

Sposób wytwarzania polimeru z promotorową sekwencją TATAAA w sztucznej kasecie TATA oraz zastosowanie tego polimeru do rozpoznawania i/lub selektywnego oznaczania sześci nukleotydowej sekwencji DNA

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania polimeru z promotorową sekwencją TATAAA w sztucznej kasecie TATA oraz zastosowanie tego polimeru do rozpoznawania i/lub selektywnego oznaczania sześci nukleotydowej sekwencji DNA. W szczególności wynalazek obejmuje zastosowanie tego polimeru do badania jego oddziaływań z wybranymi z białka TBP aminokwasami oraz w czujnikach chemicznych do rozpoznawania i/lub selektywnego oznaczania sześci nukleotydowej sekwencji DNA.

Kaseta TATA (ang. TATA box) to sekwencja dwuniciowego DNA (ang. Double-stranded DNA, dsDNA) występująca w wielu promotorach genów eukariotycznych. W kasecie tej, w odległości około 25 nukleotydów od miejsca rozpoczęcia transkrypcji, znajduje się sekwencja 5'-TATAAA-3'. Do sekwencji tej przyłącza się białko wiążące TATA (ang. TATA-binding protein, TBP). Białko TBP działa jako element czynnika transkrypcyjnego, który umożliwia polimerazie RNA rozpoznanie sekwencji promotora TATAAA i rozpoczęcie transkrypcji.

Różnorodność zastosowań polimerów wdrukowanych molekularnie, (ang. molecularly imprinted polymers, MIPs) i ich zalety wskazują, że MIP-y można bezpośrednio zastosować jako matryce nici kwasów nukleinowych. To wdrukowanie molekularne sprawia, że wdrukowana pojedyncza nić DNA, spełniająca rolę szablonu, odciska swój ślad w polimerze. Po usunięciu tego szablonu w polimerze pozostaje wnęka molekularna, która pod względem wielkości, kształtu, liczby i orientacji miejsc rozpoznających odpowiada wdrukowanej sekwencji DNA.

Do budowy MIP ze sztuczną kasetą TATA i jej promotorową sekwencją TATAAA zastosowaliśmy dwa elektroaktywne monomery funkcyjne, pochodne bitiofenu podstawione zasadami nukleinowymi - jeden adeniną (A), 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan] **1**, a drugi tyminą (T), 1-tyminoctan 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylo)metan] **2**, oraz monomer siecujący (2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen **3**. Adeninowy i tyminowy monomer funkcyjny zaprojektowaliśmy i

zsyntetyzowaliśmy w celu przyłączenia szablonu TATAAA w kompleksie pre-polimeryzacyjnym za pomocą parowania zasad typu Watsona-Cricka, A-T i A-T, według procedury opisanej w naszym zgłoszeniu patentowym nr P. 409328 z dnia 29 sierpnia 2014.

Monomery te uczestniczyły w molekularnym wdrukowaniu oligonukleotydu TATAAA, zastosowanego jako szablon, za pomocą elektropolimeryzacji. W wyniku tej elektropolimeryzacji powstał MIP, w którym wokół oligonukleotydu TATAAA wytworzył się komplementarny łańcuch heksameru tiofenowego podstawiony zasadami nukleinowymi o sekwencji ATATTT.

Po wyekstrahowaniu oligonukleotydu TATAAA wytworzonego we wnętrzu molekularnej MIP-u, heksamer ATATTT hybrydyzował oligonukleotyd TATAAA tworząc sztuczną promotorową sekwencję TATAAA. Hybrydyzowanie to potwierdziliśmy za pomocą wybranych metod analitycznych, w tym pomiarów oporności przeniesienia ładunku za pomocą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (ang. electrochemical impedance spectroscopy, EIS), impedimetrycznych pomiarów pojemności (ang. capacitive impedimetry, CI) w warunkach analizy przepływowo-wstrzykowej (ang. flow-injection analysis, FIA), odbiciowo-absorpcyjnej spektroskopii w podczerwieni (ang. infra-red reflectance-absorption spectroscopy, IRRAS) i różnicowej woltamperometrii pulsowej (ang. differential pulse voltammetry, DPV). Opracowanie i przygotowanie warstw MIP z wyekstrahowanym oligonukleotydem TATAAA oraz ich połączenie z odpowiednimi przetwornikami rozpoznawania chemicznego sygnału na sygnał analityczny doprowadziło do wytworzenia selektywnych czujników chemicznych do wykrywania pojedynczych niedopasowań nukleozasad w sekwencji oznaczanego oligonukleotydu. W naszym czujniku chemicznym, zbudowanym z warstwy rozpoznającej kwasy nukleinowe i przetwornika sygnału chemicznego, nie ma potrzeby wbudowania znacznika, np. barwnika fluorescencyjnego niezbędnego do tradycyjnego fluorescencyjnego obrazowania DNA {J. Liu, et al., *Chem. Rev.* **2009**, 109, 1948}. W niniejszym wniosku przedstawiamy czujnik chemiczny, który służy do rozpoznawania i selektywnego oznaczania wybranych oligonukleotydów za pomocą CI.

