

Studium interakcí nukleových kyselin s proteiny pomocí piezoelektrického biosensoru.

KATEŘINA KUCHARÍKOVÁ, HANA PIVOŇKOVÁ, MIROSLAV FOJTA

Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 197, e-mail: katka@ibp.cz)

Úvod

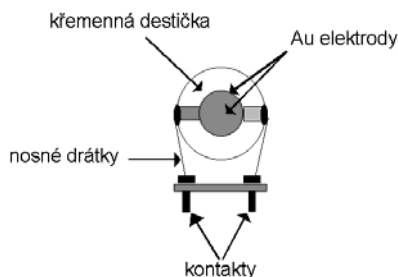
Biosensory jsou analytická zařízení, sloužící ke sledování různých biologických či biochemických dějů. Biologický systém je ve spojení s fyzikálním převodníkem a elektronickým zesilovačem signálu. Jako biologický materiál pro konstrukci biosensoru může sloužit např. enzym, protilátka, antigen, nukleová kyselina, bakterie, celá buňka nebo i část rostliny (Ngeh-Ngwainbi *et al.* 1990).

Podstata metody

Piezoelektrický biosensor je tvořen piezoelektrickým krystalovým výbrusem, na jehož obou stranách jsou kovové elektrody (pro konstrukci biosensorů se používá nejčastěji zlato, někdy také stříbro nebo platina). Jeho schematický náčrt je uveden na obr. 1. Na povrchu elektrod je imobilizován bioligand selektivně interagující s analytem. Základní charakteristikou piezoelektrického biosensoru je jeho rezonanční frekvence. Změna této veličiny je přímo úměrná změně hmotnosti vrstvy na povrchu krystalu (systém tedy funguje jako velmi citlivé mikrováhy - QCM (*quartz crystal microbalance*), čehož se využívá pro stanovení analytů ve vzorku. Vztah mezi změnou rezonanční frekvence (Δf) a změnou hmotnosti systému (Δm) popsal Sauerbrey (Sauerbrey 1959):

$$\Delta f = -2,3 \cdot 10^6 f_0^2 \frac{\Delta m}{A}$$

kde f_0 je pracovní frekvence krystalu [MHz], A je plocha elektrody [cm²].



Obr. 1. Piezoelektrický krystal

Postup

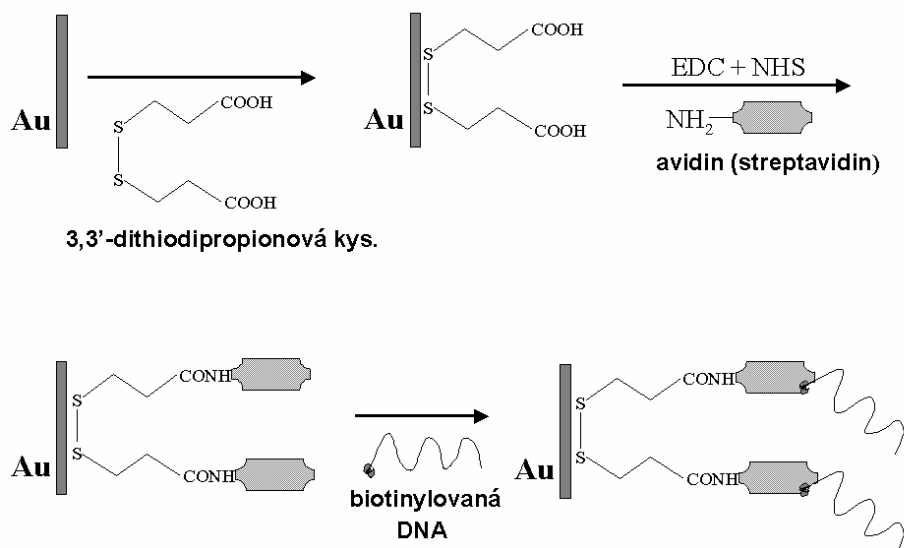
Při sledování bioafinitních interakcí se nejčastěji postupuje tak, že jedna z reagujících látek je imobilizována na povrchu krystalu a druhá je přítomna volně v roztoku, přičemž

se sleduje tvorba afinitního komplexu. Pokud dojde k navázání látky na citlivý povrch, projeví se to snížením frekvence krystalového výbrusu. Experimenty se obvykle provádějí v průtokovém uspořádání, je tedy možné sledovat celý průběh reakce a ze zaznamenaných křivek pak stanovit její rychlostní parametry.

