БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2025, том 51, № 3, с. 451–460

УДК 577.29

СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ СЕЛЕКЦИИ АПТАМЕРОВ К КЛЕТОЧНЫМ РЕЦЕПТОРАМ

© 2025 г. В. Е. Кузнецова*, #, Т. Д. Лебедев*, В. Е. Шершов*, Г. Ф. Штылев*, И. Ю. Шишкин*, Р. А. Мифтахов*, В. И. Бутвиловская*, И. В. Гречишникова*, О. А. Заседателева*, А. В. Чудинов*

** Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32*

Поступила в редакцию 20.12.2024 г.
После доработки 26.12.2024 г.
Принята к публикации 28.12.2024 г.

Предложен способ повышения эффективности селекции аптамеров к клеточным рецепторам методом cell-Selex, в частности к рецепторной тирозинкиназе c-KIT. Использование Tween 20 в составе буферных растворов в концентрации, не превышающей 0.01%, а также трипсинолиз поверхностных белков на стадии элюции связавшейся с поверхностью клеток комбинаторной библиотеки олигонуклеотидов привело к повышению специфичности аптамеров и уменьшению неспецифической сорбции согласно результатам флуоресцентной микроскопии, термофлуориметрического анализа и высокоточного секвенирования.

Ключевые слова: аптамер, cell-SELEX, трипсин, реакция удлинения праймера, c-KIT, Tween 20

DOI: 10.31857/S0132342325030081, **EDN:** KQMRJH

ВВЕДЕНИЕ

Выявление специфических маркеров, ассоциированных с развитием новообразований, – мощный инструмент в диагностике онкологических заболеваний, а понимание изменений в состоянии клеток на молекулярном уровне имеет большое значение для разработки нетоксичных и эффективных противоопухолевых препаратов [1, 2]. Рецепторные тирозинкиназы участвуют в различных сигнальных процессах, регулирующих рост и пролиферацию клеток, а их гиперэкспрессия характерна для злокачественных заболеваний, таких как лейкоз, нейробластома, мастоцитома и меланома [3].

Рецептор KIT состоит из внеклеточного, трансмембранного, внутриклеточного, околомембранного доменов и домена со свойствами тирозинкиназы [4]. Внеклеточный домен имеет пять иммуноглобулин-подобных частей, вторая и третья из которых участвуют в соединении c-KIT с его лигандом. Возможность контроля уровня экспрессии трансмембранного рецептора c-KIT и его блокирования – одна из важнейших задач современной молекулярной онкологии. В последнее десятилетие таргетная терапия, направленная на ингибирование тирозинкиназ, стала новым перспективным подходом в лечении онкологических заболеваний [5, 6]. Однако применение моноклональных антител – не панацея, оно сопряжено с рядом особенностей и проблем. Получение моноклональных антител – это сложный многоступенчатый процесс. Препараты на их основе отличаются биологической и биохимической нестабильностью, могут вызывать иммунный ответ против себя, что блокирует необходимое действие. Наиболее важный момент – высокая специфич-

Сокращения: SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения; ПАВ – поверхностно-активные вещества.

Автор для связи (тел.: +7 (499) 135-98-00; эл. почта: kuzneimb@gmail.com).

ность моноклональных антител и их токсическое действие на организм. Применение некоторых препаратов на основе моноклональных антител вызывает подавление активности отдельных звеньев иммунитета, вследствие чего повышаются риски возникновения онкологических и инфекционных заболеваний.

Современная альтернатива моноклональным антителам – аптамеры [7], представляющие собой класс олигонуклеотидных соединений с близкими к антителам показателями специфичности и аффинности по отношению к своим мишеням [8–13]. Аптамеры обладают уникальными свойствами, в том числе простотой химического синтеза, высокой химической стабильностью, низкой молекулярной массой, отсутствием иммуногенности, а также легкостью модификации по сравнению с их белковыми аналогами. Не существует универсальной технологии селекции, подходящей для любых объектов, поэтому для получения аптамеров требуется постоянная поэтапная оптимизация.

Целью данной работы была разработка способа повышения эффективности селекции аптамеров к рецепторной тирозинкиназе c-KIT методом cell-Selex посредством снижения неспецифической сорбции на поверхности мертвых клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стратегия SELEX (систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения), впервые представленная Голдом в 1990 г. [14, 15], к настоящему времени претерпела множество модификаций. Одно из направлений метода SELEX – клеточная селекция (cell-SELEX) с использованием живых клеток в качестве сложных мишеней, гарантирующая связывание мишени в ее нативной конформации [16–19]. Селекция аптамеров представляет собой сложный многостадийный процесс, включающий чередование большого количества циклов [20].

Для проведения положительных циклов селекции аптамеров отобраны модифицированные клетки крови мыши FDC-P1 с гиперэкспрессией человеческого гена *KIT* (FDC-P1-KIT), конформацию которого определяет липидный бислой мембраны, а для отрицательной селекции – аналогичные мышиные клетки, у которых отсутствует человеческий белок c-KIT [21, 22].

Аптамер получали из комбинаторной библиотеки случайных олигонуклеотидных последовательностей с вырожденной центральной частью длиной 29 нт и фланкирующими праймерами [23]. В реакции удлинения праймера [24, 25] при использовании Kod XL ДНК-полимеразы получена библиотека модифицированных олигонуклеотидов при полной замене dTTP на модифицированный дезоксиуридинтрифосфат, содержащий по C5-положению пиримидинового основания фрагмент фенилуксусной кислоты [26, 27] (рис. 1). Эту модифицированную библиотеку использовали для получения целевых аптамеров.

