**Поляризационный флуоресцентный аптамерный анализ афлатоксина В1**

***Миронова А.А.1,2***

*Студентка,4 курса бакалавриата*

*1Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН,*

*2Российский химико-технологический университет им. Д И. Менделеева*

*Е-mail: mironova.alena2002@yandex.ru*

Индуцированное плоскополяризованным светом излучение флуорофора в растворе характеризуется разной степенью поляризации в зависимости от размеров и гидродинамической подвижности содержащих флуорофор комплексов. Сочетание этого эффекта и взаимодействия аналит - рецептор позволяет быстро и просто выявлять наличие аналита в тестируемой пробе и оценивать его содержание. Поляризационный флуоресцентный анализ (ПФА) успешно применяется для контроля разнообразных низкомолекулярных соединений, взаимодействующих со специфическими антителами. В последние годы активно развиваются аналитические методы с использованием олигонуклеотидных рецепторов – аптамеров, достоинства которых включают простоту получения и модификации, низкую стоимость, способность к ренатурации. Однако замена в ПФА антител на аптамеры затруднена тем, что из-за существенно меньшей молекулярной массы последних (10-20 кДа по сравнению со 150 кДа у антител), изменение степени деполяризации при включении флуорофора в аналит-рецепторный комплекс менее выражено и поэтому не столь эффективно для оценки содержания аналита. В представляемой работе проведена разработка аптамерного ПФА афлатоксина В1 (АФВ1) – распространенного токсичного контаминанта пищевых продуктов грибного происхождения – и изучены подходы для снижения предела обнаружения данного ПФА.

Реализуемая схема ПФА состоит в конкурентном связывании с аптамером нативных (потенциально содержащихся в тестируемой пробе) и меченных флуоресцеином молекул АФВ1. Свечение индуцируется плоскополяризованным светом с λex= 490нм и регистрируется при λem = 520нм. Сопоставлены концентрационные зависимости взаимодействий с АФВ1 восьми вариантов аптамера, отличающихся длинной дуплекса; рассчитаны константы связывания АФВ1 – аптамер. Молекула с последовательностью 3´–GTTGGGCACGTGTTGTCTCTCTGTGTCTCGTGCCCAAC–5´ характеризовалась наибольшей аффинностью к АФВ1 – 82±10 нМ – и была выбрана для реализации аналитической системы. Рассмотрены возможности применения молекулярных «якорей» для снижения предела обнаружения аптамерного ПФА, то есть включения аптамеров в комплексы с высокомолекулярными носителями, увеличивающего разницу поляризации флуоресценции для свободного и связанного флуорофора. Однако для АФВ1, в отличие от других аналитов, использование таких якорей, как стрептавидин, связывающих 5´-конец аптамера, не привело к улучшению аналитических характеристик. Сравнение взаимодействий при разном составе реакционной среды показало необходимость присутствия ионов двухвалентных металлов, в частности, ионов магния или кальция. Варьирование рН в диапазоне от 7 до 9 не оказывало существенного влияния на комплексообразование АФВ1 с аптамером. Установленный оптимальный состав реакционной среды – 20мМ Трис-ацетат, 100мМ Na-ацетат, 20мМ MgCl2. ПФА характеризуется пределом обнаружения 28.7±4.3 нМ и рабочим диапазоном количественных измерений от 28.7 до 154.6 нМ. Продолжительность тестирования – 15 мин. Использование ПФА для тестирования проб вина и экстрактов миндаля и кукурузы показало эффективность разработки; минимальные выявляемые уровни контаминации – 8.9±0.4, 10.2±0.6, 4.4±0.6 мкг/кг, соответственно, что удовлетворяет практическим требованиям.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 23-74-01080).*