

УДК 577.1

БЕЗАМПЛИФИКАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДАМИ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА И ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ

Э.К. Писарев¹, О.О. Капитанова², И.А. Веселова², М.Э. Зверева²

(¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; ² химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; e-mail: e.pisarev@fbb.msu.ru)

В обзоре обсуждаются существующие на сегодняшний день подходы к созданию безамплификационных сенсорных систем для идентификации и определения нуклеиновых кислот на основе поверхностного плазмонного резонанса и гигантского комбинационного рассеяния, их возможности, ограничения и перспективы дальнейшего развития.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, безамплификационные методы анализа, ППР, ГКР, детектирование вирусных и опухолевых нуклеиновых кислот.

Последние десятилетия наблюдается высокая потребность в развитии методов выявления инфекционных и генетических заболеваний на основе идентификации и определения нуклеиновых кислот (НК). Применение последних обеспечивает экспрессность, малую инвазивность, уникальную специфичность и высокую чувствительность. Среди подходов к идентификации и определению НК для биомедицинского применения наибольшее распространение имеют методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющие получить за счет циклической ферментативной амплификации большое число физических копий фрагментов целевой молекулы нуклеиновой кислоты, ограниченных последовательностями олигонуклеотидов, необходимых для амплификации *in vitro* ДНК-полимеразой НК [1].

Многочисленное ферментативное копирование исходной НК в исследуемом образце биологического материала *in vitro* позволяет детектировать единичные молекулы (рис. 1а). При этом именно из-за ферментативного копирования в полученные фрагменты при ПЦР могут вноситься ошибки в виде точечных замен нуклеотидных остатков в последовательности НК (рис. 1б). Этот факт обуславливает ограничение использования методов на основе ПЦР для определения низкопредставленной мутантной аллельной фракции НК, т.е. в тех случаях, когда необходимо определить фрагмент с точечной

заменой нуклеотидного остатка на фоне большого числа фрагментов дикого типа. Если частота определяемой мутации количественно ниже ошибки работы фермента, использование метода ПЦР приводит к недостоверным результатам [2] (рис. 1в).

Ввиду необходимости проведения анализа внеклеточных циркулирующих НК для фетальной диагностики, диагностики онкологических и вирусных заболеваний остро встал вопрос о достоверности методов идентификации и определения НК в биологических жидкостях, что требует разработки новых подходов, позволяющих учитывать ошибку ферментативного копирования. Примером таких решений служат цифровая капельная ПЦР, оперирующая абсолютным числом нуклеиновых кислот [3] и направленное глубокое секвенирование нового поколения с использованием молекулярных идентификаторов для оценки ошибки ферментативного копирования в каждом положении [3]. Для детектирования полученных в ПЦР фрагментов НК используют различные физико-химические методы, например электрохимические [4–6], флуоресцентной спектроскопии [7, 8], инфракрасной абсорбционной спектроскопии [9–11] и др. [12]. Следует отметить, что из-за присутствия в биологических жидкостях ингибиторов ферментов методы на основе ПЦР неприменимы для прямого детектирования в них НК без предварительного выделения последних.

В случае анализа микроРНК все перечисленные недостатки усугубляются дополнительной стадией – проведением реакции обратной транскрипции (от-ПЦР, реакции перевода цепей РНК в ДНК), что делает анализ более трудоемким и дорогостоящим. Поскольку РНК-зависимые ДНК-полимеразы обладают чрезвычайно низкой точностью, очевидно, что методы на основе ПЦР и от-ПЦР не могут обеспечивать надежных результатов для исследовательских задач, требующих обнаружения точечных мутаций генов или их транскриптов [13].

Один из перспективных путей преодоления ограничений существующих на сегодня диагностических сенсорных систем – создание прямых методов (без применения ПЦР-амплификации) идентификации и определения нуклеиновых кислот на уровне единичных молекул без предварительной подготовки проб биообъектов (рис. 1з).

В первую очередь к системам такого типа относятся оптические сенсоры поверхностного плазмонного резонанса (ППР-сенсоры) [14] и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР-сенсоры) [15], принцип работы которых основан на измерении оптического отклика высокочувствительного плазмонного элемента при адсорбции на нем анализируемого вещества. ППР-сенсоры детектируют изменение показателя преломления металлической наноструктуры, который меняется при адсорбции компонентов анализируемой пробы поверхности, тем самым устанавливая наличие того ли иного вещества в среде.

ГКР-сенсоры регистрируют спектр комбинационного рассеяния анализируемого вещества, усиленный металлической наноструктурой. Этот спектр несет информацию о собственных частотах колебаний молекул и уникален для каждого вещества. Поскольку комбинационное рассеяние является нелинейным процессом, увеличение электрического поля вблизи поверхности металлической наноструктуры при возбуждении в ней локализованного ППР существенным образом повышает его эффективность, что позволяет ГКР-сенсорам детектировать сверхмалое количество вещества (на уровне единичных молекул). К примеру, метод ГКР использовался для анализа продуктов ПЦР в присутствии вирус-специфичных олигонуклеотидов ДНК биологических жидкостей пациентов, инфицированных вирусом гепатита В [16] и COVID-19 [17].

