

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Kateřina Krpačová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Biosenzory pro detekci nukleových kyselin
Bakalářská práce

2024

Kateřina Krpačová

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Biosensors for the detection of nucleic acids
Bachelor thesis

2024

Kateřina Krpačová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Krpačová**
Osobní číslo: **C21271**
Studijní program: **B0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Biosenzory pro detekci nukleových kyselin**
Téma práce anglicky: **Biosensors for the Detection of Nucleic Acids**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracovat teoretickou rešerši na téma biosenzorů využitelných pro detekci nukleových kyselin
2. V úvodu krátce popsat strukturu nukleových kyselin
3. Dále popsat konstrukci a jednotlivé části biosenzoru
4. Stěžejní část práce věnovat biosenzorům vhodným pro detekci nukleových kyselin, jejich rozdělení do skupin a uvedení výhod a nevýhod jednotlivých typů biosenzorů
5. V závěru práce uvést možnosti aplikace těchto biosenzorů

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Biosenzory pro detekci nukleových kyselin 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 28. 6. 2024

Kateřina Krpačová

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěl velmi poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D za její trpělivost, ochotu, odborné vedení a rady a především za čas, který mi věnovala během psaní mé bakalářské práce. Velké poděkování směřuje i mé rodině a přítelovi, který mě podporoval během studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se věnuje biosenzorům pro detekci nukleových kyselin. V první části práce jsou popsány základní informace o deoxyribonukleové a ribonukleové kyselině, včetně jejich struktury, významu a jejich funkčních a strukturních rozdílů. Dále se poskytuje přehled současných technik používaných k izolaci nukleových kyselin z různých biologických vzorků. Práce se dále zaměřuje na historii a různé typy biosenzorů a jejich potenciální aplikace v klinické, potravinářské a environmentální oblasti.

KLÍČOVÁ SLOVA

nukleové kyseliny, nukleotid, deoxyribonukleová kyselina, ribonukleová kyselina, biosenzor, DNA sonda

TITLE

Biosensors for the detection of nucleic acids

ANNOTATION

This bachelor thesis focuses on biosensors designed for the detection of nucleic acids. The first part of the thesis describes basic information about deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid, including their structure, significance, and functional and structural differences. It further provides an overview of current techniques used for the isolation of nucleic acids from various biological samples. The thesis also examines the history and various types of biosensors, along with their potential applications in clinical, food-related, and environmental fields.

KEYWORDS

nucleic acids, nucleotide, deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, biosensor, DNA probe

SEZNAM ILUSTRACÍ

| | |
|---|----|
| Obrázek 1: Struktura nukleotidu | 15 |
| Obrázek 2: Strukturní vzorce jednotlivých dusíkatých bází | 16 |
| Obrázek 3: Komplementarita bází v DNA | 17 |
| Obrázek 4: Centrální dogma | 18 |
| Obrázek 5: Struktury DNA..... | 18 |
| Obrázek 6: Struktura a spiralizace chromozomu..... | 19 |
| Obrázek 7: Struktura tRNA..... | 22 |
| Obrázek 8: Komponenty biosenzoru | 25 |
| Obrázek 9: Uvolnění H ⁺ iontů důsledkem polymerázové řetězové reakce | 31 |
| Obrázek 10: Princip potenciometrické detekce DNA..... | 31 |
| Obrázek 11: Schéma SPR | 33 |
| Obrázek 12: Interakce nanočástic CeO ₂ s methylovanou a nemethylovanou dsDNA | 34 |
| Obrázek 13: Piezoelektrický jev při mechanické deformaci a aplikovaného napětí... | 36 |
| Obrázek 14: Princip křížových sond..... | 41 |

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

| | |
|-----------|---|
| A | adenin |
| a_{ox} | aktivita oxidované formy analytu |
| a_{red} | aktivita redukované formy analytu |
| ATP | adenosintrifosfát (adenosine triphosphate) |
| AuNP | nanočástice zlata (gold nanoparticles) |
| C | cytosin |
| cDNA | komplementární DNA (complementary deoxyribonucleic acid) |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid) |
| dsDNA | dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina (double-stranded deoxyribonucleic acid) |
| E | potenciál |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid) |
| ELISA | enzymově vázaný imunisorbentní test (enzyme-linked immunosorbent assay) |
| E_{std} | standartní potenciál |
| F | Faradayova konstanta |
| FTIR | infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier transform infrared spectroscopy) |
| G | guanin |
| gDNA | genomová deoxyribonukleová kyselina (genomic deoxyribonucleic acid) |
| GTP | guanosintrifosfát (guanosine triphosphate) |
| HPH | vysokotlaký homogenizátor (high pressure homogenizer) |
| HRP | křenová peroxidasa (horseradish peroxidase) |
| miRNA | mikro ribonukleová kyselina (micro ribonucleic acid) |

| | |
|-------|---|
| mRNA | messenger ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid) |
| MS | hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry) |
| n | počet elektronů |
| NA | nukleová kyselina (nucleic acid) |
| PCR | polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction) |
| R | univerzální plynňová konstanta |
| RNA | ribonukleová kyselina (ribonucleic acid) |
| rRNA | ribozomální ribonukleová kyselina (ribosomal ribonucleic acid) |
| SICUA | kolorimetrie nemodifikovaných částic zlata indukovaná solí (salt-induced colorimetry of unmodified AuNPs) |
| siRNA | malá interferující ribonukleová kyselina (small interfering ribonucleic acid) |
| snRNA | malá jaderná ribonukleová kyselina (small nuclear ribonucleic acid) |
| SPE | extrakce na pevné fázi (solid phase extraction) |
| SPR | povrchová plazmová rezonance (surface plasmon resonance) |
| ssDNA | jednovláknová deoxyribonukleová kyselina (single-stranded deoxyribonucleic acid) |
| T | thymin |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| tRNA | transferová ribonukleová kyselina (transfer ribonucleic acid) |
| U | uracil |

OBSAH

| | |
|--|----|
| ÚVOD..... | 14 |
| 1 Nukleové kyseliny | 15 |
| 1.1 Struktura nukleových kyselin | 15 |
| 1.1.1 Párování bází dle Watson-Cricka | 16 |
| 1.2 Deoxyribonukleová kyselina | 17 |
| 1.2.1 Struktura DNA..... | 18 |
| 1.3 RNA | 20 |
| 1.3.1 Typy RNA | 20 |
| 1.4 Metody detekce nukleových kyselin..... | 22 |
| 1.4.1 Buněčná lýze | 22 |
| 1.4.2 Fenol-chloroformová extrakce | 23 |
| 1.4.3 SPE kolonky | 24 |
| 1.4.4 Magnetické částice | 24 |
| 2 Biosenzory pro detekci nukleových kyselin..... | 25 |
| 2.1 Historie biosenzoru | 25 |
| 2.2 Druhy detekčních biomolekul u biosenzorů | 26 |
| 2.2.1 Imunochemické bioreceptory (imunosenzory) | 26 |
| 2.2.2 Enzymatická detekce..... | 27 |
| 2.2.3 Detekce nukleonovou kyselinou | 27 |
| 2.3 Metody převodu detekce na měřitelný signál..... | 29 |
| 2.3.1 Elektrochemické biosenzory | 29 |
| 2.3.1.1 Amperometrické senzory | 29 |
| 2.3.1.2 Potenciometrické senzory..... | 30 |
| 2.3.1.3 Konduktometrické senzory | 32 |
| 2.3.2 Optické biosenzory | 32 |
| 2.3.2.1 Biosenzory povrchově plazmové rezonance | 32 |
| 2.3.2.2 Biosenzory založené na fluorescenci a luminiscenci | 33 |
| 2.3.2.3 Biosenzory fotonických krystalů..... | 34 |
| 2.3.2.4 Kolorimetrické biosenzory..... | 35 |
| 2.3.3 Piezoelektrické biosenzory | 35 |
| 2.3.4 Nanostrukturové biosenzory..... | 37 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.3.5 | DNA origami | 37 |
| 3 | Využití biosenzorů nukleových kyselin | 38 |
| 3.1 | Analýza potravin | 38 |
| 3.2 | Enviromentální analýza..... | 39 |
| 3.3 | Klinická diagnostika | 39 |
| | ZÁVĚR | 42 |
| | POUŽITÁ LITERATURA | 43 |

ÚVOD

Biosenzorem označuje zařízení, které je schopné detekovat analyt pomocí biomolekuly. Proces zahrnuje interakci analytu s detekční biomolekulou, převod vzniklého signálu na měřitelný signál, jeho následné zaznamenání a zesílení pro analytické účely. Mezi první biosenzory lze zahrnout Clarkovu kyslíkovou elektrodu, která byla sestavena v polovině 20. století. V této době se biosenzory staly zásadním nástrojem v oblasti ranné diagnostiky různých onemocnění, životního prostředí a v potravinářském průmyslu. A to hlavně díky své schopnosti detekovat rychle, specificky a citlivě biomolekuly. Mezi typy biosenzorů patří i biosenzory určené k detekci nukleových kyselin, tedy hlavně deoxyribonukleové a ribonukleové kyseliny, ale i peptidové kyseliny či aptamery. V poslední době biosenzory na bázi DNA prokázaly značný potenciál jako nová generace biomedicínských detekčních zařízení, díky jejich robustním chemickým vlastnostem a flexibilním biosnímacím funkcím.

Nukleové kyseliny jsou základní molekuly nesoucí genetickou informaci a hrají klíčovou roli v mnoha biologických procesech. Jejich přesná a spolehlivá detekce je proto nesmírně důležitá. Biosenzory, které využívají principy molekulární biologie a biochemie, umožňují detekovat tyto molekuly s vysokou specificitou a citlivostí.

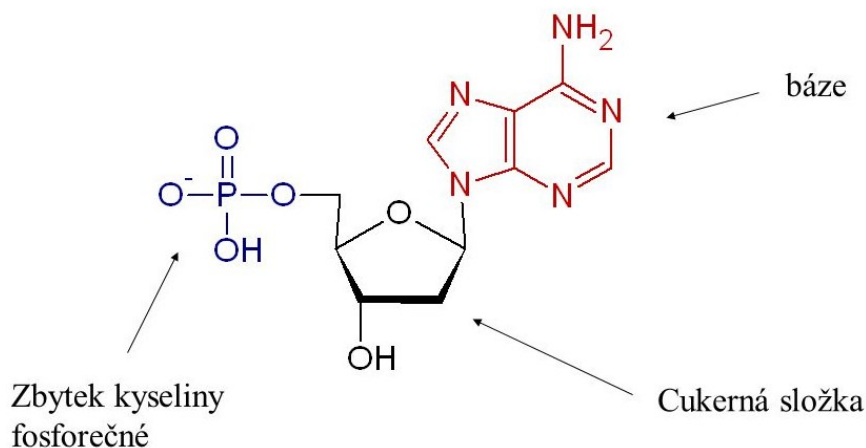
Cílem této bakalářské práce je prozkoumat a popsat metody a technologie používané v biosenzorech pro detekci nukleových kyselin. V první části práce se zaměřuje na základní informace o DNA a RNA, jejich struktuře, významu a funkčních rozdílech. Následně je práce věnována technice izolace nukleových kyselin z biologických vzorků. Hlavní část této práce se zabývá biosenzory – jejich historií, různými typy biosenzorů a možnostmi jejich aplikace v klinické diagnostice, potravinářském průmyslu a environmentální analýze.

