

Nowa sonda DNA zawierająca pochodne tiofenu i sposób jej wytwarzania, warstwa przewodzącego polimeru w drukowaniu molekularnie z zastosowaniem tych pochodnych i sposób jej wytworzenia oraz zastosowanie tej sondy do selektywnego wykrywania i oznaczania oligonukleotydu TATAAA

Przedmiotem wynalazku są (a) dwie nowe pochodne tiofenu, (b) sposób wytwarzania tych pochodnych, (c) przewodzący polimer wydrukowany molekularnie zawierający te pochodne, (d) sposób przygotowania tego polimeru, (e) zastosowanie tego polimeru jako elementu chemicznego rozpoznawania służącego do wykrywania i selektywnego oznaczania oligonukleotydu TATAAA (T – tymina, A – adenina).

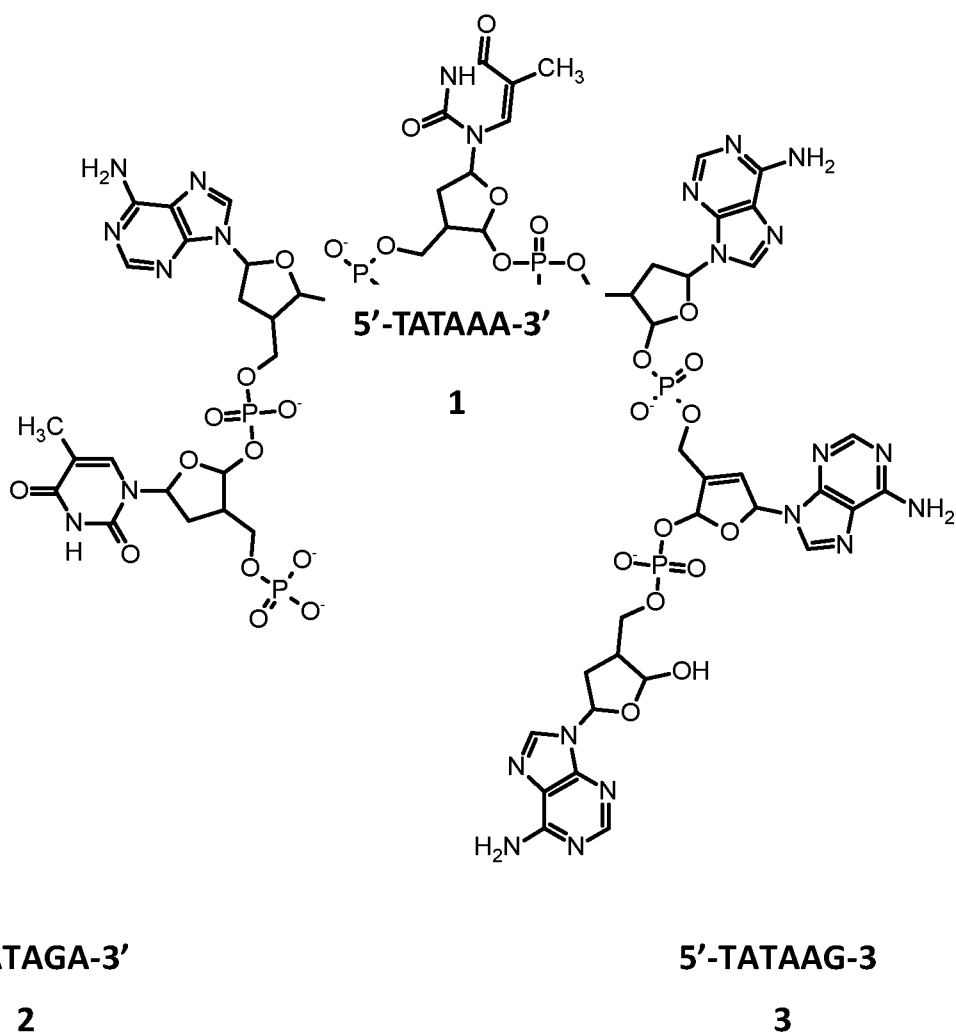
Stan techniki

Genomika zawdzięcza oligonukleotydowi TATAAA **1** (Schemat 1) rozpoczęcie transkrypcji. Ten heksanukleotyd, zawierający cztery cząsteczki adeniny (A) i dwie cząsteczki tyminy (T), charakteryzuje się sekwencją promotorową tych zasad, bez której niemożliwe jest rozpoczęcie transkrypcji.

Co więcej, transkrypcja nie może się rozpocząć w przypadkowym miejscu na matrycy DNA {S. Grünberg, et al., *Trends Biochem. Sci.* **2013**, 38, 603; L. Stryer, et al., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa **2009**}. Miejscem rozpoczęcia transkrypcji musi być początek genu. Sygnały rozpoczęcia transkrypcji są zawarte w promotorowej sekwencji zasad nukleinowych, położonej bezpośrednio przed sekwencją genu, który ulega transkrypcji. Promotorowe sekwencje nukleotydów to miejsca specyficznego przyłączenia polimerazy RNA II.

Miejsca promotorowe eukariotycznych genów kodujących białka zawierają sekwencje zgodne TATAAA w rejonie 25 nukleotydów od miejsca rozpoczęcia transkrypcji. Kasetka TATA (ang. TATA box) {Y. Kim, et al., *Nature* **1993**, 365, 512} w tych genach, zwana też kasetką Hognessa, jest podobna do kasety Pribnowa (o sekwencji zgodnej TATAAT) w genach prokariotycznych, z tym że jest ona zlokalizowana w większej odległości od miejsca transkrypcji pierwszego nukleotydu niż w genach prokariotycznych (tj. w odległości 10 nukleotydów przed pierwszym nukleotydem ulegającym transkrypcji).

DNA może pochłaniać energię promienistą (co umożliwia rejestrowanie widm absorpcyjnych UV-vis, IR, NMR i CD), emitować ją po wzbudzeniu (co umożliwia rejestrowanie widm fluorescencyjnych), jak i ją rozpraszać (co umożliwia rejestrowanie widm Ramana). Dlatego wszystkie te techniki spektroskopowe są powszechnie stosowane do oznaczania DNA.



Schemat 1. Wzór strukturalny szablonu i analitu, (oligonukleotyd TATAAA **1**), zapis skrótowy substancji przeszkadzających w oznaczaniu TATAAA (oligonukleotydu TATAGA **2** i TATAAG **3**).

Do oznaczania DNA coraz częściej stosuje się również biocujniki elektrochemiczne {E. G. Hvastkovs, et al., *Analyst* **2010**, 135, 1817}. Przyczyną tej rosnącej popularności są ich zalety, które wykazują w porównaniu do innych metod oznaczania DNA. Mianowicie, oznaczenia wykonywane z ich zastosowaniem są w miarę proste, szybkie i stosunkowo czułe.

Wynik tych oznaczeń jest dostępny natychmiast po pomiarze, przeciwnie do różnego rodzaju testów genetycznych czy biologicznych. Przeważnie bioczuJNIKI są niewielkich rozmiarów, co pozwala ograniczyć wymaganą objętość roztworu próbki i odczynników {G. Bidan, et al., *Synth. Met.* **1999**, 102, 1363}. Za pomocą bioczuJNIKÓW można oznaczać DNA zarówno w roztworach wodnych jak i aprotycznych. Co więcej, koszty produkcji elektrochemicznych bioczuJNIKÓW do oznaczania DNA i pomiarów wykonanych z ich pomocą są o wiele niższe niż koszty oznaczeń wykonanych za pomocą innych metod analitycznych {E. G. Hvastkovs and D. A. Buttry, *Analyst* **2010**, 135, 1817; A. Sassolas, et al., *Chem. Rev.* **2008**, 108, 109; E. Paleček, et al., *Chem. Rev.* **2012**, 112, 3427}.

