

Primjena nanotehnologije u istraživanju nukleinskih kiselina

Škugor, Marko

Undergraduate thesis / Završni rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:572400>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Primjena nanotehnologije u istraživanju nukleinskih kiselina

Application of nanotechnology in nucleic acid research

Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Napisao: Marko Škugor

Smjer: Molekularna biologija (Molecular biology)

Mentor: Prof. Dr. Sc. Ivana Weygand-Đurašević

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

UVOD.....	- 1 -
1.0. DNA i RNA.....	- 1 -
1.1. NANOUREĐAJI.....	- 2 -
1.2. NANOARHITEKTURA NUKLEINSKIH KISELINA.....	- 3 -
2.0. ZLATO.....	- 6 -
2.1. ZLATNE NANOČESTICE	- 6 -
2.2. PRIMJENA ZLATNIH NANOČESTICA	- 7 -
3.0. METODE MOLEKULARNE VIZUALIZACIJE	- 9 -
3.1. MIKROSKOPIJA SKENIRAJUĆOM PROBOM, SPM	- 9 -
3.1.1. Mikroskopija tunelirajućim skeniranjem, STM.....	- 10 -
3.1.2. Mikroskopija međuatomskih sila, AFM.....	- 11 -
3.2. OPTIČKA PINCETA.....	- 15 -
4.0. OSTALE METODE ANALIZE NUKLEINSKIH KISELINA.....	- 17 -
4.1. LABORATORIJ-NA-ČIPU	- 17 -
4.2. NANOLITOGRAFIJA "PERO-TINTA".....	- 19 -
4.3. NANOPORE	- 20 -
ZAKLJUČAK	- 22 -
LITERATURA	- 23 -
Sažetak.....	- 25 -
Summary.....	- 25 -

UVOD

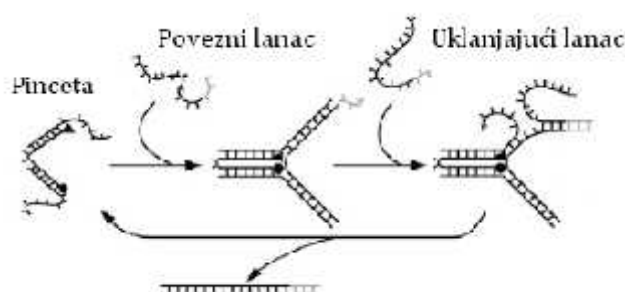
Kako nanotehnologija pronalazi nova svojstva i nove primjene prirodnim i umjetnim molekulskim kompleksima, našla je svoje mjesto u gotovo svim većim granama znanosti i tehnologije i zbog toga je nanotehnologija danas jedna od područja koje najbrže napreduju. Iako je nanotehnologija relativno novo znanje, njeni principi postoje u prirodi od početka kemijske evolucije, od vremena kad su se molekule kao RNA ili lipidi počele same organizirati u komplekse koji su daljnjim usložnjavanjem doveli do stvaranja stanice, osnove živog svijeta. Bionanotehnolozi promatranjem tih molekulskih sustava uče što sve te molekule mogu, te ih pokušavaju upotrijebiti izvan živog sustava u kontroliranom okruženju. Jednostavni primjeri za to su flagele bičaća koje koriste energiju prijenosa protona da obavljaju rad i pokreću stanicu, ili RNA koja ovisno o duljini i sekvenci može izvršavati najrazličitije zadatke. *In vitro*, ti i drugi mehanizmi mogu dobiti funkciju sasvim različitu od one koju imaju u stanici, ili se ti isti mehanizmi mogu oponašati na neki drugi način i sa nekom drugom svrhom. Međutim, od svih molekula, nukleinske su se kiseline pokazale kao model bez premca i mnogo se truda ulaže u potrazi za novim svojstvima i primjenama DNA i RNA.

1.0. DNA i RNA

Nukleinske su kiseline temelj života. Zbog njihove građe i svojstava evoluirale su u upravljački centar svih prokariotskih i eukariotskih stanica i virusa. Samo te dvije molekule, DNA i RNA, omogućile su gotovo beskonačnu bioraznolikost razvijanjem izuzetno složenih staničnih mehanizama kroz evolucijsku povijest. Od otkrivanja strukture DNA 1953.g. do danas mnogo se otkrilo o NA (nucleic acids), o njihovoj ulozi u stanici i o mehanizmima kojima djeluju i ta su saznanja uvelike unaprijedila ljudski život. No bionanotehnologija pomiče granice korisnosti NA, u smislu da se njihova svojstva mogu primijeniti tamo gdje je to prije bilo nezamislivo. Više nisu samo medicina i biologija te koje imaju ili potencijalno mogu imati najviše koristi od njih, već i računalna tehnologija, telekomunikacije, tehnologija materijala, energetika, itd. Tolika širina primjene proizlazi iz jedinstvenog skupa njihovih svojstava, koje znanstvenici koriste u konstrukciji nanouređaja, nanomotora i nanomaterijala.

1.1. NANOUREĐAJI

DNA pinceta primjer je nanouređaja sastavljenog isključivo od DNA. Sastoji se od jednog dužeg i dva kraća lanca koji su komplementarni sa krajevima dužeg, tako da je središnji dio dužeg lanca fleksibilan, a krajevi rigidni (Liedl *i sur.*, 2007.). U normalnom stanju pinceta je ispružena, odnosno otvorena. Krajevi imaju još dodatnu jednolančanu sekvencu na koju se veže komplementarni povezni lanac koji spaja krajeve pincete u zatvorenu strukturu. Drugi lanac na kraju otvori pincetu jer je komplementaran sa poveznim lancem te će ga ukloniti sa pincete (Sl.1.1.). Dodatna izvedba ovog uređaja su DNA škare.

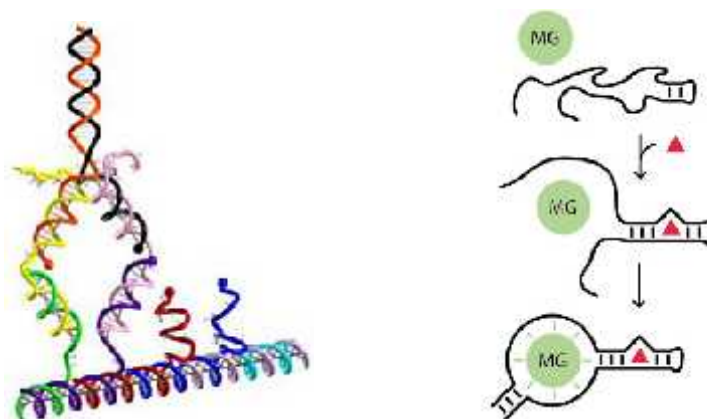


Slika 1.1. Optička se pinceta zatvara i otvara pomoću povezni (prvi korak) i uklanjajući (drugi korak) lanca. Povezni i uklanjajući lanci su komplementarni lanci i nakon opuštanja pincete izlaze iz sustava.
Preuzeto i prilagođeno iz Liedl *i sur.* 2007.

Drugi uređaj, ponešto drugačiji od pincete je DNA hodač. Na dvolančanu se DNA vežu različiti jednolančani oligonukleotidi tako da okomito strše iz nje i da su jednoliko raspoređeni po DNA, a opet dovoljno blizu. Hodač je kratki DNA lanac koji je dvolančan na jednom kraju, a na drugom kraju dva su lanca nekomplementarna jedan s drugim i ostaju jednolančana (Sl.1.2.). Povezni lanci povezuju te lance sa lancima na dsDNA, a uklanjajući lanci ih miču, prema istom principu kao i kod pincete. Jedan je kraj poveznog lanca uvijek komplementaran sa jednim od dva lanca na hodaču, dok je drugi kraj komplementaran sa jednim oligonukleotidom na dsDNA (Liedl *i sur.*, 2007.). Biranjem poveznog lanca možemo usmjeravati hodača po dsDNA, a sam se pomak dogodi zbog Brown-ovog gibanja.

Ta se dva mehanizma nazivaju nanouređajima jer mogu vršiti rad ili neku specifičnu funkciju. Postoje DNA (i RNA) koje se koriste i kao nanosenzori. Takve DNA imaju aptamer sekvence na koje se mogu vezati određene signalne čestice, ovisno o konformaciji koju

aptamer poprima (Liedl *i sur.*, 2007.). Da bi aptamer postigao specifičnu konformaciju potrebnu za vezanje signalnih čestica, nužna je prisutnost nekog DNA-vezujućeg proteina (Sl.1.2.) ili komplementarne DNA koji utječu na tu konformaciju i čija se prisutnost na taj način detektira.