1 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny, deoxyribonukleová kyselina (DNA) a ribonukleová kyselina (RNA), jsou makromolekulární látky tvořené polynukleotidovými řetězci. [1] Obě zmíněné kyseliny uchovávají genetickou informaci a jsou přítomny ve všech živých buňkách a virech. Informace je uložena v jádře, ale i mimo jádro buňky. DNA se převádí na mRNA (informační ribonukleová kyselina) a vstupuje do ribozomů, kde předává informaci syntetizovaným bílkovinám. V přírodě existuje podobný přenos informací pomocí replikace, kdy dceřiná buňka získává veškeré informace, které měla buňka mateřská. [2]

1.1 Struktura nukleových kyselin

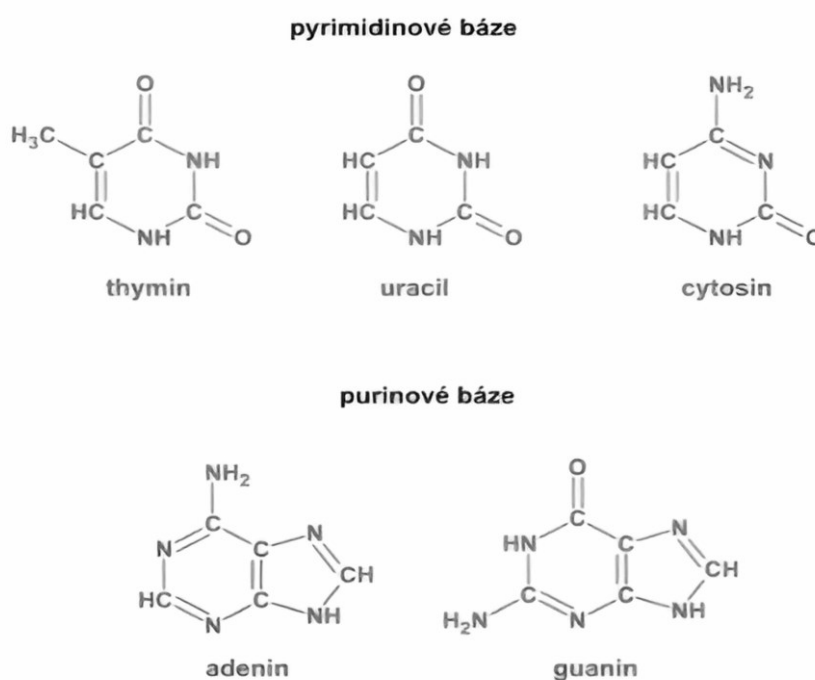
Základní stavební jednotkou je nukleotid, který je tvořen ze třech základních částí: dusíkaté (nukleové) báze – purinu či pyrimidinu, sacharidu – pentosy (deoxyribosa v DNA, ribosa v RNA) a zbytku kyseliny fosforečné. Spojením nukleové báze s molekulou sacharidu pomocí N-glykosidové vazby vzniká nukleosid. Rozdíl mezi nukleosidem a nukleotidem je, že nukleotid vzniká spojením nukleosidu a kyseliny fosforečné pomocí fosfoesterové vazby (viz Obrázek 1) [1-4].



Obrázek 1: Struktura nukleotidu (převzato: [5])

Nukleová kyselina (NA) může obsahovat buď sacharid β -D-ribofuranosu pro RNA, anebo sacharid 2-deoxy- β -D-ribofuranosu pokud se jedná o DNA. Ribosa a deoxyribosa se navzájem liší přítomností či nepřítomností hydroxylové skupiny na 2' uhlíkovém atomu. [2] Na 1' uhlíkovém atomu cukru je vždy navázána příslušná dusíkatá báze a jedna až tři fosfátové skupiny jsou připojeny k 5' uhlíku. [4]

Dusíkaté báze mohou být dvojího typu – pyrimidinové a purinové. Puriny i pyrimidiny jsou heterocyklické aromatické sloučeniny, které ve svém kruhu obsahují atomy dusíku. Atomy dusíku jsou nezbytné pro vodíkovou vazbu. Purinové dusíkaté báze se skládají z pětičlenného kruhu spojeném dohromady s cyklem šestičlenným a jsou děleny na dvě majoritní báze – adenin a guanin. Pyrimidinové báze jsou šestičlenné a rozdělují se na tři báze – cytosin, thymin nebo uracil (viz Obrázek 2). [6] V jednotlivých typech NA jsou zastoupeny vždy 4 báze. Pro DNA jsou to báze: adenin (A), guanin (G), cytosin (C) a thymin (T). RNA se liší v jednom typu báze, kdy se thymin vyměňuje za uracil (U). [2, 3]



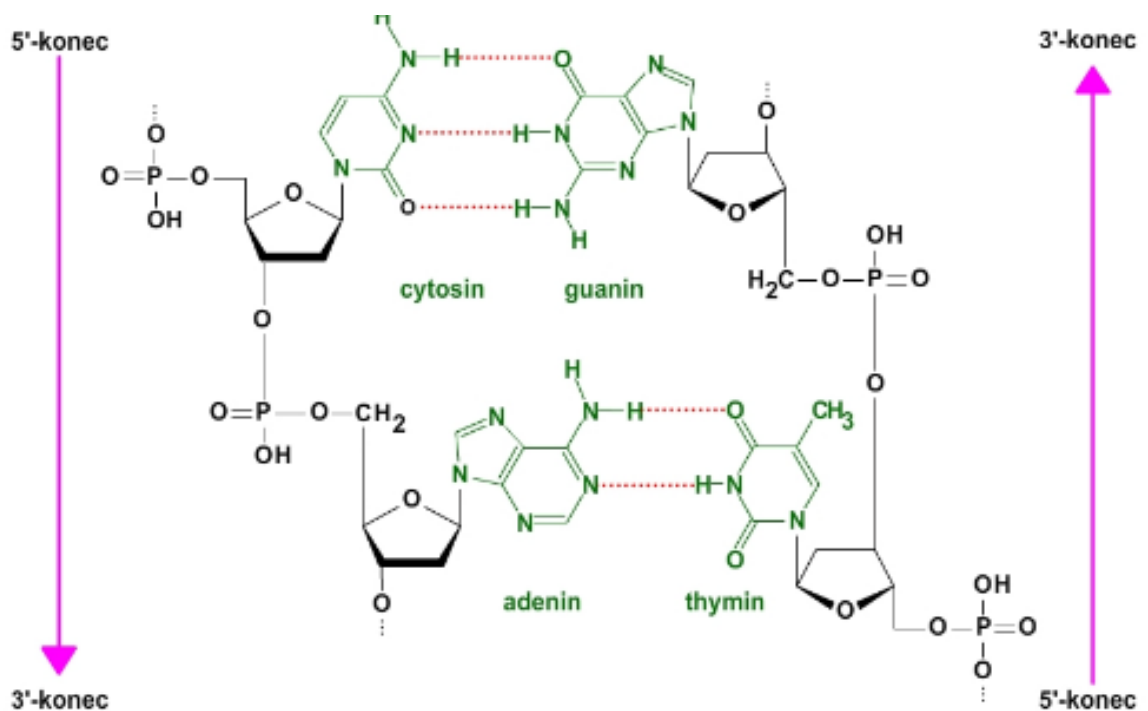
Obrázek 2: Strukturální vzorce jednotlivých dusíkatých bází (převzato a upraveno: [7])

1.1.1 Párování bází dle Watson-Cricka

Ve Watson-Crickově párování bází jsou puriny pouze komplementární s pyrimidiny. Dusíkaté báze se mezi sebou párují pomocí mezimolekulárních vodíkových vazeb. Majoritní báze nukleových kyselin (A, G, C, T/U) se vyznačují svojí silně preferovanou tautomerní formou [8]. To znamená, že adenin se páruje buď v DNA s thyminem, nebo v RNA s uracilem. S oběma komplementárními bázemi se páruje za pomoci dvou vodíkových vazeb. Cytosin se vždy páruje třemi vazbami s guaninem (viz Obrázek 3) [1-3, 8, 9].

Díky specifičnosti vodíkových vazeb je možné předpovídat, jaké účinky mohou mít možné mutace nebo sekvenční variace. Párování jednotlivých bází umožňuje: nahradit, opravit nebo replikovat páry bází, kdy nesmí docházet ke zničení páteře DNA a následné informace. [8]

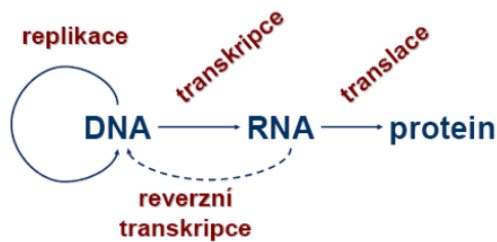
Vedle majoritních bází existují i báze minoritní, které se odlišují od majoritních svojí tautomerií (např. výměna poloh amino a ketoskupin v G nebo C vzniká iso-G a iso-C, vznik 5-methylcytosinu nebo 1-N-methylguanin). Tyto modifikace chrání DNA před restrikcími enzymy, které ji štěpí na specifických místech. [1, 2]



Obrázek 3: Komplementarita bází v DNA (převzato a upraveno: [7])

1.2 Deoxyribonukleová kyselina

DNA je schopna uchovávat a přenášet genetickou informaci, která je přítomna ve všech prokaryotických buňkách a eukaryotických jádrech. Watson a Crick odhalili v roce 1953 dva základní rysy molekuly DNA: párování nukleotidových bází komplementárním způsobem, jak již bylo zmíněno výše se vážou přednostně báze AT a CG a dvoušroubovicovou povahu DNA. V každé DNA je obsažen kód pro syntézu proteinů, kdy je DNA přepsána do RNA pomocí procesu transkripce, zatímco v procesu translace se z RNA syntetizují proteiny, toto je známé jako centrální dogma (viz Obrázek 4). [6]

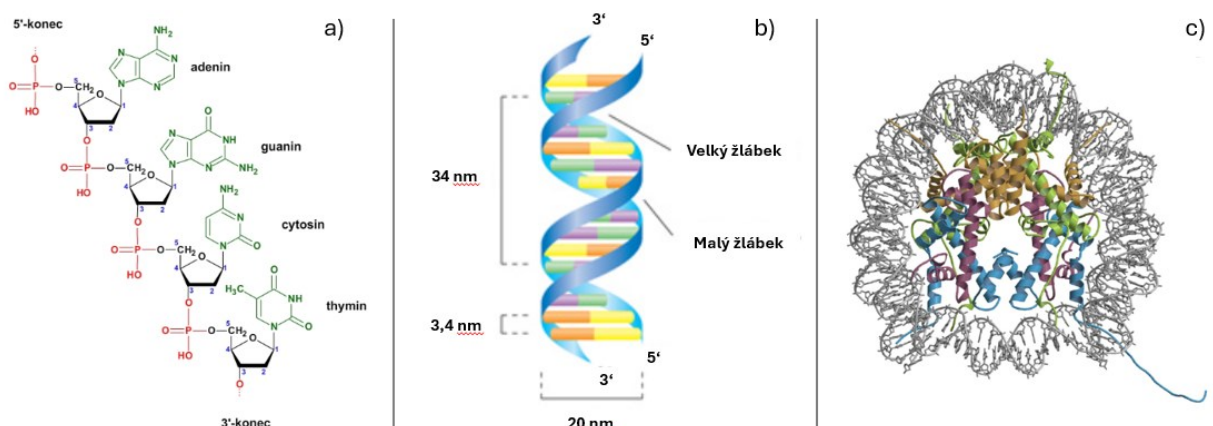


Obrázek 4: Centrální dogma (převzato a upraveno: [10])

1.2.1 Struktura DNA

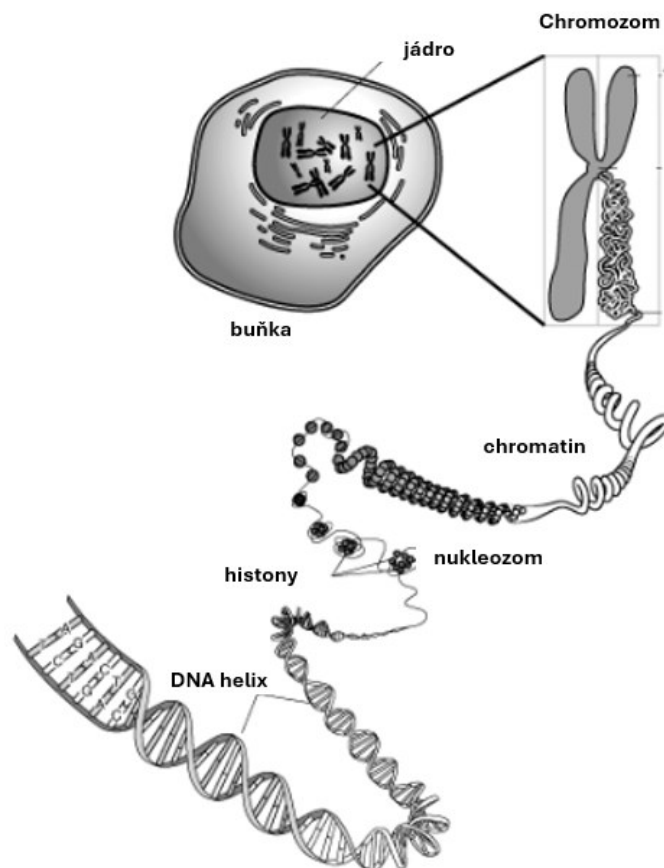
Lidský genetický materiál se primárně skládá z dvouvláknové, spirálové DNA. Tato molekula DNA se skládá z tzv. cukr-fosfátové páteře, která je složena ze střídajících se cukerných a fosfátových skupin s vodíkovými vazbami spojující dusíkaté páry bází. Cukry jsou u každého vlákna na vnější straně, zatímco báze a vodíkové vazby se nalézají uvnitř struktury. [6]

DNA se definuje do tří úrovní podle jejího uspořádání na primární, sekundární a terciární strukturu (viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Primární struktura udává pořadí jednotlivých nukleotidů v řetězci. Probíhá od 5'-konce k 3'-konce a přímo určuje genetickou informaci. Sekundární struktura nastává tehdy, když mezi sebou probíhají dva řetězce antiparalelním způsobem, kdy na 5'-konci jednoho z řetězců je 3'-konec druhého řetězce. Tyto zmíněné řetězce spolu interagují pomocí vodíkových vazeb principem komplementarity bází za vzniku dihelixu. [1, 4, 6] Struktura terciární je pravotočivá dvoušroubovice tzv. superhelix, kde je dvojitá šroubovice stáčena do nadšroubovicové struktury. [1]