Цель настоящего обзора состоит в том, чтобы дать представление об аналитических возможностях существующих на сегодняшний день безамплификационных ППР- и ГКР-сенсорных систем для идентификации и определения НК.

ППР-сенсоры для определения нуклеиновых кислот

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) для анализа биоорганических соединений, к которым относят и нуклеиновые кислоты, используется более трех десятилетий. Детально принципы ППР рассмотрены в обзоре [18]. В основе всех методов ППР лежат резонансные колебания электронов при возбуждении поверхностного плазмона внешней электромагнитной волной на его резонансной частоте. В наиболее распространенном варианте ППР-детекции падающий свет фокусируется через призму на поверхность тонкой пленки металла (как правило, золота или серебра). При соблюдении условий полного внутреннего отражения, начиная с некоторого угла падения, проходящий через призму свет отражается от поверхности стекло/металл. При этом фотоны падающего света взаимодействуют с электронами проводимости, в результате чего возникает резонанс и образование квазичастиц, получивших название «плазмоны». Плазмоны распространяются вдоль поверхности металла, создавая затухающие электромагнитные волны на расстоянии ~300 нм от нее. Это расстояние определяется двумя факторами: длиной волны падающего излучения, а значит и импульсом электронов проводимости, зависящим от свойств поверхности и процессов, происходящих на ней (например, адсорбции молекул). Затухающее поле, создаваемое плазмонами, взаимодействует с адсорбированными на поверхности металла молекулами биополимеров – белками или нуклеиновыми кислотами, что приводит к изменению показателя преломления металлической пленки. Изменение последнего регистрируется детектором [19, 20].

Как правило, специфичное ППР-определение целевых молекул указанных аналитов основано на их гибридизации, приводящей к связыванию НК-аналита с иммобилизованным на поверхности сенсора комплементарным к исследуемой последовательности олигонуклеотидом, который называют ДНК-зондом. Такие ДНК-зонды могут как содержать, так и не содержать до-

полнительные индикаторные молекулы (метки) для реализации ППР. В первом случае сигнал регистрируется при изменении положения в пространстве метки относительно плазмонной поверхности, сформированной наночастицами в результате конформационных изменений зонда, во втором случае сигнал регистрируется при образовании комплекса ДНК–ДНК (зонд–аналит) или ДНК–ДНК–белок (зонд–аналит–ДНК-связывающий белок). Существуют различные варианты иммобилизации ДНК-зондов на поверхности металла. Существуют различные варианты иммобилизации ДНК-зондов на поверхности металла: наиболее популярный вариант – ковалентная связь через тиольную группу (–SH), реже применяется вариант модификации поверхности стрептавидином, а НК – как биотином, так и с помощью включения в последовательность аптамеров соответственно [20]. Для создания подложек обычно используют наноструктурированное золото или серебро [21], реже другие переходные металлы и материалы на их основе [22]. Использование золота является более предпочтительным вариантом из-за его меньшей коррозии, низкой токсичности для биологических объектов, а также более прочной связи Au–S (418 кДж/моль [23]) по сравнению с Ag–S (217 кДж/моль, согласно сайту https://www.webelements.com/silver/compound_properties.html). Существенное преимущество метода ППР состоит в высокой чувствительности за счет многократного усиления сигнала (в 10^4 – 10^{10} раз) и отсутствии в некоторых вариантах необходимости использования специальных химических модификаций.

Метод ППР был использован также без комбинации с гибридизацией зонд–аналит для создания варианта системы определения последовательности нуклеиновой кислоты по типу секвенатора нового поколения (NGS) и разработки на его основе ППР-биосенсора для определения первичной структуры ДНК путем синтеза. В этом варианте использовали систему, состоящую из золотой пластинки, поверхность которой была модифицирована биотинилированным декстраном. В качестве модельного НК-аналита были использованы синтетические олигонуклеотиды, сшитые со стрептавидином. dNTP каждого типа последовательно подавались и удалялись в проточную ячейку чипа, а присоединение нуклеотида регистрировали по изменению показателя преломления, вызванного сдвигом ДНК-полимеразы в ее комплексе с ДНК после

