

4
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

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

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Cetonia aurata (Linnaeus, 1761)
Золотистая бронзовка
Шовкун Д.Ф.



2019

УЧРЕДИТЕЛЬ
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2019

УДК 57.083.3

М.Д. Кропанева, П.В. Храмов, М.Б. Раев

**ДНК–АПТАМЕРЫ И МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА КАК
РАСПОЗНАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ В ДОТ–ИММУНОАНАЛИЗЕ
ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПРОСТАТСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА**

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия

Цель. Сравнить эффективность использования конъюгатов углеродных наночастиц с моноклональными антителами и ДНК–аптамерами в качестве детектирующих реагентов.

Материалы и методы. Для оценки связывания моноклональных антител и ДНК–аптамеров против ПСА с мишенью применяли метод твердофазного дот–иммуноанализа в различных форматах.

Результаты. Связывание ДНК–аптамера против простатспецифического антигена (PSap4#5) при помощи различных форматов анализа не зафиксировано. Связывание моноклональных антител с простатспецифическим антигеном доказано методом дот–иммуноанализа.

Заключение. В работах, посвященных созданию диагностических тест–систем, следует использовать ДНК–аптамеры с заведомо подтвержденной способностью к специфическому связыванию с мишенью.

Ключевые слова: дот–иммуноанализ, ДНК–аптамеры, моноклональные антитела, простатспецифический антиген.

M.D. Kropaneva, P.V. Khrantsov, M.B. Rayev

**DNA–APTAMERS AND MONOCLONAL ANTIBODIES AS DETECTION MOLE-
CULES IN THE DOT–IMMUNOASSAY FOR THE PROSTATE
SPECIFIC ANTIGEN DETECTION**

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS – branch of PFRC, UB RAS,
Perm, Russia

Objective. Compare the utilization efficiency of carbon nanoparticle conjugates with monoclonal antibodies and DNA aptamers as detection reagents.

Materials and methods. The solid–state dot immunoassay method was used to assess the binding of monoclonal antibodies and anti–PSA DNA aptamers to the target.

Results. The binding of the DNA aptamer against a prostate-specific antigen (PSap4 # 5) to the target using various analysis formats was not fixed. The binding of monoclonal antibodies to prostate-specific antigen has been proven by dot immunoassay.

Conclusions. DNA aptamers with confirmed ability to specifically bind to the target should be used in the works devoted to the diagnostic test systems.

Keywords: dot–immunoassay, DNA–aptamers, monoclonal antibodies, prostate specific antigen.

Введение

В последние годы появилось большое количество публикаций, сообщающих о разработке многочисленных систем *in vitro* диагностики на основе ДНК/РНК-аптамеров для детекции бактерий, вирусов, токсинов, ионов тяжелых металлов, антибиотиков, патогенов животных и циркулирующих опухолевых клеток [1-8]. ДНК- или РНК-аптамеры являются относительно дешевым и простым в получении аналогом моноклональных антител и представляют из себя короткие (от 20 до 60 нуклеотидов), одноцепочечные молекулы РНК или ДНК, имеющие способность с высокой аффинностью и специфичностью связываться с молекулой–мишенью. В настоящее время существует большое количество аптамеров к различным мишеням. Для получения аптамеров используют технологию SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) и ее модификации [9]. При помощи данной технологии ДНК/РНК–аптамеры к практически любым мишеням отбирают из библиотеки случайных последовательностей нуклеотидов. Выделенные при помощи SELEX-технологии молекулы аптамеров секвенируют и синтезируют химически на основе уже известных последовательностей в неограниченном количестве. Несмотря на привлекательность использования аптамеров в качестве распознающих молекул, показано, что эффективность связывания аптамера одной и той же нуклеотидной последовательности с мишенью может отличаться в зависимости от метода, при помощи которого производится оценка связывания [10]. С этой точки зрения, очевидной является необходимость проверки способности связывания аптамера с мишенью как можно большим количеством способов в прямом сравнении эффективности работы аптамеров в качестве распознающих молекул с моноклональными антителами.

Целью проведенного исследования являлось сравнение эффективности работы моноклональных антител и ДНК-аптамеров в составе конъюгатов с углеродными наночастицами в качестве распознающих элементов на примере дот-иммуноанализа для детекции простатспецифического антигена (ПСА).

Материалы и методы

В ходе работы были использованы следующие реагенты и материалы: хроматографическая колонка – диаметр - 16 мм, высота - 300 мм («Amicon», США), сефароза CL–6B («GE Healthcare», США), белые полистирольные планшеты для серийных разведений («Linbro», США), черные полистирольные планшеты («SDL», Китай), казеин, бычий сывороточный альбумин –

БСА («Sigma», США), стрептавидин («Prospec Bio», Израиль), глутаровый альдегид («AppliChem», Германия), хлорид натрия, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, хлорид магния, хлорид калия, трис, глицерин, Твин–20 («Panreac», Испания), азид натрия («Fluka», Германия), моноклональные антитела к простатспецифическому антигену (Биалекса, Россия), ДНК–олигонуклеотиды производства «Синтол» (Россия) и «Евроген» (Россия). Концентрированные (100 мМ) растворы аптамеров в ТЕ–буфере с добавлением 1мМ ЭДТА хранили в замороженном виде при –20°С.

