 мМ трис, рН 7.7-9.3 с 62.5-500 нМ гемина, 20 мМ КСl, 200 мМ NaCl и 0.02% ТритонХ100. Реакционный раствор инкубировали при комнатной температуре 1-18 часов. Далее проводили определение активности ппДНКзима в лунках черного 96- луночного планшета. Для этого 80 мкл реакционного раствора переносили в лунку и добавляли 10 мкл раствора люминола и 10

мкл пероксида водорода до конечной концентрации 5 мкМ и 1.3 мМ, соответственно [72]. Интенсивность хемилюминесценции определяли через 1 минуту на люминометре «Spectra Max L» («Molecular Devices», США).

Изучение структуры квадруплекса методом кругового дихроизма

Исследование проводили при температуре 25 °C в кювете длиной светового пути 1 см. Исследуемые образцы получали следующим образом: в эппендорфе смешивали раствор предварительно стандартно отожженного в воде зонда в концентрации 2 мкМ и 0-40 мМ гемина, 0-2 мкМ микроРНК-141 в 25 мМ трис, pH 8.0 с 20 мМ KCl, 200 мМ NaCl и 0.05% тритон X100. Полученный раствор инкубировали при комнатной температуре 60 минут. Измерения проводили в интервале длин волн 230-290 нм при скорости сканирования 50 нм/сек.

Определение активности экзонуклеазы III методом, основанном на аллостерической активации ппДНКзима

Определение активности экзонуклеазы III двухэтапным методом проводили следующим образом: 20 мкл 750 нМ раствора субстрата стандартно отжигали в 25 мМ трис, рН 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂. Для инициирования гидролиза субстрата 20 мкл раствора экзонуклеазы III в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl2 добавляли к раствору субстрата и инкубировали при 37 °C 60 минут. Далее 20 мкл 750 нМ раствора гемина в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl, 60 мМ KCl и 0.06% (о/о) тритон-Х100 добавляли к раствору, после чего 40 минут при 25 °С проводилась инкубация. Определение активности экзонуклеазы III одноэтапным методом проводили следующим образом: 20 мкл 750 нМ раствора субстрата стандартно отжигали в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂. Далее 20 мкл 750 нМ раствора гемина в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl, 60 мМ КCl и 0.06% (о/о) тритон-Х100 добавляли к раствору субстрата. Для инициирования гидролиза субстрата 20 мкл раствора экзонуклеазы III в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂ добавляли к раствору субстрата, после чего проводилась инкубация при 25 °C 100 минут. Хемилюминесцентная активность полученного ппДНКзима измерялась в лунках черного полистиролового планшета. Для этого 12 мкл смеси люминола и пероксида водорода добавляли к реакционному раствору до конечных концентраций 5 мкМ и 1.3 мМ, соответственно. Интенсивность люминесценции измерялась 30 секунд после инициирования окисления люминола при комнатной температуре на люминометре «Spectra Max L».

Проведение электрофореза

Анализируемые образцы наносили в объеме 15 мкл на 20% полиакриламидный гель (ПААГ). Для приготовления 20% ПААГ проводили смешение 3.3 мл 30% раствора

акриламида/бисакриламида (29 : 1), 500 мкл раствора 500 мМ трис, pH 8.8 с 500 мМ борной кислоты и 10 мМ ЭДТА, 1.2 мл воды, 15 мкл N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамина и 15 мкл 10% раствора персульфата аммония. Полученный раствор инкубировался 2 часа при комнатной температуре для формирования геля. Электрофоретическое разделение проводилось в течение 40 минут при 300 В с использованием «Mini Protean Tetra Cell» («BioRad»). Далее гель помещался на УФ-трансиллюминатор «VilberLourmat» (длина волны 254 нм) и фотографировался.

Приготовление образцов для электрофоретической идентификации продуктов нКСШ

Перед использованием Ш1-Флу(141) и Ш2-Био(141) стандартно отжигали в концентрации 900 нМ в ТБС. Далее растворы Ш1-Флу(141), Ш2-Био(141) и миРНК-141 смешивали в ТБС в комбинациях, соответствующих определенным образцам, после чего они инкубировались 1 час при 25 ⁰С. Концентрация зондов в полученных растворах составляла 300 нМ. Далее в готовые образцы вносили глицерин до 5% (об.).

Приготовление образцов для электрофоретической идентификации продуктов КСШВО

Перед использованием Ш4-Флу(155) и Ш3-Био(155) стандартно отжигали в концентрации 600 нМ в ТБС. Дуплекс Ш4-Флу(155) и Ш3-Био(155) готовили совместным отжигом данных двух зондов в ТБС в концентрации 600 нМ. Дуплекс Ш4-Флу(155) и ДО-Флу(155) готовили аналогично. Далее приготовленные растворы дуплексов, Ш4-Флу(155), Ш3-Био(155), а также миРНК-155 смешивали в ТБС в комбинациях, соответствующих определенным образцам, после чего растворы инкубировались 1 час при 25 °С. Концентрация зондов и приготовленных дуплексов в полученных растворах составляла 200 нМ. Далее в готовые образцы вносили глицерин до 5% (об.).

Иммобилизация анФлуАт на поверхность микропланшета

Лунки планшета обрабатывали 50 мкл раствора антифлуоресцеиновых антител (анФлуАт) (6 мкг/мл) в 50 мМ карбонатном буфере, pH 9.5. Далее планшет трижды отмывали с использованием раствора ТБС, после чего поверхность лунок блокировали 100 мкл раствора казеина (1 мг/мл в ТБС) инкубацией 1 час, 37С. После планшет снова трижды отмывали ТБСТ. Отмытый планшет хранился при 4 °С.

Определение микроРНК-141 методом, основанным на гомогенной реакции нКСШ

Прежде чем быть использованными в анализе, Флу-Ш1(141) и Ш2-Био(141) отжигали. Флу-Ш1(141) отжигали в концентрации 160 нМ в ТБ с 600 мМ NaCl. Ш2-Био(141) отжигали в концентрации 160 нМ в ТБ с 600 мМ NaCl. Определение концентрации микроРНК в образцах проводилось следующим образом: 15 мкл раствора Ш1-Флу(141) смешивали с 15 мкл раствора Ш2-Био(141), а также с 15 мкл раствора микроРНК-141 в ТБ с 600 мМ NaCl и инкубировали 1 час при 37 °C. Далее полученные растворы добавляли в лунки планшета с предварительно иммобилизованными анФлуАт. После инкубации 1 час при 37 °C планшеты трижды отмывали ТБСТ. После этого в лунки вносили 50 мкл раствора конъюгата стрептавидин-полипероксидазы хрена (разведение 1 : 200 000 в ТБС с 1 мг/мл казеина), после чего проводилась инкубация 1 час при 37 °C. Планшеты трижды отмывали и далее в лунки вносили 100 мкл свежеприготовленной ХЛСС. Хемилюминесцентный сигнал детектировался на люминометре «SpectraMax L» при комнатной температуре.

Конъюгирование МЧ с анФлуАт

Для получения конъюгатов МЧ с разным содержанием антифлуоресцеиновых антител, карбоксилированные МЧ (40 мкл, 2.15×10^8 частиц/мкл) отмывали дважды с МЕСБ, после чего они инкубировались с 20 мМ сульфо-N-гидроксисукцинимидом и 40 мМ ЭДК в МЕСБ при комнатной температуре в течение 15 минут. Активированные МЧ дважды отмывали и далее они инкубировались в течение 2 при комнатной температуре часов с 10, 20, 40, 60 и 70 мкг антифлуоресцеиновых антител в 400 мкл МЕС при перемешивании 60 об/мин. После инкубации несвязанные молекулы удаляли и добавляли раствор 0.5 М этаноламин-HCl, pH 8.5 с перемешиванием в течение 15 мин для блокирования непрореагировавших групп. Каждый из синтезированных конъюгатов был ресуспендирован в 400 мкл 10 мМ трис буфер, pH 7.4, содержащем 0.25% БСА, 0.25% твин-20, 1% сахарозы и хранился при 4 °C.

Детекция иммобилизованных анФлуАт на поверхности МЧ

Все синтезированные анФлуАт-МЧ конъюгаты (5 мкл каждого) отмывали трижды с использованием ТБСТ. Вместе с предварительно отмытыми анФлуАт-МЧ в эппендорф вносили 50 мкл конъюгата антимышиных антител с ПХ (разведение 1 : 10 000) и проводилась инкубация 1 час при 37 °C. Все этапы анализа с конъюгатами анФлуАт-МЧ проводились с перемешиванием 60 об/мин. Конъюгаты анФлуАт-МЧ снова отмывали ТБСТ, и 100 мкл свежеприготовленного буфера ХЛСС добавляли в лунки планшета. Интенсивность хемилюминесценции измерялась при комнатной температуре планшетным ридером «Zenyth 3100».

Детекция ФлуДупБио с применением конъюгатов анФлуАт-МЧ и планшета в гетерогенном хемилюминесцентном анализе

Синтез ФлуДупБио проводили как описано в [176]. В пластиковый эппендорф с предварительно отмытыми конъюгатами анФлуАт-МЧ или в лунки планшета с иммобилизованными анФлуАт добавляли 50 мкл раствора ФлуДупБио с концентрациями 0-1 нМ в ТБСТ. После инкубации в течение 1 часа при 37 °C конъюгаты МЧ или планшеты отмывали трижды ТБСТ и далее к ним добавляли 50 мкл раствора стрептавидин-полиПХ конъюгата, разведенного в ТБС с 1 мг/мл казеина (разведение 1 : 100 000). После инкубации в течение 1 часа при 37 °C конъюгаты МЧ/планшеты отмывали ТБСТ и далее к ним вносили 100 мкл свежеприготовленной ХЛСС. Хемилюминесцентный сигнал измерялся при комнатной температуре на планшетном ридере «Zenyth 3100».

Определение микроРНК методом, основанным на гетерогенной реакции нКСШ

Микропланшеты с иммобилизованными анФлуАт готовили, как описано выше. Перед использованием в анализе Флу-Ш1 и Ш2-Био отжигали. Флу-Ш1 отжигали в концентрации 30 нМ в 10 мМ трис-HCl, pH 7.2 (ТБ) с 20 мМ MgCl2. Ш2-Био отжигали в концентрации 100 нМ-320 нМ в ТБ с 10 мМ MgCl₂. Определение концентрации миРНК в образцах проводили следующим образом: 50 мкл раствора Ш1-Флу (30 нМ в ТБ с 20 мМ MgCl₂) добавляли в лунки планшета с предварительно иммобилизованными анФлуАт. После инкубации в течение 1 часа при 37 °С, планшеты трижды отмывались ТБСТ. Далее, 25 мкл водных растворов миРНК (0-200 пМ) или очищенных малых РНК и 25 мкл 160-1280 нМ растворов Ш2-Био в ТБ с 20-160 мМ MgCl₂ добавляли в лунки. Далее проводилась инкубация 1 час при 25 °С, после чего лунки трижды отмывались ТБСТ и далее в них вносили 50 мкл раствора конъюгата стрептавидин-полипероксидаза хрена (разведение 1 : 100 000 в ТБС с 1 мг/мл казеина) и проводилась инкубация 1 час при 37 °С. Планшеты трижды отмывали и далее к ним вносили 100 мкл свежеприготовленной ХЛСС. Хемилюминесцентный сигнал детектировался на люминометре «SpectraMax L» при комнатной температуре.

Определение микроРНК-155 методом, основанным на реакции КСШВО

Микропланшеты с иммобилизованными анФлуАт готовили, как описано выше. Перед использованием в анализе Флу-Ш4(155) и ДО(155) отжигали совместно в концентрации 1 мкМ, ШЗ-Био(155) отжигался в концентрации 120 нМ в ТБ с 600 мМ NaCl. Далее 50 мкл раствора Ш4-Флу(155)/ДО(155) (З нМ в ТБ с 600 мМ NaCl) добавляли в лунки планшета с предварительно иммобилизованными анФлуАт. После инкубации в течение 1 часа при 37 °C

планшеты трижды отмывали ТБСТ. Далее 25 мкл растворов микроРНК-155 (0-200 пМ) в ТБ с 600 мМ NaCl и 25 мкл 120 нМ растворов ШЗ-Био(155) в ТБ с 600 мМ добавляли в лунки планшета. Далее лунки инкубировались 1 час при 25 °C, после чего их трижды отмывали ТБСТ и вносили в них 50 мкл раствора конъюгата стрептавидин-полипероксидаза хрена (разведение 1 : 100 000 в ТБС с 1 мг/мл казеина). Далее проводилась инкубация в течение 1 часа при 37 °C. Планшеты трижды отмывали и далее в лунки вносили 100 мкл свежеприготовленной ХЛСС. Хемилюминесцентный сигнал детектировался на люминометре «SpectraMax L» при комнатной температуре.

Культивирование клеточных культур

Клетки культивировали в среде «Dulbecco's Modified Eagle's Medium» с 10% тельячьей сывороткой крови при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO₂[177].

Лизирование клеток и очистка микроРНК

Очистка коротких РНК (включая миРНК) из клеточных лизатов была проведена с применением набора LRU-100-50. Суспензию культивированных клеток MCF-7 (примерно 1 миллион клеток) центрифугировали 5 минут 300 g при комнатной температуре, после чего супернатант удаляли. Клетки суспендировали в 300 мкл 10 мМ Na₂HPO₄, 1.8 мМ NaH₂PO₄, 137 мМ NaCl, pH 7.4 и затем добавляли 500 мкл реагента «Лира». Полученный раствор встряхивали вручную и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. После дальнейшего центрифугирования в течение 10 минут при 10 000 g супернатант переносили в эппендорф. Далее добавляли 100 мкл хлороформа, перемешивали 15 секунд и инкубировали 5 минут, периодически перемешивая вручную. Разделение фаз проводилось центрифугированием в течение 10 минут при 10 000 g при 4 °C. После этого 200 мкл верхней водной фазы переносили в чистый эппенорф. 67 мкл 96% этанола добавляли к 200 мкл верхней водной фазы, после чего полученный раствор вносился на колонку, которая центрифугировалась 30 секунд при 10 000 g. Далее 270 мкл 96% этанола добавляли к полученному фильтрату, перемешивали пипетированием и вносили на колонку, которую далее центрифугировали 30 секунд при 10 000 g. Полученный фильтрат удалялся. Колонку с адсорбированными миРНК помещали в чистый эппендорф и промывали 500 мкл отмывочного буфера центрифугированием в течение 30 секунд при 10 000 g. Процедуру отмывки повторяли. Далее проводили центрифугирование в течение 3 минут при 10 000 д для полного удаления промывочного буфера. После этого колонку помещали в чистый эппендорф и добавляли 70 мкл воды. После инкубации в течении 1 минуты проводили центрифугирование в течение 1 минуты при 10 000 g. Очищенные препараты миРНК хранились при -20 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Глава 4. Аналитические методы с применением аллостерической активации ппДНКзима 4.1. Метод определения микроРНК-141, основанный на аллостерической активации ппДНКзима

Как отмечено в литературном обзоре, миРНК контролируют биосинтез трети белков человека и участвуют практически во всех ключевых процессах метаболизма. Более того показано, что уровень миРНК у пациентов с различными заболеваниями отличается от уровня тех же миРНК у здоровых людей [3]. Эти данные указывают на актуальность и практическую значимость разработки методов определения миРНК.

Количественный метод определения миРНК был смоделирован нами на основе эффекта аллостерической активации пероксидаза-подобного ДНКзима (ппДНКзима) (Рис. 8 А). Этот миметик пероксидазы представляет собой нековалентный комплекс гемина со своим специфическим аптамером (Раздел 2.2). При комплексообразовании с аптамером гемин переходит из димерной в мономерную форму, что повышает его пероксидазную активность. Для формирования ппДНКзима критична структуризация аптамера в G-квадруплекс. При удлинении аптамера к гемину дополнительной последовательностью (ДП), образующей комплементарные пары с аптамером, наблюдается ингибирование каталитической активности ппДНКзима. Предполагается, что это связано с пространственными изменениями в структуре G-квадруплекса, происходящими за счет реакции гибридизации между азотистыми основаниями аптамера и ДП. Как было показано нами ранее [178], степень ингибирования увеличивается с повышением энергии взаимодействия между аптамером и ДП. В присутствии последовательности аналита, комплементарной ДП, между ней и ДП образуется дуплекс, а комплементарные пары между ДП и аптамером разрушаются. В связи с этим структура Gквадруплекса аптамера восстанавливается, что приводит к аналит-зависимой аллостерической активации ппДНКзима.

Демонстрацию применимости данного подхода для разработки метода определения миРНК осуществляли на примере определения миРНК-141 (5'-UAACACUGUCUGGUAAAGA UGG-3') [179]. Основываясь на описанной выше стратегии, нами был смоделирован и синтезирован G-квадруплексный зонд. Данный зонд состоит из последовательности аптамера к гемину EAD2, удлиненной с 5'-конца последовательностью ДП (5'-TCCCTCCCATCTTTACCA GACAGTGTTAA<u>CTGGGAGGGAGGGAGGGAGGGA-3'</u>, последовательность EAD2 подчеркнута). Выбор аптамера EAD2 был обусловлен его высокой эффективностью связывания гемина, что продемонстрировано в литературных данных [72].

Вторичная структура зонда представлена на Рис. 8 А. Зонд формирует шпилечную структуру со стеблем, представленным 3 парами А-Т и 10 парами G-C. ДП зонда образует дуплекс с миРНК-141, включающий 13 пар А-U и 9 пар G-C (Рис. 8 Б). Большее количество связей в дуплексе с миРНК-141 способствует раскрытию шпилечной структуры зонда с образованием дуплекса.





Б)

3' GGUAGAAAUGGUCUGUCACAAU

Рис. 8. А) Вторичная структура зонда и схема аллостерической активации ппДНКзима для анализа микроРНК-141. Зеленым цветом обозначена последовательность аптамера EAD2, бардовым цветом – фрагмент дополнительной последовательности, комплементарный микроРНК-141. Красными и синими точками обозначены пары G-C и A-T, соответственно. Б) Вторичная структура дуплекса зонда и микроРНК-141, используемых в методе детекции микроРНК-141, основанном на аллостерической активации ппДНКзима. Моделирование структур проведено с помощью программы Oligoanalyzer 3.1.

Изменение пространственной структуры ппДНКзима зонда в зависимости от присутствия миРНК-141 исследовано методом кругового дихроизма (КД). Как видно на Рис. 9, спектр дуплекса зонда и аналита характеризуется максимумом при 264 нм и минимумом при 242 нм, что характерно для структуры параллельного G-квадруплекса [180]. В отсутствие миРНК-141 КД спектр зонда имеет похожий отрицательный экстремум при 242 нм. В то же время интенсивность положительного пика уменьшается, а сам пик смещается от 264 к 270 нм. Из этого следует, что структура G-квадруплекса в зонде нарушена, но она восстанавливается при его взаимодействии с миРНК-141.



