

**OLIGONUKLEOTYDY DNA
JAKO WARSTWY RECEPTOROWE SENSORÓW
ELEKTROCHEMICZNYCH**

**DNA OLIGONUCLEOTIDES AS RECEPTOR LAYERS
OF ELECTROCHEMICAL SENSORS**

**Łukasz Górski, Robert Ziólkowski, Agnieszka Bala,
Marta Jarczewska, Elżbieta Malinowska**

*Institut Biotechnologii, Zakład Mikrobioanalitiky, Wydział Chemiczny,
Politechnika Warszawska
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa
e-mail: lukegor@ch.pw.edu.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Kwasy nukleinowe jako warstwy receptorowe i ich zastosowanie w biosensorach DNA do oznaczania jonów metali ciężkich
2. Opracowanie biosensorów DNA przeznaczonych do detekcji kationów: UO_2^{2+} , Hg^{2+} i Pb^{2+}

Podsumowanie

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

dr inż. Łukasz Górski uzyskał tytuł zawodowy magistra inżyniera (2001) oraz stopień naukowy doktora nauk chemicznych (2006) na Wydziale Chemicznym PW. Jest członkiem grupy profesor Malinowskiej w Zakładzie Mikrobioanalitiky oraz wykładowcą akademickim dla kierunków technologia chemiczna i biotechnologia. Prowadzone przez niego badania dotyczą elektrod jonoselektywnych, analizy wstrzykowo-przepływowej oraz zastosowania samoorganizujących się monowarstw jako elementów receptorowych w biosensorach.

dr inż. Robert Ziółkowski uzyskał tytuł zawodowy magistra inżyniera (2005) oraz stopień naukowy doktora nauk chemicznych (2013) na Wydziale Chemicznym PW. Od 2008 r. jest członkiem grupy profesor Malinowskiej w Zakładzie Mikrobioanalitiky oraz wykładowcą akademickim dla kierunków technologia chemiczna i biotechnologia. Jego badania dotyczą zastosowania samoorganizujących się warstw, cząsteczek DNA, aptamerów oraz grafenu do tworzenia warstw receptorowych w biosensorach.

mgr inż. Agnieszka Bala uzyskała tytuł zawodowy magistra inżyniera w 2013 r. na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Od 2014 r. jest członkiem grupy badawczej profesor Malinowskiej i uczestniczką studiów doktoranckich. Prowadzone przez nią badania dotyczą zastosowania analogów kwasów nukleinowych do tworzenia warstw receptorowych w biosensorach.

mgr inż. Marta Jarczevska uzyskała tytuł zawodowy magistra inżyniera w 2012 na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Od 2012 jest członkiem grupy profesor Malinowskiej i uczestniczką studiów doktoranckich. Jej badania dotyczą opracowania biosensorów zawierających w warstwie receptorowej cząsteczki kwasów nukleinowych.

prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska uzyskała stopień naukowy doktora (1984), doktora habilitowanego (2002) oraz tytuł naukowy profesora (2007) na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Jest szefem Laboratorium Biosensorów w Zakładzie Mikrobioanalitiky oraz wykładowcą akademickim dla kierunku biotechnologia. W latach 1984–1985 była członkiem grupy prof. Wilhelma Simona w Swiss Federal Institute of Technology (ETH), a w latach 1993–1995 współpracowała z prof. Mark E. Meyerhoffem na University of Michigan. Prowadzone przez nią badania dotyczą opracowania chemicznych sensorów i biosensorów.

ABSTRACT

The need for elaboration of analytical devices of small dimensions and the accessibility of novel nanomaterials caused the increase in the number of publications referring to the development of biosensors. DNA-based biosensors are of special interest and they were primarily used for the determination of a specific sequence which is crucial in the detection of cancer, genetic mutations, pathogens, as well as analysis of modified food. Interestingly, they could be also applied for the detection of other analytes including heavy metal ions, especially in connection with electrochemical techniques. It should be noted that the design of DNA biosensor concerns not only the development of transducer, but also careful preparation of sensing layer and the choice of the method of analytical signal generation.

Selectivity is one of the essential parameter of the biosensor that determines its utility, particularly in real samples of complex matrices. In case of DNA sensors dedicated for the detection of complementary sequence, high selectivity is provided by the hybridization process. A pronounced specificity of sensing layer-analyte interaction can be also achieved with the use of functional nucleic acids - aptamers, which change their conformation upon binding an analyte.

Herein, DNA-modified electrodes were firstly used for the detection of uranyl ions, as they exhibit high affinity towards phosphate moieties of nucleic acids. It was shown that UO_2^{2+} interacts with sensing layer independently from the chosen oligonucleotide sequence. Moreover, the influence of Pb^{2+} was reduced by elimination of adenine, which strongly interacts with lead ions.

