

4
НОМЕР



ISSN 2304-9081

Электронный журнал
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



2016

УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© М.Б. Раев, П.В. Храмов, М.С. Бочкова, 2016

УДК 57.088.1

М.Б. Раев^{1,2}, П.В. Храмов¹, М.С. Бочкова²

ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДНК-АПТАМЕРОМ

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Цель. Разработка метода модификации поверхности углеродных наночастиц ДНК-аптамером, специфичным к IgE человека.

Материалы и методы. Конъюгат углеродных наночастиц со стрептавидином, синтезированный по авторской методике, инкубировали с биотинилированным аптамером 5'-С6-Biotin-GGGGCACGTTTATCCGTCCTCCTAGTGGCGTGCCCC-3'. Количество связанного аптамера оценивали спектрофотометрически. Функциональную активность иммобилизованного аптамера оценивали при помощи твердофазного дот-анализа на полистироле.

Результаты. Средний размер углеродных наночастиц составлял 174 нм (min 78 нм, max 400 нм). Было установлено, что 1 мг частиц связывает 80 пм анти-IgE аптамера. Методом дот-анализа выявлено, что концентрация аптамера в диапазоне 300-400 пм/мл является оптимальной для функционализации наночастиц. Увеличение длительности инкубации аптамера с наночастицами с 1 часа до 24 часов не приводило к увеличению количества сорбированного аптамера. Методом дот-анализа на полистироле было установлено, что комплекс углеродных наночастиц с ДНК-аптамером связывает IgE, сорбированный на твердую фазу в концентрации 10 мкг/мл.

Заключение. В ходе работы был синтезирован конъюгат углеродных наночастиц с биотинилированным ДНК-аптамером, специфичным к IgE человека, посредством биоспецифического взаимодействия пары «стрептавидин-биотин». Дальнейшие направления работы связаны с тестированием различных подходов к иммобилизации ДНК-аптамера, в частности ковалентного, исследованием стабильности функционализированных аптамером наночастиц, а также использованием аптамера, несущего спейсер для повышения эффективности его взаимодействия с молекулой-мишенью.

Ключевые слова: углеродные наночастицы, аптамер, ДНК, иммуноглобулин E, стрептавидин

M.B. Rayev^{1,2}, P.V. Khrantsov¹, M.S. Bochkova²

FUNCTIONALIZATION OF CARBON NANOPARTICLES WITH DNA APTAMER

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UrB RAS, Perm, Russia

Objective. The goal of our work was to develop a method of surface modification of carbon nanoparticles with DNA aptamer against human IgE.

Materials and methods. Carbon nanoparticles coated with streptavidin was synthesized according to author's method. Nanoparticles were incubated with aptamer 5'-C6-Biotin-GGGGCACGTTTATCCGTCCTCCTAGTGGCGTGCCCC-3'. Amount of aptamer bound per mg of nanoparticles was determined by UV-VIS spectrophotometry. Functional activity of immobilized aptamer was assessed by dot-blot assay on polystyrene.

Results. Mean size of streptavidin-coated nanoparticles was 174 nm (min 78 nm, max 400 nm). According to UV-VIS 1 mg of carbon nanoparticles binds 80 pM of aptamer. Dot-blot as-

say showed that 300-400 pM is optimal concentrations to functionalize carbon nanoparticles. Increasing of duration of incubation of carbon nanoparticles with aptamer from 1 hr to 24 hrs did not lead to growth of amount of aptamer bound to nanoparticles. Dot-blot assay revealed that carbon nanoparticles coated with aptamer bind to IgE immobilized on the solid phase in the concentration of 10 ug/ml.

Conclusion. Conjugate of streptavidin-coated carbon nanoparticles with biotinylated aptamer against human IgE was synthesized. Further investigation concerned with using of spacer-bearing aptamer and examination of different approaches to immobilization of aptamer.

Keywords: carbon nanoparticles, aptamer, DNA, immunoglobulin E, streptavidin.

Введение

Аптамеры – это ДНК- или РНК-олигонуклеотиды, размером 20-40 нуклеотидов, обладающие способностью специфически взаимодействовать с мишенью, в качестве которой выступают ионы, молекулы или целые клетки. Аптамеры, специфичные к целевой молекуле, получают методом отбора из библиотеки случайных олигонуклеотидных последовательностей. По сути своей, аптамеры являются искусственными нуклеотидными «функциональными аналогами» антигенсвязывающих фрагментов антител. Впервые аптамеры были описаны в 1990 году тремя независимыми группами ученых [1-3].

