



RAPORTARE ȘTIINȚIFICĂ

ETAPA A II-A

2022

Deteția multiplex, cu sensibilitate și selectivitate moleculară, a unor miRNAs relevante fiziologic, cu ajutorul unor xeno acizi nucleici**-RNANANODETECT-**

Etapa 2 - Deteția amprentei specifice a moleculelor poli(Arg)-PNA, miRNA și a duplecșilor PNA-miRNA utilizând nanoporul de α -HL (partea a II-a). Evidențierea specificității tehnicii bazate pe utilizarea nanoporului de α -HL în deteția moleculelor de miRNA. Elaborarea mecanismului dielectroforetic de captare a complexului poli(Arg)-PNA – miRNA de către un singur nanopor.

În perioada pandemiei globale COVID-19 a devenit mai clară ca niciodată nevoia de a folosi tehnologii de diagnosticare a agenților patogeni în timp util pentru a detecta și preveni îmbolnăvirea. Tehnicile actuale de deteție a secvențelor de ADN sau ARN (precum PCR) prezintă o serie de provocări pentru că sunt complexe, costisitoare și necesită personal calificat. Deteția acizilor nucleici cu ajutorul nanoporilor este o metodă în timp real, mai ieftină, ușor de implementat și de operat.

În cadrul studiului nostru am testat o metodă de deteție la nivel de singură moleculă cu ajutorul nanoporului proteic de α -hemolizină (α -HL), care nu necesită marcarea sau amplificarea, bazată pe complementaritatea dintre secvența acidului nucleic țintă și secvența unui acid nucleic probă sintetizat. Astfel, am înregistrat și analizat semnale date de molecule probă de poli(Arg)-PNA (analogi sintetici ai moleculelor de DNA, în care *backbone*-ul este înlocuit cu o structură peptidică), de secvențe țintă de DNA similare cu miRNA și de duplecșii poli(Arg)-PNA–DNA similar cu miRNA, formați în urma hibridizării secvențelor complementare ale acizilor nucleici (**Fig. 1**). Astfel, prezența sau lipsa complexului hibridizat ne indică dacă proba conține sau nu DNA-ul similar cu miRNA căutat, demonstrând specificitatea tehnicii bazate pe utilizarea nanoporului de α -HL în deteția moleculelor de DNA similare cu miRNA.

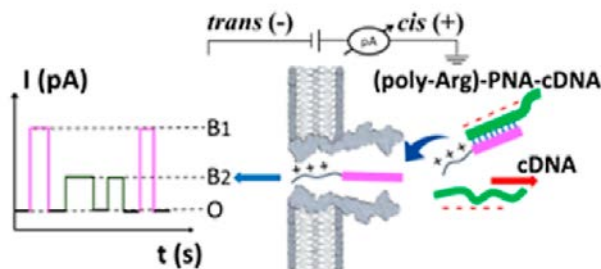


Fig. 1 Mecanismul dielectroforetic de captare a complexului poli(Arg)-PNA – miRNA de către un singur nanopor. Este reprezentat un nanopor proteic izolat într-o membrană lipidică, prin care la aplicarea unei diferențe de potențial negativă se stabilește un curent ionic, O. Adăugând moleculele probă poli(Arg)-PNA cu o sarcină electrică netă pozitivă în sistem, acestea sunt atrase în câmp electric către nanopor și produc fluctuații reversibile în curentul ionic, B1. Moleculele de DNA similare cu miRNA cu o sarcină electrică netă negativă adăugate ulterior sunt dirijate în sens invers translocării prin nanopor, neinteracționând cu nanoporul. Dacă moleculele țintă cDNA similare cu miRNA sunt complementare cu moleculele probă poli(Arg)-PNA, atunci se va forma duplexul poli(Arg)-PNA-cDNA, cu o structură de dipol electric, ce va interacționa cu nanoporul proteic și va avea o amprentă specifică, B2. (Mereuță et al., Anal. Chem 2022, 94)



Act 2.1 - A.2.3 Selectarea și testarea unor molecule PNA funcționalizate cu cozi de poliarginină de diferite lungimi în vederea obținerii unui semnal specific, dependent de lungimea cozii, la interacțiunea cu un singur por de α -HL (partea a-II-a).

Sensibilitatea și performanța analitică a tehnicii au fost testate pe secvențe de acizi nucleici similare ca și compoziție și lungime cu secvențe specifice pentru fosfoproteina nucleocapsidă (gena-N) a virusului SARS-CoV-2, reprezentativă pentru testarea Covid-19. Deoarece materialul ARN necesită condiții stricte de manipulare și facilități de depozitare, în scopul efectuării acestui studiu am recurs la utilizarea de omologi DNA identici din punct de vedere structural, care prezintă timină în loc de uracil (**Tabel 1**). Au fost proiectate ca molecule probă acizi peptidonucleici, PNA, complementari secvențelor de DNA, conjugați cu secvențe de aminoacizi arginină, poli(Arg), de lungimi diferite. Secvențele poli(Arg)-PNA, notate aici cu PA5, PA9 și PA13, sunt funcționalizate cu 5, 9 și respectiv 13 aminoacizi Arg la capătul C terminal (**Tabel 1**).

Pentru a testa moleculele de PNA funcționalizate cu cozi de poliarginină de diferite lungimi în vederea obținerii unui semnal specific dependent de lungimea cozii, am analizat interacțiunea dintre un singur nanopor de α -HL și moleculele probă de poli(Arg)-PNA adăugate în concentrație de 4 μ M de partea *cis*, respectiv *trans*, la o concentrație de 3M KCl a soluției de înregistrare și pH=7.

