



**Галина  
Грушевская,**

ведущий научный сотрудник кафедры компьютерного моделирования физического факультета БГУ, кандидат физико-математических наук

**Андрей  
Бабенко,**

доцент кафедры биоорганической химии медицинского факультета иностранных учащихся БГМУ, кандидат химических наук

**Нина  
Крылова,**

старший научный сотрудник кафедры компьютерного моделирования физического факультета БГУ, кандидат физико-математических наук

**Игорь  
Липневич,**

научный сотрудник кафедры компьютерного моделирования физического факультета БГУ

**Валентина  
Егорова,**

доцент кафедры химии факультета естествознания БГПУ им. М. Танка, кандидат биологических наук

# Одномолекулярное EIS-секвенирование ДНК на композитах нанопористых структур

**Аннотация.** В статье анализируются перспективы использования прямой ДНК-нанодиагностики в медицине, сравниваются различные способы ДНК-секвенирования и предлагается высококачественный метод секвенирования индивидуальных молекул ДНК на электрохимических импедансных (EIS) ДНК-наносенсорах.

**Ключевые слова:** прямая ДНК-диагностика, однонуклеотидный полиморфизм, электрохимический ДНК-наносенсор.

**М**етоды определения первичной последовательности нуклеиновых кислот (секвенирования) активно развиваются в нескольких направлениях. Технологии секвенирования геномов про- и эукариот *de novo*, а также метагеномные исследования используются не только в научном мире, но и в рутинной клинической

диагностике. Заметно растет спрос и на секвенирование небольших геномов или их участков, включая полиморфизм генов и определение мутационных профилей.

Практически все указанные приложения метода требуют обогащения первичной мишени, например конкретных целевых областей молекулы ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), что вносит дополнительные переменные в и без того

непростое уравнение молекулярной диагностики патологий инфекционной и неинфекционной природы. В связи с этим за последние 10 лет значительно развились методы секвенирования на наносенсорах [1–4].

## Прямая ПЦР-основанная ДНК-диагностика в медицине

В клиничко-диагностических лабораториях с помощью методов, использующих ПЦР (классическая, в режиме реального времени, цифровая), выявляют инфекционные и наследственные болезни, генетические факторы риска сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, осуществляют неинвазивный пренатальный скрининг аномалий развития плода и др. Особую важность в некоторых случаях имеют профили мутаций или полиморфных состояний определенных участков генома человека, которые включают ключевые точки, связанные с теми или иными фенотипическими (на уровне белков или регуляторных некодирующих форм РНК) проявлениями патологического

или иного характера в организме человека [5].

Несмотря на развитие технологий и широкое распространение ПЦР, использующие ее приложения все еще остаются достаточно трудоемкими и затратными с точки зрения рутинных клинических анализов. В настоящее время из-за дороговизны основными потребителями услуг генетических исследований являются исследовательские лаборатории и диагностические центры системы страховой медицины [6].

Генетический анализ полиморфизма и мутаций в отличие от определения последовательностей вирусных и бактериальных нуклеиновых кислот часто оказывается более сложным и дорогостоящим. Во многом это связано с необходимостью работы всего с одним или несколькими нуклеотидами. Характерный пример таких приложений – определение мутаций в образцах опухолевой ткани, в частности в гене, кодирующем один из ключевых белков, участвующих в передаче сигнала внутрь клетки – KRAS.

Более 90% всех особенностей в первичной последовательности

ДНК гена KRAS представляют собой точечные замены одного нуклеотида на другой во втором экзоне гена, в последовательностях, кодирующих 12-ю и 13-ю аминокислоты (табл. 1). В норме в обеих позициях располагается глицин – единственная аминокислота, не имеющая боковой цепи. Любое изменение этой последовательности приводит к его замене на аминокислоты с разветвленным углеводородным радикалом, что ведет к нарушению пространственной конфигурации белка, в результате чего блокируется способность специальных белков инактивировать KRAS, соединенный с молекулой гуанозинтрифосфата (ГТФ), путем гидролиза ГТФ. Так как ГТФ служит источником энергии для химической реакции, катализируемой ферментом KRAS, то гидролиз ГТФ прерывает цепочку, обеспечивая при этом нормальное функционирование клетки [7, 8].