Перед началом работы все ДНК–олигонуклеотиды размораживали, прогревали при +95°С в течение 5 мин, затем охлаждали при комнатной температуре в течение 15–10 мин. Использованные в работе ДНК–аптамеры представлены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика ДНК–аптамеров, использованных в работе

Мишень	Наименование	Последовательность	Ссылка	Производитель
ПСА	Bi–PSap4#5	5'–Biotin– TTTTTAATTAAAGCTC GCCATCAAATAGCTTT–3'	[13]	Синтол (Россия)
ПСА	Bi–PSap4#5	5'–Biotin– TTTTTAATTAAAGCTC GCCATCAAATAGCTTT–3'	[13]	Евроген (Россия)
ПСА	Bi–PSap4#5FAM	5'–Biotin– TTTTTAATTAAA– GCTC GCCATCAAATAGCTTT–FAM–3'	[13]	Синтол (Россия)
ПСА	PSap4#5–FAM	5'– TTTTTAATTAAAGCTC GCCATCAAATAGCTTT–FAM–3'	[13]	Синтол (Россия)

Буферные растворы, использованные в работе с ДНК–олигонуклеотидами: ТСБ (10мМ Трис/НСl, 150мМ NaCl, 5мМ KCl, 5мМ MgCl₂, pH 7.4), ТСБТ (ТСБ+ 0,1% Твин–20), ТЕ–буфер (Трис–НСl, 1мМ ЭДТА, pH 8,0).

Буферные растворы, использованные в работе с моноклональными антителами: ЗФР (0,15М раствор NaCl, забуференный 0,015М Na–фосфатами, содержащий 0,1% NaN₃, pH 7,25), ЗФРТ (ЗФР + 0,1% Твин–20).

Карбонатный–бикарбонатный буфер (КББ): 0,5 М раствор NaCl, 0,02М NaHCO₃, 0,2М Na₂CO₃, pH 9,6.

Функционализация углеродных наночастиц стрептавидином и моноклональными антителами. Конъюгаты углеродных наночастиц (С) со стрептавидином (С–Str) и моноклональными антителами (С–МКА) против ПСА (клон 1А6) получали авторским методом [11].

Оценка специфичности связывания C-Str с биотинилированным аптамером. Суспензию конъюгата C-Str разводили в ТСБТ до рабочей концентрации 0,01% и инкубировали с биотинилированным (Bi-PSap4#5-FAM) и небитинилированным (PSap4#5-FAM) в качестве контроля ДНК-аптамером в концентрациях 400; 100; 25; 6 и 1,2 нМ в объеме 500 мкл в течение 1 часа при +37°C. Оба аптамера были мечены карбоксифлуоресцеином (FAM) по 3'-концу. После инкубации смеси центрифугировали при 20000g в течение 99 мин до полного осаждения наночастиц. Связывание аптамера с функционализированной поверхностью наночастиц оценивали по снижению флуоресценции в супернатанте. Для этого в лунки черного полистирольного 96-луночного планшета добавляли 100 мкл супернатанта.

Для построения калибровочных кривых оценивали флуоресценцию растворов аптамера с известными концентрациями с использованием прибора BioTek Synergy H1 Microplate Reader (США). Эффективность связывания биотинилированного и небитинилированного аптамера характеризовала специфическое и неспецифическое взаимодействие между наночастицами и ДНК-аптамером соответственно.

Синтез конъюгата углеродные наночастицы-ДНК-аптамер. C-Str смешивали с Bi-PSap4#5 таким образом, чтобы концентрация ДНК-аптамера в суспензии, содержащей 1 мг частиц, составляла 250 пМ, и инкубировали 1 час при +37°C. Аптамер, не связавшийся с поверхностью наночастиц, отделяли при помощи гель-хроматографии. Наиболее концентрированные фракции углеродных наночастиц объединяли, добавляли к полученной смеси глицерин и БСА до конечных концентраций: 50% и 1% соответственно и хранили при -20°C. Конъюгат условно обозначали C-Str-Bi-PSap4#5 (рис. 1). Подробный протокол синтеза представлен в статье [12].

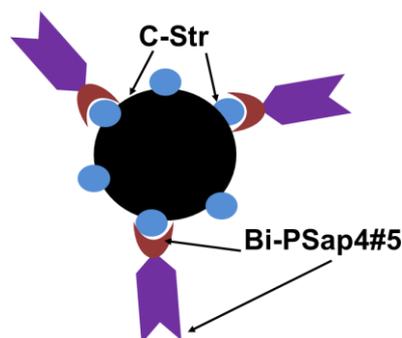


Рис.1. Схема комплекса конъюгата углеродных наночастиц и ДНК-аптамера (C-Str-Bi-PSap4#5).