Tabel 1. Structurile primare și masele moleculare corespunzătoare moleculelor probă de poli(Arg)-PNA și moleculelor țintă DNA monocatenar similar cu miRNA. Dreptunghiurile roșii ilustrează duplecșii hibridizați poli(Arg)-PNA-DNA. (Mereuță et al., Anal. Chem 2022, 94)

	(Poly-Arg)-PNA (N→C)	Mw (g/mol)	ssDNA (5'→3')	Mw (g/mol)
PA5	GTTTGTCTG-Arg5	3520.5	CAGAACAAACCCAAGGAAAT (cDNA(PA5)) CAGAACAAACCCAAGGAAAT Arg5 -GTCTGTTTG	6122
PA9	CTTTGGTGT-Arg9	4145.3	ACACAAAAGATCACATTGG (cDNA(PA9)) ACACAAAAGATCACATTGG Arg9 -TGTGGTTTC	6104
PA13	GTTTGTCTG -Arg13	4770	CAGAACAAACCCAAGGAAAT (cDNA(PA13)) CAGAACAAACCCAAGGAAAT Arg13 -GTCTGTTTG	6122

Pentru segmentele de poli(Arg)-PNA adăugate în partea *cis* a nanoporului de α -HL s-au aplicat diferențe de potențial transmembranar negative (**Fig. 2. I. a, b, c**). Astfel de condiții oferă înregistrări fără interferențe date de interacțiunea cu nanoporul a fragmentelor anionice de DNA similare cu miRNA nehibridizate.

Din analiza statistică am observat că timpul mediu al intervalelor dintre evenimentele succesive de captare (τ_{on}) depinde invers proporțional cu lungimea fragmentului poli(Arg). Acest lucru se datorează faptului că forța electroforetică ce acționează asupra moleculelor de poli(Arg)-PNA crește odată cu sarcina electrică netă pozitivă a acestora, ceea ce rezultă într-o captare electroforetică mai frecventă a moleculelor probă în nanopor.

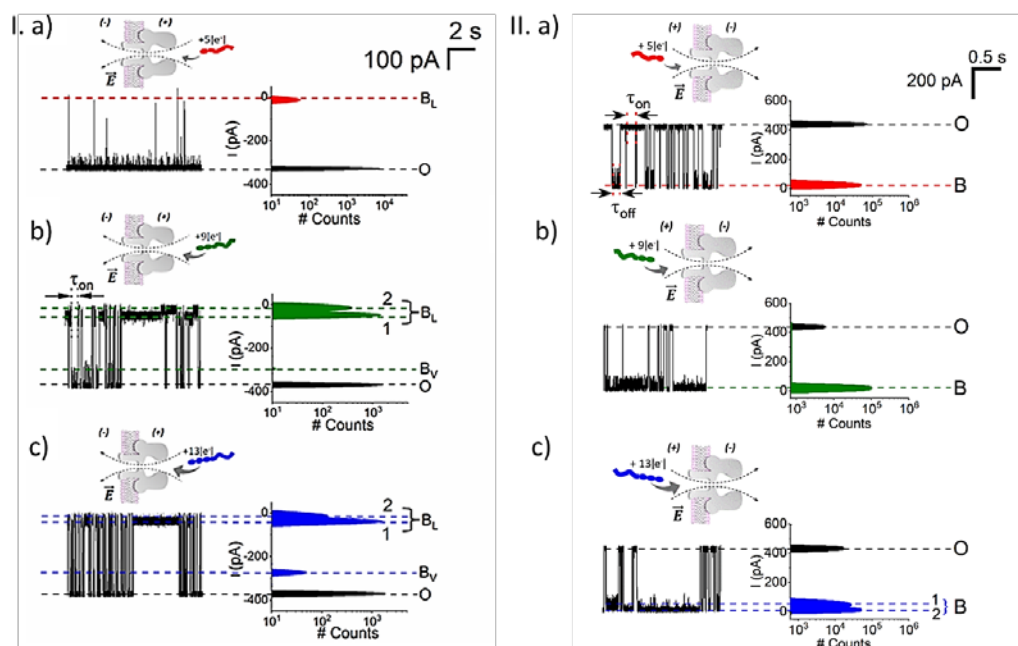


Fig. 2 Detectarea moleculelor probă de poli(Arg)-PNA adăugate: I. la intrarea *cis* în vestibul a nanoporului α -HL, **II.** la intrarea *trans* în lumenul nanoporului α -HL. Experimente tipice care arată interacțiunea reversibilă dintre nanoporul de α -HL și 4 μ M PA5 (a), PA9 (b) sau PA13 (c), la $\Delta V = -140$ mV, într-un electrolit care conține 3M KCl, pH = 7. (Mereuță et al., Anal. Chem 2022, 94)

O examinare mai atentă a unor astfel de înregistrări a confirmat că poli(Arg)-PNA-urile provoacă fluctuații distincte în curentul ionic de blocaj în timp ce traversează nanoporul. Pe baza argumentelor volumetrice simple, substările B_V și B_L (Fig. 2, Fig. 3) au fost atribuite translocării analitului în interiorul vestibulului și, respectiv, lumenului nanoporului, cu volume interioare diferite.