Согласно табл. 1, молекулярно-генетический анализ однонуклеотидного полиморфизма (SNP) только в кодонах 12 и 13 требует постановки более 10 ПЦР в режиме реального времени, для которых нужны дорогостоящие наборы реагентов (Therascreen KRAS RGQ PCR Kit, Qiagen, США). Частично эту проблему можно решить с помощью секвенирования по Сенгеру, конечная стоимость которого значительно ниже, однако этот метод не обладает достаточной чувствительностью для определения менее 20–30% мутантной ДНК в образце, что нередко наблюдается в гетерогенных опухолях.

На данный момент для рутинных клинических исследований не предложено метода анализа последовательностей ДНК,

Профиль	Гены	Определяемые мутации
KRAS 12 мутаций	KRAS (Кодоны 12,13)	Gly12Asp(GGT>GAT)
		Gly12Ala(GGT>GCT)
		Gly12Val(GGT>GTT)
		Gly12Ser(GGT>AGT)
		Gly12Arg(GGT>CGT)
		Gly12Cys(GGT>TGT)
		Gly13Asp(GGC>GAC)
	KRAS (Кодон 13)	Gly13Ser(GGC>AGC)
		Gly13Arg(GGC>CGC)
		Gly13Val(GGC>GTC)
		Gly13Cys(GGC>TGC)
		Gly13Ala(GGC>GCC)

Таблица 1. Соматические SNP-мутации гена KRAS (кодоны 12, 13)

обладающего всеми преимуществами секвенирования и ПЦР, одновременно недорогого и простого в исполнении, надежного и воспроизводимого.

## Современные методы секвенирования

При определенных условиях секвенирование может обходиться без обогащения исследуемой последовательности с помощью ПЦР или иных подходов. Благодаря этому снижается вероятность перекрестной контаминации образцов и получения ложноположительных результатов. Тем не менее в большинстве случаев количество целевых участков ДНК на старте не может обеспечить достаточное число ампликонов для корректной детекции, так как TaqMan-полимераза ингибируется через 40 циклов [9]. Из-за существования верхнего ограничения ПЦР-продукта по массе, например, мультиплексный молекулярно-генетический анализ на вирусность проводится при концентрации ДНК более  $2 \cdot 10^3$  МЕ/мл ( $8 \cdot 10^3$  геномных копий/мл) в исходном образце с вирусной ДНК (ПЦР с набором реагентов «Рибо-сорб» и «Рибо-преп») [10].

Решение обогатить целевые участки ДНК с помощью ПЦР или альтернативных подходов зачастую сопровождается незаметной на первый взгляд проблемой – потерей чувствительности к минорным последовательностям. Это связано в первую очередь с необходимостью проведения мультиплексной ПЦР вне зависимости от наличия специфических олигонуклеотидов или случайных последовательностей. Наконец, сборка коротких прочтений (ридов) в готовую последовательность