Another oligonucleotide-based sensor was developed for detection of mercury ions. The results indicate that Hg^{2+} concentration can be determined only with the use of sequence containing 100% thymine residues. Oligonucleotide-based sensor with receptor layer containing aptamers was elaborated for the detection of Pb^{2+} ions. In the presence of lead cations, an aptamer probe forms a G-quadruplex structure, a proposed biosensor could be characterized with selectivity towards Pb^{2+} .

The performance of DNA-based sensors for UO_2^{2+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} ions was optimized and addressed the choice of the manner of analytical signal generation, the influence of electrode modification with blocking agent, sensitivity dependence on the oligonucleotide sequence and the possibility of regeneration of sensing layer. Finally, the utility of proposed DNA sensors was tested by analysis in real samples.

Keywords: biosensors, heavy metals, nucleic acids, self-assembled monolayers, voltammetry, redox indicators

Słowa kluczowe: biosensory, metale ciężkie, kwasy nukleinowe, samoorganizujące się monowarstwy, woltamperometria, znaczniki redoks

WPROWADZENIE

Obserwowany w ostatnich latach intensywny wzrost liczby publikacji dotyczących biosensorów jest z jednej strony odpowiedzią na zapotrzebowanie na niewielkie urządzenia analityczne, przekształcające informację chemiczną (np. stężenie) na sygnał analityczny [1]. Z drugiej strony rozwój biosensorów wynika z dostępności nowoczesnych materiałów, których umiejętne zastosowanie prowadzi do poprawy parametrów pracy konstruowanych urządzeń [2–4]. Szczególnie ciekawą grupę biosensorów stanowią sensory DNA, które są wykorzystywane przede wszystkim do identyfikacji sekwencji nukleotydowej badanej nici DNA [5], co jest istotne w diagnostyce chorób nowotworowych i genetycznych [6], określaniu rodzaju patogenu wywołującego chorobę [7], a także w badaniu jakości żywności modyfikowanej genetycznie [8]. Innym, dość niekonwencjonalnym, a rozwijanym od niedawna zastosowaniem biosensorów DNA jest oznaczanie innych analitów, takich jak np. jony metali ciężkich [9]. W sensorach DNA zazwyczaj są wykorzystywane przetworniki optyczne, jednak coraz popularniejsze stają się elektrochemiczne techniki detekcji, głównie ze względu na niskie granice oznaczalności, łatwość miniaturyzacji oraz niskie koszty aparatury [10].

Opracowanie biosensora DNA o korzystnych parametrach analitycznych, niezależnie od jego zastosowania, wymaga przemyślanego zaprojektowania i wykonania zarówno przetwornika, jak i warstwy receptorowej. Istotny jest również sposób generowania sygnału analitycznego, który w przypadku elektrochemicznych sensorów DNA może być związany z właściwościami elektroaktywnymi analitu lub pochodzący z utlenienia zasad azotowych występujących w kwasach nukleinowych [11]. Jednak ograniczona ilość takich związków, a także konieczność poprawy czułości oraz granicy oznaczalności spowodowały, że coraz częściej stosowane są znaczniki elektroaktywne [12]. Optymalizacja kolejnych etapów przygotowania sensorów DNA jest niezbędna do określenia ich użyteczności, dzięki czemu w przyszłości mogłyby zostać wykorzystane m.in. w analizie środowiskowej oraz klinicznej [13, 14].

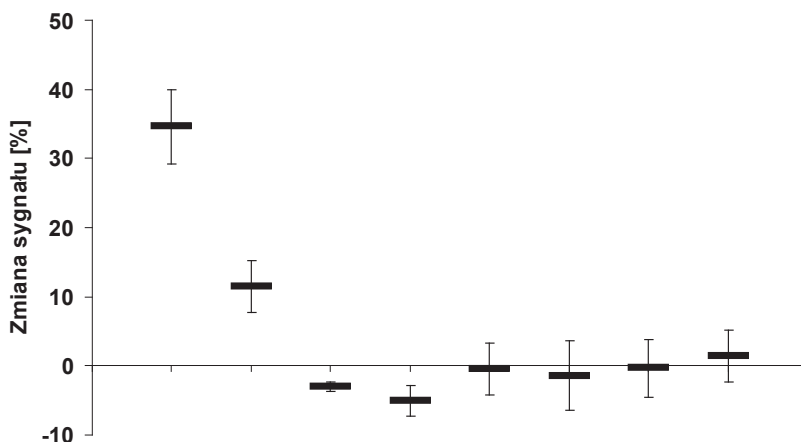
1. KWASY NUKLEINOWE JAKO WARSTWY RECEPTOROWE I ICH ZASTOSOWANIE W BIOSENSORACH DNA DO OZNACZANIA JONÓW METALI CIĘŻKICH

