

ПРИМЕНЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ИССЛЕДОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БИОАНАЛИТИКЕ

Затовская Т.В., Баранова Г.В., Загородняя С.Д.

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина
e-mail: svetazagorodnya@ukr.net*

В обзоре приведены литературные данные по применению метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР) нуклеиновых кислот в медицинской диагностике, мониторинге окружающей среды. Изложен принцип метода ППП, его преимущества для анализа взаимодействия молекул, указаны типы ППП-сенсоров и даны определения их основных характеристик. Рассмотрен принцип ППП-анализа нуклеиновых кислот и способы иммобилизации зондов на поверхности биосенсоров: модификация поверхности с помощью функциональных слоев, использование тирозированных олигонуклеотидов, использование биотинилированных зондов и биотин-стрептавидинового взаимодействия. Охарактеризованы основные подходы повышения чувствительности и специфичности ДНК-сенсоров: проведение ПЦР амплификации, применение наночастиц золота, энзимов, комбинации этих методов. Приведены примеры ДНК-сенсоров, разработанных для применения в клиническом анализе, в частности, сенсоры для выявления точечных мутаций, приводящих к онкологическим и наследственным заболеваниям. Рассмотрены биосенсоры для анализа микро-РНК, детекции точечных мутаций, вызывающих устойчивость бактерий к антибиотикам, выявления ДНК-маркеров патогенных бактерий человека и растений, а также ДНК-маркеров генно-модифицированных организмов. Приведены примеры биосенсоров с использованием аптамеров для диагностики вирусных заболеваний. Делается вывод о перспективности применения ДНК-сенсоров в биоаналитике и о необходимости разработки новых стратегий, позволяющих проводить измерения в реальных биологических образцах.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс, ДНК-сенсоры, нуклеиновые кислоты, гибридизация.

Биосенсорные технологии на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (ППР) представляют собой новый удобный подход в изучении взаимодействия биомолекул. Этот метод позволяет охарактеризовать в реальном времени кинетику взаимодействия молекул, иммобилизованных на поверхности биочипа, с молекулами аналита в растворе, не прибегая к использованию дорогостоящих реактивов для мечения [1-2]. Методы, основанные на явлении ППП, привлекают возможностью одновременной регистрации множества межмолекулярных взаимодействий, быстротой анализа, высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью результатов. В сенсорах ППП процессы ассоциации и диссоциации межмолекулярных комплексов регистрируются в виде зависи-

мости сигнала сенсора от времени (сенсограммы). На основании этих зависимостей можно рассчитать кинетические и равновесные константы реакции комплексообразования, а данные об изменениях сенсограмм при различных температурах позволяют вычислить термодинамические характеристики реакции.

Одним из наиболее интенсивно развивающихся и востребованных направлений анализа ППР есть разработка биосенсоров с использованием нуклеиновых кислот (НК), природных или синтетических олигонуклеотидов. ДНК-сенсоры применяются для решения широкого круга биомедицинских проблем, в частности, для ранней диагностики генетических заболеваний, выявления биомаркеров онкогенов, генетической экспертизы, изучения полиморфизма генов [3-5]. Высокая чувствительность метода позволяет обнаруживать точечные мутации на уровне одного нуклеотида. Кроме этого, ППР-анализ нуклеиновых кислот используют для выявления ДНК патогенов (вирусов, бактерий, грибов) в организме человека и в сельскохозяйственных культурах, ДНК генно-модифицированных организмов в пищевых продуктах, а также для мониторинга окружающей среды [1-3, 6, 7].

В настоящее время доступно большое разнообразие сенсорных платформ ППР, включая лабораторные системы для параллельного мониторинга молекулярных взаимодействий и компактные ППР-сенсоры для биоаналитического использования в полевых условиях [2, 8]. Отдельным достижением этого направления является разработка платформ SPR-imaging (SPRi) для анализа микромассивов, в которых используются чипы, позволяющие анализировать одновременно более сотни образцов [4, 8].

Принцип устройства ППР-сенсоров. Явление ППР основано на взаимодействии световых волн с тонкой пленкой металла (Au, Ag и т.п.), нанесенной на поверхность диэлектрика (например, кварца). Противоположная сторона пленки контактирует с анализируемой средой. В условиях полного внутреннего отражения свет, падающий на границу призмы с нанесенной тонкой пленкой металла, может возбуждать поверхностные плазмоны (плазмон-поляритоны). При этом наблюдается резкое снижение интенсивности отраженного света с минимумом при некотором угле падения θ , называемом углом ППР [1]. Положение минимума на кривой ППР существенно зависит от диэлектрических свойств анализируемой среды, в частности, от коэффициента преломления n . Связывание молекул рецептора, иммобилизованных на поверхности сенсора, с молекулами мишенями в анализируемом растворе приводит к возрастанию показателя преломления. Изменение показателя преломления Δn зависит от концентрации молекул аналита на поверхности сенсора и их свойств. Если связывание происходит в тонком слое на поверхности сенсора толщиной h , ответ сенсора пропорционален изменению показателя преломления и может быть выражен уравнением:

$$\Delta n = (dn / dc) \times (\Gamma / h),$$

где Γ – концентрация вещества на поверхности (отношение масса / площадь), h – толщина реакционного слоя, dn/dc – приращение показателя преломления молекул аналита. Для большинства слоев, об-

разуемых биологическими молекулами, величина dn/dc составляет 0,1 – 0,3 см³ / г [1].

Таким образом, угол минимальной интенсивности отраженного плоскополяризованного света является функцией массы или количества молекул на поверхности, измеряя который можно получать информацию о процессе адсорбции-десорбции молекул на поверхности металлической пленки. Преимущественное использование золота в таких системах обусловлено высокой химической устойчивостью этого металла.

Для возникновения плазмонов необходимы специальные приспособления, увеличивающие импульс фотонов (согласующие устройства): призмы, волноводы и дифракционные решетки. В настоящее время в ППР-сенсорах преимущественно применяются призмы в геометрической конфигурации Кречмана, что обусловлено простотой их реализации и высокой эффективностью возбуждения плазмонов (рис. 1). Призмные согласующие устройства могут сочетаться с любыми типами детекторов ППР: измеряющими резонансный угол, резонансную частоту, интенсивность или фазу отраженного света [1].

Основными характеристиками детекторов ППР являются чувствительность, разрешение, предел детекции и динамический диапазон. Чувствительность детектора ППР – это отношение изменения сигнала сенсора к изменению концентрации аналита на поверхности сенсора [1]. Разрешение сенсора ППР определяется как наименьшее изменение показателя преломления, которое вызывает обнаруживаемое изменение сенсорного сигнала. Обычно разрешение сенсоров ППР составляет величину порядка 10^{-7} RIU (refractive index unit) для настольных лабораторных систем и порядка 10^{-6} RIU для портативных ППР сенсоров. Предел детекции (ПД) определяется как концентрация аналита, которая вызывает изменение сенсорного отклика, равное трем стандартным отклонениям сенсорного отклика на контрольную пробу [9]. Динамический диапазон – это диапазон значений концентраций аналита, в котором она может быть достоверно измерена.