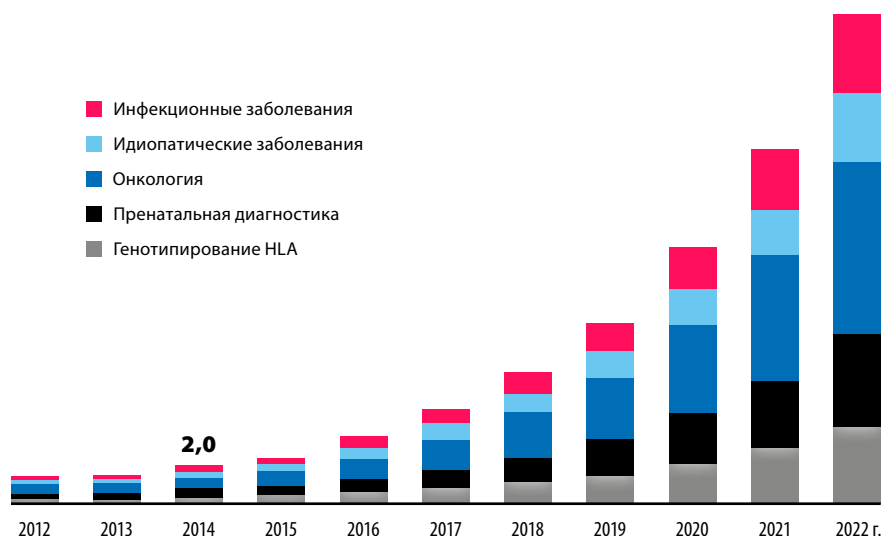


Рис. 1. Динамика объема спроса на услуги NGS-секвенирования в 2012–2022 г., млрд долл.

также приводит к ошибкам распознавания. При этом для таких направлений, как диагностика хронических и вялотекущих вирусных инфекций, мониторинг состояния пациентов с использованием жидкой биопсии, определение молекулярного профиля опухолей, роль минорных последовательностей чрезвычайно важна.

Современные методы генотипирования называют секвенированием следующих поколений – NGS (Next Generation Sequencing) и TGS (Third Generation Sequencing). TGS не использует ПЦР-обогащение [11]. NGS- и TGS-методы – это ДНК-наносенсорные технологии секвенирования, когда одновременно применяются несколько собранных вместе ДНК-сенсоров или ячеек, специализированных на различные целевые ДНК-последовательности и называемых ДНК-микрочипом [11, 12]. На каждом микрочипе может располагаться от 30–50 до нескольких десятков и даже сотен тысяч упорядоченно нанесенных микротестов или проб [13]. NGS- и оптическое

TGS-секвенирование – короткоридовые. Преимущество последнего с электрохимическим трансдьюсером – возможность длинноридового секвенирования целых нативных молекул ДНК [14].

Эффективность высокопроизводительных систем NGS и TGS поколений приведет к экспоненциальному росту спроса на услуги молекулярно-генетического анализа (рис. 1) [15]. Особенно они будут востребованы в онкологии из-за важной роли минорных последовательностей ДНК. При этом, согласно данным многочисленных обзоров клинических исследований, классическое секвенирование по Сенгеру, равно как и приложения NGS, позволяют достоверно выявлять 10–20% ДНК в общем пуле [16, 17]. С другой стороны, мультиплексные ПЦР в режиме реального времени и цифровая ПЦР гарантируют 5% [18], однако производительность этих методов недостаточна. На ранних стадиях развития опухоли с содержанием 0,01–1% числа копий мутантного гена результаты детектирования практически непредсказуемы [19].

## Длинноридовое EIS-детектирование SNP на квантовых материалах и нанокompозитах

Электрохимические или электронные методы, в отличие от оптических, не требуют обязательного использования меченых ДНК и основываются на регистрации изменения электрофизических свойств (проводимости и диэлектрической проницаемости) ДНК-образца. Полупроводниковый ионный NGS-секвенатор функционирует на ионно-селективных полевых транзисторах. При проведении синтеза вблизи поверхности их затворов положительно заряженные ионы водорода, образуемые при гидролизе нуклеотидов с последующим включением нуклеозидмонофосфатов в растущую ДНК-цепочку, вызывают перераспределение электрического заряда. Соответственно меняется электрическое поле, действующее на электрический ток между стоком и истоком транзистора.