Selektywność jest jednym z najistotniejszych parametrów sensorów chemicznych, który umożliwia oznaczanie analitu nawet w próbkach o złożonych matrycach, w których substancje przeszkadzające występują w znacznym nadmiarze do substancji oznaczanej. O selektywności sensorów chemicznych decyduje warstwa receptorowa, bezpośrednio kontaktująca się z próbką i oddziałująca z jej składnikami. W przypadku sensorów DNA przeznaczonych do wykrywania w próbce sekwencji komplementarnych wysoką selektywność rozpoznania sekwencji ozna-

czanej wśród wielu różnych fragmentów DNA zapewnia proces hybrydyzacji nici nukleotydowych, który zachodzi w warstwie receptorowej sensora [15].

Stosunkowo nowym kierunkiem badań jest zastosowanie jako warstw receptorowych tzw. funkcjonalnych kwasów nukleinowych (FNA). Grupę FNA stanowią cząsteczki DNA i RNA, które wykazują właściwości receptorowe (np. aptamery) oraz katalityczne (m.in. DNAzy) [16]. Aptamery to krótkie sekwencje DNA lub RNA, które posiadają zdolność do oddziaływania z różnymi cząsteczkami organicznymi lub nieorganicznymi. Zdolność ta wynika zarówno z obecności w strukturze kwasów nukleinowych atomów donorowych, jak i z możliwości przyjmowania przez określonego kształtu aptamery w przestrzeni, zdefiniowanego przez sekwencję oligonukleotydu. Wiązanie aptameru z określoną cząsteczką prowadzi do zmiany jego konformacji, co prowadzi do zmiany mierzonego sygnału analitycznego [17, 18].

Kwasy nukleinowe mogą zatem pełnić rolę receptorów, a wśród potencjalnych analitów, które mogą być oznaczane z ich zastosowaniem, są jony metali. Z tego powodu podjęto próby opracowania elektrod modyfikowanych DNA, przeznaczonych do detekcji jonów metali ciężkich. Wstępnym etapem prowadzonych badań było określenie, czy istnieje wyraźna zależność między doбором sekwencji oligonukleotydowej dowiązanej do elektrody, a selektywnością jej oddziaływań z jonami metali. Przedmiotem analizy był kation uranylowy UO_2^{2+} , który wykazuje znaczne powinowactwo do grup fosforanowych, obecnych również w strukturze DNA. Przypuszczano więc, że niezależnie od wykorzystanej sekwencji oligonukleotydu, będzie obserwowana znaczna selektywność sensora na jony UO_2^{2+} . Istotnie, wyniki doświadczeń [19] wykazały, że elektrody zmodyfikowane losowo wybranym oligonukleotydem charakteryzowały się wysoką selektywnością wobec kationów uranylowych w porównaniu do innych badanych jonów. Najsilniej przeszkadzającym kationem był Pb^{2+} , który zgodnie z danymi literaturowymi, wykazuje znaczne powinowactwo do adeniny, obecnej w stosowanej losowej sekwencji. Podjęto zatem próbę ograniczenia wpływu jonów Pb^{2+} na oznaczanie UO_2^{2+} poprzez zmniejszenie liczby zasad adeninowych w oligonukleotydzie zaimmobilizowanym na elektrodzie [20]. Okazało się, że elektrody modyfikowane oligonukleotydami zawierającymi mniejszą ilość zasad adeninowych lub w ogóle ich nie zawierającymi generowały znacznie niższą odpowiedź na jony ołowiu w porównaniu do sekwencji wyjściowej. Co więcej, odpowiedź na jony UO_2^{2+} była niezależna od użytej sekwencji, co potwierdza tezę, że oddziaływanie tego jonu z DNA zachodzi przede wszystkim poprzez grupy fosforanowe.



