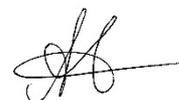


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Бодулев Олег Леонидович

**Методы количественного определения микроРНК с применением
хемилюминесцентной детекции**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

Сахаров Иван Юрьевич
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Веселова Ирина Анатольевна,
доктор химических наук, доцент,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
МГУ имени М.В.Ломоносова, химический факультет,
ведущий научный сотрудник, профессор кафедры аналитической химии

Бовин Николай Владимирович,
доктор химических наук, профессор,
Федеральное государственное учреждение
«Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук»,
главный научный сотрудник, руководитель лаборатории углеводов

Горячева Ирина Юрьевна,
доктор химических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Саратовский национальный исследовательский
государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»,
директор Института химии,
заведующая кафедрой общей и неорганической химии

Защита диссертации состоится __ декабря 2023 г. в 15:00 на заседании
диссертационного совета МГУ 014.4 Московского государственного университета имени
М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 11, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ
имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте:

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.4/2746>

Автореферат разослан « » ноября 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



И.К. Сакодынская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 и апоптоз [2-3]. Более того, проведенные экспериментальные работы позволили установить взаимосвязь между изменениями в уровне экспрессии 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 коэффициента чувствительности. Это делает анализ менее точным и затрудняет количественную оценку миРНК. Как альтернатива, в анализе миРНК используются изотермические методы амплификации в сочетании с высокочувствительными детектирующими системами. Зачастую такие методы позволяют развивать бóльшую точность 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 противостоением нуклеотидов» (нКСШ). Показано, что применение нКСШ позволяет снизить фоновые сигналы в анализах на основе реакции КСШ и тем самым улучшить аналитические параметры таких методов.

Высококочувствительные 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 нативной пероксидазой 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 высококочувствительных 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.
- Выработка стратегии гетерогенного определения миРНК с использованием тройной амплификации, основанной на применении бесферментной амплификационной реакции

КСШ, конъюгата стрептавидин-полипероксидаза и усиленной хемиллюминесценции. 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 пДНКзима с хемиллюминесцентной 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 усиленной хемиллюминесценции. На основе указанной стратегии развиты методы количественного определения миРНК-141, миРНК-155 и миРНК-39, впоследствии успешно примененные для анализа миРНК в лизатах культивируемых клеток человека (HepG2, Caco2, 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 культивируемых клеток человека, разработанные гетерогенные хемиллюминесцентные 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 мультитуночного 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 разработанный 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 конъюгатов антител с магнитными частицами карбодиимидным методом; выделение миРНК из культивируемых клеток.

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, конъюгата стрептавидин-полипероксидаза и усиленной хемилюминесценции, является

высококчувствительной 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 автором или при 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).

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 «Aptamers in Bordeaux» (Бордо, Франция, 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 РФФИ (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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Аналитические методы с применением аллостерической активации ппДНКзима

1. 1. Метод определения микроРНК-141, основанный на аллостерической активации ппДНКзима

Безамплификационный гомогенный метод определения миРНК был сконструирован на основе эффекта аллостерической активации пероксидаза-подобного ДНКзима (ппДНКзима). Этот миметик пероксидазы представляет собой нековалентный комплекс гемина со своим специфическим аптамером. При комплексообразовании с аптамером гемин переходит из димерной в мономерную форму, что повышает его каталитическую активность. Для формирования ппДНКзима критична структуризация аптамера в G-квадруплекс.

В разработанном методе последовательность аналитического зонда состояла из аптамера к гемину EAD2 и присоединенной к нему с 5'-конца дополнительной последовательности (ДП), азотистые основания которой комплементарно взаимодействовали с аптамером. Это взаимодействие препятствовало образованию G-квадруплекса аптамерного фрагмента. Однако в присутствии миРНК-141, используемой нами в качестве модельного

аналита [9] (Табл. 1), между ней и ДП формировался дуплекс, за счет чего последовательность аптамера высвобождалась. Это приводило к формированию G-квадруплексной структуры EAD2, а в присутствии гемина - ппДНКзима.

Таблица 1. МикроРНК, использованные в работе.

микроРНК	Последовательность (5'-3')
микроРНК-141	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG
микроРНК -200a	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU
микроРНК -200b	UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA
микроРНК -200c	UAAUACUGCCGGGUAUGAUGGA
микроРНК -429	UAAUACUGUCUGGUAACCGU
микроРНК -21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
микроРНК -205	UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG
микроРНК -155	UUA AUGCUAAUCGUGAUGGGGUU
микроРНК -319a	UUGGACUGAAGGGUGCUCCC
микроРНК -39	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG

Такая аналит-зависимая реакция образования ппДНКзима подтверждается полученными нами каталитическими данными. Так, наблюдалась зависимость интенсивности хемилюминесценции, образованной в результате ппДНКзим-катализируемого окисления люминола пероксидом водорода, от концентрации миРНК-141. При проведении этой реакции в течение 1 часа при оптимизированных условиях получена градуировочная зависимость определения миРНК-141 (Рис. 1 А). Видно, что данная зависимость аппроксимируется линейной функцией.