Рис. 9. Спектр кругового дихроизма зонда, используемого в методе определения микроРНК-141, основанном на аллостерической активации ппДНКзима, (А) и его комплекса с микроРНК-141 (Б). [Условия: 2 мкМ раствора зонда, предварительно стандартно отожженного в 25 мМ трис, рН 8.6 с 2 мМ гемина, 20 мМ KCl, 200 мМ NaCl и 0.02% (о/о) Тритон X100, А) в отсутствие и Б) присутствии 2 мМ микроРНК-141. Перед снятием спектра реакционная смесь инкубировалась 2 часа при комнатной температуре].

Для получения зависимостей аналитического сигнала от концентрации миРНК-141 каталитическая активность зонда измерялась хемилюминесцентным методом при помощи люминола и пероксида водорода. В целях максимизации чувствительности метода проведена оптимизация условий проведения анализа. При исследовании влияния pH реакционного буфера на интенсивность хемилюминесценции найдено, что полученная зависимость имеет 10). колоколообразный ВИД (Рис. Максимум интенсивности хемилюминесценции соответствовал диапазону рН от 8.0 до 8.6.

Дополнительно исследовано влияние концентраций гемина и зонда в реакционной среде. Из данных на Рис. 11 А можно видеть, что увеличение концентрации гемина от 63 до 500 нМ приводило к подъему интенсивности хемилюминесцентного сигнала, что, соответственно, повышало чувствительность определения миРНК-141. Дальнейшее повышение концентрации гемина в реакционной среде приводило к увеличению фонового сигнала (данные не показаны). Похожая зависимость получена при увеличении концентрации зонда с 6 до 50 нМ (Рис. 11 Б). Как и в исследовании роли концентрации гемина, фоновый сигнал также возрастал с увеличением концентрации зонда выше 50 нМ. В связи с этим дальнейшая работа проводилась в 25 мМ трис, pH 8.6, концентрации гемина и зонда в котором равнялись, соответственно, 500 и 50 нМ.



Рис. 10. Зависимость интенсивности хемилюминесценции от pH среды проведения реакции в методе детекции микроPHK-141, основанном на аллостерической активации ппДНКзима. [Условия: 25 нМ предварительно стандартно отожженного зонда в 25 мМ трис (разные pH) с 250 нМ гемина, 200 мМ NaCl, 20 мМ KCl и 0.02%(о/о) ТритонХ100 смешано с 0 или 20 нМ микроPHK-141. Перед измерением сигнала реакция проводилась 1 час]. Представленная интенсивность хемилюминесцентного сигнала рассчитана как разность сигналов, полученных в присутствии и отсутствие 20 нМ микроPHK-141.



Рис. 11. Зависимость хемилюминесцентного сигнала от концентрации в реакционной среде гемина (А), зонда (Б) в методе детекции микроРНК-141, основанном на аллостерической активации ппДНКзима. [Условия: А) 50 нМ предварительно стандартно отожженного зонда в 25 мМ трис, pH 8.6 с 62-500 нМ гемина, 200 мМ NaCl, 20 мМ KCl и 0.02%(о/о) ТритонХ100, Б) 6-50 нМ предварительно отоженного зонда I в 25 мМ трис, pH 8.6 с 250 нМ гемина, 200 мМ NaCl, 20 мМ КСl и 0.02%(о/о) ТритонХ100, смешано с и 0 или 20 нМ микроРНК-141. Перед сигнала реакция проводилась 1 час]. Представленная измерением интенсивность хемилюминесцентного сигнала рассчитана как разность сигналов, полученных в присутствии и отсутствие 20 нМ микроРНК-141.

Градуировочная зависимость определения миРНК-141 в оптимизированных условиях представлена на Рис. 12. Видно, что данная зависимость аппроксимируется линейной функцией. Предел обнаружения и коэффициент чувствительности, определенный как наклон прямой, составили 100 пМ и 110 пМ⁻¹, соответственно. Коэффициент вариации - менее 2%.

Данная градуировочная кривая получена при инкубации зонда с аналитом в течение 1 часа (Рис. 12 А). Пролонгирование этой реакции до 18 часов позволило увеличить коэффициент чувствительности определения миРНК-141 до 270 пМ⁻¹, то есть почти в три раза (Рис. 12 Б). Из этого следует, что в исследуемых экспериментальных условиях одного часа проведения реакции недостаточно для установления равновесия в системе зонд/аналит. Таким образом, можно пролонгировать реакцию для повышения ее выхода и, в свою очередь, коэффициента чувствительности детекции миРНК-141. Данный факт является аналитически важным, так как наряду с коэффициентом вариации именно коэффициент чувствительности определяет точность анализа. Его высокие значения позволяют фиксировать минимальные отклонения в концентрации аналита. Вместе с тем следует отметить, что пролонгация реакции не изменяет предел обнаружения данного метода анализа.



Рис. 12. Градуировочная зависимость определения микроРНК-141 методом, основанным на эффекте аллостерической активации ппДНКзима, при проведении реакции в течение А) 1 часа и Б) 18 часов. [Условия: концентрация микроРНК-141 варьировалась в растворе 25 нМ предварительно стандартно отожженного зонда в 25 мМ трис, pH 8.6 с 250 нМ гемина, 200 мМ NaCl, 20 мМ KCl и 0.02%(о/о) ТритонХ100].

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали возможность применения гомогенной аналитической платформы, основанной на аналит-зависимом эффекте аллостерической активации ппДНКзима, для точного и быстрого определения миРНК. Учитывая наши предыдущие результаты по определению ДНК олигонуклеотидов [178], данный метод следует позиционировать как гомогенный простой метод определения одноцепочечных олигонуклеотидов нуклеиновых кислот. В то же время надо отметить, что предел обнаружения

данного безамплификационного метода анализа довольно высок по сравнению с реальными концентрациями миРНК в биологических жидкостях человека (кровь, моча), в которых наиболее часто в диагностических целях (экспериментальной диагностике, так как до настоящего времени анализ миРНК не сертифицирован ни в одной стране) проводится определение содержания миРНК.

4.2. Метод определения активности экзонуклеазы III, основанный на аллостерической активации ппДНКзима

Аналитическая платформа, основанная на аналит-зависимом эффекте аллостерической активации ппДНКзима, по-видимому, может быть также применена для определения ферментативной активности нуклеаз. Для демонстрации этого, мы разработали гомогенный метод определения активности экзонуклеазы III, фермента, катализирующего ступенчатый гидролиз мононуклеотидов с тупого 3'-гидроксильного конца двухцепочечной ДНК [181].

Схема метода представлена на Рис. 13. В качестве субстрата экзонуклеазы используется олигонуклеотид шпилечной структуры, содержащий в своей структуре последовательность аптамера EAD2, к 3'-концу которого ковалентно присоединена дополнительная ДНК последовательность (ДП). В нашей работе были смоделированы и синтезированы 4 олигонуклеотида в качестве потенциальных субстратов экзонуклеазы III (Таблица 1). Данные соединения имеют одинаковые 5'-концевые последовательности (аптамер EAD2) и последовательности ДП разной длины, что обуславливает различную длину стебля шпилечных структур субстратов.



Рис. 13. Схема метода определения активности экзонуклеазы III, основанного на аллостерической активации ппДНКзима. *На схеме «ДП»- дополнительная последовательность.

Как видно на Рис. 14, при переходе от субстрата 1 к субстрату 4 зона комплементарности ДП с аптамером увеличивается. В результате действия экзонуклеазы III ДП субстратов гидролизуется, высвобождая тем самым последовательность свободного аптамера, который в присутствии гемина приобретает способность формировать каталитически активный ппДНКзим. Следует отметить, что исходные субстраты с гемином взаимодействовать не способны. Сравнение активности экзонуклеазы III в отношении синтезированных зондов показало, что субстраты с удлиненными стеблями более активны, однако наблюдаемое различие в активности субстратов оказалось невысоким (Таблица 1). В связи с этим, дальнейшие исследования проводились с применением субстрата **3**.



Рис. 14. Структура субстратов, использованных в методе определения активности экзонуклеазы III, основанном на аллостерической активации ппДНКзима. Красными точками обозначены комлементарные пары G-C, синими – пары А-Т. Моделирование структур проведено с помощью программы Oligoanalyzer 3.1.

С применением этого субстрата исследовался эффект температуры проведения ферментативной реакции на аналитическую эффективность. Как видно из данных Рис. 15, данная зависимость имела колоколообразный характер. Максимум интенсивности хемилюминесценции наблюдался при 37 °C.

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных субстратов, использованных для определения активности экзонуклеазы III.

Субстрат	Последовательность (5'-3')	Сигнал/фон
1	CTGGGAGGGAGGGAGGGAGGGA TGCATCCAGGTCATG	4.8
	TTCCTCCCAG	
2	CTGGGAGGGAGGGAGGGAGGGA TGCATCCAGGTCATG	4.7
	TTCCCTCCCAG	
3	CTGGGAGGGAGGGAGGGAGGGA TGCATCCAGGTCATG	5.3
	TTCCTCCCCAG	
4	CTGGGAGGGAGGGAGGGAGGGA TGCATCCAGGTCATG	5.3
	TTTCCCTCCCAG	

*Последовательность аптамера EAD2 подчеркнута.

Из литературы хорошо известно, что активность экзонуклеазы III зависит от концентрации ионов Mg^{+2} [182-183]. Более того, трехмерная структура G-квадруплексов и их способность реагировать с гемином также зависит от природы и концентрации солей [184]. Дополнительно, концентрация Mg^{+2} может оказывать влияние на энергию взаимодействия нуклеотидов в стебле зонда. Учитывая вышеперечисленное, исследовался эффект концентрации хлорида магния на хемилюминесценцию, образующуюся в процессе гидролиза экзонуклеазой III субстрата **3**. Предпочтительная концентрация $MgCl_2$ лежит в диапазоне 3-10 мМ, так как при данных концентрациях значение предела обнаружения активности экзонуклеазы III было минимальным (Рис. 16).



Рис. 15. Зависимость хемилюминесцентного сигнала от температуры проведения реакции гидролиза субстрата в методе определения активности экзонуклеазы III, основанном на аллостерической активации ппДНКзима. [Условия: 1) отжиг 750 нМ субстрата **3** в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂, 2) добавление 1 к 1 (об.) к раствору п.1 0 или 0.15 мкМ экзонуклеазы III в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂, инкубация 1 час при разных температурах, 3) добавление 1 к 2 (об.) к раствору п.2 750 нМ гемина в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl, 60 мМ KCl и 0.06% (о/о) Тритон X100, инкубация 40 минут при комнатной температуре]. Представленная хемилюминесцентная интенсивность рассчитана как разница сигналов, полученных при внесении в реакцию 0.15 мкМ экзонуклеазы III и в отсутствие экзонуклеазы III в реакции.



Рис. 16. Зависимость предела обнаружения активности экзонуклеазы III от концентрации MgCl₂ в реакционной среде в методе определения активности экзонуклеазы III, основанном на аллостерической активации ппДНКзима. [Условия: 1) отжиг 750 нМ субстрата **3** в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 0.3 - 10 мМ MgCl₂, 2) добавление 1 к 1 (об.) к раствору п.1 0-0.15 мкМ экзонуклеазы III в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 0.3 - 10 мМ MgCl₂, 2) добавление 1 к 1 (об.) к раствору п.1 0-0.15 мкМ экзонуклеазы III в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 0.3 - 10 мМ MgCl₂, инкубация 1 час при 37° С, 3) добавление 1 к 2 (об.) к раствору п.2 750 нМ гемина в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl, 60 мМ KCl и 0.06% (о/о) Тритон X100, инкубация 40 минут при комнатной температуре].

Дополнительно исследовалось влияние концентраций гемина и субстрата **3** на эффективность анализа экзонуклеазы III. Варьирование концентрации гемина в диапазоне от 75 до 750 нМ повышало хемилюминесцентный сигнал и тем самым повышало коэффициент чувствительности анализа (Рис. 17). В то же время, какого-либо влияния концентрации гемина на предел обнаружения экзонуклеазной активности не зафиксировано. Следует отметить, что дальнейшее повышение концентрации гемина приводит к повышению фонового сигнала и ухудшению аналитических параметров метода. Подобная тенденция наблюдалась и при увеличении концентрации субстрата **3** в диапазоне 188 – 750 нМ (Рис. 18). Последующие эксперименты проводились с использованием растворов гемина и субстрата **3**, концентрация которых была равна 750 нМ.



Рис. 17. Зависимость хемилюминесцентного сигнала (черные столбцы) и фона (серые столбцы) от концентрации гемина в методе определения активности экзонуклеазы III, основанном на аллостерической активации ппДНКзима. [Условия: 1) отжиг 750 нМ субстрата **3** в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂, 2) добавление 1 к 1 (об.) к раствору п.1 0 или 0.15 мкМ экзонуклеазы III в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂, инкубация 1 час при 37°С, 3) добавление 1 к 2 (об.) к раствору п.2 75-750 нМ гемина в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 0.06% (о/о) Тритон X100, инкубация 40 минут при комнатной температуре]. Представленный хемилюминесцентный сигнал получен при внесении в реакцию 0.15 мкМ экзонуклеазы III, фоновый сигнал получен в отсутствии экзонуклеазы III.



Рис. 18. Зависимость хемилюминесцентного сигнала (черные столбцы) и фона (серые столбцы) от концентрации субстрата **3** в методе определения активности экзонуклеазы III, основанном на аллостерической активации ппДНКзима. [Условия: 1) отжиг 188 - 750 нМ субстрата **3** в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂, 2) добавление 1 к 1 (об.) к раствору п.1 0 или 0.15 мкМ экзонуклеазы III в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂, 2) добавление 1 к 1 (об.) к раствору п.1 0 или 0.15 мкМ экзонуклеазы III в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂, инкубация 1 час при 37°С, 3) добавление 1 к 2 (об.) к раствору п.2 750 нМ гемина в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl, 60 мМ KCl и 0.06% (о/о) Тритон X100, инкубация 40 минут при комнатной температуре]. Представленный хемилюминесцентный сигнал получен при внесении в реакцию 0.15 мкМ экзонуклеазы III, фоновый сигнал получен в отсутствии в реакции экзонуклеазы III.

Вышеописанные эксперименты проводились по двухэтапной схеме, где сначала осуществляли реакцию гидролиза субстрата, после чего в реакцию вносили гемин. После объединения 2 этапов в один (одноэтапная схема), предел обнаружения активности экзонуклеазы III снизился в два раза - с 10 до 4.8 (7.3 нМ) Ед./мл. Градуировочные кривые, полученные обоими методами, представлены на Рис. 19. При проведении одноэтапного анализа при 37 °C значение коэффициента вариации достигало 20%, тогда как использование более низкой температуры - 25 °C позволило понизить данное значение до 6%. Подобные пределы обнаружения (5-10 Ед.акт./мл) указываются и в других работах [184-185]. Более того, в некоторых работах описаны методы с более низкими значениями предела обнаружения (0.0003 – 0.04 Ед.акт./мл) [186-188].

В связи с этим следует отметить, что сопоставление значений предела обнаружения, выраженных Ед.акт./мл, не совсем корректно, так как в разных работах специфическая активность экзонуклеазы III определялась в отношении различных субстратов и при разных экспериментальных условиях. В этом случае, активность одного и того же ферментного препарата будет иметь различные численные значения, выраженные в Ед.акт./мл. С нашей точки зрения, значительно правильнее было бы сравнивать значения пределов обнаружения, выраженные в концентрационных (молярных) единицах. Увы, в литературе нам не удалось обнаружить пределы обнаружения для методов определения экзонуклеазы III, выраженные в молярных концентрациях.



Рис. 19. Градуировочная кривая определения активности экзонуклеазы III методом, основанным на аллостерической активации ппДНКзима при использовании **A)** двухэтапной схемы, **b)** одноэтапной схемы. [Условия: 1) отжиг 750 нМ субстрата **3** в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂, **A)** 2)добавление 1 к 1 (об.) к раствору п.1 0-0.2 Ед./мл экзонуклеазы III в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂, инкубация 1 час при 37°С, 3) добавление 1 к 2 (об.) к раствору п.2 750 нМ гемина в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 0.06% (о/о) Тритон X100, инкубация 40 минут при 25°С, **b)** 2)добавление 1 к 1 (об.) к раствору п.1 0-0.2 Ед./мл экзонуклеазы III в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂, 3) добавление 1 к 2 (об.) к раствору п.2 750 нМ гемина в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂, 3) добавление 1 к 2 (об.) к раствору п.2 750 нМ гемина в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂, 3) добавление 1 к 2 (об.) к раствору п.2 750 нМ гемина в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂, 3) добавление 1 к 2 (об.) к раствору п.2 750 нМ гемина в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂, 3) добавление 1 к 2 (об.) к раствору п.2 750 нМ гемина в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl и 3 мМ MgCl₂, 3) добавление 1 к 2 (об.) к раствору п.2 750 нМ гемина в 25 мМ трис, pH 7.7 с 200 мМ NaCl, 60 мМ КСl и 0.06% (о/о) Тритон X100, инкубация 100 минут при 25°C].

В целом, подводя итог данного фрагмента работы, можно отметить, что применение разработанной нами аналитической платформы, основанной на стратегии аллостерической активации ппДНКзима олигонуклеотидами, позволило успешно разработать простой в исполнении и моделировании, а также быстрый и чувствительный метод определения экзонуклеазы III, который может быть легко использован в условиях любой лаборатории.

Глава 5. Методы определения микроРНК с применением амплификационной реакции каталитической сборки шпилек

Как показано В предыдущем разделе этой работы, при использовании безамплификационного подхода предел обнаружения метода определения миРНК оказался равен 100 пМ. Между тем исследования показали, что в биологических жидкостях концентрации миРНК колеблятся фемтомолярном-пикомолярном В основном В концентрационном диапазоне [189]. Таким образом, полученное значение предела обнаружения сильно сужает спектр миРНК, потенциально определяемых в биоматериале с помощью описанного метода.

В связи с этим, для улучшения детектируемости миРНК мы решили разработать высокочувствительные методы определения с амплификацией аналитического сигнала. В первую очередь, амплификация проводилась на стадии реакции узнавания молекулы миРНК. Для этой цели мы использовали реакцию каталитической сборки шпилек (КСШ). Суть этого изотермического метода амплификации нуклеиновых кислот, основанного на катализируемом олигонуклеотидом-аналитом взаимодействии двух комплементарных шпилечных олигонуклеотидных последовательностей, детально описана в литературном обзоре (Раздел 3.4., Рис. 7 А). Такой выбор метода амплификации связан с тем, что КСШ, в отличие от ПЦР, проводится при постоянной температуре и без применения каких-либо ферментов. Это может сделать метод анализа более экономичным, а также позволяет избежать ложноположительных или ложноотрицательных сигналов из-за ингибирования активности ферментов и образования полимераза-зависимых неспецифических продуктов [118].