Каждый цикл селекции состоял из следующих основных этапов [20]: инкубация клеток-мишеней с модифицированной библиотекой олигонуклеотидов; разделение комплексов олигонуклеотид–мишень; амплификация связанных с мишенью природных ДНК-последовательностей с последующим выделением одноцепочечной природной ДНК-библиотеки; получение модифицированной библиотеки олигонуклеотидов в реакции удлинения праймера; разделение природной и модифицированной библиотек при помощи денатурирующего электрофореза в ПААГ.

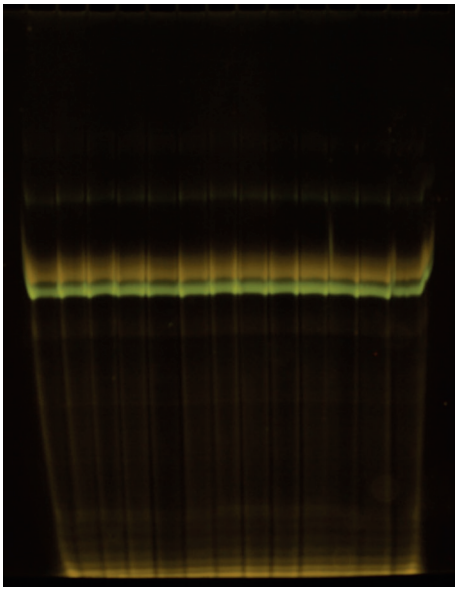

Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов реакции удлинения праймера (primer extension) при реакции с Kod XL ДНК-полимеразой. Денатурирующий 15%-ный ПААГ (соотношение акриламид–бисакриламид 19 : 1), 50°C, регистрация в диапазоне флуоресценции красителя Cy3.

Эффективность проведения селекции на клетках – многофакторный процесс, который напрямую зависит от правильности выбора исходной библиотеки, состояния роста клеток, условий проведения каждого цикла селекции и человеческого фактора. Изменение условий культивирования клеток может повлиять как на обогащение связывающихся последовательностей, так и привести к неудачной селекции. Процесс SELEX обычно занимает от нескольких недель до многих месяцев и всегда сопровождается неопределенностью, поскольку не обязательно окажется успешным [28–31]. Поэтому крайне важно следить за ходом селекции аптамеров с помощью быстрых и простых, но в то же время точных и надежных методов, чтобы значительно повысить шансы на успешный и быстрый отбор [32–36].

Каждый раунд SELEX приводит к получению уникального набора различных последовательностей, поэтому методы постселекционной обработки должны быть чрезвычайно чувствительными. Для контроля обогащения связанных последовательностей широко используется метод проточной цитометрии, которая отличается высокой статистической точностью и воспроизводимостью [19, 20]. Однако применение данного метода требует наличия исходных образцов-мишеней, которые в случае сложных рекомбинантных белков или раковых тканей, полученных от пациентов, представляют собой ценные образцы [32, 37].

Альтернативный метод, позволяющий контролировать ход селекции аптамеров и получение последовательностей с высоким сродством к конкретной мишени, – определение температуры плавления [32, 33, 35]. Подобно антителам, аптамеры сворачиваются в сложные трехмерные структуры, образуя шпильки и петли [38]. Аптамеры с более высокой аффинностью будут содержать относительно большее количество последовательностей GC, а не AT, которые образуют три и две водородные связи соответственно (три – для цитозина и гуанина, две – для аденина и тимина) [32]. Следовательно, успешная селекция аптамеров будет сопровождаться повышением температуры плавления, что может служить косвенным признаком обогащения библиотеки олигонуклеотидов высокоаффинными последовательностями.

После каждого цикла селекции проводили определение температуры плавления библиотек при использовании ПЦР в режиме реального времени (рис. 2). Из полученных данных следует, что по мере проведения селекции происходит постепенное уменьшение содержания продуктов

