**"פיתוח חיישנים אלקטרוניים ואופטיים מוגברים, בקרת מעבר אלקטרון בממשק אלקטרודה/תמיסה וביצוע תנועות מכאניות הפיכות באמצעות /////משטחים המותמרים בחומצות נוקלאיות"**

**החיבור הוגש לשם קבלת תואר**

**"דוקטור לפילוסופיה"**

**מאת גלעד פילוסוף**



הוגש לסנאט של

האוניברסיטה עברית בירושלים ספטמבר 2014

**עבודה זו נעשתה בהדרכתו של פרופסור איתמר וילנר**

**אני מודה לאלוקים על הזכות הנפלאה שנפלה בחלקי לחקור את עולמך, על הבינה שחלקת ליראיך להצליח לגלות מעט מהנסתר מעיני כל חי**

**תודתי מעומק הלב לפרופסור איתמר וילנר על ההדרכה האישית יוצאת הדופן, במהלך שנות התואר. על המעיין השופע ועל ההתלהבות למחקר מדעי וחדשני.**

**תודתי הגדולה לד"ר בלהה וילנר על האכפתיות ועל לתמיכתה ודאגתה להצלחתי.**

**הערכה רבה לד"ר רן תל ורד על תמיכתו האינסופית, מסירות אין קץ, על מקצועיות, לבביות ועל העידוד מתוך ידידות הדוקה.**

**לחבר קרוב שלי, ד"ר שמחה שמרון. מילים אינם מספיקות כדי להביע את תודתי על העזרה שלך להתגבר על קשיים ועל שיתוף הפעולה לאורך כל הדרך.**

**תודה מיוחדת למשפחתי היקרה: ההורים שלי, חמותי, ילדי גיסי, ומעל לכל לאשתי היקרה שעודדה אותי תמיד ובמיוחד בשנות לימודי לתואר. תודה.**

תקציר

# פרק 1- הקדמה

הרכב וסדר הבסיסים של חומצות נוקלאיות יוצרים רצפים ייחודיים של ביופולימר בעלי מבנים פונקציונאלים. המבנים הפונקציונאלים נגזרים מאינטראקציות ספציפיות בין הבסיסים. לדוגמא, האינפורמציה המבנית של הביופולימר (גדיל DNA), מתבטאת בזיווג בסיסים (A=T, G≡C) ומאפשרת יצירת DNA במבנה דו-גדיל ואף להתארגנות עצמית בנאנו-מבנים כגון: i-motif או G-quadruplex. זאת ועוד, ניתן ליצור צימוד בין בסיסים של חומצות נוקלאיות, ברצף ה-DNA, על-ידי יוני מתכתות היוצרים קומפלקסים (כגון:T-Hg2+-T או C-Ag+-C) המייצבים מבנה דו-גדיל או נאנו-מבנים. בנוסף לכך, התכונות הכימיות והמבניות הנגזרות מאופי וסדר החומצות הנוקלאיות מתבטאות גם ביכולתם של ביופולימרים לבנות אפטמרים עם אפיניות הכרה ספיציפית למולקולות, מקרומולקולות ואף לתאים. יצירת מבנים של חומצות נוקלאיות המשלבים בתוכם מולקולות נוספות מאפשרת בניית ביופולימרים קטליטים (DNAzymes). לדוגמא, שילובו של hemin ביחידת המבנה של G-quadruplex יוצרת מבנה קטליטי המחקה את פעילותו של האנזים horseradish peroxidase (HRP). כמו כן, רצפים ספציפיים של חומצות נוקלאיות הקושרים יוני מתכת (כגון: Cu2+, Zn2+, Mg2+ ועוד) מזרזים הידרוליזה של קשר פוספודיאסטרי ברצפים ספציפיים של חומצות נוקלאיות אחרות.

