

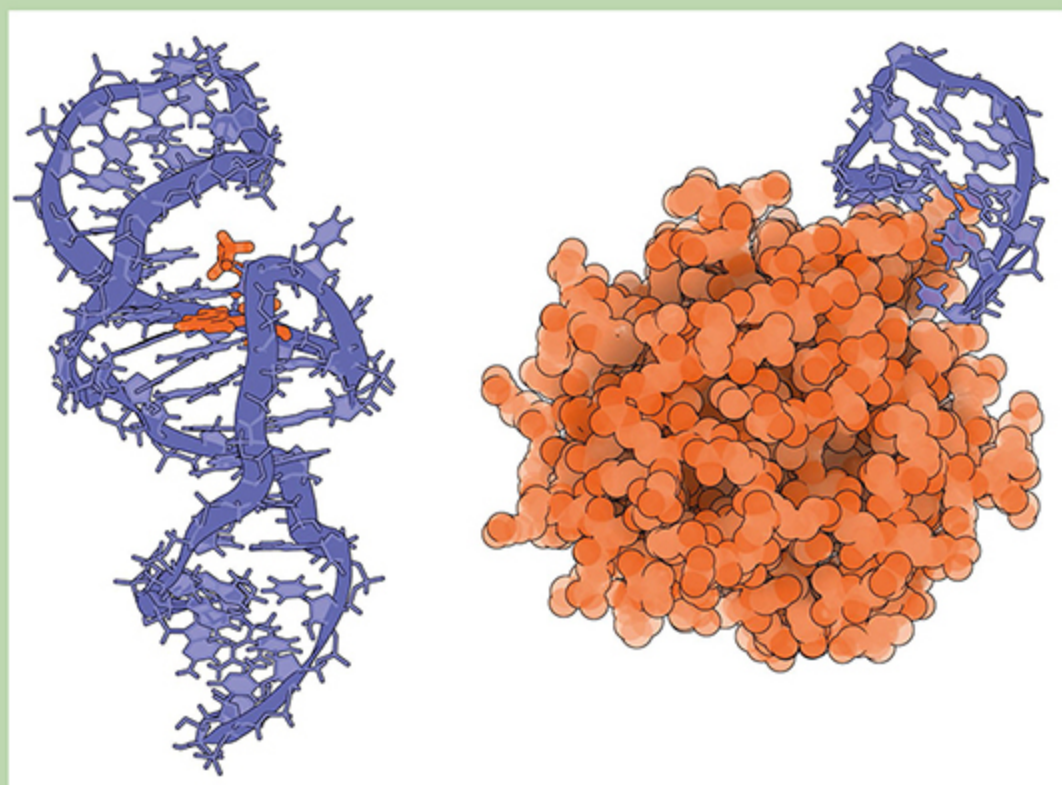


ISSN 1727-1320 (Print),
ISSN 2308-6459 (Online)

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2022 TOM 105 ВЫПУСК 1
 VOLUME ISSUE



Санкт-Петербург
St. Petersburg, Russia

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ АПТАМЕРОВ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ И РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

А.А. Коваленко^{1,2}, В.В. Шаройко³, И.А. Казарцев^{1*}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

²Научно-образовательный центр инфохимии, Университет ИТМО, Санкт-Петербург,

³Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

* ответственный за переписку, e-mail: kazartsev@inbox.ru

В современном сельском хозяйстве существует запрос на поиск альтернативных способов повышения урожайности, на усовершенствование методов детектирования химических загрязнений, улучшение качества фитосанитарной диагностики и эффективности средств защиты растений. Интересные решения в данных областях могут быть получены с использованием технологии аптамеров. Аптамеры – олигонуклеотидные и пептидные молекулы, способные к молекулярному распознаванию как небольших неорганических и органических молекул, так и белков. Получение аптамеров, специфичных в отношении целевой мишени, осуществляется *in vitro* с использованием технологии SELEX. Связывание аптамеров с мишенью происходит по принципу взаимодействия пары антиген-антитело. Благодаря этому свойству аптамеры нашли применение в разработке биологических агентов направленного действия, «умных» материалов и биоаналитических сенсоров нового поколения. Настоящий обзор представляет собой краткий анализ успехов и перспектив применения технологии аптамеров для решения задач аналитического мониторинга и фитосанитарного контроля. В частности, рассмотрены некоторые подходы к созданию тест-систем и сенсоров на основе аптамеров для определения разных групп веществ в природных объектах, а также перечислены созданные коммерческие продукты. Приведены примеры использования аптамеров в качестве «умных» удобрений, инновационных пестицидов и для создания растений, устойчивых к вирусным заболеваниям.

Ключевые слова: аптамеры, олигонуклеотиды, пептиды, защита растений, биосенсоры, наноудобрения, пестициды

Поступила в редакцию: 24.12.2021

Принята к печати: 28.02.2022

Введение

В настоящее время стало очевидно, что традиционные сельскохозяйственные технологии способны нанести существенный вред окружающей среде или попросту не приносят ожидаемого результата. Так, например, отмечается низкая эффективность усвоения минеральных удобрений растениями, и сопутствующее загрязнение окружающей среды (Aziz et al., 2019). Активное и повсеместное внесение пестицидов также оказывает многостороннее негативное влияние на здоровье человека и состояние экосистем. К тому же в популяциях вредных видов на различных сельскохозяйственных культурах наблюдается глобальное развитие резистентности к применяемым пестицидам (Whalon et al., 2008 ; Rani et al., 2021). В связи с этим существует запрос на обновление технологий в сфере производства и применения удобрений и пестицидов. Загрязнение окружающей среды ксенобиотиками, природными токсинами, патогенными микроорганизмами и т.д. обуславливает необходимость в широкомасштабном и экономически эффективном мониторинге качества сельскохозяйственной продукции и экологического состояния природных объектов (FAO, 2020). Потребность в решении этих задач служит движущей силой для развития биотехнологий и инноваций в сельском хозяйстве. В частности, большие надежды в этих областях возлагаются на использование технологии аптамеров (Yadav et al., 2019).

Термин аптамеры (от лат. «aptus», подходящий, и «meros», часть) объединяет две группы искусственных (синтетических) молекул (олигонуклеотиды и пептиды), важное свойство которых – способность к прочному и специфичному связыванию молекул-мишеней. Отметим, что термин «аптамер» чаще относится именно к молекулам олигонуклеотидов. Аптамеры на основе нуклеиновых кислот (НК-аптамеры) – это одноцепочечные молекулы ДНК и РНК длиной несколько десятков оснований (редко более 100 оснований). НК-аптамеры часто называют олигонуклеотидными аналогами антител. Название этому классу молекул было дано в 1990 г. Ellington и Szostak в работе, описывающей получение коротких РНК, способных специфично связываться с некоторыми органическими красителями (Ellington, Szostak, 1990). В дальнейшем была многократно продемонстрирована возможность *in vitro* отбора олигонуклеотидов, специфичных к веществам разнообразной природы. При этом в качестве мишени могут служить соединения разной природы (Dunn, 2014).

Принцип связывания НК-аптамеров с мишенью подобен взаимодействию пары антиген-антитело, фермент-субстрат или гормон-рецептор – это обратимое конформационно-зависимое нековалентное многоточечное взаимодействие по типу «рука-перчатка» (Patel, Suri, 2000; Dunn, 2014) (рис. 1). Связывание аптамера с целевой

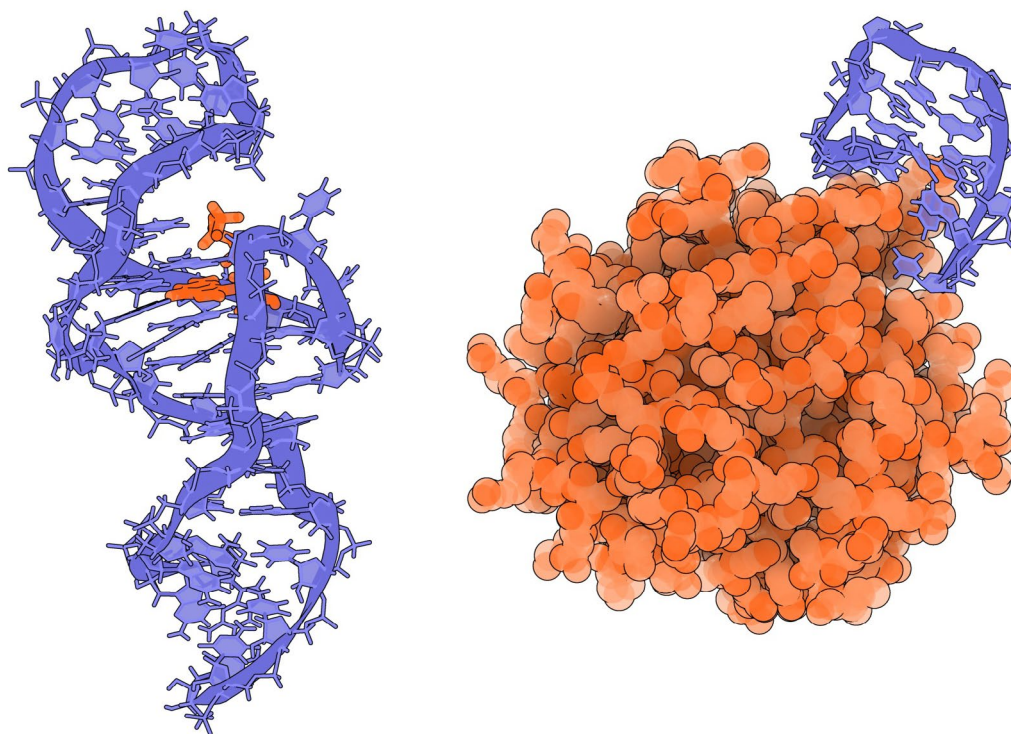


Рисунок 1. Слева связывание РНК-аптамера (фиолетовый) с ГТФ (оранжевый) PDB 2AU4. Справа связывание человеческого альфа-тромбина (оранжевый) с ДНК-аптамером (фиолетовый) PDB 4DIH. Визуализировано в Protein Imager [ориг.]

Figure 1. Left: binding of RNA aptamer (purple) to GTP (orange) PDB 2AU4. Right: binding of human alpha thrombin (orange) to DNA aptamer (purple) PDB 4DIH. Visualized with Protein Imager [orig.]

молекулой происходит за счет стерического соответствия мишени сайту связывания, которое сопровождается образованием множественных нековалентных взаимодействий различной химической природы. Мерой аффинности (прочности) связывания аптамера с мишенью выступает константа диссоциации комплекса аптамер-мишень (K_d), значение которой обычно варьирует в пределах 10^{-11} – 10^{-7} М (Dunn, 2014). Аналогичный диапазон K_d характерен и для антител. Природа специфичности аптамеров также кроется в их трехмерной структуре, обеспечивающей уникальное расположение функциональных групп олигонуклеотида, взаимодействующих с мишенью. Даже небольшие изменения в структуре мишени могут повлиять на аффинность связывания. В качестве примера можно привести аптамер к теofilлину, который обладает в 10 000 раз более высоким сродством к нему, чем к кофеину, при разнице структур в 1 метильную группу (Jenison et al., 1994). Аптамеры чувствительны и к оптической изомерии. Так, РНК-аптамер к L-аргинуину обладает в 12000 раз более высокой аффинностью к L-изомеру, чем к D-изомеру (Geiger et al., 1996). За более подробным описанием взаимодействия аптамеров с мишенями можно обратиться к обзорам Patel and Suri (2000), а также Dunn (2014).

Отбор аптамеров к целевой молекуле проводят *in vitro* с использованием технологии SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения). В процессе отбора исходная библиотека рандомизированных олигонуклеотидов обогащается последовательностями (аптамерами), специфичными к целевой мишени. Процедура состоит из последовательных раундов. В

каждом раунде: (i) проводится инкубация библиотеки олигонуклеотидов с мишенью и отделение связавшихся с ней последовательностей; (ii) последовательности, аффинные к мишени, амплифицируются при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР); (iii) из ПЦР продуктов выделяют одноцепочечные олигонуклеотиды (обогащенную аптамерами библиотеку), которые вводят в следующий раунд отбора (рис. 2). После серии раундов полученные аптамеры секвенируют, отбирают последовательности потенциально аффинных аптамеров, затем их синтезируют и изучают индивидуальное связывание с мишенью (Komarova, Kuznetsov, 2019).

В литературе описано множество вариантов SELEX, различающихся по методам фракционирования библиотеки, мониторинга аффинности аптамеров и т.д. Возможные модификации метода позволяют работать с мишенями разнообразной природы: неорганические ионы, малые органические молекулы, пептиды и белки, полисахариды, вирусные частицы, клетки и одноклеточные организмы, даже целые ткани (Darmostuk et al., 2014). Технология SELEX продолжает развиваться в сторону более простых, быстрых и автоматизированных процедур отбора. Накопление экспериментального опыта, применение технологий NGS (next generation sequencing, секвенирование нового поколения) и математического моделирования позволяет все лучше понимать процесс SELEX и приближает отбор аптамеров к рутинному биотехнологическому методу. Актуальные достижения, тенденции и принципы SELEX рассмотрены в ряде обзоров (Darmostuk et al., 2014; Komarova, Kuznetsov, 2019). SELEX объединяет много разных подходов, поэтому научные коллективы,

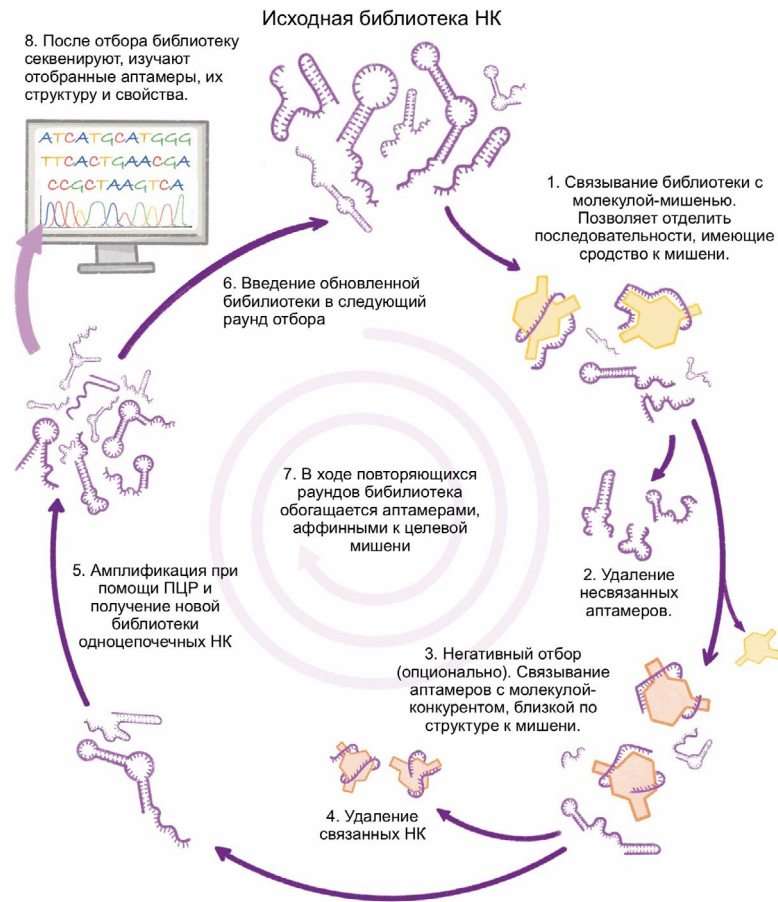


Рисунок 2. Каноническая схема этапов SELEX [ориг.]