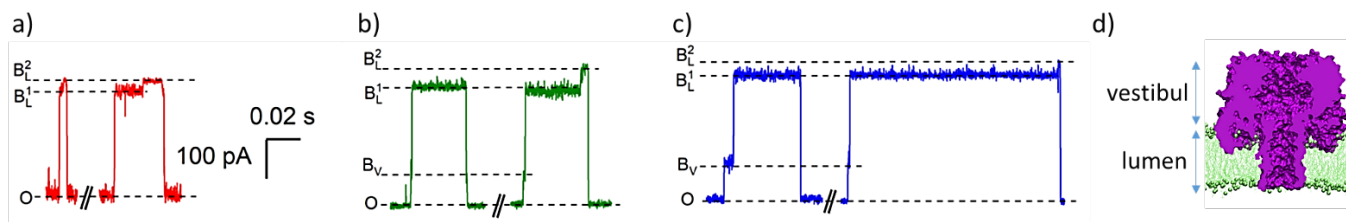


Fig. 3 Fluctuațiile specifice produse de translocarea moleculelor de poli(Arg)-PNA prin nanopor. Evenimentele de blocaj măsurate la $\Delta V = -140$ mV reflectă capturarea reversibilă a PA5 (a), PA9 (b) și PA13 (c) la intrarea *cis* a nanoporului de α -HL, din starea deschis („O”) către vestibulul parțial blocat (B_V) și lumenul parțial blocat (nivelurile B_L^1 și B_L^2). **d)** Secțiune a nanoporului de α -HL, în care se pot observa partea de vestibul și lumen. (Mereuță et al., Anal. Chem 2022, 94)

O secvență de poli-Arg mai mare alăturată moleculelor PNA se corelează cu o apariție mai clară a celor două niveluri B_L (Fig. 2 și Fig. 3). Speculăm că nivelurile suplimentare B_L apar datorită ocluzionării fizice distincte a nanoporului de către moleculele de poli(Arg)-PNA cu diferite lungimi, ceea ce produce modificări ale sarcinii ionice excluse din interiorul lumenului induse de fragmentele PNA, și deci valori diferite ale curentului ionic. Cu alte cuvinte, moleculele de poli(Arg)-PNA adoptă diferite conformații în interiorul lumenului, ceea ce rezultă în apariția subnivelurilor B_L^1 și B_L^2 . Astfel, am confirmat că moleculele probă PA5, PA9 și PA13 au provocat un răspuns distinct în timp ce interacționează reversibil cu nanoporul și, cu cât secvența de poli(Arg) este mai lungă, cu atât mai bine se văd astfel de interacțiuni.



Pentru a rafina și mai mult discriminarea moleculelor, am efectuat experimente cu analiții adăugați în partea *trans* a nanoporului (**Fig. 2, II**). În acest caz, diferențele de potențial *trans*-pozitive favorizează captarea reversibilă a moleculelor probă de către nanopor. Datorită sarcinii electrice nete negative de la intrarea în lumenul nanoporului, captarea moleculelor cationice de poli(Arg)-PNA este intensificată datorită interacțiilor electrostatice de atracție, ceea ce se reflectă și în valorile timpilor medii τ_{on} dintre două evenimente de blocaj succesive. Analiza statistică a arătat că lungimea secvențelor de poli(Arg) facilitează evenimentele de captare la nivelul lumenului nanoporului proteic și influențează în mod invers proporțional timpul mediu τ_{on} . Contribuția (i) forței electroforetice care acționează asupra moleculei probă și (ii) a atracției electrostatice între sarcina electrică netă negativă a intrării în nanopor și moleculele cationice duc la scăderea barierei energetice de captare la nivelul intrării în lumenul nanoporului la diferențe de potențial transmembranare mari. În acest tip de experiment s-a observat existența unui blocaj general, B, care în cazul moleculei probă cu cea mai lungă secvență de poli(Arg) prezintă două subniveluri, B₁ și B₂, datorită configurațiilor pe care le poate adopta în interiorul nanoporului.

Act 2.2 - A3.1 Determinarea potențialului moleculelor de poli(Arg)-PNA în detecția uni- și multi-nucleobazelor, precum și discriminarea moleculelor țintă de miRNA

În continuare am testat potențialul moleculelor de poli(Arg)-PNA în discriminarea secvențelor de DNA monocatenar similar cu miRNA. Știind amprente specifice pentru fiecare moleculă probă de poli(Arg)-PNA, am adăugat în sistem moleculele țintă complementare de DNA monocatenar similar cu miRNA, denumite DNAc(PA5), DNAc(PA9) și DNAc(PA13), ceea ce a condus la formarea duplecșilor moleculari poli(Arg)-PNA-DNA hibridizați prin intermediul legăturilor de hidrogen între perechile de baze Watson-Crick (**Fig. 4**). Prezența acestor duplecși moleculari este detectată și diferențiată în funcție de lungimea secvenței poli(Arg) atașată moleculelor probă PA5, PA9 și PA13.

Astfel, având în sistem moleculele probă de poli(Arg)-PNA în zona *cis* a nanoporului, am adăugat moleculele țintă complementare de DNA similar cu miRNA și am observat că semnalul înregistrat poate fi corelat cu lungimea secvenței de poli(Arg) din structura moleculei probă (**Fig. 4, I**). Când moleculele PA5 și PA9 au fost folosite ca molecule probă, în urma hibridizării cu cDNA(PA5) și cDNA(PA9) s-a observat o descreștere a evenimentelor de blocaj, iar în curentul ionic înregistrat s-a observat prezența nivelurilor B_V și B_L, ca în cazul semnalului dat de moleculele probă individuale (**Fig. 4, I. a, b**). Când s-a folosit molecula probă PA13, cu cea mai lungă secvență de aminoacizi încărcăți electric pozitiv, s-a observat suplimentar că hibridizarea cu cDNA(PA13) duce la apariția unui nivel asemănător cu nivelul B_V întâlnit în semnalul dat de molecula probă PA13 analizată individual, însă cu altă amplitudine (**Fig. 4, I. c**).

