



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

Etapa 2 (01.01.2021-31.12.2021)

Obiectiv 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.

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 II)

A I.3. Optimizarea condițiilor experimentale (concentrație și pH ale soluției electrofiziologice) necesare analizei sistemului nanopor-complex conjugat AuNP/PNA. Masurători experimentale și cuantificarea statistică a dinamicii de agregare a AuNP și de interacțiune a acestora cu nanoporul proteic înainte și după conjugarea cu PNA.

Obiectiv 2. Detecția secvențelor țintă de fragmente monocatenare de ADN (ssDNA) prin intermediul proceselor de hibridizare cu complexe conjugate AuNP-PNA.

A II.1. Evaluarea prin metode colorimetrice și calorimetrice a interacțiunilor mediate prin absorbție dintre AuNP neconjugate și fragmente țintă de ssDNA.

A II.2. Cuantificarea detecției fragmentelor țintă ssDNA cu ajutorul conjugatelor AuNP-PNA nefuncționalizate și funcționalizate cu grupare tiol.

A II.3 Studierea influenței proceselor de hibridizare a fragmentelor de ssDNA asupra stabilității de agregare a complexelor AuNP-PNA, în funcție de dimensiunea moleculară a AuNP, structura PNA (cu sau fără grupare tiol), tăria ionică și pH-ul mediului electrofiziologic.

A II.4. Detecția selectivă a variațiilor unei singure nucleotide (SNV) și a multiplelor nepotriviri în secvența fragmentelor ssDNA cu dimensiuni similare, bazată pe agregarea/dispersia nanoparticulelor, utilizând conjugate AuNP-PNA.

Obiectiv 3. Estimarea cantitativă și neamplificată a detecției secvențelor de ssDNA prin intermediul unui nanopor proteic, pe baza proceselor de hibridizare cu complexe PNA-AuNP.

A III.1. Detecția cu ajutorul unui nanopor proteic a nanoparticulelor de aur libere și conjugate cu PNA. Analiza parametrilor cantitativi care validează amprenta stochastică a interacțiunilor AuNP-nanopor proteic.(partea I)



În cadrul acestei etape am continuat studiile demarate în prima etapă pentru a stabili protocoalele experimentale potrivite pentru a studia interacțiunile dintre nanoparticule de aur (AuNPs) și acizi peptido - nucleici (Peptide Nucleic Acids-PNA) nefuncționalizați sau funcționalizați cu polipeptide. Strategia pe care am urmărit-o a fost de a realiza detecția unor secvențe scurte de ADN monocatenar (ssDNA) specifice infecției cu virusul hepatitei C (HCV), bazat pe capacitatea acestora de a hibridiza cu secvențe complementare de PNA (PNA2), cât și pe proprietatea AuNP de a forma complexe conjugate cu PNA. Pentru a evidenția detecția selectivă a hibrizilor complementari, am folosit și o altă secvență monocatenară scurtă de ADN, specifică infecției cu virusul gripal (H1N1), necomplementară cu PNA. Secvențele primare ale acestora sunt trecute în **Tabel 1**.

Tabel 1: Secvența primară a polinucleotidelor, precum și rolul pe care îl au acestea în studiul realizat. Conform convenției, capătul N terminal al moleculei de PNA este denotat cu 5'.

Denumire	Rol	Secvența primară
PNA2	proba	5'-CCCACCCGCAGCCCTCATTA-3'
HCV	țintă	5'-TAATGAGGGCTGCGGGTGGG-3'
H1N1	control negativ	5'-ACGGAAGGAGTGCCAA-3'

Pentru a studia fezabilitatea modelului propus în prima etapă pentru detecția ssDNA cu ajutorul unui sistem format de un nanopor proteic și complexe conjugate de AuNP-PNA, am utilizat tehnica spectroscopică UV-VIS, bazată pe proprietățile de rezonanță plasmonică de suprafață a nanoparticulelor și am investigat procesele de agregare a AuNP induse de PNA, în prezența și în lipsa unor secvențe scurte de ADN monocatenare, în concentrație cunoscută. După înregistrarea spectrelor de absorbție UV-VIS pentru AuNP dispersate în soluție, concentrația nanoparticulelor se calculează utilizând legea Lambert-Beer și coeficientul de extincție al AuNP (cu diametrul de 5nm) cunoscut din literatură.