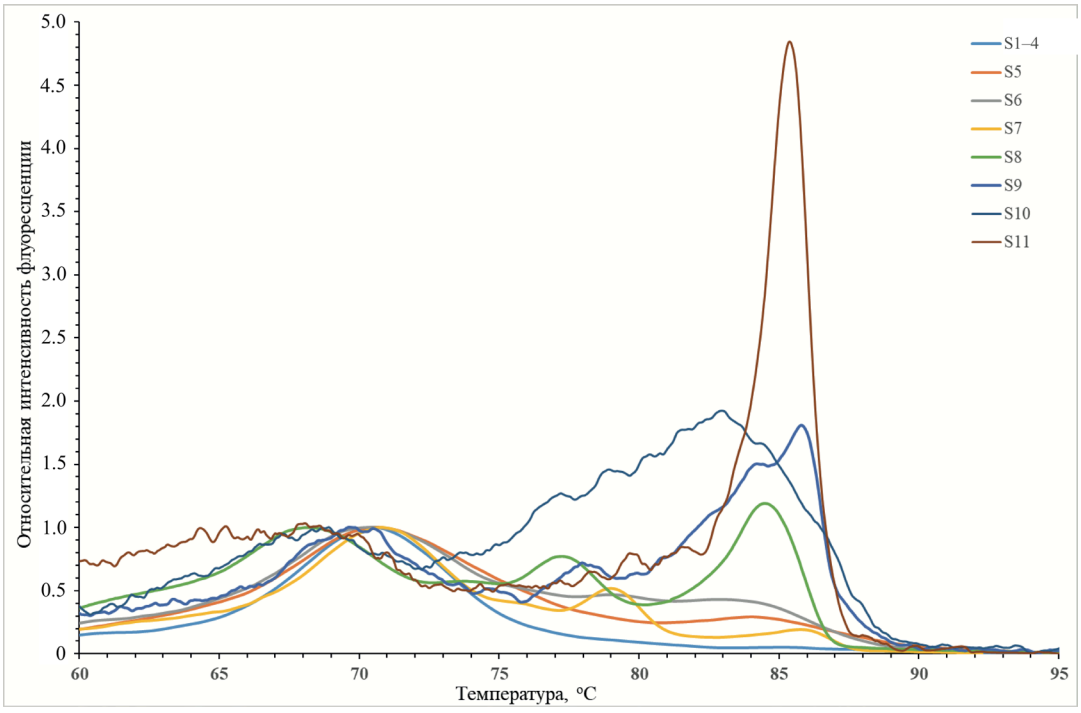

Рис. 2. Температурные кривые плавления продукта амплификации после каждого цикла селекции.

с низкой температурой плавления и увеличение количества продуктов ПЦР с высокой температурой плавления, т.е. происходит обогащение библиотеки продуктами с большей представленностью и аффинностью.

Один из основных недостатков метода cell-SELEX – то, что чередование циклов положительной и отрицательной селекции не гарантирует отсутствия в библиотеке неспецифично связавшихся аптамеров [39]. Условия селекции аптамеров, такие как буфер для связывания, буфер для промывки, буфер для элюции, а также температура и время связывания, играют важную роль в процессе SELEX на клетках. Присутствие мертвых клеток и клеточного мусора еще больше усложняет селекцию из-за их высокого неспецифического сродства к одноцепочечной ДНК. Анализ с помощью флуоресцентной микроскопии показал, что вырожденная библиотека ДНК-аптамеров продемонстрировала неспецифическое поглощение в мертвых клетках с нарушенной целостностью мембран (рис. 3*а*).

Для повышения специфичности аптамеров и уменьшения неспецифической сорбции во время циклов положительной селекции применяли конкурирующие нуклеиновые кислоты, такие как ДНК спермы лосося и сельди, дрожжевую тРНК, синтетическую маскирующую ДНК [40, 41]. Однако интенсивность сигнала флуоресценции связывания аптамеров с мертвыми клетками по сравнению с эквивалентными популяциями живых клеток различалась более чем в 100 раз.

Удаление мертвых клеток в процессе селекции – затруднительная задача, приводящая к потере единичных последовательностей вырожденной ДНК-библиотеки [38, 42]. Один из способов снижения неспецифической сорбции в процессе селекции аптамеров (при использовании в качестве мишеней бактериальных клеток) – применение неионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) [43]. Неионные ПАВ в низких концентрациях могут встраиваться в липидный бислой, образуя полярные дефекты, которые изменяют физические свойства клеточных мембран и приводят к ее обратимой солюбилизации [44].

На примере клеток крови мыши FDC-P1 методом флуоресцентной микроскопии определена степень влияния Tween 20 на жизнеспособность клеток (рис. 3*б*). Показано, что применение Tween 20

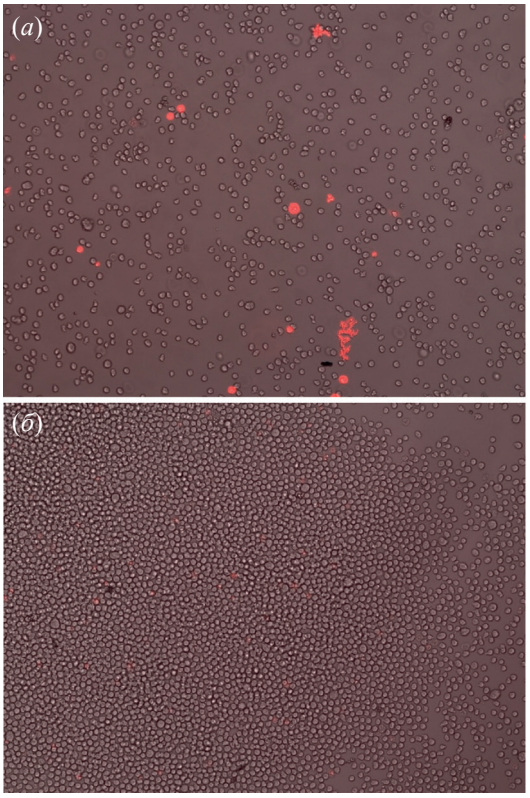

Рис. 3. Неспецифическая сорбция на примере проведения одного раунда селекции (*а*) и при использовании Tween 20 в составе буферных растворов (*б*).