În cazul moleculelor probă PA5 și PA9 și a moleculelor țintă complementare, acest rezultat se datorează faptului că la diferențe de potențial transmembranare negative semnalul înregistrat este dat doar de moleculele probă cationice de poli(ARG)-PNA, ce sunt atrase către nanopor în câmp electric, în timp ce moleculele țintă de DNA și duplecșii anionici ($Q_{PA5-cDNA(PA5)} = -15|e^-|$; $Q_{PA9-cDNA-(PA9)} = -11|e^-|$) se deplasează în sens opus translocării (**Fig. 4, I. a, b**). Astfel, întâlnim același tip de semnal ca în cazul moleculelor probă însă frecvența evenimentelor este scăzută deoarece moleculele probă libere hibridizează cu moleculele țintă adăugate în soluție și astfel nu mai pot fi înregistrate.

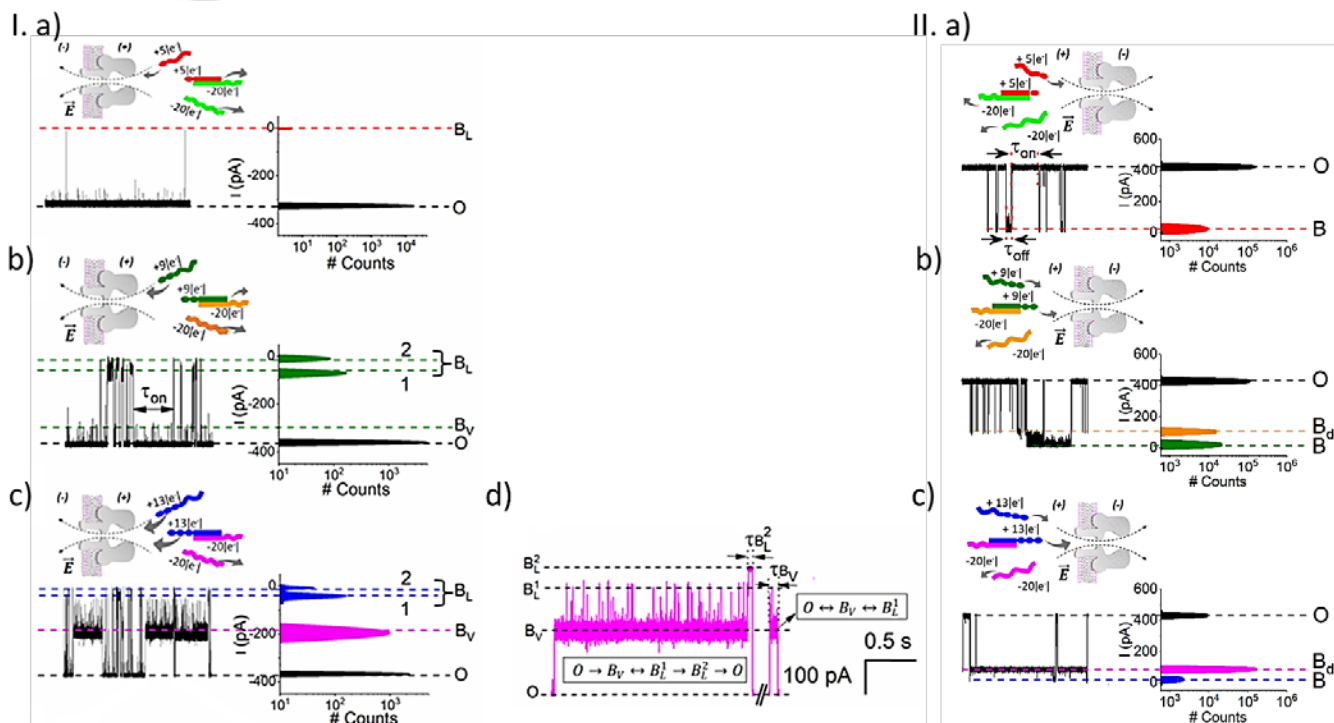


Fig. 4 Detectarea moleculelor țintă de DNA similare cu miRNA în urma hibridizării cu moleculele probă de poli(Arg)-PNA cu ajutorul nanoporului proteic de α -HL, când moleculele de **a)** PA5 și cDNA(PA5), **b)** PA9 și cDNA(PA9), **c)** PA13 și cDNA(PA13) au fost adăugate **I.** la *cis* sau **II.** la *trans*, în concentrații de 4 μ M poli(ARG)-PNA și 8 μ M cDNA similar cu miRNA. **d)** Tipuri de evenimente și subnivelurile asociate ce apar când moleculele PA13 și cDNA(PA13) sunt adăugate la *cis*, pentru 3M KCl, pH = 7. (Mereuță et al., Anal. Chem 2022, 94)

Pentru molecula probă de PA13 și molecula țintă cDNA(PA13), duplexul hibridizat este canalizat spre vestibulul nanoporului, în ciuda faptului că are o sarcină electrică netă negativă ($-7 |e^-|$). Astfel, duplexul ($\sim 2,3$ nm) pătrunde în vestibulul nanoporului ($\sim 2,6$ nm) și va produce în curentul ionic noul nivel de blocaj B_V (**Fig. 4, I.c**), însă nu va putea transloca prin zona de constricție ($\sim 1,4$ nm). Cu toate acestea, duplexul blocat reversibil poate ocluziona parțial zona de constricție (B_L^1) și poate urma două căi: i) fie forțele electroforetice care acționează asupra celor două secvențe încărcate electric opus duc la desfacerea duplexului și promovează translocarea moleculei probă PA13 prin lumen (B_L^2), ii) fie nu reușesc să îl desfacă și astfel duplexul se întoarce în mediul *cis* (**Fig. 4, I.d**).