Rysunek 1. Selektowność elektrody złotej modyfikowanej oligonukleotydem 5'-SH-(CH₂)₆-TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3' wobec wybranych jonów metali ciężkich

Figure 1. Selectivity of gold electrode, modified with 5'-SH-(CH₂)₆-TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3' oligonucleotide, towards selected heavy metal ions

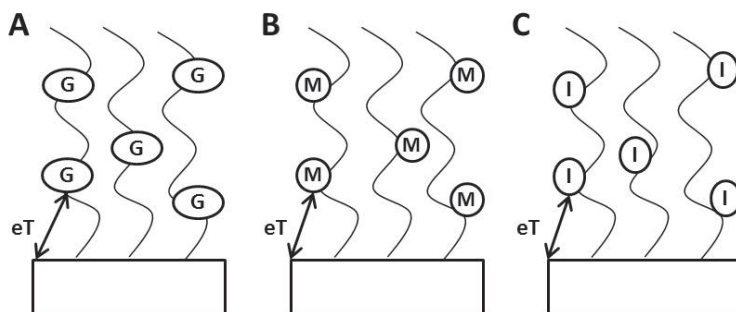
Kolejnym jonem, oznaczanym z użyciem elektrochemicznego sensora DNA, był kation Hg²⁺ [21, 22]. W literaturze występują informacje o silnym wiązaniu jonów rtęci między dwiema zasadami tyminowymi. W tym przypadku oczekiwano, że odpowiedź sensora będzie zależna od sekwencji oligonukleotydu zaimmobilizowanego na elektrodzie. Rzeczywiście, badania wykazały, że odpowiedź elektrochemiczna na jony Hg²⁺ generowana jest tylko w przypadku elektrod modyfikowanych oligonukleotydami składającymi się jedynie z zasad tyminowych. W przypadku zastosowania oligonukleotydów zawierających 33% oraz 0% zasad tyminowych, odpowiedź prądowa na jony rtęci nie była obserwowana. Co ważne, elektrody modyfikowane oligonukleotydem 5'-SH-(CH₂)₆-(T)₁₅-3' charakteryzowały się bardzo wysoką selektywnością na jony rtęci wobec większości badanych jonów przeszkadzających (Rys. 1). Jedynie kation uranylowy miał wyraźny wpływ na odpowiedź elektrody, co należy tłumaczyć oddziaływaniem tego jonu z grupami fosforowymi, obecnymi w we wszystkich sekwencjach oligonukleotydowych.

Szczególnie ciekawa wydaje się również możliwość oznaczania jonów metali z użyciem aptamerów. W przypadku tej grupy oligonukleotydów, sekwencja zasad jest istotna nie tylko z uwagi na specyficzne oddziaływania zasad z analitem (np. jonem metalu), ale także poprzez wpływ sekwencji na przestrzenny układ nici oligonukleotydu. Aptamery mogą bowiem tworzyć formy przestrzenne, preferujące swym kształtem i wielkością oddziaływanie z określoną cząsteczką [18]. Jedną z najczęściej opisywanych w literaturze sekwencji aptamerowych jest aptamer wiążący trombinę (ang. *thrombin binding aptamer*, TBA) [23]. Najważniejszym elementem strukturalnym tego receptora jest układ dwóch równoległych kwartetów guaninowych. Z uwagi na opisane w literaturze znaczne powinowactwo jonów ołowiu do zasady

guaninowej, ciekawym wydało się sprawdzenie, czy możliwe jest opracowanie sensora elektrochemicznego do oznaczania jonów Pb^{2+} wykorzystującego w warstwie receptorowej TBA [24]. Dla porównania przeprowadzono badania z elektrodami modyfikowanymi oligonukleotydem o takiej samej długości i losowej sekwencji. Wyniki pomiarów elektrochemicznych z zastosowaniem tak przygotowanych elektrod pozwoliły stwierdzić, że sekwencja TBA wykazuje, zgodnie z oczekiwaniami, znaczną selektywność wobec jonów ołowiu, podczas gdy sekwencja losowa daje znikomą odpowiedź na te jony. Co więcej, przeprowadzone pomiary spektroskopii impedancyjnej (EIS) wskazują, że struktura przestrzenna aptameru tworzy się dopiero w obecności jonów ołowiu (tzw. dopasowanie indukowane).

Podsumowując tę część badań, należy stwierdzić, że sekwencje oligonukleotydów tworzących warstwy receptorowe sensorów elektrochemicznych, przeznaczonych do oznaczania jonów metali, mają znaczny wpływ na ich selektywność. Możliwe jest wykorzystanie zarówno oddziaływań jonów metali z grupami fosforanowymi DNA, z zasadami azotowymi, jak i dopasowania przestrzennego oligonukleotydu (aptameru) do oznaczanego jonu. Podobne wnioski można wyciągnąć na podstawie przeglądu publikacji innych grup badawczych, zajmujących się tą tematyką [25].

