

*А. В. Колесников, А. В. Козырь, И. Г. Шемякин*

## ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ АПТАМЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

ФБУН ГНЦ ПМБ, Московская область, пос. Оболенск

Аптамеры на основе нуклеиновых кислот являются перспективной платформой для разработки широкого спектра диагностических и терапевтических препаратов и средств мониторинга окружающей среды. Свойства аптамеров позволяют рассматривать их как синтетические аналоги антител. Вместе с тем аптамеры имеют ряд важных преимуществ по сравнению с антителами, что делает их эффективным инструментом для разработки диагностических средств нового поколения, обеспечивающих высокую чувствительность и специфичность детекции при высокой степени воспроизводимости и контролируемости свойств и низких затратах на производство. В частности, технологии детекции биомолекул и целых микроорганизмов, созданные на базе аптамеров, могут быть использованы для решения задач высокочувствительной экспресс-диагностики бактериальных патогенов. В данном обзоре суммируются достижения аптамерных технологий в области детекции бактериальных патогенов и их компонентов и рассматриваются перспективы их практического использования.

*Ключевые слова: аптамеры, комбинаторные библиотеки, биосенсоры, иммуноферментный анализ, иммуно-ПЦР, диагностика, патогены, токсины*

### Введение

Использование новых методов диагностики, профилактики и лечения бактериальных инфекций позволило значительно снизить их негативное воздействие на человека, известное по прошедшим эпохам. Тем не менее смертность от инфекционных болезней остается высокой во всем мире, занимая первые места в развивающихся странах и уступая лишь онкологическим и сердечно-сосудистым заболеваниям в государствах с развитой или переходной экономикой. Это обусловлено как недостатками систем ранней диагностики и терапии бактериальных инфекций, так и ускорившейся модификацией патогенов под действием различных, часто антропогенных факторов, известной в западной литературе как «emerging and re-emerging infectious diseases» [32].

Несмотря на существующий арсенал молекулярных, биохимических и микробиологических методов детекции и его постоянное развитие, в клинической диагностике имеется ряд проблем, решение которых крайне важно для повышения эффективности борьбы с бактериальными патогенами. Одна из них – этиологическая расшифровка инфекции. Определение видовой принадлежности патогена проводится микробиологическими и биохимическими методами и требует значительного времени, связанного с необходимостью выделения и культивирования микроорганизма. В ряде случаев этиологическая расшифровка считается нецелесообразной, поскольку отдалает начало терапии [1].

Вместе с тем для многих инфекций быстрая этиологическая расшифровка жизненно необходима. Это

в первую очередь особо опасные инфекции и токсикоинфекции. Например, в ходе исследований смертельных случаев сибирской язвы в США в 2001 г. было показано, что порог концентрации в крови летального токсина, при котором наступает так называемое «состояние невозврата», составляет не более 1–5 пг/мл [21, 45]. Более того, для этиологической расшифровки ряда инфекций необходим мультиплексный анализ, способный дифференцировать, к примеру, относительно безвредный изолят *E. coli* O104:H4 от смертельно опасного варианта патогена, несущего шига-токсин, и мультирезистентного к антибиотикам [30]. Таким образом, основным требованием к новым диагностическим методам идентификации патогенов является возможность быстрой, высокочувствительной (1–10 пг/мл и менее для молекул, например, для токсинов и 1–20 клеток/мл для бактерий) детекции мишени без предварительного обогащения и культивирования микроорганизмов.

Одним из перспективных направлений создания высокочувствительных тест-систем для экспресс-диагностики инфекций является использование аптамеров. Аптамерами называются фрагменты нуклеиновых кислот или полипептидов, полученные в результате искусственно направляемой “эволюции в пробирке” и специфически связывающие избранные молекулы-мишени с высокой аффинностью [11, 12]. В данном обзоре будут рассматриваться аптамеры на базе нуклеиновых кислот и их потенциал для быстрой диагностики бактериальных инфекций.

### Методы экспресс-диагностики и перспективы использования аптамеров

Основными способами быстрой специфической диагностики бактериальных патогенов, широко применяющимися в клинической практике, в настоящее время являются полимеразная цепная реакция (ПЦР) и различные методы детекции с использованием специфических антител, наиболее распространенным из которых является иммуноферментный анализ (ИФА). Несмотря на широкое применение данных методов, в современном виде они имеют ряд недостатков, ограничивающих их эффективность как средств экспресс-диагностики и быстрой этиологической расшифровки патогена. Чувствительность классического ИФА с применением колориметрической детекции, как правило, не превышает 1 нг/мл мишени. Вторичные антитела и конъюгаты на основе авидина и его производных, задействованные в сэндвич-системах ИФА, нередко являются источником неспецифического сигнала. Это ограничивает возможности повышения

эффективности метода за счет увеличения чувствительности вторичных реакций в ИФА, например, использования хемилюминесцентной детекции.