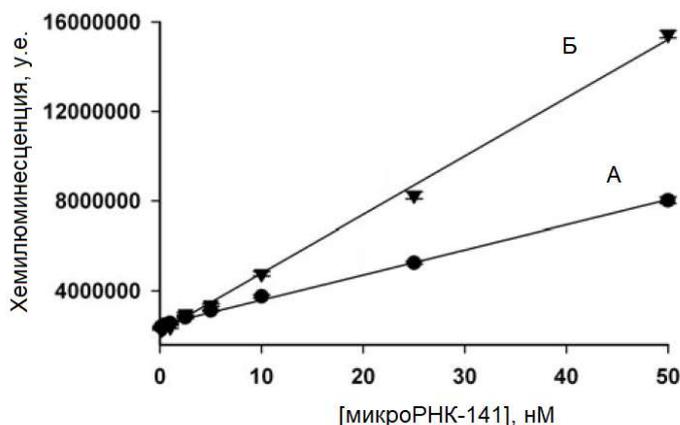


Рис. 1. Градуировочная зависимость определения микроРНК-141 методом, основанным на эффекте аллостерической активации ппДНКзима, при проведении реакции в течение А) 1 часа и Б) 18 часов. Концентрация микроРНК-141 варьировалась в растворе 25 нМ предварительно стандартно отожженного зонда в 25 мМ трис, рН 8.6 с 250 нМ гемина, 200 мМ NaCl, 20 мМ KCl и 0.02% (об/об) Тритон X100.

Предел обнаружения (определен методом 3σ) и коэффициент чувствительности (определен как наклон градуировочной зависимости), составили 100 пМ и 110 пМ^{-1} , соответственно. Пролонгирование реакции взаимодействия миРНК-141 и зонда до 18 часов

позволило увеличить коэффициент чувствительности определения миРНК-141 до 270 пМ^{-1} , то есть почти в три раза (Рис. 1 Б). При этом коэффициент вариации в обоих случаях был менее 2%, что говорит о высокой точности разработанного метода анализа.

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 [10], данный метод следует позиционировать как гомогенный простой метод для определения одноцепочечных олигонуклеотидов любой природы.

1.2. Метод определения активной экзонуклеазы, основанный на аллостерической активации ппДНКзима

Следует отметить, что аналитические возможности аллостерической активации ппДНКзима выходят за рамки анализа исключительно олигонуклеотидов. В этой работе показано, что данный принцип может также использоваться при определении 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 [11]. В качестве субстрата экзонуклеазы использовался олигонуклеотид шпильчатой структуры, содержащий в своей структуре последовательность аптамера EAD2, к 3'-концу которого ковалентно присоединена ДП, образующая комплементарные пары с аптамером. В результате действия экзонуклеазы III последовательность ДП субстрата гидролизовалась, высвобождая тем самым последовательность свободного аптамера, которая в присутствии гемина формировала каталитически активный ппДНКзим. Следует отметить, что исходные субстраты с геминном не взаимодействовали. Предел обнаружения метода определения активности экзонуклеазы III в оптимизированных условиях составил 4.8 Ед./мл (7.3 нМ). Коэффициент вариации был ниже 6%. Таким образом, применение разработанной нами аналитической платформы, основанной на стратегии аллостерической активации ппДНКзима, позволило успешно разработать простой в исполнении и моделировании, а также быстрый и чувствительный метод определения экзонуклеазы III, который может быть легко развит в условиях практически любой лаборатории.

2. Метод определения микроРНК-141, основанный на реакции КСШ

Предел обнаружения миРНК-141 (100 пМ), полученный в безамплификационном гомогенном методе с применением ппДНКзима, является достаточно высоким. Это сильно сужает спектр потенциально определяемых таким методом миРНК. В связи с этим было решено прибегнуть к альтернативной стратегии, основанной на проведении амплификации

аналитического сигнала, при этом сам анализ проводить в гетерогенной фазе. В нашей работе для проведения амплификации на этапе узнавания молекулы миРНК выбрана реакция каталитической сборки шпилек (КСШ) как наиболее эффективный (согласно литературным данным) метод бесферментной амплификации нуклеиновых кислот. Реакция КСШ представляет собой катализируемое аналитом взаимодействие двух шпилечных зондов. В своей закрытой форме зонды не имеют одноцепочечных участков, комплементарных друг другу, в связи с чем их взаимодействие кинетически затруднено. Однако на практике такое взаимодействие все же наблюдается, что приводит к повышению фонового сигнала в методах анализа с применением КСШ. Ранее для уменьшения аналит-независимой реакции зондов разработан КСШ с некомплементарным противостоянием нуклеотидов (нКСШ), где в последовательность одного из шпилечных зондов вводится пара нуклеотидов, некомплементарных последовательности другого реагирующего зонда [12]. В связи с тем, что в литературе данная модификация представлена как более эффективная, в нашей работе мы решили применить именно ее.

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

В разработанном нами методе определения миРНК-141 зонд Ш1 мечен флуоресцеином «Ш1-Флу(141)», а Ш2 - биотином «Ш2-Био(141)» (Рис. 2). Флу-метка использовалась для «посадки» Ш1 на поверхность нерастворимого носителя, несущего иммобилизованные антитела против Флу (анФлуАт), за счет антиген-антительного взаимодействия, в то время как биотиновая метка использовалась для оценки количества образующегося в нКСШ продукта. В присутствии миРНК-141, частично комплементарной последовательности хвоста шпильки Ш1-Флу(141), происходит раскрытие шпилечной структуры последней с образованием дуплекса. Благодаря этому из 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 вытеснения миРНК-141 с одновременным образованием дуплекса Ш1-Ш2, так как энергия связывания такого дуплекса

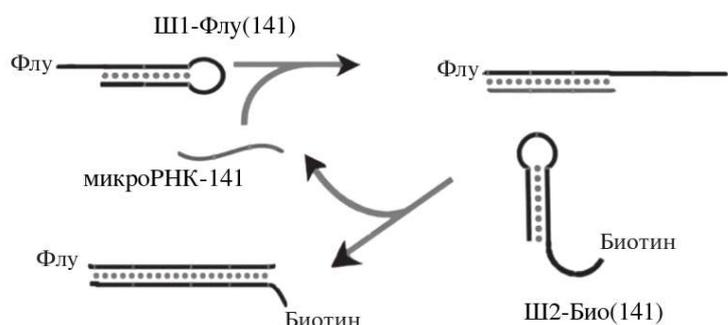


Рис. 2. Схема реакции амплификации нКСШ, используемой в методе определения микроРНК-141.

