

**MATEMATICKO–FYZIKÁLNA FAKULTA UK
BRATISLAVA**

KATEDRA BIOFYZIKY A CHEMICKEJ FYZIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCA

2000

Viktor Gajdoš

**MATEMATICKO–FYZIKÁLNA FAKULTA UK
BRATISLAVA**

KATEDRA BIOFYZIKY A CHEMICKEJ FYZIKY



Viktor Gajdoš

**Štúdium hybridizácie DNA na pevnom povrchu
pomocou ampérometrie.**

Školiteľ: Prof. RNDr. Tibor Hianik, DrSc.

Bratislava 2000

Ďakujem Prof. RNDr. Tiborovi Hianikovi, DrSc. za odborné vedenie, cenné rady a pripomienky pri experimentálnych meraniach a písaní mojej diplomovej práce.

**Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval
samostatne, s použitím uvedenej literatúry.**

.....

Úvod

Kyselina deoxyribonukleová (DNA) a kyselina ribonukleová (RNA), sú biologické makromolekuly, ktorých úlohou je uchovávanie a prenášanie genetickej informácie. Ich zloženie je priamo spojené s geneticou informáciou v nich obsiahnutou, ktorá je typická a jedinečná pre každý organizmus a biologický druh. Tvoria jednu z hlavných zložiek buniek a vírusov, a vo všetkých bunkách jedného organizmu sú (až na náhodné mutácie a poruchy) identické.

Problematike štúdia DNA sa venuje v súčasnosti veľa pozornosti, a jej výskum sa stáva záležitosťou spolupráce odborníkov z viacerých oblastí, hlavne medicíny, biológie, biochémie a biofyziky. Predpokladajú sa široké možnosti využitia poznatkov o DNA v praxi. Už v súčasnosti sa využívajú napr. v kriminalistike – na identifikáciu osôb, v poľnohospodárstve – na genetickú úpravu potravín, alebo v biológii – na odhalenie súvislostí v evolúcii biologických druhov.

Výhodné vlastnosti molekúl DNA a RNA ich umožňujú použiť ako jedinečný nástroj na určenie totožnosti, či prítomnosti v prostredí, konkrétneho organizmu, či biologického druhu. V tejto súvislosti sa veľa prác venuje problému detekcie prítomnosti konkrétnych sekvencií nukleotidov v danom prostredí, v snahe o vývoj vhodnej metódy pre širšie použitie v praxi.

Metóda hybridizácie DNA sa stáva najpoužívanejšou metódou na riešenie tohto problému. Je založená na schopnosti hybridizácie navzájom komplementárnych monovlákién DNA – tzv. ssDNA pričom vzniká dvojité závitnica DNA – tzv. dsDNA. Vlákna ssDNA bývajú súčasťou senzorickej časti detekčného systému. Ak sa v skúmanej vzorke nachádzajú k nim vlákna komplementárne, dochádza pri vhodných podmienkach k ich hybridizácii, čo spôsobuje zmenu merateľných parametrov senzora. Sledované parametre môžu byť rôzne, napr. zmeny hmotnosti, optických, či elektrochemických vlastností senzora.

Elektrochemická metóda, meranie zmien vodivosti, je spôsob na sledovanie hybridizácie DNA použitý aj v tejto práci.

1. Nukleové kyseliny

1.1 Základné zložky nukleových kyselín

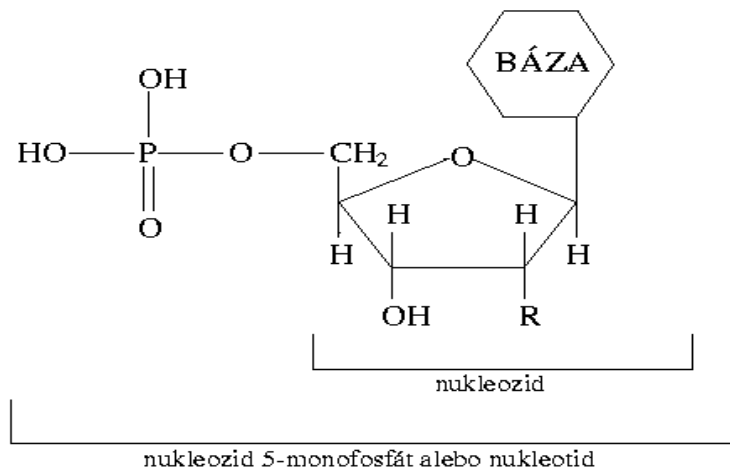
Nukleové kyseliny (NK) sú polynukleotidy. Vznikajú dehydratačnou kondenzáciou mononukleotidov, a to za aktívnej účasti príslušných enzýmov – polymeráz. Nukleotidy sa skladajú z troch zložiek :

1. dusíkatej heterocyklickej bázy
pentózy
fosforečnej.

2. sacharidu –
3. molekuly kyseliny

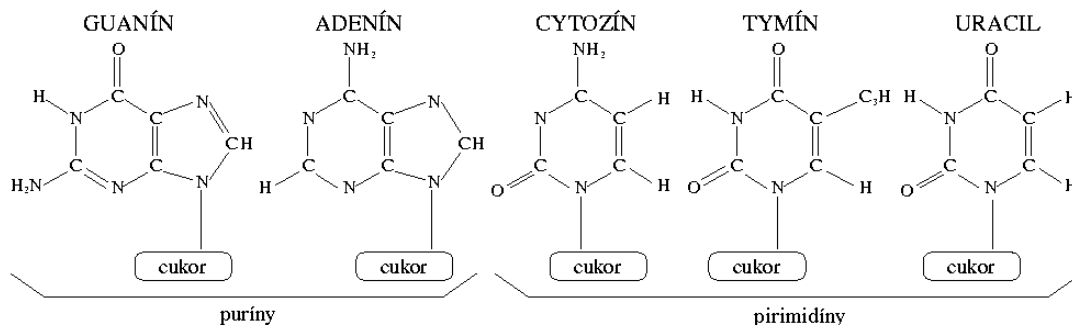
Nukleotidy obsahujúce ribózu, sa nazývajú ribonukleotidmi a sú monomérnymi jednotkami RNA. Nukleotidy obsahujúce deoxyribózu, sú deoxyribonukleotidy a tvorí sa z nich DNA. V molekule DNA aj RNA sa nukleotidy spájajú do reťazca, pomocou fosfodiesterickej väzby, ktorá sa zvyčajne vytvára medzi C³ jednej pentózy a C⁵ nasledujúcej pentózy.

Dusíkaté bázy sú deriváty purínu alebo pirimidínu. V NK sú prítomné zásadne dva purínové deriváty – adenín (A) a guanín (G), a tri pirimidínové deriváty – cytozín (C), tymín (T) a uracil (U). V ribonukleotidoch sa vyskytujú bázy A, G, C, U, v deoxyribonukleotidoch bázy A, T, G, C. Bázy sa pripájajú k sacharidu pomocou β – N – glykozidovej väzby, spájajúcej C¹ atóm pentózy s N¹ atómom pirimidínu, alebo N⁹ atómom purínu.



Obr.1.1 Ak R = H, ide o deoxyribonukleotid, ak R = OH, ribonukleotid.

Okrem uvedených typov báz, sa môžu vyskytovať aj minoritné bázy (najmä v RNA), napr.: 5 – metylcytozín, hypoxantín, xantín, cytokiníny a pod.. Tieto majú význam pri interakciách NK s ligandami a bielkovinami.



Obr.1.2 Purínové a pirimidínové bázy.

1.2 Primárna štruktúra NK

RNA a DNA sú konštruované postupne z kovalentne spojených ribonukleotidových a deoxyribonukleotidových prvkov, vytvárajúcich polynukleotidové reťazce. Prvky sa spájajú medzi sebou pomocou fosfodiesterických mostíkov, viažucich 5' hydroxylovú skupinu jedného nukleotidu s 3' hydroxylovou skupinou nasledujúceho. Vytvára sa tak pravidelný základný reťazec fosfát – sacharid – fosfát – sacharid. K sacharidu sú pripojené rôzne bázy. Polynukleotidový reťazec má polárne a nepolárne časti. Primárna štruktúra NK je tvorená postupnosťou báz, ktorá sa podľa dohody číta od 5' konca ku 3' uhlíkovému atómu pentózy. Postupnosť báz sa určuje metódami sekvenovania. V postupnosti báz je obsiahnutá genetická informácia.

Predmetom záujmu tejto práce bude ďalej molekula DNA.

1.3 Sekundárna štruktúra DNA

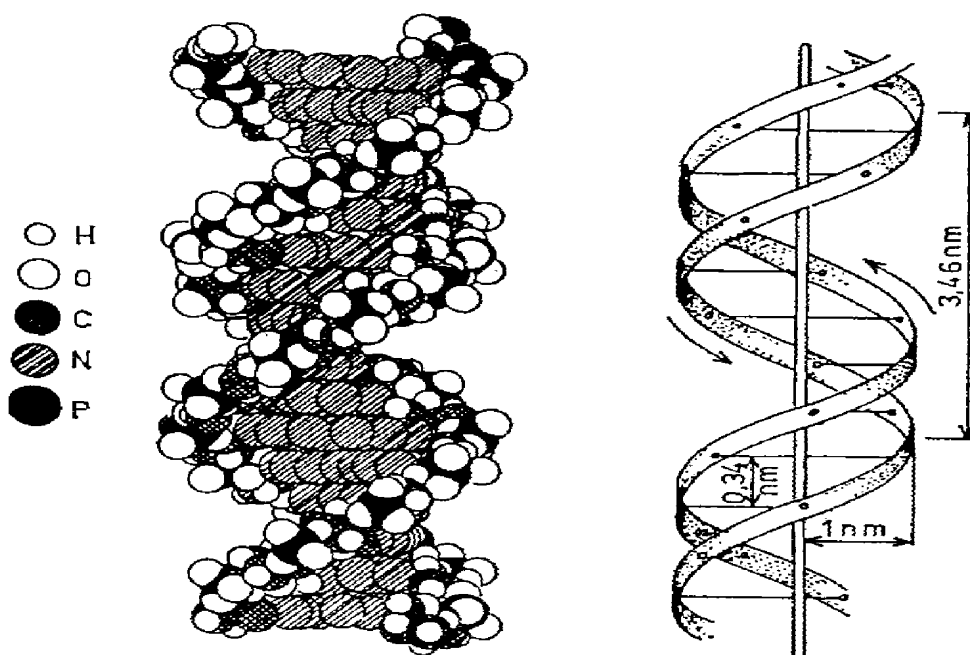
Základná charakteristika

Sekundárna štruktúra molekuly DNA sa skladá spravidla z dvoch jednotlivých reťazcov, ktoré vytvárajú pravotočivú závitnicu vo vzťahu k jednej a tej istej osi symetrie. Oba reťazce sú navzájom protismerné. Sacharidovo - fosfátová kostra je uložená na periférii závitnice, dusíkaté bázy sa nachádzajú vo vnútri závitnice a ich roviny sú spravidla kolmé k osi závitnice.

Medzi bázami sa tvoria špecifické vodíkové väzby. Adenín vždy vytvára dve vodíkové väzby s tymínom a guanín tri vodíkové väzby s cytozínom. Vzďalenessi medzi C¹ atómami deoxyribózy v dvoch reťazcoch sú rovnako veľké pre AT a GC páry a rovné 1,085 nm.

Pod komplementaritou sa chápe komplementárnosť postupnosti báz v protiľahlých reťazcoch DNA. Ak sa v jednom reťazci na niektorom mieste nachádza A, potom v druhom reťazci sa na tom istom mieste nachádza T a naopak. Analogicky je to pre G a C. V DNA je množstvo A totožné s množstvom T a to isté platí pre G a C.

Geometria dvojitej závitnice je taká, že susedné páry báz sa nachádzajú navzájom vo vzdialenessi 0,34 nm a sú vzájomne pootočené o 36° okolo osi závitnice. Na jeden závit závitnice potom pripadá 10 párov báz a krok závitnice sa rovná 3,4 nm. Priemer dvojitej závitnice je približne 2 nm.



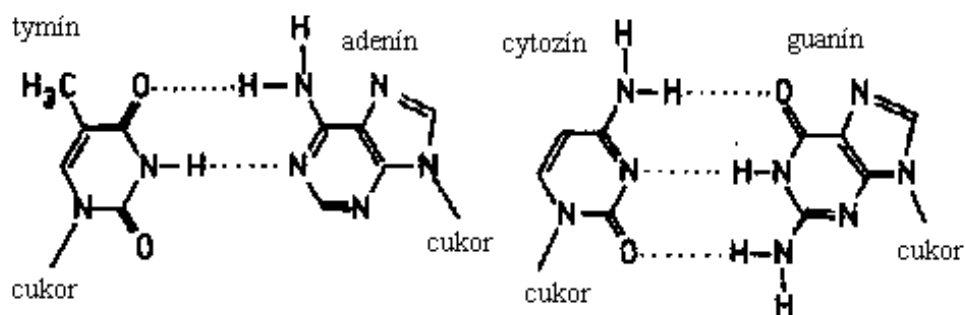
Obr.1.3 Model sekundárnej štruktúry DNA.