ПЦР является весьма чувствительным и специфичным методом анализа, теоретически для детекции ДНК-мишени достаточно присутствия в образце всего нескольких копий генома патогена. На практике клинические образцы или образцы, включающие частицы пищи, почвы и прочие примеси, содержат также ингибиторы ПЦР, родственные микроорганизмы, неспецифическую ДНК, способную дать ложноположительный сигнал (подробное описание указанных проблем ПЦР ДНК патогенов приводится, например, в работе [26]). Для проведения ПЦР часто требуется обогащение детектируемых мишеней (аналитов) в образце с применением аффинных меток или селективных сред [52], что значительно увеличивает время детекции. Кроме того, методом ПЦР невозможно напрямую детектировать белки или другие факторы вирулентности, в частности, осуществлять мониторинг концентрации токсина или иного фактора вирулентности в процессе заболевания.

Таким образом, ключевыми компонентами системы экспресс-диагностики и ранней этиологической расшифровки инфекции являются: 1) детектирующий агент, обеспечивающий высокую аффинность и специфичность связывания с мишенью; 2) система детекции и/или амплификации сигнала от детектирующего агента, обеспечивающая определение аналита в концентрации 5–50 пг/мл (или 10–100 клеток (КОЕ)/мл) и менее.

Аптамеры являются одним из наиболее перспективных современных инструментов высокочувствительной экспресс-диагностики. К преимуществам аптамеров по сравнению с антителами можно отнести дешевизну химического синтеза, простоту введения широкого спектра меток и функциональных групп непосредственно при синтезе, отсутствие падения аффинности за счет необратимой денатурации активных структур, возможность использования внутренних особенностей структуры самого аптамера для создания, например, флуоресцентного репортера, изменяющего интенсивность флуоресценции при взаимодействии с мишенью [33, 39], высокую по сравнению с антителами плотность иммобилизации в ориентированном положении на твердой фазе и целый ряд других свойств [20]. В отличие от антител аптамеры можно получить к полностью неиммуногенным мишеням и даже к малым, повсеместно встречающимся молекулам, например к АТФ [27]. Для получения и производства аптамеров не нужны живые системы. Небольшая молекулярная масса и отсутствие протяженных участков, не входящих в связывающий центр аптамеров, снижают вероятность их неспецифического взаимодействия с различными молекулами по сравнению с таковой для антител. Стоимость синтеза аптамеров и сайт-направленного введения в эти молекулы различных меток намного ниже стоимости производства и модификации антител. Чувствительность аптамеров к нуклеазам блокируется химическими модификациями в процессе синтеза [29].

#### **Технология селекции мишень-направленных аптамеров**

Технология селекции аптамеров, разработанная в начале 90-х годов XX века, получила название SELEX

(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) [14, 42, 44, 48]. Метод SELEX является типичным представителем методов скрининга комбинаторных библиотек. Вероятность нахождения высокоаффинного лиганда к избранной мишени тем больше, чем выше сложность библиотеки. Исходное разнообразие библиотеки “нуклеиновых” аптамеров намного превышает степень сложности фаговых и рибосомных библиотек. Масса 60-членной библиотеки аптамеров на базе нуклеиновых кислот (НК-аптамеров), содержащей  $6 \cdot 10^{17}$  уникальных молекул, будет составлять всего около 1,8 мг. При этом количество уникальных молекул в такой библиотеке превышает технически достижимое число уникальных молекул в комбинаторной библиотеке на основе рибосомного дисплея не менее чем в 1000 раз, в фаговой библиотеке антител – в  $10^6$  раз, в репертуаре антител человека – в  $10^8$  раз.

Размножение НК-аптамеров проводят в системе, состоящей из буферного раствора, ферментов обмена ДНК и нуклеотидтрифосфатов. Для амплификации основных альтернативных видов комбинаторных библиотек необходимы живые системы или их многокомпонентные фракции *in vitro*. Большое число неопределенных компонентов и интерференция с жизненно важными процессами в системах оказывают селективное влияние на эффективность амплификации отдельных членов библиотек. Таким образом, скрининг библиотек аптамеров является наиболее эффективным способом получения высокоаффинных лигандов к биомолекулам.