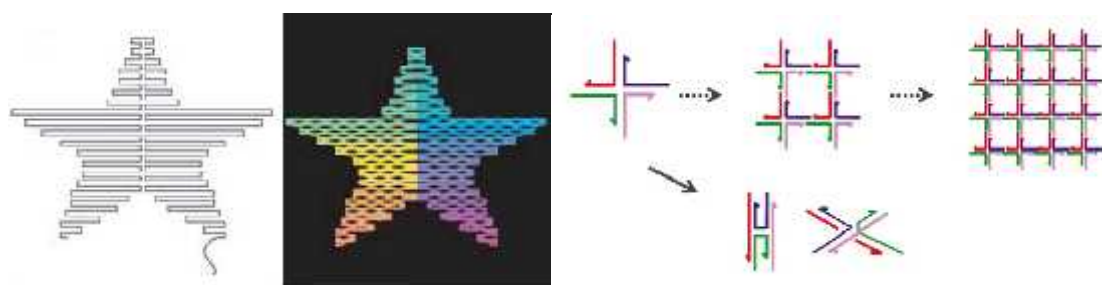
Slika 1.2. Lijevo: "DNA hodač" je nanouređaj koji se sastoji isključivo od DNA. "Hodanje" funkcionira tako da se oligonukleotid veže na stršeće lance. Desno: MGA ili Malachite Green Aptamer je reporterski sustav za detekciju. Samo se u prisustvu određene tvari MG može vezati na RNA što rezultira fluorescencijom.

Preuzeto sa www.acm.caltech.edu, i Liedl *i sur.* 2007.

1.2. NANOARHITEKTURA NUKLEINSKIH KISELINA

DNA je donedavno bila glavni materijal u nanokonstrukciji NA, no u zadnje se vrijeme i RNA koristi u nanotehnologiji, naročito u dizajniranju nanomaterijala. Modificiranjem oblika i veličine molekula NA i kombiniranjem DNA i RNA različitih duljina, moguće je postići potpunu kontrolu nad arhitekturom tih materijala. Takvi materijali mogu imati iznimnu strukturnu složenost, a samim time i iznimna svojstva. Nukleinske kiseline, kao i proteini, imaju primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternu strukturu. Primarna struktura definirana je njihovim komplementarnim spajanjem parova baza i stabiliziranjem molekule hidrofobnim slaganjem dušičnih baza. Interne petlje i ukosnice primjer su sekundarne strukture. Tercijarna struktura je trodimenzionalni izgled cijele molekule, a slaganje više molekula u jedan kompaktni supramolekulski kompleks obilježje je kvaterne strukture. Takav hijerarhijski sustav arhitekture NA vrlo je važan jer se izgled nanokonstrukta NA mora predvidjeti unaprijed i prema tome prilagoditi veličine, slijedove i broj različitih lanaca DNA i/ili RNA. Osnovni molekularni izgled nanomaterijala postiže se intramolekulskim tercijarnim strukturama i supramolekulskim spajanjem lanaca sekundarnim strukturama kao što su Hollidayeva veza, trolančana struktura, H-DNA, G-kvartet, neuobičajeno sparivanje baza ili

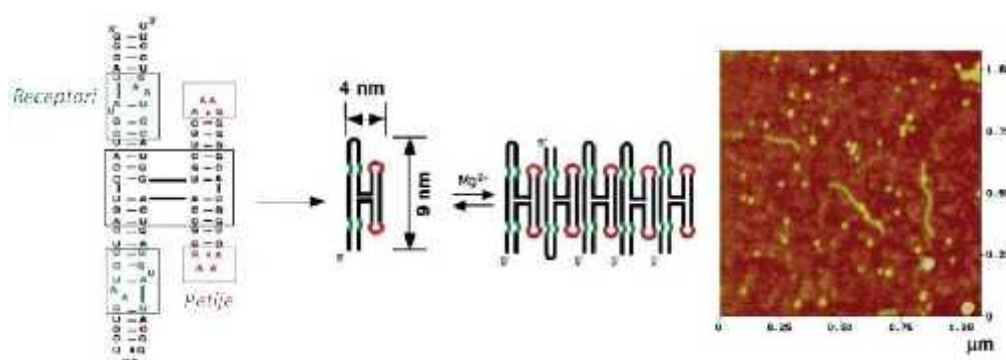
jednostavnim komplementarnim sparivanjem lanaca. I DNA i RNA imaju svoju specifičnu ulogu u nanomaterijalima. DNA je čvrsta i stabilna dvolančana molekula, ali u principu ne stvara tercijarne strukture. Zato se lanci najčešće povezuju Hollidayevim vezama pomoću komplementarnih oligonukleotida (Sl.1.3.). Konstruiranjem dvolančanih i jednolančanih dijelova možemo odrediti čvršće ili fleksibilnije dijelove jedne molekule DNA. Nanokonstrukti DNA temelje se na komplementarnosti baza i višestrukim specifičnim povezivanjem lanaca što dovodi do materijala proizvoljnih oblika, veličina i namjena. Zanimljiv primjer nanoarhitekture DNA je DNA origami što predstavlja takvu strukturu kompleksa DNA koja nalikuje na neki geometrijski oblik (Sl.1.3.) ili oblik neke životinje i sl. RNA je nestabilnija u odnosu na DNA jer se najčešće javlja kao jedan lanac. Međutim, RNA je sposobna stvarati tercijarne strukture koje mogu biti vrlo stabilne, ali i koje se javljaju u širem rasponu oblika. Takve se RNA nazivaju tektRNA, što znači da se zasebne jedinice kompleksa RNA mogu organizirati u novu strukturu bilo kojeg oblika ili veličine iz koje mozaičnim modeliranjem možemo dobiti osnovne elemente željenog nanomaterijala. Važno je naglasiti da se tektRNA, ili bilo koji drugi element nanoarhitekture NA sam smata i organizira u konformaciju s najmanje energije što je ključno za slaganje podjedinica tih elemenata, ali i većih agregata u proizvoljne oblike i strukture.



Slika 1.3. Lijevo: DNA origami. Oblik zvijezde je postignut unaprijed određenim komplementarnim vezama unutar jednog lanca DNA. Desno: Pomoću Hollidayeve se strukture slažu osnovni oblici koji daljnjim hijerarhijskim spajanjem polimeriziraju u dvodimenzionalne ili trodimenzionalne mreže. Preuzeto sa www.chm.bris.ac.uk, i La Bean *i sur.* 2007.

Danas je moguće pomoću grafičkog računalnog modeliranja predvidjeti izgled molekule DNA ili RNA, prema tome odrediti sekvencu i dizajnirati izgled molekule kakav želimo. Iako je to za molekulu RNA malo teže, pomoću NMR-a ili X-zraka možemo analizirati i modelirati trodimenzionalnu strukturu jednog lanca RNA, dok je molekulu DNA mnogo lakše dizajnirati

jer se njen izgled temelji na jednostavnijim strukturalnim motivima, kao što je Hollidayeva veza. Na taj se način dizajniraju supramolekularni građevni elementi geometrijskih oblika kao što su romb, trokut, zatim DX (dvostruki cross-over) strukture, svežnjevi od 3-16 i više dvostrukih lanaca, H-tektoRNA čestice koje tvore filamente, tektokvadrati, tektokvadrati tRNA, ili složenije strukture sa visećim elementima za hijerarhijsko povezivanje. Tektonika RNA poseban je pristup dizajniranju tektoRNA struktura koji se sastoji od nekoliko koraka (Sl.1.4.). Prvo se iz neke RNA strukture koje možemo naći unutar prokariotske ili eukariotske stanice kopiraju strukturalni motivi koji su zaslužni za tercijarnu strukturu te RNA. Nakon toga se računalnim modeliranjem ti elementi reorganiziraju tako da precizno odredimo položaj i orijentaciju njihovih međusobnih interakcija. Optimizacija tog procesa se odnosi na maksimiziranje stabilnosti interakcija i na što manjem broju potencijalnih alternativnih struktura koje bi ti elementi mogli postići, te određivanju konsenzus sekvenci koje vode proces smatanja RNA, odnosno onih sekvenci koje određuju samu strukturu. Na kraju, ovisno o geometriji zadanih elemenata, tektoRNA poprima novu supramolekularnu arhitekturu (Jaeger & Chworos, 2006.).



Slika 1.4. Osnovni princip konstruiranja tektoRNA. Sekundarna struktura tektoRNA sadrži receptore i petlje čijim spajanjem nastaje vlakno koje se vidi na slici desno snimljenom sa AFM.
Preuzeto iz Hansma *i sur.* 2003.

Dodatnu primjenu NA-nanomaterijalima daju ornamenti. Dvodimenzionalne nanostrukture mogu imati unaprijed definirana mjesta za ornamentaciju, što znači da se bi se na njihovoj površini mogao precizno odrediti raspored određenih proteina, metalnih nanočestica, specifičnih antitijela ili nekakvih nanouređaja. Nanoarhitektura DNA i RNA ima još jedan zapanjujuć potencijal, a to je da je moguće konstruirati fraktalne geometrijske oblike koristeći se samo sa DNA ili RNA. Fraktali su dvodimenzionalni ili trodimenzionalni geometrijski

oblici koji nadograđivanjem pojedinačnih dijelova određene geometrije daju oblik jednak obliku samih dijelova, što omogućuje daljnje nadograđivanje do razine koje želimo. Sierpinski-jev trokut (Sl.1.5.) primjer je fraktala kojeg je moguće konstruirati s tri dvolančana oligonukleotida DNA koji se povezuju u trokut (Jaeger & Chworos, 2006.). Povezivanjem vrhova tri trokuta u dvije dimenzije dobijemo novi trokut, te takva tri mogu tvoriti novi trokut, i tako unedogled...