выше, чем энергия связывания дуплекса Ш1 с миРНК. В результате этого высвобожденная молекула миРНК-141 способна инициировать раскрытие другой молекулы зонда Ш1-

Флу(141). Таким образом, одна молекула аналита способна инициировать образование множества дуплексов Ш1-Ш2. После проведения реакции нКСШ в гомогенной среде, продукты реакции иммобилизовывались на нерастворимый носитель с анФлуАт. Дополнительная амплификация аналитического сигнала проводилась на этапе детектирования продуктов реакции нКСШ, меченных биотином. Для этого использовался коммерческий конъюгат стрептавидина и полипероксидазы хрена с молярным соотношением его компонентов 1:80. Более того, амплификация аналитического сигнала происходила также на этапе определения активности пероксидазы конъюгата за счет применения реакции усиленной хемилюминесценции с использованием фенотиазиновых усилителей в сочетании с 4-морфолинопиридином [13].

В качестве нерастворимого носителя был выбран непрозрачный (черный) полистирольный 96-луночный планшет, хорошо зарекомендовавший себя в хемилюминесцентном иммуноферментном анализе [14]. Данный носитель является стандартизованным материалом, позволяющим мультиплицировать и роботизировать анализ. В последние годы в гетерогенных методах анализа также часто применяются магнитные частицы (МЧ). Как главное преимущество МЧ исследователями указывается наличие развитой поверхности такого носителя, приводящее к возможности повысить концентрацию захватывающего зонда в реакции с аналитом и благодаря этому улучшить аналитические параметры его определения. В связи с этим было решено разработать методы определения миРНК-141 на основе микропланшета и МЧ и тем самым сравнить эффективность используемых носителей.

Для конструирования метода анализа с применением МЧ на первом этапе получены ковалентные конъюгаты карбоксилированных МЧ и анФлуАт. При их использовании для определения миРНК-141 найдено, что зависимость аналитического сигнала от концентрации анФлуАт-МЧ в реакционной среде имеет не линейный, а колоколообразный характер. Это позволило заключить, что предположение о том, что увеличение количества частиц в реакционной среде приводит к повышению аналитического сигнала, корректно только до определенного уровня концентрации МЧ, после чего данное утверждение становится неверным. Расчеты показали, что в случае задействованных нами МЧ площадь поверхности частиц при их концентрации, соответствующей максимуму аналитического сигнала (2.3×10^9 частиц/мл), составила 65 мм^2 . При применении микропланшета анализ миРНК-141 проводился идентичным образом, за исключением иммобилизации анФлуАт, которые сорбировались на поверхности лунки. При этом в лунки вносилось 50 мкл раствора анФлуАт, чтобы площадь поверхности лунки микропланшета, задействованной в анализе, была равна площади поверхности частиц при их оптимальной концентрации (65 мм^2). Для сравнения

эффективности микропланшета и МЧ получены две градуировочные кривые определения миРНК-141, которые оказались идентичны. В то же время отмечено, что работа с МЧ занимает больше времени и является более сложной в исполнении. В связи с этим дальнейшую работу проводили с применением микропланшетов.

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

Применение гетерогенного метода, основанного на гомогенной реакции нКСШ, позволило провести определение миРНК-141 с пределом обнаружения, равным 20 пМ. Следует отметить, что данная величина в пять раз ниже предела обнаружения метода, основанного на аллостерической активации ппДНКзима. Помимо гомогенного формата проведения нКСШ возможен иной вариант, когда Ш1-Флу(141) предварительно иммобилизуется в лунки планшета, а реакция нКСШ проходит в гетерогенном формате. Было решено разработать такой формат анализа.

Оптимизация условий отжига шпилечных зондов реакции нКСШ в гетерогенном хемилюминесцентном методе определения миРНК-141

Параллельно с конструированием метода определения миРНК с применением гетерогенной реакции нКСШ решалась задача по предотвращению неспецифического взаимодействия реагирующих шпилек. Известно, что слабым местом реакций КСШ является неспецифическое взаимодействие реагирующих шпилек. Одной из возможных причин этого, согласно нашему предположению, может служить образование шпилек с дефектными структурами. Так как шпилечные структуры формируются на стадии отжига зондов (в нашем случае нагревание до 88 °С и постепенное охлаждение), исследовано влияние ряда параметров отжига на интенсивность хемилюминесценции, образующейся в гетерогенном методе определения миРНК-141, а также на получаемый предел обнаружения. Нами показано, что интенсивность фонового сигнала зависит от таких параметров как: 1) концентрация NaCl и MgCl₂ в среде отжига и 2) концентрация шпилечных зондов при их отжиге (Рис. 3). Снижение фонового сигнала, сопровождаемое повышением детектируемости аналита, наблюдается с увеличением концентраций NaCl или, в большей степени, MgCl₂ в среде отжига зондов, а также при уменьшении концентрации шпилечных зондов при их отжиге.

