UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Elektrochemické senzory k detekci DNA

Magda Staňková

Bakalářská práce

2009

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie
Akademický rok: **2008/2009**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Magda STAŇKOVÁ**

Studijní program: **B2802 Chemie a technická chemie**

Studijní obor: **Chemie a technická chemie**

Název tématu: **Elektrochemické senzory k detekci DNA**

Zásady pro vypracování:

1. Z odborných publikací zpracujte literární rešerši na téma elektrochemické detekce DNA.

2. Uveďte základní principy elektrochemické detekce nukleových kyselin. Shrňte vlastnosti a aplikační možnosti různých elektrodových materiálů.

3. Popište základní techniky detekce hybridizace DNA na uhlíkových substrátech.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Radovan Metelka, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **23. února 2009**

Termín odevzdání bakalářské práce: **26. června 2009**

L.S.

prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

prof. Ing. Karel Vytřas, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2009

V úvodu práce bych chtěla především poděkovat své rodině za velkou trpělivost a podporu v průběhu mého studia.

Dále pak poděkování patří Ing. Radovanu Metelkovi, Ph. D. za odborné vedení a připomínky v průběhu práce.

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích 17.8.2009

Magda Staňková

Souhrn

V rámci této bakalářské práce byla prostudována literatura týkající se elektrochemické detekce DNA. První část práce je věnována elektrodám, tedy materiálům elektrod používaných k detekci DNA, jejich bází, nukleotidů a nukleosidů a interakcím těchto látek s elektrodovým povrchem. V další části práce je pozornost věnována a elektrochemické oxidaci a redukci DNA a bází na povrchu různých elektrod. Třetí část práce se pak zabývá elektrochemickou detekcí hybridizace DNA. Ta je složena ze tří částí, kdy nejprve je pozornost věnována spojení studované části DNA s elektrodou. Poté provedení vlastní hybridizace a v závěru způsobům elektrochemické detekce tohoto procesu.

Klíčová slova

elektrochemická detekce DNA
detekce hybridizace DNA
voltametrie
uhlíkové elektrody

Summary

In this bachelor thesis, the literature about electrochemical detection of DNA was reviewed. The first part of this work is devoted to electrodes used to detection of DNA, their bases, nucleotides and nucleosides, and to interaction of such species with electrode surface. In the second part, the attention is focused on the electrochemical oxidation and reduction of DNA and its bases at the surface of different electrodes. The third part of thesis deals with electrochemical detection of DNA hybdridization. It is consisted of three section, where firstly immobilization of DNA at the electrode is discussed, then the hybridization process is described and finally the methods of electrochemical detection of DNA hybridization are outlined.

Keywords

electrochemical DNA detection
detection of DNA hybridization
voltammetry
carbon electrodes.

OBSAH

1. ÚVOD……...4

2. INTERAKCE ELEKTROD A NUKLEOVÝCH KYSELIN……..4

2.1 Rtuťové elektrody...…….…4

2.1.1 Rtuťové filmové elektrody na grafitových substrátech……6

2.2 Stříbrné elektrody……6

2.3. Zlaté elektrody……...7

2.4 Měděné elektrody……9

2.5 Bizmutové elektrody……10

3. ELEKTROCHEMICKÁ REDUKCE A OXIDACE DNA…….……10

3.1 Redukce a oxidace bází nukleových kyselin…….……...10

3.1.1 Redukce na rtuťové elektrodě……10

3.1.2 Oxidace na uhlíkových elektrodách……...12

3.1.3 Oxidace na diamantové elektrodě……..15

3.2 Redukce a oxidace DNA…….……..15

3.2.1 Oxidace na pevných elektrodách……16

3.2.2 Redukce……..17

4. DETEKCE HYBRIDIZACE DNA……18

4.1 Fixace na povrch elektrody……...18

4.1.1 Fixace DNA na uhlíkové elektrody……...……19

4.2 Hybridizace DNA……19

4.3 Detekce spojení s povrchem sondy…..…….20

4.3.1 Detekce pomocí sond imobilizovaných na povrchu elektrody.. 21

4.3.2 Dvoupovrchové techniky ……. 22

5. ZÁVĚR……...25

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Purinové a pyrimidinové báze vyskytující se v DNA ……..…….4

Obr. 2 Reakční schéma polarografické redukce adeninu ……..... 11

Obr. 3 Reakční schéma polarografické redukce cytosinu …….. 11

Obr. 4 Reakční schéma elektrochemické oxidace adeninu …… 13

Obr. 5 Reakční schéma elektrochemické oxidace guaninu ……...……. 13

Obr. 6 Oxidace DNA na uhlíkových elektrodách …….……. 16

Obr. 7 Watson-Crickovo párování bází …….……. 20

Obr. 8 Elektrochemická detekce hybridizace DNA využitím signální sondy ……..….. 21

Obr. 9 Elektrochemická detekce hybridizace DNA použitím elektrochemického molekulárního majáku……..……. 22

Obr. 10 Elektrochemická detekce hybridizace DNA založená na separaci cílové DNA pomocí magnetického nosiče …….…….. 23

Obr. 11 Detekce hybridizace DNA elektrochemickou imunoanalýzou DNA modifikované Os, bipy s využitím alkalické fosfatasy jako enzymové značky ……..……..... 24

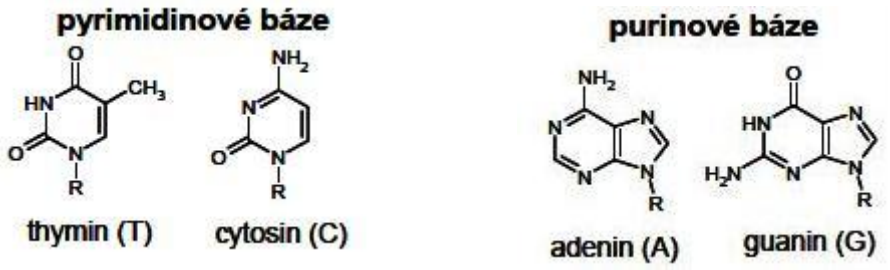
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AgSAE - silver solid amalgam electrode , elektroda z pevného stříbrného amalgámu
AdTS - adsorptive transfer stripping voltammetry, adsorptivní přenosová rozpouštecí voltametrie
BDD - boron doped diamonid, borem dopovaný diamant
CPSA - chronopotentiometric stripping analysis , chronopotenciometrická rozpouštěcí voltametrie
CSV – cathodic striping voltammetry, katodická rozpouštěcí voltametrie
CV – cyclic voltammetry, cyklická voltametrie
DME - mercury dropping electrode, kapající rtuťová elektroda
DNA – deoxyribonukleotid acid, deoxyribonukleová kyselina
DPP - differential pulse polarography, diferenční pulzní polarografie
DPV - differential pulse voltammetry, diferenční pulzní voltametrie
dsDNA – double-stranded DNA, dvouřetězcová DNA
EC-STM - electrochemical scanning tunnel microscopy, elektrochemická rastrovací tunelová mikroskopie
EVLS - elimination voltammetry with linear scan, eliminační voltametrie s lineárním skenem
GCE - glassy carbon electrode , elektroda ze skelného uhlíku
GEC - graphite-epoxy composite, směs tuhé epoxidové pryskyřice
HMDE - hanging mercury drop electrode, visící rtuťová kapková elektroda
ITO – indium tin oxide, cínem dopovaný oxid inditý
LSV - linear sweep voltammetry, voltametrie s lineární polarizací
MFE – mercury film electrode, rtuťová filmová elektroda
NA – nucleic acid, nukleová kyselina
ODN – oligodeoxyribonucleotides, oligonukleotidy
QCM – quartz crystal microbalance, křemíkové mikrováhy
RNA – ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
SERS - surface enhanced Raman spectroscopy, Ramanova rozptylová spektroskopie
STM – scanning tunneling microscopy, rastrovací tunelová mikroskopie
ssDNA – single-stranded DNA, jednořetězová DNA
UHV – ultrahigh vakuum, ultravysoké vakuum

1. ÚVOD

Molekula DNA byla objevena v roce 1869 švýcarským lékařem Miescherem. Tehdejší postupy ovšem nedovolovaly získat DNA v tak potřebné čistotě, aby mohla být dále zkoumána. V roce 1952 byla Jamesem Watsonem a Francisem Crickem objevena její dvoušroubovitá struktura. S postupným rozvojem genetického inženýrství dochází i k rozvoji různých oblastí zabývajících se výzkumem DNA, jejích vlastností a možností využití jako je např. genetická daktyloskopie, studium genetických mutací atd.

DNA se skládá ze čtyř základních bází, pyrimidinových bází thymin a cytosin, purinových bází adenin a guanin (obr.1), z cukerné složky 2-deoxyribosy a kyseliny fosforečné.



Obr. 1 Purinové a pyrimidinové báze vyskytující se v DNA [67]

Báze spojené s deoxyribosou se nazývají nukleosidy (cytidin, thymidin, guanosin a adenosin). Jejich estery s kyselinou fosforečnou se pak nazývají nukleotidy.

2. ELEKTROCHEMICKÉ VLASTNOSTI DNA

2.1 Rtuťové elektrody

Báze, nukleotidy a nukleosidy jsou povrchově aktivní látky. Tuto povrchovou aktivitu vykazují i jiné sloučeniny, např. organické molekuly. I ty jsou silně adsorbovány na rtuťových elektrodách v širokém rozsahu potenciálů. Měření impedance vzájemného ovlivňování nukleových kyselin a jejích součástí s elektrodovým povrchem se objevilo už v roce 1961 [1+2]. Diferenciální kapacita elektrodových dvojvrstev je citlivým indikátorem adsorpce. Pokud jsou nukleové kyseliny (NA), báze NA, nukleotidy a nukleosidy adsorbovány na povrchu elektrody, vytlačí z povrchu elektrody molekuly a ionty rozpouštědla a tak sníží hodnotu diferenciální kapacity elektrodových dvojvrstev. K tomu dochází vlivem vyšší dielektrické permitivity rozpouštědla oproti nukleovým

kyselinám. Nejvíce jsou na rtuťových elektrodách adsorbovány báze guaninu. Závislost povrchové koncentrace adsorbovaných molekul na jejich celkové koncentraci byla popsána Frumkinovou a Isingovou adsorpční isotermou [3].

