

Nowe anti-Stokesowskie znaczniki luminescencyjne i wielokolorowy FRET do sekwencjonowania pojedynczych nici DNA (LantaSEQ)

CZECHY: MU	POLSKA: PAS
Assoc. Prof. Hans H. Gorris   Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic	Prof. Artur Bednarkiewicz    Institute of Low Temperature and Structure Research, Polish Academy of Sciences, Wrocław, Poland

Sekwencjonowanie DNA stało się niezbędnym narzędziem w diagnostyce klinicznej i naukach przyrodniczych, na przykład w biotechnologii, badaniach ewolucyjnych czy w profilowaniu genetycznym mikroorganizmów. W przyszłości oczekiwany jest wzrost wpływu spersonalizowanej opieki zdrowotnej, ponieważ podatność na wiele chorób, takich jak choroby nowotworowe, ma związek z czynnikami genetycznymi. Sekwencjonowanie DNA genomu osobistego może też w znaczący sposób poprawić ocenę ryzyka rozwoju chorób. Ponadto, wczesna ocena indywidualnych odpowiedzi na lek może pomóc w uniknięciu niepożądanych reakcji i zoptymalizowaniu terapii. Znajomość sekwencji DNA może być również pomocna w wyborze nowych celów biochemicznych w procesie odkrywania leków. Sekwencjonowanie pojedynczych molekuł DNA jest wysoce pożądane w diagnostyce molekularnej, ponieważ charakteryzuje się (i) uproszczonym przygotowaniem matrycy DNA, (ii) większą przepustowością i szybkością, (iii) dłuższymi odczytami, a tym samym zmniejszeniem kosztów w porównaniu z konwencjonalnymi technikami sekwencjonowania.

Obecne techniki sekwencjonowania pojedynczych molekuł DNA mają jednak kilka wad, które można obejść, wykorzystując unikalne cechy fotofizyczne nowych luminescencyjnych nanomateriałów domieszkowanych lantanowcami (LnNP), które (1) wydajnie emitują światło widzialne pod wpływem wzbudzenia NIR z dużymi przesunięciami antystokesowskimi >300 nm. W takich warunkach żadne inne składniki próbki nie są wzbudzane, a sygnał tła spowodowany autofluorescencją i rozpraszaniem światła jest eliminowany. (2) LnNP są fotostabilne i – w przeciwieństwie do kropek kwantowych – nie wykazują migotania. W konsekwencji takie nowe nanocząstki zapewniają stabilny sygnał donora dla FRET, który jest niezbędny do ciągłego odczytu długich sekwencji DNA. (3) LnNP emitują wiele wąskich pasm emisyjnych pod wpływem wzbudzenia pojedynczą długością fali, tak że pojedyncza nanocząstka luminescencyjna może być użyta jako donor FRET do czterech różnych barwników akceptorowych, które są wymagane do identyfikacji poszczególnych dNTP.

Chociaż są to bardzo obiecujące właściwości, **sekwencjonowanie pojedynczych cząsteczek w oparciu o nanocząstki domieszkowane lantanowcami nie jest zadaniem trywialnym i nigdy wcześniej nie zostało zrealizowane**. W celu uzyskania takiego zastosowania nanocząstek podjęte zostaną następujące zadania:

- optymalizacja **przrządów do odczytu optycznego pod kątem wykrywania pojedynczych LnNP i obrazowania mikroskopowego w szerokim polu**
- zsyntetyzowanie i badania **nowych specjalnie zaprojektowanych LnNP** (poprzez optymalizację architektury domieszkowania i składu rdzeń-powłoka), aby uczynić je jak najjaśniejszymi i jak najbardziej wrażliwymi na cząsteczki akceptorowe.
- zoptymalizowanie **koniugacji powierzchniowej** polimerazy, w celu zminimalizowania odległości między UCNP a polimerazą
- wykorzystanie nowo opracowanych materiałów, przrządów i metod do **sekwencjonowania testowych molekuł DNA**.

W wyniku projektu powstanie funkcjonalny prototyp nowej technologii sekwencjonowania DNA (LantaSEQ).