Nie usuwając wdrukowanego oligonukleotydu TATAAA z warstwy polimeru MIP, otrzymaliśmy polimer z wypełnionymi szablonem wnękami molekularnymi jako matrycę polimerową z promotorową sekwencją TATAAA w sztucznej kasie TATA. W tej kasie grupy fosforanowe i reszty deoksyrybozy cząsteczki szablonu TATAAA nie były związane z monomerami funkcyjnymi w kompleksie pre-polimeryzacyjnym. Dlatego do tych miejsc w

sztucznej sekwencji promotorowej TATAAA chętnie przyłączały się wybrane cząsteczki aminokwasów występujące w TBP. Dlatego MIP z wbudowanymi sztucznymi kasetami TATA może rozpocząć transkrypcję przyłączając czynniki transkrypcyjne. Znana jest już elektrochemiczna platforma wiążąca TBP {Y. Zhang, et al., *Analyst* **2014**, 139, 2193}, lecz do jej budowy nie zastosowano MIP-ów.

W niniejszym wniosku zgłaszamy również do ochrony patentowej alternatywny sposób przygotowania rozpoznających oligonukleotydy MIP-ów za pomocą elektropolimeryzacji monomerów funkcyjnych w obecności PNA - elektrycznie nienaładowanego analogu DNA.

Zgodnie z wynalazkiem, sposób wytworzenia warstwy polimeru z promotorową sekwencją TATAAA w sztucznej kasecie TATA, do rozpoznawania wybranych aminokwasów występujących w białku wiążącym TATA (TBP) oddziałujących z kasetą TATA, metodą molekularnego wdrukowania prowadzącą do wytworzenia polimerów wdrukowanych molekularnie (MIP-ów), za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej w warunkach potencjodynamicznych, gdzie jako monomery funkcyjne do elektropolimeryzacji stosuje się 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan] **1** i 1-tyminoocetan 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylo-metylo)fenylu **2**, a jako monomer sieciujący stosuje się (2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen **3**, charakteryzuje się tym, że jako szablon/analit stosuje się sześci nukleotydową sekwencję DNA lub analog DNA, korzystnie peptydowy kwas nukleinowy (PNA), korzystnie analog oligonukleotydu TATAAA, tj. PNA-TATAAA.

Według wynalazku, do polimeryzacji stosuje się roztwór rozpuszczalników organicznych, korzystnie wody, acetonitrylu, toluenu i propanolu, o stosunku objętościowym jak, odpowiednio, 1,5 : 6 : 1 : 1,5, lub w acetonitrylu, zawierający sześci nukleotydową sekwencję DNA lub analog DNA, odpowiednio, 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)-metan] **1**, 1-tyminoocetan 4-(di-2,2'-bitiofen-5-ylo-metylo)fenylu **2**, (2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen **3**, korzystnie w stosunku molowym jak, odpowiednio, 1 : 2,5 : 1,25 : 25, oraz 0,1 M elektrolit podstawowy, korzystnie chloran(VII) tetrabutylamoniowy, (TBA)ClO₄.

Według wynalazku, stosuje się potencjał 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.

Ponadto wynalazek obejmuje zastosowanie warstwy rozpoznającego polimeru z promotorową sekwencją TATAAA w sztucznej kasecie TATA, otrzymanej sposobem według wynalazku, do wykrywania i/lub selektywnego oznaczania sześci nukleotydowej sekwencji DNA, w płynach ustrojowych pacjenta.

Korzystnie wynalazek ma zastosowanie do badań podstawowych obejmujących transkrypcję DNA z udziałem aminokwasów, takich jak: L-seryna, L-lizyna, kwas L-glutaminowy, L-asparagina, L-treonina, L-walina, L-fenylalanina i L-leucyna z warstwą otrzymanego polimeru, z wykorzystaniem mikrogravimetrii piezoelektrycznej (PM) w warunkach analizy przepływowo-wstrzykowej (FIA).

Korzystnie wynalazek ma zastosowanie w inżynierii genetycznej, zwłaszcza do testów genetycznych przy wczesnym wykrywaniu dziedzicznych chorób genetycznych.

Korzystnie wynalazek ma zastosowanie jako warstwa elementu czujnika chemicznego do wykrywania i/lub selektywnego oznaczania sześci nukleotydowej sekwencji DNA, w płynach ustrojowych pacjenta, z wykorzystaniem impedymetrycznych pomiarów pojemności (CI) w warunkach analizy przepływowo-wstrzykowej (FIA).

Korzystnie wynalazek ma zastosowanie do badania efektywności wdrukowania a następnie ekstrakcji szablonu TATAAA z warstwy MIP-TATAAA oraz unieruchomienia analitu TATAAA w warstwie MIPu za pomocą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS) pomiarów oporności przeniesienia ładunku dla elektrody pokrytej warstwą MIP-TATAAA, albo różnicowej voltamperometrii pulsowej (DPV), albo odbiciowo-absorpcyjnej spektroskopii w podczerwieni (IRRAS).

Wynalazek jest bliżej przedstawiony poniżej w korzystnych przykładach wykonania, z odniesieniem do załączonych rysunków.

