



Biofyzikální ústav AVČR, Brno
Centrum biofyzikální chemie, bioelektrochemie a bioanalýzy



Elektrochemická detekce poškození a hybridizace DNA

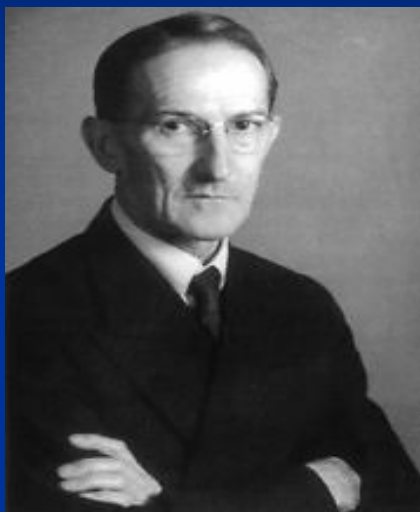
Miroslav Fojta

13. 9. 2006 Praha, kurz Možnosti inovací v elektroanalytické chemii



Trocha historie...

Elektrochemická analýza...



1922 Jaroslav Heyrovský: polarografie
1959 Nobelova cena

**základ celé škály široce využívaných
elektrochemických metod**

Trocha historie...

DNA...

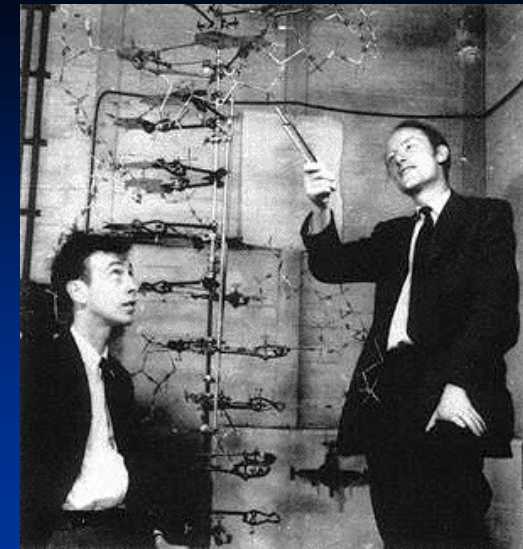
1869 Miescher: objev DNA jako do té doby neznámé složky buněk (leukocytů)

1944 Avery: DNA je zodpovědná za transformaci (změnu vlastností) buněk

1950 Herschey a Chase: DNA je genetickým materiálem buněk

Trocha historie...

Struktura DNA...



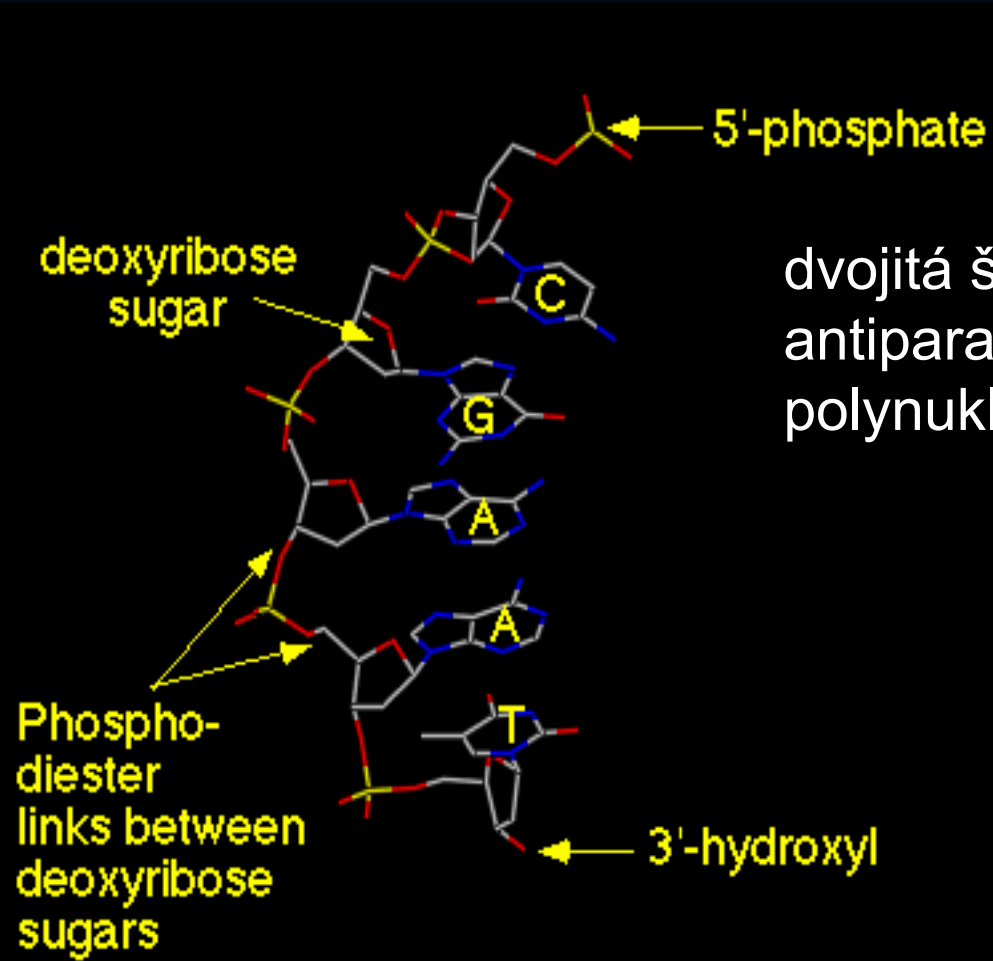
1953: James Watson, Francis Crick, Rosalind Franklin, Maurice Wilkins: dvoušroubovice DNA



