



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

-NANOSENSEDNA-

Etapa 3 (01.01.2022-31.08.2022)

Obiectiv III. 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. Detectia cu ajutorul unui nanopor proteic a nanoparticulelor de aur libere si conjugate cu PNA. Analiza parametrilor cantitativi care valideaza amprenta stochastica a interactiunilor AuNP-nanopor proteic (partea a II-a).

A III.2. Detectia fragmentelor tinta ssDNA cu ajutorul unui nanopor proteic in solutii electrolitice, prin intermediul hibridizarii acestora cu sisteme conjugate PNA-AuNP.

A III.3. Detectia selectiva si multipla la nivel de nanopor unic, a fragmentelor individuale de ssDNA tinta din amestecuri complexe si estimarea prezentei multiple a mutatiilor din secventa DNA (SNVs) prin intermediul proceselor de hibridizare a acestora cu conjugate PNA-AuNP. Analiza cineticii interactiunilor de hibridizare a ssDNA cu conjugate (PNA-AuNP) prin intermediul nanoporului proteic.

Diseminarea rezultatelor științifice

Articole:

1. *A Single-Molecule Insight into the Ionic Strength-dependent, Cationic Peptide Nucleic Acids-Oligonucleotides Interactions*; ASANDEI Alina, MEREUTA Loredana, Bucataru Ioana C., Park Yoonkyung, Luchian Tudor; 2022, **CHEMISTRY-AN ASIAN JOURNAL**

2. *A Nanopore Sensor for Multiplexed Detection of Short Polynucleotides Based on Length-Variable, Poly-Arginine- Conjugated Peptide Nucleic Acids*; MEREUTA Loredana, ASANDEI Alina, DRAGOMIR Isabela, Park Jonggwan, Park Yoonkyung, Luchian Tudor; 2022, **Analytical Chemistry**

3. *Probing the Hepatitis B Virus E-Antigen with a Nanopore Sensor Based on Collisional Events Analysis*, Ioana C. Bucataru, Isabela Dragomir, Alina Asandei, Ana-Maria Pantazica, Alina Ghionescu, Norica Branza-Nichita, Yoonkyung Park, Tudor Luchian; 2022, **Biosensors**

Conferințe:

1. International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences, 2022 - Poster: *Detection of nucleobases on short functionalized peptide-nucleic acid sequences using nanopore-tweezing method*

2. International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences, 2022 - Poster: *Protein nanopore-based method for sequence specific detection of single-stranded DNA using gold nanoparticles and peptide nucleic acids*



Implementând metode din domeniul nanotehnologiei bazate pe nanopori proteici și nanoparticule de aur (AuNPs) funcționalizate cu acizi nucleici, am validat strategia de utilizare a acizilor nucleici peptidici (PNA) ca ținte extrem de specifice pentru captarea și recunoașterea fragmentelor scurte monocatenare de ADN (ssDNA), prin procese de hibridizare specifică, datorită afinității și selectivității mai mari ai PNA pentru ssDNA.

Ținând cont de detaliile structurale ale nanoporului de α - hemolizină (având diametrul zonei de vestibul de ~ 2.6 nm), în experimentele derulate, toți analiții (AuNP, PNA, ssDNA) au fost adăugați succesiv în partea cis a membranei lipidice în care a fost inserat nanoporul proteic, facilitând astfel identificarea interacțiunilor specifice dintre nanopor și nanoparticulele de aur (care au diametrul de 5 nm).

O etapă crucială în derularea experimentelor a fost de a menține un gradient de concentrație ionică de o parte și de cealaltă a membranei lipidice (trans 3 M KCl / cis 0.1 M KCl), ceea ce a oferit două avantaje majore platformei de detecție a ssADN și anume:

- (i) tăria ionică de 0.1 M NaCl din compartimentul cis asigură menținerea stabilității AuNP, minimalizând efectele de agregare a nanoparticulelor de aur, induse de concentrații ionice mari ale mediului fiziologic;
- (ii) creșterea atât a ratei de asociere a AuNP cu nanoporul proteic cât și a raportului semnal/zgomot a evenimentelor de blocare asociate acestor interacțiuni.

În etapa finală a proiectului, pentru a testa gradul de selectivitate al sistemului α -HL/AuNP/PNA de a detecta fragmente specifice de ADN din probe contaminate cu alte fragmente de ADN, cu relevanță pentru situațiile reale, am implementat protocoale experimentale similare celor prezentate în etapele anterioare, dar în care, ulterior agregării AuNP induse de PNA, s-au adăugat succesiv fragmente de ADN necomplementare (nDNA - H1N1) respectiv complementare (cDNA-HCV) cu PNA2, detaliate în figura I.