Оценка стабильности полученных конъюгатов при хранении. О стабильности получаемых реагентов судили по изменению размеров наночастиц в процессе хранения. Размеры наночастиц оценивали методом обратного динамического светорассеяния на приборе Malvern ZetaSizer NanoZS, измеряющем светорассеяние частиц под углом 173° . Для измерения размеров суспензии наночастиц разводили в 350 раз в 700 мл ЗФР, фильтрованного через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.

Твердофазный дот-иммуноанализ. Твердофазный дот-иммуноанализ в сэндвич-формате на нитроцеллюлозе и полистироле (последний схематично представлен на рисунке 2) осуществляли следующим образом.

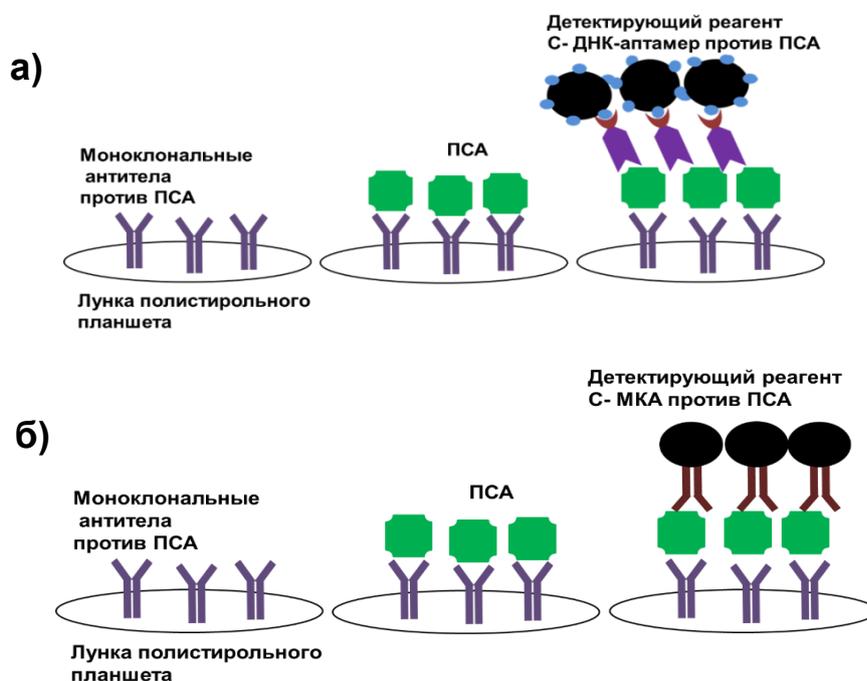


Рис. 2. Схема твердофазного дот-иммуноанализа в сэндвич формате а) детектирующий реагент: углеродные наночастицы–ДНК–аптамер против ПСА (C–Str–Bi–PSap4#5); б) детектирующий реагент: углеродные наночастицы–моноклональные антитела против ПСА (C–МКА).

Моноклональные антитела (клон 3А6) против ПСА, разведенные до конечной концентрации 0,05 мг/мл в ЗФР, сорбировали точками по 2 мкл на полоски (стрипы) нитроцеллюлозной мембраны, после чего высушивали в течении 40 мин при комнатной температуре. Все последующие этапы тестирования проводили, поместив стрипы в лунки планшета, во влажной камере в термостате при температуре $+37^\circ\text{C}$. Тест-полоски трижды промывали 600

мкл ТСБТ (при работе с ДНК–аптамерами) или ЗФРТ (при работе моноклональными антителами), блокировали 400 мкл буферного раствора с добавлением 2% казеина и 1% БСА в течение 1 часа и вновь промывали. Далее в лунки планшета вносили по 400 мкл ПСА в различных концентрациях (100, 10, 1, 0 нг/мл), инкубировали в течение 1 часа и трижды промывали. После промывки добавляли по 400 мкл конъюгата С-Str–Bi–PSap4#5, либо конъюгата С–МКА, инкубировали в течение 1 часа и трижды промывали. Результат оценивали визуально.

Для сорбции моноклональных антител на твердую фазу при твердофазном дот-иммуноанализе в сэндвич-формате на полистироле (рис. 2) использовался 0,05М карбонатный-бикарбонатный буфер, рН 9,6 (КББ).

Процедура твердофазного дот-иммуноанализа для оценки способности свободного аптамера Bi–PSap4#5 связывать ПСА представлена на рисунке 3.