#### **Системы детекции бактерий и их компонентов на основе аптамеров**

Разработка методов аптамерной диагностики бактерий, бактериальных токсинов и факторов вирулентности началась в последние 4–5 лет; число исследований в данной области еще относительно невелико, однако достигнутые результаты свидетельствуют о значительном потенциале аптамеров для разработки диагностических систем и подходов к детекции в области микробиологии и инфекционных заболеваний. Основные работы по селекции аптамеров в этой области можно разделить на три группы: получение аптамеров, узнающих целые бактерии; аптамеров, связывающихся с токсинами и другими индивидуальными биомолекулами и фракциями молекул, и разработка принципиально новых методов детекции на основе уже полученных аптамеров.

#### **Аптамеры, специфичные к целым бактериальным клеткам, и методы детекции патогенов на их основе**

Аптамеры, специфичные к спорообразующим бактериям, были одними из первых представителей этого класса молекул, отобранных с использованием живых клеток. Уместно отметить, что селекция аптамеров к целым бактериям технологически несколько проще селекции аптамеров, специфичных к биомолекулам, поскольку бактерии представляют собой по сути природный аффинный сорбент, который может быть отделен от молекул аптамеров, находящихся в растворе, простым центрифугированием, в то время как связавшиеся с бактериями аптамеры окажутся в осадке. Бактерии, фиксированные, например фор-

мальдегидом, весьма устойчивы к жестким условиям эволюции связавшейся ДНК, что позволяет отбирать высокоаффинные аптамеры. Споры бацилл, в частности *B. anthracis*, выдерживают кипячение, сохраняя жизнеспособность, поэтому являются удобной моделью для изучения методов селекции высокоаффинных аптамеров в максимально жестких условиях. Аптамеры, отобранные к спорам возбудителя сибирской язвы, демонстрировали столь высокую аффинность к мишени, что не могли быть элюированы в физиологических растворах при нагревании до 99°C, однако диссоциировали из комплекса со спорами в деионизованной воде [2]. Электрохемилюминесцентная детекция спор с применением отобранных аптамеров характеризовалась чувствительностью менее 10 бактерий и широким динамическим диапазоном (до 10<sup>6</sup> клеток в 1 мл) [3]. Аптамеры к спорам *B. thuringensis* позволяли детектировать только около 10<sup>3</sup> микроорганизмов, что, возможно, связано с выбором метода детекции (флуоресцентные квантовые точки), чувствительность которого меньше, чем у электрохемилюминесценции. Вместе с тем чувствительность данного метода выше таковой других способов флуоресцентной детекции спор бацилл [19].

Интересный подход был использован для создания системы детекции целых бактерий *Staphylococcus aureus* на основе аптамеров. Авторы применили как позитивную селекцию на клетках патогена, так и негативную с использованием близкородственных непатогенных стафилококков [6]. Было получено 5 аптамеров, эффективно детектирующих патогенный стафилококк на фоне различных, в том числе близкородственных, бактерий. Поскольку неспецифическое связывание данных аптамеров оказалось весьма невысоким, они были использованы одновременно для повышения эффективности селекции различных изолятов *Staphylococcus aureus*.

Как правило, в работах по получению диагностических аптамеров, специфичных к целым бактериям, деконволюция индивидуальной молекулы-мишени не производится, так как это сопряжено со значительными затратами без гарантии идентификации и невозможно заранее определить, будет та или иная мишень присутствовать в 100% изолятов патогена или только в части из них. Детекция нескольких мишеней одновременно, возможная ввиду высокой селективности аптамеров, позволяет значительно повысить вероятность успешного обнаружения патогена. Описанная методика позволяет детектировать единичные бактерии в мазках, полученных непосредственно от пациента. Определить потенциальную селективность пары различных аптамеров, полученных к однотипным микроорганизмам, можно методом конкурентного ингибирования, при котором избыток аптамера А, не содержащего метки, препятствует связыванию с бактерией меченого аптамера А, но не препятствует связыванию аптамеров В, С, Е и т. д., меченых красителями с различной длиной волны флуоресценции.

Помимо применения нескольких аптамеров одновременно для селективной детекции однотипной мишени, возможна и селекция одного группоспецифического аптамера. Такие молекулы были получены для определения стрептококков М-типа, превалирующих в Канаде [16]. Интересно, что полученные аптамеры

связывали все или почти все штаммы стрептококка, отобранные для селекции с константами, находящимися в диапазоне 1–13 нМ, в то время как связывание аптамеров со штаммами М-типа, не участвовавшими в селекции, было значительно менее эффективным. Таким образом, селекцию аптамеров на целых бактериальных клетках можно использовать не только с целью получения панспецифических диагностикумов, но и для разработки методов тонкой дифференциации субтипов и изолятов патогена.