V roce 1965 bylo objeveno, že báze nukleových kyselin mají mimořádně vysokou schopnost zorganizovat se spontánně na povrchu elektrody a podstupovat dvojrozměrnou kondenzaci za vzniku monomolekulární vrstvy [4]. Těmito vysokými kondenzačními schopnostmi bází nukleových kyselin se liší od většiny dalších odvozenin purinu a pyrimidinů, které se aktuálně nevyskytují v nukleových kyselinách (jako isocytosin, isoguanin, xantin). 2-D kondenzace byla pozorována u některých halogen-, aza- a methyl derivátů z běžných bází nukleových kyselin a většinou nukleosidy a nukleotidy běžně se vyskytující v nukleových kyselinách. Hnací sílou 2-D kondenzací bází nukleových kyselin je tvorba vodíkových vazeb mezi plochami orientovaných adsorbovaných molekul anebo vzájemné ovlivňování mezi kolmými adsorbovanými molekulami, tj. síly, které jsou odpovědné za stabilitu dvojitého spirálovitého uskupení DNA.

V přítomnosti kompaktních filmů z bází nukleových kyselin, nukleosidů anebo nukleotidů, které jsou stabilní jen v rozmezí určitých elektrodových potenciálů, se všechny molekuly rozpouštědla na povrchu elektrody nahrazují kondenzovanými částmi nukleových kyselin, tím se značně zmenší diferenciální kapacitance elektrodové dvojvrstvy a objeví se charakteristický propad na křivce kapacitance-potenciál(C-E) a ostrý vrchol na cyklickém voltamogramu. Takové snížení kapacitance byly poprvé pozorovány Lorenzem v roce 1958 v nenasyceném roztoku kyseliny noniové [5] a vysvětleny utvářením kondenzovaného filmu na povrchu elektrody. Pozice proudových maxim na cyklickém voltamogramu (CV) a minim na C-E křivkách závisí na směru potenciálového skenu (hystereze) a tloušťka kondenzovaného filmu se snižuje s rostoucí teplotou. Tyto charakteristické rysy jsou typické vlastnosti 2-D fyzikálně sorbované kondenzované filmy.

Z teplotní závislosti šířky minima anebo z měření povrchových napětí a z průběhu adsorpčních izoterem mohou být určeny interakční energie adsorbovaných molekul a plocha obsazené jednou absorbovanou molekulou [3]. Tato plocha dává informaci o orientaci molekul na povrchu elektrody (adenin a uracil v rovinné orientaci zabírají asi 0,6 nm^2 a v kolmé orientaci asi 0,4 nm^2) [6]. U neutrálních bází je kapacitanční propad obvykle pozorován blízko potenciálu elektrokapilárního maxima (potenciálu nulového náboje). Ionty halogenů mohou navodit druhou oblast potenciálů kondenzace, což bylo pozorováno u adeninu [7] a cytosinu [8]. Existence dvou oblastí potenciálů kondenzací

byla vysvětlena různou orientací adsorbovaných molekul v těchto oblastech. Orientace bází a nukleosidů v kompaktním filmu, vliv iontů v rozpouštědle a substituentů bází na formaci filmu a energii vzájemného ovlivňování mezi bázemi ve filmu byly dále studovány v [9].

2.1.1 Rtuťové filmové elektrody na uhlíkových substrátech

Před více než 35 lety bylo prokázáno, že uhlíkové substráty modifikované rtuťovými vrstvami, tzv. rtuťové filmové elektrody (MFE), mohou být úspěšně použity v elektrochemické analýze a k detekci stop těžkých kovů v životním prostředí a potravinových vzorcích v rozmezí potenciálů jako u rtuťových elektrod [10]. Rtutí modifikovaná uhlíková elektroda spojuje výhody uhlíkových a rtuťových elektrod. Tyto elektrody mají široký rozsah pracovních potenciálů, přiměřenou reprodukovatelnost povrchu elektrody a jsou méně ovlivněny tenzidy než pevné kovové elektrody. Použití MFE je omezené kvůli krátké stabilitě povrchu modifikovaného rtutí (od minut až do hodin). Možnosti použití MFE v elektrochemické analýze různých anorganických iontů a organických sloučenin v různých environmentálních a analytických vzorků byly shrnuty nedávno [11].

V průběhu posledních deseti let byly MFE použity pro voltametrické a impedanční analýzy DNA, RNA a syntetických polynukleotidů [12].

Bylo ukázáno, že MFE mohou být vhodné pro studium adsorpce, 2-D kondenzace a vytváření uspořádaných vrstev a kinetik fázového přechodu různých vrstev složek nukleových kyselin.

2.2 Stříbrné elektrody

Vytváření vrstvy uracilu na Ag(111) a Ag(100) elektrodách ve vodných roztocích byly studovány cyklickou voltametrií CV a ze závislosti kapacitance-potenciál [13]. Byla prokázána existence dvou zřetelně odlišných organizovaných vrstev uracilu na obou krystalových rovinách. První z nich byla vytvořena ve středních pokrytích a potenciálech blízko u potenciálu nulového náboje elektrolytu a odpovídá 2-D kondenzovanému fyzikálně sorbovaného filmu. Druhý typ vrstvy byl vytvořen při kladných hustotách náboje a vykazuje extrémní teplotní stabilitu. Tento film byl určen jako chemisorbovaný uracil. Adsorpce 6-methyluracilu, thyminu a 5,6-dimethyluracilu z vodných roztoků na Ag(111) byl sledován CV, měřením kapacity a proudovými přechody k objasnění role povrchu elektrody a mezimolekulových sil při tvorbě uspořádaných vrstev. Z

vypočítaných volných adsorpčních entalpií byly stanoveny sekvence stability pro kondenzovanou fyzikálně adsorbovanou fázi [14].

Byla zkoumána také adsorpce uridinu na Ag(111) a sledována kinetika mezifázových přeskupení zaznamenáváním křivky závislosti proudu vs. čas. Potenciálem indukované změny v koordinaci thyminu na polykrystalických stříbrných elektrodách byly studovány metodou SERS pro kladnější potenciály vzhledem k potenciálu nulového náboje až do konce rozsahu dvojvrstvy. V tomto rozsahu potenciálů lze získat dvě odlišné sady spekter. Oba rozdílné stavy odpovídají chemisorbovaným fázím thyminu na stříbru, kde se na povrch vážou různé heteroatomy. Při méně pozitivních potenciálech je za vazbu je odpovědný jeden z kruhových kyslíkových atomů a molekula se nakloní. Při kladnějších potenciálech vytváří novou vazbu s povrchem - jeden z dusíkatých atomů heterocyklu, možná deprotonovaný, a molekulární osa se blíží kolmicí k povrchu.

Ramanovou a SERS spektroskopií s využitím stříbrného koloidu byly identifikovány dva tautomery deprotovaného uracilu a sledováno jejich jejich zastoupení v závislosti na koncentraci uracilu a pH roztoku [15]. Vzájemné interakce mezi uracilem a elektrochemicky zdrsněnou stříbrnou elektrodou byly podobné těm mezi uracilem a stříbrným koloidem. Spektrální změny způsobené měnícím se potenciálem elektrody jsou nejspíše projevem induktivního působení kovu než reorientací molekul na povrchu kovu [15]. S pomocí výše uvedených stříbrných elektrod a SERS byly studovány také povrchové interakce a orientace molekul adeninu a jeho analog [16], cytosine a jeho derivátů [17] a hypoxantinu [18].

2.3 Zlaté elektrody

Adsorpce cytosinu na zlaté elektrodě z 0,1 M vodného roztoku $NaClO_4$ a $HClO_4$ byly studovány *in situ* povrchově zesílenou infračervenou absorpční spektroskopií a cyklickou voltametrií [19]. Ze spektrální analýzy bylo zjištěno, že cytosin je fyzikálně sorbovaný při negativních potenciálech a chemisorbovaný při kladných potenciálech. Při obou způsobech sorpce jsou jeho molekuly orientované N(3), C=O a NH_2 skupinami směrem k povrchu. Dvojice redox píků pozorovaných v cyklickém voltamogramu byla připsána transformaci mezi fyzikální a chemickou adsorpcí.

Bylo ukázáno, že cytidin v kyselém prostředí (pH 4,2) a neutrálním prostředí (pH 7,0) tvořil na Au(111) fyzikálně sorbovanou 2-D kondenzovanou vrstvu v rozmezí potenciálů 0,3 V až + 0,07 V [20]. V pozitivních potenciálech (okolo +0,23 V) cytidin

tvoří v kyselém a neutrálním roztoku uspořádané chemisorbované vrstvy, které jsou jen málo ovlivněné změnou teploty nebo koncentrace.

Adsorpce uracilu na zlatých monokrystalových elektrodách různé krystalografické orientace byla popsána s využitím elektrochemických a mikroskopických technik. Fyzikálně sorbovaný film z rovinně orientovaných molekul uracilu spojených vodíkovými vazbami se vytváří na záporně nabité Au(100) elektrodě. Spolu se změnami v elektronickém stavu adsorbovaného uracilu dochází při změně potenciálu ke kladnějším hodnotám k fázové přeměně, až vznikne chemisorbovaná vrstva. Dochází také ke změně orientace z rovinné na kolmou a vzniká specifický koordinační komplex se substrátem Z infračervených spekter lze odvodit, že uracil a thymin mají podobné koordinační uspořádání s povrchem a s oběma exocyklickými atomy kyslíku a deprotonovaným N(3) čelně k povrchu ve svisle orientovaném chemisorbátu. Thymin vykazuje menší uspořádané domény, které jsou rozšířeny v jednom směru kvůli prostorovým požadavkům methylové skupiny na thyminu.

