

## Autoreferat

1. Imię i Nazwisko: Łukasz Górski

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- (1996 - 2001) studia magisterskie; praca magisterska pt: „Potencjometryczne i spektrofotometryczne badania kompleksów porfiryn z jonami metali na czwartym stopniu utlenienia”, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej

- (2001 - 2006) studia doktoranckie; praca doktorska pt: „Badania kompleksów cyrkonu jako jonoforów membran jonoselektywnych”, obrona 10 kwietnia 2006, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- (od października 2006) adiunkt, Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Jednotematyczny cykl publikacji pt.:

**„Elektrochemiczne biosensory z warstwami receptorowymi zawierającymi DNA”**

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa).

- [H1] **R. Ziółkowski, M. Jarczewska, Ł. Górski\*, E. Malinowska, Oligonucleotide-based electrochemical biosensor for Hg<sup>2+</sup> using methylene blue as a redox indicator, Journal of the Electrochemical Society, 160 (2013) B152**

Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentu, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu części tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określiam na **60%**

IF<sub>2013</sub>= 2,859

CI= 0

- [H2] **M. Jarczewska, E. Kierzkowska, R. Ziółkowski, Ł. Górski\*, E. Malinowska, Electrochemical oligonucleotide – based biosensor for the determination of lead ion, Bioelectrochemistry, 101 (2015) 35**

Mój udział w tej pracy polegał na wiodącym udziale w stworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentu, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu części tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określiam na **35%**

IF<sub>2014</sub>= 4,172 (brak danych o IF<sub>2015</sub>)

CI= 6

- [H3] **A. Bala, M. Pietrzak, Ł. Górski\*, E. Malinowska, Electrochemical determination of lead ion with DNA oligonucleotide-based biosensor using anionic redox marker, Electrochimica Acta, 180 (2015) 763**

Mój udział w tej pracy polegał na wiodącym udziale w stworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentu, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu części tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określiam na **60%**

IF<sub>2014</sub>= 4,504 (brak danych o IF<sub>2015</sub>)

CI= 0

- [H4] **M. Jarczewska, Ł. Górski\*, E. Malinowska, Application of DNA aptamers as sensing layers for electrochemical detection of potassium ions, Sensors and Actuators B, 226 (2016) 37**

Mój udział w tej pracy polegał na wiodącym udziale w opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentu, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu części tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określiam na **50%**

IF<sub>2014</sub>= 4,097 (brak danych o IF<sub>2016</sub>)

CI= 0

- [H5] **R. Ziółkowski, Ł. Górski\*, Electrochemical Metal Sensors with DNA Receptor Layers, Current Analytical Chemistry, 10 (2014) 600**

Artykuł przeglądowy. Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: wykonaniu i opracowaniu przeglądu literaturowego oraz przygotowaniu większości manuskryptu.

Mój wkład określiam na **80%**

IF<sub>2014</sub>= 1,132

CI= 0

- [H6] **M. Jarczewska, S.R. Sheelam, R. Ziółkowski, Ł. Górski\*, A label - free electrochemical DNA aptasensor for the detection of dopamine, Journal of The Electrochemical Society, 163, (2016) B26**

Mój udział w tej pracy polegał na wiodącym udziale w opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentu, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu części tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określiam na **40%**

**IF<sub>2014</sub>= 3,266** (brak danych o IF<sub>2016</sub>)

**CI= 0**

- [H7] **M. Jarczewska, R. Ziółkowski, Ł. Górski\*, E. Malinowska, Electrochemical detection of chromium(VI): Induced DNA damage, Journal of the Electrochemical Society, 162 (2015) B326**

Mój udział w tej pracy polegał na wiodącym udziale w opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentu, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu części tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określiam na **40%**

**IF<sub>2014</sub>= 3,266** (brak danych o IF<sub>2015</sub>)

**CI= 0**

- [H8] **J. Zajda, Ł. Górski\*, E. Malinowska, Electrochemical Biosensor Modified with dsDNA Monolayer for Restriction Enzyme Activity Determination, Bioelectrochemistry, 109 (2016) 63**

Mój udział w tej pracy polegał na wiodącym udziale w opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu eksperymentu, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu części tekstu manuskryptu oraz korespondencji z edytorem.

Mój wkład określiam na **60%**

**IF<sub>2014</sub>= 4,172** (brak danych o IF<sub>2016</sub>)

**CI= 0**

**Sumaryczny impact factor jednotematycznego cyklu publikacji wchodzącego w skład rozprawy habilitacyjnej według listy Journal Citation Reports, zgodnie z rokiem opublikowania: 27,468. We wszystkich artykułach z tego cyklu jestem autorem korespondencyjnym.**

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Obserwowany w ostatnich latach intensywny wzrost liczby publikacji dotyczących sensorów chemicznych jest z jednej strony odpowiedzią na zapotrzebowanie na niewielkie urządzenia analityczne, przekształcające informację chemiczną (np. stężenie) na sygnał analityczny. Z drugiej strony rozwój sensorów jest możliwy dzięki dostępności nowoczesnych materiałów, które zastosowane w umiejętny sposób prowadzą do poprawy parametrów pracy konstruowanych urządzeń. Szczególnie ciekawą grupą tych urządzeń są sensory elektrochemiczne, z uwagi na prostotę konstrukcji, niski koszt oraz korzystne parametry analityczne, w tym znaczną selektywność oraz niskie granice oznaczalności, możliwe do osiągnięcia przy zastosowaniu niektórych technik.

Bardzo efektywną metodą poprawy parametrów pracy sensorów chemicznych, a w głównej mierze ich selektywności, jest zastosowanie w warstwie receptorowej składników pochodzenia biologicznego. Urządzenia takie można podzielić na biosensory katalityczne, wykorzystujące enzymy lub komórki, oraz biosensory powinowactwa, z przeciwciałami lub kwasami nukleinowymi w warstwie receptorowej. Dzięki wykorzystaniu oddziaływań występujących w naturze, możliwe jest osiągnięcie selektywności sensorów niedostępnej przy wykorzystaniu receptorów projektowanych i wytworzonych przez człowieka.

Szczególnie ciekawą grupą biosensorów są sensory DNA, służące najczęściej do określania sekwencji nukleotydowej badanej nici DNA, co jest szczególnie istotne w diagnostyce chorób nowotworowych i genetycznych, określaniu rodzaju patogenu wywołującego chorobę, a także w śledzeniu żywności modyfikowanej genetycznie. Bardziej niekonwencjonalnym, rozwijanym od niedawna zastosowaniem biosensorów DNA jest oznaczanie innych analitów, takich jak np. jony metali ciężkich. Znaczna część sensorów DNA wykorzystuje przetworniki optyczne, jednakże coraz popularniejsze stają się elektrochemiczne techniki detekcji, głównie z uwagi na niskie granice oznaczalności, łatwość miniaturyzacji a także niskie koszty aparatury. Pomimo dużej skali badań prowadzonych nad rozwojem biosensorów, ciągle istnieje potrzeba rozwoju i opracowania urządzeń przeznaczonych do oznaczania ważnych analitów.

Celem moich badań, których wyniki zaprezentowałem w cyklu prac wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej pt. „**Elektrochemiczne biosensory z warstwami receptorowymi zawierającymi DNA**”, było opracowanie nowych biosensorów z warstwami DNA, znacznie poszerzające spektrum ich możliwości aplikacyjnych. Przedstawione prace obejmują badania dotyczące trzech głównych nurtów:

1. Oznaczanie jonów metali z zastosowaniem warstw receptorowych DNA [H1 – H5].
2. Zastosowanie aptamerów do modyfikacji elektrod [H2 – H5].
3. Warstwy DNA ulegające degradacji podczas analizy [H7 – H8].

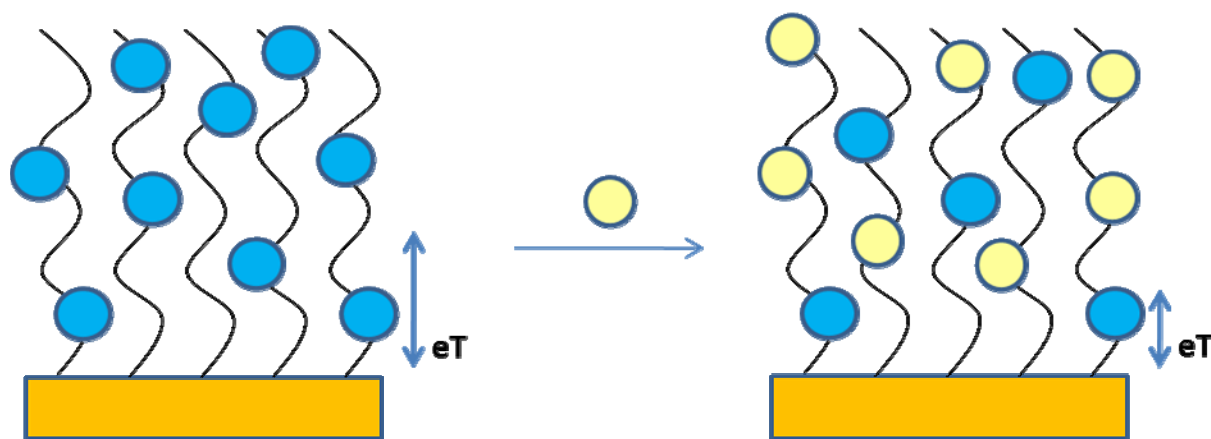
Selektywność to bardzo istotny parametr sensorów chemicznych, umożliwiający oznaczanie analitu nawet w próbkach o skomplikowanych matrycach, przy znacznym nadmiarze substancji przeszkadzających w stosunku do stężenia substancji oznaczanej. O selektywności sensorów chemicznych decyduje warstwa receptorowa, bezpośrednio kontaktująca się z próbką i oddziałująca z jej składnikami. Sensory DNA są w zdecydowanej większości przeznaczone do wykrywania w próbce sekwencji komplementarnych. Proces hybrydyzacji, który zachodzi w warstwie receptorowej sensora, zapewnia bardzo wysoką selektywność rozpoznania sekwencji komplementarnej wśród wielu różnych fragmentów DNA, obecnych w próbce.

Bardzo ciekawym kierunkiem badań, rozwijanym w ostatnich latach, są funkcjonalne kwasy nukleinowe. Tematyka ta obejmuje zastosowania DNA i RNA w nowych rolach, m.in.

jako receptory (aptamery) lub jako katalizatory (DNAzymy). Aptamery to krótkie fragmenty DNA lub RNA, które mają zdolność do oddziaływania z różnymi cząstkami organicznymi lub nieorganicznymi. Wynika to zarówno z obecności w strukturze kwasów nukleinowych atomów donorowych, jak i ze zdolności aptamerów do przyjmowania w przestrzeni określonego kształtu, zdefiniowanego przez sekwencję oligonukleotydu.

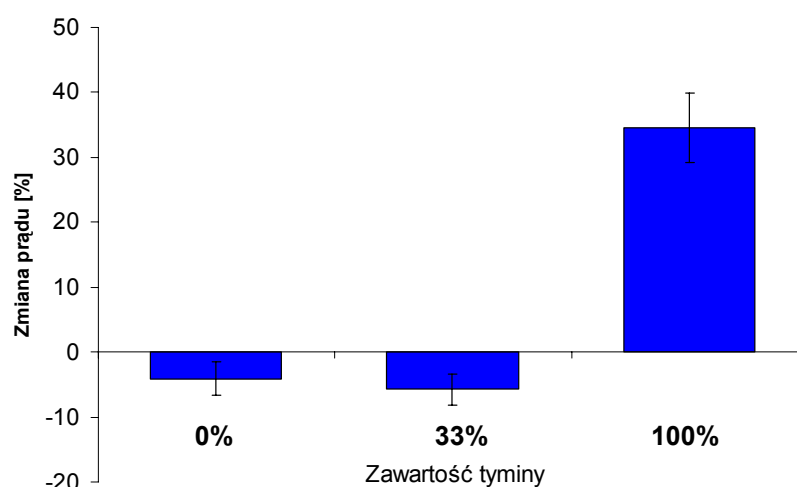
Kwasy nukleinowe mogą więc pełnić rolę receptorów, a jedną z grup analitów, które mogą być oznaczane z ich zastosowaniem, są jony metali. Tematyka ta, jako nowa i bardzo ciekawa, zainteresowała mnie, postanowiłem więc zająć się badaniami nad elektrodami modyfikowanymi DNA, przeznaczonymi do oznaczania jonów metali ciężkich.

