

## 55 LET ELEKTROCHEMIE NUKLEOVÝCH KYSELIN

EMIL PALEČEK<sup>a,b,\*</sup>, VERONIKA OSTATNÁ<sup>a</sup>  
a ZDENĚK PECHAN<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Biofyzikální ústav Akademie věd české republiky, v.v.i.,  
Královopolská 135, 612 65 Brno, <sup>b</sup> Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno  
palecek@ibp.cz

Došlo 5.2.14, přijato 6.3.14.

Klíčová slova: elektrochemie nukleových kyselin, historie, chromosomální a plasmidové DNA, RNA transferové a virové, značení DNA, rtuťové a pevné elektrody, elektrody modifikované DNA, struktura DNA na elektrodách, polarografie, voltametrie, chronopotenciometrie

## Obsah

1. Úvod
2. Redukovatelnost DNA
3. Oscilografická polarografie a rtuťové elektrody
4. V laboratoři J. Marmura
5. Pulzní polarografie
6. Věda, politika a elektrochemická analýza RNA
7. Vliv potenciálu elektrody na strukturu DNA imobilizované na elektrodě
8. Elektroaktivní značky nukleových kyselin
9. Elektrody modifikované DNA a adsorptivní přenosová voltametrie
10. Elektrochemie biomakromolekul
11. Závěr

## 1. Úvod

Po objevu struktury dvojité šroubovice DNA v r. 1953 (cit.<sup>1</sup>), vzrostl zájem o chemické i biologické vlastnosti DNA. V té době literatura uváděla, že ze všech monomerních složek DNA je polarograficky redukovatelný pouze adenin<sup>2</sup>. V r. 1957 Berg deklaroval polymerní DNA a RNA jako polarograficky inaktivní<sup>3</sup>. Ve stejné době experimenty prováděné jedním z nás (EP) na Biofyzikálním ústavu ČSAV v Brně (BFÚ) ukazovaly, že všechny baze, DNA i RNA jsou polarograficky aktivní a že je

lze elektrochemicky stanovit v relativně nízkých koncentracích. Tyto výsledky EP publikoval v r. 1958 (cit.<sup>4</sup>). Bergův závěr byl založen na experimentech prováděných v alkalickém prostředí. Později bylo zjištěno, že zbytky bází v DNA i RNA se redukují v protonizovaném stavu a v alkalickém prostředí žádné redukční signály neposkytují<sup>5</sup>. Podrobnější diskusi Bergových výsledků nalezne čtenář v cit.<sup>6</sup>. V sérii prací publikovaných EP do r. 1990 měla velký význam práce v časopise *Nature*<sup>7</sup>, která vyšla v r. 1960, tedy rok po udělení Nobelovy ceny J. Heyrovskému a krátce před udělením téže ceny J. Watsonovi, F. Crickovi a M. Wilkinsovi (1962) za objev struktury DNA. Tato práce ukazovala, že elektrochemie dokáže rozlišit dvoušroubovicovou DNA od jejich jednořetězových degradačních produktů. V téže době bylo ukázáno, že za elektrochemické signály DNA jsou odpovědný redukční a oxidační elektrodové děje bází (adenin (A), cytosin (C), guanin (G)), že tyto signály odráží změny ve struktuře DNA, při nichž se mění dostupnost bází pro elektrodové interakce<sup>5,7,8</sup> a že elektrochemicky lze sledovat denaturaci a renaturaci DNA<sup>9,10</sup>.

Již od začátku 60. let minulého století byla pořádána sympózia v Jeně (NDR), na nichž otázky elektrochemie nukleových kyselin často představovaly hlavní náplň přednášek i diskusí. V 70. letech začaly hrát důležitou roli i sympózia, pořádaná v Brně, jejichž hlavním tématem byla elektrochemie nukleových kyselin. Těchto sympózií se účastnila řada významných zahraničních elektrochemiků, jako např. P. J. Elving (USA), G. C. Barker (UK), G. Dryhurst (USA), H. Berg (NDR), W. Nurnberg (SRN) B. Czochralska (Polsko), B. Malfroy (Francie) i odborníků na nukleové kyseliny, jako D. Crothers (USA), W. Guschlbauer (Francie), H. Sobell (USA), P. T'so (USA), S. Bram (Francie) a další.

V průběhu prvních třech desetiletí se další laboratoře v Evropě i USA zapojily do výzkumu v oblasti elektrochemie DNA (více podrobností je v cit.<sup>11</sup>) V té době bylo dosaženo velmi významného pokroku [např. rozlišení dvouřetězové DNA (double-stranded, dsDNA)<sup>5,12–14</sup> a RNA<sup>15</sup> od jejich jednořetězových forem (single-stranded, ssDNA), navržení prvních elektroaktivních značek DNA a RNA<sup>16–19</sup>, elektrod modifikovaných DNA<sup>20,21</sup>], atd. (tab. I). Navzdory tomu, počet prací publikovaných v této oblasti (asi 7 až 10 laboratořemi) se pohyboval kolem 10 až 20 za rok. Od roku 1990 se situace dramaticky změnila. Počet prací na téma elektrochemie nukleových kyselin začal vzrůstat exponenciálně (obr. 1) a v současné době se pohybuje kolem 800 prací za rok. Příčinou tohoto vzestupu

\* Emil Paleček je laureátem ceny firmy Metrohm 2013 za celoživotní přínos k rozvoji elektroanalytické chemie.

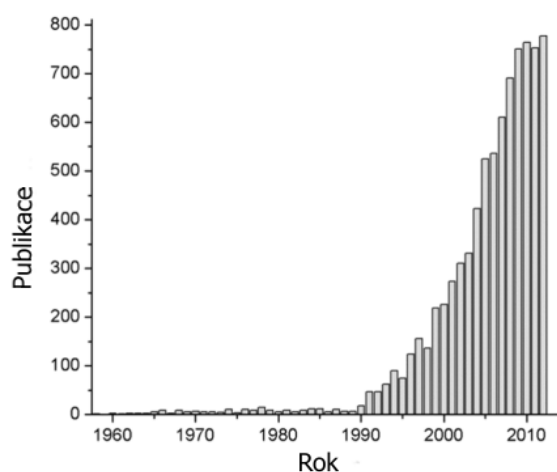
## Tabulka I

Důležitá zjištění v počátečních třech dekadách výzkumu nukleových kyselin (1958–1988).

Autoři jsou uváděni v závorkách. Pokud není uveden žádný autor, výsledky byly získány v laboratoři EP v Brně.