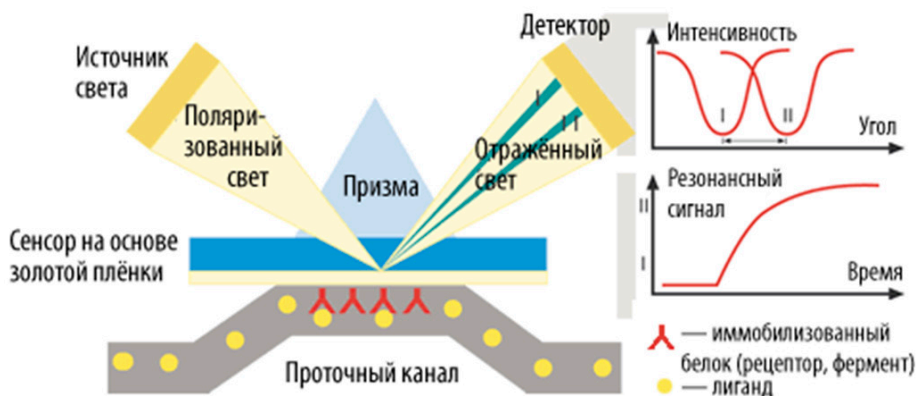


Рис. 1. Принцип устройства сенсора ППР с призмой из диэлектрика в конфигурации Кречмана [5].

Коммерческие ППР-биосенсоры способны выявлять 1 пг/мм^2 адсорбированного аналита [3]. Чувствительность биосенсоров зависит от многих параметров, в частности, от функционального слоя поверхности. На сегодняшний день основные задачи в разработке новых биосенсоров состоят не только в интегрировании различных их компонентов (системы нанесения проб, управляющей электроники и т.п.), но прежде всего в повышении их чувствительности ($< 1 \text{ пг/мм}^2$).

Настоящий прорыв в системах мультиплексного анализа совершили системы SPR-imaging, которые позволяют проводить одновременно анализ до нескольких сотен взаимодействий [4, 8]. Такие устройства появились благодаря развитию микрофлюидной техники и технологии изготовления матриц чувствительных элементов с нанесенными на них различными рецепторными молекулами. Поверхность сенсора облучается монохроматическим светом, а отраженное излучение, несущее информацию о пространственном распределении интенсивностей ППР, регистрируется CCD-камерой. Разрешение сенсора по показателю преломления обычно достигает 10^{-6} RIU. Минимальная детектируемая концентрация биомолекул для сенсоров данного типа $0,1 \text{ нМ}$ [8]. В настоящее время многие системы SPRi коммерчески доступны и успешно применяются для мультиплексного определения нуклеиновых кислот, онкомаркеров, антител, бактерий и т.п. [4, 5]. Из-за меньшего размера детекторного элемента системы SPRi обычно несколько менее чувствительны, чем стандартный анализ ППР, однако применение средств усиления (таких как наночастицы) делает возможным определение фрагментов нуклеиновых кислот в фемтомолярных концентрациях [3, 4].

ДНК-сенсоры и способы иммобилизации нуклеиновых кислот. ППР-анализ нуклеиновых кислот подразумевает регистрацию гибридизации между молекулами нуклеиновой кислоты с известной последовательностью, иммобилизованными на биочипе, с молекулами нуклеиновой кислоты в анализируемом растворе. Иммобилизованные на биочипе фрагменты ДНК обычно представляет собой синтезированные олигомеры однонитевой ДНК размером 15-40 нуклеотидов, комплементарные ключевым последовательностям анализируемых генов. Их называют ДНК-зондами (**capture probe**). ДНК-зонды используют для гибридизации, свидетельствующей о присутствии в биологическом образце комплементарных последовательностей ДНК, называемых ДНК-мишенями (**target**). Как правило, гибридизацию проводят после увеличения количества генетического материала в биологическом образце путем ПЦР-амплификации. В качестве зондов в ППР-анализе могут быть использованы также олигомеры РНК [2], синтетические аналоги однонитевой ДНК – пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК) [10, 11], блокированные нуклеиновые кислоты (LNA) [12].

В ПНК нуклеотидные основания соединены пептидными связями. ПНК имеют преимущества перед ДНК в том, что они не несут отрицательного заряда, более устойчивы к гидролизу и при этом способны к гибридизации с ДНК наряду с их природными аналогами. Вместе с тем, ПНК характеризуются очень низкой растворимостью в воде, склонностью к самоагрегации, что может ограничивать их применение.

Нативную ДНК в биосенсорах используют редко из-за многообразия факторов, влияющих на отклик такого биосенсора. Применение нативной ДНК используется в биосенсорах для выявления ее повреждений активными формами кислорода или в исследованиях противораковых препаратов, повреждающих структуру ДНК раковой клетки [13].

Важным моментом в создании биосенсоров является иммобилизация пробы на поверхности чипа. Этот процесс должен соответствовать двум основным требованиям: (1) прочное и стабильное закрепление наносимого ДНК-зонда на поверхности сенсора, (2) доступность и оптимальная ориентация зонда для связывания с молекулами ДНК-мишени в анализируемом растворе. Показано, что для гибридизации ДНК эффективным является прикрепление ДНК-зонда одним концом к поверхности сенсора [14].

В настоящее время, в основном, используют три способа иммобилизации молекул ДНК-зонда на поверхности сенсора: (1) закрепление ДНК-зонда посредством ковалентного связывания с веществами, предварительно иммобилизованными на поверхности сенсора и образующими там самособирающиеся монослои; (2) хемосорбция зонда на золотой сенсорной поверхности через ковалентно присоединенную к нему тиольную группу; (3) использование для иммобилизации ДНК взаимодействия биотина со стрептавидином или его аналогами (авидином, экстравидином, нейтравидином).

Адсорбция молекул ДНК на поверхности сенсора через серосодержащие группы происходит благодаря высокой аффинности атомов серы к атомам металлов – золота, серебра, меди и др. На этом свойстве серосодержащих групп основаны два способа прикрепления ДНК-зондов к поверхности сенсора. Один способ заключается в том, что молекулы ДНК-зонда закрепляются на поверхности сенсора посредством ковалентного связывания с предварительно сформированными самособирающимися слоями веществ, имеющих серосодержащие группы (тиольные, сульфидные, дисульфидные). Ковалентное связывание молекул ДНК-зонда с монослоями происходит через функциональные концевые группы – аминные [15] или гидроксильные [16], при участии водорастворимого карбодиимида, сукцинимиды или эпихлоргидрина.

