



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00621

(22) Data de depozit: 05/10/2020

(41) Data publicării cererii:
29/04/2022 BOPI nr. 4/2022

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN
CUZA" DIN IAȘI, BD. CAROL I NR. 11, IAȘI,
IS, RO

(72) Inventatori:
• TUDOR LUCHIAN, ȘOS.PĂCURARI
NR.71, BL.478, SC.C, ET.5, AP.17, IAȘI, IS,
RO;

• MEREUTA LOREDANA, ȘOS.PĂCURARI
NR.71, BL.478, SC.C, ET.5, AP.17, IAȘI, IS,
RO;
• ASANDEI ALINA, STR.FRUMOASĂ NR.1,
BL.654, SC.N, AP.3, IAȘI, IS, RO;
• DRAGOMIR ISABELA, STR.TINERETULUI
BL.L2, AP.7, ROZNOV, NT, RO;
• BUCATARU IOANA, BD. POITIERS
NR.177, BL.60, SC.B, ET.3, AP.23, IAȘI, IS,
RO

(54) **DETECȚIA CU NANOPORI PROTEICI A SECVENȚELOR
SCURTE DE ADN MONOCATENAR CU AJUTORUL UNOR
XENO-ACIZI NUCLEICI ȘI NANOPARTICULE DE AUR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de detecție specifică a unor secvențe scurte de ADN monocatenar pentru aplicații biomedicale din domeniul bionanotehnologic. Metoda, conform invenției, utilizează ca nanodetector un por proteic de α -hemolizină (α -HL) imersat într-o soluție de nanoparticule de aur (AuNP) funcționalizate cu un strat anionic de citrat, acizi peptido-nucleici (PNA) și moleculele ADN țintă și constă în monitorizarea,

înregistrarea și analiza amprenteii specifice a răspunsului dat de interacțiunea complexelor coagulante PNA-AuNP care se modifică semnificativ când moleculele țintă de ADN hibridizează cu cele de PNA, astfel făcând posibilă detecția ADN ca urmare a discriminării celor două tipuri de răspuns.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2020 00621
Data depozit	05.10.2020

21

Detectia cu nanopori proteici a secvențelor scurte de ADN monocatenar cu ajutorul unor xeno-acizi nucleici și nanoparticule de aur

Invenția se referă la o metodă de detecție specifică a unor secvențe scurte de ADN monocatenar ce poate sta la baza aplicațiilor biomedicale din domeniul bionanotehologic. Aceasta poate fi utilizată în testarea medicală pentru diagnosticare realizată la punctul de îngrijire, în investigațiile medico-legale sau în monitorizarea siguranței alimentare.

În scopul diagnosticului clinic al infecțiilor virale sau bacteriene sunt utilizate metodele convenționale precum: metode de numărare a culturilor și coloniilor, ce se bazează pe capacitatea microorganismelor de a se înmulți în colonii vizibile, dar care au ca dezavantaj procesul de lungă durată (pentru confirmarea rezultatului fiind necesare între 7 și 10 zile), metode imunologice bazate pe interacțiunea selectivă antigen-anticorp, care necesită personal calificat, dispozitive specializate și costuri de producție ridicate și metode bazate pe detecția secvențelor de acizi nucleici specifice anumitor maladii ce au la bază reacția de polimerizare în lanț (PCR), care prezintă dezavantajul că sunt costisitoare, iar procesul este, de asemenea, unul complicat ce necesită personal calificat și timpi mari de analiză (până la 24h). O altă metodă utilizată este detecția și secvențierea ADN-ului care permite determinarea structurii primare a unui fragment din acizii nucleici, dar care cuprinde tehnici de degradare chimică (Maxam-Gilbert) și de sinteză enzimatică (Sanger) costisitoare și care necesită timpi mari de realizare. Tehnicile de detecție și secvențiere de nouă generație care utilizează senzori moleculari (naturali, artificiali sau hibridi) și-au propus să eficientizeze acest proces. Astfel, utilizarea tehnicii de electrofiziologie la nivel de singură moleculă ce utilizează ca biosenzor un nanopor de α -hemolizină (α -HL) inserat într-o membrană lipidică artificială prezintă un potențial extrem de mare în detecția și identificarea moleculelor de ADN în timp real, fiind deasemenea foarte avantajos din punct de vedere economic. Dezavantajele acestei tehnici țin de: (i) viteza mare de translocare a moleculei prin nanopor care poate împiedica detecția