Základem měřicí aparatury je průtoková kyveta, do níž je výbrus vložen. Přítok a odtok kapaliny je řešen pomocí ocelových trubiček vsazených do kyvety a silikonových hadiček, které spojují měřicí kyvetu s peristaltickou pumpou. Při měření je krystal svými kontakty spojen s oscilačním obvodem, tzn. že frekvence oscilace je určována samotným výbrusem (tzv. rezonanční frekvence výbrusu) a jakákoliv změna na jeho povrchu se projeví změnou v oscilaci. Dále je k měření potřebný vhodný detektor frekvence s dobrým rozlišením (min. 0,1 Hz). Vlastní frekvence je zaznamenávána pomocí příslušného softwaru na počítači.

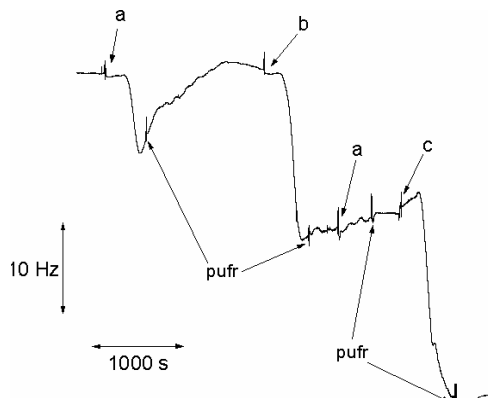
Na počátku měření kyvetou protéká pouze pracovní pufr, přičemž je nutné vyčkat úplného ustálení základní linie. Při průtoku vzorku, kdy dochází k vazbě analytu na povrch sensoru, se zaznamená tzv. asociační fáze křivky. Poté lze do kyvety pustit opět pouze samotný pufr a sledovat případný rozpad komplexu (disociační fáze).

Tento systém lze použít obecně při studiu jakýchkoliv bioafinitních interakcí (protilátka - antigen, avidin - biotin, hormon - receptor, hybridizace nukleových kyselin). V naší laboratoři jsme se rozhodli ho aplikovat jednak na detekci hybridizace (DNA, oligonukleotidy) a jednak na studium vazby nádorového supresoru, proteinu p53, na různé typy DNA. DNA, resp. oligonukleotidu je realizována pomocí silné afinitní reakce mezi streptavidinem a biotinem - streptavidin je imobilizován na povrchu sensoru, biotin je kovalentně navázán na použitý oligonukleotid (komerčně dodávaný). Schéma možného způsobu imobilizace je zobrazeno na obr. 2. Další způsoby imobilizace viz. např. Storri *et al.* 1998 nebo Tombelli *et al.* 2002. Jinou možností je imobilizovat na povrch sensoru nejdříve protein p53 přes protein A a specifickou protilátku (např. DO-1).



Obr. 2. Imobilizace biotinylované DNA na povrch elektrod piezoelektrického krystalu modifikovaný avidinem (streptavidinem); převzato z Caruso *et al.* 1997.

Ilustrační záznam měření s krystalem modifikovaným streptavidinem je uveden na obr. 3. Po ustálení základní linie v pracovním pufru (HEPES, pH 7,5) byl pufr nahrazen roztokem kontrolního oligonukleotidu (bez biotinu), po několika minutách byl pak tento vzorek opět nahrazen pufr. Z obrázku je patrné, že vazba nebyla stabilní, protože došlo pouze k přechodnému snížení frekvence. Naopak, při použití oligonukleotidu značeného biotinem [biotin-(GAA)₁₂], došlo k nevratnému snížení rezonanční frekvence, tedy k navázání biotinu na streptavidin. Dalším krokem byla interakce již navázaného oligonukleotidu s kontrolním oligonukleotidem s obecnou sekvencí. Jak je vidět ze záznamu, k vazbě nedošlo. Při použití oligonukleotidu s komplementární sekvencí [(TTC)₁₂ - A₂₅] však interakce nastala a snížení frekvence oscilace bylo ireversibilní.



Obr. 3. Záznam měření s piezoelektrickým výbrusem modifikovaným streptavidinem. Pracovní pufr: HEPES, pH 7,5; oligonukleotidy: a - kontrolní oligonukleotid s náhodnou sekvencí bez biotinu; b - biotin-(GAA)₁₂, koncentrace 1 µg.ml⁻¹; c - (TTC)₁₂-A₂₅, koncentrace 2 µg.ml⁻¹. Další podrobnosti jsou uvedené v textu.