в диапазоне концентраций 0.05–0.1% оказывает значительную цитотоксичность как в клеточных линиях с гиперэкспрессией c-KIT на поверхности, так и без нее после 30-мин воздействия в составе Selex-буфера (фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко с $CaCl_2$ и $MgCl_2$). Tween 20 в концентрациях 0.01% нетоксичен для всех клеток – выживаемость клеток составляет >95%. Эффективность окрашивания KIT-позитивных клеток FDC-P1 флуоресцентно-мечеными антителами против внеклеточного домена белка KIT оказалась одинаковой как в отсутствие Tween 20, так и при его концентрации 0.01%. При этом неспецифическая сорбция вырожденной библиотеки снизилась (рис. 4), что позволяет сделать вывод о возможности применения Tween 20 в составе буферных растворов в процессе селекции аптамеров.

Следует отметить, что немаловажный момент процесса SELEX – этап элюции ДНК-аптамеров с поверхности клетки-мишени. Более эффективный способ разрушения комплекса ДНК/мишень при-

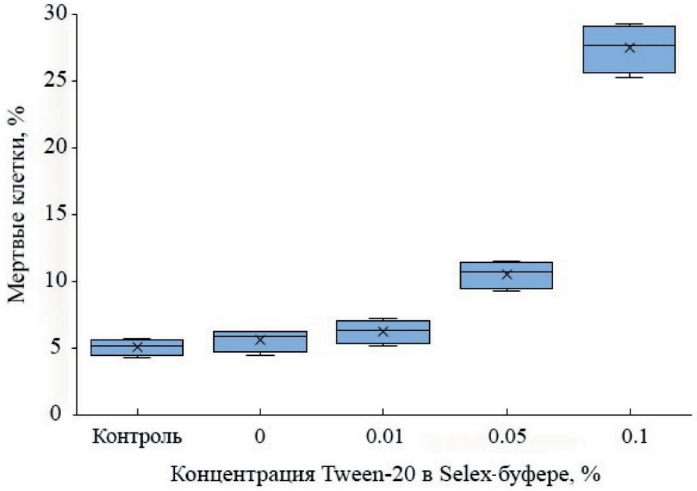

Рис. 4. Оценка влияния Tween 20 на жизнеспособность клеток FDC-P1 при помощи метода флуоресцентной микроскопии (краситель DAPI).

водит к минимизации количества циклов SELEX. Для элюции аптамеров необходимо создать денатурирующие условия, при которых аптамеры теряют свою пространственную структуру, нарушается связь с клеткой-мишенью, и олигонуклеотидные последовательности диссоциируют в раствор. Денатурирующие условия создаются за счет раствора, содержащего мочевину, с помощью лизирующего буферного раствора или под действием высокой температуры [20].

Еще один метод элюции аптамеров с поверхности клетки – метод конкурентного вытеснения антителами, согласно которому аптамеры в меньшей концентрации вытесняются с поверхности клеток за счет высокой концентрации моноклональных антител, специфичных к белковой мишени на поверхности клетки [45]. Однако из-за высокой стоимости моноклональных антител метод не нашел широкого применения.

Нами выявлено, что помимо неспецифической сорбции в процессе селекции происходит потеря значительного количества ДНК-библиотеки на этапе лизиса клеток при отделении специфичных к рецептору c-KIT ДНК-аптамеров. В классическом варианте [20] после положительной селекции клетки нагревают при 95°C, надосадочную жидкость собирают и амплифицируют. С помощью флуоресцентной микроскопии получены снимки клеток и клеточного дебриса до (рис. 3*а*) и после термической обработки (рис. 5*а*). Оказалось, что после нагревания большая часть ДНК-библио-

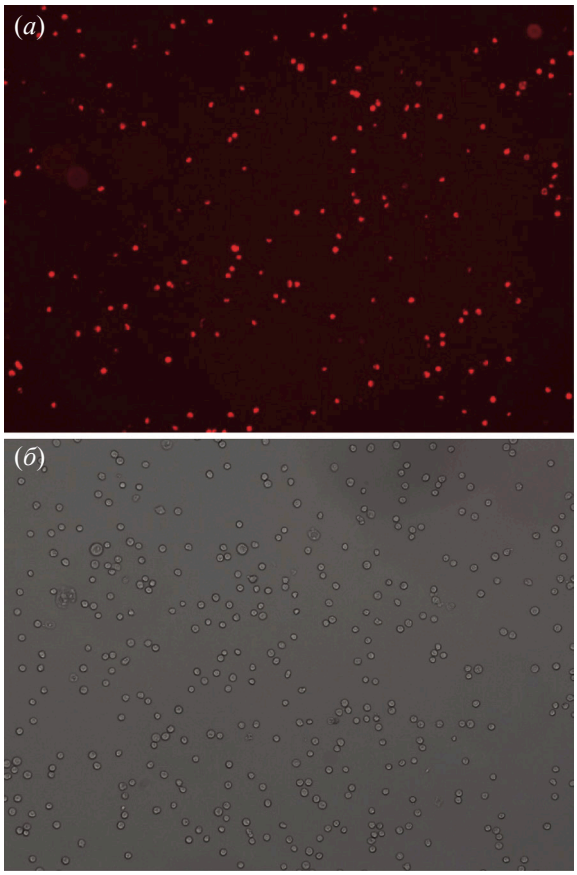

Рис. 5. Снимки неспецифической сорбции флуоресцентно-меченой ДНК-библиотеки при термической обработке клеток в буферном растворе (*а*) и трипсинолиз связавшихся с поверхностью клеток аптамеров (*б*), полученные при помощи флуоресцентной микроскопии, на примере проведения одного раунда селекции.