Ulterior ne-am propus să realizăm o estimare cantitativă și neamplificată a detecției secvențelor de ssDNA cu ajutorul unui nanopor proteic, prin identificarea unor semnale caracteristice ce indică prezența moleculelor de ADN monocatenar în soluția electrofizologică, prin intermediul proceselor de hibridizare cu complexe conjugate de AuNP-PNA cu secvență complementară.

În **Figura 1** sunt reprezentate spectrele de absorbție UV-VIS înregistrate pentru a observa interacțiunea moleculelor de PNA2 cu AuNP, pe baza proceselor de agregare a nanoparticulelor. Pentru a realiza acest studiu, în primul pas s-a înregistrat spectrul de absorbție al unei soluții de AuNP (5 nM) stabilizate cu citrat, dispersate într-o soluție buffer 0,1 M KCl, al cărei concentrații a fost determinată așa cum am menționat mai sus. Maximul de absorbție al



AuNP ($A_{\max} = 0.06$) se găsește în jurul valorii de 520 nm a lungimii de undă (**Figura 1**, curba reprezentată cu negru).

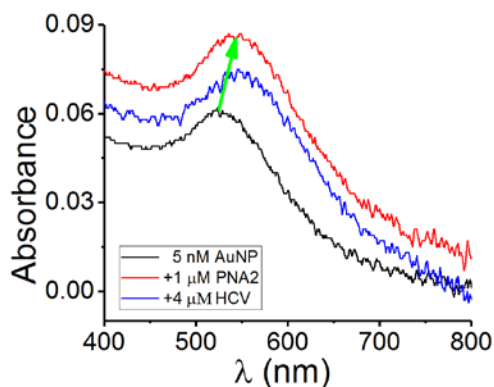


Figura 1: Spectrele de absorbție UV-VIS înregistrate pentru monitorizarea agregării AuNP (5 nM), la interacțiunea cu molecule de PNA2 (1 μM), respectiv secvențe complementare de ADN – HCV (4 μM), observându-se o deplasare ireversibilă a benzii plasmonice de absorbție, indicată de săgeata verde. (adaptat din L. Mereuta et al., *Scientific Reports*, 2020, 10)

În al doilea pas, peste AuNP se adaugă molecule de PNA2 (1 μM), iar în spectrul de absorbție se observă o deplasare a benzii plasmonice de la lungimea de undă cu valoarea 520 nm la 550 nm (**Figura 1**, curba reprezentată cu roșu, deplasarea fiind indicată de săgeata verde), cu maximul de absorbție $A_{\max} = 0.086$. Această modificare a spectrului arată că are loc agregarea AuNP datorită interacțiunii moleculelor PNA2 cu acestea. Soluția coloidală este destabilizată din cauză că moleculele de PNA2 sunt adsorbite la suprafața AuNP, înlocuind moleculele de citrat, ceea ce duce la o scădere a sarcinilor negative (*D. Murphy et al., Helv. Chim. Acta*, 2004, 87 (11); *R. Kanjanawarut și X. Su, Anal. Chem.* 2009, 81 (15)).

În pasul următor, peste soluția de AuNP funcționalizate cu PNA2 s-au adăugat molecule de ADN monocatenar cu secvență complementară (HCV) în concentrație 4 μM, fiind în exces față de PNA2. Deși ne așteptam ca hibridizarea ce are loc între secvențele complementare de PNA2 și HCV să mărească sarcina electrică negativă de la suprafața AuNP, iar procesul de agregare indus de moleculele de PNA să fie reversibil, aceasta acțiune nu are loc, observându-se o scădere a maximului de absorbție ($A_{\max} = 0.073$) la aceeași lungime de undă corespunzătoare spectrului înregistrat cu nanoparticulele agregate prin adsorbția moleculelor de PNA (**Figura 1**, curba albastră).