Dvouřetězcové oligonukleotidy (poly(dA_{30}).poly(dT_{30})) adsorbované na zlatých elektrodách byly zkoumány různými technikami včetně CV, QCM, elektrochemickou rastrovací tunelovou mikroskopií (EC-STM) a Ramanovou rozptylovací spektroskopií (SERS). Výsledky z CV a QCM ukazují, že dvouřetězcová poly(dA_{30}).poly(dT_{30}) tvoří na zlaté elektrodě nasycenou monovrstvu dvouřetězcové DNA (dsDNA) ležící přímo na povrchu. EC-STM byla použita jako přímý důkaz, že dsDNA vytváří na zlatém substrátu vysoce uspořádanou a kompaktní monovrstvu, zatímco jednořetězcová DNA (poly(dT_{30})) se svinuje, a proto nemůže tvořit uspořádanou strukturu. Navíc bylo pomocí SERS experimentů prokázána částečná denaturace duplexů v důsledku různých mezifázových orientací bází adeninu a thyminu na povrchu zlaté elektrody. DNA modifikovaný zlatý povrch je stabilní v širokém rozsahu potenciálů [21]. Organizované monovrstvy oligonukleotidů na polykrystalickém Au a monokrystalu Au(111) byly studovány Wackerbarthem a výsledky byly shrnuty do kapitoly knihy [22].

Komplementární řetězce DNA (ssDNA), navázané jeden na zlatou elektroda a druhý ke zlaté nanočástici, byly hybridizovány na povrchu k vytvoření samoorganizovaného dsDNA mostu mezi dvěma zlatými kontakty [23]. Adsorpcí ssDNA monovrstvy na každém ze zlatých rozhraní se vyloučí nespecifické interakce dsDNA s povrchem a můstek vzniká jen při hybridizaci. Použitá technika kromě dobrého elektrického kontaktu nabízí také topografický kontrast mezi zlatými nanočásticemi a nehybridizovaným povrchem a umožňuje přesné zjištění umístění mostu pro elektrická měření. Byly

provedeny reprodukovatelné AFM experimenty měření vodivosti a byly zjištěny významné rozdíly mezi vodivostí ss- a dsDNA.

Molekuly DNA byly adsorbovány specificky na zlatých površích. Specificita adsorpce byla řízena novým přístupem, při kterém byl zlatý povrch nejprve blokován hydrofobní vrstvou (C18-SH) do různé míry s následnou adsorpcí thiolované DNA. Technika byla aplikována pro krátké i dlouhé řetězce DNA. Bylo prokázáno, že reaktivita thiolovaných krátkých řetězců DNA při vazebné reakci je v přítomnosti alkylthiolové vrstvy víc než řádově zvýšena. Tato metoda blokování je díky hydrofobní a izolační povaze vrstvy C18-SH vrstvy výhodná pro elektronická měření [24].

2.4 Měděné elektrody

Bylo pozorováno, že molekuly bází DNA tvoří málo rozměrné superstruktury na Cu(111) površích díky vodíkovým vazbám mezi molekulami a stejné orientaci bází na povrchu. Formace charakteristických samoorganizovaných struktur závisí nejen na pokrytí molekulami, ale také na rychlosti depozice, a oba parametry naznačují, že dynamický proces na povrchu hraje důležitou roli při jejich tvorbě. Záznamy z STM odhalily, že chemicky inertní Cu(111) substrát umožňuje molekulám difundovat po povrchu a spontánně vznikají jejich vlastní jedinečné struktury: adenin do jednorozměrných molekulárních řetězců, thymin do 2D ostrůvků, guanin do 2D čtvercové mřížky a cytosin do jednorozměrných klikatých molekulárních shluků tvořících síť [25]. Bylo objasněno, že nejstabilnější dimery, svázané vodíkovými můstky, hrají velmi důležitou roli jako zárodek při samoorganizovaném uspořádání molekul adeninu. Tyto difundují v substrátu a shlukují se do dvou odlišných charakteristických superstruktur, jednorozměrné řetězcové a dvourozměrné hexagonální, díky dvěma odlišným způsobům tvorby vodíkových vazeb při nízkém pokrytí a malé rychlosti depozice. Také bylo zjištěno, že adenin chemicky modifikovaný alkyl řetězcem, který brání tvorbě zárodečného dimeru, vytváří náhodně shromážděné malé shluky. Nové struktury ze samoorganizovaných molekul uracilu byly také pozorovány při nižší teplotě na Cu(111). Izolované uracilové trimery se vytvářejí při nízkém pokrytí, zatímco při vyšším pokrytí vznikají 2-D ostrůvky s hexagonální superstrukturou. Dominantní síla odpovědná za formování trimerů a ostrůvků je elektrostatická interakce v důsledku tvorby anizotropních vodíkových vazeb mezi molekulami uracilu.

Semi-empirický výpočet molekulárních orbitalů indikuje existenci převážně stabilních dimerních struktur pro guanin, cytosin a adenin, zatímco takové jevy nebyly

pozorovány mezi možným thyminovým dimerem a dokonce trimer strukturami. Na základě teoretických a experimentálních výsledků lze tvrdit, že tvorba výše uvedených zárodků je rozhodující proces při 2-D samoorganizovaném formování molekul bází DNA na površích Cu(111) [26].

STM obrázky poly(dA-dT)-poly(dA-dT) a poly(dG-dC)-poly(dG-dC) adsorbovaných na Cu(111) substrátech odhalily, že tyto dvě molekuly DNA mají různé adsorbované struktury a topografické výšky. Pozorované strukturální rozdíly jsou přisuzovány rozdílům ve stabilitě párů bází adenin-thymin a guanin-cytosin [27].

2.5 Bizmutové elektrody

Metoda elektrochemické impedance byla využita pro kvantitativní studium kinetik adsorpcí uracilu na ploše monokrystalu bismutu ve vodném prostředí Na_2SO_4. Analýza dat impedance ukazuje, že adsorpční proces uracilu je komplikovaný a je omezený smíšenými kinetikami, tj. pomalými adsorpčními a difuzními kroky. Analýza z různých závislostí ukazuje, že při malých frekvencích a vyšších koncentracích uracilu je možné 2D shlukování jeho molekul [28].

3. ELEKTROCHEMICKÁ REDUKCE A OXIDACE DNA

3.1 Redukce a oxidace bází nukleových kyselin

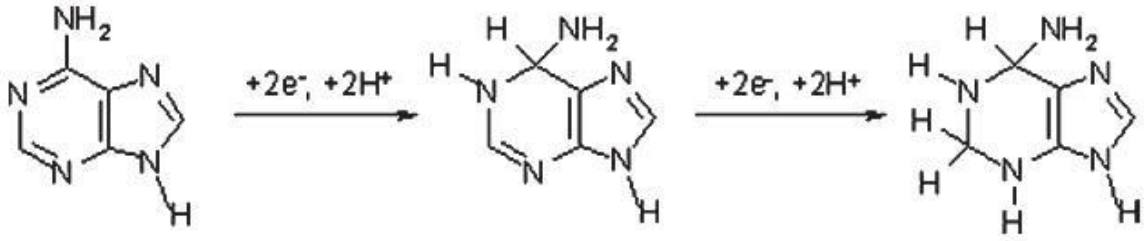
V roce 1958 přišel E. Paleček [29] na to, že všech pět bází, vyskytujících se v nukleových kyselinách, poskytuje oscilopolarografický signál. Tento signál byl zaznamenán pro příslušné nukleotidy i nukleosidy adeninu, cytosinu a guaninu.

3.1.1 Redukce na rtuťové elektrodě

Redukci na rtuťové elektrodě podléhá v protonizované formě adenin a cytosin a i jejich nukleosidy a nukleotidy. Redukce probíhá ve vodném prostředí.

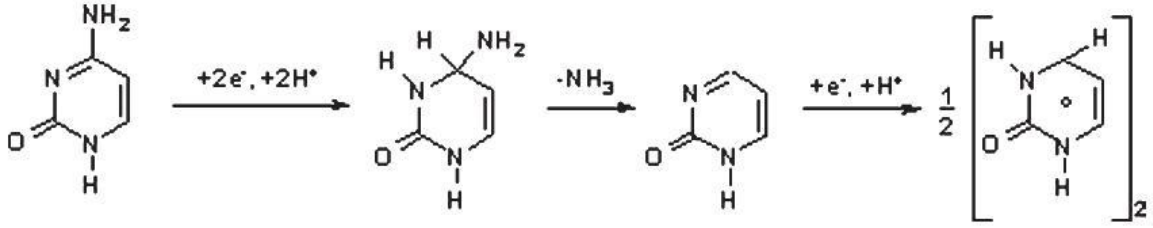
Adenin poskytuje jednoduchou, širokou a difúzí řízenou polarografickou vlnu závislou na pH ($E_{1/2}$ = -0,975 až 0,084 a pH= 1 až 6). Redukční vlna adeninu má téměř stálou výšku až do pH 4 nebo 5, kdy se začne snižovat se stoupajícím pH a zmizí při pH 6 nebo 7. Mechanismus elektrodových reakcí byl studován hlavně Janíkem a Elvingem [30]. Redukce adeninu zahrnuje primární redukci dvojné vazby N(1)=C(6) za vzniku

1,6-dihydro-6-aminopurin a v dalším kroku až na 1,2,3,6-tetrahydro-6-aminopurin(obr. 2). Redukční mechanismus je stejný i u adeninových nukleotidů a nukleosidů.