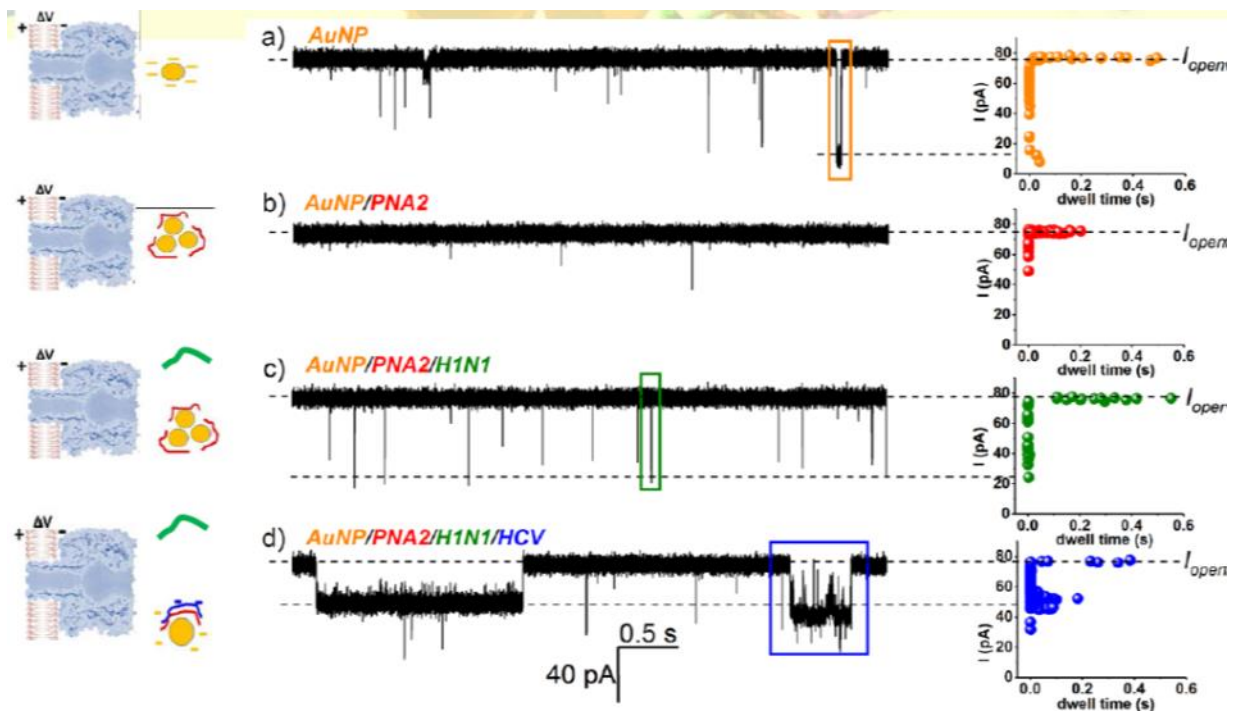


Figura I. Detecția cu ajutorul sistemului biofizic α -HL /AuNP/PNA, a unei secvențe specifice de ssDNA (HCV) din probe contaminate cu alte fragmente ssDNA (H1N1). Datele originale înregistrate la $\Delta V = +70$ mV, în condiții de gradient de concentrație (trans 3 M KCl/cis 0.1 M KCl) și pH neutru, reflectă interacțiunile dintre nanoporul proteic de α -HL și analiții adăugați succesiv în partea cis după următoarea ordine: 5nM AuNP(a) \rightarrow 5nM PNA2(b) \rightarrow 15nM H1N1(c) \rightarrow 50nM HCV(d). Ilustrațiile din partea stângă indică schematizat interacțiunile dintre nanopor și analiții adăugați succesiv iar 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 L. et al, Scientific Reports, 2020]

Analiza statistică a evenimentelor distincte de blocare evidențiate în figura I, a permis diferențierea clară ca durată și amplitudine a interacțiunilor dintre nanoporul proteic și:

- (a) nanoparticulele de aur ($\Delta I_{\text{AuNP}} = 48.1 \pm 0.8$ pA, $\tau_{\text{off_AuNP}} = 0.001 \pm 5E-4$ s),
- (c) fragmentele scurte libere de ADN monocatenar necomplementar - nDNA ($\Delta I_{\text{H1N1}} = 57.3 \pm 0.8$ pA, $\tau_{\text{off_H1N1}} = 0.0016 \pm 0.001$ s)
- (d) complexele moleculare formate între AuNP asociate cu PNA2 hibridizat de ADN complementar -cDNA ($\Delta I_{\text{Au/PNA2/HCV}} = 15.4 \pm 0.4$ pA, $\tau_{\text{off_Au/PNA2/HCV}} = 0.12 \pm 0.01$ s).