I.	1958	DNA a RNA a všechny volné base jsou elektroaktivní <sup>4</sup>
II.	1960–61	Přiřazení elektrochemických signálů DNA jednotlivým bazím. Oscilografická polarografie reflektuje strukturu DNA <sup>7,116–118</sup>
III.	1961	Adsorpce DNA na rtuťových elektrodách (ac impedanční studie); (I. R. Miller, Rehovot <sup>119,120</sup> )
IV.	1962–66	DNA premelting, denaturace, renaturace/hybridizace mohou být sledovány elektrochemicky, stopy jednořetězové DNA stanoveny v nativní dsDNA. Vliv nukleotidových sekvencí na elektrochemické signály dsDNA <sup>10,13,121–124</sup>
V.	1966	Aplikace pulsní polarografie na studia DNA <sup>13</sup>
VI.	1967	Detekce poškození DNA <sup>30,38</sup>
VII.	1967	Interakce nízkomolekulárních sloučenin s DNA (P. J. Hillson, M. J. Simons, Harrow, UK a H. Berg, Jena) <sup>49,125,126</sup>
VIII.	1974	Dvoušroubovice DNA se může na povrchu elektrody u negativních potenciálů rozvinout (E. Paleček, Brno a H. W. Nürnberg, Jülich, nezávisle na sobě)
IX.	1976	Elektrochemické chování DNA svědčí o polymorfii její dvoušroubovicové struktury <sup>8</sup>
		Po dvě desetiletí byly v analýze NA používány pouze rtuťové elektrody
X.	1978	Pevné (uhlíkové) elektrody byly uvedeny do výzkumu NA (V. Brabec a G. Dryhurst, Norman, Okla <sup>127</sup> )
XI.	1980	Stanovení bazí nukleových kyselin v nanomolárních koncentracích katodickou rozpouštěcí voltametří <sup>104,128–130</sup>
XII.	1981–93	Elektroaktivní značky kovalentně vázané na DNA <sup>58,131,132</sup>
XIII.	1986–88	DNA-modifikované elektrody <sup>21,73,133</sup>

Převzato se souhlasem z cit.<sup>6</sup> Copyright 2009, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.



Obr. 1. Publikované práce na téma *Elektrochemie nukleových kyselin* mezi rokem 1958 a 2012. Graf je sestaven na základě informací z Web of Science pro klíčové slova (polarograph\*AND DNA) nebo (electrochem\* AND DNA) nebo (electrochem\* AND "nucleic acid\*"). Převzaté s povolením z cit.<sup>6</sup> Copyright 2009 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

byla skutečnost, že se ukázalo, že elektrochemická analýza se dobře hodí ke zjišťování sekvencí nukleotidů v DNA a mohla by být zvláště výhodná při jejich decentralizované analýze v menších nemocnicích a případně i v ordinacích lékařů. Vedle toho je tato analýza vhodná pro další účely, jako např. detekce poškození DNA, interakce DNA s proteiny, stanovení mikroRNA, atd. Současnými trendy v elektrochemii DNA se zabývá článek M. Bartošíka v tomto čísle *Chemických listů*<sup>134</sup> a nedávno publikované přehledy<sup>20,22</sup>. V našem článku se pokusíme ukázat, že její začátky najdeme právě v Československu a krátce shrneme, jak a kdy tento výzkum začal.

## 2. Redukovatelnost DNA

Nejméně 10 let byl EP jediným na světě, který dokazoval, že DNA může podléhat redukčním a oxidačním dějům na elektrodách a poskytovat analyticky využitelné signály. V té době elektrochemici dávali přednost studiu jednodušších nízkomolekulárních látek a možnost polarografické redukovatelnosti velikých molekul DNA, majících komplikované prostorové uspořádání, se jim zdála

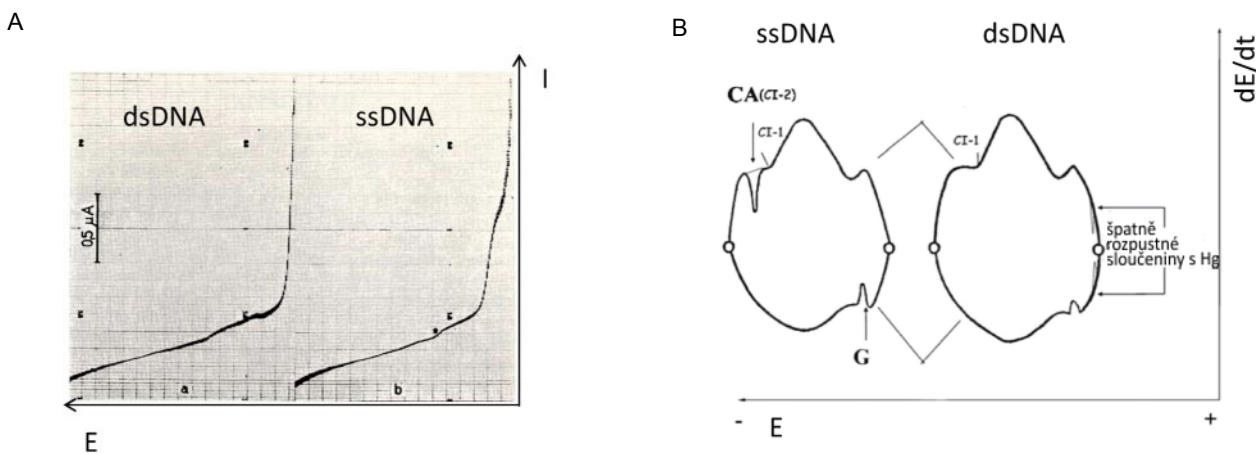
neuvěřitelná. Zde je třeba poznamenat, že nativní dvoušroubovicová DNA (v níž byly redukovatelné A a C baze ukryty uvnitř její struktury) se chovala skutečně jako nereduovatelná při použití málo citlivé klasické (d.c.) polarografie<sup>23</sup> a její redukovatelnost se projevila teprve po denaturaci DNA (obr. 2A), která zlepšila dostupnost redukovatelných bazí pro elektrodové děje. Většina elektrochemiků, kteří se k práci EP vyjadřovali, se však o chemii DNA nezajímala a zdenaturovat DNA neuměla. V r. 1961 jeden významný československý elektrochemik písemně kritizoval EP, který svoji práci musel ve veřejné rozpravě obhajovat, protože vedení BFÚ hrozilo, že bude nucen svoje elektrochemické výzkumy ukončit. Bez podpory J. Heyrovského, jeho nejbližších spolupracovníků a porozumění ze strany československých a zahraničních (zejména USA) biochemiků, by pravděpodobně EP se svou prací neuspěl. Podle názoru četných elektrochemiků by bylo možno říci, že elektrochemie vstoupila do výzkumu nukleových kyselin příliš brzy. Vlažný vztah elektrochemiků k DNA lze ilustrovat výrokem jednoho skandinávského elektrochemika, který ještě v r. 1971 v diskusi po přednášce EP uvedl: „What is this DNA? Is it something like our sheep milk, which precipitates, when the storm is coming?“ Naproti tomu biochemici soudili, že elektrochemie měla do výzkumu DNA vstoupit dříve. Můžeme zmínit výrok jednoho z účastníků Gordon Research Conferen-

ce, v New Hampshire, 1963 (které se účastnilo mnoho předních vědců v oblasti DNA a RNA, včetně čerstvého nositele Nobelovy ceny M. Wilkinse), který po přednášce EP řekl: „Finally polarography comes in“.