În prima etapă a acestui proiect s-a demonstrat prin spectrele de absorbție UV-VIS pentru AuNP, realizate în diferite substanțe, efectul sării asupra stării de agregare ale nanoparticulelor și s-a ales pentru protocolul experimental utilizarea soluției electrofiziologice de KCl în concentrație 0,1 M. Astfel, pentru a evita agregarea AuNP indusă de tăria ionică a sării, regiunea *cis* a cuvei experimentale pentru tehnica electrofiziologică, în care se va realiza detecția, se umple cu soluție electrolitică 0,1 M KCl, menținută la pH ~ 7 cu soluție buffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris). În schimb, regiunea *trans* se umple cu soluție KCl de concentrație 3M, pentru a asigura un gradient de salinitate prin nanopor, ce are rolul de a amplifica rata de captare a AuNP, precum și de a eficientiza raportul semnal-zgomot. Odată ce un singur nanopor



proteic de α -HL este inserat în membrana lipidică ce desparte cele două regiuni, curentul ionic rezidual, cauzat de caracteristica porului de a fi ușor anionic selectiv la pH neutru, se aduce la valoarea zero din amplificator. Măsurătorile experimentale se realizează prin aplicarea unor diferențe de potențial pozitive, în raport cu electrodul legat la masă (*cis*), iar nanoparticulele anionice vor fi transportate electroforetic către vestibulul nanoporului. Datorită modificărilor fizice ale AuNP (dimensiuni, sarcină electrică) ce apar ca urmare a conjugării cu PNA, experimentele electrofiziologice oferă o diferențiere clară între AuNP libere și complexele conjugate AuNP, prin modificarea parametrilor, precum timpul și amplitudinea, ce descriu fluctuațiile curentului ionic, asociate cu interacțiunile reversibile ale AuNP cu nanoporul proteic. Prin interpretarea statistică a acestor fluctuații se poate urmări dinamica de agregare a AuNP.

Cu scopul de a verifica posibilitatea de a pune în practică metoda de detecție a fragmentelor țintă de ssDNA în cazul în care acestea sunt prezente în sisteme biologice complexe, am studiat comportamentul AuNP neconjugate, respectiv conjugate cu PNA2 și interacțiunea cu proteine serice. Pentru această analiză, AuNP (5 nM) au fost suspendate într-o soluție 0,1 M KCl, peste care s-au adăugat incremental diferite concentrații de ser uman (HS): 3%, respectiv 10%. Din spectrele de absorbție ilustrate în **Figura 2, a**) se observă o descreștere graduală a absorbanței (de la $A_{\max} = 0.06$ (0% HS) la $A_{\max} = 0,055$ (3%), respectiv $A_{\max} = 0,048$ (10% HS)), precum și o deplasare a benzii plasmonice spre lungimi de undă mai mari (de la $\lambda = 528$ nm la $\lambda = 532$ nm, respectiv $\lambda = 535$ nm). Aceste observații sugerează adsorbția proteinelor serice pe suprafața AuNP și predilecția nanoparticulelor la agregare.