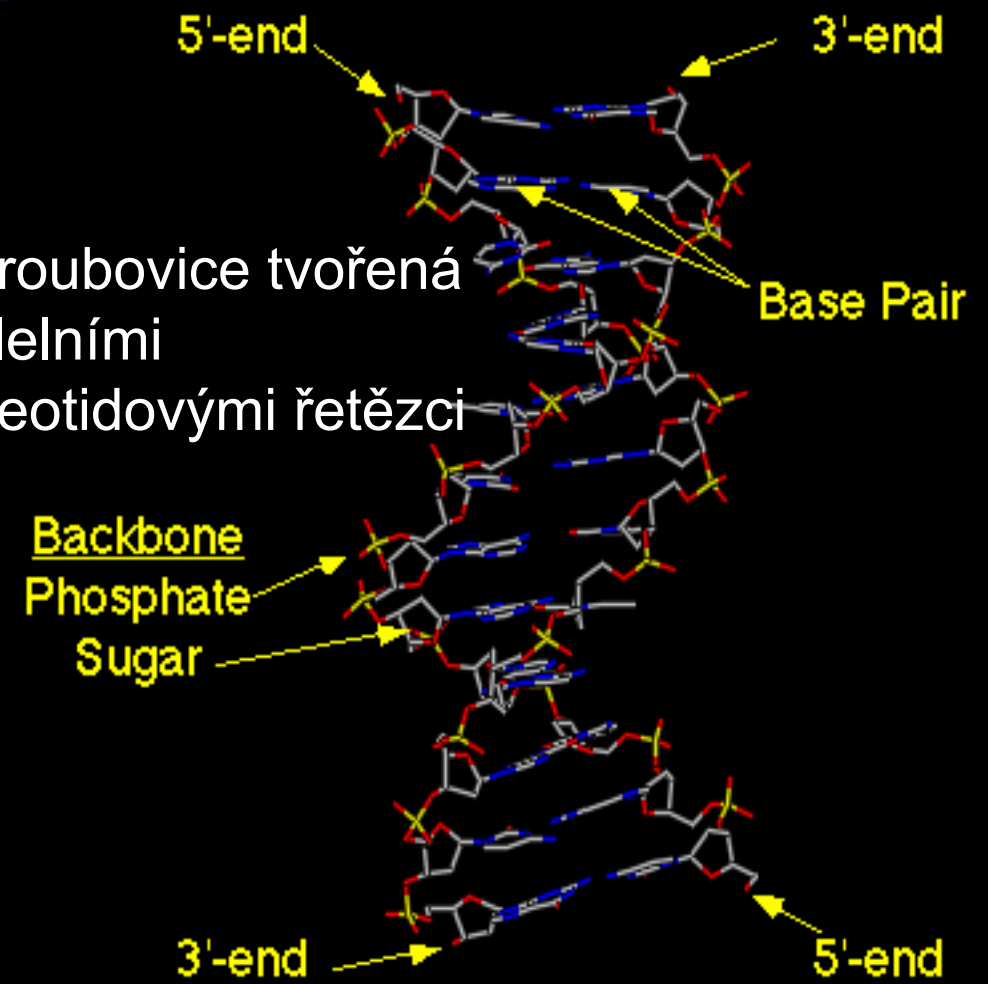
1962: Nobelova cena (JW, FC, MW)



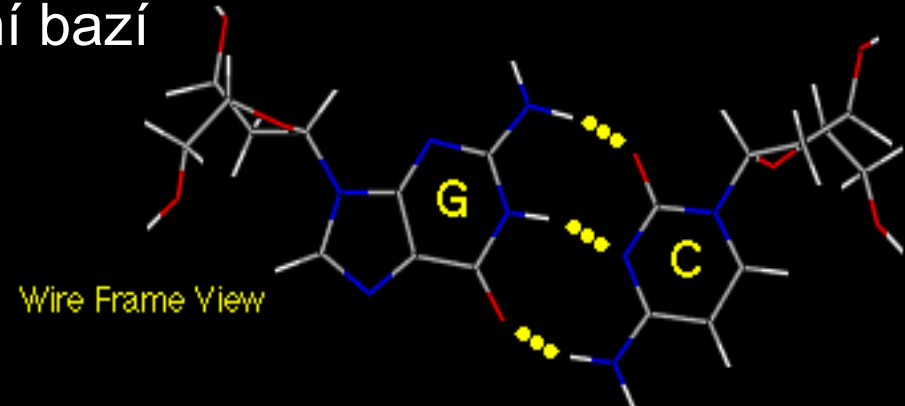
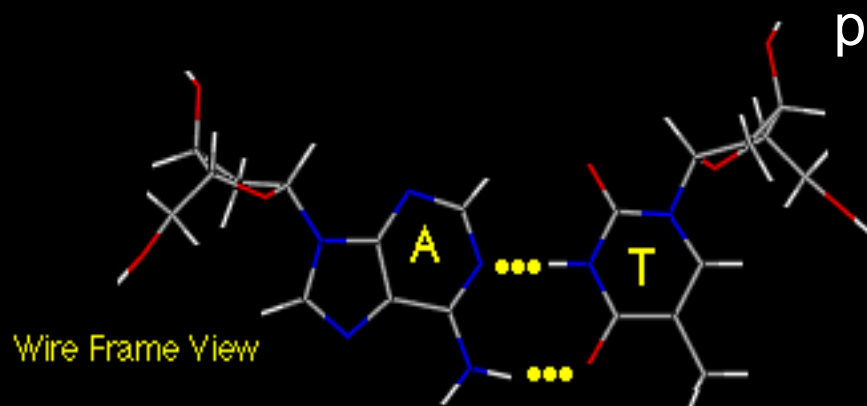
vysvětlení základních principů uchování, předávání a exprese dědičné informace



