

# פיתוח חיישן רגיש, זול ונייד ל-DNA ו-RNA\*

עמוס בר-דע ורון נעמן\*\*

## הקדמה

RNA עדיין יש צורך בטכנולוגיות פשוטות וניידות בעלות רגישות דומה או משופרת לטכנולוגיית PCR, אשר תאפשרנה לאתר ולזהות DNA ו-RNA. בעבור יישומים רבים גילוי ברגישות של מספר מולקולות קטן, DNA או RNA, יכול לספק כלי דיאגנוסטי מתקדם לכל התחומים שנסקרו לעיל.

מטרת המחקר המתואר במאמר זה הוא פיתוח שיטה חדשה ופשוטה לזיהוי ברגישות גבוהה של DNA או של RNA, וזאת ללא צורך בתהליכי הכנה, ובעיקר ללא תהליכי ריבוי החומר הגנטי הנדגם באמצעות PCR הנדרשים בחיישנים הקיימים כיום.

## השיטה

השיטה המוצעת מבוססת על היכולת להדפיס מטריצת חישה מולקולרית (גלאים) על פני שטח הדופן הפנימי של צינורית קפילרית העשויה מזכוכית שאורכה סנטימטר אחד בלבד. הגלאים הם רצפים קצרים של DNA חד-גדילי (Oligonucleotide), רצפים אלו מתוכננים להשלים חלק מהרצף של הגדיל הנבדק. למעשה המערכת דומה לתהליך ה-PCR (Polymerase Chain Reaction) אלא שהיא מתקיימת על פני משטח. מטרתה העיקרית של שיטת ה-PCR

חשיבות החישה ברגישות גבוהה של מולקולות DNA ו-RNA גדלה בשנים האחרונות. ברפואה, למשל, דרושה חישה ברגישות גבוהה של מולקולות DNA ו-RNA לשם אבחון מוקדם של סרטן ולאחר מכן למעקב אחר הטיפול. כמו כן יש חשיבות רבה בחישה ברגישות גבוהה של DNA ו-RNA כדי לנבא התקפי לב, לזהות מחלות שגורמים פטריות, חיידקים, ווירוסים<sup>1</sup> ואף לפיתוח רפואה אישית<sup>2</sup>. נוסף על כך, גילוי ה-DNA ברגישות גבוהה נעשה כלי מהפכני בתחום המדע הפורנסי<sup>3</sup> (מדע משפטי בהקשר של זיהוי פלילי) ואף בתחום ניטור גורמי זיהום הסביבה<sup>4</sup>.

כמה יישומים עוררו פיתוח של שיטות מתקדמות לחישה של DNA ו-RNA<sup>5</sup>. אלה כוללים שיטות המבוססות על אותות אופטיים כגון שבבי דנ"א<sup>6</sup>, שיטות המבוססות על אותות חשמליים כגון חיישנים אלקטרוכימיים<sup>7</sup>, ננו-גלאים<sup>8</sup>, והתקנים מבוססי טרנזיסטורים מסוג CMOS<sup>9</sup>. שיטות לניתוח ביטוי של גנים ברמת ה-DNA וגם ברמת ה-RNA הן בעלות ביקוש גבוה בשוק הביומדיטק. תפקיד חשוב מאוד בתחום זה נודע לשיטות המבוססות על טכנולוגיית PCR (Polymerase Chain Reaction)<sup>10</sup>.

למרות ההתקדמות הניכרת בשיטות הזיהוי של DNA ושל

\* מבוסס על המאמר:

Sensitive Detection and Identification of DNA and RNA Using a Patterned Capillary Tube. Anal. Chem. 2011, 83, 9418–9423.