Использование аптамеров, специфичных для конкретного серовара патогена, рассматривается на примере *Salmonella typhimurium* [23]. Эти аптамеры были ранее отобраны по связыванию с фракцией внешних мембранных белков (OMP) бактерии [22] и оказались эффективны для связывания с целыми клетками и их очистки методом магнитной сепарации из сложных смесей, содержащих близкородственные бактерии. Авторы работы показывают эффективность аптамеров как инструмента, обеспечивающего адекватную чувствительность ПЦР в реальном времени при анализе сложных смесей микроорганизмов, в которых эффективность амплификации ДНК-мишени может снижаться на несколько порядков. Чувствительность метода аптамерной магнитной очистки на микросферах, сопряженного с ПЦР в реальном времени, составляла 1 бактерию (КОЕ) на ПЦР-реакцию [23].

Исследование по отбору аптамеров к одному из основных возбудителей нозокомиальных инфекций – *Pseudomonas aeruginosa*, было направлено на разработку метода детекции клеток патогена с помощью флуоресцентно меченных аптамеров. Было показано, что наиболее эффективно связывающийся аптамер (K<sub>d</sub> около 20 нМ) позволял эффективно определять клетки-мишени методом флуоресцентной микроскопии. Такой метод является быстрым (1,5–2 ч), а также недорогим и технически несложным, что делает его использование привлекательным для диагностики в условиях стандартной клинической лаборатории [50].

Детекция патогенов с использованием аптамеров, полученных при селекции на целых бактериях, может быть весьма эффективна в тех случаях, когда культивирование бактерий проблематично. Например, распространенный пищевой патоген *Campylobacter jejuni* нуждается в микроаэрофильных условиях культивирования, которые требуют наличия оборудования и квалификации персонала, как правило, недоступных в стандартной клинико-диагностической лаборатории. Аптамеры, отобранные на связывание либо с фракцией внешних мембранных белков патогена [4], либо с целыми клетками [10], были способны детектировать примерно от 2 до 250 бактерий/мл в зависимости от типа образца, использованного для анализа. Это делает возможным эффективную детекцию клинических образцов на предмет наличия *Campylobacter jejuni* с использованием стандартного флуориметра или флуоресцентного микроскопа [4]. Кроме того, для аптамера, отобранного на взаимодействие с целыми клетками, была показана белковая природа мишени, с которой он связывается. С учетом высокой специфичности данного аптамера к различным изолятам *Campylobacter jejuni* дальнейшие исследования могут позволить выделить маркер, уникальный для данного патогена [10].

В заключение уместно отметить, что аптамеры,

узнающие мишени на поверхности живых клеток, способны блокировать инфекцию [7, 36]. Аптамеры, специфичные к бактериальным липополисахаридам, проявляли протективный противовоспалительный эффект *in vivo* [22]. Таким образом, аптамеры, специфичные к рецепторам, распознающим мишени в организме хозяина или связывающие факторы вирулентности, могут рассматриваться не только как потенциальные диагностические средства, но и в качестве кандидатов для разработки новых методов терапии.

#### Детекция молекулярных мишеней микробного происхождения с помощью аптамеров

Значительное число работ в области аптамеров, специфичных к бактериальным патогенам, посвящено биомолекулярным мишеням, которые являются или факторами вирулентности, или молекулярными маркерами того или иного микроорганизма, или обладают иными уникальными свойствами, делающими их мишенью для создания специфического способа диагностики. В рамках этих исследований получены аптамеры, специфичные к компонентам сибиреязвенного летального токсина [8], ботулинического токсина [46], холерного и стафилококкового токсинов [3], растворимым антигенам возбудителя туляремии [49], туберкулеза [38], к липополисахаридам клеточной стенки *E. coli* O111:H4 [9].

Уровень чувствительности детекции патогенов с использованием этих аптамеров был близким к уровню чувствительности детекции, достижимому методом ИФА, или несколько превосходил его. В отдельных случаях удавалось достичь более высокой чувствительности детекции (10 пг при электрохемилюминесцентной детекции стафилококкового энтеротоксина [3]), однако закономерности, влияющие на чувствительность детекции с применением аптамеров, в этой работе выявлены не были.

Растворимые компоненты клеток, в частности суммарные белки внешней мембраны, использовались для создания методов детекции целых клеток на основе аптамеров. Например, аптамеры, полученные к внешним мембранным белкам *Salmonella enterica* серовара *typhimurium*, использовались как агенты, позволяющие эффективно выделять патоген из сложных природных смесей для последующей детекции методом ПЦР. Чувствительность метода составляла около 1 бактерии на 1 мл смеси. Интересно, что в качестве инструмента аффинной очистки можно было эффективно использовать как смесь аптамеров, полученных при селекции, так и ряд индивидуальных аптамеров, полученных при деконволюции смеси. Смесь аптамеров может быть эффективно использована для детекции не только *Salmonella typhimurium*, но и других сальмонелл [22].

