

УДК 621.382.3; 577.113; 53.083

## ВАЛИДАЦИЯ ГЕТЕРОФАЗНОГО АНАЛИЗА РНК С ПОМОЩЬЮ КНИ-БИОСЕНСОРА

© Е. В. Дмитриенко<sup>1,3</sup>, А. В. Порываева<sup>1</sup>, О. В. Наумова<sup>2</sup>,  
Б. И. Фомин<sup>2</sup>, М. С. Купрюшкин<sup>1</sup>, И. А. Пышная<sup>1</sup>, Д. В. Пышный<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

<sup>2</sup>Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова СО РАН,  
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13

<sup>3</sup>Новосибирский государственный университет,  
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2  
E-mail: elena.dmitrienko@niboch.nsc.ru

Анализ нуклеиновых кислот остаётся актуальным направлением в развитии медицинской диагностики. Современные ультрачувствительные диагностические системы позволяют преобразовать специфичное взаимодействие при проведении анализа в аппаратно-регистрируемый сигнал. Пример таких диагностических устройств — биосенсоры на основе КНИ (кремний-на-изоляторе) полевых транзисторов. В данной работе использовались стеклянные поверхности (в качестве Si/SiO<sub>2</sub>-поверхности КНИ-биосенсора) для оптимизации и апробации всех этапов анализа. Продемонстрирована эффективная иммобилизация электронейтральных аналогов олигонуклеотидов на Si/SiO<sub>2</sub>-поверхность после активации Si-ОН групп 3-глицидоксипропилтриметоксисиланом или карбонилдимидазолом. В условиях низкой концентрации соли и при её отсутствии показана возможность детекции РНК-мишени на модельных стеклянных поверхностях в режиме параллельного анализа. Продемонстрированы регенерация Si/SiO<sub>2</sub>-поверхности сенсоров для проведения повторного анализа, а также стабильность сенсоров при длительном хранении.

*Ключевые слова:* КНИ-биосенсор, Si/SiO<sub>2</sub>-поверхности, гетерофазный анализ, гибридизация, электронейтральные фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды.

DOI: 10.15372/AUT20210106

**Введение.** Современные тенденции развития медицины лежат в области её персонализации: лечения, диагностики и мониторинга пациентов. Процедура диагностики в условиях медучреждений и на дому требует создания устройств, не уступающих по характеристикам тестам, выполненным на специализированном лабораторном оборудовании высококвалифицированными специалистами. Такие устройства, к которым в настоящее время относят современные биосенсоры [1], должны удовлетворять определённым требованиям: минимально возможный объём исследуемого образца, быстрый ответ, простота использования, автоматическая подстройка, высокая точность, воспроизводимость анализа. Для создания высокотехнологичных диагностических биосенсоров используют большое количество трудоёмких и дорогостоящих операций [2]. При этом, кроме непосредственно получения биосенсора, необходимо детально отработать все этапы анализа. В связи с этим возникают вопросы о модельной системе, которая позволит симитировать и этапы анализа, и последующую апробацию на диагностическом биосенсоре.

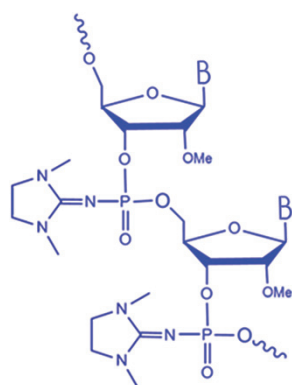
Ранее [3] с помощью биосенсора, созданного на базе полевых транзисторов кремний-на-изоляторе (КНИ), мы показали принципиальную возможность выявления анализируемой нуклеиновой кислоты (НК-мишени). Данная система детекции основана на изменении проводимости сенсора за счёт изменения заряда на его поверхности и в непосредственной близости. Заряд изменяется при образовании гибридного комплекса между незагруженным олигонуклеотидом (ОН-зондом), иммобилизованным на поверхность сенсора, и

Таблица 1

Структура комплексов ОН-зонд/РНК-мишень и их стабильность ( $T_{пл}$ , °С)  
в деионизированной воде (1) и низкосолевых условиях (10 мМ КРВ, рН 7,5) (2)