присоединения нуклеотида [24]. ППР-сенсоры могут обеспечить относительно высокую чувствительность порядка 2000–4000 нм спектрального резонансного сдвига на единицу показателя преломления (RIU), но не могут удовлетворять современным тенденциям развития биохимического анализа, а именно: новым иерархическим структурам, разрешению за пределами дифракционного предела, селективности по размеру биоконплексов и т.д. Структурирование поверхности массивами наночастиц и связанные с такой двумерной организацией локализованные поверхностные плазмонные резонансы (ЛППР) могут стать основой для ряда перспективных биосенсорных наноархитектур и обеспечить новые функциональные возможности. В сочетании с большой поверхностью для иммобилизации биоорганических соединений и биообъектов, обеспечиваемой 3D-матрицей, предлагаемая архитектура датчика предвещает новый этап в развитии технологии плазмонных сенсоров. Наконец, возможность усиления поля в «горячих» точках матрицы метаматериала позволяет проводить анализ с использованием одного сенсорного элемента методом гигантского комбинационного рассеяния параллельно с методом ППР. Значительно увеличенная площадь поверхности, заданная топографией и свойствами материала, позволяет увеличить количество биоматериала, который может быть включен в матрицу в пределах доступной глубины для гибридизации зонда [25–27]. Кроме того, расстояние между блоками в пределах наноструктурированного сенсора может быть выбрано в соответствии с размером интересующих комплексов биополимеров (НК–белок), что дает доступ к дополнительной возможности реализовать селективность по размеру, которая важна для многих задач, в частности для обнаружения вирусов и ДНК-связывающих белков. В целом, наличие регулярных ячеек с размером, подходящим под целевые аналиты, в массиве блоков для сборки поверхности (конкретная 3D-морфология используемого в каждой работе сенсора тоже, по сути, является характеристикой наноструктурированности) может способствовать повышению воспроизводимости и чувствительности определения биополимеров разной природы за счет улучшения соотношения сигнал/шум [28]. Такой подход был реализован в варианте ППР [24] и ГКР [26].

Сравнительное изучение данных литературы [18–28] показало, что безамплификационные

методы определения нуклеиновых кислот на основе ППР привлекают внимание исследователей благодаря возможности усиления сигнала в десятки миллионов раз, однако на сегодняшний день по чувствительности они по-прежнему уступают амплификационным методам на основе ПЦР, позволяющим детектировать единичные молекулы НК в биообъектах. Этот факт способствовал развитию подходов к определению указанных биомолекул методом гигантского комбинационного рассеяния.

ГКР-сенсоры определения нуклеиновых кислот

Явление неупругого рассеяния излучения на молекулах вещества, сопровождающегося изменением частоты, называется эффектом Рамана или комбинационным рассеянием (КР). Спектр КР молекулы несет информацию о переходах между колебательными подуровнями, т.е. о колебаниях атомов и групп атомов внутри молекулы [3]. Однако вероятность КР-рассеяния мала по сравнению с упругим рассеянием (1 фотон среди 10^7), поэтому актуальной задачей является усиление сигнала. При взаимодействии металлических наноструктурированных поверхностей с падающим светом в поверхности происходит возбуждение локализованных поверхностных плазмонов, создающих гигантское электромагнитное поле в горячих точках. Когда аналит попадает в такие горячие точки, то аналитический сигнал значительно усиливается. Разница по энергии падающего и рассеянного света соответствует энергиям колебаний молекул аналита [29]. ГКР дает эффект многократного увеличения интенсивности комбинационного рассеяния вещества, адсорбированного на плазмонной поверхности, когда длины волн возбуждающего электромагнитного излучения и комбинационного рассеяния близки к длине волны, на которой наблюдается плазмонный резонанс. В этом методе в качестве поверхности используют либо золотые, либо серебряные наночастицы, поскольку они обладают максимальной величиной коэффициента усиления сигнала.

С помощью ГКР можно регистрировать как собственные спектры нуклеиновых кислот (прямая ГКР-спектроскопия), так и молекул-репортеров, сшитых с ДНК-зондом (непрямая ГКР-спектроскопия). Поскольку в первом варианте сигнал от нуклеиновых кислот обусловлен колебаниями сахарофосфатного остова и азотистых оснований и не зависит ни от порядка,

ни от последовательности остатков нуклеотидов, ГКР-сигнал регистрируется независимо от структуры молекулы. Несмотря на то, что с использованием синтетических одноцепочечных ДНК была показана принципиальная возможность идентифицировать олигонуклеотиды одинаковой длины, но отличающиеся на одно основание [30], стоит учесть, что в условиях реальных биологических жидкостей внеклеточные НК подвергаются расщеплению нуклеазами, что приводит к появлению фрагментов НК разной длины (нормальное распределение с пиком около 146 нуклеотидных остатка (н.о.) для ДНК). Существование возможности альтернативного сплайсинга РНК и наличия у одного гена нескольких аллелей может существенно осложнить идентификацию целевого фрагмента. Далеко не последнюю роль играет и присутствие посторонних компонентов, например в том случае, если проводится определение мутантной ДНК, содержащей однонуклеотидную замену на фоне ДНК дикого типа, зачастую присутствующую в концентрациях на порядки больших, чем мутантная форма. Считается, что прямую ГКР-спектроскопию нельзя использовать для создания сиквенс-специфичных сенсоров без дополнительной ПЦР-амплификации. Такой метод был реализован в варианте определения высокой концентрации фрагментов НК-аналита заданного размера, которая также достигается в процессе ПЦР [16].