2. OPRACOWANIE BIOSENSORÓW DNA PRZEZNACZONYCH DO DETEKcji KATIONÓW: UO_2^{2+} , Hg^{2+} I Pb^{2+}

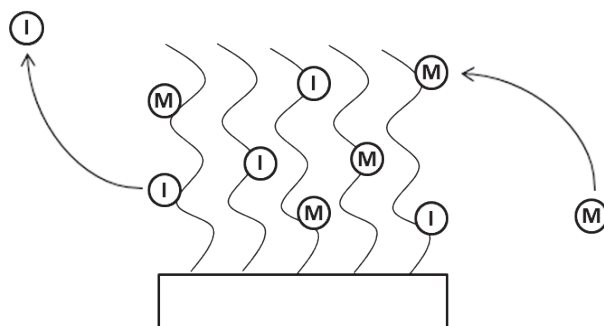


Rysunek 2. Strategie generowania sygnału analitycznego w elektrochemicznych sensorach DNA. G – guanina; M – jon metalu; I – znacznik elektrochemiczny

Figure 2. Generation of analytical signal in electrochemical DNA sensors. G – guanine; M – metal ion; I – redox indicator

Istotnym zagadnieniem w opracowaniu elektrochemicznego sensora DNA jest zawsze sposób generowania sygnału prądowego. Możliwe jest wykorzystanie właściwości redoks zasad azotowych (najczęściej guaniny) [9], redukcji lub utleniania analitu związanego z warstwą receptorową [26] lub też zastosowanie znaczników elektroaktywnych [12]. W przypadku sensorów przeznaczonych do oznaczania jonów metali ciężkich oczywistym wydaje się wykorzystanie ich właściwości redu-

kująco-utleniających (Rys. 2). Jednakże przy zastosowaniu detekcji elektrochemicznej takie rozwiązanie nie zawsze jest optymalne. Zbyt skrajne potencjały przykładane do elektrody pracującej modyfikowanej DNA mogą powodować desorpcję warstwy receptorowej, a więc uszkodzenie sensora. Dlatego w badaniach wykorzystano popularny znacznik redoks – błękit metylenowy (MB) [12]. Zaproponowano nowatorski sposób uzyskiwania sygnału analitycznego, polegający na pomiarze różnicowym (Rys. 3). W pierwszym etapie mierzony jest prąd dla elektrody modyfikowanej oligonukleotydem, zanurzonej w odpowiednim elektrolicie zawierającym MB. Następnie elektroda jest inkubowana w próbce zawierającej oznaczany jon oraz MB. Jony metali silnie oddziałujące z oligonukleotydem wypierają część cząsteczek błękitu z warstwy receptorowej, a więc prąd pochodzący od MB mierzony po ustaleniu się równowagi jest niższy. Jest to związane z dodatnim ładunkiem zarówno kationów metali, jak i błękitu metylenowego. Sygnałem analitycznym jest zatem zmiana wielkości prądu dla MB, rejestrowanego dla badanego sensora przed i po kontakcie z oznaczanym jonem metalu [19]. Zaletami takiego układu są: możliwość zastosowania znacznika dającego sygnał prądowy o możliwie niskim potencjale oraz zmniejszenie wpływu jakości powierzchni elektrody oraz niedoskonałości utworzonej oligonukleotydowej warstwy receptorowej DNA na powtarzalność wyników z uwagi na różnicowy charakter pomiaru. Z drugiej strony, wadą tego układu jest brak możliwości wykorzystania potencjału przyłożonego do elektrody do poprawy selektywności analizy, co sprawia, że jedynym czynnikiem decydującym o selektywności pozostaje oddziaływanie warstwy receptorowej ze składnikami próbki.



Rysunek 3. Mechanizm działania oligonukleotydowego biosensora z użyciem znacznika redoks. M – jon metalu; I – znacznik elektrochemiczny

Figure 3. Working mechanism for oligonucleotide-based biosensor with the use of redox indicator. M – metal ion; I – redox indicator

Opisany powyżej sposób został z powodzeniem wykorzystany do uzyskania sygnału analitycznego w sensorach DNA przeznaczonych do oznaczania jonów UO_2^{2+} , Hg^{2+} oraz Pb^{2+} . Kolejne badania zmierzały do optymalizacji parametrów analitycznych opracowanych sensorów poprzez dobór składu warstwy receptorowej. Badania rozpoczęto od przygotowania sensora na jony uranowe [19]. Zbadano

wpływ wprowadzenia do monowarstwy oligonukleotydu tzw. czynnika blokującego – 6-merkpto-1-heksanolu (MCH). Obecność tego związku prowadzi do lepszego uporządkowania monowarstwy oraz pokrycia obszarów nie związanych z oligonukleotydem. Stwierdzono, że wprowadzenie MCH do warstwy receptorowej sensora jonów UO_2^{2+} powoduje zmniejszenie nachylenia krzywej kalibracji, co można wytłumaczyć mniejszą gęstością pokrycia powierzchni elektrody przez oligonukleotydy. Jednocześnie poprawie uległa wartość korelacji liniowej krzywej kalibracji (R^2), co można wiązać z lepszym uporządkowaniem monowarstwy DNA [20].