Așadar, analiza evenimentelor de blocare induse de adăugarea succesivă în partea cis a analiților (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.

Pentru a identifica gradul de sensibilitate al sistemului α -HL/AuNP/PNA, am monitorizat detecția specifică a unor fragmente de ADN, la concentrații ale acestora în domeniul nanomolar, așa cum se regăsesc în situațiile reale, reușind astfel să demonstrăm aplicabilitatea acestei tehnici pentru probe clinice, ținând cont de faptul că măsurătorile spectrofotometrice nu permit detecția eficientă a concentrațiilor mici de ssADN (în domeniul nM), așa cum am demonstrat în prima etapă a proiectului.

În figura II, se observă că probabilitatea de hibridizare dintre moleculele de PNA2 și fragmentele monocatenare de ADN complementar (HCV) sau necomplementar (H1N1) acestora, poate fi discernabilă, chiar și la concentrații în domeniul nanomolar (5nM), prin intermediul evenimentelor de blocare distincte asociate interacțiunilor dintre nanoporul proteic și complexele moleculare AuNP/PNA2/HCV, cuantificate prin parametrii: $\Delta I_{\text{Au/PNA2/HCV}} = (20.5 \pm 0.3) \text{ pA}$ și $\tau_{\text{off_Au/PNA2/HCV}} = (0.72 \pm 0.07) \text{ s}$ (figura II panel c).

Așa cum s-a demonstrat și în experimentele anterioare și cum se observă din înregistrările realizate în experimente diferite prezentate în figura II- paneluri b și e, prezența moleculelor de acizi peptido nucleici (5 nM PNA2) induce agregarea nanoparticulelor de aur, cuantificabilă prin dispariția evenimentelor de blocare asociate interacțiunii acestora cu nanoporul proteic, cum sunt indicate în figura II paneluri a și d ($\Delta I_{\text{AuNP}} = 57 \pm 1.2 \text{ pA}$; $\tau_{\text{off_AuNP}} = 0.002 \pm 9.5 \text{E-}4 \text{ s}$). Adăugarea ulterioară a fragmentelor ADN necomplementar (H1N1) în concentrație de 5 nM, determină apariția doar a evenimentelor de blocare (în figura II panel f) asociate proceselor de translocare prin nanoporul proteic a fragmentelor de ADN, așa cum au fost detaliate și analizate anterior în studiile noastre, fiind caracterizate de parametrii: $\Delta I_{\text{H1N1}} = 61.7 \pm 0.9 \text{ pA}$ și $\tau_{\text{off_H1N1}} = 0.0002 \pm 4.1 \text{E-}5 \text{ s}$. Așadar, amprenta distinctă a curentului ionic măsurat prin intermediul platformei α -HL/AuNP/PNA, poate să ne ofere



detalii despre procesele de hibridizare specifică între structuri PNA și fragmente ssDNA complementare, făcând posibilă detecția unor secvențe specifice de ADN monocatenar prezent în concentrații de ordinul nanomolar, așa cum este cazul probelor biologice din situațiile reale.