Obr. 2 Reakční schéma polarografické redukce adeninu [31]

Cytosin také poskytuje jednoduchou, na pH závisející polarografickou vlnu ($E_{1/2}$ = -1,125 až 0,073 V a pH= 4 až 6) [32]. Základní reakční schéma zahrnuje rychlou protonizaci na pozici N(3), která vede ke vzniku elektroaktivní látky. Dvou elektronové redukce dvojné vazby N(3)=C(4)**,** po které dochází redukcí k tvorbě karbaniového iontu. Jeho protonací a následnou deaminací se regeneruje vazba N(3)=C(4) a vzniká 2-oxypyrimidin. Protonace a další jednoelektronová redukce 2-oxypyrimidinu poskytuje volný radikál, který pak dimeruje na 6,6´-bis(3,6)-dihydropirimid-2-on (obr. 3). Stejný mechanismus redukce je navržen pro nukleotidy a nukleosidy cytosinu.



Obr. 3 Reakční schéma polarografické redukce cytosinu [31]

Guanin může být na rtuťové elektrodě redukován při vysoce záporných potenciálech blízkých redukci základního elektrolytu [33].

Thymin a uracil jsou redukovány na rtuťové elektrodě v nevodných roztocích. Katodická stripping voltametrie a katodická přenosová rozpouštěcí (stripping) voltametrie vyvinutá Palečkem [34] může být použita k určování nízkých koncentrací látek, které tvoří špatně rozpustné sloučeniny se rtuťovou elektrodou.

Báze nukleových kyselin mohou být stanoveny pomocí techniky CSV na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) v nanomolárních koncentracích v přítomnosti malého množství měďných iontů, kdy se tvoří špatně rozpustné sloučeniny měďných iontů s purinovými bázemi [35]. Bylo zjištěno, že tyto látky mohou být akumulovány na povrchu elektrody buď redukcí Cu^{2+} iontů na HMDE nebo oxidací kapalného amalgámu mědi. Komplex purinová báze-Cu^{+} byl katodicky nebo anodicky rozpouštěn a na základě získaného voltametrického signálu byla možná detekce purinových bází DNA při velmi nízkých koncentrací (až desítky pikomolů).

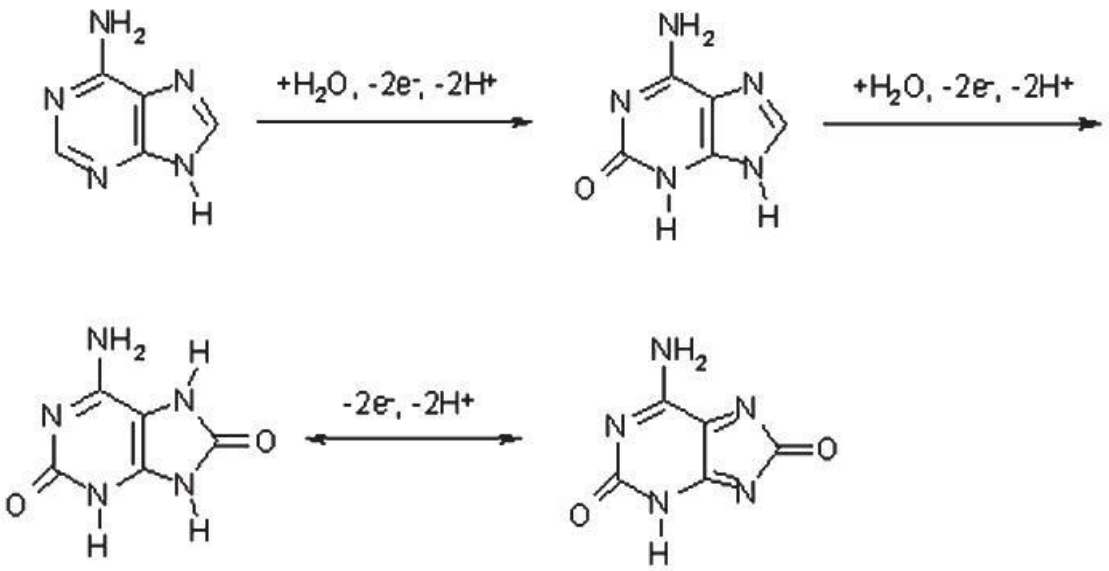
Dalšími studiemi bylo také zjištěno, že ke tvorbě komplexu purinová báze-$Cu^{(I)}$ nedochází jen na kapalných rtuťových elektrodách, ale i na pevných uhlíkových elektrodách. Při anodickém rozpouštění komplexu purinová báze-$Cu^{(I)}$, který je na povrchu uhlíkové elektrody akumulován elektrochemicky, došlo ke zvýšení oxidačních signálů purinových bází DNA.

Pro rozlišení redukčních signálů adeninu nebo cytosinu v krátkých syntetických homooligodeoxynukleotidech (dA(9) a dC(9)) může být použita eliminační voltametrie s lineárním skenem (EVLS) [36]. Ve srovnání s běžnými elektrochemickými metodami (lineární, diferenční pulzní a square-wave voltametrie) umožňuje EVLS rozlišit překrývající se signály s pomocí funkce, která eliminuje nabíjecí a kinetické proudy (I-c, I-k) a zachová difúzní proud (I-d). Pro adsorbovanou elektroaktivní látku tato eliminační funkce poskytne výrazný pík-protipík, který byl úspěšně využit při analýze přesahujících se redukčních signálů adeninu a cytosinu na HMDE. Studovaná výška a potenciál signálu byly ovlivněny poměrem dC(9)/dA(9), časem akumulace, rychlostí míchání během adsorpce a pH.

3.1.2 Oxidace na uhlíkových elektrodách

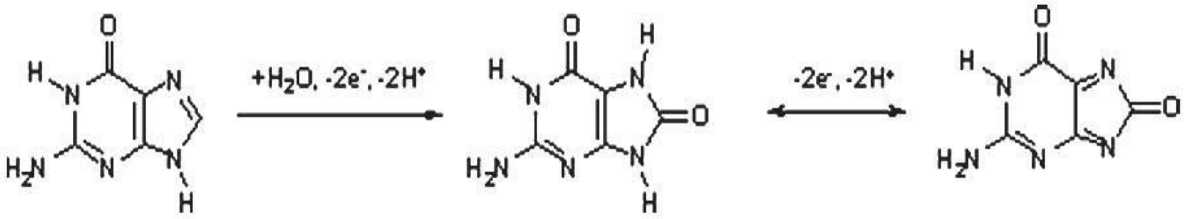
Purinové báze, nukleosidy a nukleotidy jsou oxidovány v širokém rozsahu pH na uhlíkových elektrodách.

Mechanismy elektrooxidace adeninu na grafitových elektrodách zahrnuje dvě následné oxidace, spojené s přenosem dvou elektronů a dvou protonů, za vzniku nejprve 2-oxy a poté 2,8-dioxyadeninu. Dále pak dva elektrony oxidují dvojnou vazbu na C(4)=C(5) a vzniká dikarboniový ion.



Obr. 4 Reakční schéma elektrochemické oxidace adeninu [37]

Guanin je oxidován 2 elektrony na N(7)=C(8) a vzniká 8-oxyguanin, který je ihned oxidován v dalším procesu, kdy dojde k přenosu dvou elektronů a dvou protonů, na diimin (obr. 5). Tento produkt se sekundárně hydratuje, štěpí a oxiduje na parabanovou kyselinu nebo sekundárně hydrolyzuje na oxalylguanidin. Asi 4,7 elektronů jsou přeneseny během oxidace guaninu, což odpovídá čtyřem elektronům v primárním procesu přenosu elektronů plus další elektrony pro vznik parabanové kyseliny. Ke sledování oxidace redukčního produktu guaninu (7,8-dihydroguanin) může být použito cyklické voltametrie.



Obr. 5 Reakční schéma elektrochemické oxidace guaninu [38]

Elektrochemická oxidace adenosinu a adenosin monofosfátu byla studována ve fosforečnanovém pufru v rozmezí pH 1,4 až 9,8 na pyrolitické uhlíkové elektrodě [39]. Na základě elektrochemické, spektrochemické analýzy a analýzy produktů byl navržen

detailní redoxní mechanismus pro vznik produktů oxidace v neutrálním a alkalickém prostředí.

Elektrochemická impedanční spektroskopie byla použita pro studium absorpce a oxidace guaninu a jeho nukleosidu, guanosinu a adeninu na elektrodě ze skelného uhlíku (GCE) [40]. Impedanční měření za různých koncentrací a s použitím různých potenciálů ukázalo, že všechny tři báze se absorbují na elektrodu a blokují její povrch. Ozařování elektrody nízkofrekvenčním ultrazvukem při záznamu impedančních spekter zvýšilo transport molekul k povrchu elektrody; docházelo ke kavitačnímu čištění povrchu a odstranily se tak silně adsorbované molekuly bází. Tímto způsobem provedené sonoelektrochemické experimenty dovolily studovat elektrodový proces za nepřítomnosti adsorpce a byly vypočítány rychlostní konstanty oxidace. Oxidace thyminu a cytosinu na uhlíkové elektrodě byla pozorována Oliveira-Brettem a Matysikem [41].

Voltametrická oxidace všech monofosfátových nukleotidů DNA byla studována v širokém rozsahu pH diferenční pulzní voltametrií na GCE. Experimentální podmínky jako velikost elektrody, složení základního elektrolytu a pH byly optimalizovány pro co nejlepší rozdělení píků a vyšší proudy. To dovoluje současné určení všech čtyř bází DNA v ekvimolárních směsích s detekčními limity v nanomolárním rozsahu při fyziologickém pH. Bylo možné také zjistit oxidaci jednotlivých purinových a pyrimidinových nukleotidů volných v roztoku nebo jako monomery v ssDNA.

