

# Anwendung von silanisiertem Graphenoxid als Plattform für die Immobilisierung von Sonden-Oligonukleotiden für den kabellosen elektrochemischen miRNA-Nachweis

*Sedigheh Falahi, Parvaneh Rahimi und Yvonne Joseph*

*Sedigheh Falahi, Parvaneh Rahimi, Yvonne Joseph, Instituts für Elektronik- und Sensormaterialien, Fakultät für Werkstoffwissenschaft und Werkstofftechnologie, TU Bergakademie Freiberg, Freiberg/Deutschland; Kontakt: sedigheh.falahi@doktorand.tu-freiberg.de*

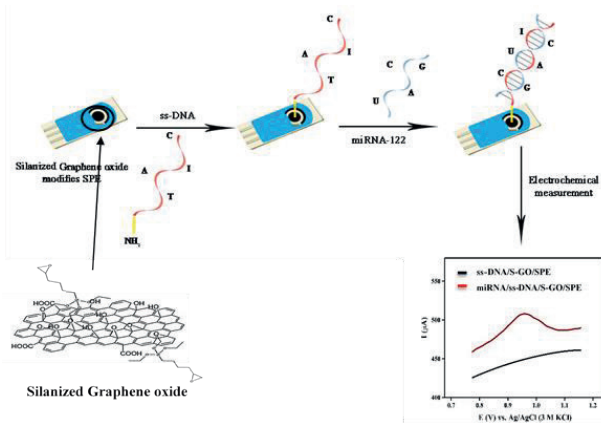
## Einleitung

Krebs ist weltweit die häufigste Todesursache. Laut den globalen Krebsdaten von 2018 ist die weltweite Belastung des Gesundheitssystems durch Krebs auf 18,1 Millionen neue Fälle und 9,6 Millionen krebsbedingte Todesfälle gestiegen [1]. In den letzten Jahren haben sich der Nachweis und die Analyse von Krebs-Biomarkern als wirksames Instrument zur Krebsvorsorge, Diagnose, Prognose und Behandlung etabliert. Biomarker sind Biomoleküle in den Geweben und Körperflüssigkeiten des Menschen, deren Werte sich bei der Entwicklung abnormaler Zustände und verschiedener Krankheiten wie Krebs verändern [2]. MicroRNAs (miRNAs) sind eine Klasse von nicht-kodierenden Genen, die als RNA-Sequenzen von etwa 22 Nukleotiden Länge transkribiert werden [3]. Das abnorme Expressionsmuster der miRNA trägt zur Krebsentstehung und -progression bei [4, 5]. Sie können entweder als Onkogene oder als Tumorsuppressoren wirken [6] und lassen sich leicht aus Geweben, Plasma, Serum, Urin und Fäkalien extrahieren. Bisher wurden viele verschiedene Methoden für den Nachweis von micRNA entwickelt, z. B. Northern Blotting [7], Microarray [8] und quantitative Polymerasekettenreaktion mit reverser Transkriptase (RT-qPCR) [9]. Trotz der akzeptablen analytischen Leistung dieser Techniken weisen sie kritische Nachteile auf, wie z. B. den hohen Zeitaufwand, das große Probenvolumen und die teure Instrumentierung. Daher ist die Entwicklung neuer Plattformen, die das miRNA-Screening in die routinemäßige Point-of-Care-Diagnostik integrieren, von entscheidender Bedeutung. In den letzten Jahren wurden mehrere biosensorbasierte Techniken zum Nachweis spezifischer Biomarker wie nicht codierende RNAs entwickelt [10, 11]. Elektrochemische, optische und elektromechanische Biosensoren wurden ausgiebig für den Nachweis krebsbezogener micRNAs eingesetzt, um den Krebs in einem frühen Stadium zu diagnostizieren [12]. Unter den verschiedenen DNA-basierten Biosensoren bieten elektrochemische Biosensoren aufgrund ihrer Einfachheit, Schnelligkeit, niedrigen Kosten und der Möglichkeit der Miniaturisierung eine hervorragende Möglichkeit für den Nachweis von Biomarkern [13, 14].