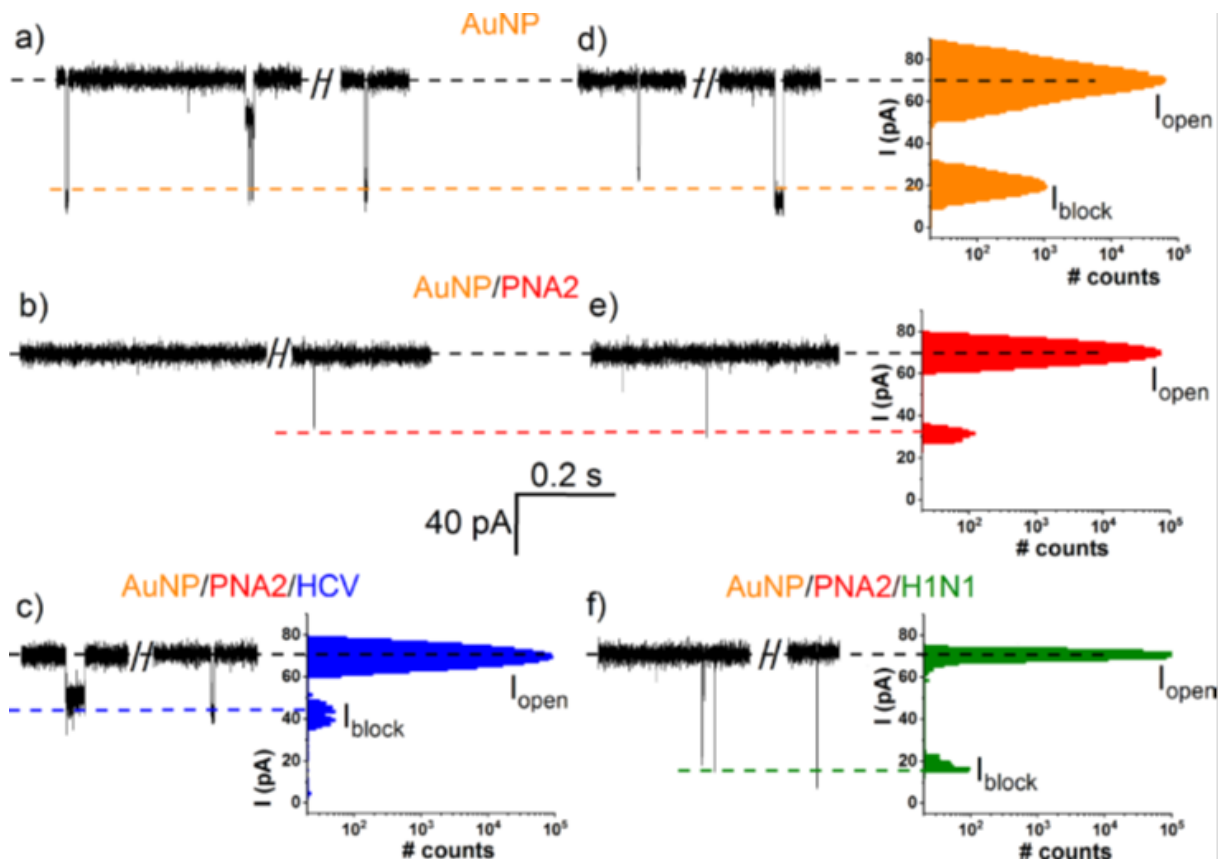


Figura II. Detecția cu ajutorul sistemului α -HL/AuNP/PNA, a fragmentelor specifice de ssDNA la concentrații ale acestora în domeniul nanomolar. Înregistrări electrofiziologice ale curentului ionic mediat de nanoporul de α -HL (la $\Delta V = +80$ mV), realizate în experimente diferite în care s-a adăugat succesiv în partea cis a membranei: 5nM AuNP (a, d), 5nM PNA2 (b, e) și 5nM ADN complementar HCV (c) sau ADN necomplementar H1N1 (f), împreună cu histogramele de amplitudini corespunzătoare fiecărui semnal înregistrat. [Mereuta L. et al, *Scientific Reports*, 2020]



În concluzie, utilizând sistemul α -HL/AuNP/PNA ca transductor molecular pentru detecția individuală a fragmentelor scurte monocatenare de ADN (ssDNA), prin analiza interacțiunilor specifice dintre nanoporul proteic și nanoparticulele de aur în prezența moleculelor de PNA hibridizate cu fragmente complementare de ssDNA, am obținut un grad ridicat de specificitate (prin contaminarea probei de ssDNA complementar cu alte secvențe necomplementare) și sensibilitate (prin detecția fragmentelor ssDNA la concentrații în domeniul nM) pentru identificarea în timp real a secvențelor de ADN, bazându-ne pe sustenabilitatea tehnicii prezentate pentru detecția și identificarea unimoleculară.

Beneficiile sociale ale acestor studii constau în dezvoltarea în viitor a medicinei personalizate, bazată pe profilul unic de boală extras din ADN și implementarea facilă a testelor în timp real de analiză a ssDNA din sistemul circulator și a probelor lichide de biopsie. Integrarea nanotehnologiilor și a rețelelor neuronale artificiale, pentru a extrage automat informații unimoleculare cu ajutorul sistemului α -HL/AuNP/PNA de detecție a ssDNA, oferă o nouă metodă pentru detectarea multiplă a mai multor biomarkeri ssDNA, într-o singură execuție.

Director Proiect,
Conf. univ.dr. Loredana MEREUȚĂ