Следует отметить, что в аналитических работах, посвященных разработке и оптимизации методов анализа с применением олигонуклеотидов шпилечных структур, условия отжига олигонуклеотидных зондов никак не обсуждаются, а зачастую в принципе не описываются. Вместе с тем, как нами обнаружено, в случае методов с использованием шпилек оптимизация условий отжига является крайне важным этапом исследования.

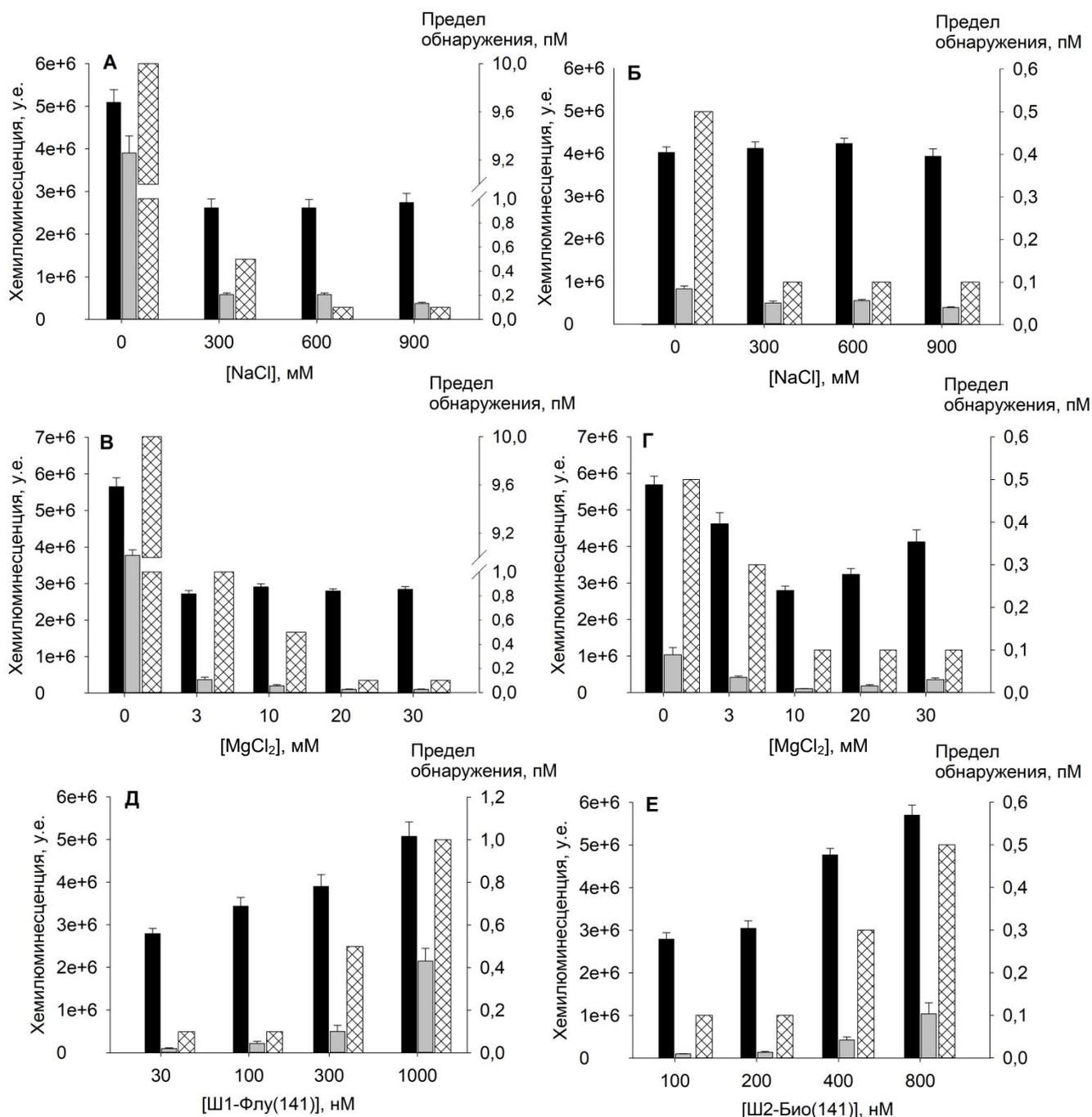


Рис. 3. Зависимость хемилюминесцентного сигнала при 50 пМ микроРНК-141 (черные столбцы), фонового сигнала (серые столбцы) и предела обнаружения микроРНК-141 (штрихованные столбцы) от концентрации А) NaCl в среде отжига с 30 нМ Ш1-Флу(141), Б) NaCl в среде отжига с 100 нМ Ш2-Био(141), В) MgCl₂ в среде отжига с 30 нМ Ш1-Флу(141), Г) MgCl₂ в среде отжига с 100 нМ Ш2-Био(141), Д) Ш1-Флу(141) и Е) Ш2-Био(141) при отжиге. Экспериментальные условия: среда отжига - 10 мМ трис, рН 7.2 с NaCl (А-Б) или MgCl₂ (В-Е), реакция нКСШ с 20 нМ Ш2-Био(141) в 10 мМ трис, рН 7.2 с 300 мМ NaCl (А), 600 мМ NaCl (Б) или 10 мМ MgCl₂ (В-Е). Используемое разведение конъюгата стрептавидин-полипероксидаза 1 : 200 000.