В настоящее время в целом ряде областей биомедицины их рассматривают как альтернативу моноклональным антителам и рекомбинантным одноцепочечным варибельным фрагментам (scFv) антител. Ключевыми преимуществами аптамеров являются: устойчивость к повышенным температурам, низкая варибельность от партии к партии, высокая аффинность по отношению к мишени, простота модификаций (метилирование, аминирование, биотинилирование, введение флуоресцентных меток и т.д.), низкая иммуногенность, высокая способность преодолевать тканевые барьеры, практически бесконечное разнообразие потенциальных мишеней (от ионов до клеток) [4].

Наиболее перспективными сферами применения аптамеров являются иммунодиагностика, таргетная терапия, гистохимия и клеточная биология [4]. Значительное число разработок в перечисленных областях биомедицины связано с использованием аптамеров, конъюгированных с наночастицами. В частности, активное поглощение клетками наночастиц обуславливает их широкое применение как транспортных средств при адресной доставке лекарств. Роль аптамеров при этом состоит как в обеспечении связывания нагруженной наночастицы с поверхностной молекулой целевой клетки, так и в регуляции процесса доставки [5, 6]. Комплексы наночастиц (прежде всего

золотых) с аптамерами применяются при разработке систем экспресс-диагностики [7, 8] и биосенсоров [9, 10]. В системах диагностики наночастицы используются как для амплификации сигнала за счет увеличения количества репортерных молекул, приходящихся на одну связанную молекулу-мишень, так и собственно для генерации сигнала. В последнем случае широко используются физико-химические свойства наночастиц: изменение спектра поглощения, проводимости, способность к люминесценции или ее гашению и др. Возможность амплификации сигнала при помощи наноматериалов определяет их успешное использование в области медицинской визуализации (medical imaging) результатов разных реакций [11]. Существенное количество работ посвящено замещению антител в составе иммуноферментных тест-систем аптамерами [12]. Пегилированный РНК-аптамер – основа препарата Pegaptanib («Макуген»), предназначенного для лечения влажной (неоваскулярной) формы возрастной макулодистрофии [13].

Целью нашего исследования была разработка метода модификации поверхности углеродных наночастиц ДНК-аптамером, специфичным к IgE человека.

Углеродные наночастицы выбраны нами в качестве объекта исследования вследствие их широкого использования в иммуноанализе [14], терапии и диагностике раковых заболеваний, адресной доставке лекарственных средств [15-17]. Ранее нами была предложена технология синтеза высокостабильных суспензий углеродных наночастиц, модифицированных биомолекулами, сохраняющих свои функциональные свойства на протяжении нескольких лет [18]. В настоящей работе предпринята попытка адаптировать эту технологию для получения углеродных наночастиц, функционализированных аптамерами.

Материалы и методы

Реактивы: G белок, бычий сывороточный альбумин (БСА), ДНК-аптамер 5'-GGGGCACGTTTATCCGTCCCTCCTAGTGGCGTGCCCC-3', специфичный к IgE человека [19], меченный биотином по 5'-концу («Синтол», Россия), бромистый этидий («Sigma», США), стрептавидин («Prospec Bio», Израиль), персульфат аммония, мочевины, глутаральдегид («AppliChem», Германия), хлорид натрия, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, хлорид магния, хлорид калия, трис, глицерин, Твин-20 («Panreac», Испания), азид натрия («Fluka», Германия), ЭДТА, бромфеноловый синий, акриламид,

N,N,N',N'-Тетраметилэтилендиамин («Bio-Rad», США). Концентрированный (100 мМ) раствор аптамера в ТЕ-буфере с 1мМ ЭДТА хранили в замороженном виде при -20°C , перед началом работы его размораживали, разводили до рабочей концентрации в ЗФРМК, прогревали при $+95^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин, а затем охлаждали до комнатной температуры в течение 10-15 мин.

Приборы: спектрофотометр Shimadzu UV-VIS UVmini 1240 (Япония), ультразвуковой дезинтегратор MSE Soniprep 150 (Великобритания), анализатор частиц Malvern ZetaSizer NanoZS (Великобритания), планшетный спектрофотометр Biohit PB 800 (Финляндия), приготовление пластин гелей и электрофорез проводили на приборе Mini-PROTEAN Tetra Cell «Bio-Rad» (США).