Istotnym parametrem warstwy receptorowej jest długość oligonukleotydu zastosowanego do jej wytworzenia. Badano elektrody modyfikowane sekwencjami o długości 5, 10, 15 i 20 zasad. Stwierdzono, że największą czułością na jony UO_2^{2+} charakteryzowały się sensory zmodyfikowane oligonukleotydem o długości 10 zasad. Niższa czułość, obserwowana w przypadku sekwencji zawierającej 5 zasad, wynika z niewielkiej ilości grup fosforanowych wiążących jon uranylowy. Natomiast nieznacznie niższa czułość dla sekwencji o długości 15 i 20 zasad jest związana z możliwością wyginania się i hybrydyzacji oligonukleotydów tworzących warstwę receptorową. Określono także wpływ czasu kontaktu sensora z próbką zawierającą jony UO_2^{2+} na czułość odpowiedzi. Zgodnie z oczekiwaniami, dłuższy czas inkubacji skutkował większą zmianą sygnału analitycznego przy zmianie stężenia analitu [20]. Należy więc stwierdzić, że czułość sensora może być w znacznym stopniu regulowana poprzez dobór długości oligonukleotydu tworzącego warstwę receptorową oraz czas inkubacji sensora w próbce.

Podjęto także próby regeneracji sensora po jego użyciu poprzez usunięcie jonów uranylowych z warstwy receptorowej. Procedura polegała na 20-krotnym skanowaniu elektrody techniką woltamperometrii cyklicznej w roztworze zawierającym EDTA. Przeprowadzone 4 cykle regeneracji wykazały, że znaczący spadek odpowiedzi obserwowany jest jedynie po pierwszej procedurze regeneracji sensora, natomiast w następnych cyklach sygnał stabilizuje się. Zastosowana procedura regeneracji, choć niedoskonała, umożliwia więc kilkukrotne wykorzystanie tego samego sensora do oznaczania jonów uranylowych. Zoptymalizowany sensor charakteryzuje się dolną granicą oznaczalności dla jonów UO_2^{2+} wynoszącą 30 nmol L^{-1} , przy maksymalnym stężeniu tego jonu dopuszczalnym w wodzie pitnej przez US Environmental Protection Agency wynoszącym 130 nmol L^{-1} [20].

Opisany powyżej sposób generowania sygnału analitycznego, wykorzystujący różnicowy pomiar prądu pochodzącego od błękitu metylenowego, został zastosowany także dla sensora jonów rtęci [21, 22]. Jak już wspomniano, w tym przypadku elektroda złota była modyfikowana oligonukleotydem składającym się z zasad tyminowych. Wykorzystując spektroskopię impedancyjną, sprawdzono celowość dodatkowego wprowadzenia do warstwy receptorowej 6-merkpto-1-heksanolu. Stwierdzono, że w monowarstwie mieszanej oligonukleotydy są rzadziej upakowane, co może sprzyjać wnikaniu w strukturę monowarstwy jonów Hg^{2+} i tworzeniu przez nie kompleksu z dwiema zasadami tyminowymi, znajdującymi się w sąsiednich

niciach DNA. Ponadto, MCH blokuje fragmenty elektrody złotej nie pokryte oligonukleotydami, co zapobiega ewentualnej redukcji jonów rtęci w czasie pomiaru i tworzeniu się amalgamatu złota. Na podstawie powyższych przesłanek, w dalszych badaniach stosowano monowarstwy zbudowane z oligonukleotydu i MCH.

Z uwagi na sposób powstawania sygnału analitycznego w badanych sensorach, polegający na wypieraniu z warstwy receptorowej cząsteczek znacznika (MB) przez jon rtęci, czynnikiem istotnym dla parametrów analitycznych jest stężenie MB w próbce pomiarowej. W związku z tym zmierzono odpowiedź sensora przy stałym stężeniu jonów rtęci i różnych stężeniach błękitu metylenowego. Największy sygnał analityczny zarejestrowano przy stężeniu MB wynoszącym $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ i takie stężenia znacznika stosowano w dalszych badaniach [22].