dvojitá šroubovice tvořená antiparalelními polynukleotidovými řetězci



párování bází



Trocha historie...

Elektrochemická analýza nukleových kyselin



1958 – 1960 Emil Paleček: polarografie DNA

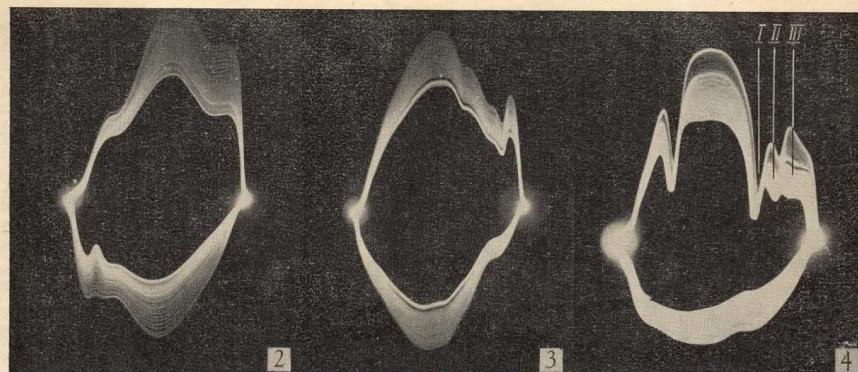


Fig. 2. 100 μg m. deoxyribonucleic acid/ml. 1 M ammonium formate
Fig. 3. Apurinic acid in 2 M ammonium formate (concentration corresponding to 2 μg m. of deoxyribonucleic acid)
Fig. 4. 900 μg m. deoxyribonucleic acid + 5 μg m. plasma albumin/1 ml. $10^{-3} M$ hexamine cobaltic trichloride in 0.1 M ammonium chloride-ammonium hydroxide. Indentations due to cobalt, I; deoxyribonucleic acid, II; protein, III

(Reprinted from *Nature*, Vol. 188, No. 4751, pp. 656-657, November 19, 1960)

Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid

PROCEEDING from my finding^{1,2} that nucleotides, nucleosides and the bases of nucleic acids can be analysed by alternating current oscillographic polarography³⁻⁵, I have also tried to study polymerized deoxyribonucleic acid by this method.

The apparatus used was a Polaroskop P 524 (Křížik, Praha). With this apparatus it is possible to plot dE/dt against E (Fig. 1). The analysis was carried out by means of the dropping mercury electrode in the same electrolytes as were used in my previous work^{1,2}. All measurements were carried out with specimens of deoxyribonucleic acid from calf thymus.

I have established that in a medium of molar ammonium formate, deoxyribonucleic acid shows an anodic indentation at the same potential as deoxyguanylic acid (Fig. 2). Other characteristics of both indentations are also analogous (dependence on direct voltage, temperature, concentration of the electrolyte), which appears to indicate that that due to

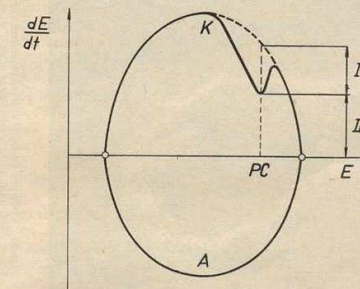


Fig. 1. Graph of dE/dt against E . The nature of the material analysed is characterized by the potential of the indentation (PC), which is somewhat similar to the polarographic half-wave potential. The quantity of the material is characterized by the depth of the indentation. For qualitative analysis, the height II, which can be measured much more easily, is generally measured. K , Cathodic part; A , anodic part

Trocha historie...

Elektrochemická analýza nukleových kyselin

60. – 70. léta: polarografické studie denaturace/renaturace DNA/RNA, předdenaturační změny, poškození DNA

80. léta: elektroaktivní značky; využívání stacionárních elektrod (včetně pevných); adsorptivní stripping

1986: zavedení **elektrod modifikovaných DNA** (imobilizace DNA na povrchu elektrody)