Sily stabilizujúce dvojitú závitnicu

Stabilita dvojitej závitnice je zabezpečená rôznymi interakciami, ktoré sú v zásade dvoch typov :

1. *horizontálne interakcie* uskutočňované prostredníctvom vodíkových väzieb medzi bázami ležiacimi v jednej rovine,
2. *vertikálne alebo poschodové interakcie* medzi bázami ležiacimi jedna nad druhou, ktoré sú vyvolané disperznými londonovskými silami a hydrofóbnymi efektami. Pritom sa zabezpečujú Van der Waalsove kontakty medzi atómami a vzniká aj doplnková stabilita v dôsledku prekrývania π - orbitálov atómov

kontaktných báz. Stabilizácii napomáha aj hydrofóbny efekt, prejavujúci sa v tom, že nepolárne bázy sú chránené od bezprostredného kontaktu s rozpúšťadlom, zatiaľ čo sacharidovo - fosfátová kostra s jej polárnymi skupinami a nabitými atómami je exponovaná, čo stabilizuje štruktúru.



Obr.1.4 Vodíkové väzby medzi bázami.

Vodíkové väzby medzi bázami sú dvoch typov ($N - H \dots N$) a ($N - H \dots O$). Vodíkové väzby sa ľahko ohýbajú a roztáhajú, v dôsledku čoho geometria systému nie je stála. Sila a dĺžka väzby závisí od náboja na atómoch, ktoré ju vytvárajú.

Vertikálne interakcie sa vytvárajú v dôsledku ukladania báz nad sebou v tvare stĺpika mincí. Hlavnú úlohu hrajú interakcie medzi stálymi a indukovanými dipólmi. Stály dipól tvoria skupiny ($C = O$) a ($C - NH_2$). Najstabilnejšie sú purín - purínové stĺpiky, potom pyrimidín - purínové a najmenej pyrimidín - pyrimidínové stĺpiky.

1.4 Denaturácia a hybridizácia DNA

Denaturácia (topenie) DNA je proces, pri ktorom dochádza k separácii vlákien dvojitej závitnice DNA. Po denaturácii vznikajú z nukleotidových reťazcov náhodné kľbká. Hlavnými príčinami denaturácie sú:

- vysoká teplota
- nízka koncentrácia stabilizačných iónov s kladným nábojom
- vysoké pH, kyseliny, zásady, alkoholy.

Zvýšenie teploty vyvoláva termickú denaturáciu DNA. Tento proces prebieha pri zvyšovaní teploty dosť prudko a je charakterizovaný teplotou topenia T_m . Pri tejto teplote je (podľa jej definície) 50% molekuly DNA v rozpletenom stave. Hodnota T_m závisí od zloženia molekuly DNA, jej dĺžky a od rozpúšťadla. Čím viac GC párov sa v molekule DNA nachádza, tým vyššia je teplota T_m . Je to spôsobené pevnejšou väzbou medzi G a C (tri vodíkové mostíky), než je väzba medzi A a T (dva vodíkové mostíky). Zo známej

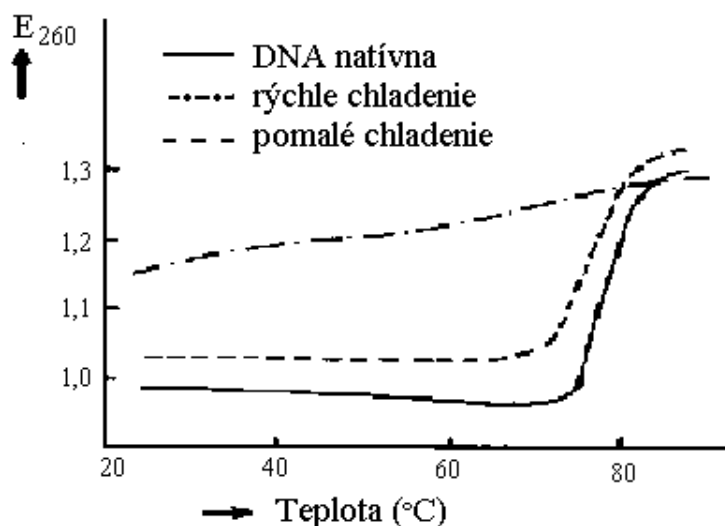
hodnoty T_m možno približne odhadnúť zloženie molekuly DNA (pomer medzi GC a AT páirmi) a naopak, zo známeho zloženia možno vypočítať hodnotu T_m podľa vzťahov :

$$\text{pre roztok DNA v } 0,8 \text{ M NaCl : } T_m = 81,5^\circ\text{C} + 0,41.(\%G + \%C) - 550/n$$

kde n je počet nukleotidov v molekule DNA,

$$\text{a pre vodný roztok bez solí : } T_m = 69,3^\circ\text{C} + 0,41.(\%G + \%C) .$$

Úplná denaturácia spôsobuje úplné oddelenie komplementárnych vlákien. Ak sa roztok denaturovanej DNA prudko schladí, vlákna ostanú oddelené, ak sa teplota znižuje pomaly, môže opäť vzniknúť dvojité závitnice - dochádza k hybridizácii komplementárnych vlákien DNA. Štruktúrnu zmenu sprevádza zníženie viskozity, zvýšenie hustoty, zmena optickej aktivity a zvyšuje sa absorpcia v UV oblasti (obr. 1.5).



Obr. 1.5 Absorpcia svetla v UV oblasti (260nm), pri termickej denaturácii DNA bakteriofága.

2. Biosenzory

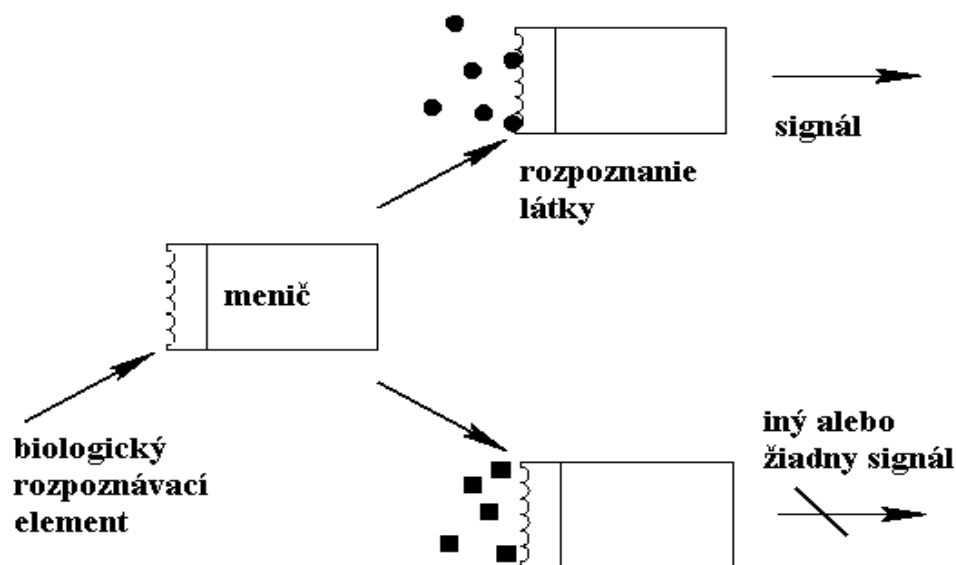
2.1 Definícia biosenzora

Biosenzory sú citlivé snímače, vhodné na detekciu fyzikálno – chemických veličín a látok v biologických prostrediach. Sú to zariadenia, ktoré v sebe zahŕňajú biologický rozpoznávací (senzitívny) element, napojený na fyzikálno – chemický prevodník – signálový menič. V tejto kombinácii sa generujú a prenášajú elektrické signály, ktoré snímajú veľkosť sledovaných veličín, napr. koncentrácie látok. Celý systém je spracovaný tak, aby bol použiteľný bez ďalších elementov a špecifický k cieľovej látke.

Signály z meniča sa ďalej spracúvajú elektronickými obvodmi. Výsledkom takejto kombinácie je schopnosť biosenzorov špecificky a veľmi citlivo určiť spektrum látok v procesoch analýzy v klinických laboratórnych podmienkach, ale aj pri kvasných procesoch, kontrole znečistenia životného prostredia a pod.. Ďalšou výhodou biosenzorov je, že málo ovplyvňujú biologické prostredie, v ktorom pracujú. V porovnaní s konvenčnými metódami na detekciu niektorých veličín môže byť ich použitie aj menej časovo a finančne náročné. Ich nevýhodou je ale menšia časová a mechanická stabilita a náročná príprava.

V biosenzoroch sa využíva priame prepojenie maticovo viazanej bioaktívnej látky, tzv. receptora s elektronickým zariadením na prenos a ďalšie spracovanie signálu. Proces merania – sledovanie požadovanej reakcie receptora a analyzovanej látky, možno na molekulárnej úrovni porovnať s princípom zámok – kľúč. Zabudovaná molekula receptora – “zámok” vytvára s molekulami detekovanej látky – “kľúčom”, komplex, ktorého vznik vyvoláva zmenu sledovaných parametrov – signál. S inými molekulami receptor neinteraguje, alebo zmeny sledovaných parametrov majú iný charakter. Fyzikálno – chemické premeny receptorov zapríčinené interakciou so sledovanou látkou sa detekujú potenciometrickými alebo ampérometrickými elektródami, termistormi, optoelektronickými detektormi, polom riadenými tranzistormi alebo inými zariadeniami a premieňajú sa na výstupný signál vo forme, ktorá môže byť zosilnená, zobrazená a uložená.

Biologické rozpoznávacie elementy možno rozdeliť do dvoch skupín : katalytické, ktoré zahŕňajú enzýmy, mikroorganizmy a rastlinné alebo živočíšne tkanivá, a nekatalytické (afinitné), medzi ktoré patria protilátky, receptory a nukleové kyseliny.



Obr. 2.1 Základná schéma práce biosenzora.

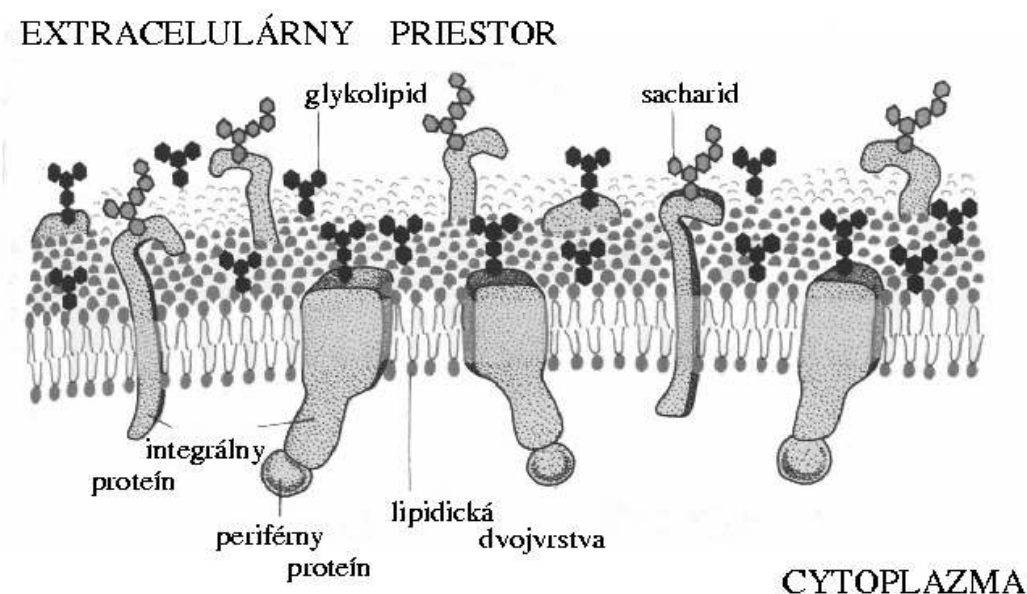
Hlavné problémy v rozvoji biosenzorov vyplývajú z obmedzenej funkčnej stability receptorových komponentov. Ďalej sa požaduje mechanická stálosť, nízky difúzny odpor ako aj neskreslený signál. Na prekonanie týchto problémov sa vyvinuli viaceré metódy pre vzájomne spoľahlivú interakciu jednotlivých zložiek v biosenzoroch. V poslednej dobe sa ako jedno z perspektívnych riešení ukazuje použitie systémov využívajúcich ako maticu na zabudovanie receptorov lipidické vrstvy.