5.1. Метод определения микроРНК-141, основанный на реакции нКСШ

Из двух вариантов КСШ, описанных в литературном обзоре (Раздел 3.4), нами выбрана КСШ с некомплементарным противостоянием нуклеотидов (нКСШ), так как в этой модификации КСШ, согласно литературным данным, фоновая реакция реагирующих шпилек протекает с меньшим выходом [163].

Согласно теории нКСШ для метода определения модельной миРНК-141 с помощью программы Oligoanalyzer 3.1 смоделировали и синтезировали два шпилечных зонда: Ш1-Флу(141) (5'-TCTGGTAAAGATGGCTCAATACACTGTCCATCTTTACCAGACAGTGTTA-3'-Флу) и Ш2-Био(141) (5'-CTCAATACACTGTCACGTAAAGATGGACAGTGTATTGAGCCA TCTTT- 3'- Био). Вторичные структуры этих зондов представлены на Рис. 20. Олигонуклеотид Ш1-Флу(141) играл роль захватывающего зонда. Флу-заместитель использовался нами для «посадки» Ш1 на поверхность нерастворимого носителя, несущего иммобилизованные антитела против Флу (анФлуАт), за счет антиген-антительного взаимодействия, в то время как биотиновая метка в Ш2-Био(141) использовалась для оценки количества образующегося в нКСШ продукта.

Гетерогенный формат амплифицированного метода определения миРНК-141 выбрали по следующим причинам. Во-первых, известно, что гетерогенные методы, хотя и более времязатратны, часто имеют более высокую чувствительность. Во-вторых, если в гомогенном анализе реальных образцов возможно матричное влияние компонентов образцов на детектирующую систему, то в гетерогенных методах такое влияние практически сведено к нулю. Это привело нас к пониманию перспективности разработки именно гетерогенного метода.



Рис. 20. Вторичные структуры зондов А) Ш1-Флу(141) и Б) Ш2-Био(141). Красными точками обозначены комплементарные пары азотистых оснований G-C, синими – пары А-Т. Моделирование структур проведено с помощью программы Oligoanalyzer 3.1.

Общая схема реакции нКСШ представлена на Рис. 21. В своей закрытой шпилечной форме зонды не имеют свободных от дуплекса участков, комплементарных друг другу, в связи с чем их взаимодействие кинетически затруднено. В присутствие миРНК-141, частично комплементарной хвосту в шпильке Ш1-Флу, происходит раскрытие шпилечной структуры последнего с образованием дуплекса (Рис. 22 А). Благодаря этому из шпилечной структуры Ш1-

Флу(141) высвобождается фрагмент, комплементарный хвосту шпилечной структуры второго зонда Ш2-Био(141). Реакция гибридизации между данным фрагментом и хвостом Ш2-Био(141) инициирует реакцию замещения с образованием дуплекса между двумя зондами, так как энергия связывания такого дуплекса выше, чем дуплекса первого зонда с миРНК (Рис. 22 Б). В результате этого процесса из дуплекса замещается молекула миРНК-141, способная далее инициировать раскрытие другой молекулы зонда Ш1-Флу(141). Таким образом, одна молекула аналита способна инициировать образование множества дуплексов зондов.



Рис. 21. Схема реакции нКСШ в методе определения микроРНК-141.



Рис. 22. Вторичные структуры А) дуплекса Ш1(141) и микроРНК-141, Б) дуплекса Ш1(141) и Ш2(141). Жирным выделен фрагмент последовательности Ш1(141), раскрывающий шпилечную структуру Ш2(141). Подчеркнуты фрагменты последовательностей, входящие в стебли шпилечных структур олигонуклеотидов до образования дуплексов.

Аналит-зависимое взаимодействие шпилечных зондов подтвердили с помощью электрофореза (Рис. 23). В отсутствие миРНК-141 наблюдается слабая полоса, соответствующая дуплексу зондов, сформированному в процессе фоновой реакции (дорожка 2). С увеличением концентрации аналита повышается интенсивность полосы, соответствующей дуплексу Ш1-

Флу(141)/Ш2-Био(141) и одновременно становится все более блеклой полоса непрореагировавшего первого зонда (дорожки 3-4). Это говорит о аналит-катализируемом взаимодействии шпилечных зондов.



Рис. 23. Идентификация продуктов амплификационной реакции нКСШ неденатурирующим ПААГ электрофорезом. Дорожка 1 - 300 нМ Ш1-Флу(141); дорожки 2 - 4 - продукты реакции нКСШ, проведенной в присутствии 0, 30 и 300 нМ миРНК-141, соответственно. Видимые полосы соответствуют флуоресценции метки в Ш1-Флу(141).

Дополнительная амплификация аналитического сигнала проводилась на стадии детекции, где для определения продуктов реакции КСШ, меченных биотином, использовался коммерческий коньюгат стрептавидина и полипероксидазы хрена с молярным соотношением его компонентов 1:80. Применение такого коньюгата позволяет значительно повысить число молекул пероксидазы на каждый биотиновый остаток. Более того, амплификация аналитического сигнала происходила и на этапе определения пероксидазной активности коньюгата за счет применения реакции усиленной хемилюминесценции с использованием фенотиазиновых усилителей в сочетании с 4-морфолинопиридином [60]. Высокая эффективность такой стратегии хемилюминесцентной детекции аналитического сигнала ранее была продемонстрирована в нашей лаборатории при разработке гетерогенного метода определения ДНК олигонуклеотидов [190]. Таким образом, в сконструированном нами гетерогенном хемилюминесцентном методе проводилась тройная амплификация сигнала.

5.1.1. Сравнение микропланшета и магнитных частиц в методе определения микроРНК-141, основанном на гомогенной реакции нКСШ

В качестве нерастворимого носителя ΜЫ выбрали непрозрачный (черный) полистирольный 96-луночный хорошо себя зарекомендовавший планшет, В хемилюминесцентном иммуноферментном анализе [58]. Преимущество микропланшета состоит в том, что это коммерчески доступный и высокостандартизованный продукт. Последнее свойство чрезвычайно важно для точности и воспроизводимости разрабатываемого метода анализа. Кроме того, аналитические подходы с использованием микропланшета легко автоматизируются, что является ключевым требованием к современной массовой диагностике населения.

Как уже отмечалось в обзоре литературы (Раздел 2.3), в последние годы в гетерогенных методах анализа активно используются магнитные частицы (МЧ). В качестве главного аргумента в пользу применения МЧ указывается их высокоразвитая поверхность, что позволяет создавать в реакционном растворе повышенные концентрации захватывающего компонента. Предполагается, что при высоких концентрациях захватывающего компонента должна повышаться эффективность экстрагируемости аналита из реакционного раствора, что, в свою очередь, усиливает чувствительность методов с использованием таких носителей. В то же время, в литературе отсутствуют работы, экспериментально подтверждающие эту концепцию. Такое положение вещей подтолкнуло нас к проведению сравнения однотипных методов анализа миРНК-141, разработанных с применением МЧ и микропланшета.

Синтез конъюгатов магнитных частиц с антителами к флуоресцеину

Для конструирования метода анализа с применением МЧ на первом этапе нами были получены конъюгаты МЧ и анФлуАт. Для синтеза ковалентных конъюгатов анФлуАт-МЧ карбодиимидным методом использовались сферические карбоксилированные МЧ со средним диаметром 440 нм (согласно данным производителя). МЧ состоят из нескольких кристаллов Fe₃O₄ размером 20-40 нм, включенных в полимерную оболочку. Применение таких частиц обеспечивает как хорошие магнитные свойства, так и подходящую поверхность для иммобилизации антител.

Для оптимизации условий синтеза анФлуАт-МЧ в реакционной среде проводилось варьирование концентрации анФлуАт в диапазоне от 25 до175 мкг/мл анФлуАт. Эффективность синтеза конъюгатов анФлуАт с МЧ оценена двумя способами. В первом способе проведена реакция синтезированных анФлуАт-МЧ с конъюгатом пероксидазы с поликлональными антителами к иммуноглобулинам мыши. После удаления избытка пероксидазного конъюгата методом усиленной хемилюминесценции оценивалась пероксидазная активность образовавшихся комплексов. Как видно на Рис. 24, увеличение концентрации анФлуАт в 50 мкг/мл реакционной среде вплоть до приводило К резкому повышению хемилюминесцентного сигнала; дальнейшее повышение концентрации анФлуАт почти не влияло на величину сигнала. Следует отметить, что в отдельном эксперименте

62

продемонстрировано отсутствие какого-либо влияния используемых МЧ на пероксидазакатализируемую хемилюминесценцию.

Во втором способе вместо конъюгата пероксидазы с поликлональными антителами к иммуноглобулинам мыши использован олигонуклеотидный дуплекс, аналогичный формируемому в нКСШ. Дуплекс был мечен флуоресцеином для взаимодействия с анФлуАт-МЧ и биотином для взаимодействия с проявляющим конъюгатом. Проведена реакция исследуемых конъюгатов анФлуАт-МЧ с модельным олигонуклеотидным дуплексом, меченым флуоресцеином и биотином (ФлуДупБио). Результаты анализа, полученные 1 и 2 способами, полностью соответствовали друг другу и показали наличие ковалентно иммобилизованных анФлуАт на поверхности МЧ (Рис. 24). Учитывая полученные результаты, синтез конъюгата проводили с внесением в реакцию 175 мкг/мл анФлуАт.



Рис. 24. Эффект концентрации анти-флуоресцеиновых антител, внесенных в реакционную среду при синтезе конъюгатов анФлуАт-МЧ, на хемилюминесцентный сигнал, получаемый при взаимодействии анФлуАт-МЧ с конъюгатом пероксидазы с антимышиными антителами (разведение 1 : 10 000) (черные столбцы) или после последовательного взаимодействия с ФлуДупБио (10 нМ) и конъюгатом стрептавидина с полипероксидазой (разведение 1 : 100 000) (серые столбцы). Средние значения фоновой хемилюминесценции, полученные в отсутствие ФлуДупБио или анФлуАт-МЧ были схожи и не превышали 4500 у.е. во всех случаях.

Наличие активного конъюгата анФлуАт-МЧ позволило нам задаться вопросом, как варьирование его концентрации в реакционном растворе влияет на уровень аналитического сигнала. Эксперимент проводился с ФлуДупБио с концентрациями 10 и 100 нМ. Зависимости хемилюминесценции от концентрации анФлуАт-МЧ имели колоколообразный характер и не зависели от концентрации использованного проявляющего дуплекса ФлуДупБио (Рис. 25). Низкая концентрация конъюгатов анФлуАт-МЧ недостаточна для получения максимального сигнала. Увеличение концентрации приводит к повышению интенсивности сигнала, после чего сигнал начинает снижаться при концентрации частиц выше 2.3 × 10⁹ частиц/мл. Причины данного явления нами не исследовались. Однако это может быть связано с агрегацией МЧ в растворах с высокой концентрацией. В то же время мы полагаем, что при использовании МЧ с иными агрегатными характеристиками значение оптимальной концентрации может отличаться от найденного нами.



Рис. 25. Зависимость хемилюминесции от концентрации и площади поверхности конъюгата К-175 при детекции ФлуДупБио в концентрации 100 нМ (черная кривая) и 10 нМ (серая кривая). Сигнал измерен после проведения обработки носителя раствором конъюгата стрептавидинполипероксидаза (разведение 1 : 100 000). Средние значения фона, полученные в отсутствие ФлуДупБио или анФлуАт-МЧ были схожи и не превышали 4500 у.е. во всех случаях.

Полученное поведение данной зависимости позволило заключить, что предположение о том, что большее количество частиц в реакционной среде приводит к более высоким сигналам и чувствительности анализа корректно только до определенного уровня концентрации МЧ, после чего данное утверждение становится неверным. В связи с этим, для получения максимальной чувствительности в методах анализа с применением МЧ мы рекомендуем проводить оптимизацию их концентрации.

Как указано выше, в данной работе оптимальная концентрация составила 2.3 × 10⁹ частиц/мл. Расчеты показали, что полная поверхность частиц при данной концентрации составляет 65 мм².

При применении микропланшета иммобилизация анФлуАт проводилась физической сорбцией на поверхность лунки. В лунку планшета вносилось 50 мкл раствора антител, так как в таком случае площадь поверхности лунки микропланшета, задействованной в анализе,

численно равняется площади полной поверхности частиц (65 мм²) при их оптимальной концентрации.

Для сравнения эффективности микропланшета и МЧ при определении миРНК-141 получены две градуировочные кривые, где в гомогенной фазе проводилась нКСШ, а дуплексный продукт реакции иммобилизовали либо в лунки планшета, либо к конъюгатам анФлуАт-МЧ (Рис. 26).



Рис. 26. Схема сравнения планшета и магнитных частиц в анализе микроРНК-141 с применением гомогенной реакции нКСШ.

Основываясь на данных Рис. 27 можно заключить, что градуировочные кривые, полученные с двумя типами носителей, идентичны, т.е. какие-либо аналитические преимущества использования МЧ по сравнению с использованием микропланшетов не обнаружены. В то же время отмечено, что работа с МЧ занимает больше времени и является более сложной в исполнении, чем работа с микропланшетом. Таким образом, в дальнейших работах по конструированию новых гетерогенных методов для определения миРНК в качестве носителя использовались микропланшеты.



Рис. 27. Градуировочные зависимости определения микроРНК-141 методом, основанным на гомогенной реакции нКСШ с использованием микропланшета (серые точки) и магнитных частиц (черные точки). [Условия: отжиг 100 нМ Ш1-Флу(141) в 10 мМ трис, рН 7.2 с 600 мМ NaCl, отжиг 100 нМ Ш2-Био(141) в 10 мМ трис, рН 7.2 с 600 мМ NaCl, реакция нКСШ с 8 нМ Ш1-Флу(141) и 40 нМ Ш2-Био(141) в 10 мМ трис, рН 7.2 с 600 мМ NaCl. Используемое разведение конъюгата стрептавидин-полипероксидаза 1 : 100 000].

5.1.2. Метод определения микроРНК-141, основанный на гетерогенной реакции нКСШ.

Достигнутый при помощи гомогенной реакции нКСШ предел обнаружения миРНК-141 составил 20 пМ. Эта величина в 5 раз ниже, чем предел обнаружения метода, основанного на аллостерической активации ппДНКзима.



Рис. 28. Схема метода определения микроРНК, основанного на амплификационной гетерогенной реакции нКСШ.

В то же время, возможен другой вариант проведения реакции, когда Ш1-Флу(141) предварительно иммобилизуется в лунки планшета, а реакция каталитической сборки шпилек с микроРНК-141 и Ш2-Био(141) проходит в гетерогенном формате (Рис. 28). Мы решили попробовать провести определение микроРНК-141 с применением гетерогенной реакции нКСШ.

Оптимизация условий отжига зондов метода нКСШ для определения микроРНК-141

Параллельно с конструированием метода определения микроРНК с применением гетерогенной реакции нКСШ решалась задача по предотвращению неспецифического взаимодействия реагирующих шпилек. Одной из возможных причин данного взаимодействия, согласно нашему предположению, может служить образование шпилек с дефектными структурами. Шпилечные структуры формируются на стадии отжига зондов (в нашем случае нагревание до 88 °С и постепенное охлаждение). Следует отметить, что в литературе с применением метода КСШ условия отжига никогда не обсуждаются, а зачастую и в принципе не указываются [191-193], что указывает на полное игнорирование роли отжига в формировании шпилечной структуры. В связи с этим нами было исследовано влияние ряда факторов на интенсивность хемилюминесценции, образующейся в гетерогенном методе определения миРНК-141, основанном на реакции нКСШ.

Известно, что присутствие NaCl и MgCl₂ увеличивает энергию Гиббса формирования стебля шпилечной структуры, тем самым ее стабилизируя. Мы предположили, что внесение таких солей к растворам шпилечных зондов на этапе их отжига может снизить фоновую реакцию и не столь сильно повлиять на специфичную.

В качестве среды отжига зондов мы применили 10 мМ трис, 7.2, широко используемый как буфер отжига [194 - 195]. Эффект внесенной в среду отжига зондов концентрации NaCl на специфичный и фоновый сигналы, а также получаемый в методе анализа миPHK-141 предел обнаружения представлен на Рис. 29. Внесение 300 мМ NaCl в среду отжига Ш1-Флу(141) приводило к двукратному уменьшению специфичного сигнала (Рис. 29 А). Дальнейшее увеличение концентрации NaCl уже не влияло на его интенсивность. Падение интенсивности фонового сигнала, в свою очередь, продолжалось при увеличении концентрации NaCl в среде отжига до 900 мМ. При отжиге Ш1-Флу(141) в буфере без NaCl за счет повышенного фонового сигнала наблюдается высокое значение предела обнаружения (около 10 пМ). Минимальное значение предела обнаружения достигается при увеличении концентрации NaCl до 600 мМ и при дальнейшем ее повышении до 900 мМ уже не меняется. Внесение NaCl в буфер отжига Ш2-Био(141) в меньшей степени, но также приводило к падению фонового сигнала и при этом

практически не меняло интенсивность специфичного сигнала (Рис. 29 Б). Такое поведение фонового сигнала отразилось и на получаемом значении предела обнаружения, которое снизилось до минимально наблюдаемого уровня при внесении NaCl в среду отжига Ш2-Био(141) до 300 мМ.



Рис. 29. Зависимость хемилюминесцентного сигнала при 50 пМ аналита (черные столбцы), фонового сигнала (серые столбцы) и предела обнаружения (штрихованные столбцы) от концентрации NaCl в среде отжига **A)** Ш1-Флу(141), **Б)** Ш2-Био(141). [Условия: отжиг 30 нМ Ш1-Флу(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с (**A** - разными концентрациями, **Б** - 300 мМ) NaCl, иммобилизация 30 нМ Ш1-Флу(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 300 мМ NaCl, отжиг

Ш2-Био(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с (**A** - 300 мМ, **Б** - разными концентрациями) NaCl, реакция нКСШ с 20 нМ Ш2-Био(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с (**A** - 300 мМ, **Б** - 600 мМ) NaCl. Используемое разведение конъюгата стрептавидин-полипероксидаза 1 : 200 000].

