

ELEKTROCHEMICKÁ ANALÝZA POŠKOZENÍ, HYBRIDIZACE A DALŠÍCH INTERAKCÍ DNA

JAN VACEK^{a,b}, LUDĚK HAVRAN^a
a MIROSLAV FOJTA^a

^a Oddělení biofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav, v.v.i. AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno, ^b Ústav lékařské chemie a biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
jan.vacek@upol.cz, fojta@ibp.cz

Došlo 21.7.09, přepracováno 30.11.09, přijato 18.2.10.

Klíčová slova: elektrody, nukleové kyseliny, elektrochemie, senzory, redukce, oxidace

Obsah

1. Úvod
2. Objev elektroaktivity DNA
3. Rtuťové elektrody
 - 3.1. Adsorpčně-desorpční děje a strukturních změny DNA na rtuťových elektrodách
4. Oxidace bází a studium DNA interakcí na uhlíkových elektrodách
5. Elektroaktivní značky nukleových kyselin
6. *Ex situ* elektrochemická měření a magnetoseparační techniky
7. DNA-senzory a jejich aplikace
 - 7.1. Hybridizační DNA-senzory
 - 7.2. Elektrochemické senzory pro poškození a interakce DNA
 - 7.2.1. Poškození DNA
 - 7.2.2. Interakce DNA s kovy a jejich komplexy
 - 7.2.3. Interakce DNA s léčivými a jinými interkalátory
 - 7.2.4. Interakce DNA s bílkovinami
8. Závěr

1. Úvod

Vzorky nukleových kyselin řadíme do skupiny vysoce komplexních analytů, které, podobně jako bílkoviny nebo cukry, jsou schopné zaujímat rozmanité konformace (strukturní stavy) v závislosti na prostředí, ve kterém se vyskytují. V současné době je pro studium nukleových kyselin a dalších biopolymerů využíváno široké spektrum moderních elektrochemických metod a přístupů, které

umožňují analyzovat jejich stopová množství ve velmi malých objemech vzorku. Předkládaný článek se zabývá aplikací těchto moderních analytických nástrojů a kromě historicky původních objevů jsou zde shrnuty vybrané recentní aplikace z oboru. Článek je zaměřen na využití rtuťových a uhlíkových elektrod pro detekci DNA. Problematika je popisována a diskutována především z pohledu využití elektroanalytických metod pro studium poškození, hybridizace a interakcí DNA s nízkomolekulárními (léčiva, ionty a komplexy kovů) a makromolekulárními látkami (jako jsou bílkoviny).

2. Objev elektroaktivity DNA

Elektrochemický výzkum biopolymerů byl v první polovině 20. století více orientován na problematiku bílkovin než nukleových kyselin. Již počátkem 30. let byly publikovány první polarografické studie bílkovin J. Heyrovským¹ a R. Brdičkou². Byly sledovány polarografické vlny odpovídající katalytickým reakcím bílkovin na povrchu rtuťových elektrod. Polarografické metody s kapající rtuťovou elektrodou (DME) našly významné uplatnění v analýze nízkých koncentrací bílkovin obsahujících cystein, a byly aplikovány i jako diagnostické nástroje v lékařském výzkumu. Detaily a historické souvislosti lze nalézt v řadě přehledných prací, např.^{3,4}.

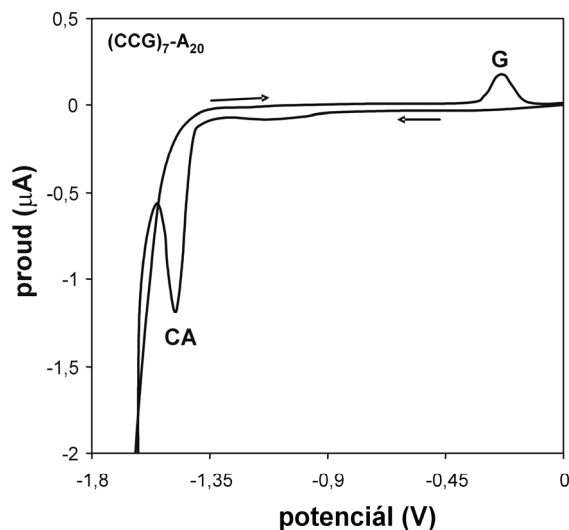
V návaznosti na tato polarografická měření se v 50. letech 20. století pokusil H. Berg⁵ analyzovat bílkoviny v přítomnosti DNA za podobných experimentálních podmínek, za jakých byly prováděny experimenty R. Brdičky². Za těchto podmínek však nebyly pozorovány elektrochemické odezvy DNA a výsledky tedy nasvědčovaly tomu, že DNA není redukovatelná na rtuťové elektrodě. Až v roce 1958 byla uveřejněna práce E. Palečka, který pomocí oscilografické polarografie se střídavým proudem prokázal elektroaktivitu DNA (původní práce^{6,7}, přehledně v cit.⁸). V roce 1961 byla také publikována první práce, která se zabývala adsorpcí DNA na povrch rtuťové elektrody⁹. Výsledky impedančního měření ukázaly, že kromě elektrochemické aktivity je DNA povrchově aktivní látkou schopnou adsorpce na rozhraní povrchu elektrody a vodného prostředí a při vkládání negativních potenciálů podléhá charakteristickým adsorpčně-desorpčním dějům.

Uvedené objevy vedly k dalšímu zkoumání elektrické a povrchové aktivity nukleových kyselin a v průběhu druhé poloviny minulého století byly intenzivně zkoumány různé strukturní formy DNA. Získané poznatky jsou ve stručnosti nastíněny v následujících odstavcích 3 až 5, kde jsou popsány základní mechanismy redukce a oxidace DNA na rtuťových a uhlíkových elektrodách a využití elektroaktivních markerů pro značení studované DNA.

3. Rtuťové elektrody

Na povrchu rtuti dochází (v závislosti na pH elektrolytu) k ireverzibilní redukci cytosinu a adeninu (v DNA poskytují jediný pík CA) při potenciálech kolem $-1,45$ V proti Ag/AgCl/3 M KCl referenční elektrodě, ke které jsou vztaženy i všechny dále uváděné potenciály (obr. 1). Naproti tomu elektrochemicky ireverzibilní redukce guaninu probíhá až ve značně negativních potenciálech ($E < -1,6$ V) a redukční pík guaninu není na elektrochemických záznamech pozorovatelný. Při těchto negativních potenciálech dochází k intenzivnímu vylučování vodíku na povrchu elektrody a proudové příspěvky spojené s touto reakcí jsou mnohonásobně vyšší nežli redukční proudy guaninu. Pozorovat lze až oxidaci vzniklého redukčního produktu guaninu¹⁰ (7,8-dihydrogenguanin), a to kolem potenciálu $-0,3$ V, viz pík G na obr. 1. Redukce thyminu, popř. uracilu v ribonukleové kyselině (RNA) na povrchu rtuti byla pozorována pouze v nevodném prostředí (dimethylsulfoxid) při velmi negativních potenciálech¹¹. Tento přístup ovšem nenašel širší uplatnění pro biochemické analýzy reálných vzorků DNA.

Experimenty s rtuťovými elektrodami poskytují velmi reprodukovatelné výsledky a byly aplikovány pro stanovení DNA různými elektrochemickými metodami. Kromě klasických polarografických měření a voltametrie s lineárním rostoucím napětím byly použity pulzní voltamet-



Obr. 1. Cyklický voltamogram oligonukleotidu s redukčním píkem cytosinu a adeninu (CA) a oxidačním píkem (G) redukčního produktu guaninu naměřený na HMDE. Použitá metoda: AdT CV, koncentrace (CCG)₇-A₂₀: $5 \mu\text{g ml}^{-1}$, základní elektrolyt: 0,3 M mravenčan amonný/0,05 M fosforečnan sodný (pH 6,95), adsorptivní přenos oligonukleotidu z prostředí 0,2 M NaCl (t_4 : 1 min), měřeno od 0 do $-1,8$ V, potenciálový krok: 5 mV, rychlost polarizace: 1 V s^{-1} , kyslík byl ze základního elektrolytu odstraněn

rické techniky. Diferenční pulzní polarografie (DPP) byla poprvé aplikována pro analýzu DNA v roce 1965. DPP byla s úspěchem využita pro analýzu denaturace DNA a studium předdenaturačních změn¹². Výšky redukčních DPP píků jednořetězcové (ss) DNA jsou významně vyšší než v případě dvouřetězcové (ds) DNA, jelikož v případě dsDNA jsou redukovatelné skupiny bázi méně přístupné povrchu elektrody a ssDNA se adsorbuje na povrch rtuti silněji nežli dsDNA. Tyto jevy byly později detailněji zkoumány a potvrzeny měřením diferenciální kapacity elektrodové dvojvrstvy impedanční spektroskopii¹³ a dalšími fázově citlivými technikami, jako je voltametrie se střídavou složkou napětí (ACV), shrnuto v cit.¹⁴. Pro citlivou analýzu nukleových kyselin na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) se ukázala jako vhodná voltametrie s vkládaným pravouhlým napětím (SWV). Tato metoda byla použita mimo jiné pro sledování procesu poškození ssDNA působením dimethylsulfátu. K tomuto účelu byl sledován pokles píku G indikující poškození guaninových zbytků¹⁵.