Перспективная альтернатива стандартным методам – развитие

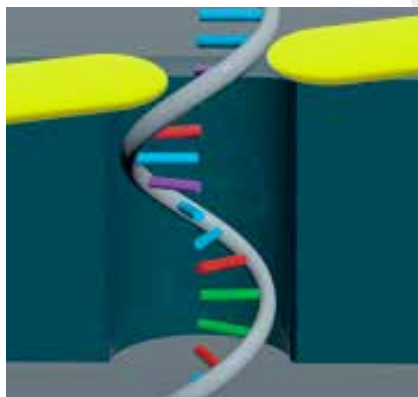


Рис. 2. Нанопоровое секвенирование ssДНК с регистрацией туннельного тока через 0,7-нанометровый разрыв электрода (электрод показан желтым цветом)

электрохимических методов длинноридового секвенирования ДНК на нанопористых поверхностях и квантовых материалах ввиду высокой чувствительности, низкой стоимости и возможности миниатюризации электрохимических ДНК-сенсоров. Электрохимическая импедансная спектроскопия с использованием современных EIS ДНК-сенсоров с электродами Si/SiO<sub>2</sub> wafer/SWCNT/AuNP, в покрытие которых включены одностенные углеродные нанотрубки (SWCNT, одностенные УНТ) и золотые наночастицы (AuNP), имеет

предельную чувствительность 10 зептоМ (зМ, 10<sup>-21</sup> М) (для олигонуклеотидов из 10 азотистых оснований) [20]. Модификация электродов графеном позволяет детектировать немеченные генные последовательности без ПЦР при предельной чувствительности 7,1 зМ [21]. EIS ДНК-сенсор с электродами из стеклоуглерода (аллотропной формы углерода типа фуллерена, GCE), модифицированными окисленным графеном rGO и наночастицами золота для детектирования мутаций в гене *BRCA1* также имеет очень низкий предел, порядка 10 зМ [22]. EIS ДНК-сенсор с электродами из GCE/rGO имеет чувствительность 3,2 зМ [23]. Наименьший предел чувствительности – 0,39 зМ достигнут для электрохимических сенсоров с электродами вида GCE/N-допированный мультиграфеновый аэрогель / золотые нанозвездочки [24]. Такие высокочувствительные сенсоры могут быть использованы для свободно циркулирующей ДНК в сыворотке крови человека с концентрациями 3 нг/мл [25] или в 40 пг (10 копий геномной ДНК), необходимых для одного анализа [26].

Для углеродных наноструктур характерен топологический транспорт носителей электрического заряда. Их уникальные свойства можно применять для разработки метода детектирования одиночных молекул ДНК на эффектах поверхностного плазмонного резонанса и поверхностно-усиленного рассеяния света, эффектах экранирования в квантовых материалах: графене с металлическими наночастицами, углеродных нанотрубках, графеноподобных монослоях на нанопористом анодном оксиде алюминия (АОА) [1, 27–31].

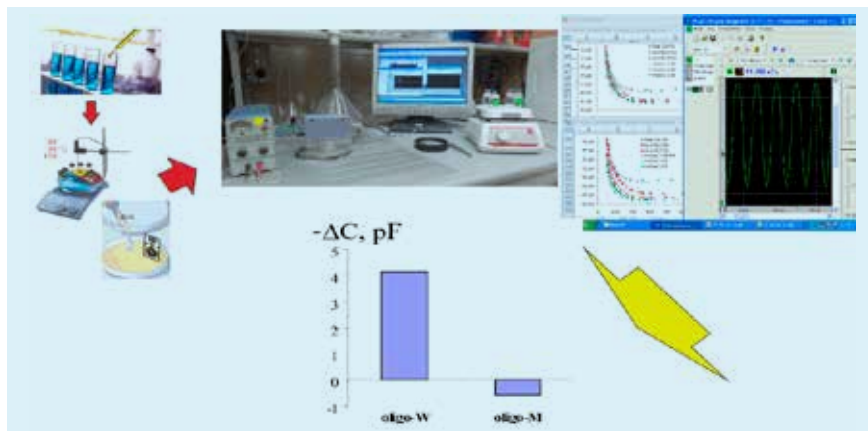


Рис. 3. Система электрохимического импедансного ДНК-анализа (в центре) с регистрацией частотных зависимостей изменения электрической емкости ΔC ДНК-сенсора (справа и внизу) после гибридизации денатурированной dsДНК (слева)