Обозначение	ОН-зонд/РНК-мишень	$T_{пл}$ (1)	$T_{пл}$ (2)
ФГ1/М1	<b>5' GUCUUC</b> CUUCUCCGCUU – (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> – NH <sub>2</sub> CAGAAGGAAGAGGGCGAAGCGGAG – FAM <sup>5'</sup>	67	82
ФГ2/М2	<b>5' UAACCG</b> AUUUCAGAUUU – (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> – NH <sub>2</sub> AUUGGCUAAAGUCUACCACGAUC – FAM <sup>5'</sup>	53	63
ФГ3/М3	<b>5' GCCAGC</b> UGCACAUGC UU – (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> – NH <sub>2</sub> CGGUCGACGUGUACGGCGUCCGG – FAM <sup>5'</sup>	73	70

Примечание: полужирным шрифтом выделены последовательности фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов, содержащих модифицированные звенья\*, курсивом — 2'-ОМe-рибоолигонуклеотиды



\* — фрагмент остова ФГ ОН,  
В — азотистое основание

анализируемой НК-мишенью. Подобного рода биосенсоры известны, и, как правило, для их создания применяют пептидоолигонуклеотиды [4] и морфолиновые олигонуклеотиды [5], синтез которых нетривиален, трудо- и ресурсозатратен. Впервые [3] использовались электронейтральные фосфорилгуанидиновые (ФГ) олигонуклеотиды (табл. 1), которые были разработаны в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (совместно с ООО «НooГен», Россия). Существенное преимущество ФГ перед морфолиновыми и пептидоолигонуклеотидами состоит в возможности получения в формате стандартного рутинного твердофазного автоматического синтеза НК [6–8]. Таким образом, если речь идёт о затратности и импортозамещении, то ФГ перспективны как зонды при разработке биосенсорных устройств, в которых формирование специфического сигнала ассоциировано с изменением локального заряда вблизи сенсорной поверхности.

Представленная работа посвящена изучению и оптимизации всех этапов анализа, необходимых для создания КНИ-биосенсора: иммобилизации на кремниевую поверхность ФГ-зондов (т. е. функционализация сенсорного элемента); последующей гибридизации ФГ-зондов с анализируемой НК-мишенью; регенерации поверхности биосенсора для проведения повторного анализа. В рамках данной работы предложено использовать стекло в качестве имитации Si/SiO<sub>2</sub>-поверхности КНИ-биосенсора. На этой поверхности показаны эффективное выявление НК-мишеней как в индивидуальном виде, так и в смеси (в том числе при длительном хранении изготовленных чипов), а также возможность её многократного использования. В конце апробированы все этапы анализа на КНИ-биосенсоре при

выявлении модельных НК и продемонстрировано успешное выявление ФГ-зондами РНК-мишеней (чувствительностью  $10^{-12}$  моль) в воде и/или низкосолевых условиях.

**Материалы и методы.** В данной работе использовали 3-глицидоксипропилтриметоксисилан (ГОПТС), Tween-20, формамид (Aldrich Chemical Co. LLC); карбонилдимидазол (КДИ) (AcrosOrganics); ацетонитрил (PanReac AppliChem); калий фосфатный буфер (КРВ, pH 7,5) (10 mM  $K_2HPO_4$ , 10 mM  $KH_2PO_4$ , pH 7,4) (Росмедбио); калия бихромат, серную кислоту (Реахим); этиловый спирт (EtOH) (Кемеровская фармацевтическая фабрика). Водные растворы приготовлены на основе деионизированной  $H_2O$  (18 M $\Omega$ ). Флуоресцентно-меченые РНК-мишени М1–М3 синтезированы в ИХБФМ СО РАН, 3'-аминосодержащие фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды ФГ1–ФГ3 синтезированы ООО «НooГен».