Аптамеры, специфичные к белкам внешней мембраны *E. coli*, использовались для непосредственной детекции бактерий методом конкурентного FRET [5]. Тестерные бактерии, иммобилизованные на поверхности пластика, содержали связанные с мишенями меченные флуоресцентным красителем аптамеры, а также были ковалентно модифицированы тушителем флуоресценции. При инкубации иммобилизованных бактерий с исследуемым образцом, содержащим *E. coli*, часть аптамеров, диссоциировавших с поверх-

ности клеток, связывалась с бактериями в образце, вследствие чего происходило усиление флуоресценции. Чувствительность метода составила около 30 клеток на 1 мл исследуемого образца.

Интересным свойством аптамеров является возможность их селекции на связывание с многими видами малых молекул, на которые практически невозможно получить антитела [27]. Бактерии синтезируют различные малые молекулы, не встречающиеся в других организмах и являющиеся факторами вирулентности, такие как кворум-факторы [24], сидерофоры [31], цикло-ди-ГМФ [40] и др. Аптамеры, связывающие такие молекулы, являются весьма перспективными агентами для селективной детекции присутствия бактерий и продукции ими факторов вирулентности и различных молекулярных сигналов.

#### Аптамерный ПЦР и перспективы повышения чувствительности детекции биомолекул

Методы детекции целых бактериальных клеток на основе аптамеров в ряде случаев достигли очень высокого уровня чувствительности, позволяя определять 1–100 клеток/мл в клинических образцах и разнообразных сложных природных смесях. В то же время чувствительность методов детекции индивидуальных биомолекул ограничивается методами генерации сигнала, которые в случае традиционных методов флуоресцентной, хемилюминесцентной или ферментативной детекции в растворе или на твердой фазе находятся на уровне от нескольких нанограммов до сотен пикограммов на 1 мл исследуемых образцов. Между тем, как упоминалось ранее, концентрация в крови больных некоторых токсинов, например сибиреязвенного, при которой смертельный исход может наступить несмотря на интенсивную антибиотикотерапию, составляет 1–5 пг/мл [21, 45].

Один из наиболее перспективных путей для создания методов детекции низких концентраций токсинов и других биомолекул, характерных для ранней стадии инфекции, связан с использованием аптамеров в качестве заменителей антител в иммуно-ПЦР (иПЦР). Классический метод иПЦР является одним из самых чувствительных методов детекции биомолекул, он позволяет определять субфемтограммовые количества веществ, в том числе патогенов и токсинов [13, 17, 18, 28, 34, 55]. Принцип иПЦР совпадает с принципом ИФА: точно так же, как и в ИФА, антиген распознается антителом, после чего сигнал амплифицируется за счет активности фермента. Если в ИФА фермент конъюгирован с первичным или вторичным антителом, то в иПЦР с антителом конъюгирован фрагмент ДНК (длиной, как правило, 80–300 нт), который амплифицируется термостабильной ДНК-полимеразой.

Высокая эффективность ПЦР обеспечивает чувствительность иПЦР на 2–4 порядка выше чувствительности классического ИФА. Вместе с тем технологические проблемы иПЦР до сих пор затрудняют разработку систем клинической диагностики на основе этой технологии. В частности, приготовление ковалентных или нековалентных (на основе авидин-биотины [34]) конъюгатов антитело–ДНК является технически сложной процедурой, некоторые конъюгаты инициируют неспецифическое связывание и амплификацию ДНК, большой размер антител и конъюгатов

уменьшает концентрацию этих молекул на твердой фазе, снижая чувствительность. Применительно к иПЦР, аптамеры объединяют в себе свойства и антител, и репортерной ДНК. Фактически при наличии аптамера, специфичного к данной мишени, антитела, процедуры конъюгации, а также часть процедур при проведении теста становятся не нужны, что ведет к значительному упрощению методики детекции, сокращению времени анализа и снижению уровня фона.

Использование аптамеров для проведения тестов, аналогичных иПЦР (аптамерный иПЦР, аПЦР), продемонстрировало высокую эффективность и чувствительность этого метода детекции [37, 53]. В последней работе два аптамера, связывающих различные эпитопы мишени, полностью заменили собой и антитела, используемые в сэндвич-ИФА, и ДНК, конъюгируемую с антителами в иПЦР. Чувствительность детекции была увеличена в 20 000 раз по сравнению с ИФА. Чувствительность аПЦР для детекции *E. coli* составила 10 бактерий/мл, обеспечив динамический диапазон детекции от 10 до 10 млн бактерий [25]. В этой работе для аффинной очистки бактерий из образца было использовано моноклональное антитело. Использование аптамеров в сэндвич-методах детекции как в качестве детектирующего агента в аПЦР, так и для аффинной селекции мишеней (биомолекул или целых клеток) позволит дополнительно упростить технологию детекции, снизить фон и удешевить методику в целом.

