

## Streszczenie popularnonaukowe

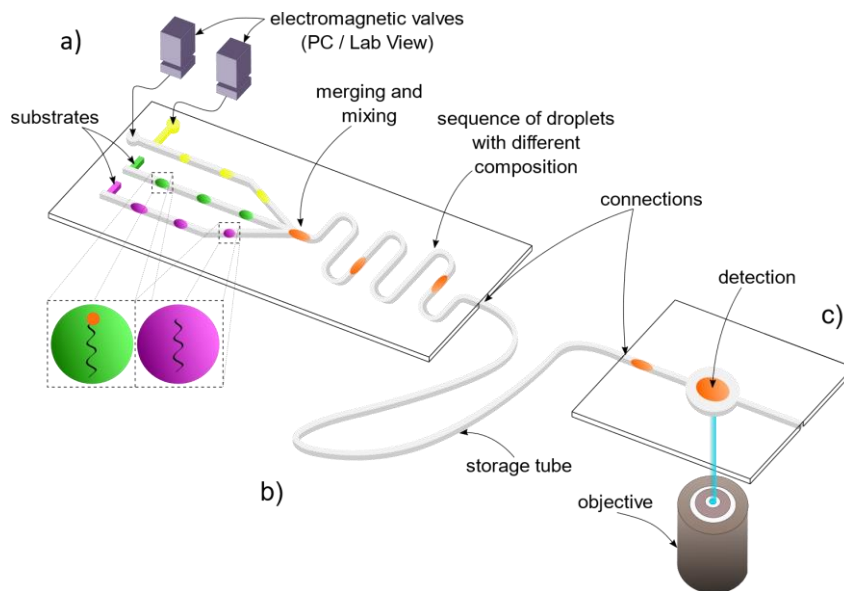
# Wysokoprzepustowy układ mikrofluidyczny do szybkiego wyznaczania stałej równowagi tworzenia kompleksów między biomolekułami: zastosowanie do oddziaływania RNA z DNA

Do kontrolowania procesów biochemicznych w żywych układach konieczne jest zrozumienie reakcji tworzenia niekowalencyjnych kompleksów. Kluczową tego typu reakcją jest hybrydyzacja kwasów nukleinowych, będąca podstawą replikacji oraz transkrypcji informacji genetycznej. Stabilność kompleksu DNA-RNA, a tym samym siłę oddziaływań nici, można określić za pomocą stałej równowagi reakcji ( $K$ ). Taki kompleks formuje się podczas edycji genów w systemie CRISPR/Cas9.

CRISPR/Cas9 jest metodą edycji genów, która wykorzystuje hybrydyzację między pierwszymi dwudziestoma nukleotydami gRNA a modyfikowaną sekwencją DNA. Wcześniejsze badania wykazały, że do hybrydyzacji dochodzi, nawet gdy sekwencje nie są w zupełności komplementarne. Może spowodować to modyfikację niewłaściwego genu podczas zastosowań terapeutycznych. Aby lepiej zrozumieć procesy będące podstawą interakcji gRNA i modyfikowanego DNA, konieczne jest określenie siły oddziaływań tych nici.

Najczęściej stosowaną metodą pomiaru stałej równowagi takich reakcji jest Transfer Energii Rezonansu Förstera (ang. FRET). Natomiast FRET wymaga znakowania dwóch substratów różnymi barwnikami fluorescencyjnymi, by zapewnić transfer energii. Dodatkowo niezbędna jest wysoka jasność początkowa reagentów i precyzyjne dostosowanie odległości między fluoroforami. Niedawno opracowaliśmy nową metodę opartą na analizie jasności molekularnej, która umożliwi wyznaczenie  $K$  w przypadku, gdy tylko jeden z substratów jest fluorescencyjny. Określenie hybrydyzacji w danych warunkach eksperymentalnych pomiędzy DNA i RNA wymaga serii rozcieńczeń o różnym stosunku stężeń nici. W związku z tym mierzy się oddziaływania pomiędzy zaledwie kilkoma proporcjami substratów, aby skrócić czas eksperymentów i zużycie odczynników. Badania na większą skalę są bardziej pracochłonne oraz wymagają większej ilości próbek. Aby rozwiązać ten problem, zamierzamy zminiaturyzować i zautomatyzować proces przygotowywania próbek poprzez zastosowanie układu mikrofluidycznego. Zautomatyzowana metoda pozwoli na szybkie wymieszanie składników i ponad 10 000-krotne skrócenie czasu eksperymentów.

W ramach tego projektu zostanie opracowany wysokowydajny mikroprzepływowy układ do ilościowej charakterystyki reakcji biochemicznych z wykorzystaniem metod fluorescencyjnych. Zamierzamy, aby ta metoda pomiarowa utorowała drogę do ilościowego badania interakcji biomolekuł w żywych systemach i wstępnych badań po syntezie nowych farmaceutyków. Przy wykorzystaniu nowo opracowanego urządzenia określimy stabilności 20-zasadowych kompleksów DNA-RNA z różnie zlokalizowanymi niedopasowaniami w sekwencji zasad. Badania przeprowadzimy w szerokim zakresie sił jonowych, pH i temperatury, by jak najlepiej oddać warunki panujące wewnątrz komórki. Ponadto zostanie określona siła oddziaływań między podwójną nicią DNA a pojedynczą nicią RNA.



Rysunek 1: Schematyczny rysunek zintegrowanego systemu o dużej przepustowości do wyznaczenia stałej równowagi reakcji. System składa się z trzech połączonych ze sobą podsystemów: a) elementu scalającego i mieszającego krople, b) przewodu magazynującego oraz c) układu detekcyjnego.