Prof. dr. Ioana Tudoret



eficiență a acesteia și (ii) geometria nanoporului α -HL împiedică secvențierea la nivel de o nucleobază.[1]–[4]

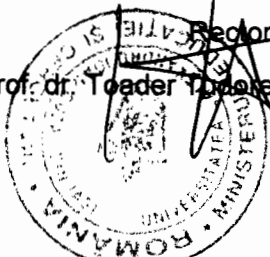
În prezent, cel mai apropiat procedeu de invenția de față implică utilizarea nanoparticulelor de aur (AuNP), a moleculelor de ADN țintă și a moleculelor de acizi peptido-nucleici (PNA) în metode colorimetrice tradiționale, în care lungimea de undă de absorbție a nanoparticulelor de aur este sensibilă la distanța dintre acestea [5], [6] ceea ce face posibilă detecția hibridizării ADN-PNA. Una dintre limitările majore ale acestei strategii este aceea că parametrii mediului experimental, precum modificarea pH-ului sau a temperaturii, pot provoca agregarea nanoparticulelor și, prin urmare, să ofere un răspuns fals pozitiv. Pe de altă parte, răspunsul calorimetric obținut prin agregarea nanoparticulelor poate avea uneori sensibilitate redusă în medii complexe datorită adsorbției nespecifice [6].

Scopul invenției constă în implementarea unei metode de detecție selectivă și discriminare a secvențelor de ADN a diferiților agenți patogeni, bazată pe modificările proprietăților de suprafață a AuNP ca urmare a procesului de hibridizare a moleculelor de xeno-acizi nucleici prezente în sistem, complementare cu cele de ADN.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția de față se referă la optimizarea metodei de detecție a moleculelor de ADN prin prisma rapidității de aplicare și a consumului minim de materie primă.

Detecția cu nanopori proteici a secvențelor scurte de ADN monocatenar cu ajutorul unor xeno-acizi nucleici și nanoparticule de aur, caracterizată prin aceea că, utilizând tehnica de electrofiziologie pentru studii la nivel de singură moleculă bazată pe un sistem format dintr-un nanopor de α -hemolizină (α -HL), o suspensie de nanoparticule de aur acoperite cu citrat (AuNP) și molecule de acizi peptido-nucleici (PNA) este posibilă detecția secvențelor de ADN țintă complementare moleculelor de PNA, ca urmare a formării complexului AuNP-PNA-ADN.

Soluția tehnică prezentată utilizează un sistem de detecție în timp real bazată pe nanopori, cu particule de aur și molecule PNA, un tip de xeno-acizi nucleici sintetici, a căror secvență primară poate fi adaptată rapid pentru a fi compatibilă cu ADN-ul

Prof. dr. Toader Toader
Rector


patogenilor țintă. Deasemenea, concentrațiile soluțiilor de PNA și ADN țintă necesare pentru detecție sunt de ordinul micromolar (10^{-6} M).

Pentru început, nanoparticulele de aur acoperite cu un strat anionic de citrat formează complexe coagulate cu acizii peptido-nucleici (PNA) care generează un răspuns specific, bine definit. Prezența ulterioară a secvențelor complementare de ADN va împiedica agregarea particulelor, ceea ce va conduce la modificarea semnificativă a semnalului înregistrat, astfel făcându-se posibilă detecția rapidă și precisă a secvențelor specifice de ADN din probă.

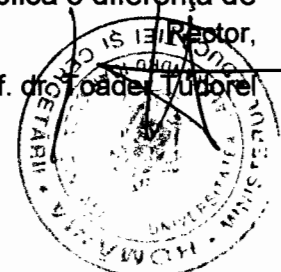
Un pas extrem de important în aplicarea acestei metode este menținerea unui gradient de sare de-a lungul nanoporului (3M / 0.1 M KCl). Principalele motive fiind: împiedicarea agregării nanoparticulelor la țării ionice mari, creșterea ratei de capturare a nanoparticulelor de către nanopor și menținerea unui raport semnal-zgomot scăzut.

Implementarea invenției prezintă următoarele avantaje: (i) detecția selectivă a unei game largi de secvențe monocatenare de ADN scurte sau lungi cu sensibilitate și specificitate ridicată, (ii) metoda este necostisitoare și rapidă și (iii) nu necesită o marcarea suplimentară a compușilor țintă.