Буферные растворы: 0,15М раствор NaCl, забуференный 0,015М Na-фосфатами, содержащий 0,1% NaN_3 pH 7,25 (ЗФР), ЗФР +0,1%Tween 20 (ЗФРТ), ЗФР+3мМ KCl+5мМ MgCl_2 (ЗФРМК), Трис-HCl, 1мМ ЭДТА, pH 8,0 (ТЕ-буфер), 2М Трис-ацетат, 50мМ ЭДТА, pH 7,6 (50x TAE-буфер). Все растворы, использованные в работе приготовлены на деионизированной воде.

Синтез углеродных наночастиц, конъюгированных со стрептавидином, осуществляли по описанной ранее методике [18]. На первом этапе синтеза поверхность углеродных частиц гидрофилизировали БСА, на втором этапе при помощи сшивающего агента (глутаральдегида) частицы ковалентно функционализировали стрептавидином и G белком стрептококка. Конъюгат углеродных наночастиц с G белком, а также гидрофилизированные углеродные наночастицы, полученные на первой стадии синтеза, использовались в качестве контроля. Концентрацию углеродных наночастиц измеряли спектрофотометрически, по интенсивности поглощения на 450 нм, исходя из данных о том, что интенсивность поглощения суспензии с массовой долей углеродных наночастиц 0,03% равна 14 оптическим единицам.

Измерение размеров углеродных наночастиц осуществляли на анализаторе частиц методом измерения обратного динамического светорассеяния. Суспензию наночастиц разводили ЗФР до концентрации углеродных наночастиц 0,01% (здесь и далее имеется в виду массовая доля) и производили 10 циклов измерений по 10 секунд.

Гомогенность препарата олигонуклеотида подтверждали методом вертикального электрофореза в 20% полиакриламидном геле (ПААГ). Десять миллилитров геля включали в себя 4,2 г мочевины (7М), 200 мкл 50x TAE-

буфера (рН 7,6), 90 мкл персульфата аммония, 20 мкл N,N,N',N'-Тетраметилэтилендиамина. Олигонуклеотиды в концентрации 1 мкМ и 10 МкМ смешивали с буфером для образцов (5 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 20 мМ ЭДТА, 8М мочевины, 0,5% бромфеноловый синий) в соотношении 1:1,5 и прогревали при +95°C в течение 5 мин. В качестве электродного буфера использовали 1х ТАЕ-буфер. Напряжение при электрофорезе составляло 100 В на пластину геля. По окончании анализа гели окрашивали бромистым этидием и обрабатывали при помощи системы Gel Doc XR «Bio-Rad» (США).

Определение количества аптамера, иммобилизованного на поверхности углеродных наночастиц осуществляли следующим образом: в 900 мкл суспензий гидрофилизированных углеродных наночастиц, углеродных наночастиц, конъюгированных со стрептавидином, и углеродных наночастиц, гидрофилизированных БСА, разведенных в ЗФР с 0,1% Твина-20, добавляли аптамер до конечной концентрации 1,5 мкМ. Концентрация углеродных наночастиц составляла 0,5%. Конъюгирование проводили при перемешивании на роторном встряхивателе при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем смеси центрифугировали при 20000g в течение 15 мин. Концентрацию не связавшегося аптамера измеряли по поглощению супернатанта при длине волны 260 нм.

Подбор оптимальной концентрации аптамера для иммобилизации методом дот-иммуноанализа. Для оценки минимальной концентрации аптамера, необходимой для функционализации поверхности наночастиц, разработан тест в формате дот-анализа, основанный на измерении подавления связывания наночастицами Str-C биотинилированного БСА (Bi-БСА) раствором аптамера.

На полоски из нитроцеллюлозной мембраны сорбировали в виде точек Bi-БСА в концентрации 10 мкг/мл в ЗФР, после чего полоски высушивали при комнатной температуре в течение часа. Наночастицы Str-C разводили в ЗФРТ до концентраций 0,12, 0,06 и 0,03%, затем в растворы добавляли аптамер до конечной концентрации 0,5, 0,25, 0,125, 0,062 и 0,03 мкМ, после часовой инкубации на роторном встряхивателе растворы инкубировали с тест-полосками в течение 60 мин. Далее полоски промывали ЗФРТ и высушивали.