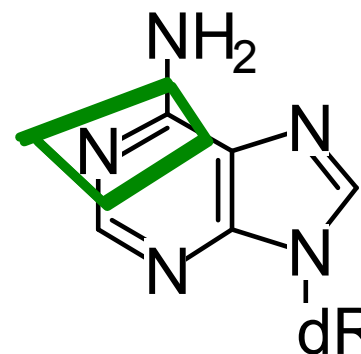
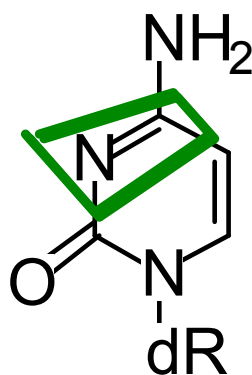
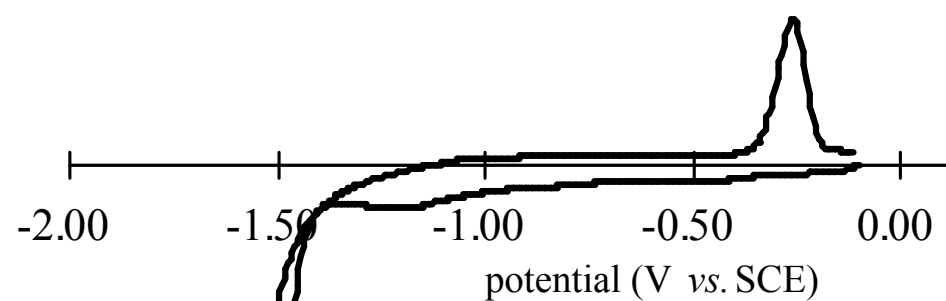
90. léta-dosud: výzkum a vývoj **elektrochemických biosenzorů**

- **pro poškození DNA**
- **pro hybridizaci DNA**

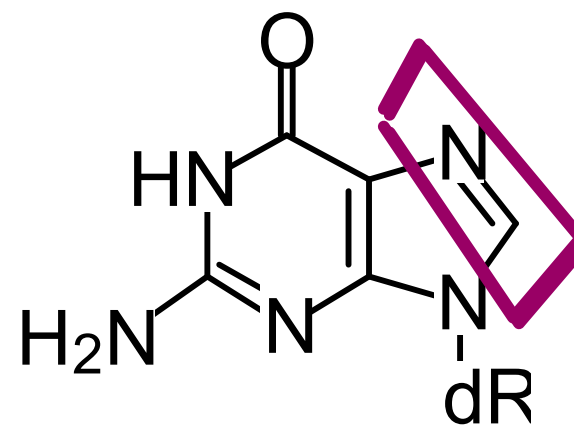
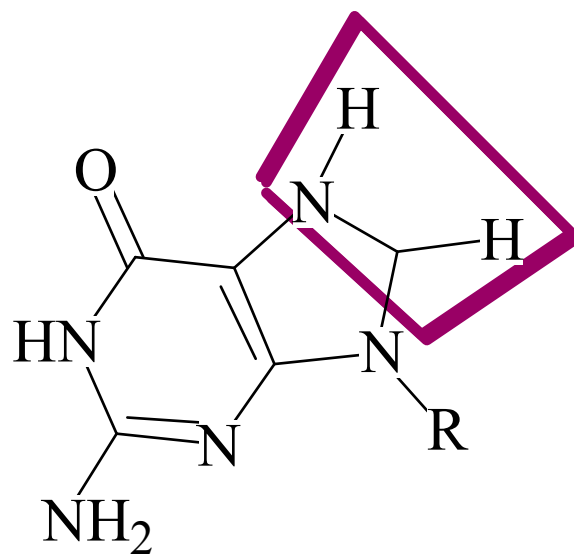
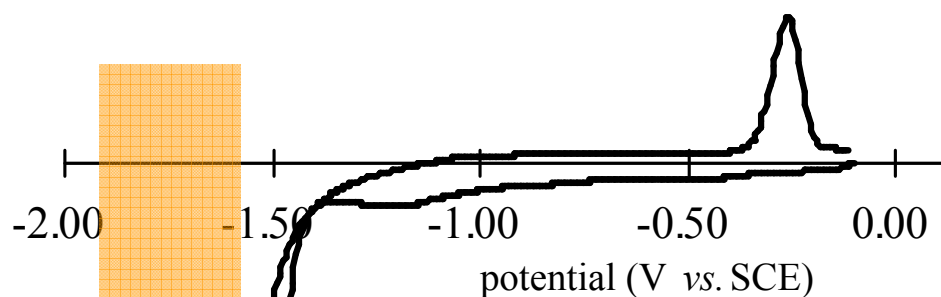
nukleové kyseliny jsou elektroaktivní

- A, C a G podléhají redoxním přeměnám na rtuťové elektrodě
- G a A jsou oxidovány na uhlíkových elektrodách
- cukerné složky NK jsou katalyticky oxidovány na měděných elektrodách Singhal, P.; Kuhr, W. G.: *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3552-3557; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4828-4832.