Opracowane i wykonane przez nas czujniki do selektywnego oznaczania wybranych oligonukleotydów to czujniki chemiczne a nie biochemiczne, ponieważ elementem rozpoznającym jest w nich syntetyczny polimer. Nasze czujniki będzie można zastosować, m.in. w inżynierii genetycznej, jako „chipy” (układy scalone) DNA, tj. odpowiedniki tzw. sond molekularnych do testów genetycznych. W biologii molekularnej, sondy molekularne to związki chemiczne zdolne do specyficznego przyłączania wykrywanych substancji. Związki te mają właściwości umożliwiające wykrycie tych substancji. Sondy DNA wykrywają zamiany pojedynczych nukleotydów w łańcuchu DNA prowadzące do punktowych mutacji. Do takich należy np. mutacja w łańcuchu DNA, który koduje łańcuch beta hemoglobiny. Mutacja ta jest przyczyną anemii sierpowatej. Dzięki testom genetycznym za pomocą niniejszego wynalazku możliwe będzie wczesne wykrycie wielu dziedzicznych chorób genetycznych. Choroby genetyczne stanowią problem kliniczny w każdej specjalności medycznej. Na przykład w zakresie diagnostyki prenatalnej zalecane jest wykonanie szeregu diagnostycznych badań genetycznych. Następnie, w pierwszych dniach życia noworodka wykonywane są testy przesiewowe w kierunku fenyloketonurii i wrodzonej niedoczynności tarczycy.

Nasze badania stworzą nowe możliwości diagnostyczne i terapeutyczne, w szczególności w odniesieniu do chorób nowotworowych, za które odpowiedzialne są zmutowane geny. Do nich zwłaszcza należą badania obejmujące blokowanie ekspresji wybranego genu za pomocą oligonukleotydów antysensowych. Próby terapeutyczne wyłączające ekspresję genów odpowiedzialnych za przebieg różnych chorób genetycznych za pomocą antysensowych oligonukleotydów są również obiecujące w angioplastyce naczyń wieńcowych, w leczeniu chorób neurologicznych oraz niektórych chorób wirusowych i

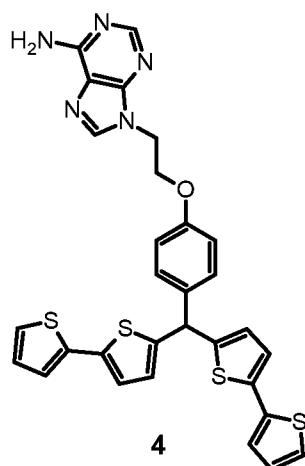
chorób wywołanych przez pasożyty.

Ponadto nasze badania mogą przyczynić się do rozwoju nowych technik wykorzystujących mutagenzę sterowaną oligonukleotydami, a ta może znacznie usprawnić i przyspieszyć, np. produkcję roślinną.

Naprzeciw powyższym wyzwaniom diagnostycznym, terapeutycznym czy rolniczym wychodzą chemoczuJNIKI z warstwą zdolną do selektywnego przyłączenia oligonukleotydu o sekwencji TATAAA w celu jego rozpoznawania. Obiecującą metodą przygotowania tych warstw jest synteza tak zwanych polimerów wdrukowanych molekularnie (ang. molecularly imprinted polymers, MIPów). W ostatnich latach ich zastosowanie do biomimetycznego rozpoznawania różnych analitów w celu ich selektywnego oznaczania wzrasta {K. Haupt, et al., *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2495; C. Malitesta, et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 1827; P. S. Sharma, et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 3177}. Jednakże dotychczas nie zastosowano takiej warstwy do budowy selektywnego chemoczuJNIKA rozpoznającego oligonukleotydową sekwencję TATAAA {H. Peng, et al., *Biomaterials* **2009**, 30, 2132; S. J. Li, et al., *Prog. Polym. Sci.* **2013**, 39, 145}. Polimery przewodzące były stosowane do oznaczania DNA, jednakże nie do oznaczania sekwencji TATAAA {N. K. Guimard, et al., *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32, 876; M. Ates, *Mater. Sci. Eng., C* **2013**, 33, 1853; L. A. Thompson, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 324; K. Sreenivasan, *React. Funct. Polym.* **2007**, 67, 859}. Tak więc celowa jest budowa chemoczuJNIKA do wykrywania i selektywnego oznaczania TATAAA, poprzez opracowanie i wykonanie dedykowanej warstwy MIPu i zastosowanie jej jako elementu rozpoznającego chemoczuJNIKA.

Dlatego celem niniejszego wynalazku jest opracowanie i zsyntetyzowanie związków chemicznych, które po spolimeryzowaniu wykorzystuje się do budowy chemicznego czuJNIKA do oznaczania oligonukleotydu o sekwencji TATAAA. Kolejnym celem wynalazku jest opracowanie warstwy polimeru wdrukowanego za pomocą oligonukleotydu TATAAA (MIP-TATAAA) i metody jej przygotowania oraz jej zastosowanie jako warstwy selektywnie rozpoznającej TATAAA, a nie różniące się jednym nukleotydem sekwencje takie jak TATAGA **2** lub TATAAG **3**. Ponadto cel wynalazku polega na zintegrowaniu warstwy tego polimeru z przetwornikiem sygnału rozpoznawania chemicznego na sygnał analityczny.

Obecny wynalazek obejmuje związek 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan] o Wzorze **4**.



Schemat 2. Wzór strukturalny 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu] 4.

Ponadto wynalazek obejmuje sposób wytwarzania 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]-fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu] **4**, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

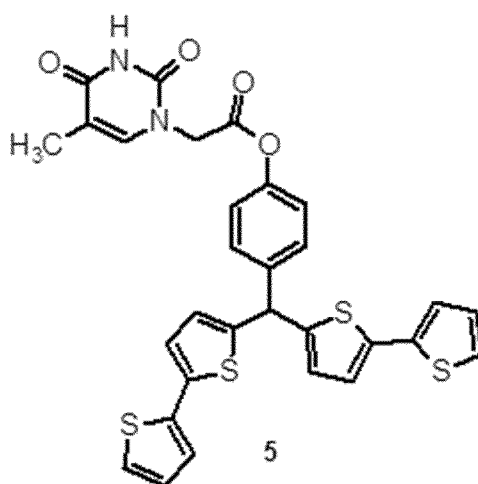
- (1) do wyjściowej mieszaniny 4-hydroksybenzaldehydu i 1,2-dibromoetanu w rozpuszczalniku organicznym, korzystnie w acetonie, dodaje się zasadę z grupy zasad Lewisa obejmującej wodorotlenki metali alkalicznych i ziem alkalicznych, korzystnie NaOH i KOH, oraz sole mocnych zasad i słabych kwasów, korzystnie węglan potasu, i otrzymuje się 4-(2-bromoetoksy)benzaldehyd, a następnie
- (2) ten 4-(2-bromoetoksy)benzaldehyd poddaje się reakcji z adeniną w rozpuszczalniku organicznym, korzystnie w DMF, i otrzymuje się 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]benzaldehyd, a następnie do tego roztworu dodaje się zasadę z grupy zasad Lewisa obejmującej wodorotlenki metali alkalicznych i ziem alkalicznych, korzystnie NaOH i KOH, oraz sole mocnych zasad i słabych kwasów, korzystnie węglan potasu, po czym
- (3) roztwór 2,2'-bisbitiofenu w rozpuszczalniku organicznym, korzystnie w glikolu etylenowym, poddaje się reakcji z 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]-benzaldehydem i kwasem chlorowym(VII) z wytworzeniem 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu].

Korzystnie, Etap 1 tego sposobu prowadzi się w atmosferze gazu obojętnego, w temperaturze w zakresie od 50 do 90 °C, korzystnie w temperaturze 70 °C, przez 12 do 20 godz., korzystnie 16 godz., przy stosunku molowym reagentów względem 4-hydroksybenzaldehydu w zakresie od 4 do 8, korzystnie 6,15 dla 1,2-dibromoetanu i od 3 do 9, korzystnie 6,77, dla zasady z grupy zasad Lewisa obejmującej wodorotlenki metali alkalicznych i ziem alkalicznych, korzystnie NaOH i KOH, oraz sole mocnych zasad i słabych kwasów, korzystnie węglan potasu.