Schemat 1 Kasetka TATA z wybranymi aminokwasami występującymi w białku wiążącym TATA, TBP (Y. Kim, J. H. Geiger, S. Hahn and P. B. Sigler, *Nature*, 1993, **365**, 512-520).

Fig. 1 Krzywe potencjodynamiczne dla acetonitrylowego roztworu 40 μ M TATAAA-PNA, 0,05 mM adeninowego monomeru funkcyjnego **1**, 0,1 mM tyminowego monomeru funkcyjnego **2**, i 0,2 mM monomer sieciujący **3**, w 0,1 M (TBA)ClO₄, zarejestrowane na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm dla siedmiu cykli zmian potencjału w

zakresie od 0,50 do 1,25 V vs Ag/AgCl. Szybkość zmian potencjału wynosiła 50 mV/s.

Fig. 2 Widma elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS) dla próbnika redoks, 0,1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ i 0,1 M $K_4[Fe(CN)_6]$, na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm, pokrytej warstwą MIP-TATAAA (krzywa 1) przed i (krzywa 2) po ekstrakcji szablonu TATAAA oraz (krzywa 3) po zanurzeniu elektrody z warstwą MIP-TATAAA z wyekstrahowanym szablonem na 15 min do roztworu 50 μ M TATAAA. Pomiary EIS przeprowadziliśmy przykładając sinusoidalnie zmienne napięcie o amplitudzie 10 mV w zakresie częstotliwości od 0,2 Hz do 500 kHz, przy stałym potencjale polaryzacji elektrody pracującej równym potencjałowi obwodu otwartego. Warstwę MIP-TATAAA osadziliśmy w warunkach potencjodynamicznych w trakcie sześciu cykli zmian potencjału w zakresie potencjałów od 0,50 do 1,25 V vs Ag/AgCl, przy szybkości zmian potencjału 50 mV/s.

Fig. 3 Widma odbiciowo-absorpcyjnej spektroskopii w podczerwieni (IRRAS) dla osadzonej na połączonym szkiełku mikroskopowym warstwy (1) TATAAA, (2) polimeru niewdrukowanego (NIP) oraz MIP-TATAAA (3) przed i (4) po ekstrakcji TATAAA za pomocą 0,1 M NaOH.

Fig. 4. Woltamperogramy różnicowej woltamperometrii pulsowej (DPV) dla 0,1 M $K_4Fe(CN)_6$ w 0,1 M KNO_3 , zarejestrowane na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm pokrytej warstwą MIP-TATAAA (krzywa 1) przed ekstrakcją i po (krzywa 2) 25-min i (krzywa 3) 45-min ekstrakcji szablonu TATAAA za pomocą 0,1 M NaOH oraz (krzywa 4) po zanurzeniu elektrody z warstwą MIP-TATAAA z wyekstrahowanym szablonem do roztworu 50 μ M TATAAA na 15 min. Warstwę MIP-TATAAA osadziliśmy w warunkach potencjodynamicznych w trakcie sześciu cykli zmian potencjału w zakresie od 0,50 do 1,25 V vs Ag/AgCl, przy szybkości zmian potencjału 50 mV/s. W pomiarach DPV na zmieniany liniowo od 0,00 do 0,70 V potencjał elektrody pracującej nakładane były prostokątne pulsy potencjałowe o amplitudzie 50 mV, o czasie trwania pulsu 100 ms i skoku potencjału 5 mV.

Fig. 5 (a) Zmiana pojemności w czasie dla różnych stężeń TATAAA w 0,5 M NaF. Zmianę tę mierzyliśmy w warunkach analizy przepływowo-wstrzykowej (FIA) przy potencjale 0,50 V vs Ag/AgCl i częstotliwości 20 Hz za pomocą chemoczuJNIKA z warstwą MIP-TATAAA z wyekstrahowanym szablonem TATAAA pokrywającą platynową elektrodę

dyskową o średnicy 1 mm. 0,5 M NaF, pompowany z szybkością 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, służył jako roztwór nośny. (b) Krzywa kalibracyjna dla (1) TATAAA, (2) TATAGA i (3) TATAAG dla chemoczuJNIKA z wyekstrahowaną warstwą MIP-TATAAA oraz (4) TATAAA dla chemoczuJNIKA z warstwą NIP.

Fig. 6 Zmiany częstotliwości rezonansowej elektrody Au-QCR pokrytej warstwą MIP-TATAAA wywołane oddziaływaniami z kwasem L-glutaminowym (Glu), L-seryną (Ser), L-lizyną (Lys), L-asparaginą (Asn), L-treoniną (Thr), L-waliną (Val) i L-feniloalaniną (Phe). Liczby na kolumnach histogramu wskazują liczbę zewnętrznych monowarstw MIP-TATAAA, przez które przenika dany aminokwas.