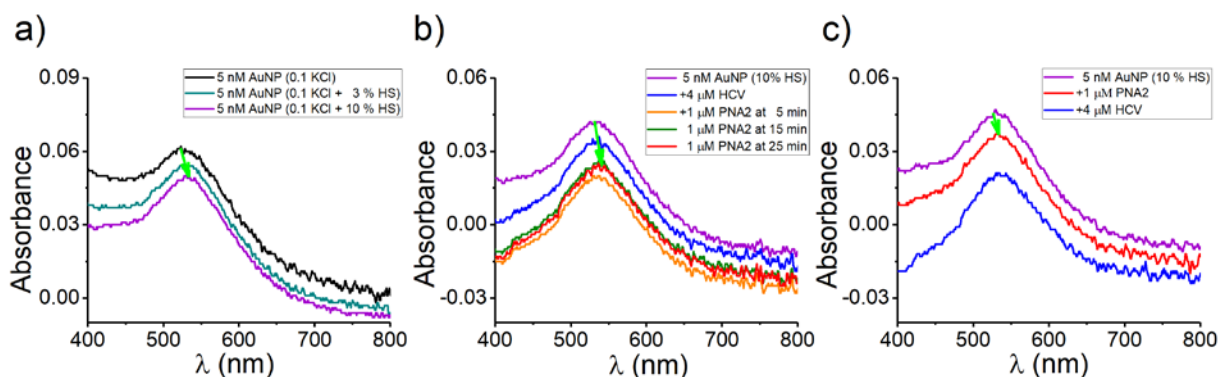


Figura 2: Spectrele de absorbție UV-VIS ce descriu efectele serului uman (HS) asupra proceselor de agregare a AuNP. a) adăugarea graduală de HS (3%, 10%) duce la agregarea AuNP (5 nM), observabilă prin deplasarea benzii plasmonice și descreșterea maximului de absorbție; b) spectrele înregistrate pentru soluția de AuNP, în prezența a 10% HS, peste care se adaugă secvențe de HCV (4 μ M), apoi molecule de PNA2 (1 μ M); c) ordinea în care sunt adăugați analiții peste soluția de AuNP ce conține 10% HS, este inversată. Săgeata verde indică deplasarea benzii plasmonice de absorbție. (adaptat din L. Mereuta et al., *Scientific Reports*, 2020, 10)



Ulterior, peste soluția de AuNP ce conține 10% HS s-au adăugat consecutiv fragmentele țintă de ssDNA (HCV, 4 μ M) și secvențe complementare de PNA2 (1 μ M) și s-au înregistrat spectrele de absorbție UV-VIS pentru timpi diferiți de incubare (Figura 2, b). Într-un experiment diferit, se inversează ordinea adăugării analiților peste AuNP (Figura 2, c). Se observă o descreștere graduală a absorbanței AuNP și o ușoară deplasare a benzii plasmonice ce poate fi neglijată. Având în vedere aceste rezultate, este posibil ca metoda spectrală de detecție a unor fragmente ssDNA, pe baza utilizării AuNP și molecule PNA, să întâmpine dificultăți la aplicarea în probe medicale, fiind relevant astfel utilizarea biosenzorului molecular bazat pe sistemul α -HL/AuNP/PNA.

În vederea verificării sensibilității a tehnicii spectroscopice UV-VIS pentru detecția fragmentelor țintă ssDNA cu ajutorul conjugatelor AuNP-PNA, s-a realizat un experiment în care s-au utilizat concentrații de ordinul nanomolar ale reactanților. În urma acestor înregistrări am obținut spectrele de absorbție UV-VIS, reprezentate în **Figura 3**, pentru soluția de AuNP (5 nM) dispersate în 0,1 M KCl în care se observă maximum de absorbție ($A_{\max} = 0.069$) localizat la 529 nm. După ce se adaugă molecule de PNA2 (5 nM) în această soluție, se observă o deplasare a benzii plasmonice spre 544 nm, cu maximum de absorbție $A_{\max} = 0.077$. Ulterior, se adaugă secvențe complementare de HCV (5 nM), dar banda plasmonică de absorbție nu se modifică. Întrucât nu există o diferențiere clară între cele două spectre, așa cum a fost observată mai sus, investigarea fragmentelor scurte de ssDNA în concentrații atât de mici, utilizând tehnica spectroscopică bazată pe procesele de agregare a AuNP indusă de PNA, devine dificilă.

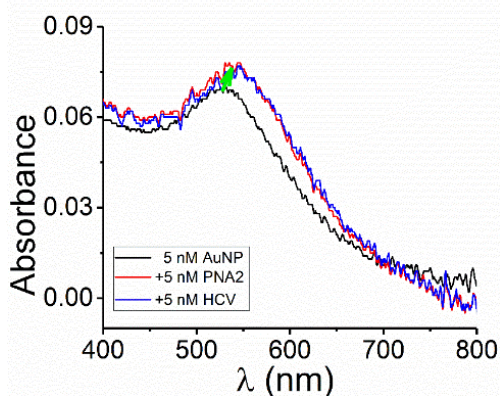


Figura 3: Spectrul de absorbție UV-VIS aferent soluției de AuNP (5nM) înainte și după adăugarea succesivă de molecule PNA2 (5nM), respectiv secvențe complementare de HCV (5nM). (L. Mereuta et al., *Scientific Reports*, 2020, 10)