Korzystnie, Etap 2 tego sposobu prowadzi się w atmosferze gazu obojętnego, w temperaturze w zakresie od 100 do 170 °C, korzystnie w temperaturze 135 °C, a do roztworu DMF dodaje się mniej adeniny niż węglanu potasu, korzystnie dziesięć razy mniej (w stosunku molowym).

Korzystnie, Etap 3 tego sposobu prowadzi się w atmosferze gazu obojętnego w temperaturze w zakresie od 20 do 30 °C, korzystnie w 25 °C, przez 12 do 20 godz., korzystnie 16 godz., przy stosunku molowym reagentów względem 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-yl)etoksy]benzaldehydu w zakresie od 0,5 do 3,5, korzystnie 2, dla 2,2'-bitiofenu i od 20 do 60, korzystnie 45, dla kwasu chlorowego(VII).

Ponadto wynalazek obejmuje związek 1-tyminooctan 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylometylo)fenylu o Wzorze 5:



Schemat 3. Wzór strukturalny 1-tyminooctan 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylometylo)fenylu 5.

Wynalazek obejmuje również sposób wytwarzania 1-tyminooctanu 4-(di-2,2'-bitiofen-

5-ylometrylo)fenylu **5**, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujący etapy.

- (1) wyjściowy roztwór 2,2'-bisbitiofenu w glikolu etylenowym poddaje się reakcji z 4-karboksybenzaldehydem i kwasem chlorowym(VII) z wytworzeniem *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoesanu glikolu, a następnie
- (2) ten *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoesan glikolu poddaje się reakcji z eterem dietylowym i otrzymuje się 4-[di-2,2'-bitiofen-5-ylometrylo)fenol, po czym
- (3) mieszaninę 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylo)metylofenolu i kwasu 1-tyminooctowego w rozpuszczalniku organicznym, korzystnie chlorku metylenu, poddaje się reakcji z *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidem (DCC), w wyniku czego otrzymuje się 1-tyminooctan 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylometrylo)fenylu **5**.

Korzystnie, Etap 1 tego sposobu prowadzi się w glikolu etylenowym, w atmosferze gazu obojętnego, w temperaturze w zakresie od 50 do 70 °C, korzystnie w 60 °C, przez 22 do 26 godz., korzystnie 24 godz., przy stosunku molowym reagentów względem 4-karboksybenzaldehydu w zakresie od 2 do 4, korzystnie ~3, dla 2,2'-bisbitiofenu i od 20 do 60, korzystnie 45, dla kwasu chlorowego(VII).

Korzystnie, Etap 2 tego sposobu prowadzi się w atmosferze gazu obojętnego, w temperaturze w zakresie od 20 do 35 °C, korzystnie w temperaturze 25 °C, a następnie dodaje się eter dietylowy, korzystnie dwa razy większą objętość eteru dietylowego niż kwasu chlorowego(VII).

Korzystnie, Etap 3 tego sposobu prowadzi się w atmosferze gazu obojętnego, w temperaturze w zakresie od 20 do 30 °C, korzystnie w 25 °C, przez 15 do 21 godz., korzystnie 18 godz., przy stosunku molowym reagentów względem kwasu 1-tyminooctowego w zakresie od 0,5 do 3, korzystnie 1,73, dla 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylometrylo)fenolu i od 0,5 do 3, korzystnie 1,64 dla *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC).

Ponadto wynalazek obejmuje polimer rozpoznający, korzystnie w postaci warstwy, wytworzony metodą wdrukowywania molekularnego, charakteryzujący się tym, że stanowi ją polimer zawierający jako monomery funkcyjne 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan] **4** według wynalazku i/lub otrzymany sposobem według wynalazku oraz 1-tyminooctan 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylometrylo)fenylu **5** według wynalazku i/lub otrzymany sposobem według wynalazku oraz jako monomer sieciujący (2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen **6**.

Wynalazek obejmuje również sposób wytworzenia warstwy rozpoznającego polimeru, metodą molekularnego wdrukowania (MIP), za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej w warunkach potencjodynamicznych, charakteryzującej się tym, że jako monomer funkcyjny do elektropolimeryzacji stosuje się 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan] **4** według wynalazku i/lub otrzymany sposobem według wynalazku i monomer funkcyjny 1-tyminoocetan 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylometrylo)fenylu **5** według wynalazku i/lub otrzymany sposobem według wynalazku, monomer sieciujący (2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen **6**.

Korzystnie, jako szablon/analit stosuje się aminę biogeniczną lub oligonukleotyd, korzystnie oligonukleotyd TATAAA.

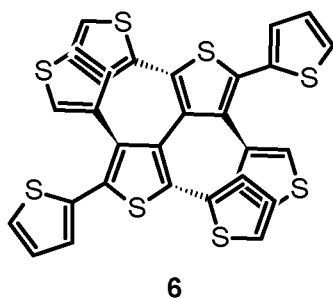
Korzystnie, do polimeryzacji stosuje się roztwór mieszanych rozpuszczalników, korzystnie acetonitrylu, wody, toluenu i izopropanolu o stosunku objętościowym, odpowiednio, jak 7,5 : 1 : 1 : 0,5. 14, zawierający oligonukleotyd TATAAA **1**, 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan] **4**, 1-tyminoocetan 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylometrylo)fenylu **5**, (2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen **6**, korzystnie w stosunku molowym jak 1 : 2,5 : 1,25 : 25, oraz 0,1 M elektrolit podstawowy, korzystnie chloran(VII) tetrabutylamoniowy, (TBA)ClO₄.

Korzystnie, w sposobie tym stosuje się potencjał jest liniowo zmieniany cyklicznie w zakresie od 0 do 1,5 V, korzystnie w zakresie od 0,50 do 1,25 V, ze stałą szybkością zawierającą się w przedziale od 5 do 1000 mV/s, korzystnie 50 mV/s.

Wynalazek również obejmuje zastosowanie warstwy rozpoznającego polimeru według zastrz. 11 i/lub otrzymanej sposobem według wynalazku, jako elementu rozpoznającego czujnika chemicznego do wykrywania i/lub selektywnego oznaczania oligonukleotydu TATAAA **1**, korzystnie w płynach ustrojowych pacjenta, z wykorzystaniem piezomikrograwimetrycznego przetwarzania sygnału chemicznego rozpoznawania TATAAA **1** na sygnał analityczny, lub do tego przetwarzania wykorzystujący tranzystory polowe z zewnętrzną bramką (ang. extended-gate field-effect transistors, EG-FETs).

Ponadto wynalazek ten ma zastosowanie w inżynierii genetycznej, zwłaszcza do testów genetycznych, przy wczesnym wykrywaniu dziedzicznych chorób genetycznych, jak również do testów przesiewowych u noworodków w kierunku fenyloketonurii i wrodzonej niedoczynności tarczycy, lub do testów diagnostycznych i terapeutycznych w odniesieniu do chorób nowotworowych związanych ze zmutowanymi genami, albo do przyspieszania

produkcji roślinnej poprzez mutagenezę sterowaną oligonukleotydami.



Schemat 4. Wzór strukturalny monomeru sieciującego, (2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofenu **6**.

Do wytworzenia MIP wykorzystano związki przedstawione na Schemacie 3. Są to nowo zsyntetyzowane na potrzeby niniejszego wynalazku: 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan] **4** i 1-tyminoocetan 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylometylo)fenylo **5**. Oba te związki służyły jako monomery funkcyjne, przyłączające za pomocą wiązań wodorowych typu par Watsona-Cricka zasady nukleinowe oligonukleotydu TATAAA **1** (Fig. 1). Pary Watsona-Cricka tworzą się pomiędzy fragmentem tyminowym związku **5** i fragmentem adeninowym oligonukleotydu TATAAA **1** oraz fragmentem adeninowym monomeru funkcyjnego **4** i fragmentem tyminowym TATAAA **1**. Jako monomer sieciujący zastosowano 2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen **6** w celu nadania strukturze polimeru odpowiedniej sztywności. Wszystkie zastosowane związki, tj. **4**, **5** i **6**, zawierają w swojej strukturze fragmenty tiofenowe zdolne do elektrochemicznej polimeryzacji. Te fragmenty pozwoliły na wytworzenie, w kontrolowany sposób, cienkich warstw polimeru z przyłączonym oligonukleotydem, MIP-TATAAA.