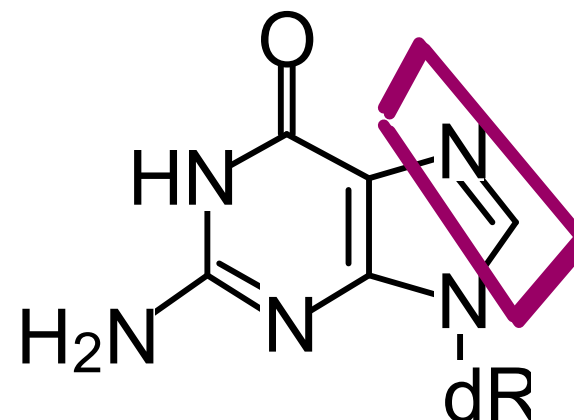
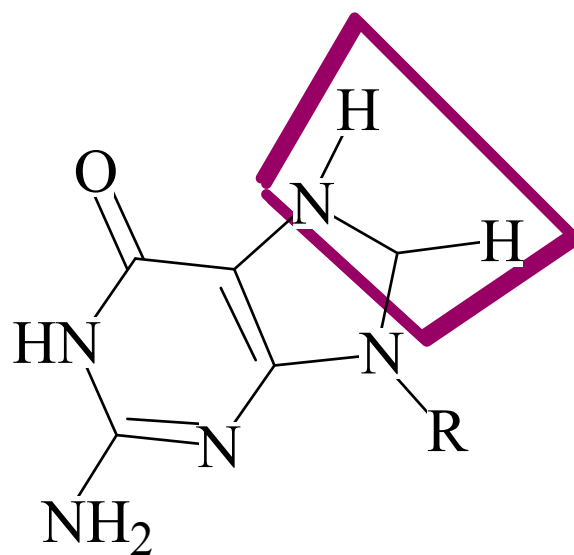
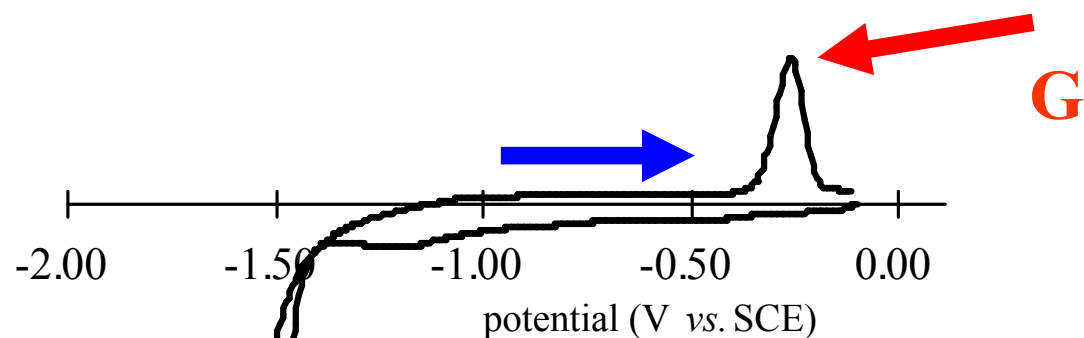
A a C jsou redukovány na rtuťové elektrodě



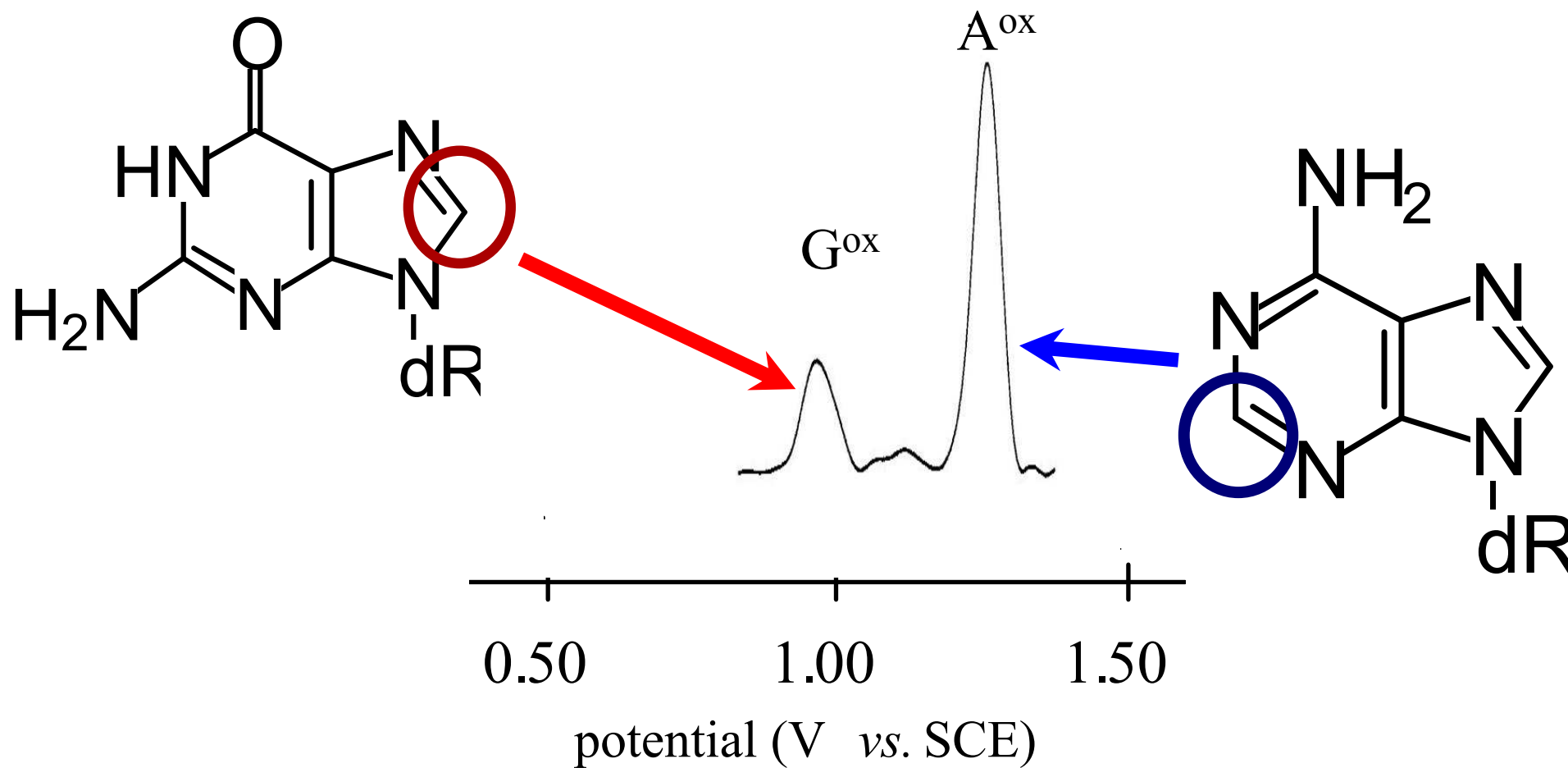
G je na rtuťové elektrodě redukován při vysoce negativním potenciálu...