Zhodnocení metody

Výhodou této metody studia bioafinitních interakcí je možnost sledování reakce v reálném čase bez nutnosti značení. Jiné metody, které se používají pro měření afinitních interakcí, jsou obvykle založeny na smíšení interagujících látek, dosažení rovnovážného stavu, separaci volných a navázaných molekul a kvantifikaci jedné z látek, k čemuž slouží vhodné detekční značky (radioaktivita, fluorescence). U těchto metod je navíc obtížné získat úplná kinetická data, zatímco v případě afinitních biosensorů je možné jednoduché stanovení rychlostních parametrů reakce (asociační, disociační, příp. rovnovážné konstanty) přímo ze zaznamenaných křivek (Skládal 1996). Podobná měření umožňuje ještě optický biosensor, který využívá principu povrchové plasmonové rezonance, nevýhodou tohoto typu sensoru je však jeho cena, která může převyšovat cenu piezoelektrického měřicího systému až o dva řády.

Literatura

- Caruso, F., Rodda E., Furlong D. N. 1997. - *Anal. Chem.* **69**: 2043. Ngeh-Ngwainbi J., Suleiman, A.A., Guilbault G.G. 1990. - *Biosens. Bioelectron.* **5**: 13.

- Sauerbrey, G.Z. 1959. - Z. Phys. **155**: 206.
 Skládal, P. 1995. - Chem. Listy **89**: 170.
 Storri S., Santoni, T., Minnuni M., Mascini M.
 1998. - Biosens. Bioelectron. **13**: 347.
 Tombelli S., Mascini M., Turner A.P.F. 2002.
 - Biosens. Bioelectron. **17**: 929.

Poděkování. Práce byla financována granty GAČR 204/02/0734, IGA MZ NC/7574 – 3 a Z 5004920.

Studium alternativních rostlinných telomer

ZUZANA KUNICKÁ

Laboratoř analýzy biologicky významných molekulových komplexů, Masarykova Univerzita v Brně, Královopolská 135, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 151, kunicka@ibp.cz)

Úvod

Telomery jsou nukleoproteinové struktury na koncích lineárních eukaryotických chromosomů, které mimo jiné chrání chromosomy před účinky nukleas nebo před jejich vzájemnou fúzí při vzniku chromosomálních zlomů. Jsou tvořeny vysoce konzervativními repetitivními sekvencemi, které jsou specifické pro různé typy organismů a zároveň společné pro skupinu organismů (Biessmann a Mason 1994). Typickým zástupcem na poli rostlinném je *Arabidopsis thaliana*, jejíž telomery jsou složeny ze sedminukleotidové repetice (TTTAGGG)_n.

Telomerová DNA je syntetizována pomocí enzymu zvaného telomerasa, který se váže na 3'-jednořetězcový přesah chromosomového konce, k němuž přidává další telomerové repetice. Tímto mechanismem řeší eukaryotické buňky problém replikace konců lineárních chromosomů. Telomerasa je ribonukleoproteinová reverzní transkriptasa, skládající se ze dvou podjednotek - RNA podjednotky, která obsahuje templátovou oblast pro syntézu telomer, a katalytické proteinové podjednotky TERT (*telomerase reverse transcriptase*), přičemž pro její enzymatickou činnost je nutná přítomnost obou podjednotek.

Hlavním rostlinným telomerovým motivem je repetice (TTTAGGG)_n, v poslední době byly v genomech některých rostlin kromě těchto typických telomerických sekvencí popsány i jiné typy (např. lidský, *Tetrahymena*) (Sýkorová *et al.* 2003). Většina těchto poznatků byla dosud získávána pomocí Southernovy hybridizace nebo fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Tyto metody nejsou dostatečně přesné k zodpovězení otázek, jestli jde o důsledek evolučního procesu, zda je v těchto rostlinách přítomna telomerasa, syntetizující odlišné telomerové sekvence, event. zda se u těchto rostlin nevyskytuje více telomeras vedle sebe. Na tyto otázky lze odpovědět pomocí metody TRAP (*telomere repeat amplification protocol*) používané pro stanovení aktivity telomerasy v lidských buňkách (Kim *et al.* 1994). Zatímco v tomto případě jde o takřka „rutinní“ záležitost, stanovení aktivity telomerasy v rostlinách je variabilnější a stále zde „číhají“ mnohá úskalí.

Ačkoli je dnes již jasné, že mnohé rostliny s „netypickými“ telomerami pouze zaměnily *Arabidopsis*-typ telomerické sekvence za lidský typ, stále existují a objevují se i další