

Колориметрическая детекция белка DKK-1 с использованием ДНК-аптамеров

Шатунова Е.А.^{1*}, Королев М.А.^{1, 2}, Воробьева М.А.¹

¹ Институт химической биологии и медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

* lizashatunova@yandex.ru

Ключевые слова: ДНК-аптамеры; Dickkopf-1; колориметрический анализ; анкилозирующий спондилит

Мотивация и цель: Сывороточный белок Dickkopf-1 (DKK-1) является одним из ингибиторов Wnt-сигнального пути и важным регулятором костного метаболизма. В частности, его рассматривают в качестве потенциального сывороточного маркера при диагностике иммуновоспалительных ревматических заболеваний, в том числе анкилозирующего спондилита. Соответственно, существует потребность в тест-системах для определения DKK-1 в сыворотке, позволяющих проводить регулярный мониторинг уровня этого белка и сохраняющих воспроизводимость свойств в ходе долговременных исследований. Перспективным подходом является создание ИФА-подобных систем на основе аптамеров – синтетических одноцепочечных молекул РНК и ДНК, способных селективно и с высокой аффинностью связывать специфичные мишени.

Методы и алгоритмы: Для получения аптамеров использовали *in vitro* селекцию из комбинаторной библиотеки оцДНК с неравномерной рандомизацией случайной области с последующим высокопроизводительным секвенированием на платформе MiSeq Illumina в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН. Для химического синтеза комбинаторной оцДНК-библиотеки, праймеров и аптамеров использовали твердофазный фосфитамидный метод. Скрининг аффинности кандидатных аптамеров проводили с использованием колориметрического метода в микропланшетном варианте с нековалентной иммобилизацией белка на поверхность лунки или биослойной интерферометрии. При конструировании колориметрических тест-систем для определения белка DKK-1 аптамер с концевой алифатической аминокислотной группой ковалентно иммобилизовали на карбокси-активированную поверхность планшета, после внесения белка добавляли конъюгат антитела с пероксидазой или биотинилированный аптамер и конъюгат стрептавидин-пероксидаза, для получения сигнала использовали хромогенный субстрат ТМВ.

Результаты: После четырех раундов отбора и секвенирования пять наиболее представленных в финальной библиотеке аптамеров были выбраны для синтеза и скрининга аффинности. Показано, что 71-звенные ДНК-аптамеры DK1, DK2, DK3, DK4 связывают белок DKK-1 с высокой аффинностью (константы диссоциации в диапазоне 1.3–3.7 нМ). Создана серия укороченных аптамеров (41–50 нт), сохранивших высокое сродство к DKK-1. Аптамеры DK1, DK4, укороченные варианты DK1_48t и DK4_41t и ДНК-аптамер TD10, полученный на основе литературных данных [1], использовали для конструирования

колориметрических систем детекции DKK-1 в микропланшетном варианте. Показано, что в модельных условиях для тест-систем сэндвич-формата «аптамер/антитело» в диапазоне 0.156–10 нг/мл DKK-1 при увеличении концентрации белка наблюдается стабильный рост сигнала, максимальную амплитуду сигнала обеспечивали аптамеры DK4 и TD10. Исследована возможность создания колориметрических тест-систем сэндвич-формата «аптамер/аптамер» без использования антител к белку. Выявлены пары аптамеров, подходящие для систем такого типа, и продемонстрирована их работоспособность в модельном растворе и в допированной DKK-1 сыворотке крови в диапазоне концентраций 0.156–10 нМ. При этом наилучшими характеристиками обладали системы с использованием пар аптамеров DK1/DK4 и DK4_{41t}/TD10. Дальнейшие исследования будут направлены на дополнительную оптимизацию колориметрических систем для повышения чувствительности в образцах сыворотки.