Другой способ иммобилизации ДНК-зондов на поверхности сенсора – прикрепление с помощью тиольной группы, которая ковалентно присоединена к одному из концов олигомера ДНК. Как правило, в качестве носителей тиольных групп используют 6-меркапто-1-гексил, 11-меркапто-1-ундецил, производные этиленгликоля или их комбинацию. В качестве блокирующих агентов используют тиолы – 6-меркапто-1-гексанол [17], 2-меркаптоэтанол, 11-меркапто-1-ундеканол или тиолированные этиленгликоли [3]. Применение этих веществ предотвращает неспецифическую адсорбцию смысловых последовательностей молекул ДНК-зонда на поверхности сенсора и повышает их доступность молекулам анализируемых ДНК-мишеней [14, 17]. Но, прежде всего, блокировку сенсорной поверхности применяют для того, чтобы снизить уровень неспецифической сорбции компонентов анализируемых образцов и таким образом уменьшить вероятность ложно-положительных сенсорных откликов. Было по-

казано, что плотность тиолированных фрагментов ДНК на поверхности сенсора с золотым покрытием достаточно высока и может достигать 4×10^{13} молекул/см² [18]. Она зависит от длины используемого ДНК-зонда, состава иммобилизационного буфера, pH среды [14].

Третий способ иммобилизации ДНК на поверхности сенсора – при помощи стрептавидин-биотинового взаимодействия – подразумевает использование биотинилированных ДНК-зондов, поскольку стрептавидин-биотиновый комплекс характеризуется высокой аффинностью. Биотинилированный ДНК-зонд взаимодействует с белком стрептавидином или его аналогами (авидином, экстравидином, нейтравидином), которые ковалентно связаны с функциональным слоем, обычно карбоксилированным декстраном, активированным с помощью карбодимида и сукцинимида или малеимида [8]. Эти функциональные слои, в свою очередь, закреплены с поверхностью сенсора через самособирающийся слой 11-меркапто-1-ундеканола.

Эти же способы иммобилизации зондов НК применяют при изготовлении микрочипов для проведения анализа микромассивов методом SPRi [4, 8].

С целью повышения чувствительности анализа гибридизации для иммобилизации ДНК-зондов было предложено использовать дендримеры. Марк с соавт. [19] использовали самособирающийся слой аминоундекантиола для нанесения на поверхность сенсора дендримеров из полиамидоамина, к которым были ковалентно прикреплены молекулы ДНК, модифицированные на 5'-конце аминогруппами. В другом случае для иммобилизации ДНК-зондов были использованы мультислои на основе поликатионных и полианионных фосфорных дендримеров четвертого поколения [20]. Изготовленные таким образом биочипы показали высокий предел детекции при выявлении ДНК-мишеней (30 пМ ДНК на 4 бисюля), а также высокую стабильность в процессе их регенерации, что свидетельствует о перспективности использования такого подхода. Главное преимущество этого метода состоит в том, что дендримеры могут быть использованы как трехмерные линкеры для молекул ДНК-зонда, благодаря чему повышается доступность к ним ДНК-мишеней и таким образом эффективность гибридизации. Особенно это важно в анализе микромассивов.

Пути повышения чувствительности и специфичности ДНК-сенсоров для качественного и количественного определения нуклеиновых кислот. Как уже упоминалось, обычно ДНК-сенсоры характеризуются пределом детекции порядка наномолярных и субнаномолярных величин, в зависимости от размера ДНК-мишени, условий гибридизации и используемой сенсорной платформы. Несмотря на множество факторов, влияющих на ПД для ДНК-сенсоров, можно сделать несколько общих заключений относительно этого параметра. Так, ПД порядка наномолярных концентраций для ДНК-мишеней может достигаться при использовании денатурирующих агентов (например, формамида, мочевины) или при низких концентрациях солей (< 300 mM NaCl). Использование буферов с высокой ионной силой (с концентрацией NaCl > 300 mM или MgCl₂ около 15 mM) приводит к более низким значениям ПД, хотя позволяет достигать более высокой эффективности гибридизации [3]. Как правило, ПД снижается при увеличении размера олигонуклеотидов-мишеней, хотя в

некоторых случаях может наблюдаться обратная зависимость, что может быть связано с влиянием конформации связывающихся молекул. Применение тиолированных зондов и использование стрептавидин-биотинового взаимодействия позволяет достигать одинаковых величин ПД.

Одной из наиболее общих стратегий для детекции нуклеиновых кислот в очень низких концентрациях является использование ПЦР для получения большого числа копий анализируемых фрагментов-мишеней. Обычно метод ПЦР используется для детекции специфических генов с низкой копийностью. Однако при повышении концентрации молекул-мишеней в ПЦР могут амплифицироваться также фрагменты ДНК со сходными последовательностями, что усложняет анализ [3]. Кроме того, обычно продукты ПЦР имеют умеренную неспецифическую адсорбцию к поверхности сенсора.

Также необходимо отметить, что продукты ПЦР обычно содержат последовательности-мишени ДНК в дуплексе с антисмысловыми олигонуклеотидами, в связи с чем необходимо их разделение перед началом проведения ППР-анализа. Как правило, высокотемпературная обработка неэффективна для этой цели, поскольку комплементарные фрагменты могут реассоциироваться еще до того, как достигнут поверхности сенсора. Было показано, что добавление формамида или мочевины к продуктам ПЦР может повышать сенсорный ответ на гибридизацию с мишенью в 2-3 раза [21]. Более трудоемкий, но эффективный метод состоит в разделении биотинилированных и небитинилированных нитей ДНК при помощи магнитных бус со стрептавидиновым покрытием [22]. Другой метод был предложен в работе Ванга с соавт. [23]. Он состоит в добавлении коротких олигонуклеотидов к смеси продуктов ПЦР. После денатурации (95°C, 5 мин) двухцепочечной ДНК продуктов ПЦР смесь инкубируют (1 мин) с короткими олигонуклеотидами (10-30 оснований), которые связываются с некоторыми комплементарными им участками цепей ДНК, предотвращая их повторную гибридизацию, при этом последовательность мишени, комплементарная к зонду, иммобилизованному на поверхности сенсора, остается доступной для связывания с ним.

Одной из наиболее общих стратегий усиления чувствительности сенсоров является применение наночастиц золота. Они имеют большую массу по сравнению с биомолекулярными метками и их применение приводит к большему изменению показателя преломления, чем использование обычных материалов-диэлектриков. В анализе ППР наночастицы золота могут быть использованы в комбинации с различными молекулами, такими как линейные НК, аптамеры, а также с функциональными слоями [11, 24, 25]. Так, усиление сенсорного ответа в 5500 раз было показано при комбинировании биотинилированных ПНК, используемых в качестве зонда, с позитивно заряженными, покрытыми аминокдекстраном наночастицами золота, которые адсорбировались на отрицательно заряженных молекулах-мишенях [11]. Данный биосенсор был разработан для детекции бактерий *E. coli* и *Staphylococcus aureus*. Схема эксперимента представлена на рис. 2. Анализ проводили без предварительной амплификации 16S рРНК благодаря относительно высокому количеству копий этой РНК. Дуплексы нейтральных олигомеров ПНК с одноцепочечной 16S рРНК приобретали отрицательный заряд, а те ПНК, которые не участвовали

в процессе гибридизации, оставались нейтральными. Покрытые аминоксиданом положительно заряженные наночастицы золота взаимодействовали с отрицательно заряженными гибридизованными нуклеиновыми кислотами, в результате чего резонансный сигнал значительно усиливался. ПД снижался до 58 пг/мл. Этот метод требует точного дизайна зондов ПНК, поскольку резкое увеличение отклика ППР происходит не только при специфическом связывании, но и при неспецифической адсорбции нуклеиновых кислот.