Иммобилизацию ОН на сенсорную поверхность проводили двумя способами: на основе активации Si-ОН групп 3-глицидоксипропилтриметоксисиланом (ГОПТС-методика I) и карбонилдимидазолом (КДИ-методика II) с последующим присоединением 3'-аминосодержащего ФГ в ручном режиме и на поверхность эпоксисилановых стёкол (ЕрохуSlides, TekdonInc., США) размерами  $75 \times 25 \times 1$  мм методом автоматической контактной печати. В ручном режиме поверхность стёкол (Corning, США) размерами  $75 \times 25$  мм толщиной 0,96–1,06 мм 15 мин обрабатывали 15 мл 10 %-ным бихроматом калия в концентрированной серной кислоте, отмывали  $H_2O$  ( $3 \times 10$  мл) и EtOH ( $1 \times 10$  мл), выдерживали 24 ч в растворе 5 %-ного ГОПТС в спирте или 1 %-ного КДИ в ацетонитриле (10 мг/мл), промывали спиртом или ацетонитрилом соответственно ( $3 \times 10$  мл) и высушивали на воздухе. Далее ОН ФГ1–ФГ3 (0,33 мкл на точку) вручную раскапывали на Si/SiO<sub>2</sub>-поверхность. Стёкла помещали в чашку Петри на водяную подушку. Через 20 ч стёкла отмывали  $H_2O$  ( $2 \times 10$  мл), EtOH ( $2 \times 10$  мл) и ацетонитрилом ( $1 \times 10$  мл), высушивали на воздухе. КНИ-биосенсоры получали согласно способу (II).

На поверхность эпоксисилановых стёкол (TekdonInc., ЕрохуSlides, США) размерами  $75 \times 25 \times 1$  мм методом автоматической контактной печати (согласно протоколу BioRadBioOdysseyCalligrapher, США) добавляли олигонуклеотиды ФГ1–ФГ3 (1 нл из  $5 \times 10^{-5}$  М на точку), отмывали  $H_2O$  ( $3 \times 5$  мл). Точку печати каждого зонда дублировали. Все стёкла и КНИ-биосенсоры использовали сразу или хранили на воздухе при +4 °С в темноте.

**Гибридизационный анализ иммобилизованных ОН-зондов с НК-мишенью.** На Si/SiO<sub>2</sub>-поверхность добавляли 10 мкл анализируемой смеси (5 мкл/см<sup>2</sup>), содержащей НК-мишень ( $10^{-5}$ – $10^{-7}$  М) в  $H_2O$  или в 10 mM КРВ (pH 7,5), 0,125 % Tween-20 и (если оговорено) формамид (5–20 %). Смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре, отмывали  $H_2O$  ( $3 \times 1$  мл). Интенсивность флуоресценции на стекле фиксировали лазерным сканером PerkinElmerScanArrayExpress (PerkinElmer, США).

Для денатурации гибридизационного комплекса стёкла после анализа выдерживали при 60 °С в 50 мл раствора 10 mM КРВ, содержащего 20 % EtOH, 1 % Tween-20, через 1 ч стёкла отмывали EtOH ( $3 \times 5$  мл), высушивали на воздухе и использовали повторно.

В случае КНИ-биосенсора на его поверхность, ограниченную инертным пластиковым цилиндром высотой 5 мм, наносили раствор НК-мишени ( $10^{-5}$  М) в воде или 10 mM КРВ. Записывали вольт-амперные характеристики каждой проволоки. Для этого подавали развёртку напряжения от 0 до 30 В с шагом 1 В через каждые 0,3 с и фиксировали модуляцию тока через проволоку с помощью пиковольтамперметра KEITHLEY 6430.

**Результаты и обсуждение.** При разработке диагностических НК-биосенсоров ключевыми этапами являются функционализация сенсорного элемента (или иммобилизация олигонуклеотидных ОН-зондов) и последующее формирование комплекса между иммобилизованным ОН-зондом и анализируемой нуклеиновой кислотой (НК-мишенью). Открытая

поверхность КНИ-элемента представляет собой кремниевую проволоку, которая расположена на изоляторе между контактными областями стока/истока и, как правило, покрыта естественным или специально сформированным слоем  $\text{SiO}_2$ . Поэтому стеклянная поверхность была предложена как модельная, имитирующая  $\text{Si/SiO}_2$ -поверхность кремниевой микропроволоки. В качестве анализируемых мишеней были выбраны фрагменты диагностически значимых РНК (М1–М3, см. табл. 1). Мишень М1 соответствовала фрагменту WHSC2 (NELFA) (компонент фактора негативной регуляции элогации РНК полимеразной II), М2 — фрагменту hsa-miR-29a-3p (микроРНК, участвующей в регуляции ключевых клеточных процессов) [9], М3 — фрагменту hsa-miR-451a (микроРНК, регулирующей дифференцировку эритроцитов в норме) [10]. Для разработки эффективного микропроволочного биосенсора необходимо оптимизировать условия его функционализации, позволяющие минимизировать заряд на поверхности проволоки [11]. Отработку условий функционализации сенсорного элемента проводили на примере электронейтральных олигонуклеотидов ФГ1–ФГ3, комплементарных РНК М1–М3, содержащих на 5'-конце флуоресцентную метку (см. табл. 1). Процесс функционализации валидировали по флуоресцентному сигналу зоны нанесения положительного контроля иммобилизации, в качестве которого выступал некомплементарный ОН, содержащий флуоресцентную метку (5'-FAM-CCTCGACTACGG).