Adăugarea ulterioară a moleculelor complementare cDNA similar cu miRNA în zona *trans* care conține moleculele probă poli(Arg)-PNA a dus la apariția unor evenimente de blocaj dependente de tipul de moleculă probă. În cazul moleculelor complementare PA5 și cDNA(PA5) s-a observat că numărul de evenimente de blocaj este mult mai rar, aceasta pentru că moleculele de cDNA(PA5) și duplecșii PA5-cDNA(PA5) sunt oprite de la interacțiunea cu nanoporul datorită orientării lor în câmp electric (**Fig. 4, II.a**). Atunci când moleculele probă de PA9, respectiv PA13, sunt adăugate peste moleculele țintă corespondente cDNA(PA9), respectiv cDNA(PA13), în semnalul înregistrat s-a observat apariția unui nou nivel de blocaj, notat ca B_d în figura **Fig. 4, II.b, c**. Acest nivel B_d este probabil generat de blocarea parțială a fluxului ionic dat de duplexul poli(Arg)-PNA-cDNA ($\sim 2,3$ nm) prins la gura nanoporului (~ 2 nm), înainte de a fi eliberat înapoi în soluție în zona *trans*. Și în acest caz, duplexul nu poate pătrunde în interiorul canalului ionic datorită dimensiunii mari comparativ cu deschiderea *trans*. Alternativ, datorită forțelor electroforetice care acționează asupra lui, duplexul poate disocia în cele două segmente



componente, astfel că molecula de poli(Arg)-PNA va transloca prin nanopor către partea *cis*, ducând la apariția nivelului de blocaj B specific interacțiunii moleculei de poli(Arg)-PNA cu nanoporul (Fig. 4, II.b, c), iar molecula de cDNA similar cu miRNA va fi condus în câmp electric în sens opus translocării.

Act 2.3 - A3.2 Implementarea protocolului bazat pe nanopori pentru detecția necomplementarităților de tip uni- sau multi-nucleobază în secvențe miRNA de lungimi asemănătoare, bazat pe analiza timpilor de rezidență și de desfacere a complexului PNA-miRNA în interiorul α -HL.

Am testat această metodă bazată pe nanopori pentru a detecta secvențe de acizi nucleici necomplementare și am obținut rezultate promițătoare. Pornind de la molecula probă PA13 situată în mediul *trans* (Fig. 5, a), am adăugat molecula țintă necomplementară cDNA(PA9) (Fig. 5, b). În semnalul înregistrat s-a observat doar nivelul de blocaj B caracteristic moleculei probă PA13, semn că nu a avut loc hibridizarea moleculelor. Moleculele de cDNA(PA9) sunt atrase în câmp electric în sens opus translocării prin nanopor, astfel că nu apar în semnalul ionic.

Atunci când în sistem s-a adăugat molecula țintă cDNA(PA13) (Fig. 5, c), s-a observat apariția unui nivel de blocaj B_{d1} specific complexului hibridizat PA13-cDNA(PA13). Adăugând în soluție molecula probă PA9 complementară cu molecula țintă cDNA(PA9) (Fig. 5, d), am remarcat un alt nivel B_{d2} , specific duplecșilor hibridizați PA9-cDNA(PA9).

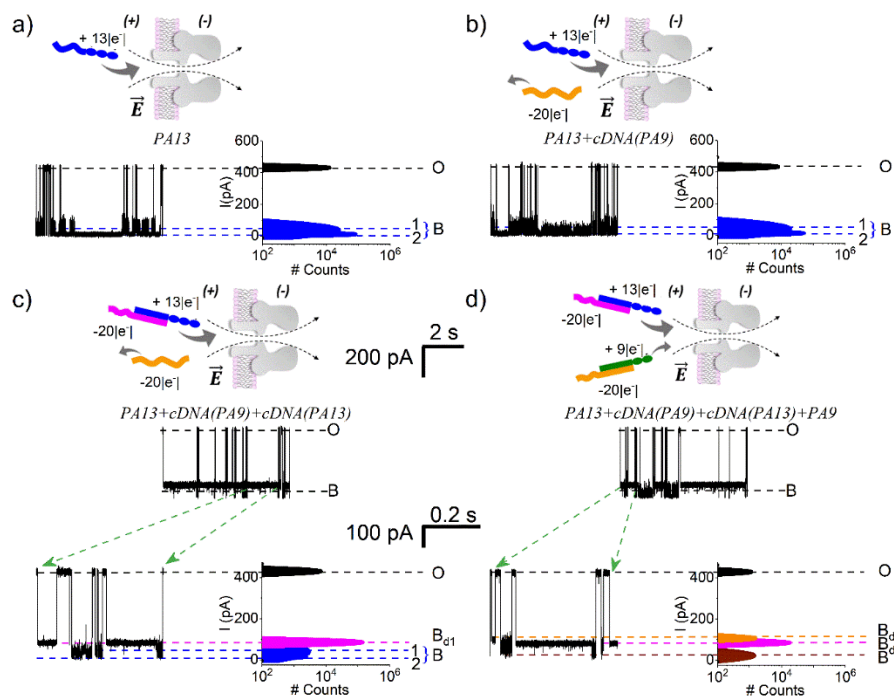


Fig. 5 Detecția multiplex a moleculelor țintă de DNA prin captarea de către nanoporul de α -HL a duplecșilor hibridizați poli(Arg)-PNA-cDNA. Semnalul dat de interacțiunea moleculelor probă PA13- α -HL măsurat la $\Delta V = +140$ mV (a) rămâne nealterat în prezența moleculei țintă necomplementare cDNA(PA9) (b). Adăugarea moleculelor țintă complementare cDNA(PA13) a provocat apariția nivelului de blocare B_{d1} , ceea ce sugerează captarea duplecșilor hibridizați PA13-cDNA(PA13) (c). Pipetarea ulterioară a moleculei probă PA9, complementară cu cDNA(PA9) deja prezent, a generat hibridizarea duplecșilor PA9-cDNA(PA9) care produc nivelul B_{d2} (d). Concentrațiile moleculelor probă poli(Arg)-PNA și a moleculelor țintă DNA au fost de 4, respectiv 8 μ M, în 3M KCl, pH = 7. (Mereuță et al., Anal. Chem 2022, 94)



Datele obținute demonstrează că secvența de poli(Arg) cu lungime variabilă din structura moleculei probă PNA poate constitui baza unui sistem de detecție a moleculelor unicatenare de cDNA similar cu miRNA, bazat exclusiv pe capacitatea de discriminare a substărilor de blocaj date de duplexul hibridizat poli(Arg)-PNA-cDNA într-un amestec eterogen.