בשנים האחרונות נחקרו לעומק תכונות ההכרה של רצפי DNA (אפטמרים) ואוּפיינוּ התכונות הקטליטיות של חומצות נוקלאיות (קטליטית DNAzymes). שימוש בתכונות ההכרה הוביל לפיתוחם של חיישנים ביולוגים (ביוסנסורים) מגוונים הבנויים מרצפי חומצות נוקלאיות המסוגלים לבצע זיהוי ופעולות נלוות של הגברה ושידור כתוצאה מהזיהוי. תכונות הכרחית לבניית חיישן ביולוגי הן אתר הכרה לגורם הנבדק (אנליט), היוצר אות שידור כָּמוּתי כתגובה להיווצרות הקומפלקס בין אתר ההכרה והאנליט. מערכת החיישן מתוכננת מראש כך שזיהוי ספציפי על-ידי קומפלקס ההכרה יוצר אות פיסיקאלי או כימי המשדר את קיומו של אירוע ההכרה. האותות הפיסיקאלים המשודרים מהחיישן מגוונים ונושאים אופי שונה כגון: אות אופטי (שינויי צבע, פלאורוסנציה, כמילומינסנציה, ועוד), אות חשמלי (זרם, עכבה-impedance, מתח, התנגדות) שינויים באותות מגנטים ועוד. פעולת החיישן מתבססת על קיבוע אתר הכרה ספציפי על שדר אלקטרוני אופטי או מגנטי, כך שאירוע ההכרה המתרחש על פני השדר מוביל לאות שידור. פרק ההקדמה מציג מספר דוגמאות ליישום DNA בחיישנים המשדרים אותות אופטיים ואלקטרוכימיים כתוצאה מאינטראקציות הכרה היוצרות שינויים מבניים כגון: אוליגונוקלאוטיד היוצר דו-גדיל, חשיפה לסובסטרט היוצר תצמיד אפטמר-סובסטרט, כמו גם המצאות יוני מתכת המייצבים דו גדיל (Hg2+ ,Ag+) או גורמים לחיתוכו (כגון: Cu2+, Zn2+, Mg2+ וכו').

התפתחות מדע הנאנוטכנולוגיה והסינתזות היעילות ליצירת נאנו-חלקיקי מתכת או מוליכים למחצה בגדלים, צורות והרכבים מבוקרים תרמו לגילויים של חומרים חדשים עם תכונות אופטיות ואלקטרוניות ייחודיות. נאנו-חלקיקים של מוליכים למחצה (QDs) מאופיינים בלומינסנציה, בעוד שנאנו-חלקיקי מתכות (metal NPs) מאופייניים בבליעת פלסמון. כמו כן, נמצא כי אגרגציה של נאנו-חלקיקי מתכת פלסמוניים מובילה לתכונות אופטיות ייחודיות כתוצאה מצימוד בין הפלסמונים, תופעה המובילה לשינוי צבע התמיסה. אינטראקציות של חומצות נוקלאיות עם נאנו-חלקיקי מוליכי למחצה או של נאנו-חלקיקי מתכת פלסמונים מהוות גורם מפתח בפיתוח מגוון חיישנים שבהם אינטראקצית ההכרה על פני החלקיקים גורמות לשינויים בתכונות הפוטו-פיסיקאליות של החלקיקים, וכתוצאה מכך מתאפשרת חישה אופטית לשינויים כימים או פיסיקאלים.

אחד האתגרים המרכזיים בפיתוח חיישנים כולל פיתוח שיטות רגישות לאפיון הגורם הנבדק, וזאת על-ידי פיתוח שיטות הגברה (amplification). הגברת תהליך החישה ניתנת להשגה על-ידי צימוד זרז (קטליזטור) ביולוגי או כימי לאירוע ההכרה. התהליך הקטליטי גורם להיווצרות מספר גדול של מולקולות "קריאות" על-ידי השדר כתוצאה מאירוע הכרה בודד. תהליך המוביל לאות פיסיקלי קריא כתוצאה ממספר מוגבל של אירועי הכרה. פרק ההקדמה מציג מספר שיטות לפיתוח תהליכי הגברה עבור חישני DNA תוך שימוש בחומצות נוקלאיות קטליטיות-DNAzyme, שימוש בתהליך rolling circle amplification (RCA) כמנגנון ליצירת מולקולות DNAzyme קטליטיות, שימוש בתהליכי hybridization chain reaction (HCR) כמנגנון ליצירת חוטים של יחידות DNAzyme, ופיתוח מכונות DNA דוגמאת פולימריזציה/חיתוך (polymerization/nicking) ויצירה מחזורית של DNAzyme קטליטי.