Procesy elektrodowe, prowadzone w warunkach hydrodynamicznych, a więc gdy dominującym sposobem transportu cząsteczek w elektrolicie jest konwekcja wymuszona, charakteryzują się znacznie wydajniejszą wymianą masy na granicy faz elektroda/elektrolit niż procesy prowadzone w warunkach stacjonarnych. W związku z tym wykonano krzywe kalibracji opracowanych sensorów zarówno w warunkach stacjonarnych, jak i dynamicznych (z mieszaniem próbki zawierającej jony rtęci). W warunkach stacjonarnych dolna granica oznaczalności dla jonów rtęci wyniosła $70,2 \text{ nmol L}^{-1}$, co jest wartością zbyt wysoką do praktycznych zastosowań sensora. W warunkach hydrodynamicznych zarejestrowano znacznie niższą wartość dolnej granicy oznaczalności, wynoszącą $4,63 \text{ nmol L}^{-1}$. Wartość ta jest niższa niż maksymalne dopuszczalne stężenie jonów rtęci w wodzie pitnej, ustalone przez US Environmental Protection Agency na poziomie $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ (około 10 nM L^{-1}). Możliwość zastosowania opracowanego sensora do oznaczania rtęci w próbkach rzeczywistych sprawdzono, dokonując analizy certyfikowanego materiału odniesienia. Otrzymany wynik ($3,51 \mu\text{mol L}^{-1}$) jest na poziomie stężenia deklarowanego przez producenta ($3,00 \mu\text{mol L}^{-1}$) [22].

Interesujące wyniki otrzymano podczas badań nad sensorem przeznaczonym do oznaczania jonów ołowiu [23]. W tym przypadku w warstwie receptorowej sensora zastosowano aptamer – oligonukleotyd przyjmujący w obecności jonów ołowiu strukturę podwójnego kwadrupleksu guaninowego (TBA). Tworzony układ decyduje o selektywności tego sensora, ma jednak także wpływ na oddziaływanie z błękitem metylenowym stosowanym w celu uzyskania sygnału prądowego. Większe wyeksponowanie zasad guaninowych sprawia, że MB, wykazując znaczne powinowactwo do guaniny, silniej oddziałuje z aptamerem w konformacji kwadrupleksu niż w układzie liniowym. Mierzalnym efektem takiej sytuacji jest wzrost prądu pochodzącego od błękitu metylenowego, rejestrowany przy wzrastającym stężeniu jonów ołowiu w próbce. W przypadku opisywanych wcześniej sensorów przeznaczonych do oznaczania jonów UO_2^{2+} i Hg^{2+} , wraz ze wzrastającym stężeniem analitu sygnał malał.

Podobnie jak dla pozostałych badanych sensorów DNA, przeznaczonych do oznaczania jonów metali ciężkich, w sensorze jonów ołowiu zastosowano monowarstwę mieszaną, w skład której wchodził oligonukleotyd (aptamer) oraz 6-mer-

kapto-1-heksanol. Tak przygotowany sensor zastosowano do oznaczania ołowiu w próbkach wody wodociągowej, do której dodano $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ w stężeniu $1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Wynik analizy tak przygotowanej próbki z zastosowaniem sensora DNA, wynoszący $0,99 \mu\text{mol L}^{-1}$, świadczy o możliwości jego wykorzystania do analizy próbek rzeczywistych [23].

Opracowany sensor charakteryzował się dolną granicą oznaczalności dla jonów ołowiu wynoszącą $34,7 \text{ nmol L}^{-1}$. Choć jest to wartość niższa od maksymalnego dopuszczalnego stężenia jonów Pb^{2+} w wodzie pitnej, ustalonego przez US Environmental Protection Agency ($0,015 \text{ mg L}^{-1}$, 72 nmol L^{-1}), to należy jednak stwierdzić, że nie jest ona satysfakcjonująca na tle innych elektrochemicznych metod oznaczania ołowiu. Dlatego też podjęto prace nad obniżeniem dolnej granicy oznaczalności tych sensorów, między innymi poprzez zastosowanie innego znacznika redoks. Badania te są wciąż prowadzone, a ich wstępne wyniki wydają się bardzo obiecujące [23].