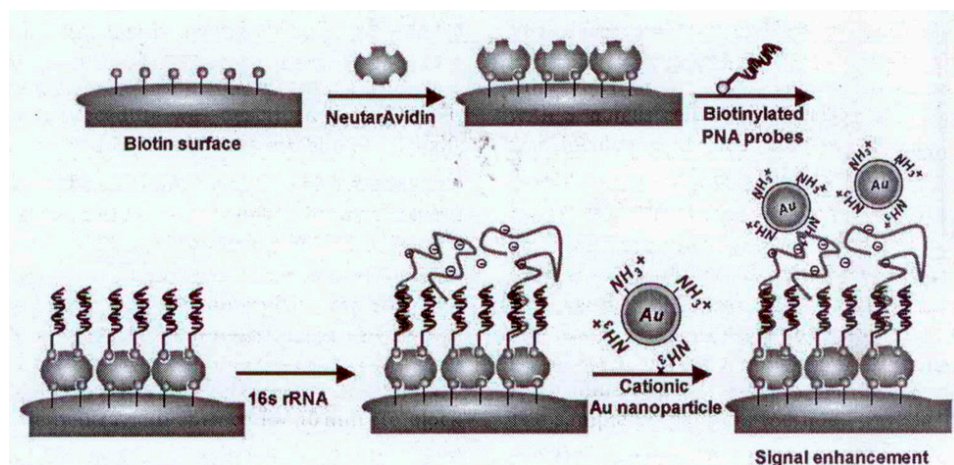


Рис. 2. Схема проведения гибридизации ПНК-зонда с 16S рРНК и усиления резонансного сигнала путем взаимодействия гибридизованных молекул с положительно заряженными наночастицами золота [11]

Другие методы, усиливающие чувствительность ДНК-сенсоров, основаны на применении энзимов. Это может приводить к увеличению сигнала, совпадающему по эффекту с использованием наночастиц. В работе [26] описана методика детекции, по которой ДНК гибридизовали с ПНК-зондами с последующим нанесением полианилина на пробы ДНК. Полимеризация анилина была инициирована H_2O_2 в присутствии пероксидазы хрена. При использовании этого метода ПД возрастал в 50 раз.

Предел детекции был повышен также при использовании метода, комбинирующего усиление при помощи энзимов с усилением при использовании наночастиц [12]. В данной работе молекулы-мишени после гибридизации с ДНК-зондом были элонгированы от 3'-конца при помощи полимеразы полиА. Затем были введены наночастицы золота, покрытые поли-Т-цепями, которые связывались с поли-А-цепями. Этот подход позволил детектировать мишень НК в концентрациях порядка аттомолярных.

Чтобы улучшить предел детекции сенсора ППР, можно также использовать сэндвичный формат гибридизации нуклеиновых кислот. В этом формате процедура состоит из двух этапов: 1) идентификация ДНК-мишени путем селективной гибридизации с ДНК-зондами, иммобилизованными на сенсорной поверхности, и 2) усиление сенсорного отклика дополнительной стадией гибридизации между ДНК-мишенью и третьим

олигонуклеотидом, так называемым зондом-детектором (**detection probe**). Зонды-детекторы используют или сами по себе, или в составе конъюгатов с усиливающим агентом – наночастицы, макромолекулы и т.п. [3, 27, 28].

Под специфичностью ДНК-сенсоров подразумевают их способность различать последовательности ДНК-мишени и сходные с ними последовательности НК. Специфичность детекции нуклеиновых кислот обычно определяют как $[1 - (SR_{MM}/SR_M)] \times 100\%$, где SR_{MM} – сенсорный ответ на гибридизацию зонда с мишенью НК, содержащей единственную замену нуклеотида, и SR_M – сенсорный ответ на гибридизацию с комплементарной последовательностью НК в такой же концентрации [3]. Специфичность зависит от различных факторов. В целом условия, которые дестабилизируют комплексы НК, обеспечивают более высокую специфичность. Такие условия включают использование коротких зондов, гибридизационных буферов с низкой концентрацией солей, более высокую температуру или добавление денатурирующих агентов (например, формамида) к буферу [3, 29]. На специфичность анализа в ДНК-сенсорах может влиять длина молекулы-мишени, а также фактор стерических помех, который может быть обусловлен способом иммобилизации ДНК [3]. Так, специфичность детекции была повышена на 10% при использовании более длинных мишеней [30].

Одним из общих подходов повышения специфичности ДНК-сенсоров для дискриминации единичных нуклеотидных замен является применение двух ДНК-зондов в сэндвичном формате. Такой подход представлен, например, в работе Сыповой с соавт. [31]. Один участок ДНК-мишени распознается зондом (А), связанным с олигонуклеотид-стрептавидиновыми комплексами. Смесь подается на поверхность сенсора, на которой иммобилизован зонд (Б) для связывания с другим участком мишени. Присутствие единичной нуклеотидной замены снижает ответ на гибридизацию до уровня базового шума.

Использование ДНК-сенсоров для биоанализа. В медицинской диагностике анализ нуклеиновых кислот методом ППР применяется для выявления генетических мутаций человека, являющихся причинами различных заболеваний, а также биомаркеров различных заболеваний (микроРНК), патогенных бактерий и вирусов.

Многочисленные исследования посвящены разработке ДНК-сенсоров для выявления точечных мутаций в геноме человека, приводящих к онкологическим заболеваниям, в частности, мутаций в генах-супрессорах опухолей [31, 32] или мутаций, связанных с определенными типами рака [16, 30, 33-35] и наследственными заболеваниями [36].

Ген *TP53*, кодирующий супрессор опухолей, транскрипционный фактор p53, наиболее часто мутирован при онкологических заболеваниях человека, в связи с чем это один из наиболее изучаемых генов в исследованиях данного направления. Один из первых биосенсоров по выявлению мутаций в гене *TP53* был разработан в 2005 г. [32]. Анализ проводился на недорогом, коммерчески доступном спектрометре (SPREETA SPR-EVM-VT). С ДНК-зондом, представляющим собой тиолированный олигомер, гибридизовали полностью комплементарный ему фрагмент ДНК, олигомер с заменой одного нуклеотида и некомплементарный фрагмент ДНК.

Для олигомера ДНК, отличающегося от полностью комплементарного фрагмента на один нуклеотид, наблюдался низкий ответ. Кроме того, на биосенсоре анализировали ДНК из клеток линии дикого типа и мутированных клеток (с точечной мутацией в гене *TP53*). Изготовленный биочип характеризовался высокой чувствительностью, воспроизводимостью результатов и стабильностью (был использован 50 раз), время гибридизации составляло 2 мин, что свидетельствует о перспективности применения его в клиническом анализе.

В исследованиях [30] проводили детекцию мутации R1443X гена *BRCA1*, которая связана с раком яичников и молочной железы. Сенсорные ответы на гибридизацию зонда с фрагментами ДНК, содержащими точечные мутации, были на 70-92 % ниже, чем при гибридизации с комплементарным фрагментом ДНК.