תחום "הנאנו-טכנולוגיה עם DNA" כולל מספר נושאים כגון פיתוחם של חיישנים, שימוש בחומצות נוקלאיות כיחידות פונקציונאליות להתארגנות עצמית של נאנו-מבנים, יישום חומצות נוקלאיות כתבניות לאירגון מערכים ביומולקולרים, שימוש ב-DNA כתבנית לקיבוע מערכים אי-אורגניים (כגון חוטי מתכת), שימוש בחומצות נוקלאיות כחומר פונקציונאלי לביצוע פעולות חישוביות, ועוד. תחום מרכזי ב"נאנו-טכנולוגיה עם DNA" כולל יישומם של חומצות נוקלאיות כחומרים פעילים לבניית "מכונות DNA". "מכונת DNA" מהווה מערך סופראמולקולרי של חומצות נוקלאיות המבצע פעולה דינאמית המחקה את פעילותה של "מכונה מקרוסקופית". מכונות ה-DNA מופעלות על-ידי אות חיצוני (דלק) המוביל לרה-קונפיגורציה מבנית של המערך הסופראמולקולרי. בניית מכונת DNA וחקירתה דורשת קיומם של מספר תנאים בסיסיים הכוללים: תיכנון רצפי DNA (קידוד) המגיבים לאות ה"דלק" החיצוני, תיכנון מספר מצבים מוגדרים לרה-קונפיגורציה של המערך הסופראמולקולרי, קיום מנגנון לשיחזור המצב המקורי של "מכונת ה-DNA" (פעילות הפיכה) וזאת על-ידי אות חיצוני הפועל כנגד ה"דלק" הראשוני-"אנטי-דלק", ותיכנון שיטות פיסיקליות למעקב אחר הפעילות הדינאמית של מכונת ה-DNA. מיגוון אותות חיצוניים שימשו להפעלת מכונות DNA ואלו כוללים: רצפי חומצות נוקלאיות המשמשות כ"דלק"/"אנטי-דלק", שינויי pH, יוני מתכת/ליגנד, אור ואותות אלקטרוכימיים. מכונות DNA פשוטות ניתנות להגדרה כמתגים (switches), ואלוּ עוברים רה-קונפיגורציה הפיכה בין שני מיבנים בנוכחות ה"דלק"/"אנטי-דלק". מכונות DNA מורכבות יותר כוללות רה-קונפיגורציה הפיכה של המבנים הסופראמולקולרים בין מספר מצבים כתוצאה מהפעלת מגוון "דלקים"/"אנטי-דלקים". במהלך השנים האחרונות דווחו מספר מכונות DNA מורכבות הכוללות, למשל, הלכים (walkers), רוטורים ומטוטלת. פרק ההקדמה דן בעקרונות לבניית "מכונות DNA" ומציג מספר דוגמאות ל"מכונות DNA".

פן מרכזי של עבודת המחקר כולל את הארגון העצמי (self assembly) של חומצות נוקלאיות על פני משטחים (אלקטרודות) או נאנו-חלקיקים. פרק ההקדמה מתאר את השיטות הכימיות להיווצרות חד-שכבות של DNA על פני משטחים, ואת השיטות הפיסיקאלית, ספקטרוסקופיות, אלקטרוכימיות ומיקרוסקופיות לאפיון חד-השכבות.

# מטרות המחקר

המחקר מתמקד ביישום האינפורמציה הפונקציונאלית (מבנית וריאקטיבית) המקודדת בסדר הבסיסים של ה-DNA לפיתוח חיישנים רגישים למגוון גורמים, ולפיתוח מערכות פונקציונאליות על פני משטחים בהן מבוקרות תכונות מעבר האלקטרון בתווך המגע משטח-נוזל, או המערכות מתפקדות כמכונות DNA מולקולאריות על פני המשטח.

להלן פרוט מטרות המחקר:

1. יישום hemin/G-quadruplex המקובע לאלקטרודה כזרז אלקטרוכימי לחיזור מי חמצן למים. בנושא זה, יוצג השימוש ב hemin/G-quadruplex כסמן אלקטרו קטליטי לזיהוי DNA, זיהוי קומפלקס-סובסטרט, זיהוי יוני מתכת (Pb2+), כזרז אלקטרוכימי לחישת מי חמצן הנוצרים במהלך תגובות אנזימטיות של אוקסידאזות (glucose oxidase).

2. יוצג השימוש בספקטרוסקופיית פלסמון רזוננס על פני המשטח (surface plasmon resonance) כשיטה פיסיקאלית לחישת אינטראקצייות אפטמר-סובסטרט, וכן לזיהוי יוני מתכות (Hg2+ ,Pb2+). במסגרת מאמצים אלה, ייושם מבנה ה-hemin/G-quadruplex, הנוצר כתוצאה מתהליך החישה, כסמן אופטי להגברת תהליכי הזיהוי של קומפלקסים כגון אפטמר-סובסרט ושל המתכת, כסמן עבור ספקטרוסקופיית ה-SPR. יתירה מזו, תוצג בנייתם של מערכי חישה מוגברים הכוללים את הסמן האופטי hemin/G-quadruplex על פני נאנו-חלקיקי זהב, המקובעים למשטח זהב כאמצעי להגברה. דהיינו, הצימוד שבין הפלסמון המקומי (local plasmon) של נאנו-חלקיקי הזהב והגל הפלסמוני על פני המשטח ישמש להגברת השינויים הדיאלקטריים המתקיימים על פני השדר, כתוצאה מאירוע ההכרה.