### 3. Oscilografická polarografie a rtuťové elektrody

Věcně vzato rané experimenty v oblasti elektrochemie DNA před r. 1958 musely být dělány se rtuťovou elektrodou, neboť rtuťová kapková elektroda (dropping mercury electrode, DME) byla základem klasické (d.c.) polarografie<sup>24</sup>, která v té době v elektrochemii převládala. Využití DME k analýze DNA mohlo být však jen stěží úspěšné ve spojení s d.c. polarografií. K analýze dlouhých molekul chromosomální DNA byly nezbytné jiné typy polarografie, které by byly citlivější než klasická polarografie. Vyšší citlivosti bylo možno dosáhnout jednak (a) lepší eliminací nabíječícího (kapacitního) proudu a jednak (b) akumulací DNA na povrchu elektrody, která však vyžadovala, aby celá analýza byla provedena na jediné kapce rtuti. Možnost (a) v té době řešila pulzní polarografie, zatímco možnost (b) nabízela Heyrovského oscilografická polarografie.

Podle našich vědomostí, existovaly v té době jen 2 země, ve kterých mohly být nejpravděpodobněji elektro-



Obr. 2. (A) D.c. polarogram 500 mg/ml nativní dsDNA a denaturované ssDNA z telecího brzlíku, ukazující slabě vyvinutou d.c. polarografickou vlnu ssDNA při  $-1,4$  V. Křivky začínají od potenciálu 0.0 V. dsDNA v neutrálním prostředí i při relativně vysoké koncentraci se jevila jako polarograficky inaktivní. Naproti tomu oscilopolarografie při 10x nižší koncentraci dsDNA poskytovala zářez CI-1 a malý anodický zářez G (podmíněný oxidací redukčního produktu zbytku guaninu). (B) Oscilopolarogram ssDNA a dsDNA. Vrchní část oscilopolarogramu ukazuje směr katodické polarizace od 0 do  $-2$  V (v závislosti od složení základního elektrolytu). Spodní část reprezentuje anodickou polarizaci od  $-2$  V zpět k 0 V. Dva světlé body pozorovány na obrazovce osciloskopu: bod napravo označuje nejpozitivnější potenciály a je ovlivněn rozpouštěním rtuti. Bod vlevo je způsoben redukcí kationů ze základního elektrolytu. Přítomnost elektroaktivní substance (depolarizátoru) v roztoku se projevuje zářezy. Potenciály těchto zářezů korespondují s půlvlnovým potenciálem v d.c. polarografii. Porovnání potenciálů zářezů poskytuje informaci o reverzibilitě daných elektrodových procesů. Plocha a hloubka zářezů závisí na koncentraci analytu, podobně jako výška d.c. polarografické vlny. Katodický zářez CI-2 (podmíněn redukcí A a/nebo C) je charakteristický pro denaturovanou ssDNA, zatímco kapacitní CI-1 poskytují obě, jak nativní dsDNA tak i ssDNA. Obě ss a dsDNA dávají pík G, i když pík dsDNA je mnohem menší. DNA byla tepelně denaturována v 7 mM NaCl s 0.7 mM citrátem, pH 7. Převzaté s povolením z (A)<sup>25</sup> a (B)<sup>110</sup> Copyright 2002 a 1968 Elsevier a John Wiley & Sons

chemické experimenty s DNA úspěšně zahájeny. Byla to Anglie a Československo. V Anglii měl G. C. Barker (který se zasloužil svou prací v oblasti výzkumu radarů o obranu Anglie za II. světové války<sup>29</sup>) již v té době k dispozici (jím vyvinutý) pulzní polarograf, který se později ukázal být velmi vhodným nástrojem při analýze DNA<sup>10,14,30,31</sup>, tento přístroj však tehdy nebyl ještě komerčně dostupný. Barker se ale začal zajímat o DNA mnohem později<sup>25–29</sup>. J. Heyrovský navrhl novou polarografickou metodu, tzv. oscilografickou polarografií, již v r. 1941. První práce s DNA vznikly pouze díky přístroji pro oscilografickou polarografií (OP), (podle současné nomenklatury chronopotenciometrie střídavým proudem). Polaroskop P524 se stal komerčně dostupným v Československu již v první polovině 50. let 20. století. Vladimír Morávek, profesor biochemie na Masarykově univerzitě v Brně a někdejší přednosta výzkumného oddělení Masarykova onkologického ústavu, byl mezi prvními, kteří tento přístroj zakoupili. Dal ho ihned k dispozici svým studentům biochemie, aby ho mohli využít při svých diplomových pracích. Trojice studentů D. Kaláb, Z. Pechan a EP si v laboratoři prof. Morávka vychutnala práci na polarografu i Polaroskopu při analýze bílkovin<sup>32</sup> a aminokyselin<sup>33</sup> (na Polaroskopu neaktivněji pracoval D. Kaláb<sup>34–37</sup>). Tato práce jim umožnila uvědomit si rozdíly, výhody a nevýhody těchto dvou přístrojů a metod, které nabízely. V době, kdy DME vládla elektrochemické analýze, tyto studenti neváhali pracovat i s pevnými amalgamovými elektrodami<sup>33,37</sup>. Díky získaným zkušenostem mohl EP, po svém nástupu do špatně vybavených laboratoří BFÚ<sup>38</sup>, využít oscilografickou polarografií (OP) k analýze DNA a RNA. Na BFÚ dostal EP za úkol zkoumat poškození DNA ionizujícím zářením (úkol typický pro období „studené války“). Brzy se ukázalo, že OP a později i další, novější elektrochemické metody (derivační/diferenční pulzní polarografie) rozeznávají změny ve struktuře DNA a citlivě detegují i jednořetězové zlomy (single strand breaks) v DNA<sup>30</sup> a že se tedy dobře hodí i ke studiu poškození DNA zářením<sup>39</sup> (obr. 2B).

#### 4. V laboratoři J. Marmura v Bostonu

Záhy po publikování práce o oscilografické polarografii chromosomální DNA v časopise *Nature*<sup>7</sup> byl EP pozván J. Marmurem z Harvardovy univerzity, aby v jeho laboratoři pracoval jako post-doktorand. Trvalo to asi dva roky, než bylo EP povoleno vycestovat z Československa, což se mu jevilo přímo jako zázrak. Výrazně k tomu přispěla skutečnost, že Julius Marmur v r. 1961 při své cestě na světový Biochemický kongres v Moskvě se stavitel v Brně, chtěl vidět oscilopolarografické pokusy s DNA a šel se zeptat ředitele BFÚ, prof. F. Herčíka, proč EP ještě neodjel do USA. Totéž učinil i L. Grossman (který pozval EP do své laboratoře o něco později než J. Marmur) a který se kromě OP signálů nativní a denaturované DNA zajímal o chování chemicky modifikované DNA. Na F. Herčíka (který před r. 1939 pracoval na Rockefellerově

ústavu v New Yorku) rozhovory s dvěma americkými vědci silně zapůsobily a přestal zdůrazňovat, že cesta EP do USA je zcela vyloučena.

