

Abstrakt

Disertační práce popisuje syntézu modifikované DNA nesoucí elektrochemické aktivní značky (antrachinon, benzofurazan, azidoskupinu a nitrofenyltriazol) pro aplikaci v bioanalýze. Byla vyvinuta metoda přípravy modifikovaných trifosfátů, která je založena na vodné Suzukiho cross-couplingové reakci halogenovaných deoxynukleosid trifosfátů s arylboronovými kyselinami, na Sonogashirově cross-couplingové reakci jodovaných deoxynukleosid trifosfátů s terminálními alkyny, nebo na fosforylaci již modifikovaných nukleosidů. Enzymatická inkorporace funkcionalizovaných nukleosid trifosfátů do DNA byla testována prostřednictvím primer extension experimentu a elektrochemické vlastnosti DNA nesoucí redoxní značky byly studovány pomocí cyklické a "square wave" voltametrie. Jako první byl jako elektrochemická značka testován antrachinon. Modifikované 2'-deoxynukleosid trifosfáty nesoucí antrachinon připojený přes acetylenový nebo přes propargylkarbamoylový linker v pozici 5' 2'-deoxycytidin 5'-trifosfátu a v pozici 7' 7-deaza-2'-deoxyadenosin-5'-trifosfátu byly připraveny pomocí Sonogashirova cross-couplingu. Deoxynukleosid trifosfáty značené antrachinonem byly inkorporovány do DNA prostřednictvím primer extension experimentu. Elektrochemické vlastnosti antrachinonem značených nukleosidů, nukleotidů a DNA byly studovány pomocí cyklické voltametrie, při které byla pozorována reverzibilní dvojice píků při -0.4 V. Kombinace dvou redukovatelných značek, antrachinonu a nitrofenylu byla testována pomocí voltametrie a poskytla jeden nerozlišený široký signál. Benzofurazan jako nová elektrochemická značka byl připojen k deoxynukleosidům a deoxynukleosid trifosfátům přímo, nebo přes acetylenový linker. Benzofurazanem značené nukleotidy byly inkorporovány do DNA prostřednictvím primer extension experimentu. Elektrochemické vlastnosti nukleosidů, nukleotidů a DNA značených benzofurazanem byly studovány pomocí cyklické voltametrie, která zobrazuje intenzivní katodický signál v oblasti -0.7 a -0.85 V. Kombinací benzofurazanu s nitrofenylem a aminofenylem jsme úspěšně vyvinuli trojpotenciálové kódování DNA bází. Kombinace benzofurazanu s nitrofenylem je vynikající pro poměrové analýzy nukleotidových sekvencí a je vhodná pro bioanalytické aplikace. Redoxní značení DNA azido skupinou, která může být chemicky transformována na nitrofenyltriazol nebo na fenylyltriazol bylo využito pro elektrochemickou detekci interakce DNA-protein (protein p53). Pouze azidofenylové skupiny v úsecích DNA, které nejsou zakryty proteinem p53, byly transformovány na nitrofenyltriazoly.