Směs tuhé epoxidové pryskyřice (GEC) má nerovný povrch dovolující adsorpci oligonukleotidů DNA a volných bází DNA za použití jednoduchých a rychlých procedur mokré adsorpce. Na rozdíl od dalších senzorů užívaných pro elektrochemický genosenzing jsou oxidační potenciály při použití této elektrody mnohem nižší. Volná guaninová báze se oxiduje při 0,35 V, zatímco adenin při 0,63 V (proti Ag/AgCl). Volné báze cytosinu a inosinu neposkytují žádné píky v pracovním rozsahu potenciálů. Oxidace guaninu v DNA nastane při 0,55 V, zatímco báze adeninu v DNA jsou oxidovány při 0,85 V. Pro specifickou detekci sekvencí týkajících se bakterií *Salmonella* byl jako elektrochemický snímač vyvinut nový hybridizační genosenzor bez využití značky [42]. Rozsah hybridizace mezi sondou a cílovou DNA na povrchu GEC byl určen technikou DPV z oxidačního signálu guaninu z cílové DNA.

3.1.3 Oxidace na diamantové elektrodě

Borem dopovaný diamant se jeví jako materiál, který je velmi vhodný pro elektroanalytickou chemii hlavně kvůli jeho vysoké chemické stálosti, vysoké elektrické měrné vodivosti a velkému rozsahu pracovních potenciálů ve vodném prostředí. Poslední uvedená vlastnost umožnila studium přímé oxidace dvou elektroaktivních nukleosidů, guanosinu a adenosinu [43]. Borem dopovaná diamantová elektroda (BDD) byla nejprve aktivovaná aplikací vysokých oxidačních potenciálů dovolující zvětšit anodický rozsah potenciálů díky oxidaci CH povrchových skupin na hydroxyl a karbonyl skupiny. Guanosin (1,2 V proti Ag/AgCl) a adenosin (1,5 V proti Ag/AgCl) mohly být elektrochemicky detekovány s přijatelným poměrem signál/ šum. Elektrochemický vzor každé oxidovatelné báze byl určen použitím DPV v roztocích obsahujících jeden nebo oba nukleosidy. Tyto experimenty poukázaly na adsorpci oxidačních produktů na diamantovém povrchu. Skenovací elektrochemickou mikroskopií byly tyto adsorpční jevy zkoumány na mikroskopické úrovni. Bylo potvrzeno možné použití BDD elektrod pro přímé elektrochemické stanovení syntetických oligonukleodtidů.

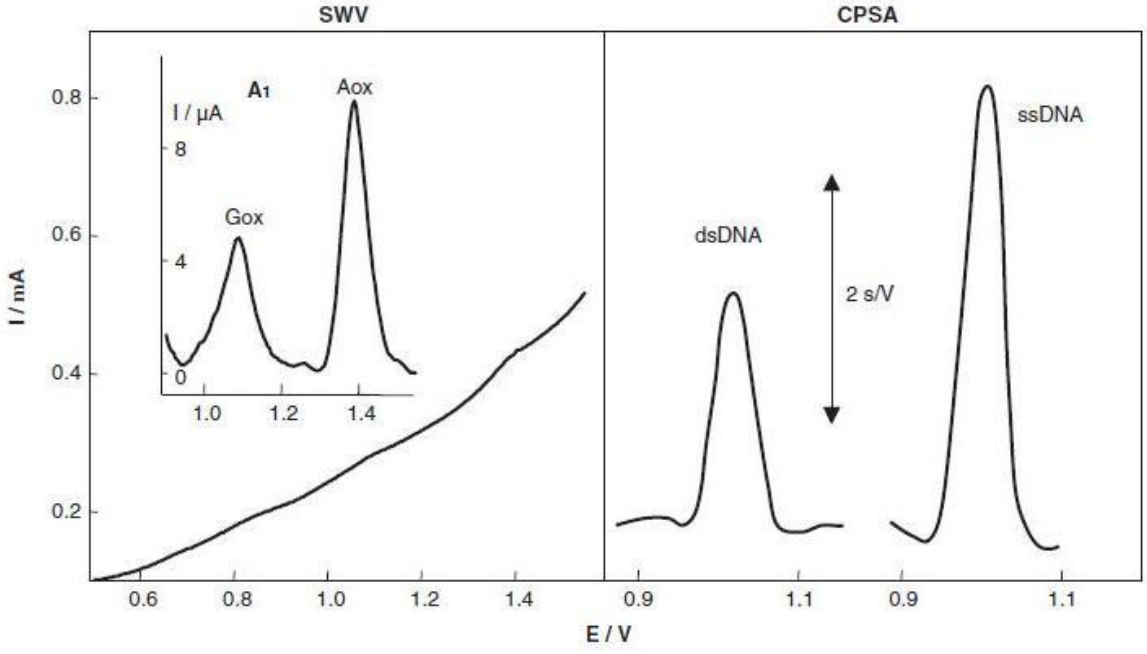
3.2 REDUKCE A OXIDACE NUKLEOVÝCH KYSELIN

Schopnost nukleových kyselin (NA) přijímat nebo poskytovat elektrony při interakci s elektrodami byla pozorována před více než 40 lety [29] a dále byla v průběhu let zkoumána v některých laboratořích. Obecně však na základě některých prací panoval názor, že NA jsou elektroinaktivní [44] a měli by se značit elektroaktivními látkami. Toto tvrzení bylo mylně podporováno v posledním desetiletí, kdy se populárním stal výzkum senzorů hybridizace DNA a mnoho výzkumných pracovníků využívalo zlaté elektrody pro elektrochemické studie DNA, na kterých byla DNA elektroinaktivní. Zlaté elektrody jsou vhodné k fixaci thiolovaných oligodeoxyribonukleotidů (ODN), ale neznačená chromozomální DNA se váže jen slabě a literatury o elektroaktivitě NA na těchto elektrodách je velmi málo. Elektrooxidaci nukleotidů purinu stejně jako nativní a denaturované DNA na zlatých mikroelektrodách prezentoval Pang [45]. Ferapontova a Dominiques [46] publikovali v poslední době oxidaci guaninu na polykrystalické zlaté elektrodě. Při použití vhodných elektrochemických metod poskytuje DNA i RNA výrazné

redukční a oxidační signály na rtuťových elektrodách a oxidační signály na uhlíkových elektrodách.

3.2.1 Oxidace na pevných elektrodách

Oxidace guaninových a adeninových zbytků polynukleotidů na uhlíkových elektrodách byla uveřejněna již koncem sedmdesátých let [47] a brzo poté byly voltametrické oxidační signály využity ve výzkumu DNA a RNA. Voltametrické píky DNA však nebyly příliš zřetelné a citlivost analýzy DNA a RNA byla podstatně nižší než na rtuťových elektrodách. V roce 1995 bylo ukázáno, že aplikací propracované korekce na základní linii se velmi zlepšil tvar oxidačních píků a zvýšila se citlivost analýzy nukleových kyselin na uhlíkových elektrodách. Použitím chronopotenciometrické rozpouštěcí analýzy s konstantním proudem nebo square-wave rozpouštěcí voltametrie se zvýšila citlivost stanovení DNA a RNA o 2-3 řády (viz obr. 6) a stala se tak srovnatelnou s citlivostmi získanými na rtuťových elektrodách.



Obr. 6 Oxidace DNA na uhlíkových elektrodách [48]

SWV…Square wave voltametrická křivka oligodeoxynukleotidu (AAAAGGAGAG) před a po korekci na základní linii. Na obrázku jsou oxidační píky adeninu a guaninu.

CPSA…Chronopotenciometrická striping analýza ds a ss DNA. Je zobrazen jen oxidační pík guaninu.

Další zlepšení pro analýzu nukleových kyselin bylo nedávno dosaženo použitím uhlíkových vláknových mikroelektrod v nemíchaném roztoku a při nízké iontové síle a použitím uhlíkových nanotrubiček, jejichž možnosti ještě nebyly plně využívány. Docela nedávno Brett [49] poukázal, že kromě guaninu a adeninu také pyrimidinové báze jako cytosin a thymin mohou poskytovat oxidační signály při vysoce pozitivních potenciálech na uhlíkových elektrodách.

Aplikace uhlíkových nanotrubiček v elektroanalýze nukleových kyselin a zvláště biosensorech je velice slibná. Jsou to útvary 10000x tenčí než lidský vlas. Tyto trubičky je možné připravit výbojem v oblouku mezi dvěma uhlíkovými elektrodami, laserovou ablací uhlíku anebo chemickou depozicí par. Uhlíkové nanotrubičky mohou zlepšovat elektrochemickou reaktivitu důležitých biomakromolekul včetně oxidace guaninových zbytků v DNA. Tyto nanotrubičky také mohou fungovat jako rezervoáry enzymů a dalších katalyticky aktivních složek v DNA senzorech, zvláště v kombinaci s dvoupovrchovou technikou.

Mezi dalšími pevnými elektrodami aplikovanými v elektrochemii nukleových kyselin jsou stříbrné a měděné elektrody. Na měděných elektrodách ve spojení s AC voltametrií byly pozorovány signály oxidace cukerných zbytků a tato metoda byla použita pro stanovení nukleotidů, ODN a DNA. Thorpova skupina studovala oxidační odezvy DNA měřené ITO elektrodami modifikovanými nitrocelulózovými nebo nylonovými membránami nebo se samoorganizovanými monovrstvami dikarboxylátu [50-51]. V těchto experimentech byla DNA navázána na elektrodu buď kovalentní vazbou nebo adsorpčními sílami v modifikované vrstvě. Čistá ITO elektroda DNA neadsorbovala. Oxidace guaninu v DNA byla zprostředkována redoxním chelátem kovu [$Ru(bipy)_3$], který přenášel elektrony na povrch elektrody z DNA buď v roztoku nebo jako fixovaný na film modifikátoru [50+51]. Rovněž byla použita metoda fixace redoxního mediátoru na ITO elektrodu modifikovanou elektropolymerizovaným poly[$Ru(bipy)_3$] filmem.