2.2 Biosenzory na báze lipidických vrstiev

Biologické membrány

Lipidická dvojvrstva (BLM) je základná štruktúrna zložka plazmatických membrán buniek. Polárne časti molekúl lipidov v nej smerujú von a nepolárne dovnútra dvojvrstvy. V bunkovej membráne sú prítomné lipidy troch typov : fosfolipidy, cholesterol a glykolipidy. Dvojvrstva lipidov nie je spojitá, pretože je prerušovaná molekulami bielkovín, ktoré možno podľa stupňa ponorenia do dvojvrstvy rozdeliť na integrálne a periférne. Zabudované bielkoviny majú rôzne úlohy – transport, metabolizmus a pod.. Malú časť membrány tvoria sacharidy, ktoré sú umiestnené na vonkajšej strane membrány a sú naviazané buď na bielkoviny (glykoproteíny) alebo lipidy (glykolipidy). Do membrány sú zabudované aj rôzne špecializované makromolekulové komplexy, ktoré majú úlohu receptorov – napr. termoreceptorov, chemoreceptorov, hormonálnych a imunoreceptorov. Membrány sú asymetrické, vrstvy v dvojvrstve sa odlišujú lipidickým a bielkovinovým zložením, čo vyjadruje funkčné rozdiely ich povrchov a umožňuje

orientovaný tok hmoty, energie a informácií cez membránu. Hrúbka membrány je obvykle 6 – 10 nm. (Ottová – Leitmanová, 1993, Chorvát, 1998)



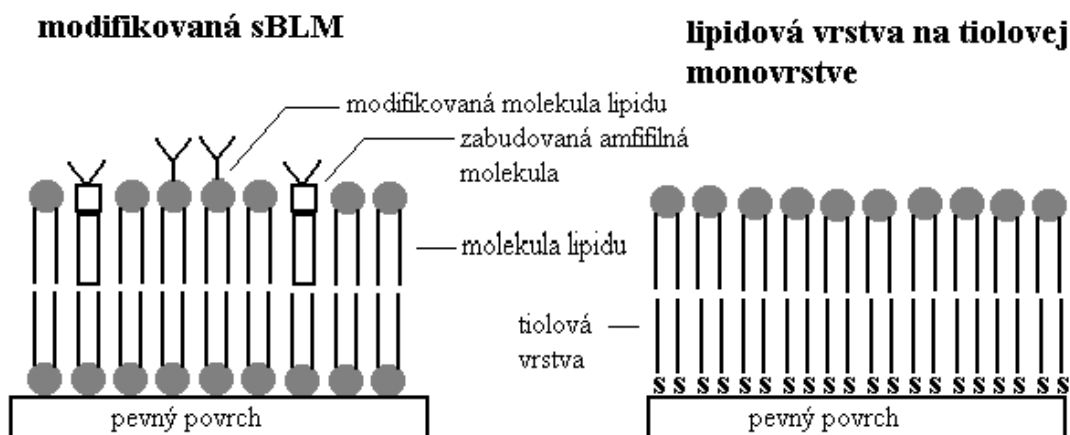
Obr. 2.2 Molekulárne zloženie biomembrány.

Využitie lipidických vrstiev na tvorbu biosenzorov

Koncept lipidickej vrstvy ako základnej zložky biomembrány sa stal všeobecne známy v 50. rokoch 20. storočia. Intenzívny rozvoj výskumu týchto systémov sa začal v 60. rokoch, po tom, čo sa Muellerovi a spol. v r. 1962 po prvý krát podarilo vytvoriť stabilnú lipidickú dvojvrstvu (BLM) nanosením lipidického roztoku na malý kruhový otvor v teflónovej priehradke ponorenej v elektrolyte. Ukázalo sa, že BLM je možné modifikovať – zabudovať do nich rôzne makromolekuly – receptory, iónové kanály a pripraviť BLM s vlastnosťami podobnými biologickej membráne. Zabudovanie rôznych funkčných komplexov do lipidickej vrstvy umožňuje amfifilná povaha molekúl lipidov. Rôzne iné amfifilné molekuly sa do BLM ukotvujú na základe hydrofilných a hydrofóbnych interakcií, svojimi nepolárnymi časťami penikajú do vnútra a polárnymi do povrchu BLM. Proces imobilizácie býva väčšinou samovolný a prebieha pri normálnych podmienkach.

Ďalší výskum BLM zameraný na možnosť ich použitia na určovanie rôznych parametrov v biologickom prostredí ukázal, že BLM sú biokompatibilné štruktúry vhodné pre vývoj nových typov elektrochemických senzorov a biosenzorov. V roku 1989 Tien a Salomon vynali nový spôsob prípravy lipidických dvojvrstiev - na kovovom povrchu. Ďalej boli vyvinuté metódy na prípravu BLM na rôznych pevných povrchoch, napr. na

agare, alebo vodivých polyméroch a metódy na prípravu lipidických vrstiev formovaných na zlate či platine pokrytej monovrstvou z alkánltiolu či merkaptoundekanolu. Pre lipidické membrány na pevnom povrchu sa používa označenie sBLM.



Obr. 2.3 Shématické znázornenie lipidických vrstiev na pevných povrchoch.

Organické vrstvy na pevných podkladoch sú relatívne časovo aj mechanicky stabilné štruktúry. Ich životnosť býva až niekoľko dní (v prípade klasických BLM niekoľko hodín) a znášajú elektrické napätie do 1,5 V (BLM strácajú stabilitu pri 100 - 300mV). sBLM boli skúmané v súvislosti s ich použitím pre prípravu biosenzorov, ako napr. iónový enzymatický senzor na detekciu glukózy, niektorých toxínov, imunosenzorov (*Hianik a spol., 1999*) a sú v tomto smere predmetom intenzívneho výskumu.

Výhodné vlastnosti sBLM ich umožňujú použiť ako matricu na zabudovanie receptorov, funkčné filtre či súčasť prevodníka na transformáciu signálu pri tvorbe biosenzora. (*Hianik 1998*)

3. Metódy detekcie DNA pomocou hybridizácie

Metódy na detekciu konkrétnych sekvencií nukleotidov v DNA využívajúce hybridizáciu, patria v súčasnosti medzi najviac skúmané a rozvíjané metódy na riešenie tohto problému. Sú založené na schopnosti hybridizácie navzájom komplementárnych jednonit'ových vlákien DNA – jvDNA (jedno vláknová DNA), pričom z nich vzniká duplex – dvojité závitnica DNA – dvDNA (dvoj vláknová DNA), prípadne môžu tvoriť triplex.

Ide tu teda o princíp zámok – kľúč. Vlákna jvDNA bývajú súčasťou senzorickej časti detekčného systému, ktorý sa dostáva do kontaktu so skúmanou vzorkou. Ak sa vo vzorke nachádzajú k nim vlákna komplementárne, dochádza za vhodných podmienok k ich hybridizácii – vzniká dvDNA. Tento proces spôsobuje zmeny merateľných parametrov senzora (vznik signálu).

Metódy na sledovanie hybridizácie DNA sa dajú rozdeliť na dve skupiny :

- metódy využívajúce rôzne značky – rádioaktívne, fluorescenčné či enzýmové
- metódy bez použitia značiek.

Pri metódach používajúcich značky, sa takouto značkou označia jvDNA vlákna v skúmanej vzorke. Po interakcii senzora so skúmanou vzorkou, je možné, ak došlo k hybridizácii, pozorovať prítomnosť použitej značky. Ich nevýhodou je však časová náročnosť a obmedzenosť použitia na špecializované laboratória.

Predmetom ďalšieho záujmu v tejto práci budú ďalej metódy bez použitia značiek. Patria medzi ne hlavne metódy využívajúce elektrochemické, optické, a nanogravimetrické techniky.

3.1 Spôsoby prípravy DNA senzorov, imobilizácia jvDNA na pevný povrch

Dôležitým krokom pri vývoji biosenzora na detekciu sekvencií DNA pomocou hybridizácie, je vyriešenie problému naviazania vlákien jvDNA na aktívny povrch senzora. Použitý spôsob imobilizácie jvDNA musí zabezpečiť dostatočne stabilnú väzbu, umožniť kontakt medzi imobilizovanými a k nim komplementárnymi vláknami v analyzovanej vzorke a musí umožňovať vznik a prenos signálu v súvislosti s použitou detekčnou technikou.

Výhodné a v súčasnosti vo viacerých prácach s obľubou používané sú hladké povrchy ušľachtilých kovov, hlavne zlata a platiny. Takýto povrch býva ďalej modifikovaný a naviazanie jvDNA môže byť realizované vo všeobecnosti týmito spôsobmi :

- priamou kovalentnou väzbou modifikovanej jvDNA na kovový povrch (používa sa napr. sírou zakončené vlákno jvDNA, kovalentná väzba S - Au)
- ukotvenie modifikovanej jvDNA do lipidickej vrstvy (*Nikolelis, 1997*)
- ukotvenie pomocou modifikácie jvDNA molekulou s veľkou afinitou k molekule imobilizovanej na povrchu (používa sa napr. systém avidín – biotín).

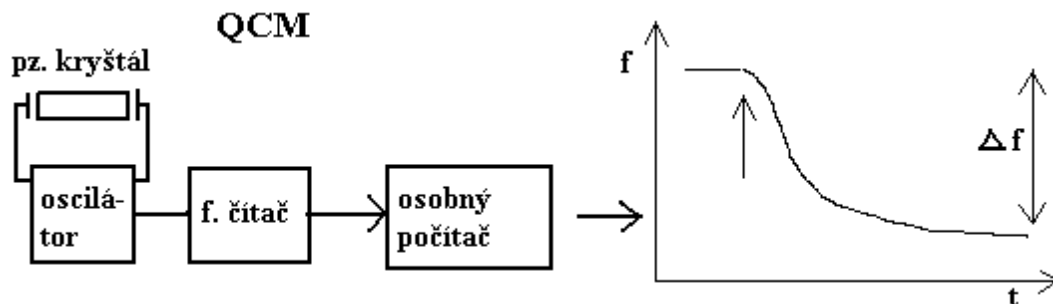
Modifikácia jvDNA alebo dvDNA vlákien tiolovou skupinou (SH) patrí medzi najpoužívanejšie spôsoby na naviazanie týchto vlákien na kovový povrch. Medzi niektorými kovmi (často sa používa zlato) a sírou vzniká pevná a stabilná kovalentná väzba. Naviazanie sírou modifikovanej DNA (S – DNA) na kovový povrch prebieha samovoľne, po ponorení povrchu do roztoku S – DNA alebo kvapnutí jeho malého množstva na povrch (*Yang a spol.,1998*).

Množstvo naviazaných molekúl jvDNA alebo dvDNA na povrch a hustotu jeho pokrytia je možné sledovať napr. pomocou nanogravimetrických metód (*Yang a spol.,1998, Caruso a spol.,1997*), alebo cyklickej voltametrie (*Steel a spol.,1998*)

3.2 Techniky na sledovanie imobilizácie na pevný povrch a hybridizácie DNA

Nanogravimetrické metódy - QCM

Senzorické zariadenia pracujúce na princípe QCM (Quartz Crystal Microbalance), využívajú piezoelektrický kremenný kryštál s aktívnym povrchom a sledovaným parametrom je frekvencia kmitania kryštálu. Povrch kryštálu slúži ako aktívny povrch biosenzora, a dostáva sa do kontaktu so skúmanou vzorkou. Je upravený tak, aby dochádzalo k afinitným interakciám s analyzovanou látkou, čo spôsobuje zmenu hmotnosti kryštálu. Zvýšenie resp. zníženie hmotnosti kryštálu sa prejaví znížením resp. zvýšením frekvencie kmitania piezoelektrického kryštálu. Metóda QCM umožňuje sledovať kinetiku afinitných reakcií a určovať hmotnosť a počet naviazaných molekúl. Pracovné frekvencie v bežne používaných QCM zariadeniach sú rádovo v MHz a sledované zmeny sú rádovo od jednotiek Hz. Detekčné limity môžu byť až pikogramy.



Obr. 3.1 Schéma QCM aparatury a typický výstupný signál – zmena frekvencie po interakcii s analyzovanou látkou (ktorej dodanie je znázornené šípkou).