Korzystne przykłady wykonania wynalazku

Przykład 1

Przygotowanie warstw polimerów wdrukowanych molekularnie za pomocą PNA-TATAAA

Ważne z punktu widzenia biologicznego i medycznego substancje, takie jak białka, kwasy nukleinowe, itp., są rozpuszczalne w roztworach wodnych. Dlatego są one molekularnie wdrukowywane za pomocą monomerów funkcyjnych rozpuszczalnych w roztworach wodnych. Jednak tworzenie warstw MIP-ów jest efektywniejsze w rozpuszczalnikach organicznych niż w roztworach wodnych, zwłaszcza wówczas gdy wdrukowanie szablonów w warstwy MIP ma charakter niekowalencyjny, w tym za pomocą wiązań wodorowych. Za pomocą aprotycznych rozpuszczalników organicznych można wyeliminować wszystkie inne wiązania wodorowe niż te pomiędzy cząsteczkami substancji rozpuszczonej a cząsteczkami monomerów funkcyjnych, uniemożliwiające tworzenie kompleksu pre-polimeryzacyjnego. Takie dogodne możliwości rozpoznawania DNA stwarza peptydowy kwas nukleinowy (ang. peptide nucleic acid, PNA). W niniejszym zgłoszeniu, proponujemy wdrukowanie w warstwą MIP rozpuszczalnego w rozpuszczalnikach organicznych analogu jednoniciowego DNA (ang. single-stranded, ssDNA), jakim jest PNA. Jest to alternatywny sposób przygotowania warstw MIP-ów w celu selektywnego rozpoznawania oligodeoksyrybonukleotydów. Na Fig. 1 przedstawione są krzywe polimeryzacji elektrochemicznej przeprowadzonej w warunkach potencjodynamicznych, w wyniku której na dyskowej elektrodzie platynowej osadza się

warstwa MIP z wdrukowanym PNA-TATAAA. PNA-TATAAA wdrukowano w warstwę MIP-u za pomocą adeninowego **1** i tyminowego **2** monomeru funkcyjnego. Adeninowy i tyminowy monomer funkcyjny zaprojektowano i zsyntetyzowano do przyłączania szablonu TATAAA w kompleksie pre-polimeryzacyjnym za pomocą parowania zasad A-T i A-T typu Watsona-Cricka, według procedury opisanej w naszym zgłoszeniu patentowym nr P. 409328 z dnia 29 sierpnia 2014.

Zsyntetyzowanie dwóch nowych pochodnych tiofenu podstawionych zasadami nukleinowymi otworzyło nowe możliwości molekularnego wdrukowania oligonukleotydu TATAAA za pomocą tworzenia par typu Watsona-Cricka. W niniejszym zgłoszeniu przedstawiamy wdrukowanie analogu oligonukleotydu TATAAA, tj. PNA-TATAAA, za pomocą tworzenia par typu Watsona-Cricka. Po rozwiązaniu problemu wymywania szablonu PNA z warstwy MIP, możliwe będzie rozpuszczenie w jednym rozpuszczalniku organicznym składników kompleksu pre-polimeryzacyjnego i ich elektropolimeryzacja w nieobecności wody. Zaowocuje to opracowaniem nowej procedury przygotowania warstw MIP wdrukowanych za pomocą szablonu rozpuszczalnego w aprotycznych rozpuszczalnikach organicznych, takiego jak PNA. Elektropolimeryzacja potencjodynamiczna w zakresie dodatnich potencjałów znakomicie nadaje się do wdrukowania PNA-TATAAA w polimer zbudowany z pochodnych tiofenu z uwagi na zalety tego wdrukowania, takie jak (i) krótki czas przygotowania warstwy MIP, wynoszący zaledwie kilka minut, potrzebny do osadzenia warstwy za pomocą zaledwie kilku cykli zmian potencjału, (ii) trwałe przywieranie warstwy MIPu do podłoża o dostatecznej szorstkości, (iii) łatwa kontrola grubości warstwy za pomocą liczby cykli potencjałowych, (iv) łatwa kontrola porowatości warstwy za pomocą wyboru odpowiednich składników roztworu do elektropolimeryzacji i (v) elektropolimeryzacja w jednym aprotycznym rozpuszczalniku organicznym ułatwiający polimeryzację tiofenowych monomerów funkcyjnych.

Warstwy MIPu wdrukowanego sztucznym oligonukleotydem PNA-TATAAA osadziliśmy z roztworu do elektropolimeryzacji, zawierającego szablon PNA-TATAAA, zamiast TATAAA stosując taką samą procedurę jak procedura, którą wcześniej opracowaliśmy do osadzania warstw MIP-TATAAA.

Warstwy MIPu z wdrukowanym PNA-TATAAA przygotowaliśmy 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. Wzrost warstwy MIP, zarówno na platynowej elektrodzie dyskowej jak i na elektrodzie złotej krystalicznego rezonatora kwarcowego (ang. *quartz crystal resonator*, QCR), Au-QCR, o podstawowej częstotliwości rezonansowej 10 MHz, kontrolowaliśmy za pomocą liczby cykli zmian potencjału. Po zakończeniu elektropolimeryzacji, warstwy MIP-u obficie przemyliśmy acetonitrylem, aby usunąć z nich nadmiar roztworu elektrolitu podstawowego. Następnie z warstw MIP-ów próbowaliśmy wyekstrahować szablon PNA-TATAAA za pomocą 0,1 M NaOH przez 45 min w temperaturze pokojowej, według procedury opisanej w naszym zgłoszeniu patentowym nr P. 409328 z dnia 29 sierpnia 2014. Pomimo zastosowania roztworów o wysokiej kwasowości lub zasadowości, usuwanie szablону PNA-TATAAA nie powiodło się. W przyszłości powrócimy do badań wmywania PNA z warstw MIP.