V té době bylo možné sledovat elektrochemicky DNA denaturaci a renaturaci pouze pomocí OP. Tato technika odkryla také nový jev, tzv. předdenaturační změny v DNA (DNA premelting). EP znal práce svého budoucího šéfa, který spolu s P. Dotym objevil renaturaci DNA<sup>40</sup> a navrhl velmi jednoduchou metodu izolace DNA z bakterií<sup>41</sup>. V té době jeho laboratoř disponovala pravděpodobně nejobtáhlejší sbírkou čistých nativních bakteriálních DNA (s rozličným složením basí) na světě, takže vznikla neobyčejná příležitost pro aplikaci OP. V r. 1962 se přístroj pro oscilografickou polarografií „Polaroskop P 524“ vyráběl pouze v Československu. J. Marmur (který se mezitím přesunul z Harvardu na Brandeis University v Bostonu) (Graduate Department of Biochemistry, Boston, Mass, USA) EP doporučil, aby Polaroskop přivezl s sebou. Přístroj byl poslán do USA s předstihem jako letecká zásilka. Před odjezdem byl v laboratoři EP zkonstruován nový multifunkční přístroj, který s použitím pravouhého střídavého proudu byl schopen registrovat jednorázové („single-sweep“) oscilogramy při různých frekvencích, rovněž další funkce kromě  $dE/dt$  proti  $E$  apod. Nicméně tento přístroj nebylo EP dovoleno vyvézt ze země. Vybaven doporučujícím dopisem od J. Heyrovského přiletěl EP do USA koncem listopadu 1962. Neměl pochybnosti o vhodnosti své elektrochemické metody pro výzkum nukleových kyselin. Bohužel, přístroj dorazil do Bostonu až po 9 měsících a byl poškozený a nefunkční. V laboratoři byl učiněn jednomyšlný závěr, že přístroj byl „velmi důkladně prozkoumán“ tajnými službami na obou stranách Železné opony.

Mezitím se EP zapracoval do mikrobiologie i do práce na analytické ultracentrifuze a zúčastnil se molekulárně-biologických studií, které se týkaly transkripce RNA<sup>42</sup>. Univerzitní dílna odmítla poškozený přístroj (zkonstruovaný na základě předválečných technologií) opravit, ale nakonec se EP podařilo přesvědčit jednoho majitele opravny televizorů, aby se o to pokusil. Oprava se podařila a přesto, že univerzita byla ochotná opravu zaplatit, majitel opravny úhradu nepřijal s tím, že je rád, že mohl něco udělat pro vědu.

Ke konci svého pobytu se EP podařilo vykonat některá měření s DNA, která dokončil až v Brně. Tyto výsledky ukázaly, že na rozdíl od denaturace DNA, premelting DNA byl výrazně závislý na nukleotidových sekvencích bakteriálních DNA<sup>10</sup>. Dá se uzavřít, že velká šance pro elektrochemickou analýzu DNA byla v roce 1963 prakticky ztracena. Ve své práci EP doma pokračoval za obvyklých podmínek nedostatku chemikálií a vědeckých informací ze Západu.

#### 5. Pulzní polarografie

Diferenční pulsní polarografie (DPP) byla poprvé použita pro analýzu DNA v r. 1965, díky tomu, že si EP povšimnul přístroje vystavovaného na brněnském veletrhu

firmou Southern-Harwell (Pulse Polarograph) a přesvědčil technika (B. D. Frary) této firmy, aby mu dovolil měření roztoků DNA na vystavovaném přístroji v průběhu výstavy. Velké rozdíly ve výšce DPP piků ss a dsDNA byly použity pro vysoce citlivé stanovení stop ssDNA za přítomnosti velkého nadbytku dsDNA a práce byla publikována v r. 1966 v Arch. Biochem. Biophys.<sup>13</sup>. V šedesátých letech a v první polovině let sedmdesátých elektrochemické techniky, zejména pak DPP, přinesly první poznatky nejen o premelting DNA, ale také o polymorfii dvoušroubovice DNA (přehled viz<sup>8</sup>). Polymorfie struktury DNA byla později spolehlivě prokázána studii RTG-krytalografie a NMR<sup>43,44</sup>. Bylo by vhodné ve studiu DNA premelting pokračovat, neboť existuje naděje, že současné elektrochemické techniky by mohly pomoci osvětlit dřívější výsledky a přispět k lepšímu porozumění vlastností DNA jak v roztoku, tak na nabitých površích.

## 6. Věda, politika a elektrochemická analýza RNA

Když by se biochemik podíval na vývoj elektrochemie nukleových kyselin do roku 1988, mohl by si všimnout, že většina prací se zabývá DNA a jen velmi málo prací se týká RNA. Kolem roku 1969 projevil němečtí biochemici v SRN zájem o elektrochemickou analýzu RNA a po dohodě s EP mu poslali několik vzorků tRNA specifických pro různé aminokyseliny. První měření přinesla zajímavé výsledky. Když o nich EP informoval ředitele ústavu, dostal striktní zákaz se vzorky dále pracovat, protože by ředitel nemohl obhájit další působení EP na ústavu. EP nezbylo nic jiného, než práci s tRNA přerušit.

Dnes to zní divně, ale třeba poznamenat, že po roce 1969 byl EP na doporučení Městského výboru KSČ zbaven funkce vedoucího svého týmu a předurčen k propuštění z ústavu. Naštěstí ředitel ústavu Z. Karpfel ustanovil za nového vedoucího oddělení mikrobiologa, který o elektrochemii nukleových kyselin neměl zájem a práce týmu pokračovala jako orchestr bez kapelníka. EP velmi ocenil chování svých tehdejších spolupracovníků a bývalých studentů/aspirantů, jako V. Brabce, E. Lukášové a M. Vorlíčkové, kteří ho v obtížné době podporovali, přesto, že ztratil možnost jim za jejich práci navrhovat odměny. Naděje pro EP svítila v době, kdy skončil obecný zákaz obhajovat dizertace DrSc. Nový předseda komise pro obhajoby z biochemie Dr. J. Říman si všimnul dizertace EP (dokončené koncem r. 1969) a otázal se ředitele BFÚ, proč nebyla vyvinuta iniciativa potřebná k zahájení řízení směřujícího k obhajobě. Když mu bylo vysvětleno, že EP upadl v nemilost u výboru KSČ, navrhl J. Říman práci na Státní cenu za vědu. BFÚ podal návrh na tři vědce: Z. Karpfel (ředitel BFÚ), E. Paleček, M. Skalka (předseda závodního výboru KSČ BFÚ) a v r. 1976 byla cena udělena. Díky tomu byla EP povolena obhajoba jeho dizertace, přestalo se uvažovat o jeho propuštění, a posléze mu byla vrácena i jeho funkce. Svůj neúspěch s elektrochemií tRNA, si EP kompenzoval v r. 1974 spoluprací

s J. Doskočilem<sup>15</sup> na virové dsRNA, která se chovala podobně jako dsDNA.