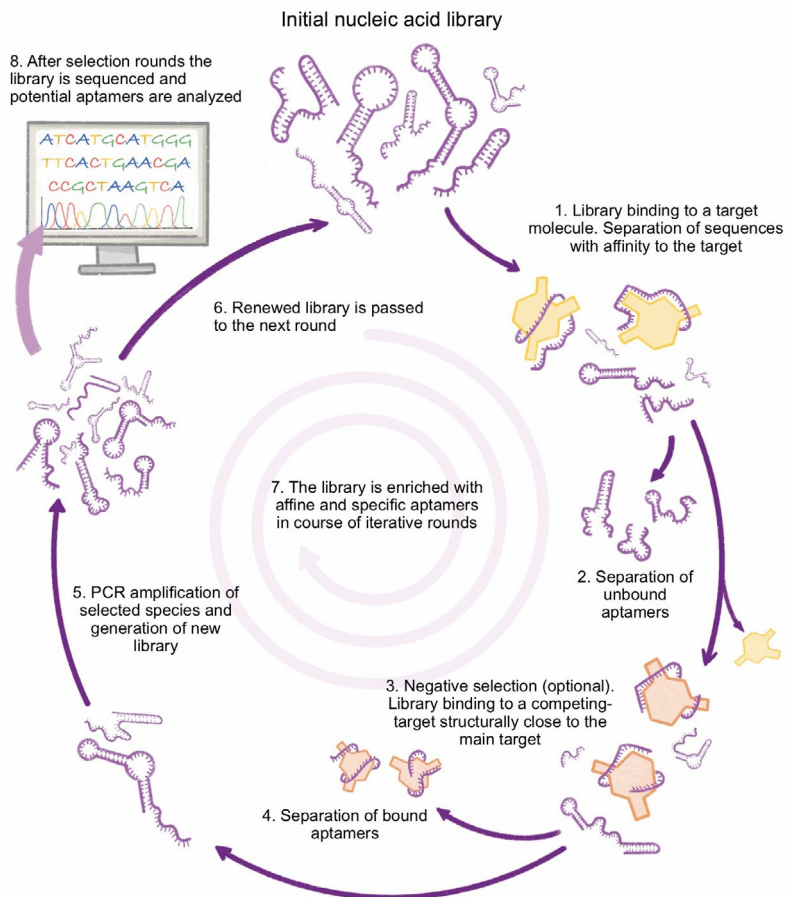


Figure 2. Canonical scheme of SELEX stages [orig.]

желающие адаптировать эту технологию для своей работы, могут выбрать методику, наилучшим образом отвечающую поставленным целям и сопоставимую с их техническими возможностями. Работа с НК-аптамерами может обходиться и без SELEX. Исследователи могут использовать опубликованные аптамеры для своих проектов, заказав их в компаниях, занимающихся автоматизированным синтезом олигонуклеотидных последовательностей. База данных Apta-Index™, содержащая более 700 аптамеров, представлена на онлайн-портале компании «Aptagen» (Apta-Index™, 2019). К сожалению, эта необновляемая база на сегодняшний день является единственной доступной. При необходимости найти аптамер к интересующей молекуле стоит обратиться к научной литературе.

Аптамеры зарекомендовали себя в качестве серьезного конкурента технологии антител. В сравнении с ними аптамеры имеют ряд преимуществ, а именно: (i) производятся относительно дешевым автоматизированным химическим синтезом; (ii) проявляют минимальную иммуногенность; (iii) обладают большей термической стабильностью и способностью к ренатурации с сохранением свойств; (iv) поддаются гибкой химической модификации и т.д. При этом аптамеры ничуть не уступают антителам в отношении аффинности и специфичности связывания с целевой молекулой (Dunn, 2014). Большое число работ посвящено аптамерам как терапевтическим агентам. Описано создание систем доставки лекарств, средств диагностики, био-визуализации и тераностики на основе аптамеров (Huang et al., 2015). Аптамеры привлекаются в качестве распознающих элементов для дизайна высокочувствительных и специфичных сенсоров (аптасенсоров), позволяющих детектировать целевой аналит в многокомпонентных образцах. Растет количество публикаций, описывающих разнообразные аптасенсоры для определения как низкомолекулярных соединений, так и крупных биомолекул, клеток и микроорганизмов (Huang et al., 2015). Не смотря на преимущественный интерес к технологии аптамеров в сфере медицинских разработок, растет и число работ, актуальных для решения задач в агропромышленном секторе.

Существенный недостаток НК-аптамеров, ограничивающий их эффективность в биологических средах – это стремительная деградация в присутствии нуклеаз. К тому же при эксплуатации аптамеров в условиях, отличных от условий отбора *in vitro*, можно столкнуться со снижением их аффинности. Исследователи решают эти проблемы посредством химической модификации нуклеотидов, конъюгации со стабилизирующими молекулами и т.д. (Dunn, 2014). Гибкость химической модификации позволяет

использовать аптамеры для решения разнообразных задач, к примеру, для введения флуоресцентных меток, мобилизации на полимерных носителях или поверхности электродов в дизайне гибридных материалов (Dunn, 2014). Обзор подходов к модификации аптамеров представлен в работе Odeh с соавт. (2020).

Аптамерами также называют отдельный класс белковых молекул. Белковые аптамеры, пептимеры, представляют собой короткие переменные участки последовательно соединенных аминокислот, как правило, встроенных в белковую матрицу (носитель). Эти участки обеспечивают аффинность к определенной молекулярной мишени. Отбор пептимеров проводят из рандомизированных библиотек как *in vitro*, так и *in vivo*. Наиболее часто задействуют *in vivo* дрожжевую двухгибридную систему, которая позволяет отбирать пептимеры, активные в физиологических условиях. К *in vitro* технологиям отбора относятся фаговый дисплей и мРНК дисплей. Несмотря на подобие пептимеров антителам, от последних они отличаются малым размером, синтетической (искусственной) природой и подходами к разработке. Среди преимуществ пептимеров в сравнении с антителами: высокая стабильность и растворимость, высокий выход при бактериальной экспрессии, возможность химического синтеза, быстрый фолдинг и в некоторых случаях отсутствие дисульфидных связей и свободных остатков цистеина. Более того, пептидные аптамеры имеют K_d сравнимые, а иногда и ниже, чем таковые для антител. Тем не менее процесс получения пептимеров заметно сложнее, чем НК-аптамеров, что объясняет относительно большую популярность последних.

Селективное и прочное связывание аптамеров с мишенью позволяет использовать их как инструмент для инновационных биоаналитических решений, «умных» материалов (материалов, меняющих свои свойства под действием внешних факторов) и биологически активных агентов нового поколения. Настоящий обзор посвящен перспективам применения аптамеров для решения задач, возникающих в агропромышленном комплексе и пищевой безопасности, и обобщает достижения в этой области. Стоит отметить, что подавляющее большинство опубликованных работ посвящено именно биоаналитическому применению аптамеров. Существенно меньшее количество работ исследует аптамеры в качестве пестицидов, компонентов систем контролируемого высвобождения удобрений или для решения иных задач. Ниже приведена систематизация существующих направлений и подходов, иллюстрирующая многофункциональность аптамеров как инструмента для биотехнологических разработок.

Биоаналитические решения на основе аптамеров

Всесторонний мониторинг качества в пищевой и кормовой индустрии – важное направление аналитической и биоаналитической химии. Круг задач в этой области широк: от обнаружения патогенных микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности (белков, низкомолекулярных метаболитов) до контроля качества продукции или мониторинга антропогенных загрязнений (переходных металлов, пестицидов, удобрений, промышленных отходов и т.д.) (Romero-González, 2015). Отчет Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (FAO) от 2020 г. выделяет следующие актуальные проблемы пищевой

безопасности: пищевые патогены и паразиты, цветение воды, тяжелые металлы, пестициды, микотоксины и др. (FAO, 2020).

К традиционным методам химического анализа пищевых продуктов и природных объектов относятся: масс-спектрометрия (МС), ядерный магнитный резонанс (ЯМР), спектрофотометрия, инфракрасная спектроскопия (ИКС) и УФ-спектроскопия, атомная спектроскопия (АС), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газовая хроматография (ГХ), капиллярный электрофорез (КЭ), электрохимический анализ и т.д. Перечисленные

методы имеют широкие возможности, но иногда требуют дорогостоящего оборудования, значительных временных затрат, привлечения квалифицированного персонала для проведения анализа и интерпретации результатов. При работе с биологическими объектами важную роль играют молекулярно-биологические подходы, такие как ПЦР, биохимические и иммунохимические методы. Указанные методы не универсальны и зачастую имеют значительные ограничения (Romero-González, 2015; Rodríguez et al., 2021). В связи с этим ведется поиск новых многопрофильных, экспрессных, портативных и эргономичных сенсорных устройств для анализа сельскохозяйственной продукции и природных объектов.

На развитие экспресс-анализа в свое время повлияло появление технологии антител. Иммунохимические методы позволили разработать наборы для быстрого и простого определения многих веществ: от низкомолекулярных антибиотиков, пестицидов, природных токсинов до патогенных микроорганизмов. При этом технология антител имеет ряд ограничений, связанных с дорогостоящей разработкой и производством белков, специальными условиями хранения, ограниченными возможностями химической модификации и т.д. (Xiao et al., 2021).

Новые решения, альтернативные существующим иммунохимическим методам, могут быть созданы на основе аптамеров, подобрать которые можно практически к любой молекулярной мишени. Это позволяет использовать аптасенсоры для решения широкого круга аналитических задач. Другой подход состоит в дизайне аффинных сорбентов, позволяющих селективно выделять и концентрировать целевой аналит для дальнейшего определения. Подробный обзор аффинных аптасорбентов представлен в работе Pichon с соавт. (2015).

Описан широкий спектр оригинальных подходов по созданию аптасенсоров, но подавляющее большинство из них относится к оптическим или электрохимическим сенсорам. Оптические сенсоры, основаны на принципе детекции аналитического сигнала флуориметрическими и колориметрическими методами и реже – хемиллюминиметрическими или при помощи спектроскопии комбинационного рассеяния. Как правило, в перечисленных подходах аптамер сочетается с оптически активным маркером. Связывание мишени индуцирует конформационное изменение в молекуле аптамера, которое может выражаться в высвобождении красителя, тушении или возникновении флуоресценции, а также иных процессах, детектируемых оптическими приборами. Некоторые варианты оптических сенсоров весьма просты и могут быть воспроизведены во многих лабораториях, располагающих оптическим измерительным прибором. Помимо этого, существуют подходы для визуального определения аналита, к примеру: тест-полоски, индикаторные полоски (Pliuk et al., 2011; Evtugyn, Nianik, 2019; Goud et al., 2020).

В электрохимических сенсорах аптамеры иммобилизуют на поверхности электрода, а регистрация сигнала при связывании аналита производится в режимах потенциометрии, спектроскопии электрохимического импеданса (СЭИ), дифференциальной импульсной вольтамперометрии, циклической вольтамперометрии (ЦВА), квадратно-волновой вольтамперометрии и т. д. Электрохимические сенсоры обладают хорошим потенциалом

миниатюризации и стандартизации, что позволяет проводить разработку доступных коммерческих тестов по типу глюкометра (Pliuk et al., 2011; Evtugyn, Nianik, 2019; Goud et al., 2020). Тем не менее, возможности их лабораторного применения доступны менее широкому кругу научных коллективов в силу необходимости специального оборудования и соответствующих навыков.

Наиболее широкое биоаналитическое применение находят именно НК-аптамеры, в связи с чем ниже будут рассмотрены сенсоры только на их основе. В обзоре приведены примеры дизайна оптических и электрохимических сенсоров, показывающие возможность работы с широким кругом аналитов и разными вариантами их выявления. Схема детекции, рассмотренная на примере конкретного соединения, часто может быть адаптирована и для другого аналита путем замены аптамера и оптимизации условий анализа. Отметим также, что характеристики методик (предел обнаружения и линейный диапазон) приведены в единицах и с точностью, указанными авторами оригинальных работ. Так как цитируемые работы преимущественно описывают результаты применения разработок в лабораторных условиях, то их поточное широкомасштабное внедрение составляет отдельную задачу, которую еще предстоит решить.

Более подробный разбор аптасенсоров и принципов их действия можно найти в ряде обзорных работ (Tombelli et al., 2007; Pliuk et al., 2011). Работа Zhang с соавт. (2020) фокусируется на мультиплексных аптасенсорах для анализа пищевой продукции. Обзор Shan с соавт. (2020) рассматривает применение электрохимических аптасенсоров на основе нанокомпозитов для детектирования токсинов грибов, водорослей и бактериальных энтеротоксинов. Отдельные обзоры также посвящены оптическим сенсорам (Lan et al., 2017) и методам гомогенного анализа пищевой продукции (Xia et al., 2020a).

Аптамеры к микотоксинам

Микотоксины – это низкомолекулярные биологически активные метаболиты филаментных фитопатогенных грибов. В настоящее время идентифицировано около 300–400 микотоксинов, но лишь некоторые из них представляют опасность для здоровья человека и животных. Некоторые наиболее изученные с точки зрения токсикологии вещества: охратоксин А (ОТА), афлатоксины В1 и М1 (АФВ1, АФМ1), зеараленон (ЗЕН), патулин, фумонизины В1 и М1 (ФВ1, ФМ1), а также трихотеценовые микотоксины (Т-2 и НТ-2 токсины, ниваленол и дезоксиниваленол). Среди микотоксинов обнаруживаются мутагенные, канцерогенные, тератогенные, геморрагические, гормональные, гено-, гепато-, иммуно-, дермо-, нефро- и нейротоксические соединения (Bennett, Klich., 2003).

Основные подходы для анализа этих веществ основаны на высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии (МС). Для многих токсинов доступны наборы для иммуноферментного анализа (ИФА) (Tittlemier et al., 2021). Широкое распространение загрязнения микотоксинами пищевой и кормовой продукции делает необходимым развитие подходов для масштабного и экспрессного мониторинга. В силу большой значимости этой группы веществ в пищевой безопасности они оказались в фокусе множества работ по разработке

инновационных биосенсоров. В связи с этим применение аптамеров к микотоксинам заслуживает отдельного рассмотрения. На сегодняшний день описано довольно много аптамеров к микотоксинам, некоторые примеры представлены в таблице 1. Одной из первых разработками таких аптамеров занялась компания «NeoVentures Biotechnology Inc.» (Канада), которая еще в 2008 г. предложила аптамер, специфичный к ОТА. В 2011 г. компанией запатентована методика определения микотоксинов с помощью аптамеров на примере все того же аптамера к ОТА (Allen, Andres, 2010). Кроме того, можно отметить деятельность коллектива «Key Laboratory of Food Science and Technology» (Университет Цзяннань, Китай). При участии специалистов этой лаборатории были разработаны аптамеры к АФВ1 (Ma et al., 2014), ФВ1 и ФМ1 (Chen et al., 2014a), Т-2 токсину (Chen et al., 2014b), ЗЕН (Chen et al., 2013) и патулину (Wu et al., 2016).

Накоплен богатый опыт разработки как оптических, так и электрохимических аптасенсоров для определения микотоксинов в реальных объектах (Evtugyn, Nianik, 2019; Goud et al., 2020). Простейший оптический сенсор основан на флуориметрическом выявлении токсина при помощи немодифицированного аптамера и красителя SYBR Green I (асимметричный краситель класса цианинов), флуоресценция которого проявляется при взаимодействии

с нуклеиновыми кислотами. Связывание аптамера с мишенью приводит к вытеснению связанных молекул красителя и понижению сигнала флуоресценции (рис. 3А). Линейная связь между понижением сигнала флуоресценции и концентрацией микотоксина позволяет задействовать методику для количественного анализа. Подобный подход апробирован для многих веществ, в том числе для ОТА (McKeague et al., 2014). Авторы работы описали измерение концентрации ОТА лишь в градуировочных растворах, установив предел обнаружения (ПО) 9 нМ (3.6 ppb) и линейный диапазон (ЛД) градуировочного графика 9–100 нМ. Чувствительность методики к ократоксину В, гомологу ОТА, в 6–10 раз меньше, чем для целевого токсина. В другом случае, модифицированная версия методики с красителем SYBR Gold позволила количественно определить ОТА в образцах пива и вина (Lv et al., 2017). Отметим, что успешное флуориметрическое определение с SYBR-красителями было уже продемонстрировано и для антибиотиков, в том числе на примере реальных образцов (Yang et al., 2018; Yi et al., 2019).

