



Detecția multiplă și ultra-senzitivă a fragmentelor scurte de acizi nucleici, utilizând nanoparticule de aur și nanopori proteici

-NANOSENSEDNA-

Etapa 1 - Identificarea protocoalelor experimentale necesare studierii interacțiunilor dintre nanoparticule de aur (AuNPs) și acizi peptido - nucleici (Peptide Nucleic Acids-PNA) nefuncționalizați sau funcționalizați cu polipeptide.

Tehnica de electrofiziologie la nivel de singură moleculă cu ajutorul nanoporului proteic de α -hemolizină (α -HL) se bazează pe analiza statistică a variațiilor curentului ionic mediat de un singur nanopor inserat într-un bistrat lipidic biomimetic, produse în urma interacțiunii dintre nanopor și moleculele de interes. Analiza parametrilor precum durata și amplitudinea evenimentelor de blocare a curentului ionic mediat de nanopor, durata dintre două evenimente succesive de blocare, permit obținerea unor informații despre proprietățile fizico-chimice ale moleculei (volum, constante de asociere/disociere, etc.). După realizarea bistratului lipidic artificial planar prin tehnica *Montal-Mueller*, în zona *cis* a cuvei experimentale se adaugă soluția de monomeri de proteină α -HL, care se vor autoorganiza spontan sub forma unui canal ionic heptameric în membrana lipidică. La aplicarea unei diferențe de potențial de o parte și de alta a membranei cu ajutorul a doi electrozi Ag/Cl conectați la un amplificator, prin acest nanopor se va înregistra un curent ionic dat de electroliții din soluția electrofiziologică, K^+ și Cl^- . Interacțiunea reversibilă dintre analiți și nanopor, mediată de forțe electroforetice, electroosmotice și electrostatice, cauzează modificarea secțiunii transversale a nanoporului și implicit creșterea rezistența acestuia, ceea ce este vizualizat prin modificări ale amplitudinii curentului ionic.

În implementarea acestei etape, am propus o metoda de detecție selectivă și de discriminare a secvențelor specifice ale unor fragmente scurte de ADN monocatenar (ssDNA), caracteristice unor agenți patogeni cu ajutorul nanosenzorului molecular de α -HL, bazată pe modificările proprietăților de suprafață a nanoparticulelor de aur ca urmare a procesului de hibridizare dintre moleculele de acizi peptido-nucleici PNA adsorbite pe suprafața AuNP și secvențele complementare de ssDNA țintă. Primul pas îl constituie studierea ampretei specifice a interacțiunilor dintre nanopor și nanoparticulele de aur (5 nM AuNP) adăugate în aceeași parte *cis* în care au fost adăugați și monomerii proteici de α -HL (**Figura 1, II, a**). Aceste nanoparticule au fost funcționalizate cu citrat pentru a evita agregarea lor prin respingeri electrostatice. Ulterior, se adaugă în regiunea *cis* o soluție de PNA cu secvența complementară ADN-ului patogenului căutat, ceea ce va duce la agregarea AuNP prin ecranarea sarcinilor electrice negative (**Figura 1, II, b**). În final, se adaugă proba ssDNA în partea *cis*. Dacă proba conține secvența de ADN a patogenului ce se dorește a fi detectat, moleculele de ADN și PNA



complementare vor hibridiza, ceea ce va duce la ruperea agregatelor de AuNP-PNA și formarea unor complexe moleculare AuNP-PNA-DNA (**Figura 1, II, c**). Fiecare tip de complex molecular produce evenimente specifice de blocare a curentului ionic mediat de nanoporul proteic, ceea ce permite detecția selectivă a fragmentelor scurte de ADN monocatenar.