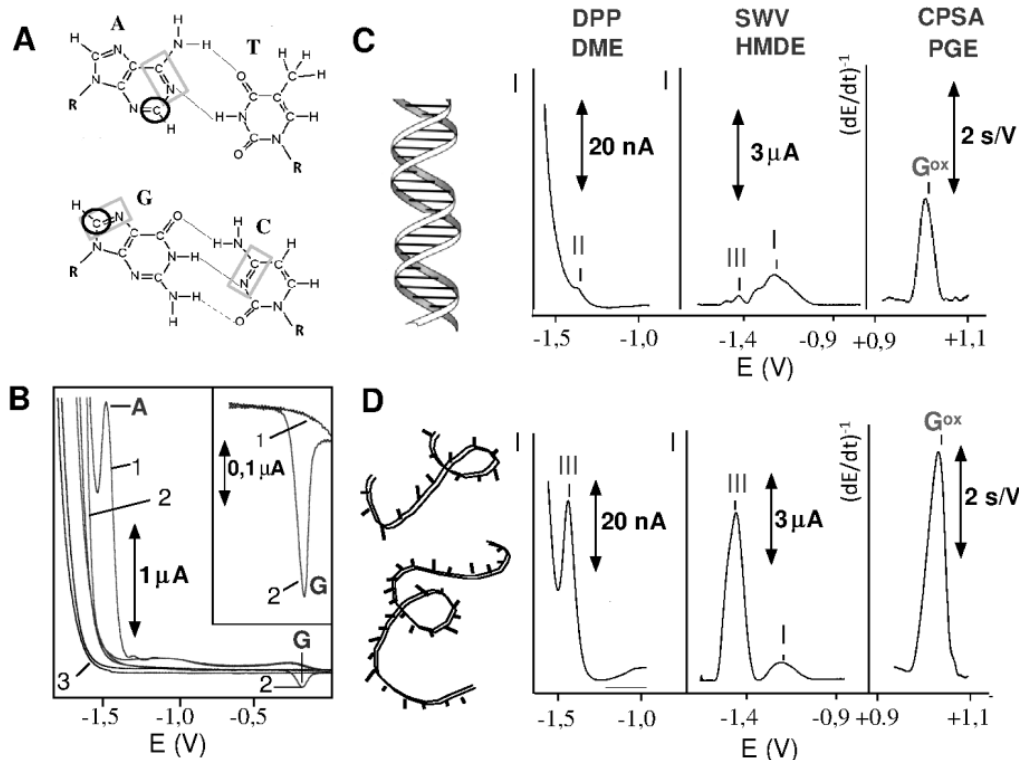
## 7. Vliv potenciálu elektrody na strukturu DNA imobilizované na elektrodě

Dobrá korelace mezi polarografickými odezvami (při práci s metodami používajícími malé změny potenciálu během života rtuťové kapky, jako jsou klasická polarografie nebo DPP) na straně jedné a optickými metodami na straně druhé naznačovaly, že struktura dsDNA se významně nemění během adsorpce dsDNA na DME kolem  $-1,4$  V, kde se tvořily redukční signály DNA. Naproti tomu při práci s metodami používajícími velké změny potenciálu během života rtuťové kapky (jako je normální pulsní polarografie, NPP, nebo voltametrie, NPV) byly získány odlišné výsledky<sup>45</sup>. V úzkém potenciálovém rozmezí blízkém potenciálu desorpce dsDNA (okolo  $-1,2$  V) se objevily velké změny v mezipovrchových vlastnostech dsDNA, v důsledku delší expozice dsDNA těmto potenciálům (přehled viz<sup>11,46,47</sup>). V r. 1974 tyto změny byly interpretovány ve smyslu otevírání (povrchové denaturace) dvojité šroubovice DNA na negativně nabitým povrchu elektrody (viz přehled<sup>47</sup>). V kyselém prostředí se objevila povrchová denaturace DNA v širším potenciálovém rozmezí<sup>48</sup> (viz přehledy<sup>47,49</sup>). Další experimenty s elektrodami modifikovanými DNA<sup>46</sup> a zejména kovalentně uzavřenou kruhovou DNA silně podporovaly otevírání<sup>50–55</sup> dvojité šroubovice DNA na povrchu elektrody. V posledních letech byl prokázán vliv negativních potenciálů na denaturaci dsDNA imobilizovaných na různých elektrodách a tento jev byl využit v hybridizačních senzorech DNA<sup>20</sup>.

## 8. Elektroaktivní značky nukleových kyselin

*Nekovalentní interakce.* Nukleové kyseliny jsou elektroaktivní, ale k jejich irreverzibilní redukci či oxidaci na elektrodách dochází u dosti negativních nebo pozitivních potenciálů (přehled např.<sup>20,56</sup>). Proto byly činěny pokusy o přípravu komplexů nebo derivátů NA, které by poskytovaly reverzibilní signály při méně extrémních potenciálech nebo katalytické signály, které by umožnily dosažení vyšší citlivosti a/nebo lepší selektivity pro strukturu DNA. Koncem šedesátých let se Berg zabýval interakcemi DNA s elektroaktivními interkalátory, když studoval léčiva a jiné látky, které se vážaly nekovalentně na DNA<sup>57</sup>. Později byly zkoumány interakce DNA s molekulami interkalátorů i látek, které se vážou do žlábků dvoušroubovice DNA (groove binders). Tyto látky vážící se přednostně na dsDNA měly sloužit k rozlišení ds a ssDNA v hybridizačních senzorech (viz přehledy<sup>20,56</sup>).

*Kovalentně vázané značky.* První elektroaktivní značky kovalentně vázané na DNA byly použity počátkem osmdesátých let<sup>16,17,58,59</sup>. Byly založeny na komplexech oxidu osmičelého (osmium tetroxide) s dusíkatými ligandy [Os(VIII)L], které vytvářely stabilní DNA-Os(VIII)L adukty a tvořily redoxní páry při cyklické voltametii (CV)

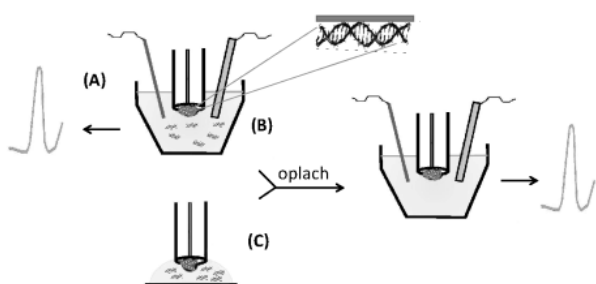


Obr. 3. Redukce a oxidace jednořetězové a dvouřetězové nukleové kyseliny na elektrodách. (A) Schematická reprezentace Watson-Crickova párováníází a elektroaktivních skupin. Primární redukční a oxidační místa na rtuťových (obdélníky) a uhlíkových elektrodách (kruhy). (B) Cyklický voltamogram syntetických polynukleotidů ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) měřených na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) (1) polyadenylová kyselina, (2) polyguanylová kyselina, (3) elektrolyt. Vložen detail píku G. (C, D) Redoxní signály získané s (C)  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  nativní (dvoušroubovicové) dsDNA nebo (D)  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  denaturované (jednořetězové) ssDNA pomocí (I) diferenční pulzní polarografie (DPP) na rtuťové kapkové elektrodě (DME), (II) adsorpční přenosové rozpouštěcí (AdTS) voltametrie s pravouhlejším napětím (square wave voltammetry, SWV) na HMDE a (III) AdTS chronopotenciometrie konstantním proudem na pyrolytické uhlíkové elektrodě (PGE). Převzaté s povolením z cit.<sup>56</sup> Copyright 2001 American Chemical Society.

na uhlíkových a rtuťových elektrodách a poskytovaly katalytický signál kolem  $-1,2 \text{ V}$  na rtuťové elektrodě; navíc tyto komplexy vykazovaly užitečnou selektivitu pro ssDNA<sup>18,60,61</sup>. První kovalentně vázané elektroaktivní značky DNA se brzy staly sondami struktury DNA *in vitro*<sup>62–64</sup> a v buňkách<sup>63,65,66</sup> ve spojení s různými metodami, včetně technik sekvenování DNA a imunologických stanovení (viz přehledy<sup>43,63,67</sup>). Os(VIII)L komplexy se váží přednostně na pyrimidiny v ssDNA, a umožňují citlivé stanovení DNA<sup>68,69</sup>. Při pokusech s adsorpční transferovou square-wave voltametrií s objemem analytu  $3 \mu\text{l}$  postačovaly pro analýzu stovky attomolů ss 20-meru oligodeoxynukleotidu (ODN) při krátkých akumulacích časech. V devadesátých letech byly kovalentně navázány na konce ODN deriváty ferrocenu, daunomycin a další sloučeniny, poskytující reverzibilní redoxní páry, které pak byly použity ve studiích hybridizace DNA (přehled viz<sup>20,70</sup>).