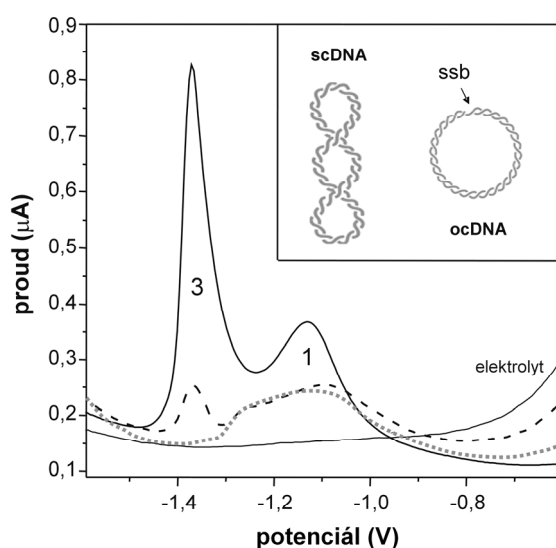
Z galvanostatických metod se osvědčila rozpouštěcí chronopotenciometrie s konstantním proudem (CPSA)¹⁶. Tato metoda je svou podstatou podobná tzv. oscilografické polarografii, kterou zavedl J. Heyrovský v roce 1941 (cit.¹⁷), a pomocí které byly prováděny první elektrochemické analýzy DNA^{6,7}. V případě CPSA se sleduje časový průběh změny potenciálu pracovní elektrody za konstantního proudu. Výhodou této metody je možnost provádět elektrochemická měření v elektrolytech obsahujících kyslík, což je při voltametrických měřeních obvykle komplikováno katodickými proudy souvisejícími s redukcí kyslíku.

V posledních letech jsou pro konstrukci nových DNA-senzorů používány syntetické analogy DNA (PNA: peptidová nukleová kyselina, LNA: angl. „locked nucleic acid“). Na povrchu rtuti byly metodou cyklické voltametrie (CV) a SWV studovány různé oligonukleotidy DNA a PNA a jejich hybridy. PNA je schopna vytvářet stabilní duplexy s DNA a je proto využívána v různých typech DNA hybridizačních senzorů. PNA nenese elektrický náboj, na rozdíl od negativně nabitě DNA, což se odráží v jejím chování na elektricky nabitěm povrchu. PNA poskytuje na HMDE katodické a anodické píky podobně jako DNA s tím rozdílem, že (v oblasti neutrálního pH) jsou pozorovatelné při negativnějších potenciálech a mohou být vyšší nežli píky DNA¹⁸.

3.1. Adsorpčně-desorpční děje a strukturální změny DNA na rtuťových elektrodách

Fázově citlivé metody poskytují cenné informace o adsorpci studované DNA na povrchu rtuťových elektrod v závislosti na její struktuře¹⁹. V katodickém AC voltamogramu DNA lze pozorovat sérii tenzametrických píků, které souvisí s adsorpcí/desorpcí resp. reorientací molekul DNA na elektrodovém povrchu.

Při potenciálu kolem $-1,2$ V se projevuje segmentální desorpce cukr-fosfátové páteře DNA v podobě voltametrického píku (označovaného jako pík 1). K desorpci částí



Obr. 2. AdT AC voltamogramy denaturované ocDNA (plná čára), ocDNA (čárkovaná) a scDNA (tečkovaná/šedě) na HMDE. Parametry měření: frekvence: 230 Hz, amplituda: 10 mV, rychlost polarizace: 10 mV s⁻¹, adsorptivní přenosová technika (t_A : 60 s), elektrolyt: 0,3 M-NaCl + 0,05 M-Na₂HPO₄; kyslík nebyl ze základního elektrolytu odstraněn; ssb: jednořetězcový zlom

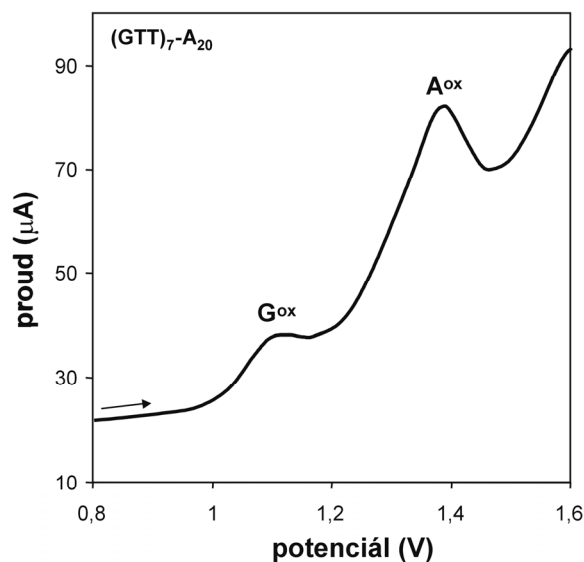
molekul DNA adsorbovaných na povrchu elektrody prostřednictvím bází dochází až při negativnějších potenciálech kolem -1,4 V (pík 3, obr. 2). Tento tenzametrický pik je pozorován pouze v případě, že je na povrch elektrody adsorbována ssDNA nebo jednořetězcové úseky uvnitř dsDNA. V případě dsDNA se v širokém rozmezí potenciálů významně nemění její struktura, ale při potenciálech kolem -1,2 V (tzv. U-region) byl pozorován jev, který je označován jako povrchová denaturace²⁰. To znamená, že pokud dsDNA obsahuje volné konce, dochází v jejich okolí k odvíjení dvoušroubovice DNA, které je řízeno potenciálem elektrody. Kromě uvedených piků 1 a 3, byl identifikován pik 2 okolo -1,3 V (často se částečně překrývá s pikem 1), který lze pozorovat při konformačních změnách (distorzi) v úsecích dsDNA vyvolaných např. její interakcí s interkalátorem²¹. Uvedené adsorpčně/desorpční píky nejsou pozorovatelné u PNA, jelikož její pseudopeptidová páteř není elektricky nabitá, a v důsledku toho její komponenty, na rozdíl od negativně nabitě DNA, nepodléhají desorpci při negativních potenciálech²².

Jako pracovní elektrody se dají pro ACV měření použít kromě HMDE i pevné elektrody na bázi rtuti (např. amalgamové elektrody). Na povrchu elektrody ze stříbrného nebo platinového amalgamu nebo uhlíkových elektrod potažených vrstvou rtuti lze sledovat totožné tenzametrické píky, jaké byly popsány výše²³. Amalgamové elektrodové materiály obvykle neposkytují tak reprodukovatelné

výsledky jako HMDE, avšak jsou vhodnější pro konstrukci DNA-senzorů.

4. Oxidace bází a studium DNA interakcí na uhlíkových elektrodách

Uhlíkové elektrody, na rozdíl od rtuťových elektrod, umožňují pozorovat oxidační děje, které probíhají při pozitivních potenciálech. Při potenciálech kolem +0,1 V již dochází k elektrolytickému rozpouštění rtuti, a z tohoto důvodu jsou rtuťové elektrody preferovány pro sledování katodických dějů (nebo anodických reakcí při potenciálech nižších než 0 V). První výsledky týkající se oxidace purinových zbytků v DNA na uhlíkových elektrodách publikoval V. Brabec koncem 70. let (cit.²⁴). Na povrchu uhlíkových elektrod probíhá (v závislosti na pH) oxidace guaninu kolem potenciálu +1,0 V a adeninu kolem potenciálu +1,2 V (obr. 3). Oxidace pyrimidinových bází, thyminu a cytosinu je detegovatelná při ještě pozitivnějších potenciálech, kolem +1,2 až +1,3 V, v závislosti na experimentálních podmínkách²⁵. Oxidační píky pyrimidinových bází v polynukleotidovém řetězci nejsou obvykle pozorovatelné. Z tohoto důvodu jsou analyticky využívány téměř výhradně oxidační píky purinů. Detailní informace o mechanismu oxidace guaninu a adeninu na povrchu uhlíku je možné nalézt v nedávno



Obr. 3. Voltamogram oligonukleotidu s oxidačními píky guaninu (G^{ox}) a adeninu (A^{ox}) naměřený na elektrodě z pyrolytického grafitu. Použitá metoda: AdT SWV, koncentrace (GTT)₇-A₂₀: 5 μg ml⁻¹, základní elektrolyt: 0,2 M acetátový pufr (pH 5,0), AdT z prostředí 0,2 M-NaCl (t_A : 2 min), potenciálový krok: 5 mV, amplituda: 25 mV, frekvence: 200 Hz, kyslík nebyl ze základního elektrolytu odstraněn

zveřejněné práci²⁶.