Act 2.4 - A3.3 Investigarea uni-moleculară a dependenței de temperatură a stabilității PNA-miRNA, pentru domenii de necomplementaritate de diferite lungimi. Corelarea cu valorile termodinamice a energiilor de hibridizare.

Stabilitatea duplecșilor PNA-DNA similar cu miRNA este influențată de mai mulți factori, printre care temperatura, pH-ul, concentrația soluției electrofiziologice KCl și lungimea secvențelor constituente.

Ținând cont că la variații mici de temperatură sistemul este stabil, am analizat influența lungimii secvenței de poli(Arg) asupra procesului de detecție a moleculelor țintă de DNA monocatenar similar cu miRNA atunci când moleculele sunt adăugate în parea *trans*, pentru 3M KCl, pH = 7. Am analizat statistic valorile timpilor medii evidențiați în **Fig. 6, a)** și **e)**, pentru complexe PA9-cDNA(PA9) cu 9 arginine și PA13-cDNA(PA13) cu 13 arginine: τ_1 (timpul în care duplexul poli(Arg)-PNA-DNA este captat și blochează gura lumenului), τ_2 (timpul în care are loc procesul de desfacere a duplexului în moleculele constituente) și τ_3 (timpul de translocare prin nanopor a moleculei de poli(Arg)-PNA rezultate în urma procesului de desfacere a duplexului). În urma analizei statistice am calculat constantele termodinamice de reacție aferente, k_1 , k_2 și k_3 (**Fig. 6**).

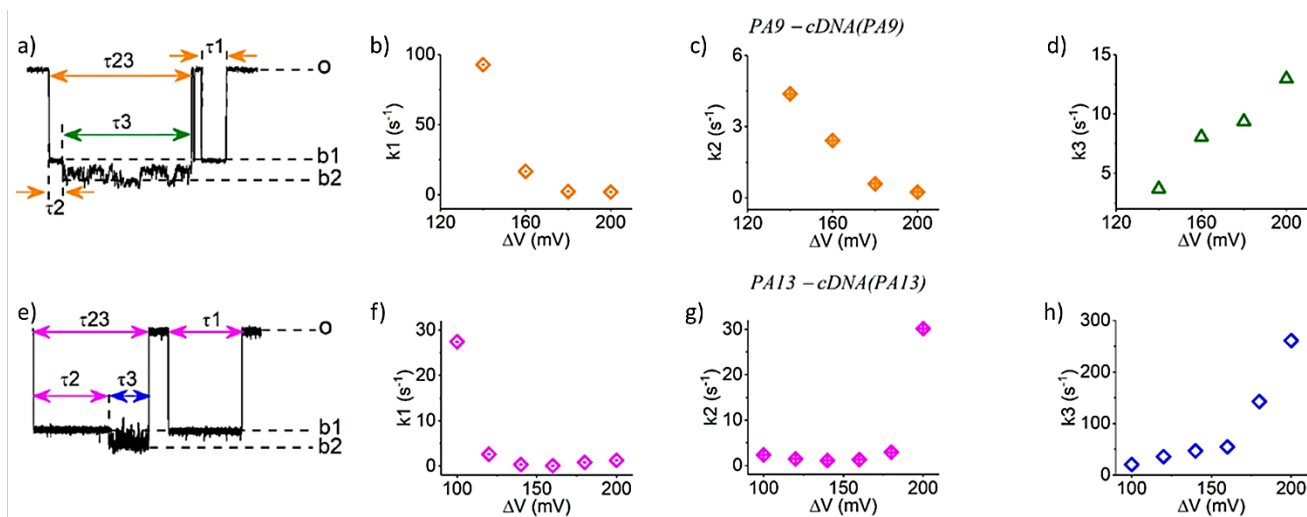


Fig. 6 Constantele microscopice de rată de reacție care descriu interacțiunea duplexului cu nanoporul. Dependența de tensiune a constantelor microscopice de rată de reacție k_1 , k_2 și k_3 descriind evoluția în timp a duplecșilor PA9-cDNA(PA9) (a-d) și PA13-cDNA(PA13) (e-h) capturați la intrarea *trans* în lumenul nanoporului. (Mereuță et al., Anal. Chem 2022, 94)

În cazul ambilor complecși observăm o descreștere a constantei k_1 ce caracterizează întoarcerea complexului în mediul *trans* pe măsură ce diferența de potențial crește, datorită faptului că forța electroforetică ce se opune difuziei în soluție a complexului captat la gura nanoporului este din ce în ce mai mare (τ_1 crește deci k_1 scade).



Observăm că $k_1(\text{PA13-cADN}(\text{PA13})) < k_1(\text{PA9-cADN}(\text{PA9}))$ la toate tensiunile aplicate pentru că PA13 este mai încărcat pozitiv față de fragmentul PA9 și implică depășirea unei bariere energetice mai mare pentru a reveni în soluție atunci când e captat la intrarea în lumen.