Zastosowane monomery funkcyjne i sieciujące umożliwiają przygotowanie kompleksu TATAAA **1** z odpowiednimi monomerami funkcyjnymi w roztworze do polimeryzacji, a następnie wytworzenie warstwy polimeru MIP-TATAAA. Struktura i skład kompleksu prepolimeryzacyjnego były modelowane za pomocą obliczeń kwantowo-chemicznych. W dalszej kolejności przygotowanie roztworu do polimeryzacji elektrochemicznej wymagało rozpuszczenia wszystkich jego składników o różnej polarności w tym samym roztworze oraz zapewnienia warunków elektropolimeryzacji takich, aby wytworzone w jej trakcie kationorodniki tiofenu nie ulegały rekombinacji. Do tego celu roztwór rozpuszczalników,

takich jak acetonitryl, woda, toluen i izopropanol, zmieszano w stosunku objętościowym jak, odpowiednio, 7,5 : 1 : 1 : 0,5. Następnie przeprowadzono elektrochemiczną polimeryzację w warunkach potencjodynamicznych z zastosowaniem powyższego roztworu. Pozwoliło to na efektywne osadzenie warstw MIP-TATAAA lub polimeru niewdrukowanego (ang. non-imprinted polimer, NIP) dobrze przylegających do przewodzącego podłoża. Warstwy te osadzono na powierzchni dwóch różnych przetworników sygnału chemicznego. Następnie z osadzonych warstw MIP-TATAAA usunięto szablon oligonukleotydu TATAAA **1**. W ten sposób przygotowano elementy rozpoznające tych chemoczuJNIKÓW. W jednym z nich przetwornikiem był kwarcowy rezonator krystaliczny (ang. quartz crystal resonator, Au-QCR), z dyskową elektrodą złotą o średnicy 5 mm, elektrochemicznej mikrowagi kwarcowej (ang. electrochemical quartz crystal microbalance, EQCM). W pomiarach mikrogravimetrii piezoelektrycznej (ang. piezoelectric microgravimetry, PM) przeprowadzonych za pomocą tej mikrowagi, jako analityczny sygnał detekcji wykorzystuje się zmianę częstotliwości rezonansowej. Przetwornikiem drugiego chemoczuJNIKA był tranzystor polowy z zewnętrzną bramką (EG-FET). Sygnał detekcji oligonukleotydu TATAAA **1** w roztworze badanym związany jest z wypełnieniem a następnie opróżnieniem luk molekularnych polimeru przez cząsteczki analitu TATAAA **1**. W pierwszym chemoczuJNIKU jako sygnał detekcji służyła zmiana częstotliwości rezonansowej Au-QCR proporcjonalna do zmian masy polimeru. W drugim natomiast jako sygnał detekcji wykorzystano zmianę prądu źródło-dren tranzystora polowego. Zmiana ta była wywołana przez sorpcję analitu TATAAA **1** w warstwie MIP-TATAAA osadzonej na tej bramce.

Opracowane i wykonane chemosensory wykazują wysoką selektywność oznaczania TATAAA **1** względem związków przeszkadzających, takich jak oligonukleotydy z zamienionym przynajmniej jednym nukleotydem. Przykładowo, czułość oznaczania TATAAA **1** jest znacznie wyższa niż oligonukleotydu TATAGA.

Wynalazek jest bliżej przedstawiony poniżej, w korzystnych przykładach wykonania, z odniesieniem do załączonego rysunku, na którym:

Fig. 1 przedstawia (a) proponowany wzór strukturalny kompleksu **1** z monomerami funkcyjnymi **4** i **5** oraz (b) model szkieletowy zoptymalizowanego za pomocą teorii funkcjonału gęstości (ang. density functional theory, DFT) na poziomie B3LYP/3-21G(*) fragmentu TA sekwencji TATAAA skompleksowanego dwoma monomerami

funkcyjnymi, **4** i **5**,

Fig. 2 przedstawia krzywe potencjałowej zależności (a) prądu jak również zmian (b) częstotliwości rezonansowej i (c) rezystancji dynamicznej równocześnie zarejestrowanych w trakcie osadzania warstwy MIP-TATAAA, za pomocą elektropolimeryzacji w warunkach potencjodynamicznych, na elektrodzie złotej rezonatora kwarcowego o podstawowej częstotliwości rezonansowej 10 MHz, przy czym polimeryzacja ta prowadzona była w 0,04 mM **1**, 0,1 mM **4**, 0,05 mM **5**, 1 mM **6** w 0.1 M (TBA)ClO₄, w roztworze rozpuszczalników, acetonitrylu, wody, toluenu i izopropanolu, zmieszanych w stosunku objętościowym jak, odpowiednio, 7,5 : 1 : 1 : 0,5, w zakresie potencjałów od 0,50 do 1,25 V vs Ag|AgCl, przy szybkości zmian potencjału 50 mV/s,

Fig. 3 przedstawia wysokiej rozdzielczości widma rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronowej (XPS) w zakresie energii wiązania elektronu P 2p dla warstwy MIP-TATAAA osadzonej na płytce szklanej z napylnym złotem (a) przed (krzywa 1) i po (krzywa 2) ekstrakcji oligonukleotydu TATAAA **1** za pomocą 0,1 M NaOH przez 3 godz. w temperaturze 25 °C. Dla porównania, (b) przedstawia widmo XPS (krzywa 3) dla warstwy TATAAA **1** przygotowanej przez nakroplenie na taką płytkę a następnie odparowanie 40 μM TATAAA w mieszaninie rozpuszczalników, acetonitrylu, wody, toluenu i izopropanolu a warunki osadzania podane są w opisie do Fig. 1,

Fig. 4 przedstawia dwuwymiarowe zdjęcie mikroskopii sił atomowych (AFM) warstwy polimeru MIP-TATAAA osadzonej na płytce szklanej z napylnym złotem w warunkach osadzania podanych w opisie do Fig. 3, przy czym pole widzenia wynosiło (0,5 × 0,5) μm²,

Fig. 5 przedstawia zmiany prądu źródło-dren w czasie po kolejnym dodaniu próbek wodnych roztworów oligonukleotydu TATAAA o różnych objętościach, zarejestrowane za pomocą czujnika EG-FET z bramką pokrytą (1) warstwą MIP-TATAAA z wyekstrahowanym następnie oligonukleotydem TATAAA **1** lub (2) warstwą NIP, przy czym napięcie źródło-dren i bramki wynosiło, odpowiednio, 1,7 i 1,50 V a zmiany te rejestrowano w warunkach stacjonarnych,

Fig. 6 przedstawia krzywe kalibracyjne oznaczania oligonukleotydu TATAAA **1**

skonstruowane z wykorzystaniem pomiarów wykonanych za pomocą czujnika EG-FET pokrytego (1) warstwą MIP-TATAAA z następnie wyekstrahowanym oligonukleotydem TATAAA 1 oraz (2) warstwą NIP, przy czym parametry pomiaru były identyczne jak te podane w opisie do Fig. 5,

Fig. 7 przedstawia krzywe kalibracyjne oznaczania (1) oligonukleotydu TATAAA 1 oraz (2) oligonukleotydu TATAGA skonstruowane z wykorzystaniem pomiarów wykonanych za pomocą czujnika EG-FET z bramką pokrytą warstwą MIP-TATAAA z następnie wyekstrahowanym oligonukleotydem TATAAA 1 oraz (3) warstwą NIP, przy czym parametry pomiaru były identyczne jak te przedstawione w opisie do Fig. 5,

Fig. 8 przedstawia zmianę częstotliwości rezonansowej w czasie dla zastrzykiwanych próbek roztworów o objętości 200 μ L i o różnych stężeniach oligonukleotydu TATAAA, przy czym zmiana ta była mierzona w warunkach analizy przepływo-wstrzykowej (FIA) dla warstwy MIP-TATAAA z wyekstrahowanym oligonukleotydem TATAAA pokrywającej elektrodę złotą rezonatora kwarcowego o podstawowej częstotliwości rezonansowej 10 MHz a 0,1 M bufor fosforanowy (pH = 7,5), pompowany z szybkością 35 μ L/min, służył jako roztwór nośny,

Fig. 9 przedstawia krzywą kalibracyjną oznaczania oligonukleotydu TATAAA skonstruowaną za pomocą czujnika piezomikrograwimetrycznego z Au-QCR pokrytym wyekstrahowaną warstwą MIP-TATAAA, przy czym parametry pomiaru były identyczne jak te przedstawione w opisie do Fig. 8.