PODSUMOWANIE

W niniejszym artykule opisano zastosowanie biosensorów z warstwami receptorowymi DNA, przeznaczonymi do oznaczania jonów metali ciężkich. Można stwierdzić, że taki sposób modyfikacji jest prostszy i dający więcej możliwości, w porównaniu do zastosowania klasycznych receptorów. Opracowanie nowego związku, zdolnego do selektywnego oddziaływania z wybranym analitem, wymaga zazwyczaj syntezy kilku związków o zbliżonej strukturze, a wybór najlepszego z nich jest dokonywany na podstawie badań empirycznych. Synteza receptorów to najczęściej proces wieloetapowy, wymagający dużej wiedzy, czasu, a przede wszystkim generujący znaczne koszty. Oligonukleotydy są obecnie dostępne komercyjnie, zakupić można właściwie dowolną sekwencję zasad, dodatkowo istnieje możliwość modyfikacji oligonukleotydu różnego rodzaju grupami, np. w celu ułatwienia immobilizacji. Co szczególnie ważne, dzięki automatyzacji syntezy, koszty zakupu oligonukleotydów są niewielkie, nawet w przypadku oczyszczania HPLC i modyfikacji np. grupą $-\text{SH}$. Umożliwia to sprawne prowadzenie szeroko zakrojonych badań nad sensorami DNA.

Zastosowanie opracowanych sensorów DNA do oznaczania jonów metali ciężkich odbiega od najbardziej naturalnej aplikacji, jaką jest oznaczanie ważnych sekwencji kwasów nukleinowych. Mimo to, sensory te charakteryzują się wysoką selektywnością wobec oznaczanych jonów, przy czym selektywność może być w znacznym stopniu modyfikowana przez dobór odpowiedniej sekwencji oligonukleotydu. Dolne granice oznaczalności, wyznaczone dla tych sensorów, pozwalają na oznaczanie jonów uranowych, ołowiu i rtęci w próbkach np. wody pitnej na poziomie poniżej dopuszczalnych norm.

PODZIĘKOWANIA

Badania zrealizowano dzięki finansowaniu z grantu NCN nr 2011/01/N/ST4/03330 oraz ze środków Politechniki Warszawskiej.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] G.S. Wilson, R. Gifford, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, **20**, 2388.
- [2] N.I.L. Rosi, C.A. Mirkin, *Chem. Rev.*, 2005, **105** (4), 1547.
- [3] Y. Shao, J. Wang, H. Wu, J. Liu, I.A. Aksay, Y. Lin, *Electroanal.*, 2010, **22** (10), 1027.
- [4] J. Wang, *Electroanal.*, 2005, **17**(1), 7.
- [5] F.R.R. Teles, L.P. Fonseca, *Talanta*, 2008, **77**, 606.
- [6] A. Sassolas, B.D. Leca-Bouvier, L.J. Blum, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 109.
- [7] K.R. Rogers, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **568**, 222.
- [8] D.P. Kalogianni, T. Koraki, T.K. Christopoulos, P.C. Ioannou, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **21**, 1069.
- [9] S.C.B. Oliveira, O. Corduneanu, A.M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry*, 2008, **72**, 53.
- [10] T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21** (10), 1192.
- [11] J.J. Gooding, *Electroanal.*, 2002, **14** (17), 1149.
- [12] E.E. Ferapontova, *Curr. Anal. Chem.*, 2011, **7** (1), 51.
- [13] G. Bagni, D. Osella, E. Sturchio, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **573–574**, 81.
- [14] P. D'Orazio, *Clin. Chim. Acta*, 2011, **412**, 1749.
- [15] E. Palecek, M. Fojta, M. Tomschik, J. Wang, *Biosens. Bioelectron.*, 1998, **13**, 621.
- [16] Y. Lu, J. Liu, *Curr. Opin. Biotech.*, 2006, **17**, 580.
- [17] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, *Biomem. Eng.*, 2007, **24**, 381.
- [18] S. Song, L. Wang, J. Li, J. Zhao, C. Fan, *Trac-Trend Anal. Chem.*, 2008, **27** (2), 108.
- [19] R. Ziółkowski, Ł. Górski, S. Oszałdowski, E. Malinowska, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **402**, 2259.
- [20] M. Jarczewska, R. Ziółkowski, Ł. Górski, E. Malinowska, *Bioelectrochemistry*, 2014, **96**, 1.
- [21] Ł. Górski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, *ECS Trans.*, 2012, **50**, 333.
- [22] R. Ziółkowski, M. Jarczewska, Ł. Górski, E. Malinowska, *J. Electroche. Soc.*, 2013, **160**, B152.
- [23] A.-E. Radi, J.L.A. Sanchez, E. Baldrich, C.K. O'Sullivan, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 6320.
- [24] M. Jarczewska, E. Kierzkowska, R. Ziółkowski, Ł. Górski, E. Malinowska, *Bioelectrochemistry*, 2015, **101**, 35.
- [25] R. Ziółkowski, Ł. Górski, *Curr. Anal. Chem.*, 2014, **10**, 600.
- [26] A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, *Electroanal.*, 2009, **21** (11), 1237.

Praca wpłynęła do Redakcji 8 maja 2015