При взаимодействии наночастиц Str-C с Bi-БСА на поверхности мембраны формируются темные точки, предварительная инкубация частиц с биотинилированным аптамером должна была снизить уровень сигнала. По-

давление сигнала оценивали визуально.

Для исследования способности частиц *Apt~Str-C* взаимодействовать с иммуноглобулинами человека суспензию углеродных наночастиц разводили ЗФРТ до концентрации 0,5%, после чего в раствор добавляли аптамер до конечной концентрации 1,5 мкМ и объема раствора 1 мл. Смесь инкубировали на роторном встряхивателе при комнатной температуре в течение 1 часа. Частицы отмывали ЗФРТ от избытка аптамера четырьмя последовательными циклами центрифугирования (20000g, 15 мин) и декантации. После последней промывки объем суспензии довели до 1 мл ЗФРТ, осадок наночастиц ресуспендировали на вортексе и пятиминутным озвучиванием с использованием ультразвукового дезинтегратора.

Взаимодействие функционализированных аптамером углеродных наночастиц с IgE и IgG человека исследовали методом дот-анализа на полистирольной поверхности. Для анализа использовали планшет с лунками из непрозрачного белого полистирола объемом 2 мл. Лунки планшета перед использованием промывали дистиллированной водой. На дно лунок точками наносили растворы белков IgG, IgE, Vi-БСА и БСА в ЗФР в концентрации 10 мкг/мл. Сенсibilизацию полистирола проводили в течение 30 мин во влажной камере при температуре +37°C, после чего лунки трехкратно промывали 300 мкл ЗФРТ и вносили в них частицы *Apt~Str-C*, разведенные в ЗФРТ до концентрации 0,03%. Лунки планшетов заклеивали пленкой, планшеты помещали на качалку на полчаса инкубацию в термостате при +37°C.

Результаты и обсуждение

Иммобилизацию аптамеров на поверхности наночастиц осуществляют различными путями: с использованием электростатических, ковалентных или биоспецифических взаимодействий. Одним из наиболее простых и мягких подходов является использование стрептавидин-биотинового взаимодействия. Такой подход позволяет производить ориентированную «посадку» биотинилированного аптамера на наночастицы, покрытые стрептавидином, а преимущества его кроются в высокой специфичности и скорости реакции стрептавидин-биотин. С учетом имеющегося опыта синтеза конъюгатов углеродных частиц со стрептавидином был сделан выбор в пользу использования в работе биотинилированной формы аптамера.

В ходе проведения исследования нами была получена 1,23% суспензия

углеродных наночастиц, конъюгированных со стрептавидином. Помимо частиц и буфера суспензия содержала 1% БСА и 20% глицерина. Средний размер частиц составил 174 нм (min 78 нм, max 400 нм); разброс размеров частиц представлен на рисунке 1.

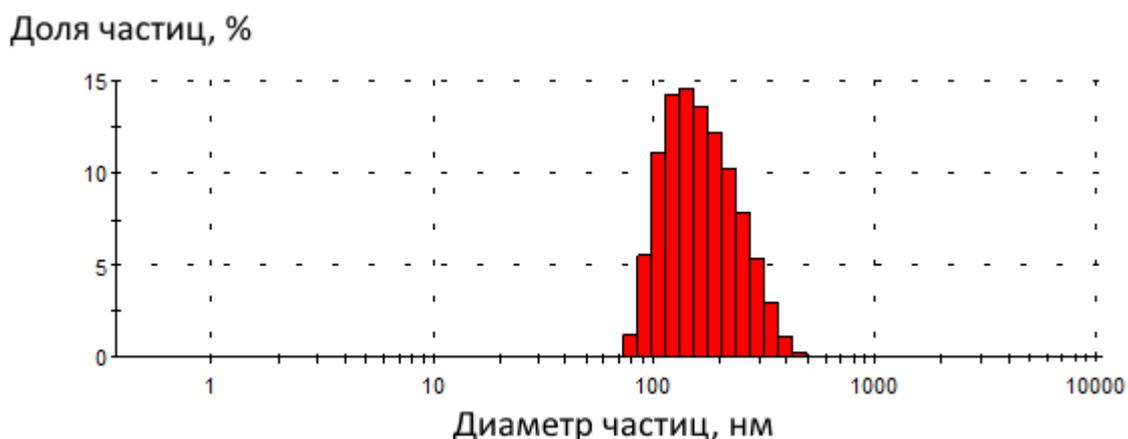


Рис. 1. Распределение по размерам углеродных наночастиц, конъюгированных со стрептавидином.