Constanta k_3 care descrie translocarea prin nanopor a fragmentului poli(Arg)-PNA rezultat în urma desfacerii complexului crește odată cu diferența de potențial aplicată datorită forței electroforetice din ce în ce mai mare care acționează asupra segvenței încărcate electric, astfel că procesul de traversare a nanoporului se va desfășura din ce în ce mai rapid. Cu cât sarcina electrică a moleculei este mai mare, cu atât translocarea va fi mai rapidă, fapt demonstrat și de valorile obținute: $k_3(\text{PA13-cDNA}(\text{PA13})) > k_3(\text{PA9-cDNA}(\text{PA9}))$, la orice diferență de potențial.

Cinetica timpului de desfacere a duplexului descris de constanta k_2 a prezentat o tendință de descreștere în funcție de ΔV pentru complexul PA9-cDNA(PA9) (**Fig. 6, c**) și un comportament opus (**Fig. 6, g**) pentru complexul PA13-cDNA(PA13). În cea mai simplă aproximare, ne așteptăm să obținem creșterea constantei k_2 în funcție de ΔV , ce se datorează faptului că un câmp electric mai mare face ca forța ce acționează asupra duplexului capturat să fie mai mare și astfel timpul de desfacere scade. Observăm că $k_2(\text{PA13-cDNA}(\text{PA13})) > k_2(\text{PA9-cDNA}(\text{PA9}))$ la diferențe mari de potențial. Cu alte cuvinte, energia de hibridizare este mai mare în cazul duplexului PA9-cDNA(PA9) care resimte o forță electroforetică de desfacere mai mică. Ne-am propus să explorăm această descoperire în experimente viitoare.

Act 2.5 - A3.4 Determinarea limitei de detecție a miRNA-ului și a intervalului dinamic al nanosenzorului, a curbelor doză-răspuns și a reversibilității senzorului, în soluții compatibile cu medii biologice.

În urma experimentelor din cadrul acestui studiu s-a observat că biosenzorul de α -HL utilizat oferă rezultate corecte și la concentrații foarte mici de analit, ceea ce face limita de detecție a DNA-ului similar cu miRNA să fie de ordinul micromolar.

Pentru a realiza detecția în soluții compatibile cu medii biologice, am realizat experimente în care soluția electrofiziologică de KCl are concentrații diferite: 3M, 1M și 0.5M, cea din urmă fiind cea mai apropiată de concentrația ionilor de K^+ și Cl^- din organism. Am observat că hibridizarea și stabilitatea complexilor variază în funcție de concentrația sării KCl utilizate, fapt evidențiat și în modificările curentului ionic specific înregistrat (**Fig. 7**).

În **Fig. 7** sunt evidențiate interacțiunile reversibile dintre nanoporul proteic de α -HL și moleculele de interes, observate prin fluctuațiile în curentul ionic mediat de nanopor: nivelul de blocaj B dat de moleculele de poli(Arg)-PNA și nivelul de blocaj B_d dat de interacțiunea complexului de poli(Arg)-PNA-DNA cu gura nanoporului. Remarcăm că valoarea nivelului de blocaj B_d depinde puternic de concentrația de KCl din soluția electrofiziologică de înregistrare, pe când valoarea B nu depinde.

Raportat la numărul total de evenimente înregistrate la o anumită concentrație de sare, procentul duplecșilor poli(Arg)-PNA-DNA care suferă procesul de desfacere după captarea la gura lumenului și a moleculelor de poli(Arg)-PNA captate individual, scade dramatic odată cu scăderea concentrației de sare din soluție, în timp ce procentul de duplecși captați și eliberați fără desfacerea ulterioară în moleculele constituente crește.