V práci *Carusa a spol. (1997a)* bol použitý spôsob imobilizácie jvDNA na zlatý povrch QCM kryštálu pomocou afinitnej interakcie medzi avidínom a biotínom. Zlatý povrch kryštálu bol modifikovaný avidínom (na Au bola najprv naviazaná kyselina 3,3'-ditiopropiónová, na ktorú bol ďalej naviazaný avidín) a vlákno jvDNA s dĺžkou 30 nukleotidov bolo na jednom konci modifikované biotínom. Po naviazaní biotín-jvDNA vlákna na povrch bola sledovaná reakcia na dodanie komplementárneho resp. nekomplementárneho reťazca. Po dodaní komplementárneho vlákna do roztoku s QCM kryštálom nasledovala výrazná odozva (zmena frekvencie), ktorá sa ustálila do 5 min.. Odozva po dodaní nekomplementárneho vlákna pri rovnakých podmienkach, bola nepatrná.

Imobilizácia sírou modifikovaných oligonukleotidov na zlatý povrch a rozdiely v hybridizácii krátkych a dlhých vlákien DNA na zlatom povrchu boli študované v ďalšej práci z toho istého laboratória (*Caruso a spol. z r. 1997b*). Kratšie jvDNA vlákna mali dĺžku 21 nukleotidov a na jednom konci boli modifikované tiolovou (SH) skupinou. Po ich naviazaní na povrch QCM kryštálu bola pozorovaná výrazná odozva pri interakcii s komplementárnym vláknom (koncentrácia 0,5µg/ml), ktorá sa ustálila v priebehu 30 min., v protiklade s nulovou odozvou pri interakcii s nekomplementárnym vláknom. Ďalej bola študovaná imobilizácia dvDNA vlákna dĺžky 7200 nukleotidov ktoré bolo modifikované dvomi spôsobmi – štyrmi alebo päťdesiatimi koncovými α -fosfotionukleotidmi. Pri QCM meraní sa ukázalo, že množstvo imobilizovaných dvDNA vlákien na povrchu kryštálu (po jeho ponorení v dvDNA roztoku) bolo podobné pri oboch typoch modifikácie a hustota pokrytia zodpovedala horizontálnemu usporiadaniu dvDNA vlákien na povrchu. Po ponorení kryštálu s naviazanou dvDNA na 10 min. do vody s teplotou 65°C s následným prudkým ochladením sa predpokladala denaturácia

dvDNA vlákien. Malá zmena frekvencie pri QCM meraní tento predpoklad nepotvrdila a ani interakcia s komplementárnym jvDNA vláknom nevyvolala očakávanú odozvu. Problém hybridizácie dlhých jvDNA vlákien sa nepodarilo vyriešiť ani pomocou použitia jvDNA vlákna získaného samostatnou denaturáciou pôvodnej dvDNA. Po jeho naviazaní na povrch síce bola pozorovaná polovičná zmena hmotnosti v porovnaní s dvDNA, ale pri interakcii s komplementárnym jvDNA vláknom neboli pozorované zmeny zodpovedajúce hybridizácii, čo môže byť vysvetlené vzájomnými prekrytiami a slučkovitým usporiadaním dlhých jvDNA vlákien na povrchu kryštálu, čo zabraňuje hybridizácii.

Výsledky získané v nasledujúcej práci poukazujú na to, že problém denaturácie 7200 nukleotidov dlhého dvDNA vlákna naviazaného na pevný povrch mohol byť v jeho dĺžke, alebo nedostatočných podmienkach pre denaturáciu. V práci *Yanga a spol., (1998)*, bolo použité 718 nukleotidov dlhé dvDNA vlákno, na jednom konci modifikované SH skupinou. Zmeny frekvencie po jeho naviazaní na Au povrch QCM kryštálu zodpovedali povrchovej hustote $4,6 \times 10^{11}$ molekúl/cm². Zmeny po denaturácii (ponorenie do NaOH alebo 90°C teplej vody) zodpovedali strate 50% povrchovej hmotnosti kryštálu, teda 100% denaturácii dvDNA vlákien na povrchu QCM kryštálu.

Elektrochemické metódy

Podobný spôsob imobilizácie jvDNA na zlatý povrch – príprava DNA senzora, ako v mojej práci, bol použitý aj v práci *Steela a spol., (1998)*. Ako jvDNA vlákno bol použitý oligonukleotid obsahujúci 25 rôznych nukleotidov, na jednom konci modifikovaný SH skupinou. Pomocou chronocoulometrie bola študovaná závislosť povrchovej hustoty naviazaných S - jvDNA vlákien od času deponácie v ich 1μM roztoku a následne úroveň hybridizácie v závislosti od tejto hustoty. Na vyplnenie medzier medzi naviazanými S - jvDNA vláknami na Au povrchu bol použitý 6 - mercapto 1 - hexanol (1 hod v 1mM roztoku). Pomocou chronocoulometrie s použitím ruténium hexaamínu (3+/2+) ako redoxnej značky sa zistilo, že povrchová hustota S – jvDNA prudko rastie počas prvých 40 min. deponácie, ďalej narastá pomaly a po niekoľkých hodinách sa už prakticky nemení. Prehľad týchto zmien je v tabuľke 3.1.

Tabuľka 3.1 Závislosť povrchovej hustoty naviazaných S – jvDNA molekúl na zlatom povrchu senzora od času deponácie.

Čas deponácie / min.	1	10	40	240
hustota / molekúl $\times 10^{12}$ / cm ²	2,2	4	5	6

(hodnoty sú približné, odčítané z grafu v *Steel 1998*)

Pri sledovaní hybridizácie bol senzor ponorený na 1 hod. do 1 μ M roztoku komplementárneho oligonukleotidu pri teplote 35°C a ďalej bola sledovaná povrchová hustota naviazaného komplementárneho vlákna v závislosti od hustoty S – jvDNA. Ku 100% hybridizácii dochádzalo pri povrchovej hustote S – jvDNA do 4 $\times 10^{12}$ molekúl / cm², pri vyššej hustote efektívnosť hybridizácie klesá. Tieto výsledky, získané pomocou chronocoulometrie sú v súlade s údajmi z iných prác, s použitím povrchovej plazmovej rezonancie alebo metód využívajúcich rádioaktívne značenie.

Medzi prvé práce, využívajúce naviazanie jvDNA na povrch lipidickej vrstvy na pevnom podklade (sBLM) a sledovanie hybridizácie pomocou merania zmien vodivosti jednosmerného elektrického prúdu, patrí práca *Nikolelisa a spol, (1997)*. Lipidická dvojvrstva (sBLM) bola v tomto prípade vytvorená na povrchu strieborného drôtika, ktorý bol ponorený do elektrolytu a použitý ako pracovná elektróda. Ďalej bol sledovaný proces imobilizácie oligonukleotidu dT₂₀ - C₁₆ (dT₂₀ vlákno na jednom konci modifikované uhl'ovodíkovým reťazcom C₁₆) na povrch sBLM. Tento proces (po vstreknutí dT₂₀ - C₁₆ do elektrolytu) bol sprevádzaný nárastom vodivosti sBLM, v závislosti od koncentrácie dT₂₀ - C₁₆ (0 až 25 ng/ml). Podobný nárast vodivosti nasledoval aj po ďalšom dodaní komplementárneho vlákna dA₂₀ (0 až 15 ng/ml), pričom systém sa po 10 až 20 min. dostal do pôvodného stavu, ako pred dodaním dT₂₀ - C₁₆. Úroveň odozvy na dodanie dT₂₀ - C₁₆ aj dA₂₀ bola závislá od ich koncentrácie a nebola pozorovaná odozva pri interakcii s nekomplementárnym vláknom.

Cieľ práce

Cieľom tejto práce, je pomocou sledovania zmien vodivosti preštudovať možnosť pozorovania hybridizácie krátkych oligonukleotidov, imobilizovaných na povrch zlatej elektródy týmito spôsobmi:

- ukotvením cholesterolom modifikovaných oligonukleotidov do lipid – alkántiolovej vrstvy, vytvorenej na povrchu zlatej elektródy

- priamym naviazaním oligonukleotidov na povrch zlatej elektródy pomocou ich modifikácie:

- SH skupinou na jednom konci

- SH skupinou na oboch koncoch reťazca

a zhodnotiť možnosť použitia tejto metódy a študovaných štruktúr pre detekciu špecifických sekvencií nukleotidov v DNA.

5. Výsledky a diskusia

Predmetom záujmu pri tvorbe DNA senzora, bola charakteristika jednotlivých úrovní modifikácie zlatého povrchu, teda hodnoty elektrického odporu R pracovnej elektródy pri jednosmernom prúde, elektródového potenciálu U_v pracovnej elektródy (PE) voči referenčnej Ag/AgCl elektróde (RE), a schopnosť špecifickej odozvy vytvoreného senzora na prítomnosť rôznych koncentrácií komplementárneho resp. nekomplementárneho oligonukleotidu v elektrolyte.

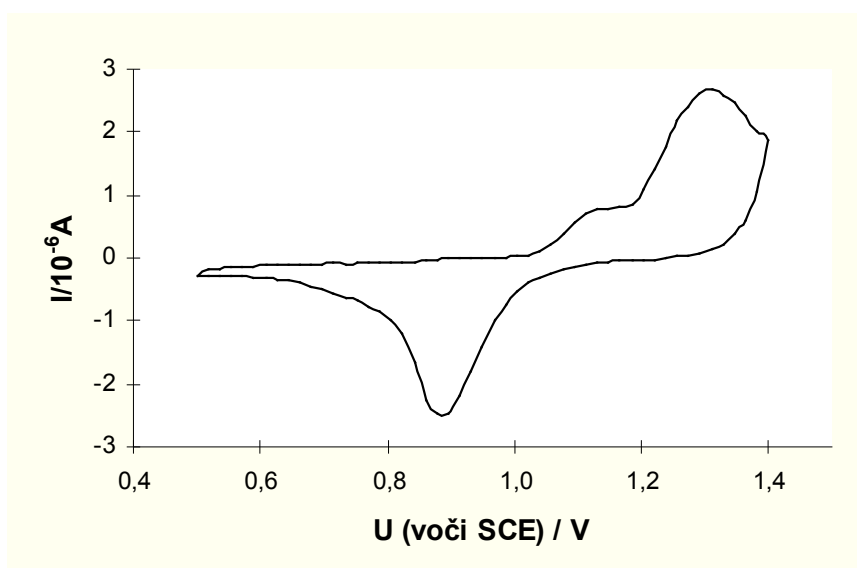
Ďalej uvádzané hodnoty merného odporu R_m zodpovedajú nameraným hodnotám prúdu I pri napätí $U_k = 100\text{mV}$ (na PE voči RE), prepočítaným na jednotku plochy (cm^2), podľa vzťahu: $R_m = (U_k / I) \cdot S$, kde S je plocha pracovnej elektródy, $S = 0,0043\text{ cm}^2$.

U_v predstavuje hodnotu napätia na PE voči RE, po jeho ustálení, behom 5 - 7 minút po spustení merania.

Výsledky sú uvádzané v tvare: $X = x \pm sd$ kde x je priemerná hodnota veličiny X a sd je štandardná odchýlka. V tabuľkách je v stĺpci n uvádzaný počet meraní, z ktorých boli tieto hodnoty vypočítané.

Zlatý povrch, nemodifikovaná elektróda.

Cyklická voltametria bola súčasťou čistenia a prinášala tiež prvú informáciu o zlatej elektróde. Typický voltamogram používaných Au elektród je na obr. 5.1. Pri zvyšovaní napätia na zlatej elektróde, je zlatý povrch oxidovaný, čo sa na voltamograme prejavuje



Obr. 5.1 Typický voltamogram zlatej elektródy v 0,2 M H_2SO_4 , pri 100 mV/s.

prítomnosťou oxidačného píku pri napätí okolo 1.1V, pri následnom znižovaní napätia dochádza k jeho redukcii, čomu zodpovedá redukčný pík v oblasti okolo 0.9V. Takýto tvar voltamogramu bol podmienkou pre ďalšie použitie zlatej vrstvy.

Merný odpor zlatých vrstiev pri napätí 100mV, v elektrolyte E2 (0,1M NaF + 10mM Tris-HCl + 1mM EDTA, pH = 7,6) bol :

$$R_m = (10,7 \pm 1,9) \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2.$$

Potenciálový rozdiel medzi zlatou a referenčou Ag/AgCl elektródou v elektrolyte E2 bol :

$$U_v = (51 \pm 18) \text{ mV}.$$

Aj napriek rovnakým podmienkam pri príprave a čistení Au vrstiev dochádza k odchýlkam R_m a U_v medzi jednotlivými Au vrstvami. Príčinou je pravdepodobne znečistenie niektorých vrstiev, asi prachovými časticami, vo fáze medzi ich očistením uvedeným postupom a ďalším použitím pri experimentoch. Pri manipulácii môžu byť vrstvy tiež mechanicky poškodené. Tieto chyby nie sú voľným okom viditeľné a nemusia sa prejaviť pri cyklickej voltametrii, majú však väčší vplyv pri vytváraní statického potenciálového rozdielu medzi PE a RE.