Ферриото с соавт. анализировали точечную мутацию W1282X гена *CFTR*, приводящую к фиброзу мочевого пузыря [33]. В этой работе в качестве зонда, иммобилизованного на чипе, использовали короткий биотинилированный фрагмент ПНК, комплементарный фрагменту гена *CFTR* с мутацией W1282X. В качестве ДНК-мишеней были продукты ПЦР, полученные от ДНК пациентов с мутацией W1282X и людей с немутированным геном. Сенсорный ответ на гибридизацию зонда с комплементарными продуктами ПЦР был выше на 70%, чем на гибридизацию зонда с ДНК немутированного гена.

Группой Корна [34] был разработан сенсор SPRi для детекции единичного нуклеотидного полиморфизма гена *BRCA1*. Высокая чувствительность данного сенсора, способного выявлять пикомолярные концентрации ДНК, была достигнута благодаря применению наночастиц золота, что позволило проводить анализ без предварительной амплификации ДНК. Такой же подход был применен для детекции единичного нуклеотидного полиморфизма гена β -глобина, связанного с несколькими типами наследственного заболевания крови – β -талассемии [36]. Анализ проводили с использованием проб периферической крови больных, предел детекции был ниже аттомолярных концентраций. Все эти результаты свидетельствуют о перспективности анализа ППР и SPRi в диагностике наследственных заболеваний.

В последние годы проводятся исследования по разработке биочипов для выявления и количественного анализа микроРНК. МикроРНК представляют собой олигомеры РНК (18-25 нуклеотидов), которые могут регулировать экспрессию генов у человека, животных и растений путем связывания с 3'-нетранслируемой областью мРНК [37]. Было показано, что микроРНК участвуют в регуляции процессов клеточной пролиферации и дифференциации, метаболизма липидов и др. Уровень микроРНК изменяется при онкологических заболеваниях, диабете, болезнях печени, сердечно-сосудистой и нервной систем, в связи с чем их рассматривают как перспективные биомаркеры для диагностики этих болезней. В плазме крови человека микроРНК обнаруживаются в низких (нано-, пико- или фемтомолярных) концентрациях. Таким образом, разработка высокочувствительных методов детекции микроРНК при помощи ППР-анализа весьма актуальна.

Фанг с соавт. [12] создали ДНК-микрочип, позволяющий выявлять микроРНК в очень низких концентрациях (10 fM). В качестве зондов гибридизации использовали три комплементарные блокированные НК, которые более прочно связываются с микроРНК, чем ДНК. Для усиления сенсорного ответа проводили полиаденилирование микроРНК (при помощи поли(А)полимеразы), после чего с адениновыми нуклеотидами гибридизовали тиминные олигонуклеотиды (T_{30}), адсорбированные на золотых наночастичках. Другой подход для выявления микроРНК был использован Сыповой с соавт. [38]. На поверхность сенсора наносили тиолированные олигомеры ДНК, которые гибридизовались с микроРНК из проб тотальной РНК без предварительной их амплификации. Для усиления сенсорного ответа вводили антитела, которые специфически связывались с ДНК-РНК-комплексом. Анализ проводили на портативном ППР-спектрометре в течение 30 мин, определяемая концентрация микроРНК в пробах из печени мышей составляла 2 пМ и ниже. Полученные таким способом результаты хорошо согласовывались с данными анализа методом ПЦР, что свидетельствует о перспективности применения данного метода для выявления и количественного анализа микроРНК.

Еще один способ детекции микроРНК был предложен Дингом с соавт. [28]. Для усиления сенсорного сигнала использовали дополнительную гибридизацию ДНК и биотин-стрептавидиновые комплексы. Разработанный биочип также характеризовался высокой чувствительностью (определяемая концентрация микроРНК была в пределах от 1×10^{-11} М до 1×10^{-6} М), специфичностью, воспроизводимостью результатов и был предложен для клинической диагностики микроРНК.

Одним из направлений применения ДНК-сенсоров может быть раннее выявление устойчивости патогенных микроорганизмов к лекарственным препаратам. Было показано, что единичные замены нуклеотидов в гене *rpoB* у *Mycobacterium tuberculosis* могут быть причиной устойчивости микобактерий к антибиотикам, что приводит к неэффективности применения данных препаратов при лечении туберкулеза. Рачковым с соавт. [27, 39] был разработан ДНК-сенсор для быстрого выявления нуклеотидных последовательностей, относящихся к гену *rpoB*, и дискриминации фрагментов ДНК нормального и мутированного гена. В качестве зонда использовали тиолированный олигомер ДНК (21-мер), комплементарный фрагменту гена *rpoB*. Проведение анализа в оптимально подобранных условиях позволяло получить сенсорный ответ на гибридизацию полностью комплементарных олигонуклеотидов в 16 раз выше, чем на гибридизацию зонда с олигомером, имеющим единичную замену.

Актуально применение ДНК-сенсоров для точной и оперативной диагностики патогенных бактерий и вирусов у человека. Был разработан биочип для выявления штамма O157:H7 *E. coli* в фекалиях человека [40]. В качестве зонда использовали олигомер ПНК, гибридизацию проводили с продуктами ПЦР на приборе Biacore. Созданный биочип мог выявлять бактерии в концентрации менее 10^2 в 0,1 г фекалий, что позволяло идентифицировать этот патогенный штамм *E. coli* у инфицированных пациентов, а также у здоровых носителей.

Биосенсор с высокой пропускной способностью для быстрой одно-временной идентификации нуклеиновых кислот трех бактериальных патогенов – *Brucella abortus*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* – был разработан группой Гомолы [41]. В качестве зондов были использованы фрагменты ДНК (18-23 нуклеотида) из области 16S рРНК, специфичные для этих бактерий и применяемые для их идентификации. Шестиканальный биосенсор выявлял фрагменты 16S рРНК данных бактерий в концентрации 100 пМ, время детекции составляло 15 мин, чип легко регенерировался.

В работе Ванга с соавт. [42] одновременно выявляли ДНК четырех патогенных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani* и *C. perfringens*). ДНК экстрагировали из бактерий, ПЦР продукты амплифицировали с использованием универсальных праймеров (для 16S рРНК) и гибридизовали со специфическими тиолированными ДНК-зондами на мультиканальном сенсоре. Анализ был специфичным, быстрым, ПД составлял 10-30 пМ, чип мог быть использован многократно.

Высокоспецифичный и чувствительный метод детекции патогенной бактерии *Legionella pneumophila* представлен в работе [43]. В качестве зонда также использовали фрагмент 16S рРНК. Благодаря оптимально подобранным условиям ППР-анализа и дизайну проб удалось выявлять только метаболически активные патогены в фемтомолярных концентрациях (0,45 фМ) менее чем за 3 часа. Биосенсор был разработан для детекции *L. pneumophila* в системах водоснабжения.