Аналогичное исследование проводилось при добавлении $MgCl_2$ в среды отжига обоих шпилечных зондов (Рис. 30). Увеличение концентрации $MgCl_2$ приводило к уменьшению специфичного и, в большей степени, фонового сигналов. При этом даже при применении меньших концентраций $MgCl_2$ оказывал более сильный эффект, чем NaCl. Так, при добавлении 3 мМ $MgCl_2$ в среду отжига Ш1- Φ лу(141) специфичный сигнал уменьшился в 2 раза, тогда как фоновый - более чем в 8 (Рис. 30 A). Предел обнаружения миРНК-141 понизился в 10 раз. С дальнейшим повышением концентрации $MgCl_2$ вплоть до 20 мМ наблюдалось продолжение уменьшения фона, тогда как специфичный сигнал уже не менялся. Вместе с фоновым сигналом снижался и получаемый предел обнаружения, минимум которого был также достигнут при увеличении концентрации соли магния до 20 мМ $MgCl_2$. При варьировании $MgCl_2$ в среде отжига Ш2-Био(141) получен несколько иной характер зависимости исследуемых параметров от концентрации соли (Рис. 30 Б). При увеличении концентрации $MgCl_2$ до 10 мМ сигнал снизился менее, чем на 20%, фон - в 2 раза, а при дальнейшем повышении концентрации соли наблюдалось небольшое возрастание сигнала и фона. Предел обнаружения, в свою очередь, достиг своего минимума при 10 мМ MgCl₂, а при дальнейшем повышении соли до 30 мМ уже не менялся.



Рис. 30. Зависимость хемилюминесцентного сигнала при 50 пМ аналита (черные столбцы), фонового сигнала (серые столбцы) и предела обнаружения (штрихованные столбцы) от концентрации MgCl₂ в среде отжига **A)** Ш1-Флу(141), **Б)** Ш2-Био(141). [Условия: отжиг 30 нМ Ш1-Флу(141) в 10 мМ трис, рН 7.2 (**A** - с разными концентрациями MgCl₂, **Б** - с 20 мМ MgCl₂), иммобилизация 30 нМ Ш1-Флу(141) в 10 мМ трис, рН 7.2 с 20 мМ MgCl₂, отжиг 100 нМ Ш2-Био(141) в 10 мМ трис, рН 7.2 с (**A** - 10 мМ MgCl, **Б** - разными

концентрациями MgCl₂) реакция нКСШ с 20 нМ Ш2-Био(141) в 10 мМ трис, рН 7.2 с 10 мМ

MgCl₂. Используемое разведение конъюгата стрептавидин-полипероксидаза 1 : 200 000].

Полученные результаты позволили предположить, что более выраженные зависимости исследуемых параметров от концентрации NaCl и MgCl₂ в случае их варьирования в среде отжига Ш1-Флу(141), чем в среде отжига Ш2-Био(141), могут быть связаны с тем, что после проведения отжига Ш1-Флу(141) иммобилизуется на планшет. Иммобилизация зонда может оказывать дестабилизирующее влияние на его структуру, которое компенсируется ее стабилизацией посредством увеличения концентрации NaCl или MgCl₂ в среде отжига. В случае же отжига Ш2-Био(141), в силу отсутствия дестабилизирующего фактора иммобилизации, зависимость исследуемых параметров от концентрации NaCl или MgCl₂ в среде отжига менее выражена. С учетом полученных данных, в ходе дальнейшей работы отжиг Ш1-Флу(141) и Ш2-Био(141) проводился в 10 мМ трис, pH 7.2, смешанном с 20 мМ и 10 мМ MgCl₂, соответственно.

С другой стороны, шпилечные зонды могут формировать димеры. Это может привести к повышенной реакционной способности зондов (в силу энтропийного фактора) что, в свою очередь, повышает фоновый сигнал в анализе. Свободная энергия образования шпилечной структуры в результате внутримолекулярного взаимодействия ниже, чем энергия образования димера по бимолекулярной реакции, однако даже низкие концентрации димера могут инициировать фоновую реакцию нКСШ. В соответствии с теорией бимолекулярных реакций выход димера становится выше в более концентрированных растворах зонда. Эти соображения натолкнули нас на исследование интенсивности специфичного и фонового сигналов, а также предела обнаружения миРНК-141 от концентрации шпилечных зондов при их отжиге.

Найдено, что с понижением концентраций Ш1-Флу(141) и Ш2-Био(141) при их отжиге наблюдается уменьшение специфичных и в большей мере фоновых сигналов (Рис. 31). Так, в случае отжига Ш1-Флу(141) при уменьшении его концентрации с 1000 до 30 нМ сигнал уменьшается менее чем в 2 раза, тогда как фон - более чем в 10 раз (Рис. 31 А). Подобные соотношения наблюдаются и при снижении концентрации Ш2-Био(141) при ее отжиге с 800 до 100 нМ (Рис. 31 Б). Достигаемые пределы обнаружения микроРНК-141, в свою очередь, планомерно уменьшаются со снижением концентрации отжига Ш1-Флу(141) до 30 нМ и Ш2-Био(141) до 200 нМ. Таким образом, полученные результаты однозначно указывают на верность нашей гипотезы. В дальнейшей работе отжиг Ш1-Флу(141) и Ш2-Био(141) проводился с использованием 30 нМ и 100 нМ растворов, соответственно. В случае Ш1-Флу(141) концентрации ниже 30 нМ не применялись, так как данная концентрация использовалась нами на этапе сорбции Ш1-Флу(141) на планшет. Ранее показано, что данная концентрация оптимальна при иммобилизации флуоресцеин-меченых олигонуклеотидов на планшет с иммобилизованными анФлуАт [196]. Отжиг Ш2-Био(141) при концентрациях ниже 100 нМ не влиял на фон.



Рис. 31. Зависимость хемилюминесцентного сигнала при 50 пМ аналита (черные столбцы), фонового сигнала (серые столбцы) и предела обнаружения (штрихованные столбцы) от концентрации **A)** Ш1-Флу(141), **Б)** Ш2-Био(141) при отжиге.

[Условия: отжиг (**A** - разных концентраций, **Б** - 30 нМ) Ш1-Флу(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, иммобилизация 30 нМ Ш1-Флу(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, отжиг Ш2-Био(141) (**A** - 100 нМ, **Б** - разных концентраций) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 10 мМ MgCl₂, реакция нКСШ с 20 нМ Ш2-Био(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 10 мМ MgCl₂. Используемое разведение конъюгата стрептавидин-полипероксидаза 1 : 200 000].

Таким образом, оптимальные условия отжига Ш1-Флу(141) и Ш2-Био(141) оказались следующими: 30 нМ Ш1-Флу(141) и 100 нМ Ш2-Био(141) отжигаются в 10 мМ трис, рН 7.2, смешанном с 20 мМ MgCl₂ и 10 мМ MgCl₂, соответственно.

Так как в среде отжига зондов содержится $MgCl_2$, реакционный раствор, в котором проводится нКСШ, также содержит $MgCl_2$, что, в свою очередь, может оказывать влияние на эффективность взаимодействия зондов. В связи с этим концентрация $MgCl_2$ в реакционной среде также была оптимизирована. Как видно на Рис. 32 А, увеличение концентрации $MgCl_2$ приводило к увеличению как сигнала, так и фона. Достигаемый предел обнаружения имеет минимум в диапазоне 10-20 мМ $MgCl_2$ и далее повышается. С учетом найденного, реакция нКСШ проводилась в буферном растворе с добавлением10 мМ $MgCl_2$.

Слишком низкие концентрации зонда Ш2-Био(141), введенные в реакцию нКСШ, могут в силу низкой эффективности реакции ухудшать чувствительность определения аналита. Нарушение баланса в сторону высоких концентраций, в свою очередь, интенсифицирует фоновый процесс, который также способен ухудшить наблюдаемую детектируемость. Для определения оптимума проварьирована вводимая в реакцию нКСШ концентрация Ш2-Био(141) (Рис. 32 Б). Можно видеть, что с увеличением концентрации Ш2-Био(141) синхронно возрастают сигнал и фон. При этом наблюдается минимум рассчитанных пределов обнаружения миРНК, который соответствует 20 нМ Ш2-Био(141).



Рис. 32. Зависимость хемилюминесцентного сигнала при 50 пМ аналита (черные столбцы), фонового сигнала (серые столбцы) и предела обнаружения (штрихованные столбцы) от концентрации **A)** MgCl₂, **Б)** Ш2-Био(141) в среде реакции нКСШ для определения микроРНК-141.

[Условия: отжиг 30 нМ Ш1-Флу(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, иммобилизация 30 нМ Ш1-Флу(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, отжиг 100 нМ Ш2-Био(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 10 мМ MgCl₂, реакция нКСШ с (**A** - 20 нМ, **Б** - разными концентрациями) Ш2-Био(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с (**A** - разными концентрациями, **Б** - 10 мМ) MgCl₂. Используемое разведение конъюгата стрептавидин-полипероксидаза 1 : 200 000].

Аналитические параметры метода определения микроРНК-141, основанного на гетерогеннной реакции нКСШ

В оптимизированных условиях градуировочная зависимость определения миРНК-141 (Рис. 33) описывается следующей формулой:

 $y = \frac{ax}{b+x} + \frac{cx}{d+x}$ (R²=0.9978), где *a*, *b*, *c* и *d*, соответственно, 2x10⁶, 0.12, 6x10⁷ и 365.

Данное уравнение может быть использовано для расчета концентраций миРНК-141 в образце. Кривые подобного характера описаны ранее для методов анализа миРНК с применением КСШ [197-198]. Анализ градуировочной зависимости показал, что при изменении концентрации аналита от 1 до 100 пМ интенсивность хемилюминесценции возрастает в 8 раз, в то время как в большинстве ранее описанных методов определения миРНК значение сигнала изменяется лишь в 3-4 раза при изменении концентрации аналита в диапазоне 6-7 порядков [199-203]. Это говорит о высокой точности разработанного метода.

Рассчитанный методом 3σ предел обнаружения миРНК-141 составил 100 фМ. Нижний предел рабочего диапазона - 1 пМ (определен методом 10 σ). Коэффициент вариации в рабочем диапазоне не превышал 12%. Следует отметить, что от 10 до 100 пМ миРНК-141 на представленной зависимости наблюдается линейный участок зависимости с высоким значением коэффициента чувствительности, равным 100 000 пМ⁻¹. Следует подчеркнуть, что переход от гомогенной к гетерогенной нКСШ позволил улучшить детектируемость миРНК в 200 раз. Мы полагаем, что это связано с отсутствием в гетерогенной схеме конкуренции между продуктовыми дуплексами и непрореагировавшими зондами Ш1-Флу(141) при иммобилизации, снижающей чувствительность анализа. Учитывая полученные результаты, мы сосредоточились на более углубленном изучении характеристик метода с применением гетерогенной реакции нКСШ.

Важно заметить, что если в нКСШ зонды Ш1(141) и Ш2(141) поменять местами, т.е вместо захватывающего зонда Ш1(141) и детектирующего зонда Ш2(141) использовать захватывающий зонд Ш2(141) и детектирующий зонд Ш1(141), градуировочная кривая не меняется.


Рис. 33. Градуировочная зависимость определения микроРНК-141 методом, основанным на гетерогенной реакции нКСШ в А) линейных, Б) полулогарифмических координатах. [Условия: отжиг 30 нМ Ш1-Флу(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, иммобилизация 30 нМ Ш1-Флу(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, отжиг 100 нМ Ш2-Био(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 10 мМ MgCl₂, реакция каталитической сборки шпилек с 20 нМ Ш2-Био(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 10 мМ MgCl₂. Используемое разведение конъюгата стрептавидин-полипероксидаза 1 : 100 000].

Исследование специфичности метода определения микроРНК-141, основанного на реакции нКСШ

Поскольку последовательности миРНК имеют высокую гомологию, а количество различных микроРНК в биологических образцах велико, на практике можно использовать исключительно высокоспецифичные методы [204]. Специфичность разработанного метода анализа протестирована с использованием миРНК-141 (совершенный аналит) и 5 других миРНК, таких как миРНК-200a, миРНК-200b, миРНК-200c и миРНК-429 (Таблица 2). Следует отметить, что все указанные микроРНК принадлежат к одному семейству и являются наиболее гомологичными. К этому списку дополнительно добавлена миРНК-39. Это было сделано из-за того, что данную миРНК используют в качестве внешнего стандарта при анализе миРНК в биообразцах человека [205 -206].

Как показано на Рис. 34 разработанный нами метод анализа обнаруживает только миРНК-141 и миРНК-200а (наиболее гомологичная миРНК-141 в семействе). При этом перекрестная реактивность миРНК-200а, последовательность которой отличается от миРНК-141 всего на два нуклеотида (таблица 2), составляет менее 20% по сравнению с миРНК-141. Остальные миРНК с помощью нашего метода анализа не обнаруживались. Другими словами, его специфичность оказалась очень высокой. Следует также отметить, что многие методы анализа миРНК, разработанные с использованием КСШ, также показывают высокую специфичность [207 - 208].

Таблица 2. МикроРНК, использованные при исследовании специфичности метода определения микроРНК-141, основанного на гетерогенной реакции нКСШ. Подчеркнуты и выделены жирным нуклеотиды, отличающиеся от нуклеотидов последовательности микроРНК-141 в соответствующих положениях.

микроРНК	Последовательность (5'-3')
микроРНК-141	UAACACUGUCUGGUAAAGAUGG
микроРНК -200а	UAACACUGUCUGGUAA <u>C</u> GAUG <u>U</u>
микроРНК -200b	UAA <u>U</u> ACUG <u>C</u> CUGGUAA <u>U</u> GAUG <u>A</u>
микроРНК -200с	UAA <u>U</u> ACUG <u>C</u> C <u>G</u> GGUAA <u>U</u> GAUGG <u>A</u>
микроРНК -429	UAA <u>U</u> ACUGUCUGGUAAA <u>ACC</u> G <u>U</u>
микроРНК -39	U <u>C</u> AC <u>CGG</u> GU <u>G</u> U <u>AAAUC</u> AG <u>C</u> U <u>U</u> G



Рис. 34. Специфичность метода определения микроРНК-141, основанного на гетерогенной реакции нКСШ. [Условия: отжиг 30 нМ Ш1-Флу(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, иммобилизация 30 нМ Ш1-Флу(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, отжиг 100 нМ Ш2-Био(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 10 мМ MgCl₂, реакция нКСШ с 20 нМ Ш2-Био(141) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 10 мМ MgCl₂].

5.2. Методы определения микроРНК-155 и микроРНК-39, основанные на реакции нКСШ

Разработав гетерогенный метод определения миРНК-141 с использованием стратегии тройной амплификации, мы задались вопросом, насколько она универсальна для разработки методов определения различных миРНК. Для того чтобы ответить на этот вопрос, основываясь на данной стратегии мы разработали метод определения еще одной миРНК, связанной с развитием опухолей – миРНК-155 (5'-UUAAUGCUAAUCGUGAUGGGGUU-3'). Более того, в

целях дальнейшего применения для анализа миРНК-141 и миРНК-155 в клетках человека был разработан метод определения миРНК-39 (5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3'). Данная миРНК не присутствует в жидкостях и тканях человека, в связи с чем может быть применена в качестве внешнего стандарта при анализе в биообразцах человека.

Дизайн методов определения миРНК-155 и миРНК-39 аналогичен дизайну метода определения миРНК-141. Одинаковость протоколов проведения анализов для всех миРНК в дальнейшем представляла существенное удобство при проведении эксперимента по определению содержания нескольких исследуемых миРНК в образцах. По аналогии с вышеописанной системой детекции миРНК-141, смоделированы и синтезированы пары зондов миРНК-155 анализа И миРНК-39: Ш1-Флу(155) (5'-GTGATA лля GGGGTGACCGTAGATAATCGTCACCCCTATCACGATTAGCATTAA-3'-Флу), Ш2-Био(155) (5'-ССТАСАТААТССТСТТАССССТСАССС-3'-Био) и Ш1-Флу(39) (5'-ТGTAAATCAGCTTGATGTATTGGGTGTCAAGCTG ATTTACACCCGGTGA-3'-Флу) и Ш2-Био(39): (5'-ATGATATTGGGTGTTTATCAG СТТGACACCCAATATCATCAAGCTG-3'-Био). Вторичные структуры пар зондов и образуемых в реакции нКСШ дуплексов для систем определения миРНК-155 и миРНК-39 представлены на Рис. 35 и Рис. 36, соответственно.

Схема проведенной оптимизации методов определения миРНК-155 и миРНК-39 аналогична вышеописанной для метода определения микроРНК-141, и оптимизированные условия совпали для двух методов: отжиг и сорбция 30 нМ Ш1-Флу в 10 мМ трис, pH 7.2 с 10 мМ MgCl₂, отжиг 320 нМ Ш2-Био в 10 мМ трис, pH 7.2 с 10 мМ MgCl₂, реакция нКСШ с 160 нМ Ш2-Био в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂.

На Рис. 37 представлены градуировочные зависимости определения трех миРНК, полученные в оптимизированных условиях с помощью разработанных методов, основанных на реакции нКСШ. Как можно видеть, они расположены близко друг к другу (Рис. 37). Все три зависимости аппроксимируются одним типом уравнения: $y = \frac{ax}{b+x} + \frac{cx}{c+x}$ с параметрами a, b, c и d, указанными в Таблице 3. Рассчитанные аналитические параметры определения трех миРНК также получились близкими (Таблица 3).

Для исследования специфичности методов анализа миРНК-155 и миРНК-39, помимо задействованных в работе основных миРНК–аналитов (миРНК-141, миРНК-39 и миРНК-155), использованы часто встречающиеся в литературе миРНК-319а, миРНК-21 и миРНК-205 (таблица 4). При исследовании специфичности методов показано, что кросс-реактивность исследуемых аналитов для системы определения миРНК-155 относительно миРНК-155 ниже 1% (Рис. 38 А), а для системы определения миРНК-39 относительно миРНК-39 не выше 3%

(Рис. 38 Б). Полученные результаты говорят о высокой специфичности разработанных методов определения миРНК-155 и миРНК-39.

Таким образом, гетерогенная стратегия, основанная на тройной амплификации, продемонстрировала универсальность для разработки методов определения других миРНК, а также, что немаловажно, показала при этом близкие аналитические параметры.





Рис. 35. Вторичные структуры олигонуклеотидов в составе зондов A) Ш1-Флу(155) и Б) Ш2-Био(155) [Красными точками обозначены пары G-C, синими – связи А-Т. Моделирование структур проведено с помощью программы Oligoanalyzer 3.1], В) дуплекса Ш1-Флу(155) и микроРНК-141, Г) дуплекса Ш1-Флу(155) и Ш2-Био(155). Подчеркнуты фрагменты последовательностей, входящие в стебли шпилечных структур олигонуклеотидов до образования дуплексов.





Рис. 36. Вторичные структуры олигонуклеотидов в составе зондов А) Ш1-Флу(39) и Б) Ш2-Био(39) [Красными точками обозначены комплементарные пары G-C, синими – пары А-Т. Моделирование структур проведено с помощью программы Oligoanalyzer 3.1], В) дуплекса Ш1-Флу(39) и микроРНК-141, Г) дуплекса Ш1-Флу(39) и Ш2-Био(39). Подчеркнуты фрагменты последовательностей, входящие в стебли шпилечных структур олигонуклеотидов до образования дуплексов.



Рис. 37. Градуировочные зависимости определения микроРНК-141, микроРНК-39 (А) и микроРНК-155 (Б) методом, основанным на реакции нКСШ.