Slika 1.5. Sierpinski-jev trokut. Ako zamislimo da se svaki crni trokut sastoji od tri oligonukleotida, i da se ti trokuti mogu međusobno povezivati, onda možemo vidjeti da se takva struktura može graditi u beskonačnost.
Preuzeto sa www.stcsig.org.

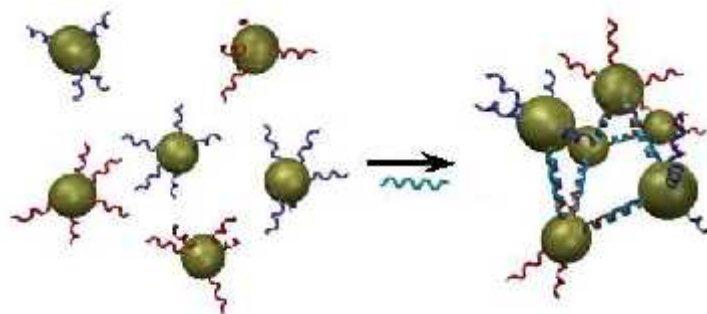
2.0. ZLATO

Zahvaljujući nanotehnologiji, zlato više nije privlačno i vrijedno samo zbog svojeg sjaja, nego i zbog svoje iznimne primjenjivosti u nanosvijetu. Zlato je stabilno, inertno i netoksično što ga čini biokompatibilnim u smislu da ne izaziva neželjene nuspojave unutar *in vivo* sustava. Iako je kemijski inertno, zlato može stvoriti polukovalentnu vezu sa sumporom. Ta zlato-tiolna veza temelj je za konjugirane sustave NA i zlatnih čestica o čemu će biti riječi u kasnijem dijelu poglavlja.

2.1. ZLATNE NANOČESTICE

Za sintezu Au-alkentiol nanočestica koristi se metoda Brust *et al* (Springer, 2004.). Tom se metodom mogu proizvesti čestice velike 2-5 nm koje su stabilne kroz duži vremenski period. Metoda Brust *et al.* je metoda dvofazne redukcije, što znači da se čestice zlata prenose iz vodene otopine u organsku fazu, te se reduciraju iz Au(III) u Au(0). Ključni sastojci postupka su HAuCl_4 , što služi kao izvor zlata, zatim DDT, što je zapravo alkentiol na kojeg se vežu zlatne čestice, TOAB, koji služi za promjenu faza, i NaBH_4 , reducirajući agens. Prednost ove

metode je da su čestice zlata individualno konjugirane, odnosno gotovo da nema dvostrukih čestica u završnom uzorku. Alkentioli se mogu funkcionalizirati na suprotnom kraju od tiolne skupine pomoću neke kemijske modifikacije, no nukleinske kiseline imaju određene prednosti



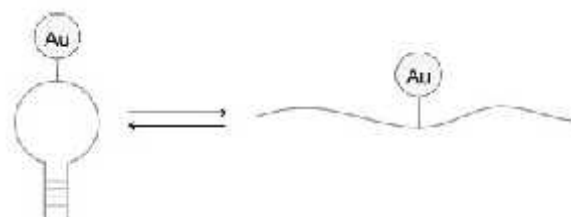
Slika 2.1. Samoorganizacija mreže Au-DNA. Dva se tipa zlatnih nanočestica funkcionaliziranim s DNA povezuju pomoću naknadno dodane komplementarne DNA u trodimenzionalnu mrežu. Preuzeto sa web-barret-group.mcgill.ca.

za vezanje na AuNP (zlatne nanočestice). Dodavanjem različitih komplementarnih oligonukleotida koji bi se vezali na čestice zlata, oni hibridiziraju i stvaraju mrežu nanočestica (Sl.2.1.). Pažljivim odabirom veličine i sekvence oligonukleotida, možemo unaprijed odrediti dvodimenzionalni ili trodimenzionalni izgled jedne takve mreže. Sumpor se na DNA veže umjesto kisika na fosfatnim skupinama, tako da se čestici zlata može odrediti na koji ju položaj na oligonukleotidu želimo smjestiti (Mirkin *i sur.*, 1996.). Praktičnih primjena Au-DNA nanočestica ima nekoliko. Hibridizacijom višestrukih lanaca sa vezanim nanočesticama možemo dobiti dvodimenzionalnu mrežu sa nanočesticama poredanim u nizove ili u karakteristične uzorke, zatim proizvodnja SAM, elektronička kontrola hibridizacije, itd.

2.2. PRIMJENA ZLATNIH NANOČESTICA

SAM (self-assembled monolayer, samoorganizirajući jednosloj) je, kako samo ime kaže, sloj molekula koje se same organiziraju na površini određenog supstrata. Osnovni supstrat za vezanje molekula najčešće je zlato, ali mogu biti i drugi metali ili nabijene molekule. Na supstrat se mogu vezati alkentioli ili DNA (Boeckl & Graham, 2006.). Vezanje DNA omogućuje vezanje neke nove molekule ili nanočestice funkcionalizirane sa komplementarnom DNA što daje SAM-u svojstva koje želimo: električnu provodljivost, osjetljivost na prisutnost određenih tvari, karakteristična optička svojstva i sl.

Svojstvo zlata da provodi toplinu počelo se primjenjivati na elektroničku kontrolu hibridizacije DNA. Takav je pristup prije bio nezamisliv jer se nije mogao pronaći način povezivanja elektroničkog sučelja i biološkog sustava. No, to se postiglo sa AuNP i induktivnim grijanjem. Ako uzmemo kratki oligonukleotid komplementaran samom sebi na način da stvara ukosnicu na čijem se vrhu nalazi vezana čestica zlata, i takvu AuNP podvrgnemo alternirajućem magnetskom polju što zagrijava česticu zlata, onda to zlato provodi toplinu po oligonukleotidu (Hamad-Schifferli, 2004.). Dovoljna količina topline uzrokovat će denaturaciju ukosnice u linearnu molekulu (Sl.2.2.). Gašenjem vanjskog magnetskog polja, toplina se raspršuje i molekula ponovno poprima konformaciju s najmanje energije, ukosnicu. Budući da je AuNP vrlo mala, prijenos topline ostaje lokaliziran, tako da ne utječe na okolne molekule. Ovaj se princip može primijeniti i na proteine koji se također denaturiraju toplinom i na taj način gasu svoju funkciju. Ova je metoda kontrole aktivnosti



Slika 2.2. Prikaz oligonukleotida sa česticom zlata na vrhu. Zlato služi za proizvodnju i provodnju topline da bi se oligonukleotid denaturirao.
Preuzeto iz Hamad-Schifferli 2004.

NA i proteina vrlo obećavajuća što se tiče uporabe *in vivo*. Umjesto zlata, mogu se koristiti i drugi metali ili čak organske nanočestice, tako da su takve NP primijenjive i u citoplazmi stanice ili mogu biti ugradive u membrane. Ekscitacija vanjskim magnetskim poljem ne zahtijeva velike valne duljine zračenja za AuNP, pa može slobodno prolaziti kroz tkiva do svojeg odredišta. I na kraju, AuNP su vrlo stabilne tako da mogu trajati kroz duži vremenski period unutar živog sustava.

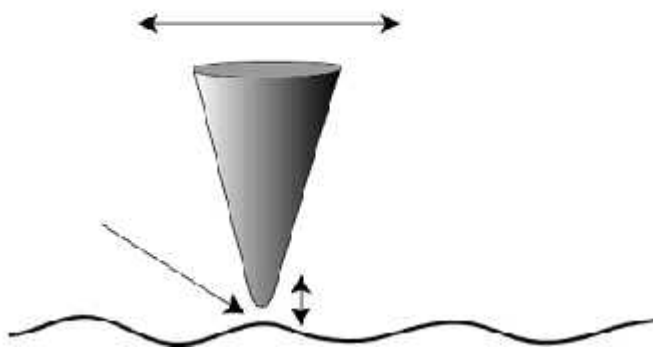
3.0. METODE MOLEKULARNE VIZUALIZACIJE

Zaccharias Janssen, Anthony Leeuwenhoek i Robert Hooke, kao tri čovjeka koji se smatraju očevima mikroskopije u 17. stoljeću, sigurno nisu ni slutili koliko će se jedna od osnovnih metoda biologije, metoda mikroskopije, razviti do početka 21. stoljeća. Samo svjetlosna mikroskopija ima mnoštvo primjena, uzmimo za primjer fluorescenciju, koja omogućuje da se organeli i stanične strukture selektivno obilježavaju fluorescencijskim bojama, koje nakon pobude svjetlom određene valne duljine fluoresciraju na određen način, tj. određenom bojom, dajući sliku organela ili strukture koju smo obojali. Problem koji se javlja kod svjetlosne mikroskopije je prevelika valna duljina svjetla kojim skeniramo određenu mikroskopsku površinu. Neke suborganelne strukture, supramolekulski sustavi i makromolekule manji su od valne duljine vidljivog svjetla te su zbog toga "nevidljivi" gledani kroz objektiv svjetlosnog mikroskopa. Taj je problem riješila elektronska mikroskopija koja umjesto fotona koristi elektrone puno manje valne duljine, što je drastično pomaknulo granicu vidljivog, s mikro razine na nano. Međutim, zadnjih par desetaka godina javile su se neke metode mikroskopiranja koje koriste potpuno drukčija načela za vizualizaciju od klasičnih svjetlosnih i elektronskih mikroskopa, metode koje nisu ograničene valnom duljinom za dobivanje što oštrije razlučivosti, i koje se, iznenađujuće, mogu koristiti u neke svrhe sasvim različite od mikroskopiranja. Radi se o mikroskopima nove generacije, o metodama vizualizacije koje spremno zadiru u svijet molekula, od kojih su nama najzanimljivije nukleinske kiseline.