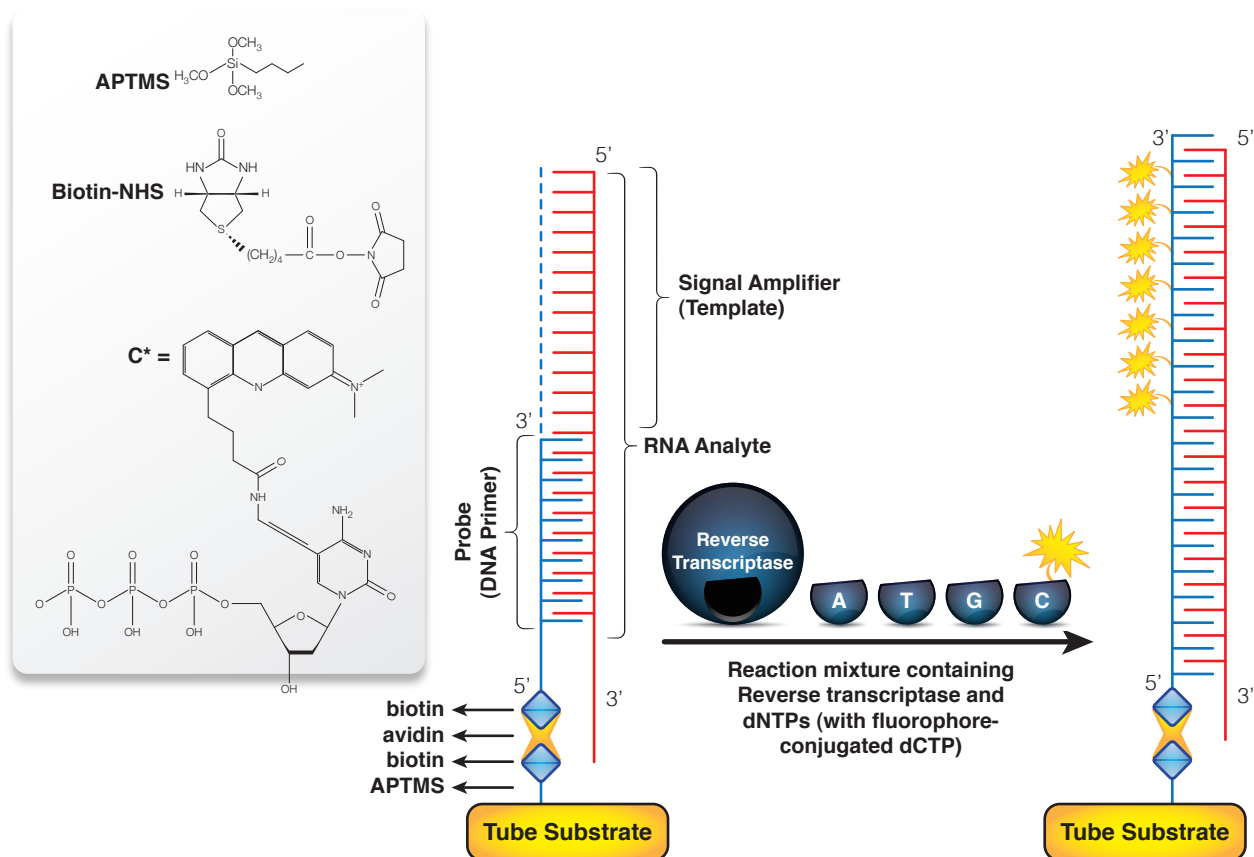
\*\* ד"ר עמוס בר-דע ופרופ' רון נעמן, המחלקה לפיזיקה כימית, מכון ויצמן למדע, רחובות.

הגדילים מוזרמים לצינורית אנזימי DNA פולימראז במקרה של גילוי DNA או Reverse Transcriptase (RT) וכן בסיסים dNTPs (deoxynucleosides) הכוללים את בסיס הציטוזין (C\*) הקשור לתג פלואורסצנטי.

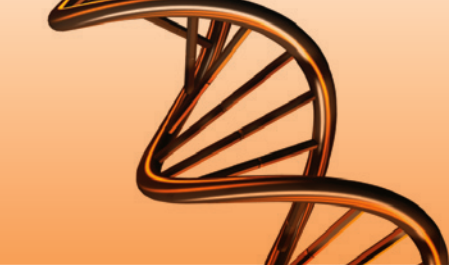
קישור של הגורם הנבדק אל הגלאי המותקן על פני השטח הפנימי של הצינורית יוצר מערך דו-גדילי המאפשר לאנזימי DNA פולימראז או RT להיקשר ולקטלז תהליך של פלמור בסיסים המשלימים לרצף הנבדק על פני הגלאי על פי תבנית הרצף של הגורם הנבדק (איור 1). תהליך הקטליזה כולל את הקישור של C בעל תג פלואורסצנטי.