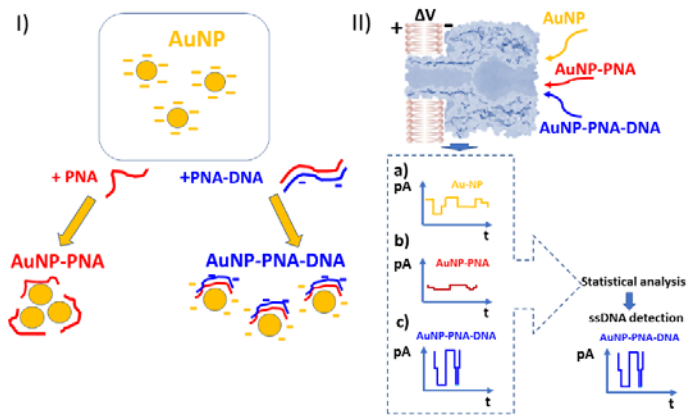


Figura 1. Protocol experimental schematizat de detecție a fragmentelor scurte de ADN monocatenar cu ajutorul sistemului AuNP/ α -HL:

I) AuNPs dispersate în soluție agregă în prezența moleculelor de PNA cationice, iar adăugarea ulterioară a secvențelor de ssDNA complementare cu PNA, perturbă agregatele AuNP în mod semnificativ.

II) Prin analiza statistică a evenimentelor de blocare a curentului ionic mediat de nanoporul proteic se poate identifica amprenta specifică a interacțiunilor dintre nanopor și: a) AuNP; b) AuNP-PNA; c) AuNP-PNA-DNA.

A I.1. Realizarea sistemelor conjugate AuNP- PNA funcționalizate sau nefuncționalizate cu grupare tiol.

Pentru a găsi condițiile optime de lucru astfel încât să minimalizăm probabilitatea de agregare a AuNPs funcționalizate cu citrat indusă de tăria ionică a soluției electrofiziologice și stabilizarea electrostatică a acestora și, de asemenea, să îmbunătățim sensibilitatea de detecție a ADN-ului monocatenar, am testat diferite soluții buffer în care au fost solubilizate AuNPs și am realizat spectrele UV-VIS aferente (**Figura 2.**), descrise mai jos. Pentru o concentrație de 100 nM a AuNPs solubilizate în citrat am obținut un maxim de absorbție la ~ 525 nm, care scade în valoare absolută, dar rămâne vizibil la aceeași lungime de undă atunci când soluția este diluată la 10 nM AuNPs în apă distilată. Într-o soluție electrofiziologică de KCl cu o concentrație de 0.1 M și după incubare de până la 30 de minute, există o ușoară deplasare a maximului de absorbție la ~ 530 nm, indicând prezența AuNP-urilor încă dispersate, în timp ce într-o soluție electrofiziologică de KCl cu o concentrație de 3 M am observat o deplasare a maximului de absorbție la ~ 580 nm, indicând agregarea AuNPs. Astfel, am ales concentrația de 0.1 M KCl pentru soluția electrofiziologica utilizată în protocolul experimental.

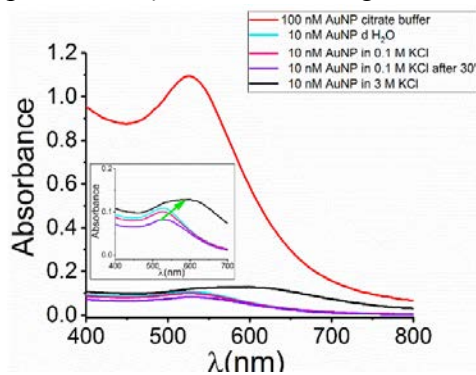


Figura 2. Spectrele de absorbție UV-VIS ale AuNPs (diametru 5 nm) funcționalizate cu citrat în diferite soluții buffer. [Mereuta et al., *Scientific Reports* (<http://www.nature.com/scientificreports>) | (2020) 10:11323]



A I.2. Evaluarea afinității și a eficienței de interacțiune cu AuNP a PNA (cu sau fără grupare tiol) în funcție de dimensiunea moleculară, gruparea tiol, dimensiunea conectorului și sarcina electrică netă a acestor PNA-uri (partea I).