Pentru a studia influența proceselor de hibridizare a fragmentelor de ssDNA asupra stabilității de agregare a complexelor AuNP-PNA, am realizat un experiment diferit, în care peste AuNP (5 nM) s-a adăugat un amestec realizat prin hibridizarea dintre molecule de PNA2 (1 μ M) și secvențe complementare de HCV (4 μ M), lăsat la incubat anterior. Din spectrul de absorbție UV-VIS, ilustrat în **Figura 4**, nu se observă o deplasare a benzii plasmonice, ceea ce înseamnă că agregarea AuNP nu are loc din cauza interacțiunilor de respingere electrostatică dintre PNA2-HCV și AuNP, produse între sarcinile electrice negative din fragmentele de ssDNA și cele de la suprafața AuNP funcționalizate cu citrat.

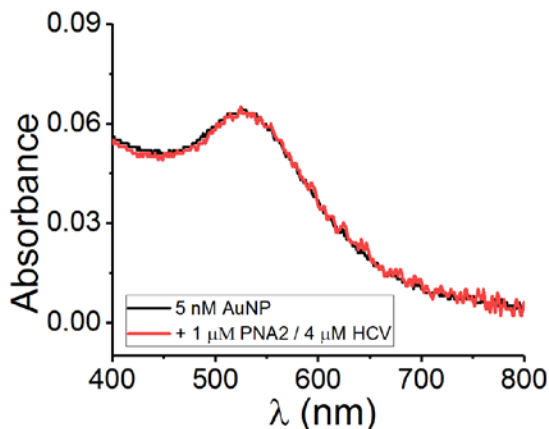


Figura 4: Spectrul de absorbție UV-VIS corespunzător soluției de AuNP (5 nM) peste care s-au adăugat complexe hibridizate PNA2-HCV (1:4 μM), incubate în prealabil. (adaptat din L. Mereuta et al., *Scientific Reports*, 2020, 10)

Într-un experiment separat, realizat cu aceeași tehnică spectroscopică UV-VIS, bazată pe agregarea/dispersia nanoparticulelor, utilizând conjugate AuNP-PNA, am dorit să evaluăm influența multiplelor nepotriviri în secvența fragmentelor ssDNA, cu dimensiuni similare. În acest caz, am lăsat la preincubat molecule de PNA2 (1 μM) cu secvențe monocatenare necomplementare de ADN, numite H1N1 (4 μM). Acest amestec a fost adăugat peste soluția electrolitică ce conține AuNP (5 nM) dispersate. În spectrul de absorbție UV-VIS, din **Figura 5**, se observă o deplasare a benzii plasmonice de absorbție, de la lungimea de undă 525 nm ($A_{\max} = 0.064$) la 535 nm ($A_{\max} = 0.072$), corespunzătoare agregării AuNP după adăugarea amestecului. Acest proces are loc datorită conjugării între moleculele de PNA2 nehibridizate și AuNP.

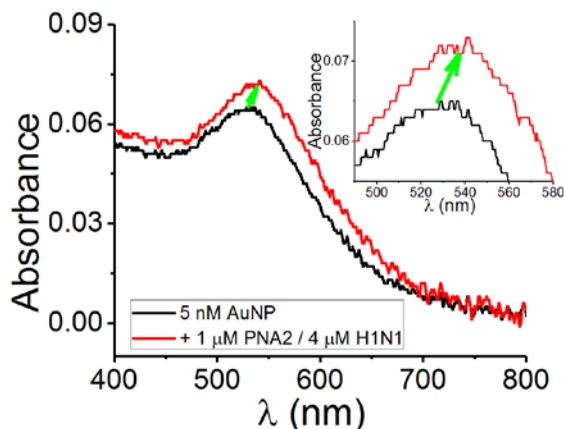


Figura 5: Spectrul de absorbție UV-VIS înregistrat pentru soluția de AuNP (5 nM) peste care se adaugă un amestec preincubat format din molecule de PNA2 (1 μM) și secvențe necomplementare de H1N1 (4 μM). (adaptat din L. Mereuta et al., *Scientific Reports*, 2020, 10)