היא להרבות מספר מועט של רצפי DNA, בעוד שבשיטה המוצעת פה מטרת התהליך היא דיאגנוסטיקה.

לאחר התקנת הגלאי וקישורו על פני השטח הפנימי של הצינורית, מזרימים דרך הצינורית הקפילרית תמיסה המכילה את הגורם הנבדק: DNA או RNA. אם יש התאמה בין הרצף של הגלאי המותקן על פני המשטח הפנימי של הצינורית לחלק מרצף של מולקולות ה-DNA או ה-RNA הנבדקים, מתקיים תהליך של הכלאה (היברידיזציה) בין הגדילים, באופן זה מיוצר פריימר המאפשר לאנזים הפלמור להתחיל את עבודתו בדומה לתהליך ה-PCR. בעקבות ההכלאה בין



איור 1: תיאור אופן קישור הגלאי למשטח הזכוכית ושיטת החישה המגבירה את אות החישה של רצף RNA. החישה של רצף DNA (רצף האדום באיור יהיה DNA) מתבצעת באותה השיטה בהחלפת האנזים RT ב-DNA פולימראז.



החישה אנו מצפים לקישור של כ-15 כרומוזומים על פני הגלאי באמצעות תהליך פלמור ביוקטיליטי המופעל על-ידי DNA פולימראז.

איור 2 מציג את תוצאות בדיקת הרגישות של המערכת שתוארה לעיל. הגרף מציג את עוצמת הפלואורסנציה כתלות בריכוז הרצף הנבדק או במספר המולקולות של אותו רצף (ציר x עליון) אשר הוזרמו דרך הצינורית הקפילרית. לצינורית הקפילרית הוזרקו בין  $10^2$  ל- $10^{14}$  מולקולות DNA נבדק (שווה-ערך לריכוזים שבין  $10^{-16}$  M ל- $10^{-4}$  M). נמצא כי אות החישה הוא ליניארי עד  $10^5$  מולקולות של הרצף הנבדק והוא ברוויה כבר ב- $10^8$  מולקולות.

מאחר שבתהליך זה אין מדובר במכל המכיל נפח קבוע של תמיסה, אלא בזרימה קבועה של הנוזל המכיל את הגורם הנבדק דרך החיישן – יש להתחשב במספר המולקולות של הרצף הנבדק המוזרמות דרך הצינורית ולא בריכוז הרצף הנבדק הכולל נפח. יוצא אפוא שאם נזרים מספר זהה של מולקולות בנפחים משתנים נצפה לסיגנל זהה. הגרף הפנימי (insert) באיור 2 ממחיש את הרגישות למספר מולקולות ה-AND הנבדק (במקום ריכוז) של מולקולות. גרף זה מתאר ניסוי שבו הוזרק מספר קבוע של  $10^4$  מולקולות (של הרצף הנבדק) אך בנפחים שונים (ולכן אף הריכוזים שונים) בקצב זרימה של  $40 \mu\text{l}$  מיקרוליטר לדקה. עוצמת האות נשארה כמעט קבועה אף על פי שהגורם הנבדק נמהל בארבעה סדרי גודל.

ניסוי זה מראה בבירור שהחיישן שפותח יכול לזהות כמות נמוכה מאוד של מולקולות ללא תלות בריכוזם בתמיסה. רגישות גבוהה של שיטה זו היא תוצאה של קוטר פנימי זעיר של הצינורית הקפילרית. זמן דיפוזיה לדפנות של הצינור הוא קצר במיוחד בשל קוטר הצינורית הקפילרית, 001 מיקרומטר בלבד. קצב הדיפוזיה מבטיח כי כל מולקולה של הגורם הנבדק יכולה לתקשר עם מטריצת החישה אשר מצפה את דופן הצינורית הקפילרית.