Аналитические параметры гетерогенного хемилюминесцентного метода определения микроРНК, основанного на реакции нКСШ

В оптимизированных условиях гетерогенного метода анализа получена градуировочная зависимость определения микроРНК-141 (Рис. 4). Предел обнаружения и нижний предел рабочего диапазона составили 100 фМ и 1 пМ, соответственно. Коэффициент

вариации в рабочем диапазоне не превышал 12%. Как видно из Рис. 4, от 10 до 100 пМ миРНК-141 наблюдается линейный участок зависимости с высоким значением коэффициента чувствительности, равным $100\ 000\ \text{пМ}^{-1}$. Следует подчеркнуть, что в методе с гетерогенным форматом проведения нКСШ достигнутый предел обнаружения в 200 раз ниже предела обнаружения, присущего методу анализа миРНК-141, где нКСШ проводилась в гомогенной фазе. Мы полагаем, что это связано с тем, что в гетерогенном варианте отсутствует конкуренция между непрореагировавшими зондами Ш1-Флу(141) и продуктами нКСШ на стадии иммобилизации, что и повышает чувствительность определения миРНК. Учитывая полученные результаты, в дальнейшей работе мы сосредоточились на более углубленной оценке возможностей метода анализа миРНК-141 с гетерогенным форматом проведения нКСШ.

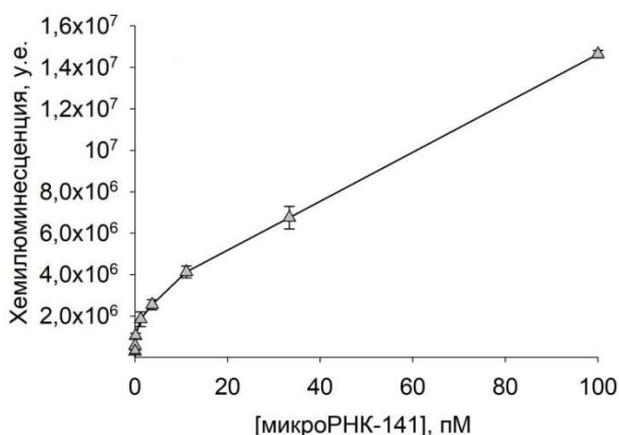


Рис. 4. Градуировочная зависимость определения микроРНК-141 методом, основанным на гетерогенной реакции нКСШ. Экспериментальные условия: отжиг 30 нМ Ш1-Флу(141) в 10 мМ трис, рН 7.2 с 20 мМ MgCl₂, иммобилизация 30 нМ Ш1-Флу(141) в 10 мМ трис, рН 7.2 с 20 мМ MgCl₂, отжиг 100 нМ Ш2-Био(141) в 10 мМ трис, рН 7.2 с 10 мМ 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 : 100 000.

Специфичность разработанного метода протестирована с использованием миРНК-141 (совершенный аналит) и четырех других наиболее близкородственных ей миРНК, входящих в семейство миРНК-200 человека: миРНК-200а, миРНК-200б, миРНК-200с и миРНК-429 (таблица 1). В этот список дополнительно добавлена нематодная миРНК-39, так как она обычно используется в количественном анализе исследуемых миРНК и вводится в биологические образцы в качестве эталонной молекулы для оценки эффективности очистки аналита из образцов [15]. Как выяснилось, разработанный метод анализа обнаруживает только миРНК-141 и миРНК-200а (наиболее гомологичная миРНК-141 в семействе), при этом перекрестная реактивность миРНК-200а составляет менее 20% по сравнению с миРНК-141. Другими словами, специфичность анализа оказалась чрезвычайно высокой.

2.3. 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 данная аналитическая стратегия универсальна для детекции различных миРНК. В связи с этим был разработан метод определения еще одной миРНК, связанной с развитием раковых опухолей – миРНК-155.

Полученный предел обнаружения для метода определения миРНК-155 составил 400 фМ. Коэффициент вариации в рабочем диапазоне (который начинается от 3 пМ) не превышал 12%. Линейный участок зависимости (от 10 до 100 пМ аналита) характеризуется высоким коэффициентом чувствительности $90\ 000\ \text{пМ}^{-1}$. Для исследования специфичности метода определения миРНК-155 использованы задействованные в работе основные миРНК-аналиты (миРНК-141 и миРНК-39), а также часто встречающиеся в литературе миРНК-319а, миРНК-21 и миРНК-205 (таблица 1). Результаты исследования показали, что кросс-реактивность посторонних исследуемых аналитов не превышала 1%, что говорит о высокой специфичности разработанного метода.

Дополнительно сконструирован метод количественного определения нематодной миРНК-39 (аналитическая схема полностью соответствовала схемам методов определения миРНК-141 и миРНК-155). Известно, что данная миРНК отсутствует в биообразцах человека, и по этой причине метод ее детекции необходим для оценки матричного эффекта при определении миРНК в клетках человека. Предел обнаружения миРНК-39 составил 300 фМ. Коэффициент вариации в пределах рабочего диапазона, который начинается от 0.8 пМ, не превышал 11%. Коэффициент чувствительности, рассчитанный как наклон линейного участка зависимости (от 10 до 100 пМ) оказался равен $130\ 000\ \text{пМ}^{-1}$. Для исследования специфичности использован тот же набор миРНК, что при исследовании специфичности метода определения миРНК-155. Показано, что кросс-реактивность используемых миРНК не превышала 3% относительно миРНК-39.