5.1 Imobilizácia jvDNA priamou väzbou na zlatý povrch

Sytém Au + HS - N + MUA

Au + HS - N

Naviazanie oligonukleotidu HS - N na zlatý povrch, sa prejavuje posunom U_v do záporných hodnôt. Pre takto modifikovanú zlatú elektródu je :

$$U_v = (-70 \pm 57) \text{ mV}.$$

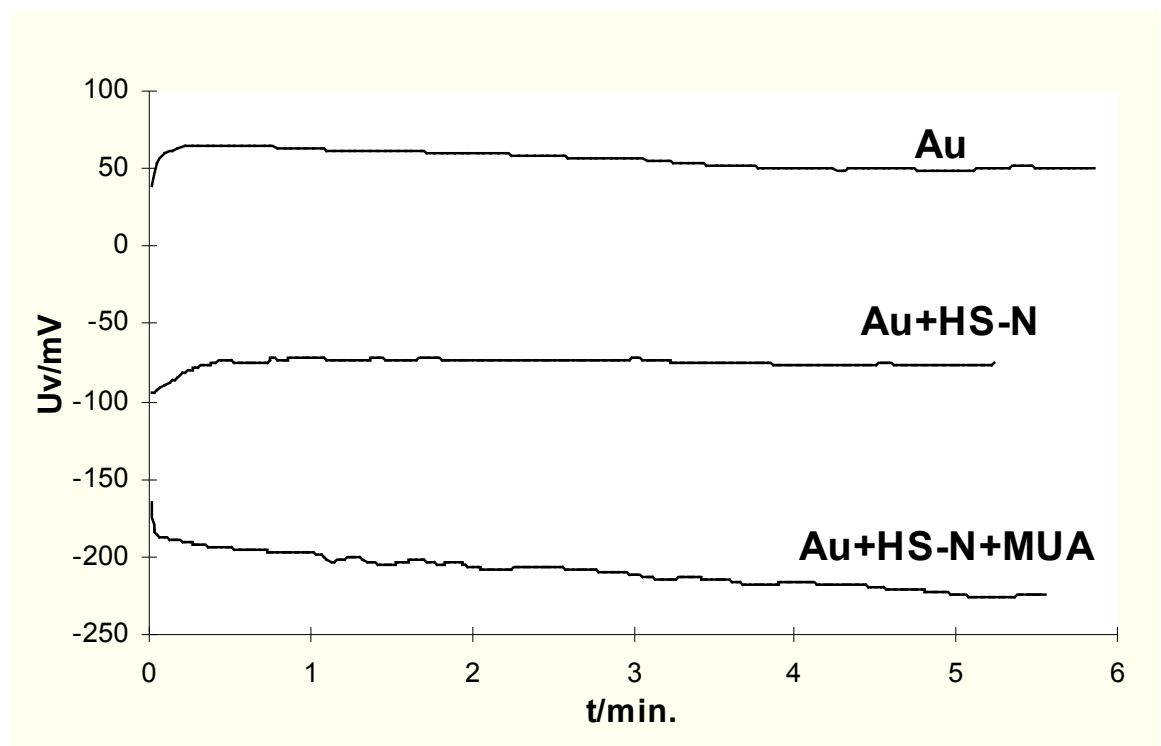
Cukor - fosfátová kostra molekuly DNA (aj jvDNA) býva v roztoku pri neutrálnom pH nabitá záporne (O^-). Naviazanie záporne nabitého oligonukleotidu na povrch zlatej vrstvy tak pravdepodobne vysvetľuje záporné U_v takto modifikovanej elektródy.

Vytvorením jvDNA monovrstvy na Au povrchu dochádza ku zvýšeniu jeho odporu o dva rády : $R_m = (520 \pm 390) \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$.

Au + HS - N + MUA.

Po vyplnení medzier medzi molekulami HS - N naviazanými na Au povrchu molekulami MUA je, usporiadanie molekúl na povrchu hustejšie a dochádza ku zvýšeniu

odporu : $R_m = (5,2 \pm 5,2) \text{ M}\Omega.\text{cm}^2$. Naviazanie MUA tiež spôsobuje, že pracovná elektróda sa stáva oproti referenčnej ešte viac zápornejšou : $U_v = (-208 \pm 85) \text{ mV}$. Molekulu MUA možno považovať za elektrický dipól : $\text{HS}^- - \text{R}^+$, kde záporným pólom je molekula síry S^- a kladným zvyšok uhl'ovodíkového reťazca R^+ zakončený COOH skupinou. Vytvorenie dipólovej vrstvy so záporným pólom na zlatom povrchu sa prejavuje ďalším posunom U_v do záporných hodnôt. Zmeny U_v pri jednotlivých úrovniach modifikácie zlatej elektródy je vidno v obr. 5.2. Porovnanie zmien R_m a U_v je v tabuľke 5.1.



Obr. 5.2 Zmeny napätia U_v na pracovnej elektróde, pri jednotlivých úrovniach jej modifikácie.

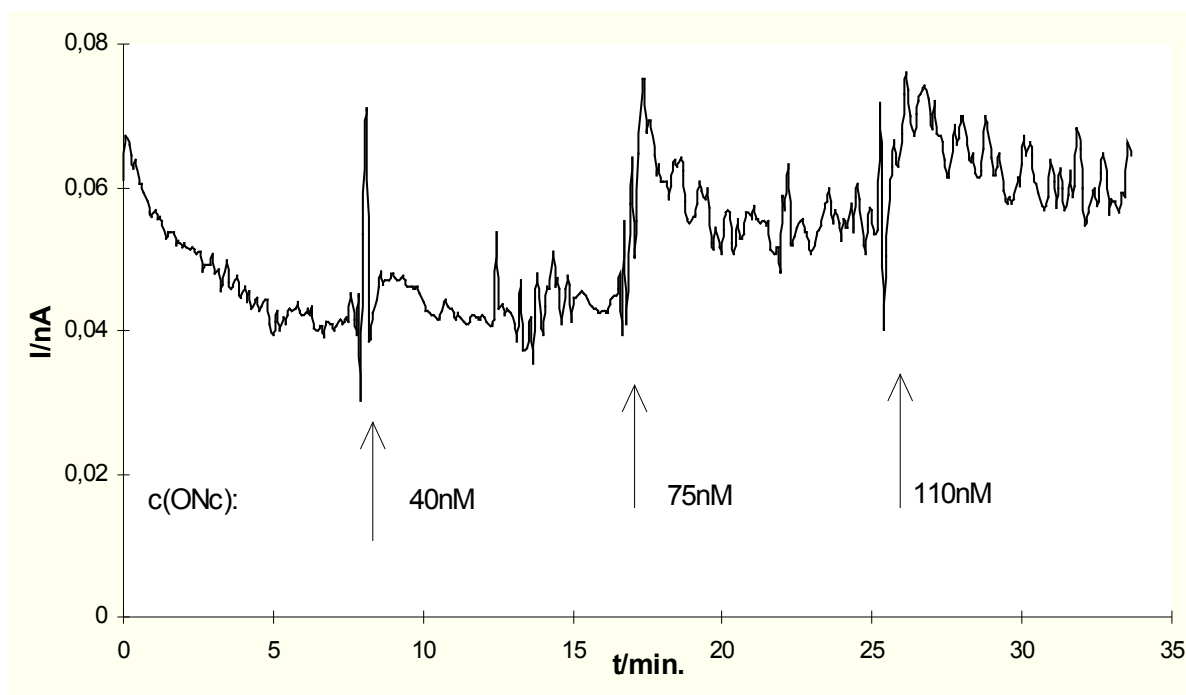
Tabuľka 5.1 Zmeny R_m a U_v pri modifikácii zlatej elektródy.

vrstva	$R_m/\text{k}\Omega.\text{cm}^2$	n	U_v/mV	n
Au	$10,7 \pm 1,9$	4	51 ± 18	6
Au + HS - N	520 ± 390	9	-70 ± 57	11
Au + HS - N + MUA	5200 ± 5200	9	-208 ± 85	15

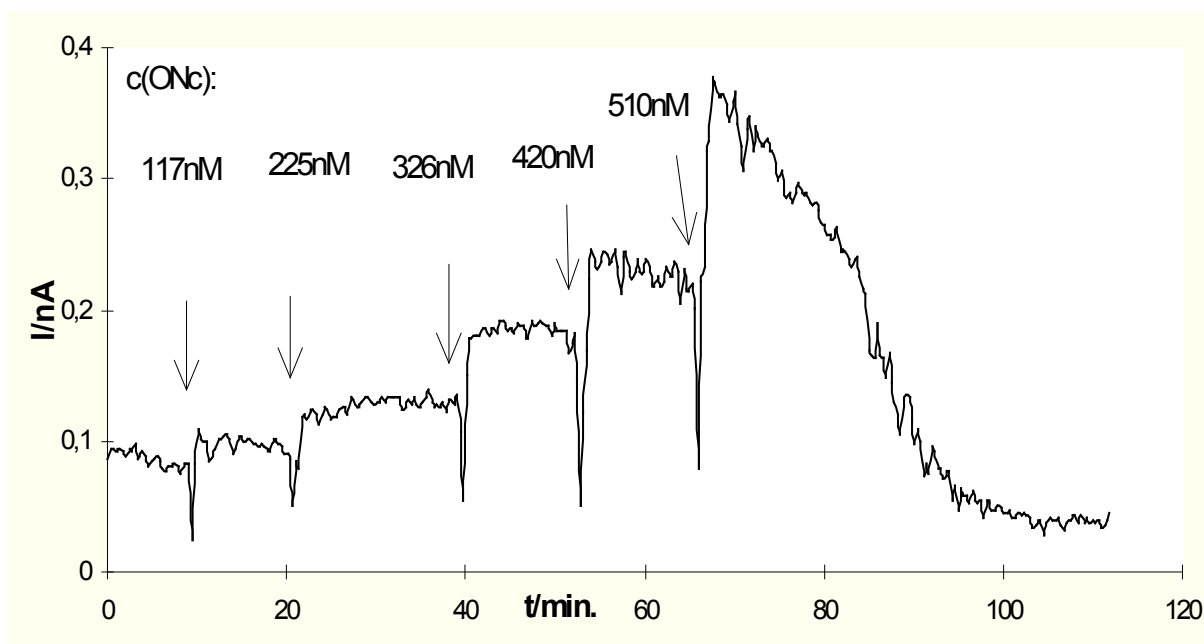
Hybridizácia

Uvedený systém Au + HS - N + MUA reaguje na dodanie komplementárneho vlákna do elektrolytu nárastom vodivosti. Odozvu je možné pozorovať už pri koncentrácii ONc od 40nM, pričom úroveň odozvy (veľkosť zmeny prúdu) je tým väčšia, čím je väčšia zmena koncentrácie ONc po jeho dodaní do elektrolytu. K zvýšeniu vodivosti dochádza už po približne desiatich sekundách po dodaní roztoku ONc do elektrolytu a k nárastu prúdu na maximálnu hodnotu dochádza behom 1 - 3 min. Pri nízkych koncentráciách, Po dosiahnutí maximálnej odozvy väčšinou nastáva proces relaxácie – systém sa pomaly vracia skoro do pôvodného stavu. Tento proces je výrazný hlavne v oblasti nízkych koncentrácií ONc, okolo 40nM a vysokých, nad 400nM. Príklady reakcie na dodanie komplementárneho oligonukleotidu ONc do elektrolytu predstavujú obr 5.3 a 5.4.

Výrazné, niekoľko sekúnd trvajúce zmeny prúdu (viditeľné v predchádzajúcich aj niektorých nasledujúcich obr.), sú spôsobené porušením rovnováhy systému otvorením faradayovej kľetky a dodaním roztoku oligonukleotidu do elektrolytu.