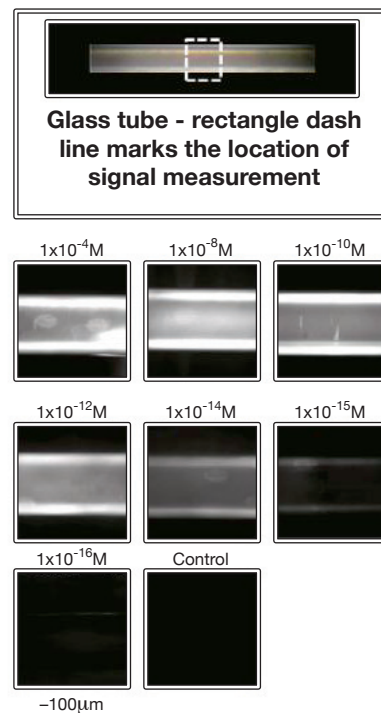
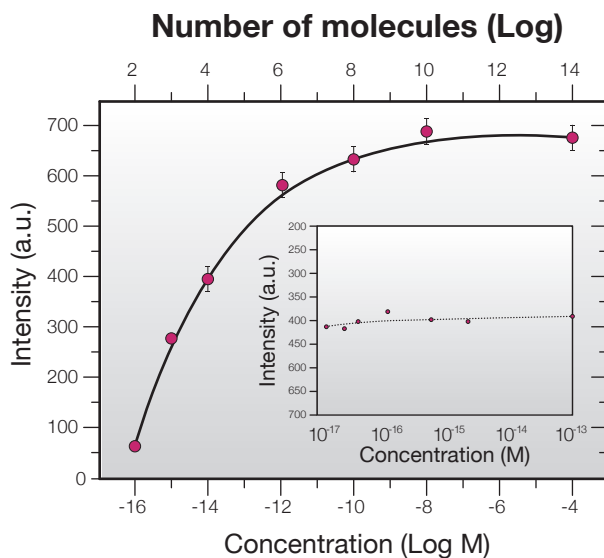
יוצא אפוא שעל כל אירוע הכרה בין הרצף הנבדק לבין מולקולת הגלאי שבמטריצת החישה ייקשרו מספר רב של סמנים פלואורסצנטיים, תהליך המגביר את רגישות החישה. לאחר זמן הדגרה קצר, שבו מתרחשת הקטליזה של הריאקציה הביוכימית לפלמור הגלאי, שוטפים את הצינורית וקוראים את עוצמת הפלואורסנציה באמצעות מיקרוסקופ פלואורסצנטי. ביצירת גרף כיול לכל רצף נבדק מקבלים את הקשר בין ריכוזו בתמיסה לבין עוצמת הפלואורסנציה המתקבלת.

## תוצאות

### רגישות החיישן

הרגישות לגילוי ה-DNA על-ידי החיישן נקבעה באמצעות חישה של אוליגונוקלאוטיד באורך 80 בסיסים המהווה את הגורם הנבדק. על פני הדופנות הפנימיים של הצינוריות הקפילריות הותקנה מטריצת חישה הבנויה מאוליגונוקלאוטיד המשמש גלאי. הגלאי מורכב מרצף של 40 בסיסים, כאשר בקצה ה-5' שלו קשורה מולקולת ביוטין הנקשרת לאבידין אשר על פני המשטח. באופן זה הגלאי מעוגן לפני שטח הדופנות הפנימיים של הצינוריות. 20 הבסיסים שבקצה ה-3' של הגלאי תוכננו להיות משלימים לרצף אשר ב-DNA החד-גדילי הנבדק (ראו איור 1).

האוליגונוקלאוטיד הנבדק הנו בעל שני מקטעים: (א) בצד 3', רצף של 20 בסיסים המשלימים לגלאי שעל מטריצת החישה; (ב) בהמשך מקטע באורך של 60 בסיסים המשמש להגברת אות החישה (ראו רצף אדום באיור 1). מקטע ב' בעל 60 הבסיסים מהווה תבנית (template) שעליה יתרחש התהליך הביוקטיליטי על-ידי האנזים DNA פולימראז לפלמור הבסיסים על גבי הגלאי. בן 60 בסיסיו של מקטע זה נמצאים 15 בסיסי גואנין (G) המשלימים לציטוזין המסומן פלואורסצנטית ( $C^*$ ) propargylamino-dCTP-5 (סמן פלואורסצנטי על דאוקסיציטוזין טריפוספט; ראו איור 1). לפיכך, על כל אירוע של הכרה בין הגורם הנבדק למטריצת