Istotną kwestią w opracowaniu elektrochemicznego sensora DNA jest zawsze sposób generowania sygnału prądowego. Możliwe jest wykorzystanie właściwości redox zasad azotowych (najczęściej guaniny), redukcji lub utlenianiu może ulegać analit związany z warstwą receptorową, lub też stosowane mogą być znaczniki redoksaktywne. W przypadku sensorów przeznaczonych do oznaczania jonów metali ciężkich, najbardziej oczywiste wydaje się wykorzystanie ich właściwości redukująco-utleniających. Jednakże w przypadku badanych przeze mnie sensorów elektrochemicznych takie postępowanie nie zawsze jest optymalne. Zbyt skrajne potencjały przykładane do elektrody pracującej modyfikowanej DNA mogą powodować desorpcję warstwy receptorowej, a więc uszkodzenie sensora. Dlatego postanowiłem w swoich badaniach skorzystać ze znacznika redoks – błękitu metylenowego (MB). Zaproponowałem nowatorski sposób uzyskiwania sygnału analitycznego, polegający na pomiarze różnicowym. Schemat takiego pomiaru przedstawiono na Rys. 1. W pierwszym etapie mierzony jest prąd dla elektrody modyfikowanej oligonukleotydem, zanurzonej w odpowiednim elektrolicie zawierającym MB. Następnie elektroda jest zanurzana w próbce zawierającej oznaczany jon oraz MB. Jony metali silnie oddziałujące z oligonukleotydem wypierają część cząsteczek błękitu z warstwy receptorowej, a więc prąd pochodzący od MB mierzony po ustaleniu się równowagi jest niższy. Jest to związane z dodatnim ładunkiem zarówno kationów metali, jak i błękitu metylenowego. Sygnałem analitycznym jest więc zmiana wielkości prądu dla MB, rejestrowanego dla badanego sensora przed i po kontakcie z oznaczanym jonem metalu. Zaletami takiego układu są: możliwość zastosowania znacznika dającego sygnał prądowy przy możliwie niskim potencjale oraz zmniejszenie wpływu niedokładności w przygotowaniu elektrody i immobilizacji DNA na powtarzalność wyników z uwagi na różnicowy charakter pomiaru. Wadą tego układu jest brak możliwości wykorzystania potencjału przyłożonego do elektrody do poprawy selektywności analizy, a więc jedynym czynnikiem decydującym o selektywności pozostaje oddziaływanie warstwy receptorowej ze składnikami próbki.



Rys. 1. Schemat różnicowego pomiaru sygnału analitycznego, wykorzystywanego w niniejszej pracy. Kolor niebieski – znacznik; kolor żółty – analit.

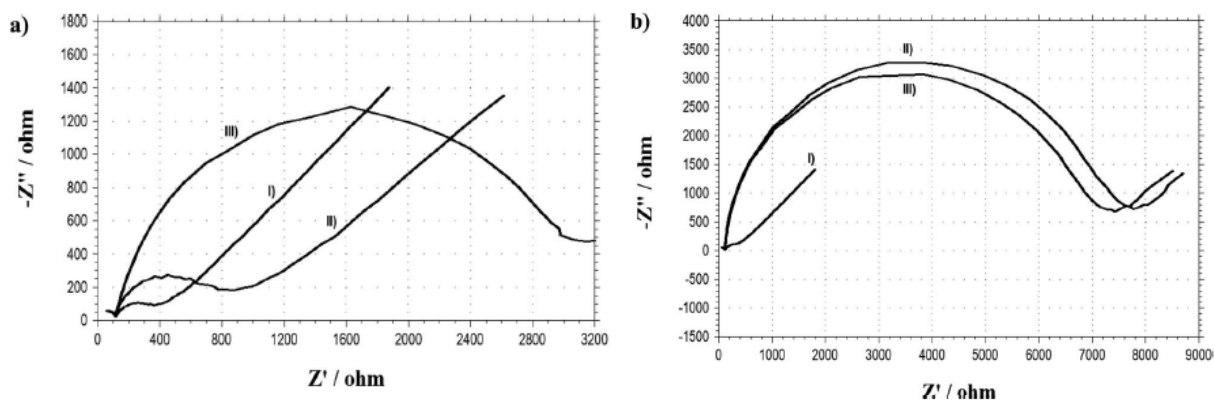
Jonem, którego oddziaływanie z DNA wykorzystałem do konstrukcji sensorów elektrochemicznych, był kation  $Hg^{2+}$ . W literaturze pojawiają się informacje o silnym wiązaniu jonów rtęci między dwiema zasadami tyminowymi. W tym przypadku spodziewałem się więc wpływu sekwencji oligonukleotydu zaimmobilizowanego na elektrodzie na odpowiedź sensora. Istotnie, badania wykazały, że odpowiedź elektrochemiczna na jony rtęci generowana jest tylko w przypadku elektrod modyfikowanych oligonukleotydami składającymi się jedynie z zasad tyminowych. W przypadku zastosowania oligonukleotydów zawierających 33% oraz 0% zasad tyminowych, odpowiedź elektrochemiczna na jony rtęci nie była obserwowana, co widoczne jest na Rys. 2. Elektrody modyfikowane oligonukleotydem 5'-SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-(T)<sub>15</sub>-3' charakteryzowały się bardzo wysoką selektywnością na jony rtęci, wobec badanych jonów przeszkadzających. Jedynie kation uranylowy miał wyraźny wpływ na odpowiedź elektrody, co należy tłumaczyć oddziaływaniem tego jonu z grupami fosforowymi, obecnymi w oligonukleotydach niezależnie od ich sekwencji.



Rys. 2. Odpowiedź na jony  $Hg^{2+}$  zarejestrowana dla elektrod modyfikowanych oligonukleotydami o różnej zawartości zasad tyminowych: 5'-SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>- AAA AAA AAA AAA AAA -3' (0%), 5'-SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>- CGA CTG TGA ATT CGT -3' (33%), 5'-SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>- TTT TTT TTT TTT TTT -3' (100%).

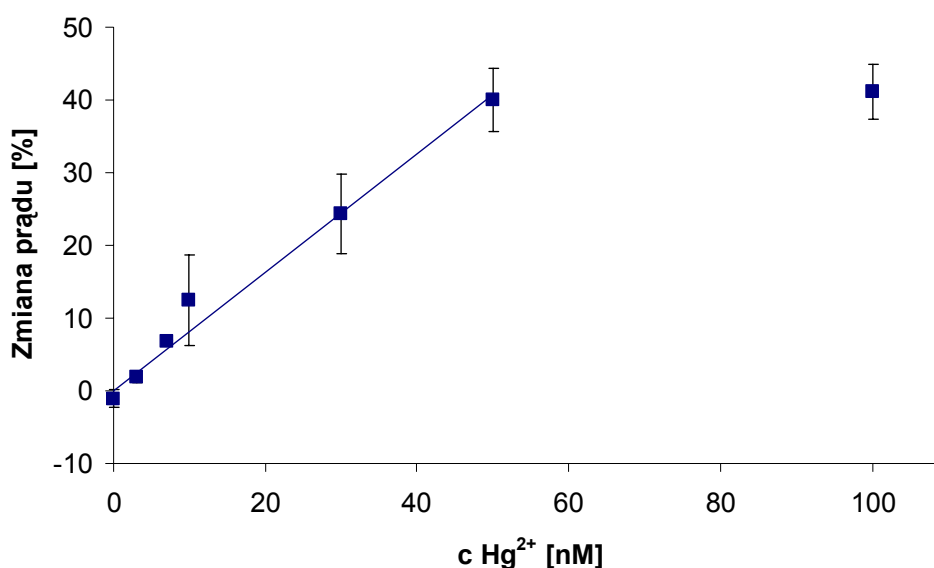
Wykorzystując spektroskopię impedancyjną, sprawdzono celowość wprowadzenia merkptoheksanolu do warstwy receptorowej sensorów przeznaczonych do oznaczania jonów rtęci (Rys. 3). Stwierdzono, że w monowarstwie mieszanej oligonukleotydy są rzadziej upakowane, co może sprzyjać wnikaniu w strukturę monowarstwy jonów  $Hg^{2+}$  i tworzeniu przez nie kompleksu z dwiema zasadami tyminowymi, znajdującymi się w sąsiednich niciach DNA. Ponadto, merkptoheksanol blokuje fragmenty elektrody złotej nie pokryte oligonukleotydami, co zapobiega ewentualnej redukcji jonów rtęci w czasie pomiaru i tworzeniu się amalgamatu złota. Na podstawie powyższych przesłanek, w dalszych badaniach stosowano monowarstwy zbudowane z oligonukleotydu i merkptoheksanolu.

Z uwagi na sposób powstawania sygnału analitycznego w badanych sensorach, polegający na wypieraniu z warstwy receptorowej cząsteczek znacznika (MB) przez jon rtęci, czynnikiem istotnym dla parametrów analitycznych jest stężenie MB w próbce pomiarowej. W związku z tym zmierzono odpowiedź sensora przy stałym stężeniu jonów rtęci i różnych stężeniach błękitu metylenowego. Największy sygnał analityczny zarejestrowano przy stężeniu MB wynoszącym 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  i takie stężenia znacznika stosowano w dalszych badaniach.



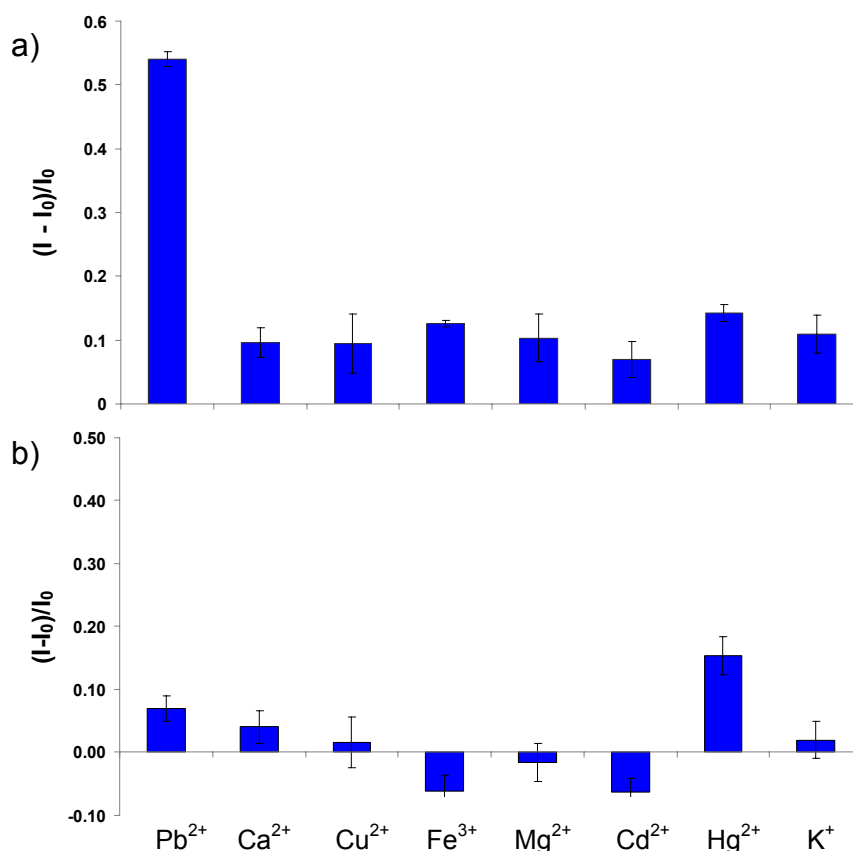
Rys. 3. Wykresy Nyquista dla: a) elektrody modyfikowanej monowarstwą ssDNA; b) elektrody modyfikowanej monowarstwą mieszaną ssDNA/MCH. I) elektroda bez modyfikacji; II) elektroda modyfikowana monowarstwą; III) elektroda modyfikowana monowarstwą po inkubacji w roztworze zawierającym  $5 \mu\text{mol L}^{-1} \text{HgCl}_2$  przez 30 min.