Выводы: Получена серия новых высокоаффинных ДНК-аптамеров к DKK-1 и их укороченных вариантов, сохраняющих сродство к DKK-1. На основе сэндвич-пар ДНК-аптамеров были сконструированы ИФА-подобные системы колориметрической детекции DKK-1, показана их принципиальная работоспособность.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ и правительства НСО № 22-15-20050.

Colorimetric detection of DKK-1 protein using DNA aptamers

Shatunova E.^{1*}, Korolev M.^{1, 2}, Vorobyeva M.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* lizashatunova@yandex.ru

Key words: DNA-aptamers; Dickkopf-1; colorimetric detection; ankylosing spondylitis

Motivation and Aim: The serum protein Dickkopf-1 (DKK-1) is a Wnt-signaling pathway inhibitor and a key regulator of bone metabolism. Particularly, it is considered a potential serum marker for the diagnosis of immunoinflammatory rheumatic diseases, such as ankylosing spondylitis. Therefore, there is a need for test systems for measuring DKK-1 in serum that support regular monitoring of this protein's concentration and maintain reproducible properties during long-term studies. The development of ELISA-like systems based on aptamers, synthetic single-stranded RNA and DNA molecules with high affinity for selective binding of certain targets, is a promising strategy.

Methods and Algorithms: DNA aptamers were in vitro selected from a combinatorial ssDNA library with uneven randomization. The selection was followed by high-throughput sequencing on the MiSeq Illumina platform at the Genomics Core Facility of the ICBFM SB RAS. The solid-phase phosphoramidite method was used for the chemical synthesis of a combinatorial ssDNA library, primers, and aptamers. The affinity screening of candidate aptamers was carried out using a colorimetric microplate method with non-covalent immobilization of the protein on the well surface or biolayer interferometry. To construct a colorimetric test system for measuring the DKK-1 protein,

an aptamer with a terminal aliphatic amino group was covalently immobilized on the carboxy-activated surface of the plate. After adding the protein, an antibody-peroxidase conjugate or a biotinylated aptamer and a streptavidin-peroxidase conjugate were added, and the chromogenic substrate TMB was used to obtain a signal.

Results: After four rounds of selection and sequencing, the five aptamers most prevalent in the final library were chosen for synthesis and affinity screening following. 71-mer DNA aptamers DK1, DK2, DK3, and DK4 bind the DKK-1 protein with high affinity (dissociation constants in the range of 1.3–3.7 nM). We also generated a series of truncated aptamers (41–50 nt) which retained high affinity for DKK-1. Aptamers DK1, DK4, truncated versions DK1_48t and DK4_41t, and previously published DNA aptamer TD10 [1], were used for the construction of colorimetric DKK-1 detection systems in a microplate format. Under model conditions, the aptamer/antibody variant of sandwich test systems provided a stable signal increase in the signal with the rise of protein concentration in the range of 0.156–10 ng/ml DKK-1; the maximum signal amplitude was obtained for the DK4 and TD10 aptamers. We also investigated the possibility to use the aptamer/aptamer sandwich format of the DKK-1 colorimetric detection without DKK-1-specific antibodies. We identified pairs of aptamers suitable for systems of this type, and their demonstrated their applicability in both a model solution and in serum spiked with 0.156–10 nM of DKK-1. The best characteristics were provided by systems made of DK1/DK4 and DK4_41t/TD10 aptamer sandwich pairs. Future research will focus on further optimization of colorimetric systems to improve their sensitivity in serum samples.

Conclusion: We generated new high-affinity DNA aptamers for DKK-1 and their truncated variants that retain affinity for DKK-1. ELISA-like colorimetric detection systems for DKK-1 based on sandwich pairs of DNA aptamers were constructed, and their principal functionality was demonstrated.

Funding: The study is supported by the grant of Russian Science Foundation and government of Novosibirsk region No. 22-15-20050.

Список литературы/References

1. Zhou Y. et al. Developing slow-off dickkopf-1 aptamers for early-diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Talanta*. 2019;194:422-429