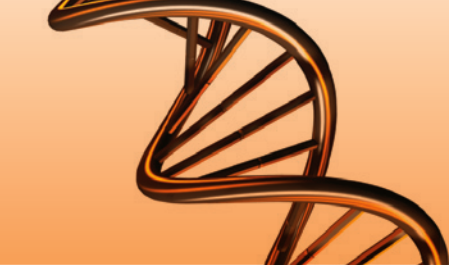
איור 2: עוצמת הפלואורסנציה כתלות בריכוז הרצף הנבדק או במספר המולקולות של אותו רצף (ציר x עליון) אשר הוזרמו דרך הצינורית הקפילרית. בצד ימין מוצגת הזהירה הפלואורסנצית על-פני הדפנות הפנימיים של הצינוריות כתלות בריכוזים השונים של הגורם הנבדק. הגרף הפנימי מציג את תלות עוצמת הפלואורסנציה במספר קבוע של מולקולות DNA הנבדק בריכוזים משתנים.

אירוע אחד של הכרה בין הגורם הנבדק למטריצת החישה אנו מצפים לקישור של כ-6 כרומופורים על פני הגלאי שבמטריצת החישה באמצעות תהליך פלמור ביוקטילי המופעל על-ידי האנזים RT.

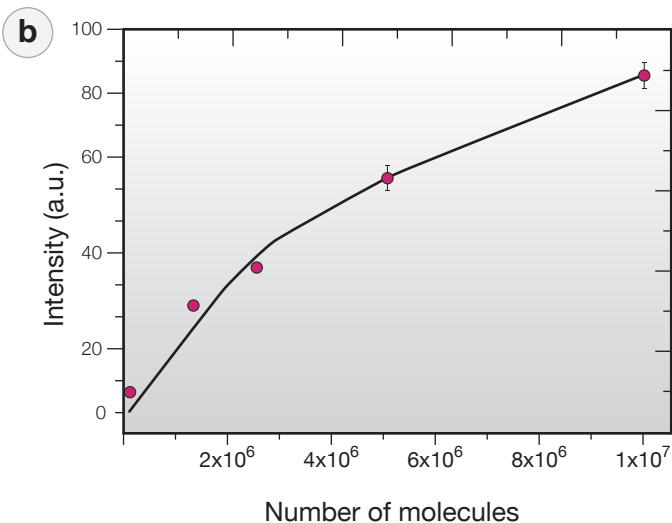
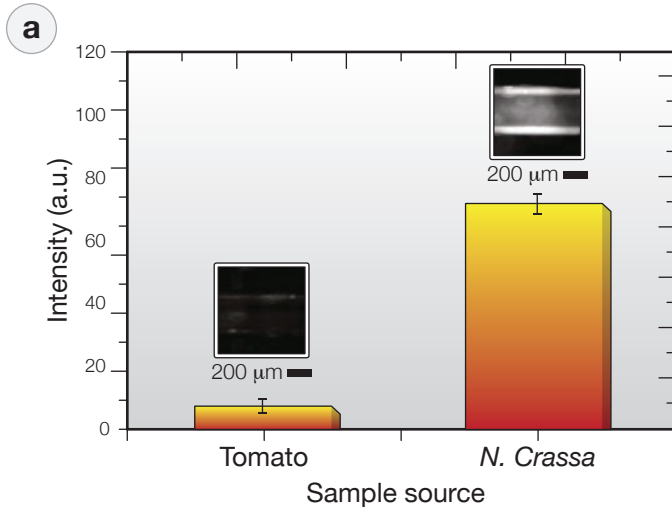
איור 3 מציג את עוצמת הפלואורסנציה כפונקציה של הריכוזים השונים של ה-RNA הנבדק או במספר המולקולות של אותו רצף (ציר x עליון) אשר הוזרמו דרך הצינורית הקפילרית.

לצינורית החישה הקפילרית הוזרקו בין  $10^3$  ל- $10^{13}$  מולקולות RNA נבדק (שווה-ערך לריכוזים שבין  $10^{-15} M$  ל- $10^{-5} M$ ). נמצא כי אות החישה הוא ליניארי עד  $10^8$  מולקולות של הרצף הנבדק והוא ברוויה כבר ב- $10^{10}$  מולקולות.

