

## Zadanie 6 – propozycja rozwiązania + komentarz

- A. *Przyporządkuj do poszczególnych doświadczeń (a,b,c) odpowiednie krzywe kalibracji (d,e,f) i uzasadnij, z czego mogą wynikać różnice w charakterze krzywych (ich nachyleń). Jak sądzisz, czy podobne różnice byłyby możliwe do zaobserwowania w przypadku detekcji wykorzystującej znakowanie (np. fluorescencyjne)? (3 pkt)*

### Prawidłowe odpowiedzi:

a-e

b-f

c-d

### Uzasadnienie:

Rezonans plazmonów powierzchniowych jako technika bezznacznikowa bazuje na zmianach właściwości optycznych na powierzchni biosensora, wywołanych wiązaniem z powierzchnią cząsteczek analitu. Z tego względu wartość uzyskanego sygnału (dRU) będzie zależała od masy analitu. Sekwencja oligonukleotydowa o długości 15 zasad, z racji większej masy w porównaniu do sekwencji o długości 10 zasad, będzie wywoływała większe zmiany współczynnika załamania światła dla tego samego stężenia. Przełoży się to na większą czułość oznaczenia – a co za tym idzie uzyskamy większe nachylenie krzywej kalibracji.

Najmniejsze nachylenie krzywej kalibracji będzie obserwowane dla sekwencji o długości 10 zasad z pojedynczą mutacją punktową. Pomimo bardzo zbliżonej masy do sekwencji w pełni komplementarnej (również o długości 10 zasad), wydajność wiązania takiej sekwencji z sondą DNA immobilizowaną na powierzchni będzie znacząco mniejsza. Mutacja punktowa istotnie utrudnia łączenie się nici DNA w postać podwójnej helisy. Taki kompleks cechuje dużo mniejsza tzw. termodynamiczna stała trwałości – nici wiążą się zdecydowanie mniej „chętnie” niż w przypadku pełnej komplementarności. (warto w tym miejscu zwrócić uwagę, że kwasy nukleinowe posiadają ładunek ujemny z uwagi na obecność łańcuchów fosforanowych, dlatego fragmenty niekomplementarne z reguły się odpychają).

W przypadku detekcji pośredniej, wykorzystującej np. znakowanie fluorescencyjne BYŁOBY MOŻLIWE zaobserwowanie różnic w komplementarności (nić znakowana fluorescencyjnie z mutacją punktową wiązałyby się mniej wydajnie z powierzchnią, co skutkowałooby mniejszą zarejestrowaną fluorescencją. Z kolei zaobserwowanie różnicy w długości wiązanej sekwencji (przy takiej samej długości odcinka wiążącego) NIE BYŁOBY MOŻLIWE – intensywność sygnału zależałyby w tym przypadku jedynie od liczby związanych cząsteczek DNA, a nie ich masy.

- B. Techniki bezznacznikowe, oprócz zastosowania w biosensorach do oznaczania stężeń ważnych bioanalitów, mogą zostać wykorzystane również do szeroko pojętych badań oddziaływań między cząsteczkami biologicznymi. Wskaż, jakie inne informacje na temat oddziaływań międzycząsteczkowych (np. DNA-DNA czy przeciwciało-antygen) można uzyskać za pomocą technik bezznacznikowych. Z czego wynika ich przewaga nad technikami wykorzystującymi znaczniki? (4 pkt)

Inne informacje na temat oddziaływań międzycząsteczkowych uzyskiwane za pomocą technik bezznacznikowych, to m, in:

- termodynamiczne stałe trwałości (stała asocjacji, stała dysocjacji, termodynamiczne powinowactwo itp.)
- informacje na temat kinetyki oddziaływań,

Przewagi technik bezznacznikowych względem technik wykorzystujących znaczniki:

PRZEDE WSZYSTKIM:

- możliwość obserwowania oddziaływań biologicznych w tzw. czasie rzeczywistym (dzięki temu można badać kinetykę tworzenia wiązań i ich dysocjacji, szybkość reakcji itp.),
- uzyskiwany sygnał zależy bezpośrednio od właściwości badanego analitu a nie od znacznika,

A TAKŻE:

- prostota (brak konieczności stosowania znacznika skutkuje mniejszą ilością etapów detekcji),
- oszczędność czasu,

*C. Biosensor DNA wykorzystujący zjawisko hybrydyzacji powinien cechować się zdolnością do wielokrotnego, odwracalnego wiązania specyficznej, oznaczanej sekwencji. Wiedząc, jakie zjawisko jest odpowiedzialne za wiązanie analitu, zaproponuj dwa przykłady strategii regeneracji warstwy receptorowej. Uzasadnij odpowiedź w 1-2 zdaniach. (3 pkt)*

Regeneracja warstwy receptorowej biosensora DNA polega na rozpadzie kompleksów receptor-analit poprzez osłabienie tworzących je oddziaływań (w tym przypadku celem jest zniszczenie podwójnej helisy – tzw. dehybrydyzacja). Należy unikać jednak stosowania drastycznych warunków, które mogą doprowadzić do degradacji lub desorpcji sekwencji DNA sondy - biosensor powinien zachować zdolność do wielokrotnego, odwracalnego wiązania sekwencji oznaczanej.

Odwracalną dehybrydyzację podwójnej helisy można osiągnąć poprzez zastosowanie np.:

- wysokiego pH (np. roztworu NaOH) (rozpad wiązań wodorowych),
- roztworu surfaktanta (rozpad wiązań wodorowych),
- roztworu o małej sile jonowej lub rozpuszczalników organicznych (zwiększenie sił odpychania pomiędzy ujemnie naładowanymi łańcuchami),
- podwyższonej temperatury (rozpad wiązań wodorowych) – rozwiązanie mało praktyczne w przypadku biosensorów SPR, jednak szeroko stosowane np. w technice PCR.