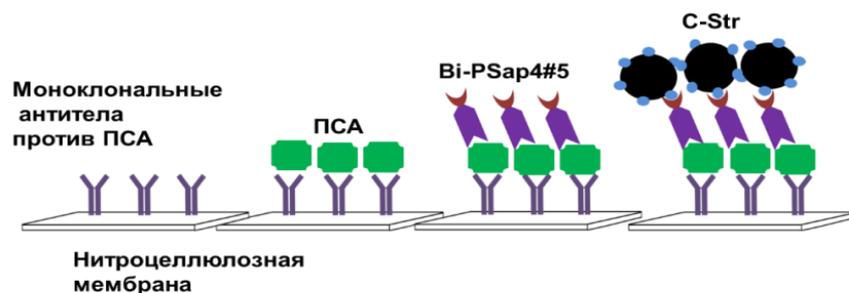


Рис. 3. Схема анализа для оценки способности свободного Bi-PSap4#5 связывать ПСА.

Иммуноферментный анализ с использованием ДНК–аптамеров. Вариант прямого ИФА проводили по схеме, описанной в статье [10]. В качестве детектирующего реагента использовали конъюгат стрептавидина, меченного пероксидазой хрена (рис. 4а).

ИФА в сэндвич-формате проводили следующим образом (рис. 4б). На дно лунок 96-луночного планшета для иммунологических реакций сорбировали моноклональные антитела к ПСА в КББ и инкубировали в течении 24 ч при +4°C. Далее планшет пятикратно промывали 300 мкл ТСБТ, блокировали 100 мкл 1% БСА в ТСБТ в течении 60 мин при +37°C в термошейкере и промывали. Далее в лунки вносили 100 мкл пробы с ПСА и инкубировали 60 мин при +37°C в термошейкере и вновь промывали. После этого производили инкубацию с 50 мкл Bi–PSap4#5 в течении 60 мин при +37°C, промывали и вносили 50 мкл детектирующего реагента. После инкубации в течение 60

мин при 37°C, трехкратно промывали. После чего вносили 50 мкл субстрата, инкубировали в темноте при комнатной температуре 30 мин, добавляли стоп-реагент и измеряли показатели оптической плотности.

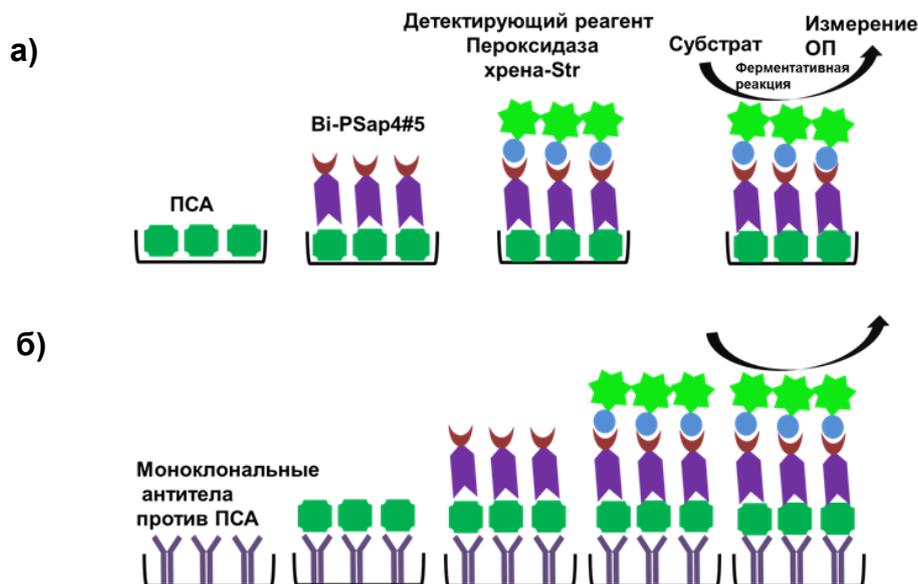


Рис. 4. Схема анализа в формате ИФА

а) прямое определение; б) сэндвич-анализ.

Результаты и обсуждения

Оценка способности углеродных наночастиц специфически связывать ДНК-аптамер. В результате проведенных экспериментов было показано, что биотинилированный ДНК-аптамер PSap4#5 в отработанных условиях эффективно связывается с поверхностью функционализированных стрептавидином углеродных наночастиц (рис. 5).