#### **Аптамеры и перспективы биосенсорной детекции патогенов и токсинов**

Биосенсоры разрабатываются как портативные автоматизированные устройства, обеспечивающие детекцию биомишеней в окружающей среде и минимизирующие действия оператора по приготовлению проб и постановке реакции. В ряде случаев (например, детекция патогена в воздухе или воде) биосенсор рассматривается как полностью автономное устройство, сигнализирующее о появлении патогена или токсина. Разработка биосенсоров нацелена на создание устройств, которые могут применяться в полевых или близких к ним условиях.

Искусственно синтезируемые (зачастую вместе с функциональными группами, обеспечивающими иммобилизацию и детекцию) аптамеры являются намного более удобными и эффективными молекулами с точки зрения создания сенсора и однородности его физико-химических свойств, чем антитела и другие биосинтетические продукты [47]. И хотя в настоящее время аптасенсоры являются исключительно лабораторными разработками, в перспективе на их основе могут быть созданы устройства, обеспечивающие детекцию малых и сверхмалых количеств мишени [41].

Чувствительность аптасенсоров на основе карбоновых нанотрубок и потенциометрической детекции может быть весьма высокой (1 бактерия на 5 мл) [54]. При детекции клеток *E. coli* с применением аналогичного аптасенсора была зарегистрирована высокая селективность метода по отношению к близкородственной *Salmonella typhimurium*, однако чувствительность была ниже на 2–3 порядка по сравнению с предыдущим исследованием [43]. Очевидно, что чувствительность аптасенсоров зависит от целого ряда факторов,

например, от константы связывания аптамера с мишенью, способа его иммобилизации, совершенства технологии регистрации сигнала и пр., которые не всегда поддаются эффективной расшифровке [54]. В настоящее время достаточно сложно предсказать, эти или другие форматы аптасенсоров – электрохимический для ботулинического токсина, чувствительность которого была повышена до 40 пг/мл благодаря разработанной системе оптимизации детекции [51], или волоконно-оптический для *Listeria monocytogenes* [35] или какие-то новые технологии, например активно исследуемые в последние годы высокочувствительные сенсоры на основе нанопор [15], получают преимущественное развитие в области диагностики. Тем не менее очевидно, что применение аптасенсоров для детекции патогенов имеет значительный потенциал, который будет реализован полностью с развитием технологий создания самих сенсорных систем. Описанные выше преимущества синтетических аптамеров над биомолекулами будут играть не последнюю роль в создании коммерческих образцов диагностических биосенсоров.

#### **Заключение**

Использование аптамеров является перспективным для создания систем диагностики бактериальных патогенов, мониторинга патогенеза и терапии инфекций, изучения бактерий в окружающей среде, в том числе в пище и источниках питьевой воды. Аптамеры фактически являются искусственными аналогами антител и при этом обладают рядом важных преимуществ по сравнению с ними. Несмотря на относительно недавнее начало исследования аптамеров в качестве потенциальных средств диагностики инфекционных заболеваний и анализа бактериальной контаминации окружающей среды, в настоящее время сложилась достаточно четкая картина развития аптамерных технологий в приложении к клинической микробиологии. Не исключено, что в самой ближайшей перспективе в клинике появятся системы детекции живых клеток микроорганизмов на основе аптамеров. Для внедрения в клинику аптамерных технологий высокочувствительной диагностики токсинов и факторов вирулентности с помощью аптамеров потребуется больше времени, хотя использование аптамеров вместо антител, например в иПЦР, способно революционизировать этот высокочувствительный метод и способствовать его быстрому внедрению в клиническую практику. Создание аптамерных биосенсоров, пригодных для использования в клинической практике, скорее всего, произойдет в более отдаленной перспективе, однако потенциал этой технологии очень высок ввиду автономности и портативности сенсорных устройств. В целом свойства аптамеров, рассмотренные в данном обзоре, делают их важнейшим компонентом диагностических систем ближайшего будущего.

*Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 16.512.11.2109, заключенного в Минобрнауки России в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического процесса России на 2007–2013 годы».*

Работа выполнялась в лаборатории молекулярной биологии Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Московская область, пос. Оболensk.