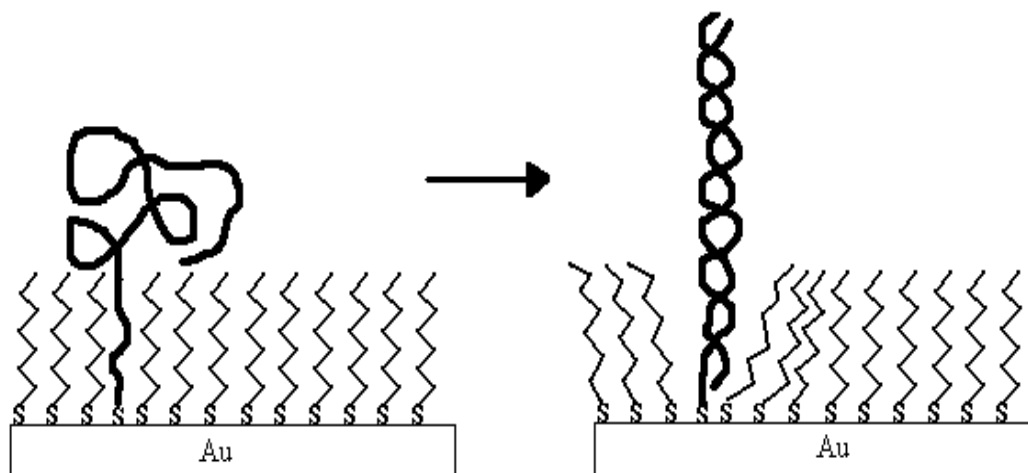


Obr. 5.3 Príklad odozvy systému Au + HS - N + MUA na zvyšovanie koncentrácie komplementárneho vlákna ONc v elektrolyte.



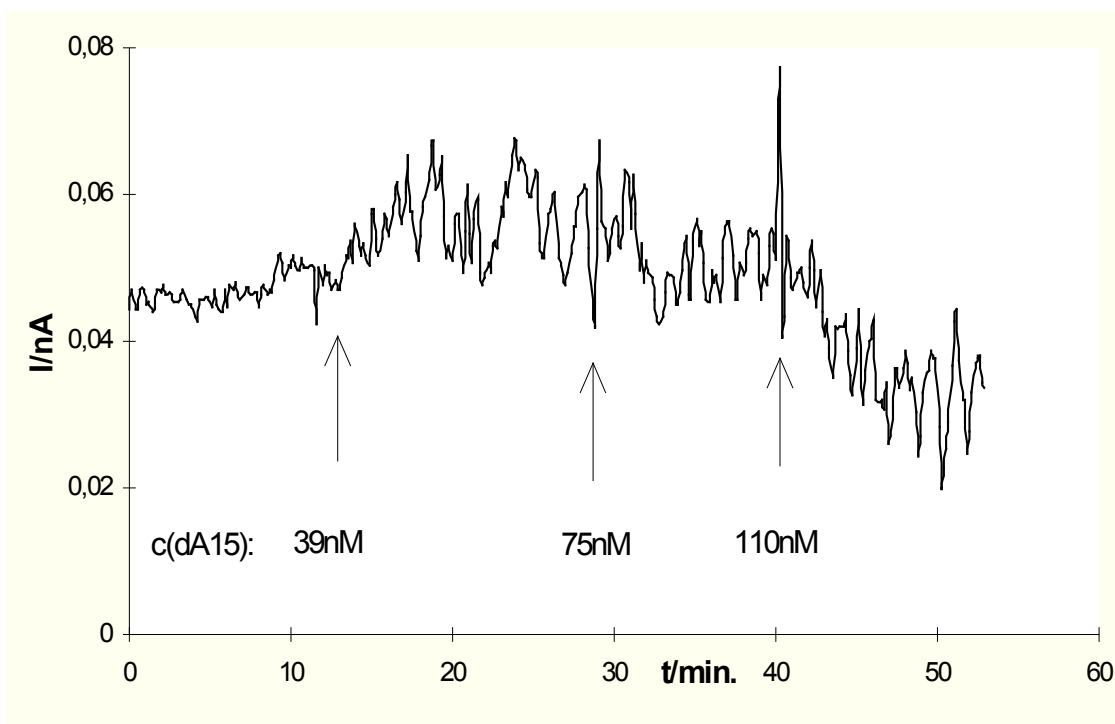
Obr. 5.4 Príklad odozvy systému Au + HS - N + MUA na vyššie koncentrácie komplementárneho vlákna ONc v elektrolyte.

Mechanizmus interakcie komplementárnych oligonukleotidov na povrchu senzora tohto typu a s ním spojený nárast vodivosti tohto systému zatiaľ nie je dostatočne preskúmaný. Nárast vodivosti senzora pri hybridizácii si vysvetľujem nasledujúcim spôsobom. JvDNA vlákno je v porovnaní s dvDNA vláknom oveľa ohybnejšie. Takéto vlákna, naviazané na povrchu senzora pravdepodobne z neho netrčia kolmo, ale tvoria štatistické kľbká, ktoré pokrývajú povrch senzora. Pri hybridizácii vznikajú dvojité závitnice dvDNA, ktoré sú rovné, kolmé na povrch senzora a zaberajú tak na povrchu menej miesta. Je tomu tak v dôsledku značnej perzistentnej dĺžky dvojitej závitnice DNA, približne 50 nm (Mag a spol., 2000). V dôsledku elektrostatických interakcií medzi molekulou dvDNA a okolitými molekulami MUA tiež môže dochádzať k ich odpudzovaniu a rozširovaniu medzery medzi nimi. Takto vznikajú podmienky pre ľahšiu výmenu elektrického náboja medzi zlatým povrchom a elektrolytom. Túto hypotézu znázorňuje obr. 5.5. Pokles vodivosti senzora pri vysokej koncentrácii ONc (obr. 5.4) je pravdepodobne spôsobený nešpecifickými interakciami medzi vláknom ONc a povrchom senzora. Pri jeho vysokej koncentrácii možno tiež dochádza k tvorbe zložitejších komplexov (napr. triplexov DNA) na povrchu senzora a zablokovaniu vodivých miest.



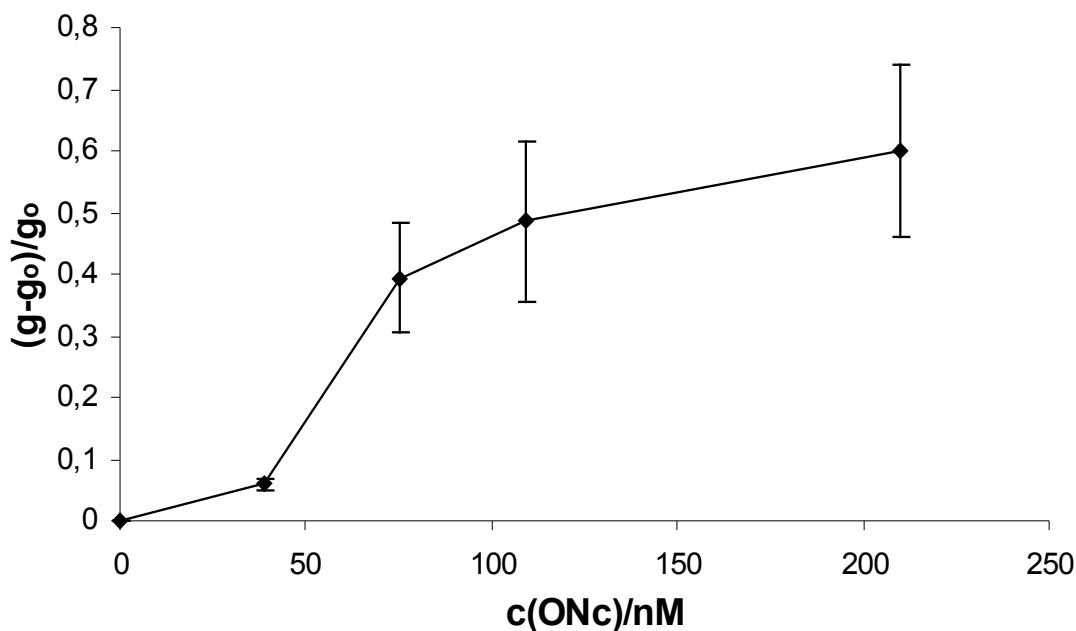
Obr. 5.5 Predstava o usporiadaní molekúl jvDNA a dvDNA na povrchu senzora, ktorá vysvetľuje zvýšenie vodivosti po hybridizácii.

Pri interakcii s nekomplementárnym vláknom dA15 senzor na dodanie dA15 buď nereagoval, alebo dochádzalo ku krátkodobému nárastu alebo poklesu vodivosti a zvýšeniu šumov. Tieto zmeny mali nepravidelný a nestály charakter. Príkladom takejto reakcie senzora na dodanie nekomplementárneho vlákna dA15 do elektrolytu je na obr. 5.6.



Obr. 5.6 Príklad odozvy systému Au + HS - N + MUA na zvyšovanie koncentrácie nekomplementárneho vlákna dA15 v elektrolyte.

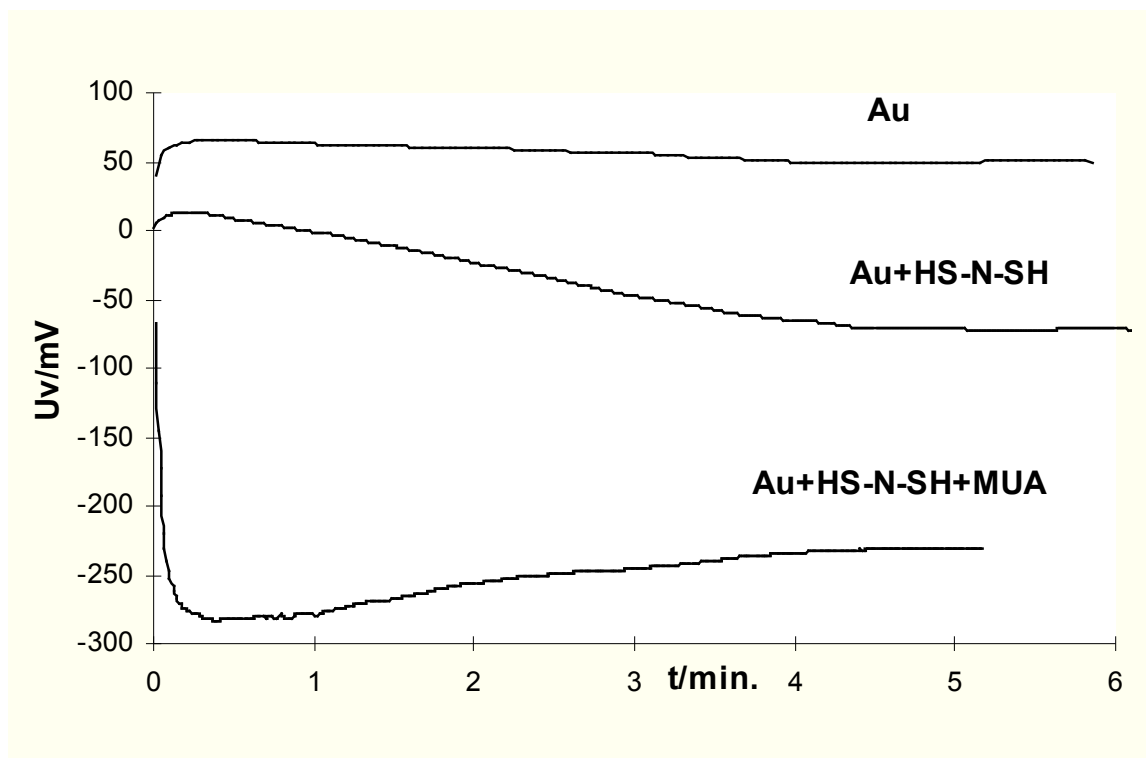
Odozva senzora na zmenu koncentrácie komplementárneho vlákna sa dá vyjadriť pomocou relatívnej zmeny vodivosti : $(g - g_0) / g_0$, kde hodnota g_0 je vodivosť senzora pri nulovej koncentrácii komplementárneho vlákna v elektrolyte, g je vodivosť po zvýšení jeho koncentrácie. Závislosť relatívnej zmeny vodivosti senzora Au + HS – N + MUA od koncentrácie ONc znázorňuje obr. 5.7.



Obr. 5.7 Závislosť relatívnej zmeny vodivosti senzora Au + HS – N + MUA od koncentrácie komplementárneho vlákna ONc. Stredné hodnoty a ich štandardné odchýlky boli určené z 3 - 4 meraní.

Sytém Au + HS – N – SH + MUA.

Pri vytváraní tohto typu senzora, dochádza pri modifikácii zlatej elektródy k podobnej zmene parametrov U_v a R_m ako pri systéme Au + HS – N + MUA. Prehľad týchto zmien je v tabuľke 5.2 a zmeny potenciálového rozdielu medzi pracovnou a Ag/AgCl elektródou pri modifikácii Au elektródy je vidno na obr. 5.8.



Obr. 5.8 Zmeny napätia na pracovnej elektróde, pri jednotlivých úrovniach jej modifikácie.