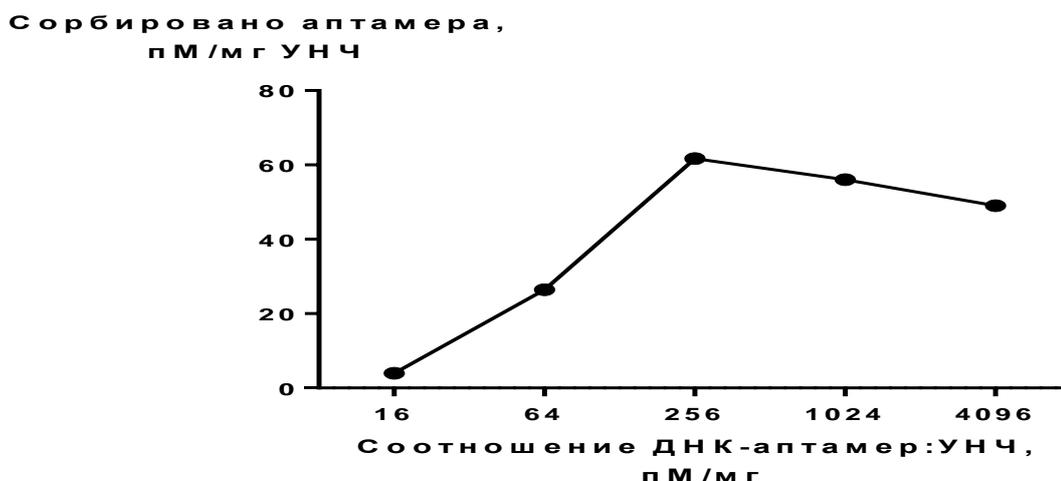


Рис. 5. Эффективность связывания биотинилированного ДНК-аптамера с поверхностью углеродных наночастиц, функционализированных стрептавидином.

Как видно из представленного рисунка, с наибольшей эффективностью это происходит при концентрации аптамера 250 пМ в суспензии, содержащей 1 мг наночастиц.

В дальнейшей работе для синтеза конъюгата C-Str-Bi-PSap4#5 использовали данное соотношение. Специфичность связывания была подтверждена отсутствием взаимодействия небиотинилированного ДНК-олигонуклеотида с наночастицами.

Стабильность получаемых реагентов была исследована путем скрининга изменения размеров конъюгатов в процессе хранения. Средний диаметр частиц конъюгата C-Str-Bi-PSap4#5 при хранении при -20°C составлял 174,2 нм в день синтеза конъюгатов и 180,4 нм через 30 дней хранения (рис. 6). Средний диаметр частиц конъюгата C-МКА при хранении при $+4^{\circ}\text{C}$ составлял 164,2 нм в день синтеза конъюгатов и 175,8 нм через 30 дней хранения (рис. 6). Температурные режимы хранения были выбраны на основании предыдущих экспериментов.

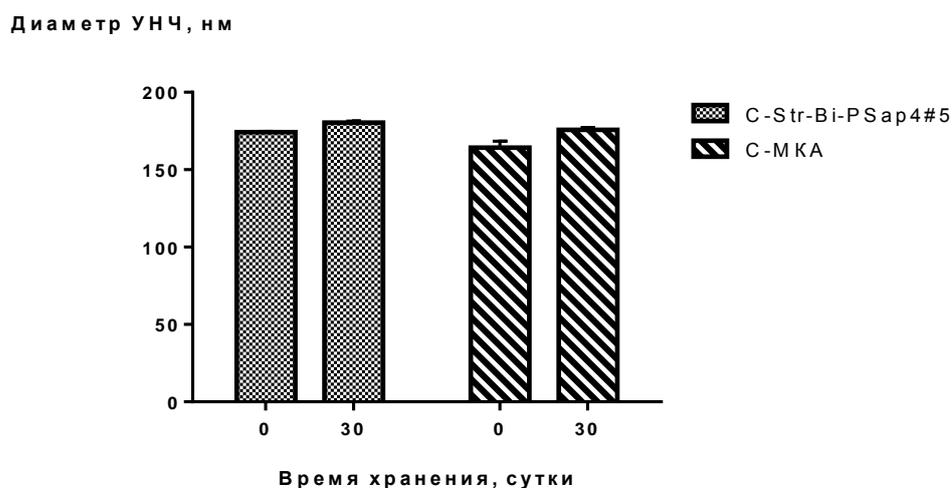


Рис. 6. Изменения среднего диаметра углеродных наночастиц в составе конъюгатов C-Str-Bi-PSap4# и C-МКА при хранении (n=3).

Таким образом, стабильность при хранении полученных реагентов не вызывает сомнений.

Оценка эффективности работы конъюгатов на основе ДНК-аптамеров и моноклональных антител в качестве детектирующих реагентов. Детектирующие реагенты представляли собой конъюгаты, в состав которых входили ДНК-аптамеры или моноклональные антитела, выступающие в роли распознающих молекул, способных специфично связываться с мишенью, а также

углеродные наночастицы, в качестве цветной метки. Подтверждением специфичности связывания распознающих молекул с мишенью служило визуально определяемое темное окрашивание в зоне сорбции мишени на твердой фазе, в данном случае простатспецифического антигена.

При тестировании эффективности работы конъюгата C–Str–Bi–PSap4#5 в качестве детектирующего реагента при помощи дот–иммуноанализа в сэндвич-формате цветовой сигнал связывания аптамера с мишенью не наблюдался. В качестве твердой фазы в данном эксперименте использовали нитроцеллюлозную мембрану. Эффективность сорбции аптамера на поверхности наночастиц была доказана в предыдущих экспериментах (описано выше). Это свидетельствует в пользу того, что отсутствие сигнала не связано с проблемами связывания молекул аптамера с поверхностью функционализированных стрептавидином наночастиц.