...a jeho redukční produkt při elektrooxidaci poskytuje anodický signál

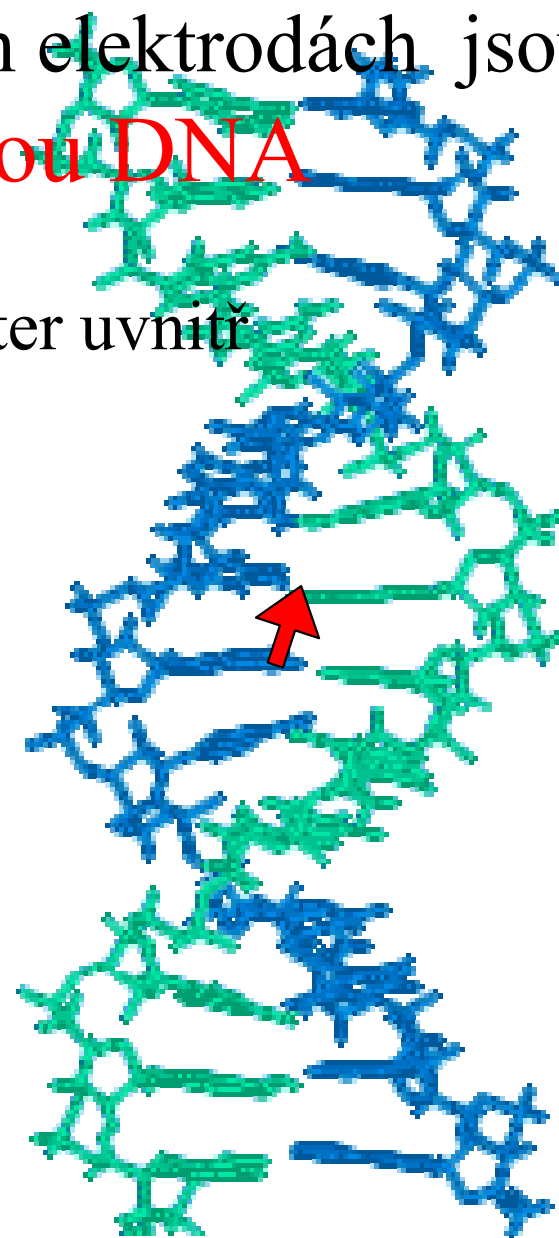
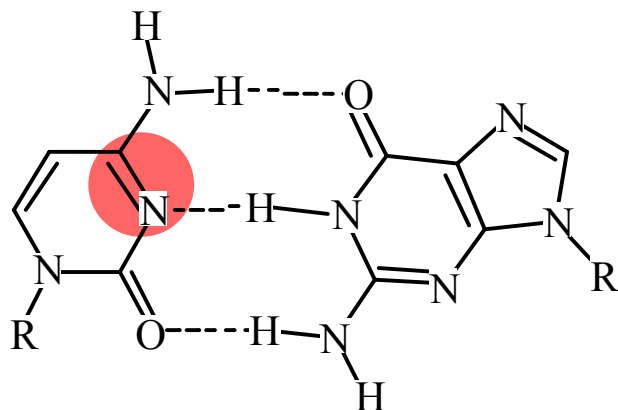
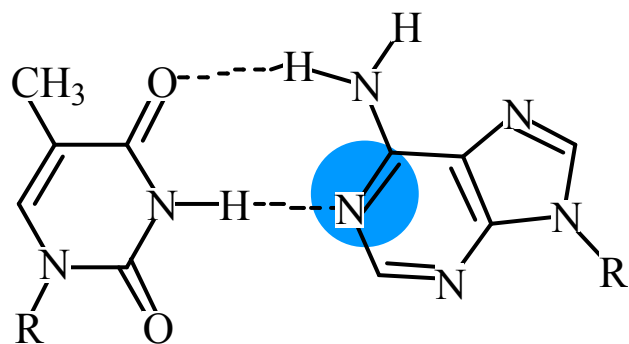