[Условия: **A**) отжиг 30 нМ Ш1-Флу(39) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, иммобилизация 30 нМ Ш1-Флу(39) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, отжиг 320 нМ Ш2-Био(39) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂; **b**) Условия: отжиг 30 нМ Ш1-Флу(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂; **b**) Условия: отжиг 30 нМ Ш1-Флу(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, иммобилизация 30 нМ Ш1-Флу(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, отжиг 320 нМ Ш2-Био(55) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, иммобилизация 30 нМ Ш1-Флу(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, отжиг 320 нМ Ш2-Био(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂. Био(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂. Био(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂. Гользуемое разведение стрептавидин-полипероксидаза 1 : 100 000].

Таблица 3. Аналитические параметры и параметры аппроксимации градуировочных зависимостей определения микроРНК-141, микроРНК-155 и микроРНК-39 методом, основанном на реакции нКСШ.

	миРНК-141	миРНК-155	миРНК-39
Предел обнаружения, пМ	0.1	0.4	0.3
Нижний предел рабочего диапазона, пМ	1	3	0.8
Коэффициент чувствительности, пМ ⁻¹	100 000	90 000	130 000
(от 10 до 100 пМ)			
Коэффициент вариации, %	Не выше 12	Не выше 12	Не выше 11
Коэффициент детерминации, R ²	0.9978	0.9980	0.9976
Параметр а	2x10 ⁶	2.5x10 ⁶	5.03x10 ⁶
Параметр b	0.12	0.22	6.5
Параметр с	6x10 ⁷	1.1×10^{8}	6.3×10^{14}
Параметр d	365	10 ³	5.8x10 ⁹

Таблица 4. МикроРНК, использованные в исследовании специфичности методов определения микроРНК-155 и микроРНК-39, основанных на реакции нКСШ.

микроРНК	Последовательность (5'-3')
микроРНК-141	UAACACUGUCUGGUAAAGAUGG
микроРНК -21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
микроРНК -205	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG
микроРНК -155	UUAAUGCUAAUCGUGAUGGGGUU
микроРНК -319а	UUGGACUGAAGGGUGCUCCC
микроРНК -39	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG



Рис. 38. Специфичность методов определения микроРНК-155 (А) и микроРНК-39 (Б), основанных на реакции нКСШ.

[Условия: **A**) отжиг 30 нМ Ш1-Флу(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, иммобилизация 30 нМ Ш1-Флу(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, отжиг 320 нМ Ш2-Био(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, реакция нКСШ с 0 или 100 пМ микроРНК, 160 нМ Ш2-Био(55) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂; **Б**) отжиг 30 нМ Ш1-Флу(39) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂; **Б**) отжиг 30 нМ Ш1-Флу(39) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, отжиг 320 нМ ш1-Флу(39) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ мgCl₂; **Б**) отжиг 30 нМ Ш1-Флу(39) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ мgCl₂, отжиг 320 нМ ш2-Био(55) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ мgCl₂, реакция нКСШ с 160 нМ Ш2-Био(55) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ мgCl₂].

5.3. Метод определения микроРНК-155, основанный на реакции КСШВО

В обзоре литературы (Раздел 3.5) обсуждалось, что для разработки каскадных амплификаций с применением на первом этапе реакции КСШ нужно создать ее модификацию, продуктом которой является одноцепочечный олигонуклеотид. Так же было отмечено, что удлинение последовательностей реагирующих зондов реакции КСШ приводит к ухудшению эффективности амплификации. Поэтому было принято решение пойти альтернативным путем, а именно модифицировать КСШ таким образом, чтобы в процессе амплификационной реакции

накапливался дополнительный олигонуклеотид (ДО), который потенциально может играть роль инициатора второго этапа каскадной амплификации. Данное условие теоретически будет выполнено, если вместо одного из зондов реакции КСШ используется дуплекс этого зонда и ДО. Полученная амплификационная реакция была нами названа «каталитическая сборка шпилек с высвобождением олигонуклеотида» (КСШВО).

Для оценки ее эффективности были смоделированы зонды и ДО для определения миРНК-155. Схема полученного метода представлена на Рис. 39. Для иммобилизации дуплекса Ш4(155) с ДО(155) зонд Ш4(155) мечен флуоресцеином. Ш3(155), соответственно, мечен биотином. Смоделированы и синтезированы зонды Ш3-Био(155) (Био-5' –ААТСGTGATAGG GGACTAACTATGCATCACCCCTATCACGATTAGCATTAA-3'), Ш4-Флу(155) (5'-Флу-ААТ CGTGATAGGGGTGATGCATAGTTAGTCCCCTATCAC-3'), а также ДО(155)(5'-АСТААСТАТ GCATCACCCCTA-3'). Вторичные структуры зондов Ш3(155) и Ш4(155) изображены на Рис. 40.



Рис. 39. Схема метода определения микроРНК-155 с применением реакции КСШВО.

Перед проведением реакции КСШВО дуплекс Ш4-Флу(155) с ДО(155) (Рис. 40 В) готовился путем совместного отжига двух олигонуклеотидов и далее иммобилизовался на планшет. В ходе реакции КСШВО Ш3-Био(155) раскрывается миРНК-155 (Рис. 40 Г). В результате этого в нем высвобождается 5'-домен, комплементарный 3'-концевому фрагменту зонда Ш4-Флу(155) в дуплексе с ДО(155). Это инициирует реакцию замещения с образованием

дуплекса зондов ШЗ-Био(155) и Ш4-Флу(155) (Рис. 40 Д) и высвобождением ДО(155) и микроРНК-155, которая раскрывает следующий зонд ШЗ-Био(155).

Аналогично разработанным методам, основанным на нКСШ, проявление сформированных дуплексов с биотиновыми метками проводится с применением конъюгата стрептавидина с полипероксидазой и реакцией усиленной хемилюминесценции.



B) 5'

АСТААСТАТGCATCACCCCTA ||||||||||||||| САСТАТССССТGATTGATACGTAGTGGGGATAGTGCTAA — Флу

Г) 5 'Био-ААТСGTGATAGGGGACTAACTATGCATCACCCCTATCACGATTAGCATTAA

Рис. 40. Вторичные структуры шпилечных зондов **A**) Ш3(155), **Б**) Ш4(155) [Красными точками обозначены комплементарные пары G-C, синими – пары A-T. Моделирование структур проведено с помощью программы Oligoanalyzer 3.1], **B**) дуплекса ДО/Ш4-Флу(155), **Г**) дуплекса зонда Ш3-Био(155) и микроРНК-155, Д) дуплекса зондов Ш3-Флу(155) и Ш4-Био(155) амплификационной реакции КСШВО для определения миРНК-155.

Для подтверждения схемы реакции КСШВО между зондами метода был проведен анализ продуктов амплификации с помощью ПААГ электрофореза (Рис. 41). В отсутствии миРНК-155 КСШВО какие-либо реакции не наблюдаются и видна лишь полоса, относящаяся к дуплексу Ш4-Флу(155)/ДО-Флу(155) (дорожка 5). Когда амплификационная реакция проводилась в присутствии 20 нМ миРНК-155 (дорожка 6), помимо полосы Ш4-Флу(155) /ДО-Флу(155), становятся видными полосы дуплекса Ш3-Био(155)/Ш4-Флу(155), а также свободного ДО-Флу (155). Повышение концентрации миРНК-155 до 200 нМ привело к исчезновению полосы, соответствующей Ш4-Флу(155) /ДО-Флу(155). Что важно, интенсивность полос дуплекса Ш3-Био(155)/Ш4-Флу(155) и свободного ДО-Флу (155) на дорожке 7 значительно выше, чем на дорожке 6, когда реакция проводилась при меньшей концентрации миРНК-155. Таким образом, полученные данные подтвердили верность предположенного механизма реакции КСШВО, представленного на Рис. 39.



Рис. 41. Идентификация продуктов реакции КСШВО неденатурирующим ПААГ электрофорезом. Дорожка 1 - 200 нМ Ш4-Флу(155); дорожка 2 - 200 нМ ДО-Флу(155); дорожка 3 - 200 нМ дуплекса Ш3-Био(155)/Ш4-Флу(155), приготовленного отжигом; дорожка 4- 200 нМ дуплекса Ш4-Флу(155)/ДО-Флу(155), приготовленного отжигом; дорожки 5-7 - продукты реакции КСШВО, проведенной в присутствии 0, 20 и 200 нМ миРНК-155, соответственно.

Для оптимизации концентраций зондов получены градуировочные зависимости хемилюминесцентного сигнала от введенной концентрации миРНК-155 в реакцию при фиксированной концентрации ШЗ-Био(155), но различными концентрациями дуплекса Ш4-Флу(155)/ДО(155) при иммобилизации на планшет. С увеличением концентрации Ш4-Флу(155)/ДО(155) вплоть до максимально взятой (30 нМ) наблюдается возрастание как специфичного сигнала, так и фона, тогда как зависимость значений предела обнаружения имеет минимум около 3 нМ (Рис. 42 А). Зафиксировав данную концентрацию дуплекса Ш4Флу(155)/ДО(155), далее получили зависимости хемилюминесцентного сигнала от введенной концентрации миРНК-155 в реакцию в присутствии разных концентраций ШЗ-Био(155). При увеличении ее концентрации аналогично происходит увеличение специфичных сигналов и фонов, тогда как минимум предела обнаружения располагается около 60 нМ (Рис. 42 Б).

Учитывая вышеобозначенное, для дальнейших экспериментов были выбраны 3 нМ Ш4-Флу(155)/ДО(155) и 60 нМ Ш3-Био(155).



Рис. 42. Зависимость хемилюминесцентного сигнала (50 пМ микроРНК-155) (черные столбцы), фона (серые столбцы) и предела обнаружения (штрихованные столбцы) от концентрации А) Ш4-Флу(155)/ДО(155) при иммобилизации на планшет (концентрация Ш3-Био(155) 60 нМ), Б) Ш3-Био(155) в реакции каталитической сборки шпилек с высвобождением олигонуклеотида (КСШВО) для определения микроРНК-155.

[Условия: совместный отжиг Ш4-Флу(155) и ДО(155) в концентрации 1 мкМ, отжиг 120 нМ Ш3-Био(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 300 мМ NaCl; иммобилизация (**A** - 1-30 нМ) (**Б** - 3 нМ Ш4-Флу(155) и ДО(155) после совместного отжига) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 300 мМ NaCl; реакция КСШВО с (**A** - 60 нМ) (**Б** - 15-120 нМ) Ш3-Био(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 300 мМ NaCl].

Реакцию КСШВО, аналогично нКСШ, проводили в среде 10 мМ трис, рН 7.2. Так как эффективность реакции КСШ зависит от присутствия NaCl и MgCl₂ в среде проведения реакции, было изучено, каким образом добавление различных концентраций данных солей в буфер влияет на получаемые интенсивности хемилюминесценции и предел обнаружения аналита. С увеличением концентрации NaCl до 600 мМ повышаются специфичные сигналы и фон. При дальнейшем повышении сигнал не увеличивается, но фон возрастает. Минимум предела обнаружения наблюдается в присутствии 300-600 мМ NaCl (Рис. 43 А). В методах, основанных на нКСШ, оптимальным солевым составом при проведении реакции было показано присутствие 20 мМ MgCl₂. При варьировании в среде КСШВО концентрации MgCl₂ мы обнаружили, что полученный минимум предела обнаружения (при 10 мМ MgCl₂) оказался выше, чем при работе в условиях с NaCl (Рис. 43 Б). В связи с этим, в качестве оптимальных условий проведения

анализа были выбраны иммобилизация 3 нМ Ш4-Флу(155)/ДО(155) и реакция КСШВО в 10 мМ трис, pH 7.2 с 600 мМ NaCl в присутствии 60 нМ Ш3-Био(155).

Следует отметить, что при разработке метода также был рассмотрен вариант, в котором проводилась предварительная иммобилизация Ш4-Флу(155), а в реакцию вместе с Ш3-Био(155) вводился ДО(155). Однако, данный подход не показал каких-либо аналитических преимуществ.



Рис. 43. Зависимость сигнала (50 пМ микроРНК-155) (черные столбцы), фона (серые столбцы) и предела обнаружения (штрихованные столбцы) от концентрации А) NaCl , Б) MgCl₂ в реакции каталитической сборки шпилек с высвобождением олигонуклеотида (КСШВО) для определения микроРНК-155.

[Условия: совместный отжиг Ш4-Флу(155) и ДО(155) в концентрации 1 мкМ, отжиг 120 нМ Ш3-Био(155) в А) 10 мМ трис, pH 7.2 с 300 мМ NaCl, Б) 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂; иммобилизация 3 нМ Ш4-Флу(155) и ДО(155) после совместного отжига в А) 10 мМ трис, pH 7.2 с 300 мМ NaCl Б) 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂; реакция КСШВО с 60 нМ Ш3-Био(155) в А) 10 мМ трис, pH 7.2 с 150-1200 мМ NaCl, Б) 10 мМ трис, pH 7.2 с 5-40 мМ MgCl₂].

Полученная градуировочная зависимость определения миРНК-155 с помощью реакции КСШВО практически совпала с построенной с применением нКСШ (Рис. 44). Эта зависимость аппроксимируется следующим уравнением:

$$y = \frac{ax}{b+x} + \frac{cx}{d+x}$$
 (R² = 0.9997), где a = 1,7x10⁶, b = 2.8, c = 4.8x10⁷, d = 370.

Предел обнаружения составил 0.4 пМ. Коэффициент вариации в рабочем диапазоне (от 3 пМ) не превышал 12%. Коэффициент чувствительности линейного участка зависимости (от 10 до 100 пМ аналита) - 90 000 пМ⁻¹.

Для исследования специфичности метода определения миРНК-155, основанного на реакции КСШВО, использована та же линейка миРНК, что и в методе, основанном на нКСШ: миРНК-141, миРНК-39, миРНК-319а, миРНК-21 и миРНК-205 (Таблица 4). Для метода определения миРНК-155, основанного на реакции КСШВО, кросс-реактивность посторонних

исследуемых аналитов не превышала значения фона. Это говорит о чрезвычайно высокой специфичности исследуемого метода.



Рис. 44. Градуировочная зависимость определения микроРНК-155 методом, основанным на реакции нКСШ (А), КСШВО (Б).

[Условия: **A**) отжиг 30 нМ Ш1-Флу(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, иммобилизация 30 нМ Ш1-Флу(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, отжиг 320 нМ Ш2-Био(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂, реакция нКСШ с 160 нМ Ш2-Био(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 20 мМ MgCl₂; **Б**) совместный отжиг Ш4-Флу(155) и ДО(155) в концентрации 1 мкМ, отжиг 120 нМ Ш3-Био(155) в 10 мМ трис, pH 7.2 с 600 мМ NaCl; иммобилизация 3 нМ Ш4-Флу(155) и ДО(155) после совместного отжига в 10 мМ трис, pH 7.2 с 300 мМ NaCl; реакция КСШВО с 60 нМ в 10 мМ трис, pH 7.2 с 600 мМ NaCl. Используемое разведение стрептавидин-полипероксидаза 1 к 100 000].

Сравнение аналитических параметров, характеризующих методы определения миРНК-155 с применением нКСШ и КСШВО, показало их идентичность. Это позволяет нам заключить, что эффективность амплификации КСШВО не ниже, чем нКСШ, и оба метода в равной степени могут быть использованы при конструировании методов анализа миРНК. В то же время появление в руках экспериментаторов КСШВО, оригинального бесферментного метода амплификации нуклеиновых кислот, одним из продуктов которого является одноцепочечный ДНК олигонуклеотид, открывает широкие возможности разработки для новых высокоэффективных каскадных методов амплификации. Еще одним преимуществом КСШВО является то, что в данной реакции на поверхности носителя иммобилизуется дуплекс, а не шпилечный зонд, который, как описано в литературе, в некоторых случаях может дестабилизироваться поверхностью носителей при его иммобилизации [209]. Таким образом, реакция КСШВО может расширить возможности применения бесферментой амплификации в гетерогенном анализе миРНК и других олигонуклеотидов.

5.4. Количественное определение микроРНК-141 и микроРНК-155 в образцах лизатов клеток человека методами, основанными на реакции нКСШ

Сравнение градуировочных кривых, полученных при определении миРНК-39, растворенной в буфере и в лизате клеток человека, выявило высокий матричный эффект. В связи с этим прямое определение миРНК в клеточных лизатах с помощью предлагаемого метода оказалось невозможным. Данный матричный эффект, по-видимому, связан с влиянием компонентов клеточного лизата. В литературе данная проблема решается внесением стадии предварительной пробоподготовки. Для реализации этого с помощью коммерческого набора LRU-100-500 ("БиоЛабМикс") проведено выделение коротких РНК (менее 200 нуклеотидов) из исследуемых клеточных лизатов. Сравнение градуировочных кривых, полученных при определении разработанным методом миРНК-39, растворенной в буфере и в выделенном растворе коротких РНК, показало, что полученные кривые были практически идентичны.

Таблица 5. Содержание микроРНК-141 и микроРНК-155 в культивируемых клетках, определенное с помощью разработанных гетерогенных методов, основанных на реакции нКСШ.

	Содержание микроРНК-141, копий на клетку	Содержание микроРНК-155, копий на клетку
MCF-7	3500±200	Не обнаружено
CaCo2	5200±300	70±30
HepG2	120±30	180±40
HeLa	Не обнаружено	Не обнаружено

Полученный факт позволил нам использовать зависимости интенсивности хемилюминесценции от концентрации исследуемых миРНК, растворенных в буферном растворе, как градуировочные кривые при определении содержания миРНК-141 и миРНК-155 в лизатах клеток раковых линий MCF-7, CaCo2, HepG2 и HeLa. В процессе пробоподготовки теряется часть исследуемых миРНК. Для количественной оценки выхода очистки миРНК известное количество нематодной миРНК-39 добавляли в раствор лизата клеток, а после выделения смеси коротких РНК в полученном растворе оценивали концентрацию миРНК-39. С применением доступного нам коммерческого набора выход очистки миРНК составил 50±10%. Предполагая, что выход анализируемых миРНК такой же, рассчитаны абсолютные значения их содержания в культивируемых раковых клетках человека (Таблица 5). Таким образом, полученные результаты продемонстрировали возможность практического применения разработанных высокочувствительных высокоспецифичных нами И гетерогенных хемилюминесцентных методов анализа миРНК.