Наиболее распространенные подходы к созданию оптических сенсоров включают иммобилизацию аптамеров на носителе: полимерной смоле или наночастицах. Например, описана детекция АФВ1 с помощью аптамеров, иммобилизованных на магнитных наночастицах. При

Таблица 1. Аптамеры к наиболее важным микотоксинам

Микотоксин	Константа диссоциации, K_d	Ссылка
Охратоксин А (ОТА)	290 ± 150 нМ и 110 ± 50 нМ	(McKeague et al., 2014)
Охратоксин А (ОТА)	200 нМ	(Cruz-Aguado, Penner, 2008)
Афлатоксин В1 (АФВ1)	11.39 нМ	(Ma et al., 2014)
Афлатоксин В1 (АФВ1)	96–221 нМ (5 аптамеров)	(Malhotra et al., 2014)
Афлатоксин М1 (АФМ1)	35–1515 нМ (36 аптамеров)	(Malhotra et al., 2014)
Афлатоксин В2 (АФВ2)	9.83 нМ	(Ma et al., 2015)
Фумонизин В1 (ФВ1)	100 ± 30 нМ	(McKeague et al., 2010)
Фумонизин В1 (ФВ1)	62±5 нМ	(Chen et al., 2014a)
Лизергамид	44 нМ ²	(Rouah-Martin et al., 2012)
Метерголин	73 нМ и 499 нМ (2 аптамера)	(Rouah-Martin et al., 2012)
Патулин (ПАТ)	21.83±5.022 нМ	(Wu et al., 2016)
Т-2 токсин	20.8 ± 3.1 нМ	(Chen et al., 2014b)
Зеараленон (ЗЕН)	41±5 нМ	(Chen et al., 2013)
Дезоксиниваленол (ДОН)	-	(Wu et al., 2012)

Table 1. Aptamers to most important mycotoxins

Mycotoxin	Dissociation constant, K_d	Reference
Ochratoxin A (OTA)	290 ± 150 nM and 110 ± 50 nM	(McKeague et al., 2014)
Ochratoxin A (OTA)	200 nM	(Cruz-Aguado, Penner, 2008)
Aflatoxin B1 (AFB1)	11.39 nM	(Ma et al., 2014)
Aflatoxin B1 (AFB1)	96–221 nM (5 aptamers)	(Malhotra et al., 2014)
Aflatoxin M1 (AFM1)	35–1515 nM (36 aptamers)	(Malhotra et al., 2014)
Aflatoxin B2 (AFB2)	9.83 nM	(Ma et al., 2015)
Fumonisin B1 (FB1)	100 ± 30 nM	(McKeague et al., 2010)
Fumonisin B1 (FB1)	62±5 nM	(Chen et al., 2014a)
Lysergamide	44 nM ²	(Rouah-Martin et al., 2012)
Metergoline	73 nM and 499 nM (2 aptamers)	(Rouah-Martin et al., 2012)
Patulin (PAT)	21.83±5.022 nM	(Wu et al., 2016)
T-2 toxin	20.8 ± 3.1 nM	(Chen et al., 2014b)
Zearalenone (ZEN)	41±5 nM	(Chen et al., 2013)
Deoxynivalenol (DON)	-	(Wu et al., 2012)

связывании анализита происходит высвобождение комплементарной флуоресцентно-меченой пробы, концентрация которой в растворе измеряется после магнитной сепарации (Ma et al., 2014) (рис. 3В). Для сенсора авторы использовали аптамер к АФВ1 с K_d 11.39 нМ и высокой специфичностью к целевому токсину: аффинность аптамера по отношению к АФВ2 и другим родственным токсинам не превосходила 15% от аффинности к АФВ1. Градуировочный график для сигнала флуоресценции имеет широкий ЛД 50–1.500 нг/л. ПО методики 35 нг/л. Методика была апробирована для определения АФВ1 в образцах арахисового масла с добавками токсина (0–800 нг/л). Во всех вариантах получены достоверные результаты, содержание токсина составляло 94.2–101.2% от расчетного.

Другой распространенный режим детекции в оптических сенсорах – колориметрия. Как правило, колориметрические аптасенсоры используют аналитические реакции, катализируемые ферментами и наночастицами (Majdinasab et al., 2021). К примеру, описано определение ЗЕН в образцах кукурузного масла на основе колориметрической

реакции окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, катализируемой частицами золота (Sun et al., 2018). Десорбция аптамеров с частиц при связывании ЗЕН обеспечивает смену окраски раствора, интенсивность которой пропорциональна концентрации анализита (ЛД 10–250 нг/мл, ПО 10 нг/мл).

Более простой и неоднократно апробированный подход для колориметрического детектирования анализитов основан на агрегации наночастиц Au или Ag в растворах с высокой концентрацией NaCl. Адсорбция аптамеров на частицах стабилизирует их в растворе соли. Связывание аптамеров с токсином приводит к десорбции аптамеров и агрегации частиц со сменой окраски коллоида от красной к синей (для частиц Au), детектируемой фотометрически (Yang et al., 2011; Yin et al., 2017) (рис. 3С). Работа Yin с соавт. (2017) описывает агрегацию наночастиц Au для анализа образцов белого вина с добавками ОТА. ЛД определения ОТА составил 32–1024 нг/мл, а ПО 20 нг/мл. Анализ образца занимает порядка 5 мин. Так, в работе (Kasouji et al., 2020) описан аптасенсор для определения

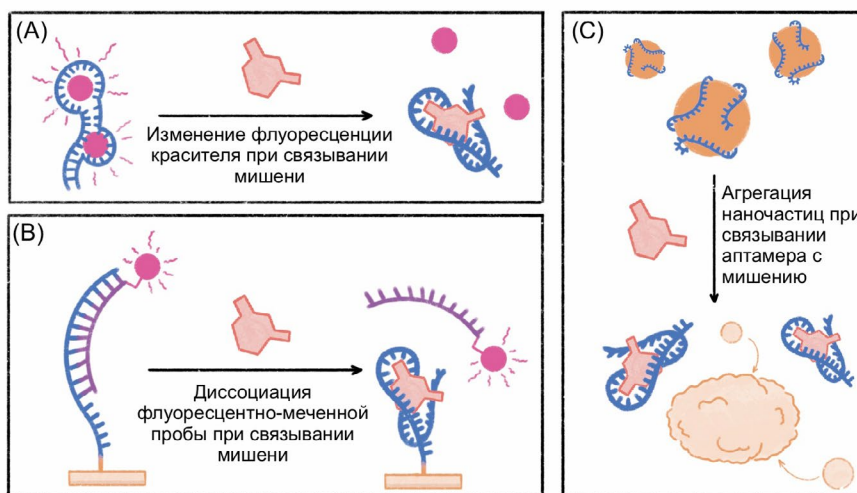


Рисунок 3. Подходы к дизайну оптических аптасенсоров. (А) Связывание аптамера вызывает изменение флуоресценции красителя. (В) Связывание мишени с аптамером вызывает диссоциацию комплементарной флуоресцентно-меченой пробы. (С) Десорбция аптамеров с поверхности наночастиц при связывании мишени вызывает агрегацию, детектируемую фотометрически. [ориг.]

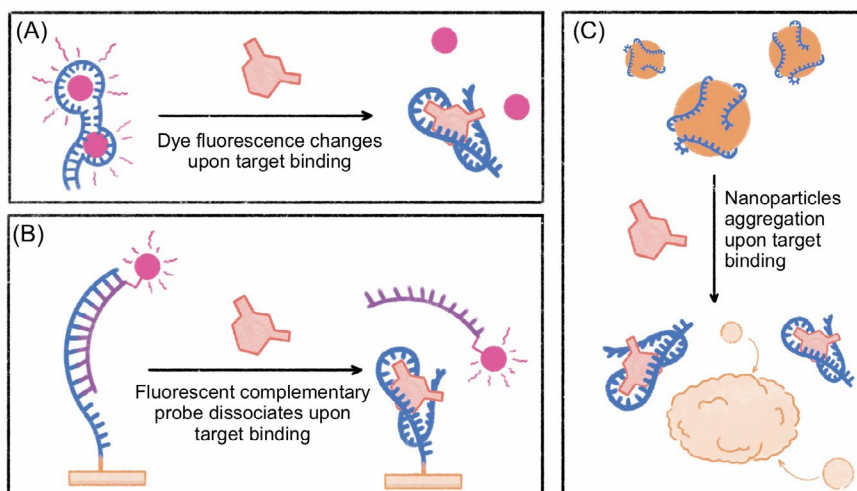


Figure 3. Approaches for the design of optical aptasensors. (A) Aptamer binding induces change in dye binding and fluorescence intensity. (B) Aptamer binding induces dissociation of the complementary fluorescent probe. (C) Desorption of aptamers from the surface of nanoparticles upon target binding leads to aggregation, which is detected photometrically. [orig.]

АФВ1, который работает по принципу индикаторной бумажной полоски и позволяет детектировать токсин в градуировочных растворах в диапазоне от 1 пМ до 1 мМ. Недостаток методик с наночастицами состоит в способности некоторых веществ, в том числе некоторых микотоксинов, адсорбироваться на частицах и препятствовать агрегации, что может привести к заниженным результатам измерений (Majdinasab et al., 2021).

Подходы для создания визуальных тестов не ограничиваются агрегацией наночастиц. Серия работ посвящена

разработке тест-полосок по аналогии с иммунохроматографическим анализом для выявления одного или нескольких токсинов одновременно (Majdinasab et al., 2021). К примеру, предложены тест-полоски для ОТА, позволяющие определять токсин в образцах кукурузы за 20 мин (ЛД 1–1000 нг/мл, ПО 0.40 нг/мл) (Zhang et al., 2018) (рис. 4).

Следует отметить, что разнообразие представленных в цитируемых работах параметров аптасенсоров (ПО и ЛД) делает затруднительным их систематическое сопоставление с установленными предельно допустимыми

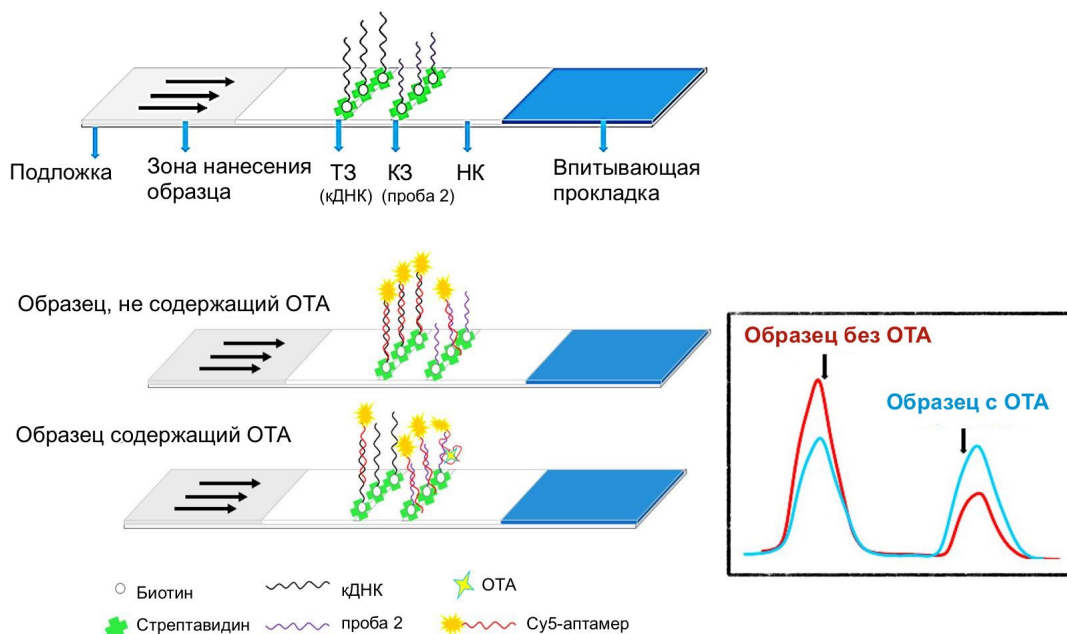


Рисунок 4. Определение охратоксина А (ОТА) при помощи тест-полосок на основе флуоресцентно-меченного Cy5-аптамера. Комплементарные пробы (кДНК и проба 2) иммобилизуются на полоске за счет биотин-стрептавидинового взаимодействия. Полоска содержит тестовую зону (ТЗ), контрольную зону (КЗ) и зону негативного контроля (НК). Нижняя правая часть рисунка иллюстрирует изменение соотношения сигналов флуоресценции ТЗ и КЗ в образцах в присутствии и отсутствие токсина. Иллюстрация из статьи открытого доступа (Zhang et al., 2018)

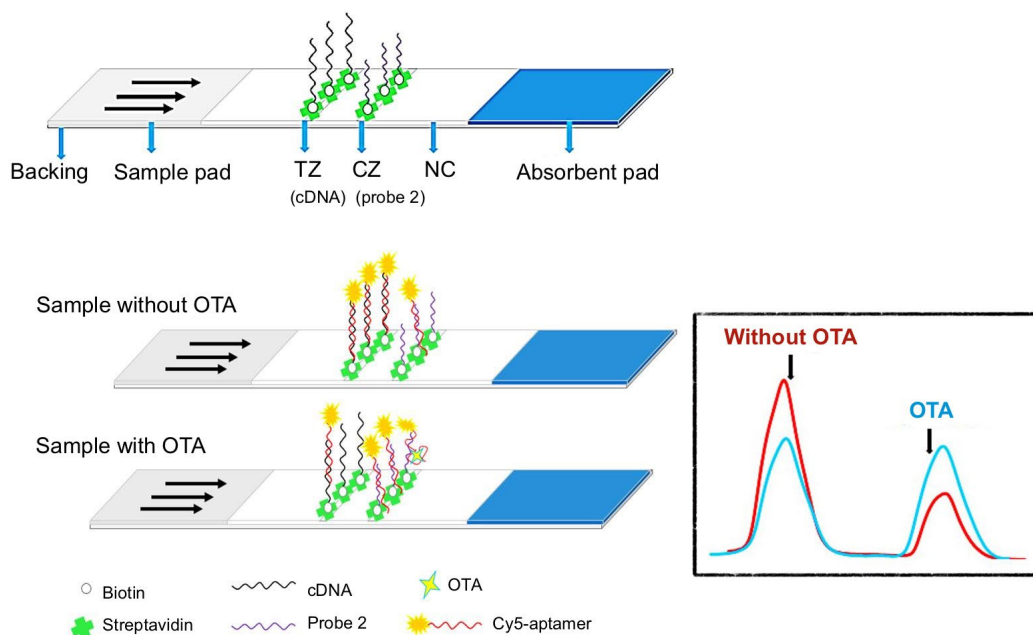


Figure 4. Determination of ochratoxin A (OTA) using lateral-flow strips based on fluorescently labeled Cy5 aptamer. Complementary probes (cDNA and probe 2) are immobilized on the strip via biotin-streptavidin interaction. The strip includes a test zone (TZ), a control zone (CZ) and a negative control zone (NC). The lower right part of the figure illustrates the change in fluorescence signals ratio of TZ and CZ in presence and absence of the toxin. Illustration from an open access article (Zhang et al., 2018)

нормами для отдельных веществ. Однако в целом можно заключить, что описанные оптические аптасенсоры имеют перспективу для дальнейших разработок с точки зрения чувствительности, селективности и экспрессности детектирования. При этом многие подходы могут быть воспроизведены при помощи простых и малозатратных процедур.

Подробный разбор электрохимических аптасенсоров к микотоксинам представлен в работе Evtugyn и Nianik (2019). В работе Goudc с соавт. (2020) также описаны актуальные разработки для регистрации микотоксинов с использованием разнообразных наноматериалов.