Korzystne przykłady wykonania wynalazku

Wykonanie wynalazku jest zilustrowane za pomocą sześciu korzystnych przykładów wykonania przedstawionych poniżej.

Przykład 1

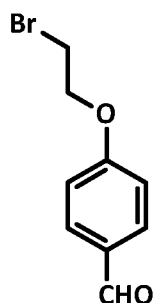
Wytwarzanie monomeru funkcyjnego 4, 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu]

Metoda trój etapowej syntezy monomeru funkcyjnego (4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu]) 4 została opracowana w ramach

niniejszych badań, na ich potrzeby, w sposób następujący.

Etap 1. Synteza 4-(2-bromoetoksy)benzaldehydu (Schemat 5)

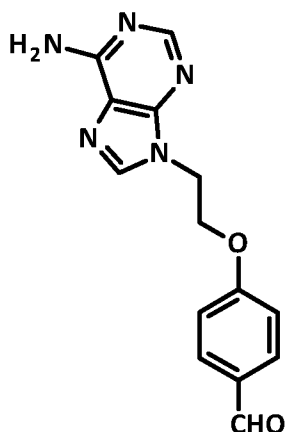
4-Hydroksybenzaldehyd (1,30 g, 10,64 mmoli) i 1,2-dibromoetan (8,00 g, 42,58 mmoli) rozpuszczono w acetonie (100 mL). Następnie dodano K_2CO_3 (8,80 g, 63,67 mmoli) i mieszano przez 16 godz. w temperaturze 70 °C. Po odparowaniu rozpuszczalnika, surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym. Jako eluent zastosowano roztwór heksanu i chloroformu w stosunku objętościowym jak 4 : 1. Otrzymano 1,20 g czystego produktu (Wydajność 32 %). 1H NMR ($CDCl_3$) δ 9,70 (s, 1H), 7,65 (d, 2H), 6,83 (d, 2H), 4,20 (t, 2H), 3,50 (t, 2H).



Schemat 5. Wzór strukturalny 4-(2-bromoetoksy)benzaldehydu.

Etap 2. Synteza 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-yl)etoksy]benzaldehydu (Schemat 6)

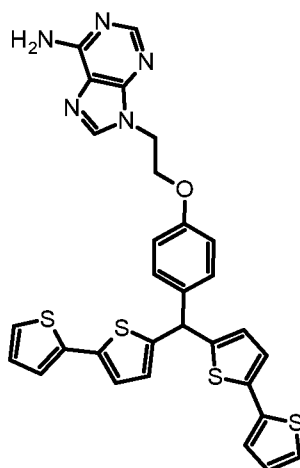
Adeninę (300 mg, 2,22 mmoli) i K_2CO_3 (3,00 g, 21,7 mmoli) dodano do DMF (100 mL) i mieszano przez 1 godz. w temperaturze 130 °C. Po odparowaniu rozpuszczalnika, surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym. Jako eluent zastosowano roztwór chloroformu i metanolu w stosunku objętościowym jak 4 : 1. Otrzymano 350 mg czystego produktu (wydajność 44 %). 1H NMR ($CDCl_3$) δ 8,18 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 9,75 (s, 1H), 7,70 (d, 2H), 6,95 (d, 2H), 4,30 (t, 2H), 3,88 (t, 2H).



Schemat 6. Wzór strukturalny 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]benzaldehydu.

Etap 3. Synteza 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu]
(Schemat 7)

Przygotowano zawiesinę 2,2'-bistiofenu (220 mg, 1,32 mmola) i 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]benzaldehydu (100 mg, 371,33 mola) w glikolu etylenowym (50 mL). Do zawiesiny tej dodano 70% kwas chlorowy(VII) (8,2 mL) i mieszano ją przez 16 godz. w temperaturze 60 °C. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, do mieszaniny reakcyjnej dodano nadmiar chlorku metylenu. Następnie mieszaninę przemyto nasyconym roztworem Na₂CO₃, po czym wodą. Wreszcie wysuszono ją siarczanem sodu i odparowano do sucha. Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym. Jako eluent zastosowano chlorek metylenu. Otrzymano 20 mg czystego produktu (Wydajność 6%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 8,17 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,22 (d, 2H), 7,15 (d, 2H), 7,06 (dd, 2H), 6,97 (dd, 2H), 6,94 (d, 2H), 6,78 (d, 2H), 6,70 (d, 2H), 5,76 (s, 1H), 4,78 (t, 2H), 4,42 (t, 2H). ESI-MS, M. cz. obliczona dla C₃₀H₂₃N₅O₄: 597,80, wyznaczona: 598,08.



Schemat 7. Wzór strukturalny 4-[2-(6-amino-9H-purin-9-yl)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-yl)metanu] **4**.

Przykład 2

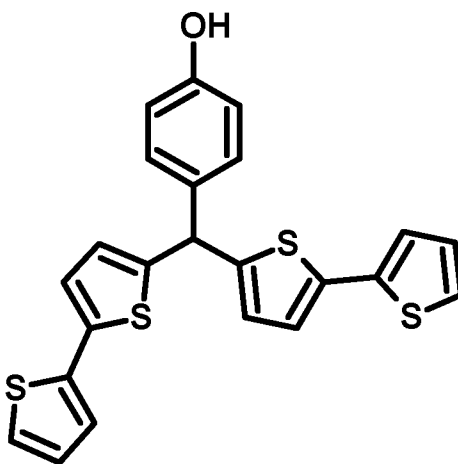
Otrzymywanie monomeru funkcyjnego **5**, 1-tyminooctanu 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylometylo)fenylu

Dwuetakowa synteza monomeru funkcyjnego, 1-tyminooctanu 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylometylo)fenylu **5** została opracowana w ramach niniejszych badań, na ich potrzeby, w sposób następujący.

Etap 1. Synteza 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylometylo)fenolu (Schemat 8)

Przygotowano zawiesinę 2,2'-bitiofenu (4,00 g, 24,06 mmoli) i 4-hydroksybenzaldehydu (1,47 g, 12,07 mmoli) w glikolu etylenowym (200 mL). Do zawiesiny tej dodano 60% kwas chlorowy(VII) (25 mL) i mieszano ją przez 24 godz. w temperaturze 60 °C. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodano do niej eter dietylowy (50 mL) i otrzymany roztwór przemyto dwa razy wodą (po 100 mL), a następnie solanką (50 mL). Po wysuszeniu siarczanem magnezu, rozpuszczalnik odparowano pod obniżonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym. Jako eluent zastosowano roztwór heksanu i octanu etylu o stosunku objętościowym zmienianym w kolejności jak 9:1→8:1→7:1→6:1. Otrzymano 2,00 g jasnofioletowego produktu (Wydajność 38 %) o t.t. 71 °C z rozkładem. ¹H NMR (400 MHz,

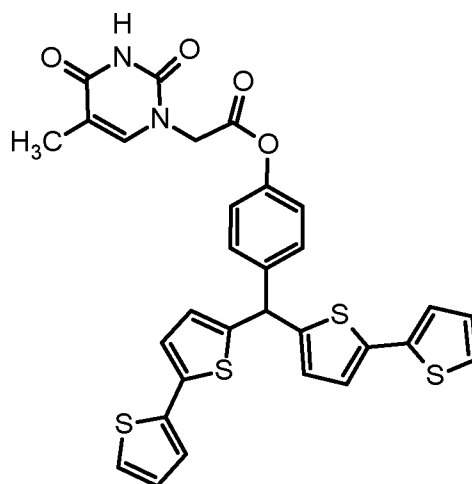
CDCl_3) δ 7,26–7,20 (m, 1H), 7,16 (dd, $J = 5,1, 1,0$ Hz, 1H), 7,08 (dd, $J = 3,6, 1,0$ Hz, 1H), 7,00 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H), 6,96 (dd, $J = 5,1, 3,6$ Hz, 1H), 6,83–6,77 (m, 1H), 6,74 (dd, $J = 3,6, 0,8$ Hz, 1H), 5,70 (s, 1H), 4,86 (s, 1H), 1,61 (s, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 154,9, 146,8, 137,6, 137,0, 135,5, 129,8, 127,9, 126,8, 124,3, 123,6, 123,3, 115,6, 47,2.