În cadrul acestei activități am utilizat tehnica electrofiziologică la nivel de singură moleculă, descrisă în prima etapă, bazată pe un nanopor proteic inserat într-o membrană lipidică, pentru a detecta AuNP, fie libere sau conjugate cu PNA. Din datele obținute în etapa precedentă, analiza evenimentelor de blocare induse de adăugarea succesivă în partea *cis* a



analizilor (în ordinea: AuNP → PNA2 → H1N1 → HCV) a demonstrat posibilitatea de detecție a unor fragmente scurte specifice de ADN monocatenar aflate într-o soluție mixtă cu fragmente diferite de ADN, având aplicabilitate relevantă pentru tehnicile de detecție selectivă sau multiplă a fragmentelor scurte de ADN monocatenar. În completarea acestor rezultate, am demonstrat eficiența utilizării sistemului α -HL/AuNP/PNA de detecție a fragmentelor scurte monocatenare de ADN, și în situația în care s-au adăugat soluții de ADN complementar sau necomplementar, preincubate anterior cu PNA.

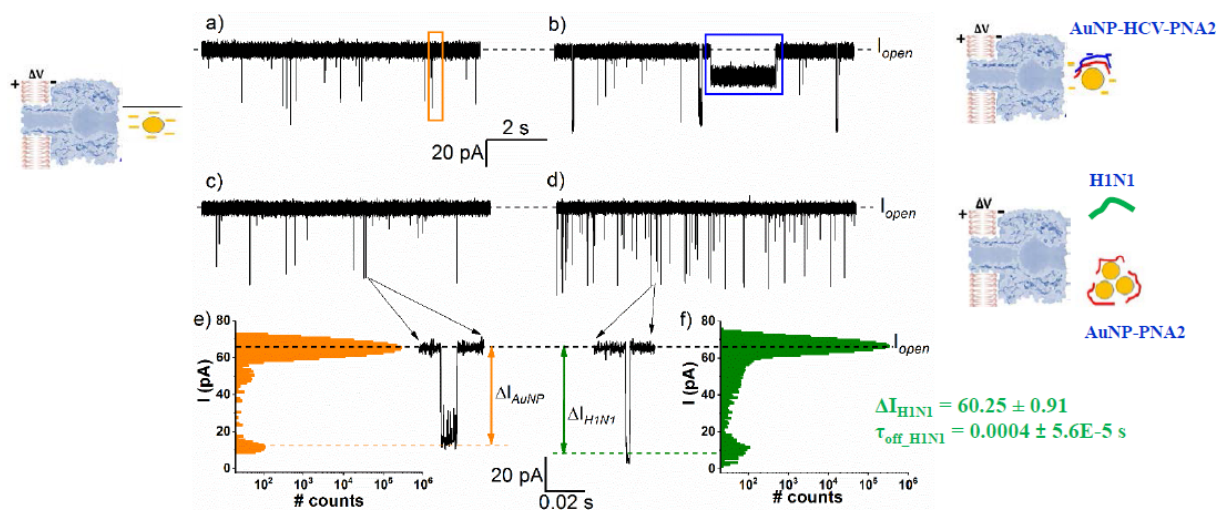


Figura 6. Înregistrări electrofiziologice realizate în condiții de gradient de concentrație (*trans* 3 M KCl/*cis* 0.1 M KCl), pH neutru și $\Delta V = +80$ mV, ale curentului ionic mediat de nanoporul de α -HL în prezența a 5nM AuNP (a, c) înainte și după adăgarea ulterioară a amestecurilor preformate dintre 1 μ M PNA2 și 4 μ M ADN complementar *HCV* (b) sau necomplementar *H1N1* (d). [Mereuta L. et al, Scientific Reports, 2020]

În figura 6 se pot observa evenimentele de blocaj distincte induse de interacțiunea nanoporului proteic cu AuNP (panele a, c) sau cu fragmentele libere de ADN necomplementar cu PNA2 (panel d). Adăgarea ulterioară în partea *cis* a membranei, a complexelor preformate de PNA - ADN complementar (*PNA2/HCV*) duce la apariția unor evenimente de blocare (figura 6 panel b) identice cu cele observate în experimentele anterioare (figura 6 panel c) în care s-au adăugat succesiv PNA2 și respectiv HCV și care sunt asociate interacțiunilor dintre nanopor și complexele moleculare AuNP/PNA2/HCV. În situația în care s-au adăugat soluții mixte de PNA-ADN necomplementar (*PNA2/H1N1*), singurele evenimente de blocare detectate corespund proceselor de translocare prin nanopor a fragmentelor libere de H1N1, asemănătoare din punct de vedere cinetic cu evenimentele de blocaj înregistrate în prezența fragmentelor libere de ADN.