G a **A** poskytují specifické oxidační signály
na uhlíkové elektrodě

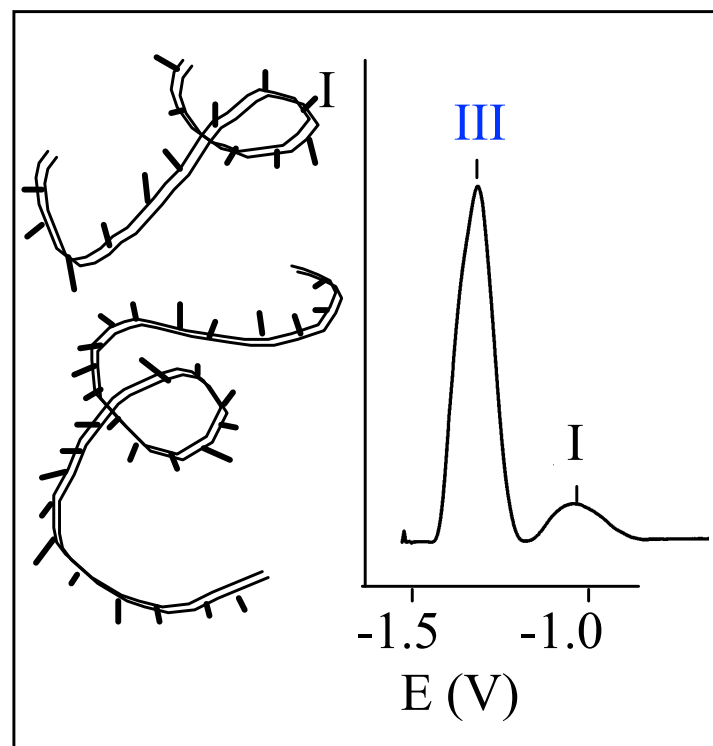
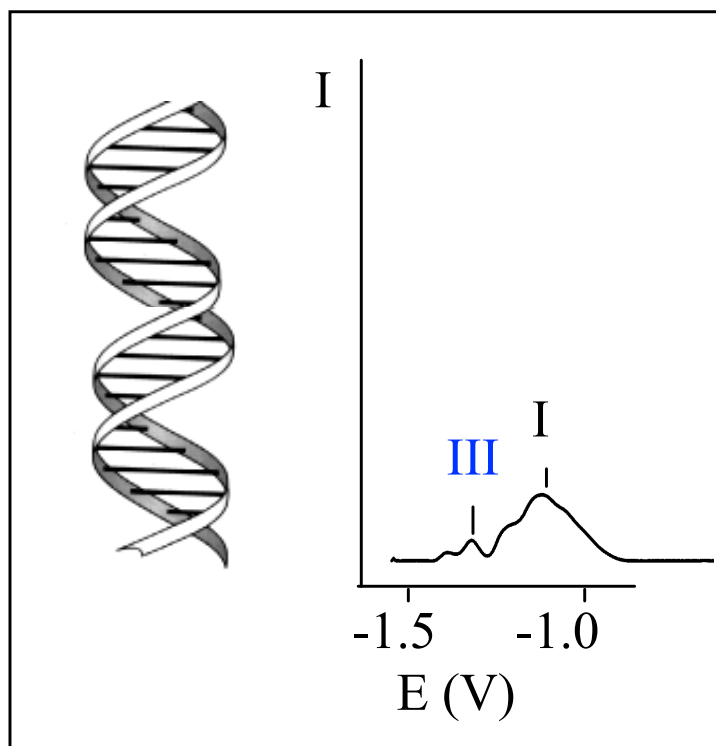


redukční signály C a A na rtuťových elektrodách jsou
silně ovlivněny strukturou DNA

- souvisí to s lokalizací elektroaktivních center uvnitř dvoušroubovice DNA

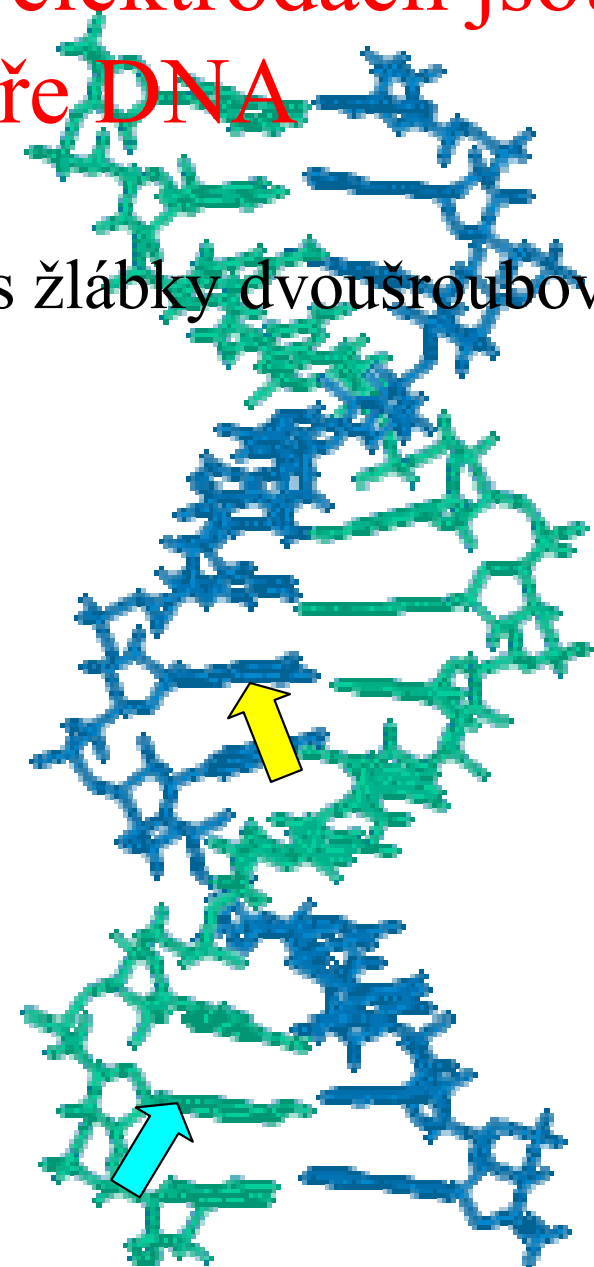
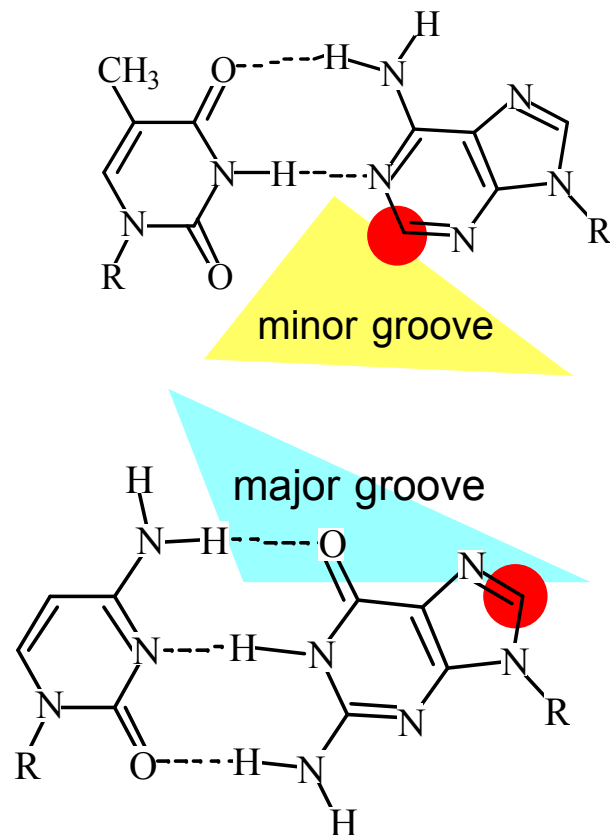