Schemat 8. Wzór strukturalny 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylometylo)fenolu.

Etap 2. Synteza 1-tyminooctanu 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylometylo)fenylu 5 (Schemat 9)

4-(Di-2,2'-bitiofen-5-ylometylo)fenol (610,1 mg, 1,4 mmoli) i kwas 1-tyminooctowy (352,4 mg, 1,93 nmoli) rozpuszczono w chlorku metylenu (14 mL). Do otrzymanego roztworu dodano roztwor DCC w chlorku metylenu (2,8 mL, 1,0 M) i mieszano przez 18 godz. Następnie chlorek metylenu odparowano. Ze stałej pozostałości przygotowano zawiesinę w metanolu (30 mL) i gotowano ją pod chłodnicą zwrotną przez 1 godz. Wytrącony osad odsączono na gorąco i przemyto metanolem. Otrzymano 724,4 mg białego produktu o t.t. 191 °C z rozkładem. (wydajność 86%). ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11,45 (s, 1H), 7,70–7,34 (m, 5H), 7,34–6,96 (m, 8H), 6,87 (s, 2H), 6,11 (s, 1H), 4,77 (s, 2H), 1,78 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 167,1, 164,2, 151,0, 149,0, 145,8, 141,4, 140,8, 136,3, 136,0, 129,3, 128,2, 127,2, 125,3, 123,9, 123,5, 121,7, 108,8, 48,6, 45,7, 11,9.



Schemat 9. Wzór strukturalny 1-tyminooctanu 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylometylo)fenyl 5.

Przykład 3

Obliczenia kwantowo-chemiczne dla kompleksu TATAAA 1 z monomerami funkcyjnymi 4 i 5

Strukturę kompleksu oligonukleotydu TATAAA 1 z monomerami funkcyjnymi 4 i 5 o różnych stosunkach molowych zoptymalizowano (Fig. 1b) a wartości funkcji termodynamicznych jego tworzenia obliczono za pomocą teorii funkcyjna gęstości (ang. density functional theory, DFT) w przybliżeniu B3LYP/3-21g* przy zastosowaniu oprogramowania Gaussian 09 {M. J. Frisch, et al., Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA 2009}. Przeprowadzone obliczenia wskazały, że kompleks o stosunku molowym oligonukleotydu TATAAA: 4 : 5 jak, odpowiednio, 1 : 2,5 : 1,25, jest trwały. Zmiana całkowitej swobodnej entalpii tworzenia kompleksu fragmentu TA sekwencji TATAAA z dwoma z monomerami funkcyjnymi 4 i 5 wynosi, $\Delta G = -256,64 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Przykład 3

Osadzanie warstw MIP-TATAAA na różnych elektrodach badanych

Warstwy MIP-TATAAA wytworzono za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej w warunkach potencjodynamicznych w zakresie potencjałów od 0,50 do 1,25 V vs Ag|AgCl przy szybkości zmian potencjału 50 mV/s. Do polimeryzacji zastosowano roztwór mieszaniny rozpuszczalników, acetonitrylu, wody, toluenu i izopropanolu, o stosunku objętościowym jak, odpowiednio, 7,5 : 1 : 1 : 0,5, zawierający oligonukleotyd TATAAA 1, 1-tyminooctan 4-(di-2,2'-

bitiofen-5-ylometylo)fenolu **5**, 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-yl)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-yl)metan] **4** o stosunku molowym jak, odpowiednio, 1 : 2,5 : 1,25. Stosunek ten przyjęto na podstawie przeprowadzonych obliczeń kwantowo-chemicznych opisanych w Przykładzie 2, powyżej. Stężenie oligonukleotydu TATAAA **1** w roztworze mieszaniny rozpuszczalników, acetonitrylu, wody, toluenu i izopropanolu, o stosunku objętościowym jak, odpowiednio, 7,5 : 1 : 1 : 0,5, wynosiło 0,04 mM. Aby wdrukowane w polimerze luki molekularne były trwałe, do roztworu do polimeryzacji dodano monomer sieciujący **6** o stosunku molowym oligonukleotydu TATAAA **1** do monomeru sieciującego jak 1 : 25. Przewodność roztworu do polimeryzacji zapewnił elektrolit podstawowy, 0,1 M chloran(VII) tetrabutylamoniowy, (TBA)ClO₄. W tak przygotowanym roztworze umieszczono odpowiednią elektrodę badaną, na której osadzono polimer MIP-TATAAA kontrolując jego grubość za pomocą liczby cykli zmian potencjału. Warstwę MIP-TATAAA osadzono na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm, na elektrodzie złotej Au-QCR, o podstawowej częstotliwości rezonansowej 10 MHz, lub też na płytce szklanej z naparowaną warstwą złota na podkładzie tytanowym. Przygotowane w celach porównawczych warstwy polimeru niewdrukowanego (ang. non-imprinted polymer, NIP) osadzono z roztworu do elektropolimeryzacji nie zawierającego szablonu oligonukleotydu TATAAA stosując taką samą procedurę jak procedura zastosowana do osadzania warstw MIP-TATAAA.

W celu osadzenia warstwy MIP-TATAAA na elektrodzie złotej Au-QCR zastosowano elektropolimeryzację w warunkach potencjodynamicznych za pomocą sześciu cykli zmian potencjału w zakresie od 0,50 do 1,25 V vs Ag|AgCl przy szybkości zmian potencjału 50 mV/s (Fig. 2). W trakcie osadzania, na krzywej zależności prądu od potencjału widoczny był prąd anodowy związany z utlenianiem monomerów przy potencjale powyżej 0,9 V i pik anodowy przy potencjale 1,0 V (Fig. 2a). W kolejnych cyklach zmian potencjału natężenie prądu spadło od 0,9 do 1,1 V w związku z osadzeniem warstwy polimeru o coraz wyższej oporności. Na krzywych zależności prądu od potencjału nie obserwowano prądów katodowych, które odpowiadały redukcji powstającego polimeru. Oligonukleotyd TATAAA **1** jest elektrochemicznie nieaktywny w zastosowanym zakresie potencjałów.

Rejestrowane równocześnie ze zmianami prądu zmiany częstotliwości rezonansowej Au-QCR (Fig. 2b) wskazały, że utlenianiu monomerów towarzyszył spadek częstotliwości rezonansowej. Ten spadek wywołany był wzrostem masy Au-QCR w wyniku osadzania polimeru. Częstotliwość malała w każdym cyklu po osiągnięciu potencjału prądu piku.

Spadek częstotliwości w kolejnych cyklach towarzyszył spadkowi prądu utleniania. Wskazuje to na wzrost oporności warstwy polimeru wraz ze wzrostem grubości warstwy.

W celu przeprowadzenia pomiarów elektrochemicznych, warstwę MIP-TATAAA osadzono również na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm. Natomiast w celu scharakteryzowania warstwy i przygotowania chemoczuJNIKA EG-FET, warstwę tę osadzono na płytce szklanej z warstwą złota napyłoną na podkładzie tytanowym. W tych badaniach zastosowano taką samą procedurę osadzania MIP-TATAAA jak opisana powyżej procedura zastosowana do osadzania warstwy na elektrodzie złotej Au-QCR.

Zarówno na Au-QCR, na elektrodzie platynowej jak i na płytkach złotych, w wyniku polimeryzacji powstawała brązowa warstwa o dobrej przyczepności do podłoża. Tak naniesione warstwy przemyto acetonitrylem w celu usunięcia z nich śladów elektrolitu podstawowego i niespolimeryzowanych monomerów.

