

Streszczenie

Reakcje hybrydyzacji, polegające na specyficznym łączeniu komplementarnych nici kwasów nukleinowych, odgrywają kluczową rolę zarówno w procesach biologicznych, jak i w licznych zastosowaniach biotechnologicznych. W środowisku wodnym ich znaczenie dodatkowo wzrasta – kwasy nukleinowe cechują się wysoką rozpuszczalnością i stabilnością w roztworach wodnych.[1] Selektowność tych oddziaływań stanowi fundament wielu nowoczesnych metod, takich jak mikromacierze DNA, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH), biosensory czy terapie z zastosowaniem oligonukleotydów.[2-5] Przykładowo, mikromacierze wykorzystują fluorescencyjnie znakowane cząsteczki cDNA, które hybrydują z sondami osadzonymi na powierzchni, umożliwiając jednoczesną analizę ekspresji tysięcy genów.[6] Z kolei metoda FISH pozwala na lokalizację konkretnych sekwencji DNA lub mRNA w komórkach, co znajduje zastosowanie m.in. w diagnostyce aberracji chromosomowych, takich jak aneuploidie, oraz w badaniach organizacji przestrzennej centromerów.[7] Dodatkowo, w terapii genowej wykorzystuje się oligonukleotydy antysensowne oraz interferujące RNA (siRNA), które poprzez hybrydyzację wyciszają określone geny, oferując nowe możliwości leczenia chorób genetycznych i zakaźnych.[8]

Pomimo szerokiego zastosowania, skuteczność reakcji hybrydyzacji jest silnie uzależniona od warunków środowiskowych, zwłaszcza w roztworach wodnych. Parametry takie jak pH, temperatura, siła jonowa i zatłoczenie molekularne wpływają na szybkość i wydajność tworzenia dupleksów. Wysoka siła jonowa sprzyja hybrydyzacji, ponieważ jony dodatnie neutralizują odpychanie elektrostatyczne pomiędzy ujemnie naładowanymi niciami DNA. Z kolei skrajne wartości pH mogą zakłócać tworzenie wiązań wodorowych i prawidłowe parowanie zasad.[9, 10] Zatłoczenie molekularne dodatkowo zmienia przebieg reakcji – ogranicza dostępność przestrzeni, co prowadzi do zmian w szybkościach asocjacji i dysocjacji oraz wartości stałych równowagi reakcji.[11, 12] Przy niskich stężeniach cząsteczek powodujących zatłoczenie (poniżej 15 % wagowych), obserwuje się wzrost stałej równowagi hybrydyzacji kwasów nukleinowych K nawet o rząd wielkości,[13] natomiast

przy wyższych stężeniach, spadek K sięgający trzech rzędów wielkości.[14] Ten nietypowy efekt wynika z działania przeciwstawnych sił: satbilizujących sił wyczerpania (depletion) oraz szeroko pojętej destabilizacji struktury dupleksu przez zatłoczenie. Dodatkowym czynnikiem komplikującym zrozumienie wpływu zatłoczonego środowiska na reakcje kwasów nukleinowych są oddziaływania elektrostatyczne.

Dotychczas nie został opracowany jeden spójny model, który w pełni wyjaśniałby współdziałanie tych zjawisk. W dwóch pierwszych częściach tej pracy przedstawiono wpływ jonów i przeciwnie naładowanych cząsteczek na szybkość asocjacji DNA-DNA, a także efekt zatłoczenia i siły jonowej na stan równowagi reakcji hybrydyzacji. Na podstawie wyników eksperymentalnych opracowano modele teoretyczne. Pierwszy z nich opisuje przyspieszenie reakcji pomiędzy jednoimiennie naładowanymi cząsteczkami w obecności przeciwnie naładowanych katalizatorów w środowisku wodnym. Z kolei, drugi model analizuje wpływ zatłoczenia molekularnego na równowagę hybrydyzacji DNA, uwzględniając współdziałanie sił wyczerpania, oddziaływań elektrostatycznych i destabilizacji wynikającej z ograniczeń przestrzennych.

W badaniach hybrydyzacji DNA-DNA zastosowano techniki Transferu Energii Rezonansu Förstera (FRET) oraz Analizę Jasności Molekularnej (MBA). Obie te metody pozwalają śledzić przesunięcia równowagi w odpowiedzi na zmiany pH, siły jonowej, zatłoczenia oraz stężenia jonów.[14–20] Natomiast, w połączeniu z Spektroskopią Korelacji Fluorescencji (FCS) umożliwiają pomiary z rozdzielczością pojedynczych cząsteczek w objętościach rzędu femtolitrów. Technika FRET charakteryzuje się wysoką dokładnością i korzystnym stosunkiem sygnału do szumu, jednak wymaga znakowania cząsteczek dwoma barwnikami fluorescencyjnymi oraz ich precyzyjnego rozmieszczenia w odległości 1–10 nm. MBA, mimo niższego stosunku sygnału do szumu, upraszcza procedurę – funkcjonuje przy użyciu jednego barwnika fluorescencyjnego. Obie metody mają jednak ograniczenia pod względem przepustowości.

Wyznaczenie stałej równowagi K dla reakcji $A + B \rightleftharpoons AB$ wymaga wykonania serii rozcieńczeń, obejmującej zazwyczaj 20–30 różnych stosunków stężeń reagentów.[21] Przygotowanie próbek oraz same pomiary są

czasochłonne i mogą trwać wiele godzin. W badaniach zależnych od pH lub siły jonowej, liczba wymaganych próbek może wzrosnąć nawet kilkadziesiąt razy. Ograniczenie liczby punktów pomiarowych powoduje istotny wzrost błędu – z około 15 % (dla 30 punktów) do nawet 60 % (dla 10 punktów). Dodatkowo, standardowe procedury wykorzystują jednorazowe płytki wielodołkowe mieszczące najczęściej 200 μL roztworu w każdym dołku, co prowadzi do dużego zużycia materiałów i wysokich kosztów. Nawet po przygotowaniu próbek konieczna jest ręczna wymiana płytki co kilka pomiarów w zależności od liczby dołków w płytce, co dodatkowo ogranicza wydajność.

Aby sprostać tym ograniczeniom, w trzeciej części pracy zaprezentowano platformę mikroprzepływową, która automatyzuje zarówno przygotowanie próbek, jak i pomiar. System ten znacząco upraszcza przebieg eksperymentów, ograniczając udział użytkownika do konfiguracji początkowej i kalibracji mikroskopu. Po uruchomieniu platforma działa autonomicznie, skracając czas potrzebny na wyznaczenie K z około 180 minut do 35 minut. Układ dodatkowo poprawia dokładność pomiarów MBA i redukuje zużycie odczynników o trzy rzędy wielkości – z około 200 μL w standardowej procedurze do około 100 nL na próbkę w układzie mikroprzepływowym. Dzięki tym usprawnieniom badania hybrydyzacji DNA stają się bardziej wydajne, oszczędne i lepiej przystosowane do analiz wysokoprzepustowych w różnych warunkach środowiskowych.