Obrázek 5: Struktury DNA – a) primární; b) sekundární, c) terciární struktura (převzato a upraveno z: [7, 11,12])

Aby se DNA vešla do buněk, musí být vysoce kondenzovaná a obalena kolem histonových proteinů, které tvoří základní jednotku – nukleozom. Jeden nukleozom obsahuje osm histonových proteinů (dva z každého typu: H2A, H2B, H3 a H4) a asi 147 párů bází DNA omotanou těsně kolem něj. Nukleozomy jsou odděleny krátkými úseky linkerové DNA a spojené s histonem H1, jenž je klíčový pro stabilitu nukleozomu, působí jako spojovací protein. Nukleozomové vlákno se dále zhušťuje do silnější struktury známé jako 30nm vlákno, které vzniká díky interakcím mezi nukleozomy s jádrem. Následně se spojitý řetězec DNA svíjí do chromatinu, který v průběhu dělení buňky kondenzuje a vytváří chromozomy (viz Obrázek 6). Histonové proteiny mají klíčový význam pro strukturu a funkci chromatinu během přechodu mezi jeho aktivním a neaktivním stavem. [13-15] Chromatin existuje v jednom ze dvou stavů. Kondenzovaný heterochromatin umožňuje omezený přístup transkripčních enzymů a volný euchromatin umožňuje interakci s transkripčními enzymy. Přechod je určen posttranslační modifikací histonových proteinů jako jsou methylace a acetylace. Po buněčném dělení se DNA musí znovu oddělit od histonových proteinů, aby prošla transkripcí. [9]



Obrázek 6: Struktura a spiralizace chromozomu (převzato a upraveno: [16])

DNA má schopnost podstupovat strukturální změny v závislosti na svém prostředí (např. změny relativní vlhkosti), kroucením, otáčením a nataháním, což vede k široké škále DNA struktur. Nejznámějšími strukturami jsou A-DNA, B-DNA a Z-DNA. Existuje ale i mnoho dalších struktur, které se mezi sebou liší ve směru otáčení, párování bází nebo počtem vláken. A i B forma DNA jsou obě pravotočivé, vznikají pouze za jiné relativní vlhkosti a liší se počtem zbytků na otočku. A-DNA vzniká za nízké relativní vlhkosti a je tvořena 11 páry bází na otočku. Na druhé straně B-DNA je hlavní sekundární strukturou DNA, vzniká za vysoké relativní vlhkosti a je charakterizována 10 páry bází na jednu otočku. Z-forma je na rozdíl od předcházejících levotočivou šroubovicí, v níž na jeden závit připadá 12 párů bází. [1, 9]

1.3 RNA

Molekula RNA zajišťuje přepis a překlad genetické informace z deoxyribonukleové kyseliny. RNA je oproti DNA méně stabilnější z důvodu cukru ribosy, kvůli její hydroxylové skupině (může umožňovat např. alkalickou hydrolyzu řetězce) a také pro její neustálé přepisování a degradaci. [2] RNA většinou existuje ve formě jednovláknové, ale tvoří se výjimečně i nestabilní dvouvláknová forma u speciálních RNA virů. RNA virus používá RNA jako svůj genetický materiál místo molekuly DNA. [17]

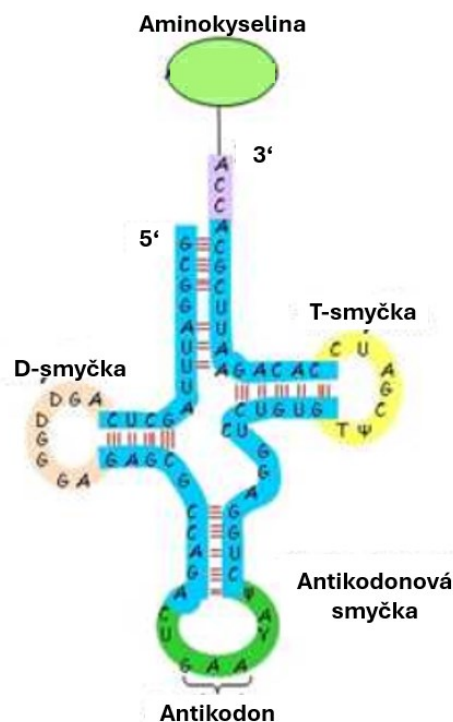
1.3.1 Typy RNA

RNA lze rozdělit do dvou skupin: kódující a nekódující RNA. Nekódujících RNA regulují genovou expresi na transkripční a posttranskripční úrovni a zahrnuje snRNA, miRNA, siRNA a další. **snRNA** (malá jaderná RNA) je zodpovědná za sestřih intronů z pre-mRNA transkriptu. **miRNA** (mikroRNA) hraje klíčovou roli v regulaci genové exprese blokováním translace proteinů tím, že se páruje s nedokonalou komplementaritou k cílovým sekvencím v molekulách mRNA. **siRNA** (malé interferující RNA) jsou dvouvláknové RNA, které inhibují genovou expresi, degradují mRNA a brání translaci proteinů. Oproti miRNA mají schopnost specificky zaměřit vybraný gen, přičemž jeden vodící řetězec siRNA může být využit opakovaně. **tRNA** (transferová RNA) přenáší aminokyseliny do ribozomu během syntézy proteinů. **rRNA** (ribozomální RNA) se podílí na tvorbě strukturální a katalytické části ribozomu. [17, 18] Kódující RNA umožňují přenos genetické informace z DNA do ribozomů, kdy hlavním typem je

mRNA (messenger RNA), která je důležitá pro přenos genetické informace potřebné pro syntézu proteinů. [18]

Na syntéze proteinů se podílejí tři hlavní typy RNA: mRNA, tRNA a rRNA. mRNA je přepisována z DNA a přenáší genetickou informaci z chromozomů k ribozomům v cytoplazmě, kde se využívá k syntéze bílkovin. Zatímco u prokaryotické mRNA se může ihned zapojit do syntézy proteinů bez nutnosti dalšího zpracování. U eukaryotické RNA dochází nejdříve ke vzniku prekurzoru, tj. primárního transkriptu, označovaného jako pre-mRNA. Před vznikem mRNA musí nejdříve dojít ke zrání, než se začne pre-mRNA využívat dále. V pre-mRNA jsou obsaženy střídající se nekódující a kódující oblasti známé jako introny a exony. Při zrání jsou introny sestřiženy z primárního transkriptu a exony se spojí, čímž vznikne nepřerušovaná kódující sekvence. Na 5' konec RNA transkriptu je přidána 5' čepička (tzv. "cap") a na 3' konec poly-A ocas. Během zahájení transkripce je 5' konec RNA opatřen guanosintrifosfátovým (GTP) zbytkem. Tímto přidáním vzniká "cap0," což je známé jako 7-methylguanosin. [17, 18]

tRNA mají čtyřlístkovou strukturu a jejich primární funkcí je transport aminokyselin na 3' akceptorovém místě do ribozomu, což je umožněno enzymem zvaným aminoacyl-tRNA syntetáza. Aminoacyl-tRNA syntetázy jsou enzymy, které připojují správnou aminokyselinu k volné tRNA, což je nezbytné pro syntézu proteinů. Typ aminokyseliny závisí na kodonu mRNA, což je trojice nukleotidů kódující konkrétní aminokyselinu. tRNA obsahuje i antikodon, který je komplementární ke kodonu na mRNA a tím určuje, kterou aminokyselinu má tRNA přenášet (viz Obrázek 7). Start kodon je sekvence AUG, zatímco kodony UAG, UGA a UAA slouží jako terminační kodony, které ukončují translaci proteinu. Přidávání aminokyselin do polypeptidového řetězce pokračuje, dokud ribozom nedosáhne jednoho ze stop kodonů. [17]



Obrázek 7: Struktura tRNA (převzato a upraveno z: [19])

rRNA je klíčovou složkou ribozomů, které jsou nezbytné pro syntézu proteinů. Ribozomy se skládají z velké a malé podjednotky. U prokaryotických buněk tvoří malá 30S a velká 50S podjednotka kompletní 70S ribozom. U eukaryotických buněk tvoří malá 40S a velká 60S podjednotka kompletní 80S ribozom. Ribozomy obsahují tři specifická místa pro vazbu tRNA molekul: výstupní, peptidylové a akceptorové místo, které spojují aminokyseliny dohromady pro syntézu polypeptidu. [17]

1.4 Metody detekce nukleových kyselin

Prvním úkolem při manipulaci s nukleovými kyselinami je jejich izolace z přirozeného materiálu ve vhodném množství a čistotě. NA je nutné zbavit všech látek, které se po lýzi buněk nebo virů stávají součástí hrubých lyzátů, jelikož by narušovaly působení enzymů používaných k analýze a úpravám. [20]

1.4.1 Buněčná lýze

Buněčná lýze je laboratorní technika k rozrušení buněk a následnému rozbití buněčné membrány, což umožňuje uvolnění vnitřního obsahu do mezibuněčného prostoru. Je nezbytná pro analýzu buněčných složek, jako jsou proteiny, DNA, RNA a organely. Metody pro lýzu buněk lze rozdělit na mechanické a nemechanické techniky. [21]

Při mechanické lýze je buněčná membrána fyzicky rozbita pomocí mechanické síly, například vysokotlakým homogenizátorem (HPH) nebo mletím pomocí kuliček. HPH využívá vysoký tlak k protlačení buněk skrz malý otvor. Druhá metoda používá mikroskopické kuličky, které při srážce s buňkou rozbijí membránu a uvolní buněčný obsah. [21]

Nemechanická lýze je technika k rozrušení buněčných struktur, která zahrnuje fyzikální, chemickou a biologickou metodu. Fyzikální metody využívají vnější sílu, jako je tepelná lýze, kavitace nebo osmotický šok. Chemické lýzy využívají k rozrušení buněčné membrány lyzační pufrů, které mění pH. Do těchto pufrů se přidávají detergenty k solubilizaci membránových proteinů a k protržení membrány. Chemické rozrušení buněk se obvykle dělí na alkalickou lýzu a lýzu detergentem. U biologické lýzy se využívá specifčnosti štěpení buněk pomocí enzymů jako je lysozym, chitinasa, proteinasa a další. [21]

Kromě výše zmíněných technik jsou využívány také techniky jako optická, akustická a elektrická lýza. Optická lýza využívá laserů a technik opticky indukované dielektroforézy k otevření buněčné membrány. Při akustické lýze se generuje vysokoenergetická zvuková vlna, zatímco u elektrické lýzy jsou buňky vystaveny silnému elektrickému poli. [21]

1.4.2 Fenol-chloroformová extrakce

Fenol-chloroformová extrakce je laboratorní metoda pro izolaci DNA a RNA z biologických vzorků. Směs se homogenizuje s fenolem a centrifuguje, čímž vznikají tři fáze: vodní, organická a mezifáze. V organické fázi se nacházejí nečistoty jako degradované proteiny, polysacharidy, lipidy a zbytky membrán. Nukleové kyseliny jsou obsaženy ve vodné fázi, která se odděluje ze směsi a dále čistí směsí chloroformu s isoamylalkoholem k odstranění případných zbytků fenolu. Okyselením a přidáním 96% ethanolu (popř. přidání isopropanolu či acetonu) se nukleové kyseliny precipitují při teplotách -20 až -80 °C. Sediment (tzv. pelet) se promyje 70% ethanolem a suší na vzduchu, následně se rozpustí v TRIS/EDTA pufru nebo demineralizované vodě. [22]