Běžně jsou na uhlíkových elektrodách detegována mikrogramová množství DNA. Pomocí adsorptivního nahromadění DNA (viz odst. 6) na povrchu uhlíkové elektrody a při použití vhodné elektrochemické techniky lze však stanovit i nanogramová množství DNA²⁷. Na rozdíl od redukčních nebo tenzametrických píků DNA na HMDE nejsou oxidační signály purinů na uhlíkových elektrodách příliš citlivé ke strukturním změnám dsDNA (např. nebyly pozorovány výrazné rozdíly v elektrochemických záznamech mezi kovalentně uzavřenou kružnicovou a lineární DNA²⁷).

Značné množství prací publikovaných v posledních letech je zaměřeno na sledování změn intenzity oxidačních píků purinových bází v DNA po její interakci s toxickými látkami (především léčivý nebo kovy a jejich komplexy). Tvorba reakčního produktu mezi interagující látkou a zbytky bází v molekule DNA obvykle způsobuje pokles intenzity výše popsaných oxidačních píků. Vzhledem k tomu, že guanin je reaktivnější vůči řadě chemických činidel než ostatní báze, osvědčilo se sledovat změny ve výšce jeho oxidačního signálu (pík G^{ox}). Navíc oxidace guaninu předchází na potenciálové škále oxidaci adeninu (pík A^{ox}) a ostatních bází, a tak není výsledek měření zatížen přítomností produktů předešlých reakcí na povrchu elektrody. Po interakci dané látky s DNA je pokles ve výšce píku G^{ox} obvykle způsoben vytvářením aduktů s guaninem, uvolněním poškozeného guaninového zbytku z DNA nebo zablokováním přístupu guaninových zbytků k povrchu elektrody. Pokud je např. studována reakce DNA s oxidačními činidly, může být pokles píku způsoben konverzí guaninu na 8-oxoguanin, který má nižší oxidační potenciál než guanin a při potenciálu píku G^{ox} již žádné elektrochemické reakci nepodléhá²⁵.

K analýze DNA byly navrženy různé konstrukční typy uhlíkových elektrod a různé strukturní formy (modifikace) uhlíku. DNA byla měřena také na uhlíkových elektrodách, které byly chemicky modifikovány²⁸, např. byla na jejich povrchu vytvořena vrstva z vodivého polymeru – polypyrrolových nanovláken²⁹. Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo např. při detekci hybridizace DNA na povrchu uhlíkové pastové elektrody³⁰ nebo při její aplikaci pro detekci telomerasové aktivity³¹.

5. Elektroaktivní značky nukleových kyselin

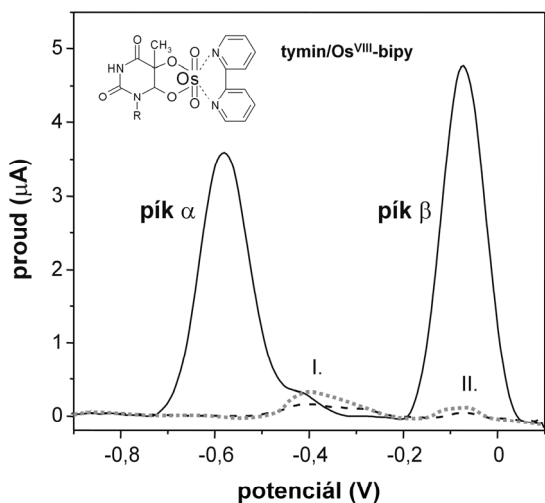
Elektrochemická analýza DNA může být založena na sledování její vlastní elektroaktivity, což je obvykle nejjednodušší a finančně nejméně náročná varianta (angl. „label-free detection“). Jinou možností, jak elektrochemicky detegovat DNA, je provést její modifikaci elektroaktivní značkou. Získáme tak DNA nesoucí jiné elektroaktivní redoxní skupiny než elektrochemicky redukovatelné či oxidovatelné nukleobáze. Díky těmto značkám lze snadno elektrochemicky analyzovat přítomnost a množství modifikované DNA ve vzorku, a to i v nadbytku neznačené

DNA. Tento přístup je vhodný v situacích, kdy je např. studovaná DNA (cílová DNA) ve značném nadbytku další (nespecifické) DNA. Značená DNA se proto dá s výhodou využít pro přípravu hybridizačních sond, což jsou úseky DNA (nebo jejich syntetických analogů, viz výše) o specifické sekvenci, které mohou hybridizovat se sekvencí cílové DNA. Tímto způsobem může být identifikována např. DNA patogenu v potravinách nebo přítomnost mutací v určitých úsecích DNA v klinických vzorcích. Značnou výhodou některých elektroaktivních značek jsou jejich elektrokatalytické vlastnosti. Katalytické proudy jsou obvykle díky velkému elektronovému výtěžku výrazně vyšší nežli faradaické proudy, spojené s oxidací nebo redukcí samotných bází.

Obecně rozlišujeme tři různé způsoby značení DNA. Elektroaktivní značkou mohou být značeny konce DNA nebo jednotlivé báze v celém řetězci. Jinou strategií je inkorporovat elektroaktivní analogy nukleotidů nebo kovalentně značené nukleotidy do deoxyribonukleotidového řetězce pomocí DNA polymeras³². Z praktického hlediska se ukazuje jako výhodné používat elektroaktivní značky, které mají zároveň vlastnosti fluoroforů (tedy optických značek). Je tak možné provádět souběžně dvojí způsob detekce (optický a elektrochemický)³³. Mezi osvědčené elektroaktivní značky patří ferocen a jeho analogy a komplexy organických ligandů s přechodnými kovy (nejčastěji osmium, ruthenium nebo měď).

Pravděpodobně nejrozšířenější elektrochemickou značkou DNA je ferocen, který byl využit pro přípravu hybridizačních sond a k analýzám specifických sekvencí a bodových mutací (shrnuje v cit.³⁴). Oligonukleotidy koncově značené feroceniem byly studovány na povrchu zlatých elektrod, na kterých se Fe^{II} ferocenu oxiduje na Fe^{III} kolem potenciálu +0,6 V (cit.³⁵).

Dobré výsledky byly dosaženy s komplexy OsO_4 s bidentátními dusíkatými heterocyklickými ligandy. Nejčastěji je používán komplex Os^{VIII} -bipy (bipy: 2,2'-bipyridin), který se preferenčně váže na tyminové zbytky v DNA a produkt této reakce poskytuje dobře definované voltametrické píky na povrchu rtuťových, uhlíkových i zlatých elektrod³⁶. V případě rtuťových elektrod je konečná redukce osmia v aduktu DNA- Os^{VIII} -bipy spojena s katalytickým vylučováním vodíku, díky čemuž lze analyzovat velmi nízké koncentrace DNA³⁷. Výhodou komplexu Os^{VIII} -bipy je to, že se váže s vysokou selektivitou na ssDNA, díky čemuž se dá využít jako DNA strukturní sonda (především pro studium otevřených lokálních struktur a obecně strukturních změn vedoucích k tvorbě jednořetězcových úseků v dsDNA)^{38,39}. Rozdíly v elektrochemických křivkách získaných po modifikaci různých strukturních forem DNA jsou ukázány na obr. 4. V případě denaturovaného vzorku DNA, který byl modifikován komplexem Os^{VIII} -bipy, jsou dobře viditelné SWV píky α a β (kolem potenciálů -0,6 a -0,1 V), které jsou spojeny s reverzibilní oxidací osmia v aduktu s DNA. V případě dsDNA, která s Os^{VIII} -bipy za daných podmínek téměř nereaguje, nebyly tyto píky pozorovány⁴⁰.



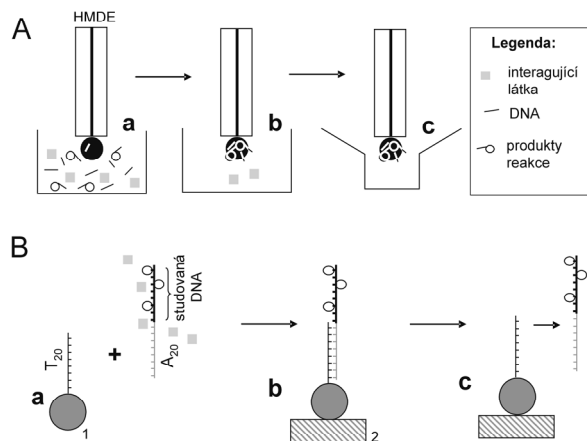
Obr. 4. Voltametrické píky α a β denaturované ocDNA (plná čára), ocDNA (čárkovaná) a scDNA (tečkovaná/šedě), po modifikaci Os^{VIII} , bipy (2 mmol dm^{-3} , 2 h, 37°C) měřeno na uhlíkové (PGE) elektrodě. Parametry SWV měření: frekvence 200 Hz, amplituda 25 mV, rychlost polarizace 1 V s^{-1} , adsorptivní přenosová technika (t_d : 60 s), elektrolyt 0,2 M acetátový pufr (pH 5). Píky I, II – oxidace volného Os. Koncentrace DNA: $20 \mu\text{g ml}^{-1}$