Die elektrochemische Messung von miRNA ist empfindlich, schnell, einfach und kostengünstig. Die Immobilisierung der einzelsträngigen (ss-DNA) Sondenmoleküle auf der Wandleroberfläche ist dabei ein entscheidender Schritt bei der Herstellung dieser DNA-

Biosensoren [15]. Um einen guten Immobilisierungseffekt und eine hervorragende Nachweiseistung der Biosensoren zu erreichen, werden viele neue funktionale Materialien wie Polymere, ionische Flüssigkeiten und Nanopartikel [16-18] als Biosensorschnittstelle verwendet. Unter diesen sind kohlenstoffbasierte Nanomaterialien aufgrund ihres ultrahohen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses, ihrer hervorragenden Leitfähigkeit und ihrer guten biologischen Verträglichkeit besonders vielversprechend. Nanomaterialien auf Graphenbasis haben nachweislich einzigartige Eigenschaften wie ultradünne Dicke, große Oberfläche, hohe Leitfähigkeit und gute Biokompatibilität, was zu Oligonukleotidnachweisen mit verbesserter Leistung führen kann [3]. Graphen selbst kann jedoch aufgrund einiger inhärenter Nachteile wie Hydrophobie, Null-Bandlücke und chemischer Stabilität nicht direkt für den DNA-Nachweis verwendet werden, so dass es modifiziert werden muss, um Verwendung finden zu können.

Zu diesem Zweck wurde Graphenoxid mit Hilfe einer neuartigen Methode unter Verwendung von 5,6-Epoxyhexyltriethoxysilan (EHTES) als Silanisierungsmittel erfolgreich funktionalisiert. Silane werden häufig als Vernetzungsreagenzien für die Immobilisierung von Biomolekülen auf Oxidoberflächen verwendet. Anschließend wurde eine kommerzielle Graphit-Siebdruckelektrode mit dem silanisiertem Graphenoxid beschichtet, so dass jetzt aminomodifizierte ss-DNA-Sondenmoleküle über eine starke kovalente Bindung direkt auf die Epoxid-Terminierung zu angebunden werden können. Anschließend wurde die zum Sondenmolekül komplementäre miRNA mit Hilfe der elektrochemischen Impedanzspektroskopie (EIS) und der Differentialpulsvoltammetrie (DPV) nachgewiesen. Der Biosensor zeigte eine hohe sub-nanomolare Empfindlichkeit und auch eine große Spezifität, die in der Lage ist, zwischen komplementärer Ziel-miRNA und nicht-komplementärer miRNA zu unterscheiden. Folglich kann das entwickelte Assay als vielversprechende tragbare Plattform für eine schnelle, empfindliche und spezifische markierungsfreie mi-RNA Detektion z.B. für die Krebsfrüherkennung verwendet werden. Das grundlegende Funktionsprinzip des elektrochemischen DNA-Biosensors ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abb. 1:** Illustration eines markierungsfreien elektrochemischen Biosensors zum Nachweis von miRNA-122 auf der Grundlage einer mit ss-DNA modifizierten silanisierten Graphenoxid-Siebdruckelektrode

## Methoden und Materialien

### Silanisierung von Graphenoxid

In einer typischen Reaktion wurden 40 mg GO in einen Dreihalskolben mit 240 ml Toluol gegeben und 30 Minuten lang mit Ultraschall (im Wasserbad) dispergiert. Danach wurden etwa 5 ml EHTES tropfenweise in die Mischung gegeben. Dann wurde 12 Stunden lang bei 100°C unter Stickstoffatmosphäre gerührt, um die Silanisierung durchzuführen. Das umgesetzte GO wurde 2 bis 3 Mal mit Toluol und 4 bis 5 Mal mit Ethanol gewaschen und anschließend 24 Stunden lang im Vakuumofen bei 60 °C getrocknet. Das so erhaltene funktionalisierte GO-Material wird als S-GO bezeichnet.