теки неспецифически связывается с клеточным дебрисом. Если в исходной библиотеке присутствует много слабоаффинных аптамеров, то впоследствии именно они будут амплифицироваться и накапливаться, а небольшая фракция высокоаффинных последовательностей быстро исчезнет за счет интенсивной неспецифической сорбции на этапе элюции, что приведет к отрицательному результату селекции.

Данной неспецифической сорбции можно избежать при использовании трипсинолиза для снятия связавшихся с поверхностью клеток аптамеров [45–48]. Трипсин, выступающий ферментом класса гидролаз и обладающий протеолитической активностью, расщепляет пептидные связи белков на поверхности клетки, не нарушая целостность мембраны и ДНК-аптамеров (рис. 5*б*). После диссоциации аптамеров в растворе трипсина в PBS при 37°C фермент деактивировали нагреванием при 95°C, и полученный продукт далее использовали в качестве матрицы в ПЦР. Постамплификационный анализ кривых плавления продуктов ПЦР (рис. 2) после каждого раунда селекции показал, что применение трипсина (S11 – цикл 11) по сравнению с термической обработкой клеток (S1–10 – циклы 1–10) привел к интенсивному обогащению библиотеки продуктами с высокой температурой плавления, т.е. с большей представленностью и аффинностью.

Обогащенную библиотеку случайных последовательностей ДНК секвенировали методом секвенирования нового поколения для идентификации отдельных последовательностей потенциальных аптамеров. Согласно результатам секвенирования, идентифицированы 14 наиболее представленных последовательностей, содержащих в своей структуре GC-богатые участки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе применяли трифосфаты дезоксинуклеозидов (dNTPs) (Thermo Scientific, США), полимеразы Taq (Thermo Scientific) и Kod XL (Sigma-Aldrich, США). Остальные реактивы и растворители приобретены в компаниях Sigma-Aldrich (США), Acros Organics (Бельгия) и Fluka (США) и имели качество “reagent grade” или “biochemical grade”.

Воду для приготовления растворов получали на установке Milli-Q (EMD Millipore, США). Хроматографическую очистку олигонуклеотидов проводили на колонке BDS Hypersil C18 (Thermo Scientific, США).

В работе использовали полуавтоматические пипетки (Gilson, Франция), амплификатор PTC-220 (Bio-Rad Laboratories, США), амплификатор для ПЦР в режиме реального времени IQ5 (Bio-Rad Laboratories, США) для регистрации кривых плавления в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen (Biotium, США), центрифугу-вортекс Микроспин FV-2400 (Biosan, Латвия), высокоскоростную центрифугу для микропробирок Frontier 5515 (Ohaus, США), флуоресцентный микроскоп Leica DMI8 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Германия). Для разделения фрагментов ДНК использовали вертикальный электрофорез в ПААГ, трансиллюминатор TCP-20.MC 254/312 нм (Vilber Lourmat, Франция), цифровой фотоаппарат EOS 500D (Canon, Япония) с оптическим фильтром SYBR Photographic Filter S7569 (Molecular Probes, США). Олигонуклеотиды синтезировали с помощью автоматического синтезатора ABI 394 DNA/RNA (Applied Biosystems, США). Измерение концентрации олигонуклеотидов и ДНК проводили с помощью спектрофотометра для микрообъемов NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США).

оцДНК-библиотеку с вырожденной центральной частью и соответствующие праймеры получали стандартными методами синтеза однонитевых олигонуклеотидов, при синтезе вырожденной части в реакцию добавляли смесь всех четырех производных дезоксирибонуклеотидов (1.5 : 1.25 : 1.15 : 1.0, A : C : G : T). Матрица 5′-AGCAGCACAGAGGTCAGATG-29N-CCTATGCGTGCTACCGTGAA-3′, где N – любой нуклеотид. Прямой праймер 5′-AGCAGCACAGAGGTCAGATG-3′; 5′-FITC-NH_2-AGCAGCACAGAGGTCAGATG-3′. Обратный праймер 5′-ACGGTAGCACGCATAGG-3′; 5′-Cy3-NH_2-ACGGTAGCACGCATAGG-3′.

5′-Cy3 – аминолинк – гексаэтиленгликоль-ACGGTAGCACGCATAGG-3′.

Модифицированный дезоксиуридинтрифосфат, содержащий по C5-положению пиримидинового основания фрагмент фенилуксусной кислоты, синтезирован по методу, описанному ранее [26, 27].

Модифицированные клетки крови мыши FDC-P1 с гиперэкспрессией человеческого гена *KIT* (FDC-P1-KIT) получали согласно предложенному в литературе протоколу [21, 22]. Селекцию аптамеров проводили согласно предложенному в литературе протоколу с модификациями [20, 23].