Нанопоры с диаметром порядка 1 нм могут играть роль молекулярного сита, которое отбирает одноцепочечные ДНК, комплементарные ДНК-зонду, с последующей генерацией отклика электрохимического трансдьюсера и не пропускает несвязавшуюся dsДНК 2-нанометровой толщины [14]. Принцип действия одномолекулярного бионанопорового секвенирования заключается в определении одной молекулы ДНК на протеиновой нанопоре с диаметром отверстия 1,2–1,4 нм с регистрацией ионных токов через поры [14]. Нанобиопоры расположены в липидной мембране. Основная проблема данного метода – точность сборки гена не более 97% из-за числа прочтений не более 2 раз.

Использование не биологических, а более стабильных твердотельных нанопор, легко интегрируемых в электронные МОП-структуры, позволило бы разработать высокоточные системы длинноридового нанопорового секвенирования. Однако все синтезированные твердотельные нанопористые материалы имеют поры большего размера: графеноподобный мономолекулярный слой (монослой) MoS<sub>2</sub> с порами 2,8 нм; нанопористые SnO<sub>2</sub>, AOA и Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> с диаметром пор 10 нм. Было предложено закрывать твердотельные нанопоры электродами с наноразрывами шириной 0,7 нм (рис. 2). При комплементарном связывании с ssДНК-зондом dsДНК-мишень расплетается и поцепочно может диффундировать в нанопору через 0,7-нанометровый зазор [32]. Гибридизация регистрируется по изменению квантового туннельного тока.

Преимущество EIS ДНК-сенсоров нефарадеевского типа

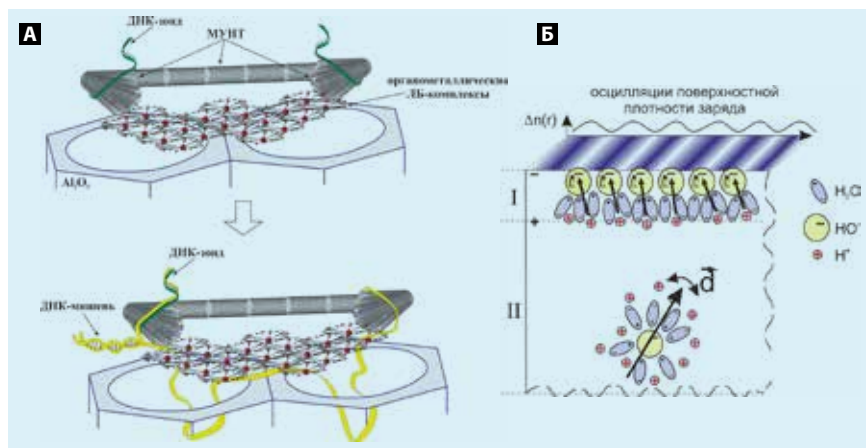


Рис. 4. **А** – одномолекулярное секвенирование на МУНТ, декорированных расположенными на нанопорах АОА органометаллическими ЛБ-комплексами.