Exemplu de realizare

Dispozitivul utilizat pentru implementarea metodei constă în utilizarea unei cuve cu două compartimente, denumite convențional *cis* (electrodul legat la masă) și *trans*, separate de un film de Teflon cu grosimea de 25 μm , care prezintă o apertură cu diametrul de aproximativ 120 μm . O primă problemă tehnică presupune prevenirea agregării nanoparticulelor de aur indusă de concentrația de sare, astfel că în regiunea *cis* se adaugă o soluție 0.1 M KCl menținută la pH neutru cu soluție buffer 1 mM EDTA și 10 mM Tris, iar în regiunea *trans* o soluție 3 M KCl, menținută la același pH. La nivelul aperturii din filmul pretratată cu 1:10 hexadecan n-pentan, se va forma un bistrat lipidic obținut din difitanoi fosfatidilcolină (DPhPC) dizolvată în n-pentan. În regiunea *cis* se va adăuga o cantitate mică de soluție stoc de α -hemolizină, urmărindu-se inserția unui singur nanopor heptameric de α -HL în suportul lipidic. În cele două compartimente sunt inserați doi electrozi Ag/Cl conectați la un amplificator, cu ajutorul cărora se aplică o diferență de

Prof. dr. Ioana Tușonea
Rector,



potențial și se înregistrează curentul ionic generat de mișcarea ionilor de sare din soluțiile utilizate. Metoda se aplică în condiții de presiune atmosferică și la temperatura camerei (~ 23 °C).

Fazele metodei propuse sunt următoarele: i) după inserția unui singur nanopor de α -HL în suportul lipidic, se adaugă în regiunea *cis* o cantitate de ordinul nanomolar dintr-o suspensie de AuNP acoperite cu citrat; ii) ulterior, se adaugă în regiunea *cis* o soluție cu concentrația de ordinul micromolar de PNA cu secvența complementară ADN-ului patogenului căutat; iii) peste acestea se adaugă proba tot în concentrații de ordinul micromolar. În cazul prezenței unei infecții, proba va conține secvența de ADN a patogenului ce se dorește a fi detectat.

Fluctuațiile de curent ionic datorate interacțiunilor cu nanoporul proteic, în urma aplicării unor diferențe de potențial pozitive, sunt înregistrate și analizate, putând astfel obține informații ce permit detecția selectivă a ADN-ului.



Bibliografie

- [1] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, and C. Adley, "An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors," *Biotechnology Advances*, vol. 28, no. 2, pp. 232–254, Mar. 2010.
- [2] E. R. Mardis, "Next-Generation DNA Sequencing Methods," *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.*, vol. 9, no. 1, pp. 387–402, Sep. 2008.
- [3] N. Varongchayakul, J. Song, A. Meller, and M. W. Grinstaff, "Single-molecule protein sensing in a nanopore: a tutorial," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 47, no. 23, pp. 8512–8524, 2018.
- [4] L. Mereuta *et al.*, "Sequence-specific detection of single-stranded DNA with a gold nanoparticle-protein nanopore approach," *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, p. 11323, Dec. 2020.
- [5] S. Arca-Lafuente, P. Martínez-Román, I. Mate-Cano, R. Madrid, and V. Briz, "Nanotechnology: A reality for diagnosis of HCV infectious disease," *Journal of Infection*, vol. 80, no. 1, pp. 8–15, Jan. 2020.
- [6] M. S. Verma, J. L. Rogowski, L. Jones, and F. X. Gu, "Colorimetric biosensing of pathogens using gold nanoparticles," *Biotechnology Advances*, vol. 33, no. 6, pp. 666–680, Nov. 2015.



Revendicări

1. Detecția cu nanopori proteici a secvențelor scurte de ADN monocatenar cu ajutorul unor xeno-acizi nucleici și nanoparticule de aur, **caracterizată prin aceea că**, utilizând tehnica de electrofiziologie pentru studii la nivel de singură moleculă bazată pe un sistem format dintr-un nanopor de α -hemolizină (α -HL), o suspensie de nanoparticule de aur acoperite cu citrat (AuNP) și molecule de acizi peptido-nucleici (PNA) este posibilă detecția secvențelor de ADN țintă complementare moleculelor de PNA, ca urmare a formării complexului AuNP-PNA-ADN.

2. Detecția cu nanopori proteici a secvențelor scurte de ADN monocatenar cu ajutorul unor xeno-acizi nucleici și nanoparticule de aur, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, analiza semnalelor înregistrate cu ajutorul sistemului nanopor-AuNP-PNA, în absența și în prezența moleculelor de ADN, oferă informații specifice și clare pentru detecția ADN-ului, având selectivitate ridicată și sensibilitate de ordinul micromolar.

Prof. dr. Teodor Tudorel