В данной работе для иммобилизации ОН на  $\text{Si/SiO}_2$ -поверхность использовалось два подхода: первый основан на активации  $\text{Si-OH}$  групп 3-глицидоксипропилтриметоксисиланом с последующим присоединением 3'-аминосодержащего ФГ, во втором в качестве активатора применяли карбонилдиимидазол. В случае силиановой химии на  $\text{Si/SiO}_2$ -поверхности образуется слой толщиной 1–10 нм [12]. Использование КДИ обеспечивает более короткий линкер между поверхностью и иммобилизованным ОН. Данный факт имеет особое значение при конструировании биосенсора, так как существует понятие «дебаевский радиус экранирования», который описывает расстояние распространения заряда в проводящих средах и зависит от ионной силы раствора (составляет порядка 10 нм для стандартных буферных условий [13]). В таком случае для достоверной регистрации НК-мишени необходимо минимизировать расстояние между поверхностью микропроволоки и анализируемой молекулой и/или уменьшить ионную силу раствора. Оба подхода должны были обеспечить необходимое расстояние между анализируемым комплексом и поверхностью сенсора. Следует отметить, что КДИ и ГОПТС с течением времени самопроизвольно гидролизуются на воздухе и в воде, что позволяет избежать дополнительной стадии блокирования.

Известно, что ионная сила раствора влияет на параметры «дебаевского радиуса экранирования» поверхности [14]. Этот фактор может негативно сказываться на результате анализа (повышение ионной силы снижает чувствительность и специфичность выявления НК-мишени с помощью КНИ-биосенсора). Отсутствие заряда у иммобилизованного ФГ-зонда позволяет рассчитывать на образование гибридационного комплекса в бессолевых (деионизированная вода) и низкосолевых (КРВ) условиях. Предварительно методом термической денатурации было показано, что все ОН в этих условиях способны формировать комплементарные комплексы с РНК (см. табл. 1). Стабильность комплементарных комплексов варьировала от 53 °С (ФГ2/М2 в воде) до 82 °С (ФГ1/М1 в 10 мМ КРВ), т. е. зависела от нуклеотидной последовательности комплекса. Это может объясняться образованием различных внутримолекулярных комплексов, а также стабильностью шпильчатых структур РНК-мишеней.

При иммобилизации на  $\text{Si/SiO}_2$ -поверхность эпоксисилановых стёкол методом автоматической контактной печати, помимо специфичных ОН (ФГ1–ФГ3), наносили положительный ( $\text{K}^+$ ) и отрицательный ( $\text{K}^-$ ) контроли. Сигнал  $\text{K}^+$  не зависел от наличия или отсутствия флуоресцентной РНК-мишени, сигнал  $\text{K}^-$  демонстрировал отсутствие неспецифических взаимодействий в зонах иммобилизации ОН. В трёх повторах были нанесены