## 9. Elektrody modifikované DNA a adsorpční přenosová voltametrie

Na začátku osmdesátých let 20. století významnost elektrochemických technik pro biochemické a molekulární biologické studie DNA rychle klesala, neboť výzkum DNA byl orientován na studie s dobře definovanými ODN a plasmidovými nebo virovými DNA se známými nukleotidovými sekvencemi. Příprava takových vzorků DNA byla pracná a v té době nákladná, takže byly preferovány citlivější biochemické metody. Oligonukleotidy byly pro nás cenově nedostupné a první práci s ODN jsme publikovali až v r. 1990 ve spolupráci s krystalografem (U. Heinemann), který nám laskavě dal několik preparátů k dispozici<sup>71</sup>. Uprostřed osmdesátých let jsme v naší laboratoři využili silné adsorpce DNA a RNA na rtuťové a uhlíkové elektrody a navrhli experimenty s elektrodami modifikovanými DNA<sup>21,72,73</sup>. Navrhli jsme tzv. adsorpční přenosovou techniku (Adsorptive Transfer Stripping,



Obr. 4. Při konvenční analýze (AdS, *in situ*), (A) DNA je adsorbována na elektrodu z analytické nádoby, v které probíhá jak adsorpce DNA na elektrodu tak i záznam voltamogramu. Při přenosové analýze (AdT, *ex situ*) je adsorpce a elektrodový proces oddělen. DNA je adsorbována na povrch (B) z elektrolytické cely nebo (C) z malé kapky roztoku DNA (kolem 5  $\mu$ l). DNA-modifikovaná elektroda je umyta a přenesena do nádoby se základním elektrolytem (neobsahujícím DNA), kde je voltamogram zaznamenán.

AdTS), která umožňovala práci s malými kapkami (3–10  $\mu$ l) roztoku DNA či jiné biomakromolekuly<sup>21,55,72,73</sup>. Elektroda pokrytá vrstvou DNA byla promyta a přenesena do roztoku čistého základního elektrolytu, kde mohly být sledovány interakce DNA s jinými látkami a provedena elektrochemická měření (obr. 3). Za několik let elektrody modifikované DNA (DNA-modified electrodes) dominovaly na poli elektrochemie DNA v souvislosti s výzkumem a vývojem senzorů a detektorů DNA (viz přehledy<sup>11,20,56,74</sup>). Kombinace AdTS s chronopotenciometrií konstantním proudem byla zvláště úspěšná v analýze nukleových kyselin<sup>75–77</sup> a bílkovin<sup>78–80</sup> na uhlíkových a rtuťových elektrodách. Později se stala populární kovalentní imobilizace NA (např. oligonukleotidy na konci značené sírou na zlatých elektrodách (viz přehledy<sup>11,20,56,70,74,81</sup>).

## 10. Elektrochemie biomakromolekul

Vedle elektrochemické analýzy DNA a RNA<sup>20,74,82–86</sup> se v posledních letech naše laboratoř orientuje na elektrochemii nekonjugovaných bílkovin a glykoproteinů<sup>20,74,87–93</sup> a na chemickou modifikaci a elektrochemické chování polysacharidů a oligosacharidů<sup>20,74,94–98</sup>. Kolem roku 1960 jsme používali metodu oscilografické polarografie (tj. chronopotenciometrie střídavým proudem) a v posledních letech pracujeme opět s chronopotenciometrií, ale používáme její modernější variantu, u které nacházíme jedinečné vlastnosti při analýze bílkovin a interakcích bílkovin s DNA<sup>99,100</sup>.

## 11. Závěr

Kolem r. 1960 EP ukázal, že DNA a RNA mohou odvádět nebo přijímat elektrony při interakcích

s elektrodami. První tři desetiletí jeho laboratoř rozvíjela analýzu DNA s ohledem na citlivost elektrochemického chování DNA ke změnám v její struktuře. První práce se zabývaly především polydispersními molekulami chromosomálních DNA<sup>5</sup> a biosyntetickými polynukleotidy<sup>101,102</sup>, později byly studovány i monodispersní plasmidové DNA<sup>103</sup>. Navrhli jsme metody stanovení nanomolárních koncentrací nízkomolekulárních komponent DNA a RNA, založených na schopnosti těchto látek vytvářet špatně rozpustné sloučeniny se rtuť<sup>104–106</sup>. Kolem r. 1995 se práce zaměřily na syntetické oligonukleotidy v souvislosti s výzkumem senzorů DNA<sup>20</sup> a spolu s laboratoří J. Wanga jsme využili peptidovou nukleovou kyselinu k navržení první elektrochemické metody detekce bodových mutací v DNA (point mutation, single base mismatch<sup>107</sup> a přispěli k výzkumu senzorů a detektorů DNA. V současné době se orientujeme na elektrochemii nekonjugovaných bílkovin a glykoproteinů a interakce DNA s proteiny. Přesnější obraz o vývoji elektrochemie nukleových kyselin i práci laboratoře EP v uplynulých letech může čtenář nalézt v knižních i časopiseckých přehledných článcích<sup>5,8,11,14,18,20,43,47,63,74,90,108–115</sup>.

*Tato práce vznikla za podpory RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101 a GACR P301/11/2055.*

## LITERATURA

1. Watson J. D., Crick F. H. C.: *Nature* 171, 737 (1953).
2. Bendich A., v knize: *The Nucleic Acids* (E. Chargaff a J. N. Davidson, ed.), Academic Press, New York 1955.
3. Berg H.: *Biochem. Z.* 329, 274 (1957).
4. Paleček E.: *Naturwissenschaften* 45, 186 (1958).
5. Paleček E., v knize: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (J. N. Davidson a W. E. Cohn, ed.), Academic Press, New York 1969.
6. Paleček E.: *Electroanalysis* 21, 239 (2009).
7. Paleček E.: *Nature* 188, 656 (1960).
8. Paleček E.: *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 18, 151 (1976).
9. Paleček E.: *J. Mol. Biol.* 11, 839 (1965).
10. Paleček E.: *J. Mol. Biol.* 20, 263 (1966).
11. Paleček E.: *Electroanalysis* 8, 7 (1996).
12. Paleček E.: *Biochim. Biophys. Acta* 94, 293 (1965).
13. Paleček E., Frary B. D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 115, 431 (1966).
14. Paleček E., v knize: *Methods in Enzymology: Nucleic Acids, part D* (L. Grossman a K. Moldave, ed.), Academic Press, New York 1971.
15. Paleček E., Dorskocil J.: *Anal. Biochem.* 60, 518 (1974).
16. Lukášová E., Jelen F., Paleček E.: *Gen. Physiol. Biophys.* 1, 53 (1982).
17. Paleček E., Lukášová E., Jelen F., Vojtísková M.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 8, 497 (1981).