6. Ex situ elektrochemická měření a magnetoseparační techniky

V mnoha případech jsou studovány reakční produkty DNA v nadbytku reakčních činidel nebo je potřeba analyzovat DNA v komplexních (např. biologických) matricích. V těchto situacích je vhodné použít před elektrochemickou detekcí DNA přečišťovací (purifikační) krok pro odstranění interferujících látek ze vzorku. Nejjednodušší strategie je založena na využití silné, prakticky ireverzibilní adsorpce DNA na povrchu rtuťových nebo grafitových elektrod v tzv. adsorpčních přenosových (AdT, *ex situ*) elektroanalytických technikách⁴¹ (obr. 5A). DNA lze na povrch elektrody adsorbovat ponořením této elektrody do roztoku obsahujícího DNA za širokého rozmezí podmínek. Po naadsorbování DNA na její povrch je elektroda opláchnuta destilovanou vodou nebo pufrům, čímž se odstraní slabě se adsorbující látky. Výsledkem je elektroda modifikovaná adsorbovanou vrstvou DNA, která je přenesena do základního elektrolytu, kde proběhne elektrochemické měření. DNA je možné adsorbovat na povrch elektrody z velmi malého objemu vzorku (řádově jednotky mikrolitrů)⁴². AdT technika se osvědčila při studiu reaktivity a poškození DNA. V tomto případě je DNA inkubována s příslušnou interagující látkou v roztoku a adsorpce DNA na povrch je provedena až po ukončení inkubace. Jinou variantou této techniky je sledování interakce mezi DNA již adsorbované

na povrchu elektrody a danou látkou v roztoku; DNA-modifikovaná elektroda tak představuje elektrochemický biosenzor pro látky poškozující DNA. Oba uvedené postupy se osvědčily v případě, že byla studována interakce DNA s látkou, která nebyla příliš pevně adsorbována k povrchu elektrody. Přítomnost reakčních činidel, které se silně adsorbují společně s DNA na povrch elektrody, může narušit nebo znemožnit elektrochemickou analýzu DNA. Pro vyřešení problému koadsorpce DNA s dalšími reakčními činidly je nutné adsorpci DNA na povrch elektrody předřadit další purifikační krok. V poslední době se osvědčily jednoduché přečišťovací techniky založené na magnetické separaci.

Magnetoseparační techniky využívají magnetický nosič, na jehož povrch je DNA po inkubaci s interagujícími činidly navázána. Po odmytí nezreagovaných činidel se DNA z nosiče uvolní a je elektrochemicky analyzována. Na magnetickém nosiči (nejčastěji paramagnetických mikročasticích) lze studovanou DNA ukotvit pomocí vhodného adaptoru, např. systému (strept)avidin/biotin, nebo pomocí hybridizace oligo(A) sekvence připojené ke studované DNA s oligo(T) sekvencí kovalentně vázanou na povrchu nosiče^{43,44} (obr. 5B). Možností, jak vázat cílové molekuly DNA na povrch těchto mikročastic, je mnoho a jejich aplikace závisí na konkrétním experimentálním uspořádání⁴⁵. Na rozdíl od instrumentálně náročných metod typu iontové výměnné chromatografie, kapilární elektroforézy nebo izotachoforézy, umožňují tyto metody rychlé přečištění studované DNA a její rozpuštění v roztocích pufrů, které jsou vhodné pro elektrochemickou analýzu. Kombinace magnetické separace a AdT voltamet-

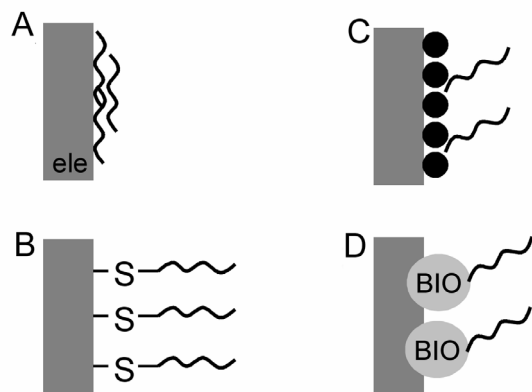


Obr. 5. (A) Schéma *ex situ* (adsorpční přenosové) techniky. Vzorek (a) je adsorbován na povrch pracovní elektrody, (b) odmytí interferujících látek, (c) elektrochemické měření. (B) Aplikace paramagnetických mikročastic s kovalentně vázanými T_{20} řetězci schopnými (a) hybridizovat s analyzovanou DNA; (b) po odmytí interferujících látek lze (c) DNA uvolnit z nosiče tepelnou denaturací a elektrochemicky analyzovat; 1 – paramagnetická mikročastice, 2 – magnet

rie (nebo chronopotenciometrie) nabízí relativně jednoduchý a účinný způsob analýzy malých množství nukleových kyselin v nadbytku interferujících látek nebo v reálných vzorcích.

7. DNA-senzory a jejich aplikace

Senzor je zařízení, které snímá danou veličinu (fyzikální nebo chemickou) a transformuje ji fyzikálním převodem na veličinu výstupní⁴⁶. Elektrochemický senzor je tvořen elektrodou, která je napojena na elektrický zdroj a vyhodnocovací zařízení. Pokud se jedná o biosenzory, je součástí elektrody biologický materiál (tzv. biorekogniční prvek), což může být DNA, enzym, buňka, tkáň, vzorek rostlinného pletiva apod.⁴⁷. První práci pojednávající o elektrochemických biosenzorech publikoval⁴⁸ L. C. Clark v roce 1962, který společně se svým kolegou C. Lyonsem imobilizoval enzym glukosaoxidasu na kyslíkovou elektrodu pomocí dialyzační membrány. Enzym je schopný katalyzovat oxidaci glukosy, což je spojeno s úbytkem kyslíku. Ten byl měřen pomocí kyslíkové elektrody a jeho koncentrace odpovídala koncentraci glukosy ve vzorku. Clarkův vynález byl zaveden do praxe a v roce 1973 firma Yellow Springs Inst. Comp. uvedla na trh komerční zařízení, které se v různých modifikacích dodnes používá pro kontrolu koncentrace glukosy v krvi diabetiků.



Obr. 6. Různé typy imobilizace studované DNA na povrch elektrody (ele). Elektroda může být modifikována pomocí fyzikální sorpce (adsorpce) DNA na její povrch, v tomto případě obvykle dochází k tvorbě značně heterogenní vrstvy (A). Studovaná DNA koncově značená –SH skupinami může vytvářet na povrchu kovových materiálů (chemisorpce) monovrstvu: SAM – self-assembled monolayer (B). DNA může reagovat s elektrodou prostřednictvím vodivého polymeru nebo jiné struktury (mikro, nano-částice) schopné přenášet elektrony (C). DNA koncově značená biotinem se může vázat na streptavidin, který je součástí uhlíkové pastové elektrody (D)

Obecně může být DNA imobilizována na široké spektrum kovových (Au, Ag, Pt) i nekovových (uhlík, vodivé polymery) elektrodových materiálů. Počátek vývoje elektrochemických DNA-senzorů je spojen s prvním používáním rtuťových elektrod modifikovaných molekulami DNA, kde byla DNA imobilizována na povrch rtuťové kapky prostou fyzikální adsorpcí. V případě fyzikální adsorpce dochází k tvorbě značně heterogenní vrstvy na povrchu elektrody (obr. 6A). Jinou variantou je využít k imobilizaci chemické afinity mezi skupinami SH koncově značené DNA a povrchem kovové elektrody. Za vhodně zvolených experimentálních podmínek lze na povrchu elektrody připravit vysoce organizovanou monovrstvu, která bývá v anglické literatuře označována jako SAM („self-assembled monolayer“). Proces vedoucí k tomuto typu imobilizace založený na reakci SH skupin, připojených na konce syntetických oligonukleotidů, s povrchem zlata je označován jako chemisorpce (obr. 6B). Ačkoli je tento přístup nejčastěji využíván právě ve spojení se zlatými elektrodami⁴⁹, existuje i možnost docílit tvorby SAM thiolovaných oligonukleotidů na povrchu rtuťové kapky⁵⁰ nebo dalších materiálů. Povrch elektrody může být před samotnou imobilizací DNA modifikován různými vodivými elementy (membránou, hydrofilním/hydrofobním polymerem, mikrovlákny, mikro- nebo nanočásticemi), a až na takto připravenou vrstvu je imobilizována DNA (obr. 6C). Zajímavou alternativou je také imobilizace DNA koncově značené vhodným adaptorem (např. biotinem) na elektrodu modifikovanou afinitním partnerem k danému adaptoru (např. streptavidinem). Elektroda může být modifikována přímo na povrchu nebo uvnitř elektrodového materiálu (obr. 6D). Příkladem je modifikovaná uhlíková pasta, připravená smícháním syntetického oleje, uhlíkového prášku a streptavidinu. Další informace o DNA senzorech, nejrůznějších aplikacích a možnostech jejich uplatnění jsou uvedeny v recentní práci⁵¹ a dalších přehledných článcích^{21,52–55}.