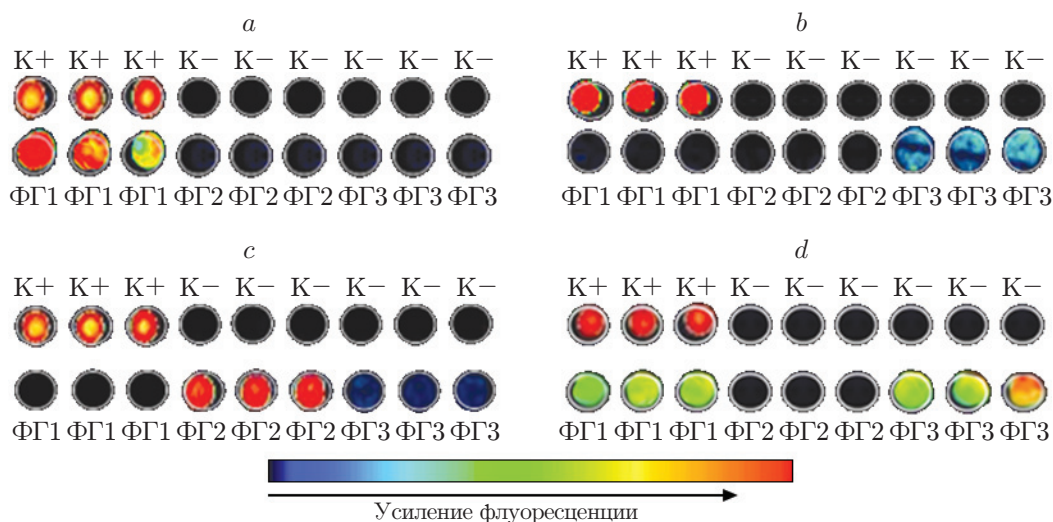


Рис. 1. Сканированные изображения стёкол после гибридизации в  $H_2O$ : с флуоресцентно-меченой мишенью М1 (а), М2 (b), М3 (c) и смесью М1 и М3 (d)

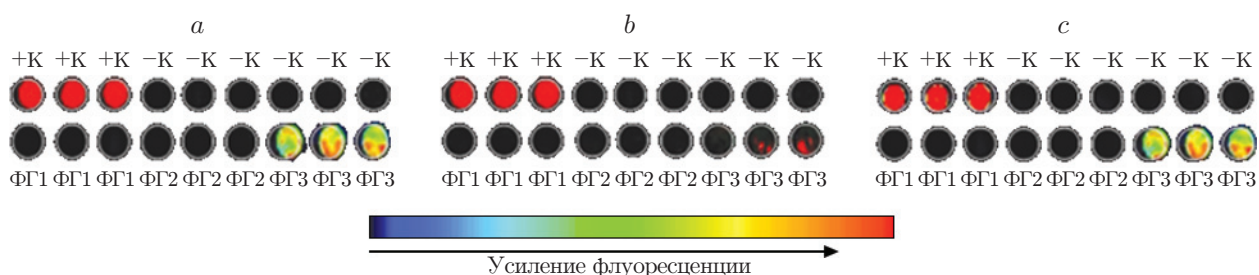


Рис. 2. Сканированные изображения стёкол: после гибридизации (а), денатурации в 20 % EtOH, 10 mM КРВ pH 7,5, 1 % Tween-20 (b) и повторной гибридизации (c) мишени М3

ФГ и  $K^+$ ,  $K^-$  — в шести. Видно, что в водных условиях все ФГ-зонды (ФГ1–ФГ3) способны успешно выявлять соответствующие им РНК М1–М3 (рис. 1, а–с), а также их смеси (например, М1 и М3 (рис. 1, d)) в режиме параллельного анализа. В ряде случаев при комнатной температуре наблюдали сигнал от неспецифического НК/НК-связывания, полностью нивелировать данный эффект удалось при добавлении формамида (5–20 %) в гибридизационную смесь.

Для демонстрации возможности регенерации и повторного использования Si/SiO<sub>2</sub>-поверхности, а впоследствии и КНИ-транзисторов был проведён поиск условий денатурации сформированного комплекса зонд/мишень. Полное удаление мишени (т. е. разрушение НК-дуплексов и отсутствие сигнала) наблюдали после обработки Si/SiO<sub>2</sub>-поверхности раствором, содержащим 20 % EtOH/10 mM КРВ, pH 7,5/1 % Tween-20. Стабильность связи ОН-зонда с поверхностью контролировали по интенсивности сигнала  $K^+$ . Было успешно проведено три раунда анализа (гибридизация — денатурация — повторная гибридизация). Видно (рис. 2), что для ФГ3 наблюдается интенсивный сигнал при повторной гибридизации. Следует отметить высокую стабильность сенсорной поверхности с иммобилизованными ФГ-зондами. Эффективность гибридизационного анализа не снижалась по истечении 3 месяцев с момента изготовления биосенсорной поверхности.