**Б** – принципы функционирования сенсора нефарадеевского типа для детектирования поляризационных процессов в электрически заряженном двойном слое Гельмгольца. I, II – области поляризации объемного и поверхностного электрического заряда соответственно. Поверхностная зарядовая плотность  $\Delta n(r)$  осциллирует в резонансе с колебаниями дипольного момента  $d$  гидратного комплекса

заключается в возможности детектирования гибридизации ДНК без меток [2–4]. Это делает их дешевыми, простыми в использовании и перспективными для миниатюризации. Изменения в сопротивлении или емкости двойного приэлектродного слоя индуцируются гибридизацией ДНК-мишени с одноцепочечной зондовой ДНК, адгезированной на углеродную нанотрубку (УНТ) и расположенной в приэлектродной области. Система наносеквенирования на нефарадеевских наносенсорах представлена на рис. 3. Наносенсорный EIS-преобразователь сигнала связывания олигонуклеотидного ssДНК-зонда с dsДНК-мишенью является емкостным сенсором открытого типа и представляет собой встречно-штыревую систему алюминиевых электродов, которые напылены на плоскую металлическую подложку и покрыты диэлектрическим тонким слоем нанопористого АОА и монослоями наноциклических комплексов высокоспинового октаэдрического

железа Fe(II) с дитионил-пирроловыми лигандами (Fe(II)ДТР), получаемых технологией Ленгмюра–Блоджетт (ЛБ). Последующее нанесение многостенных УНТ (МУНТ) дает декорированные металлоорганическими ЛБ-комплексами Fe(II)ДТР МУНТ. МУНТ, предварительно функционализированные молекулами ДНК-зонда, являются трансдьюсером сигнала гибридизации.

Гибридизация комплементарной ДНК-мишени с ДНК-зондом в чувствительном слое приводит к проникновению высвободившейся ssДНК через нанополости Fe(II)ДТР-монослоя в нанопористый АОА с последующим ее связыванием торцов МУНТ, как показано на рис. 4А. Детектирование целевой последовательности основывается на эффекте экранирования приэлектродного двойного слоя Гельмгольца, приводящего к уменьшению электрической емкости  $C_{dl}$  двойного слоя. Экранирующий эффект обусловлен резонансным

Тип ДНК-мишени	Концентрация ДНК-мишени, мкг/мл	Изменение емкости (–ΔC), пФ	
		ДНК-зонд дикого типа	ДНК-зонд с SNP-последовательностью
Очищенная геномная ДНК из плаценты здоровых доноров	10	2,0	0,1
	56	4,6	–0,5
Геномная ДНК из тканей КРР	20	–2,0	1,5
	40	–1,2	4,7
кДНК, КРР	40	3,0	3,0
	67	1,2	4,0
	700	0,2	10,0
ПЦР ампликоны с кДНК, КРР	2	0,1	1,1

Таблица 2. Изменение электрической емкости EIS ДНК-наносенсоров при секвенировании различных типов ДНК-мишеней

распадом гидратных комплексов ионов и гидратированных нуклеиновых кислот на собственных частотах ионных осцилляций  $\omega_{res}$ . Графически принципы функционирования электрохимического ДНК-наносенсора представлены на рис. 4Б. Резонансный распад гидратированных ионов усиливается осцилляциями свободного электрического заряда в МУНТ, декорированных адгезированными атомами Fe(II) в высокосоциальном состоянии. Поверхностные состояния приэлектродного МУНТ-содержащего слоя резонируют опосредованно с ионными рекомбинационными процессами на частоте  $\omega_{res}$  следующим образом. Поверхностные состояния возбуждаются квантами электромагнитного поля, испускаемыми в рекомбинационном процессе ион – противоион, так что колебательные моды поверхностной зарядовой плотности  $\Delta n(\vec{r})$  резонансно возбуждаются (рис. 4Б).

С помощью системы, представленной на рис. 3, исследовали образцы опухолевой ткани кишечника (колоректальный рак, КРР), которые содержат мутации в гене KRAS, выявленные с помощью ПЦР в режиме реального времени и подтвержденные