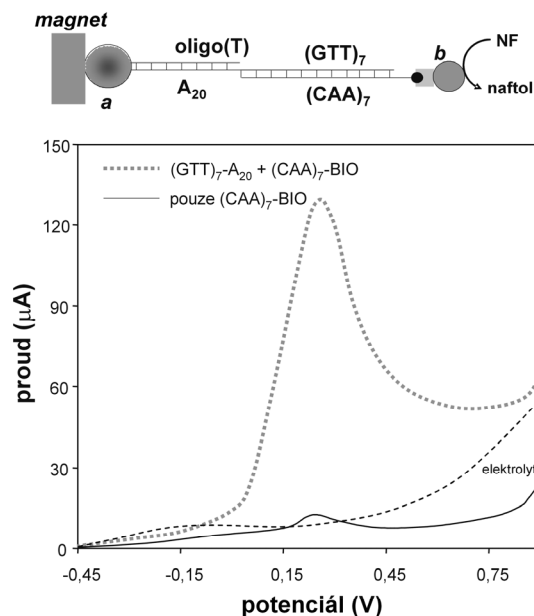
7.1. Hybridizační DNA-senzory

DNA-senzory sloužící k detekci hybridizace mezi dvěma vlákny DNA (nebo RNA, příp. PNA), mohou být založeny na sledování elektroaktivity bází DNA nebo elektroaktivní značky, kterou je hybridizační sonda značená. Elektroaktivní značka může být v takovém případě schopná selektivní vazby na duplex (když k hybridizaci dojde), nebo naopak na ssDNA (když k hybridizaci nedojde). Detekce hybridizace DNA může probíhat přímo na povrchu elektrody nebo může být elektrochemické měření odděleno od procesu hybridizace, která proběhne např. na povrchu paramagnetických mikročástic nebo na jiném pevném nosiči. Z recentní literatury je patrné, že k elektrochemické detekci hybridizace DNA bývají upřednostňovány přístupy využívající elektroaktivních značek před technikami založenými na elektroaktivitě samotné DNA. V některých případech se využívá redoxních mediátorů k zesílení elektrochemických signálů samotné DNA. Např. H. Thorp zavedl zajímavý přístup založený na využití redoxního mediátoru $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$, který poskytuje kataly-

tickou reakci na povrchu elektrody pouze v případě, že DNA v blízkosti elektrody obsahuje guaninové zbytky. Hybridizační sonda tak může např. obsahovat oligo(G) koncovou sekvenci, pomocí které může být analyzována hybridizace sondy ke komplementárnímu úseku v cílové DNA.

Z elektroaktivních značek byl pro detekci hybridizace DNA nejčastěji využit ferocen³⁵, kterým byla koncově značena hybridizační sonda. Pokud dojde k tvorbě duplexu s cílovou DNA (která byla imobilizována na povrch elektrody), lze pozorovat oxidační pík ferocenylové jednotky, čehož lze využít nejen ke studiu hybridizace DNA, ale i pro analýzu specifických úseků v cílové DNA⁵⁶. Podobně lze detegovat hybridizaci DNA i v případě, že hybridizační sonda obsahuje koncovou oligo(T) sekvenci, kterou lze modifikovat komplexem Os^{VIII}-bipy. Kromě značek kovalentně navázaných na jednořetězcové úseky nebo konce hybridizační sondy byly aplikovány elektroaktivní komplexy, které se selektivně vážou na již vzniklý duplex. Uvedeným způsobem byla studována hybridizace cílové DNA nesoucí sekvenci HIV viru s komplementárními úseky imobilizovanými na povrch elektrody. Vzniklý duplex byl identifikován pomocí komplexu [Cu(H₂O)(phen)₂]²⁺ (phen: 1,10-fenantrolin), který poskytuje částečně reverzibilní signál kolem potenciálu +0,2 V na elektrodě z pyrolytického grafitu⁵⁷. Komplexy kovů s fenantrolinem nacházejí obecně uplatnění v různých experimentálních postupech sloužících k analýze DNA. Také komplex fenantrolinu s kobaltem [Co(phen)₃]³⁺ byl například s úspěchem aplikován při detekci DNA/DNA a DNA/PNA duplexů⁵⁸. Obvykle jsou přesně komplementární duplexy obsahující PNA stabilnější nežli DNA duplexy o stejné nukleotidové sekvenci. Z tohoto důvodu byly PNA navrženy nejen ke konstrukci hybridizačních senzorů, ale i jako terapeutické nástroje k zablokování transkripce vybraných genů. Při této aplikaci je jejich další důležitou vlastností to, že nepodléhají degradaci nukleasami (podobně je tomu i v případě LNA)⁵⁹.

Kromě elektroaktivních značek nebo elektrokatalytických mediátorů může být na sondu koncově vázán enzym, katalyzující tvorbu elektroaktivního produktu; jeho přítomnost indikuje proběhnuvší hybridizaci. Uvedená strategie byla použita při analýze hybridizace se sondou, která byla modifikována komplexem Os^{VIII}-bipy. Na DNA/Os^{VIII}-bipy adukty byla navázána monoklonální protilátka a konjugát sekundární protilátky s alkalickou fosfatase, která dokáže přeměnit 1-naftylfosfát na elektroaktivní 1-naftol, který byl detegován na základě jeho elektrooxidace na uhlíkové elektrodě⁴⁴. Uvedený systém je nejen značně specifický, ale díky využití enzymové značky, katalyzující tvorbu mnoha molekul elektroaktivního indikátoru, dochází také k významné amplifikaci signálu. Výsledky měření se sondou nesoucí alkalickou fosfatase jsou ukázány na obr. 7. V případě, že neproběhne hybridizace sondy s ssDNA imobilizovanou na paramagnetických mikročásticích, není pozorován pík 1-naftolu. Hybridizační DNA sonda může být kromě enzymu také koncově značena nanočásticí (např. ZnS, CdS), která nese značné množství



Obr. 7. Voltamogramy naftolu měřené na uhlíkové elektrodě. Oligonukleotid (GTT)₇-A₂₀ (koncentrace v roztoku 5 µg ml⁻¹) byl navázán na oligo(T) sekvenci ukotvenou na povrchu paramagnetických mikročástic (a). K sekvenci (GTT)₇-A₂₀ byla hybridizována biotinylovaná sonda (CAA)₇-BIO. Na biotin byl navázán konjugát avidin-alkalická fosfatáza (b), katalyzující reakci naftylfosfátu (NF) na naftol, který byl elektrochemicky detegován. Parametry SWV měření: základní elektrolyt: 0,2 M acetátový pufr (pH 5), adsorptivní přenosová technika (GTT)₇-A₂₀ z prostředí 0,2 M-NaCl (*t*_A: 2 min), potenciálový krok: 5 mV, amplituda: 25 mV, frekvence: 200 Hz, kyslík nebyl ze základního elektrolytu odstraněn; detaily viz text

redox-aktivních atomů. Uvedený způsob byl například aplikován při detekci hybridizace DNA pomocí potenciometrického měření sondy s CdS nanočásticemi, které byly navázány na jejím konci⁶⁰.

7.2. Elektrochemické senzory pro poškození a interakce DNA

Elektrochemická analýza poškození nebo interakcí DNA s kovy, léčivy nebo jinými látkami může být provedena v zásadě dvěma způsoby. Interakce mezi DNA a danou látkou může probíhat přímo na povrchu pracovní elektrody (DNA modifikovaná elektroda) nebo může interakce proběhnout v roztoku a po jejím ukončení následuje AdT procedura a elektrochemické měření. Ať již je DNA předem adsorbována na povrch elektrody, nebo vystavena působení genotoxických látek v roztoku, dochází v ní ke strukturním změnám, které se mohou projevit změnou v měřených elektrochemických signálech. Určitou alternativou k tomuto uspořádání je adsorpce interagující

látky na povrch elektrody s následnou inkubací takto připravené elektrody ve vzorku DNA, tento postup však nachází výrazně méně aplikací než výše uvedené strategie⁶¹.

7.2.1. Poškození DNA

Mezi velmi efektivní postupy, které našly uplatnění ve studiu poškození DNA, patří ACV měření na rtuťových elektrodách. Metoda byla pro tyto účely poprvé aplikována v roce 1997 M. Fojtou a E. Palečkem¹⁹, přičemž široké množství různých aplikací této metody nasvědčují tomu, že řádově citlivé ACV měření na rtuťových elektrodách může být využíváno pro detekci strukturních změn DNA vyvolaných toxickou látkou nebo fyzikálními vlivy¹⁴.

První aplikace této metody byly zaměřeny na studium poškození cccDNA (kovalentně uzavřená kružnicová DNA) vyvolané γ -zářením nebo hydroxylovými radikály produkovanými Fentonovou reakcí^{20,62}. Rtuťová elektroda modifikovaná DNA byla použita jako biosenzor pro analýzu toxických (DNA-poškozujících) látek, kdy po adsorpci DNA na povrch rtuťové kapky byla elektroda ponořena do zkoumaného vzorku (např. vzorek odpadní vody) a po uplynutí inkubační doby proběhlo voltametrické měření. Bylo prokázáno, že ACV poskytuje po stránce kvalitativní i kvantitativní analýzy z voltametrických metod nejlépe vyvinuté píky, možné je však použít i SWV⁶³.