1.4.3 SPE kolonky

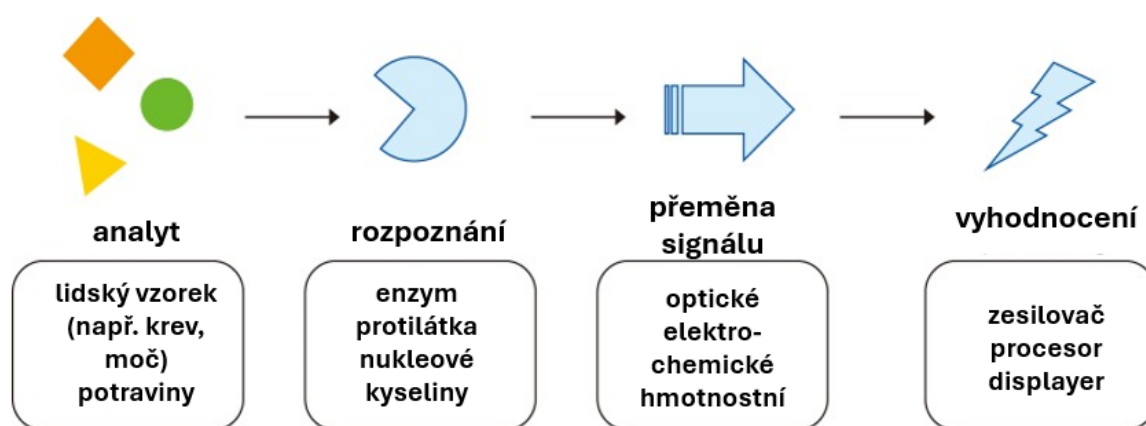
Extrakce na pevné fázi (SPE) je extrakční metoda, pomocí níž dochází k izolaci analytu z roztoku mezi kapalnou (matrice či rozpouštědlo s analytickými látky) a pevnou (sorpční) fází. SPE funguje tak, že analyty se vážou na povrch sorbentu v kolonce nebo disku. Nepochopitelné interakce využívají van der Waalsovy síly, zatímco pro polární sloučeniny slouží vodíkové vazby a iontové interakce. Účinnost extrakce závisí na vlastnostech sorbentu, jako je jeho hydrofobnost, polarita a specifické funkční skupiny. Obecný postup této techniky zahrnuje aplikaci roztoku na pevnou fázi kolonek, odstranění nežádoucích složek a následné eluování požadovaných analytů do sběrné nádoby pomocí jiného rozpouštědla. [23]

1.4.4 Magnetické částice

Magnetická separace využívá magnetické pole k separaci paramagnetických a feromagnetických částic. Pro izolaci se používají magnetické částice, které mají na svém povrchu navázané ligandy nebo biopolymery, které jsou schopné specificky vázat cílové nukleové kyseliny. Tyto nosiče mají nepravidelný, porézní povrch a získávají magnetický moment, když jsou umístěny do magnetického pole. Nejčastěji se používají magnetické mikrokuličky, vyrobené ze silných permanentních magnetů ze vzácných zemin potažených syntetickými či biologickými polymery jako je agarosa či chitosan. Princip použití spočívá v přiložení magnetu na stěnu nádoby se vzorkem, kdy se částice shluknou u stěny nádoby a zbytek vzorku lze odlít. [24]

2 Biosenzory pro detekci nukleových kyselin

Samotný pojem biosenzor označuje zařízení, které je schopné detekovat analyt pomocí biomolekuly. Princip biosenzorů lze vysvětlit v několika jednoduchých krocích. Jako první je interakce analytu s detekční biomolekulou (nejčastěji enzym, protilátka nebo nukleová kyselina). Následně dochází k převodu signálu vzniklého interakcí na signál vhodný pro analytické měření (světlo, elektrický proud, zbarvení a jiné). Následný signál je zaznamenán a zesílen, čímž může být využit pro analytické účely (viz Obrázek 8). [25]



Obrázek 8: Komponenty biosenzoru (převzato a upraveno z: [25])

2.1 Historie biosenzoru

První biosenzor vynalezl profesor Leland C. Clark Jr., podle kterého byla pojmenována elektroda známá jako Clarkova kyslíková elektroda. V roce 1956 byla publikována práce o této elektrodě, kde byl představen její princip zachytávání glukosooxidasy (GOx) na kyslíkové elektrodě pomocí dialyzační membrány. Na elektrodě byla měřena koncentrace kyslíku ve vzorku. Glukosooxidasa katalyzuje reakci glukosy s kyslíkem za vzniku kyseliny glukonové a peroxidu vodíku. Po této reakci elektroda detekuje pokles koncentrace kyslíku, který se dále stanovuje elektrochemicky, což umožňuje stanovení glukosy ve vzorku na základě množství úbytku kyslíku. [26]

Po Clarkovi představili Rechnitz spolu s S. Katzem roku 1963 první přímé potenciometrické stanovení močoviny po hydrolýze ureasou. Poté byly vyvinuty další biosenzory, mezi které patří například laktátová elektroda, biosenzor založený na mikrobech, vláknový optický senzor s imobilizovaným indikátorem pro měření oxidu

uhličitého nebo kyslíku. Dále došlo k rozvoji optických a piezoelektrických biosenzorů a také amperometrického glukosového biosenzoru pro domácí monitorování glukosy. V současnosti jsou zkoumány a vyvíjeny nanobiosenzory, implantované biosenzory a integrované biosenzory. [26]

2.2 Druhy detekčních biomolekul u biosenzorů

Pro detekci analytů lze využít široké spektrum biomolekul. Často používanou detekční biomolekulou jsou enzymy, kovalentně navázané na povrch detektoru. Enzymy jsou schopné velice specificky vázat pouze určitý analyt, který je následně enzymaticky přeměněn. Hlavní výhodou enzymů je, že reakce není pro enzym destruktivní a je tedy schopen opakovaně interagovat s analytem. Často při enzymatické reakci dochází ke vzniku chemicky reaktivních molekul (H_2O_2 , ATP), které jsou přímo měřeny nebo následně přeměněny na analyticky signální molekuly. Další skupinou detekčních biomolekul jsou protilátky. Protilátky jsou bílkoviny, schopné vysoce specificky vázat antigeny. Nevýhodou je, že nemohou interagovat s více molekulami analytu současně a jejich cena je vysoká. Třetí a poslední skupinou je detekce pomocí nukleových kyselin. Ta spočívá v komplementární interakci nukleonové kyseliny s analytem. [25]

2.2.1 Imunochemické bioreceptory (imunosenzory)

Imunochemická detekce analytu je založena na vysoce specifické interakci antigen–protilátka, která vede ke vzniku imunokomplexu. [27, 28]

Imunosenzory se pak dělí na 2 hlavní skupiny: značené a neznačené. Neznačené imunosenzory změní svoje fyzikální vlastnosti po vzniku vazby antigen–protilátka. Tyto vlastnosti se pak dají přímo měřit (například barva). Značené imunosenzory, jak již název vyjadřuje, na sobě nesou nějakou značku, která je schopna vydat signál. Značkou v tomto případě může být například enzym, fluorescenční molekula, elektroaktivní molekula nebo třeba substrát pro enzymatickou přeměnu. [29]

Principem neznačených imunosenzorů je navázání antigenu nebo protilátky na pevnou matici, za vzniku zařízení, které poté může sloužit k detekci. Zatímco značené imunosenzory jsou založeny na principu, kdy komplex antigen-protilátka probíhá na povrchu sensorové matrice, který je dále detekován potenciometricky, amperometricky či pomocí optického měření. [29]

2.2.2 Enzymatická detekce

U enzymatické detekce se používají enzymy, jako jsou oxidasy nebo dehydrogenasy, které jsou fixovány na povrchu senzoru. Využívá se při tom schopnosti katalyzovat reakci, která přeměňuje substrát na elektroaktivní produkt, který poté umožňuje detekci cílového analytu. Během jejich katalýzy potřebují tyto enzymy koenzymy, například flavinadenindinukleotid (FAD), nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) nebo jejich redukované formy, které musí být regenerovány pro katalýzu dalších reakcí. [30]

U oxidasových enzymů je nejčastějším kofaktorem FAD, který není kovalentně vázán na enzym. Jak již jejich název napovídá, jsou oxidasové enzymy závislé na kyslíku, tudíž biosenzory, které využívají kyslík jako akceptor protonů, jsou náchylné k chybovosti, způsobenými změnami či nízkými koncentracemi rozpuštěného kyslíku. Proto je jejich použitelnost omezena, hlavně při použití ischemických podmínek, kdy dochází k nedostatečnému přísunu kyslíku. Dalšími využívanými enzymy jsou dehydrogenázy. Při použití dehydrogenasových enzymů je koncentrace redukované formy nikotinamidadenindinukleotidu (NADH), přítomného v matrici, přímo úměrná koncentraci sledovaného analytu. [30]

Dalšími biosenzory jsou mediátorové amperometrické biosenzory, které používají mediátory jako oxidační činidla, aby fungovaly jako přenáščeči elektronů. Využívá se to při práci s nízkými potenciály, přičemž nevzniká tolik závislost na kyslíku. Mezi nejčastěji používané mediátory patří ferrikyanid a ferrocen, avšak široké využití mají také mediátory methylenová modř, fenaziny, pruská modř a anorganické redoxní ionty. Existují i biosenzory, které se spoléhají na bioelektrokatalýzu, kde probíhá přenos elektronů mezi elektrodou a enzymem. Jejich vývoj ale ještě stále probíhá, tudíž se pro analýzu běžně nepoužívají. [30]

2.2.3 Detekce nukleonovou kyselinou

Nukleové kyseliny (DNA, RNA, peptidové kyseliny či aptamery), fungují na biosenzoru jako biorekogniční prvky a transducery, které přeměňují biologickou interakci na detekovatelný signál. Biosenzory založené na NA fungují na principu hybridizace, kdy je detekční vrstva biosenzoru tvořena jednovláknovou DNA (ssDNA), která slouží jako sonda. Tato ssDNA je schopna se efektivně a specificky spojovat do duplexu, aby se komplementovala s cílovým fragmentem NK a vykazovala selektivitu

vůči nekomplementárním sekvencím. Mezi hlavní výhody hybridizačních biosenzorů patří jejich nízké náklady, vysoká citlivost a selektivita při detekci cílových fragmentů DNA, což lze využít i pro rutinní testování. [31]

V elektrochemickém snímání DNA se pro imobilizaci DNA sond používají techniky jako adsorpce, kovalentní vazby a interakce avidin-biotin. Nejjednodušší metodou, která nevyžaduje chemická činidla ani modifikaci DNA sond je adsorpce. DNA sondy se přichytí na povrch pracovní elektrody elektrostatickou adsorpcí mezi záporně nabitou fosfátovou skupinou DNA a kladně nabitými elektrodami. Imobilizace pomocí kovalentní vazby je syntetizovaná DNA sonda spojena s thiolovou ($-SH$) nebo aminovou ($-NH_2$) skupinou na 3' nebo 5' konci, pro navázání na kovový povrch nebo specifickou funkční skupinu na elektrodě. To zajišťuje vysokou specifitu a minimalizuje nespecifickou vazbu. U interakce mezi avidinem a biotinem, která je v přírodě jednou z nejsilnějších nekovalentních vazeb, se využívá strategie nekovalentní imobilizace DNA sond na elektrodě. Avidin nebo streptavidin, je velký tetramerní protein, poskytující čtyři vazebná místa pro biotin. DNA sondy se mohou navázat na povrch elektrody 3' nebo 5' koncem pomocí modifikace biotinu na elektrodu s avidinem či streptavidinem navázaným na jejich povrchu. [31]

U aptamerů je detekční mechanismus podobný interakcím antigen-protilátka nebo receptor-ligand, kdy často dochází ke konformačním změnám v sekundární a terciální struktuře. Aptamery jsou jednořetězcové oligonukleotidy DNA nebo RNA, které se mohou vázat na buňky, proteiny, peptidy a některá léčiva. RNA aptamery obvykle vykazují vyšší afinitu k vázání než DNA aptamery na stejnou cílovou sekvenci, což je způsobeno přítomností hydroxylové skupiny na 2' pozici v RNA aptamerech. Aptamer má mnoho výhod oproti tradičním biosenzorům jako je přizpůsobivost extrémně vysokým teplotám, pH a iontovým koncentracím. Jejich hlavní výhodou ale zůstává identifikace konkrétních sekvencí jednořetězcové DNA/RNA, které jsou schopné vázat se na cílový ligand. [32] Nejčastěji se pro detekci cílového analytu používá funkcionalizace aptameru DNA s reportní molekulou, ferrocenem či methylenovou modří, nebo imobilizační molekulou, například alkanthiolem, streptavidinem a hydrazoátem na 5' a 3' konci řetězce DNA. [33]

Peptidové nukleové kyseliny jsou syntetická analoga DNA, kdy neutrální peptidová struktura, složená z opakujících se jednotek N-(2-aminoethyl)glycinu,

nahrazuje cukr-fosfátový základ NA. Tato úprava zvyšuje stabilitu vůči enzymatickému štěpení, zlepšuje selektivitu a umožňuje jejich syntézu na pevné fázi. Tyto biosenzory byly vyvinuty pro včasnou diagnostiku rakoviny, detekci mikroorganismů nebo pro aplikaci v oblasti bezpečnosti potravin a sledování životního prostředí. [32]