Заключение

В результате проделанной работы с применением аллостерической активации ппДНКзима развит гомогенный хемилюминесцентный метод количественного определения микроРНК-141, позволяющий с высокой точностью (коэффициент вариации менее 2%) быстро и просто проводить определение до 100 пМ микроРНК. Кроме того, показано, что аналогичный аналитический принцип может быть использован для количественного анализа активной экзонуклеазы III с пределом обнаружения 7.3 нМ. Создана оригинальная стратегия гетерогенного определения микроРНК с помощью тройной амплификации, включающей применение бесферментной амплификационной реакции каталитической сборки шпилек с некомплементарным противостоянием нуклеотидов (нКСШ), конъюгата стрептавидинполипероксидаза и усиленной хемилюминесценции. На основе данной стратегии разработаны высокочувствительные и высокоспецифичные методы определения микроРНК-141, микроРНК-155, а также микроРНК-39, используемой в качестве внешнего стандарта при анализе микроРНК в биообразцах человека. Разработанные методы позволили детектировать до 100, 400 и 300 фМ аналитов, соответственно, и были успешно апробированы для количественного анализа микроРНК в лизатах культивируемых клеток человека (HepG2, Caco2, MCF7 и HeLa). Впервые показано, что эффективность гетерогенной реакции нКСШ, и, как следствие, аналитические параметры метода определения микроРНК с ее применением, зависят от условий отжига шпилечных зондов, задействованных в реакции, а именно от концентраций NaCl/MgCl₂ в среде отжига и от концентрации зондов при их отжиге. Предложена оригинальная бесферментная амплификационная реакция, названная «реакция каталитической сборки шпилек высвобождением олигонуклеотида» (КСШВО), эффективность которой, как с было установлено, практически идентична эффективности нКСШ.

выводы

1. С использованием аналитической платформы, основанной на аллостерической активации ппДНКзима, сконструированы гомогенные хемилюминесцентные методы количественного определения микроРНК-141 и каталитически активной экзонуклеазы III с пределами обнаружения, равными 100 пМ и 7.3 нМ, соответственно. Коэффициент вариации для методов определения аналитов ниже 6 %.

2. Разработана оригинальная стратегия гетерогенного определения микроРНК с основанной использованием тройной амплификации, применении бесферментной на реакции амплификационной каталитической сборки шпилек с некомплементарным противостоянием нуклеотидов (нКСШ), конъюгата стрептавидин-полипероксидаза и усиленной хемилюминесценции. С использованием данной стратегии развиты высокочувствительные методы определения микроРНК-141, микроРНК-155 и микроРНК-39 с пределами обнаружения 100, 400 и 300 фМ, соответственно. Показано, что разработанные методы являются высокоспецифичными.

3. Найдено, что интенсивность фоновой реакции в гетерогенном методе определения микроРНК с применением реакции нКСШ зависит как от концентрации солей (NaCl, MgCl₂) в буферном растворе, используемом при отжиге олигонуклеотидных зондов, так и от концентрации зондов на стадии их отжига. Оптимизация условий отжига позволила улучшить аналитические параметры планшетного метода анализа микроРНК-141.

4. Предложен новый формат реакции каталитической сборки шпилек, названный «каталитическая сборка шпилек с высвобождением олигонуклеотида» (КСШВО). Показано, что эффективность реакций амплификации нКСШ и КСШВО в гетерогенном методе определения микроРНК-155 практически идентична.

5. Показано, что разработанные на основе реакции нКСШ гетерогенные хемилюминесцентные методы определения микроРНК позволяют проводить количественный анализ микроРНК в лизатах культивируемых клеток человека (HepG2, Caco2, MCF7 и HeLa).

88

Список литературы

- Ying S. Y., Chang D. C., Lin S. L. The microRNA (miRNA): overview of the RNA genes that modulate gene function // Molecular Biotechnology. – 2008. – V. 38. – P. 257-268.
- Wienholds E., Kloosterman W. P., Miska E., Alvarez-Saavedra E., Berezikov E., De Bruijn E., Horvitz H. R., Kauppinen S., Plasterk R. H. MicroRNA expression in zebrafish embryonic Development // Science. – 2005. – V. 309 – № 5732. – P. 310-311.
- Alvarez-Garcia I., Miska E. A. MicroRNA functions in animal development and human disease // Development. – 2005. – V.132. – P. 4653-466.
- Lu J., Getz G., Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert L.B., Mak R.H., Ferrando A.A., Downing J.R., Jacks T., Horvitz H.R., Golub T.R. MicroRNA expression profiles classify human cancers // Nature. – 2005. – V. 435. – P. 834-838.
- Lee J. S., Ahn Y. H., Won H. S., Sun D. S., Kim Y. H., Ko Y. H. Prognostic role of the microRNA-200 family in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis // BioMed Research International. – 2017. – V. 2017. – P. 1928021.
- Zhang L., Wu H., Zhao M., Lu Q. Identifying the differentially expressed microRNAs in autoimmunity: a systemic review and meta-analysis // Autoimmunity. – 2020. – V. 53. – P. 122-136.
- He M., Zhang H. N., Tang Z. C., Gao S. G. Diagnostic and therapeutic potential of exosomal microRNAs for neurodegenerative diseases // Neural Plasticity. – 2021. – V. 2021. – P. 8884642.
- Laggerbauer B., Engelhardt S. MicroRNAs as therapeutic targets in cardiovascular disease // The Journal of Clinical Investigation. – 2022. – V. 132. – № 11. – P. e159179.
- Letafati A., Najafi S., Mottahedi M., Karimzadeh M., Shahini A., Garousi S., Abbasi-Kolli M., Nahand J.S., Zadeh S.S.T., Hamblin M.R., Rahimian N., Taghizadieh M., Mirzaei H. MicroRNA let-7 and viral infections: focus on mechanisms of action // Cellular & Molecular Biology Letters. – 2022. – V. 27. – № 1. – P. 1-47.
- Xiong Q., Zhang Y., Li J., Zhu Q. Small non-coding RNAs in human cancer // Genes. 2022. –
 V. 13. № 11. P. 2072.
- Plotnikova O., Baranova A., Skoblov M. Comprehensive analysis of human microRNA-mRNA interactome // Frontiers in Genetics. – 2019. – V. 10. – P. 933.
- Katoh T., Sakaguchi Y., Miyauchi K., Suzuki T., Kashiwabara S. I., Baba T., Suzuki T. Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly (A) polymerase GLD-2 // Genes & Development. 2009. V. 23. № 4. P. 433-438.

- Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 // Cell. – 1993. – V. 75. – № 5. – P. 843-854.
- Naeli P., Winter T., Hackett A. P., Alboushi L., Jafarnejad S. M. The intricate balance between microRNA-induced mRNA decay and translational repression // The FEBS Journal. – 2023. – V. 290. – № 10. – P. 2508-2524.
- Liang Y., Ridzon D., Wong L., Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues // BMC genomics. – 2007. – V. 8. – P. 1-20.
- 16. Mitchell P. S., Parkin R. K., Kroh E. M., Fritz B. R., Wyman S. K., Pogosova-Agadjanyan E. L. Peterson A., Noteboom J., O'Briant K.C., Allen A., Lin D.W., Urban N., Drescher C.W., Knudsen B.S., Stirewalt D.L., Gentleman R., Vessella R.L., Nelson P.S., Martin D.B., Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008. V. 105 № 30. P. 10513-10518.
- Bodulev O. L., Sakharov I. Y. Isothermal nucleic acid amplification techniques and their use in bioanalysis // Biochemistry (Moscow). – 2020. – V. 85. – P. 147-166.
- Rafique B., Iqbal M., Mehmood T., Shaheen M. A. Electrochemical DNA biosensors: A review //Sensor Review. – 2018. – V. 39. – № 1. – P. 34-50.
- Rashid J. I. A., Yusof N. A. The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review // Sensing and Biosensing Research. – 2017. – V. 16. – P. 19-31.
- Mansfield E. S., Worley J. M., McKenzie S. E., Surrey S., Rappaport E., Fortina P. Nucleic acid detection using non-radioactive labelling methods // Molecular and Cellular Probes. 1995. V. 9 № 3. P. 145-156.
- Tian R., Ning W., Chen M., Zhang C., Li Q., Bai J. High performance electrochemical biosensor based on 3D nitrogen-doped reduced graphene oxide electrode and tetrahedral DNA nanostructure // Talanta. – 2019. – V. 194. – P. 273-281.
- Kutluk H., Bruch R., Urban G. A., Dincer C. Impact of assay format on miRNA sensing: Electrochemical microfluidic biosensor for miRNA-197 detection // Biosensors and Bioelectronics. – 2020. – V. 148. – P. 111824.
- Smith D. A., Simpson K., Cicero M. L., Newbury L. J., Nicholas P., Fraser D. J., Caiger N., Redman J. E., Bowen T. Detection of urinary microRNA biomarkers using diazo sulfonamidemodified screen- printed carbon electrodes // RSC Advances. – 2021. – V. 11. – P. 18832-18839.

- 24. Zhu L., Zhang X., Yuan R., Chai Y. Y-shaped walker with abundant recognition domians mediated ultrasensitive electrochemical biosensor for miRNA-21 detection // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2023. – V. 375. – P. 132901.
- 25. Gao Y. P., Huang K. J., Wang F. T., Hou Y. Y., Wang B. Y., Xu J., Shuai H., Li G. The self-powered electrochemical biosensing platform with multi-amplification strategy for ultrasensitive detection of microRNA-155 // Analytica Chimica Acta. 2023. V. 1239. P. 340702.
- Hoekstra R., Blondeau P., Andrade F. J. Distributed electrochemical sensors: recent advances and barriers to market adoption // Analytical and Bioanalytical chemistry. – 2018. – V. 410. – P. 4077-4089.
- Das S., Devireddy R., Gartia M. R. Surface plasmon resonance (SPR) sensor for cancer biomarker detection // Biosensors. – 2023. – V. 13. – № 3. – P. 396.
- Jebelli A., Oroojalian F., Fathi F., Mokhtarzadeh A., de la Guardia M. Recent advances in surface plasmon resonance biosensors for microRNAs detection // Biosensors and Bioelectronics. – 2020. – V. 169. – P. 112599.
- 29. Lai M., Slaughter G. Label-free MicroRNA optical biosensors // Nanomaterials. 2019. V. 9.
 P. 1573.
- 30. Chang Y. F., Chou Y. T., Cheng C. Y., Hsu J. F., Su L. C., Ho J. A. Amplification-free detection of cytomegalovirus miRNA using a modification-free surface plasmon resonance biosensor //Analytical Chemistry. 2021. V. 93. № 22. C. 8002-8009.
- Xue T., Liang W., Li Y., Sun Y., Xiang Y., Zhang Y., Dai Z., Duo Y., Wu L., Qi K., Shivananju B. N., Zhang L., Cui X., Zhang H. Ultrasensitive detection of miRNA with an antimonene-based surface plasmon resonance sensor // Nature Communications. 2019. V. 10. P. 1-9.
- 32. Hu F., Xu J., Chen Y. Surface plasmon resonance imaging detection of sub-femtomolar microRNA // Analytical Chemistry. 2017. V.89. № 18. P. 10071-10077.
- 33. Wei X., Liu D., Zhao M., Yang T., Fan Y., Chen W., Ding S. An enzyme-free surface plasmon resonance imaging biosensing method for highly sensitive detection of microRNA based on catalytic hairpin assembly and spherical nucleic acid // Analytica Chimica Acta. – 2020. – V. 1108. – P. 21-27.
- Zeng K., Li H., Peng Y. Gold nanoparticle enhanced surface plasmon resonance imaging of microRNA-155 using a functional nucleic acid-based amplification machine //Microchimica Acta. - 2017. - V. 184. - P. 2637-2644.

- 35. Wang L., Liu Z. J., Cao H. X., Liang G. X. Ultrasensitive colorimetric miRNA detection based on magnetic 3D DNA walker and unmodified AuNPs // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2021. – V. 337. – P. 129813.
- 36. Wang C., Zhang Y., Liu C., Gou S., Hu S., Guo W. A portable colorimetric point-of-care testing platform for MicroRNA detection based on programmable entropy-driven dynamic DNA network modulated DNA-gold nanoparticle hybrid hydrogel film // Biosensors and Bioelectronics. – 2023. – V. 225. – P. 115073.
- 37. Ying N., Sun T., Chen Z., Song G., Qi B., Bu S., Sun X., Wan J., Li Z. Colorimetric detection of microRNA based hybridization chain reaction for signal amplification and enzyme for visualization // Analytical Biochemistry. – 2017. – V. 528. – P. 7-12.
- Zhang H., Wang K., Bu S., Li Z., Ju C., Wan J. Colorimetric detection of microRNA based on DNAzyme and nuclease-assisted catalytic hairpin assembly signal amplification // Molecular and Cellular Probes. – 2018. – V. 38. – P. 13-18.
- Yang X., Yuan L., Xu Y., He B. Target-catalyzed self-assembled spherical G-quadruplex/hemin DNAzymes for highly sensitive colorimetric detection of microRNA in serum // Analytica Chimica Acta. – 2023. – V. 1247. – P. 340879.
- 40. Shahsavar K., Shokri E., Hosseini M. Sensitive colorimetric detection of miRNA-155 via G-quadruplex DNAzyme decorated spherical nucleic acid // Microchimica Acta. 2022. V. 189. № 9. P. 357.
- 41. Lavis L. D., Raines R. T. Bright ideas for chemical biology // ACS Chemical Biology. 2008.
 V. 3. № 3. P. 142-155.
- 42. Du Y., Dong S. Nucleic acid biosensors: recent advances and perspectives // Analytical Chemistry. 2016. Vol. 89. № 1. P. 189-215.
- 43. Sempere L. F., Freemantle S., Pitha-Rowe I., Moss E., Dmitrovsky E., Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation // Genome Biology. – 2004. – V. 5. – P. 1-11.
- 44. Martinho C., Lopez-Gomollon S. Detection of microRNAs by northern blot // MicroRNA Detection and Target Identification: Methods and Protocols. – New York, NY : Springer US, 2023. – P. 47-66.
- 45. Martinho C., Lopez-Gomollon S. Detection of microRNAs by northern blot // MicroRNA Detection and Target Identification: Methods and Protocols. – New York, NY : Springer US, 2023. – P. 47-66.

- 46. Shimomura, A., Shiino, S., Kawauchi, J., Takizawa, S., Sakamoto, H., Matsuzaki, J., Ono M., Takeshita F., Niida S., Shimizu C., Fujiwara Y., Kinoshita T., Tamura K., Ochiya T. Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage // Cancer Science. 2016. V. 107. № 3. P. 326-334.
- Gungormez C., Gumushan Aktas H., Dilsiz N., Borazan E. Novel miRNAs as potential biomarkers in stage II colon cancer: microarray analysis // Molecular Biology Reports. – 2019. – V. 46. – P. 4175-4183.
- Li W., Ruan K. MicroRNA detection by microarray // Analytical and bioanalytical chemistry. 2009. – V. 394. – P. 1117 –1124.
- 49. Ueno T., Funatsu T. Label-free quantification of microRNAs using ligase-assisted sandwich hybridization on a DNA microarray // PloS One. 2014. V. 9. № 3. P. E90920.
- Lakowicz J. R. (ed.). Principles of fluorescence spectroscopy. Third Edition // Springer Science & Business Media. – 2013.– P. 443.
- 51. Juskowiak B. Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2011. V. 399. № 9. P. 3157-3176.
- Kalinina O., Lebedeva I., Brown J., Silver J. Nanoliter scale PCR with TaqMan detection // Nucleic Acids Research. – 1997. – V. 25. – № 10. – P. 1999-2004.
- 53. Wang M., Fu Z., Li B., Zhou Y., Yin H., Ai S. One-step, ultrasensitive, and electrochemical assay of microRNAs based on T7 exonuclease assisted cyclic enzymatic amplification // Analytical Chemistry. 2014. V. 86. № 12. P. 5606-5610.
- Chen H. G., Ren W., Jia J., Feng J., Gao Z. F., Li N. B., Luo H. Q. Fluorometric detection of mutant DNA oligonucleotide based on toehold strand displacement-driving target recycling strategy and exonuclease III-assisted suppression // Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – V. 77. – P. 40-45.
- 55. Xiao Q., Xu C. Research progress on chemiluminescence immunoassay combined with novel technologies // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2020. – V. 124. – P. 115780.
- 56. Aktas G. B., Skouridou V., Masip L. Nucleic acid sensing with enzyme-DNA binding protein conjugates cascade and simple DNA nanostructures // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2017. – V. 409 – № 14. – P. 3623-3632.
- 57. McCarpa F.. Chemical Generation of Excited States: The Basis of Chemiluminescence and Bioluminescence // Methods of Enzymology. – 2000. – V. 305. – P. 3-47
- 58. Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М. Теория и практика иммуноферментного анализа //М.: Высш. шк. 1991. Т. 288. С. 12.

- 59. Marzocchi E., Grilli S., Della Ciana L., Prodi L., Mirasoli M., Roda A. Chemiluminescent detection systems of horseradish peroxidase employing nucleophilic acylation catalysts // Analytical Biochemistry. – 2008. – V. 377. – № 2. – P. 189-194.
- 60. Sakharov I. Y., Demiyanova A. S., Gribas A. V., Uskova N. A., Efremov E. E., Vdovenko M. M. 3-(10'-Phenothiazinyl) propionic acid is a potent primary enhancer of peroxidase-induced chemiluminescence and its application in sensitive ELISA of methylglyoxal-modified low density lipoprotein // Talanta. 2013. V. 115. P. 414-417.
- 61. Sakharov I. Y., Vdovenko M. M. Mechanism of action of 4-dialkylaminopyridines as secondary enhancers in enhanced chemiluminescence reaction // Analytical Biochemistry. 2013. V. 434.
 № 1. P. 12-14.
- 62. Solovjev A. M., Galkin I. I., Medved'ko A. V., Pletjushkina O. Y., Zhao S., Sakharov I. Y. Comparison of chemiluminescent heterogeneous and homogeneous–heterogeneous assays coupled with isothermal circular strand-displacement polymerization reaction amplification for the quantification of miRNA-141 // Analyst. 2022. V. 147. № 19. P. 4293-4300.
- 63. He L., Ding L., Yu S., Yu F., Tian Y., Xie X., Qu L., Liu L., Wu Y. Self-assembled poly-HRP dual signal amplification strategy for high-sensitive detection of circulating miR-142-3p in human serum //Sensors and Actuators B: Chemical. 2019. V. 279. P. 440-446.
- 64. Cai S., Ye J., AL-maskri A. A. A., Sun, L., Zeng S. A conformational switch-based aptasensor for the chemiluminescence detection of microRNA // Luminescence. 2019. V. 34. № 8. P. 823-829.
- 65. XuY., Li D., Cheng W., Hu R., Sang Y., Yin Y., Ding S., Ju H. Chemiluminescence imaging for microRNA detection based on cascade exponential isothermal amplification machinery // Analytica Chimica Acta. – 2016. – V. 936. – P. 229-235.
- 66. Chen Y., Ding Z. Highly sensitive analysis strategies of microRNAs based on electrochemiluminescence // Current Opinion in Electrochemistry. 2022. V. 32. P. 100901.
- 67. Hu T., Zhang L., Wen W., Zhang X., Wang S. Enzyme catalytic amplification of miRNA-155 detection with graphene quantum dot-based electrochemical biosensor // Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – V. 77. – P. 451-456.
- Aktas G. B., Skouridou V., Masip L. Novel signal amplification approach for HRP- based colorimetric genosensors using DNA binding protein tags // Biosensors and Bioelectronics. 2015. V. 74. P. 1005-1010.
- Bodulev O. L., Gribas A. V., Sakharov I. Y. Microplate chemiluminescent assay for HBV DNA detection using 3-(10'-phenothiazinyl) propionic acid/N-morpholinopyridine pair as enhancer of HRP-catalyzed chemiluminescence // Analytical Biochemistry. – 2018. – V. 543. – P. 33-36.