Ранее при проведении работ, посвященных ДНК-аптамеру против иммуноглобулина E (D17.4), нами было замечено, что на связывание аптамера D17.4 с мишенью влияет вид твердой фазы, на которой проводится анализ [12]. При проведении анализа на нитроцеллюлозной мембране сигнал связывания D17.4 с IgE отсутствовал, а при использовании в качестве твердой фазы полистирола (непористая твердая фаза) наблюдали связывание аптамера с мишенью. Описанные данные позволили сделать предположение о том, что на связывание аптамера с мишенью может влиять вид твердой фазы, на которой проводится анализ.

В этой связи было решено исследовать способность Bi–PSap4#5, иммобилизованного на поверхности углеродных наночастиц, функционализированных стрептавидином, связывать ПСА с помощью дот-иммуноанализа, проводимого на ином виде твердой фазы – полистироле. Цветовой сигнал, свидетельствующий о связывании ДНК-аптамера с мишенью при данных условиях детекции также не наблюдался.

Была исследована способность свободного Bi–PSap4#5 связывать ПСА с помощью дот-иммуноанализа на нитроцеллюлозной мембране и полистироле с использованием конъюгата C-Str, инкубация с которым производилась после взаимодействия аптамера с твердой фазой. Сигнал связывания аптамера с мишенью также не был зафиксирован.

Еще одним фактором, способным оказывать влияние на специфическое взаимодействие ДНК-аптамера с мишенью, могла быть природа используе-

мой цветной метки – углеродных наночастиц. Для проверки данного предположения вместо конъюгата с углеродной меткой использовали конъюгат с заведомо известными характеристиками на основе ферментной метки, в качестве которой использовали пероксидазу хрена. Тем более, что для отбора нуклеотидной последовательности аптамера Vi-PSap4#5 методом SELEX производители использовали аналогичный конъюгат [13].

Было проведено прямое определение ПСА в формате ИФА в 96-луночных иммунологических планшетах и сэндвич-анализ в формате ИФА с использованием разных клонов моноклональных антител против ПСА (5A9C, 1A6, 2H11, 9E2, 3C7, 2H1, 2G6, 3A6), сорбируемого на твердой фазе. Известно, что сайт связывания, посредством которого аптамер Vi-PSap4#5 взаимодействует с мишенью не определен [14]. При данных обстоятельствах являлось целесообразным тестирование нескольких клонов моноклональных антител против ПСА, используемых в качестве первых антител, для того, чтобы избежать ситуации, в которой сайт связывания аптамера с мишенью будет заблокирован антителом, находящимся на твердой фазе.

Сигналом связывания аптамера с мишенью в данном случае служил показатель оптической плотности, зависящий от количества ПСА в образце. Как при прямом определении, так и в сэндвич-формате сигнала связывания ДНК-аптамера с мишенью не было выявлено. Все вышеописанные анализы были проведены для ДНК-аптамеров, синтезированных двумя российскими производителями “Синтол” и “Евроген” по протоколам химического синтеза на основе известных нуклеотидных последовательностей.

При тестировании эффективности работы конъюгата С-МКА в качестве детектирующего реагента на нитроцеллюлозной мембране цветовой сигнал связывания моноклональных антител с мишенью был получен (рис. 7).

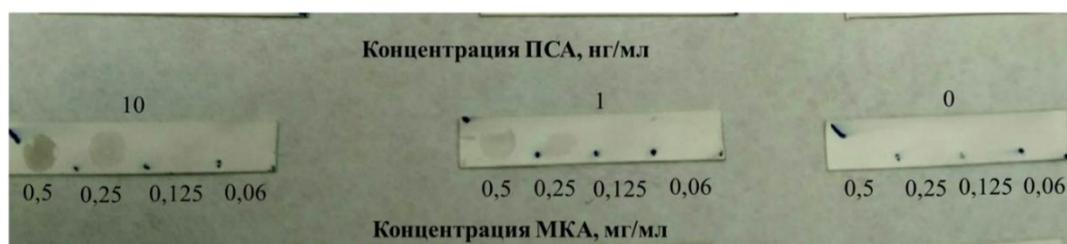


Рис. 7. Результат твердофазного дот-иммуноанализа на нитроцеллюлозной мембране с использованием в качестве детектирующего реагента конъюгата углеродных наночастиц с моноклональными антителами против ПСА (клон 1A6).

Было установлено, что при проведении дот-иммуноанализа в сэндвич-формате с конъюгатом углеродных наночастиц с моноклональными антителами против ПСА в качестве детектирующего реагента возможно выявлять ПСА в исследуемом образце в концентрации, равной 1 нг/мл.