Ekstrakcja oligonukleotydu TATAAA z warstw MIP-TATAAA

W celu opróżnienia luk molekularnych w polimerze, z osadzonych warstw MIP-TATAAA wyekstrahowano szablon oligonukleotydu TATAAA za pomocą 0,1 M NaOH w ciągu 3 godz. w temperaturze 25 °C. Do ekstrakcji zastosowano roztwór o tej właśnie kwasowości z uwagi na dysocjację podwójnych łańcuchów DNA na pojedyncze przy wysokich wartościach pH. Postęp ekstrakcji szablону monitorowano za pomocą rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS) w zakresie energii wiązania elektronów atomu fosforu. W tym zakresie dla warstwy przed ekstrakcją występowały dwa piki o energii wiązania 133,6 i 134,5 eV (Fig. 3a) odpowiadające elektronom, odpowiednio, $2p_{3/2}$ i $2p_{1/2}$ atomu fosforu {A. Jaramillo, et al., *Analyst* **1999**, 124, 1215}. Potwierdzają one obecność TATAAA **1** w warstwie MIP-TATAAA, jako że w badanym układzie tylko TATAAA **1** zawiera fosfor. Pików fosforu nie było w widmie po ekstrakcji TATAAA **1** (Fig. 3b), co potwierdza całkowite usunięcie oligonukleotydu TATAAA z warstwy polimeru. Uzyskane wyniki wskazują na skuteczność usuwania szablónu oligonukleotydu TATAAA **1** z polimeru i umożliwiają oszacowanie czasu niezbędnego do całkowitego usunięcia oligonukleotydu TATAAA **1** z polimeru.

Morfologia warstwy MIP-TATAAA

W celu określenia grubości i szorstkości, warstwę MIP-TATAAA osadzono na płytkach

szklanych pokrytych złotem za pomocą procedury opisanej w Przykładzie 4, powyżej. Warstwę tę osadzono za pomocą sześciu cykli zmian potencjału a następnie szablon TATAAA 1 wyekstrahowano według procedury opisanej w Przykładzie 4, powyżej. Następnie zarejestrowano zdjęcia mikroskopii sił atomowych (ang. atomic force microscopy, AFM) powierzchni warstw i na ich podstawie określono ich grubość i szorstkość. Zdjęcia wykonano w trybie ScanAsyst za pomocą mikroskopu AFM Nanoscope V firmy Bruker (RFN) sterowanego oprogramowaniem Multimode w wersji 8. Dwuwymiarowe zdjęcie obszaru powierzchni ($0,5 \times 0,5$) μm^2 warstwy MIP-TATAAA (Fig. 4) pokazuje, że warstwa zbudowana jest z nieregularnych agregatów o wymiarach kilkudziesięciu nanometrów. Osadzona warstwa MIP-TATAAA ma grubość 230 nm a jej szorstkość wyrażona za pomocą parametru R_a wynosi 2,6 nm.

Przykład 5

Oznaczanie oligonukleotydu TATAAA 1 za pomocą czujnika chemicznego w postaci tranzystora polowego z zewnętrzną bramką (EG-FET) pokrytą warstwą MIP-TATAAA rozpoznającą oligonukleotyd TATAAA 1

W celu przygotowania czujnika EG-FET do oznaczania oligonukleotydu TATAAA 1 w roztworze badanym, warstwę MIP-TATAAA osadzono na płytce szklanej pokrytej warstwą złota na podłożu tytanowym stosując procedurę opisaną w Przykładzie 4, powyżej. Powierzchnia i grubość osadzonej warstwy wynosiła, odpowiednio, $\sim 0,7 \text{ cm}^2$ i $\sim 230 \text{ nm}$. Z tak osadzonej warstwy wyekstrahowano szablon oligonukleotydu TATAAA 1 według procedury opisanej w Przykładzie 4, powyżej. Następnie płytkę z tą warstwą podłączono do bramki komercyjnego tranzystora polowego tak, aby tworzyła tzw. zewnętrzną bramkę (extended gate) {C.-P. Chen, et al., *Anal. Chem.* **2011**, 83, 1938}. Płytkę tę umieszczono w naczynku elektrochemicznym, w którym umieszczano również elektrodę odniesienia w postaci drutu platynowego tworzącą bramkę elektrochemiczną. Do naczynka wiano wodę dejonizowaną. Elektrodę odniesienia podłączono do dwukanałowego źródła wymuszająco-pomiarowego model 2636A firmy Keithley. Natomiast źródło i dren tranzystora polowego oraz zewnętrzną bramkę podłączono do drugiego kanału tego źródła. Następnie w tak przygotowanym układzie pomiarowym zarejestrowano charakterystyki tranzystora, zależności prądu źródło-dren (i_{sd}) od napięcia źródło-dren (U_{sd}) w zakresie od 0 do 5,0 V przy

zadany napięciu bramki, $U_g = 1,50$ V.

Po każdym dodaniu roztworu oligonukleotydu TATAAA **1** rejestrowano krzywą $i_{sd} - U_{sd}$ i mierzono wzrost granicznego prądu źródło-dren $i_{sd,lim}$. Wzrost ten wywołany był zwiększaniem ilości nośników ładunku w obszarze bramkowym tranzystora wskutek zmiany ładunku warstwy polimeru MIP-TATAAA związanej z selektywną absorpcją oligonukleotydu TATAAA **1** w tej warstwie. Na podstawie tych pomiarów skonstruowano krzywą zależności prądu granicznego, $i_{sd,lim}$, od czasu przy $U_{sd} = 1,7$ V i $U_g = 1,50$ V (Fig. 6). Zgodnie z oczekiwaniem, po dodaniu każdej kolejnej próbki roztworu oligonukleotydu TATAAA **1**, $i_{sd,lim}$ wzrastał w miarę jak oligonukleotyd TATAAA wiązany był w warstwie MIP-TATAAA. Dla porównania, pomiary takie przeprowadzono z zastosowaniem płytki szklanej z napyłonym złotem pokrytej warstwą polimeru NIP (krzywa 2, Fig. 6). Dla tego polimeru, $i_{sd,lim}$ małał proporcjonalnie do stężenia oligonukleotydu TATAAA w roztworze. Jednakże bezwzględne zmiany $i_{sd,lim}$ były znacznie mniejsze niż w przypadku zastosowania zewnętrznej bramki pokrytej polimerem MIP-TATAAA. Liniowy zakres stężeniowy rozciągał się przynajmniej od 0,10 do 7,5 μ M (Fig. 7). Wyznaczona czułość tego chemoczuJNIKA wynosiła $3,57 \times 10^{-4}$ nA $cm^{-2} \mu$ M⁻¹ ze współczynnikiem korelacji 0,92 a jego wykrywalność, przy stosunku sygnału do szumu, $S/N = 3$, wynosiła 330 nM TATAAA **1**. Ponadto, z nachylenia krzywych kalibracyjnych wyznaczono wartość pozornego współczynnika wdrukowania oligonukleotydu TATAAA **1** mierzonego stosunkiem czułości chemoczuJNIKA z warstwą MIP-TATAAA do czułości czuJNIKA z warstwą NIP. Współczynnik ten był bardzo wysoki, wynosił bowiem 33.

W celu wyznaczenia selektywności chemoczuJNIKA EG-FET przeprowadzono serię pomiarów z zastosowaniem pokrytej złotem szklanej płytki z osadzoną warstwą MIP-TATAAA, po wyekstrahowaniu szablonu, oligonukleotydu TATAAA. W pomiarach tych do naczynka dodawano wodne roztwory oligonukleotydu TATAGA **2** jako substancję przeszkadzającą. Krzywą kalibracyjną skonstruowaną na podstawie tych pomiarów przedstawia Fig. 7. Po dodaniu kolejnej porcji roztworu TATAGA, $i_{sd,lim}$ nieznacznie spadała. Jest to efekt przeciwny do obserwowanego w przypadku oligonukleotydu TATAAA. Wskazuje on na niewielkie zmniejszanie liczby nośników ładunku w obszarze bramkowym tranzystora w wyniku tylko nieznacznej absorpcji oligonukleotydu TATAGA w warstwie polimeru MIP-TATAAA.