2.3 Metody převodu detekce na měřitelný signál

2.3.1 Elektrochemické biosenzory

V případě využití elektrochemických metod se jedná o získání elektrického signálu, který je indukovaný konverzí elektroaktivních složek vzniklých po biochemické detekci analytu (často látky vzniklé po enzymatické reakci analytu). Máme tři hlavní metody pro elektroanalytickou detekci. Metoda amperometrická, při které se měří proud, indukovaný elektrochemickou reakcí, kde velikost proudu závisí na koncentraci elektroaktivní látky ve vzorku. Dále se jedná o metodu potenciometrickou, kde se měří potenciál proti referentní elektrodě, nedochází zde k přenosu náboje a toku elektrického proudu. Poslední metoda je konduktometrická, u které měříme vodivost analyzovaného vzorku. Vodivost se může měnit, pokud dochází ke změně iontového složení analytu. Obecnou výhodou elektrochemických stanovení je jejich jednoduchost, nízká pořizovací i provozní cena a dobré analytické parametry (citlivost, opakovatelnost). Jistou nedokonalostí těchto metod je jejich citlivost na teplotu a prostředí (například pH). [25]

2.3.1.1 Amperometrické senzory

Jak již bylo řečeno, u amperometrických metod měříme protékající proud, procházející systémem při oxidaci nebo redukci elektroaktivních látek. Protékající proud se může měřit při konstantním potenciálu (amperometrie) nebo při měnícím se potenciálu (voltametrie). Principem kvantitativního vyhodnocení je potom Faradayův zákon, který lze vyložit tak, že velikost prošlého proudu je přímo úměrná koncentraci elektroaktivního analytu. Jako mediátor redukce nebo oxidace slouží povrch pracovní elektrody. Ta je většinou doplněna ještě referentní a pomocnou elektrodou. Jako referentní elektroda se nejčastěji využívá chloridostříbrná a slouží pro zajištění stabilního stálého potenciálu, od kterého se nastavuje potenciál pracovní elektrody. Pomocná elektroda je většinou nějaký chemicky stabilní a dobře vodivý kov, například platina nebo zlato. [34, 35] Příkladem využití metod je například stanovení

komplementární DNA (cDNA) hmyzu lišaje tabákového, kde bylo využito elektrokatalytické oxidace ribosy na měděném povrchu. [36]

Většina metod se zaměřuje na elektroaktivitu nukleových bází a lze tak dobře stanovit vzorky obsahující ssDNA. Problémem je však stanovení dsDNA, kde jsou báze výrazně stéricky blokovány a dochází k útlumu jejich elektroaktivity. Řešením tohoto problému bylo využití elektrokatalytické oxidace ribosy, která je součástí DNA, na měděném povrchu [36]. Dalším příkladem je detekce DNA enzymatickým genosenzorem. Taková detekce spočívá v navázání enzymu (například HRP) a jednovláknového úseku DNA na pevný povrch. Když poté dojde k navázání komplementárního úseku DNA, dojde ke stérickému rušení aktivity enzymu, které pak můžeme sledovat jako úbytek elektroaktivních molekul produkovaných enzymatickou katalýzou. [37]

2.3.1.2 Potenciometrické senzory

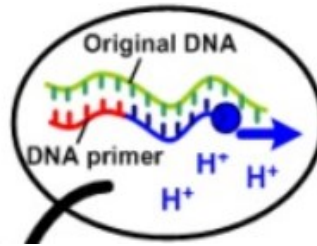
V případě potenciometrických metod, měříme změnu potenciálu mezi referenční a měrnou elektrodou (často se jedná o iontově selektivní elektrodu), která nastává měnící se koncentrací iontů v roztoku. Tento jev je popsán Nernstovou rovnicí (Rovnice 1). V tomto případě neprochází soustavou proud a nedochází k přenosu náboje. [34]

$$E = E_{std} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}}$$

Rovnice 1: Nernstova rovnice

Kde E – potenciál, E_{std} – standardní potenciál, R – univerzální plynová konstanta [$8,31447 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$], T – teplota [Kelvin], n – počet elektronů přecházejících v reakci, F – Faradayova konstanta [$96\,485,34 \text{ C mol}^{-1}$], a_{ox} – aktivita oxidované formy analytu, a_{red} – aktivita redukované formy analytu. [34]

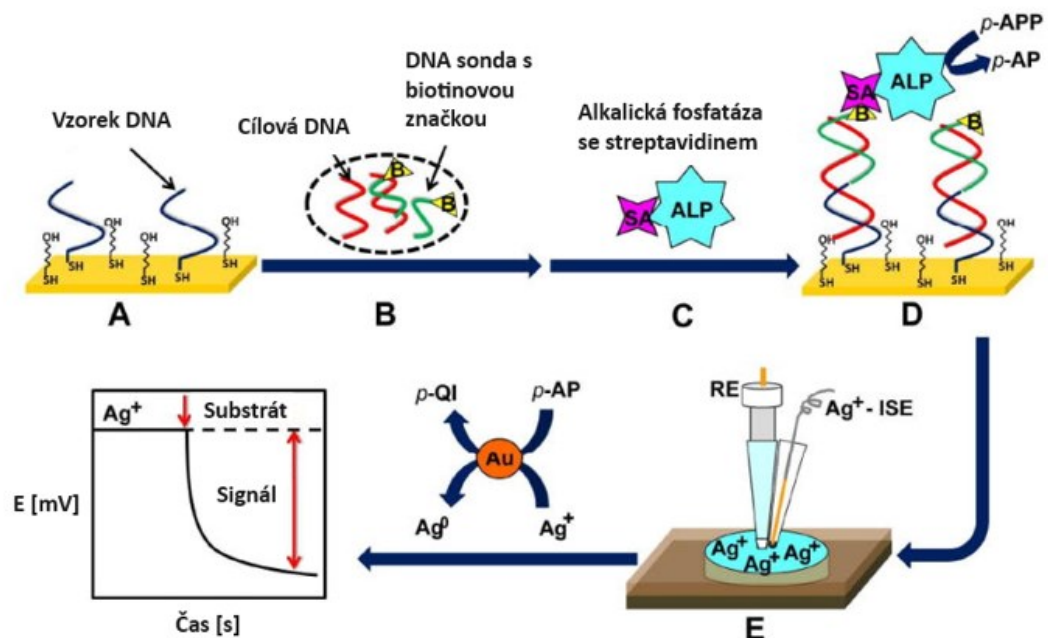
Potenciometrické detekce bylo využito například u průkazu DNA bakterie rodu *Salmonella*, kde bylo využito uvolnění H^+ iontů při polymerázové reakci (Obrázek 9). Změna koncentrace H^+ iontů pak byla měřena na pracovní elektrodě. [38]



Obrázek 9: Uvolnění H^+ iontů důsledkem polymerázové řetězové reakce (převzato z: [38])

Další využití bylo při detekci DNA za pomoci CdS-značených DNA sond, které jsou po navázání na komplementární úsek DNA, vystaveny prostředí s H_2O_2 , který má za následek uvolnění Cd^{2+} do roztoku. Uvolněné kationty jsou pak měřeny iontově selektivní elektrodou. [39]

Potenciometrická metoda byla využita i například u stanovení přítomnosti bakteriální DNA *Escherichia coli*. Princip spočíval v navázání biotinem značené sondy na úsek imobilizované DNA na pevném povrchu. Na sondu poté byl navázán enzym (vazba streptavidin-biotin), který katalyzoval vznik *p*-aminofenolu. *p*-Aminofenol následně redukoval Ag^+ kationty přítomné ve vzorku a tento pokles byl měřen iontově selektivní elektrodou. (Obrázek 10) [40]



Obrázek 10: Princip potenciometrické detekce DNA (převzato a upraveno z: [40])

2.3.1.3 Konduktometrické senzory

U konduktometrických metod se měří schopnost roztoku vést elektrický proud mezi dvěma elektrodami. Tato metoda se dá využít v případě, kde dochází ke změně koncentrací elektricky nabitých částic v roztoku. Této metody se využívá hlavně u enzymatických reakcí, jelikož při nich často vznikají nebo se naopak spotřebovávají ionty. Bohužel tyto metody nebyly ještě dostatečně studované a nejsou příliš významné pro detekci nukleových kyselin. [41]

2.3.2 Optické biosenzory

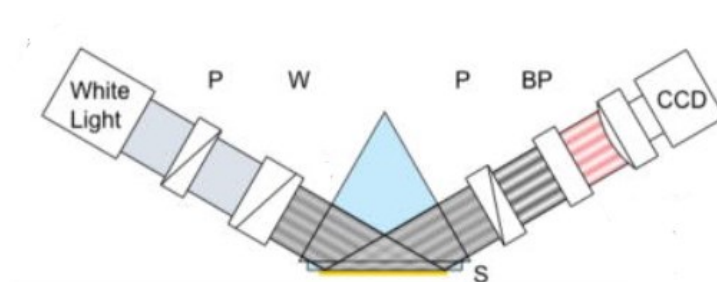
Při použití optických biosenzorů je analyt detekován pomocí světla s využitím značených či neznačených metod. Při měření se využívá optických převodníků, které jsou integrovány s biosnímacím prvkem. Pro detekci analytu se používá fluorescenční, chemiluminiscenční nebo kolorimetrické značení, kdy se sleduje intenzita fluorescence či změna barvy. [42] Neznačené metody detekce jsou schopny generovat signál přímo po navázání na rozpoznávací prvek, bez potřeby dalších interakcí s jinými značenými sondami, které poskytují signál. Pro jejich detekci se využívají povrchové plazmové rezonance (SPR), fluorescenční biosenzory s evanescentní vlnou, fotonické krystaly či optické vlnovody. [43] Oproti tradičním metodám mají optické biosenzory mnoho výhod jako je specifická, citlivost, kompaktní velikost, nízká cena a rychlý čas analýzy. [42] Optické biosenzory mají uplatnění v oblasti farmacie pro vývoj léčiv, biomedicínských nástrojů, v oblasti diagnostiky patogenů, protilátek a biomarkerů nebo při monitorování a diagnostice infekčních onemocnění, rakoviny a neurologických poruch. [45] Označené biosenzory mají ale určitá omezení, kvůli časové náročnosti, možné nehomogenitě v systému a možnosti ovlivnění biologické aktivity cílové biomolekuly. [44]

2.3.2.1 Biosenzory povrchově plazmové rezonance

SPR vznikají oscilací volných elektronů na rozhraní mezi kovem a dielektrikem. Tato rezonance je vyvolána paprskem dopadajícího světla, které generuje evanescentní vlny. Evanescentní vlna je elektromagnetické pole, které může existovat jen ve velmi krátké vzdálenosti od povrchu materiálu. SPR v konfiguraci s hranolem se využívá skleněného hranolu s vysokým indexem lomu, který umožňuje spojení optického signálu s povrchem kovu a dielektrika. Intenzitu odraženého světla od povrchu lze poté použít k měření citlivosti zařízení. Změna indexu lomu v detekční

oblasti na povrchu senzoru, je vyhodnocena jako změna rezonančního úhlu, která slouží pro účely biosnímání. SPR byla využita pro detekci viru dengue v lidském séru, díky diagnostickému testu založeném na imunoglobulinu M nebo pro detekci glukosy v moči. Také byl zaznamenán jejich pokrok ve sběru biologických tekutin od pacientů s různými chorobami, jako je diabetes, hepatitida nebo různých druhů rakoviny. [45]

Schéma SPR zahrnuje dva polarizátory, které společně umožňují detekci biomolekulárních interakcí prostřednictvím analýzy fázových posunů a světelného spektra (viz Obrázek 11).