באותו האופן הופעל ניסוי הבוחן את רגישות החיישן לגורם נבדק מסוג רצף RNA. בניסוי זה הגלאי הוא DNA והגורם הנבדק הוא RNA בעל 40 בסיסים. רצף ה-RNA הנבדק הוא בעל שני מקטעים: (א) בצד 3', רצף של 20 בסיסים המשלימים לגלאי שעל מטריצת החישה; (ב) בהמשך מקטע באורך 20 בסיסים נוספים המשמש להגברת אות החישה (ראו רצף אדום באיור 1). מקטע ב' בעל 20 הבסיסים מהווה תבנית (template) שעליה יתרחש התהליך הביוקטילי על-ידי האנזים RT (המפלמר DNA – של הגלאי – על תבנית של RNA, המהווה במקרה זה את הגורם הנבדק). בין 20 בסיסיו של מקטע זה יש 6 בסיסי גואנין (G) המשלימים לציטוזין מסומן propargylamino-dCTP-5 (C\*) (סמן פלואורסנציה על דאוקסיציטוזין טריפוספט – ראו איור 1). לפיכך, על כל



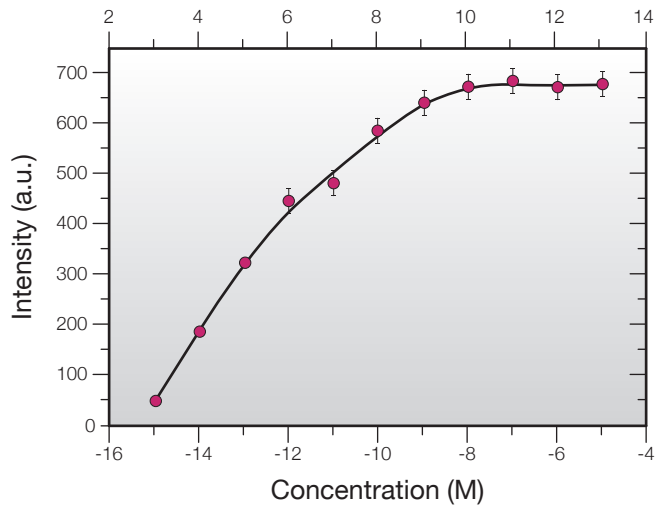
לא ספציפית לגלאי של החיישן באמצעות RNA שמוצה מעגבנייה בריכוז 1nM לחישה ספציפית באמצעות RNA שמוצה מהפטרייה *N. crassa* בריכוז 1pM הנמוך בשני סדרי גודל.



איור 4: חישה סלקטיבית וספציפית של החיישן. a: השוואה בין חישה לא ספציפית באמצעות RNA שמוצה מעגבנייה לחישה ספציפית באמצעות RNA שמוצה מהפטרייה *N. crassa*; b: עוצמת הבליעה הפלואורסצנטית כפונקציה של ריכוז ה-RNA מהפטרייה של *N. crassa* בסרום אדם.

אפשר לראות כי ההבדלים בעוצמות הפלואורסצניה מובהקים כאשר עוצמת האות הפלואורסצנטי של הקישור הבלתי ספציפי של ה-RNA מהעגבנייה מהווה רק כ-3% מעוצמת

### Number of molecules (Log)



איור 3: עוצמת הפלואורסצניה כתלות בריכוז רצף ה-RNA הנבדק או במספר המולקולות של אותו רצף (ציר X עליון) אשר הוזרמו דרך הצינורית הקפילרית.

### ספציפיות וסלקטיביות

תהליכים כימיים על גבי משטחים עלולים לסבול מבעיות של סלקטיביות מופחתת בשל היעדר ספציפיות של אינטראקציות והפרעות סטריות עם פני השטח. כדי לחקור את סלקטיביות וספציפיות החיישן שבנינו השתמשנו ב-RNA שמוצה מפטרייה בשם *N. crassa*<sup>11</sup>. גן האקטין (NCU04173.4) של פטרייה זו הוא באורך 1448 בסיסים. בריצוף של הגן נמצא כי רצף של 20 בסיסים (מבסיס 296 עד בסיס 316) ספציפי רק לגן האקטין של פטרייה זו ולא לאף גן אקטין אחר בטבע. בהמשך, תוכנן גלאי ל-20 בסיסים כאשר 296 בסיסים יהוו תבנית ל-RT בתהליך הביוקטליטי של הפלמור. בקרב 296 בסיסים אלו יש 48 בסיסי גואנין (G) ולכן בנצולת מרבית נקבל 48 כרומופורים לכל אירוע של היברידיזציה על פני הגלאי. מחד גיסא, הגן ארוך מאוד ולכן צפויות בעיות סטריות, ומאידך גיסא, יש אפשרות של הגברת הסיגנל פי 48.