Ферментативное получение флуоресцентно-меченой модифицированной вырожденной ДНК-библиотеки методом Primer Extension. Реакцию достраивания праймера проводили в реакционной смеси (100 мкл), содержащей 5 мкМ флуоресцентно-меченого обратного праймера, 1 мкМ матрицы, dCTP, dATP, dGTP и модифицированные dUTP в концентрации 0.3 мМ каждого и Kod XL ДНК-полимеразы в количестве 2 ед. акт. в рекомендованном производителем буфере при использовании температурно-временного профиля – предварительная денатурация при 95°C в течение 5 мин и 99.9°C в течение 30 с, с последующей элонгацией при 60°C в течение 55 мин (5 циклов). Для наработки нужного количества ДНК-библиотеки общий объем ПЦР-смеси составил 1 мл. Далее реакционную массу осаждали при помощи 2%-ного раствора перхлората лития в ацетоне, нужный продукт выделяли при помощи денатурирующего электрофореза в ПААГ в трис-боратном буферном растворе (15%, соотношение акриламид–бисакриламид 19 : 1, 7 М мочевина, 60°C). Из полученной электрофореграммы целевую полосу ДНК вырезали, измельчали и инкубировали в 1 мл PBS в течение 48 ч при 40°C и встряхивании при 1000 об/мин. Затем раствор отделяли от геля центрифугированием (1 мин, 13 500 об/мин) на фильтрационных спин-колонках. оцДНК выделяли концентрированием с помощью экстракции *n*-бутанолом и осаждали из водного раствора 2%-ным раствором перхлората лития в ацетоне, высушивали и растворяли в 100 мкл апирогенной воды.

Трипсинолиз для снятия связавшихся с поверхностью клеток аптамеров. После инкубации флуоресцентно-меченой ДНК-библиотеки с клетками крови мыши FDC-P1 с гиперэкспрессией человеческого гена *KIT* клетки промывали буферным раствором Дульбекко [20] с добавлением 0.01% Tween 20. Далее к клеткам добавляли трипсин (0.25%, 70 мкл), PBS (40 мкл) и выдерживали при 37°C в течение 7 мин. Супернатант отбирали, к клеткам добавляли 100 мкл промывочного буфера Дульбекко (без Tween 20). Растворы объединяли и нагревали при 95°C в течение 10 мин для инактивации трипсина.

Амплификация обогащенной ДНК-библиотеки и регистрация кривых плавления. ПЦР проводили в реакционной смеси (100 мкл), содержащей 3 мкМ каждого праймера, 10% (об.) образца элюированной ДНК-матрицы, нуклеотидтрифосфаты в концентрации 0.2 мМ каждого, 2.5 мМ, 2.5 мМ $MgCl_2$ и Taq ДНК-полимеразу в количестве 3 ед. акт. в рекомендованном производителем буфере. Температурно-временной профиль состоял из следующих стадий: предварительный прогрев при 95°C в течение 5 мин, за которым следовали 20 циклов: 95°C – 30 с, 57°C – 30 с, 72°C – 40 с. Завершающую инкубацию проводили при 72°C в течение 5 мин. Далее продукт реакции осаждали 2%-ным раствором перхлората лития в ацетоне (для дезактивации фермента), осадок выделяли центрифугированием, высушивали и добавляли 100 мкл буфера для Taq-полимеразы. Отбирали 19 мкл раствора, добавляли 1 мкл красителя EvaGreen и регистрировали кривую плавления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование неионных ПАВ (Tween 20) в составе буферных растворов, а также трипсинолиз поверхностных белков на стадии элюции связавшейся с поверхностью клеток библиотеки олигонуклеотидов значительно снижают неспецифическую сорбцию. Прямой мониторинг каждого цикла селекции аптамеров с помощью анализа сдвига кривой плавления в сторону более высоких температур позволяет контролировать процесс обогащения комбинаторной библиотеки олигонуклеотидов благодаря корреляции между увеличением содержания GC-участков и температуры плавления с увеличением сродства аптамера к соответствующей мишени. Дальнейшее совершенствование метода отбора аптамеров с помощью cell-SELEX должно привести к более глубокому пониманию биохимических и молекулярных процессов, происходящих в злокачественных, бактериальных и вирусных клетках.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-24-00549.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – ВЕК, ВЕШ, АВЧ; экспериментальные работы – ВЕК, ТДЛ, ВЕШ, ВИБ, ИВГ, ОАЗ; написание статьи – ВЕК, ВЕШ, АВЧ; анализ данных – ТДЛ, ГФШ, ИЮШ, РАМ; администрирование проекта – ВЕК, АВЧ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Liu H., Chen X., Focia P., He X.* // EMBO J. 2007. V. 26. P. 891–901. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601545
