

# Оптические наноструктурированные аптасенсоры для обнаружения вируса гриппа

Е.Г. Завьялова<sup>1</sup>, Д.А. Грибанев<sup>2</sup>, Г.А. Жданов<sup>1</sup>, А.С. Гамбарян<sup>3</sup>, А.Ю. Оленин<sup>1</sup>,  
Г.В. Лисичкин<sup>1</sup>, В.И. Кукушкин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, Россия, 119991

<sup>2</sup>Институт физики твердого тела РАН, академика Осипьяна, 2, Черноголовка, Россия, 142432

<sup>3</sup>Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, пос. Института полиомиелита, 8, корп. 1, Москва, Россия, 108819

## Аннотация

Разработаны оптические наноструктурированные биосенсоры, работающие на основе эффекта поверхностно-усиленного Рамановского рассеяния света (SERS - surface enhanced Raman scattering), с широкой штаммовой специфичностью к вирусам гриппа. В качестве узнающих мишень элементов выступают аптамеры. Предел обнаружения находится на уровне  $10^4$  вирусных частиц в пробе или  $10^{-4}$  НАУ в пробе, что существенно лучше, чем в других экспресс-методах. Предложенные методики можно рассматривать в качестве экспресс-тестов для диагностики вируса гриппа из-за короткого времени анализа (менее 15 мин) и простой пробоподготовки.

## Ключевые слова

SERS, Рамановское рассеяние света, аптамер, оптический сенсор, вирус гриппа

## 1. Введение

Аптамеры нуклеиновых кислот являются перспективными распознающими элементами для терапии и диагностики социально значимых заболеваний [1,2]. Благодаря своей пространственной структуре аптамер специфично и надежно связывается с мишенью. В целях создания оптических сенсоров аптамеры являются более технологичным решением, чем антитела, благодаря:

- 1) химическому синтезу;
- 2) возможности включения модификаций в определенные участки;
- 3) легкому сворачиванию и рефолдингу;
- 4) высокой стабильности при хранении.

Развитие аптасенсоров связано с возможностью построения стабильных и дешевых систем экспресс-диагностики. Высокочувствительная и быстрая технология поверхностно-усиленного Рамановского рассеяния (SERS - surface-enhanced Raman scattering) позволяет создавать аптасенсоры на основе наноструктурированных субстратов с целью обнаружения вируса гриппа [3]. В настоящей работе мы предлагаем несколько подходов, сочетающих быстрое специфическое обнаружение и возможность количественного определения вирусов на примере вируса гриппа А.

## 2. Материалы и методы

В первом подходе мы использовали аптамер с широкой видоспецифичностью по отношению к различным штаммам вируса гриппа А. Для достижения высокой чувствительности на твердотельной наноструктурированной SERS-подложке был собран сэндвич из первичных аптамеров, вируса гриппа и вторичных аптамеров с Рамановскими метками (Рис. 1А). На SERS-сигнал влияла концентрация как первичного, так и вторичного

аптамера. Предел обнаружения для вируса H3N2 (A/England/42/72) составлял  $5 \cdot 10^{-4}$  единицы гемагглютинации на пробу. Сенсоры на основе аптамеров обеспечивали распознавание различных штаммов вируса гриппа, включая подтипы гемагглютинаина H1, H3, H5 и H9. Эта методика обеспечивала качественную оценку вируса гриппа А.

Другой подход применялся для количественной оценки вируса гриппа А. Серебряные наночастицы (НЧ) были функционализированы тиол-модифицированными аптамерами. Затем наночастицы смешивались с мечеными аптамерами и агрегировали (Рис. 1Б). Добавление вируса гриппа А незначительно уменьшало SERS-сигнал от Рамановской метки, а добавление неспецифичных молекулярных веществ значительно эффективнее подавляло оптический сигнал. Были получены концентрационные зависимости для вируса гриппа А штамма H5N1. Оптимальный SERS-аптасенсор имел предел обнаружения  $2 \cdot 10^5$  VP/ml и динамический диапазон:  $2 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^6$  VP/ml. Помимо описанного аптасенсора на основе наночастиц, были разработаны и другие варианты аптасенсоров. В частности, был изменен порядок смешения наночастиц, аптамеров и вирусов. Показано, что порядок смешения реагентов определяет предел обнаружения вируса гриппа, а также диапазон количественного определения вируса.

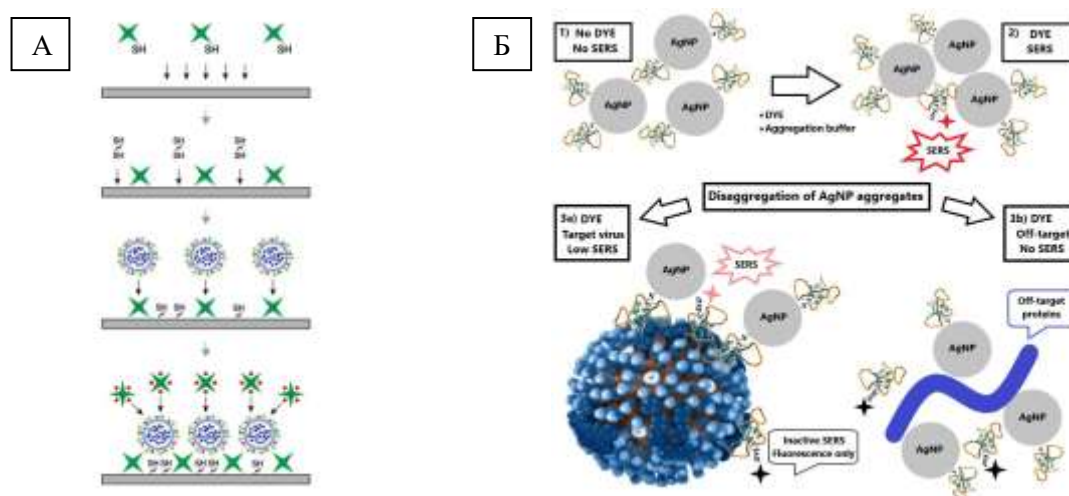


Рисунок 1. Схемы создания SERS-аптасенсоров (А – на твердотельных подложках, Б – на НЧ)

### 3. Заключение

Разработаны SERS – аптасенсоры с широкой штаммовой специфичностью к вирусам гриппа. Предел обнаружения находится на уровне  $10^4$  вирусных частиц в пробе или  $10^{-4}$  HAU в пробе, что существенно лучше, чем в других экспресс-методах. Предложенные методики имеют простую пробоподготовку и короткое время анализа и их можно рассматривать в качестве экспресс-тестов для высокоспецифичной и чувствительной диагностики вируса гриппа.

### 4. Благодарности

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-74-10019).

### 5. Литература

- [1] Liu, J. Functional nucleic acid sensors / J. Liu, Z. Cao, Y. Lu // Chem. Rev. – 2009 – Vol. 109. – P. 1948-1998.
- [2] Zhang, H. Ultrasensitive detection of proteins by amplification of anity aptamers / H. Zhang, Z. Wang, X.F. Li, X.C. Le // Angew. Chem. Int. Ed. – 2006 – Vol. 45. – P. 1576-1580.

- [3] Kukushkin, V.I. Highly sensitive detection of influenza virus with SERS aptasensor / V.I. Kukushkin, N.M. Ivanov, A.A. Novoseltseva, A.S. Gambaryan, I.V. Yaminsky, A.M. Kopylov, E.G. Zavyalova // PLoS ONE. – 2019. – Vol. 14. – P. e0216247.