

RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC

ETAPA II / 2018

Raport cu privire la metodologia de realizare a electrozilor modificați.

Rezumatul etapei

Raportul prezintă stadiul actual al cunoașterii în domeniu pentru tematica abordată – funcționalizarea monostraturilor peptidice autoasamblate pe suprafețe de aur cu elemente de recunoaștere cu masă moleculară mică mai mică 5000 Da și activitățile aferente metodelor specifice de imobilizare controlată a liganzilor pentru detecția analiților cu masă moleculară peste mare 10000 Da. Protocoalele de imobilizare au fost dezvoltate în acord cu tipul de senzor electrochimic : de tip "signal-on"-(SON) - creștere de semnal la legarea analitului și "signal-off"-(SOFF) – scădere de semnal la legarea analitului de suprafața funcționalizată. În etapa precedentă s-au optimizat: metoda de pre-tratare a suprafeței de aur pentru obținerea unui monostrat autoasamblat compact; compoziția stratului autoasamblat mixt peptidă/1,6-hexanditiol/6-mercaptohexanol; protocolul de marcare controlată a moleculelor peptidice din monostrat cu centri redox, methylene blue (MB); compoziția soluției de stocare a electrodului pentru stabilizarea filmului peptidic pe termen lung. În cadrul acestei etape s-au folosit două secvențe peptidice sintetice cu 9 radicali aminoacizi, fiecare având posibilitatea de a fi modificate cu MB la anumite resturi de aminoacizi din catena laterală. În acest mod s-au testat două tipuri de senzori electrochimici SON și SOFF pentru 3 liganzi cu masa moleculară mică: cloramfenicol (CAP), masă moleculară 323 Da; ocratoxina A (OTA), masă moleculară 404 Da și o peptidă denumită generic CJC-1295 (peptidă sintetică de tip agonist al grelinei, care se leagă specific la proteina receptor pentru eliberarea hormonului de creștere, GHSR-1a, cu masa moleculară 3368 Da). Răspunsul senzorului la legarea analiților pentru acești liganzi (anticorp anti-CAP, anticorp anti-OTA, respective receptorul GHSR-1a) a fost monitorizat prin măsurători de voltametrie cu undă pătrată. S-a observat că cele două suporturi peptidice autoasamblate pe suprafața de aur pot fi utilizate pentru o mare varietate de liganzi cu masa moleculară mică în vederea detecției analiților cu masa moleculară mare, în format de interacție de afinitate.

Summary

This report presents the state of knowledge in the field-functionalization of peptide-based self-assembled monolayers with low molecular weight recognition elements (≤ 5000 Da) – and the specific methods for controlled immobilization of these small ligands for the detection of high molecular weight analytes (≥ 10000 Da). The immobilization protocols were developed according to the response of the electrochemical sensor to the analyte binding: signalling-on (SON) and signalling-off (SOFF). The following steps were optimized in the previous stage: the pretreatment procedure of the gold surface in order to obtain a compact self-assembled monolayer; the composition of the mixed peptide/1,6-hexandithiol/6-mercaptohexanol monolayer; the redox-tagging protocol with Methylene Blue (MB); the storage solution of electrodes for long-term stability of the mixed peptide/thiols film. In this stage we employed two synthetic peptides with 9 amino acid residues, each one with functional group able to bind MB. Two types of electrochemical sensors were tested: SON and SOFF for 3 small ligands: chloramphenicol (CAP, M.W. 323 Da), Ochratoxin A (OTA, M.W. 404 Da) and CJC-1295 peptide modified with maleimide (a 3360 Da synthetic peptide, which acts as ghrelin agonist and binds the growth releasing hormone receptor GHSR-1a). The sensors' responses to the binding of the corresponding target analytes (anti-OTA antibody, anti-CAP antibody and GHSR-1a) were monitored through square-wave voltammetry measurements. It was observed that the peptide supports are able to covalently bind various small ligands and can be used further for direct detection of large analytes in affinity assays.

1. Descrierea științifică și tehnică
2. Strategii de funcționalizare pentru suporturile peptidice
3. Etapele de asamblare modulară a senzorilor peptidici E-PB
 - a) Activarea suprafeței de aur
 - b) Depunerea peptidelor suport pe suprafața de aur
 - c) Funcționalizarea peptidelor imobilizate cu Methylene Blue (MB)
 - d) Grefarea liganzilor pe senzorii modificați
 - e) Grefarea Ocratoxinei A pe suporturile peptidice marcate redox
 - f) Imobilizarea moleculelor de cloramfenicol pe suporturile peptidice marcate redox
 - g) Imobilizarea peptidei CJC-1259 pe suporturile peptidice marcate redox
4. Concluzii

În cadrul acestei etape s-a optimizat protocolului de grefare și s-au realizat senzori peptidici marcați redox care prezintă staturi peptidice conductoare la care se pot atașa diferiți liganzi. Prezența moleculelor de ligand la suprafața senzorilor s-a verificat cu ajutorul interacției de afinitate cu receptorul specific, prin măsurători de voltametrie cu undă pătrată. Grefarea cu ajutorul unui linker a conferit flexibilitate probei peptidice. De asemenea s-a verificat stabilitatea stratului funcționalizat peptidic