Таким образом, все этапы гетерофазного гибридизационного анализа исследованы

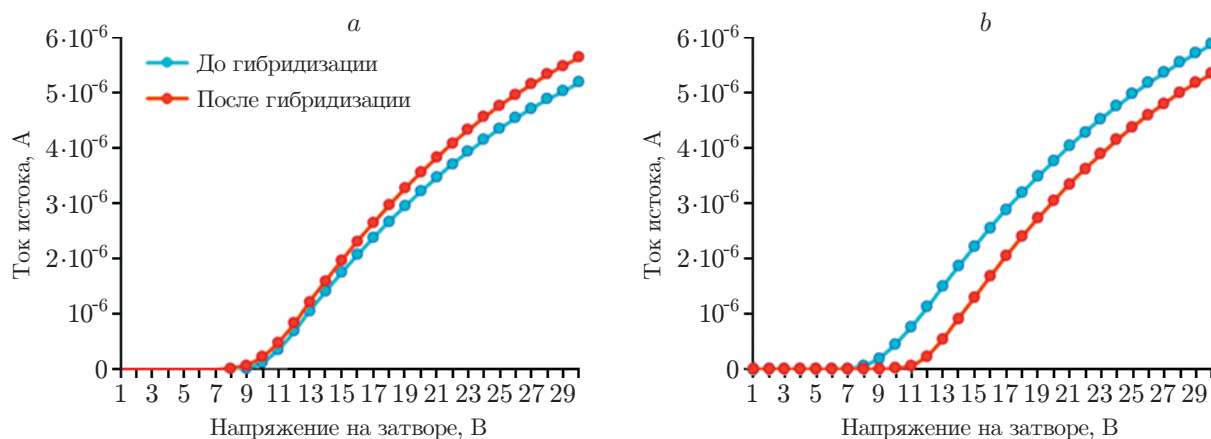


Рис. 3. Зависимость стокзатворных характеристик микропроволочного транзистора (3 мкм) с иммобилизованным ФГ1-зондом до и после гибридизации с М1-мишенью в зависимости от зоны: *a* — контрольная зона без зонда, *b* — полностью комплементарный зонд

на Si/SiO<sub>2</sub>-поверхности, имитирующей поверхность кремниевой микропроволоки, в целях их дальнейшей апробации на КНИ-биосенсоре. Подобраны условия функционализации Si/SiO<sub>2</sub>-поверхности и формирования слоя ФГ-зондов, оптимизированы условия выявления мишеней, показано повторное использование сенсорной поверхности.

На заключительном этапе был использован прототип биосенсорного устройства на основе КНИ-транзисторов, содержащий 12 сенсорных элементов (проволоки размерами 10 × 3 мкм), на которые иммобилизовали вышепредставленные ФГ-зонды. При проведении гибридизационного анализа были определены стокзатворные характеристики каждой проволоки по аналогии с работой [3]. Гибридизация иммобилизованного ФГ1-зонда с РНК-мишенью М1 (10<sup>-12</sup> М) меняет отклик сенсора (рис. 3, *b*) по сравнению с сигналом сенсорного элемента без ОН-зонда (рис. 3, *a*). При этом линии стокзатворных характеристик остаются параллельными друг другу (см. рис. 3, *b*). Непараллельное смещение стокзатворных характеристик (см. рис. 3, *a*) свидетельствует о неспецифической сорбции компонентов гибридизационной смеси на поверхность кремниевой проволоки, поскольку изменение её состояния происходит в процессе увеличения подаваемого напряжения. Заметим, что в отличие от проточных реакторов, имеющих накопительный эффект, скорость и эффективность гибридизации в нашем случае в большей степени определяются диффузией. Поэтому продемонстрированная здесь пиколярная чувствительность по отношению к мишени может быть сопоставима с уровнями фемтолярных концентраций для проточных реакторов [5]. Таким образом, показана возможность выявления маркерных фрагментов микро- и матричных РНК, ассоциированных с немелкоклеточным раком лёгкого, с использованием КНИ-биосенсора и после проработанных этапов анализа на стеклянной поверхности.