Таким образом, методы определения трех миРНК (миРНК-141, миРНК-155 и миРНК-39), основанные на разработанной нами гетерогенной стратегии с применением реакции нКСШ, показали близкие аналитические параметры, характеризующие данные методы как высокочувствительные и высокоспецифичные. Этот факт, в свою очередь, характеризует развитую нами стратегию как универсальную для разработки методов определения различных миРНК.

3. Метод определения микроРНК-155, основанный на амплификационной реакции КСШВО

В последние годы бурно развиваются методы анализа миРНК, основанные на применении бесферментных каскадных методов амплификации. При развитии таких методов продуктом первой амплификации должен стать одноцепочечный олигонуклеотид, позволяющий инициировать второй этап каскадной амплификации. Обычно это требование выполняется за счет модификации последовательностей реагирующих зондов. Однако, как говорит наш опыт, подобные модификации могут привести к понижению эффективности амплификации и ухудшению аналитических характеристик методов, созданных на их основе.

В связи с этим нами была поставлена задача разработать модификацию реакции КСШ, одним из продуктов которой будет одноцепочечный ДНК олигонуклеотид, и затем сравнить эффективность полученного метода и нКСШ в анализе миРНК.

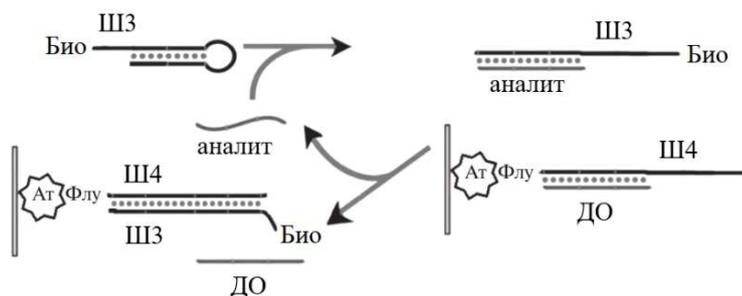


Рис. 5. Схема амплификационной реакции КСШВО.

Принцип такого метода амплификации, названного нами «каталитическая сборка шпилек с высвобождением олигонуклеотида» (КСШВО), представлен на схеме Рис. 5. На первом этапе КСШВО в лунках с анФлуАт производится иммобилизация дуплекса Флу-меченого шпилечного зонда Ш4-Флу и комплементарной ему дополнительной последовательности (ДО). Затем биотинилированный зонд Ш3-Био (аналог зонда Ш1 в КСШ) реагирует с миРНК-аналитом, за счет чего в Ш3-Био из дуплекса высвобождается домен, способный вступать в реакцию замещения с дуплексом Ш4-Флу/ДО. В результате этого образуется комплекс зондов Ш3-Био и Ш4-Флу (продукт традиционной КСШ) и свободные миРНК-аналит и ДО. Свободная миРНК участвует в следующем цикле амплификации, тогда как одноцепочечный ДО накапливается в реакционном растворе, при этом концентрация ДО пропорциональна концентрации исследуемой миРНК. Определение образуемых дуплексов Ш3-Био/Ш4-Флу проводилось так же, как и в методах, основанных на реакции нКСШ. Для подтверждения реакций, приведенных на схеме метода КСШВО, нами проводился ПААГ электрофорез в неденатурирующих условиях (Рис. 6).

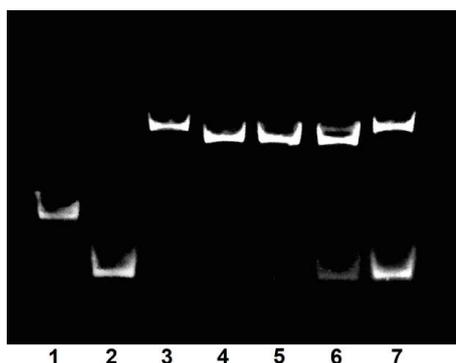


Рис. 6. Идентификация продуктов реакции КСШВО неденатурирующим ПААГ электрофорезом. Дорожка 1 - 200 нМ Ш4-Флу(155); дорожка 2 - 200 нМ ДО-Флу(155); дорожка 3 - 200 нМ дуплекса Ш3-Био(155)/Ш4-Флу(155), приготовленного отжигом; дорожка 4- 200 нМ дуплекса Ш4-Флу(155)/ДО-Флу(155), приготовленного отжигом; дорожки 5-7 - продукты реакции КСШВО, проведенной в присутствии 0, 20 и 200 нМ миРНК-155, соответственно.

Исчезновение полосы, соответствующей дуплексу Ш4-Флу(155)/ДО-Флу(155) в сочетании с интенсификацией полос дуплекса Ш3-Био(155)/Ш4-Флу(155) и свободного ДО-Флу(155) при увеличении концентрации миРНК-155 в реакции КСШВО подтверждает верность предположенного механизма реакции.

В оптимизированных условиях получена градуировочная зависимость определения миРНК-155 методом, основанным на реакции КСШВО. Она оказалась практически идентична полученной с помощью реакции нКСШ (Рис. 7). Предел обнаружения, характеризующий данные методы, 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) - $90\ 000\ \text{пМ}^{-1}$. При исследовании специфичности метода определения миРНК-155, основанного на реакции КСШВО найдено (при исследовании специфичности задействованы те же миРНК, что и для метода на основе нКСШ), что кросс-реактивность исследуемых миРНК по отношению к миРНК-155 не превышала 1%.