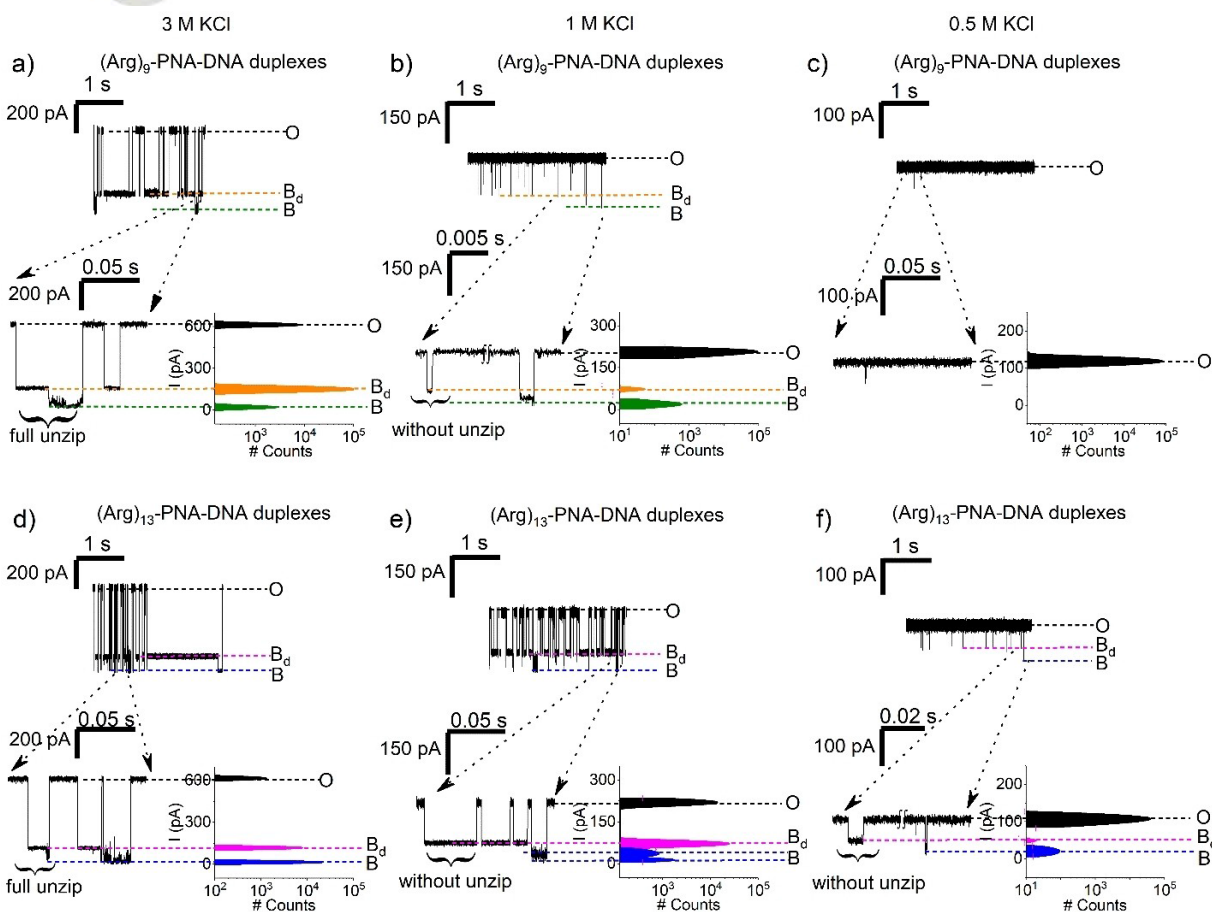


Fig. 7 Detecția duplexelor moleculare poli(Arg)-PNA-ADN cu ajutorul nanoporului de α -HL în medii cu diferite concentrații ale KCl. Frecvența și durata evenimentelor de blocaj provocate de duplexii de PA9-cDNA (PA9) (a-c) și (PA13-cDNA (PA13) (d-f), situați în zona *trans*, la $\Delta V = +200$ mV. În imaginile mărite sunt ilustrate blocaje reprezentative specifice desfacerii complete a duplexului captat la intrarea în lumenul α -HL și, respectiv, evenimente de captură și eliberare a duplexului, fără desfaceră. Histogramele valorilor curentului ioic înregistrat evidențiază nivelurile de blocaj. (Asandei et al., Chem. Asian J. 2022, 17)

S-a observat că pe măsură ce concentrația de ioni din soluție scade și sarcinile electrice sunt din ce în ce mai puțin ecranate, numărul duplexelor hibridizați scade datorită interacțiunii dintre sarcina electrică pozitivă a secvenței de poli(Arg) din structura PNA și sarcina electrică negativă a secvențelor de DNA, împiedicând hibridizarea complexului. În urma acestei etape a studiului am concluzionat că molecula probă de poli(Arg)-PNA ce conține un număr mai mare de aminoacizi este potrivită pentru o paletă largă de concentrații ale soluției de înregistrare, oferind sistemului o stabilitate ridicată.

Am reușit astfel să îndeplinim obiectivele pe care le-am propus în această etapă și să demonstrăm capacitatea de detecție multiplex a biosenzorului de α -HL, cu sensibilitate și selectivitate moleculară, a unor molecule de DNA similare cu miRNAs relevante fiziologic, urmând ca în etapa viitoare să optimizăm această tehnică.



Rezultatele și modul de diseminare a rezultatelor.

În această etapă au fost publicate un număr de **3 articole** cu factor de impact, 2 din acestea fiind în zona roșie (Q1):

1. *A Nanopore Sensor for Multiplexed Detection of Short Polynucleotides Based on Length-Variable, Poly-Arginine-Conjugated Peptide Nucleic Acids*, Loredana Mereuta, Alina Asandei, Isabela Dragomir, Jongwan Park, Yoonkyung Park, and Tudor Luchian, **Analytical Chemistry** **2022** 94 (24), 8774-8782, DOI: 10.1021/acs.analchem.2c01587 Q1

2. *A Single-Molecule Insight into the Ionic Strength-dependent, Cationic Peptide Nucleic Acids-Oligonucleotides Interactions*, Alina Asandei, Loredana Mereuta, Ioana C. Bucataru, Yoonkyung Park, Tudor Luchian, **Chemistry Asian Journal** **2022**, e202200261, DOI: 10.1002/asia.202200261 Q2

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 Park⁴, Tudor Luchian, **Biosensors**, *submitted*. Q1

Rezultatele obținute în cadrul acestei etape au fost prezentate la **1 conferință internațională și 1 conferință națională**:

1. Sixth Edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences, "IC-ANMBES 2022", June 8-10, 2022, Brasov, Romania

- *Detection of nucleobases on short functionalized peptide-nucleic acid sequences using nanopore-tweezing method*, Isabela S. Dragomir, Alina Asandei, Irina Schiopu, Ioana C. Bucataru, Loredana Mereuta, Tudor Luchian
- *Protein nanopore-based method for sequence specific detection of single-stranded DNA using gold nanoparticles and peptide nucleic acids*, Ioana Cezara Bucataru, Loredana Mereuta, Alina Asandei, Isabela Dragomir, Tudor Luchian

2. A XVII-a Conferință Națională de Biofizică, CNB 2022, 23-25 Septembrie 2022, Târgu Mureș, România

- *A tug-of-war between electric forces: The nanopore-tweezing method applied in molecular sensing*, Isabela S. Dragomir, Alina Asandei, Irina Schiopu, Ioana C. Bucataru, Loredana Mereuta, Tudor Luchian

Data 1.10.2022

Director de proiect,

Prof. Univ. Dr. Tudor LUCHIAN