

АНАЛИЗ КРИВЫХ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ПЛАВЛЕНИЯ АТФ-АПТАМЕРА В РАЗНЫХ pH ПРИ ПОМОЩИ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

П. В. Габрусёнок, П. А. Соколов

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Широко применяемым методом для изучения термодинамики нуклеиновых кислот является анализ их кривых плавления [1]. Простота организации эксперимента с использованием пары флюоресцентный краситель-тушитель в ПЦР-термоциклерах делает такую методику крайне популярной и доступной. Анализ получаемых кривых плавления подразумевает их корректную интерпретацию, особенно если требуется получить абсолютные значения температур плавления и/или энтальпии и энтропии переходов между состояниями меченой молекулы. Поиск базовых линий сигнала, вид которых зависит как от свойств самих систем, так и от используемого оборудования [2], является первостепенно важной задачей, без решения которой дальнейший анализ существенно ограничен. Как правило, характеристика базовых линий осуществляется за пределами области плавления [3], что в ряде случаев невозможно. В данной работе предлагается простой в реализации подход для интерпретации кривых плавления. Он основывается на накладывании ограничений на интерпретацию сигнала, основанных на термодинамической модели системы. Предлагаемый метод показал высокую воспроизводимость и независимость результатов (температур плавления проб) от юстировки прибора, т.е. выравнивания лазера, положения кюветы с образцом, паразитных отражений в ней и следов испарения образца на стенках и переменной чувствительности детектора от ячейки к ячейке.

Активное исследование аптамеров позволило применять их в качестве терапевтических и диагностических медицинских систем, а также в роли молекулярных сенсоров и датчиков окружающей среды [4]. Применение молекулярных переключателей с замещающей нитью к аптамеру [5] в биологических системах требует изучения термодинамики модифицированных аптамеров в различных pH, так как он варьируется в разных тканях, а также изменяется при определенных заболеваниях [6]. В данной работе мы изучили связывание классического АТФ-аптамера с АТФ и его гибридизацию с замещающими нитями при различных pH и ионных условиях вышеописанным методом анализа флуоресцентного плавления. Мы показали, что стабильность АТФ-аптамера различается в разных pH и растет с повышением концентрации АТФ. Сравнивая pH зависимости стабильности АТФ-аптамера и его дуплексов с комплементарными нитями разной длины, мы пришли к выводу, что молекулярные переключатели вида «аптамер-замещающая нить» могут иметь собственную pH-зависимость, которая ранее никогда не принималась во внимание и должна учитываться при рациональном дизайне подобных систем в будущем.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-25-00302.

Библиографические ссылки

1. You Y., Tataurov A.V., Owczarzy R. Measuring thermodynamic details of DNA hybridization using fluorescence // *Biopolymers*. 2011. Vol. 95, iss. 7. P. 472–486.
2. Owczarzy R. Melting temperatures of nucleic acids: discrepancies in analysis // *Biophys Chem*. 2005. Vol. 117, iss. 3. P. 207–215.

3. *Palais R., Wittwer C. T.* Mathematical algorithms for high-resolution DNA melting analysis // *Methods Enzymol.* 2009. Vol. 454. P. 323–343.
4. *Dunn M. R., Jimenez R. M., Chaput J. C.* Analysis of aptamer discovery and technology // *Nat Rev Chem.* 2017. Vol. 1, iss. 10. P. 1–16.
5. *Feagin T. A., Maganzini N., Soh H. T.* Strategies for creating structure-switching aptamers // *ACS Sens.* 2018. Vol. 3, iss. 9. P. 1611–1615.
6. pH and its applications in targeted drug delivery / S. Abdella [et al.] // *Drug Discov Today.* 2023. Vol. 28, iss. 1. P. 103414.