Ряд исследований посвящен созданию биосенсоров для ранней диагностики патогенов сельскохозяйственных растений. Был создан биочип для выявления ДНК гриба *Fuzarium culmorum* в листьях пшеницы [21]. В качестве зонда использовали биотинилированный фрагмент однострессовой ДНК *F. culmorum* размером 25 нуклеотидов. ДНК зонда гибридизовали с ПЦР-продуктом размером 0,57 kb, выбранным в качестве специфического маркера *F. culmorum* и содержащим фрагмент ДНК, комплементарный ДНК-зонду. Перед проведением гибридизации двухцепочечные продукты ПЦР подвергали денатурации с использованием формамида или мочевины, препятствующим формированию вторичных структур ДНК. Для того, чтобы оценить влияние на ППР-анализ ДНК матрикса листьев пшеницы, амплификацию ПЦР продукта *F. culmorum* проводили в присутствии ДНК пшеницы. Разработанный биочип позволял выявлять ДНК *F. culmorum* в количестве 0,06 пг в присутствии 30 нг ДНК пшеницы с большей чувствительностью и специфичностью, чем анализ продуктов ПЦР методом электрофореза в полиакриламидном геле. Такой чип мог быть использован многократно (не менее 75 раз) при регенерации его щелочным раствором.

Для быстрого и эффективного выявления РНК вируса полосатой мозаики ячменя в листьях пшеницы был разработан «фиточип» [44]. В качестве зонда использовали тиолированные олигомеры ДНК, комплементарные фрагментам РНК вируса полосатой мозаики ячменя. Высокая чувствительность биочипа (выявление РНК вируса в концентрации 14,7 – 84 пг/мкл), воспроизводимость результатов и быстрота проведения анализа (50 мин) свидетельствуют о возможности его применения для детекции данной вирусной инфекции.

В последние годы продолжает возрастать количество выращиваемых генно-модифицированных растений, в связи с чем весьма актуальна разработка быстрых и точных методов детекции ГМО, в частности, применение для этой цели ДНК-сенсоров. В настоящее время для выявления ГМО используется метод ПЦР с дальнейшим обнаружением продуктов ПЦР методом электрофореза в полиакриламидном геле или с помощью флуоресцентных микрочипов. Возможность детекции продуктов ПЦР с помощью биосенсора была показана для последовательностей ГМО в ДНК цветков трансгенной сои [6]. В этой работе двухцепочечные ампликоны ДНК были разделены с помощью магнитных бус и определялись в концентрации ниже 1 нМ. В работе Ферриотто с соавт. [22] применили ППР-анализ для выявления и количественного определения последовательностей Vt-176 в продуктах ПЦР из генно-модифицированной кукурузы. Результаты количественного определения ГМО, полученные с помощью анализа ППР, были сопоставимы с данными, полученными с использованием метода ПЦР в реальном времени. Эти результаты свидетельствуют о перспективности применения данного метода для детекции ГМО.

Еще одним важным и перспективным направлением анализа ППР является разработка биосенсоров для исследования взаимодействия аптамеров с молекулами-мишенями. Аптамеры представляют собой небольшие синтетические фрагменты однонитевой ДНК или РНК, которые связываются со специфическими молекулами-мишенями, например, белками, регуляторными пептидами, антибиотиками, токсинами, вирусами, и таким образом блокируют их активность. Они обладают очень высокой аффинностью и специфичностью по отношению к молекулам-мишеням. Кроме того, аптамеры имеют явные преимущества перед антителами, поскольку могут быть получены вне биологических систем, более стабильны, а также характеризуются низкой иммуногенностью и токсичностью [45]. Отбор аптамеров осуществляется с помощью метода SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), а ППР-анализ применяют для их скрининга и измерения параметров аффинности отобранных аптамеров к лиганду [46]. Эти свойства позволяют рассматривать аптамеры как потенциальные препараты для лечения различных заболеваний, в том числе онкологических и вирусных [46-48]. Так, были отобраны ДНК и РНК- аптамеры против вирусных белков и целых вирусных частиц, в частности, гликопротеина 120 вируса иммунодефицита человека, полимеразы вируса гепатита В, гликопротеина E2 вируса гепатита С, цитомегаловируса человека, вируса гриппа А [47].

В работе Ванга с соавт. [49] анализ ППР применяли для измерения аффинности отобранных аптамеров к рекомбинантному гемагглютиниону H5N1 и частицам вируса птичьего гриппа. Иммунизацию аптамеров на чипе осуществляли с помощью биотин-стрептавидинового связывания. Константа диссоциации лучшего кандидата-аптамера равнялась 4,65 нМ, что свидетельствовало о его высокой аффинности к гемагглютиниону и возможности использования для выявления вируса птичьего гриппа H5N1.

Высокочувствительный метод выявления вирусных частиц птичьего гриппа H5N1 с помощью ППР-биосенсора был продемонстрирован также в работе [50]. Биотинилированные аптамеры, иммобилизованные

на поверхности сенсора с помощью стрептавидин-биотинового взаимодействия, связывались с целыми вирусными частичками. Резонансный сигнал был значительно усилен путем соединения комплекса со вторым аптамером, молекулы которого были конъюгированы с наночастицами золота. Созданный биочип планируется использовать для оперативного выявления вирусных частиц H5N1 в пробах помета птиц.

К настоящему времени были синтезированы и охарактеризованы при помощи биосенсорного анализа аптамеры против поверхностных белков более 40 вирусов различных групп [47]. Таким образом, использование ДНК-сенсоров и ППР анализа перспективно для борьбы с опасными вирусными инфекциями человека и животных.

Заключение. В последние два десятилетия биосенсоры ППР стали удобным инструментом для изучения молекулярных взаимодействий. Применение таких биосенсоров для исследования взаимодействия нуклеиновых кислот с белками, нуклеиновыми кислотами и малыми молекулами позволяет проводить анализ большого количества проб, углубляет понимание сложных биологических процессов в клетке, способствует разработке новых лекарственных препаратов. Главное преимущество биосенсоров ППР состоит в их способности определять кинетические параметры молекулярных взаимодействий в реальном времени без их специального мечения. Большой объем публикуемых материалов посвящен созданию ДНК-сенсоров для биоаналитических исследований. Разрабатываются новые стратегии повышения их чувствительности и специфичности, благодаря чему появилась возможность выявлять нуклеиновые кислоты на фемтомолярном уровне и обнаруживать различия единичных нуклеотидов в последовательностях-мишенях. В то же время большинство публикаций, посвященных анализу ППР, представляют собой исследования, выполненные в буферных растворах. Количество работ по применению сенсоров ППР для анализа реальных образцов, находящихся в сложных средах, достаточно ограничено. Кроме того, экспериментальные данные, такие как предел детекции нуклеиновых кислот, полученные в сложных образцах, являются результатом комплексного взаимодействия множества факторов (сенсорной платформы, зондов, способа иммобилизации, методологии детекции, состава образца). Это затрудняет количественное сравнение результатов, полученных разными исследователями. Опубликованные работы свидетельствуют о том, что одним из главных факторов, ограничивающих применение ППР-анализа НК в реальных пробах, является неспецифическая адсорбция фрагментов НК, не являющихся последовательностями-мишенями, что создает фоновый сигнал. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования и развитие методик для достижения уровня, который позволил бы использовать метод ППР-анализа как инструмент для детекции нуклеиновых кислот в реальных биологических образцах.