В работе [31] показано, что НК-фрагменты длиной 20 и 141, но не 35 оснований, содержащие однонуклеотидные замены гена *KRAS* могут иметь индивидуальные четко-различимые спектры на фоне большего количества НК дикого типа. Также для фрагмента 141 н.о. было показано наличие пика в области 633 и 684 см^{-1} соответствующего 3'-эндо и 2'-эндо конформациям дезоксирибозы, что указывает на присутствие одновременно А- и В-форм ДНК в этом фрагменте. В случае фрагментов 20 и 35 н.о. такого не наблюдалось. Это, вероятно, связано с тем, что короткие фрагменты НК длиной 20 и 35 н.о. складываются в пространственную упорядоченную структуру с фрагментами двойной спирали одной формы, в то время как вторичная структура фрагмента длиной 141 н.о. является более сложной комбинацией А- и В-форм ДНК [31]. Хотя авторы работы [31] и показали, что предложенным методом можно определить олигонуклеотиды, различающиеся по составу и размеру, а также имеющие одинаковый состав, но

разный порядок оснований, однако этот метод едва ли применим для анализа реальных клинических образцов из-за гетерогенности длин НК. Стоит отметить, что в этом исследовании был предложен метод унификации длины фрагментов аналитов путем ферментативного расщепления эндонуклеазами рестрикции. Однако, как и в вышеописанной работе [30], недостатком использования для анализа одноцепочечной ДНК является сложность селективного выделения одной цепи из двойной спирали ДНК. Обобщая все вышесказанное, можно заключить, что методы анализа на основе прямого ГКР-определения индивидуальных молекул ДНК представляют интерес с точки зрения фундаментальной химии, однако возможность их практического применения требует дальнейших исследований.

Методы анализа непрямого ГКР-спектроскопии лишены перечисленных недостатков и успешно применяются для создания биосенсоров при решении широкого спектра биомедицинских задач, таких как определение ДНК вирусов, бактерий, точечных мутаций онкогенов.

Авторы [32] разработали “on-to-off” сенсор для определения мутаций в гене *KRAS*. Поскольку ген *KRAS* может содержать множество мутаций, авторы предложили определять содержание ДНК дикого типа (*WT-KRAS*) в тотальной ДНК *KRAS*. В качестве ГКР-усиливающей поверхности использовали так называемые «наностержни» – вытянутые нитевидные наночастицы, состоящие из золотого ядра и серебряной оболочки. Наночастицы были иммобилизованы на тиолированном предметном стекле и конъюгированы с олигонуклеотидом, содержащим SH-группу на 3'-конце и ГКР-активную метку на 5'-конце. Появление в смеси *WT-KRAS* приводит к раскрытию шпильки и падению интенсивности сигнала. Сенсор протестировали в двух вариантах: 1) на выделенных ДНК *KRAS* дикого типа и *KRAS G12V* (мутантные формы с точечной мутацией, приводящие к замене в белке в 12-м положении глицина на валин), а также на их смесях с разным соотношением компонентов ДНК дикого типа и мутантных форм; 2) на тотальной ДНК, выделенной из двух клеточных линий клеток человека, одна из которых содержала мутацию, а другая нет, и их смесях с разным соотношением ДНК дикого типа и мутантных форм. Результаты определения получились статистически достоверными. К безусловным преимуществам данного метода стоит отнести низкий предел обнаружения (50 фМ) определе-

ния ДНК гена *KRAS*, небольшое время анализа (~40 мин) и низкую стоимость. Однако нельзя не отметить, что хотя авторам и удалось показать статистическую сходимость результатов по трем измерениям для определенных соотношений концентраций, при изменении соотношения сигнал в образцах ДНК дикого типа становится статистически неотличим от сигнала в образцах, содержащих 10% мутантной формы. Это обстоятельство накладывает ограничение по содержанию ДНК опухолевых клеток в образце: оно должно быть достаточно высоким (судя по имеющимся данным, не менее 50%). Это существенно осложняет применение данного сенсора в онкодиагностике.

В некоторых модификациях сенсор конструируют из двух зондов, один из которых, как правило, растворим и конъюгирован с наночастицей металла (по сути, необходим для усиления сигнала при приближении к поверхности), а второй прикреплен к поверхности и работает как якорь. Зонды подбираются таким образом, чтобы последовательность целевой ДНК могла связывать оба зонда одновременно, формируя два дуплекса. Такой подход получил название “Sandwich-system” из-за сходства с бутербродом, для сборки которого обязательно присутствие аналита.