3.2.2 Redukce

Doposud byla elektroredukce nukleových kyselin pozorována výhradně na rtuťových elektrodách. Rtuťové elektrody jsou zvláště citlivé na malé změny v konformaci DNA způsobené nukleázami, chemickými a fyzikálními činiteli, které zahrnují i ionizační záření. Lineární nativní dvouřetězcová DNA v neutrálním pH a nízkých iontových silách neposkytuje žádný polarografický redukční signál (na DME) při pokojové teplotě [52]

dokonce ani při koncentracích 0,5 mg/ml. Denaturovaná DNA a další jednořetězcové NA (ssNA) obsahující adeninové anebo cytosinové zbytky byly za stejných podmínek polarograficky redukovatelné. Polarografický signál poskytnutý denaturovanými chromozomálními ssNA byl dost nízký kvůli pomalému transportu jejich molekul k elektrodě. Klasická polarografie tak není příliš vhodnou technikou pro biochemickou analýzu požadující citlivější metody. Derivační pulzní polarografie (která byla použita pro analýzu DNA již v roce 1960) dovolila detekci ssDNA v μM a menších koncentracích (vztaženo k obsahu monomeru).

Jednořetězcové nukleové kyseliny obsahující cytosin nebo adenin byly redukovatelné v neutrálním a slabě kyselém pH s polarografickými (s DME) nebo voltametrickými (s HMDE) redukčními signály okolo -1,4 V. Protonované formy nukleových kyselin byly nevratně redukovány v adsorbovaném stav. V rozsahu pH 6,0 – 8,7 (v základním elektrolytu mravenčanu amonném) byly v denaturované DNA redukovány zbytky adeninu a cytosinu [53].

4. DETEKCE HYBRIDIZACE DNA

K detekci hybridizace (spojení dvou komplementárních řetězců) DNA se nejčastěji používají elektrody uhlíkové a zlaté. Průběh detekce je možné rozdělit do tří kroků. Prvním je fixace DNA na povrch elektrody. Poté následuje vlastní hybridizace DNA a následná detekce tohoto spojení.

4.1 Fixace DNA na povrch elektrody

Fixovat DNA na povrch elektrody je možné metodami fyzikálními (adsorpce, fixace pomocí membrán, v gelech nebo přímo do materiálu elektrody) nebo chemickými (tvorbou kovalentních vazeb). Úseky DNA, které podléhají hybridizaci, se nazývají hybridizační sondy. Jde o část řetězce s délkou od 20 do několika tisíc nukleotidů, pro praktické užití je však nejvhodnější sonda oligonukleotidová, tj. kratší než 50 nukleotidů [54].

Původně se k fixaci DNA využívalo fyzikální metody fixace na membrány. Materiál této membrány byla nitrocelulóza. V současné době se kromě nitrocelulózové membrány používají i jiné materiály jako je sklo, keramika, křemičité membrány, magnetické částice nebo nylon či polymery [55]. Lze ale také použít elektrody jako například uhlíkové nebo

zlaté. Techniky fixace DNA závisí na typu použité elektrody, na jejich užití. Hlavním cílem tohoto kroku je zafixovat na povrch elektrody co nejvíc DNA a zároveň zabránit zachycení nežádoucích látek.

4.1.1 Fixace DNA na uhlíkové elektrody

Fixovat DNA můžeme na různé typy uhlíkových elektrod, ať už jde o pastovou uhlíkovou elektrodu nebo pyrolytickou grafitovou elektrodu, grafit z tužky, uhlíkovou tištěnou elektrodu, elektrodu z uhlíkového vlákna nebo ze skelného uhlíku [56].

Jednou z možností je fixace pomocí adsorpce. Je to proces reverzibilní a závislý na koncentraci adsorbované látky, čistotě, iontové síle, pH roztoku, teplotě, velikosti povrchového náboje. Jednoduchou a rychlou je adsorpce elektrochemická, avšak její nevýhodou je riziko desorpce z povrchu elektrody. DNA se snadno absorbuje na povrch uhlíkových elektrod imobilizací za stálého potenciálu.

Další možností je fixace v objemu uhlíkové pasty. Pro fixaci DNA je touto metodou využito křemičitých kuliček, které jsou pokryté vrstvou oxidu titaničitého. Takto upravené kuličky jsou vmíseny do materiálu uhlíkové pastové elektrody [57] a na ně fixována DNA.

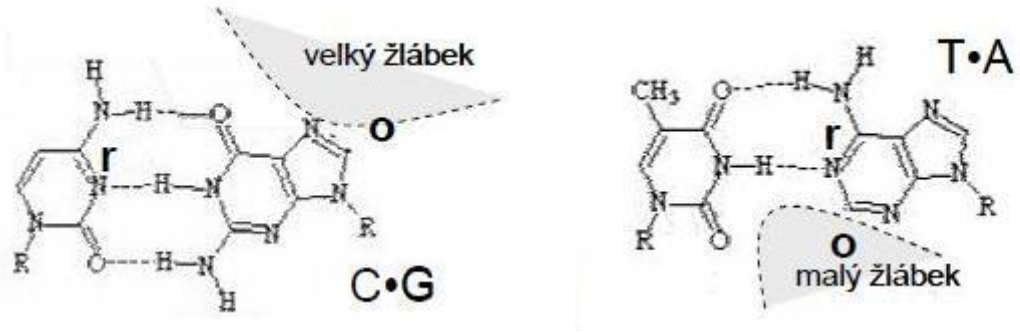
Imobilizace DNA je možná také s využitím polymeru, který je ve formě filmu. Tento film je spontánně tvoří z reaktivních monomerů, které jsou připraveny elektrochemickou oxidací. Výhodou těchto filmů je jejich možnost vytvoření i na nerovném povrchu nebo na povrchu mikroelektrod. V průběhu elektropolymerace může docházet k různým jevům. Pokud jsou přítomny biomolekuly, dochází k jejich zachycení do vnitřku membrány, lze ovlivnit i její vlastnosti přídavkem dalších látek do elektropolymerační směsi. Některé elektropolymerní vrstvy mohou být vodivé, což vede k usnadnění transportu elektronů mezi elektrodou a biomolekulami. Nejvyužívanějšími polymery jsou polypyrroly nebo také polyakrylamidy [58].

Mezi další možnosti patří např. vazba avidin-biotin, mezi nimiž je silná nekovalentní vazba, vazba biotinylovaných sond na koloidní vrstvu zlata a neutravidinu nebo kovalentní vazba –aktivace povrchu.

4.2 Hybridizace DNA

Hybridizaci lze vysvětlit jako spárování dvou jednořetězcových DNA. Vzniká tak dvou-šroubovice DNA na základě párování bází dle pravidel Watson-Cricka. Báze cytosin

a guanin jsou vzájemně spojeny třemi vodíkovými vazbami, adenin a thymin pak dvěma vodíkovými vazbami (obr.7).



Obr. 7 Watson-Crickovo párování bází [67]

Průběh tohoto párování závisí na různých faktorech, kterými jsou například délka hybridizační sondy (tedy počet bází účastnících se hybridizace), její koncentrace, komplementarita.

4.3 Detekce spojení

K detekci hybridizace nukleových kyselin lze využít metod elektrochemických, optických a metody QCM [59]. Budeme-li sledovat změny elektrochemických vlastností mezi jednořetězovou a dvouřetězovou DNA, použijeme metodu přímé elektrochemické detekce. Nevýhodou této metody je nižší citlivost než při použití indikačních látek.

Jako indikační látky se používají především interkalátory, které se váží dovnitř dvoušroubovice [60]. Mezi tyto látky patří např. ethidium, akridin a další.

Dále se ke značení používají např. komplexy oxidu osmičelého, organické komplexy přechodných kovů jako je ferocen, enzymy nebo nanočástice.

Oxid osmičelý je elektroaktivní látka, používá se v kombinaci s vhodným ligandem a jako strukturní sonda je ve výzkumu DNA využíván již řadu let. Ligandem, dusíkatým ligandem, může být 2,2´-bipyridil, 1,10-fenantrolin a jiné.

Nejčastěji používané enzymy ke značení jsou peroxidasy nebo fosfatasy. Použití molekuly enzymu katalyzuje vznik většího množství elektroaktivních značek, které pak poskytují elektrochemický signál.

Vlastní detekce a metoda imobilizace hybridizační sondy se vzájemně prolínají. Obecně lze techniky detekce rozdělit do dvou kategorií. První jsou techniky založené na

imobilizaci hybridizační sondy na povrchu elektrody, tzv. jednopovrchové techniky. Druhé, dvoupovrchové techniky, spočívají v imobilizaci sondy na povrch, kde proběhne hybridizace. Poté se cílová část vlákna od sondy oddělí a provede se příslušné stanovení.

4.3.1 Detekce pomocí sond imobilizovaných na povrchu elektrody

Detekce využitím vlastní elektrochemické aktivity DNA

Tato technika je závislá na elektroaktivitě mezi sondou a cílovým vláknem. Tuto aktivitu způsobuje odlišnost obsahu některé báze. Nejvíce tento jev způsobuje guanin, je možno jej stanovit elektrochemickou oxidací [61]. Principem této detekce je nahrazení všech guaninů v sondě např. hypoxantinem (jde o derivát purinu), který se páruje stejně jako guanin s cytosinem. Pokud se pak objeví elektrochemické signály, došlo k hybridizaci s cílovým vláknem, které guanin obsahoval.

