Development of DNA aptamers-based biosensors for food safety and medical diagnostics

(*Vývoj biosenzorov na báze DNA aptamérov pre bezpečnosť potravín a lekársku diagnostiku***)**

Kiran Sontakke

Abstrakt

Rezíduá antibiotík a ťažké kovy vo vzorkách potravín a životného prostredia, ako aj proteínové biomarkery neurologických ochorení, sú látkami s regulačným alebo klinickým významom, ktoré sa v komplexných matriciach vyskytujú vo veľmi nízkych koncentráciách. Hoci sú konvenčné metódy citlivé, sú nákladné, časovo náročné a nevhodné na použitie priamo v teréne. Táto dizertačná práca rieši uvedené obmedzenia návrhom a charakterizáciou biosenzorov na báze DNA aptamérov, ktoré zahŕňajú povrchy funkcionalizované nanomateriálmi a antifoulingové spojovacie molekuly. Cieľovými analytmi v oblasti bezpečnosti potravín boli penicilín G (PEN), oxytetracyklín (OTC) a ortuť, zatiaľ čo cieľovým analytom v oblasti lekárskej diagnostiky bol myelínový bázický proteín (MBP), biomarker demyelinizácie pri roztrúsenej skleróze. Použité boli elektrochemické (DPV, CV a EIS), akustické (QCM-D) a optické (LSPR) transdukčné metódy.

MOF na báze kobalt-sukcinátu s inkorporovaným Ag a s aptamérmi modifikovanými tiolovými a aminoskupinami imobilizovanými metódou vrstveného nanášania detegoval Hg(II) v rozsahu 0.7–10 nM s LOD 0.3 nM. Biosenzor na bíze elektródy zo sklovitého uhlíka (GCE) modifikovanej nanokompozitom rGO–MWCNT s kovalentne pripojenými DNA aptamérmi detegoval OTC s limitom detekcie (LOD) 1.72 ng/mL, čo je približne 58-krát menej než limit EÚ pre mlieko. Biosenzor bol aplikovaný vzorkách mlieka s prídavkom OTC. Pre PEN dosiahol aptasenzor založený na monovrstve MUA LOD 0.23 ng/mL. Po prvý krát bola použitá kombinovaná platforma QCM-D/LSPR, na detekciu antibiotík. Táto metóda poskytla takmer identické LOD 3.0 nM pri QCM-D a 3.1 nM pri LSPR, s disociačnými konštantami 50 nM, respektíve 20 nM. Všetky namerané hodnoty boli nižšie než limit EÚ 4 ng/mL. Pre MBP zmiešaná antifoulingová monovrstva HS-MEG-COOH/DTT umožnila detekciu pomocou DPV a QCM-D, pričom poskytla porovnateľné LOD 2.74 a 4.14 ng/mL v pufri a 6.36 a 6.87 ng/mL v umelej cerebrospinálnej tekutine. V tejto vzorke bola hlavnou interferenciou nešpecifická adsorpcia albumínu.

Výsledky naznačujú, že účinnosť senzorov ovplyvňuje afinitný charakter aptamérov aj vlastnosti senzorového rozhrania. Tieto vlastnosti zahŕňajú imobilizačnú chémiu, podporu nanomateriálmi, heterogenitu povrchu a antifoulingový dizajn. Začlenením komplementárnych transdukčných techník sa dosiahla citlivá detekcia a zároveň sa získali mechanistické poznatky o interakciách medzi aptamérmi a ich cieľovými analytmi.

Kľúčové slová: DNA aptaméry, biosenzory, elektrochemická detekcia, nanomateriály, antifoulingové povrchy, oxytetracyklín, penicilín G, ortuť, myelínový bázický proteín, DPV, QCM-D, LSPR, bezpečnosť potravín, klinická diagnostika.