методом секвенирования по Сенгеру. В табл. 2 представлены результаты распознавания мутации KRAS в различных типах ДНК-мишеней с использованием разработанного нами нового ДНК-наносенсорного EIS-комплекса. Комплементарное связывание плацентарной ДНК, не имеющей мутации гена KRAS, происходит на сенсорах с пробной ДНК дикого типа (ДНК-зонд типа oligo-W), что приводит к уменьшению емкости сенсоров oligo-W. Напротив, электрическая емкость ДНК-сенсора, содержащего ДНК-зонд с однонуклеотидной заменой (ДНК-зонд с SNP-последовательностью, ДНК-зонд oligo-M), практически не изменяется после гибридизации с плацентарной ДНК (отрицательный контроль). Для геномной ДНК, выделенной из опухолевой ткани, снижение емкости регистрируется для oligo-M сенсоров, в то время как емкость сенсоров с ДНК-зондом дикого типа, наоборот, повышается, вероятно, за счет контаминации ДНК-образца. Для образцов комплементарной ДНК (кДНК), полученных с помощью обратной транскрипции с РНК опухолевых клеток, регистрируется понижение емкости сенсоров

обоих типов, в то же время с ростом концентрации ДНК-мишени наблюдается меньшее изменение емкости для сенсора с ДНК-зондом дикого типа. Для образцов кДНК, полученных ПЦР-амплификацией, зарегистрировано снижение емкости сенсора с олигонуклеотидом мутантного типа при низких концентрациях ДНК-мишени (2 мкг/мл).

Предлагаемый нами способ ДНК-идентификации не требует дорогостоящего оборудования и практически не чувствителен к контаминации; результат EIS-анализа различных образцов ДНК может быть получен в течение 30 мин. [11]

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Abdul Rasheed P., Sandhyarani N. // Biosensors and Bioelectronics. 2017. Vol. 97. P. 226.
2. Babenka A. S., Grushevskaya H. V., Krylova N. // Int. J. Mol. Medicine. 2018. Vol. 42. P. 16.
3. Xuanying Li et al. // Biosensors and Bioelectronics. 2019. Vol. 126. P. 596.
4. Grushevskaya H. V., Krylova N. G., Lipnevich I. V. et al. // Semiconductors. 2018. Vol. 52. P. 1836.
5. WHO. Genomics and world health // Report of a WHO scientific group. 2002. NPHL: QZ 50.
6. Shaikh S., Sumant O. DNA sequencing market: global opportunity analysis and industry forecast, 2017–2025 // Allied Market Research, Diagnostics and Biotech. 2018. N°LI\_17163. <https://www.alliedmarketresearch.com/dna-sequencing-market>.
7. Ghosh A., Praefcke G. J. K., Renault L. et al. // Nat. Cell Biol. 2006. Vol. 440. P. 101.
8. Stolze B., Reinhart S., Bullinger L. et al. // Sci. Rep. 2015. Vol. 5. P. 8535.
9. Heid C. A., Stevens J., Livak K. J. et al. // Genome Res. 1996. Vol. 6. P. 986.
10. Методические рекомендации по применению набора реагентов для определения и дифференциации генотипов вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенсHCV-генотип-Г» – М., 2017.
11. Liu L., Li Y., Li S. et al. // J. Biomed. Biotech. 2012. Vol. 2012. Article ID251364.
12. NGS: высокопроизводительное секвенирование / под ред. Д. В. Ребрикова. – М., 2014.
13. Наволоцкий Д. В., Крисько А. В., Арнаутов В. А. и др. // Научное приборостроение. 2010. Т. 20. С. 10.
14. Rang F. J., Kloosterman W. P., de Ridder J. // Genome Biology. 2018. Vol. 19. Article ID90.
15. Next Generation Sequencing 2017–2025. 2018. Report N°978–1–68038–428–4 // <https://www.grandviewresearch.com>.
16. Cottrell C. E., Al-Kateb H., Bredemeyer A. J. et al. // J. Mol. Diagn. 2014. Vol. 16. P. 89.
17. Дрибноходова О., Миронов К. О., Дунаева Е. А. и др. // Клиническая лабораторная диагностика. 2013. №6. С. 49.

Полный список использованных источников

 <http://innosfera.by/2019/04/DNA>