Întrucât nanoparticulele de AuNP (5 nM) funcționalizate cu citrat prezintă sarcină electrică negativă la suprafață, ele sunt transportate electroforetic către gura porului și captate reversibil, atunci când se aplică o diferență de potențial pozitivă la *trans*. În urma interacțiunii AuNP cu nanoporul de α -HL, se observă o serie de evenimente de blocaj a curentului ionic prin por, descrise de amplitudinea ΔI ($\Delta I = I_{\text{open}} - I_{\text{block}}$) și durata medie a acestora (τ_{off}). Din analiza statistică a timpului mediu de interacțiune a nanoparticulelor cu nanoporul proteic de α -HL (7), s-a observat creșterea acestor valori, odată cu diferența de potențial aplicată (ΔV). Acest lucru ne indică faptul că procesul de disociere a AuNP de nanopor este defavorizat, ceea ce are sens, întrucât în timpul acestui proces nanoparticulele anionice se mișcă în direcția opusă câmpului electric.

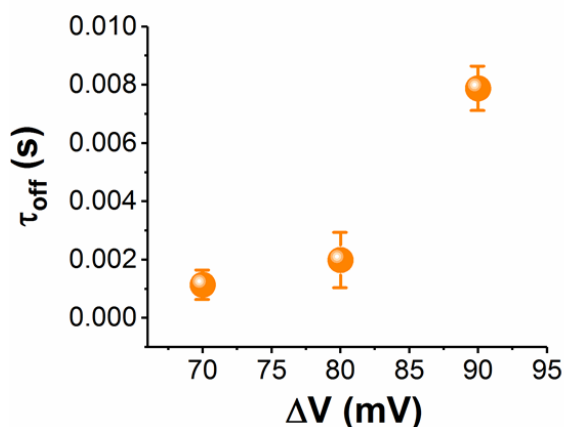


Figura 7: Variația timpului mediu al evenimentelor de blocaj cu diferența de potențial aplicată, în cazul interacțiunii AuNP cu nanoporul proteic. (L. Mereuta et al., Scientific Reports, 2020, 10)

Acestea fiind menționate, sunt îndeplinite obiectivele propuse pentru desfășurarea celei de a doua etape a proiectului, demonstrând detecția unor secvențe țintă de fragmente monocatenare de ADN, prin intermediul proceselor de hibridizare cu complexe conjugate AuNP-PNA.

Dissemination of scientific results - Article:

1. Asandei, A; Mereuta, L; Schiopu, I; Park, Y; Luchian, T. *Teaching an old dog new tricks: A lipid membrane-based electric immunosensor for real-time probing of the spike S-1 protein subunit from SARS-CoV-2*, **2021**, **PROTEOMICS**, DOI10.1002/pmic.202100047
2. Luchian, T; Mereuta, L; Park, Y; Asandei, A; Schiopu, I. *Single-molecule, hybridization-based strategies for short nucleic acids detection and recognition with nanopores*, **2021**, **PROTEOMICS**, DOI10.1002/pmic.202100046
3. Dragomir, IS; Asandei, A; Schiopu, I; Bucataru, IC; Mereuta, L; Luchian, T. *The Nanopore-Tweezing-Based, Targeted Detection of Nucleobases on Short Functionalized Peptide Nucleic Acid Sequences*, **2021**, **POLYMERS**, DOI10.3390/polym13081210
4. Schiopu, I; Asandei, A; Mereuta, L; Dragomir, I; Bucataru, C; Luchian, T. *SINGLE-MOLECULE DETECTION AND MANIPULATION WITH BIOLOGICAL NANOPORES*, **2021**, **STUDIA UNIVERSITATIS BABES-BOLYAI CHEMIA**, DOI10.24193/subbchem.2021.3.09