18. Palecek E.: *Meth. Enzymol.* 212, 139 (1992).
19. Fojta M., Kostecka P., Trefulka M. R., Havran L., Palecek E.: *Anal. Chem.* 79, 1022 (2007).
20. Palecek E., Bartosik M.: *Chem. Rev.* 112, 3427 (2012).
21. Palecek E., Postbieglová I.: *J. Electroanal. Chem.* 214, 359 (1986).
22. Palecek E.: *Electroanalysis* 21, 239 (2009).
23. Palecek E., Vetterl V.: *Biopolymers* 6, 917 (1968).
24. Heyrovský J., Kůta J.: *Základy polarografie.*, Naklad. ČSAV, Praha 1962.
25. Barker G. C.: *J. Electroanal. Chem. Interfac. Electrochem.* 214, 373 (1986).
26. Barker G. C.: *J. Electroanal. Chem. Interfac. Electrochem.* 226, 171 (1987).
27. Barker G. C., Gardner A. W.: *Analyst* 117, 1811 (1992).
28. Barker G. C., McKeown D.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 3, 373 (1976).
29. Palecek E., Heyrovsky M.: *Talanta* 56, 805 (2002).
30. Palecek E.: *Biochim. Biophys. Acta* 145, 410 (1967).
31. Palecek E.: *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 142 (1968).
32. Palecek E.: *Pharmazie* 11, 551 (1956).
33. Pechan Z., Kaláb D., Palecek E.: *Pharmazie* 10, 526 (1955).
34. Kaláb D.: *Die Pharmazie* 10, 528 (1955).
35. Kaláb D.: *Die Pharmazie* 11, 265 (1956).
36. Kaláb D.: *Naturwissenschaften* 44, 350 (1957).
37. Kaláb D., Franek F.: *Die Pharmazie* 10, 31 (1955).
38. Palecek E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 76, 1799 (2011).
39. Lukášová E., Palecek E.: *Radiat. Res.* 47, 51 (1971).
40. Marmur J., Rownd R., Schildkraut C. L., v knize: *Progress in Nucleic Acid Research* (J. N. Davidson a W. E. Cohn, ed.), Academic Press, London 1963.
41. Marmur J.: *J. Mol. Biol.* 3, 208 (1961).
42. Marmur J., Greenspan C. M., Palecek E., Kahan F. M., Levine J., Mandel M., v knize: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* ed.), Cold Spring Harbor 1963.
43. Palecek E.: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26, 151 (1991).
44. Sinden R. R.: *DNA Structure and Function*, Academic Press, San Diego 1994.
45. Palecek E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 39, 3449 (1974).
46. Palecek E.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 28, 71 (1992).
47. Palecek E., v knize: *Topics in Bioelectrochemistry and Bioenergetics* (G. Milazzo, ed.), J. Wiley, London 1983.
48. Valenta P., Nurnberg H. W.: *Biophys. Struct. Mech.* 1, 17 (1974).
49. Berg H., v knize: *Topics Bioelectrochemistry Bioenergetics* (G. Milazzo, ed.), J. Wiley, London 1976.
50. Fojta M., Bowater R. P., Stanková V., Havran L., Lilley D. M. J., Palecek E.: *Biochemistry* 37, 4853 (1998).
51. Fojta M., Kubicárová T., Palecek E.: *Electroanalysis* 11, 1005 (1999).
52. Fojta M., Kubicárová T., Vojtesek B., Palecek E.: *J. Biol. Chem.* 274, 25749 (1999).
53. Fojta M., Palecek E.: *Anal. Chim. Acta* 342, 1 (1997).
54. Fojta M., Stanková V., Palecek E., Koscielniak P., Mítás J.: *Talanta* 46, 155 (1998).
55. Teijeiro C., Nejedly K., Palecek E.: *J. Biomol. Struct. Dyn.* 11, 313 (1993).
56. Palecek E., Fojta M.: *Anal. Chem.* 73, 74A (2001).
57. Berg H., Eckardt K.: *Z. Naturforsch. Part B – Chemie Biochemie Biophysik Biologie Und Verwandten Gebiete B* 25, 362 (1970).
58. Palecek E., Hung M. A.: *Anal. Biochem.* 132, 236 (1983).
59. Palecek E., Vojtisková M., Jelen F., Lukášová E.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 12, 135 (1984).
60. Lilley D. M., Palecek E.: *EMBO J.* 3, 1187 (1984).
61. Nejedly K., Kwinkowski M., Galazka G., Klysik J., Palecek E.: *J. Biol. Struct. Dyn.* 3, 467 (1985).
62. Galazka G., Palecek E., Wells R. D., Klysik J.: *J. Biol. Chem.* 261, 7093 (1986).
63. Palecek E.: *Meth. Enzymol.* 212, 305 (1992).
64. Palecek E., Vojtisková M., Jelen F., Kozinová M., v knize: *Charge and field effects in biosystems* (M. J. Allen, ed.), P.N.R. Usherwood, Abacus press, Tonbridge (UK) 1984.
65. Karlovsky P., Pecinka P., Vojtisková M., Makaturová E., Palecek E.: *FEBS Lett.* 274, 39 (1990).
66. Palecek E., Robert-Nicoud M., Jovin T. M.: *J. Cell Sci.* 104, 653 (1993).
67. Palecek E., v knize: *Nucleic acids and Molecular Biology* (E. Eckstein a D. M. J. Lilley, ed.), Springer Verlag, Berlin 1994.
68. Jelen F., Karlovsky P., Pecinka P., Makaturová E., Palecek E.: *Gen. Physiol. Biophys.* 10, 461 (1991).
69. Kizek R., Havran L., Fojta M., Palecek E.: *Bioelectrochemistry* 55, 119 (2002).
70. Wang J.: *Chem. Eur. J.* 5, 1681 (1999).
71. Palecek E., Kolár V., Jelen F., Heinemann U.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 23, 285 (1990).
72. Palecek E.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 15, 275 (1986).
73. Palecek E.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 20, 171 (1988).
74. Palecek E., Bartosik M., Ostatna V., Trefulka M.: *Chem. Rec.* 12, 27 (2012).
75. Cai X., Rivas G., Farias P. A. M., Shiraishi H., Wang J., Fojta M., Palecek E.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 40I, 41 (1996).
76. Palecek E., Tomschik M., Stanková V., Havran L.: *Electroanalysis* 9, 990 (1997).
77. Wang J., Cai X., Wang J., Jonsson C., Palecek E.: *Anal. Chem.* 67, 4065 (1995).
78. Cai X., Rivas G., Shiraishi H., Farias P., Wang J., Tomshik M., Jelen F., Palecek E.: *Anal. Chim. Acta*