Классический вариант такой системы был реализован в работе [33]. В ней авторы нанесли серебряные наночастицы на поверхность микрочастиц из сополимера стирола и акриловой кислоты. Затем к Ag-наночастицам были ковалентно пришиты ГКР-активные молекулы (по принципу 1 частица – 1 ГКР-активное соединение), и вся конструкция покрывалась наносферой из оксида кремния. Стеклоподобная поверхность была обработана пираньей и 3-глицидилоксипропилтриметоксисиланом (GPTMS), который за счет эпоксидной группы способен ковалентно связываться как со стеклом (через свободные ОН-группы стекла), так и с NH₂-группами гетероциклических оснований нуклеиновых кислот. С помощью данного сенсора удалось идентифицировать индивидуальные нуклеиновые кислоты в смеси. Более того, оказалось, что все четыре проверенных в работе ГКР-активных соединения имеют индивидуальные пики. Из этого следует, что данная система позволяет проводить мультиплексный анализ, т.е. одновременное определение нескольких мишеней. Однако предел обнаружения и специфичность такой системы не определялись. К тому же процедура анализа занимает более 12 ч, из

чего следует, что тест не является экспрессным. На основании вышесказанного можно заключить, что эту систему теоретически можно применять для лабораторных исследований, однако использование ее в клинической диагностике, где требуется высокая пропускная способность, невозможно.

Другой вариант “sandwich-system” был использован в работе [34]. Растворимый зонд был конъюгирован с кубической «нанопогремушкой», в центре которой находилось золотое ядро, помещенное в центр полой Au–Ag-сферы. В пространстве между гранями куба и ядром находилась ГКР-активная метка, а снаружи куб покрывался золотом для того, чтобы метка не покидала пространство между золотым ядром и сферой. Второй зонд был конъюгирован с магнитными наночастицами. В магнитном поле магнитные частицы оседали на стенках стекла, и в случае присутствия целевого аналита в результате гибридизации формировалась полная система зонд 1 – аналит – зонд 2. Коэффициент усиления КР-сигнала системы с «погремушками» был на три порядка выше, чем в случае использования обычных наночастиц золота. Такая разница обусловлена как минимум двумя причинами: 1) аккумуляцией ГКР-активного соединения между золотой наночастицей и Au–Ag-оболочкой; 2) усилением электромагнитного поля в этом пространстве в несколько раз. С учетом того, что усиление ГКР-сигнала зависит от 4-й степени усиления ближнего электромагнитного поля, интенсивность сигнала будет увеличиваться на несколько порядков. Авторы [34] успешно использовали такую систему для определения однонуклеотидных полиморфизмов of *P. falciparum* гена *pfk_13* (предел обнаружения составил 100 амоль). Важным дополнительным результатом рассматриваемой работы стало выявление влияния температурного эффекта на специфичность биосенсоров такого типа. На синтетических субстратах было показано, что понижение температуры снижает специфичность зонда с последовательностью к дикому типу на ДНК-мишени этого типа. Отношение интенсивности мишени дикого типа к мутированной последовательности с одним неспаренным основанием при формировании дуплекса составило 8:1 и 2,5:1 при 37 и 25 °С соответственно.

В более усовершенствованном варианте [35] гибридизацию с РНК-аналитом проводили в стеклянном капилляре, содержащем несколько разных отмывочных буферных растворов. Ря-

дом с капилляром был установлен постоянный магнит. Капилляр перемещали так, чтобы магнит последовательно воздействовал на все буферы. Соответственно, магнитные частицы двигались вместе с ним, что позволяло избавляться от неспецифического связывания. В последнем буфере осуществлялся ГКР-анализ. Концепция данного сенсора получила название “Lab-in-a-stick”. Сенсор такого типа, лишенный недостатка, связанного с долгими промывками, был успешно протестирован как на синтетических образцах, так и на РНК малярийного плазмодия, в частности был установлен предел обнаружения – 2 амоль (объем образца 10 мкл). Применение такого метода для реальных клинических образцов крови зараженных пациентов дало положительные результаты. Однако нельзя не отметить, что при анализе реальных объектов оказалось, что интенсивность сигнала существенно меняется при изменении времени инкубации с 3 до 5 ч. Интенсивность сигнала в неинфицированных образцах падала, а в инфицированных возрастала, что увеличивало разницу в значениях интенсивности инфицированных и неинфицированных образцов, более того, эта разница становилась статистически значимой. Причина этого заключается, вероятно, в медленной кинетике образования сэндвич-комплекса.

