

Abstrakt

Cílem mé disertace byla syntéza modifikovaných 2'-deoxyribonukleosid trifosfátů (dNTP) nesoucích elektrochemicky oxidovatelné značky a jejich inkorporace do DNA pro aplikace v bioanalýze.

V první části disertace jsem vyvinula syntézu modifikovaných dNTP nesoucích 2,3-dihydrobenzofuran (DHB) nebo 2-methoxyphenol (MOP) v poloze 5 u 2'-deoxycytidin-5'-*O*-trifosfátu a v poloze 7 u 7-deaza-2'-deoxyadenosin-5'-*O*-trifosfátu pomocí Suzukiho-Miyaurových cross-coupling reakcí. Poté byly modifikované dNTP využity jako substráty pro DNA polymerasy při enzymové syntéze modifikovaných DNA pomocí PCR nebo prodlužování primeru. Studovali jsme elektrochemické vlastnosti nukleosidů, dNTP a DNA značených DHB nebo MOP skupinami s použitím metod square-wave voltametrie (SWV) na pyrolytické grafitové elektrodě (PGE) a pozorovali signály oxidace MOP při cca. 0.5 V a oxidaci DHB při 0.85V. Využití DHB skupiny v kombinaci s dalšími redoxními značkami bylo limitováno blízkostí pozice jejího oxidačního píku k signálům přirozených nukleobází, zatímco MOP skupina byla úspěšně použita k redoxnímu kódování nukleobází v kombinaci s aminofenylovou nebo benzofurazanovou značkou, kdy každá značka poskytla odlišný a nezávisle detekovatelný redoxní signál.

V druhé části disertace jsem studovala fenothiazin (PT) jako novou redoxní značku. Syntéza nukleosidů a dNTP modifikovaných PT byla prováděna pomocí Suzukiho-Miyaurových nebo Sonogashirových cross-coupling reakcí. Modifikované DNA nesoucí PT značky byly syntetizovány pomocí enzymových reakcí: prodlužování primeru, PCR nebo nicking enzyme amplifikační reakce. Modifikovaná nukleosidy a dNTPs nesoucí PT skupinu vázanou přes acetylenový můstek vykazovaly fluorescenční vlastnosti. Elektrochemické vlastnosti nukleosidů, dNTPs a DNA modifikovaných PT byly studovány cyklickou voltametrií (CV) a SWV na pyrolytické grafitové elektrodě a vykazovaly anodické signály v oblasti 0.66 V a 0.86 V. PT skupina byla rovněž studována pro multipotenciálové kódování DNA bázi v kombinaci s benzofuranovou nebo nitrofenylovou skupinou.

V poslední části byly studovány ferrocenové (Fc) deriváty s elektron-donorními a elektron-akceptorními skupinami jako nové redoxní značky s laditelným redoxním potenciálem. Navrhla a syntetizovala jsem 1-(*N,N*-dimethylaminocarbonyl)-1'-ethynylferrocen a 1-fluoro-1'-ethynylferrocen jako stavební bloky pro syntézu modifikovaných nukleosidů a nukleotidů. Tyto nové deriváty, a také známé 1-ethynyl-1',2,2',3,3',4,4',5-octamethylferrocen a propargylamidoferrocen, byly použity pro Sonogashirovy cross-coupling reakce s

halogenovanými dNTPs. Získané značené nukleotidy nesoucí modifikované Fc skupiny byly použity jako substráty pro enzymovou syntézu modifikované DNA. Dosud byly prostudovány elektrochemické vlastnosti modifikovaných nukleosidů pomocí SWV, zatímco další elektrochemické studie a aplikace dNTP a DNA značených modifikovanými Fc skupinami bude studována v blízké budoucnosti ve spolupráci s týmem Doc. Fojty.