Procesy elektrodowe, prowadzone w warunkach hydrodynamicznych, a więc gdy dominującym sposobem transportu cząsteczek w elektrolicie jest konwekcja wymuszona, charakteryzują się znacznie bardziej wydajną wymianą masy na granicy faz elektroda/elektrolit, niż procesy prowadzone w warunkach stacjonarnych. W związku z tym, wykonano krzywe kalibracji opracowanych sensorów zarówno w warunkach stacjonarnych, jak i dynamicznych (z mieszaniem próbki zawierającej jony rtęci). W warunkach stacjonarnych dolna granica oznaczalności dla jonów rtęci wyniosła  $70,2 \text{ nmol L}^{-1}$ , co jest wartością zbyt wysoką do praktycznych zastosowań sensora. W warunkach hydrodynamicznych zarejestrowano znacznie niższą wartość dolnej granicy oznaczalności, wynoszącą  $4,63 \text{ nmol L}^{-1}$  (Rys. 4). Wartość ta jest niższa niż maksymalne dopuszczalne stężenie jonów rtęci w wodzie pitnej, ustalone przez US Environmental Protection Agency na poziomie  $0,002 \text{ mg L}^{-1}$  (około  $10 \text{ nmol L}^{-1}$ ). Możliwość zastosowania opracowanego sensora do oznaczania rtęci w próbkach rzeczywistych sprawdzono, dokonując analizy certyfikowanego materiału odniesienia. Otrzymany wynik ( $3,51 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) dobrze zgadza się ze stężeniem deklarowanym przez producenta ( $3,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).



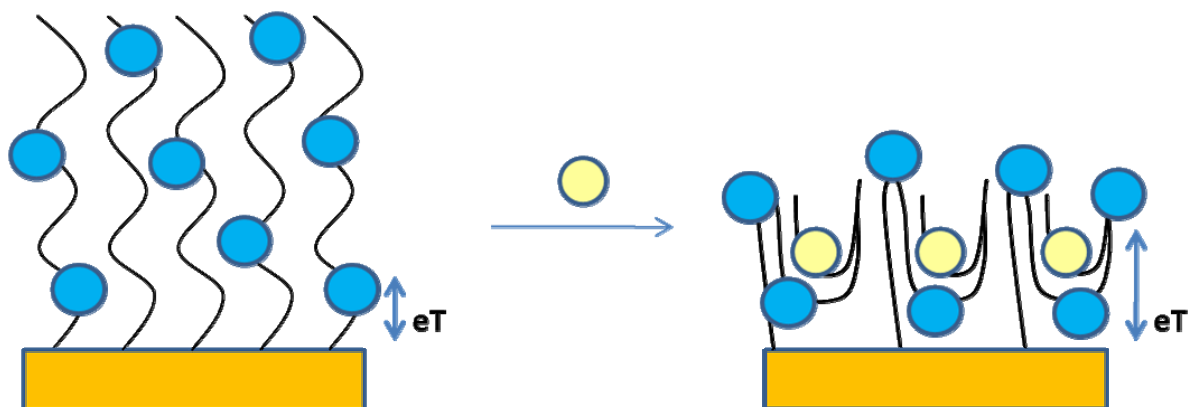
Rys. 4. Krzywa kalibracji na jony rtęci dla elektrody złotej modyfikowanej oligonukleotydem o sekwencji  $5\text{'-SH-(CH}_2\text{)}_6\text{- TTT TTT TTT TTT TTT -3'}$ .

Szczególnie ciekawa wydaje się możliwość oznaczania jonów metali z zastosowaniem aptamerów. W przypadku tej grupy oligonukleotydów, sekwencja zasad jest istotna nie tylko z uwagi na specyficzne oddziaływania zasad z analitem (np. jodem metalu), ale także poprzez wpływ sekwencji na przestrzenny układ nici oligonukleotydu. Aptamery mogą bowiem tworzyć układy przestrzenne, preferujące swym kształtem i wielkością oddziaływanie z określoną cząsteczką. Jedną z najczęściej opisywanych w literaturze sekwencji aptamerowych jest aptamer wiążący trombinę (thrombin binding aptamer – TBA). Najważniejszym elementem strukturalnym tego receptora są dwa równoległe kwartety guaninowe. Z uwagi na opisane w literaturze znaczne powinowactwo jonów ołowiu do zasady guaninowej, ciekawym wydało się sprawdzenie, czy możliwe jest opracowanie sensora elektrochemicznego do oznaczania jonów  $Pb^{2+}$ , wykorzystującego TBA w warstwie receptorowej. Dla porównania prowadzono badania z elektrodami modyfikowanymi oligonukleotydem o takiej samej długości i losowej sekwencji TBAC. Badania elektrochemiczne z zastosowaniem tak przygotowanych elektrod pozwoliły stwierdzić, że sekwencja TBA wykazuje, zgodnie z oczekiwaniem, znaczną selektywność wobec jonów ołowiu, podczas gdy sekwencja losowa daje znikomą odpowiedź na te jony. Wyniki te przedstawiono na Rys. 5. Większe wyeksponowanie zasad guaninowych sprawia, że MB, mając znaczne powinowactwo do guaniny, silniej oddziałuje z aptamerem w konformacji kwadrupleksu niż w układzie liniowym. Mierzalnym efektem takiej sytuacji jest wzrost prądu pochodzącego od błękitu metylenowego, rejestrowany przy wzrastającym stężeniu jonów ołowiu w próbce. W przypadku opisywanych wcześniej sensorów przeznaczonych do oznaczania jonów  $Pb^{2+}$ , wraz ze wzrastającym stężeniem analitu sygnał malał. Przeprowadzone pomiary spektroskopii impedancyjnej wskazują, że struktura przestrzenna aptameru tworzy się dopiero w obecności jonów ołowiu (tzw. dopasowanie indukowane, Rys. 6).



Rys. 5. Selektywność elektrod modyfikowanych oligonukleotydami: a) TBA, b) TBAC.

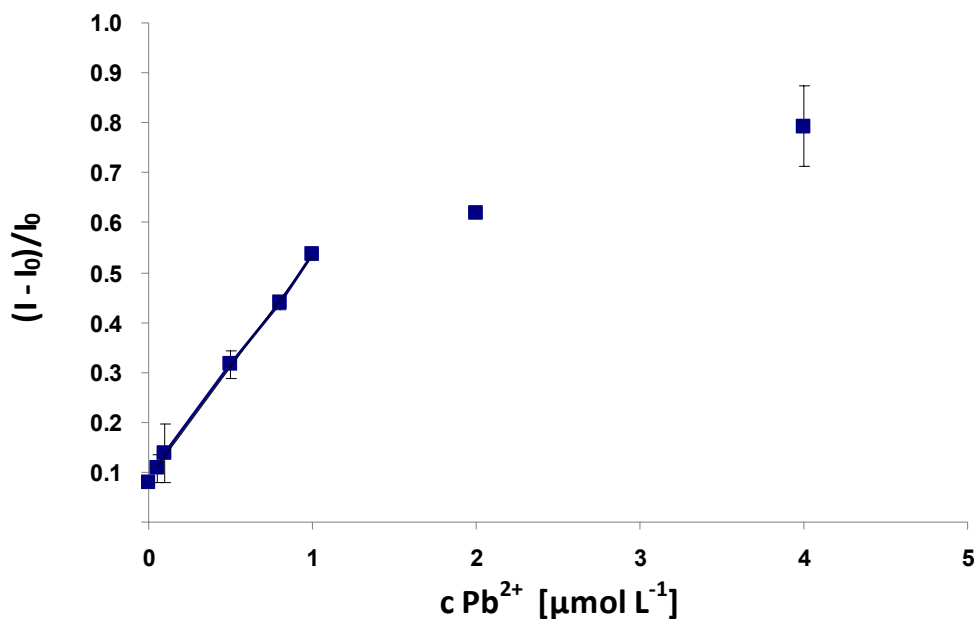




Rys. 6. Schemat działania sensora jonów ołowiu zawierającego aptamer.

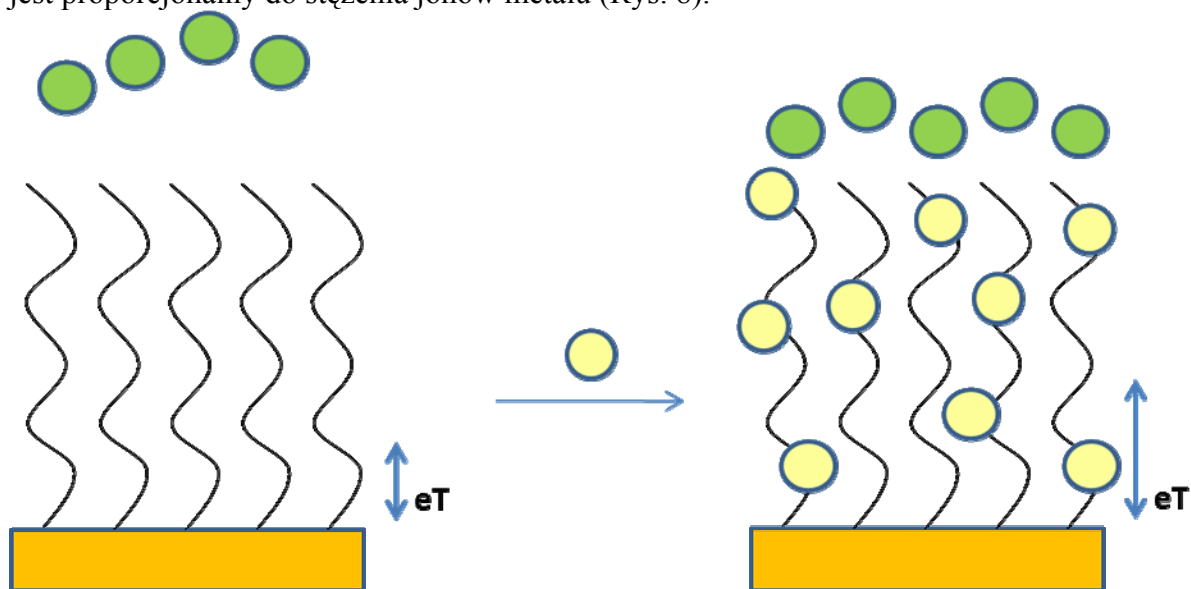
Podobnie jak dla pozostałych badanych przez mnie sensorów DNA, przeznaczonych do oznaczania jonów metali ciężkich, w sensorze jonów ołowiu zastosowałem monowarstwę mieszaną, w skład której wchodził oligonukleotyd (aptamer) oraz merkaptoheksanol. Tak przygotowany sensor zastosowano do oznaczania ołowiu w próbkach wody wodociągowej, do której dodano  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  w stężeniu  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Wynik analizy tak przygotowanej próbki z zastosowaniem sensora DNA, wynoszący  $0,99 \mu\text{mol L}^{-1}$ , świadczy o możliwości jego wykorzystania do analizy próbek rzeczywistych.

Opracowany sensor charakteryzował się dolną granicą oznaczalności dla jonów ołowiu wynoszącą  $34,7 \text{ nmol L}^{-1}$  (Rys. 7). Jest to wartość niższa od maksymalnego dopuszczalnego stężenia jonów  $\text{Pb}^{2+}$  w wodzie pitnej, ustalonego przez US Environmental Protection Agency ( $0,015 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $72 \text{ nmol L}^{-1}$ ), należy jednak stwierdzić, że nie jest ona satysfakcjonująca na tle innych elektrochemicznych metod oznaczania ołowiu. Dlatego też podjąłem prace nad obniżeniem dolnej granicy oznaczalności tych sensorów, między innymi poprzez zastosowanie innego znacznika redoks.



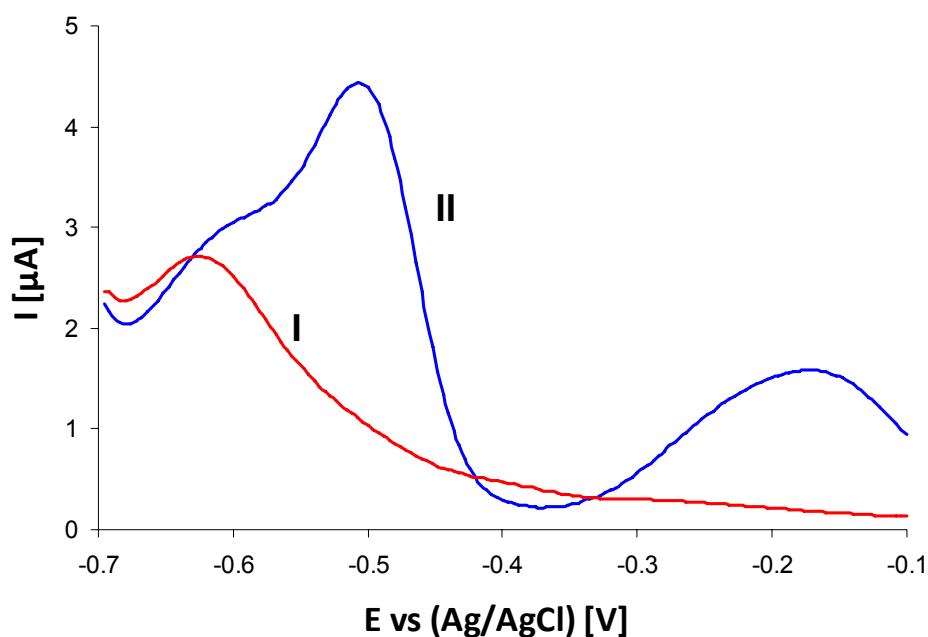
Rys. 7. Krzywa kalibracji na jony ołowiu dla elektrody złotej modyfikowanej oligonukleotydem TBA.

