**Определение тромбина в смеси с альбумином методом интерферометрии биослоёв**

***Сулима А.О. 1, Моисеенко В.Л. 1,2,3, Мухаметова Л.И. 1***

*Студент, 2 курс специалитета*

*1 Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В.  Ломоносова, Москва, Россия*

*2 Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия*

*3 Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии
имени академика Н.Н. Бурденко, Москва, Россия*

*E-mail:* *anniesulima@yandex.ru*

Аптамеры - небольшие одноцепочечные олигонуклеотиды, способные специфически узнавать и с высоким сродством связывать свои мишени. Потенциальное практическое применение аптамеров – детекция молекулярных мишеней *in vivo*. Вследствие этого появляется необходимость оценивать аффинность аптамера к мишени в смесях, приближенных к плазме крови.

Целью работы была оценка изменения аффинности известного аптамера к тромбину 15ТВА в присутствии более высоких концентраций альбумина.

В работе была оценена активность нескольких образцов человеческого тромбина при взаимодействии с хромогенным субстратом S-2238 по изменению поглощения при 405 нм. Образец с наибольшей активностью использовался далее в экспериментах интерферометрии биослоёв (ИБС). На поверхность стрептавидинового биосенсора иммобилизовали биотинилированный 15TBA, в растворе находился тромбин, БСА или смесь белков тромбин-БСА в различных концентрациях.

Для индивидуальных белков – тромбина и БСА – методом интерферометрии биослоёв были определены константы скоростей ассоциации (kon) и диссоциации (koff) и кажущиеся константы диссоциации (кКд) комплексов 15TBA-белок. Для смесей тромбин-БСА в концентрационных соотношениях 1:1, 1:10, 1:100 и 1:1000 получены и проанализированы сенсограммы, характеризующие взаимодействие аптамера 15TBA с тромбином в присутствии альбумина.

Полученные численные значения равновесных кКд не являются единственным критерием для оценки аффинности аптамеров, поскольку на взаимодействие также влияет удельная активность белка. [2] Взаимодействие аптамера с мишенью в присутствии альбумина отличается от взаимодействия без него. Возможно, вклад в наблюдаемое различие вносит стабилизация тромбина в растворе в присутствии альбумина, что приводит к более эффективному взаимодействию 15ТВА-тромбин. Уже при концентрации БСА в смеси, в 10 раз превышающей концентрацию тромбина, наблюдается увеличение амплитуды и скорости изменения сигнала. Неспецифическое взаимодействие 15ТВА-БСА вносит значимый вклад в сигнал взаимодействия аптамера с тромбином при 100-1000-кратном избытке альбумина. В случае с белковыми смесями важно учитывать амплитуду и скорость изменения кинетических кривых ассоциации и диссоциации для определения соотношения белков, при котором наблюдается специфичное взаимодействие аптамер-мишень.

*Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2024-561 от 24.04.2024 г.)*

**Литература**

1. Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A. at el. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin // Nature. 1992. Vol. 355. P. 564-566.

2. Moiseenko V.L., Antipova O.M., Rybina A.A., et al. Post-Selection Design of Aptamers: Comparative Study of Affinity of the DNA Aptamers to Recombinant Extracellular Domain of Human Epidermal Growth Factor Receptors // Biochemistry (Mosc). 2024. Vol. 89. P. 2183-2193.