

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DISERTAČNÍ PRÁCE

2009

Mgr. Petra Horáková

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra analytické chemie

**Elektrochemická analýza nukleotidových sekvencí
s využitím enzymových a elektroaktivních značek**

Disertační práce

Autor: Mgr. Petra Horáková

Školitel: prof. Ing. Karel Vytřas, DrSc.

Školitel-specialista: doc. RNDr. Miroslav Fojta, CSc.

2009

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
Department of Analytical Chemistry

Electrochemical Analysis of Nucleotide Sequences
Using Enzymes and Electroactive Labels

Dissertation Thesis

Author: Mgr. Petra Horáková

Supervisor: prof. Ing. Karel Vytrás, DrSc.

Supervisor-specialist: doc. RNDr. Miroslav Fojta, CSc.

2009

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.

V Pardubicích dne 1.9. 2009

Petra Horáková

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. Ing. Karlu Vytřasovi, DrSc. za možnost studovat pod jeho vedením doktorský program.

Velký dík patří mému školiteli – specialistovi doc. RNDr. Miroslavu Fojtovi, CSc. z Biofyzikálního ústavu AV ČR, v.v.i. v Brně za poskytnutí pracovního zázemí na svém oddělení. Děkuji mu též za odborné vedení, cenné rady a předané zkušenosti a také za připomínky při zpracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat spolupracovníkům z Biofyzikálního ústavu za příjemné pracovní prostředí a veškerou pomoc, které se mi od nich dostalo.

V neposlední řadě děkuji své rodině a především manželovi za nekonečnou podporu a trpělivost.

Souhrn

Tato disertační práce je zaměřena na elektrochemickou analýzu nukleotidových sekvencí s využitím enzymových a elektrochemických značek. Teoretická část je rozdělena do tří kapitol. První popisuje vlastní elektrochemickou aktivitu DNA na rtuťových a uhlíkových elektrodách a představuje nejčastěji používané elektrochemické metody pro detekci DNA. Druhá kapitola se zabývá elektrochemickou detekcí hybridizace DNA pomocí uhlíkových elektrod a biosenzorů na bázi uhlíkových tištěných elektrod. Třetí je pak věnována možnostem a příkladům značení DNA pomocí nukleotidů modifikovaných elektrochemicky aktivními značkami.

Experimentální část je přiložena ve formě pěti publikací otištěných v impaktovaných časopisech, viz přílohy 1-5. V kapitole Výsledky a diskuze jsou shrnuty a stručně komentovány výsledky obsažené v těchto článcích.

Dvě z přiložených prací jsou zaměřeny na detekci nukleotidových sekvencí DNA pomocí amplifikace detekovaného signálu reakcí katalyzovanou enzymem alkalickou fosfatázou navázanou na DNA. V první publikaci byly navrženy metody pro sekvenční analýzu DNA s využitím tištěných uhlíkových elektrod. Pomocí hybridizace cílové DNA se specifickým primerem nebo sekvenčně specifickým včleněním biotinylovaných nukleosid trifosfátů (dNTP) metodou prodlužování primeru (PEX) bylo možno nejen ověřit přítomnost hledané sekvence ve studovaném úseku genu *p53*, ale i monitorovat expresi genu *rbcL* v různých tkáních rostliny tabáku. V druhé práci byla metoda PEX využita pro analýzu jednonukleotidových polymorfismů v genu *p53* a exprese jeho mutantních forem v buněčných liniích. Detekce byla prováděna pomocí elektrody z pyrolytického grafitu.

Následující tři publikace se zabývaly značením DNA pomocí dNTP nesoucích elektrochemicky aktivní značku, které byly začleněny do řetězce DNA polymerázami. Pro modifikaci DNA bylo použito pět různých značek. Tři z nich obsahovaly ionty kovů (ferocen, komplexy $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ a $[\text{Os}(\text{bpy})_3]^{2+}$), další dvě byly organické elektroaktivní skupiny (nitro- a aminoderiváty fenylu). Všechny, kromě komplexu $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, měly velmi vhodné vlastnosti pro elektrochemickou detekci značené DNA uhlíkovými elektrodami. Zavedené značky byly využity pro detekci jednonukleotidových polymorfismů a pro „vícebarevné“ elektrochemické značení, umožňující detekci různě modifikovaných DNA nebo jedné DNA modifikované různými značkami současně.

Summary

This dissertation thesis is focused on the electrochemical analysis of nucleotide sequences using enzymes and electroactive labels. The theoretical part consists of three sections. In the first one, intrinsic electrochemical activity of DNA on mercury or carbon electrodes and electrochemical methods frequently used for the DNA detection are described. The second section deals with the electrochemical detection of DNA hybridization using carbon electrodes and biosensors based on screen-printed carbon electrodes (SPCE). In the third section, the possibilities of DNA labeling using nucleotides modified with electrochemically active labels are introduced.

Experimental part of the thesis encompasses five papers published in international peer-reviewed journals (see appendices 1-5). The results included in these papers are summarized and briefly commented in the chapter Results and Discussion.

Two of the attached publications are focused on the detection of DNA nucleotide sequences using amplification of the detected signals by catalytic reaction of alkaline phosphatase used as an enzyme label. In the first paper, methods for sequence-specific analysis using SPCE are proposed. The presence of a target sequence in the studied *p53* gene fragment is detected using the target DNA hybridization with specific primer or using sequence-specific incorporation of a nucleoside triphosphate (dNTP), bearing biotin as an anchor for the enzyme attachment, by primer extension (PEX). The same approaches were used for the detection of *rbcl* gene expression in different tissues of tobacco plant. In the second publication, the PEX method was applied for the single nucleotide polymorphisms analysis in *p53* gene and for monitoring expression of its mutants in human cell lines.

The other three publications are focused on DNA labeling by incorporation of dNTPs bearing electroactive labels into DNA by DNA polymerases. Five different labels were prepared; three of them included a metal ion (ferrocene, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ and $[\text{Os}(\text{bpy})_3]^{2+}$ complexes), the other two were organic electroactive groups (nitro- and amino derivatives of phenyl). All of them, with the exception of the $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ complex, exhibited excellent features for the electrochemical detection of the labeled DNA using carbon electrodes. These labels were applied for the single nucleotide polymorphisms detection and in the “multicolor” electrochemical DNA labeling.