

Микрофлюидная платформа на основе одномерного фотонного кристалла для безметочной оптической детекции олигонуклеотидов

© Г.О. Нифонтова¹, И.Р. Набиев^{1,2,3}

¹ Лаборатория по исследованиям в области нанонаук, LRN-EA4682, Университет Реймса, Шампань-Арденны, 51100 Реймс, Франция

² Лаборатория нано-биоинженерии, Национальный исследовательский ядерный университет „МИФИ“ (Московский инженерно-физический институт),

115409 Москва, Россия

³ ЛИФТ-Центр, Сколково,

121205 Москва, Россия

e-mail: igor.nabiev@gmail.com

Поступила в редакцию 23.11.2023 г.

В окончательной редакции 23.11.2023 г.

Принята к публикации 28.11.2023 г.

Циркулирующие внеклеточные нуклеиновые кислоты малого размера являются одним из клинически значимых классов биомаркеров различных патологий человека, включая аутоиммунные, онкологические и инфекционные заболевания. Для обнаружения циркулирующей ДНК (цДНК) в жидкостных пробах используется метод полимеразной цепной реакции в реальном времени, основанный на амплификации молекул цДНК и определении степени накопления флуоресцентного сигнала от репортерной метки во времени. В настоящее время представляется актуальной разработка новых альтернативных подходов к быстрой и высокоточной детекции цДНК малого размера. Оптические биосенсоры безметочной детекции на основе анализа изменений распространения поверхностных волн на поверхности одномерного фотонного кристалла могут быть адаптированы для обнаружения олигонуклеотидов, а их комбинация с микрофлюидной платформой позволяет миниатюризировать и увеличить производительность биоаналитической процедуры. В настоящем исследовании продемонстрирована возможность оптической безметочной детекции низкомолекулярной одноцепочечной ДНК с различным количеством нуклеотидных оснований без дополнительной амплификации сигнала в микрофлюидном режиме с использованием биосенсора на основе одномерного фотонного кристалла.

Ключевые слова: одномерный фотонный кристалл, поверхностные волны, оптическая безметочная детекция, одноцепочечная ДНК, микрофлюидная платформа.

DOI: 10.61011/OS.2023.11.57032.5786-23

Введение

Разработка новых подходов к быстрой и высокоточной детекции жидкостных аналитов является одним из важных направлений в области клинической диагностической практики [1]. Использование микрофлюидных технологий с этой целью позволяет эффективно увеличить производительность детекции, миниатюризировать и автоматизировать аналитическую процедуру путем уменьшения количеств используемых реагентов в том числе за счет используемого внешнего оборудования (детектор, перистальтические насосные системы) и обеспечения минимального вмешательства пользователя [2]. Методы оптической безметочной и быстрой детекции жидкостных аналитов находят широкое применение в клинической диагностике, поскольку могут использоваться в широком концентрационном диапазоне аналитов, не требуют использования оптических (флуоресцентных или хромогенных) меток и могут быть адаптированы для многопараметрического и высокопроизводительного анализа [3].

Для безметочного обнаружения онкомаркеров [4], бактериальных токсинов [5] и других биомаркеров [6] могут быть использованы оптические сенсоры на основе одномерных фотонных кристаллов. Их многослойная структура, характеризующаяся периодическим изменением индекса преломления в одномерном измерении, позволяет поддерживать дальнедействующее распространение оптических волн по своей поверхности, что обеспечивает сверхчувствительную детекцию биомолекул и регистрацию биомолекулярных взаимодействий [7]. Такие оптические биосенсорные платформы универсальны и позволяют использовать специфические биораспознающие молекулы, ковалентно связанные с поверхностью сенсора, для высокоточной детекции жидкостных аналитов.

Циркулирующие внеклеточные нуклеиновые кислоты являются важным классом диагностических маркеров аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваний человека [8]. Стандартным подходом для детекции циркулирующей ДНК (цДНК) является метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-

РВ). Однако в связи с необходимостью амплификации и анализа накопления сигнала флуоресценции репортерной метки метод ПЦР-РВ является времязатратной процедурой. Кроме того, данный метод требует наличия дорогостоящего оборудования и специальных диагностических наборов [9]. В связи этим разработка альтернативных и универсальных подходов обнаружения нуклеиновых кислот, в том числе и адаптация с этой целью уже существующих методов оптической детекции, является актуальной биоаналитической задачей. В настоящем исследовании продемонстрирована возможность оптической безметочной детекции низкомолекулярной одноцепочечной ДНК, представляющей собой олигонуклеотиды с различным количеством оснований, в проточном режиме с помощью микрофлюидной платформы и биосенсора на основе анализа изменений распространения поверхностных волн в одномерном фотонном кристалле (ПВ ФК).