Помимо сенсоров, аптамеры могут служить для выделения и концентрирования мишени перед анализом, что значительно упрощает аналитическую процедуру. Описана экстракция ОТА из образцов пшеничной муки на аффинной колонке, модифицированной аптамерами, с последующей элюцией и его флуориметрическим определением (Cruz-Aguado, Penner, 2008). Процедура апробирована для анализа сертифицированных образцов муки с естественным содержанием токсина. Предварительное испытание удерживающей способности колонки с использованием 100 нМ раствора ОТА показало, что колонка удерживает 97% аналита. Аналогичная одностадийная процедура экстракции была продемонстрирована на примере силикагеля, модифицированного аптамерами, для селективной экстракции эргозина, эргокриптоина и эргокорнина из образцов ржи перед ВЭЖХ-МС/МС анализом (Rouah et al., 2014).

Важно отметить, что применение аптамеров не ограничивается задачами выделения и детекции. Аптамеры – многофункциональный инструмент для исследовательской работы. К примеру, описан нанозонд на основе аптамера для визуализации ОТА в клеточной культуре HeLa, инкубированной в присутствии токсина (Xia et al., 2020b). Этот пример иллюстрирует творческий потенциал для применения аптамеров при решении разнообразных задач.

Аптамеры к прочим малым органическим молекулам

К органическим анализам, представляющим интерес для пищевой и кормовой промышленности, относятся не только микотоксины, но и множество других органических веществ. Основными методами для их анализа служат ЯМР, ВЭЖХ, ГХ, МС и т.д., которые, как уже отмечалось, плохо удовлетворяют целям широкомасштабного и экспрессного мониторинга (Romero-González, 2015; Rodriguez et al., 2021).

Пестициды и антибиотики. Химические препараты для борьбы с патогенами животных и растений стали большим прорывом в индустрии XX века, но с годами стали очевидны и сопутствующие проблемы. Антибиотики и пестициды позволили эффективно бороться с вредными организмами, однако их чрезмерное внесение привело не только к появлению резистентных организмов, но и к серьезному загрязнению окружающей среды и сельскохозяйственной продукции (Rani et al., 2021). В связи с этим, аналитический контроль пестицидов и антибиотиков необходим во многих отраслях сельского хозяйства и на разных стадиях производства. В литературе можно найти аптамеры, специфичные ко многим органическим пестицидам и антибиотикам, таким как офлоксацин (Reinemann

et al., 2016), атразин (Abraham et al., 2018), ацетамиприд (He et al., 2011), форат, пропенофос, изокарбофос (Wang et al., 2012) и пр.

В качестве примера рассмотрим тебуконазол – системный фунгицид для обработки зерновых культур. Он внесен в список потенциальных канцерогенов и несет риск для состояния окружающей среды уже при низких концентрациях. Колориметрическая методика на основе агрегации наночастиц Ag позволила специфично определять тебуконазол в образцах риса за 20 мин (ПО 10 нМ) (Truong et al., 2021).

Другой пример – β-лактамы антибиотики (пенициллины, цефалоспорины и др.), широко используемые в животноводстве, благодаря своей химической стабильности часто загрязняют молочную продукцию. Работа Paniel с соавт. (2017) описывает отбор аптамера к пенициллину G и разработка аптасенсора для его определения в молоке. Для создания электрохимического сенсора авторы иммобилизовали аптамеры на поверхности углеродного электрода. Связывание мишени изменяет свойства поверхностного слоя, что регистрируется количественно в режиме СЭИ (рис. 5А) (ЛД 0.4–1000 мкг/л, ПО 0.17 мкг/л). Показана селективность определения в присутствии родственных пенициллину G антибиотиков, ампициллина и амоксициллина. При этом наблюдался значительный неспецифичный отклик на тетрациклин, что, по мнению авторов, может быть связано с полициклической природой антибиотика и его склонностью к взаимодействию с нуклеиновыми кислотами. Неспецифичный отклик на тетрациклин ставит под вопрос применимость конкретного подхода для анализа реальных объектов и указывает на необходимость учета нюансов при использовании аптасенсоров для конкретных мишеней. Антибиотики наряду с микотоксинами привлекают большое внимание коллективов, занимающихся аптасенсорами. Дополнительная информация по соответствующим разработкам может быть найдена в статьях Mehlhorn с соавт. (2018) и Yue с соавт. (2021).

Пищевые добавки. Эту группу веществ можно проиллюстрировать на примере стимуляторов роста – кленбутерола (КЛБ) и рактопомина, которые добавляют в корм для ускорения набора массы и снижения жирности мяса сельскохозяйственных животных. Аптамер, специфичный к КЛБ, конъюгированный с флуоресцеином, задействован для получения флуоресцентного сенсора, основанного на десорбции аптамеров с поверхности оксида графена при связывании мишени (ЛД 0.10–50 нг/мл, ПО 0.07 нг/мл, рис. 6) (Duan et al., 2017b). Аналогично устроенный аптасенсор, описанный для рактопамина, позволил определять данный аналит в образцах свинины (ЛД 0.10–100 нг/мл, ПО 0.04 нг/мл) (Duan et al., 2017a).

Аптамеры применимы и для определения менее опасных веществ. К примеру, для контроля содержания ванилина в пищевой продукции. Kuznetsov с соавт. (2018) описал аптамер, специфичный к ванилину в присутствии его близких аналогов: бензальдегида, гваякола, фуранеола, этилгваякола и этилванилина. На основе аптамера разработан электрохимический сенсор, который можно описать схемой, приведенной на рис. 5В. Аптамер с комплементарной электрохимически активной пробой иммобилизован на подложке из Ta₂O₅. При связывании ванилина происходит высвобождение пробы, детектируемое как изменение

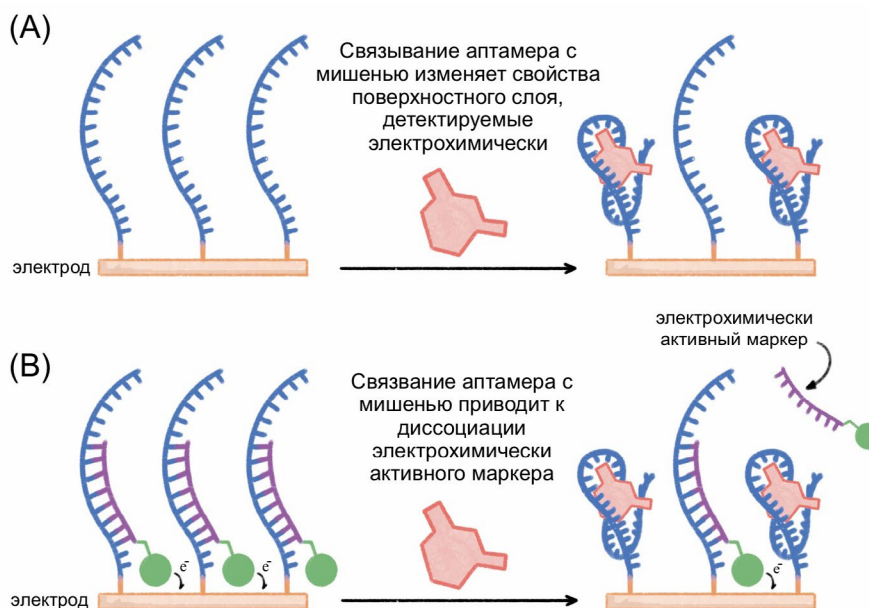


Рисунок 5. Устройство электрохимических аптасенсоров. (А) Электрод, модифицированный аптамерами, для обеспечения специфичного ответа на присутствие мишени. (В) Электрод, модифицированный аптамерами с комплементарной электрохимически активной пробой, диссоциирующей в присутствии мишени. [ориг.]

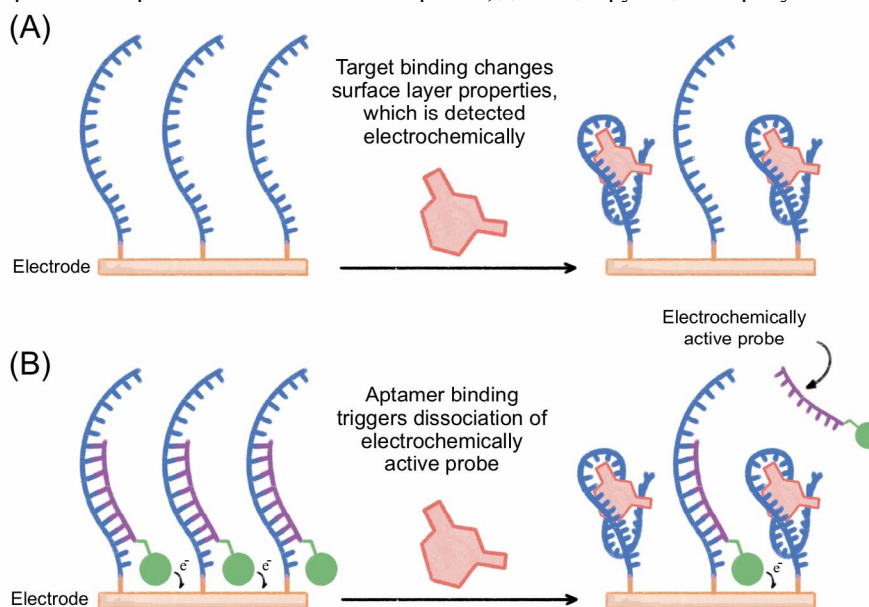


Figure 5. Concepts of electrochemical aptasensors. (A) Aptamer-modified electrode provides specific response in the presence of a target. (B) Aptamer-modified electrode with a complementary electrochemically active probe dissociating upon target binding. [orig.]

поверхностного потенциала. При помощи этого сенсора авторы выполнили селективное определение ванилина в смеси альтернативных веществ и в образцах кофейного экстракта (ПО 1.55×10^{-7} М, ЛД $1.55 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-6}$ М).

Прочие вредные органические вещества. Поллютанты в окружающей среде можно разделить на соединения природного и антропогенного происхождения. В качестве примера природного токсина можно привести липополисахариды (ЛПС) – экзотоксины и компоненты внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Авторы работы (Ye et al., 2017) провели отбор аптамеров, специфичных к широкому кругу ЛПС, с использованием ЛПС *Salmonella enterica* серотип *typhimurium* в качестве основной мишени SELEX. Оптимальный аптамер в составе флуоресцентного

аптасенсора позволил выявить ЛПС трех различных видов бактерий в пробах воды (для разных ЛПС ПО 3.00–99.31 нг/мл, ЛД в диапазоне от сотых долей до десятков мкг/мл).

Поллютант антропогенного происхождения ди(2-этилгексил)фталат (ДЭГФ), широко распространённый пластификатор в упаковочных материалах, может вызвать эндокринные нарушения и угнетение иммунитета. Аптамер к молекуле ДЭГФ использован для создания электрохимического аптасенсора на основе СЭИ для прямого обнаружения пластификатора в пробах воды с высокой чувствительностью (ЛД $7.629 - 2 \times 10^6$ пг/мл, ПО 0.103 пг/мл) и специфичностью, а также низкой стоимостью анализа (Lu et al., 2020).

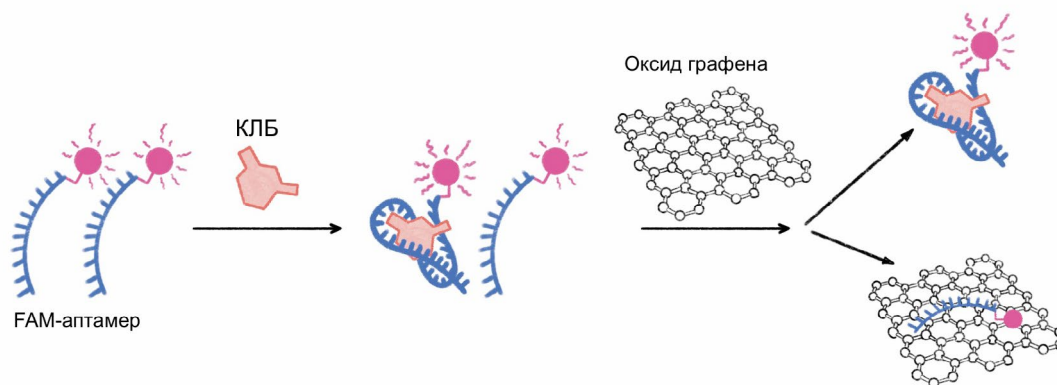


Рисунок 6. Детектирование клербутерола (КЛБ), основанное на десорбции флуоресцентно-меченных аптамеров с поверхности оксида графена при связывании мишени. Оксид графена используется в виде суспензии, разделение осуществляется центрифугированием. Составлено на основе иллюстрации из статьи открытого доступа (Duan et al., 2017b)

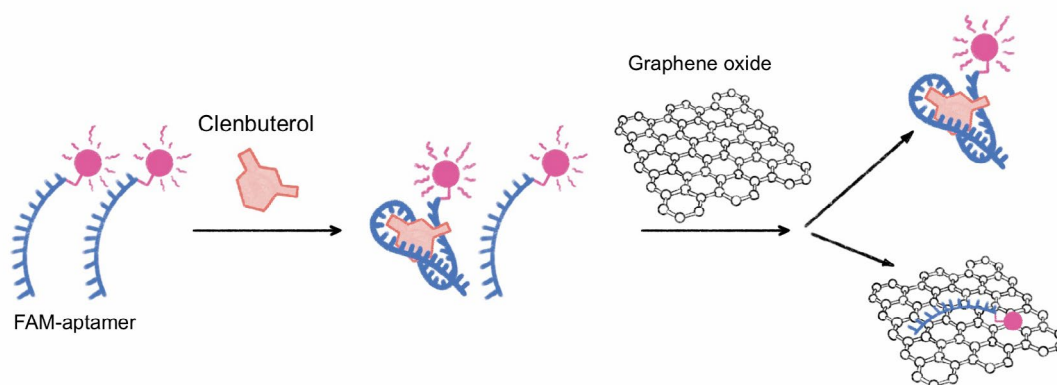


Figure 6. Clenbuterol detection based on desorption of fluorescently labeled aptamers from graphene oxide upon target binding. A suspension of graphene oxide is used, separation is carried out by centrifugation. Based on illustration from an open access article (Duan et al., 2017b)

Аптамеры к катионам металлов

К неотъемлемым задачам химического мониторинга окружающей среды относится определение тяжелых металлов, при проведении которого в первую очередь опираются на спектральные, оптические и электрохимические методы анализа. Практика показывает, что аптасенсоры для ионов металлов не уступают многим классическим аналитическим методикам. Так, аптамер к Hg^{2+} в методике с агрегацией наночастиц Au позволяет визуально фиксировать концентрацию аналита от 8.2×10^{-8} М. В предложенном подходе агрегация наночастиц происходит под действием аптамера в отсутствие мишени, что позволяет избежать негативного влияния неселективной адсорбции аналита на частицах, препятствующей агрегации. Сравнение количественного спектрофотометрического детектирования Hg^{2+} при помощи аптамера в природных образцах воды (ПО 4.9×10^{-11} М) с результатами атомной спектроскопии холодного пара показало согласованность результатов. В этой же работе авторы успешно привлекли эту методику для определения Ag^+ (визуальный ПО 1.0×10^{-8} М, колориметрический ПО 6.4×10^{-10} М) (Qi et al., 2019). Аналогичная методика описана и для Cd^{2+} (ПО 4.6 нМ) (Wu et al., 2014).