איור 4 מציג חישה סלקטיבית וספציפית של החיישן. על פני הדפנות הפנימיים של הצינורית הותקנה מטריצת חישה עם הגלאי לאקטין של *N. crassa*. איור 4a משווה בין חישה

הפלוואורסנציה של הקישור הספציפי, אף על פי שריכוז גדול פי 100 מריכוז ה-RNA הספציפי. תוצאות אלו מוכיחות סלקטיביות וספציפיות של החיפוש שבו היחס בין סיגנל ספציפי וסלקטיבי לסיגנל שאינו ספציפי הוא כ- 1:2500.

על מנת לבדוק רגישות וסלקטיביות של החיפוש מהלנו בריכוזים שונים את הגורם הנבדק (הגן המבוטא ב-RNA של פטריית *N. crassa*) בסרום דם אדם. המטרה להציג את רגישות החיפוש לגורם הנבדק בסביבה הכוללת את המרכיבים החלבוניים של דם האדם. איור 4b מציג את עוצמת הבליעה הפלוואורסנטית כפונקציה של ריכוז ה-RNA מהפטרייה בסרום. נמצא שהחיפוש רגיש בתנאים אלו לריכוז הנמוך מ-1pM - בנפח של מיקרוליטר אחד תמיסה (כמיליון מולקולות במיקרוליטר תמיסה).

## דיון ומסקנות

תיארנו שיטה חדשה לאיתור רגיש במיוחד הן של DNA והן של RNA. קבענו כי לחיפוש המבוסס על צינורית קפילרית יש יתרונות חשובים: רגישות חישה גבוהה במיוחד; יכולת לזהות באופן כמותי DNA ו-RNA בספציפיות וסלקטיביות גבוהה, אפילו בנוכחות גורמים העלולים להפריע, כגון חלבונים וחומצות גרעין בסרום. יתר על כן, נמצא כי אין צורך בטיפול מקדים כמו בשיטות האחרות הקיימות, שכן נזל הדגימה מוכנס היישר לתוך הצינורית הקפילרית ללא כל הכנה; זמן הדיפוזיה של הגורם הנבדק הוא מהיר למדי בשל הקוטר הקטן של הצינור, דבר המאפשר רגישות גבוהה ולכן גם זמן בדיקה קצר במיוחד. כמו כן, החיפוש ניד זול מאוד שכן הוא פשוט לייצור בעלויות נמוכות במיוחד.

מבחינה יישומית, תהליך הייצור של החיישנים כולל ציפוי הדופן הפנימי של הקפילרות. תהליך הייצור הוא פשוט, יחסית, וכולל הזרמת תמיסות אחדות וזמן הדגרה קצר, יחסית, תהליך שיכול לעבור אוטומציה. תפעול החיפוש אצל הצרכן הוא קל ונוח, יחסית. תהליך קריאת האותות הפלוואורסנטיים יכול להיעשות מתוך סדרה של דיודות פולטות אור וסדרה של אלמנטי CCD, כך שכל המערכת

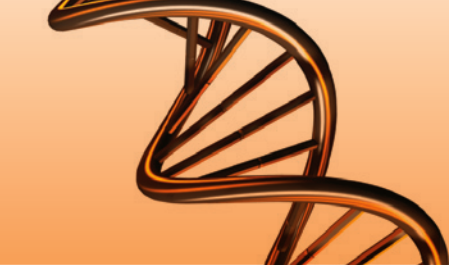
יכולה להיות ניידת ולכלול בדיקות רבות באופן מקבילי. המחקר הנוכחי מראה כי חיפוש ביולוגי המבוסס על צינור נימי פשוט פותח את האפשרות לגלות ולזהות באופן כמותי, רגיש וספציפי מולקולות של חומצות גרעין מסוג DNA ו-RNA, באמצעות מערכת דיאגנוסטית, ניידת, פשוטה לתפעול וזולה.