2. *Camorani S., Crescenzi E., Fedele M., Cerchia L.* // Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer. 2018. V. 1869. P. 263–277. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.03.003
3. *Рулина А.В., Спирин П.В., Прасолов В.С.* // Усп. биол. химии. 2010. Т. 50. С. 349–386.
4. *Bibi S., Langenfeld F., Jeanningros S., Brenet F., Soucie E., Hermine O., Damaj G., Dubreuil P., Arock M.* // Immunol. Allergy Clin. North Am. 2014. V. 34. P. 239–262. https://doi.org/10.1016/j.iac.2014.01.009
5. *Kövecsi A., Jung I., Szentirmay Z., Bara T., Bara T., Jr., Popa D., Gurzu S.* // Oncotarget. 2017. V. 8. P. 55950–55957. https://doi.org/10.18632/oncotarget.19116
6. *Sankhala K.K.* // Expert Opin. Investig. Drugs. 2017. V. 26. P. 427–443. https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1303045
7. *Hicke B.J., Marion C., Chang Y.-F., Gould T., Lynott C.K., Parma D., Schmidt P.G., Warren S.* // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 48644–48654. https://doi.org/10.1074/jbc.m104651200
8. *Zhang Y., Chen Y., Han D., Ocsoy I., Tan W.* // Bioanalysis. 2010. V. 2. P. 907–918. https://doi.org/10.4155/bio.10.46
9. *Wang C., Zhang M., Yang G., Zhang D., Ding H., Wang H., Fan M, Shen B., Shao N.* // J. Biotechnol. 2003.V. 102. P. 15–22. https://doi.org/10.1016/s0168-1656(02)00360-7
10. *Cerhia L., Hamm J., Libri D., Tavitian B., Franciscis B.* // FEBS Lett. 2002. V. 528. P. 12–16. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03275-1
11. *Blank M., Weinschenk T., Priemer M., Schluesener H.* // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 16464–16468. https://doi.org/10.1074/jbc.m100347200
12. *Daniels D.A., Chen H., Hicke B.J., Swiderek K.M., Gold L.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 15416–15421. https://doi.org/10.1073/pnas.2136683100
13. *Laos R., Thomson J.M., Benner S.A.* // Front. Microbiol. 2014. V. 5. P. 565. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00565
14. *Tuerk C., Gold L.* // Science. 1990. V. 249. P. 505–510. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2200121
15. *Ellington A.D., Szostak J.W.* // Nature. 1990. V. 346. P. 818–822. https://doi.org/10.1038/346818a0
16. *Zhu G., Zhang H., Jacobson O., Wang Z., Chen H., Yang X., Niu G., Chen X.* // Bioconj. Chem. 2017. V. 28. P. 1068–1075. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00746
17. *Wang D.L., Songc Y.L., Zhu Z., Li X.L., Zou Y., Yang H.T., Wang J.J., Yao P.S., Pan R.J., Yang C.J., Kang D.Z.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014. V. 453. P. 681–685. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.023
18. *Hollenstein M.* // Molecules. 2012. V. 17. P. 13569–13591. https://doi.org/10.3390/molecules171113569
19. *Gold L., Ayers D., Bertino J, Bock C., Bock A., Brody E.N., Carter J., Dalby A.B., Eaton B.E., Fitzwater T., Flather D., Forbes A., Foreman T., Fowler C., Gawande B., Goss M., Gunn M., Gupta S., Halladay D., Heil J., Heilig J., Hicke B., Husar G., Janjic N., Jarvis T., Jennings S., Katilius E., Keeney T.R., Kim N., Koch T.H., Kraemer S., Kroiss L., Le N., Levine D., Lindsey W., Lollo B., Mayfield W., Mehan M., Mehler R., Nelson S.K., Nelson M., Nieuwlandt D., Nikrad M., Ochsner U., Ostroff R.M., Otis M., Parker T., Pietrasiewicz S., Resnicow D.I., Rohloff J., Sanders G., Sattin S., Schneider D., Singer B., Stanton M., Sterkel A., Stewart A., Stratford S., Vaught J.D., Vrkljan M., Walker J.J., Watrobka M., Waugh S., Weiss A., Wilcox S.K., Wolfson A., Wolk S.K., Zhang C., Zichi D.* // PLoS One. 2010. V. 5. P. e15004. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015004