Перед проведением экспериментов по иммобилизации аптамера на углеродных наночастицах нами оценивалась гомогенность препарата ДНК-олигонуклеотида методом вертикального гель-электрофореза в ПААГ (рис. 2).

Для количественной оценки иммобилизации аптамера на поверхности частиц нами был использован спектрофотометрический метод. Частицы Str-C инкубировали с аптамером, осаждали и измеряли снижение поглощения при 260 нм в супернатанте. Изначально для разведения частиц был использован ЗФР, однако в ходе отмывок частицы в значительном количестве оседали на стенках микропробирок, искажая результаты измерения поглощения супернатанта. Кроме того, нами был отмечен высокий уровень неспецифического взаимодействия аптамеров с углеродными наночастицами: уровень поглощения в супернатанте снижался при инкубации с частицами, несущими на своей поверхности стрептавидин, G белок и даже при инкубации с наночастицами, гидрофилизированными БСА. Для устранения этих проблем в последующих экспериментах для разведения и промывок был использован ЗФРТ.

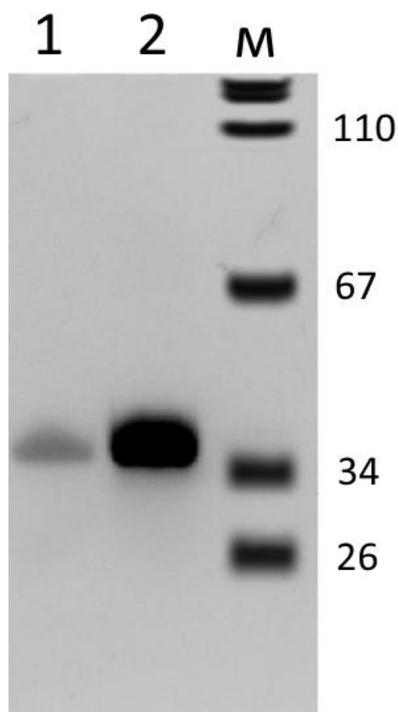


Рис. 2. Гель-электрофоретическое исследование препарата аптамера.
Дорожки: 1 – аптамер 1мкМ, 2 – аптамер 10 мкМ, М – маркеры с указанным количеством нуклеотидов.

В ходе первых экспериментов аптамер в концентрации 1,5 мкМ инкубировали с растворами частиц, содержание которых составляло 0,01% и менее. В этом случае снижения оптической плотности в супернатанте не отмечалось, очевидно, вследствие слишком малого количества связавшегося с частицами аптамера. Было решено увеличить концентрацию углеродных наночастиц до 0,5%. Снижение оптической плотности супернатанта было невелико, однако достоверно отлично от контрольных проб. В пересчете на концентрацию олигонуклеотида установлено, что с 1 мг углеродных частиц связывается порядка 80 пМ аптамера, при исходной концентрации 300 пМ на 1 мг.

Количественные характеристики взаимодействия олигонуклеотида с наночастицами Str-C исследованы при помощи дот-аналитической системы. Выявлено, что предварительная инкубация наночастиц, модифицированных стрептавидином, приводит к подавлению их способности взаимодействовать с биотинилированным агентом (в нашем случае – Vi-BCA). Полное подавление сигнала на твердой фазе наблюдалось при предынкубации частиц с аптамером в соотношении 1 мг частиц на 300-400 пМ аптамера, что совпадало с данными спектрофотометрии. Увеличение длительности инкубации с 1 часа до 12 и 24 часов не влияло на результат исследования, что можно объяснить

высокой скоростью реакции стрептавидин-биотин.

При оценке функциональной активности иммобилизованного аптамера методом дот-анализа на полистироле установлено, что частицы Апт~Str-C способны взаимодействовать с IgE человека. Кроме того, отмечалась также слабая реакция с IgG человека, что соответствует литературным данным. Интересно, что при прямой детекции IgE, сорбированного на нитроцеллюлозную мембрану, сигнал отсутствовал. Не было получено сигнала и при последовательной инкубации полистирола или нитроцеллюлозной мембраны, сенсибилизированных IgE, с растворами аптамера и наночастиц Str-C. Очевидно, этот результат связан с тем, что малые размеры аптамера (2-3 нм) относительно размера наночастиц служат причиной стерических помех при взаимодействии в системе «твердая фаза-аптамер-наночастица». Решением в данном случае может быть введение в структуру аптамера инертного спейсера, который пространственно отдалит связывающий участок аптамера от точки «крепления» к поверхности наночастицы. Ранее на примере анти-IgE аптамера уже продемонстрирована эффективность добавления поли-Т-линкера с 5'-конца олигонуклеотида при разработке твердофазного анализа [20]. Изучение влияния спейсера на функциональную активность аптамера, иммобилизованного на поверхности углеродных наночастиц, составит предмет предстоящих исследований.