W kolejnym etapie badań, celem obniżenia dolnej granicy oznaczalności, do generacji sygnału prądowego użyto anionowy znacznik – sól sodową kwasu antrachino-2-sulfonowego (AQMS). W przeciwieństwie do znaczników kationowych, dostęp znaczników anionowych do powierzchni elektrody jest ograniczony, a dopiero dodatek metalu silnie wiążącego się z kwasami nukleinowymi zmniejsza siłę odpychania elektrostatycznego, częściowo kompensując ujemny ładunek oligonukleotydów. Tym samym znacznie więcej cząsteczek markera dociera do powierzchni elektrody i dochodzi do przyrostu sygnału prądowego, który jest proporcjonalny do stężenia jonów metalu (Rys. 8).



Rys. 8. Schemat działania biosensora selektywnego na jon metalu, z oligonukleotydową warstwą receptorową i anionowym znacznikiem redoksaktywnym.

Podobnie jak w przypadku kationowego MB, wstępne pomiary prowadzono dla elektrod modyfikowanych TBA w odpowiednim elektrolicie o pH 4,0 zawierającym AQMS. Jednak, zarówno przed jak i po inkubacji w roztworze jonów ołowiu, nie zaobserwowano żadnych zmian w wielkości prądu pochodzącego od znacznika. Najprawdopodobniej w warunkach pomiaru dochodziło do protonowania znacznika, w związku z czym utracił on swój anionowy charakter. Zatem w kolejnym etapie pomiary prowadzono w roztworze o pH 6,0. Wartość ta była optymalna zarówno dla znacznika, który zachowywał swój anionowy charakter, a także dla jonów ołowiu, które w tym środowisku nie wytrącały się z roztworu w postaci wodorotlenku. Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdzają postulowany mechanizm działania biosensora, bowiem po inkubacji w roztworze jonów ołowiu, które silnie oddziałują z kwasami nukleinowymi, dochodzi do przyrostu sygnału prądowego pochodzącego od AQMS, związanego z warstwą receptorową (Rys. 9).

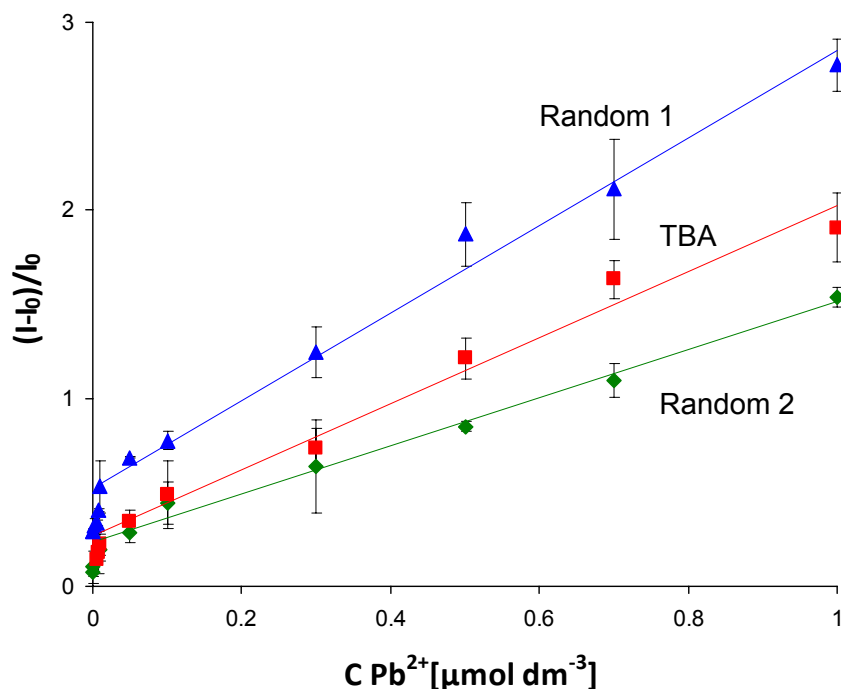


Rys. 9. Woltamperogramy zarejestrowane techniką DPV dla elektrod złotych modyfikowanych TBA: (I) pomiary w buforze TRIS pH 6,0 o stężeniu 50 mmol·L<sup>-1</sup>, zawierającym AQMS o stężeniu 1 mmol·L<sup>-1</sup>; (II) pomiary w tym samym roztworze zawierającym Pb<sup>2+</sup> o stężeniu 1 µmol·L<sup>-1</sup>.

W kolejnym etapie, celem poprawy parametrów analitycznych opracowanego biosensora, sprawdzono wpływ długości nici oligonukleotydowej oraz sekwencji zasad w łańcuchu na odpowiedź elektrod. Doniesienia literaturowe mówią o wysokim powinowactwie jonów ołowiu do zasad guaninowych. W przypadku pierwszej badanej sekwencji – TBA (15n) – zawartość guanin wynosiła 60%. Tak też było w przypadku dłuższej (20n) losowo dobranej sekwencji Random 1. Jednak wyższą zmianę sygnału prądowego – przed i po inkubacji w roztworze jonów ołowiu – zaobserwowano dla TBA ( $\Delta=1,91$  dla TBA,  $\Delta=1,54$  dla Random 1), co najprawdopodobniej jest związane z formowaniem się G-kwadrupleksu po kontakcie z Pb<sup>2+</sup>. Kolejno do pomiarów użyto sekwencję Random 2 o długości 15 zasad w łańcuchu i znacznie niższej zawartości guanin, wynoszącej tylko 20%. Wyniki przeprowadzonych badań jednoznacznie wskazują na najwyższy – w przypadku Random 2 – przyrost sygnału prądowego ( $\Delta=2,77$ ).

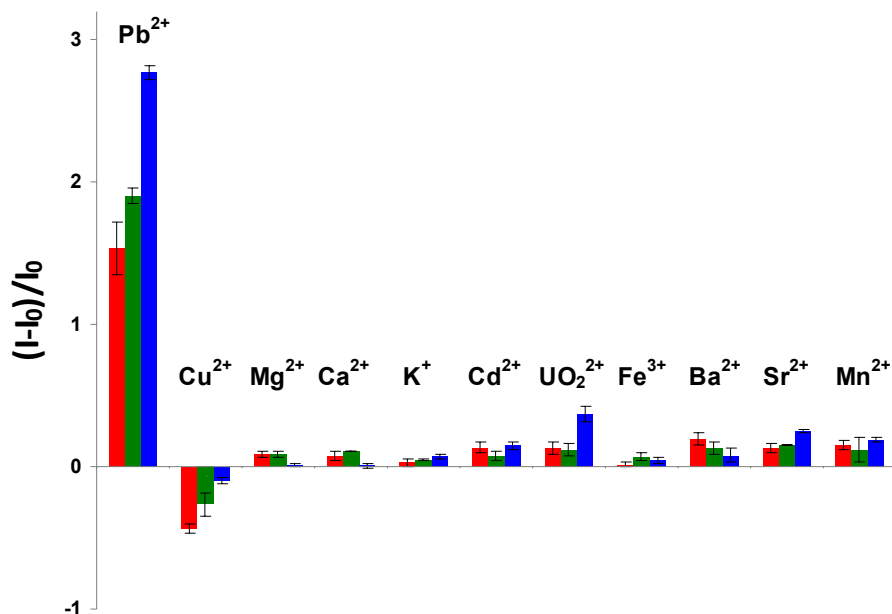
Następnie podjęto próbę wyznaczenia zależności zmian wielkości prądu w funkcji stężenia jonów ołowiu. Zaobserwowano przyrost sygnału wraz ze wzrostem stężenia jonów

ołowiu a otrzymane wyniki przedstawiono na wykresie (Rys. 10). Dla wszystkich badanych sekwencji udało się wyznaczyć liniowy zakres odpowiedzi. Dla elektrody modyfikowanej Random 1, dolna granica oznaczalności wynosiła  $69,0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  i wartość ta była około dwukrotnie wyższa niż dla sensora z TBA ( $33,0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Najlepszymi parametrami pracy charakteryzowała się elektroda wykorzystująca Random 2 w warstwie receptorowej, dla której zakres liniowej odpowiedzi został przesunięty w stronę niższych stężeń, z dolną granicą oznaczalności na poziomie  $4,2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Uzyskane wyniki porównano z wartościami stałej dysocjacji dla kompleksu oligonukleotyd –  $\text{Pb}^{2+}$ , obliczonych wg modelu Scatcharda, a uzyskane wartości potwierdzają wysokie powinowactwo Random 2 do  $\text{Pb}^{2+}$  (TBA:  $K_d = 0,1393 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Random 1:  $K_d = 0,2578 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Random 2:  $K_d = 0,0116 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ).



Rys. 10. Porównanie krzywych kalibracji na jony  $\text{Pb}^{2+}$  dla elektrod złotych modyfikowanych oligonukleotydami: Random 1 (20 zasad), Random 2 (15 zasad) oraz TBA (15 zasad).

W kolejnym etapie zbadano również selektywność opracowanych biosensorów (Rys 11). Uzyskane wyniki dla każdej z sekwencji są zadowalające, bowiem nie zaobserwowano znacznych interferencji ze strony jonów metali ciężkich, takich jak kadm czy uranyl. Należy podkreślić, że prezentowana selektywność dotyczy całej metody – procedury pomiarowej wraz z zastosowanymi odczynnikami i parametrami – a nie tylko monowarstwy powstałej w wyniku immobilizacji nici oligonukleotydowych na powierzchni elektrody. Warto zwrócić uwagę na fakt, iż w warunkach pomiaru (pH 6) wiele z badanych jonów strąca się dzięki czemu liczba potencjalnych interferentów maleje.



Rys. 11. Selektyność elektrod modyfikowanych oligonukleotydamy TBA, Random 1 i Random 2 (w tej kolejności). Stężenie każdego z jonów wynosi 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pomiary wykonano w roztworze buforowym TRIS, pH 6,0, zawierającym AQMS o stężeniu 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

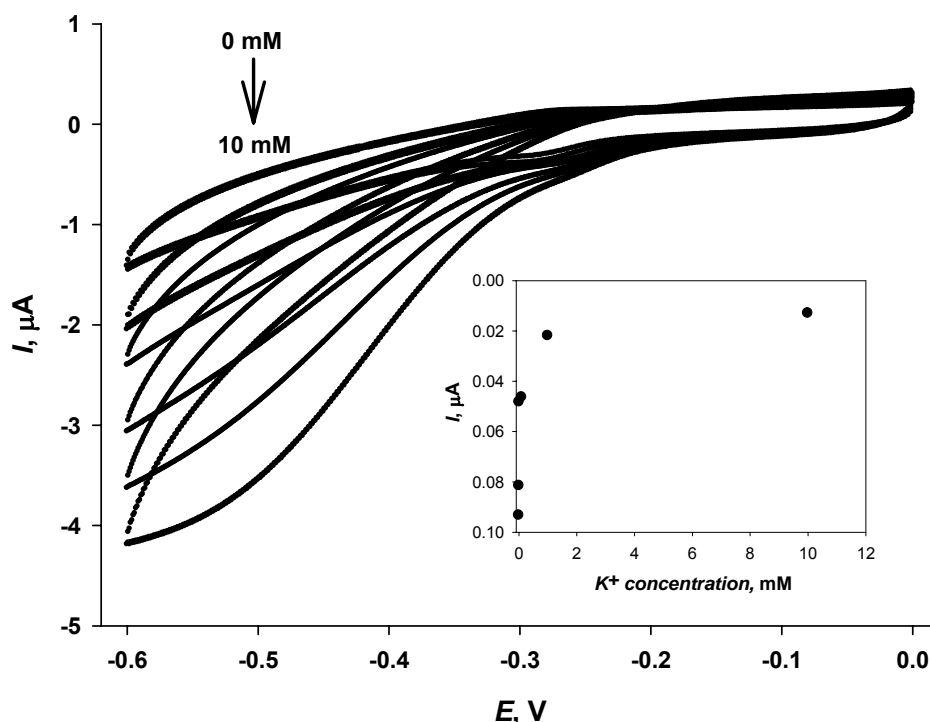
Metale ciężkie nie są jedynymi ważnymi analitami, możliwymi do oznaczania z zastosowaniem elektrod modyfikowanych aptamerami. W literaturze można odnaleźć informacje na temat kilku aptamerów, wykazujących oddziaływanie z kationem potasowym. Oznaczanie tego jonu jest szczególnie ważne w próbkach klinicznych, potas pełni bowiem w organizmie istotną rolę, uczestnicząc w regulacji ciśnienia krwi, pracy mięśni, działaniu enzymów oraz utrzymaniu właściwego pH.