Аптамеры к патогенным микроорганизмам

Патогенные бактерии, присутствующие в пищевой продукции, становятся причиной многих серьезных, зачастую смертельных, заболеваний (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Vibrio spp* etc.). (Davydova et al., 2016; Majdinasab et al., 2018). Помимо бактерий, патогенных для человека, немаловажна и проблема фитопатогенных микроорганизмов. Грибные и бактериальные болезни растений наносят огромный урон сельскому хозяйству, а токсичные продукты их жизнедеятельности – здоровью человека и животных (FAO, 2020). Микробиологические методы, основанные на идентификации выделенных культур по культурально-морфологическим признакам, занимают много времени и ресурсов. Также для идентификации микробов получили большое распространение ПЦР и ИФА. При этом последний имеет ограниченное применение, специфичность и чувствительность. В этом отношении ПЦР оказывается более эффективным подходом для диагностики патогенов, однако процедура ресурсозатратна и требует привлечения квалифицированного персонала (Davydova et al., 2016; Majdinasab et al., 2018).

Технология SELEX позволяет получать аптамеры, специфичные к молекулам клеточных оболочек микроорганизмов (Davydova et al., 2016; Majdinasab et al., 2018), и использовать их для создания специфичных сенсоров. Такие

примеры описаны для *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter* spp., *Listeria* spp. и *Shigella flexneri*. Для выявления бактерий задействованы те же принципы дизайна аптасенсоров, что и для молекул, рассмотренных выше. Флуоресцентные и электрохимические аптасенсоры обеспечивают более высокую чувствительность, в то время как колориметрические методики и тест-полоски эффективны для экспресс-диагностики (Majdinasab et al., 2018). В качестве примера рассмотрим гибридную методику для одновременного детектирования *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* и *S. enterica* серотип *typhimurium*. Клетки бактерий связываются при помощи магнитных наночастиц, покрытых антителами. Параллельная детекция осуществляется при помощи смеси 4 аптамеров, конъюгированных с разными флуоресцентными квантовыми

точками (рис. 7). Пределы обнаружения *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes* и *S. enterica* серотип *typhimurium* составляли 80, 100, 47 и 160 КОЕ/мл соответственно в чистой культуре и 320, 350, 110 и 750 КОЕ/мл в говяжьем фарше. Аптасенсор позволяет детектировать бактериальные клетки в диапазоне 10^1 – 10^4 КОЕ/мл (Xu et al., 2015).

В работе Krivitsky с соавт. (2021) описано применение аптамеров для определения уредоспор возбудителя ржавчины сои (*Phakopsora pachyrhizi*) в воздухе. Споры улавливают с помощью устройства для сбора воздуха с углеродным фильтром, выполняющим функции электрода (рис. 8). После сбора пробы на электрод наносится биотинилированный аптамер, специфичный к белкам спор возбудителя ржавчины сои. После связывания аптамеров с мишенью электрод инкубируется с конъюгатом стрептавидина и щелочной фосфатазы. Иммуобилизованный на

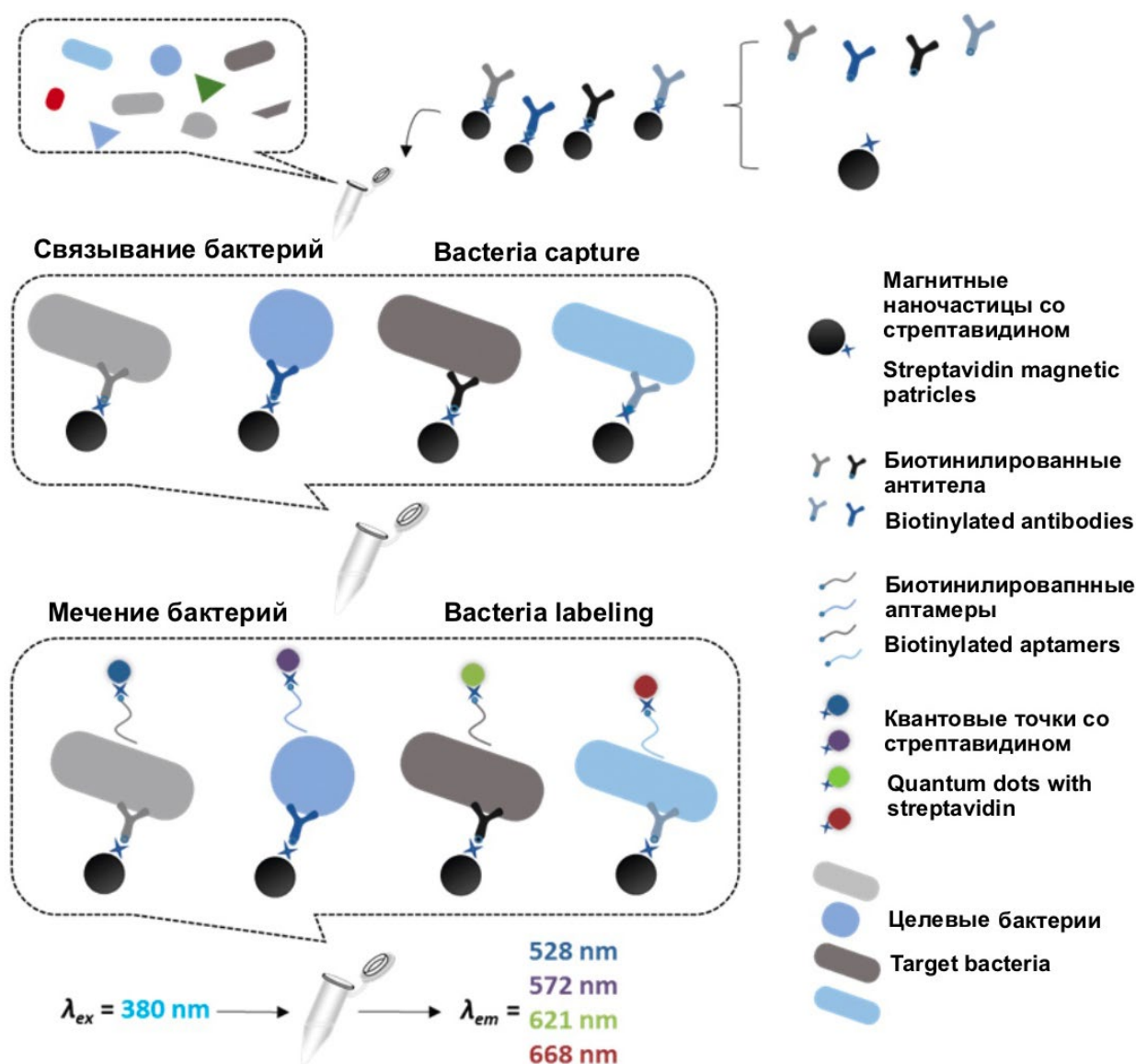


Рисунок 7. Процесс параллельного детектирования 4 патогенных бактерий при помощи антител, аптамеров и флуоресцентных квантовых точек (Xu et al., 2015). Воспроизведено с согласия правообладателя. © American Society of Agricultural and Biological Engineers

Figure 7. The process of simultaneous detection of 4 pathogenic bacteria species using antibodies, aptamers, and fluorescent quantum dots. From (Xu et al., 2015). Used with the copyright holder permission. © American Society of Agricultural and Biological Engineers

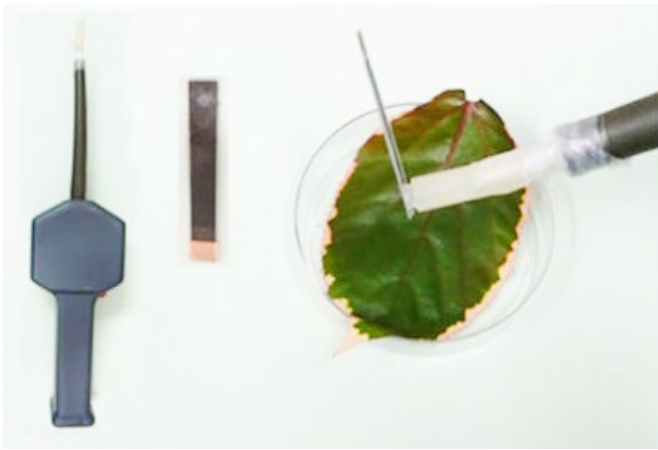


Рисунок 8. Портативное устройство для сбора спор ржавчины сои для последующего определения при помощи аптамера. Иллюстрация из статьи открытого доступа (Krivitsky et al., 2021)

Figure 8. Portable device for collection of soybean rust spores for subsequent aptamer-assisted determination. Illustration from an open access article (Krivitsky et al., 2021)

аптамере фермент катализирует превращение *n*-нитрофенилфосфата в *n*-нитрофенол, выступающий в качестве электрохимически активного маркера. При тестировании специфичности системы в отношении *P. pachyrhizi*, а также филогенетически близкого вида *P. meibomiae*, была продемонстрирована высокая избирательность в отношении именно целевого объекта (уредоспоры *Phakopsora pachyrhizi*). Устройство позволяет осуществлять быстрый сбор образца с последующим обнаружением спор фитопатогена (около 2 минут). Максимальная чувствительность прибора составила около 10 спор на электрод (диаметр электрода 4 мм). Авторы отмечают, что чувствительность потенциально можно повысить, увеличивая время инкубации с ферментом. Предложенное устройство может быть адаптировано для раннего обнаружения возбудителей болезней растений, распространяющихся по воздуху.

Коммерческие продукты на основе аптамеров

Несмотря на многообещающие результаты лабораторных испытаний, сведений об успешной коммерциализации продуктов на основе аптамеров в настоящее время не много. Это можно объяснить, как относительной новизной

самой технологии, так и доступностью устоявшихся подходов. Тем не менее, расширяется список компаний, которые занимаются получением аптамеров к любым мишеням и адаптацией методов их использования. Список некоторых компаний опубликован на портале «International Society on Aptamers» (McKeague et al., 2021). На данный момент одна из областей пищевой отрасли, в которой появлялись коммерческие разработки – это диагностика микотоксинов.

Так «OTA-Sense» (Neoventures Biotechnology Inc., Канада) – это набор для флуоресцентного определения ОТА. Набор состоит из аффинной колонки, модифицированной аптамерами к ОТА, и раствора для детектирования. Колонка позволяет провести предварительную концентрацию токсина из пробы. Раствор для детектирования содержит ОТА-специфичный аптамер и катионы Tb^{3+} . Катион металла взаимодействует с комплексом ОТА-аптамер, при этом люминесценция Tb^{3+} увеличивается в несколько раз. Набор предназначен для определения ОТА в зерне и алкогольных напитках. «AflaSense» – аналогичный набор этой же компании для определения АФВ1 в образцах кукурузы и арахиса (Kaur et al., 2018). Другое устройство с похожим названием, «AflaSense Plus» (Nanoelectronics and MEMS laboratory, НЕСТЕС, Тайланд) – портативный электрохимический детектор для определения АФВ1. Процедура анализа состоит из экстракции образца, инкубации экстракта с реагентом с последующим нанесением раствора на тонкий одноразовый электрод на основе графена в виде пластинки (рис. 9) («AflaSense Plus: Rapid and Portable...», 2016). Электрохимическая платформа универсальна и может быть легко адаптирована для других мишеней с помощью подходящего аптамера. Аналогичная портативная электрохимическая система предложена компанией Cibus Biotechnologies Inc. (США). Система CibusDx обеспечивает получение результатов на месте в течение 30 мин. Круг анализов пока не уточняется. Как и «AflaSense Plus», эта система основана на использовании тонких одноразовых электродов, за исключением того, что в этом случае анализирующий прибор более миниатюрен и может быть соединен с мобильными устройствами («CibusDx technology shifts...», 2017). Все вышеперечисленные проекты в настоящий момент, вероятно, испытывают затруднения или не активны. Тем не менее приведенные примеры, несомненно, представляют историческую ценность в качестве прототипов коммерческих технологий, которые, мы надеемся, однажды станут частью биоаналитической практики.

Аптамеры как индивидуальные биологически активные агенты

Пестициды на основе аптамеров

Помимо рассмотренной выше проблемы загрязнения окружающей среды пестицидами, все более реальной становится угроза экспансии патогенов, резистентных к широко распространенным препаратам. В связи с этим необходим поиск новых решений для контроля фитопатогенов (Rani et al., 2021). Предполагается, что аптамеры могут быть привлечены в качестве средств защиты растений за счет целенаправленного действия на выбранные молекулярные мишени, ответственные за жизненно важные функции вредного организма. Высокий уровень специфичности таких препаратов позволяет избежать нецелесообразной токсичности. Более того, деградация НК-аптамеров

и белковых аптамеров в окружающей среде происходит естественным способом и не продуцирует опасных побочных продуктов (Ha et al., 2016; Colombo et al., 2020). Накоплен обширный опыт отбора аптамеров к биомолекулам животных и человека (Dunn, 2014), тем не менее, до сих пор в литературе представлено мало примеров аптамеров, ингибирующих те или иные функции патогенов. Стоит ожидать, что рутинизация технологий отбора и применения аптамеров, изменит эту ситуацию.

Проиллюстрируем логику использования аптамеров в качестве пестицидов на примере бактерии *Xanthomonas axonopodis* патовар *citri*, этиологического агента рака цитрусовых. Заболевание вызывает дефолиацию, приводит к

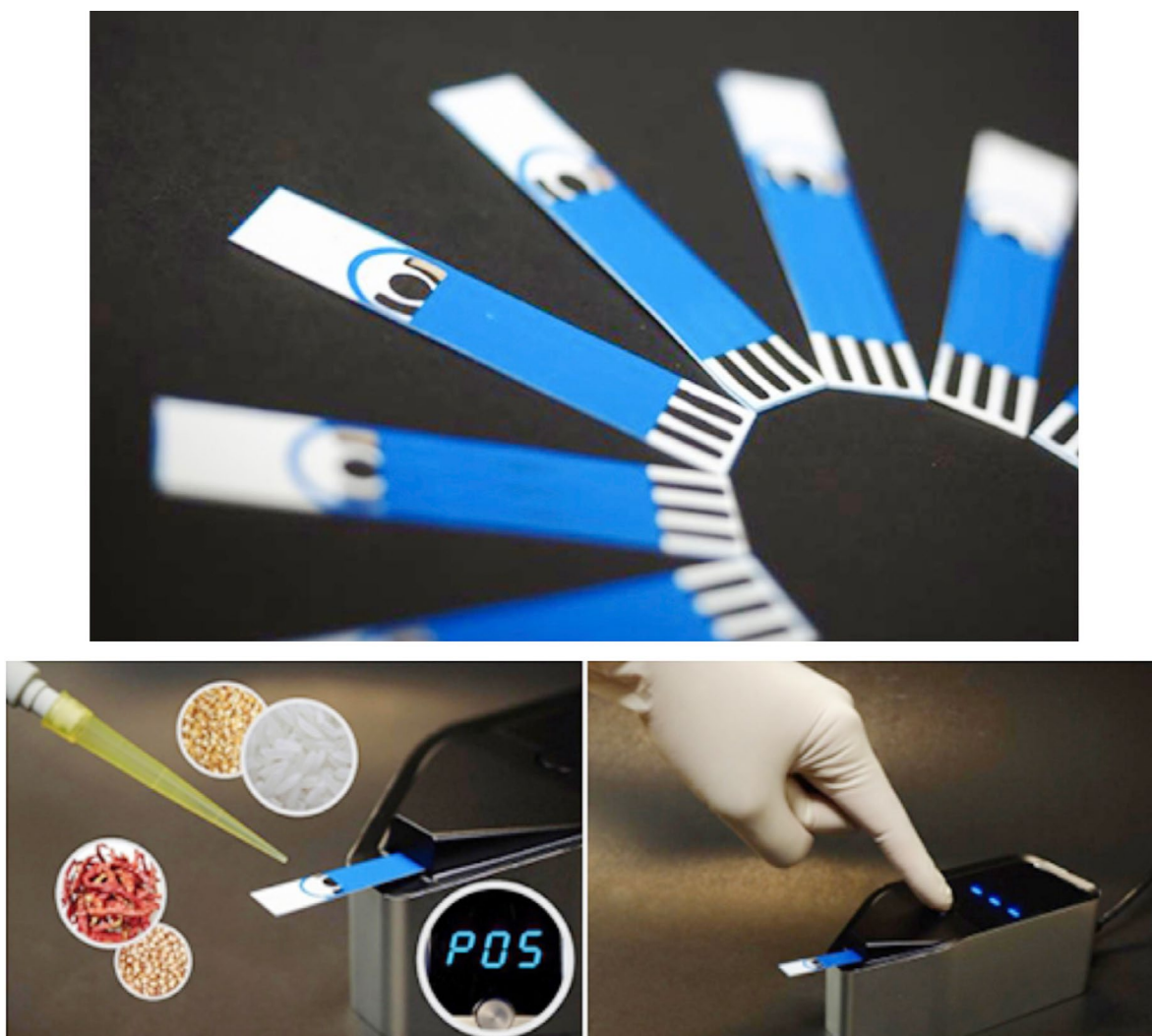


Рисунок 9. Электрохимическая система для детектирования охратоксина А, «AflaSense Plus». Сверху – фотография тонких одноразовых электродов на основе графена. Снизу – портативное регистрирующее устройство в процессе анализа. Источник («AflaSense Plus: Rapid and Portable...», 2016). Воспроизведено с согласия правообладателя.
© National Electronics and Computer Technology Center