Экспериментальная часть

Сенсорная система

Для безметочной оптической детекции использовали сенсорную систему на основе одномерного фотонного кристалла, представляющего собой подложку размером $\sim 22 \times 25$ мм из стекла типа BK-7 с напыленным покрытием чередующихся слоев оксида кремния (SiO_2) и оксида титана (TiO_2), как это было описано ранее [10]. Напыленные слои образовывали структуру $\text{TiO}_2(\text{SiO}_2/\text{TiO}_2)_5\text{SiO}_2$, поддерживающую p -поляризованную поверхностную моду при 500 нм и обладающую эффективным показателем преломления 1.38. Толщины слоев оксида титана и оксида кремния составляли 64 и 214.3 нм соответственно, а толщина внешнего слоя оксида кремния составляла 298.8 нм. Детекцию взаимодействия модельных олигонуклеотидов различной длины с поверхностью фотонного кристалла проводили посредством визуализации предварительно биофункционализированной поверхности фотонного кристалла после его установки на поверхности призмы, смонтированной в конфигурации Кречмана. При этом длина волны возбуждения фотонного кристалла составляла 500 нм и соответствовала промежуточному положению между максимумами синего (~ 460 нм) и зеленого (~ 545 нм) пикселей цветной камеры, регистрирующей изменения в изображении поверхности фотонного кристалла.

Возбуждение фотонного кристалла при данной длине волны, как правило, приводит к появлению резонансного пика. Сдвиги положения резонансного пика фотонного кристалла, связанные с детектируемыми межмолекулярными взаимодействиями на поверхности сенсора, учитывали путем анализа изменения интенсивностей обоих пикселей с последующим конвертированием изменений их интенсивностей в изменение толщины молекулярного слоя на поверхности сенсора [10].

Описанные изменения представляли в виде сенсограмм, демонстрирующих изменение толщины молекулярного слоя на поверхности сенсора с течением времени при введении рабочих буферных растворов и растворов модельных одноцепочечных ДНК-олигонуклеотидов, взаимодействующих с распознающими элементами, химическими иммобилизованными на поверхности фотонного кристалла.

Биофункционализация поверхности

Для биофункционализации фотонного кристалла с помощью химического ковалентного связывания распознающих элементов предварительно осуществляли модификацию его поверхности путем инкубации в 1% растворе (3-аминопропил)триэтоксисилана (Merck Group, Франция) в ацетоне (Acros Organics/Thermo Fischer Scientific, Франция). Затем поверхность фотонного кристалла активировали путем инкубации в 2.5% растворе глутарового альдегида (Merck Group, Франция) в 0.02 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7.4 в течение 60 min. После тщательного промывания поверхности раствором 0.02 М ФСБ, pH 7.4 на активированную поверхность фотонного кристалла наносили с помощью дозатора аликвоты объемом $1 \mu\text{l}$ рабочих растворов нейтравидина (НА, Thermo Fischer Scientific, Франция) в 0.02 М ФСБ, pH 7.4 с концентрациями 1.0, 1.5 и 2.0 mg/ml и проводили инкубацию в течение 5 min. Избытки раствора НА удаляли с поверхности фотонного кристалла путем продувки и монтировали подложку на поверхность призмы.

Микрофлюидная платформа

Для проведения детекции аналитов использовали микрофлюидную ячейку, снабженную двумя отверстиями (на вход/выход) и металлическими коннекторами для фиксации трубок с внутренним диаметром 0.51 мм и пропускания растворов аналитов в проточном режиме с помощью 3-канального перистальтического насоса Ismatec Reglo ICC, США, управляемого с помощью компьютера. В структуре микрофлюидной ячейки предусмотрен один канал глубиной 5–50 μl и объемом 0.5–5 μl . После сборки микрофлюидной платформы производили заполнение микрофлюидной ячейки рабочим буферным раствором (0.02 М ФСБ, pH 7.4) со скоростью 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. После заполнения осуществляли впрыскивание растворов со скоростью потока 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ в следующей последовательности: рабочий буферный раствор (0.02 М ФСБ, pH 7.4) — 600 с; блокирующий буферный раствор (2 mg/ml раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) в 0.02 М ФСБ, pH 7.4) — 600 с; 0.001 μM –10 μM растворы модельных одноцепочечных ДНК-олигонуклеотидов, содержащих 30 или 50 оснований тимидина и биотинилированных по 5'-концу (Eurofins Genomics, Германия) в 0.02 М ФСБ, pH 7.4; рабочий буферный рас-