3.1. MIKROSKOPIJA SKENIRAJUĆOM PROBOM, SPM

Mikroskopija skenirajućom probom (Scanning Probe Microscopy, SPM) zapravo je mikroskopski princip kojeg je ključni dio fizička proba koja skenira površinu uzorka i na taj način formira sliku. Interakcija površine i probe zabilježena je za svaku točku na površini uzorka, i ovisno o tome formira se vjeran mozaik koji čini sliku. Razlučivost u SPM ne ovisi o valnoj duljini nekog zračenja, već o probi i o njenom precizno kontroliranom pokretanju (Sl.3.1.). SPM metode imaju nanometarsku razlučivost, čak do 0,1 nm, a mogu dati i trodimenzionalne slike uzorka. Proba je "cantilever", ili greda, što znači da je učvršćena na jednom kraju, a slobodna na drugom. Ona skenira u rasteru, liniju po liniju, a njen slobodni kraj prilagođen je za skeniranje ovisno o kojem tipu mikroskopiranja se radi. Postoji mnogo

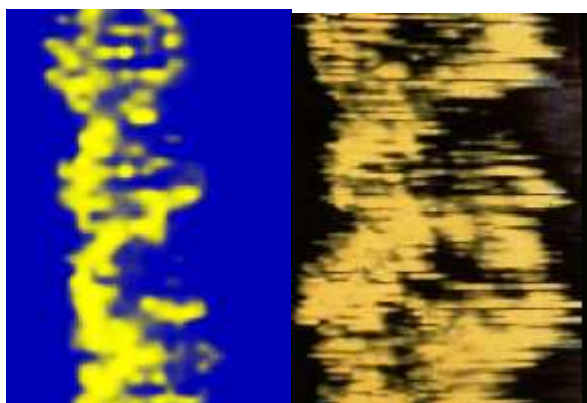
izvedbi SPM koje se uglavnom razlikuju u tipu interakcije probe sa uzorkom, no najviše se koriste Mikroskopija međuatomskih sila (Atomic Force Microscopy, AFM) i Mikroskopija skenirajućim tuneliranjem (Scanning Tunneling Microscopy, STM).



Slika 3.1. Osnovno načelo rada SPM uređaja. Vrh probe mjeri određeno svojstvo površine uzorka, proba se skenira u odnosu na uzorak i povratni mehanizam održava probu na određenoj visini od površine uzorka.
Preuzeto sa www.nanoscience.com.

3.1.1. Mikroskopija tunelirajućim skeniranjem, STM

Tunelirajući mikroskop iz 1981.g. je prvi napravljeni mikroskop koji koristi SPM tehnologiju. STM, kako samo ime kaže, radi na principu kvantnog tuneliranja. Tuneliranje je kvantno svojstvo fundamentalnih čestica koje imaju čestična i valna svojstva. Valna svojstva elektrona omogućuju im da probijaju neprovodljivu barijeru postavljenu između dva provodljiva medija, udaljenima ne više od 10 nm. Dakle, ako primjenimo određenu razliku potencijala na dva metala i razdvojimo ih vakuumom na udaljenosti manjoj od 10 nm, elektroni će strujiti kroz vakuum. Proba STM prilagođena je za tuneliranje i postavlja se na udaljenosti 0,3-1 nm od uzorka. Očiti nedostatak STM je da, ako želimo da dođe do efekta tuneliranja, uzorak mora biti provodljiv. STM može raditi na dva načina: s konstantnom visinom probe, ili sa stalnom strujom tuneliranja. Ako radimo sa konstantnom visinom, proba je učvršćena i mjeri se promjena struje tuneliranja dok proba skenira po uzorku. Ako smo odredili da je struja stalna, to znači da se visina probe mora povratnim mehanizmom stalno prilagođavati u odnosu na uzorak, jer je tuneliranje izraženije ako su proba i uzorak bliže (Springer, 2004.). Posljednjih godina STM je također korišten kao alat za precizno i selektivno pucanje i stvaranje kemijskih veza, i zbog toga svega je STM jedna od moćnijih nanotehnoloških metoda današnjice.



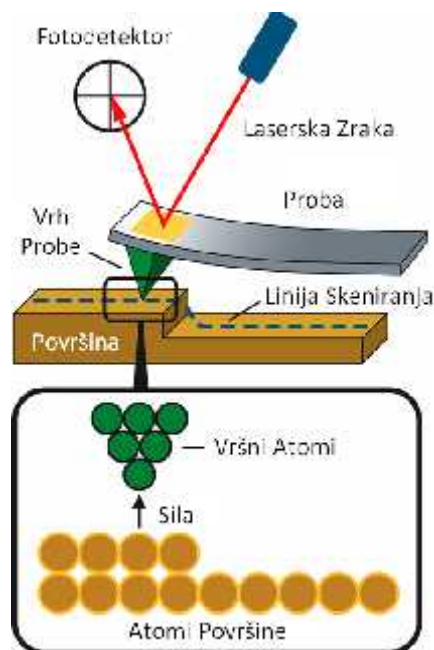
Slika 3.2. Dvije slike DNA snimljene sa STM. Na njima se mogu vidjeti desni zavoji, dušične baze i šećerna okosnica. Razlučivost ovih slika manja je od 1 nm. Preuzeto sa bio.gsi.de, i www.nanopicoftoday.org.

STM se pokazao kao vrlo korisna metoda u proučavanju nukleinskih kiselina. Prve SPM slike DNA dobivene su 1984. g. i pokazuju imobiliziranu DNA na slikonskom čipu slikanu sa STM. Jedan od najimpresivnijih uspjeha STM su slike DNA i RNA iznimne oštine na kojima se vrlo jasno vide desni zavoji, mali i veliki utori (Sl.3.2.), i na kojima se također mogu vidjeti i sekundarne strukture kao što su petlje, ukosnice ili čak vezna mjesta za određene proteine (Keller *i sur.*, 1989.). Tanaka *i sur.* razvili su metodu elektroničkog sekvenciranja DNA, što se pokazalo vrlo uspješnim, budući da se sa STM za analizu može odabrati točan položaj na molekuli. Vizualizacijom su uspjeli identificirati samo gvanine, ali predložili su da se elektroničkom tunelirajućom spektroskopijom mogu identificirati sve baze, čak i da bi se mogli identificirati i locirati mononukleotidni polimorfizmi duž molekule DNA.

3.1.2. Mikroskopija međuatomskih sila, AFM

Mikroskopija međuatomskih sila (Atomic Force Microscopy, AFM) se u mnogočemu razlikuje od STM. Iako je osnovni SPM princip isti, AFM koristi probu za mjerenje sile koja se javlja između atoma površine probe i uzorka. Veličina izmjerene sile daje informaciju o udaljenosti probe i uzorka, i to kroz jedan od tri različita načina rada AFM: statični, dinamični i tapkajući AFM. Statični AFM se još naziva kontaktni jer je proba u stalnom dodiru sa uzorkom. Zbog toga se javljaju slabe odbijajuće sile preklapanjem elektronskih orbitala između površinskih atoma probe i uzorka. Dinamični, ili vibracijski, AFM daje gradijent sile jer proba nije u kontaktu sa podlogom već vibrira s modulirajućom frekvencijom ili

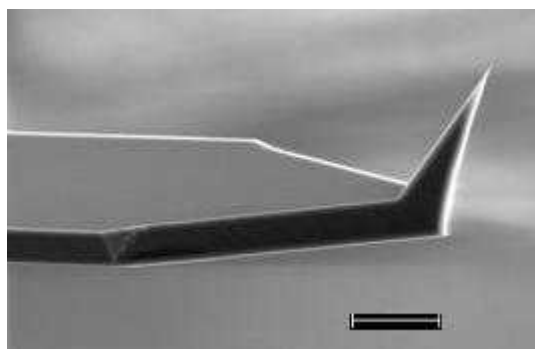
amplitudom. Slabe privlačne van der Waalsove sile utječu na rezonantnu frekvenciju vibracije i ta se promjena mjeri. Dinamični AFM je prilično složen i rijetko se koristi. Posljednji konstruirani AFM modus operandi je tzv. tapkajući AFM, koji je specifičan po tome što proba vibrira stalnom amplitudom i određenom frekvencijom, koja se mjeri i prema kojoj se