Figure 9. Electrochemical system for ochratoxin A detection, “AflaSense Plus”. At the top: thin disposable graphene electrodes. Below: a portable recording device and the process of analysis. Source (“AflaSense Plus: Rapid and Portable...”, 2016). Used with the copyright holder permission. © National Electronics and Computer Technology Center

ухудшению качества плодов и их преждевременному опаданию. Внесение бактерицидных агентов ингибирует рост и препятствует распространению бактерий, но эффективных препаратов, способных справиться с болезнью в прогрессирующей стадии, не существует (Ha et al., 2016). Для решения этой проблемы предложен ДНК-аптамер к цитоскелетному белку FtsZ (Ha et al., 2016). Это главный белок в цитокinesisном механизме деления прокариотических клеток, следовательно, ингибитор FtsZ может нарушить процесс деления. Авторами описано выделение FtsZ из *X. axonopodis* с последующим отбором ДНК-аптамеров к этому белку. Полученные аптамеры имеют K_d в наномолярном диапазоне. Идентифицировано три олигонуклеотида, проявляющих сильное ингибирование полимеризации FtsZ *in vitro*. В качестве оценки эффективности авторы приводят концентрацию полумаксимального ингибирования (IC_{50}) полимеризации белка. Для трех аптамеров величина IC_{50} составила 1–2 мкМ. Аналогичное значение IC_{50} было получено для берберина, коммерческого

антибактериального препарата. Аптамеры также показали высокую ингибирующую активность в бактериальных культурах со значениями MIC_{50} (минимальная концентрация, подавляющая рост 50% организмов) на уровне 100 мкМ (Ha et al., 2016).

Аналогичный подход создания апта-пестицида можно перенести и на другие группы организмов. Так, для борьбы с патогеном *Plasmopara viticola*, вызывающим ложную мучнистую росу винограда, предложен пептидный аптамер NoPv1 («No *Plasmopora viticola* 1»), состоящий из 8 аминокислотных остатков (Colombo et al., 2020). Для отбора была задействована дрожжевая двугибридная система с целлюлозосинтазой 2 в качестве мишени (PvCesA2) *P. viticola*, ингибирование которой нарушает процесс образования зародышевой трубки патогена и развития инфекции (Colombo et al., 2020). Преимущество отбора в двугибридной дрожжевой системе заключается в получении аптамеров, взаимодействующих с белком-мишенью в живых клетках, в отличие от систем отбора *in vitro* (фаговый

дисплей и др.). Активность отобранных аптамеров протестирована путем инокуляции листовых дисков винограда *Vitis vinifera* культурой *P. viticola* в присутствии 200 мкМ NoPv1. Аптамер позволил предотвратить поражение листовых дисков на 100%, не вызывая повреждения растительных тканей (рис. 10). В отсутствие NoPv1 через 5–7 дней после инокуляции четко фиксировалась споруляция *P. viticola*. В опытах на горшечных культурах винограда 800 мкМ NoPv1 также эффективно подавлял развитие патогена, как и коммерческий фунгицид на основе соединения меди Kocide 2000. Раствор аптамера распыляли на листовые диски до (от 7 дней до 2 ч) и после (от 1 ч до 2 дней) инокуляции. NoPv1 эффективно подавлял инфекцию даже при обработке за 7 дней до инокуляции, однако его эффективность быстро снижалась при нанесении после инокуляции (Colombo et al., 2020). Также показано, что NoPv1 способен противодействовать росту культуры *Phytophthora infestans* в чашке Петри. Авторы объясняют это высоким сходством аминокислотных последовательностей между белками целлюлозосинтазы *P. viticola* и *P. infestans*. Дополнительные исследования продемонстрировали, что применение аптамера не влияет на рост целевых микроорганизмов и что пептид не проявляет токсического действия по отношению к клеткам растений и человека (Colombo et al., 2020).

Еще один пептидный аптамер SNP-D4 с фунгицидной активностью нацелен на кальмодулин CaM гриба *Pyricularia oryzae*, вызывающего пирикулярриоз риса (Xu et al., 2019). Аптамер получен при помощи бактериальной двугибридной системы с CaM в качестве мишени. CaM служит регулятором Ca²⁺-сигнальных путей, важных для патогенеза. Конидиальную суспензию инкубировали в присутствии аптамера и изучали развитие патогена. Степень подавления прорастания спор коррелировала с концентрацией SNP-D4. Авторы показали, что эффект SNP-D4 с концентрацией 10 мкМ равен таковому для 0.01% раствора фунгицида трициклазола (Xu et al., 2019).

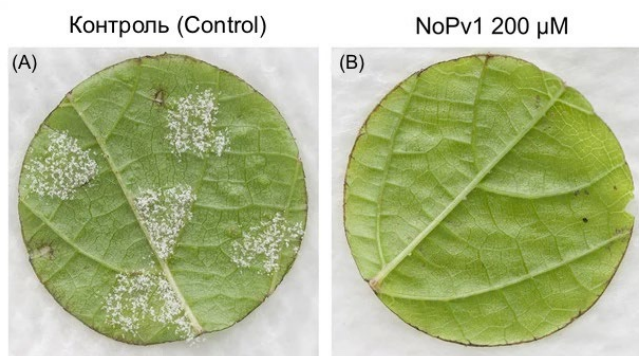


Рисунок 10. Изображения дисков листьев винограда, совместно инокулированных *ex vivo* культурой *Plasmopara viticola*. (B) – в присутствии пептидного аптамера NoPv 1, (A) – контроль без обработки аптамером. Иллюстрация из статьи открытого доступа (Colombo et al., 2020)

Figure 10. Images of vine leaf disks co-inoculated *ex vivo* with a *Plasmopara viticola* culture. (B) – in presence of NoPv 1 peptide aptamer, (A) – control without aptamer treatment. Illustration from an open access article (Colombo et al., 2020)

Приведенные примеры иллюстрируют потенциал НК-аптамеров и пептимеров в качестве эффективных пестицидов, ингибирующих те или иные функции патогенных микроорганизмов. Тем не менее, в сравнении с биоаналитическими направлениями, исследования в этой области довольно скудны. Необходимо дальнейшее накопление опыта, касающегося не только тестирования активности аптамеров *in vitro* и *in vivo*, но и эффективности полевого применения, биодоступности и биостабильности таких препаратов.

Антивирусные препараты

В отличие от грибов и бактерий, против вирусов растений нет эффективных пестицидов. Попытки обеспечить устойчивость растений к вирусным инфекциям, как правило, основаны на РНК-интерференции и редактировании генома (Sera, 2017). Аптамеры открывают новое направление для создания растений, резистентных к вирусным заболеваниям за счет направленного ингибирования важных функциональных белков вирусов и нарушения их репликационного цикла (Sera, 2017).

Первое применение пептимеров в этом направлении относится к вирусу пятнистого увядания томатов (TSWV) (Rudolph et al., 2003). Для отбора аптамеров авторы воспользовались фрагментами нуклеопротеина TSWV, гомополимеризация которого необходима для цикла развития вирусной инфекции. Пептидные аптамеры к нуклеопротеину были отобраны из рандомизированной библиотеки с использованием дрожжевой двугибридной системы. В результате эксперимента получен пептид из 29 аминокислот. Пептид конъюгировали с β-глюкуронидазой в качестве белка-носителя. Исследование аффинности конъюгата показало сильное взаимодействие с нуклеопротеином TSWV, а также с нуклеопротеинами других тосповирусов: вируса хлоротической пятнистости томата (TCSV), вируса кольцевой пятнистости арахиса (GRSV), вируса некроза побегов хризантем (CSNV) и вируса некротической пятнистости бальзамина (INSV). Активность аптамера протестирована *in planta* посредством получения трансгенных растений, экспрессирующих разработанный конъюгат. Многие трансгенные линии демонстрировали полную устойчивость без видимых симптомов заболевания при заражении TSWV (рис. 11). При этом все инокулированные контрольные линии проявляли симптомы и в конечном итоге погибали. Трансгенные линии продемонстрировали устойчивость и к другим тосповирусам (TCSV, GRSV и CSNV, но не INSV), что согласуется с результатами экспериментов в дрожжевой двугибридной системе. Такой результат демонстрирует возможность создания растений с широким спектром противовирусной устойчивости благодаря аптамерам к высоко консервативным белкам вирусов.

В другой работе белковые аптамеры были получены к репликационному белку AL1 вируса золотой мозаики томатов (TGMV) (Lopez-Ochoa et al., 2006), для отбора также применялась дрожжевая двугибридная система. Некоторые аптамеры препятствовали репликации TGMV в эксперименте с использованием протопластов, выделенных из суспензионных клеток *Nicotiana tabacum* (BY-2). Тем не менее, устойчивость к TGMV *in planta* не изучалась. Эксперимент в дрожжевой двугибридной системе показал аффинность отобранных пептидов не только к AL1 TGMV,

но и к аналогичному белку вируса курчавости капустных листьев (CaLCuV).

Продолжая опыты с пептимерами к AL1 TGMV, Reyes с соавт. (2013) исследовал связывание 16 пептидных аптамеров с репликационными белками, девяти вирусов из трех основных родов *Geminiviridae*. Анализ в дрожжевой двугибридной системе показал, что два пептимера (A22, A64) не только имели высокий уровень связывания с белком AL1 TGMV, но взаимодействовали и с репликационными белками, полученными из других геминивирусов. Эти пептимеры были экспрессированы в растениях томата *Solanum lycopersicum* (рис. 12), после чего была исследована устойчивость трансгенных растений к вирусу желтой курчавости листьев томата и вирусу крапчатости листьев томата (TYLCV и ToMoV). Показано, что трансгенные линии эффективно задерживают накопление вирусной ДНК в сравнении с растениями дикого типа.

На сегодняшний день опыт применения пептимеров для борьбы с вирусными инфекциями растений исчерпывается вышеперечисленными публикациями. Работы, посвященные применению НК-аптамеров в этом направлении, вовсе отсутствуют. Позитивные результаты рассмотренных исследований представляют собой благоприятную почву для проведения дальнейших работ и детального изучения возможностей аптамеров как агентов для борьбы с фитовирусами.

Воздействие на биохимические процессы в растениях

Отбор аптамеров к функциональным белкам растений может быть использован и для направленного регулирования метаболических процессов, изменения фенотипа



Рисунок 11. Инокулированные TSWV растения, 23 дня после инокуляции. (А) – Дикий тип. (В) – Тип, экспрессирующий немодифицированную глюкоранидазу. (С) – Тип, экспрессирующий конъюгат аптамера с глюкоранидазой. Иллюстрация из статьи открытого доступа (Rudolph et al., 2003)

Figure 11. TSWV-inoculated plants, 23 days post-inoculation. (A) – Wild type. (B) – Type expressing unmodified glucuronidase. (C) – Type expressing aptamer-glucuronidase conjugate. Illustration from an open access article (Rudolph et al., 2003)

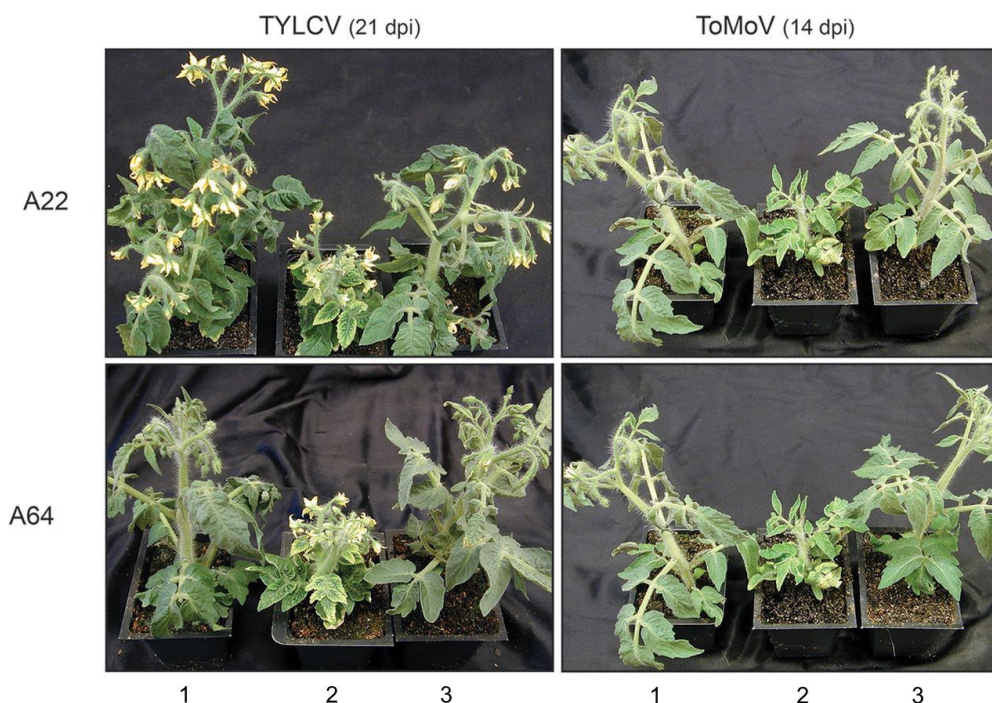


Рисунок 12. Изучение эффективности пептимеров (A22, A64), экспрессируемых томатами, в отношении TYLCV и ToMoV. 1 – контроль без инокуляции. 2 – инокулированные растения дикого типа. 3 – инокулированные трансгенные растения на 21 день после инокуляции TYLCV и на 14 день после инокуляции ToMoV. Иллюстрация из статьи открытого доступа (Reyes et al., 2013)

Figure 12. Efficacy of tomato-expressed peptimers (A22, A64) against TYLCV and ToMoV. 1 – control without inoculation. 2 – inoculated wild-type plants. 3 – inoculated transgenic plants on day 21 post TYLCV inoculation (dpi) and on day 14 after ToMoV inoculation. Illustration from an open access article (Reyes et al., 2013)

и изучения молекулярно-биологических процессов. Так, описан пептидный аптамер PAP, содержащий 16 аминокислот и препятствующий работе функционального белка MAGO NASHI (OsMAGO) в растениях риса — ключевого компонента в комплексе сшивания экзонов (Exon junction complex, EJC) (Gong et al., 2014). Аптамер PAP был идентифицирован путем скрининга библиотеки пептидов в дрожжевой двугибридной системе с использованием OsMAGO1 в качестве мишени. Несмотря на отсутствие позитивного эффекта от ингибирования OsMAGO, воздействие на него ярко отражается на фенотипе растения, иллюстрируя потенциальные возможности применения

Нанодобрения с использованием аптамеров

В наши дни сельское хозяйство столкнулось с серьезными последствиями чрезмерного и малоэффективного применения минеральных удобрений. По некоторым оценкам, при их внесении в почву, около 40–60% азота не усваиваются растениями. Аналогичная проблема наблюдается для фосфора (не усваивается 80–90%) и калия (не усваивается 30–50%) (Aziz et al., 2019). Излишки удобрений вымываются из почвы с дождями и в процессе орошения, попадают в грунтовые воды, приводя к загрязнению воды и неконтролируемому росту микроорганизмов. Избытки азота могут высвобождаться в форме нитратов, газообразного аммиака и оксидов азота (Aziz et al., 2019).