3. יוצג הקיבוע של, רצפי DNA מתוכנתים, הניתנים לרה-קונפיגורציה מבנית הפיכה בין מבנה שרשרתי רנדומאלי (random coil) ומערך מבני מאורגן, דוגמת i-motif או G-quadruplex, על פני אלקטרודות. בעזרת אותות חיצוניים כגון pH (ליצירה או פרוק i-motif), או הוספת יוני אשלגן, K+, (ליצירת G-quadruplex ), יווצרו שינויים במבנה ה-DNA. השינויים המבניים ב DNA על פני המשטח יובילו לבקרה הפיכה של תכונות מעבר האלקטרון בשכבת המגע אלקטרודה-תמיסה.

4. תוצג הבנייה של מערכי DNA על פני אלקטרודות או נאנו מוליכים למחצה (QDs) הפועלים כ"זרוע" מכאנית המונעת בין אתרים ספציפיים על מתווה ה-DNA. תנועת הזרוע תופעל על-ידי אותות חיצוניים, ופעולת ה"זרוע" תיבחן באמצעות מדידות אלקטרוכימיות (על משטח האלקטרודות, כ"שהזרוע" מסומנת בסמן חמצון חיזור), או אופטיות (על משטחי ה-QDs, כשהזרוע מסומנת במשכך פלואורסנציה).

במכלול המערכות נרצה לאפיין במגוון שיטות את המבנים הפונקציונאליים הפועלים כחיישנים או כמכונות DNA מולקולאריות. השיטות העיקריות בבהן נשתמש לבדיקת המערכים יכללו שיטות אלקטרוכימיות, ספקטרוסקופיות, ומיקרוסקופית. מאמצים מיוחדים יוקדשו לגשר בין התכונות המבניות של המערכות השונות לפעילויות הפונקציונאליות המתקבלות מהן. כמו כן, נדון ביישומים השונים של המערכות השונות ובפיתוחים העתידיים הצפויים להיגזר מפעילות המחקר.

# פרק 2- שיטות המחקר

בפרק זה מתוארים המכשירים שבהם נעשה שימוש במחקר. תאורי המערכות הנסיוניות מופיעים בצורה מדויקת בחלקים הניסויים של אסופת המאמרים הרלוונטיים.

# פרק 3- תוצאות המחקר

בפרק זה מופיעים המאמרים המדעיים שנגזרו מעבודת המחקר, ואלו מחולקים לתתי פרקים הכוללים חמישה מאמרים, כדלקמן:

3.1 “Amplified Biosensing Using the Horseradish Peroxidase-Mimicking

 DNAzyme as an Electrocatalyst”

 Pelossof G., Tel-Vered R., Elbaz J., Willner, I. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 4396.173\*

3.2 "Amplified Surface Plasmon Resonance-Based DNA Biosensors, Aptasensors,

 and Hg2+ Sensors Using Hemin/G-Quadruplexes and Au Nanoparticles"

 Pelossof G.; Tel-Vered, R.; Liu, X.Q.; Willner, I. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 8904.174\*

3.3 “Amplified Surface Plasmon Resonance (SPR) and Electrochemical Detection of Pb2+ Ions Using the Pb2+-Dependent DNAzyme and Hemin/G-quadruplex as a Label”

 Pelossof, G.; Tel-Vered, R.; Willner, I. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 3703.175\*

3.4 “Controlling Interfacial Electron Transfer and Electrocatalysis by pH- or Ion-

 Switchable DNA Monolayer-Modified Electrodes”

 Pelossof, G.; Tel-Vered, R.; Shimron, S.; Willner, I. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1137.176\*

3.5 “Switchable Mechanical DNA “Arms” Operating on Nucleic Acid Scaffolds

 Associated with Electrodes or Semiconductor Quantum Dots”

 Pelossof, G.; Tel-Vered, R.; Liu, X.; Willner I. *Nanoscale* **2013**, *5*, 8977.177\*

# פרק 4- דיון בתוצאות המחקר

בפרק זה מתקיים דיון המסכם את הישגי המחקר בכל אחד מהמאמרים המופיעים באסופת המאמרים של התזה.

הדיון כולל:

- תיאור קצר של עקרונות נושאי המחקר הנידונים במאמר הספציפי, תוך התייחסות לאפיון המערכים הניסויים.

- תיאור קצר של ההישגים המרכזיים הנגזרים מפעילות המחקר.

- מסקנות עיקריות הנגזרות מתוצאות המחקר והשלכות המחקר על פיתוחים עתידיים בתחום הנושא הנידון.

# פרק 5- מובאות

חלק זה כולל את הסימוכין הספרותיים הקשורים לעבודות המחקר.