Metoda se uplatnila při studiu štěpení DNA enzymy, např. při sledování tvorby jednořetězcových zlomů deoxyribonukleasou I v cccDNA. ACV měření DNA na HMDE bylo též využito pro sledování tvorby pyrimidinových dimerů nebo modifikaci cccDNA dimethylsulfátem, která vede k tvorbě abazických míst v důsledku uvolnění N7-methylguaninu z N-glykosidové vazby. Uvedené modifikace jsou rozpoznávány opravnými enzymy, jako je T4 endonukleasa V nebo *E. coli* exonukleasa III, které DNA v místech poškození štěpí, což se dá pozorovat pomocí tenzametrického píku 3. Tento přístup byl úspěšně využit nejen pro detekci poškození DNA *in vitro*, ale i v případě DNA izolované z buněk *E. coli* ozářených UV světlem. Kromě HMDE byla pro tyto účely aplikována i stříbrná amalgamová elektroda⁶⁴. Amalgámy stříbra byly též použity ke sledování tenzametrických ACV píků a poškození DNA přímo na povrchu elektrody, kde byla adsorbovaná superhelikální DNA vystavena komplexu mědi s 1,10-fenantrolinem v přítomnosti kyseliny L-askorbové a molekulárního kyslíku. Za těchto podmínek jsou generovány volné radikály způsobující tvorbu zlomů v DNA⁶⁵. Kromě amalgamových elektrod^{65,66} byly takto využity i rtuťové filmové elektrody vytvořené elektrolytickým vyloučením vrstvy rtuti na povrchu elektrody ze skelného uhlíku⁶³.

7.2.2. Interakce DNA s kovy a jejich komplexy

Ke studiu interakcí mezi DNA izolovanou z telecího brzlíku (nebo syntetickým oligonukleotidem obsahujícím guanin) a oxidem arsenitým použil M. Ozsoz a spol.⁶⁷ DPV a potenciometrickou rozpouštěcí analýzu. Po interakci DNA s ionty arsenu (v roztoku nebo na povrchu uhlíkové pastové elektrody (CPE)) byl pozorován pokles píku G^{ox} DNA. Uvedená interakce probíhala odlišně v případě

ss a dsDNA, což bylo pozorováno pomocí závislosti poklesu píku G^{ox} na koncentraci As_2O_3 . CPE a HMDE použili jiní autoři pro sledování interakce mědi (Cu^I) s DNA⁶⁸. Purinové báze tvoří s ionty mědi (Cu^I) stabilní komplexy. Ty byly využity pro citlivé stanovení jak A a G, tak i DNA po kyselé hydrolyze na leštěné stříbrné pevné amalgamové elektrodě⁶⁹. Kromě toho, že byl sledován pík G^{ox} a A^{ox} , byl sledován také pík kolem potenciálu +1,35 V, který pravděpodobně souvisí s oxidací vzniklého komplexu kovu a DNA⁶⁸. Změny oxidačních píků G^{ox} a A^{ox} byly pozorovány po interakci dsDNA s ionty kadmia, niklu a olova⁷⁰. Nejprve byl povrch uhlíkové elektrody modifikován DNA, která vytvořila na jejím povrchu heterogenní vrstvu (obr. 6A). Posléze byla takto modifikovaná elektroda ponořena do roztoku obsahujícího ionty uvedených kovů a po AdT bylo provedeno DPV měření a byly sledovány poklesy oxidačních píků DNA. Dále byla zkoumána interakce mezi ionty kovů a homopurinovými polynukleotidy, u kterých byly identifikovány produkty oxidativního poškození. V případě inkubace poly(A) s olovnatými kationty byl pozorován oxidační pík kolem potenciálu +0,45 V, který indikoval přítomnost oxidačního produktu adeninu. Ukazuje se, že pro studium interakce kovů a DNA je vhodné použít i zlaté elektrody⁷¹ s imobilizovou ssDNA. Tímto způsobem byly pomocí cyklické voltametrie sledovány redoxní píky kadmia. Metoda může být použita nejen k analýze interakcí DNA s ionty kovu, ale také jako citlivý analytický nástroj pro stanovení pikomolárních koncentrací kadmia.

Z hlediska lékařské chemie a biochemie nacházejí některé komplexy kovů, které se vážou na DNA, uplatnění jako léčiva nádorových onemocnění. Asi nejznámější, klinicky využívaná, jsou platinová cytostatika, jako je cisplatina, karboplatina a oxaliplatina. Tyto platinové komplexy jsou schopny tvořit intra- nebo intermolekulární bifunkční adukty s DNA, které blokují proces transkripce, což vede k potlačení růstu nádorových buněk. Vzniklé adukty mohou být studovány elektrochemicky na povrchu pracovních elektrod ze rtuti nebo uhlíku^{72–74}. Ukazuje se, že velmi efektivním nástrojem pro studium interakcí tohoto typu jsou různé konstrukční typy uhlíkových elektrod (včetně uhlíkových tištěných elektrod⁷⁴). Problematika komplexů platiny a titanu, jejichž interakce s DNA se dají studovat pomocí elektrochemických DNA-biosenzorů, byla shrnuta v publikacích M. Masciniho a spol.^{75,76}.

7.2.3. Interakce DNA s léčivy a jinými interkalátory

Podobně jako v případě interakcí DNA s kovy a jejich komplexy je i v případě interakcí DNA s léčivy často využíváno měření oxidačního píku G^{ox} na uhlíkových nebo píku G na rtuťových elektrodách⁶¹ (studium těchto interakcí je možné provádět i na elektrodách zlatých, kde se využívá spíše vlastních elektrochemických signálů interkalátorů⁷⁷). V případě analýzy interkalace látek s planární strukturou do dvoušroubovice lze měřit samotný úbytek interkalačního činidla, ke kterému dochází se zvyšující se koncentrací dsDNA v reakční směsi (shrnutí v cit.⁶¹).

Daunomycin je antracyklinové protinádorové léčivo

s cukernou složkou nesoucí aminoskupinu. Díky planárnímu uspořádání antracyklinové části se molekula daunomycinu interkaluje mezi páry bází dvoušroubovice, což je možné pozorovat pomocí píku G^{ox} a redoxního signálu daunomycinu metodou CPSA v kombinaci s CPE⁷⁸. Velmi podobným způsobem byly zkoumány interkalace nebo jiný typ interakcí léčiv (mitomycinu C, doxorubicinu, mitoxantronu, prometazinu, anthramycinu nebo epirubicinu) s DNA^{61,79,80}. Mezi nejnovější aplikace patří analýza interakce berberinu⁸¹ nebo imidazoakridinového derivátu⁸² s DNA na povrchu elektrod ze skelného uhlíku. Také uměle syntetizované tetracyklinové heterocyklické sloučeniny (benzothienindol a benzofuroindol) byly zkoumány elektrochemicky v přítomnosti DNA pomocí DPV a uhlíkové tužkové elektrody. Po interakci uvedených sloučenin s DNA byly pozorovány poklesy jejich oxidačních piků. Vazebná afinita mezi léčivem a DNA je ovlivněna především jeho strukturou, přičemž bylo prokázáno, že i malé změny v chemické struktuře (rozmístění funkčních skupin apod.) léčiva mohou výrazně ovlivňovat jeho vazbu s DNA. Pomocí voltametrických metod bylo provedeno srovnání vazebných konstant u vybraných antracyklinových léčiv (daunomycin a adriamycin s jeho 4-deoxy derivátem) s nogalamycinem⁸³. K určení vazebných konstant mezi léčivem a DNA byla použita také potenciometrická měření. Nawaz a spol.⁸⁴ aplikovali CPSA pro studium interakce ciprofloxacinu s DNA, k čemuž použili měření poklesu píku G^{ox} , který indikoval interakci. Navíc byl touto metodou sledován vliv sodných a vápenatých iontů na průběh interakce.

7.2.4. Interakce DNA s bílkovinami

Elektrochemické metody jsou v posledních letech s úspěchem využívány při studiu interakcí DNA s bílkovinami. Pozornost je věnována např. konstrukci elektrochemických čipů a biosenzorů pro detekci bílkovin a studium jejich interakcí⁸⁵.

V roce 2002 byla uveřejněna práce popisující aplikaci zlaté elektrody pro sledování vazby mezi DNA a proteinem. DNA-duplexy koncově značené SH skupinami byly imobilizovány na povrch zlaté elektrody. Vytvořená SAM byla stabilizována ionty Mg^{2+} , které jsou schopny eliminovat odpuzování mezi duplexy DNA ukotvenými na povrchu elektrody. Imobilizovaná DNA byla na konci směřujícím do roztoku modifikována daunomycinem, který podléhá reverzibilní redukci, která je detegovatelná chronocoulometrií při potenciálu $-0,57$ V. V daném systému byl přenos elektronů mezi molekulou daunomycinu a elektrodou zprostředkován přesně komplementární dvoušroubovicí DNA. Vazba proteinů (HhaI methylasa, uracil DNA glykosylasa a TATA-vázající protein) na DNA narušovala stohové („stacking“) interakce mezi páry bází a tím inhibovala přenos elektronů, což vedlo k poklesu chronocoulometrických křivek⁸⁶. Podobného principu využili i jiní autoři, např. na povrch elektrody ze skelného uhlíku (GCE) lze navázat poly(TTCA) nukleotidový řetězec ssDNA nebo dsDNA a pomocí impedančního měření a křemenných mikroválek sledovat vazbu proteinu. Touto

metodou byla sledována vazba proteinu MutH s dsDNA, a proteinu mPurβ, který se váže na ssDNA⁸⁷. Ve většině případů byl povrch elektrod modifikován oligonukleotidem, obvykle obsahujícím 20 až 30 bází^{86,87}. Hianik a spol.⁸⁸ použili ve své práci 19-ti mer koncově značený SH skupinou, imobilizovaný na povrch zlaté elektrody.