Заключение

Проведенные исследования показали, что используемые в работе аптамеры в корректной форматной аранжировке не способны обеспечить конструктивное решение задачи, связанной с разработкой тест-системы для определения ПСА. При этом речь идет о конкретных аптамерах, а не о предложенной методологии в целом. Использование моноклональных антител в данном конкретном случае более адекватно.

Следует отметить, что выбор нуклеотидной последовательности ДНК-аптамера против ПСА, впервые полученной группой японских ученых в 2010 г., был обусловлен большим количеством публикаций, посвященных успешному созданию биосенсоров на основе данного ДНК-аптамера [15-20]. Синтез ДНК-олигонуклеотидов проводили по уже известной последовательности на автоматическом синтезаторе амидофосфитным методом фирмами “Синтол” и “Евроген”. Способность к связыванию полученного ДНК-аптамера с простатспецифическим антигеном указанными фирмами не проверялась, то есть выходной контроль отсутствовал.

Полученные результаты говорят о том, что в работах, посвященных созданию диагностических тест-систем, следует использовать ДНК-аптамеры с уже доказанной способностью к связыванию с мишенью. При разработке диагностических тест-систем с целью выхода на масштабируемое производство использование моноклональных антител в качестве распознающих элементов является более надежным решением, что, однако совершенно не исключает разработку альтернативных вариантов, в том числе на основе соответствующих аптамеров.

(Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭГМ УрО РАН ПФИЦ УрО РАН; № государственной регистрации темы: 01201353246)

ЛИТЕРАТУРА

1. Bazin I., Tria S.A., Hayat A. et al. New biorecognition molecules in biosensors for the detection of toxins. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017. 87: 285-298.
2. Dickey D.D., Giangrande H. Oligonucleotide aptamers: A next-generation technology for the capture and detection of circulating tumor cells. *Methods*. 2016. 97: 94-103.

3. Farzin L., Shamsipur M., Sheibani S. A review: Aptamer-based analytical strategies using the nanomaterials for environmental and human monitoring of toxic heavy metals. *Talanta*. 2017. 174 (22): 619-627.
4. Jalalian S.H., Karimabadi N., Ramezani M. et al. Electrochemical and optical aptamer-based sensors for detection of tetracyclines. *Trends in Food Science and Technology*. 2018. 73 (4): 45-57.
5. Pan Q., Luo F., Liu M. et al. Oligonucleotide aptamers: promising and powerful diagnostic and therapeutic tools for infectious diseases. *Journal of Infection*. 2018. 85: 57-106.
6. Vidic J., Manzano M., Chang C.-M. et al. Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. *Veterinary research*. 2018. 48 (11): 533-555.
7. Zhou W., Saran R., Liu J et al. Metal Sensing by DNA. *Chemical Reviews*. 2017. 117 (12): 8272-8325.
8. Kavosi B., Salimi A., Hallaj R. et al. Ultrasensitive electrochemical immunosensor for PSA biomarker detection in prostate cancer cells using gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded with enzyme linked aptamer as integrated triple signal amplification strategy. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015. 74: 915-923.
9. Zhuo Z., Yu Y., Wang M. et al. Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. 18 (10): 2142-2161.
10. McKeague M., De Girolamo A., Valenzano S. et al. Comprehensive Analytical Comparison of Strategies Used for Small Molecule Aptamer Evaluation. *Analytical Chemistry*. 2015. 87 (17): 8608-8612.
11. Раев М.Б., Храмов П.В., Бочкова М.С. Исследование размеров углеродных наночастиц ковалентно функционализированных белковыми макромолекулами. *Российские Нанотехнологии*. 2015. 1: 112-118.
12. Khrantsov P., Kropaneva M., Kalashnikova T. et al. Highly Stable Conjugates of Carbon Nanoparticles with DNA Aptamers. *Langmuir*. 2018. 34 (35): 10321-10332.
13. Savory N., Abe K., Sode K. et al. Selection of DNA aptamer against prostate specific antigen using a genetic algorithm and application to sensing. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010. 26: 1386-1391.
14. Li M., Guo X., Li H. et al. Epitope Binning Assay Using an Electron Transfer-Modulated Aptamer Sensor. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2018. 10: 341-349.
15. Cha T., Cho S., Kim Y.T et al. Rapid aptasensor capable of simply diagnosing prostate cancer. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014. 62: 31-37.
16. Chong J., Chong H., Lee J.H. A chemiluminescent dual-aptasensor capable of simultaneously quantifying prostate specific antigen and vascular endothelial growth factor. *Analytical Biochemistry*. 2019. 564-565: 102-107.
17. Jolly P., Formisano N., Estrela P. et al. DNA aptamer-based detection of prostate cancer. *Chemical Papers*. 2015. 69 (1): 77-89.
18. Jolly P., Zhuravski P., Hammond J.L. et al. Self-assembled gold nanoparticles for impedimetric and amperometric detection of a prostate cancer biomarker. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2017. 251: 637-643.
19. Liu B., Lu L., Hua E. et al. Detection of the human prostate-specific antigen using an aptasensor with gold nanoparticles encapsulated by graphitized mesoporous carbon. *Microchimica Acta*. 2012. 178 (1-2): 163-170.
20. Zhao J., Ma Z. Ultrasensitive detection of prostate specific antigen by electrochemical aptasensor using enzyme-free recycling amplification via target-induced catalytic hairpin assembly. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018. 102: 316-320.