Заключение

В ходе работы были синтезированы углеродные наночастицы, конъюгированные с биотинилированным ДНК-аптамером, специфичным к IgE человека, посредством биоспецифического взаимодействия пары «стрептавидин-биотин». Использованы различные методы количественной характеристики взаимодействия аптамера и наночастиц. С помощью классического спектрофотометрического метода продемонстрировано связывание анти-IgE аптамера с частицами Str-C в количестве 80 пМ аптамера на 1 мг частиц, при условии, что изначальная концентрация аптамера составляет 300 пМ на 1 мг частиц. Кроме того, нами разработан метод оценки взаимодействия аптамера с наночастицами, основанный на использовании твердофазного дот-анализа. Функциональная активность сорбированного аптамера продемонстрирована при помощи прямой детекции IgE дот-анализом на полистироле. Дальнейшие направления работы связаны с тестированием различных подходов к иммо-

билизации ДНК-аптамера, в частности ковалентного, изучением стабильности функционализированных аптамером наночастиц, а также использованием аптамера, несущего спейсер, для повышения эффективности его взаимодействия с молекулой-мишенью.

(Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 16-44-590427 p_a)

ЛИТЕРАТУРА

1. Ellington A., Szostak J. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990. 346: 818-822.
2. Robertson D., Joyce G. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*. 1990. 344: 467-468.
3. Tuerk C., Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990. 249: 505-510.
4. Sun H. Zu Y. A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. *Molecules*. 2015. 20: 11959-11980.
5. Alibolandi M, Ramezani M, Abnous K et al. AS1411 Aptamer-Decorated Biodegradable Polyethylene Glycol–Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanopolymersomes for the Targeted Delivery of Gemcitabine to Non–Small Cell Lung Cancer In Vitro. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016. 5: 1741-1750.
6. Bazak R., Houry M., El Achy S. et al. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015 141: 769-784.
7. Gopinath S., Lakshmipriya T., Chen Y. et al. Aptamer-based ‘point-of-care testing’. *Biotechnology Advances*. 2016. 3: 198-208.
8. Chen A., Yang S. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015. 15: 230-242.
9. Chauhan S., Mukherji S. Gold nanoparticles and nanostructures in optical biosensors *Materials Technology*. 2015. B3:B167-B177
10. Ping J., Zhou Y., Wu Y. Recent advances in aptasensors based on graphene and graphene-like nanomaterials. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015. 64: 373-385.
11. Annapragada A. Advances in Nanoparticle Imaging Technology for Vascular Pathologies. *Annual Review of Medicine*. 2015. 66: 177 -193.
12. Toh S., Citartan M., Gopinath S. et al. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015. 64: 392-403.
13. Ng E., Shima D., Calias P. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006. 5: 123-132.
14. Posthuma-Trumpie G., Wichers J., Koets M. et al. Amorphous carbon nanoparticles: a versatile label for rapid diagnostic (immuno)assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012. 402: 593-600.
15. Kumar V. et al. Fluorescent Carbon Nanoparticles in Medicine for Cancer Therapy. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2013. 11: 1012-1013.
16. Mukerjee A. et al. Combinatorial Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy. *Current Medicinal Chemistry*. 2012. 22: 3714-3721.
17. Zhang Y. et al. Toxicity and efficacy of carbon nanotubes and graphene: the utility of carbon-based nanoparticles in nanomedicine. *Drug Metabolism Reviews*. 2014. 2:232-246.
18. Раев М.Б., Храпцов П.В., Бочкова М.С. Исследование размеров углеродных наночастиц, ковалентно функционализированных белковыми макромолекулами. *Российские нанотехнологии*. 2015. 1-2: 112-118.
19. Wiegand T. et al. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc

epsilon receptor I. J Immunol. 1996. 157: 221–230.

