

Uniwersytet w Białymstoku

Wydział Biologiczno-Chemiczny



**Streszczenie rozprawy doktorskiej**

**Opracowanie i charakterystyka elektrochemicznych  
genoczujujących przeznaczonych do wykrywania wirusa  
ptasiej grypy typu H5N1**

Kamila Dorota Malecka

*Praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Radeckiego  
w Zakładzie Biosensorów Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej  
Akademii Nauk i przedstawiona Radzie Wydziału Biologiczno-Chemicznego  
Uniwersytetu w Białymstoku*

Białystok 2016

Wykrywanie wirusów jest bardzo istotne w wielu dziedzinach, m.in. w ochronie zdrowia, procesach biotechnologicznych, produkcji żywności, monitoringu środowiska czy w ochronie roślin. Konwencjonalne metody, takie jak reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) bądź test immunoenzymatyczny (ELISA) często wymagają obróbki wstępnej analizowanej próby, wykwalifikowanego personelu, kosztownego sprzętu oraz drogich odczynników chemicznych. Nadal poszukiwane są szybkie, czułe, proste w zastosowaniu i stosunkowo tanie metody wykrywania patogenów w warunkach poza laboratoryjnych. W ostatnich latach obserwuje się wzrastające zainteresowanie bioczuJNIkami chemicznymi będącymi alternatywą dla dotychczas stosowanych metod oznaczania. Wysoka czułość i selektywność względem danego analitu oraz prostota wykonania szybkiej analizy to główne zalety, dzięki którym czujniki mogą zastąpić tradycyjne metody. Ponadto posiadają one duży potencjał miniaturyzacji, dzięki czemu oferują możliwość prowadzenia analiz środowiskowych (w miejscu poboru próbek) w niewielkich objętościach. Ze względu na rozwój produkcji masowej, mogą uzyskać stosunkowo niską cenę jednostkową.

Przedmiotem niniejszej rozprawy było opracowanie czułych genoczuJNIków elektrochemicznych i zastosowanie ich do selektywnego wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1. Opracowano trzy bioczuJNIki DNA za pomocą których z powodzeniem udało się wykrywać sekwencje DNA i/lub RNA. Do tego celu zastosowano złote elektrody dyskowe. Przedstawione bioczuJNIki DNA oparte o warstwy Au/SH-ssDNA/Merkaptoheksanol (MCH) oraz Au/kwas merkaptoundekanolowy (MUA) + MCH/NH<sub>2</sub>-ssDNA działały według mechanizmu jonokanałowego. Natomiast podstawą trzeciego była warstwa redoks-aktywna Au/Aminoetantioł/5,6-epoksy-5,6-dihydro-1,10-fenantrolina /Fe(III) /5,6-epoksy-5,6-dihydro-1,10-fenantrolina /NH<sub>2</sub>-ssDNA. Czujniki typu kanału jonowego wymagały obecności zewnętrznego znacznika elektroaktywnego do obserwacji procesów hybrydyzacji. Z kolei bioczuJNIk posiadający warstwę redoks-aktywną posiadał centrum odpowiadające za generowanie sygnału analitycznego na powierzchni elektrody. Każdy z nich różnił się sposobem przyłączenia sondy DNA do powierzchni elektrody złotej. Sonda SH-ssDNA była bezpośrednio przymocowana do powierzchni elektrody złotej za pomocą wiązania kowalencyjnego złoto – siarka. Natomiast sondę NH<sub>2</sub>-ssDNA unieruchamiano na dwa sposoby. W przypadku czujnika typu kanału jonowego za pośrednictwem grupy karboksylowej tiokwasu (MUA) poprzez wiązanie amidowe utworzone przy współdziałaniu pochodnych karbodiimidowych (EDC/NHS). Z kolei na

warstwie redoks-aktywnej sondę aminową osadzono za pomocą reakcji „click” tj. nukleofilowego otwarcia pierścienia epoksydowego.

Przeprowadzono szereg badań, w wyniku, których zoptymalizowano procedury modyfikacji powierzchni złotych elektrod roboczych, a także warunki procesów hybrydyzacji z poszczególnymi kwasami nukleinowymi. Do pomiarów zastosowano trzy techniki elektrochemiczne: woltamperometrię cykliczną, woltamperometrię fali prostokątnej oraz elektrochemiczną spektroskopię impedancyjną w układzie trójelektrodowym. Jako analitów użyto 20-merowych sekwencji DNA, ok. 180-pz sekwencji DNA (PCR), a także ok. 280-merowych transkryptów RNA. W zależności od długości testowanego analitu posiadały one 20-merowe sekwencje komplementarne lub niekomplementarne, a także 20-merowe sekwencje komplementarne w długim łańcuchu DNA czy RNA znajdujące się w różnych położeniach (na końcu 3', na końcu 5' lub na środku).

Podjęto również próbę miniaturyzacji najprostszego z zaproponowanych genoczuJNIKÓW opartego o warstwę Au/SH-ssDNA/MCH z zastosowaniem elektrod sitodrukowanych z pracującą elektrodą złotą. Za jego pomocą udało się wykrywać m.in. niewymagające odwrotnej transkrypcji sekwencje RNA o długości około 280 oligonukleotydów, co może stanowić podstawę do aplikacji w warunkach poza laboratoryjnych.

Biorąc pod uwagę czułość i selektywność trzech przedstawionych genoczuJNIKÓW, można stwierdzić, że każdy z nich z powodzeniem nadaje się do wykrywania materiału genetycznego wirusa ptasiej grypy typu H5N1. Znaczący walor stanowi również możliwość wykrywania fragmentów komplementarnych do sondy ssDNA znajdujących się w ok. 180-pz łańcuchach DNA oraz ok. 280-merowych transkryptach RNA. Opracowane genoczuJNIKI umożliwiły również rozróżnienie położenia sekwencji komplementarnych znajdujących się w analizowanych oligonukleotydach. Na podstawie aktualnie przanalizowanej literatury naukowej takie prace nie zostały dotychczas opublikowane.

Ponadto, w przeciwieństwie do często pojawiających się w literaturze naukowej, bioczuJNIKÓW zawierających znakowane oligonukleotydy DNA, zaproponowane w rozprawie uniwersalne systemy (jonokanałowy i z warstwą redoks-aktywną) nie wymagają skomplikowanych modyfikacji i znakowania sond DNA. Można je zastosować do unieruchamiania różnych sond DNA posiadających jedynie grupę tiolową bądź aminową na końcu 5'.