Obrázek 11: Schéma SPR (převzato a upraveno z: [49])
(kde: P – polarizátor, W – klínová retardační deska, S – povrch hranolu se zlatým tenkým filtrem, BP – pásmový filtr)

Jevu SPR bylo využito i například u stanovení DNA agregací nanočástic zlata. Principem stanovení byl jev, při kterém ssDNA zhlukovala nanočástice zlata, které následně zabarvily roztok modře. Zatímco dsDNA měla opačný účinek a stabilizovala rozptýl částic. Vyhodnocení pak spočívalo v přidavku DNA sond, které pokud nasedaly na komplementární úsek DNA, tak měnily poměr dsDNA a ssDNA, což mělo za následek změnu. [48]

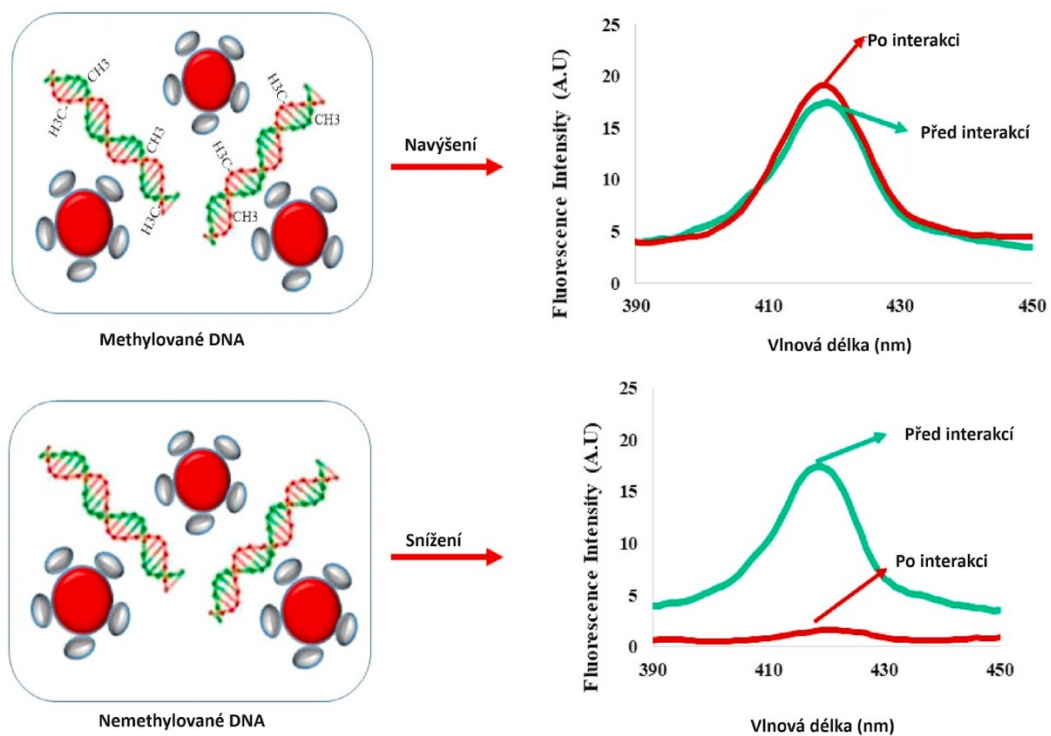
2.3.2.2 Biosenzory založené na fluorescenci a luminiscenci

U fluorescenčních a luminiscenčních optických biosenzorů generované světlo vzniká po excitaci záření určité vlnové délky, které je detekováno pomocí fotodiod nebo fotonásobičů. Fluorescenční sondy, jako jsou například fluorofory, kvantové tečky, nanoklastry a uhlíkové tečky mohou mít buď zvýšenou, nebo sníženou intenzitu fluorescence v závislosti na jejich interakci s cílovým analytem. Pro správnou analýzu stopových biomolekul byly vyvinuty techniky zesílení signálu jako je cyklické zesilování signálu, kdy pomocí této technologie může být fluorescenční signál až několikrát

zesílen. Biosenzory založené na luminiscenci využívají schopnosti materiálu emitovat světlo po jeho excitaci. [50]

Příkladem využití je například stanovení úseku DNA za pomoci fluorescenčních DNA sond. Fluorescenční sonda je vlastně krátký úsek ssDNA, který na sobě nese fluorescenční značku. Principem pak je specifické nasednutí sondy na komplementární část testované DNA a následné měření intenzity fluorescence. [46]

Dalším příkladem je například stanovení míry methylace DNA, kde bylo využito specifické interakce $-CH_3$ skupin s nanočásticemi CeO_2 . Přídavek methylované nebo nemethylované komplementární DNA má za následek zvýšení nebo snížení intenzity fluorescence (Obrázek 12). [47]



Obrázek 12: Interakce nanočástic CeO_2 s methylovanou a nemethylovanou dsDNA (převzato a upraveno z: [47])

2.3.2.3 Biosenzory fotonických krystalů

V optických biosenzorech s fotonickým krystalem je využívána jako snímací mechanismus změna v indexu lomu a periodicitě, které ovlivňují optické chování. Typická struktura tohoto biosenzoru se skládá z krystalu s taveným oxidem křemičitým a vrstvou stříbra či zlata. Biosenzory s fotonickým krystalem mají širokou škálu funkcí, ale jejich využití je stále omezené, protože mohou detekovat jen specifické látky a čelí problémům s citlivostí, což může ovlivnit jejich přesnost a spolehlivost při detekci.

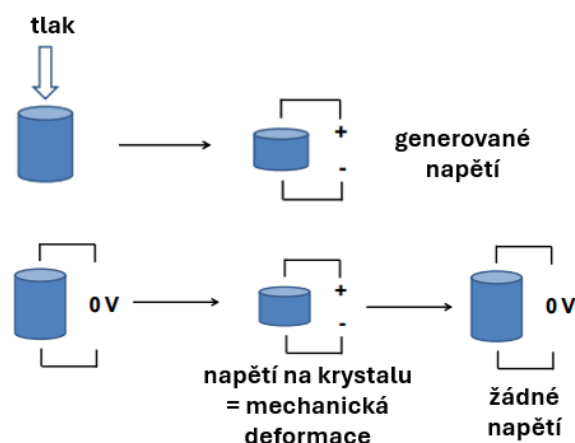
Nejvíce se metoda fotonického krystalu používá pro detekci C-reaktivního proteinu. [45]

2.3.2.4 Kolorimetrické biosenzory

Kolorimetrické biosenzory mohou detekovat přítomnost určité látky pomocí optického detektoru nebo vizuálně pozorovatelné změny barevného posunu. Pro výrobu těchto biosenzorů se nejčastěji používají nanočástice zlata (AuNP), které změní barvu roztoku při agregaci nebo deagregaci v reakci s cílovou látkou. Zesíťující kolorimetrie DNA-AuNP a kolorimetrie nemodifikovaných AuNP indukovaná solí (SICUA) jsou dva hlavní přístupy kolorimetrické detekce nukleových kyselin využívajících zlaté nanočástice. Sondy DNA-AuNP mohou být spojeny do systému DNA-nanočástic pomocí komplementárního duplexu DNA s „lepkavými konci“, které slouží jako spojovací řetězec. Tento proces umožňuje kontrolu sestavování DNA-AuNP s barevným reverzem tepelnou denaturací. Na rozdíl od toho metoda SICUA využívá nemodifikované AuNP během detekce, aby zabránila jejich kovalentní funkcionalizaci a zjednodušila experimentální fázi, kdy klíčovým mechanismem je elektrostatická interakce mezi nemodifikovanými AuNP a NA. [51]

2.3.3 Piezoelektrické biosenzory

Piezoelektrické senzory umožňují okamžité sledování biinterakcí na povrchu senzoru, což zjednodušuje testovací postupy tím, že průběžné vyhodnocování poskytuje podrobnější informace o průběhu interakce. Piezoelektrický efekt vykazují některé anizotropní krystaly (krystaly bez středu symetrie), jako je berilit, křemen nebo organické polymery, kdy se při jejich mechanickém namáhání produkuje elektrické napětí. Jev funguje i opačně, kdy při střídavém napětí, které je aplikované na povrch těchto krystalů, dochází k vyvolání oscilací nebo mechanickému namáhání (Obrázek 13). Nevýhodou je omezení použití pro analytické aplikace, kdy má posun frekvence vliv na fyzikální nebo chemická interakce a další vlastnosti jako viskozita okolního roztoku. [52]



Obrázek 13: Piezoelektrický jev při mechanické deformaci a aplikovaného napětí (převzato a upraveno z: [53])

Principem piezoelektrických biosenzorů je excitace pomocí střídavého napětí, které je aplikováno na povrch dvěma elektrodami. Když je piezoelektrický krystal napojen do oscilačního obvodu, tak střídavé napětí způsobí mechanickou oscilaci, jejíž frekvence je měřena. Analyzovaná látka, navázaná na povrch elektrod, způsobí změnu frekvence oscilací. Tato změna je potom úměrná hmotě navázané na krystal. [52, 53]

Frekvence oscilací se měří v standardních analytických aplikacích a interakce s krystalem nebo elektrodou, která aplikuje elektrický impuls na povrchu krystalu, může sloužit k identifikaci analytu. Navázaná hmota na povrchu krystalu způsobuje zpomalení oscilací. U běžných křemenných krystalů platí, že posun frekvence Δf je přímo úměrný hmotnosti Δm , která je vázána na krystal, což je princip popsáný Sauerbreovou rovnicí. [53]

$$\Delta f = \frac{-2f_0 \Delta m}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}} = -2,3 \times 10^6 f_0^2 \frac{\Delta m}{A}$$

V rovnici znamená: f_0 – základní frekvence oscilace krystalu (hertz), A – plocha piezoelektricky aktivní (centimetr), ρ_q – hustota ($2,648 \text{ g/cm}^3$), μ_q – smykový modul křemene ($2,947 \times 10^{11} \text{ g/cm} \cdot \text{s}^2$). [53]

Piezoelektrické biosenzory mohou být navrženy s různými typy bioreceptorů, jako jsou protilátky, antigenní fragmenty, enzymy nebo i specifické DNA sondy. Tyto bioreceptory jsou obvykle imobilizovány na povrchu piezoelektrického krystalu a reagují s analytem. [53]

2.3.4 Nanostrukturové biosenzory

Nanomateriály, jako jsou nanočástice, uhlíkové nanotrubicе či grafeny, vzbuzují velký zájem při tvorbě nových biosenzorů díky jejich vynikající vodivosti, elektrokatalytické aktivitě, vysokému specifickému povrchu, vysoké adsorpční kapacitě a schopnosti funkcionalizace. Funkcionalizace je schopnost upravit povrch materiálu tak, aby se na něj mohly navázat specifické chemické skupiny, molekuly nebo biomolekuly. Tyto nanomateriály jsou zásadní pro vývoj elektrochemických enzymových biosenzorů využívaných v environmentálních aplikacích, kdy nejvýznamnější při vývoji nových enzymových biosenzorů jsou nanomateriály na bázi uhlíku – grafen, mezoporézní uhlíky a uhlíkové nanotrubicе. Uhlíkové materiály lze rovněž zakomponovat do nanokompozitů, což umožňuje kombinovat jejich jedinečné vlastnosti s vlastnostmi jiných materiálů. [54]

Nanočástice kovů a kovových oxidů vykazují v elektrochemických biosenzorech katalytickou aktivitu. Kvůli lepšímu přenosu elektronů a poskytnutí synergického efektu se spojují s jinými vodivými nosiči. Využití kovů jako jsou nanočástice stříbra či zlata dosahují zlepšení výkonu lakasové elektrody pro fenolické sloučeniny. Z oxidu kovů se využívá oxid hlinitý, který umožňuje zlepšení katalytické aktivity HRP. [54]

2.3.5 DNA origami

Technologie DNA origami je metoda v oblasti nanotechnologií, která využívá schopnost DNA skládat se do přesných a komplexních struktur. Dlouhé jednovláknové struktury DNA se pomocí "samoskládání" sestaví do určeného tvaru po smíchání a nasednutí s krátkými syntetickými DNA vlákny. Funkcionalizací ssDNA v nanostrukturách DNA je možné přesně umístit cílové molekuly na předem stanovená místa. [55]

Výhody technologie DNA origami zahrnují možnost vytváření přesných a složitých tvarů s nanometrickým rozlišením, schopnost přenášet a organizovat jiné materiály na mikroskopické úrovni a dramaticky zvýšit aktivitu navázaného enzymu. Významnou nevýhodou DNA origami je časově náročný proces žihání, vysoké náklady a omezení při rozšiřování aplikací do větších rozměrů a komplexnějších uspořádání vzhledem k omezené délce přirozeného řetězce DNA. [56]

3 Využití biosenzorů nukleových kyselin

3.1 Analýza potravin

Biosenzory na bázi nukleových kyselin jsou často využívány k monitorování bezpečnosti potravin, identifikaci patogenů nebo toxinů, chemických sloučenin, alergenů či znehodnocení a identifikaci geneticky modifikovaných organismů v potravinářských produktech. Nejpoužívanější analytické metody jsou založeny na polymerázové řetězové reakci (PCR), enzymově vázaný imunosorbentní test (ELISA), dále se využívá infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) a hmotnostní spektrometrie (MS). [31, 57]

Detekce kontaminace potravin patogenními bakteriemi, jako jsou *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* a další, může pomoci jako prevence vzniku onemocnění přenosnými potravinami. Tradičně se bakterie identifikují pomocí kultivace, mikroskopie a sérologie, což je většinou časově náročné. Proto se využívají i elektrochemické a optické biosenzory obsahující nanomateriály pro rychlý a spolehlivý screening patogenů pro detekce *Staphylococcus aureus* v prasečí kůži pomocí uhlíkových nanotrubic či detekce *Bacillus cereus* obsaženého v mléce a kojenecké výživě. [31]

Biosenzory jsou hojně využívány i pro stanovení mykotoxinů a neurotoxinů. Mykotoxiny jsou produkovány mikroskopickými vláknitými houbami a plísněmi, zatímco neurotoxiny pocházejí od několika druhů mořských řas, měkkýšů či ryb jako jsou například velice známí čtverzubci. Kdy za pomoci biosenzoru na bázi aptamerů se daly stanovit mořské toxiny. Dalším příkladem aplikace je detekce botulismu a ricinových toxinů pomocí elektrochemického biosenzoru. [31]