Dlatego do dalszych badań wdrukowaliśmy oligodeoksyrybonukleotyd TATAAA w mieszaninie rozpuszczalników opisanych w naszym zgłoszeniu patentowym nr P. 409328 z dnia 29 sierpnia 2014. Poniższe przykłady obejmują badania warstw MIP-ów wdrukowanych oligodeoksyrybonukleotydem TATAAA, tj. MIP-TATAAA.

Przykład 2

Badania efektywności wdrukowania a następnie ekstrakcji szablónu TATAAA z warstwy MIP-TATAAA za pomocą pomiarów EIS oporności przeniesienia ładunku oraz pomiarów IRRAS i DPV

Zmierzyliśmy oporność przeniesienia ładunku warstwy MIPu za pomocą EIS. W tym celu na dyskowej elektrodzie platynowej o średnicy 1 mm osadziliśmy warstwę MIP-TATAAA według procedury opisanej w naszym zgłoszeniu patentowym nr P. 409328 z dnia 29 sierpnia 2014 r. Pomiarы EIS przeprowadziliśmy na platynowej elektrodzie dyskowej pokrytej warstwą MIP-TATAAA z zastosowaniem próbnika redoks, 0.1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ i 0.1 M $K_4[Fe(CN)_6]$, przy potencjale otwartego obwodu i częstotliwości zmienianej w zakresie od 200 kHz do 100 mHz, co 10 mHz, i amplitudzie napięcia zmiennego 0,1 mV. Zależności składowej urojonej impedancji od składowej rzeczywistej dla próbnika redoks, zarejestrowane przed i po ekstrakcji szablónu TATAAA oraz po zanurzeniu elektrody pokrytej warstwą MIP-TATAAA z wyekstrahowanym szablónem w roztworze analitu TATAAA przedstawia, odpowiednio, krzywa 1, 2 i 3 na Fig. 2. Krzywa 1 na Fig. 2 to krzywa typowa dla elektrody pokrytej

wdrukowaną oligonukleotydem TATAAA warstwą MIP w postaci dużego półokręgu, który odpowiada oporowi przeniesienia ładunku (13 k Ω). Półokrąg ten to krzywa teoretyczna dopasowana do punktów eksperymentalnych po odpowiednim dobraniu parametrów elektrycznych zastępczego obwodu Randlesa-Erszlera. Warstwa MIP zawierająca wdrukowany oligonukleotyd TATAAA utrudnia transport próbnika redox do powierzchni elektrody. Krzywa zarejestrowana po ekstrakcji szablonu TATAAA składa się z półokręgu i odcinka prostoliniowego, odpowiednio, w zakresie wysokich i niskich częstotliwości (Krzywa 2 na Fig. 2). Średnica tego półokręgu jest mniejsza od średnicy półokręgu przedstawionego na Krzywej 1. Oznacza to, że opór przeniesienia ładunku (2,04 k Ω) jest mniejszy w przypadku warstwy MIPu z usuniętym szablonem TATAAA. W przypadku wyekstrahowanej warstwy MIP, opór ten wzrasta po przyłączeniu analitu TATAAA, do wartości 2,42 k Ω . Nachylenie ($0,58 \pm 0,01$) prostoliniowego odcinka na Krzywej 3 na Fig. 2 w zakresie niskich częstotliwości jest mniejsze niż nachylenie ($0,65 \pm 0,01$) analogicznego odcinka na Krzywej 2 na Fig. 2. Co oznacza, że po usunięciu szablonu TATAAA, w warstwie MIP pozostają puste wnęki molekularne, dzięki którym warstwa ta jest przepuszczalna dla próbnika redoks. Natomiast po przyłączeniu analitu TATAAA, przepuszczalność warstwy MIP jest mniejsza.

Za pomocą pomiarów IRRAS zarejestrowano widma dla czterech próbek, tj. dla warstwy TATAAA (widmo 1 na Fig. 3), NIP (widmo 2 na Fig. 3) oraz MIP-TATAAA przed (widmo 3 na Fig. 3) i po (widmo 4 na Fig. 3) ekstrakcji szablonu TATAAA. W widmie 3 można wyróżnić piki odpowiadające drganiom wiązań w szablonie TATAAA pomimo znacznego nakładania się tych pików na piki odpowiadające drganiom wiązań polimeru. Są to piki o liczbie falowej 1013 i 1077 cm^{-1} odpowiadające drganiom rozciągającym wiązań ugrupowania, odpowiednio, PO_2^- i P-O-P w skompleksowanym TATAAA {R. Cini, et al., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1989**, 575; H. Takeuchi, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 392; E. Mateo-Marti, et al., *Biosen. Bioelectron.* **2007**, 22, 1926}. Piki te były znacznie niższe po ekstrakcji szablonu TATAAA (Widmo 4 na Fig. 3). Powyższe zmiany w widmie znacznie uwydatniły się po normalizacji wysokości pików względem wysokiego pików o liczbie falowej 800 cm^{-1} odpowiadającemu drganiom wiązań w cząsteczce politiofenu.