Slika 3.3. Princip rada AFM. Ovisno o jakosti interakcije atoma površine i vrha probe, laserska će zraka biti deflektirana od probe u detektor pod određenim kutem. Preuzeto sa nano.tm.agilent.com.

povratnim mehanizmom održava vibracija probe. Vibriranjem proba lagano lupka, ili tapka, po površini uzorka i ovisno o pomaku probe u trenutku udara kreira se slika površine uzorka. Ovaj je način rada AFM povoljan za topografska mjerenja jer se tako smanjuje trenje uzrokovano pomicanjem probe po površini uzorka. Ono što se mjeri u AFM je deflekcija probe, odnosno koliko se proba pomakla iz svog ravnotežnog ili očekivanog položaja i to se može mjeriti na različite načine, bilo tunelirajućim vrhom iznad probe koji je prvi primijenjen za te svrhe, optičkom interferometrijom, ili mjerenjem deflekcije laserske zrake usmjerene prema probi koja ju reflektira u detektor što se danas najviše upotrebljava jer može mjeriti i promjenu kuta, odnosno silu trenja, a i neovisno je o daljini između mjernog uređaja i probe (Sl.3.3.) (Springer, 2004.). Mediji u kojima se mogu obavljati AFM mjerenja su uglavnom zrak, vakuum ili neka tekućina, ovisno o uzorku. Velika prednost AFM, pa i STM, je ta što su to direktne metode koje ne zahtijevaju složenu preparaciju uzorka, već mogu analizirati

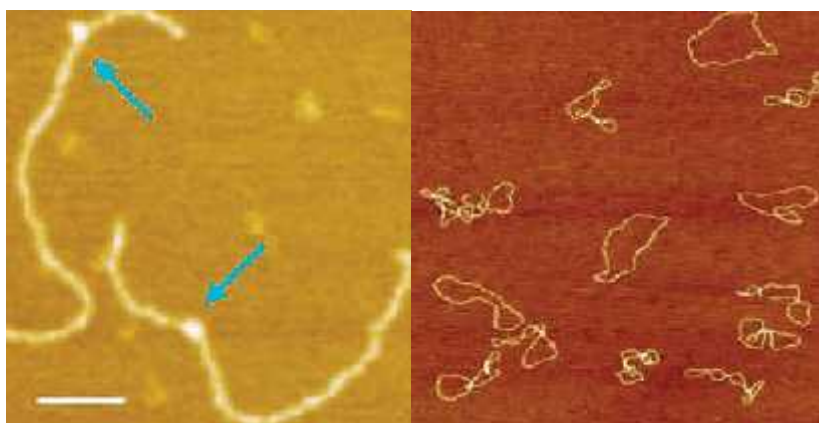
uzorak kakav jest. Izvedenica AFM je Mikroskop sile trenja (Friction Force Microscope, FFM), koji je pak usmjeren na mjerenje sile trenja koja se javlja na kontaktu između probe i uzorka. Jedna od zanimljivih dodatnih mogućnosti AFM je da se može koristiti u nanolitografiji kao precizno oksidacijsko sredstvo zajedno sa drugim metodama u konstrukciji nanostruktura (Springer 2004.).



Slika 3.4. Mikroskopska slika AFM probe. Ona je na jednom kraju pričvršćena, a na drugom se nalazi vrh za skeniranje. Skala je 10 μm .
Preuzeto sa www.nanoandmore.com.

Od 1992. AFM se intenzivno koristi u proučavanju nukleinskih kiselina, iako malo više DNA nego RNA. Lyubchenko *i sur.* pomoću AFM su proučavali utjecaj ionske jakosti na plektonemsko superzavijanje DNA i na geometriju superzavoja. Tako su mogli proučavati točno određene dodirne regije DNA-DNA i kako se mijenjaju vremenom analizom uzastopnih slika dobivenih u razmaku od jedne minute. Hansma *i sur.* (1995.) su pokretanje DNA snimali u vremenskim intervalima od 20 sekundi, proučavali su utjecaj različitih tekućih medija (voda, propanol) na skeniranje DNA, i dobili su slike DNA u propanolu na kojima se jasno vide desni zavoji. Landousy *i sur.* su proučavali interakcije DNA i proteina sa AFM. Mjerili su promjene oblika i kuta molekule sa vezanim proteinom, uvodeći jednolančane lomove dobili su slike vezane glikozilaze hOGG1 uključene u popravak DNA točno na mjestima sa lomovima (Sl.3.5.), proučavali su dinamiku interakcija DNA i proteina vezanih na DNA i koji se kreću duž molekule DNA, kao što su fotolijaza, RNA polimeraza, p53 i Dnaza I snimajući svakih 100-300 sekundi. Zanimljivo je da se analizom slika RNA dobivenih s AFM razvijaju novi algoritmi koji predviđaju sekundarnu strukturu molekule RNA na temelju primarne strukture (Khan, 2005.), za razliku od prijašnjih algoritama koji su takva predviđanja temeljili pretežito na mjerenju slobodne energije. Hansma *i sur.* (2003.) su iskoristili AFM za

promatranje petlji RNA koje se dotiču i procjenu makromolekularnih volumena na temelju nekih aproksimacija, ali s dovoljnom preciznošću. Također su analizirali vlakna tektoRNA dobivenih polimerizacijom pojedinih receptor-petlja tektoRNA i utjecaj orijentacije spajanja; povezivanje glava-rep rezultiralo je daljnjim produljenjem lanca, dok je spajanje glava-glava uglavnom završavalo terminacijom vlakna ili bi se u slučaju produljenja lanca na tom mjestu stvorio kut od 45°.

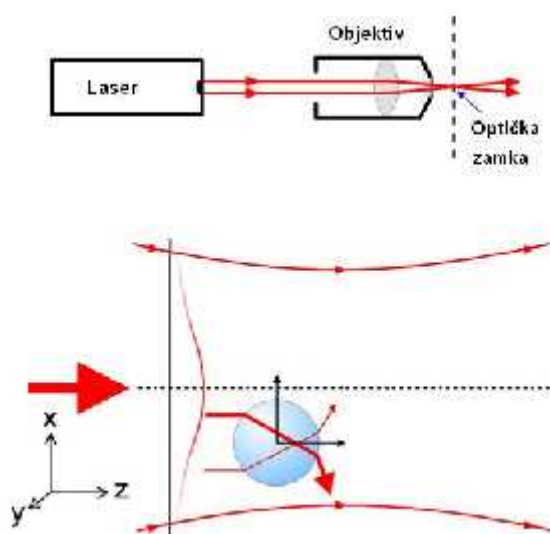


Slika 3.5. Lijevo: hOGG1 glikozilaza. Strelice pokazuju na svjetle točke koje predstavljaju vezanu glikozilazu. Skala je 50 nm. Desno: plazmid pTZ18R. Ovi plazmidi su imobilizirani i vizualizirani na zraku. Preuzeto iz Landousy i sur. 2006.

Kao i sve druge metode, SPM metode imaju svoje prednosti i nedostatke. AFM i STM u odnosu na elektronsku mikroskopiju imaju nekoliko značajnih prednosti. Prva od tih je mogućnost stvaranja trodimenzionalnih slika uzoraka, što SEM ne može. Zatim, AFM i STM ne zahtijevaju predtretman uzorka, kao što je bojanje srebrom ili oblikovanje uzorka kod elektronske mikroskopije što ireverzibilno oštećuje uzorak. Skenirajući i transmisijski elektronski mikroskop zahtijevaju vakuum koji se postiže sa skupom opremom, dok AFM i STM funkcioniraju čak na atmosferskom zraku. Transmisijski elektronski mikroskop je postigao maksimalnu razlučivost od 0,05 nm, dok AFM postiže razlučivost od 0,1 nm kao prilično standardnu veličinu, ali je sveukupna cijena AFM uređaja puno manja od one koju ima TEM. Još jedna od prednosti je što uzorka ne mora biti puno za AFM i STM analizu, nanogramske količine sasvim su dovoljne. Iako su odabir tipa probe i medija, te imobilizacija uzorka vrlo važni za AFM i STM, i sami instrumenti su prilično osjetljivi, to su metode koje se još razvijaju i kojima se još mogu pronaći razne korisne primjene od obične vizualizacije.