Při identifikaci druhu v potravinách se využívá tzv. markerů DNA, které umožňují rozpoznání genetické variability v genomu a efektivně odhalují rozmanitost mezi druhy i v rámci jednoho druhu. DNA markery lze detekovat v jaderném, mitochondriálním a chloroplastovém genomu. U živočichů se většina markerů nachází v mitochondriálním genomu a u rostlin je to většinou genom chloroplastový, protože jejich mitochondriální genom je příliš stabilní na poskytnutí dostatečné variace. [57]

3.2 Enviromentální analýza

Pro monitorování životního prostředí se dají aplikovat tyto biosenzory pro detekci těžkých kovů, kdy dochází k oxidačnímu poškození a změn ve struktuře DNA a k detekci polycyklických aromatických uhlovodíků ve vzorcích rybí žluči. Pro zvýšení selektivity cílových chemikálií se může využít funkce aptameru, kdy se může ještě využít spojení s nanomateriály pro detekci těžkých kovů a organických polutantů jako jsou pesticidy. [58]

Pro detekci patogenních mikrobů nalézajících se ve vodě, půdě či atmosféře se využívají metody, mezi nimiž jsou optické biosenzory, zejména na principu kolorimetrického rozpoznávání, kdy mikroby slouží jako indikátory biologického znečištění. Tato zařízení se osvědčila jako rychlá, jednoduchá a nákladově efektivní pro rychlou prognózu daného problému. Využívají se i mikrofluidní optické senzory, které jsou komerčně rozvíjeny díky svým výhodám, jako je regulace průtokových podmínek, lepší mísení činidel a snížení objemu vzorků i činidel, což zvyšuje citlivost detekce. Nejčastějšími patogenními mikroby v životním prostředí jsou *Escherichia coli*, která se nachází v půdě a půdních sedimentech, a *Staphylococcus aureus*, hlavní indikátor znečištění vody a ovzduší. Oba tyto mikroby lze detekovat pomocí FTIR, SPR nebo kolorimetrické detekce. Dalšími významnými patogeny jsou *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida glabrata*. [44]

3.3 Klinická diagnostika

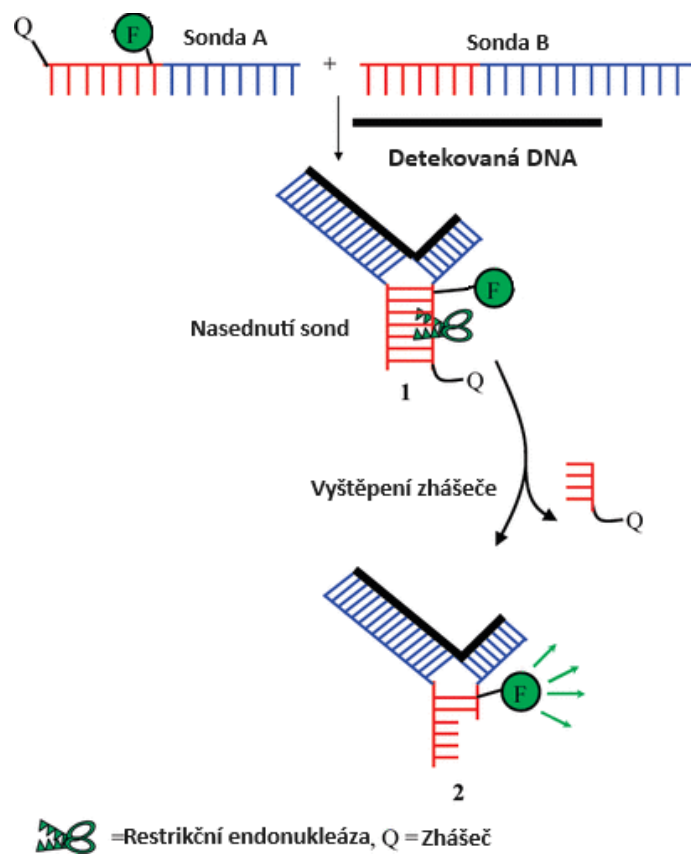
V klinické diagnostice se biosenzory na bázi NA používají pro diagnózu onemocnění a lékařský výzkum. Metody zahrnující elektrochemické biosenzory, aptamery, nanočástice Antigen-Au/Ag a optické biosenzory, poskytují rychlou, spolehlivou, přenosnou a pokročilou diagnostiku. Příkladem může být detekce specifického antigenu SARS-CoV pomocí biosenzoru s optickým vláknem pro identifikaci nukleokapsidového proteinu, nebo imunosenzorů, enzymatických a celobuněčných biosenzorů. [31]

V lékařské praxi se pro detekci patogenů využívá zařízení na bázi mikrofluidního papíru, díky jejich jednoduchému použití a možnosti vizuálního čtení výsledků, pomocí proužků s bočním průtokem, kdy výsledek dostaneme během dvou minut. Nevýhodou je omezení na detekci pouze jednoho cíle na test a obtížnost

kvantifikace výsledků, na opačnou stranu nevyžadují odesílání vzorků do laboratoře, což je důležité pro včasnou léčbu pacienta. [59]

Rovněž je důležité zmínit, že rychlá a přesná diagnostika má významnou roli v boji proti rakovině. Biosenzory DNA poskytují informace, podle kterých lékaři určují prognózu pacientů s tímto onemocněním jako je detekce mutace genu, který je spojován s rakovinou prsu, pomocí diferenčně pulsní voltametrie nebo detekce prostatického specifického antigenu, biomarkerem rakoviny prostaty, pomocí DNA aptameru. [31, 60] Pro detekci jednonukleotidového polymorfismu se využívá fluorescenčních biosenzorů s oxidem grafenu, který se vyznačuje vysokou citlivostí na detekci jednotlivých neshod bází. Principem byla alelová specifická hybridizace, kde se využilo zhášející účinnosti a rozdílné vazebné afinity grafenu, aby se překonal rozdíl teplotních závislostí mutací na jedné bázi. Dále se k detekci využívají uhlíkové kvantové tečky, které jsou také založené na principu zhášení fluorescence, kombinace streptavidin křenové peroxidázy modifikované nanočásticemi SiO₂ a DNA polymerázy nebo detekce založenou na ligasově řetězové reakci. [61]

Příkladem využití je detekce miRNA (mikro RNA), které sloužilo jako biomarker rakoviny krku. Principem bylo využití tzv. křížových sond (obrázek 14). Jedná se o 2 druhy sond, které obsahují vzájemně komplementární úsek DNA a úsek komplementární pro detekovanou DNA. Sondy jsou navrženy tak aby byla teplota, při které navzájem hybridizují velmi nízká (15 °C a méně) a nedocházelo tak k jejich nasednutí při teplotě experimentu (30 °C). Pokud se však ve vzorku nachází DNA komplementární s jejich úseky, dochází ke křížové interakci, která způsobí nasednutí sond. Pro detekci nasednutí sond může být využita například fluorescenční značka se zhášečem a restriční endonukleáza, ta štěpí pouze dvouvláknovou DNA, čímž je zajištěno, že bude úsek obsahující zhášeč vyštěpen až po nasednutí sond. [62]



Obrázek 14: Princip křížových sond (převzato a upraveno z: [63])

ZÁVĚR

Biosenzory jsou v dnešní době rychle se rozvíjející technologií, a to díky velkým průlomům v jejich miniaturizaci a využití nových materiálů, které byly zavedeny v minulé dekádě. Využití biosenzorů ke stanovení nukleonových kyselin je a do budoucna bude stále více významné, jelikož potřeba stanovení DNA a průkazů genů je nutná pro efektivnější a šetrnější léčbu nemocí, kontroly škůdců nebo monitorování invazivních druhů. Tyto problémy budou obzvláště alarmující v nadcházejících letech, jelikož rapidně měnící se klima tyto jevy umocňuje.

V oblasti životního prostředí biosenzory umožňují monitorování kvality vody, půdy a ovzduší. Jsou schopny detekovat přítomnost nebezpečných mikroorganismů, toxinů a znečišťujících látek na molekulární úrovni, což napomáhá rychlé reakci na dané problémy a minimalizaci dopadů na zdraví člověka.

V potravinářském průmyslu biosenzory zajišťují bezpečnost a kvalitu potravin díky své schopnosti rychle a přesně identifikovat patogeny, jako jsou bakterie *Salmonella* nebo *Escherichia coli*, a monitorovat geneticky modifikované organismy. Dále umožňují detekovat přítomnost alergenů či reziduí pesticidů, kdy pomáhají chránit spotřebitele před potenciálně škodlivými látkami.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ŠTĚPÁNKOVÁ, Šárka. *Obecná biochemie* [online]. Univerzita Pardubice, 2020 [cit. 2024-06-18]. ISBN 978-80-7560-342-5. Dostupné z: <https://eshop.upce.cz/epub/9006493/obecnaa-biochemie>.
2. BRESLER, Semen Jefimovič a ZADRAŽIL, Stanislav. *Molekulární biologie*. Praha: Academia, 1979.
3. BRÍŽĎALA, Jan. Nukleové kyseliny. *E-ChemBook* [online]. 2010 [cit. 2024-06-18]. Dostupné z: <https://e-chembook.eu/nukleove-kyseliny>.
4. MINCHIN, Steve a Julia LODGE. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays Biochem.* [online]. 2019, 433–456 [cit. 2024-06-18]. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20180038.
5. BUREŠ, Zbyněk. Nukleové kyseliny. Online. SlidePlayer. Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/3386895/>. [cit. 2024-06-24].
6. GHANNAM, Jack Y. Jason WANG, Arif JAN a David LANDSMAN. Biochemistry, DNA Structure. *National Library of Medicine* [online]. 2022 [cit. 2024-06-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538241/>.
7. TEPLÁ, Milada. Struktura DNA a RNA. Online. Studium Biochemie. 2013. Dostupné z: <http://www.studiumbiochemie.cz/na.html>. [cit. 2024-06-24].
8. WESTHOF, Eric, Marat YUSUPOV a Gulnara YUSUPOVA. Recognition of Watson-Crick base pairs: constraints and limits due to geometric selection and tautomerism. *F1000Prime Rep.* [online]. 2014 [cit. 2024-06-18]. Dostupné z: doi:10.12703/P6-19.
9. BANSAL, Manju. DNA structure: Revisiting the Watson–Crick double helix. *Current Science* [online]. 2003, 1556-1563 [cit. 2024-06-18]. Dostupné z: doi:10.4068/cmj.2019.55.2.86.
10. KORECKÁ, Lucie. Struktura DNA a RNA. Online. Studium Biochemie. 2012. Dostupné z: <http://www.studiumbiochemie.cz/na.html>. [cit. 2024-06-24].
11. KODÍČEK, Milan. Dihelix DNA. Online. Biochemické pojmy : výkladový slovník. 2007. Dostupné z: http://26qgdfc.257.cz/vyuka/bio_pojmy/hesla/dihelix_dna.html. [cit. 2024-06-24].
12. TRAVERS, Andrew A., MUSKHELISHVILI, Georgi a THOMPSON, John Michael T. DNA information: from digital code to analogue structure. Online.

- Philos Trans A Math Phys Eng Sci. 2012, č. 370(1969), s. 2960-86. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rsta.2011.0231>. [cit. 2024-06-24].
13. SANVICTORES, Terrence a Fabiola FARCI. Biochemistry, Primary Protein Structure. *National Library of Medicine* [online]. 2022 [cit. 2024-06-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564343/>.
 14. MARIÑO-RAMÍREZ, Leonardo, Maricel G KANN, Benjamin A SHOEMAKER a David LANDSMAN. Histone structure and nucleosome stability. *Odborný posudek proteomiky* [online]. **2005**(5), 719-729 [cit. 2024-06-18]. Dostupné z: [doi:10.1586/14789450.2.5.719](https://doi.org/10.1586/14789450.2.5.719).
 15. SIMPSON, Brittany, Connor TUPPER a Nora M. AL ABOUD. Genetics, DNA Packaging. *National Library of Medicine* [online]. 2023 [cit. 2024-06-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534207/>.
 16. ŠÍPEK, Antonín. Chromozomy a jejich stavba. Online. Genetika - Biologie. 2012. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/chromozomy>. [cit. 2024-06-24].
 17. WANG, David a Aisha FARHANA. Biochemistry, RNA Structure. *National Library of Medicine* [online]. 2023 [cit. 2024-06-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558999/>.
 18. CLARK, David P. *Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution*. Burlington: Elsevier, 2005. ISBN 0-12-175551-7.
 19. TEPLÁ, Milada. Translace. Online. Studium Biochemie. 2013. Dostupné z: <http://www.studiumbiochemie.cz/translace.html>. [cit. 2024-06-24].
 20. ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie*. 4. díl, Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie. 3. vyd., inovované. Brno: Stanislav Rosypal, 2002. ISBN 80-902562-4-4.
 21. SHEHADUL ISLAM, Mohammed, Aditya ARYASOMAYAJULA a Ponnambalam Ravi SELVAGANAPATHY, OHTA, Aaron T. a Wenqi HU, ed. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines (Basel)* [online]. 2017, (8(3)), 83 [cit. 2024-06-18]. Dostupné z: [doi:10.3390/mi8030083](https://doi.org/10.3390/mi8030083).
 22. BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.