Одна из популярных концепций при разработке инновационных удобрений, позволяющих повысить усвоение, обеспечить адресную доставку и постепенное высвобождение питательных веществ – это микроинкапсулирование с использованием «умных» материалов. В настоящее время предложены системы инкапсулирования, в которых высвобождение веществ происходит в зависимости от pH, температуры или бактериального воздействия. Синхронизация поступления питательных веществ с потребностями сельскохозяйственных культур может повысить эффективность использования удобрений без негативного влияния на урожайность (Aziz et al., 2019). Существующие подходы к созданию инкапсулированных нанодобрений с добавлением гидрогелей, наночастиц глины и хитозана направлены в большей степени на пролонгированное высвобождение, нежели на адресное высвобождение. Технология аптамеров может стать полезным инструментом для разработки новых капсул, обеспечивающих адресную доставку и высвобождение питательных веществ.

Известно, что культурные растения посылают сигналы голодания, выделяя в окружающую почву определенные биомаркеры: аминокислоты, органические кислоты, углеводы и фенольные соединения и т.д. Аптамеры, чувствительные к таким биомаркерам, могут применяться в качестве спускового механизма, высвобождающего питательные вещества. Концепция такой системы

данной технологии. Фенотипический анализ показал, что трансгенные линии, экспрессирующие PAP, были карликовыми, с дефектными цветами и тычинками, более того, они характеризовались чрезвычайно низкой продуктивностью. Этот результат указывает на то, что конкурентное связывание PAP с MAGO дестабилизирует функцию гетеродимера MAGO-Y14 в рисе. Применение аптамера PAP показывает, что пептидные аптамеры представляют собой альтернативный подход к функциональной геномике высших растений, выступая в качестве ингибиторов и модуляторов активности целевых белков.

проиллюстрирована на рисунке 13 (Mastronardi, 2017). Олигонуклеотидные аптамеры встроены в многослойные полиэлектролитные капсулы (polyelectrolyte multilayer, PEM). Небольшие молекулы, такие как корневые экссудаты, могут диффундировать внутрь PEM, связываясь с аптамерами, стимулируя деформацию слоев PEM. Таким образом, присутствие биомаркера вызывает изменение проницаемости частицы, позволяя инкапсулированному источнику питательных веществ высвобождаться (Mastronardi, 2017). Стоит отметить, что аналогичный подход может быть задействован для контролируемого высвобождения пестицидов и гербицидов.

В диссертации Foster (2013) описан дизайн такой капсулы на основе аптамера к сульфородамину в качестве модельного соединения. Для создания PEM использована комбинация хитозана и гиалуроновой кислоты. Исследование свойств этой системы показало сохранение связывающих свойств аптамера, включенного в PEM. Аналогичное исследование описано в диссертации Sultan (2011), посвященной полиэлектролитным капсулам, чувствительным к присутствию растительного биомаркера L-лизина. В работе показано сохранение связывающей активности аптамера в составе капсулы и изменение проницаемости капсулы при связывании лизина. Также описаны микрокапсулы, чувствительные к присутствию L-серина (Mastronardi, 2017). Иные принципы разработки «умных» материалов, имеющих потенциал для доставки и контролируемого высвобождения удобрений, описаны в обзоре Mastronardi с соавт. (2014).

Несмотря на привлекательность описанной концепции, на практике пока отсутствуют завершенные работы, описывающие применение нанодобрений с использованием аптамеров в полевых условиях. При этом в существующих работах не исследуется вопрос эффективности таких микрокапсул непосредственно для удобрения растений, так что описанные материалы скорее обозначают направление будущих исследований, чем их результаты.

Заключение

Олигонуклеотидные и пептидные аптамеры зарекомендовали себя как перспективный инструмент для решения разнообразных прикладных задач, в которых требуется прочное и селективное связывание определенной молекулярной мишени. Будучи аналогами антител, аптамеры имеют целый ряд преимуществ, что делает их привлекательной основой для развития альтернативных

технологий. За 30 лет развития этой области накоплен большой объем информации о привлечении аптамеров для создания биологически активных агентов, биоаналитических методик и средств биовизуализации, а также технологий адресной доставки (Dunn, 2014).

Биоаналитическое применение аптамеров изучено наиболее подробно и имеет большой потенциал для

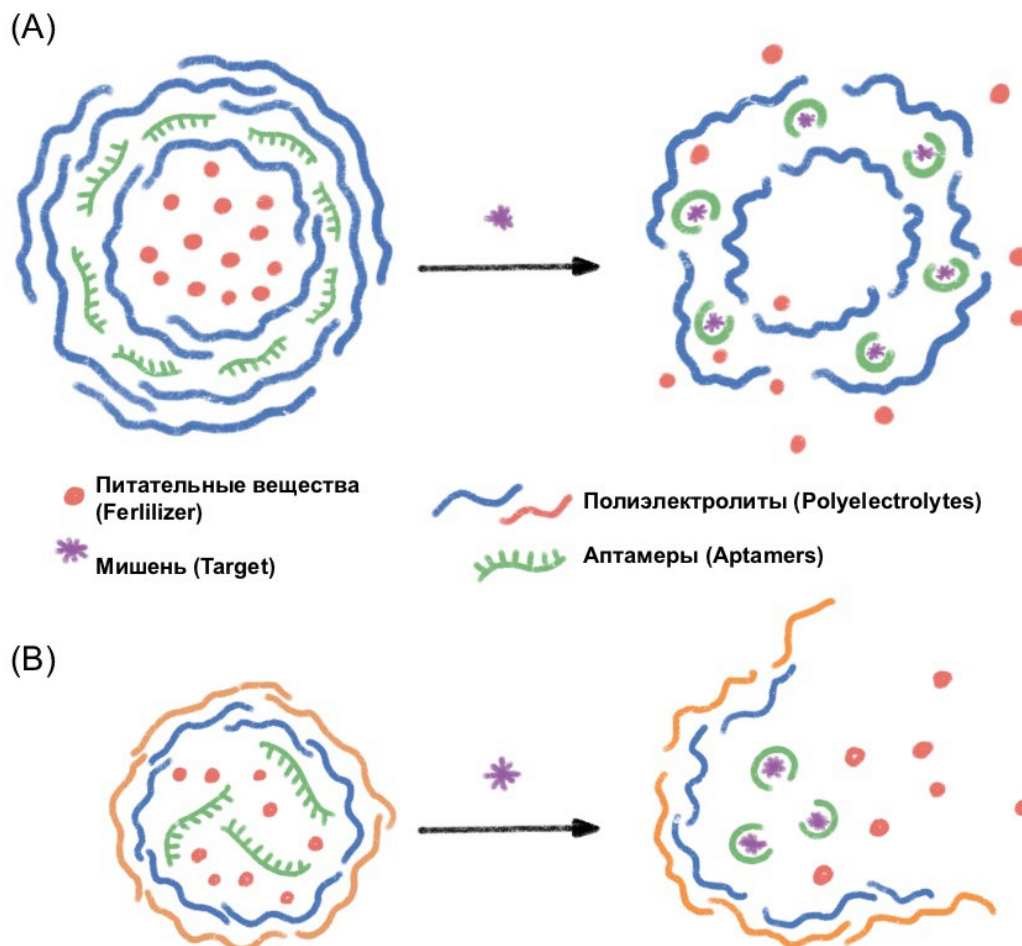


Рисунок 13. Концепция микроконтейнеров для удобрений на основе полиэлектролитных многослойных капсул (PEM), содержащих аптамеры. (А) Включение аптамеров в PEM позволяет регулировать проницаемость капсулы при связывании мишени. (В) Связывание аптамеров с мишенью стимулирует раскрытие капсулы. Составлено на основе иллюстрации из статьи открытого доступа Mastronardi (2017)

Figure 13. The concept of aptamer-modified fertilizer microcontainers based on polyelectrolyte multilayers (PEM).

(A) Incorporation of aptamers into PEM allows regulation of capsule permeability upon target binding.

(B) Aptamer binding to the target stimulates capsule eruption.

Based on illustration from an open access article (Mastronardi, 2017)

агропромышленного комплекса. Наиболее широкое применение в этой области находят НК-аптамеры, тогда как примеры использования пептидных аптамеров малочисленны. Многократно подтверждено, что аптасенсоры показывают хорошие аналитические характеристики и позволяют определять неорганические вещества, органические молекулы и даже определённые микроорганизмы в многокомпонентных образцах (Tombelli et al., 2007; Piiuk et al., 2011; Evtugyn, Nianik, 2019; Goud et al., 2020). Активно развиваются компании, занимающиеся отбором аптамеров и дизайном биоаналитических методик на заказ. Несмотря на видимую доступность технологии, до сих пор реализовано не так много коммерческих тест-систем на основе аптамеров, и подавляющее большинство предложенных продуктов не активно в настоящий момент. Тому можно найти ряд причин: от несовершенности технологии SELEX и проблем, связанных с применением аптамеров, до необходимости крупных инвестиций в новую технологию и частичного отказа от производства антител (занимающих значительную долю рынка), что может быть нецелесообразно по экономическим соображениям. Тем не

менее, технологии на основе аптамеров активно развиваются, вместе с ними неуклонно растёт и соответствующая индустрия, а значит, в будущем можно ожидать расширения области применения аптасенсоров.

Привлечение аптамеров в качестве биологически активных агентов, пестицидов нового поколения, равно как и для создания ГМ-растений, устойчивых к вирусным инфекциям, исследовано относительно мало. Большинство примеров в этой области описывает пептидные аптамеры. Имеются свидетельства об успешном использовании аптамеров для разработки фунгицидных, бактерицидных и противовирусных агентов, демонстрирующих высокую эффективность *in vitro* и *in planta*. Тем не менее, трудно говорить об эффективности этих технологий в полевых условиях. В литературе недостаточно информации о фитотоксичности этих средств, побочных эффектах и о практических аспектах биостабильности и биодоступности предложенных агентов.

Ещё меньше информации опубликовано относительно наноудобрений с использованием аптамеров: концепция капсул с проницаемостью регулируемой аптамерами

разработана в недостаточной степени, отсутствуют данные о практическом применении таких удобрений. Несмотря на малое количество информации в этой области, мы считаем, что это направление перспективно для новых исследований. Аптамеры безусловно имеют потенциал для обновления сельскохозяйственных технологий. Проблемы применения аптамеров на практике, связанные с недостаточной селективностью, потерей свойств *in vivo*, низкой биостабильностью и биодоступностью, могут быть решены за счет гибкости технологии и разнообразных путей для ее модификации.

Подводя итоги, можно заключить, что аптамеры зарекомендовали себя как многоплановый инструмент

Авторы выражают благодарность правообладателям изображений Adisorn Tuantranont (National Electronics and Computer Technology Center) и Glenn Laing (American Society of Agricultural and Biological Engineers) за разрешение воспроизведения иллюстраций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-76-30005).

Библиографический список (References)

- Abraham KM, Roueinfar M, Ponce AT, Lussier ME et al (2018) In Vitro Selection and Characterization of a Single-Stranded DNA Aptamer Against the Herbicide Atrazine. *ACS Omega* 3(10): 13576–13583. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01859>
- AflaSense Plus: Rapid and Portable Aflatoxin Sensor. NECTEC. <https://www.nectec.or.th/en/innovation/product-innovation/aflasense.html> (2016)
- Allen G, Andres J (2010) Method of Mycotoxin Detection. Invention patent US20110306508A1
- Apta-Index™. Aptagen. <https://www.aptagen.com/apta-index/> (2019)
- Aziz MZ, Naveed M, Abbas T, Siddique S et al (2019) Alternative Fertilizers and Sustainable Agriculture. In: Farooq M, Pisante M (eds) *Innovations in Sustainable Agriculture*. Springer International Publishing, Cham, 213–245. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23169-9_8
- Bennett JW, Klich M (2003) Mycotoxins. *Clin Microb Rev* 16(3): 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Chen X, Huang Y, Duan N, Wu S, et al (2013) Selection and identification of ssDNA aptamers recognizing zearalenone. *Anal Bioanal Chem* 405(20): 6573–6581. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7085-9>
- Chen X, Huang Y, Duan N, Wu S et al (2014) Selection and characterization of single stranded DNA aptamers recognizing fumonisin B1. *Microchim Acta* 181(11–12): 1317–1324. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1260-3>
- Chen X, Huang Y, Duan N, Wu S et al (2014) Screening and identification of DNA aptamers against T-2 toxin assisted by graphene oxide. *J Agr Food Chem* 62(42): 10368–10374. <https://doi.org/10.1021/jf5032058>
- CibusDx technology shifts safety paradigm from responding to food contamination to prevention. Cibus Biotechnologies, Inc. <https://cibusbiotechnologies.com/2017/08/14/cibusdx-technology-shifts-safety-paradigm-from-responding-to-food-contamination-to-prevention/> (2020)
- Colombo M, Masiero S, Rosa S, Caporali E et al (2020) NoPv1: a synthetic antimicrobial peptide aptamer targeting the causal agents of grapevine downy mildew and potato late blight. *Sci Rep* 10(1): 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73027-x>
- Cruz-Aguado JA, Penner G (2008) Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer. *J Agr Food Chem* 56(22): 10456–10461. <https://doi.org/10.1021/jf801957h>
- Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, Ruml T (2014) Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol Adv* 33(6): 1141–1161. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.008>
- Davydova A, Vorobjeva M, Pyshnyi D, Altman S et al (2016) Aptamers against pathogenic microorganisms. *Crit Rev Microbiol* 42(6): 847–865. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1070115>
- Duan N, Gong W, Wu S, Wang Z (2017a) An ssDNA library immobilized SELEX technique for selection of an aptamer against ractopamine. *Anal Chim Acta* 961: 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.008>
- Duan N, Gong W, Wu S, Wang Z (2017b) Selection and Application of ssDNA Aptamers against Clenbuterol Hydrochloride Based on ssDNA Library Immobilized SELEX. *J Agr Food Chem* 65(8): 1771–1777. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04951>
- Dunn MR, Jimenez RM, Chaput JC (2014) Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat Rev Chem* 1(10): 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0076>
- Ellington AD, Szostak JW (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346(6287): 818–822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>
- Evtugyn G, Hianik T (2019) Aptamer-based biosensors for mycotoxin detection. *Nanomycotoxicology: Treating Mycotoxins in the Nano Way*. Elsevier Inc., pp 35–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817998-7.00003-3>
- FAO (2020) Climate change: Unpacking the burden on food safety. *Food safety and quality series*. <https://doi.org/10.4060/ca8185en>
- Foster A (2013) Development of biocompatible aptamer films as smart materials for novel fertilizer systems. *PhD Thesis*. Carleton University, 142 p
- Geiger A, Burgstaller P, Eltz H Von der, Roeder A et al (1996) RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res* 24(6): 1029–1036. <https://doi.org/10.1093/nar/24.6.1029>
- Gong P, Quan H, He C (2014) Targeting MAGO proteins with a peptide aptamer reinforces their essential roles in multiple