ЗАСТОСУВАННЯ ОПТИЧНИХ БІОСЕНСОРНИХ ТЕХНОЛОГІЙ В ДОСЛІДЖЕННІ МОЛЕКУЛЯРНИХ ВЗАЄМОДІЙ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ ТА БІОАНАЛІТИЦІ

Затовська Т.В., Баранова Г.В., Загородня С.Д.

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Акад. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

Резюме

В огляді наведені літературні дані щодо застосування методу поверхневого плазмонного резонансу (ППР) нуклеїнових кислот у медичній діагностиці та моніторингу навколишнього середовища. Викладено принцип методу ППР, його переваги для аналізу взаємодії молекул, вказані типи ППР-сенсорів і дано визначення їх основних характеристик. Розглянуто принцип ППР-аналізу нуклеїнових кислот і способи іммобілізації зондів на поверхні біосенсорів: модифікація поверхні за допомогою функціональних шарів, використання тіольованих олігонуклеотидів, використання біотинільованих зондів та біотин-стрептавідинової взаємодії. Охарактеризовано основні підходи підвищення чутливості і специфічності ДНК-сенсорів: проведення ПЛР ампліфікації, застосування наночастинок золота, ензимів, комбінації цих методів. Наведено приклади ДНК-сенсорів, розроблених для застосування в клінічному аналізі, зокрема, сенсори для виявлення точкових мутацій, що призводять до онкологічних і спадкових захворювань. Розглянуто біосенсори для аналізу мікро-РНК, детекції точкових мутацій, які викликають стійкість бактерій до антибіотиків, виявлення ДНК-маркерів патогенних бактерій людини та рослин, а також ДНК-маркерів генно-модифікованих організмів. Наведено приклади біосенсорів з використанням аптамерів для діагностики вірусних захворювань. Зроблено висновок про перспективність застосування ДНК-сенсорів в біоаналітиці та про необхідність розробки нових стратегій, що дозволяють проводити вимірювання в реальних біологічних зразках.

Ключові слова: поверхневий плазмонний резонанс, ДНК-сенсори, нуклеїнові кислоти, гібридизація.

APPLICATION OF OPTICAL BIOSENSOR TECHNOLOGIES IN THE STUDY OF MOLECULAR INTERACTIONS OF NUCLEIC ACIDS AND BIOANALYTICS

Zatovska T.V., Baranova G.V., Zagorodnya S.D.

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine,
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine*

Summary

The review provides literature data on the application of the technique of surface plasmon resonance (SPR) of nucleic acids in medical diagnostics, environmental monitoring. The principle of the SPR method and its advantages for analyzing the molecular interactions, the types of SPR sensors and the concepts of their basic characteristics are outlined. The principle of SPR analysis of nucleic acids and ways of immobilization of probes on the surface of biosensors are considered: modification of surface by functional layers, the application of thiolated oligonucleotides, the use of biotinylated probes and biotin-

streptavidin interaction. The main approaches for increasing the sensitivity and specificity of DNA sensors are characterized: PCR amplification, application of gold nanoparticles, enzymes, combinations of these methods. Examples of DNA sensors developed for application in clinical analysis are given, in particular, sensors for detecting point mutations causing oncological and hereditary diseases are described. Biosensors for the analysis of micro-RNA, detection of point mutations causing bacterial-resistance to antibiotics, for detection of DNA markers of human and plant pathogenic bacteria, as well as DNA markers of genetically modified organisms are reviewed. Examples of biosensors using aptamers for the diagnosis of viral infections are considered. It is concluded that the application of the SPR-based DNA sensors in bioanalytics is promising and the development of new strategies that allow measurements in real biological samples is necessary.

Keywords: surface plasmon resonance, DNA sensors, nucleic acids, hybridization.

1. Homola J. Surface Plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chem. Rev.* 2008; 108(2):462-93.
2. Piliarik M, Vaisocherova H, Homola J. Surface plasmon resonance biosensing. *Methods Mol Biol.* 2009; 503:65-88.
3. Sípová H, Homola J. Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: a review. *Anal Chim Acta.* 2013; 773:9-23.
4. D'Agata R, Spoto G. Surface plasmon resonance imaging for nucleic acid detection. *Anal Bioanal Chem.* 2013; 405(2-3):573-84.
5. Mariani S, Minunni M. Surface plasmon resonance applications in clinical analysis. *Anal Bioanal Chem.* 2014; 406(9-10):2303-23.
6. Minunni M, Tombelli S, Mariotti E, Mascini M. Biosensors as new analytical tool for detection of Genetically Modified Organisms (GMOs). *Fresenius J Anal Chem.* 2001; 369(7-8):589-93.
7. Gambari R, Feriotto G. Surface plasmon resonance for detection of genetically modified organisms in the food supply. *J AOAC Int.* 2006; 89(3):893-7.
8. Scarano S, Mascini M, Turner A, Minunni M. Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2010; 25:957-66.
9. Thomsen V, Schatzlein D, Mercurio D. Limits of Detection in Spectroscopy. *Spectroscopy* 2003; 18 (12): 112-4.
10. Corradini R, Feriotto G, Sforza S, Marchelli R, Gambari R. Enhanced recognition of cystic fibrosis W1282X DNA point mutation by chiral peptide nucleic acid probes by a surface plasmon resonance biosensor. *J. Mol. Recognit.* 2004; 17(1):76-84.
11. Joung H, Lee N, Lee S, Ahn J, Shin Y, Choi H, Lee C, et al. High sensitivity detection of 16S rRNA using peptide nucleic acid probes and a surface plasmon resonance biosensor. *Anal Chim Acta.* 2008; 630(2):168-73.
12. Fang S, Lee H, Wark A, Corn R. Attomole microarray detection of microRNAs by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions. *J Am Chem Soc.* 2006; 128(43):14044-6.
13. Rachkov O, Ushenin Yu, Holodova Yu, Negrutska V, Palchikovska L, Soldatkin O. Investigation of possibility to use the method of surface plasmon resonance for study of interactions between acridone derivatives and DNA. *Visnyk of Lviv Univ.* 2008; 47:42-8.
14. Steel A, Levicky R, Herne T, Tarlov M. Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophys J.* 2000; 79(2):975-81.