Нестандартный подход к синтезу наночастиц бы реализован в работе [36]. В этом случае один растворимый зонд был иммобилизован на золотой наночастице с золотым ядром и ГКР-активным соединением в пустом пространстве структуры-раковины. Второй зонд был конъюгирован с серебряными микросферами (Ag-NMS), сформированными с помощью бактерий *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. Систему использовали для исследования присутствия трех микроРНК. Такая мультиплексная система показала высокие значения селективности и специфичности с достаточно низким пределом обнаружения (2,72; 0,24 и 2,68 пМ для miR-21, miR-122 и miR-223 соответственно). Дальнейшую проверку проводили на РНК, полученной из клеточной линии HepG2 с двойным независимым контролем количества с помощью количественного ПЦР. Разработанный сенсор является многократным для всех трех РНК-мишеней. Величина отклика варьировала в диапазоне от 90,24 до 92,69%. Результаты, полученные двумя методами, хорошо коррелировали между собой, хотя интервал достоверности был ниже для количественного ПЦР.

В исследовании [25] описано применение другого варианта систем такого типа с двумя металлическими поверхностями. Для создания первой поверхности использовали матрицу из периодически повторяющихся золотых треугольников, которые получают с использованием ДНК-нанотехнологии (такой тип поверхности оказался значительно эффективнее металлической пленки), на которых был иммобилизован ДНК-зонд. Второй ДНК-зонд был конъюгирован с наночастицей, состоящей из серебряного ядра, прослойки нефлуоресцирующего ГКР-активного соединения изотиоционатного красителя малахитового зеленого (MGITC) и внешней оболочкой из оксида кремния. Последняя имела три функции: удержание репортерной молекулы внутри сферы частицы, повышение растворимости и связывание ДНК-зонда. Зонды подбирались таким образом, чтобы они были комплементарны двум участкам НК вируса HBV. Таким образом, в присутствии целевой НК собиралась полная система. Среди преимуществ данного сенсора необходимо отметить низкий предел обнаружения (50 аМ) и 100%-ю специфичность (последовательности НК HBV с одним неспаренным основанием не гибридизовались с зондами). Низкий предел обнаружения обусловлен тем, что золотая матрица и серебряные наночастицы находятся в непосредственной близости. В этом случае локальные электромагнитные поля, создаваемые плазмонами, сопрягаются, что приводит к значительному увеличению сигнала и снижению предела обнаружения.

Один из вариантов ГКР-анализа состоит в применении сенсора типа «молекулярный часовой». В классическом методе «молекулярный часовой» ДНК-зонд формирует структуру в виде шпильки, один из концов которой прикреплен к металлической наночастице, а второй модифицирован ГКР-активной меткой. При связывании с аналитом шпилька раскрывается, метка удаляется на слишком большое расстояние от поверхности, в результате чего не взаимодействует с ближним электромагнитным полем плазмонов и интенсивность сигнала падает [37] (система «on-to-off»). Данный принцип был успешно использован для создания ДНК-биосенсоров на такие мишени, как ВИЧ-1, рак молочной железы, респираторные вирусные инфекции, и РНК-биосенсоров (например, на маркер высокоинфекционного штамма вируса птичьего гриппа). Примечательно, что путем иммобилизации зон-

да на поверхности, состоящей из нанопористых золотых дисков удалось добиться определения единичных молекул [37], а на примере транскриптов белков IFI27 и IFI44L показана возможность детекции нескольких мишеней одновременно [38], что привело к созданию ДНК-чипов для медицинской диагностики.

Развитием этого подхода стало создание системы «обратный молекулярный часовой». В этом варианте прикрепленный к поверхности зонд изначально гибридизован с другой цепью ДНК. При взаимодействии с аналитом происходит замещение зонда в дуплексе за счет формирования более стабильной спирали между неприкрепленной ДНК и формированием ДНК/РНК гетеродуплексом с аналитом. В итоге двуспиральная ДНК на поверхности поверхности сенсора разрушается, а зонд сворачивается в шпильку, что приводит к возникновению сигнала. Этот подход был реализован при разработке ДНК-чипа к последовательности вируса Денги (DENV4) (предел обнаружения составил 6 аМ, но реальные образцы не были проверены) [40], а также для разработки сенсора для обнаружения miR-21 и miR-34a, которые играют важную роль в развитии рака молочной железы и служат перспективными мишенями для диагностики [39]. Разработанная система позволяет провести количественное сравнение уровня содержания miR-21 в клеточных линиях (Au565 и SUM149), что согласуется с данными количественного ПЦР, сопряженного с обратной транскрипцией, а также обладает мультиплексностью (использовали ГКР-активные метки Cu5, Cu5.5). Мультиплексность была показана как на синтетических РНК, так и на РНК из клеточной линии MCF-7. Хотя предел обнаружения не был определен, измерения выполнялись при концентрации 5–10 пМ (объем образца 10 мкл). Это означает, что сигнал надежно детектируется при содержании РНК в образце порядка десятых и сотых долей фемтомоль/л.