Detekce použitím signálních sond

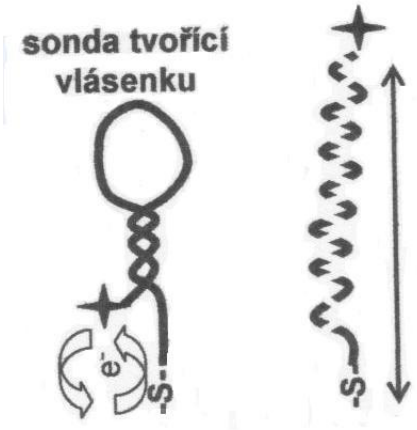
Při této metodě jsou přítomny dvě sondy. První je zakotvena na elektrodě, s níž dojde k hybridizaci. Poté proběhne hybridizace i s druhou, signální sondou, která nese elektrochemicky aktivní látku, jejíž signál je sledován.

Obr. 8 Elektrochemická detekce hybridizace DNA využitím signální sondy [67]

Detekce na principu elektrochemického molekulárního majáku

Sonda je za jeden konec zakotvena na povrchu elektrody a na druhém konci je navázána elektrochemicky aktivní značka. Pokud nedojde k hybridizaci s cílovým vláknem, sonda vytvoří strukturu „vlásenky“. Elektrochemicky aktivní značka je

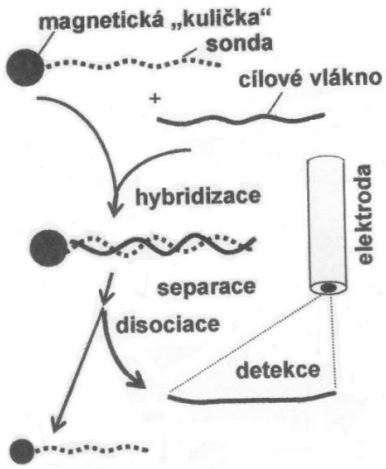
v blízkosti elektrody a poskytuje elektrochemický signál. V přítomnosti cílového vlákna se vytvoří lineární dvoušroubovice, která vzhledem ke vzdálenosti značky neposkytuje elektrochemický signál [62].



Obr. 9 Elektrochemická detekce hybridizace DNA použitím elektrochemického molekulárního majáku[67]

4.3.2 Dvoupovrchové techniky

Senzory založené na imobilizaci sondy na povrchu elektrody z hlediska jednoduchosti provedeni stanovení se jeví jako ideální. Ovšem pro stanovení reálných vzorků, kdy je cílové vlákno delší než sonda a bývá přirozeně dvouřetězcové, je lepší provedení hybridizace a detekce na dvou různých površích [63]. K provedení hybridizace obvykle slouží magnetický nosič (kulička z paramagnetického materiálu) nesoucí hybridizační sondu. Poté lze cílové vlákno oddělit a stanovit příslušnou elektrochemickou metodou.



Obr. 10 Elektrochemická detekce hybridizace DNA založená na separaci cílové DNA pomocí magnetického nosiče [67]

Výhodou tohoto stanovení je možnost nachytání většího množství cílové DNA a povrch pracovních elektrod není nutné upravovat k provádění hybridizace.

Stanovení purinových bází uvolněných ze separovaného cílového vlákna kyselou hydrolýzou

Po proběhnutí hybridizace se sondou umístěnou na magnetické kuličce se cílové vlákno oddělí a uvede do styku s kyselinou chloristou. Tím dojde k uvolnění purinových bází, ty lze stanovit v komplexech s ionty mědi nebo rtuti pomocí rozpouštěcích voltametrických technik na HMDE nebo na amalgámových elektrodách.

Značení cílové DNA komplexy oxidu osmičelého

Metoda je vhodná pro cílové úseky DNA, které neobsahují pyrimidinové nukleotidy. Purinové báze nereagují s komplexy OsO_4.

Signální sondy značené komplexy oxidu osmičelého

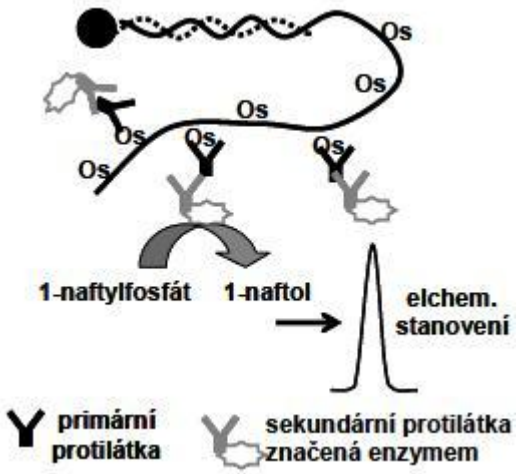
Metoda funguje tak, že hybrid imobilizovaná sonda-cílové vlákno-signální sonda je vytvořen na magnetických kuličkách. Postup je srovnatelný s postupem na obrázku č. 9. Na konec signální sondy se naváží osmiové značky, po odseparování a oddělení navázaných molekul na magnetickou kuličku se stanoví Os na HMDE příp. uhlíkových elektrodách. Tyto signální sondy jsou základem pro diagnostiku některých dědičných chorob [64].

Značení DNA pomocí mikro- nebo nanočástice [65]

Tato metoda vede ke zvýšení citlivosti detekce. Sonda nebo cílové vlákno DNA je označeno větším počtem elektrochemicky aktivních molekul. Na koncovou část se naváže nanočástice např. zlatá nebo ze sulfidů zinku. Po provedení hybridizace se částice rozpustí a stanoví voltametricky nebo rozpouštěcí chronopotenciometrickou analýzou.

Využití enzymů při detekci hybridizace DNA

Použitý enzym katalyzuje přeměnu substrátu na elektrochemicky aktivní indikátor, jehož signál je registrován.



Obr. 11 Detekce hybridizace DNA elektrochemickou imunoanalýzou DNA modifikované Os, bipy s využitím alkalické fosfatasy jako enzymové značky [67]

DNA, která je navázaná na povrch nosiče není nutné odstraňovat z magnetických kuliček, ale celé se přenese do roztoku a proběhne enzymová reakce jako např. na obrázku 11.

5. ZÁVĚR

Výsledky výzkumu a metody zjišťování DNA se v praxi využívají v mnoha oborech. K významným patří kriminalistika, soudnictví, medicína, botanika, archeologie a mnohé další.

Jednoznačné výsledky testů DNA se využívá např. v soudních procesech při určování otcovství, kde test DNA je naprosto nezpochybnitelný.

V oblasti kriminalistiky pak testy DNA stejně nezvratitelně spolu s daktyloskopickými stopami usvědčují pachatele trestných činů na rozdíl od nepřímých důkazů jako jsou pachové stopy, zvukové nahrávky a zejména pak často měněné výpovědi svědků.

V oblasti výzkumu v zemědělství pomáhají výsledky testů DNA výzkumným pracovníkům při šlechtění nejodolnějších, nejvýnosnějších užitkových odrůd rostlin a vyloučení dědičných chorob.

Obdobně jsou využívány výsledky v bádání i v medicíně, kde testy DNA jsou využívány k zjišťování případných dědičných nemocí plodu, k výzkumu v oblasti diagnostiky a léčení leukémie jakož i v dalších specializovaných oborech medicíny.

V archeologii pak výzkum pomocí aplikací testů DNA pomáhají k určování a rozpoznaná archeologických nálezů, totožnosti osob, příslušnosti k určitým kmenovým společnostem, při odkrytí sídlišť, pohřebišť atd.

Je možno konstatovat, že rozvoj metod k zjišťování DNA a jejich praktické využívání v širokém spektru vědeckých disciplín je jedním z nejvýznamnějších objevů poslední doby.

SEZNAM LITERATURY

1. MILLER, I.R., 1961, *The structure of DNA and RNA in the water-mercury interfaces*, J. Mol. Biol. 3, 229-240
2. MILLER, I.R., 1961, *Temperature dependence of the adsorption of native DNA in polarized water-mercury interface*, J. Mol. Biol. 3, 357-361
3. BRABEC, V., VETTERL, V., VRANA, O., 1996, *Experimental techniques in biochemistry, Electroanalysis of Biomacromolecules*, Vol. 3, 287-359
4. VETTERL, V., 1965, *Adsorption of DNA components on the mercury electrode, Experientia* 21, 9-11
5. LORENTZ, W., 1958, *Ùber Die Geschwindigkeit Der Adsorption Und Der Zweidimensionalen Assoziation Hõherer Fettsäuren an Der Grenzfläche Quecksilber-Electrolytlösung*, Z. Electrochem. 62, 192-200
6. BRABEC, V., CHRISTIAN, S.D., DRYHURST, G., 1977, *Interfacial behavior of uracil at the mercury-solution interface. Evidence for surface reorientation processes*, J. Electroanal. Chem. 85, 389-405
7. VETTERL, V., de LEVIE, R., 1991, *The effect of halide ions on the condensation of adenine at the mercury-water interface*, J. Electroanal. Chem. 310, 305-315
8. JURSA, J., VETTERL, V., 1984, *Effect Cl^-, Br^- and I- ions on the adsorption and association of cytosine at a mercury electrode*, Bioelectrochem. Bioenerg. 12, 137-146
9. JURSA, J., VETTERL, V., 1986, *The effect of pH and ionic strength on the association of cytosine on the surface of mercury electrode*, Studia Biophys. 114, 75-82
10. BRAININA, K.Z., NEYMAN, E., 1993, *Electroanalytical Stripping Methods*, Wiley, New York
11. ECONOMOU, A., FIELDEN, P.R., 2003, *Mercury film electrodes: Developments, trends and potentialities for electroanalysis*, Analyst 128, 205-212
12. HASOŇ, JELEN, F., FOJT, L., VETTERL, V., 2005, *Determination of piogram quantities of oligodeoxynucleotides by stripping voltammetry at mercury modified graphite electrode surfaces*, J. Electroanal. Chem. 577, 263-272
13. WANDLOWSKI, T., 1995, *Phase-transitions in uracil adlayers on Ag, Au and Hg electrodes- substrate effects*, J. Electroanal. Chem. 395, 83-89