O usunięciu szablonu TATAAA z warstwy MIP-TATAAA świadczą również wyniki badań DPV (Fig. 4). W badaniach tych zastosowaliśmy $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ jako próbnik redoks. Okupujące wnęki molekularne MIP-TATAAA cząsteczki szablonu utrudniają dyfuzję tego próbnika do

powierzchni elektrody. Dlatego pik elektrotleniania $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ był stłumiony (krzywa 1 na Fig. 4). Jednakże po ekstrakcji TATAAA pik ten był znacznie wyższy (krzywe 2 i 3 na Fig. 4), ponieważ opróżnienie wdrukowanych wnęk molekularnych ułatwiło dyfuzję próbnika do powierzchni elektrody. Po zanurzeniu na 15 min elektrody pokrytej wyekstrahowaną warstwą MIP do roztworu 50 μM TATAAA, pik DPV zmaleł (krzywa 4 na Fig. 4). Świadczy to o unieruchomieniu analitu TATAAA w warstwie MIPu a przez to o obniżeniu szybkości dyfuzji przez tę warstwę.

Przykład 3

Oznaczanie TATAAA w warunkach FIA za pomocą chemocujnika Cl z warstwą rozpoznającą MIP-TATAAA

Pozbawione TATAAA warstwy MIP-TATAAA pokrywające platynową elektrodą dyskową o średnicy 1 mm zbadaliśmy za pomocą Cl w warunkach FIA. Roztwór nośny był pompowany z szybkością 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ przez przepływowe naczynko elektrochemiczne o cienkowarstwowym przepływie radialnym z zamocowaną platynową elektrodą dyskową o średnicy 1 mm w izolatorze z PTFE. Objętość każdej zastrzykiwanej próbki wynosiła 100 μl . Zastrzykiwane substancje były rozpuszczone w roztworze o takim samym składzie jak roztwór nośny, tj. w 0,5 M NaF.

Badania Cl przeprowadziliśmy przy stałym potencjale i częstotliwości prądu zmiennego równym, odpowiednio, 0,50 V vs Ag/AgCl i 20 Hz. Przy tej wartości potencjału na elektrodzie nie przebiegał żaden proces faradajowski.

Do oznaczeń TATAAA służył pomiar pojemności elektrycznej warstwy podwójnej, C . Pojemność tę wyznacaliśmy ze zmierzonej składowej urojonej impedancji, Z'' , przy stałej częstotliwości kołowej prądu zmiennego, ω , i potencjale przyłożonym do elektrody, za pomocą Równania (1).

$$Z'' = \frac{1}{\omega C} \quad (1)$$

Zgodnie z oczekiwaniem, po zastrzyknięciu każdej kolejnej próbki roztworu TATAAA

pojemność początkowo rosta w miarę jak TATAAA wnikał do warstwy MIP-TATAAA (Fig. 5). Następnie pojemność malała powracając do swojej pierwotnej wartości w miarę wymywania TATAAA z warstwy przez nadmiar roztworu nośnego - elektrolitu podstawowego (0,5 M NaF). Zachowanie to wskazuje na pełną odwracalność wiązania TATAAA w warstwie. Za mierzone zmiany pojemności najprawdopodobniej odpowiedzialne były zmiany pojemności części sztywnej elektrycznej warstwy podwójnej z uwagi na znikomy wkład pojemności jej części rozmytej do całkowitej pojemności warstwy przy tak wysokim stężeniu elektrolitu podstawowego o nieadsorbujących się specyficznie jonach jak 0,5 M NaF. Dlatego część sztywną warstwy przybliżyliśmy za pomocą modelu Helmholtza. W modelu tym pojemność warstwy podwójnej jest wprost proporcjonalna do jej przenikalności elektrycznej. Przenikalność ta rośnie wraz ze wzrostem obsadzenia wnęk molekularnych warstwy MIP-TATAAA przez analit TATAAA.

Wysokość pików zmian pojemności był proporcjonalny do stężenia TATAAA w roztworze badanym (Krzywa 1 na Fig. 5). Liniowy zakres stężeniowy rozciągał się przynajmniej od 0.05 do 2.00 μM spełniając następujące równanie regresji liniowej, $C (\mu\text{F cm}^{-2}) = 0,18 (\mu\text{F cm}^{-2}) + 0,014 c_{\text{TATAAA}} (\mu\text{M})$. W równaniu tym c_{TATAAA} oznacza stężenie TATAAA w roztworze badanym. Przy stosunku sygnału do szumu, $S/N = 3$, wartość LOD wynosiła 10 nM TATAAA a czułość $0,014 \mu\text{F cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ ze współczynnikiem korelacji 0,99. Niniejsze parametry analityczne przemawiają za tym, że wytworzony czujnik chemiczny nadaje się do oznaczania sekwencji TATAAA. Czujnik chemiczny z warstwą MIP był $\sim 3,2$ and $\sim 1,7$ razy bardziej czuły względem analitu TATAAA niż względem oligonukleotydów TATAAG i TATAGA. Korzystnie dla tych oznaczeń TATAAA, analityczny sygnał CI był o wiele bardziej stały w czasie niż sygnał mikrogravimetrii piezoelektrycznej (ang. piezoelectric microgravimetry, PM) w oznaczeniach opisanych w zgłoszeniu patentowym nr P. 409328 z dnia 29 sierpnia 2014 r.