3.2. OPTIČKA PINCETA

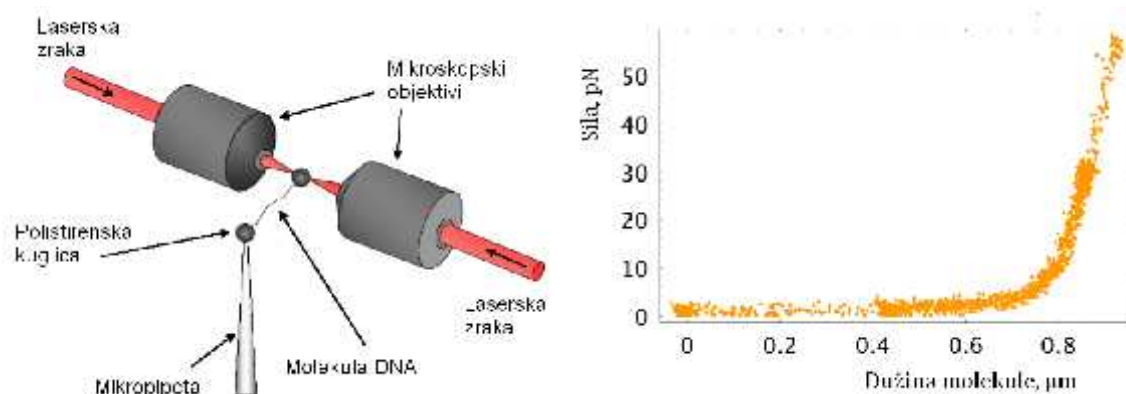
AFM i STM su neposredne, direktne metode vizualizacije. Postoji još jedna, indirektnija, metoda koja se sve više koristi u svijetu bionanotehnologije, a to je optička pinceta. Koncept "optical tweezing" u početku je zamišljen kao trodimenzionalna zamka za pojedinačne atome. U osamdesetim godinama 20. stoljeća taj je princip primijenjen i na neke biološke sustave. Tako su uspjeli zarobiti pojedinačne TMV i *E. coli*. Kao i AFM, optička pinceta mjeri silu, no u odnosu na AFM, optička je pinceta mnogo osjetljivija i može detektirati silu reda 0,1-10 pN, dok AFM detektira između 100 i 1 000 pN. Optička pinceta koristi usko usmjerene laserske



Slika 3.6. Optička se pinceta sastoji od dvostruke laserske zrake koje pomoću mikroskopskog objektiva čine usko grlo. Unutar tog uskog dijela javlja se gradijent jakosti laserske zrake koja je najjača u sredini i koja slabi prema rubu i koja zbog difrakcije unutar kuglice mijenja moment. Jači će vektor jače utjecati na zarobljenu kuglicu i tako uzrokovati pomak kuglice od središta, dok kuglicu drži električno polje koje stvara laserska zraka. Preuzeto sa ffn.ub.es.

zrake koje na najužem dijelu stvaraju gradijent električnog polja što zadržava dielektrične čestice u središtu laserske zrake. No, laserska zraka utječe ne samo električno na česticu, već i mehanički, tako da je čestica pomaknuta od najužeg središta zbog sile kojom laser djeluje na nju (Sl.3.6.). Za to postoje dva objašnjenja, ovisno o odnosu veličine valne duljine lasera i čestice. Ako je čestica veća, onda se primjenjuje optičko objašnjenje koje kaže da svjetlo ima moment koji se mijenja promjenom smjera uzrokovanom difrakcijom unutar zarobljene čestice. Kada se taj moment promjeni, zbog trećeg Newtonovog zakona, ista se promjena momenta sile treba dogoditi i čestici, samo u suprotnom smjeru, i zato se događa pomak. Ako

je čestica manja od valne duljine laserske zrake, onda se čestica tretira kao točkasti dipol i na nju djeluju dvije sile, jaka električna sila koja ju privlači do središta i slaba sila raspršenja svjetla, koja česticu pomiče od središta niz os laserske zrake. Optička pinceta služi za preciznu nanomanipulaciju i detekciju dielektričnih nanočestica. Za svrhe proučavanja biomolekula, često se koriste male staklene ili silikatne kuglice na kojima se imobiliziraju DNA ili proteini. 1990-ih optička se pinceta koristila za proučavanje sile i dinamike molekularnih motora, kada su i razvili spektroskopiju sile optičke zamke. Nadalje se optička pinceta koristila za proučavanje pokretnosti stanica, biopolimera, citoskeleta (pokretanje kinetina niz mikrotubule) i za sortiranje stanica. No najzanimljivija istraživanja sa optičkom pincetom uključivala su nukleinske kiseline kao predmet istraživanja.



Slika 3.7. Sustav dvostruke optičke pincete. Dvije laserske zrake kontroliraju jednu kuglicu koja je molekulom DNA povezana sa drugom kuglicom koja je fiksirana mikropipetom. Ovim se sustavom određuje ovisnost sile napetosti unutar molekule DNA o duljini molekule. Graf pokazuje jedan takav odnos mjeran optičkom pincetom. Preuzeto sa the-scientist.com, i opttweez - biocurious.com.

Prva istraživanja na nukleinskim kiselinama sa optičkom pincetom bila su najjednostavnija: Mjerili su ovisnost elastične sile dvolančane DNA o duljini molekule koristeći sustav sa dvije kuglice, jednom fiksnom, a drugom mobilnom koja je rastezala DNA (Sl.3.7.) (Wang *i sur.*, 1997.). Ta su se istraživanja kasnije primjenila i na istraživanja jakosti i sile pucanja kemijskih veza na biopolimerima. Mangeol *i sur.* (2005.) su konstruirali sustav dvostruke pincete kojima su mehanički denaturirali male i velike jednolančane RNA, na temelju čega su zaključili da se veće RNA denaturiraju skokovito, odnosno da im se pojedine regije tercijarne strukture denaturiraju neovisno jedna o drugoj. Jedno drugo istraživanje bavilo se RNA polimerazom i mjerenjem brzine kretanja niz DNA tijekom transkripcije.

Najimpresivnije istraživanje sa optičkom pincetom bilo je proučavanje karakteristika pakiranja DNA u virusnu kapsidu pomoću "virusnog portalnog motora", što je pokazalo da taj protein tijekom pakiranja mora djelovati protiv sile otpora koja raste kako se kapsida sve više puni s DNA (Springer, 2004.). Sva ova istraživanja s optičkom pincetom, pa i ona s AFM, daju novi uvid u svijet molekula, uvid koji prije nije bio toliko dostupan, a to je onaj mehanički, što je zapravo i direktan rezultat mogućnosti manipulacije na nano razini.

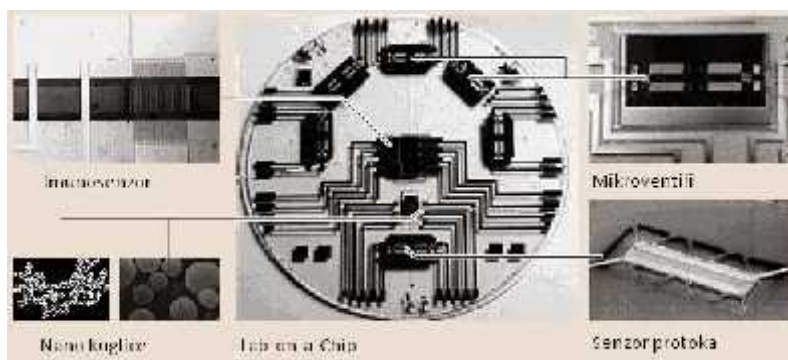
4.0. OSTALE METODE ANALIZE NUKLEINSKIH KISELINA

Razumljivo je da se razvojem nanotehnologije pojavljuju neke nove ideje za rješavanje starih problema. Takve bi ideje trebale uvelike povećati efikasnost i brzinu, te smanjiti cijenu skupih i složenih postupaka laboratorijske analize. Neke će od tih ideja biti kratko predstavljene u zadnjem poglavlju ovog rada.

4.1. LABORATORIJ-NA-ČIPU

Laboratorij-na-čipu (Lab-on-a-Chip) predstavlja jednu takvu ideju. Laboratorij-na-čipu je mali čip na kojem se mogu obavljati najrazličitiji laboratorijski testovi. Laboratorij-na-čipu temelji se na mikrofluidici koja se bavi ponašanjem tekućina u prostoru mikrovolumenskih proporcija i podtip je tehnologije μ TAS (Micro Total Analysis System) i MEMS (Microelectromechanical Systems). Ono što je najzaslužnije za razvoj tehnologije Laboratorij-na-čipu su metode mikroizrade. Mikroizrada površine čipa važna je stavka u proizvodnji, i to zbog odabira materijala, kao što su silikon, staklo ili plastika, i zbog načina tretiranja odabranog materijala da bi se stvorili kanali i šupljine za provođenje otopine uzorka i u kojima će se odviti skup kemijskih reakcija na temelju kojih se dobije određena informacija o prirodi analiziranog uzorka. Najčešće se tu radi o imunotestovima sa specifičnim antitijelima imobiliziranim na staklenim kuglicama i enzimima kao što su alkalna fosfataza koji zajedno daju informaciju o prisustvu određenog antigena (Sl.4.1.). Zatim, ono što je važno je kontrola toka te otopine, pa su konstruirani mikroventili i mikropumpe koji kontroliraju protok tekućine kroz kanale na površini čipa. Aktivni mikroventili koriste pritisak ili električnu energiju za otvaranje i zatvaranje kanala, pasivni se uglavnom sastoje od različitih zalistaka i membrana. Mikropumpe koriste sile osmotskog tlaka, površinske napetosti ili isparavanja za

potiskivanje tekućine. Postoje još i mikromikseri u kojima se odvijaju reakcije, mikrodispenseri za preusmjeravanje tekućine u više kanala i senzori protoka koji mogu detektirati i određeni produkt. Svi ti mikrouređaji nalaze se na malom čipu i vrlo brzo i