Tabuľka 5.2.

vrstva	$R_m/k\Omega.cm^2$	n	Uv/mV	n
Au	$10,7 \pm 1,9$	4	51 ± 18	6
Au + HS – N – SH	1550 ± 560	6	-98 ± 49	9
Au + HS – N – SH + MUA	3870 ± 3600	6	-215 ± 57	9

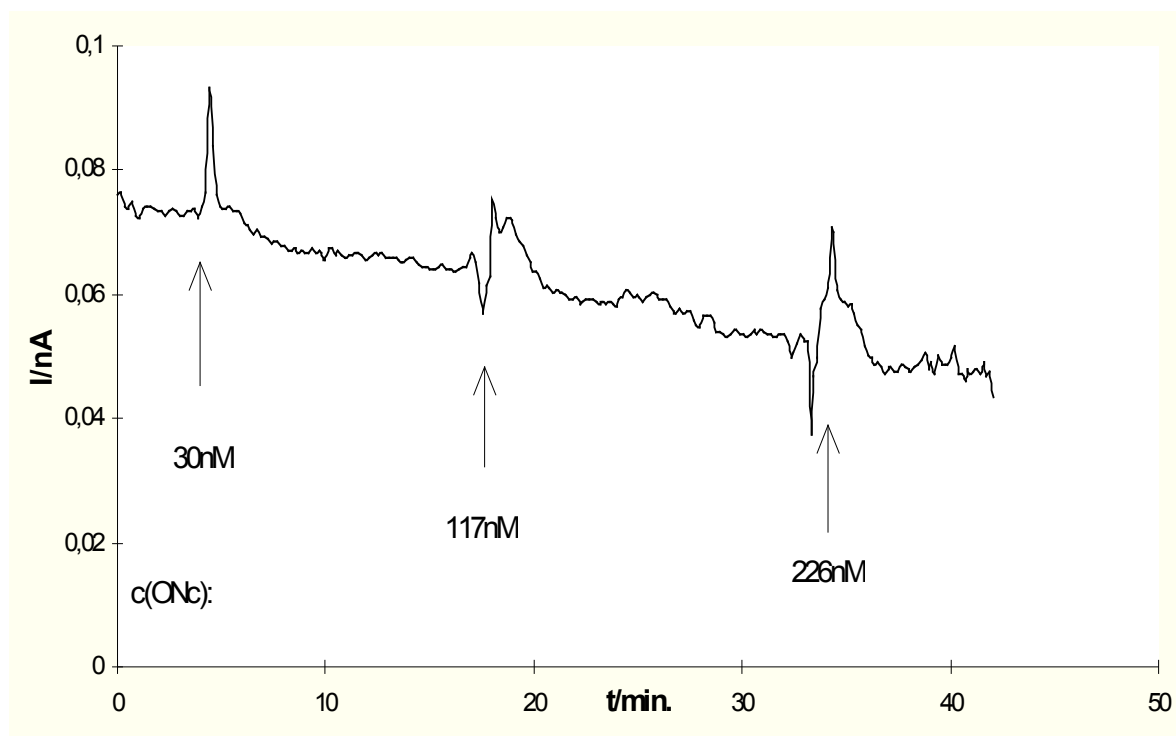
Trojnásobne vyšší odpor zlatej elektródy po naviazaní oligonukleotidu HS – N – SH modifikovaného na oboch koncoch SH skupinou, v porovnaní s oligonukleotidom HS – N, naznačuje, že sa tu vytvára pravdepodobne hustejšia vrstva s väčším počtom naviazaných molekúl jvDNA na povrchu. Obojstranne naviazané jvDNA vlákno má tiež menší stupeň voľnosti v porovnaní s jednostranne naviazaným vláknom. Usporiadanie takejto monovrstvy však môže byť komplikovanejšie, pretože jednotlivé vlákna HS – N – SH sa môžu navzájom prekryvať (ako vlákna siete). Vytvára sa tak viac prekážok pre naviazanie molekúl MUA, ktoré nevytvárajú takú súvislú vrstvu na Au povrchu ako

v prípade systému Au + HS – N + MUA, čo môže vysvetliť nižší odpor systému Au + HS – N – SH + MUA oproti Au + HS – N + MUA.

Hybridizácia.

Systém Au + HS – N – SH + MUA reaguje na zvýšenie koncentrácie komplementárneho vlákna ONc poklesom vodivosti.. K zníženiu vodivosti dochádza po 1 – 3 min. od dodania roztoku ONc do elektrolytu a nová úroveň prúdu sa ustáli približne po 15 min.. Tieto zmeny majú trvalý charakter, nedochádza k návratu do pôvodného stavu. Veľkosť odozvy (nárast g) je úmerná koncentrácii ONc v elektrolyte. Detekčný limit je 30nM. V tomto prípade som robil merania, pri ktorých bol potenciál pracovnej elektródy oproti referenčnej kladný aj merania so záporným pólom na PE ($\pm 100\text{mV}$). V oboch prípadoch však po dodaní ONc dochádzalo k podobnej relatívnej zmene vodivosti. Reprodukovanosť tohto typu odozvy je viac ako 60%, podobne reagovali 4 senzory zo 6.

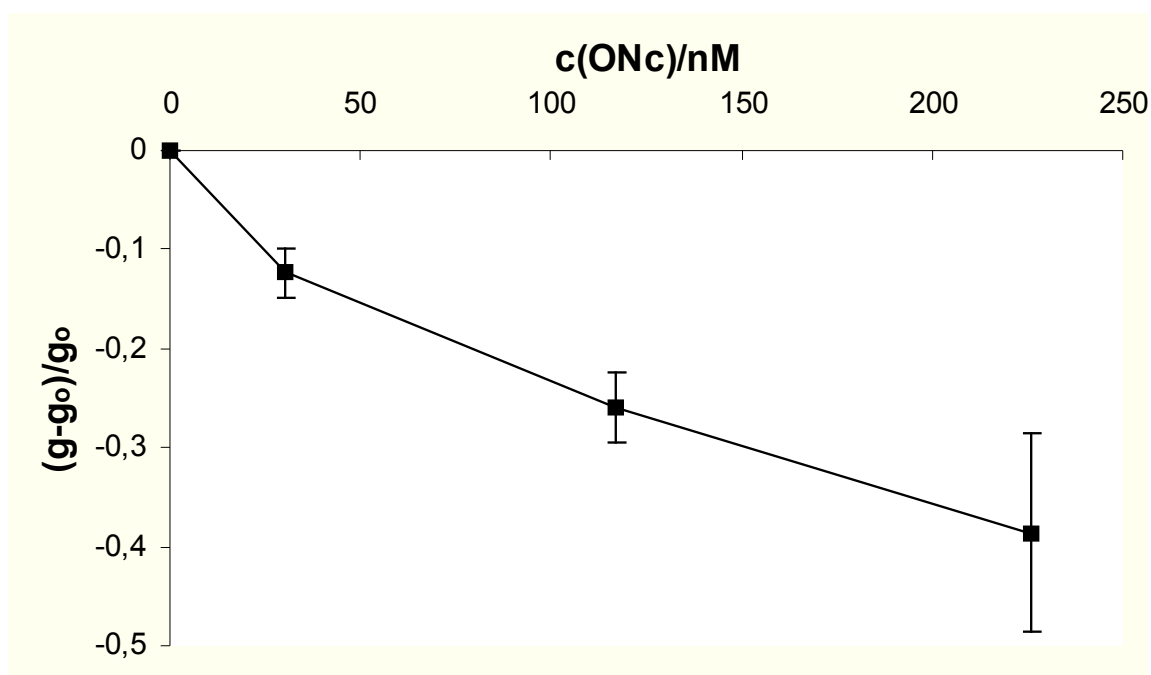
Príklad odozvy senzora Au + HS – N – SH + MUA na zvyšovanie koncentrácie komplementárneho oligonukleotidu ONc v elektrolyte je obr.5.9.



Obr. 5.9 Príklad odozvy senzora Au + HS – N – SH + MUA na zvyšovanie koncentrácie komplementárneho oligonukleotidu ONc v elektrolyte.

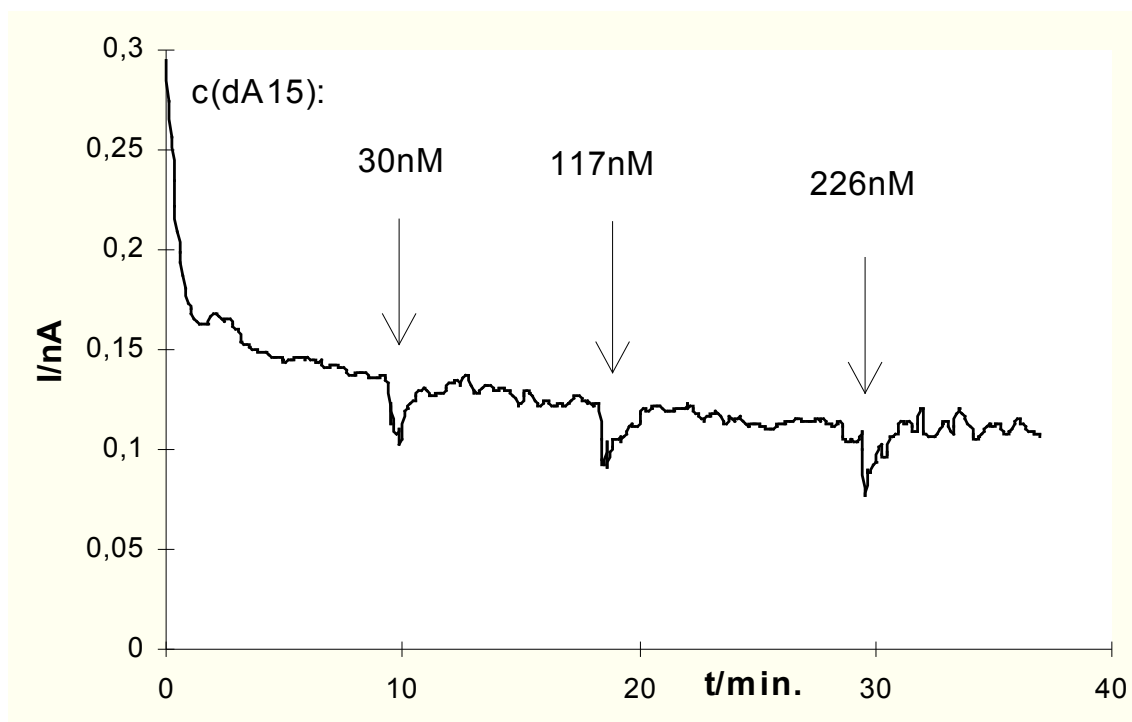
Zníženie vodivosti tohto systému po dodaní komplementárneho vlákna ONc do elektrolytu je pravdepodobne spôsobené zvýšením povrchového pokrytia senzora vznikajúcimi molekulami dvDNA, ktoré zaberajú viac miesta ako jednonit'ové molekuly jvDNA. Dochádza tak ku ťahšej výmene elektrického náboja medzi Au povrchom a elektrolytom.

Závislosť relatívnej zmeny vodivosti senzora $\text{Au} + \text{HS} - \text{N} - \text{SH} + \text{MUA}$ od koncentrácie komplementárneho vlákna ONc znázorňuje obr. 5.10.



Obr.5.10 Závislosť relatívnej zmeny vodivosti senzora $\text{Au} + \text{HS} - \text{N} - \text{SH} + \text{MUA}$ od koncentrácie komplementárneho vlákna ONc. Stredné hodnoty a ich štandardné odchýlky boli určené zo 4 meraní.

Na prítomnosť nekomplementárneho vlákna dA15 jednotlivé senzory reagovali podobne ako senzory typu $\text{Au} + \text{HS} - \text{N} + \text{MUA}$. Po dodaní dA15 do elektrolytu v niektorých prípadoch vodivosť klesla, nedochádzalo však ku trvalým a jednoznačným zmenám. Príklad reakcie tohto senzora na zvyšovanie koncentrácie dA15 v elektrolyte je na obr. 5.11.



Obr. 5.11 Príklad odozvy senzora Au + HS - N - SH + MUA na zvyšovanie koncentrácie nekomentárneho oligonukleotidu dA15 v elektrolyte.

5.2 Imobilizácia jvDNA na povrch lipidickej vrstvy

Pri vytváraní systému Au + T + L + Ch - dT15 som postupne premeral odpor všetkých úrovní tohto typu modifikácie zlatej elektródy.

Po vytvorení monovrstvy z 1 - dodekántiolu na povrchu zlatej elektródy výrazne vzrastá jej odpor : $R_m = (20,2 \pm 11,6) M\Omega$.