- 70. Kolosova A. Y., Sakharov I. Y. Triple amplification strategy for the improved efficiency of a microplate-based assay for the chemiluminescent detection of DNA // Analytical Letters. 2019.
 V. 52. P.1352-1362.
- 71. Ding Y., Fleming A. M., Burrows C. J. Case studies on potential G-quadruplex-forming sequences from the bacterial orders Deinococcales and Thermales derived from a survey of published genomes // Scientific reports. 2018. V. 8. № 1. P. 15679.
- Gribas A. V., Zhao S., Sakharov I. Y. Improved method for chemiluminescent determination of peroxidase-mimicking DNAzyme activity // Analytical Biochemistry. – 2014. – V. 466. – P. 19 -23.
- 73. Zhu L., Li C., Zhu Z., Liu D., Zou Y., Wang C., Fu H., Yang C. J. In vitro selection of highly efficient G-quadruplex-based DNAzymes // Analytical Chemistry. – 2012. – V. 84. – № 19. – P. 8383-8390.
- 74. Paramasivan S., Rujan I., Bolton P. H. Circular dichroism of quadruplex DNAs: applications to structure, cation effects and ligand binding // Methods. 2007. V. 43. № 4. P. 324-331.
- Largy E., Mergny J. L., Gabelica V. Role of alkali metal ions in G-quadruplex nucleic acid structure and stability // The Alkali Metal Ions: Their Role for Life. Springer, Cham. – 2016. – P. 203-258.
- 76. Travascio P., Li Y., Sen D. DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin complex // Chemistry & Biology. 1998. V. 5. № 9. P. 505-517.
- 77. Gribas A. V., Zhao S., Sakharov I. Y. Homogeneous chemiluminescent DNA assay based on allosteric activation of peroxidase-mimicking DNAzyme // RSC advances. – 2015. – V. 5. – № 101. – P. 82865-82868.
- 78. Li Z., Wang J., Yang H., Chen S., Ma G., Zhang X., Zhu M., Yu J., Singh R., Zhang Y., Li S., Wang Z., Su E. Ultrasensitive detection of gastric cancer plasma microRNAs via magnetic beads-based chemiluminescent assay // Journal of Biomedical Nanotechnology. 2017. V. 13. № 10. P. 1272-1280.
- 79. Fan A., Lau C., Lu J. Colloidal gold–polystyrene bead hybrid for chemiluminescent detection of sequence-specific DNA // Analyst. – 2008. – V. 133. – № 2. – P. 219-225.
- 80. Li H., Lau C., Lu J. Carrier-resolved technology for homogeneous and multiplexed DNA assays in a 'one-pot reaction' // Analyst. 2008. Vol. 133, № 9. P. 1229-1236.
- A.V. Lin, Indirect ELISA, in: R. Hnasko (Ed.), ELISA: Methods and Protocols, Springer New York, New York, NY, 2015. – P. 51-59.

- 82. Li D., Cui Y., Morisseau C., Gee S. J., Bever C. S., Liu X., Wu J., Hammock B. D., Ying Y. Nanobody based Immunoassay for Human Soluble Epoxide Hydrolase Detection using PolyHRP for Signal Enhancement—the Rediscovery of PolyHRP? // Analytical Chemistry. 2017. V. 89 № 11. P. 6248.
- 83. Ling K., Jiang H., Huang X., Li Y., Lin J., Li F. R. Direct chemiluminescence detection of circulating microRNAs in serum samples using a single-strand specific nuclease-distinguishing nucleic acid hybrid system // Chemical Communications. 2018. V. 54. № 15. P. 1909-1912.
- 84. Le Goff, G. C., Corgier B. P., Mandon C. A., De Crozals G., Chaix C., Blum L. J. Impact of immobilization support on colorimetric microarrays performances // Biosensors and Bioelectronics. – 2012. – V. 35. – № 1. – P. 94-100.
- 85. Cai S., Lau C., Lu J. Turn-on aptameric system for simple and selective detection of protein via base stacking-dependent DNA hybridization event // Analytical Chemistry. – 2011. – Vol. 83, № 15. – P. 5844-5850.
- 86. Ling K., Jiang H., Huang X., Li Y., Lin J., Li F. R. Direct chemiluminescence detection of circulating microRNAs in serum samples using a single-strand specific nuclease-distinguishing nucleic acid hybrid system // Chemical Communications. 2018. V. 54. № 15. P. 1909-1912.
- 87. Roy D., Kwak J. W., Maeng W. J., Kim H., Park J. W. Dendron-modified polystyrene microtiter plate: surface characterization with picoforce AFM and influence of spacing between immobilized amyloid beta proteins //Langmuir. – 2008. – V. 24. – № 24. – P. 14296-14305.
- Torrente-Rodríguez R. M., Campuzano S., Montiel V. R. V., Montoya J. J., Pingarrón J. M. Sensitive electrochemical determination of miRNAs based on a sandwich assay onto magnetic microcarriers and hybridization chain reaction amplification // Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – Vol. 86. – P. 516-521.
- Yuan J., Wu S., Duan N., Ma X., Xia Y., Chen J., Ding Z. Wang Z. A sensitive gold nanoparticle-based colorimetric aptasensor for Staphylococcus aureus // Talanta. – 2014. – V.127. – P. 163-168.
- 90. Chen C., Ridzon D. A., Broomer A. J., Zhou Z., Lee D. H., Nguyen J. T., Barbisin M., Lan X. N., Mahuvakar V. R., Andersen M. R., Lao K. Q., Livak K. J., Guegler K. J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // Nucleic Acids Research. 2005. V. 33. P. e179.

- 91. Lao T. D., Le T. A. H. Development of stem-loop real-time PCR technique for miRNA-141 expression analysis in nasopharyngeal carcinoma // Asian Journal Pharmaceutical Research Health Care. - 2020. - V. 11. - P. 30-36.
- 92. Xu Y. F., Hannafon B. N., Khatri U., Gin A., Ding W. Q. The origin of exosomal miR-1246 in human cancer cells // RNA Biology. – 2019. – V. 16. – P. 770-784.
- 93. Zhang L., Lin J., Ye Y., Oba T., Gentile E., Lian J., Wistuba I. I., Roth J. A., Ji L., Wu X. Serum microRNA-150 predicts prognosis for early-stage non-small cell lung cancer and promotes tumor cell proliferation by targeting tumor suppressor gene SRCIN1 // Clinical Pharmacology and Therapeutics 2018. V. 103. P. 1061-1073.
- 94. Konoshenko M. Y., Lekchnov E. A., Bryzgunova O. E., Zaporozhchenko I. A., Yarmoschuk S. V., Pashkovskaya O. A., Pak S. V., Laktionov P. P. The panel of 12 cell-free microRNAs as potential biomarkers in prostate neoplasms // Diagnostics. 2020. V. 10. P. 38.
- 95. Androvic P., Valihrach L., Elling J., Sjoback R., Kubista M. Two-tailed RT-qPCR: A novel methodfor highly accurate miRNA quantification // Nucleic Acids Research. – 2017. – V. 45. – P. e144-e144.
- 96. Raabe C. A., Tang T. H., Brosius J., and Rozhdestvensky T. S. Biases in small RNA deep sequencing data // Nucleic Acids Research. 2014. V. 42. P. 1414-1426.
- 97. Zhang J., Li Z., Wang H., Wang Y., Jia H., Yan J. Ultrasensitive quantification of mature microRNAs by real-time PCR based on ligation of a ribonucleotide-modified DNA probe // Chemical Communications. – 2011. – Vol. 47. – P. 9465-9467.
- 98. Tian H., Sun Y., Liu C., Duan X., Tang W., Li Z. Precise quantitation of microRNA in a single cell with droplet digital PCR based on ligation reaction // Analytical Chemistry. – 2016. – V.88. – P.11384-11389
- 99. Bilinska A., Pszczola M., Stachowiak M., Stachecka J., Garbacz F., Aksoy M. O., Szczerbal I. Droplet Digital PCR Quantification of Selected Intracellular and Extracellular microRNAs Reveals Changes in Their Expression Pattern during Porcine In Vitro Adipogenesis //Genes. – 2023. – V. 14. – № 3. – P. 683.
- 100. Mai H. T., Vanness B. C., Linz T. H. Reverse transcription-free digital-quantitative-PCR for microRNA analysis //Analyst. 2023. V. 148. № 13. P. 3019-3027.
- 101. Friedländer M. R., Chen W., Adamidi C., Maaskola J., Einspanier R., Knespel S., Rajewsky N. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep // Nature Biotechnologies. - 2008. – V. 26. – P. 407-415

- 102. Dave V. P., Ngo T. A., Pernestig A. K., Tilevik D., Kant K., Nguyen T., Wolff A., Bang D. D. MicroRNA amplification and detection technologies: opportunities and challenges for point of care diagnostics // Laboratory Investigation. – 2019. – V. 99. – P. 452-469.
- 103. Castoldi M., Collier P., Nolan T., Benes V. Expression profiling of microRNAs by quantitative real-time PCR: the good, the bad, and the ugly // PCR Technology: Current Innovations. 2013. P. 307.
- 104. Borst A., Box A. T. A., Fluit A. C. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy // European Journal of Clinical Microbiology and Infections. – 2004. – V. 23. – P. 289-299.
- 105. Garc-a P. B., Robledo N. L., Islas A. L. Analysis of non-template-directed nucleotide addition and template switching by DNA polymerase // Biochemistry. 2004. –V. 43. P. 16515-16524.
- 106. Lomidze L., Williford T. H., Musier-Forsyth K., Kankia B. Isothermal amplification of long DNA segments by quadruplex priming amplification // Analytical Methods. – 2018. – V. 10. – P. 2972-2979.
- 107. Jonstrup S. P., Koch J., Kjems J. A microRNA detection system based on padlock probes and rolling circle amplification // RNA. 2006. V. 12. P. 1747-1752.
- 108. Wu X., Zhu S., Huang P., Chen Y. Highly specific quantification of microRNA by coupling probe–rolling circle amplification and Förster resonance energy transfer // Analytical Biochemistry. – 2016. –V. 502. – P. 16-23.
- 109. Li R., Liu Q., Jin Y., Li B. Sensitive colorimetric determination of microRNA let-7a through rolling circle amplification and a peroxidase-mimicking system composed of trimeric G-triplex and hemin DNAzyme // Microchimica Acta. – 2020. – V. 187. P. 1-8.
- 110. Kumara G. S. R., Pandith A., Seo Y. J. Highly fluorescent morpholine naphthalimide deoxyuridine nucleotide for the detection of miRNA 24-3P through rolling circle amplification // Analyst. – 2020. – V.145. – P.4777-4781.
- 111. Zhou Y., Huang Q., Gao J., Lu J., Shen X., Fan C. A dumbbell probe-mediated rolling circle amplification strategy for highly sensitive microRNA detection // Nucleic Acids Research. – 2010. – V. 38. – P. e156.
- 112. Li R., Wang Y., Liu C. G., Calin G. A., Volinia S., Croce C. M. MicroRNA expression profiling using microarrays // Nature Protocols. 2008. V. 3. P. 563-578.
- 113. Liu H., Li L., Duan L., Wang X., Xie Y., Tong L., Wang Q., Tang B. High specific and ultrasensitive isothermal detection of microRNA by padlock probe-based exponential rolling circle amplification // Analytical Chemistry. – 2013. – V. 85. – P. 7941-7947.

- 114. Chen S., Zhao J., Xu C., Sakharov I. Y., Zhao S. Absolute quantification of microRNAs in a single cell with chemiluminescence detection based on rolling circle amplification on a microchip platform // Analytical Chemistry. – 2021. – V. 93. – P. 9218-9225.
- 115. Zhang X., Liu Y., Yang Y., Huang J., Wang H., Zhu Z., Wang X., Ma P., Zhou X., Wang S., Zhou X. Ligation-promoted hyperbranched rolling circle amplification enables ultrasensitive detection of microRNA in clinical specimens // Sensors Actuators B Chem. – 2018. – V. 277. – P. 634-639.
- 116. Eslamizadeh S., Heidari M., Agah S., Faghihloo E., Ghazi H., Mirzaei A., Akbari A. The role of microRNA signature as diagnostic biomarkers in different clinical stages of colorectal cancer // Cell Journal. – 2018. – V. 20. – P. 220.
- 117. Zhang S., Liu C., Zou X., Geng X., Zhou X., Fan X., Zhu D., Zhang H., Zhu W. MicroRNA panel in serum reveals novel diagnostic biomarkers for prostate cancer // PeerJ. – 2021. – V. 9. – P. e11441.
- 118. Zyrina N. V., Antipova V. N. Nonspecific synthesis in the reactions of isothermal nucleic acid amplification // Biochemistry (Moscow). 2021. V. 86. P. 887-897.
- 119. Van Ness J., Van Ness L. K., Galas D. J. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides //Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. – 2003. – V. 100. P. 4504-4509.
- 120. Jia H., Li Z., Liu C., Cheng Y. Ultrasensitive detection of microRNAs by exponential isothermal amplification // Angewante Chemie. 2010. V. 49. P. 5498-5501.
- 121. Wu H., Wu J., Liu Y., Wang H., Zou P. Fluorometric determination of microRNA using arched probe-mediated isothermal exponential amplification combined with DNA-templated silver nanoclusters // Microchimica Acta. – 2019. V. 186. – P. 1-8.
- 122. Reid M. S., Le X. C., Zhang H. Exponential isothermal amplification of nucleic acids and assays for proteins, cells, small molecules, and enzyme activities: An EXPAR example // Angewadnte Chemie. – 2018. – V. 57. – P. 11856-11866.
- 123. Chen J., An T., Ma Y., Situ B., Chen D., Xu Y., Zhang L., Dai Z., Zou X. Isothermal amplification on a structure-switchable symmetric toehold dumbbell-template: A strategy enabling MicroRNA analysis at the single-cell level with ultrahigh specificity and accuracy // Analytical Chemistry. – 2018. – V. 90. – P. 859-865.
- 124. Li C., Li Z., Jia H., Yan J. One-step ultrasensitive detection of microRNAs with loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // Chemical Communications. – 2011. – V. 47. – P. 2595-2597.

- 125. Tran D. H., Phung H. T. T. Detecting Fasciola hepatica and Fasciola gigantica microRNAs with loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // Journal of Parasitic Deseases. – 2020. – V. 44. – P. 364-373.
- 126. Du W., Lv M., Li J., Yu R., Jiang J. A ligation-based loop-mediated isothermal amplification (ligation-LAMP) strategy for highly selective microRNA detection // Chemical Communications. – 2016. –V. 52. – P. 12721-12724.
- 127. Liu L., Deng D., Wu D., Hou W., Wang L., Li N., Sun Z. Duplex-specific nuclease-based electrochemical biosensor for the detection of microRNAs by conversion of homogeneous assay into surface-tethered electrochemical analysis // Analityca Chimica Acta. – 2021. – V. 1149. – P. 338199.
- 128. Yin B. C., Liu Y. Q., Ye B. C. One-step, multiplexed fluorescence detection of microRNAs based on duplex-specific nuclease signal amplification // Journal of American Chemical Society. - 2012. – V. 134. – P. 5064-5067.
- 129. Ma X., Xu H., Qian K., Kandawa-Schulz M., Miao W., Wang Y. Electrochemical detection of microRNAs based on AuNPs/CNNS nanocomposite with Duplex-specific nuclease assisted target recycling to improve the sensitivity // Talanta. – 2020. – V. 208. – P. 120441.
- 130. Sang Y., Xu Y., Xu L., Cheng W., Li X., Wu J., Ding S. Colorimetric and visual determination of microRNA via cycling signal amplification using T7 exonuclease // Microchimica Acta. – 2017. – V. 184. – P. 2465-2471.
- 131. Zheng Y., Chen J., Li Y., Xu Y., Chen L., Chen W., Liu A., Lin X., Weng S. Dual-probe fluorescent biosensor based on T7 exonuclease-assisted target recycling amplification for simultaneous sensitive detection of microRNA-21 and microRNA-155 // Analytical Bioanalytical Chemistry. – 2021. – V. 413. – P. 1605-1614.
- 132. Wang M., Fu Z., Li B., Zhou Y., Yin H., Ai S. One-step, ultrasensitive, and electrochemical assay of microRNAs based on T7 exonuclease assisted cyclic enzymatic amplification // Analytical Chemistry. – 2014. – V. 86. – P. 5606-5610.
- 133. Zhang P., Zhuo Y., Chang Y., Yuan R., Chai Y. Electrochemiluminescent graphene quantum dots as a sensing platform: A dual amplification for microRNA assay // Analytical Chemistry. – 2015. – V. 87. – P. 10385-10391.
- 134. Chen Z., Xie Y., Huang W., Qin C., Yu A., Lai G. Exonuclease-assisted target recycling for ultrasensitive electrochemical detection of microRNA at vertically aligned carbon nanotubes // Nanoscale. – 2019. – V.11. – P. 11262-11269.