**Tabela 1.** Porównanie stałych dysocjacji ( $K_d$ ) dla kompleksów potasu z badanymi sekwencjami aptamerowymi.

Aptamer	$K_d, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
TBA	1,13
AG3	5,03
PS2M	1,49

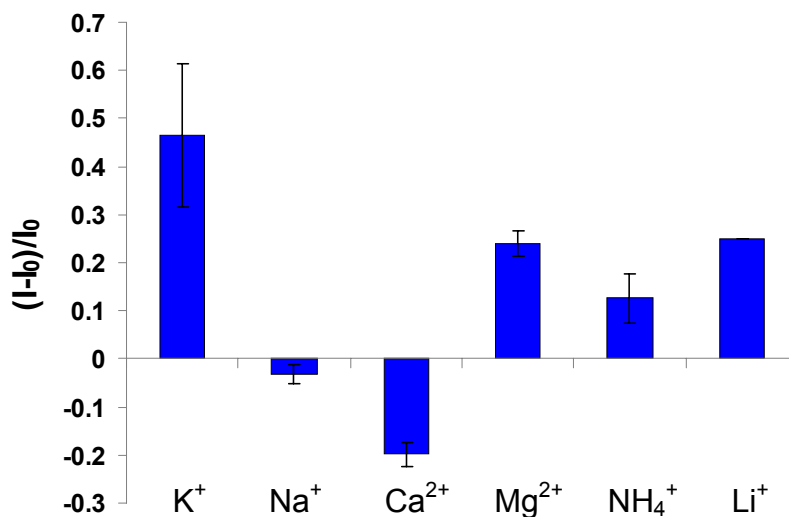
W pierwszym etapie badań dokonano wyboru sekwencji aptamerowej, która najlepiej nadaje się do konstrukcji sensora. W tym celu obliczono stałe dysocjacji kompleksów trzech wybranych aptamerów z jonem potasu ( $K_d$ ). Na podstawie tych wartości, zebranych w Tabeli 1, można stwierdzić, że najsilniejsze oddziaływanie z  $\text{K}^+$  wykazuje TBA – aptamer zaprojektowany pierwotnie do wiązania trombiny. Ma to niewątpliwie związek z dwoma kwartetami guaninowymi, które są tworzone przez ten aptamer. Elektrody zmodyfikowane TBA zostały następnie poddane badaniu techniką woltamperometrii cyklicznej w roztworach o różnym stężeniu jonów potasu. Jako znacznik redoks zastosowano w tych pomiarach błękit metylenowy. Na Rys. 12 widoczny jest wyraźny spadek prądu pochodzącego od MB, wraz ze wzrostem stężenia jonów potasu. Efekt ten jest spowodowany zmniejszaniem się

sumarycznego ładunku ujemnego warstwy receptorowej, wywołanym przez wiązanie przez nią jonów potasu. W związku z tym stężenie kationowego znacznika redoks (błękitu metylenowego) przy elektrodzie spada, co prowadzi do spadku sygnału prądowego. Rysunek 11 przedstawia także krzywą kalibracji opracowanego sensora dla jonów potasu. Jej odcinek prostoliniowy zawiera się w zakresie od  $10^{-8}$  do  $10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>, a wartość dolnej granicy oznaczalności wynosi  $2,31 \cdot 10^{-9}$  mol·L<sup>-1</sup>.



Rys. 12. Voltamperogramy cykliczne dla elektrody złotej modyfikowanej TBA, zarejestrowane w roztworach KCl o stężeniach w zakresie  $10^{-6}$  do  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>; w roztworze obecny był błękit metylenowy w stężeniu  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Inset: zależność prądu anodowego od stężenia jonów  $\text{K}^+$ .

Badaniami objęto także selektywność opracowanego sensora wobec wybranych jonów metali z pierwszej i drugiej grupy układu okresowego. Najsilniejszy efekt przeszkadzający zaobserwowano dla jonów litu i magnezu, natomiast jony sodu praktycznie nie wywołują odpowiedzi sensora. Wyniki badań selektywności przedstawiono na Rys. 13.



Rys. 13. Selektyność elektrod modyfikowanych oligonukleotydem TBA. Stężenie kationów jonów metali wynosiło  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pomiary w roztworze buforowym TRIS zawierającym  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  błękitu metylenowego.

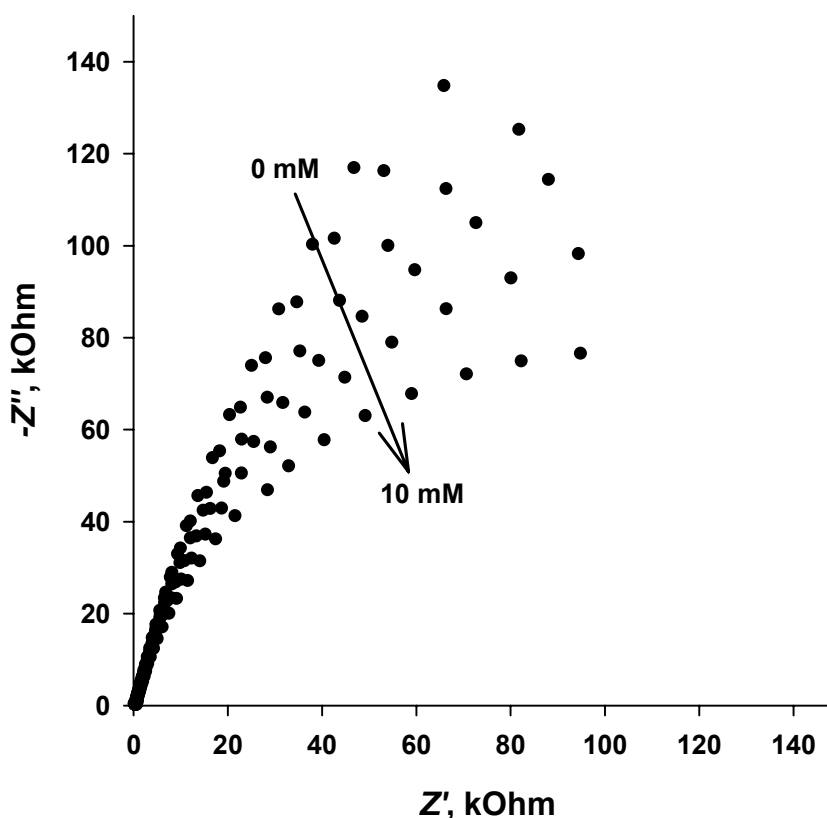


Fig. 14. Wykresy Nyquista dla elektrody złotej modyfikowanej oligonukleotydem TBA w roztworach o stężeniu KCl w zakresie  $10^{-6}$  do  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . Pomiary wykonane w roztworze buforowym TRIS, pH 7,4, zawierającym błękit metylenowy w stężeniu  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

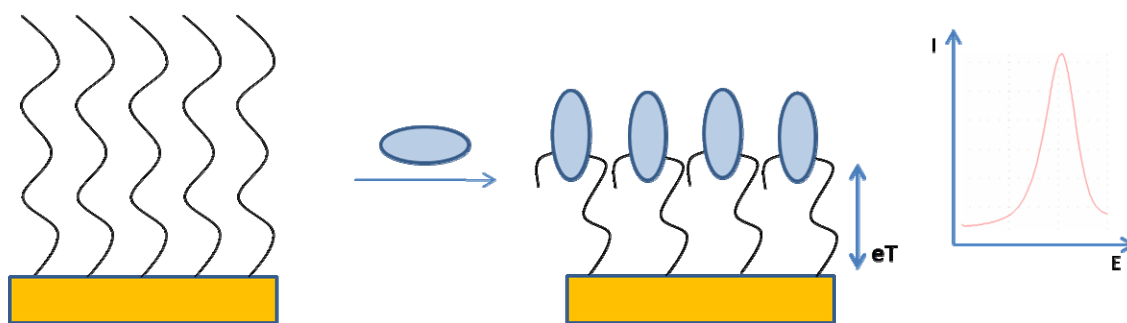
Oddziaływanie potasu z TBA badane było także z zastosowaniem spektroskopii impedancyjnej (Rys. 14). Stwierdzono, że wraz ze wzrostem stężenia  $K^+$  w roztworze spada

opór przeniesienia ładunku na powierzchni elektrody. Może to być spowodowane zmianą konformacji aptameru pod wpływem oddziaływania z jonami potasu, co powoduje zmniejszenie grubości warstwy receptorowej.

Podsumowując tę część badań należy stwierdzić, że sekwencje oligonukleotydów tworzących warstwę receptorową sensorów elektrochemicznych, przeznaczonych do oznaczania jonów metali, mają znaczny wpływ na ich selektywność. Podobne wnioski można wyciągnąć z przeglądu publikacji innych grup badawczych, zajmujących się tą tematyką. Przegląd taki, którego jestem współautorem, ukazał się w czasopiśmie *Current Analytical Chemistry*, publikującym głównie eksperckie artykuły przeglądowe ze wszystkich dziedzin chemii analitycznej.

Jak wykazano powyżej, aptamery mogą służyć do oznaczania jonów metali. Jednakże ich najczęstszym polem zastosowań jest analiza związków o znaczeniu biologicznym. Interesującą grupą takich związków są neuroprzekaźniki, a spośród nich dopamina (DA). Związek ten jest jednym z podstawowych neuroprzekaźników z grupy katecholamin, odgrywa kluczową rolę w organizmie człowieka wpływając m.in. na układ sercowo-naczyniowy, układ nerwowy oraz hormonalny. Największe ilości dopaminy znajdują się w mózgu ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a jej średnie stężenie w ludzkim organizmie zawiera się w zakresie od  $10^{-8}$  do  $10^{-6} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Nieprawidłowy poziom dopaminy może być związany z rozwojem poważnych chorób o podłożu neuronalnym, takich jak choroba Parkinsona, choroba Huntingtona, ADHD czy choroba Alzheimer'a. Dopamina jest wykrywana przy użyciu różnorodnych technik, w tym HPLC czy spektrometria mas, jednak techniki te są czasochłonne i wymagają kosztownego sprzętu. Dlatego też jednym z wyzwań jest opracowanie selektywnych i czułych metod, które mogą być stosowane do oznaczania dopaminy w złożonych próbkach biologicznych, takich jak krew lub surowica.

W proponowanym przeze mnie rozwiązaniu, które pozwoli na stosunkowo szybkie oznaczenie dopaminy, jako warstwę receptorową elektrochemicznego biosensora zastosowano 57-merowy aptamer DNA, selektywny na dopaminę (DBA). W opisanych do tej pory pracach, do wytwarzania sygnału prądowego, celem poprawy m.in. dolnej granicy oznaczalności a także zakresu prostoliniowej odpowiedzi, wykorzystywane były znaczniki redoks. Jednak badania wstępne wykazały, iż nie ma liniowej zależności między zmianą sygnału prądowego pochodzącego od błękitu metylenowego a stężeniem dopaminy. Najprawdopodobniej w trakcie inkubacji elektrod w roztworze znacznika dochodziło do formowania się dupleksu w obrębie długoniciowej pojedynczej nici oligonukleotydowej i MB wiązał się z warstwą receptorową nie tylko poprzez elektrostatyczne oddziaływanie, lecz również poprzez interkalację wewnątrz podwójnej nici DNA. Zatem wyniki tych badań wykluczyły możliwość zastosowania znacznika redoks do oznaczania dopaminy. W związku z tym, podjęto próby wykorzystania prądu utlenienia dopaminy jako sygnału analitycznego (Rys. 15).