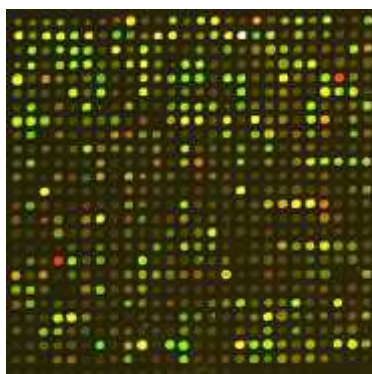


Slika 4.1. Laboratorij-na-čipu. Na slici se mogu vidjeti mikrokanaali koji vode tekućinu do mikrouređaja za analizu. Ovaj čip služi za imunodetekciju s magnetičnim kuglicama koje služe za fiksaciju i detekciju antigena. Preuzeto iz Springer Handbook of Nanotechnology, 2004.

efikasno, u nekoliko sekundi ili minuta, daju rezultat testa, što je u usporedbi sa standardnim laboratorijskim metodama, kojima trebaju sati ili dani, vrlo impresivno. Važno je napomenuti da se tu radi o iznimno malim volumenima, što je zapravo jedna od prednosti tehnologije Laboratorij-na-čipu jer su potrebne male količine uzorka, kemijska se reakcija odvija mnogo brže, a i smanjuje se količina neželjenih i štetnih nusprodukata reakcije. Laboratorij-na-čipu bi trebao smanjiti standardne biokemijske laboratorije na veličinu uređaja koji se može držati u ruci. Takva prednost se može primjeniti i za uporabu kod kuće za samotestiranje kod nekih bolesti, ili u budućnosti za prijenosne laboratorije koji će naći svoje mjesto u forenzici ili ekologiji. Ova tehnologija se već primjenjuje za analizu krvi, razvijanje i testiranje lijekova, te za proteinsku i DNA analizu (Springer, 2004.).

Jedna od izvedbi Laboratorija-na-čipu za višestruku analizu DNA je DNA čip (DNA microarray). DNA čip radi na vrlo jednostavan način: Na čipu se nalazi oko deset tisuća jažica, svaka jažica je ispunjena fiksiranom DNA jedinstvene sekvence, a koja će to DNA biti (eukariotska, bakterijska, virusna ili umjetna) ovisi o testu. Zatim se otopina testirane RNA nanese na čip, i ta RNA hibridizira sa onom DNA s kojom je komplementarna, što se detektira najčešće fluoroforom. Na kraju, laserska zraka skenira svaku jažicu i računalo daje intenzitet fluoresciranja koji govori o broju hibridiziranih RNA, što daje informaciju o

komplementarnosti DNA u toj jažici s testiranom RNA. Takvi se testovi mogu uporabiti u mnogo različitih svrha: za praćenje ekspresije gena, za filogenetske analize, za detekciju određenih mikroorganizama u nekom uzorku (Sl.4.2.), za detekciju mononukleotidnih polimorfizama, za detekciju alternativnog prekrajavanja primarnih transkripata, za detekciju fuzijskih gena, itd. Sve to proizlazi iz temeljne prednosti ove metode, a to je da se na jednom takvom čipu može izvršiti onoliko testova koliko je proba, odnosno fiksiranih DNA na čipu, što može biti i preko milijun.

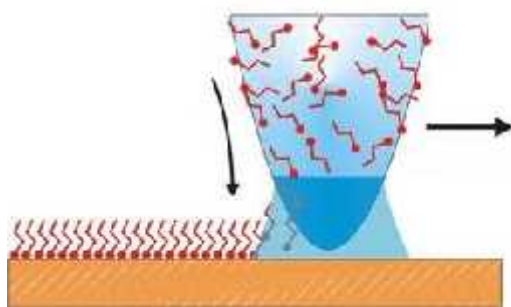


Slika 4.2. Rezultat jednog DNA microassay testa. U ovom je testu bilo bitno razlikovati između RNA iz dvije različite bakterijske linije, od kojih jedna daje crveni, a druga zeleni signal.
Preuzeto sa wormbook.org.

4.2. NANOLITOGRAFIJA "PERO-TINTA"

Slijedeća metoda koja je sve prisutnija u svijetu nanotehnologije dio je jedne metode već spomenute u ovom radu. Nanolitografija "pero-tinta" (Dip-Pen Nanolithography, DPN) koristi istu aparaturu kao i AFM, odnosno ta bi se nanolitografija mogla smatrati kao još jednom primjenom AFM. DPN služi za preciznu kemijsku sintezu, a radi slično kao i pero i tinta. Da bi pero (pen) pisalo, mora se umočiti (dip) u tintu. AFM proba se mora "umočiti" u određenu kemikaliju koja će pri kontaktu probe s površinom skliznuti na površinu. Taj se prijelaz događa zahvaljujući vodenom meniskusu koji se stvara na dodiru probe i površine i unutar tog meniskusa kemikalija difundira do površine (Sl.4.3.). Na taj se način molekulama doslovno može pisati po površini koje se zbog toga vrlo precizno slažu jedna do druge. Do sada se DPN primjenila na provodljive polimere, dendrimere, čestice zlata, antitijela, alkentiole i DNA koja se može slagati ili nukleotidima ili oligonukleotidima (Springer, 2004.). Ova je metoda vrlo obećavajuća, budući da je jedna od glavnih problematika kojima se nanotehnologija bavi

sastavljanje na nanorazini. Jedan od pristupa tome je samoorganizacija koja se primjenjuje pomoću biomolekula kao što su nukleinske kiseline, dok je drugi način potpuna kontrola nad tim procesom, što je do sada bilo prilično neizvedivo. Zbog toga je DPN vrlo moćna metoda koja će se sigurno dalje razvijati do toga da će biti moguće iz najosnovnijih građevnih jedinica, atoma, sastaviti ne samo nanočestice, nego čak i makroskopske uređaje i predmete.

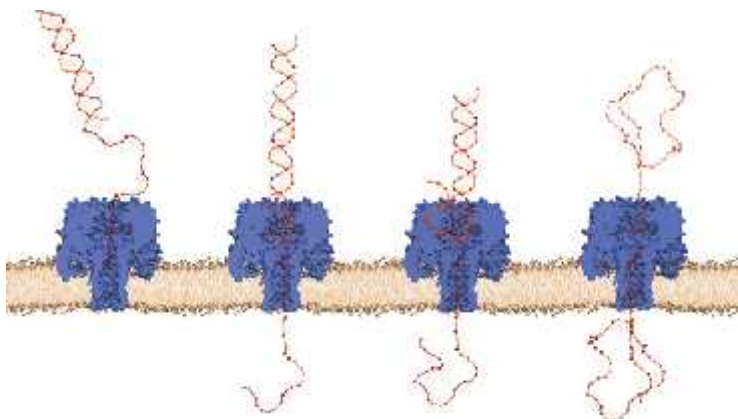


Slika 4.3. Nanolitografija "pero-tinta". Između vrha probe i površine stvara se vodeni meniskus koji služi za prijelaz molekula na površinu. Na površini se molekule uredno i precizno slažu jedna do druge.
Preuzeto sa xnet.rrc.mb.ca.

4.3. NANOPORE

Sve metode koje su dosad spomenute imale su više primjena. Zadnja metoda koja će biti predstavljena zasad ima samo jednu svrhu, a to je sekvenciranje nukleinskih kiselina. Proteinski kanal α -hemolizin, odnosno α -toksin, dio je infektivnog mehanizma patogene bakterije *Staphylococcus aureus*, na način da se njegovi monomeri sami ugrade u stanične membrane eritrocita i tvore heptamer propusan primarno za kalcijeve ione, čija prevelika količina u stanici izaziva apoptozu. No, α -hemolizin ima tu mogućnost da propušta i veće organske molekule, kao što su nukleotidi i linearne jednolančane nukleinske kiseline. Iz te karakteristike proizašla je ideja da se α -hemolizin iskoristi za sekvenciranje nukleinskih kiselina. Naime, ako na kanal fiksiran na membrani *in vitro* primijenimo neki napon i pustimo struju da teče isključivo kroz kanal, tu struju možemo mjeriti. Međutim, ako kanal blokiramo nukleotidom ili polinukleotidom, jakost struje pada. Dokazano je da postoji određeno mjesto unutar α -hemolizina koje je posebno osjetljivo na nukleotide i tu je promjena jakosti struje najveća. Glavna zamisao je da svaki od 4 nukleotida karakteristično mijenja jakost struje prema čemu se mogu i identificirati. Taj se koncept naziva sekvenciranje nanoporama

(Sl.4.4.). Dakle, kako nukleotidi prolaze, bilo slobodni ili nanizani u lancu, oni izazivaju promjene jakosti struje unutar kanala i ta se promjena grafički zabilježi za prolaz svakog pojedinog nukleotida. Na grafu se nakon toga svakom padu jakosti struje dodijeli odgovarajući nukleotid i tada imamo sekvencu analizirane nukleinske kiseline. Za sada su uspješno izvedeni eksperimenti sa identifikacijom homopolinukleotida i sekvenciranjem pomoću egzonukleaze koja otpušta pojedinačne nukleotide jednog po jednog sa DNA lanca u nanoporu i proteinskog adaptera unutar α -hemolizina koji zadržava nukleotide dovoljno dugo da se promjena jakosti struje može očitati (Deamer & Branton, 2001.). Velika prednost ove metode sekvenciranja nad dosadašnjima je da se nanoporama može sekvencirati i RNA jer nanopora ne pravi veliku razliku između ribonukleotida i deoksiribonukleotida što se tiče same izvedivosti. Ovaj je koncept vrlo jednostavan i vrlo izvediv iako još nije usavršen i još se traže alternative α - hemolizinu, bilo to drugi prirodni proteinski kanali ili neke sintetske nanopore koji bi se pokazali uspješnijima u sekvenciranju DNA i RNA.