- 135. Liu M. X., Liang S., Tang Y., Tian J., Zhao Y., Zhao S. Rapid and label-free fluorescence bioassay for microRNA based on exonuclease III-assisted cycle amplification // RSC Advances. - 2018. – V. 8. – P. 15967-15972.
- 136. Tang Y., Liu M., Zhao Z., Li Q., Liang X., Tian J., Zhao S. Fluorometric determination of microRNA-122 by using ExoIII-aided recycling amplification and polythymine induced formation of copper nanoparticles // Microchimica Acta. – 2019. – V. 186. – P. 133.
- 137. Yan X. M., Wang Y. Q., Chen Y., Chen Z. P., Yu R. Q. Detection of microRNAs by the combination of exonuclease-III assisted target recycling amplification and repeated-fishing strategy // Analytica Chimica Acta. – 2020. – V. 1131. – P. 1-8.
- 138. Miao P., Wang B., Yu Z., Zhao J., Tang Y. Ultrasensitive electrochemical detection of microRNA with star trigon structure and endonuclease mediated signal amplification // Biosensors Bioelectronics. – 2015. – V. 63. – P. 365-370.
- 139. Huang Y., Wang W., Wu T., Xu L. P., Wen Y., Zhang X. A three-line lateral flow biosensor for logic detection of microRNA based on Y-shaped junction DNA and target recycling amplification // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2016. – V. 408. – P. 8195-8202.
- 140. Luo L., Wang L., Zeng L., Wang Y., Weng Y., Liao Y., Chen T., Xia Y., Zhang J., Chen J. A ratiometric electrochemical DNA biosensor for detection of exosomal microRNA // Talanta. – 2020. – V. 207. – P. 120298.
- 141. Giuffrida M. C., Zanoli L. M., D'Agata R., Finotti A., Gambari R., Spoto G. Isothermal circular-strand-displacement polymerization of DNA and microRNA in digital microfluidic devices // Analytical Bioanaytical. Chemistry. – 2015. – V. 407. – P. 1533-1543.
- 142. Wang B., You Z., Ren D. Target-assisted FRET signal amplification for ultrasensitive detection of microRNA // Analyst. 2019. V.144. P. 2304-2311.
- 143. Ma W., Situ B., Lv W., Li B., Yin X., Vadgama P., Zheng L., Wang W. Electrochemical determination of microRNAs based on isothermal strand-displacement polymerase reaction coupled with multienzyme functionalized magnetic micro-carriers // Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – V. 80. – P. 344-351.
- 144. Cai S., Ye J., Al-Maskri A. A. A., Sun L., Zeng S.mA conformational switch-based aptasensor for the chemiluminescence detection of microRNA // Luminescence. – 2019. – V. 34. – P. 823-829.
- 145. Solovjev A. M., Galkin I. I., Pletjushkina O. Y., Medvedko A. V., Zhao S., Sakharov I. Y. Isothermal chemiluminescent assay based on circular stand-displacement polymerization

reaction amplification for cel-miRNA-39-3p determination in cell extracts // International Journal Biological Macromolecules. – 2021. – V. 182. – P. 987-992.

- 146. Ang Y. S., Yung L.Y. L. Rational design of hybridization chain reaction monomers for robust signal amplification // Chemical Communications. 2016. V. 52. P. 4219-4222.
- 147. Zhang H., Liu X., Zhang C., Xu Y., Su J., Lu X., Shi J., Wang L., Landry M. P., Zhu Y., Lv M., Mi X. A DNA tetrahedral structure-mediated ultrasensitive fluorescent microarray platform for nucleic acid test // Sensors Actuators B Chemical. 2020. V. 321. P. 128538.
- 148. Miao P., Tang Y., Yin J. MicroRNA detection based on analyte triggered nanoparticle localization on a tetrahedral DNA modified electrode followed by hybridization chain reaction dual amplification // Chemical Communictions. – 2015. – V. 51. – P. 15629-15632.
- 149. Ge Z., Lin M., Wang P., Pei H., Yan J., Shi J., Huang Q., He D., Fan C., Zuo X. Hybridization chain reaction amplification of microRNA detection with a tetrahedral DNA nanostructurebased electrochemical biosensor // Analytical Chemistry. – 2014. – V. 86. – P. 2124-2130.
- 150. Liu H., Bei X., Xia Q., Fu Y., Zhang S., Liu M., Fan K., Zhang M., Yang Y.. Enzyme-free electrochemical detection of microRNA-21 using immobilized hairpin probes and a targettriggered hybridization chain reaction amplification strategy // Microchimica Acta. – 2016. – V. 183. – P. 297-304.
- 151. Guo Q., Yu Y., Zhang H., Cai C., Shen Q. Electrochemical sensing of exosomal microRNA based on hybridization chain reaction signal amplification with reduced false-positive signals // Analytical Chemistry. 2020. V. 92. P. 5302-5310.
- 152. Xiong Z., Pan R., Hu Q., Yun W., Li N., Wang Q., Yang L. One-step triggered branched DNA nanostrucuture for ultra-sensitive electrochemical detection of microRNA // Microchemical Journal. – 2020. – V. 158. – P. 105186.
- 153. Hosseinzadeh E., Ravan H., Mohammadi A., Pourghadamyari H. Colorimetric detection of miRNA-21 by DNAzyme-coupled branched DNA constructs // Talanta. – 2020. –V. 216. – P. 120913.
- 154. Li Y., Huang C. Z., Li Y. F. Ultrasensitive electrochemiluminescence detection of MicroRNA via one-step introduction of a target-triggered branched hybridization chain reaction circuit // Analytical Chemistry. – 2019. – V. 91. – P. 9308-9314.
- 155. Shen Z., He L., Wang W., Tan L., Gan N. Highly sensitive and simultaneous detection of microRNAs in serum using stir-bar assisted magnetic DNA nanospheres-encoded probes // Biosensors and Bioelectronics. – 2020. – V. 148. – P. 111831.

- 156. Shuai H. L., Huang K. J., Xing L. L., Chen Y. X. Ultrasensitive electrochemical sensing platform for microRNA based on tungsten oxide-graphene composites coupling with catalyzed hairpin assembly target recycling and enzyme signal amplification // Biosensors and Bioelectronics. – 2016. – V. 86. – P. 337-345.
- 157. Ji D., Mou X., Kwok C. K. Label-free and ratiometric detection of microRNA based on targetinduced catalytic hairpin assembly and two fluorescent dyes // Analytical Methods. – 2019. – V. 11. – P. 4808-4813.
- 158. Li C., Huang Y., Yang Y. Coupling of an antifouling and reusable nanoplatform with catalytic hairpin assembly for highly sensitive detection of nucleic acids using zeta potential as signal readout // Sensors Actuators B Chemical. – 2021. – V. 326. – P. 128845.
- 159. Jin F., Xu D. A fluorescent microarray platform based on catalytic hairpin assembly for MicroRNAs detection // Analytica Chimica Acta. 2021. V. 1173. P. 338666.
- 160. Jiang Z., Wang H., Zhang X., Liu C., Li Z. An enzyme-free signal amplification strategy for sensitive detection of microRNA via catalyzed hairpin assembly // Analytical Methods. – 2014. – V. 6. – P. 9477-9482.
- 161. Zhang Y., Zhang X., Situ B., Wu Y., Luo S., Zheng L., Qiu Y. Rapid electrochemical biosensor for sensitive profiling of exosomal microRNA based on multifunctional DNA tetrahedron assisted catalytic hairpin assembly // Biosensors and Bioelectronics. – 2021. – V. 183. – P. 113205.
- 162. Zhang R. Y., Luo S. H., Lin X. M., Hu X. M., Zhang Y., Zhang X. H., Wu C. M., Zheng L., Wang Q. A novel electrochemical biosensor for exosomal microRNA-181 detection based on a catalytic hairpin assembly circuit // Analytica Chimica Acta. – 2021. – P. 1157
- 163. Jiang Y. S., Bhadra S., Li B., Ellington A. D. Mismatches improve the performance of stranddisplacement nucleic acid circuits // Angewandte Chemie. – 2014. – V. 126. –P. 1876-1879.
- 164. Yang Z., Guo Y., Zhou J., Liu F., Liang W., Chai Y., Li Z., Yuan R. Ultrasensitive fluorescence detection and imaging of microRNA in cells based on a hyperbranched RCAassisted multiposition SDR signal amplification strategy // Analytical Chemistry. – 2022. – V. 94. – № 46. – P. 16237-16245.
- 165. Xu L., Hou S., Huang X., Wang M., Li C., Dong N., Lin Z. Highly sensitive homogeneous electrochemiluminescence biosensor for microRNA-155 based on enzyme-free cascade signal amplification and magnetic assisted enrichment // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2023. – V. 933. – P. 117274.

- 166. Yang X., Zhao J., Hou L., Sakharov I. Y., Tian J., Zhao S. A microchip electrophoresisassisted triple-cycle cascade chemiluminescence signal amplification strategy for the ultrasensitive detection of microRNA-141 in cells //Talanta. – 2023. – V. 253. – P. 124011.
- 167. Zhuang J., Lai W., Chen G., Tang D. A rolling circle amplification-based DNA machine for miRNA screening coupling catalytic hairpin assembly with DNAzyme formation // Chemical Communications. – 2014. – V. 50. – P. 2935-2938.
- 168. Liu H., Tian T., Zhang Y., Ding L., Yu J., Yan M. Sensitive and rapid detection of microRNAs using hairpin probes-mediated exponential isothermal amplification // Biosensors and Bioelectronics. – 2017. – V. 89. – P. 710-714.
- 169. Fu P., Xu M., Xing S., Zhao Y., Zhao C. Dual cascade isothermal amplification reaction based glucometer sensors for point-of-care diagnostics of cancer-related microRNAs // Analyst. – 2021. – V. 146. – № 10. – P. 3242-3250.
- 170. Wang H., Wang H., Wu Q., Liang M., Liu X., Wang F. A DNAzyme-amplified DNA circuit for highly accurate microRNA detection and intracellular imaging // Chemical Science. 2019.
 V. 10. № 41. P. 9597-9604.
- 171. Wang S., Lu S., Zhao J., Ye J., Huang J., Yang X. An electric potential modulated cascade of catalyzed hairpin assembly and rolling chain amplification for microRNA detection // Biosensors and Bioelectronics. – 2019. – V. 126. – P. 565-571.
- 172. Jin F., Xu D. A cascaded DNA circuit in bead arrays for quantitative single-cell MicroRNA analysis // Analytical Chemistry. 2021. V. 93. № 33. P. 11617-11625.
- 173. Wang J., Fu X., Liu S., Liu R., Li J., Wang K., Huang J. Catalyst-Accelerated Circular Cascaded DNA Circuits: Simpler Design, Faster Speed, Higher Gain // Small. – 2023. – V. 19. – № 12. – P. 2205903.
- 174. Wu J., Lv J., Zheng X., Wu Z. S. Hybridization chain reaction and its applications in biosensing // Talanta. 2021. V. 234. P. 122637.
- 175. Sakharov I. Y., Demiyanova A. S., Gribas A. V., Uskova N. A., Efremov E. E., Vdovenko M. M. 3-(10'-Phenothiazinyl) propionic acid is a potent primary enhancer of peroxidase-induced chemiluminescence and its application in sensitive ELISA of methylglyoxal-modified low density lipoprotein // Talanta. 2013. V. 115. P. 414-417.
- 176. Safenkova I. V., Ivanov A. V., Slutskaya E. S., Samokhvalov A. V., Zherdev A. V., Dzantiev B.
 B. Key significance of DNA-target size in lateral flow assay coupled with recombinase polymerase amplification // Analytica Chimica Acta. 2020. V. 1102. P. 109-118.

- 177. Zinovkina L.A., Galivondzhyan A.K., Prikhodko A.S., Galkin I.I., Zinovkin R.A. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds do not affect estrogen receptor α // PeerJ. – 2020. – V. 8. – P. e8803.
- 178. Бодулев О. Л., Грибас А. В., Вдовенко М. М., Сахаров И. Ю. Хемилюминесцентная детекция ДНК ВИЧ на основе аллостерической активации пероксидаза-подобного ДНКзима // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2018. – Т. 59. – № 2. – С. 78-84.
- 179. Gao Y., Feng B., Han S., Zhang K., Chen J., Li C., Wang R., Chen L. The roles of MicroRNA-141 in human cancers: from diagnosis to treatment // Cellular Physiology and Biochemistry. – 2016. – V. 38. – № 2. – P. 427-448.
- 180. Travascio P., Li Y., Sen D. DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA aptamer-hemin complex // Chemistry & Biology. 1998. V. 5. № 9. P. 505-517.
- 181. Hoheisel J. D. On the activities of Escherichia coli exonuclease III // Analytical Biochemistry.
 1993. T. 209. № 2. C. 238-246.
- 182. Rogers S. G., Weiss B. Cloning of the exonuclease III gene of Escherichia coli // Gene. 1980.
 V. 11. № 3-4. P. 187-195.
- 183. Yuan M., Zhu Y., Lou X., Chen C., Wei G., Lan M., Zhao J. Study of inhibitory effect of mercury (II) ion on exonuclease III via gel electrophoresis and microfluidic electrophoresis // Analytical Methods. – 2012. – V. 4. – № 9. – P. 2846-2851.
- 184. Leung C. H., Chan D. S. H., Man B. Y. W., Wang C. J., Lam W., Cheng Y. C., Fong W. F., Hsiao W. L. W., Ma D. L. Simple and convenient G-quadruplex-based turn-on fluorescence assay for 3'→ 5' exonuclease activity // Analytical chemistry. – 2011. – V. 83. – № 2. – P. 463-466.
- 185. Lee H. K., Heo J., Myung S., Shin I. S., Kim T. H. Homogeneous Electrochemical Assay for Real-time Monitoring of Exonuclease III Activity Based on a Graphene Monolayer // Electroanalysis. – 2017. – V. 29. – № 7. – P. 1749-1754.
- 186. Wu X., Chen J., Zhao J. X. Ultrasensitive detection of 3'-5' exonuclease enzymatic activity using molecular beacons //Analyst. 2014. V. 139. № 5. P. 1081-1087.
- 187. Liu Q., Lian J., Liu M., Jin Y., Li B. A simple "turn-on" fluorescent biosensor for sensitive detection of exonuclease III activity through photoinduced electron transfer and self-hybridization of a DNA probe // Analytical Methods. 2018. V. 10. № 19. P. 2257-2262.
- 188. Su X., Zhu X., Zhang C., Xiao X., Zhao M. In situ, real-time monitoring of the 3' to 5' exonucleases secreted by living cells // Analytical Chemistry. 2012. V. 84. № 11. P.

5059-5065.

- 189. Williams Z., Ben-Dov I. Z., Elias R., Mihailovic A., Brown M., Rosenwaks Z., Tuschl T. Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – V. 110. – № 11. – P. 4255-4260.
- 190. Kolosova A. Y., Sakharov I. Y. Triple amplification strategy for the improved efficiency of a microplate-based assay for the chemiluminescent detection of DNA // Analytical Letters. 2019.
 V. 52. № 8. P. 1352-1362.
- 191. Liu J., Zhang Y., Zhao Q., Situ B., Zhao J., Luo S., Li B., Yan X., Vadgama P., Su L., Ma W., Wang W., Zheng L. Bifunctional aptamer-mediated catalytic hairpin assembly for the sensitive and homogenous detection of rare cancer cells // Analytica Chimica Acta. – 2018. – V. 1029. – P. 58-64.
- 192. Wang D., Zhao X., Wei Y., Xue W., Xu Z. A pH-responsive colorimetric detection of human telomerase RNA based on a three-dimensional DNA amplifier // Analytica Chimica Acta. – 2020. – V. 1111. – P. 67-74.
- 193. Li X., Dou B., Yuan R., Xiang Y. Mismatched catalytic hairpin assembly and ratiometric strategy for highly sensitive electrochemical detection of microRNA from tumor cells // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2019. – V. 286. – P. 191-197.
- 194. Zhou Q., Tang D. Catalytic hairpin assembly-mediated surface charge density on the electrode for sensitive potentiometric detection of microRNA-21 in IgA-nephropathy // Biochemical Engineering Journal. – 2018. – V. 140. – P. 9-16.
- 195. Sakharov I. Microplate chemiluminescent assay for DNA detection using apoperoxidaseoligonucleotide as capture conjugate and HRP-streptavidin signaling system // Sensors. – 2018. – V. 18. – № 4. – P. 1289.
- 196. Bodulev O. L., Burkin K. M., Efremov E. E., Sakharov I. Y. One-pot microplate-based chemiluminescent assay coupled with catalytic hairpin assembly amplification for DNA detection // Analytical Bioanalytical Chemistry. – 2020. – V. 412. – P. 5105-5111.
- 197. Gu J., Qiao Z., He X., Yu Y., Lei Y., Tang J., Shi H., He D., Wang K. Enzyme-free amplified detection of miRNA based on target-catalyzed hairpin assembly and DNA-stabilized fluorescent silver nanoclusters //Analyst. – 2020. – V. 145. – № 15. – P. 5194-5199.
- 198. Dong G., Dai J., Jin L., Shi H., Wang F., Zhou C., Zheng B., Guo Y., Xiao D. A rapid roomtemperature DNA amplification and detection strategy based on nicking endonuclease and catalyzed hairpin assembly //Analytical Methods. – 2019. – V. 11. – № 19. – P. 2537-2541.

- 199. Jiang L., Yang Y., Lin Y., Chen Z., Xing C., Lu C., Yang H., Zhang S. An electrochemical sensor based on enzyme-free recycling amplification for sensitive and specific detection of miRNAs from cancer cells // Analyst. – 2020. – V. 145. – № 9. – P. 3353-3358.
- 200. Wang L. J., Ren M., Wang H. X., Qiu J. G., Jiang B., Zhang C. Y. Construction of a quencherfree cascade amplification system for highly specific and sensitive detection of serum circulating miRNAs //Analytical Chemistry. – 2020. – V. 92. – № 12. – P. 8546-8552.
- 201. Trinh M. P., Carballo J. G., Adkins G. B., Guo K., Zhong W. Physical and chemical templateblocking strategies in the exponential amplification reaction of circulating microRNAs // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2020. –V. 412. – P. 2399-2412.
- 202. Hakimian F., Ghourchian H. Ultrasensitive electrochemical biosensor for detection of microRNA-155 as a breast cancer risk factor // Analytica Chimica Acta. – 2020. – V. 1136. – P. 1-8.
- 203. Zhao L. L., Pan H. Y., Zhang X. X., Zhou Y. L. Ultrasensitive detection of microRNA based on a homogeneous label-free electrochemical platform using G-triplex/methylene blue as a signal generator // Analytica Chimica Acta. – 2020. – V. 1116. – P. 62-69.
- 204. Ouyang T., Liu Z., Han Z., Ge Q. MicroRNA detection specificity: recent advances and future perspective // Analytical Chemistry. 2019. V. 91. № 5. P. 3179-3186.
- 205. Li X., Dou B., Yuan R., Xiang Y. Mismatched catalytic hairpin assembly and ratiometric strategy for highly sensitive electrochemical detection of microRNA from tumor cells // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2019. – V. 286. – P. 191-197.
- 206. Kroh E. M., Parkin R. K., Mitchell P. S., Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) // Methods. 2010. V. 50. № 4. P. 298-301.
- 207. Gu J., Qiao Z., He X., Yu Y., Lei Y., Tang J., Shi H., He D., Wang K. Enzyme-free amplified detection of miRNA based on target-catalyzed hairpin assembly and DNA-stabilized fluorescent silver nanoclusters // Analyst. – 2020. – V. 145. – № 15. – P. 5194-5199.
- 208. Jiang L., Yang Y., Lin Y., Chen Z., Xing C., Lu C., Yang H., Zhang S. An electrochemical sensor based on enzyme-free recycling amplification for sensitive and specific detection of miRNAs from cancer cells // Analyst. 2020. V. 145. № 9. P. 3353-3358.
- 209. Lin M., Wen Y., Li L., Pei H., Liu G., Song H., Zuo X., Fan C., Huang Q. Target-responsive, DNA nanostructure-based E-DNA sensor for microRNA analysis // Analytical chemistry. – 2014. – V. 86. – №. 5. – P. 2285-2288.