### Elektrodenvorbereitung

1 mg S-GO wurde in 1 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst und 10 Minuten lang im Ultraschallbad suspendiert. 1,5 µl der Suspension von S-GO wurde auf die gereinigte Oberfläche der siebgedruckten Elektroden (SPE) getropft und bei Raumtemperatur getrocknet. Die resultierende funktionalisierte Siebdruckelektrode wird als S-GO/SPE bezeichnet.

Für die Immobilisierung einer inosinmodifizierter ss-DNA (CAAA CAC CAT TIT CAC ACT CCA), die am 3'-Ende mit einem C6-Aminolinker (Eurofins) versehen wurde, wurde eine 30 µM-Lösung der Probe-DNA (1 µM) auf die S-GO/SPE-Oberfläche aufgebracht und 4 Stunden im Kühlschrank reagieren gelassen. Anschließend wurde die Elektrode 1 Minute lang mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, um alle nicht gebundenen ss-DNA-Sonden zu entfernen.

Für die Hybridisierung mit dem komplementären Target (UGG AGU GUG ACA AUG GUG UUUG) und dem nicht komplementären miRNA-Let-7-a-Target (UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGUU) mit ss-DNA/S-GO/SPE wurde die Elektrode in 1,0x Saline Natriumcitrat (SSC)-Puffer mit 1 µM miRNA-122 90 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert (miRNA-122/ssDNA/S-GO/SPE). Anschließend

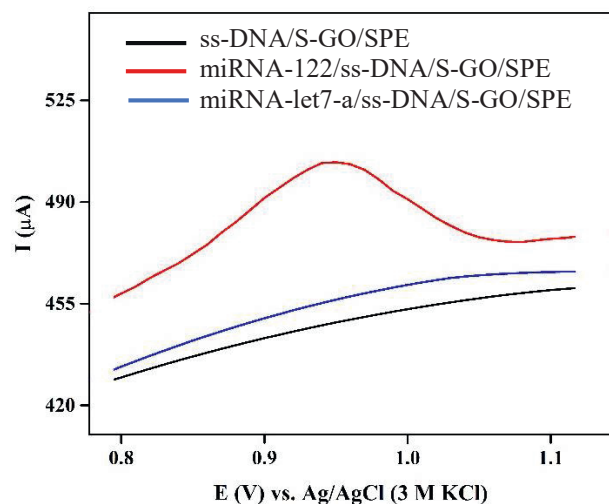
wurde die Elektrode 1 Minute lang in 0,1x SSC-Puffer gewaschen, um unspezifische Bindungen zu entfernen, und anschließend wurden die impedimetrischen Messungen durchgeführt [19]. Das gleiche Verfahren wurde für die nicht-komplementäre Sequenz angewandt.

Der Guanin-Oxidationsstrom wurde mittels in 0,1 M PBS (pH 7,4) mit dem PalmSense4 Potentiostat/Galvanostat gemessen.

Impedimetrische Messungen wurden in Gegenwart von 0,1 M KCl mit 2,5 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$  und 2,5 mM  $K_4[Fe(CN)_6]$  (1:1) als Redox-Sonde durchgeführt. Die Impedanz wurde im Frequenzbereich von 100 mHz bis 100 kHz bei einem Potential von +0,24 V mit einem sinusförmigen Signal von 5 mV gemessen. Das Frequenzintervall wurde in 78 logarithmisch äquidistante Messpunkte unterteilt. Die Randles-Schaltung wurde als Ersatzschaltungsmodell für die Anpassung der Impedanzdaten verwendet. Die Elemente der Randles-Schaltung wurden mit dem Anpassungsprogramm PSTrace 5.8 berechnet. Sie setzen sich aus dem Lösungswiderstand ( $R_s$ ), der Kapazität ( $Q$ ), dem Ladungstransferwiderstand ( $R_{ct}$ ) und der Warburg-Impedanz ( $W$ ) zusammen. Der jeweilige Halbkreisdurchmesser entspricht dem Ladungstransferwiderstand  $R_{ct}$ .