20. Katilius E., Flores C., Woodbury N. Exploring the sequence space of a DNA aptamer using microarrays. Nucleic Acids Research. 2007. 35:7626-7635.

Поступила 21.11.2016

(Контактная информация:

Раев Михаил Борисович – д.б.н., в.н.с. лаборатории экологической иммунологии Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; Адрес: 614081 г. Пермь, ул. Голева, 13, тел.: 8 (342) 2807794; e-mail: mraev@iegm.ru

Храмцов Павел Викторович – к.б.н., ассистент кафедры ФБГОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Адрес 614000 г.Пермь, ул. Букирева, 15, тел.: 8 (342) 2807794; e-mail: khramtsovpavel@yandex.ru

Бочкова Мария Станиславовна – к.б.н., н.с. лаборатории экологической иммунологии Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; Адрес: 614081 г. Пермь, ул. Голева, 13, тел.: 8 (342) 2807794; e-mail: krasnykh-m@mail.ru)

LITERATURA

1. Ellington A., Szostak J. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature. 1990. 346: 818-822.
2. Robertson D., Joyce G. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. Nature. 1990. 344: 467-468.
3. Tuerk C., Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science. 1990. 249: 505-510.
4. Sun H. Zu Y. A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. Molecules. 2015. 20: 11959-11980.
5. Alibolandi M, Ramezani M, Abnous K et al. AS1411 Aptamer-Decorated Biodegradable Polyethylene Glycol–Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanopolymersomes for the Targeted Delivery of Gemcitabine to Non–Small Cell Lung Cancer In Vitro. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2016. 5: 1741-1750.
6. Bazak R., Houry M., El Achy S. et al. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. J Cancer Res Clin Oncol. 2015 141: 769-784.
7. Gopinath S., Lakshmi Priya T., Chen Y. et al. Aptamer-based ‘point-of-care testing’. Biotechnology Advances. 2016. 3: 198-208.
8. Chen A., Yang S. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. Biosensors and Bioelectronics. 2015. 15: 230-242.
9. Chauhan S., Mukherji S. Gold nanoparticles and nanostructures in optical biosensors Materials Technology. 2015. B3: B167-B177
10. Ping J., Zhou Y., Wu Y. Recent advances in aptasensors based on graphene and graphene-like nanomaterials. Biosensors and Bioelectronics. 2015. 64: 373-385.
11. A. Annapragada. Advances in Nanoparticle Imaging Technology for Vascular Pathologies. Annual Review of Medicine. 2015. 66: 177 -193.
12. Toh S., Citartan M., Gopinath S. et al. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. Biosensors and Bioelectronics. 2015. 64: 392-403.
13. Ng E., Shima D., Calias P. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. Nature Reviews Drug Discovery. 2006. 5: 123-132.
14. Posthuma-Trumpie G., Wichers J., Koets M. et al. Amorphous carbon nanoparticles: a versatile label for rapid diagnostic (immuno)assays. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2012. 402: 593-600.
15. Kumar V. et al. Fluorescent Carbon Nanoparticles in Medicine for Cancer Therapy. ACS Medicinal Chemistry Letters. 2013. 11: 1012-1013.
16. Mukerjee A. et al. Combinatorial Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy. Current

- Medicinal Chemistry. 2012. 22: 3714-3721.
17. Zhang Y. et al. Toxicity and efficacy of carbon nanotubes and graphene: the utility of carbon-based nanoparticles in nanomedicine. *Drug Metabolism Reviews*. 2014. 2: 232-246.
 18. Raev M.B., Khramcov P.V., Bochkova M.S. Issledovanie razmerov uglerodnykh nanochastic, kovalentno funkcionalizirovannykh belkovymi makromolekulami. *Rossijskie nanotekhnologii*. 2015. 2: 112-118.
 19. Wiegand T. et al. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. *J Immunol*. 1996. 157: 221-230.
 20. Katilius E., Flores C., Woodbury N. Exploring the sequence space of a DNA aptamer using microarrays. *Nucleic Acids Research*. 2007. 35: 7626-7635.

Образец ссылки на статью:

Раев М.Б., Храмцов П.В., Бочкова М.С. Функционализация поверхности углеродных наночастиц ДНК-аптамером. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2016. 4: 12с. [Электронный ресурс]. (URL: [http:// elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-4/Articles/MBR-2016-4.pdf](http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-4/Articles/MBR-2016-4.pdf)).