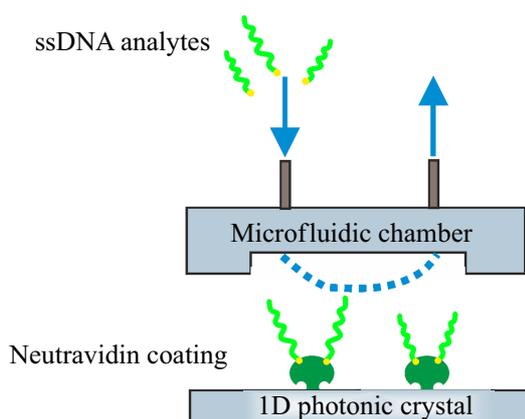


Рис. 1. Схема обнаружения модельных одноцепочечных ДНК-олигонуклеотидов в потоке с помощью микрофлюидной платформы и сенсора на основе одномерного фотонного кристалла. Стрелками обозначены направления впрыскивания и удаления аналита из микрофлюидной платформы. Обозначения: ssDNA — одноцепочечная ДНК; 1D photonic crystal — одномерный фотонный кристалл; neutravidin coating — покрытие поверхности фотонного кристалла нейтравидином; microfluidic chamber — микрофлюидная ячейка.

твор (0.02 М ФСБ, pH 7.4) — 400–600 с. Все используемые для впрыскивания в микрофлюидную систему растворы были предварительно дегазированы с помощью ультразвуковой бани Elma Sonics, Германия.

Результаты и обсуждение

В результате проведения предварительной активации и биофункционализации на поверхности фотонного кристалла был химически иммобилизован биотин-связывающий рекомбинантный белок НА. Перед его нанесением поверхность сенсора была аminosиланирована и активирована глутаровым альдегидом для обеспечения эффективного связывания белковых молекул. Первичные аминогруппы в составе поверхностного слоя АПТЭС вступают в реакцию с глутаровым альдегидом с образованием оснований Шиффа, что позволяет химически связать НА посредством ковалентного связывания первичных аминогрупп в аминокислотной последовательности белка с поверхностью сенсора [11]. Вследствие особенностей структуры НА его ковалентное связывание с поверхностью фотонного кристалла обеспечивает стерическую доступность в микрофлюидном режиме как минимум 2 из 4 имеющихся сайтов связывания биотинилированного аналита [12] (рис. 1).

В результате использования в реакции растворов НА с различной концентрацией эффективность ковалентного связывания НА с поверхностью сенсора составила $96.2 \pm 0.5\%$. После установки биофункционализированного сенсора в микрофлюидную платформу рабочие

Максимальный прирост средней толщины поверхности сенсора после последовательных впрыскиваний растворов модельных аналитов — биотинилированных одноцепочечных ДНК-олигонуклеотидов с различным количеством оснований

Аналит	Mean da_{\max} , nm		
	Плотность покрытия сенсора нейтравидином		
	1.2 mg/mm ²	1.8 mg/mm ²	2.4 mg/mm ²
Одноцепочечная ДНК (50 оснований)	0.43601	0.39985	0.29696
Одноцепочечная ДНК (30 оснований)	0.34374	0.30351	0.23526

буферы и растворы исследуемых аналитов вводили в проточном режиме до выхода сигнала от сенсора на платформу. Для уменьшения неспецифического связывания поверхность сенсора обрабатывали блокирующим буфером в проточном режиме, после чего осуществляли последовательные впрыскивания растворов модельных биотинилированных одноцепочечных ДНК-олигонуклеотидов вплоть до выхода уровня сигнала от сенсора на платформу (рис. 2).

Полученные сенсограммы показывают, что существенный рост сенсорного сигнала наблюдается при введении 0.1 мкМ растворов обоих типов олигонуклеотидов и для всех анализируемых плотностей покрытия поверхностей сенсоров распознающим элементом (НА). При этом максимальный уровень насыщения сигнала, свидетельствующий о максимально возможном связывании аналитов с поверхностью, наблюдается при введении 1–10 мкМ растворов обоих типов олигонуклеотидов. Величины максимального прироста толщины слоя поверхности сенсора при анализе связывания обоих типов аналитов после проведения полного цикла титрования представлены в таблице.