## Ergebnisse

Abbildung 2 zeigt die elektrochemische Reaktion von ss-DNA/S-GO/SPE, miRNA-122/ss-DNA/S-GO/SPE und miRNA-Let7-a/ss-DNA/S-GO/SPE in 0,1 M PBS pH 7,4 und einer Scanrate von 0,5  $vs^{-1}$ .

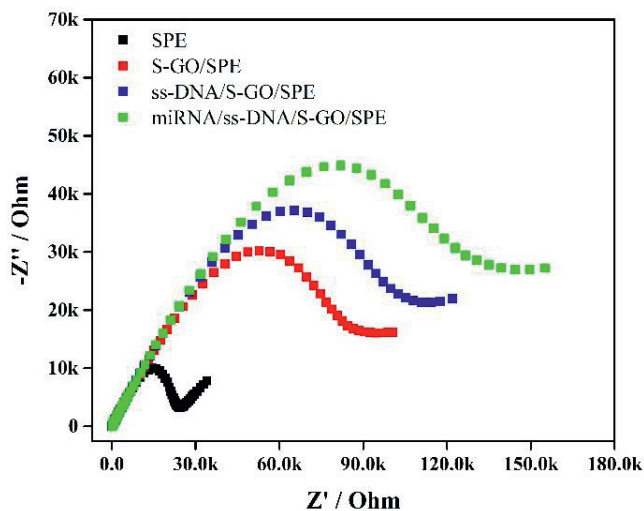


**Abb 2:** DPVs von ss-DNA/S-GO/SPE, miRNA-122/ss-DNA/S-GO/SPE und miRNA-let7-a/ss-DNA/S-GO/SPE in PBS 0,1 M pH 7,4. Scanrate: 50 mv/s

Im Vergleich zu anderen elektrochemischen Methoden kann die elektrochemische EIS mehr Informationen über die Grenzflächeneigenschaften von oberflächenmodifizierten Elektroden liefern [21]. Das Impedanzspektrum besteht aus zwei Teilen, der erste Teil

ist ein Halbkreis, der bei höheren Frequenzen aufgezeichnet wird und dem Elektronentransfer entspricht, der zweite Teil ist linear und wird bei niedrigen Frequenzen aufgezeichnet, was auf den Diffusions- und Begrenzungsschritt des elektrochemischen Prozesses zurückzuführen ist. Der Halbkreisdurchmesser entspricht dem  $R_{ct}$  und kann für die Oberflächencharakterisierung der Elektrode verwendet werden; sein zunehmender Wert zeigt die Immobilisierung von isolierenden Molekülen auf der Elektrodenoberfläche an.

Abbildung 3 zeigt die Nyquist-Diagramme, die nach jedem Schritt bei der Konstruktion des Biosensors (SPE, S-GO/SPE, ss-DNA/S-GO/SPE und miRNA/ss-DNA/S-GO/SPE) erhalten wurden.



**Abb 3:** Nyquist-Plots während der Herstellung der Biosensorschicht und nach der Hybridisierung mit  $1 \mu\text{M}$  miRNA-21. Redox-Marker:  $2.5 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  mit  $0,1 \text{ M KCl}$ ; Frequenzbereich:  $10 \text{ KHz}$  bis  $10 \text{ mHz}$ ; Potentialamplitude:  $5 \text{ mV}$ ; Arbeitspotential:  $0,24 \text{ V}$

## Diskussion

In Abb. 2 zeigt Ss-DNA/S-GO/SPE keinen spezifischen Spitzenstrom. Nach der Hybridisierung mit miRNA-122 erschien der Spitzenstrom bei  $0,95 \text{ v}$ , was auf die Oxidation von Guanin auf miRNA-122/ss-DNA/S-GO/SPE zurückzuführen ist und die erfolgreiche Herstellung des Biosensors beweist [20]. Die Selektivität des vorgeschlagenen miRNA-Biosensors wurde durch eine Vergleichsstudie mit der nicht komplementären ZielmikroRNA-let7-a. MicroRNA-let7-a/ssDNA/S-GO/SPE zeigte keinen signifikanten Spitzenstrom in  $0,1 \text{ M PBS pH } 7$ . Dieses Ergebnis zeigt, dass der vorgeschlagene Biosensor selektiv für die Unterscheidung der komplementären miRNA-122 von anderen unspezifischen Sequenzen ist. Außerdem konnten unspezifische Sequenzen die genaue Bestimmung von miRNA-122 in realen Proben nicht beeinflussen.