Wyznaczone parametry analityczne przemawiają za tym, że wytworzony czuJNIK chemiczny EG-FET nadaje się do oznaczania oligonukleotydu TATAAA w układach

biologicznych.

Przykład 6

Oznaczanie oligonukleotydu TATAAA 1 w warunkach FIA za pomocą chemoczuJNIKA PM z warstwą rozpoznającą MIP-TATAAA

Do oznaczania oligonukleotydu TATAAA 1 w warunkach analizy przepływowo-wstrzykowej (ang. flow-injection analysis, FIA) za pomocą chemosensora piezomikrograwimetrycznego (PM) zastosowano przetwornik Au-QCR pokryty warstwą MIP-TATAAA o grubości ~230 nm, zgodnie z procedurą opisaną w Przykładzie 4, powyżej. Objętość każdej próbki zastrzykiwanego roztworu wynosiła 250 μl . Zastrzykiwane substancje rozpuszczono w roztworze o takim samym składzie jak roztwór nośny, tj. w 0,1 M buforze fosforanowym (pH = 7,0). Szybkość przepływu roztworu nośnego wynosiła 35 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Wyniki pomiarów pokazane są na Fig. 8. Dla dostatecznie sztywnych warstw MIP-TATAAA zmiana częstotliwości rezonansowej, Δf , jest przeciwna do zmian masy, Δm , zgodnie z zależnością Sauerbry'a, Równanie 1 {D. A. Buttry, et al., *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1355}.

$$\Delta f = - \frac{2 f_0^2 \Delta m}{A_{ac} (\mu_q \rho_q)^{1/2}} \quad (1)$$

W równaniu tym f_0 oznacza podstawową częstotliwość rezonansową rezonatora kwarcowego. Dla zastosowanych w naszych badaniach rezonatorów kwarcowych, $f_0 = 10$ MHz. Akustycznie czynna powierzchnia stosowanych Au-QCR, A_{ac} , wynosiła 0,1963 cm^2 . Pozostałe wielkości w Równaniu 1 to μ_q - moduł ścinający monokryształu kwarcu o cięciu AT ($2,947 \times 10^{11} \text{ g s}^{-2} \text{ cm}^{-1}$) i ρ_q - gęstość kwarcu ($2,648 \text{ g cm}^{-3}$). Zmiany lepkości i gęstości warstw MIP-TATAAA w trakcie pomiaru można zaniedbać {A. Pietrzyk, et al., *Anal. Chem.* **2009**, 81, 10061}.

Zarejestrowane krzywe zmian Δf w czasie dla Au-QCR pokrytego warstwą MIP-TATAAA (krzywa 1, Fig. 8) i NIP (krzywa 2, Fig. 8) wykazują spadek częstotliwości rezonansowej po zastrzyknięciu każdej kolejnej porcji oligonukleotydu TATAAA 1. Za ten spadek odpowiedzialny był wzrost masy polimeru wynikający z wnikania oligonukleotydu TATAAA 1 do wdrukowanych luk molekularnych MIP-TATAAA. Ponieważ pomiar prowadzony był w warunkach FIA, nadmiar roztworu nośnego następnie wypłukiwał

oligonukleotyd TATAAA **1** z warstwy prowadząc do wzrostu częstotliwości rezonatora do poziomu sygnału tła (tj. do spadku jego masy). Pomiary te wskazują na odwracalne wiązanie analitu w warstwie MIP-TATAAA. Wysokość pików zmian częstotliwości była zależna do stężenia TATAAA w roztworze badanym przynajmniej w zakresie od 2 do 25 μM (Fig. 9). Wykrywalność chemoczuJNIKA PM z warstwą MIP-TATAAA, wyznaczona dla $S/N = 3$, wynosiła 18 nM TATAAA **1**, a jego czułość $-5,09 \text{ Hz cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ ze współczynnikiem korelacji 0,98.

Tak więc wykrywalność chemoczuJNIKA PM jest wyższa niż chemoczuJNIKA EG-FET, co przemawia za tym, że wytworzony chemiczny czujnik PM nadaje się do oznaczania oligonukleotydu TATAAA **1** w układach biologicznych.

Wnioski

Obliczenia kwantowo-mechaniczne wykazały możliwość tworzenia kompleksu oligonukleotydu TATAAA zarówno z każdym z monomerów funkcyjnych z osobna, jak też z obydwojma monomerami równocześnie. Wyniki obliczeń dają wgląd w strukturę i stechiometrię tworzonego kompleksu pre-polimeryzacyjnego.

Zsyntetyzowano dwie nowe pochodne bis(2,2'-bitien-5-yl)metanu, jedna z fragmentem tyminowym a druga – adeninowym, zdolne do wdrukowania molekularnego nie tylko oligonukleotydu TATAAA ale i innych amin biogenicznych lub oligonukleotydów.

Elektropolimeryzacja potencjodynamiczna w zakresie dodatnich potencjałów jest przydatna do wytwarzania warstw polimerów tiofenowych molekularnie wdrukowanych za pomocą oligonukleotydu TATAAA. Opracowana metoda polimeryzacji pozwala na szybkie przygotowanie warstw MIP o znacznej grubości (200-300 nm) trwale przylegających do przewodzącego podłoża zarówno o znacznej (Au-QCR) jak i nieznacznej szorstkości (Au/szkło, elektrody platynowe). Metoda ta pozwala na dogodną kontrolę grubości i porowatości otrzymanych warstw za pomocą liczby cykli zmian potencjału oraz doboru odpowiednich składników porogenicznych roztworu do elektropolimeryzacji (np. rodzaju elektrolitu podstawowego).

Opracowana i wykorzystana metoda osadzania warstw polimeru molekularnie wdrukowanego oligonukleotydem TATAAA umożliwia łatwą ich integrację z przetwornikami sygnału chemicznego, takimi jak chemoczułe tranzystory polowe z zewnętrzną bramką (EG-

FET) i przetworniki piezomikrograwimetryczne.

Z pomiarów piezomikrograwimetrycznych w warunkach analizy przepływowo-wstrzykowej wynika, że wiązanie oligonukleotydu TATAAA w lukach molekularnych polimeru MIP-TATAAA jest odwracalne. Świadczy o tym pojawianie się pików na krzywej zmian częstotliwości rezonansowej Au-QCR pokrytego warstwą MIP-TATAAA w funkcji czasu po zastrzyknięciu kolejnych porcji roztworu oligonukleotydu TATAAA. Oznacza to, że chemoczuJNIK ten może być urządzeniem wielokrotnego użycia. Ponadto pomiary za pomocą chemoczuJNIKA PM w obecności substancji przeszkadzających, takich jak oligonukleotydy TATAGA, wykazują, że oznaczanie TATAAA jest wysoce selektywne.

Spośród dwóch zbudowanych w ramach wynalazku chemoczuJNIKÓW, chemoczuJNIK PM wykazał wyższą wykrywalność oligonukleotydu TATAAA. Wynosiła ona 18 nM TATAAA **1**. Wykrywalność chemosensora EG-FET również była wysoka i wynosiła 330 nM TATAAA **1**. Wykrywalności obu chemoczuJNIKÓW są wystarczające do oznaczania oligonukleotydu TATAAA **1** w układach biologicznych. Dodatkowo czujniki te pracują w środowisku wodnym, co ułatwia ich zastosowanie do oznaczeń nukleotydów w płynach ustrojowych.

Podziękowania

Niniejsza praca była sfinansowana ze środków Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (grant POMOST/2012-6/10 dla A.P.L.), w ramach projektu „Kwantowe nanostruktury półprzewodnikowe do zastosowań w biologii i medycynie – Rozwój i komercjalizacja nowej generacji urządzeń diagnostyki molekularnej opartych o nowe polskie przyrządy półprzewodnikowe” (POIG.01.01.02-00-008/08 dla W.K.) oraz ze środków US National Science Foundation (Grant No. 1110942, dla F.D.).

Opłaty związane z ochroną wynalazku sfinansowano ze środków projektu Nanotechnology, Biomaterials and alternative Energy Source for ERA integration FP7-REGPOT-CT-2011-285949-NOBLESSE.