При увеличении концентрации раствора НА, используемого для модификации поверхности фотонного кристалла, отмечается снижение максимального прироста толщины слоя поверхности сенсора (Mean da_{\max}) в случае детекции обоих типов олигонуклеотидов, что может быть обусловлено агрегацией данного белка на поверхности сенсора при увеличении его содержания в реакционной смеси при биофункционализации, приводящей к формированию многослойного белкового покрытия. Этот эффект затрудняет распознавание биотинилированных субстратов, в частности олигонуклеотидов с большей молекулярной массой (50 оснований, молекулярная масса ~ 15.5 kDa) по сравнению с олигонуклеотидами с меньшей молекулярной массой (30 оснований, молекулярная масса ~ 9.2 kDa) [13].

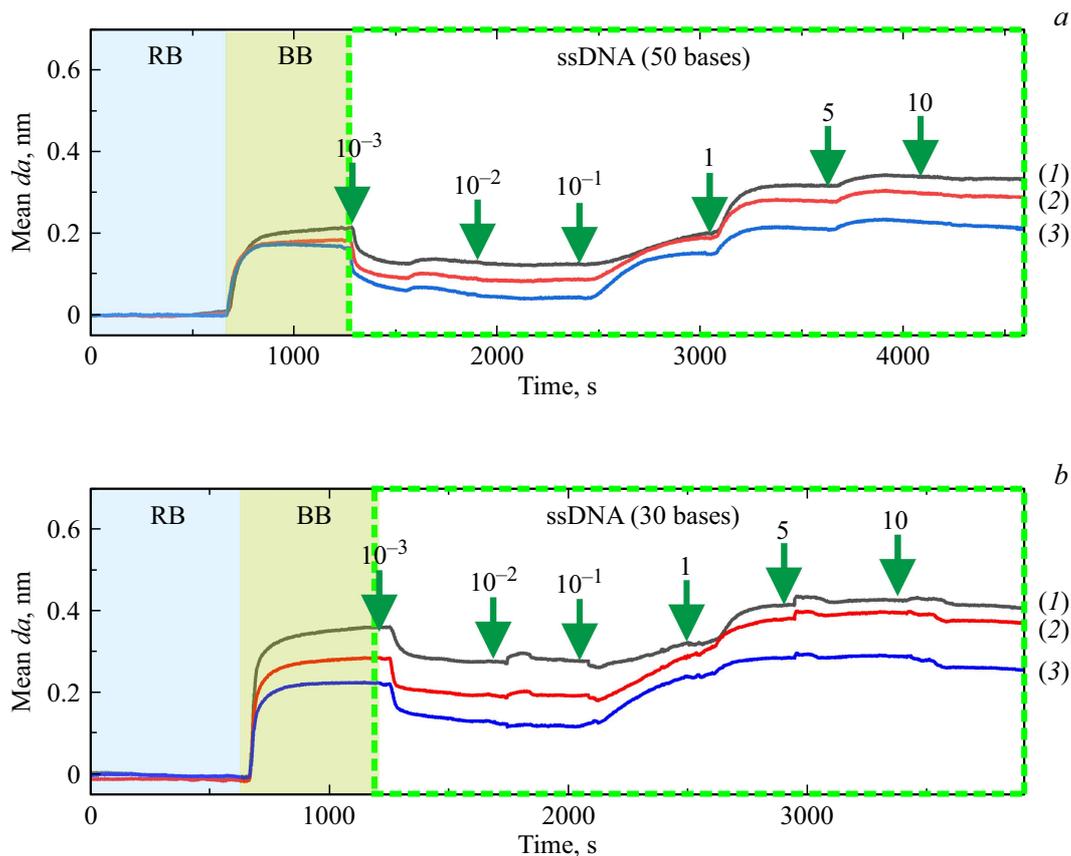


Рис. 2. Сенсограммы, полученные в результате детекции биотинилированных одноцепочечных ДНК-олигонуклеотидов, содержащих последовательности (а) 50 или (б) 30 нуклеотидных оснований, с помощью одномерного фотонного кристалла, поверхность которого была функционализована биотин-связывающим белком нейтравидином. Стрелками на рисунке обозначено начало впрыскивания растворов олигонуклеотидов. Цифрами обозначены вводимые концентрации растворов олигонуклеотидов (μM). Обозначения: RB — рабочий буфер; BB — блокирующий буфер; ssDNA (50 bases) — одноцепочечная ДНК, содержащая 50 нуклеотидных оснований; ssDNA (30 bases) — одноцепочечная ДНК, содержащая 30 нуклеотидных оснований. Цифрами справа обозначены сенсограммы, полученные при использовании фотонных кристаллов с различной плотностью покрытия их поверхности нейтравидином: 1 — $1.2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, 2 — $1.8 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, 3 — $2.4 \mu\text{g}/\text{mm}^2$. Каждая представленная сенсограмма представляет собой усредненные показания трех сенсограмм.