Авторы [41] разработали сенсор, сочетающий ГКР-определение сопряженное с лигированием (ферментативно катализируемое ковалентное присоединение адаптерной последовательности). В данном варианте использовались три типа олигонуклеотидов: один (общий олигонуклеотид) был конъюгирован с металлической наночастицей, второй (дикий тип) и третий (мутант с точечной заменой нуклеотидного остатка на конце) с двумя разными ГКР-активными метками. Зонды были сконструиро-

ваны так, чтобы общий зонд и один из зондов с ГКР-меткой гибридизовались с ДНК аналита последовательно. Измерения проводили при количестве ДНК-матрицы и олигонуклеотидов, равном 20 и 100 пмоль соответственно. Предел обнаружения не был установлен. Однако рассматриваемый метод интересен тем, что сигнал и концентрация образца связаны прямой пропорциональной зависимостью, что повышает точность метода [41].

Несмотря на многочисленные попытки применения метода ГКР для анализа различных мишеней *in vivo*, первое удачное испытание такого биосенсора в варианте «обратного молекулярного часового» с использованием нуклеиновых кислот на животных было описано совсем недавно [42]. Разработанная система имеет ряд преимуществ: 1) высокую стабильность в коже (исследование проводилось на послеоперационных срезах), в немалой степени обусловленная тем, что система работала в матрице на основе агар-агара; 2) присутствие собственного пика «нанопогремушки», зависящего только от ее концентрации. Таким образом, система предусматривает наличие внутреннего стандарта, интенсивность и положение которого не изменяется при раскрытии/закрытии шпильки Су7-меченого зонда. Сенсор в 5%-м геле внутрикожно вводили йокширским свиньям, затем через 10 мин вводили целевую ДНК. Регистрацию спектров проводили при $\lambda_{\text{ex}} = 785$ нм до и после введения ДНК. С учетом калибровки (пик 1288 см^{-1}) интенсивность основного пика (506 см^{-1}) изменялась на порядок. Это свидетельствует о возможности использования таких сенсоров *in vivo*.

Заключение

Проведенный обзор литературы позволяет сделать заключение, что стадия “proof of concept” для безПЦР-амплификационного определения НК за счет использования физико-химического усиления сигнала на основе ППР и

ГРК пройдена. Ограниченный объем сведений обусловлен отсутствием универсальных базовых принципов эффективного создания таких систем. Несмотря на малочисленность существующих данных по использованию ППР- и ГКР-систем для безамплификационного детектирования НК можно однозначно говорить о перспективности этих направлений, так как в ряде случаев чувствительность определения целевых аналитов достигает уровня единичных молекул, прежде всего это относится к ГКР-сенсорам. По мнению авторов обзора, перспективы дальнейшего развития указанного подхода к детектированию нуклеиновых кислот заключаются в: 1) использовании замещения цепей НК-сенсора аналитом, приводящего к появлению сигнала по принципу «обратный молекулярный часовой» [39]; 2) создании высокоструктурированных самоперестраивающихся систем, способных в присутствии аналита формировать поверхности, обеспечивающие более эффективное усиление сигнала [35]; 3) необходимости контроля как буферных, так и температурных условий [41].

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов «Российского фонда фундаментальных исследований» РФФИ № 20-04-60477 (безамплификационный анализ вирусных НК) и № 18-29-08040 (безамплификационный анализ внеклеточных опухолевых ДНК).

Информация о вкладе авторов: И.А. Веселова и М.Э. Зверева принимали участие в создании концепции обзора и анализе полученных данных. Э.П. Писарев и О.О. Капитонова осуществили поиск и сбор литературных данных. Все авторы участвовали в написании рукописи и оформлении статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов. Все авторы имеют равный вклад.

Конфликта интересов нет.

Дополнительных материалов нет.

Дополнительная информация: М.Э. Зверева (<https://orcid.org/0000-0002-7432-1574>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dunbar S., Das S. // J Clin Virol. 2019. Vol. 115. P. 18.
2. Filges S. et al. // Sci Rep. 2019. Vol. 9. N 1. P. 3503.
3. Volik S. et al. // Mol Cancer Res. 2016. Vol. 14. N 10. P. 898.
4. Karaballi R.A. et al. // Physical Chemistry Chemical Physics. 2015. Vol. 17. N 33. P. 21356.
5. Hajian R. et al. // Nature Biomedical Engineering, 2019. Vol. 3. N 6. P. 427.
6. Santhanam M., Algov I., Alfonta L. // Sensors (Basel), 2020. Vol. 20. N 16. P. 4648.
7. Bossert N. et al. // Scientific Reports. 2016. Vol. 6. N 1. P. 37897.
8. Jeong Y., et al. // Biosensors and Bioelectronics. 2018. Vol. 111. P. 102.