20. *Sefah K., Shangguan D., Xiong X., O'Donoghue M.B., Tan W.* // Nat. Protoc. 2010. V. 5. P. 1169–1185. https://doi.org/10.1038/nprot.2010.66
21. *Вагапова Э.Р., Лебедев Т.Д., Попенко В.И., Леонова О.Г., Спирин П.В., Прасолов В.С.* // Act. Nat. 2020. Т. 12. С. 51–55. https://doi.org/10.32607/actanaturae.10938
22. *Lebedev T.D., Vagapova E.R., Popenko V.I., Leonova O.G., Spirin P.V., Prassolov V.S.* // Front. Oncol. 2019. V. 9. P. 1046. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01046
23. *Meyer S., Maufort J.P., Nie J., Stewart R., McIntosh B.E., Conti L.R., Ahmad K.M., Soh H.T., Thomson J.A.* // PLoS One. 2013. V. 8. P. e71798. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071798
24. *Chudinov A.V., Shershov V.E., Pavlov A.S., Volkova O.S., Kuznetsova V.E., Zasedatelev A.S., Lapa S.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 856–858. https://doi.org/10.1134/S1068162020050064
25. *Vasiliskov V.A., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Surzhikov S.A., Shershov V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Miftahov R.A., Zasedateleva O.A., Lisitsa A.V., Radko S.P., Zasedatelev A.S., Timofeev E.N., Chudinov A.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 221–223. https://doi.org/10.1134/s1068162019030063
26. *Chudinov A.V., Kiseleva Y.Y., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Lapa S.A., Timofeev E.N., Archakov A.I., Lisitsa A.V., Radko S.P., Zasedatelevet A.S.* // Mol Biol. 2017. V. 51. P. 474–482. *https://doi.org/10.1134/S0026893317030025*
27. *Lapa S.A., Pavlov A.S., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Radko S.P., Zasedatelev A.S., Lisitsa A.V., Chudinov A.V.* // Mol. Biol. 2019. V. 53. P. 460–469. https://doi.org/10.1134/S0026893319030099
28. *Lyu Y., Chen G., Shangguan D., Zhang L., Wan S., Wu Y., Zhang H., Duan L., Liu C., You M., Wang J., Tan W.* // Theranostics. 2016. V. 6. P. 1440–1452. https://doi.org/10.7150/thno.15666
29. *Cerchia L., Duconge F., Pestourie C., Boulay J., Aissouni Y.* // PLoS Biol. 2005. V. 3. P. e123. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030123
30. *McKeague M., Derosa M.C.* // J. Nucleic Acids. 2012. V. 2012. P. 748913. https://doi.org/10.1155/2012/748913
31. *Ouellet E., Foley J.H., Conway E.M., Haynes C.* // Biotechnol. Bioeng. 2015. V. 112. P. 1506–1522. https://doi.org/10.1002/bit.25581
32. *Kissmann A.K., Bolotnikov G., Li R., Müller F., Xing H., Krämer M., Gottschalk K.E., Andersson J., Weil T., Rosenau F.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2024. V. 108. P. 284. https://doi.org/10.1007/s00253-024-13085-7
33. *Zhang H.L., Lv C., Li Z.H., Jiang S., Cai D., Liu S.S., Wang T., Zhang K.H.* // Front. Chem. 2023. V. 11. P. 1144347. https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1144347
34. *Ouellet E, Lagally E.T., Cheung K.C., Haynes C.A.* // Biotechnology. 2014. V. 111. P. 2265–2279. https://doi.org/10.1002/bit.25294
35. *Schutze T., Arndt P., Menger M., Wochner A., Vingron M., Erdmann V., Lehrach H., Kaps Ch., Glokler J.* // Nucleic Acids Res. 2009. V. 38. P. e23. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029604
36. *Pearson K., Doherty C., Zhang D., Becker N.A., Maher L.J.* // Anal. Biochem. 2022. V. 650. P. 114712. https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114712
37. *Raber H.F., Kubiczek D.H., Bodenberger N., Kissmann A.K., D'souza D., Xing H., Mayer D., Xu P., Knippschild U., Spellerberg B., Weil T., Rosenau F.* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 10425. https://doi.org/10.3390/ijms221910425
38. *Catuogno S., Esposito C.L.* // Biomedicines. 2017. V. 5. P. 49. https://doi.org/10.3390/biomedicines5030049
39. *Flanagan Sh.P., Fogel R., Edkins A.L., Ho L., Limson J.* // Anal. Methods. 2021. V. 13. P. 1191–1203. https://doi.org/10.1039/d0ay01878c
40. *Shangguan D., Meng L., Cao Z.C., Xiao Z., Fang X., Li Y., Cardona D., Witek R.P., Liu C., Tan W.* // Anal. Chem. 2008. V. 80. P. 721–728. https://doi.org/10.1021/ac701962v
41. *Cherney L.T., Obrecht N.M., Krylov S.N.* // Anal. Chem. 2013. V. 85. P. 4157–4164. https://doi.org/10.1021/ac400385v
42. *Mayer G., Ahmed M.S., Dolf A.* // Nat. Protoc. 2010. V. 5. P. 1993–2004. https://doi.org/10.1038/nprot.2010.163
43. *Xiong L., Xia M., Wang Q., Meng Z., Zhang J., Yu G., Dong Z., Lu Y., Sun Y.* // Biotechnol. Lett. 2022. V. 44. P. 777–786. https://doi.org/10.1007/s10529-022-03252-z
44. *Hua T., Zhang X., Tang B., Chang Ch., Liu G., Feng L., Yu Y., Zhang D., Hou J.* // BMC Vet. Res. 2018. V. 14. P. 138. https://doi.org/10.1186/s12917-018-1457-5
45. *Zhang Y., Wu Y., Zheng H., Xi H., Ye T., Chan C.Y., Kwok C.K.* // Anal. Chem. 2021. V. 93. P. 5744–5753. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04862
46. *Замай А.С., Замай Г.С., Коловская О.С., Замай Т.Н., Березовский М.В.* // Патент RU2518368C1, 2012.
47. *Zhang K., Sefah K., Tang L., Zhao Z., Zhu G., Ye M., Sun W., Goodison S., Tan W.* // ChemMedChem. 2012. V. 7. P. 79–84. https://doi.org/10.1002/cmdc.201100457
48. *Gu L., Yan W., Liu S., Ren W., Lyu M., Wang S.* // Anal. Biochem. 2018. V. 561–562. P. 89–95. https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.09.004

A Method for Increasing the Efficiency of Selection of Aptamers to Cellular Receptors

V. E. Kuznetsova*, #, T. D. Lebedev*, V. E. Shershov*, G. F. Shtylev*, I. Yu. Shishkin*, R. A. Miftahov*, V. I. Butvilovskaya*, I. V. Grechishnikova*, O. A. Zasedateleva*, and A. V. Chudinov*

 # Phone: +7 (495) 135-98-00; e-mail: kuzneimb@gmail.com

** Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia*

A method has been proposed to increase the efficiency of selection of aptamers to cellular receptors by the cell-Selex method, in particular to the receptor tyrosine kinase c-KIT. The use of Tween 20 in buffer solutions in concentrations not exceeding 0.01%, as well as trypsinolysis of surface proteins at the stage of elution of the combinatorial library of oligonucleotides bound to the cell surface, led to an increase in the specificity of aptamers and a decrease in nonspecific sorption according to the results of fluorescence microscopy, thermofluorimetric analysis and high-precision sequencing.

Keywords: *aptamer, cell-SELEX, trypsin, primer extension, c-KIT, Tween 20*