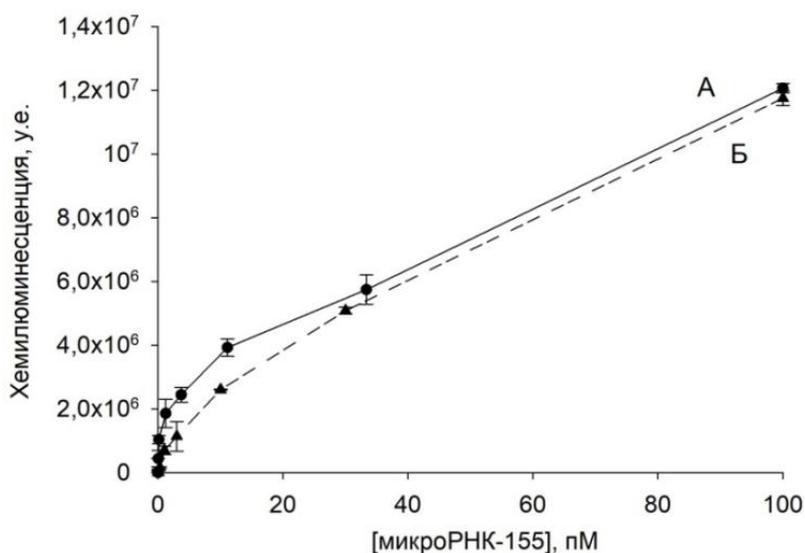


Рис. 7. Градуировочная зависимость определения микроРНК-155

методом, основанным на реакции А) нКСШ. Экспериментальные условия: отжиг 30 нМ Ш1-Флу(155) в 10 мМ трис, рН 7.2 с 20 мМ MgCl_2 , иммобилизация 30 нМ Ш1-Флу(155) в 10 мМ трис, рН 7.2 с 20 мМ MgCl_2 , отжиг 320 нМ Ш2-Био(155) в 10 мМ трис, рН 7.2 с 20 мМ MgCl_2 , реакция нКСШ с 160 нМ Ш2-Био(155) в 10 мМ трис, рН 7.2 с 20 мМ MgCl_2 .

Б) КСШВО. Экспериментальные условия: совместный отжиг Ш4-Флу(155) и ДО(155) в концентрации 1 мкМ, отжиг 120 нМ Ш3-Био(155) в 10 мМ трис, рН 7.2 с 600 мМ

NaCl ; иммобилизация 3 нМ Ш4-Флу(155) и ДО(155) после совместного отжига в 10 мМ трис, рН 7.2 с 300 мМ NaCl ; реакция КСШВО с 60 нМ Ш3-Био(155) в 10 мМ трис, рН 7.2 с 600 мМ NaCl . Используемое разведение стрептавидин-полипероксидаза 1 : 100 000.

Сравнение аналитических параметров, характеризующих методы определения миРНК-155 с применением нКСШ и КСШВО, демонстрирует, что эффективность амплификации обоих методов близка, и они в равной степени могут быть использованы при конструировании методов анализа миРНК. Более того, появление в руках экспериментаторов КСШВО, оригинального бесферментного метода амплификации нуклеиновых кислот, открывает широкие возможности разработки 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 за счет его взаимодействия с поверхностью носителей при его иммобилизации [16]. Таким образом, реакция КСШВО может расширить возможности применения бесферментной амплификации в гетерогенном анализе миРНК и других олигонуклеотидов.

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

При попытке определения внесенной в лизат клеток миРНК-39 (с помощью разработанного нами метода определения миРНК-39) без какой-либо его пробоподготовки выявлен высокий матричный эффект. Для осуществления предварительной пробоподготовки с помощью коммерческого набора LRU-100-500 («БиоЛабМикс») нами было проведено выделение коротких РНК (менее 200 нуклеотидов) из исследуемых клеточных лизатов.

Таблица 2. 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

Данная пробоподготовка снизила наблюдаемый матричный эффект до незначительного уровня. Полученный факт позволил нам использовать зависимости интенсивности хемилюминесценции от концентрации исследуемых миРНК, растворенных в буферном растворе, как градуировочные кривые при определении содержания микроРНК-141 и микроРНК-155 в лизатах клеток раковых линий MCF-7, CaCo2, HepG2 и HeLa.

В процессе пробоподготовки, что вполне естественно, теряется часть выделяемых 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 количество оставшейся 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 2). Таким образом, полученные результаты продемонстрировали возможность практического применения разработанных нами высокочувствительных и высокоспецифичных гетерогенных хемилюминесцентных методов анализа миРНК.

Заключение

В результате проделанной работы с применением аллостерической активации пДНКзима 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 стрептавидин-полипероксидаза 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 с высвобождением олигонуклеотида» (КСШВО), эффективность которой, как было установлено, практически идентична эффективности нКСШ.

ВЫВОДЫ

1. С использованием аналитической платформы, основанной на аллостерической активации пДНКзима, 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 использованием тройной амплификации, основанной на применении бесферментной амплификационной реакции 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).

Список использованной литературы

1. 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.
2. 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.
3. Alvarez-Garcia I., Miska E. A. MicroRNA functions in animal development and human disease // *Development*. – 2005. – V.132. – P. 4653-466.
4. Lu J., Getz G., Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers // *Nature*. – 2005. – V. 435. – P. 834-838.
5. 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.
6. 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.
7. He M., Zhang H. N., Tang Z. C., Gao S. G. Diagnostic and therapeutic potential of exosomal microRNAs for neurodegenerative diseases // *Neural Plasticity*. – 2021. – P. 1-13.
8. 8.Laggerbauer B., Engelhardt S. MicroRNAs as therapeutic targets in cardiovascular disease // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2022. – V. 132. – № 11. – P. e159179.
9. 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.