15. Lee H, Li Y, Wark A, Corn R. Enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging detection of DNA by exonuclease III digestion of DNA microarrays. *Anal Chem.* 2005; 77(16):5096-100.
16. Mannelli I, Lecerf L, Guerrouache M, Goossens M, Millot M, Canva M. DNA immobilisation procedures for surface plasmon resonance imaging (SPRI) based microarray systems. *Biosens Bioelectron.* 2007; 22(6):803-9.
17. Herne T, Tarlov M. Characterization of DNA probes immobilized on gold. *Journal of the Am. Chem Soc.* 1997; 119(38):8916-20.
18. Peeters S, Stakenborg T, Reekmans G, Laureyn W, Lagae L, Van Aerschot A, Van Ranst M. Impact of spacers on the hybridization efficiency of mixed self-assembled DNA/alkanethiol films. *Biosens Bioelectron.* 2008; 24(1):72-7.
19. Mark S, Sandhyarani N, Zhu C, Campagnolo C, Batt C. Dendrimer-functionalized self-assembled monolayers as a surface plasmon resonance sensor surface. *Langmuir.* 2004; 20(16):6808-17.
20. Yu Y, Feng C, Caminade A, Majoral J, Knoll W. The detection of DNA hybridization on phosphorus dendrimer multilayer films by surface plasmon field enhanced-fluorescence spectroscopy. *Langmuir.* 2009; 25(23):13680-4.
21. Zezza F, Pascale M, Mulè G, Visconti A. Detection of *Fusarium culmorum* in wheat by a surface plasmon resonance-based DNA sensor. *J Microbiol Methods.* 2006; 66(3):529-37.
22. Feriotto G, Gardenghi S, Bianchi N, Gambari R. Quantitation of Bt-176 maize genomic sequences by surface plasmon resonance-based bio-specific interaction analysis of multiplex polymerase chain reaction (PCR). *J Agric Food Chem.* 2003; 51(16):4640-46.
23. Wang R, Minunni M, Tombelli S, Mascini M. A new approach for the detection of DNA sequences in amplified nucleic acids by a surface plasmon resonance biosensor. *Biosens Bioelectron.* 2004; 20(3):598-605.
24. Thaxton C, Georganopoulou D, Mirkin C. Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. *Clin Chim Acta.* 2006; 363(1-2):120-6.
25. Xu H, Mao X, Zeng Q, Wang S, Kawde AN, Liu G. Aptamer-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for protein analysis. *Anal Chem.* 2009; 81(2):669-75.
26. Su X, Teh H, Aung K, Zong Y, Gao Z. Femtomol SPR detection of DNA-PNA hybridization with the assistance of DNA-guided polyaniline deposition. *Biosens Bioelectron.* 2008; 23(11):1715-20.
27. Rachkov A, Patskovsky S, Soldatkin A, Meunier M. Surface plasmon resonance detection of oligonucleotide sequences of the *rpoB* genes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Talanta.* 2011; 85(4):2094-9.
28. Ding X, Yan Y, Li S, Zhang Y, Cheng W, Cheng Q, Ding S. Surface plasmon resonance biosensor for highly sensitive detection of microRNA based on DNA super-sandwich assemblies and streptavidin signal amplification. *Anal Chim Acta.* 2015; 874:59-65
29. Matsishin M, Ushenin Iu, Rachkov A, Solatkin A. SPR detection and discrimination of the oligonucleotides related to the normal and the hybrid *bcr-abl* genes by two stringency control strategies. *Nanoscale Res Lett.* 2016; 11(1):19.
30. Carrascosa L, Calle A, Lechuga L. Label-free detection of DNA mutations by SPR: application to the early detection of inherited breast cancer. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009; 393:1173-82.

31. Sípová H, Springer T, Homola J. Streptavidin-enhanced assay for sensitive and specific detection of single nucleotide polymorphism in *TP53*. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 399(7):2343-50.32. Jiang T, Minunni M, Wilson P, Zhang J, Turner A, Mascini M. Detection of *TP53* mutation using a portable surface plasmon resonance DNA-based biosensor. *Biosens Bioelectron.* 2005; 20(10):1939-45.
33. Feriotto G, Corradini R, Sforza S, Bianchi N, Mischiati C, Marchelli R, Gambari R. Peptide nucleic acids and biosensor technology for real-time detection of the cystic fibrosis W1282X mutation by surface plasmon resonance. *Lab Invest.* 2001; 81(10):1415-27.
34. Li Y, Wark A, Lee H, Corn R. Single-nucleotide polymorphism genotyping by nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance imaging measurements of surface ligation reactions. *Anal Chem.* 2006; 78(9):3158-64.
35. Li Y, Yan Y, Lei Y, Zhao D, Yuan T, et al. Surface plasmon resonance biosensor for label-free and highly sensitive detection of point mutation using polymerization extension reaction. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014; 12: 15-20.
36. D'Agata R, Breveglieri G, Zanoli L, Borgatti M, Spoto G, Gambari R. Direct detection of point mutations in nonamplified human genomic DNA. *Anal Chem.* 2011; 83(22):8711-7.
37. Bartel D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116:281-97.
38. Sípová H, Zhang S, Dudley A, Galas D, Wang K, Homola J. Surface plasmon resonance biosensor for rapid label-free detection of microribonucleic acid at subfemtomole level. *Anal Chem.* 2010; 82(24):10110-5.
39. Rachkov A, Patskovsky S, Soldatkin A, Meunier M. Discrimination of single base mismatched oligonucleotides related to the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* using a surface plasmon resonance biosensor. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 2013; 60(4):453-8.
40. Kai E, Ikebukuro K, Hoshina S, Watanabe H, Karube I. Detection of PCR products of *Escherichia coli* O157:H7 in human stool samples using surface plasmon resonance (SPR). *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 29(4):283-8.
41. Piliarik M, Parova L, Homola J. High-throughput SPR sensor for food safety. *Biosens Bioelectron.* 2009; 24:1339-404.
42. Wang J, Luo Y, Zhang B, Chen M, Huang J, Zhang K, et al. Rapid label-free identification of mixed bacterial infections by surface plasmon resonance. *J Transl Med.* 2011; 9:85.
43. Foudeh A, Trigui H, Mendis N, Faucher S, Veres T, Tabrizian M. Rapid and specific SPRi detection of *L. pneumophila* in complex environmental water samples. *Anal Bioanal Chem.* 2015; 407(18):5541-5.
44. Florschütz K, Schröter A, Schmieder S, Chen W, Schweizer P, Sonntag F, Danz N, et al., 'Phytochip': on-chip detection of phytopathogenic RNA viruses by a new surface plasmon resonance platform. *J Virol Methods.* 2013; 189:80-6.
45. Chen A, Yang S. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosens Bioelectron.* 2015; 71:230-42.
46. Zhou W, Huang P, Ding J, Liu J. Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *Analyst.* 2014; 139(11):2627-40.

47. Wandtke T, Woźniak J, Kopiński P. Aptamers in diagnostics and treatment of viral infections. *Viruses*. 2015; 7(2):751-80.
48. Kumar P. Monitoring intact viruses using aptamers. *Biosensors (Basel)*. 2016; 6(3):40.
49. Wang R, Zhao J, Jiang T, Kwon Y, Lu H, Jiao P, Liao M, Li Y. Selection and characterization of DNA aptamers for use in detection of avian influenza virus H5N1. *J Virol Methods*. 2013; 189(2):362-9.
50. Nguyen V, Seo H, Kim B, Kim S, Song C, Gu M. Highly sensitive sandwich-type SPR based detection of whole H5Nx viruses using a pair of aptamers. *Biosens Bioelectron*. 2016; 86:293-300.

Отримано 29.05.2017