Поступила 16 октября 2019 г.

(Контактная информация: Раев Михаил Борисович – д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии ИЭГМ ПФИЦ УРО РАН;

LITERATURA

1. Bazin I., Tria S.A., Hayat A. et al. New biorecognition molecules in biosensors for the detection of toxins. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017. 87: 285-298.
2. Dickey D.D., Giangrande H. Oligonucleotide aptamers: A next-generation technology for the capture and detection of circulating tumor cells. *Methods*. 2016. 97: 94-103.
3. Farzin L., Shamsipur M., Sheibani S. A review: Aptamer-based analytical strategies using the nanomaterials for environmental and human monitoring of toxic heavy metals. *Talanta*. 2017. 174 (22): 619-627.
4. Jalalian S.H., Karimabadi N., Ramezani M. et al. Electrochemical and optical aptamer-based sensors for detection of tetracyclines. *Trends in Food Science and Technology*. 2018. 73 (4): 45-57.
5. Pan Q., Luo F., Liu M. et al. Oligonucleotide aptamers: promising and powerful diagnostic and therapeutic tools for infectious diseases. *Journal of Infection*. 2018. 85: 57-106.
6. Vidic J., Manzano M., Chang C.-M. et al. Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. *Veterinary research*. 2018. 48 (11): 533-555.
7. Zhou W., Saran R., Liu J et al. Metal Sensing by DNA. *Chemical Reviews*. 2017. 117 (12): 8272-8325.
8. Kavosi B., Salimi A., Hallaj R. et al. Ultrasensitive electrochemical immunosensor for PSA biomarker detection in prostate cancer cells using gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded with enzyme linked aptamer as integrated triple signal amplification strategy. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015. 74: 915-923.
9. Zhuo Z., Yu Y., Wang M. et al. Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. 18 (10): 2142-2161.
10. McKeague M., De Girolamo A., Valenzano S. et al. Comprehensive Analytical Comparison of Strategies Used for Small Molecule Aptamer Evaluation. *Analytical Chemistry*. 2015. 87 (17): 8608-8612.
11. Raev M.B., Khrantsov P.V., Bochkova M.S. Investigation of the sizes of carbon nanoparticles covalently functionalized with protein macromolecules. *Russian Nanotechnology*. 2015.1: 112-118.
12. Khrantsov P., Kropaneva M., Kalashnikova T. et al. Highly Stable Conjugates of Carbon Nanoparticles with DNA Aptamers. *Langmuir*. 2018. 34 (35): 10321-10332.
13. Savory N., Abe K., Sode K. et al. Selection of DNA aptamer against prostate specific antigen using a genetic algorithm and application to sensing. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010. 26: 1386-1391.
14. Li M., Guo X., Li H. et al. Epitope Binning Assay Using an Electron Transfer-Modulated Aptamer Sensor. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2018. 10: 341-349.
15. Cha T., Cho S., Kim Y.T et al. Rapid aptasensor capable of simply diagnosing prostate cancer. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014. 62: 31-37.
16. Chong J., Chong H., Lee J.H. A chemiluminescent dual-aptasensor capable of simultaneously quantifying prostate specific antigen and vascular endothelial growth factor. *Analytical Biochemistry*. 2019. 564-565: 102-107.
17. Jolly P., Formisano N., Estrela P. et al. DNA aptamer-based detection of prostate cancer. *Chemical Papers*. 2015. 69 (1): 77-89.
18. Jolly P., Zhuranski P., Hammond J.L. et al. Self-assembled gold nanoparticles for impedimetric and amperometric detection of a prostate cancer biomarker. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2017. 251: 637-643.
19. Liu B., Lu L., Hua E. et al. Detection of the human prostate-specific antigen using an aptasensor with gold nanoparticles encapsulated by graphitized mesoporous carbon. *Microchimica Acta*. 2012. 178 (1-2): 163-170.

20. Zhao J., Ma Z. Ultrasensitive detection of prostate specific antigen by electrochemical aptasensor using enzyme-free recycling amplification via target-induced catalytic hairpin assembly. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018. 102: 316-320.

Образец ссылки на статью:

Кропанева М.Д., Храмцов П.В., Раев М.Б. ДНК-аптамеры и моноклональные антитела как распознающие молекулы в доп-иммуноанализе для детекции простатспецифического антигена. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2019. 4. 13с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2019-4/Articles/MDK-2019-4.pdf>).

DOI: 10.24411/2304-9081-2019-15011