

Warstwy aptamerowe na powierzchni złota: porównanie sposobu wiązania

Patrycja Kucińska

promotor: dr hab. Agnieszka Więckowska

opiekun: mgr Marcin Jaskółowski

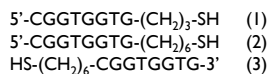


■ Cel pracy

Porównanie właściwości warstw aptamerowych na podłożu złotym w zależności od miejsca modyfikacji nici DNA grupami wiążącymi.

■ Wprowadzenie

Z oryginalnego 76-merowego aptameru wrażliwego na tetracyklinę wyekstrahowano krótką sekwencję zasad i zbadano ją jako przydatny aptamer dla tej samej klasy związków. W badaniach wykorzystano skróconą sekwencję aptameru do oceny wpływu metody wiązania nici DNA na właściwości monowarstwy aptameru utworzonej na powierzchni złota.



Rys. 1. Sekwencje użytych aptamerów.

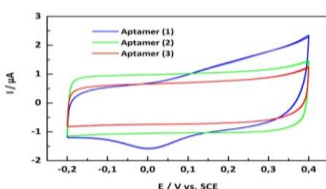
■ Otrzymane wyniki

Przygotowanie monowarstw aptameru na elektrodach złotych

Elektrody złote wypolerowane na tlenku glinu umieszczono w naczynku elektrochemicznym i zarejestrowano krzywe voltamperometryczne w 0,5M roztworze KOH, a następnie w IM roztworze H_2SO_4 . Z powyższych pomiarów wyznaczono powierzchnie elektrod. Po przepłukaniu wodą destylowaną elektrody zanurzone w 1 μM wodnym roztworze aptameru (1) lub (2) lub (3) w IM buforze fosforanowym, pH = 7 na 24h.

Pojemność monowarstw aptameru na elektrodach złotych

Krzywe voltamperometrii cyklicznej zarejestrowano na elektrodach złotych zmodyfikowanych monowarstwami aptameru (1) lub (2) lub (3) w 0,01M roztworze TRIS, pH = 7,4.



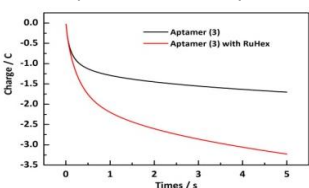
Aptamer	Pojemność monowarstwy aptameru [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]
(1)	17,58
(2)	14,46
(3)	11,32

Rys. 2. Krzywe CV zarejestrowane na elektrodach złotych zmodyfikowanych monowarstwami aptameru (1), (2) i (3) w roztworze 0,01M buforu TRIS o pH=7,4.

Wartość pojemności jest najniższa dla monowarstwy aptameru (3). Warto zauważyć, że cząsteczki kwasu nukleinowego są naładowane, dlatego nici te tworzą stosunkowo słabo upakowane warstwy o dużej pojemności. W celu uszczelnienia warstwy oligonukleotydowej stosuje się obojętne wypełnienie tiolowe, np. merkaptohexanol (MCH). Pojemności tak zmieszanych warstw aptameru i MCH oscylują w granicach 5-6 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Liczba unieruchomionych cząsteczek aptameru na elektrodach złotych

Ilość immobilizowanego DNA określono w doświadczeniu chronokulometrycznym w obecności i przy braku wskaźnika redoks – chlorku heksaamminierutenu (III). Wskaźnik ten jest elektrostatycznie związany ze szkieletem fosforanowym nici DNA, dlatego określając ładunek redukcji zaadsorbowanego wskaźnika, można obliczyć gęstość powierzchniową sond DNA na powierzchni elektrody.



Aptamer	Gęstość powierzchniowa DNA [molekuly/ cm^2]
(1)	$8,82 \cdot 10^{12}$
(2)	$1,34 \cdot 10^{13}$
(3)	$1,3 \cdot 10^{13}$

Rys. 3. Krzywe chronokulometryczne zarejestrowane na elektrodzie złotej zmodyfikowanej monowarstwą aptameru (3) w obecności i nieobecności wskaźnika chlorku heksaamminierutenu (III) w roztworze 0,1M buforu TRIS o pH=7,4.

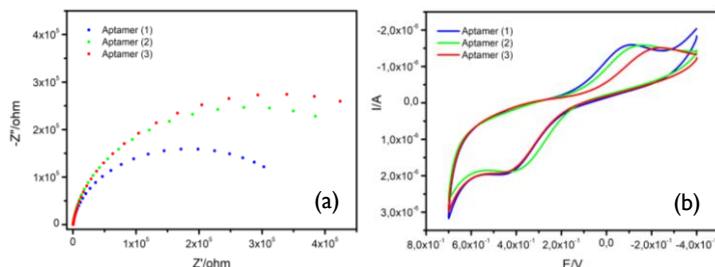
Największą wartość gęstości powierzchniowej unieruchomionych cząsteczek DNA na elektrodzie złotej wyznaczono dla aptamerów (2) i (3).