Slika 4.4. Teoretski model sekvenciranja nanoporama. Kroz proteinski bi kanal mogao proći samo jedan lanac DNA, koji bi ometao protok struje. Svaki nukleotid tog lanca bi u trenutku prolaza kroz kanal karakteristično smanjio protok struje pomoću čega bi im se mogao odrediti redoslijed u molekuli DNA.

Preuzeto sa www.nbp.espci.fr.

ZAKLJUČAK

Sva navedena znanstveno-tehnološka postignuća samo su mali dio onoga čime se znanstvenici cijeloga svijeta bave radi boljeg shvaćanja i sve šire primjene nanosvijeta. Nanotehnologija će u slijedećih 10-20 godina zauzeti važno mjesto ne samo u znanosti, nego i u svakodnevnom životu, budući da se veliki naponi ulažu komercijalizaciju ove tehnologije tako da bude dostupna i korisna svima. Nukleinske kiseline, DNA i RNA, pokazale su se iznimno korisnima i poučnima znanstvenicima koji se bave nanotehnologijom, jer su vrlo inteligentne i samodostatne molekule. Sve njihove karakteristike: samoorganizacija, čvrstoća, fleksibilnost, multifunkcionalnost, čak i provodljivost struje i topline, sve one su poželjne u budućim nanouređajima, nanorobotima i nanostrojevima, koji će vremenom i trudom postati vrlo spretni, pametni i korisni u mnogo različitih područja kao što su medicina, telekomunikacije, promet, ekologija ili računalna tehnologija. To su dovoljni razlozi da se u ovu tehnologiju ulaže vrijeme, novac i trud, tako da bi cijelo čovječanstvo moglo imati koristi od toga.

LITERATURA

KNJIGE

- Abu-Lail N.I., Camesano T.A., 2004., Atomic Force Microscopy and Single-Molecule Force Microscopy Studies of Biopolymers, *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 119-131.
- Fritzsche W., 2004. DNA-Conjugated Metal Nanoparticles: Applications in Chip Detection. *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 955-962.
- Hamad-Schifferli K., 2004. DNA Hybridization: Electronic Control. *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 963-975.
- Bhushan B., 2004. Springer Handbook of Nanotechnology.
- Papazoglou E.S., Parthasarathy A., 2007. Bionanotechnology: Synthesis Lectures on Biomedical Engineering.

ČLANCI

- Boeckl M., Graham D., 2006. Self-Assembled Monolayers: Advantages of Pure Alkanethiols. *Material Matters: Molecular Self-Assembly* **13**, 3-5.
- Deamer D.W., Branton D., 2001. Characterization of Nucleic Acids by Nanopore Analysis. *Accounts of Chemical Research* **430**, 817-825.
- Hansma H.G., Laney D.E., Bezanilla M., Sinsheimer R.L., Hansma P.K., 1995. Applications for Atomic Force Microscopy of DNA. *Biophysical Journal* **68**, 1672-1677.
- Hansma H.G., Oroudjev E., Baudrey S., Jaeger L., 2003., TectoRNA and 'kissing-loop' RNA: Atomic Force Microscopy of self-assembling RNA structures. *Journal of Microscopy* **212**, 273-279.
- Jaeger L., Chworos A., 2006. The architectonics of programmable RNA and DNA nanostructures. *Current Opinion in Structural Biology* **16**, 531-543.
- Keller D., Bustamante C., Keller R.W., 1989. Imaging of single uncoated DNA molecules by Scanning Tunneling Microscopy. *PNAS:Biophysics* **86**, 5356-5360.
- Khan A., 2005. Intelligent RNA folding with Atomic Force Microscopy information.
- LaBean T.H., Li H., 2007. Constructing novel materials with DNA. *NanoToday* **14**, 26-35.
- Landousy F., Le Cam E., 2006. Probing DNA-Protein Interactions with Atomic Force Microscopy. www.veeco.com
- Liedl T., Sobey T.L., Simmel F.C., 2007. DNA-based nanodevices. *NanoToday* **14**, 36-41.
- Lyubchenko Y.L., Shlyakhtenko L.S., 1997. Visualization of supercoiled DNA with Atomic Force Microscopy *in situ*. *PNAS:Biophysics* **94**, 496-501.
- Mangeol P., Côte D., Bizebard T., Legrand O., Bockelmann U., 2005. Probing DNA and RNA single molecules with a double optical tweezer. *The European Physical Journal E* **19**, 311-317.
- Mirkin C.A., Letsinger R.L., Mucic R.C., Storhoff J.J., 1996. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into nanoscopic materials. *Nature* **382**, 607-609.
- Sarikaya M., Tamerler C., Jen A., Schulten K., Baneyx F., 2003. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nature Materials* **2**, 577-585.

- Soni G.V., Hameed F.M., Roopa T., Shivashankar G.V., 2002. Development of an optical tweezer combined with micromanipulation for DNA and protein nanobioscience. *Current Science* **1008**, 1464-1470.
- Tanaka H., Kawai T., 2009. Partial sequencing of a single DNA molecule with a scanning tunneling microscope. *Nature Nanotechnology* **4**, 518-522.
- Wang M.D., Yin H., Landick R., Gelles J., Block S.M., 1997. Stretching DNA with Optical Tweezers. *Biophysical Journal* **72**, 1335-1346.

WEB STRANICE

<http://bio.gsi.de/RESEARCH/rastermicro.html>
<http://chemgroups.northwestern.edu/mirkingroup/dpn.htm> (DPN)
<http://www.genomeweb.com/sequencing/scanning-tunneling-microscope-generates-guanine-base-map-single-dna-strands>
http://www.lot-oriel.com/site/pages_es_en/spectrum/european_edition_8/dip_pen.php (DPN)
<http://www.physics.ucsb.edu/~hhansma/afm-ac news.htm>
http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/tutorial.html#Nanostructured_Materials
<http://xnet.rrc.mb.ca/davidb/nanotools.htm>

Sažetak

Danas je nanotehnologija jedna od grana znanosti koje najbrže napreduju budući da obuhvaća fiziku, kemiju, inženjering i biologiju. Zbog svojih izvanrednih osobina, nukleinske kiseline, DNA i RNA, postale su središtem zanimanja znanstvenika koji te osobine koriste u izgradnji novih materijala, nanostrojeva i drugih nanočestica, te onih koji razvijaju nove, jeftine, brze i efikasne laboratorijske metode radi daljnjeg proučavanja DNA i RNA. Cilj ovog rada je da pokaže kako se nanotehnologija primjenjuje u istraživanju nukleinskih kiselina, ali i obrnuto, odnosno, koju ulogu nukleinske kiseline imaju u razvoju nanotehnologije. DNA i RNA postale su nezamjenjive u bionanotehnologiji i sve se više koriste kao oruđe, a ne samo kao predmet istraživanja. Povrh toga, nove metode vizualizacije i nanomanipulacije doslovce su nam otvorile oči za nanosvijet te nam tako omogućile da oblikujemo tvari s velikom preciznošću. I na kraju, ova tehnologija može pomoći čovječanstvu na mnogo načina i u nizu različitih područja znanosti, kao što su medicina, ekologija, energetika, računalna znanost, itd.

Summary

Nanotechnology is one of the fastest growing fields of science today as it encompasses physics, chemistry, engineering and biology. Due to their remarkable properties, nucleic acids, DNA and RNA, have been in the center of interest of scientists who employ those properties to construct novel materials, nanomachines and other nanoparticles, and who have been developing new, low cost - high speed and efficacy, laboratory methods to learn more about DNA and RNA. The objective of this paper is to show how nanotechnology applies to nucleic acid research and vice versa, i.e. to show how nucleic acids contribute in the development of nanotechnology. DNA and RNA have proven themselves irreplaceable in bionanotechnology and are being used more and more as engineering tools rather than as test subjects. Moreover, new visualization and nanomanipulation techniques have literally opened our eyes to the nanoworld enabling us to shape matter with great precision. Finally, this technology can help mankind in many ways and in many scientific areas, including medicine, ecology, energetics, computer technology, etc.