DNA duplex jako substrát pro vazbu bílkoviny může být nahrazen funkční nukleovou kyselinou, která je označována jako aptamer. Aptamery mohou zaujímat různou terciární strukturu, čehož se dá využít nejen pro vysoce specifickou vazbu bílkovin, ale i polysacharidů a dalších biopolymerů. Aptamer afinitní k lysozymu byl imobilizován na povrch zlaté elektrody⁸⁹. Po vazbě lysozymu byly imobilizované aptamery modifikovány redoxní značkou $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$, přičemž interakce mezi lysozymem a DNA se projevila poklesem píku této značky. Kromě výše popsaných přístupů se jako velmi efektivní ukázalo sledovat elektroaktivitu samotné bílkoviny, která se na DNA váže. Tento přístup byl aplikován při studiu vazby proteinu MutS^{90,91} na dsDNA, který je schopen rozpoznávat chybně párované báze ve studovaném duplexu. K tomuto studiu byla použita již zmíněná magnetoseparační technika v kombinaci s elektrochemickou detekcí proteinu na rtuťových nebo uhlíkových elektrodách.

8. Závěr

DNA senzory jsou v současné době jedním z aktuálních témat moderní analytické chemie a biochemie. Elektrochemické metody a techniky jsou díky svému jednoduchému experimentálnímu uspořádání (potenciostat/galvanostat, vodiče a elektrody) často aplikovány při konstrukci DNA senzorů.

Mezi nejčastěji používané elektrodové materiály patří rtuť a uhlík. Kovová rtuť je ideálním elektrodovým materiálem, nicméně v současné době jsou pro účely konstrukce DNA senzorů upřednostňovány uhlíkové elektrody z pyrolytického grafitu, skelného uhlíku, uhlíkové pasty nebo elektrody tištěné. Zajímavou alternativou ke klasickým rtuťovým elektrodám jsou elektrody amalgamové, v některých případech modifikované rtuťovým meniskem, popřípadě rtuťové filmové elektrody. Pracovní elektrody vyrobené z grafitu nemají, na rozdíl od rtuti, tak dokonale obnovitelný povrch, zato jsou vhodné pro využití v průtokových systémech. Pomocí měření DNA na uhlíkových elektrodách lze získat pouze částečné informace o strukturním stavu studované DNA. Z tohoto pohledu představují rtuťové elektrody v současnosti velmi efektivní nástroj pro sledování strukturních změn DNA, které mohou být vyvolány její interakcí s jinou látkou nebo jejím přímým poškozením.

To, že elektrochemické metody nacházejí uplatnění v biochemickém a molekulárně biologickém výzkumu, potvrzují nejen výsledky získané na našem pracovišti, ale také publikační výstupy řady světově uznávaných laboratorů^{55,79,92}. Na základě výše uvedeného lze předpokládat, že elektrochemická analýza bude schopná i v budoucnosti

konkurovat konvenčním metodám optické detekce. Kromě toho, elektrochemické měření DNA je založené na jiném fyzikálně-chemickém principu, než běžně používané spektrometrické metody. Výsledky elektrochemických analýz tak mohou poskytnout odlišný pohled na studovanou problematiku a odhalit tak zákonitosti, které ostatní experimentální postupy nedokáží rozpoznat.

Tato práce byla financována podporou MŠMT centra základního výzkumu LC06035, vědeckovýzkumným záměrem MŠM 6198959216 a záměry AV0Z50040507 a AV0Z50040702.

Seznam zkratek

ACV	voltametrie se střídavou složkou napětí
AdT technika	adsorpční přenosová technika
cccDNA	kovalentně uzavřená kružnicová DNA
CPE	uhlíková pastová elektroda
CPSA	chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza
DME	rtuťová kapková elektroda
DNA (ss, ds)	deoxyribonukleová kyselina (jednořetězcová, dvouřetězcová)
DPP	diferenční pulzní polarografie
DPV	diferenční pulzní voltametrie
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
LNA	angl. „locked nucleic acid“
ocDNA	otevřená kružnicová forma DNA
PGE	uhlíková elektroda z pyrolytického grafitu
PNA	peptidová nukleová kyselina
pík CA	redukční pík cytosinu a adeninu
pík G	elektrochemický pík oxidace redukčního produktu guaninu
pík G ^{ox} (A ^{ox})	elektrochemický oxidační pík guaninu (adeninu)
RNA	ribonukleová kyselina
scDNA	superhelikální DNA
SWV	voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím
t _A	doba akumulace

LITERATURA

- Heyrovský J., Babička J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 2, 370 (1930).
- Brdička R.: Collect. Czech. Chem. Commun. 5, 112 (1933).
- Heyrovský M.: Electroanalysis 16, 1067 (2004).
- Zuman P., Paleček E.: v knize: *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins. Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics*. (E. Paleček, F. Scheller, J. Wang, ed.), s. 386. Elsevier, Amsterdam 2005.
- Berg H.: Biochem. Z. 329, 274 (1957).
- Paleček E.: Naturwiss. 45, 186 (1958).
- Paleček E.: Nature 188, 656 (1960).
- Paleček E.: Talanta 56, 809 (2002).
- Miller I. R.: J. Mol. Biol. 3, 357 (1960).
- Trnková L., Studničková M., Paleček E.: Bioelectrochem. Bioenerg. 7, 644 (1980).
- Cummings T. E., Elving P. J.: J. Electroanal. Chem. 102, 237 (1979).
- Paleček E., Frary B. D.: Arch. Biochem. Biophys. 115, 431 (1966).
- Strašák L., Dvořák J., Hasoň S., Vetterl V.: Bioelectrochemistry 56, 37 (2002).
- Fojta M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 69, 715 (2004).
- Jelen F., Tomschik M., Paleček E.: J. Electroanal. Chem. 423, 141 (1997).
- Paleček E., Tomschik M., Staňková V., Havran L.: Electroanalysis 9, 990 (1997).
- Heyrovský J., Kuta J.: *Základy polarografie*, s. 425. Nakladatelství ČSAV, Praha 1965.
- Tomschik M., Jelen F., Havran L., Trnková L., Nielsen P. E., Paleček E.: J. Electroanal. Chem. 476, 71 (1999).
- Fojta M., Paleček E.: Anal. Chim. Acta 342, 1 (1997).
- Fojta M., Bowater R. P., Staňková V., Havran L., Lilley D. M. J., Paleček E.: Biochemistry 37, 4853 (1998).
- Fojta M.: Electroanalysis 14, 1449 (2002).
- Fojta M., Vetterl V., Tomschik M., Jelen F., Nielsen P., Wang J., Paleček E.: Biophys. J. 72, 2285 (1997).
- Hasoň S., Vetterl V.: Electrochim. Acta 51, 5199 (2006).
- Brabec V., Dryhurst G.: J. Electroanal. Chem. 89, 161 (1978).
- Oliveira-Brett A. M., Piedade J. A. P., Silva L. A., Diclescu V. C.: Anal. Biochem. 332, 321 (2004).
- Boussicault F., Robert M.: Chem. Rev. 108, 2622 (2008).
- Cai X. H., Rivas G., Farias P. A. M., Shiraishi H., Wang J., Fojta M., Paleček E.: Bioelectrochem. Bioenerg. 40, 41 (1996).
- Wring S. A., Hart J. P.: Analyst 117, 1215 (1992).
- Ozcan A., Sahin Y., Ozsoz M.: Electroanalysis 19, 2208 (2007).
- Masařík M., Kizek R., Kramer K. J., Billová S., Brazdová M., Vacek J., Bailey M., Jelen F., Howard J. A.: Anal. Chem. 75, 2663 (2003).
- Eskiocak U., Ozkan-Ariksoysal D., Ozsoz M., Oktem H. A.: Anal. Chem. 79, 8807 (2007).
- Hocek M., Fojta M.: Org. Biomol. Chem. 6, 2233 (2008).
- Paleček E.: Trends Biotechnol. 22, 55 (2003).
- Umek R. M., Lin S. W., Vielmetter J., Terbruggen R. H., Irvine B., Yu C. J., Kayyem J. F., Yowanto H., Blackburn G. F., Farkas D. H., Chen Y. P.: J. Mol. Diagn. 3, 74 (2001).
- Nakayama M., Ihara T., Nakano K., Maeda M.: Talanta 56, 857 (2002).
- Trefulka M., Ferreyra N., Ostatná V., Fojta M., Rivas G., Paleček E.: Electroanalysis 19, 1334 (2007).

