

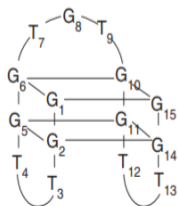


Cel pracy

Celem pracy jest przygotowanie aptamerowego czujnika do oznaczania trombiny oraz określenie jego jakości działania w zależności od stężenia roztworu i czasu inkubacji w roztworze analitu.

Wprowadzenie

Hemostaza, to ogół mechanizmów zapobiegających wypływowi krwi w przypadku przerwania ciągłości naczyń. Dzięki obecności trombiny w procesie hemostazy możliwa jest aktywacja płytek krwi, zmiana fibrynogenu w fibrynę oraz proteoliza czynników krzepnięcia. Jedną z najbardziej znanych sekwencji aptamerowych jest TBA (ang. *thrombin binding aptamer*), czyli aptamer wiążący trombinę. Składa się z jednoniciowego 15-merowego DNA o sekwencji 5'-GGTTGGTGTGGTGG-3'.



Rysunek 1. Struktura kwadrupleksu TBA.

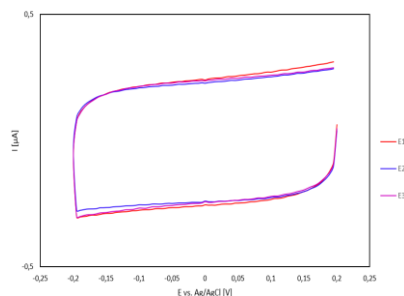
W celu przygotowania warstwy aptameru na powierzchni elektrody zastosowano aptamer TBA zmodyfikowany na końcu 5' grupą wiążącą -C₆SH. Odpowiednio przygotowane złote elektrody umieszczono na 24h w roztworze 1 μM TBA w 1M buforze fosforanowym o pH=7. Następnie w celu uporządkowania warstwy aptameru na elektrodzie oraz wypełnienia wolnych miejsc na powierzchni zanurzone elektrody w roztworze merkaptohexanolu (MCH).

Do określenia jakości otrzymanych warstw aptamerowych wykorzystano szereg metod elektrochemicznych, m.in. woltamperometrię cykliczną oraz spektroskopię impedancyjną. Gęstość powierzchniową warstwy DNA wyznaczono z pomiarów chronokulometrycznych w czystym elektrolicie oraz z dodatkiem depolaryzatora. Właściwości hydrofilowo-hydrofobowe warstw TBA po inkubacji w roztworze trombiny określono metodą mikroskopii kąta zwilżania.

Otrzymane wyniki

Tabela 1. Pojemności warstw TBA na elektrodach złotych.

Elektroda	Pojemność monowarstwy aptameru [μF/cm ²]	Pojemność monowarstwy aptameru + MCH [μF/cm ²]
E1	8,29	5,67
E2	9,25	7,28
E3	9,23	7,73

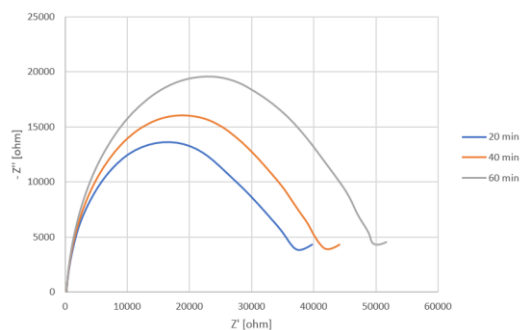


Rysunek 2. Krzywe cykliczne zarejestrowane na elektrodach złotych zmodyfikowanych aptamerem TBA w roztworze 0,1M buforu TRIS o pH=7,4. v=1V/s

Tabela 2. Wyznaczone wartości gęstości powierzchniowej TBA na elektrodach złotych.

Gęstość powierzchniowa DNA [molekuły /cm ²]	Gęstość powierzchniowa DNA + MCH [molekuły /cm ²]
1,33 · 10 ¹³	7,25 · 10 ¹²
8,38 · 10 ¹²	4,36 · 10 ¹²
1,21 · 10 ¹³	5,14 · 10 ¹²

W celu oceny oddziaływania aptameru TBA unieruchomionego na elektrodzie inkubowano przygotowane elektrody w roztworach trombiny o różnym stężeniu oraz przez określony czas (20min., 40 min., oraz 60 min.).



Rysunek 3. Widma impedancyjne zarejestrowane na elektrodzie złotej zmodyfikowanej aptamerem TBA inkubowane w roztworze trombiny o stężeniu 1 μM przez 20min., 40 min., 60 min. w 0,1M buforze TRIS o pH=6,5.

Kąt zwilżania monowarstwy TBA [°] Kąt zwilżania monowarstwy TBA/MCH [°]

43,38 ± 1,42

35,12 ± 2,44

Kąt zwilżania Inkubacja TBA 20 min [°]

Kąt zwilżania Inkubacja TBA 40 min [°]

Kąt zwilżania Inkubacja TBA 60 min [°]

42,00 ± 0,71

42,09 ± 4,00

41,70 ± 4,12

Wnioski

- Modyfikacja elektrod złotych aptamerem prowadzi do spadku pojemności elektrod, przy czym po uszczelnieniu warstwy aptameru cząsteczkami inertnego tiolu wartość ta ulega jeszcze obniżeniu. Fakt ten świadczy o utworzeniu warstwy aptameru na elektrodzie.
- Wartości gęstości powierzchniowej cząsteczek aptameru na elektrodzie są bardzo wysokie, jednak po uszczelnieniu warstwy aptameru merkaptohexanolem obserwowano częściowe usuwanie aptameru z powierzchni elektrody.
- Stosując impedancję faradajowską oceniono stopień wiązania trombiny do aptameru na powierzchni elektrody. Im dłuższy czas inkubacji TBA tym większy opór przeniesienia ładunku pomiędzy warstwą a próbnikiem redoks.
- Wartość kąta zwilżania warstwy TBA po inkubacji w roztworach trombiny zmienia właściwości hydrofilowo-hydrofobowe warstwy.