Wie in Abbildung 3 gezeigt führte die Einführung von S-GO in SPE führte aufgrund der blockierenden Wirkung der Sauerstoffgruppen und der elektrostatischen Abstoßung mit dem Redoxmarker zu der erwarteten Erhöhung von  $R_{ct}$ .

Sobald das DNA-Sondenmolekül an S-GO/SPE immobilisiert ist, erhöht sich  $R_{ct}$  aufgrund der blockierenden Wirkung der nichtleitenden Nukleinsäureschicht und der elektrostatischen Abstoßung des Redox-Markers mit dem negativ geladenen Ribose-Phosphat-Grundgerüst der DNA. Bei der Hybridisierung mit  $1 \mu\text{M}$  miRNA-122 kommt es zu einem erheblichen Anstieg von  $R_{ct}$  aufgrund der Zunahme der elektrostatischen Abstoßung zwischen der Redox-Sonde und der höheren negativen Ladungsdichte als Folge der Oberflächen-Heteroduplexbildung [22].

Zusammenfassend wurde ein chemisches GO-Silanisierungsprotokoll vorgestellt, das einfach zu handhaben und kostengünstig ist und eine Massenproduktion ermöglicht. Außerdem wurde ein elektrochemischer Sensor zum Nachweis von miRNA entwickelt. In diesem Zusammenhang wurde ein aminierte ss-DNA-Sondenmolekül auf der Oberfläche einer mit S-GO modifizierten SPE immobilisiert. Die differentielle Pulsvoltammetrie (DPV)-Technik wurde als erfolgreiche Analysemethode zum Nachweis der Guanin-Oxidation infolge der Bildung eines Hybrids zwischen der miRNA und ihrer Inosin-Ersatz-Fangsonde verwendet, die auf der Oberfläche der ss-DNA/S-GO/SPE immobilisiert ist. Außerdem wurde eine zerstörungsfreie EIS-Technik entwickelt, die qualitativ hochwertige Daten auf der Grundlage des Elektronentransfers an der Biosensoroberfläche liefert und als zuverlässige Plattform für den miRNA-Nachweis mit hoher Selektivität und Empfindlichkeit eingesetzt wird.

## Literatur

- [1] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A.: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 68 (2018), Nr. 6, S. 394–424.
- [2] Strimbu, K.; Tavel, J. A.: What are biomarkers? In: *Current opinion in HIV and AIDS* 5 (2010), Nr. 6, S. 463–466.
- [3] Wu, X.; Mu, F.; Wang, Y.; Zhao, H.: Graphene and Graphene-Based Nanomaterials for DNA Detection: A Review. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (2018), Nr. 8.
- [4] Gong, J.; He, X.-X.; Tian, D.-A.: Emerging role of microRNA in hepatocellular carcinoma (Review). In: *Oncology letters* 9 (2015), Nr. 3, S. 1027–1033.
- [5] Bartel, D. P.: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. In: *Cell* 136 (2009), Nr. 2, S. 215–233.
- [6] Peng, Y.; Croce, C. M.: The role of MicroRNAs in human cancer. In: *Signal Transduction and Targeted Therapy* 1 (2016), Nr. 1, S. 15004.
- [7] Torres, A. G.; Fabani, M. M.; Vigorito, E.; Gait, M. J.: MicroRNA fate upon targeting with anti-miRNA oligonucleotides as revealed by an improved Northern-blot-based method for miRNA detection. In: *RNA (New York, N.Y.)* 17 (2011), Nr. 5, S. 933–943.