37. Paleček E., Hung M. A.: *Anal. Biochem.* 132, 236 (1983).
38. Paleček E.: *Methods Enzymol.* 212, 139 (1992).
39. Paleček E.: *Methods Enzymol.* 212, 305 (1992).
40. Havran L., Vacek J., Cahová K., Fojta M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 1751 (2008).
41. Paleček E., Postbieglová I.: *J. Electroanal. Chem.* 214, 359 (1986).
42. Paleček E.: *Electroanalysis* 8, 7 (1996).
43. Wang J., Xu D. K., Erdem A., Polsky R., Salazar M. A.: *Talanta* 56, 931 (2002).
44. Paleček E., Kizek R., Havran L., Billová S., Fojta M.: *Anal. Chim. Acta* 469, 73 (2002).
45. Paleček E., Fojta M.: *Talanta* 74, 276 (2007).
46. Thévenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S.: *Biosens. Bioelectron.* 16, 121 (2001).
47. Grieshaber D., MacKenzie R., Vörös J., Reimhult E.: *Sensors* 8, 1400 (2008).
48. Clark L. C., Lyons C.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 102, 29 (1962).
49. Zhao Y. D., Pang D. W., Hu S., Wang Z. L., Cheng J. K., Dai H. P.: *Talanta* 49, 751 (1999).
50. Ostatná V., Paleček E.: *Langmuir* 22, 6481 (2006).
51. Cosnier S., Mailley P.: *Analyst* 133, 984 (2008).
52. Drummond T. G., Hill M. G., Barton J. K.: *Nat. Biotechnol.* 21, 1192 (2003).
53. Ju H. X., Zhao H. T.: *Front. Biosci.* 10, 37 (2005).
54. Paleček E., Fojta M.: *Anal. Chem.* 73, 74A (2001).
55. Odenthal K. J., Gooding J. J.: *Analyst* 132, 603 (2007).
56. Ihara T., Nakayama M., Murata M., Nakano K., Maeda M.: *Chem. Commun.* 1609 (1997).
57. Niu S.-Y., Wang S.-J., Li X.-M.: *Chin. J. Chem.* 26, 134 (2008).
58. Wang J., Paleček E., Nielsen P. E., Rivas G., Cai X. H., Shiraishi H., Dontha N., Luo D. B., Farias P. A. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7667 (1996).
59. Wackerbarth H., Grubb M., Wengel J., Chorkendorff I., Ulstrup J.: *Surface Sci.* 600, L122 (2006).
60. Numnuam A., Chumbimuni-Tores K. Y., Xiang Y., Bash R., Thavarungkul P., Kanatharana P., Pretsch E., Wang J., Bakker E.: *J. Am. Chem. Soc.* 130, 410 (2008).
61. Erdem A., Ozsoz M.: *Electroanalysis* 14, 965 (2002).
62. Fojta M., Staňková V., Paleček E., Koscielniak P., Mitáš J.: *Talanta* 46, 155 (1998).
63. Kubičárová T., Fojta M., Vidic J., Havran L., Fojta M.: *Electroanalysis* 12, 1422 (2000).
64. Cahová-Kuchaříková K., Fojta M., Mozga T., Paleček E.: *Anal. Chem.* 77, 2920 (2005).
65. Kuchaříková K., Novotný L., Yosypchuk B., Fojta M.: *Electroanalysis* 16, 410 (2004).
66. Yosypchuk B., Heyrovský M., Paleček E., Novotný L.: *Electroanalysis* 14, 1488 (2002).
67. Ozsoz M., Erdem A., Kara P., Kerman K., Ozkan D.: *Electroanalysis* 15, 613 (2003).
68. Stanić Z., Girousi S.: *Talanta* 76, 116 (2008).
69. Fadrná R., Yosypchuk B., Fojta M., Navrátil T., Novotný L.: *Anal. Lett.* 37, 399 (2004).
70. Oliveira S. C. B., Corduneanu O., Oliveira-Brett A. M.: *Bioelectrochemistry* 72, 53 (2008).
71. Wong E. L. S., Chow E., Gooding J. J.: *Electrochem. Commun.* 9, 845 (2007).
72. Křížková S., Adam V., Petrlová J., Zítka O., Stejskal K., Zehnálek J., Sures B., Trnková L., Beklová M., Kizek R.: *Electroanalysis* 19, 331 (2006).
73. Pieck A. C., Drescher A., Wiesmann K. G., Messerschmidt J., Weber G., Strumberg D., Hilger R. A., Scheulen M. E., Jaehde U.: *Brit. J. Cancer* 98, 1959 (2008).
74. Ravera M., Bagni G., Mascini M., Dobrowiak J. C., Osella D.: *J. Inorg. Biochem.* 101, 1023 (2007).
75. Bagni G., Ravera M., Osella D., Mascini M.: *Curr. Pharm. Anal.* 1, 217 (2005).
76. Ravera M., Bagni G., Mascini M., Osella D.: *Bioinorg. Chem. Appl. article number: 91078, p. 11*, (2007).
77. Li X., Chen Y., Huang X.: *J. Inorg. Biochem.* 101, 918 (2007).
78. Wang J., Ozsoz M., Cai X., Rivas G., Shiraishi H., Grant D. H., Chicharro M., Fernandes J., Paleček E.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 45, 33 (1998).
79. de-los-Santos-Alvarez P., Lobo-Castanon M. J., Miranda-Ordieres A. J., Tunon-Blanco P.: *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 104 (2004).
80. Yu D., Blankert B., Viré J.-C., Kauffmann J.-M.: *Anal. Lett.* 1687 (2005).
81. Tian X., Song Y., Dong H., Ye B.: *Bioelectrochemistry* 73, 18 (2008).
82. Nowicka A. M., Zabost E., Donten M., Mazerska Z., Stojek Z.: *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1931 (2007).
83. Ibrahim M. S.: *Anal. Chim. Acta* 443, 63 (2001).
84. Nawaz H., Rauf S., Akhtar K., Khalid A. M.: *Anal. Biochem.* 354, 28 (2006).
85. Yu X., Xu D., Cheng Q.: *Proteomics* 6, 5493 (2006).
86. Boon E. M., Salas J. E., Barton J. K.: *Nat. Biotechnol.* 20, 282 (2002).
87. Ban C. G., Chung S. M., Park D. S., Shim Y. B.: *Nucleic Acids Res.* 32, (2004).
88. Hianik T., Ostatná V., Zajacová Z.: *J. Electroanal. Chem.* 564, 19 (2004).
89. Cheng A. K. H., Ge B., Yu H.-Z.: *Anal. Chem.* 79, 5158 (2007).
90. Masařík M., Cahová K., Kizek R., Paleček E., Fojta M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 259 (2007).
91. Paleček E., Masařík M., Kizek R., Kuhlmeier D., Hassmann J., Schüle J.: *Anal. Chem.* 76, 5930 (2004).
92. Paleček E., Jelen F.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32, 261 (2002).

J. Vacek^{a,b}, L. Havran^a, and M. Fojta^a
(^a Department of Biophysical Chemistry and Molecular Oncology, Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic, ^b Department of Medicinal Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic): **Electrochemical Analysis of DNA Damage, Hybridization and Interactions**

Modern trends in electrochemical sensing deoxyribonucleic acids (DNA), particularly the use of electrochemical sensors for detection of DNA damage or hybridization, are discussed. Applications of electrochemical methods such as AC voltammetry, square-wave voltammetry and

constant current chronopotentiometry as well as use of mercury and carbon electrodes are presented. Special attention is paid to application of Hg amalgams and carbon (pyrolytic graphite, C paste or glassy C) electrodes for monitoring reduction and oxidation processes (label-free detection). Techniques and procedures used for DNA labeling with electroactive tags such as transition-metal (Os, Ru, Cu) complexes or redox mediators are described. DNA interactions with heavy metal ions, drugs, and proteins are also mentioned. The review does not intend to give a complete overview of the topics considered but, rather, to present some historic consequences and modern electrochemical methods used in DNA research.

Vážení autoři, redakce Chemických listů na základě podnětů autorů nabízí novou službu

Vzhledem k množství rukopisů, které přicházejí do redakce, se čekací doba na vytištění prodlužuje až na **1,5 roku**. Pokud chcete tuto dobu zkrátit, nabízíme Vám následující nadstandardní službu:

vytištění Vašeho příspěvku do dvou měsíců od skončení jeho recenzního a redakčního řízení.

Za tuto nadstandardní službu Vám budeme účtovat dodatečné publikační náklady – 1000 Kč za jednu tiskovou stránku Chemických listů.

Podrobnější informace poskytne technická redaktorka Ing. Řápková na tel. čísle 221 082 370, příp. 222 220 184 nebo na e-mailové adrese chem.listy@csvts.cz

Urychlete publikování Vašich prací **o více než jeden rok!**