23. ŻWIR-FERENC, Agata a Marek BIZIUK. Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications. *Polish Journal of Environmental Studies* [online]. 2006, (15(5), 677-690 [cit. 2024-06-22]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/279597851_Solid_phase_extraction_technique_-_Trends_opportunities_and_applications.
24. BERENSMEIEROVÁ, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol.* [online]. 2006, (73(3), 495–504 [cit. 2024-06-22]. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-006-0675-0.
25. FU, Zirui, Yi-Cheng LU a James J. LAI. Recent Advances in Biosensors for Nucleic Acid and Exosome Detection. *Chonnam Med J.* [online]. 2019, 86–98 [cit. 2024-06-18]. Dostupné z: doi:10.4068/cmj.2019.55.2.86.
26. ARORA, Neha. Biosensors History. Online. *Scientific India Magazine.* 2017, article 23. ISSN 2349 - 1418. Dostupné z: *Scientific India*, <https://scind.org/Science/article/Biosensors-History>. [cit. 2024-06-24].
27. DARWISH, Ibrahim A. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. Online. *International Journal of biomedical Science.* 2006, č. 2(3), s. 217-235. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614608/>. [cit. 2024-06-24].
28. FU, Zirui; LU, Yi-Cheng a LAI, James J. Recent Advances in Biosensors for Nucleic Acid and Exosome Detection. Online. *Chonnam Medical Journal.* 2019, č. 55(2), s. 86-98. Dostupné z: <https://doi.org/10.4068/cmj.2019.55.2.86>. [cit. 2024-06-24].
29. AIZAWA, Masuo. Immunosensors for Clinical Analysis. Online. *Advances in Clinical Chemistry.* 1994, č. 31, s. 247-275. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(08\)60337-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(08)60337-6). [cit. 2024-06-24].
30. GAIA, Rocchitta; SPANU, Angela; BABUDIARI, Sergio; LATTE, Gavinella; MADEDDU, Giordano et al. Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. Online. *Sensors.* 2016, č. 16(6), s. 780. Dostupné z: <https://doi.org/doi.org/10.3390/s16060780>. [cit. 2024-06-27].
31. KHARRATI-KOOPAEE, Hamed; REZAEI, Vahideh; ESMAILIZADEH, Ali a SABAHI, Fatemeh. DNA Biosensors Techniques and Their Applications in Food Safety, Environmental Protection and Biomedical Research: A mini-review.

- Online. *J Cell Dev Biol.* 2020, č. 3(1), s. 28-35. Dostupné z: <https://doi.org/10.36959/596/446>. [cit. 2024-06-26].
32. BARBOSA, Laura C.; CEPEDA, Diego I.; TORRES, Andrés F. L.; CORTES, María M. A.; MONROY, Zuly J. R. et al. Nucleic acid-based biosensors: analytical devices for prevention, diagnosis and treatment of diseases. Online. *JOURNAL VITAE.* 2021, s. 26 – 85. Dostupné z: <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v28n3a347259>. [cit. 2024-06-24].
33. HUA, Yu; MA, Jiaming; LI, Dachao a WANG, Ridong. DNA-Based Biosensors for the Biochemical Analysis: A Review. Online. *Biosenzory (Basilej).* 2022, č. 12(3), s. 183. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios12030183>. [cit. 2024-06-27].
34. GRIESHABER, Dorothee, Robert MACKENZIE, Janos VÖRÖS a Erik REIMHULT. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors (Basel)* [online]. 2008, (8(3)), 1400–1458 [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: [doi:10.3390/s80314000](https://doi.org/10.3390/s80314000).
35. L. HAMMOND, Jules, Nello FORMISANO, Pedro ESTRELA, Sandro CARRARA a Jan TKAC. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays Biochem* [online]. 2016, (60(1)), 69–80 [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: [doi:10.1042/EBC20150008](https://doi.org/10.1042/EBC20150008).
36. SINGHAL, Pankaj a Werner G. KUHR. Ultrasensitive Voltammetric Detection of Underivatized Oligonucleotides and DNA. *Analytical chemistry (Washington)* [online]. 1997, 23(69), 4828–4832 [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: [doi:10.1021/ac970731q](https://doi.org/10.1021/ac970731q).
37. PAN, Jin. Voltammetric detection of DNA hybridization using a non-competitive enzyme linked assay. Online. *Biochemical Engineering Journal.* 2007, č. 35(2), s. 183-190. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.012>. [cit. 2024-06-26].
38. LEE, Kang-Ho, Dongkyu LEE, Jongsu YOON, Ohwon KWON a Jaejong LEE. A Sensitive Potentiometric Sensor for Isothermal Amplification-Coupled Detection of Nucleic Acids. *Sensors (Basel)* [online]. 2018, (18(7)), 2277 [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: [doi:10.3390/s18072277](https://doi.org/10.3390/s18072277).
39. NUMNUAM, Apon; CHUMBIMUNI-TORRES, Karin Y.; XIANG, Yun; BASH, Ralph; THAVARUNGKUL, Panote et al. Potentiometric Detection of DNA Hybridization. Online. *Journal of the American Chemical Society.* 2008, č.

- 130(2), s. 410–411. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ja0775467>. [cit. 2024-06-26].
40. WU, Jie; CHUMBIMUNI-TORRES, Karin Y.; GALIK, Michal; THAMMACHET, Chongdee; HAAKE, David A. et al. Potentiometric Detection of DNA Hybridization using Enzyme-Induced Metallization and a Silver Ion Selective Electrode. Online. *Anal Chem.* 2009, č. 81(24), s. 10007–10012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac9018507>. [cit. 2024-06-26].
41. JAFFREZIC-RENAULT, Nicole a Sergei V. DZYADEVYCH. Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring. *Sensors (Basel)* [online]. 2018, (8(4)), 2569–2588 [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: doi:10.3390/s8042569.
42. KUMAR SINGH, Amit, Shweta MITTAL, Mangal DAS, Ankur SAHARIA a Manish TIWARI. Optical biosensors: a decade in review [online]. 2023, (67), 673-691 [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: doi:10.1016/j.aej.2022.12.040.
43. ZANCHETTA, Giuliano, Roberta LANFRANCO, Fabio GIAVAZZI, Tommaso BELLINI a Marco BUSCAGLIA. Emerging applications of label-free optical biosensors. *Nanophotonics* [online]. 2017, 627–645 [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: doi:10.1515/nanoph-2016-0158.
44. SHARMA, Kajal a SHARMA, Meenakshi. Optical biosensors for environmental monitoring: Recent advances and future perspectives in bacterial detection. Online. *Environmental Research.* 2023, č. 236(2), s. 116826. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116826>. [cit. 2024-06-26].
45. KUMAR SINGH, Amit, Shweta MITTAL, Mangal DAS, Ankur SAHARIA a Manish TIWARI. Optical biosensors: a decade in review. *Alexandria Engineering Journal* [online]. 2023, (67), 673-691 [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: doi:10.3390/mi14020295.
46. TALAVERA, Eva M.; AFKIR, Moustafa; SALTO, Rafael; VARGAS, Alberto M. a ALVAREZ-PEZ, Jose M. Fluorescence-labelled DNA probes to detect complementary sequences in homogeneous media. Online. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2000, č. 59(1-3), s. 9-14. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(00\)00127-5](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00127-5). [cit. 2024-06-26].
47. ADAMPOUREZARE, Mina; NIKZAD, Behzad; AMINI, Mojtaba a SHEIBANI, Nader. Fluorimetric detection of DNA methylation by cerium oxide nanoparticles for early cancer diagnosis. Online. *Heliyon.* 2024, č. 10(7), article e28695. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28695>. [cit. 2024-06-26].

48. XIA, Fan; ZUO, Xiaolei; YANG, Renqiang; XIAO, Yi; KANG, Di et al. Colorimetric detection of DNA, small molecules, proteins, and ions using unmodified gold nanoparticles and conjugated polyelectrolytes. Online. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022, č. 107(24), s. 10837–10841. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.1005632107>. [cit. 2024-06-27].
49. HALPERN, Aaron R.; CHEN, Yulin; CORN, Robert M. a KIM, Donghyun. Surface plasmon resonance phase imaging measurements of patterned monolayers and DNA adsorption onto microarrays. Online. Anal Chem. 2011, č. 83(7), s. 2801-2806. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac200157p>. [cit. 2024-06-24].
50. EKSIN, Ece a Arzum ERDEM. Recent Progress on Optical Biosensors Developed for Nucleic Acid Detection Related to Infectious Viral Diseases. Micromachines [online]. 2023, (14(2)), 295 [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: [doi:10.3390/mi14020295](https://doi.org/10.3390/mi14020295).
51. YANG, Tao, Zewei LUO, Yonghui TIAN, Cheng QIAN a Yixiang DUAN. Design strategies of AuNPs-based nucleic acid colorimetric biosensors. TrAC Trends in Analytical Chemistry [online]. 2020, (124), 115795 [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: [doi:10.1016/j.trac.2019.115795](https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115795).
52. SKLÁDAL, Petr. Piezoelectric biosensors: shedding light on principles and applications. Online. Mikrochim Acta. 2024, č. 191(4), s. 184. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00604-024-06257-9>. [cit. 2024-06-24].
53. POHANKA, Miroslav. The Piezoelectric Biosensors: Principles and Applications, a Review. Online. Int. J. Electrochem. Sci. 2017, č. 12, s. 496-506. Dostupné z: <https://doi.org/10.20964/2017.01.44>. [cit. 2024-06-24].
54. WANG, Xue; LU, Xianbo a CHEN, Jiping. Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants. Online. Trends in Environmental Analytical Chemistry. 2014, č. 2, s. 25-32. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.teac.2014.04.001>. [cit. 2024-06-24].
55. WILLIAMSON, Paul; PISKUNEN, Petteri; IJÄS, Heini; BUTTERWORTH, Adrian; LINKO, Veikko et al. Signal Amplification in Electrochemical DNA Biosensors Using Target-Capturing DNA Origami Tiles. Online. ACS Sensors. 2023, č. 8(4), s. 1471–1480. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acssensors.2c02469>. [cit. 2024-06-27].

56. HUA, Yu; MA, Jiaming; LI, Dachao a WANG, Ridong. DNA-Based Biosensors for the Biochemical Analysis: A Review. Online. *Biosensors (Basel)*. 2022, č. 12(3), s. 183. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios12030183>. [cit. 2024-06-27].
57. BARRIAS, Sara; IBÁÑEZ, Javier; FERNANDES, José R. a MARTINS-LOPES, Paula. The role of DNA-based biosensors in species identification for food authenticity assessment. Online. *Trends in Food Science & Technology*. 2024, č. 145. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104350>. [cit. 2024-06-26].
58. HUANG, Chi-Wei; LIN, Chitsan; NGUYEN, Minh Ky; HUSSAIN, Adnan; BUI, Xuan-Thanh et al. A review of biosensor for environmental monitoring: principle, application, and corresponding achievement of sustainable development goals. Online. *Bioengineered*. 2023, č. 14(1), s. 58-80. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2095089>. [cit. 2024-06-26].
59. WANG, Jiangshan; DAVIDSON, Josiah Levi; KAUR, Simerdeep; RANJIBARAN, Mohsen; KAMEL, Mohamed S. et al. Paper-Based Biosensors for the Detection of Nucleic Acids from Pathogens. Online. *Biosensors*. 2022, č. 12(12), s. 1094. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios12121094>. [cit. 2024-06-27].
60. QUAZI, Sameer. Application of biosensors in cancers, an overview. Online. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023, č. 11, s. 1193493. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1193493>. [cit. 2024-06-27].
61. WU, Kaimin; KONG, Feizhi; ZHANG, Jingjing; TANG, Ying; CHEN, Yao a kol. Nedávný pokrok v biosenzorech jednonukleotidového polymorfismu. Online. *Biosenzory*. 2023, č. 13(9). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios13090864>. [cit. 2024-06-27].
62. WANG, ZongWen; ZHANG, Jing; GUO, Ying; WU, XiaoYan; YANG, WeiJuan a kol. Nový elektricky magneticky ovladatelný elektrochemický biosenzor pro ultra citlivou a specifickou detekci mikroRNA související s rakovinou dutiny ústní na úrovni atomu. Online. *Biosenzory a bioelektronika*. 2013, č. 45, s. 108-113. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.02.007>. [cit. 2024-06-27].
63. SINTIM, Herman O.; YAN, Lei a NAKAYAMA, Shizuka. Junction Probes – sekvenčně specifická detekce nukleových kyselin prostřednictvím template Enhanced Hybridization Processes. Online. *Journal of the American Chemical Society*. 2008, č. 130(38), s. 12560–12561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ja803146f>. [cit. 2024-06-27].