Analityczne sygnały detekcji CI rejestrowane w postaci pików a nie schodków wskazują, że wiązanie cząsteczek TATAAA we wdrukowanych wnękach molekularnych MIP-TATAAA jest w pełni odwracalne. Zachowanie to jest korzystne do wytwarzania czujników chemicznych wielokrotnego użycia do oznaczania TATAAA. Najniższa wartość LOD dla warstwy MIP-TATAAA o grubości ~ 140 nm wynosiła 10 nM TATAAA. Osiągnięto ją za pomocą czujnika FIA-CI. Czujnik ten lepiej nadaje się do oznaczania TATAAA niż czujnik FIA-PM.

Czujnik FIA-CI można zastosować w inżynierii genetycznej, zwłaszcza do testów genetycznych przy wczesnym wykrywaniu dziedzicznych chorób genetycznych.

Przykład 4

Sztuczna sekwencja promotorowa w kasecie TATA i jej powinowactwo do wybranych aminokwasów

Spośród 180 aminokwasów wchodzących w skład TBP wybraliśmy aminokwasy oddziałujące z promotorową sekwencją TATAAA w naturalnej kasecie TATA. Zbadaliśmy oddziaływanie tych aminokwasów z warstwą MIP-TATAAA za pomocą PM w warunkach FIA. Warstwa ta stanowiła matrycę ze sztucznymi kasetami TATA. Promotorową sekwencję TATAAA ze sztucznej kasety TATA rozpoznawały aminokwasy, takie jak L-seryna, L-lizyna, kwas L-glutaminowy, L-asparagina, L-treonina, L-walina, L-feniloalanina i L-leucyna.

Roztworem nośnym była woda pompowana z szybkością 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ przez oprawkę przepływową do QCR za pomocą pompy strzykawkowej. Do zastrzykiwania próbek roztworów badanych zastosowano sześciopozycyjny pętlicowy zawór dozujący. Objętość zastrzykiwanej próbki wynosiła 100 μl . W pomiarach PM rejestrowaliśmy zmiany częstotliwości rezonansowej elektrody Au-QCR pokrytej warstwą MIP-TATAAA wywołane zastrzykami 0,2 M roztworów aminokwasów wymienionych powyżej (Tabela 1).

Masę aminokwasów oddziałujących z wdrukowaną oligodeoksyrybonukleotydem TATAAA warstwą MIP wyznaczyliśmy ze zmian częstotliwości rezonansowej, zgodnie z zależnością Sauerbry'a {D. A. Buttry, et al., *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1355}. W ten sposób wyznaczyliśmy liczbę moli poszczególnych aminokwasów oddziałujących z wdrukowaną oligodeoksyrybonukleotydem TATAAA warstwą MIP (Tabela 1).

Tabela 1. Oddziaływania wdrukowanej oligodeoksyrybonukleotydem TATAAA warstwy MIP z cząsteczkami aminokwasów, takich jak: kwas L-glutaminowy (Glu), L-seryna (Ser), L-lizyna (Lys), L-asparagina (Asn), L-treonina (Thr), L-walina (Val), L-feniloalanina (Phe) i L-leucyna (Leu).

Aminokwas	Zmiana częstotliwości rezonansowej, Hz	Masa aminokwasu oddziałującego z warstwą MIP-TATAAA, ng	Liczba cząsteczek aminokwasu oddziałująca z kasetą TATA ^a	Liczba moli aminokwasu oddziałująca z monowarstwą MIP-TATAAA	Liczba zewnętrznych monowarstw MIP-TATAAA dostępnych dla cząsteczki aminokwasu
Ser	-17	$14,7 \times 10^{-9}$	2	$8,8 \times 10^{-12}$	4,0
Lys	-22	$19,1 \times 10^{-9}$	7	$3,1 \times 10^{-11}$	1,0
Glu	-22	$19,1 \times 10^{-9}$	1	$4,4 \times 10^{-12}$	7,3
Asn	-22	$19,1 \times 10^{-9}$	2	$8,8 \times 10^{-12}$	4,0
Thr	-7.5	$6,5 \times 10^{-9}$	3	$1,3 \times 10^{-11}$	1,0
Val	-15	$13,0 \times 10^{-9}$	6	$2,6 \times 10^{-11}$	1,0
Phe	-20	$17,3 \times 10^{-9}$	4	$1,7 \times 10^{-11}$	1,5
Leu	Brak sygnału				

^a Y. Kim, J. H. Geiger, S. Hahn, and P. B. Sigler, *Nature*, 1993, **365**, 512-520.