Fúziou lipozómov sa vytvára na hydrofóbnom povrchu dodekántiolovej monovrstvy lipidická vrstva. Dochádza tak ku ďalšiemu zvýšeniu odporu takto modifikovanej Au elektródy : $R_m = (30,1 \pm 19) M\Omega$. Veľké odchýlky v odpore jednotlivých vrstiev svedčia o tom, že na dodekántiolovom povrchu sa nevytvára vo všetkých prípadoch súvislá lipidická monovrstva. Samotné dodekántiolové vrstvy sú navzájom odlišné, a pri vytváraní lipidických vrstiev sa tieto odchýlky ešte zväčšujú. Príčinou týchto odlišností sú pravdepodobne drobné znečistenia, ktorým sa dá ťažko zabrániť aj pri snahe o dodržanie maximálnej čistoty pri manipulácii. Okolo takýchto znečistení alebo štruktúrnych defektov v monovrstve z dodekántiolu sa lipidická vrstva nevytvára, prípadne nie je dostatočne stabilná a pri manipulácii odpadáva.

Elektródu s vytvorenou lipidickou vrstvou som po premeraní ponoril na 20 hod. do roztoku Ch – dT15. Po tejto procedúre sa odpor takto modifikovanej elektródy vo väčšine prípadov znižuje, na hodnotu : $R_m = (21,0 \pm 10,3) \text{ M}\Omega$. Príčinou zníženia odporu je pravdepodobne porušenie štruktúry lipidickej monovrstvy počas jej 20 hodinovej inkubácii v roztoku Ch – dT15, prípadne jej poškodenie pri manipulácii.

Zmeny odporu pri jednotlivých úrovniach modifikácie zlatej vrstvy sú v tabuľke 5.3.

Tabuľka 5.3 Zmeny R_m pri modifikácii zlatej elektródy.

Systém	$R_m/\text{M}\Omega.\text{cm}^2$	n
1 – dodekántiol	$20,2 \pm 11,6$	25
1 – dodekántiol + lipid	$30,1 \pm 19$	20
1 – dodekántiol + lipid + Ch – dT15	$21,0 \pm 10,3$	19

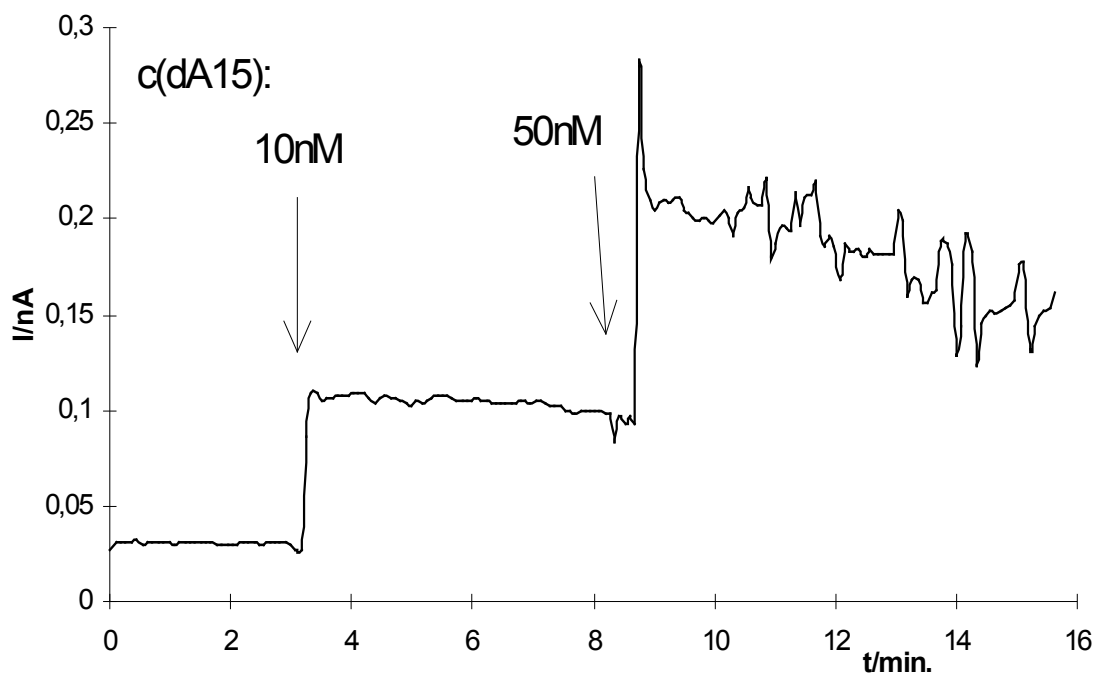
Hybridizácia.

Pri väčšine experimentov na sledovanie hybridizácie nedochádzalo pri zvyšovaní koncentrácie komplementárneho vlákna dA15 k jednoznačným zmenám vodivosti pracovnej elektródy. Polovicu meraní som robil pri potenciálovom rozdiel medzi pracovnou a referenčnou elektródou -50 mV a polovicu pri +100 mV (napätie na PE z externého zdroja). Pri devätnástich experimentoch boli iba štyri prípady, pri ktorých reagoval systém na dodanie dA15 do elektrolytu jednoznačným a trvalým nárastom vodivosti a to aj pri -50 mV aj pri +100mV potenciálovom rozdiel medzi PE a RE. Príklady dvoch takýchto reakcií sú uvedené na obr. 5.12 a 5.13. V týchto prípadoch však došlo po dodaní dA15 do elektrolytu k výraznému a jednoznačnému nárastu vodivosti senzora a to už pri koncentrácii dA15 10nM. Problém necitlivosti ostatných senzorov bol pravdepodobne v tom, že na ich povrchu pravdepodobne neboli naviazané vlákna Ch – dT15 a štruktúra ich povrchu nezodpovedala uvedenej predstave. Kvôli nedostatku informácií o týchto systémoch som nevedel tieto chyby používanou metódou odhaliť.

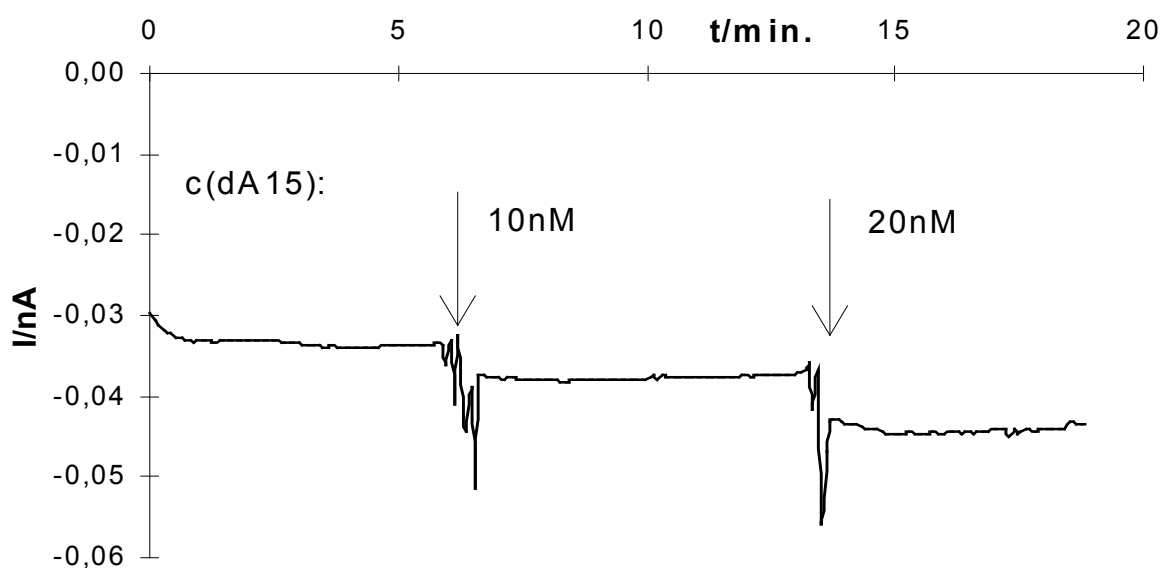
Vysvetlenie nárastu vodivosti, ku ktorému došlo pri hybridizácii v spomínaných prípadoch je podobné ako v prípade systému Au + HS – N + MUA. Molekuly jvDNA tvoria na povrchu lipidickej vrstvy štatistické kĺbká, ktoré sa pri hybridizácii vznikom

dvDNA vyrovnávajú, čím dochádza k uvoľneniu miesta na povrchu senzora a lepšej výmene nábojov medzi elektródou a elektrolytom.

Keďže nedochádzalo k pravidelnej odozve na komplementárne vlákno, nerobil som experimenty s vláknom nekomplementárnym. Kôli malému počtu pozitívnych výsledkov neuvádzam ani závislosť relatívnej zmeny vodivosti od koncentrácie dA15.



Obr. 11 Príklad odozvy systému Au + T + L + Ch – dT15 na dodanie komplementárneho vlákna do elektrolytu, pri $U_k = +100$ mV (na PE voči RE).



Obr. 12 Príklad odozvy systému Au + T + L + Ch – dT15 na dodanie komplementárneho vlákna do elektrolytu, pri $U_k = -50$ mV (na PE voči RE).

Záver

V predloženej práci bola pomocou sledovania zmien vodivosti študovaná hybridizácia krátkych oligonukleotidov na povrchu tenkých organických filmov, s cieľom vývoja biosenzora na detekciu špecifických sekvencií DNA.

Modelový systém pripravený pomocou ukotvenia cholesterolom modifikovaného oligonukleotidu, obsahujúceho 15 tymínov, do lipid – alkántiolovej vrstvy na povrchu zlatej elektródy reaguje na interakciu s komplementárnym vláknom nárastom vodivosti už pri jeho koncentrácii od 10nM. Problémom však bola nízka reprodukovateľnosť výsledkov, pravdepodobne súvisiaca s pomerne zložitou štruktúrou a nízkou funkčnou stabilitou tohto systému.

Systém využívajúci priame naviazanie SH skupinou modifikovaného oligonukleotidu na zlatý povrch reaguje na koncentrácie komplementárneho vlákna od 30nM, pričom pri použití oligonukleotidu modifikovaného SH skupinou na jednom konci dochádza k nárastu vodivosti, v prípade oligonukleotidu s SH skupinou na oboch koncoch vlákna dochádza pri interakcii s komplementárnym vláknom k poklesu vodivosti.

Metóda sledovania zmien vodivosti a študované spôsoby prípravy DNA senzora by mohli byť v budúcnosti použité na realizáciu biosenzora pre detekciu špecifických sekvencií DNA. Predpokladom je však dôkladnejšie preskúmanie a zvýšenie funkčnej stability týchto štruktúr.

Literatúra

- F. Caruso (a) E. Rodda, D. N. Furlong, V. Haring : DNA binding and hybridization on gold and derivatized surfaces. *Sensors and Actuators B* 41, 1997, 189 – 197.
- F. Caruso (b), E. Rodda, D. N. Furlong, K. Nikkura, Y. Okahata : Quartz Crystal Microbalance Study of DNA Immobilization and Hybridization for Nucleic Acid Sensor Development, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2043 – 2049.
- T. Hianik, M. Šnejdárková, L. Sokolíková, E. Meszár, R. Krivánek, V. Tvarožek, I. Novotný, J. Wang : Immunosensors based on supported lipid membranes, protein films and liposomes modified by antibodies, *Sensors and Actuators B* 57, 1999, 201 – 212.
- T. Hianik : Biosenzors based on solid supported lipid bilayers and their physical properties, v D. P. Nikolelis et al., *Biosensors for Direct Monitoring of Enviromental Pollutants in Field*, Kluwer Academic Publishers, 1998, 317 – 333.
- D. Chorvát : *Biofyzika*, Univerzita Komenského, Bratislava 1998.
- S. Mag, D. Harries, A. Bin - Shaul : The behavior of cationic Lipid - DNA complexes, *Biophys. J.*, 78, 2000, 1681 – 1697.
- D. P. Nikolelis, Ch. G. Siontorou, P. A. E. Piunno, U. L. Krull : Detection of DNA Hybridization Using Self-Assembled Bilayer Lipid Membranes (BLMs), *Electroanalysis* 1997, 9, No. 14, 1067 – 1071.
- A. Ottová – Leitmanová : *Základy biofyziky*, Alfa, Bratislava 1993.
- A. B. Steel, T. M. Herne, M. J. Tarlov : Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 4670 – 4677.
- T. Wink, S. J. Zuilen, A. Bult, W. P. Bennekom : Self-assembled Monolayers for Biosenzors, *Analyst*, 1997, Vol. 122, 43 – 50.
- M. Yang, H. C. M. Yau, H. L. Chan : Adsorption Kinetics and Ligand Binding Properties of Thiol-Modified Double-Stranded DNA on a Gold surface, *Langmuir*, 1998, 14, 6121 – 6129.