החשיבות הגדולה בחישה של DNA ושל RNA נובעת מהעובדה כי בדרך כלל ה-DNA נותן חיפוש לנשאות של מחלה על רקע תורשתי או פתוגני (מיקרוביאלי או ויראלי) בעוד mRNA הוא מחוון לפעילות המחלה. האפשרות לבחון את אלה במהירות מאפשרת תגובה תרפויטית מהירה והעלאת סיכויי הריפוי.

פשטות הגילו והזיהוי עשויים לאפשר יישומים חדשים של ה-DNA ושל RNA בדיאגנוסטיקה הרפואית, בניטור טיפולי, ברפואה אישית ובניטור סביבתי. הרגישות והסלקטיביות הגבוהות מאפשרות יישום בתחום הזיהוי הפלילי, שם נדרשות מערכות לזיהוי רצפי חומצות גרעין מזירות פשע המכילות כמות זעומה שלהן בסביבה מזוהמת.

השלב הבא של המחקר יהיה יישום חיישנים המבוססים על צינוריות חישה של חלבונים. לשם כך יהיה צורך למצוא שיטה גנרית לציפוי הדופנות הפנימיים במטריצת חישה שתאפשר אפליקציית הגברה לאחר אירוע ההכרה עם הגורם הנבדק. בסיום שלב זה של המחקר יהיה אפשר להציג מערכת כוללת המאפשרת חישה כמותית של RNA, DNA וחלבון - דבר שיפתח אפשרות יישומית בשטחים שנמנו לעיל.

החיפוש שפותח והוצג בעבודה זו מדגים **טכניקה גנרית** לחישה של מרכיבים ביולוגיים, ויכול להתאים לשטחים מגוונים שבהם יש צורך ליישם חישה ביולוגית. הפיתוח הוא גנרי משום שהוא מציע שיטה שהוכחה בעבודה זו רק באופן מוגבל על רצפי חומצות גרעין, אולם בהתאמה תכנונית של גלאי אשר יותקן על דפנות הצינוריות יהיה אפשר לחוש מגוון רחב מאוד של חומרים ביולוגיים לפי הנדרש.



## מקורות

1. Ramachandran, C.; Melnick, S. J., *Molecular Diagnosis* 1999, 4, 81-94.
2. Shastry, B. S., *Pharmacogenomics Journal* 2006, 6, 16-21.
3. Liu, P.; Li, X.; Greenspoon, S. A.; Scherer, J. R.; Mathies, R. A., *Lab on a Chip* 2011, 11, 1041-1048.
4. Riesenfeld, C. S.; Schloss, P. D.; Handelsman, J., *Annual Review of Genetics* 2004, 38, 525-552.
5. Dvorak, Z.; Pascussi, J.-M.; Modriansky, M., *Biomedical Papers (Olomouc)* 2003, 147, 131-135.
6. Gerhold, D.; Rushmore, T.; Caskey, C. T., *Trends in Biochemical Sciences* 1999, 24, 168-173.
7. Bardea, A.; Patolsky, F.; Dagan, A.; Willner, I., *Chemical Communications* 1999, 21-22.
8. Drummond, T. G.; Hill, M. G.; Barton, J. K., *Nature Biotechnology* 2003, 21, 1192-1199.
9. Thewes, R.; Hofmann, F.; Frey, A.; Holzapfl, B.; Schienle, M.; Paulus, C.; Schindler, P.; Eckstein, G.; Kassel, C.; Stanzel, M.; Hintsche, R.; Nebling, E.; Albers, J.; Hassman, J.; Schulein, J.; Goemann, W.; Gumbrecht, W., 2002 IEEE International Solid-State Circuits Conference. Digest of Technical Papers (Cat. No.02CH37315) 2002.
10. Kubista, M.; Andrade, J. M.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jonak, J.; Lind, K.; Sindelka, R.; Sjoback, R.; Sjogreen, B.; Strombom, L.; Stahlberg, A.; Zoric, N., *Molecular Aspects of Medicine* 2006, 27, 95-125.
11. Ziv, C.; Gorovits, R.; Yarden, O., *Fungal Genetics and Biology* 2008, 45, 103-116.