Заключение

Данные, полученные в настоящей работе, демонстрируют возможность обнаружения низкомолекулярной ДНК с различным количеством оснований в проточном режиме с помощью микрофлюидной платформы и оптического безметочного сенсора на основе одномерного фотонного кристалла. Таким образом, в результате химической модификации поверхности фотонного кристалла достигается эффективная иммобилизация распознающего элемента сенсора — биотин-связывающего белка НА, что обеспечивает надежное обнаружение низкомолекулярных одноцепочечных ДНК, меченых биотином, в минимальной концентрации $0.1 \mu\text{M}$ без дополнительного усиления сигнала. В дальнейшем разрабатываемая микрофлюидная платформа безметочной оптической детекции может быть адаптирована для обнаружения внеклеточных циркулирующих нуклеиновых кислот малого размера в клинических жидкостных пробах.

Финансирование работы

Настоящая работа была поддержана грантом № 075-15-2021-935 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] L. Mou, X. Jiang. Adv. Healthcare Mater., **6** (15), 1601403 (2017). DOI: 10.1002/adhm.201601403
- [2] C. Achille, C. Parra-Cabrera, R. Dochy, H. Ordutowski, A. Piovesan, P. Piron, L. Van Looy, Sh. Kushwaha, D. Reynaerts, P. Verboven, B. Nicolai, J. Lammertyn, D. Spasic, R. Ameloot. Adv. Mater., **33** (25), 2008712 (2021). DOI: 10.1002/adma.202008712

- [3] F. Soltermann, W.B. Struwe, Ph. Kukura. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **23** (31), 16488 (2021). DOI: 10.1039/D1CP01072G
- [4] I. Petrova, V. Konopsky, I. Nabiev, A. Sukhanova. *Sci. Rep.*, **9**, 8745 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-45166-3
- [5] И.О. Петрова, В.Н. Конопский, А.В. Суханова, И.Р. Набиев. *Вестник РГМУ*, **4**, 22 (2018). DOI: 10.24075/vrgmu.2018.047
- [6] Т.В. Митько, Р.И. Шакуров, Ф.В. Ширшиков, С.В. Сизова, Е.В. Алиева, В.Н. Конопский, Д.В. Басманов, Ю.А. Беспярых. *Клиническая практика*, **12** (2), 14 (2021). DOI: 10.17816/clinpract71815
- [7] V. Konopsky, T. Mitko, K. Aldarov, E. Alieva, D. Basmanov, A. Moskalets, A. Matveeva, O. Morozova, D. Klinov. *Biosens. Bioelectron.*, **168**, 112575 (2020). DOI: 10.1016/j.bios.2020.112575
- [8] M. Bartosik, L. Jirakova. *Curr. Opin. Electrochem.*, **14**, 96 (2019). DOI: 10.1016/j.coelec.2019.01.002
- [9] C.S. Huertas, O. Calvo-Lozano, A. Mitchell, L.M. Lechuga. *Front. Chem.*, **7**, 724 (2019). DOI: 10.3389/fchem.2019.00724
- [10] G. Nifontova, I. Petrova, E. Gerasimovich, V.N. Konopsky, N. Ayadi, C. Charlier, F. Fleury, A. Karaulov, A. Sukhanova, I. Nabiev. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (5), 4347 (2023). DOI: 10.3390/ijms24054347
- [11] A.I. Modenez, D.E. Sastre, C.F. Moraes, C.G.C. Marques Netto. *Molecules*, **23** (9), 2230 (2018). DOI: 10.3390/molecules23092230
- [12] T.N. Sut, H. Park, D.J. Koo, B.K. Yoon, J.A. Jackman. *Sensors*, **22** (14), 5185 (2022). DOI: 10.3390/s22145185
- [13] M. Calero, R. Fernández, P. García, J.V. García, M. García, E. Gamero-Sandemetro, I. Reviakine, A. Arnau, Y.A. Jiménez. *Biosensors*, **10** (12), 189 (2020). DOI: 10.3390/bios10120189