

mgr inż. Agnieszka Bala

Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny

Zakład Mikrobioanalitiky

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Analogi kwasów nukleinowych jako warstwy receptorowe sensorów elektrochemicznych

Promotor: dr hab. inż. Łukasz Górski

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej, zaprezentowanej jako zbiór pięciu tematycznie spójnych publikacji, było zbadanie możliwości zastosowania analogów kwasów nukleinowych jako warstw receptorowych sensorów elektrochemicznych. Wśród analogów kwasów nukleinowych wyróżnić można m.in. PNA (ang. peptide nucleic acid) oraz PTO (ang. phosphorothioate oligonucleotide). Związki te wykazują zdolność do hybrydyzacji z nicią komplementarną, a dzięki odporności na działanie enzymów restrykcyjnych, możliwe jest ich zastosowanie w pomiarach *in vivo*. Co więcej, odmienna budowa m.in. szkieletu stanowiącego trzon łańcucha, może wpływać na selektywność oddziaływań pomiędzy warstwą receptorową zawierającą nici analogów kwasów nukleinowych a analitami np. jonami metali.

Pierwszy projekt dotyczył zastosowania PTO jako warstwy receptorowej w elektrochemicznym sensorze do oznaczania jonów uranylowych. Dzięki obecności siarki w łańcuchu PTO, możliwe było bezpośrednie dowiązanie PTO do powierzchni złota, bez konieczności dodatkowej modyfikacji. Oddziaływanie pomiędzy warstwą receptorową a UO_2^{2+} było analizowane z użyciem technik woltamperometrycznych oraz elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej. Wykonano również badania mające na celu charakteryzację powierzchni złota – niemodyfikowanego oraz modyfikowanego DNA-SH lub PTO – z użyciem mikroskopii sił atomowych. Przeprowadzone badania dowiodły, że zaprojektowany sensor cechuje się wysoką selektywnością na jony UO_2^{2+} i umożliwia ich oznaczenie na niskim poziomie stężeń.

Celem kolejnego projektu była konstrukcja sensora selektywnego na jony rtęci, z PTO jako warstwą receptorową, i ocena wpływu obecności atomów siarki na selektywność

oznaczeń. Przeprowadzone badania potwierdziły postulowane oddziaływanie Hg^{2+} z PTO jako warstwą receptorową. Dodatkowo sprawdzono wpływ pH roztworu pomiarowego oraz obecności zasad tyminowych w nici PTO na odpowiedź elektrod. Przeprowadzone badania jednoznacznie wskazują, że obecność siarki w łańcuchu PTO przyczynia się do selektywnego wiązania Hg^{2+} a zaprojektowany sensor pozwala na oznaczenie Hg^{2+} w próbce rzeczywistej.

Zadowolające wyniki badań stały się inspiracją do konstrukcji sensora z PNA jako warstwą receptorową do oznaczania jonów rtęci. Podstawą założenia, że warstwa receptorowa złożona z nici PNA – zawierających ugrupowania peptydowe – jest w stanie związać jony Hg^{2+} , były doniesienia literaturowe o oddziaływaniu pomiędzy jonami metali a peptydami. Przeprowadzone pomiary spektrofotometryczne dowiodły słuszności tych założeń. Również pomiary z użyciem technik woltamperometrycznych oraz elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej potwierdziły oddziaływanie pomiędzy Hg^{2+} a ugrupowaniami peptydowymi z łańcucha PNA. Zaprojektowany sensor pozwolił na selektywne oznaczenie Hg^{2+} na niskim poziomie stężeń, również w certyfikowany materiale odniesienia.

Kolejny projekt był kontynuacją prac nad zastosowaniem PNA jako warstwy receptorowej do oznaczania jonów Hg^{2+} . Celem prowadzonych prac była ocena wpływu sekwencji zasad w łańcuchu PNA i możliwość tworzenia kompleksów tymina – Hg^{2+} – tymina na odpowiedź elektrod. Wykonano szereg pomiarów mających na celu dobór znacznika, którego zastosowanie pozwoliło na uzyskanie jak największych zmian sygnału prądowego, co bezpośrednio przełożyło się na parametry pracy zaprojektowanego sensora. Co więcej, okazało się, że obecność ugrupowań peptydowych wpływa na poprawę selektywności oznaczeń a zaprojektowany sensor pozwala na oznaczenie Hg^{2+} na niskim poziomie stężeń.

Ostatni z projektów dotyczył zastosowania PNA jako warstwy receptorowej w sensorze hybrydyzacji umożliwiającym oznaczenie mutacji w genie (sekwencji DNA). Wykonano szereg badań mających na celu optymalizację procedury pomiarowej m.in. składu warstwy receptorowej oraz czasu inkubacji elektrod w roztworze znacznika. Przeprowadzono również badania mające na celu dobranie odpowiedniego znacznika elektroaktywnego, umożliwiającego rejestrowanie zmian zachodzących w warstwie receptorowej. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że hybrydyzacja z nicią komplementarną skutkuje wysoką zmianą rejestrowanego sygnału, podczas gdy obecność niekomplementarnej pary zasad wpływa na niską zmianę rejestrowanego sygnału prądowego. Zaprojektowany sensor umożliwił oznaczenie sekwencji powodującej anemię sierpowatą i rozróżnienie jej od sekwencji prawidłowej hemoglobiny.

Przeprowadzone badania dowiodły, że analogi kwasów nukleinowych z powodzeniem mogą zostać zastosowane w sensorze do oznaczania nie tylko sekwencji DNA lecz również jonów metali. Okazało się, że zarówno sekwencja zasad jak i zmodyfikowany łańcuch DNA, wpływają na selektywność oznaczeń a rodzaj znacznika elektroaktywnego jest istotny z uwagi na parametry pracy zaprojektowanego sensora.

Słowa kluczowe: biosensory, analogi kwasów nukleinowych, woltamperometria