9. Xu J.-Y. et al. // *Chemical Communications*. 2012. Vol. 48. N 25. P. 3052.
10. Hui X. et al. Surface-Enhanced Infrared Absorption-Based Biosensor and its Application to DNA Identification, in 2020 IEEE 33rd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS). 2020.
11. Neubrech F. et al. // *Chemical Reviews*. 2017. Vol. 117. N 7. P. 5110.
12. Huber F. et al. // *Nature Nanotechnology*, 2013. Vol. 8. N 2. P. 125.
13. Tiberio P. et al. // *BioMed Research International*. 2015. Vol. 2015. P. 731479.
14. Tabasi O., Falamaki C. // *Analytical Methods*. 2018. Vol. 10. N 32. P. 3906.
15. Gu X. et al. // *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2018. Vol. 11. N 1. P. 147.
16. Batool F. et al. // *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2021. Vol. 255. P. 119722.
17. Yin G. et al. // *J. Raman Spectroscopy*. 2021. Vol. 52. N 5. P. 949.
18. Сотников Д.В. и др. // *Успехи биологической химии*, 2015. Vol. 55. С. 391.
19. Moran K.L.M., Lemass D., O'Kennedy R., Chapter 6. Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays: Approaches, Performance, and Applications, in *Handbook of Immunoassay Technologies*, S.K. Vashist and J.H.T. Luong, Editors. 2018. P. 129.
20. Nguyen H.H. et al. // *Sensors (Basel)*. 2015. Vol. 15. N 5. P. 10481.
21. Dendisova M. et al. // *J. Raman Spectroscopy*. 2012. Vol. 43. P. 181.
22. Cong S. et al. // *Nature Communications*. 2015. Vol. 6. N 1. P. 7800.
23. Emamzadeh M., Pasparakis G. // *Scientific Reports*. 2021. Vol. 11. N 1. P. 9404.
24. Cetin, A.E. et al. // *ACS Sensors*, 2018. Vol. 3. N 3. P. 561.
25. Li M. et al. // *Analytical Chemistry*. 2013. Vol. 85. N 4. P. 2072.
26. Wang X. et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. 2020. Vol. 156. P. 112130
27. Vohra P. et al. // *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8. N 1. P. 11410.
28. Aristov A.I. et al. // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. N 1. P. 25380.
29. Fabris L. // *Chem. Nano. Mat*. 2016. Vol. 2. N 4. P. 249.
30. Xu L.-J. et al. // *J. American Chemical Society*. 2015. Vol. 137. N 15. P. 5149.
31. Morla-Folch J. et al. // *Angewandte Chemie International Edition*. 2017. Vol. 56. N 9. P. 2381.
32. Wu L. et al. // *Nanoscale*. 2019. Vol. 11. N 16. P. 7781.
33. Li J.-M. et al. // *J. Mater. Chem*. 2012. Vol. 22. P. 12100.
34. Ngo H.T. et al. // *Biosens Bioelectron*. 2016. Vol. 81. P. 8.
35. Ngo H.T. et al. // *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8. N 1. P. 4075.
36. Zhou W. et al. // *Analytical Chemistry*. 2017. Vol. 89. N 11. P. 6120.
37. Ngo H.T. et al. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016. Vol. 408. N 7. P. 1773.
38. Ngo H.T. et al. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014. Vol. 408. N 14. P. 3335.
39. Wang H.-N. et al. // *J. Physical Chemistry C*. 2016. Vol. 120. N 37. P. 21047.
40. Ngo H.T. et al. // *Analyst*. 2014. Vol. 139. N 22. P. 5655.
41. Lowe A.J. et al. // *Analytical Chemistry*. 2010. Vol. 82. N 13. P. 5810.
42. Wang H.-N. et al. // *Nano Research*. 2018. Vol. 11. N 8. P. 4005.

Поступила в редакцию 18.05.2021
 Получена после доработки 20.05.2021
 Принята к публикации 28.05.2021

METHODS FOR IDENTIFYING AND DETERMINING NUCLEIC ACIDS, WITHOUT AMPLIFICATION, BASED ON SURFACE PLASMON RESONANCE AND SURFACE-ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY

E.K. Pisarev¹, O.O. Kapitanova², I.A. Vesolova², M.I. Zvereva²

(¹Faculty of Bioengineering and Bioinformatics of Lomonosov Moscow State University; ²Department of Chemistry of Lomonosov Moscow State University; e-mail: e.pisarev@fbb.msu.ru)

The review discusses contemporary approaches to the development of sensory systems for the identification and determination of nucleic acid without amplifying target molecules. Herein we summarized data about methods based on surface plasmon resonance and surface-enhanced Raman spectroscopy, their potentiality, limitations, and prospects for further development.

Key words: nucleic acids, analysis without amplification, SPR, SERS, detection of viral and tumorous nucleic acids.

Сведения об авторах: *Писарев Эдуард Константинович* – аспирант факультета биотехнологии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова (e.pisarev@fbb.msu.ru); *Капитанова Олеся Олеговна* – мл. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (olesya.kapitanova@gmail.com); *Веселова Ирина Анатольевна* – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (irina.veselova@mail.ru); *Зверева Мария Эмильевна* – доцент кафедры хим. природных соединений химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (mzvereva@chem.msu.ru).