10. 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.
11. Hoheisel J. D. On the activities of Escherichia coli exonuclease III // *Analytical Biochemistry*. – 1993. – V. 209. – № 2. – P. 238-246.
12. Jiang Y. S., Bhadra S., Li B., and Ellington A. D. (2014) Mismatches improve the performance of strand-displacement nucleic acid circuits // *Angewandte Chemie*. – V. 126. – P. 1876-1879.
13. 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.
14. Xiao Q., Xu C. Research progress on chemiluminescence immunoassay combined with novel technologies // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2020. – V. 124. – P. 115780.
15. Solovjev A. M., Galkin I. I., Pletjushkina O. Y., Medvedko A. V., Zhao S., Sakharov I. Y. Isothermal chemiluminescent assay based on circular strand-displacement polymerization reaction amplification for cel-miRNA-39-3p determination in cell extracts // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – V. 182. – P. 987-992.
16. 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.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science, Scopus

1. **Bodulev O. L.**, Sakharov I. Y. Chemiluminescent determination of microRNA-141 using target-dependent activation of the peroxidase-mimicking DNAzyme // *Analytical Letters*. – 2019. – V. 52. – № 5. – P. 813-824. (объем 0.4 п.л.) [Импакт-фактор WoS=2.267]
2. Burkin K. M., **Bodulev O. L.**, Gribas A. V., Sakharov I. Y. One-step label-free chemiluminescent assay for determination of exonuclease III activity towards hairpin oligonucleotides // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2019. – V. 131. – P. 109419. (объем 0.2 п.л.) [Импакт-фактор WoS=3.705]
3. **Бодулев О. Л.**, Сахаров И. Ю. Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот и их применение в биоанализе // *Биохимия (Москва)*. – 2020. – Т. 85. – С. 174-196. (объем 0.7 п.л.) (**Bodulev O. L.**, Sakharov I. Y. Isothermal nucleic acid amplification techniques and their use in bioanalysis // *Biochemistry (Moscow)*. – 2020. – V. 85. – P. 147-166. (объем 0.7 п.л.) [Импакт-фактор WoS = 2.824])

4. **Bodulev O. L.**, Zhao S., Sakharov I. Y. Improving the sensitivity of the miRNA assay coupled with the mismatched catalytic hairpin assembly reaction by optimization of hairpin annealing conditions // *Analytical Chemistry*. – 2021. – V. 93. – № 17. – P. 6824-6830. (объем 0.2 п.л.) [Импакт-фактор WoS=8.008]

5. **Бодулев О. Л.**, Сахаров И. Ю. Современные методы определения микроРНК // *Биохимия (Москва)*. – 2022. – Т. 87. – № 4. – С. 474-496. (объем 0.7 п.л.) (**Bodulev O. L.**, Sakharov I. Y. Modern Methods for Assessment of microRNAs // *Biochemistry (Moscow)*. – 2022. – V. 87. – № 5. – P. 425-442. (объем 0.6 п.л.) [Импакт-фактор WoS=2.824])

6. **Бодулев О. Л.**, Сахаров И. Ю. Планшетный хемилюминесцентный метод определения микроРНК-141, основанный на применении каталитической сборки шпилек и конъюгата стрептавидина и полипероксидазы // *Журнал Аналитической Химии*. – 2022. – Т. 77. – № 4. – С. 448-455. (объем 0.3 п.л.) (**Bodulev O. L.**, Sakharov I. Y. A Microtiter-Plate Chemiluminescence Method for the Determination of MicroRNA-141 Based on the Application of Catalytic Hairpin Assembly and a Streptavidin–Polyperoxidase Conjugate // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2022. – V. 77. – № 4. – P. 450-457. (объем 0.3 п.л.) [Импакт-фактор WoS = 1.237])

7. Safenkova I. V., Burkin K. M., **Bodulev O. L.**, Razo S. C., Ivanov A. V., Zherdev A. V., Dzantiev B.B., Sakharov I. Y. Comparative study of magnetic beads and microplates as supports in heterogeneous amplified assay of miRNA-141 by using mismatched catalytic hairpin assembly reaction // *Talanta*. – 2022. – V. 247. – P. 123535. (объем 0.3 п.л.) [Импакт-фактор WoS = 6.556]

8. **Bodulev O. L.**, Galkin I. I., Zhao S., Pletyushkina O. Y., Sakharov I. Y. Quantitation of microRNA-155 in human cells by heterogeneous enzyme-linked oligonucleotide assay coupled with mismatched catalytic hairpin assembly reaction // *Biosensors*. – 2022. – V. 12. – № 8. – P. 570. (объем 0.4 п.л.) [Импакт-фактор WoS = 5.743]

Сокращения, принятые в тексте. **миРНК** - микроРНК, **пДНКзим** - пероксидаза-подобный ДНКзим, **ДП** - дополнительная последовательность, **ПЦР** - полимеразная цепная реакция, **КСШ** - каталитическая сборка шпилек, **нКСШ** - каталитическая сборка шпилек с некоплементарным противостоянием нуклеотидов, **КСШВО** - каталитическая сборка шпилек с высвобождением олигонуклеотида, **МЧ** - магнитные частицы, **анФлуАт** - антифлуоресцеиновые антитела, **Флу** - флуоресцеин, **Био** - биотин.