W naturalnej kasecie TATA sześć nukleotydowa sekwencja TATAAA wiąże od 2 do 7 cząsteczek wybranych aminokwasów (Schemat 1).

Wdrukowane oligodeoksyrybonukleotydem TATAAA warstwy MIP tworzą marycę ze sztuczną promotorową sekwencją TATAAA w kasecie TATA. Grupy fosforanowe tej sekwencji silnie oddziałują z dodatnio naładowaną cząsteczką L-seryny i L-lizyny (Tabela 1). W naszej sztucznej kasecie TATA, dwie sferyczne cząsteczki L-seryny i sześć wydłużonych cząsteczek L-lizyny oddziałują, odpowiednio, z dwoma i sześcioma grupami fosforanowymi wdrukowanego oligodeoksyrybonukleotydu TATAAA, podobnie jak w naturalnej kasecie TATA.

W interpretacji wyników badań oddziaływań aminokwasów z warstwą MIP-TATAAA uwzględniliśmy średnicę, kształt i właściwości chemiczne wybranych aminokwasów.

Aminokwasy polarne, takie jak L-asparagina i L-treonina oraz niepolarne, takie jak L-walina i L-feniloalanina, oddziaływały, odpowiednio, z zasadami nukleinowymi oraz resztami dezoksyrybozy sztucznej promotorowej sekwencji TATAAA z kasety TATA (Tabela 1). Dla cząsteczek L-asparaginy spadek częstotliwości rezonansowej elektrody Au-QCR pokrytej warstwą MIP-TATAAA był większy niż dla cząsteczkami L-treoniny (Fig. 6). Natomiast spadek częstotliwości dla podłużnych cząsteczek L-feniloalaniny był znacznie większy niż dla cząsteczek kulistej L-waliny ze względu na oddziaływania π - π pierścienia aromatycznego L-feniloalaniny z pierścieniami tiofenowymi warstwy MIP (Fig. 6). Co więcej, wielkość i kształt hydrofobowych grup tetrabutylowych L-leucyny utrudniał jej oddziaływania z wdrukowaną oligodeoksyrybonukleotydem TATAAA warstwą MIP. Dlatego w obecności L-leucyny częstotliwość rezonansowa elektrody Au-QCR nie ulegała zmianie.

Oszacowaliśmy liczbę moli poszczególnych aminokwasów oddziałujących z monowarstwą MIP-TATAAA i głębokość przenikania cząsteczek aminokwasów przez warstwą MIP-TATAAA (Tabela 1). Okazało się, że im bardziej kulisty kształt aminokwasu tym głębiej wnikał on w warstwą MIP-TATAAA. Przykładowo, kuliste cząsteczki L-seryny i podłużne cząsteczki L-lizyny przenikały na głębokość, odpowiednio, czterech i jednej monowarstwy MIP-TATAAA. W obliczeniach uwzględniliśmy względne pole powierzchni (ang. relative surface area, $R_{SA} = 4,08 \pm 0,2$ nm) warstwy MIP-TATAAA wyznaczone za pomocą mikroskopii sił atomowych (ang. atomic force microscopy, AFM).

Stężenie TATAAA w warstwie MIP, równe $\sim 0,50$ M, wyznaczyliśmy zgodnie z procedurą opisaną w naszym zgłoszeniu patentowym nr PL 209950 z dnia 9 czerwca 2011.

Dla oddziaływań z pojedynczymi cząsteczkami aminokwasów, zmiana częstotliwości rezonansowej elektrody Au-QCR pokrytej warstwą MIP była znacznie większa dla aminokwasów przenikających na głębokość od 4 do 7 monowarstw MIP-TATAAA. Przykładowo, cząsteczka kwasu L-glutaminowego silnie oddziałuje z cząsteczką adeniny promotorowej sekwencji TATAAA w sztucznej kasecie TATA (Fig. 6), dlatego przenika aż na głębokość siedmiu monowarstw MIP-TATAAA (Tabela 1). Najprawdopodobniej cząsteczki kwasu L-glutaminowego obecne w TBP przyczyniają się do oddziaływania tego białka ze sztuczną kasetą TATA. Dlatego kasetę ta może uczestniczyć w transkrypcji DNA.

Podsumowując, nasza sztuczna promotorowa sekwencja TATAAA z kasety TATA w warstwie MIP-TATAAA jest rozpoznawana przez aminokwasy oddziałujące z promotorową

sekwencją TATAAA w naturalnej kasecie TATA.

Podziękowania

Niniejsza praca była sfinansowana ze środków projektu POMOST2012-6/10 (dla A. P.-L.), pt.: „Selective determination of chosen oligonucleotides by synthetic polymer systems of molecular recognition” w ramach Programu POMOST Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Działanie 1.2 Wzmocnienie potencjału kadrowego nauki).

Opłaty związane z ochroną wynalazku sfinansowano ze środków projektu POMOST/2012-6/10 (dla A.P.-L.) Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.