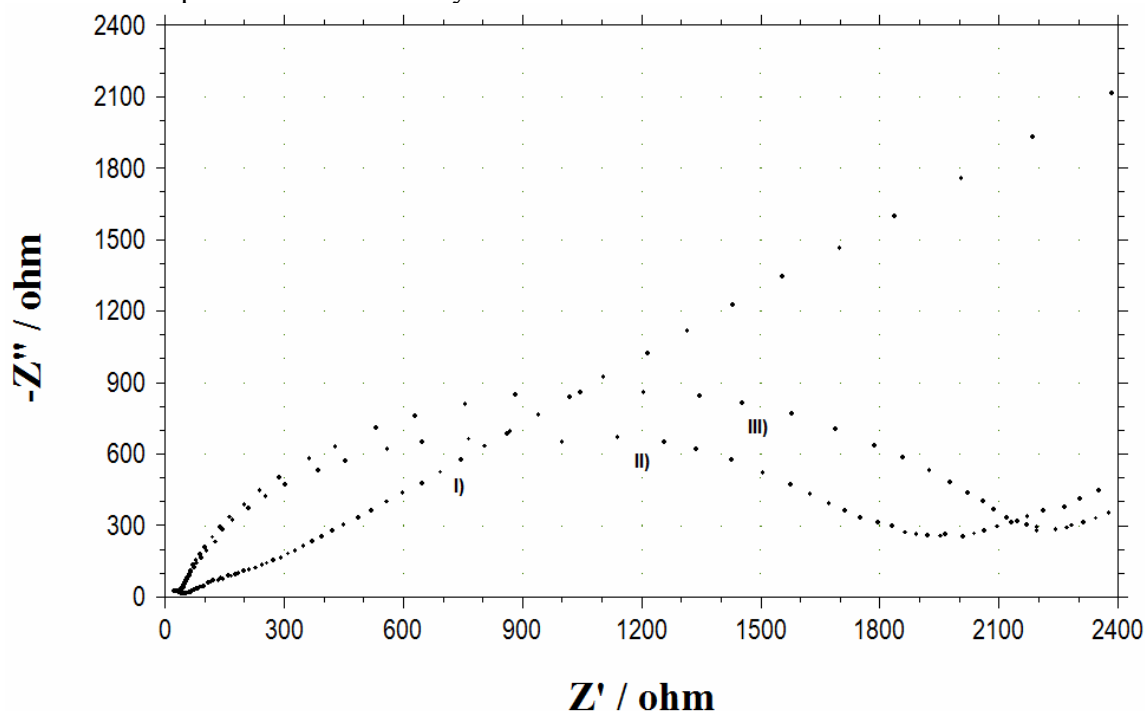


Rys. 15. Schemat mechanizmu działania biosensora selektywnego na dopaminę.



Celem wyeliminowania niespecyficznego oddziaływania dopaminy z warstwą receptorową, zastosowano wypełniacz MCH, który blokował fragmenty elektrody złotej nie pokryte oligonukleotydami, co uniemożliwiało adsorpcję dopaminy na przetworniku. Sprawdzone również wpływ czasu inkubacji modyfikowanych elektrod w roztworze dopaminy i największy przyrost sygnału prądowego zaobserwowano dla 5-minutowej inkubacji połączonej z mieszaniem. Przeprowadzono również analogiczne pomiary dla elektrody modyfikowanej losowo dobraną sekwencją o tej samej długości, co sekwencja aptamerowa (57 zasad). Zarejestrowany sygnał był około 2-krotnie niższy i wynikał jedynie z elektrostatycznego oddziaływania pomiędzy ujemnie naładowaną warstwą receptorową a analitem. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż w przypadku sekwencji aptamerowej na dopaminę, obok oddziaływań elektrostatycznych, po kontakcie z dopaminą dochodzi do specyficznego przestrzennego dopasowania nici oligonukleotydowej do badanego analitu, co wpływa na wysokie powinowactwo sekwencji aptamerowej wobec dopaminy.

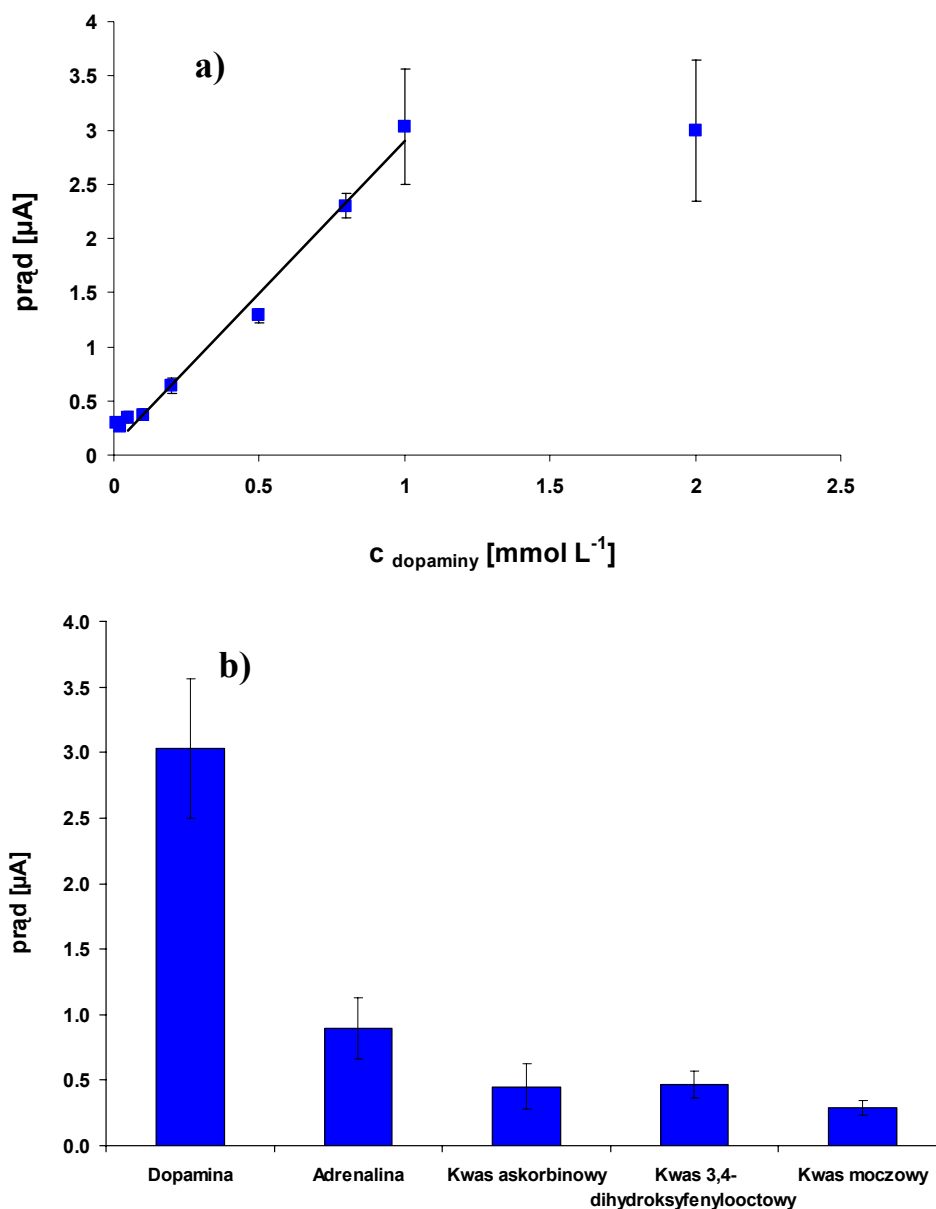
W kolejnym etapie wykonano pomiary z użyciem spektroskopii impedancyjnej w roztworze anionowego znacznika. Na wykresie Nyquista (Rys. 16), w obszarze wysokich częstotliwości obserwowany jest wzrost oporu, związany z odpychaniem pomiędzy ujemnie naładowaną warstwą receptorową a ujemnie naładowanym znacznikiem. Kolejno, po inkubacji w roztworze dopaminy, mimo częściowej kompensacji ujemnego ładunku warstwy receptorowej, wartość oporu wzrosła, co można wytłumaczyć skompleksowaniem dopaminy przez warstwą receptorową i uformowaniem zawady sterycznej, która ograniczała dostęp znacznika do powierzchni elektrody.



Rys. 16. Wykres Nyquista dla elektrody niemodyfikowanej (I), elektrody modyfikowanej DBA/MCH przed (II) i po (III) 5-minutowej inkubacji w  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  roztworze dopaminy, pH 7,4. Wszystkie pomiary wykonywano w  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  roztworze Tris-HCl zawierającym  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl,  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  MgCl<sub>2</sub> przy potencjale 0,2 V.

Podjęto również próbę wyznaczenia zależności pomiędzy prądem utlenienia dopaminy a jej stężeniem (Rys. 17). Stwierdzono, że zależność ta jest liniowa w zakresie stężeń od  $0,05$  do  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  a opracowany biosensor pozwala na oznaczenie dopaminy na poziomie  $26,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Dla wyższych stężeń dopaminy ( $> 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) zaobserwowano wypłaszczenie krzywej kalibracji związane najprawdopodobniej z całkowitym wysyceniem warstwy

receptorowej. Sprawdzone również selektywność zaprojektowanego sensora. Jedyne interferencje zarejestrowano tylko w przypadku adrenaliny (wielkość prądu była ponad 3-krotnie mniejsza niż dla dopaminy), która w warunkach pomiaru (pH 7,4) jest dodatnio naładowana ( $pK_a$  8,55), a tym samym jest przyciągana przez ujemnie naładowaną warstwę receptorową. Dodatkowo wiązanie adrenaliny przez aptamer na dopaminę może mieć związek z oddziaływaniem  $\pi - \pi$  pomiędzy adrenaliną a aromatycznymi pierścieniami zasad nukleinowych.



Rys. 17. (a) Krzywa kalibracji na dopaminę dla elektrody złotej modyfikowanej DBA; (b) Selektywność elektrody modyfikowanej DBA wobec typowych związków przeszkadzających.

Tak przygotowany sensor zastosowano do oznaczania dopaminy w próbce serum, którą przygotowano przez 100-krotne rozcieńczenie. Wynik analizy tak przygotowanej próbki z zastosowaniem sensora DNA, wynoszący  $2,47 \mu\text{A} \pm 0,29 \mu\text{A}$ , zawierał się w zakresie prostoliniowej odpowiedzi sensora i odpowiadał stężeniu dopaminy równemu  $0,85 \pm 0,10$

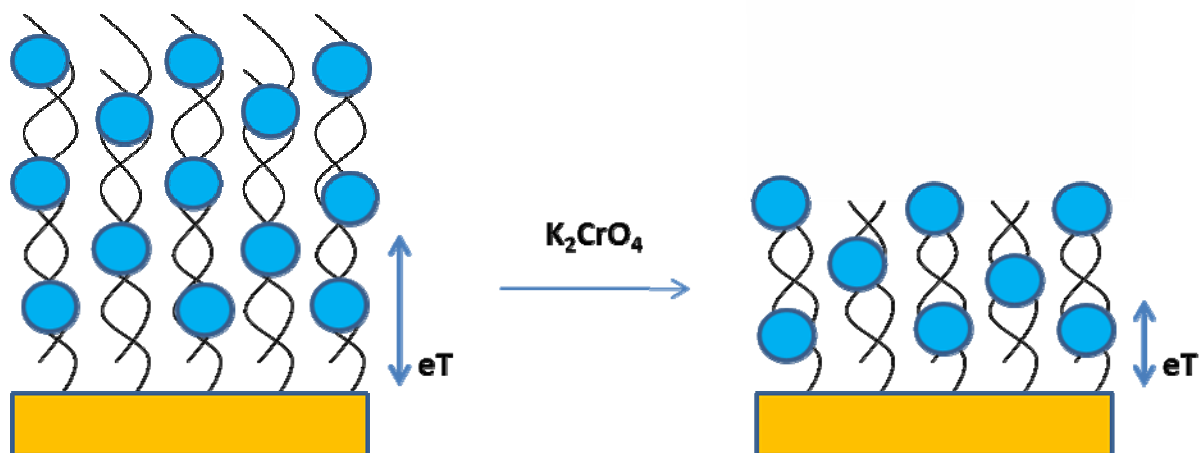
$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , co świadczy o możliwości wykorzystania zaprojektowanego sensora do analizy próbek biologicznych.