**Заключение.** В рамках данной работы продемонстрировано использование стеклянной поверхности в качестве имитации Si/SiO<sub>2</sub>-поверхности КНИ-биосенсора. Проведены исследования на модельной валидированной системе, которая позволила симитировать все этапы анализа для их детальной проработки и последующей апробации на диагностическом КНИ-биосенсоре. Разработанная система гетерофазного гибридизационного анализа на стеклянных чипах с использованием незаряженных фосфорилгуанидиновых аналогов нуклеиновых кислот успешно адаптирована на КНИ-биосенсор с чувствительностью 10<sup>-12</sup> М.

**Благодарности.** Выражаем благодарность сотрудникам ИХБФМ СО РАН М. И. Мещаниновой за проведённый синтез флуоресцентно-меченых последовательностей РНК 1–3 и Д. В. Семенову за предоставленные последовательности диагностически значимых РНК.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (государственная регистрация № АААА-А17-117020210021-7) и Российского научного фонда (грант № 18-14-00357).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Blair E. O., Corrigan D. K.** A review of microfabricated electrochemical biosensors for DNA detection // *Biosens. Bioelectron.* 2019. **134**. P. 57–67.
2. **Sarangadharan I., Regmi A., Chen Y. W. et al.** High sensitivity cardiac troponin I detection in physiological environment using AlGaIn/GaN high electron mobility transistor (HEMT) biosensors // *Biosens. Bioelectron.* 2018. **100**. P. 282–289.
3. **Dmitrienko E., Naumova O., Fomin B. et al.** Surface modification of SOI-FET sensors for label-free and specific detection of short RNA analyte // *Nanomedicine.* 2016. **11**, N 16. P. 2073–2082.
4. **Kaisti M.** Detection principles of biological and chemical FET sensors // *Biosens. Bioelectron.* 2017. **98**. P. 437–448.
5. **Zhang G. J., Luo Z. H. H., Huang M. J. et al.** Morpholino-functionalized silicon nanowire biosensor for sequence-specific label-free detection of DNA // *Biosens. Bioelectron.* 2010. **25**, N 11. P. 2447–2453.
6. **Купрюшкин М. С., Пышный Д. В., Стеценко Д. А.** Фосфорилгуанидины. Новый класс аналогов нуклеиновых кислот // *Acta Naturae.* 2014. **6**, N 4. С. 123–125.
7. **Пат. RU2708237 С2.** Модифицированные олигонуклеотиды и способ их получения / Д. А. Стеценко, М. С. Купрюшкин, Д. В. Пышный. Опубл. 05.12.2019, Бюл. 34.
8. **Dyudeeva E., Kupryushkin M. S., Lomzov A. A. et al.** Physicochemical properties of the phosphoryl guanidine oligodeoxyribonucleotide analogs // *Russ. Journ. Bioorgan. Chem.* 2019. **45**, N 6. P. 709–718.
9. **Yu D., Green B., Tolleson W. H. et al.** MicroRNA hsa-miR-29a-3p modulates CYP2C19 in human liver cells // *Biochem. Pharmacol.* 2015. **98**, N 1. P. 215–223.
10. **Su Z., Ni L., Yu W. et al.** MicroRNA-451a is associated with cell proliferation, migration and apoptosis in renal cell carcinoma // *Mol. Med. Rep.* 2015. **11**, N 3. P. 2248–2254.
11. **Zhang G. J., Zhang G., Chua J. H. et al.** DNA sensing by silicon nanowire: Charge layer distance dependence // *Nano Lett.* 2008. **8**, N 4. P. 1066–1070.
12. **Luzinov I., Julthongpiput D., Liebmann-Vinson A. et al.** Epoxy-terminated self-assembled monolayers: Molecular glues for polymer layers // *Langmuir.* 2000. **16**, N 2. P. 504–516.
13. **Stern E., Wagner R., Sigworth F. J. et al.** Importance of the Debye screening length on nanowire field effect transistor sensors // *Nano Lett.* 2007. **7**, N 11. P. 3405–3409.
14. **Desruisseaux C., Long D., Drouin G., Slaughter G. W.** Electrophoresis of composite molecular objects. 1. Relation between friction, charge, and ionic strength in free solution // *Macromolecules.* 2001. **34**, N 1. P. 44–52.

*Поступила в редакцию 08.07.2020*

*После доработки 09.09.2020*

*Принята к публикации 09.11.2020*