14. HÖLZLE, M.H., KOLB, D.M., KRZNARIC, D., COSOVIC, B., 1996, *Adsorption and phase formation of uracil derivatives on gold and silver single-crystal electrodes*, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 100, 1779-1790
15. GIESE, B., McNAUGHTON, D., 2002, *Surface –enhanced Raman spectroscopic study of uracil. The influence of the surface substrate, surface potential*, and pH, J. Phys. Chem, B 106, 1461-1470
16. GIESE, B., McNAUGHTON, D., 2002, *Surface-enhanced Raman spectroscopic and density functional theory study of adenine adsorption to silver surfaces,* J. Phys. Chem. B 106, 101-112
17. SÁNCHEZ-CORTÉS, S., GARCÍA-RAMOS, J. V., 2001, *Influence of coverage in the surface-enhanced Raman scattering of cytosine and its methyl derivatives on metal colloids: Chloride and pH effects,* Surf. Sci. 473, 133-142
18. CHOWDHURY, J., MUKHERJEE, K. M., MISRA, T. N., 2000, *A pH dependent surface-enhanced Raman scattering study of hypoxantine,* J. Raman Spectrosc. 31, 427-431
19. ATAKA, K., OSAWA, M., 1999, *In situ infrared study of cytosine adsorption on gold electrodes,* J. Electroanal. Chem. 460, 188-196
20. TAO, N.J., De ROSE, J.A., LINDSAY, S.M., 1993, *Self-assembly of molecular superstructures studied by in situ scanning tunneling microscopy: DNA bases on Au (III),* J. Phys. Chem. 97, 910-919
21. WANDLOWSKI, T., DRETSCHKOW, T., 1997, *Two dimensional nucleation according to an exponential law with surface diffusion- controlled growth in the phose formation of uracil on Au (hkl),* J. Electroanal. Chem. 427, 105-112
22. ZHANG et al, 2002, *Investigation of ordered ds-DNA monolayers on gold electrodes*, J. Phys. Chem. B 106, 11233-11239
23. WACKERBARTH et al, 2004, *Long-range order of organized oligonucleotide monolayers on Au (III) electrodes,* Langmuir 20, 1647-1655
24. NOGUES et al, 2004, *Electrochemical properties of short DNA oligomers characterized by conducting atomic force microscopy*, Phys. Chem. 6, 4459-4466
25. AQUA, T., NAAMAN, R., DAUBE, S.S., 2003, *Controlling the adsorption and reactivity of DNA on gold electrode,* Langmuir 19, 10573-10580
26. FURAKAWA, M., TANAKA, H., KAWAI, T., 1997, *Scanning tunneling microscopy observation of two.dimensional self-assembly formation of adenine molecules on Cu (III) surfaces*, Surf. Sci. 392, L33-L39

27. TANAKA, H., HAMAI, Ch., KANNO, T., KAWAI, T., 1999, *High-resolution scanning tunneling microscopy imagig of DNA molecules on Cu (III) surfaces*, Surf. Sci. 432, L611-L616
28. NISHIMURA, M., TANAKA, H., KAWAI, T., 2002, *Structure of linear double-stranded deoxyribonucleic acid adsorbed on Cu (III) surfaces: A low temperature scanning tunneling microscopy study*, Jpn. J. Appl. Phys. Part-1 Regular Papers Short Notes & Review Papers 41, 7510, 7511
29. KASUK, H., NURK, G., LUST, K., LUST, E., 2003, *Adsorption kinetics of uracil on bismuth single crystal planes*, J. Electroanal. Chem. 550, 13-31
30. PALEČEK, E., 1958, *Oscillographische polarographie der Nuclein sauren und ihrer Bestandteile*, Die naturwissenschaften 45, 186-187
31. JANIK, B., ELVING, P.J., 1968, *Polarographic behavior of nucleosides of purines, pyrimmidines, pyridines, and flavins*, Chem.Rev. 68, 295-319
32. HASOŇ, S., VETTERL,V., 2005, *Electrochemical properties of nucleic acid components*, 52
33. WEBB, J.W., JANIK, B.,ELVING, P.J., 1973, *Cytosine nucleoside-nucleotide series electrochemical study of reduction mechanism, association, and separation*, J. Am. Chem. Soc. 95, 991-1003
34. STUDNIČKOVÁ, M., TRNKOVÁ, L., ZETEK, J., GLATZ, Z., 1989, *Reduction of guanosine at mercury electrode*, Bioelectrochem. Bioenerg. 21, 83-86
35. PALEČEK, E., JELEN, F., POSTHIEGLOVÁ, I., 1989, *Adsorptive transfer stripping voltammetry offers new possibilities in DNA research*, Stud. Biophys 130, 51-54
36. TRNKOVÁ et al, 2003, *Application of elimination voltammetry to the resolution of adenine and cytosine signals in oligonucleotides, I. Homooligonucleotides dA9 and dC9*, Electroanalysis 15, 1529-1535
37. GLODOWSKI, S., BILEWICZ, R., KUBLIK, Z., 1987, *Cathodic and anodic-stripping determination of traces of adenine and adenosine based on accumulation of copper (I) compounds at mercury or amalgama electrodes*, Anal. Chim. Acta 201, 11-22
38. HASOŇ, S., VETTERL, V., 2005, *Electrochemical properties of nucleic acid components*, 54
39. HASOŇ, S., VETTERL, V., 2005, *Electrochemical properties of nucleic acid components*, 55

40. GOYAL, R.N., SANDAL, A., 2003, *Electrochemical oxidation of adenosine monophosphate at a pyrolytic graphite electrode*, J. Electroanal. Chem. 557, 147-155
41. OLIVEIRA-BRETT et al, 2002, *Adsorption of guanine, guanosine, and adenine at electrodes studied by differential pulse voltammetry and electrochemical impedance,* Langmuir 18, 2326-2330
42. BRETT, A.M.O., MATYSIK, F.M., 1997, *Voltammetric and sonovoltammetric studies on the oxidation of thymine and cytosine at a glassy carbon electrode*, J. Electroanal.Chem 429, 95-99
43. ERDEM, A., PIVIDORI, M.I., delVALLE, M., ALEGRET,S., 2004, *Rigid carbon composites: A new transducing material for label-free electrochemical genosensing*, J. Electroanal. Chem. 567, 29-37
44. BERG, H., 1957, *Polarographische untersuchungen an nucleisauren und nucleasen, I. Mitt. Polarographische nachweis von proteinen neben nucleisauren,* Biochem. Z. 329, 274
45. FORTIN et al, *Nucleosides and ODN electrochemical detection onto boron doped diamond electrodes*, Bioelectrochemistry 64, 303-306
46. PANG et al, 1995, *Electrochemical oxidation of DNA at a gold microelectrode*, Electroanalysis 7, 774
47. FERAPONTOVA, E.E., DOMINGUEZ,E., 2003, *Direct electrochemical oxidation of DNA on polycrystalline gold electrodes*, Electroanalysis 15, 629
48. BRABEC, V., 1981, *Nucleic acid analysis by voltammetry at carbon electrodes*, Bioelectrochem. Bioenerg. 8, 437
49. PALEČEK, E., JELEN, F., 2005, *Electrochemistry of Nucleic Acid*, 88
50. OLIVIERA- BRETT et al, 2004, *Voltammetric determination of all DNA nucleotides,* Anal. Biochem. 332, 321
51. NAPIER, M.E., THORP, H.H, 1997, *Modification of electrodes with dicarboxylate self-assembled monolayers for attachment and detection of nucleic acid*, Langmuir 13, 6342
52. NAPIER, M.E., THORP, H.H., 1999, *Electroanalytic oxidation of nucleic acids at electrodes modified with nylon and nitrocellulose membranes*, J. Fluorescence 9, 181
53. PALEČEK, E., 1966, *Polarographic behavior of native and denatured deoxyribonucleic acids*, J. Mol. BIOL. 20, 431

54. HAMES, B. D., HIGGINS, S. J., 1985, *Nucleic acid hybridization: A practical approach*, IRL Press Oxford, Oxford, p. 3
55. WALSH, M. K., WANG, X. WEIMER, B. C., 2001, *Optimizing the immobilization of single-stranded DNA onto glass beads*J. Biochem. Biophys. Methods 47, 221
56. MILLAN, K. M., SPURMANIS, A. J., MIKKELSEN, S. R., 1992, *Covalent immobilization of DNA onto glassy carbon electrodes*, Electroanalysis 4, 929
57. WANG, J., FERNANDES, J. R., KUBOTA, L. T., 1998, *Polishable and renewable DNA hybridisation biosensors*, Anal chem.. 70, 3699
58. CAI, H., YHU, N., JIANG, Y., HE, P., FANG, Y., 2003, *Femtomolar Electrochemical Detection of DNA Hybridization Using Hollow Polyelectrolyte Shells Bearing Silver Nanoparticles*, Biosens. Bioelectron. 18, 1311
59. http: /www.roche-diagnostics.cz/download/la/odborne/pcr2.pdf
60. http:/www.uochb.cas.cz/Zprávy/postGrad2005/7_Stibor.pdf
61. PALECEK, E., FOJTA, M., JELEN, F., VETTERL, V., 2005, *The encyklopedia of electrochemistry, Vol 9- Biochemistry*, Wilea-VCH, Weinheim, 365
62. FOJTA, M., 2006, *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*, 104-106
63. PALECEK, E., JELEN, F., 2005, *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*, Elsevier, Amsterdam, p. 74
64. PALECEK, E., FOJTA, F., 2005, *Bioelectronics*, Wilea-VCH, Weinheim, 365
65. WANG, J., 2005 *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*, Elsevier, Amsterdam, p. 369
66. BRABEC, V., PALEČEK, E., 1974, *Polarographic reduction of adenine and cytosine residues in denatured DNA*, Z. Naturforsch 29, 323
67. FOJTA, M., 2006, *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*, 91-105