W ostatnim etapie prowadzonych badań nad zaprojektowaniem sensora do oznaczania dopaminy w próbkach biologicznych, podjęto próby poprawy parametrów analitycznych poprzez modyfikację powierzchni elektrody zredukowanym tlenkiem grafenu, nanocząstkami złota oraz DBA. Przeprowadzone pomiary z użyciem spektroskopii impedancyjnej potwierdziły, że dochodzi do wiązania dopaminy przez warstwę receptorową i udało się wyznaczyć liniową zależność sygnału prądowego utleniania dopaminy od jej stężenia w zakresie od 5 do  $75\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Poprawie uległa również selektywność sensora a także dolna granica oznaczalności, osiągając wartość  $3,36\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Działanie dotychczas opisanych przez mnie sensorów DNA polegało na wiązaniu wybranego analitu przez warstwę receptorową DNA. Możliwe są jednak układy, gdzie działanie analitu polega na niszczeniu warstwy receptorowej, a pomiar elektrochemiczny dostarcza informacji o stopniu jej zniszczenia. Można w ten sposób oznaczać substancje zdolne do cięcia nici DNA. Jedną z takich substancji są związki chromu.

Chrom(III) jest niezbędnym do życia mikroelementem, zmniejszając ryzyko zawału serca i rozwoju miażdżycy czy też ułatwiając przenikanie glukozy z krwi do komórek. Z kolei chrom(VI), nawet w niewielkiej ilości, wpływa szkodliwie na zdrowie człowieka poprzez działanie toksyczne, mutagenne i kancerogenne. Chrom(VI), oddziałując z DNA, wywołuje zmiany w jego strukturze m.in. powodując uwolnienie zasad azotowych lub cięcie nici DNA, co w konsekwencji może prowadzić do stanów chorobowych, w tym chorób nowotworowych. Stąd też rozwój tanich i szybkich metod, pozwalających na oznaczanie związków powodujących degradację DNA na niskim poziomie stężeń, jest niezwykle istotny.

Degradacja DNA spowodowana przez związki chromu(VI) może być monitorowana elektrochemicznie poprzez zmiany wielkości prądu utleniania adeniny i guaniny. Jednak ze względu na niskie wartości rejestrowanego prądu, zdecydowano się na użycie w pomiarach znacznika redoks – kationowego błękitu metylenowego (MB). Sensor przygotowano poprzez adsorpcję podwójnej nici DNA (dsDNA) na powierzchni elektrody z węgla szklanego. Zaproponowano następujący mechanizm odpowiedzi sensora: po inkubacji elektrod w roztworze znacznika, obserwowany jest wysoki prąd pochodzący od MB. Z kolei po inkubacji w roztworze  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ , dochodzi do cięcia dsDNA, tym samym mniejsza ilość markera jest wiązania przez warstwę receptorową, co generuje spadek sygnału prądowego (Rys. 18).

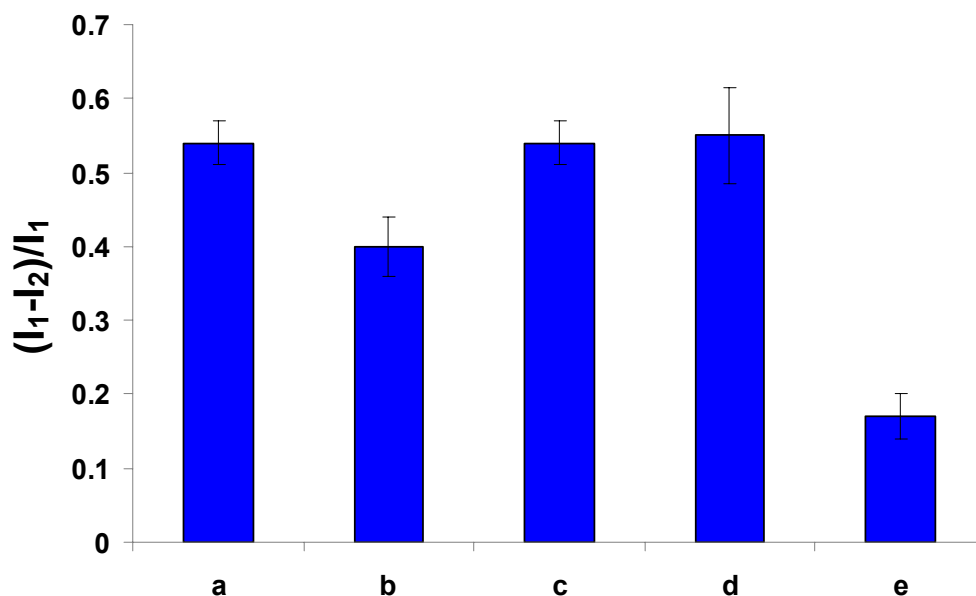


Rys. 18. Schemat mechanizmu działania sensora do badania degradacji DNA.

Kolejno podjęto próby optymalizacji metody immobilizacji długoniciowego dsDNA na powierzchni przetwornika a także sprawdzono wpływ pH oraz czasu inkubacji elektrod w roztworze  $K_2CrO_4$  na odpowiedź sensora.

Pomiary wykonywano dla elektrod modyfikowanych dsDNA na przetworniku z węgla szklanego oraz na elektrodzie złotej z zastosowaniem monowarstwy złożonej z cysteaminy, której dodatni ładunek oddziaływał z ujemnie naładowanym dsDNA. Największą zmianę sygnału prądowego (pochodzącego od MB) przed i po 30-minutowej inkubacji w roztworze  $K_2CrO_4$ , zaobserwowano dla pH 3,0 (dla pH 4,5 oraz 6,0 odpowiedź elektrod była znikoma). Kolejno sprawdzano wpływ czasu inkubacji (w pH 3,0) na odpowiedź elektrod. Największą zmianę sygnału prądowego zaobserwowano dla 60-minutowego czasu inkubacji, jednak w tym przypadku odnotowano najwyższe odchylenie standardowe. Z kolei dla 30- oraz 45-minutowego czasu inkubacji, odpowiedź elektrod była porównywalna, stąd też zdecydowano się na 30-minutową inkubację elektrod w roztworze  $K_2CrO_4$ . Przeprowadzono także pomiary z użyciem spektroskopii impedancyjnej. Po inkubacji elektrod w roztworze  $K_2CrO_4$ , zaobserwowano wzrost oporu związanego z przeniesieniem ładunku między cząsteczkami znacznika z roztworu a powierzchnią elektrody. Prawdopodobne jest, że po cięciu dsDNA przez  $K_2CrO_4$ , krótsze nici dsDNA uformowały gęściej upakowaną warstwę. Dodatkowo, przyłożony do elektrody dodatni potencjał (+0,2 V) przyciągał i mocniej wiązał ujemnie naładowaną warstwę receptorową, co spowodowało ograniczoną mobilność nici DNA na powierzchni przetwornika, co skutkowało wzrostem oporu przeniesienia ładunku.

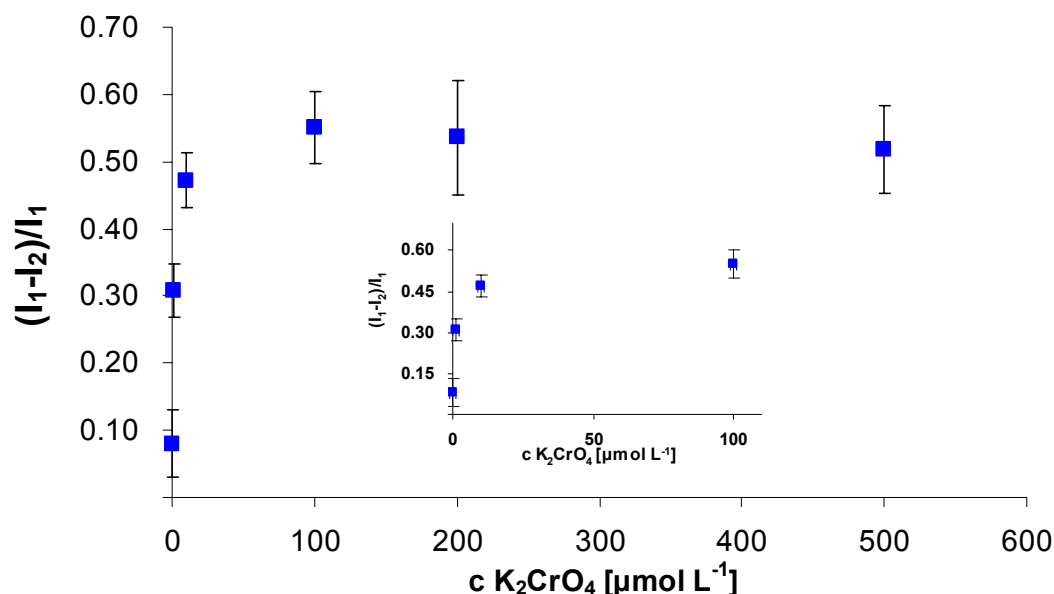
Kolejno badano wpływ substancji o charakterze redukującym na zdolność Cr(VI) do trawienia DNA (Rys. 19), istnieją bowiem doniesienia literaturowe mówiące o takiej możliwości. Stwierdzono, że dodatek kwasu askorbinowego (AA) do roztworu  $K_2CrO_4$ , inhibuje destrukcyjne działanie Cr(VI), bowiem zmiany w wielkości zarejestrowanego prądu MB po inkubacji w mieszaninie  $K_2CrO_4$ :AA były mniejsze (porównując z wynikami dla  $K_2CrO_4$ ). Z kolei  $H_2O_2$  okazał się być mniej efektywnym czynnikiem o charakterze destrukcyjnym niż  $K_2CrO_4$  a jego dodatek do mieszaniny  $K_2CrO_4$  oraz AA, inhibował aktywność AA.



Rys. 19. Porównanie zmian wielkości prądu MB dla elektrod modyfikowanych dsDNA, po inkubacji w  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ : a)  $K_2CrO_4$ , b)  $K_2CrO_4$  i AA, c)  $K_2CrO_4$ , AA i  $H_2O_2$ , d)  $K_2CrO_4$  i  $H_2O_2$ , e)  $H_2O_2$ .

Ostatnim etapem prowadzonych badań było wyznaczenie zależności zmian prądu, rejestrowanych dla elektrody modyfikowanej dsDNA, a stężeniem  $K_2CrO_4$  (Rys. 20).

Stwierdzono liniowy przebieg krzywej kalibracji w zakresie od 1 do 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$  (dla wyższych stężeń dochodziło do wypłaszczenia krzywej kalibracji, będącej wynikiem wysycenia warstwy receptorowej).



Rys. 20. Zależność zmian wielkości prądu związanego z redukcją MB w funkcji stężenia  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  dla elektrody z węgla szklanego, modyfikowanej dsDNA. Pomiary wykonywano dla 30-minutowej inkubacji w roztworze  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  (w  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 3.0).

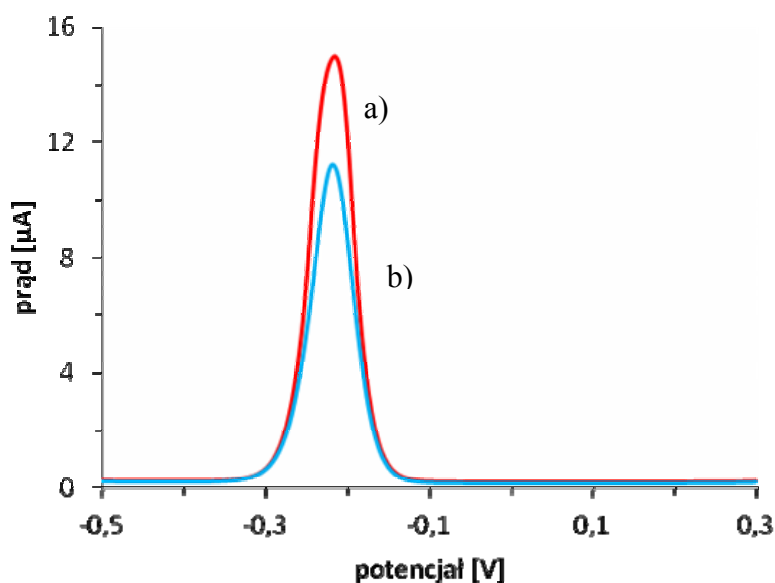
Zastosowanie monowarstwy, która ulega częściowemu strawieniu w trakcie analizy, może służyć do oznaczania różnorodnych analitów. Kolejnym przykładem tej strategii jest opracowany przeze mnie sensor do wyznaczania aktywności enzymów restrykcyjnych. Enzymy te odgrywają kluczową rolę we współczesnej inżynierii genetycznej i diagnostyce molekularnej. Ponadto, dysfunkcje niektórych enzymów w organizmie są łączone z ryzykiem wielu chorób, w tym nowotworowych. Nie ulega więc wątpliwości, że wyznaczanie aktywności enzymów restrykcyjnych to ważne zadanie analityczne. Najpopularniejszymi metodami stosowanymi w tym celu są: elektroforeza żelowa, wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) oraz testy immunoenzymatyczne (ELISA). Metody te są jednakże długotrwałe, pracochłonne, wymagają także drogiej aparatury. Dlatego też zaproponowałem nową, elektrochemiczną metodę wyznaczania aktywności enzymów restrykcyjnych, polegającą na pomiarze stopnia hydrolizy oligonukleotydów DNA zaimmobilizowanych na elektrodzie, przez restryktazy obecne w próbce.