Datele originale reprezentative din **Figura. 3**, obținute implementând protocolul experimental detaliat anterior, surprind principiul de detecție cu ajutorul sistemului AuNP- α -HL a fragmentelor scurte de ADN monocatenar (HCV - secvență asociată infecțiilor cu virusul hepatitei C). Datorită încărcării electrice negative nete a nanoparticulelor de aur acoperite cu citrat, acestea adăugate în *cis* (5 nM) sunt capturate reversibil la deschiderea vestibulului nanoporului în prezența unui potențial electric aplicat *trans* pozitiv, iar procesul este descris de evenimente specifice de blocare ale curentului ionic mediat de nanoporul α -HL (**Figura. 3, a**). Adăugarea ulterioară a moleculelor de PNA (1 μ M) în partea *cis* a dus la o reducere aproape completă (**Figura. 3, b**) a evenimentelor de blocaj induse de AuNPs ca urmare a agregării nanoparticulelor în urma adsorbției PNA pe suprafața lor, ceea ce duce la formarea agregatelor moleculare AuNP-PNA ale căror dimensiuni depășesc cu mult diametrul de deschidere a vestibulului α -HL, fiind astfel excluse de la captarea cu succes de către nanopor. După adăugarea secvențelor de ssADN complementare PNA-ului din sistem, se observă apariția unor evenimente de blocaj cu o amplitudine mai mică și un interval de timp mai mare față de evenimentele cauzate doar de AuNPs (**Figura. 3, c**), fiind identificată astfel o amprentă specifică unor posibile complexe moleculare AuNP-PNA-DNA.

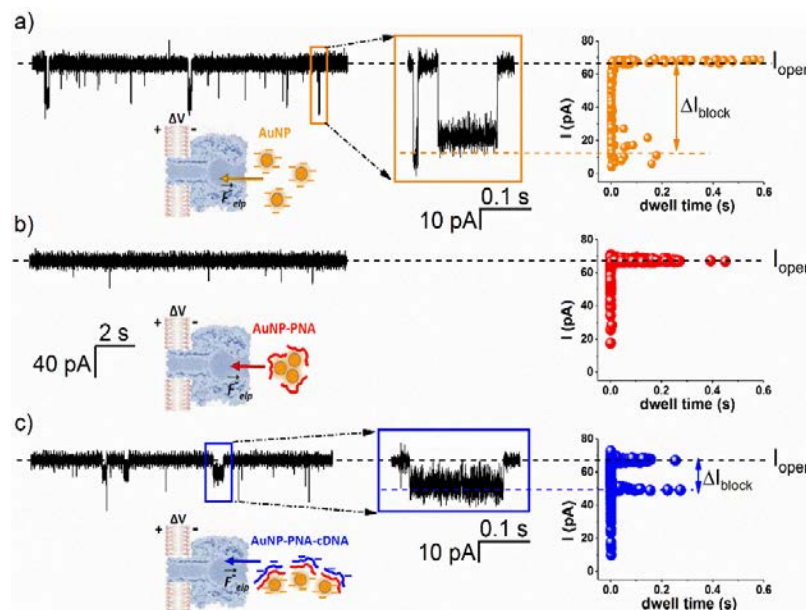


Figura 3. Detecția fragmentelor ssDNA cu sistemul biofizic constituit din nanoporul de α -HL și AuNP. Înregistrări electrofiziologice realizate în condiții de gradient de concentrație (*trans* 3 M KCl/*cis* 0.1 M KCl), pH neutru și $\Delta V = +70$ mV, ale evenimentelor de blocare a curentului ionic mediat de nanoporul de α -HL induse de interacțiunea acestuia cu 5 nM AuNP adăugate în partea *cis* a membranei, înainte (a) și după adăugarea succesivă în partea *cis* a moleculelor de 1 μ M PNA (b) și a fragmentelor de 4 μ M ADN complementar (cDNA - HCV) (c). Diagramele din partea dreaptă indică amplitudinea ($\Delta I_{\text{block}} = I_{\text{open}} - I_{\text{block}}$) și durata (τ_{off}) evenimentelor de blocare corespunzătoare fiecărui panel. [Mereuta et al., *Scientific Reports* | (2020) 10:11323]

Am reușit astfel să demonstrăm viabilitatea tehnicii propuse, urmând în etapele următoare să eficientizăm procesul de detecție specifică a fragmentelor scurte de ADN monocatenar, în condiții relevante clinic, cu ajutorul sistemului nanopor proteic-nanoparticule de aur.