- 344, 65 (1997).
79. Wang J., Rivas G., Cai X., Chirarro M., Farias P. A. M., Palecek E.: *Electroanalysis* 8, 902 (1996).
  80. Tomschik M., Havran L., Fojta M., Palecek E.: *Electroanalysis* 10, 403 (1998).
  81. Thorp H. H.: *Trends Biotechnol.* 16, 117 (1998).
  82. Bartosik M., Fojta M., Palecek E.: *Electrochim. Acta* 78, 75 (2012).
  83. Bartosik M., Palecek E.: *Electroanalysis* 23, 1311 (2011).
  84. Campuzano S., Kuralay F., Lobo-Castanon M. J., Bartosik M., Vyavahare K., Palecek E., Haake D. A., Wang J.: *Biosens. Bioelectron.* 26, 3577 (2011).
  85. Ostatna V., Palecek E.: *Langmuir* 22, 6481 (2006).
  86. Trefulka M., Bartosik M., Palecek E.: *Electrochem. Commun.* 12, 1760 (2010).
  87. Ostatna V., Dogan B., Uslu B., Ozkan S., Palecek E.: *J. Electroanal. Chem.* 593, 172 (2006).
  88. Ostatna V., Jelen F., Hianik T., Palecek E.: *Electroanalysis* 17, 1413 (2005).
  89. Paleček E., Černocká H., Ostatná V., Navrátilová L., Brázdová M.: *Anal. Chim. Acta*, v tisku.  
doi.org/10.1016/j.aca.2014.03.029
  90. Palecek E., Ostatna V.: *Electroanalysis* 19, 2383 (2007).
  91. Palecek E., Ostatna V.: *Chem. Commun.* 1685 (2009).
  92. Polaskova P., Novotny L., Ostatna V., Palecek E.: *Electroanalysis* 21, 625 (2009).
  93. Cernocka H., Ostatna V., Palecek E.: *Anal. Chim. Acta* 789, 41 (2013).
  94. Palecek E., Trefulka M., Fojta M.: *Electrochem. Commun.* 11, 359 (2009).
  95. Trefulka M., Ostatna V., Havran L., Fojta M., Palecek E.: *Electroanalysis* 19, 1281 (2007).
  96. Trefulka M., Palecek E.: *Electroanalysis* 21, 1763 (2009).
  97. Trefulka M., Palecek E.: *Electroanalysis* 22, 1837 (2010).
  98. Trefulka M., Palecek E.: *Bioelectrochemistry* 88, 8 (2012).
  99. Ostatna V., Cernocka H., Palecek E.: *Bioelectrochemistry* 87, 84 (2012).
  100. Ostatna V., Cernocka H., Palecek E.: *J. Am. Chem. Soc.* 132, 9408 (2010).
  101. Palecek E.: *J. Electroanal. Chem.* 22, 347 (1969).
  102. Palecek E., Jelen F., Vetterl V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 52, 2810 (1987).
  103. Boubliková P., Vojtísková M., Palecek E.: *Anal. Lett.* 20, 275 (1987).
  104. Palecek E.: *Anal. Biochem.* 108, 129 (1980).
  105. Palecek E., Jelen F., Hung M., Lasovsky J.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 8, 621 (1981).
  106. Palecek E., Osteryoung J., Osteryoung R. A.: *Anal. Chem.* 54, 1389 (1982).
  107. Wang J., Palecek E., Nielsen P., Rivas G., Cai X., Shiraishi H., Dontha H., Luo D., Farias P. A. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7667 (1996).
  108. Kuta J., Palecek E., v knize: *Topics in Bioelectrochemistry and Bioenergetics* (G. Milazzo, ed.), J. Wiley, London 1983.
  109. Palecek E., v knize: *Proc. Electroanal. Hyg. Environm., Clin. Pharm. Chem.* (W. F. Smyth, ed.), Elsevier, Amsterdam 1980.
  110. Palecek E.: *Talanta* 56, 809 (2002).
  111. Palecek E., Fojta M., Jelen F., Vetterl V., v knize: *The encyclopedia of electrochemistry* (A. J. Bard a M. Stratsmann, ed.), Wiley-VCH, New York 2002.
  112. Palecek E., v knize: *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics.* (E. Palecek, F. Scheller a J. Wang, ed.), Elsevier, Amsterdam 2005.
  113. Palecek E., Fojta M., v knize: *Bioelectronics* (E. Willner a E. Katz, ed.), Wiley-VCH, Weinheim 2005.
  114. Palecek E., Jelen F., v knize: *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics.* (E. Palecek, F. Scheller a J. Wang, ed.), Elsevier, Amsterdam 2005.
  115. Zuman P., Palecek E., v knize: *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics.* (E. Palecek, F. Scheller a J. Wang, ed.), Elsevier, Amsterdam 2005.
  116. Palecek E.: *Biokhimiya* 25, 803 (1960).
  117. Palecek E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 25, 2283 (1960).
  118. Palecek E.: *Biochim. Biophys. Acta* 51, 1 (1961).
  119. Miller I. R.: *J. Mol. Biol.* 3, 229 (1961).
  120. Miller I. R.: *J. Mol. Biol.* 3, 357 (1961).
  121. Palecek E.: *Z. Chem.* 2, 260a (1962).
  122. Palecek E.: *Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin* 270 (1964).
  123. Palecek E.: *Proc. Elektrochemische methoden und prinzipien in der molekular-biologie, III. Jenaer symp.* Berlin 1966.
  124. Palecek E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 31, 2360 (1966).
  125. Hillson P. J.: *J. Soc. Dyers Colour.* 83, 186 (1967).
  126. Simons M. J.: *Trans. Faraday Soc.* 64, 727 (1968).
  127. Brabec V., Dryhurst G.: *J. Electroanal. Chem.* 91, 219 (1978).
  128. Palecek E.: *Anal. Lett.* 13, 331 (1980).
  129. Palecek E., Jelen F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 45, 3472 (1980).
  130. Palecek E., Jelen F., Manousek O.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 45, 3472 (1980).
  131. Lukášová E., Vojtísková M., Palecek E.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 7, 671 (1980).
  132. Palecek E.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 8, 469 (1981).
  133. Palecek E.: *Anal. Biochem.* 170, 421 (1988).
  134. Bartošik M.: *Chem. Listy* 108, 500 (2014).

**Paleček E.<sup>a,b</sup>, V. Ostatná<sup>a</sup>, and Z. Pechan<sup>a</sup>** (*Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, and Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno*):  
**Fifty Five Years of Nucleic Acid Electrochemistry**

Electrochemistry of nucleic acid is at present a booming field producing about 800 papers published per year. First papers in this field were published in 1958–1961 in Brno (Czech Republic) showing that purine and pyrimidine base residues in single-stranded DNA and RNA were reduced at Hg electrodes and the guanine residue produced an anodic signal when cyclic modes were used. The reduction sites of the base residues in native double-stranded (ds) DNA are hidden in the interior of the dsDNA molecule, which made their reduction difficult. At that time oscillographic polarography (ac chronopotentiometry) showed excellent sensitivity to changes in DNA structure and allowed to investigate DNA denaturation and hybridization. Later on also other electrochemical methods and electrodes were applied. In the following three decades basic principles were found which are at present used in the development of DNA hybridization sensors.