- rice developmental pathways. *Plant J* 80(5): 905–914. <https://doi.org/10.1111/tpj.12672>
- Goud KY, Reddy KK, Satyanarayana M, Kummari S et al (2020) A review on recent developments in optical and electrochemical aptamer-based assays for mycotoxins using advanced nanomaterials. *Microchim Acta* 187(1): 1–32. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-4034-0>
- Ha NR, Lee SC, Hyun JW, Yoon MY (2016) Development of inhibitory ssDNA aptamers for the FtsZ cell division protein from citrus canker phytopathogen. *Process Biochem* 51(1): 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.008>
- He J, Liu Y, Fan M, Liu X (2011) Isolation and identification of the DNA aptamer target to acetamiprid. *J Agr Food Chem* 59(5): 1582–1586. <https://doi.org/10.1021/jf104189g>
- Huang R, Xi Z, He N (2015) Applications of aptamers for chemistry analysis, medicine and food security. *Sci China Chem* 58(7): 1122–1130. <https://doi.org/10.1007/s11426-015-5344-7>
- Iliuk AB, Hu L, Tao WA (2011) Aptamer in Bioanalytical Applications. *Anal Chem* 83(12): 4440–4452. <https://doi.org/10.1021/ac201057w>
- Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* 263(5152): 1425–1429. <https://doi.org/10.1126/science.7510417>
- Kasoju A, Shrikrishna NS, Shahdeo D, Khan AA et al (2020) Microfluidic paper device for rapid detection of aflatoxin B1 using an aptamer based colorimetric assay. *RSC Adv* 10(20): 11843–11850. <https://doi.org/10.1039/d0ra00062k>
- Kaur H, Bruno JG, Kumar A, Sharma TK (2018) Aptamers in the therapeutics and diagnostics pipelines. *Theranostics* 8(15): 4016–4032. <https://doi.org/10.7150/thno.25958>
- Komarova N, Kuznetsov A (2019) Inside the black box: What makes Selex better? *Molecules* 24(19): 3598. <https://doi.org/10.3390/molecules24193598>
- Krivitsky V, Granot E, Avidor Y, Borberg E et al (2021) Rapid Collection and Aptamer-Based Sensitive Electrochemical Detection of Soybean Rust Fungi Airborne Urediniospores. *ACS Sens* 6(3): 1187–1198. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c02452>
- Kuznetsov A, Komarova N, Andrianova M, Grudtsov V et al (2018) Aptamer based vanillin sensor using an ion-sensitive field-effect transistor. *Microchim Acta* 185(1): 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2586-4>
- Lan L, Yao Y, Ping J, Ying Y (2017) Recent progress in nanomaterial-based optical aptamer assay for the detection of food chemical contaminants. *ACS Appl Mater Interfaces* 9(28): 23287–23301. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b03937>
- Lopez-Ochoa L, Ramirez-Prado J, Hanley-Bowdoin L (2006) Peptide Aptamers That Bind to a Geminivirus Replication Protein Interfere with Viral Replication in Plant Cells. *J Virol* 80(12): 5841–5853. <https://doi.org/10.1128/jvi.02698-05>
- Lu Q, Liu X, Hou J, Yuan Q et al (2020) Selection of Aptamers Specific for DEHP Based on ssDNA Library Immobilized SELEX and Development of Electrochemical Impedance Spectroscopy Aptasensor. *Molecules* 25(3): 747. <https://doi.org/10.3390/molecules25030747>
- Lv L, Li D, Liu R, Cui C et al (2017) Label-free aptasensor for ochratoxin A detection using SYBR Gold as a probe. *Sens Actuators B Chem* 246: 647–652. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.02.143>
- Ma X, Wang W, Chen X, Xia Y et al (2015) Selection, characterization and application of aptamers targeted to Aflatoxin B2. *Food Control* 47: 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.037>
- Ma X, Wang W, Chen X, Xia Y et al (2014) Selection, identification, and application of Aflatoxin B1 aptamer. *Eur Food Res Technol* 238(6): 919–925. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2176-1>
- Majdinasab M, Aissa S Ben, Marty JL (2021) Advances in colorimetric strategies for mycotoxins detection: Toward rapid industrial monitoring. *Toxins* 13(1): 1–35. <https://doi.org/10.3390/toxins13010013>
- Majdinasab M, Hayat A, Marty JL (2018) Aptamer-based assays and aptasensors for detection of pathogenic bacteria in food samples. *Trends in Analyt Chem* 107: 60–77. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.07.016>
- Malhotra S, Pandey AK, Rajput YS, Sharma R (2014) Selection of aptamers for aflatoxin M1 and their characterization. *J Mol Recognit* 27(8): 493–500. <https://doi.org/10.1002/jmr.2370>
- Mastronardi E (2017) Development of aptamers and aptamer-based materials for agricultural applications. *PhD Thesis*. Carleton University, 219 p
- Mastronardi E, Foster A, Zhang X, DeRosa MC (2014) Smart materials based on DNA aptamers: Taking aptasensing to the next level. *Sensors* 14(2): 3156–3171. <https://doi.org/10.3390/s140203156>
- McKeague M, Bradley CR, Girolamo A De, Visconti A (2010) Screening and Initial Binding Assessment of Fumonisin B1 Aptamers. *Int J Mol Sci* 11(12): 4864–4881. <https://doi.org/10.3390/ijms11124864>
- McKeague M, Shigdar S, Sohail M. Aptamer Companies. <http://aptamersociety.org/aptamer-companies/> (2021)
- McKeague M, Velu R, Hill K, Bardóczy V et al (2014) Selection and characterization of a novel DNA aptamer for label-free fluorescence biosensing of ochratoxin A. *Toxins* 6(8): 2435–2452. <https://doi.org/10.3390/toxins6082435>
- Mehlhorn A, Rahimi P, Joseph Y (2018) Aptamer-based biosensors for antibiotic detection: A review. *Biosensors* 8(2): 54. <https://doi.org/10.3390/bios8020054>
- Odeh F, Nsairat H, Alshaer W, Ismail MA et al (2020) Aptamers chemistry: Chemical modifications and conjugation strategies. *Molecules* 25(1): 3. <https://doi.org/10.3390/molecules25010003>
- Paniel N, Istamboulié G, Triki A, Lozano C et al (2017) Selection of DNA aptamers against penicillin G using Capture-SELEX for the development of an impedimetric sensor. *Talanta* 162: 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.058>
- Patel DJ, Suri AK (2000) Structure, recognition and discrimination in RNA aptamer complexes with cofactors, amino acids, drugs and aminoglycoside antibiotics. *Rev Mol Biotechnol* 74(1): 39–60. [https://doi.org/10.1016/s1389-0352\(99\)00003-3](https://doi.org/10.1016/s1389-0352(99)00003-3)
- Pichon V, Brothier F, Combès A (2015) Aptamer-based-sorbents for sample treatment – A review. *Anal Bioanal Chem* 407(3): 681–698. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8129-5>
- Qi Y, Ma J, Chen X, Xiu FR et al (2019) Practical aptamer-based assay of heavy metal mercury ion in contaminated environmental samples: convenience and sensitivity. *Anal Bioanal Chem* 412(2): 439–448. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02253-8>
- Rani L, Thapa K, Kanojia N, Sharma N et al (2021) An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *J Clean Prod* 283: 124657. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124657>

- Reinemann C, Frein von Fritsch U, Rudolph S, Strehlitz B (2016) Generation and characterization of quinolone-specific DNA aptamers suitable for water monitoring. *Biosens Bioelectron* 77: 1039–1047. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.069>
- Reyes MI, Nash TE, Dallas MM, Ascencio-Ibanez JT et al (2013) Peptide Aptamers That Bind to Geminivirus Replication Proteins Confer a Resistance Phenotype to Tomato Yellow Leaf Curl Virus and Tomato Mottle Virus Infection in Tomato. *J Virol* 87(17): 9691–9706. <https://doi.org/10.1128/jvi.01095-13>
- Rodriguez RS, O'Keefe TL, Froehlich C, Lewis RE et al (2021) Sensing Food Contaminants: Advances in Analytical Methods and Techniques. *Anal Chem* 93(1): 23–40. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04357>
- Romero-González R (2015) Food safety: How analytical chemists ensure it. *Anal Methods* 7(17): 7193–7201. <https://doi.org/10.1039/c5ay00263j>
- Rouah-Martin E, Mehta J, Dorst B van, Saeger S et al (2012) Aptamer-based molecular recognition of lysergamine, metergoline and small ergot alkaloids. *Int J Mol Sci* 13(12): 17138–17159. <https://doi.org/10.3390/ijms131217138>
- Rouah E, Maho W, Mehta J, Saeger S De et al (2014) Aptamer-Based Extraction of Ergot Alkaloids from Ergot Contaminated Rye Feed. *Adv Biosci Biotechnol* 5(8): 692–698. <https://doi.org/10.4236/abb.2014.58082>
- Rudolph C, Schreier PH, Uhrig JF (2003) Peptide-mediated broad-spectrum plant resistance to tospoviruses. *P Natl A Sci* 100(8): 4429–4434. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730832100>
- Sera T (2017) Use of peptide aptamers, cationic peptides and artificial zinc finger proteins to generate resistance to plant viruses. *Curr Opin Virol* 26: 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.07.023>
- Shan H, Li X, Liu L, Song D et al (2020) Recent advances in nanocomposite-based electrochemical aptasensors for the detection of toxins. *J Mater Chem B* 8(27): 5808–5825. <https://doi.org/10.1039/D0TB00705F>
- Sultan Y (2011) Development of Smart Materials Using Aptamer Based Bionanotechnologies. *PhD Thesis*. Carleton University, 206 pp
- Sun S, Zhao R, Feng S, Xie Y (2018) Colorimetric zearalenone assay based on the use of an aptamer and of gold nanoparticles with peroxidase-like activity. *Microchim Acta* 185(12). <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3078-x>
- Tittlemier SA, Brunkhorst J, Cramer B, DeRosa MC et al (2021) Developments in mycotoxin analysis: an update for 2019–2020. *World Mycotoxin J* 14(1): 3–26. <https://doi.org/10.3920/wmj2020.2664>
- Tombelli S, Minunni M, Mascini M (2007) Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis. *Biomol Eng* 24(2): 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.03.003>
- Truong PL, Duyen VTC, Toi V Van (2021) Rapid Detection of Tebuconazole Based on Aptasensor and Aggregation of Silver Nanoparticles. *J Nanomater*. <https://doi.org/10.1155/2021/5532477>
- Whalon ME, Mota-Sanchez D, Hollingworth RM (2008) Analysis of global pesticide resistance in arthropods. In: Whalon ME, Mota-Sanchez D, Hollingworth RM (eds) *Global Pesticide Resistance in Arthropods*. CAB International. 5–31. <http://dx.doi.org/10.1079/9781845933531.0005>
- Wang L, Liu X, Zhang Q, Zhang C et al (2012) Selection of DNA aptamers that bind to four organophosphorus pesticides. *Biotechnol Lett* 34(5): 869–874. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0850-6>
- Wu S, Duan N, Zhang W, Zhao S, Wang Z (2016) Screening and development of DNA aptamers as capture probes for colorimetric detection of patulin. *Anal Biochem* 508: 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.05.024>
- Wu S, Liu H, Liu Y (2012) Deoxynivalenol nucleic acid aptamer and application thereof. Invention patent CN102559686
- Wu Y, Zhan S, Wang L, Zhou P (2014) Selection of a DNA aptamer for cadmium detection based on cationic polymer mediated aggregation of gold nanoparticles. *Analyst* 139(6): 1550–1561. <https://doi.org/10.1039/c3an02117c>
- Xia X, He Q, Dong Y, Deng R et al (2020a) Aptamer-based homogeneous analysis for food control. *Curr Anal Chem* 16(1): 4–13. <https://doi.org/10.2174/1573411014666180810125737>
- Xia X, Zhang T, Deng S, Chen J et al (2020b) Visualization of Mycotoxins in Living Cells Using Conformation-Resolved Aptamer Nanoprobes. *ACS Sustain Chem Eng* 8(26): 9920–9925. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c03399>
- Xiao X, Hu S, Lai X, Peng J et al (2021) Developmental trend of immunoassays for monitoring hazards in food samples: A review. *Trends Food Sci Technol* 111: 68–88. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.045>
- Xu L, Callaway ZT, Wang R, Wang H et al (2015) A fluorescent aptasensor coupled with nanobead-based immunomagnetic separation for simultaneous detection of four foodborne pathogenic bacteria. *Trans ASABE* 58(3): 891–906. <https://doi.org/10.13031/trans.58.11089>
- Xu Q, Ye X, Ma X, Li H et al (2019) Engineering a peptide aptamer to target calmodulin for the inhibition of Magnaporthe oryzae. *Fungal Biol* 123(7): 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.04.005>
- Yadav GS, Parashar A, Aggarwal NK (2019) Aptamer: A Next Generation Tool for Application in Agricultural Industry for Food Safety. In: Yadav GS, Kumar V, Aggarwal NK (eds), *Aptamers: Biotechnological Applications of a Next Generation Tool*. Springer Singapore, Singapore, pp 175–186. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8836-1_12
- Yang C, Bie J, Zhang X, Yan C et al (2018) A label-free aptasensor for the detection of tetracycline based on the luminescence of SYBR Green I. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 202: 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.05.075>
- Yang C, Wang Y, Marty JL, Yang X (2011) Aptamer-based colorimetric biosensing of Ochratoxin A using unmodified gold nanoparticles indicator. *Biosens Bioelectron* 26(5): 2724–2727. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.032>
- Ye H, Duan N, Wu S, Tan G et al (2017) Orientation selection of broad-spectrum aptamers against lipopolysaccharides based on capture-SELEX by using magnetic nanoparticles. *Microchim Acta* 184(11): 4235–4242. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2453-3>
- Yi H, Yan Z, Wang L, Zhou X et al (2019) Fluorometric determination of ofloxacin by using an aptamer and SYBR Green I. *Microchim Acta* 186(10): 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3788-8>
- Yin X, Wang S, Liu X, He C et al (2017) Aptamer-based colorimetric biosensing of ochratoxin A in fortified white grape wine sample using unmodified gold nanoparticles. *Anal Sci* 33(6): 659–664. <https://doi.org/10.2116/analsci.33.659>
- Yue F, Li F, Kong Q, Guo Y et al (2021) Recent advances in aptamer-based sensors for aminoglycoside antibiotics

- detection and their applications. *Sci Total Environ* 762: 143129. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143129>
- Zhang G, Zhu C, Huang Y, Yan J et al (2018) A lateral flow strip based aptasensor for detection of Ochratoxin A in corn samples. *Molecules* 23(2): 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules23020291>
- Zhang, K, Li H, Wang W, Cao J et al (2020) Application of multiplexed aptasensors in food contaminants detection. *ACS Sens* 5(12): 3721–3738. <https://doi.org/10.3390/molecules23020291>

Plant Protection News, 2022, 105(1), p. 6–27

OECD+WoS: 4.01+AM (Agronomy)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-1-15186>

Full-text review

PROSPECTS FOR THE APPLICATION OF APTAMERS IN PLANT PROTECTION AND CROP PRODUCTION

A.A. Kovalenko^{1,2}, V.V. Sharoiko³, I.A. Kazartsev^{1*}

¹All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

²Infochemistry Scientific Center, ITMO University, St. Petersburg, Russia

³Pavlov First State Medical University of St. Petersburg, St. Petersburg, Russia

*corresponding author, e-mail: kazartsev@inbox.ru

In modern agriculture, there is a demand for alternative approaches to increase yields, to upgrade methods for detecting chemical contaminants, and to improve quality of phytosanitary diagnostics and the effectiveness of plant protection. One promising approach to addressing these issues is aptamer technology. Aptamers are oligonucleotide and peptide molecules capable of molecular recognition of both small inorganic and organic compounds, as well as proteins. Development of aptamers specific to the target molecule is performed *in vitro* using SELEX technology. Aptamer binding to the target follows principles common to antigen-antibody interaction. Due to this property, aptamers have found applications as targeted biological agents, «smart» materials, and new generation bioanalytical sensors. This review contains a brief analysis of the successes and prospects of applying aptamer technology in analytical monitoring and phytosanitary control. In particular, approaches and examples of aptamer-based test systems and sensors for detection of various compounds in natural objects, and related commercial products are discussed. Examples of aptamers application in development of “smart” fertilizers, innovative pesticides, and for engineering of plants resistant to viral diseases are also given.

Keywords: aptamers, oligonucleotides, peptides, food safety, plant protection, biosensors, nanofertilizers, pesticides

Submitted: 24.12.2021

Accepted: 28.02.2022