#### Сведения об авторах:

Колесников Александр Владимирович – канд. биол. наук, зав. лаб. иммунопротеомики микроорганизмов ООО «Институт инженерной иммунологии», вед. науч. сотр. ФБУН ГНЦ ПМБ, e-mail: pfu2000@mail.ru

Козырь А. В. – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФБУН ГНЦ ПМБ, e-mail: fenyu\_gys@mail.ru

Шемякин И. Г. – д-р биол. наук, проф., зам. директора по научным вопросам, зав. лаб. молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ, e-mail: shemyakin@obolensk.org

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Юцук Н. Д., Бродов Л. Е. // Лечащий врач. – 1999. – № 7. – С. 40.
2. Bruno J. G., Kiel J. L. // Biosens. Bioelectron. – 1999. – Vol. 14, N 5. – P. 457–464.
3. Bruno J. G., Kiel J. L. // Biotechniques. – 2002. – Vol. 32, N 1. – P. 178–180; 182–183.
4. Bruno J. G., Phillips T., Carrillo M. P., Crowell R. // J. Fluoresc. – 2009. – Vol. 19, N 3. – P. 427–435.
5. Bruno J. G., Carrillo M. P., Phillips T., Andrews C. J. // J. Fluoresc. – 2010. – Vol. 20, N 6. – P. 1211–1223.
6. Cao X., Li S., Chen L. et al. // Nucl. Acids Res. – 2009. – Vol. 37, N 14. – P. 4621–4628.
7. Chen F., Zhou J., Luo F. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2007. – Vol. 357, N 3. – P. 743–748.
8. Choi J. S., Kim S. G., Lahousse M. et al. // J. Biomol. Screen. – 2011. – Vol. 16, N 2. – P. 266–271.
9. Dwarakanath S., Bruno J. G., Shastry A. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – Vol. 325, N 3. – P. 739–743.
10. Dwivedi H. P., Smiley R. D., Jaykus L. A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 87, N 6. – P. 2323–2334.
11. Ellington A. D., Szostak J. W. // Nature. – 1990. – Vol. 346. – P. 818–822.
12. Ellington A. D., Conrad R. // Biotechnol. Annu. Rev. – 1995. – Vol. 1. – P. 185–214.
13. Fischer A. A., von Eiff C., Kuczius T. et al. // J. Mol. Med. – 2007. – Vol. 85, N 5. – P. 461–469.
14. Gopinath S. C. // Anal. Bioanal. Chem. – 2007. – Vol. 387, N 1. – P. 171–182.
15. Gu L. Q., Ding S., Gao C. // Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. – 2009. – Vol. 2009. – P. 6699–6702.
16. Hamula C. L., Le X. C., Li X. F. // Anal. Chem. – 2011. – Vol. 83, N 10. – P. 3640–3647.
17. He X., McMahon S., Henderson T. D. et al. // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, N 9. – P. 12858.
18. He X., McMahon S., McKeon T. A., Brandon D. L. // J. Food Prot. – 2010. – Vol. 73, N 4. – P. 695–700.
19. Ikanovic M., Rudzinski W. E., Bruno J. G. et al. // J. Fluoresc. – 2007. – Vol. 17, N 2. – P. 193–199.
20. Jayasena S. D. // Clin. Chem. – 1999. – Vol. 45, N 9. – P. 1628–1650.
21. Jernigan D. B., Raghunathan P. L., Bell B. P. et al. // Emerg. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 8. – P. 1019–1028.
22. Joshi R., Janagama H., Dwivedi H. P. et al. // Mol. Cell. Probes. – 2009. – Vol. 23, N 1. – P. 20–28.
23. Jyoti A., Vajpayee P., Singh G. et al. // Environ. Sci. Technol. – 2011. – Vol. 45, N 20. – P. 8996–9002.
24. Kalia V. C., Purohit H. J. // Crit. Rev. Microbiol. – 2011. – Vol. 37, N 2. – P. 121–140.
25. Lee H. J., Kim B. C., Kim K. W. et al. // Biosens. Bioelectron. – 2009. – Vol. 24, N 12. – P. 3550–3555.
26. Lin A., Sultan O., Lau H. K. et al. // Food Microbiol. – 2011. – Vol. 28, N 3. – P. 478–483.
27. Liu X., Li W., Xu X. et al. // Meth. Mol. Biol. – 2012. – Vol. 800. – P. 119–132.
28. Malou N., Raoult D. // Trends Microbiol. – 2011. – Vol. 19. – P. 295–302.
29. Matsuda A. // Yakugaku Zasshi. – 2011. – Vol. 131, N 2. – P. 285–298.
30. Mellmann A., Harmsen D., Cummings C. A. et al. // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, N 7. – P. e22751.
31. Miethke M., Marahiel M. A. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2007. – Vol. 71, N 3. – P. 413–451.
