

Bezznacznikowe metody oznaczania laktoferyny z wykorzystaniem nowego selektywnego bioreceptora opartego na DNA

Streszczenie

Laktoferyna jest wielofunkcyjnym białkiem endogennym o właściwościach immunomodulujących. Jest uważana za kluczowy element systemu obronnego ze względu na zdolność do odpowiadania na zmiany fizjologiczne w organizmie gospodarza. Jej cechy strukturalne warunkują właściwości takie jak utrzymywanie homeostazy jonów Fe^{3+} , aktywność antymikrobiologiczna przeciwko różnorodnym bakteriom i wirusom, oraz efekty przeciwnowotworowe. Laktoferyna odgrywa również rolę ochronną i naprawczą w stosunku do ludzkiego genomu. Białko to jest zdolne do wiązania się z DNA i w określonych warunkach działania jak deoksyrybonukleaza (DNaza), aktywując transkrypcję i regulując cykl komórkowy. Mimo to, w literaturze nie ma wystarczająco wyczerpujących danych eksperymentalnych opisujących mechanizm tejże interakcji, natomiast możliwość wykorzystania DNA jako potencjalnego bioreceptora laktoferyny nie została dotychczas podjęta w badaniach naukowych. Niniejsza rozprawa doktorska poświęcona jest opracowaniu nowego bioreceptora typu DNA do selektywnego oznaczania laktoferyny w próbkach rzeczywistych za pomocą bezznacznikowych, nieniszczących dla bioreceptora technik, takich jak powierzchniowy rezonans plazmonów i elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna. Praca składa się z dwóch głównych części: określenia sekwencji DNA o najwyższym powinowactwie do białka docelowego oraz wykorzystania jej do opracowania nowego bioczuJNIKA impedancyjnego do ilościowych oznaczeń laktoferyny w próbkach śliny ludzkiej.

W pierwszej części pracy doktorskiej, zaprezentowano i omówiono wyniki badań wykorzystujących metodę powierzchniowego rezonansu plazmonów do opracowania nowego bioreceptora typu DNA wykazującego wysokie powinowactwo i selektywność względem laktoferyny. Celem było zbadanie powinowactwa różnych typów oligonukleotydów do białka docelowego. Dalsze badania prowadzono z użyciem zhybrydowanej sekwencji 5'[TAGAGGATCAAAA-AAA]₄TAGAGGATCAAAA3' o długości 72 par zasad azotowych, która wykazywała największe powinowactwo do laktoferyny. Szczegółowa analiza interakcji laktoferyny z wybraną sekwencją DNA dostarczyła informacji dotyczących stałych szybkości i stałych równowagi interakcji. Analiza kinetyki oddziaływania pozwoliła na ustalenie stechiometrii oddziaływania wskazując na typ jeden-do-jednego z wartościami stałych kinetycznych, w tym odpowiednio stałych szybkości asocjacji i dysocjacji $k_a = (2.49 \pm 0.03) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ i $k_d = (1.89 \pm 0.02) \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$, oraz stałych równowagi asocjacji i dysocjacji – $K_A (0.13 \pm 0.05) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ i $K_D = (7.61 \pm 0.18) \cdot 10^{-8} \text{ M}$. W zakresie temperatur od 291,15 do 305,15 K przeprowadzono badania termodynamiczne w celu wyznaczenia ΔH° , ΔS° , and ΔG° do charakterystyki van't Hoffa. Ustalono, że tworzenie kompleksu laktoferyna-DNA ma charakter endotermiczny, napędzany zmianą entropii, natomiast interakcja ma naturę hydrofobową. Selektywność wybranej sekwencji DNA względem laktoferyny została potwierdzona wobec interferentów, dla których odpowiedź stanowiła mniej niż 3% referencyjnego sygnału pochodzącego od laktoferyny.

Oligonukleotyd dsDNA o unikalnej sekwencji $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_6-5'[\text{TAGAGGATCAAAA-AAA}]_4\text{TAGAGGATCAAAA}3'$ został użyty jako bioreceptor do opracowania impedancyjnego bioczuJNIKA laktoferyny. Orientację przestrzenną warstwy bioreceptorowej uzyskano unieruchamiając oligonukleotyd za pomocą grupy H_2N - na końcu 5'. Opracowany bioczuJNIK został scharakteryzowany metodą spektroskopii impedancyjnej z użyciem modelu faradajowskiego i niefaradajowskiego, zaś analiza danych eksperymentalnych umożliwiła zaproponowanie elektrycznego modelu zastępczego opartego na modelu Randlesa. Wartość elementu zastępczego opisującego rezystancję transferu elektronów R_{3f} modelu faradajowskiego okazała się być zależną od stężenia laktoferyny. Charakterystykę bioczuJNIKA określono jako zależność między stosunkiem rezystancji R_{3f} przed/po interakcji bioreceptor-analit i stężeniem analitu. Opracowany bioczuJNIK impedancyjny wykazał liniową odpowiedź dla próbek laboratoryjnych w zakresie stężeń laktoferyny do 625 nM, z granicą

wykrywalności 1,25 nM i granicą oznaczalności 2,5 nM, przy czułości dla zakresu liniowego na poziomie . W kolejnych badaniach zastosowano opracowany bioczujnik do ilościowego oznaczania laktoferyny w próbkach śliny ludzkiej. Wyniki badań były zgodne z wynikami uzyskanymi metodą powierzchniowego rezonansu plazmonów z wykorzystaniem tego samego receptora typu DNA oraz kolorymetrycznego testu immunologicznego. Zaproponowany impedancyjny bioczujnik laktoferyny z opracowanym bioreceptorem typu DNA odpowiada na narastające zapotrzebowanie na szybkie, proste i skuteczne metody analityczne do wykrywania immunomodulatorów o potencjalnym zastosowaniu w diagnostyce klinicznej.

Praca wpisuje się w paradygmat inżynierii biomedycznej poprzez zaproponowanie nowatorskiej metody opracowania bioreceptora opartego na DNA, a następnie jego wykorzystania do wytworzenia czułego, bezznacznikowego impedancyjnego bioczujnika laktoferyny, która jest analitem o znaczeniu klinicznym. Badania dostarczyły nowej metodyki projektowania i opracowywania bioreceptorów z wykorzystaniem powierzchniowego rezonansu plazmonów jako głównej techniki pozwalającej na analizę oddziaływań międzycząsteczkowych w czasie rzeczywistym. Szeroko omówiono ograniczenia i zalety badań metodą SPR, wynikiem których był wybór jednego oligonukleotydu DNA o określonej sekwencji, jako najbardziej obiecującego i specyficznego bioreceptora laktoferyny, co potwierdzono w badaniu selektywności z udziałem interferentów. Ponadto porównanie wyników własnych wykazało przewagę opracowanego elementu bioreceptorowego opartego na DNA nad elementami opartymi na przeciwciałach i biomimetycznymi. Realizacja badań zapewnia nowe podejście do projektowania specyficznych bioreceptorów dla potrzeb metod bezznacznikowych i może zostać wykorzystana w dalszych pracach nad rozwojem warstw bioczujnikowych dla dużych cząsteczek istotnych klinicznie, w szczególności białek.

Słowa kluczowe: bioreceptor typu oligonukleotyd DNA, bezznacznikowe oznaczenie oparte na powinowactwie molekularnym, laktoferyna, bioczujnik impedancyjny, powierzchniowy rezonans plazmonów;