■ Wnioski

- Najlepsze upakowanie warstwy aptamerowej na powierzchni elektrody złotej na podstawie pomiarów pojemności zaobserwowano dla monowarstwy aptameru (3).
- Najwyższe wartości gęstości powierzchniowej DNA wyznaczono dla monowarstw aptameru (3) i (2). Dodatkowe 3 atomy węgla w łańcuchu modyfikującym mają duży wpływ na stopień organizacji monowarstwy.

Właściwości blokujące monowarstw aptameru na złotych elektrodach

Właściwości blokujące monowarstw aptameru zbadano metodą spektroskopii impedancyjnej w obecności próbnika redoks. Złote elektrody zmodyfikowane monowarstwami aptameru (1) lub (2) lub (3) umieszczono w roztworze $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ w 0,1M buforze fosforanowym.

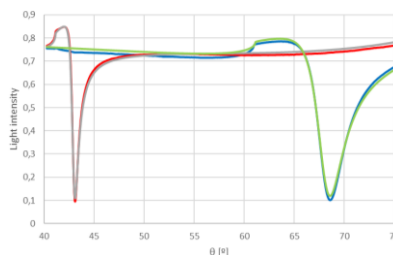


Rys. 4. Widma impedancji (a) i krzywe voltamperometrii cyklicznej (b) zarejestrowane na elektrodach złotych zmodyfikowanych monowarstwami aptameru (1), (2) lub (3) w roztworze $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ($5 \cdot 10^{-3}\text{M}$) w 0,1M buforze fosforanowym o pH=7.

Najwyższą wartość oporu przeniesienia elektronu pomiędzy ujemnie naładowanym próbnikiem redoks a powierzchnią elektrody zaobserwowano dla monowarstwy aptameru (3).

Oszacowanie grubości monowarstwy oligonukleotydu

W celu oszacowania grubości monowarstwy oligonukleotydów użyto metody wieloparametrowego rezonansu plazmonów powierzchniowych (MP-SPR). Doświadczenie MP-SPR przeprowadzono na czujnikach modyfikowanych monowarstwami różnych aptamerów w różnych mediach (powietrze i woda) oraz o różnych długościach fali.



Aptamer	Grubość monowarstwy [nm]
(1)	$3,14 \pm 0,43$
(2)	$4,07 \pm 0,52$
(3)	$4,13 \pm 0,57$

Rys. 5. Krzywa eksperymentalna zarejestrowana na dysku złotym zmodyfikowanym monowarstwą aptameru (1) (linia czerwona) – krzywa eksperymentalna w powietrzu; linia szara – krzywa dopasowana w powietrzu; linia niebieska – krzywa eksperymentalna w wodzie; linia zielona – krzywa dopasowana w wodzie.

Właściwości hydrofobowo-hydrofilowe warstw aptamerów

Właściwości hydrofobowo-hydrofilowe monowarstw oligonukleotydów oceniono za pomocą eksperymentów mikroskopii kąta zwilżania. Monowarstwy trzech badanych oligonukleotydów przygotowano metodą samoorganizacji w wodnym roztworze 1 μM sond DNA na złotych dyskach. Zmianę kąta zwilżania rejestrowano również po inkubacji monowarstwy aptameru w 5 $\cdot 10^{-4}\text{M}$ roztworze tetracykliny.



Rys. 6. Obrazy kąta zwilżania powierzchni złota zmodyfikowanej za pomocą monowarstwy aptameru (1) (a), monowarstwy aptameru (2) (b), monowarstwy aptameru (3) (c).

Aptamer	Kąt zwilżania monowarstwy [°]	Kąt zwilżania monowarstwy po inkubacji w roztworze tetracykliny [°]
(1)	$20,81 \pm 0,24$	$47,81 \pm 0,14$
(2)	$6,90 \pm 0,86$	$51,19 \pm 0,13$
(3)	$12,79 \pm 0,30$	$52,01 \pm 2,07$

Kąt zwilżania monowarstwy aptameru jest najniższy dla warstwy aptameru (2), jednak po inkubacji dysków zmodyfikowanych aptamerami w roztworach analitu wartości kąta zwilżania na tych dyskach są podobne.

- Wartości grubości monowarstwy wyznaczone metodą MP-SPR dobrze odpowiadają wartościom teoretycznym, uwzględniającym długość cząsteczki i nachylenie łańcuchów kierunku powierzchni.
- Wartości kąta zwilżania po inkubacji w roztworze tetracykliny są podobne i wskazują na wiązanie cząsteczek hydrofobowych.