32. Morens D. M., Folkers G. K., Fauci A. S. // Nature. – 2004. – Vol. 430, N 6996. – P. 242–249.
33. Morse D. P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2007. – Vol. 359, N 1. – P. 94–101.
34. Niemeyer C. M., Adler M., Wacker R. // Trends Biotechnol. – 2005. – Vol. 23, N 4. – P. 208–216.
35. Onk S. H., Koo O. K., Sen T. J. // Appl. Microbiol. – 2010. – Vol. 109, N 3. – P. 808–817.
36. Pan Q., Zhang X. L., Wu H. Y. et al. // Antimicrob. Chemother. – 2005. – Vol. 49, N 10. – P. 4052–4060.
37. Pinto A., Bermudo Redondo M. C., Pzalp V. C., O'Sullivan C. K. // Mol. Biosyst. – 2009. – Vol. 5, N 5. – P. 548–553.
38. Qin L., Zheng R., Ma Z. et al. // Clin. Chem. Lab. Med. – 2009. – Vol. 47, N 4. – P. 405–411.
39. Rajendran M., Ellington A. D. // Anal. Bioanal. Chem. – 2008. – Vol. 390, N 4. – P. 1067–1075.
40. Römling U., Simm R. // Contrib. Microbiol. – 2009. – Vol. 16. – P. 161–181.
41. Sefah K., Phillips J. A., Xiong X. et al. // Analyst. – 2009. – Vol. 134, N 9. – P. 1765–1775.
42. Shamah S. M., Healy J. M., Cload S. T. // Acc. Chem. Res. – 2008. – Vol. 41, N 1. – P. 130–138.
43. So H. M., Park D. W., Jeon E. K. et al. // Small. – 2008. – Vol. 4, N 2. – P. 197–201.
44. Stoltenburg R., Reinemann C., Strehlitz B. // Biomol. Eng. – 2007. – Vol. 24, N 4. – P. 381–403.
45. Tang S., Moayeri M., Chen Z. et al. // Clin. Vaccine Immunol. – 2009. – Vol. 16. – P. 408–413.
46. Tok J. B., Fischer N. O. // Chem. Commun. (Camb.). – 2008. – Vol. 16. – P. 1883–1885.
47. Torres-Chavolla E., Alocilja E. C. // Biosens. Bioelectron. – 2009. – Vol. 24, N 11. – P. 3175–3182.
48. Tuerk C., Gold L. // Science. – 1990. – Vol. 249, N 4968. – P. 505–510.
49. Vivekananda J., Kiel J. L. // Lab. Invest. – 2006. – Vol. 86, N 6. – P. 610–618.
50. Wang K. Y., Zeng Y. L., Yang X. Y. et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 30, N 2. – P. 273–278.
51. Wei F., Bai B., Ho C. M. // Biosens. Bioelectron. – 2011. – [электронная публикация, PMID: 21993141].
52. Yang H., Qu L., Wimbrow A. N. et al. // Int. J. Food Microbiol. – 2007. – Vol. 118, N 2. – P. 132–138.
53. Yoshida Y., Horii K., Sakai N. et al. // Anal. Bioanal. Chem. – 2009. – Vol. 395, N 4. – P. 1089–1096.
54. Zelada-Guill@en G. A., Riu J., Düzgün A., Rius F. X. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2009. – Vol. 48, N 40. – P. 7334–7337.
55. Zhang W., Bielaszewska M., Pulz M. et al. // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46, N 4. – P. 1292–1297.

Поступила 21.10.11

#### PROSPECTS FOR APPLICATION OF APTAMERS IN DIAGNOSTICS OF BACTERIAL INFECTIONS

A. V. Kolesnikov, A. V. Kozyr, and I. G. Shemyakin

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Moscow Region, Obolensk, Russia

Nucleic acid-based aptamers are widely accepted as promising tools for development of a plethora of diagnostic and therapeutic preparations, as well as means of environmental monitoring. Aptamers can be regarded as fully synthetic analogs of antibodies. At the same time, certain properties of aptamers render them superior to antibodies in terms of development of new diagnostic and monitoring systems that combine high sensitivity and specificity with high reproducibility and inexpensive manufacturing. In particular, the aptamers tailored to bind biomolecules and live cells can be employed in solving the problem of combining short analysis time with high sensitivity and specificity in detection of pathogenic bacteria. The present review summarizes the current state of the techniques developed for aptamer-based detection of bacteria and their components and discusses the potential of their practical application.

Key words: aptamers, combinatory library, biosensors, immune enzyme analysis, immuno-PCR, diagnosticums, pathogens, toxins