- [8] Luo, X.; Shen, S.; Yi, S.; Hu, J.; Sun, Y.; Gao, K.; Zhu, L.: Screening of differentially expressed miRNAs in tensile strain-treated HepG2 cells by miRNA microarray analysis. In: *Molecular medicine reports* 21 (2020), Nr. 6, S. 2415–2426.
- [9] Jung, S.; Kim, W. J.; Kim, B. K.; Kim, J.; Kim, M. J.; Kim, K. P.; Kim, S. K.: In-particle stem-loop RT-qPCR for specific and multiplex microRNA profiling. In: *Biosensors & bioelectronics* 163 (2020), S. 112301.
- [10] Rafiee-Pour, H.-A.; Behpour, M.; Keshavarz, M.: A novel label-free electrochemical miRNA biosensor using methylene blue as redox indicator: application to breast cancer biomarker miRNA-21. In: *Biosensors & bioelectronics* 77 (2016), S. 202–207.
- [11] Mujica, M. L.; Gallay, P. A.; Perrachione, F.; Montemerlo, A. E.; Tamborelli, L. A.; Vaschetti, V. M.; Reartes, D. F.; Bollo, S.; Rodríguez, M. C.; Dalmasso, P. R.; Rubianes, M. D.; Rivas, G. A.: New trends in the development of electrochemical biosensors for the quantification of microRNAs. In: *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 189 (2020), S. 113478.
- [12] Dai, Y.; Han, B.; Dong, L.; Zhao, J.; Cao, Y.: Recent advances in nanomaterial-enhanced biosensing methods for hepatocellular carcinoma diagnosis. In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 130 (2020), S. 115965.
- [13] Bartosik, M.; Jirakova, L.: Electrochemical analysis of nucleic acids as potential cancer biomarkers. In: *Current Opinion in Electrochemistry* 14 (2019), S. 96–103.
- [14] Rashid, J. I. A.; Yusof, N. A.: The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review. In: *Sensing and Bio-Sensing Research* 16 (2017), S. 19–31.
- [15] Hai, X.; Li, Y.; Zhu, Ch.; Song, W.; Cao, J.; Bi, S.: DNA-based label-free electrochemical biosensors: From principles to applications. In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 133 (2020), S. 116098.
- [16] Falahi, S.; Rafiee-Pour, H.-A.; Zarejousheghani, M.; Rahimi, P.; Joseph, Y.: Non-Coding RNA-Based Biosensors for Early Detection of Liver Cancer. In: *Biomedicines* 9 (2021), Nr. 8.
- [17] El A., M.; Yammouri, G.; Mohammadi, H.; Amine, A.; Korri-Youssoufi, H.: Electrochemical Biosensors for Detection of MicroRNA as a Cancer Biomarker: Pros and Cons. In: *Biosensors* 10 (2020), Nr. 11.
- [18] Fritea, L.; Banica, F.; Costea, T. O.; Moldovan, L.; Dobjanschi, L.; Muresan, M.; Cavalu, S.: Metal Nanoparticles and Carbon-Based Nanomaterials for Improved Performances of Electrochemical (Bio)Sensors with Biomedical Applications. In: *Materials* 14 (2021), Nr. 21, S. 6319.
- [19] Suni, I. I.: Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27 (2008), Nr. 7, S. 604–611.
- [20] Lusi, E. A.; Passamano, M.; Guarascio, P.; Scarpa, A.; Schiavo, L.: Innovative electrochemical approach for an early detection of microRNAs. In: *Analytical chemistry* 81 (2009), Nr. 7, S. 2819–2822.
- [21] Canali, Ch.; Larsen, L. B.; Martinsen, Ø. G.; Heiskanen, A.: Conductometric analysis in bio-applications: A universal impedance spectroscopy-based approach using modified electrodes. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 212 (2015), S. 544–550.
- [22] López M., M.; Zhang, Y.; Gutierrez, F.; Bédioui, F.; Rivas, G.: Non-amplified impedimetric genosensor for quantification of miRNA-21 based on the use of reduced graphene oxide modified with chitosan. In: *Microchemical Journal* 160 (2021), S. 105596.