W pierwszym etapie badań oceniono wydajność immobilizacji oligonukleotydów DNA na powierzchni oraz wydajność hybrydyzacji z zastosowaniem chronokulometrii. Jako znacznik w tych pomiarach wykorzystano aminowy kompleks rutenu -  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ , wiążący się z DNA w określonej stechiometrii. Otrzymane wartości: gęstość monowarstwy  $5,1 \pm 0,4 \times 10^{12}$  cząstek  $\cdot\text{cm}^{-2}$  oraz wydajność hybrydyzacji  $39,52 \pm 3,74$  % pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi.

Kolejne badania przeprowadzono w celu oceny wpływu substancji dodawanych typowo do komercyjnych preparatów enzymów restrykcyjnych na monowarstwę DNA. Badaniami objęto BSA, DTT, glicerol oraz TRITON X-100, a jako technikę pomiarową zastosowano spektroskopię impedancyjną. Na podstawie porównania wykresów Nyquista, zarejestrowanych przed i po inkubacji modyfikowanej elektrody w roztworze zawierającym badaną substancję, stwierdzono istotny wpływ detergentu TRITON X-100 na monowarstwę DNA. Obserwowany spadek oporu przeniesienia ładunku  $R_{ct}$  jest spowodowany wnikiem

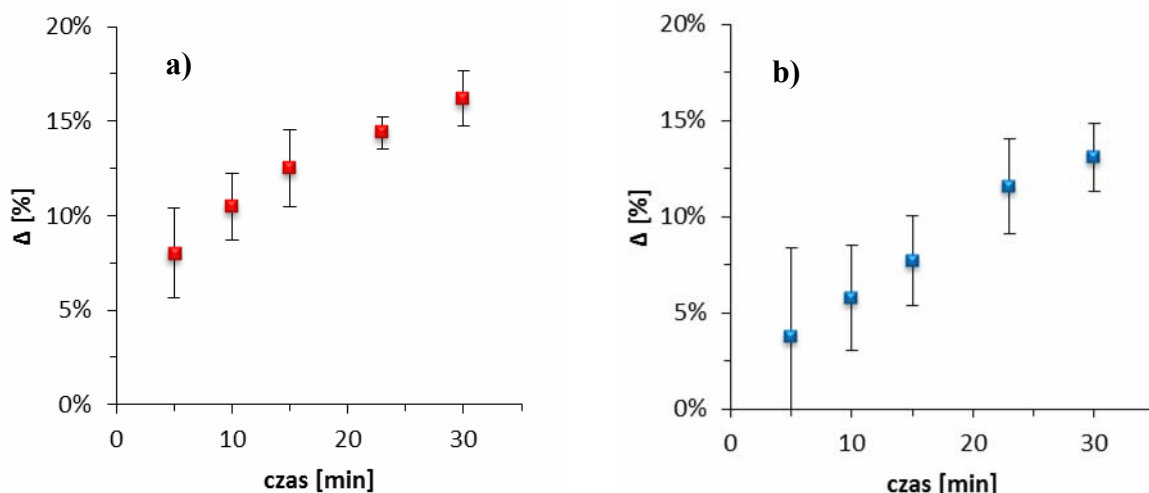
cząsteczek detergentu między łańcuchy oligonukleotydów, co powoduje rozluźnienie struktury monowarstwy i ułatwia dostęp znacznika do powierzchni elektrody. Na podstawie powyższych wyników, do dalszych badań jako enzym modelowy wybrano endonukleazę *PvuII*, której forma handlowa nie zawiera detergentów.

Wybrany enzym rozpoznaje fragment DNA o sekwencji 5' –CAGCTG– 3' i przecina go w połowie. W badaniach zastosowano dwie sekwencje, z różnie umieszczonym fragmentem rozpoznawanym przez endonukleazę *PvuII*. Sekwencje dsDNA zostały zaimmobilizowane na elektrodzie złotej, a efekty trawienia enzymatycznego oceniano na podstawie pomiarów z zastosowaniem błękitu metylenowego jako znacznika redoks. Na Rys. 21 widoczny jest spadek sygnału prądowego, zarejestrowany po działaniu enzymu restrykcyjnego na monowarstwę DNA, zaimmobilizowaną na elektrodzie. Wynika on ze zmniejszenia się, w wyniku działania enzymu, ilości dsDNA na elektrodzie, co powoduje spadek ilości znacznika oddziałującego z monowarstwą.



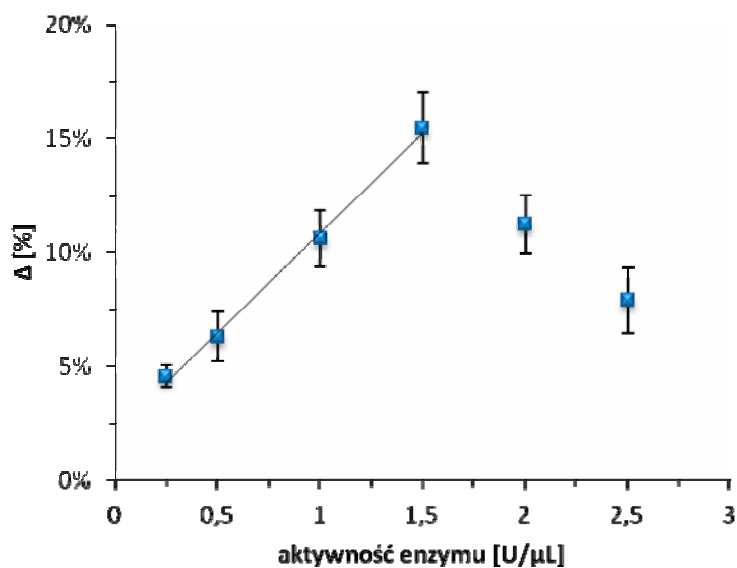
Rys. 21. Woltamperogramy fali prostokątnej zarejestrowane dla elektrody modyfikowanej monowarstwą dsDNA/MCH: a) przed oraz b) po reakcji enzymatycznej. Pomiar wykonano w roztworze buforowym TRIS, pH 7,5, zawierającym błękit metylenowy ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ),  $\text{MgCl}_2$  ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) oraz  $\text{NaCl}$  ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

W toku dalszych prac zbadano kinetykę reakcji enzymatycznej na powierzchni elektrody. Rys.22 przedstawia zmiany prądu w zależności od czasu inkubacji monowarstwy w roztworze zawierającym enzymy. Zarówno dla elektrod modyfikowanych sekwencją posiadającą miejsce restrykcyjne w połowie długości, jak i w bliżej elektrody, widoczne są znaczące zmiany sygnału prądowego, zwiększające się wraz z czasem inkubacji elektrody w roztworze zawierającym enzym. Dowodzi to stopniowego, niszczącego działania enzymu na monowarstwę DNA, co skutkuje zmniejszeniem ilości znacznika oddziałującego z monowarstwą i mniejszym prądem.



Rys. 22. Kinetyka reakcji enzymatycznej na powierzchni elektrody złotej modyfikowanej monowarstwą dsDNA/MCH. Miejsce restrykcyjne umieszczone: a) przy 10 zasadzie, b) przy 5 zasadzie od końca 5' oligonukleotydu. Aktywność enzymu PvuII wynosiła 1 U/ $\mu$ L.

Ostatnim etapem badań było zbadanie możliwości wyznaczenia aktywności enzymu restrykcyjnego *PvuII* w roztworze. Na Rys. 23 przedstawiono zależność zmiany sygnału prądowego, zarejestrowanego dla elektrody modyfikowanej monowarstwą dsDNA, pozostającą przez 15 minut w kontakcie z roztworem zawierającym enzym restrykcyjny o różnej aktywności. Liniową odpowiedź sensora zaobserwowano w zakresie aktywności enzymu od 0,25 do 1,50 U/ $\mu$ L. Co ciekawe, powyżej tego zakresu nie pojawiło się spodziewane wypłaszczenie krzywej kalibracji. Zamiast niego widoczny jest spadek sygnału analitycznego. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest obecność w komercyjnym preparacie enzymatycznym glicerolu. Stężenie tego związku w roztworach o aktywności enzymu przekraczającej 1,50 U/ $\mu$ L jest wyższe niż 8%, co jest uważane za wartość mogącą znacznie wpłynąć na działanie enzymów restrykcyjnych. Należy jednak podkreślić, że opracowanie sensora elektrochemicznego, umożliwiającego szybkie i proste oznaczenie aktywności endonukleazy, zakończyło się powodzeniem.



Rys. 23. Krzywa kalibracji dla elektrod modyfikowanych monowarstwą dsDNA/MCH, wobec aktywności enzymu PvuII. Czas inkubacji elektrod w roztworze enzymu wynosił 15 minut.

## Podsumowanie

Głównym zadaniem sensorów DNA jest oznaczanie istotnych sekwencji kwasów nukleinowych, jednakże badania prowadzone w wielu ośrodkach pokazują, że możliwe jest znaczne poszerzenie ilości analitów dostępnych dla tego typu urządzeń. Omówiony przeze mnie jednotematyczny cykl publikacji pt. „**Elektrochemiczne biosensory z warstwami receptorowymi zawierającymi DNA**” opisuje najciekawsze, w mojej ocenie, wykonane przeze mnie badania dotyczące analitycznego wykorzystania elektrod modyfikowanych DNA. Wykazałem różnorodność analitów możliwych do oznaczenia za pomocą takich elektrod, umożliwiając one bowiem oznaczanie zarówno jonów metali, neuroprzekaźników, jak i aktywności enzymów. Na uwagę zasługują także różne mechanizmy oddziaływania analitu z warstwą DNA: od wiązania go przez specyficzne sekwencje zasad, przez dopasowanie przestrzenne nici DNA do kształtu analitu, aż do degradacji warstwy receptorowej przez analit. Na tej podstawie mogę stwierdzić, że moje prace stanowią istotny wkład w nową i ciekawą dziedzinę chemii analitycznej.

W mojej ocenie, kolejne prace badawcze dotyczące sensorów zawierających w warstwie receptorowej DNA, a w szczególności funkcjonalne kwasy nukleinowe, powinny dotyczyć przede wszystkim dalszego poszerzania zakresu analitów, które mogą być oznaczane z ich zastosowaniem. W szczególności aptamery mogą być potencjalnie wykorzystane do przygotowania sensorów selektywnych wobec analitów ważnych klinicznie, takich jak neuroprzekaźniki czy markery nowotworów. Dzięki selektywności, stabilności oraz łatwości syntezy aptamerów, aptasensory mogą być w przyszłości równie popularnym i wszechstronnym narzędziem analitycznym, jak obecnie sensory oparte na przeciwciałach. Innym ciekawym kierunkiem rozwoju tego typu sensorów jest niewątpliwie zastosowanie w warstwach receptorowych analogów kwasów nukleinowych. Związki te mają zdolność do hybrydyzacji z naturalnym DNA i RNA, jednak są odporne na działanie enzymów restrykcyjnych, znacznie lepiej rozpoznają także mutacje punktowe. Z uwagi na te cechy,



analogi kwasów nukleinowych są szczególnie predestynowane do konstrukcji sensorów przeznaczonych do analizy próbek biologicznych oraz do pomiarów in vivo. Duża różnorodność struktur analogów kwasów nukleinowych daje szerokie możliwości badawcze i aplikacyjne.