redukční signály C a A na rtuťových elektrodách jsou
silně ovlivněny strukturou DNA

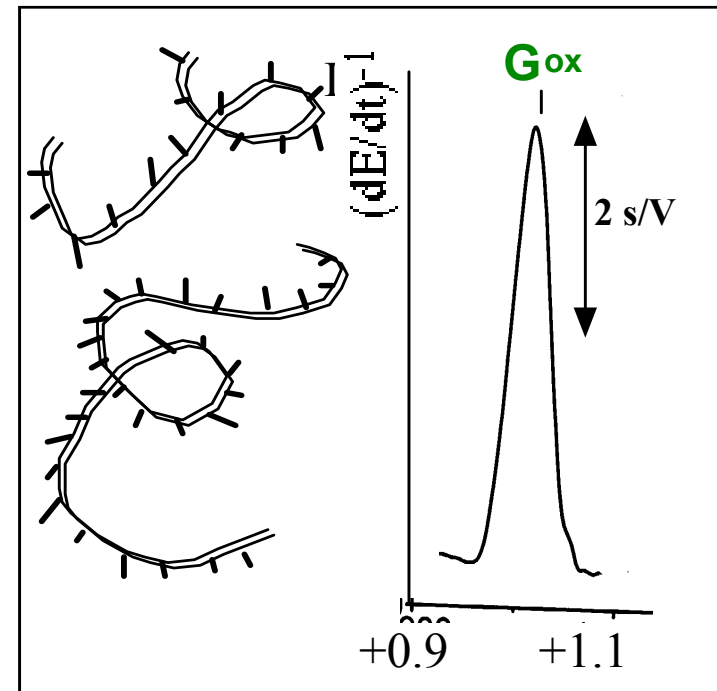
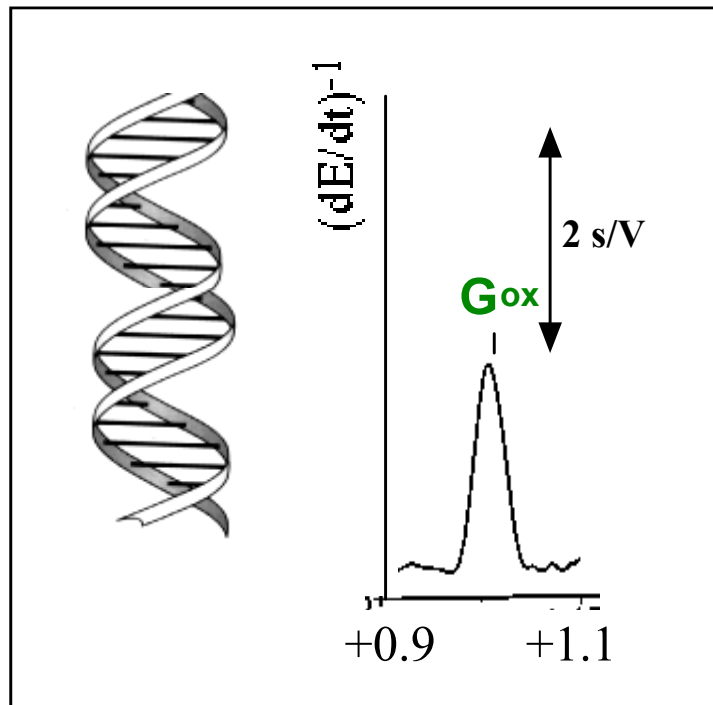


oxidační signály na uhlíkových elektrodách jsou méně citlivé ke struktuře DNA

- oxidační místa G a A jsou přístupná přes žlábký dvoušroubovice



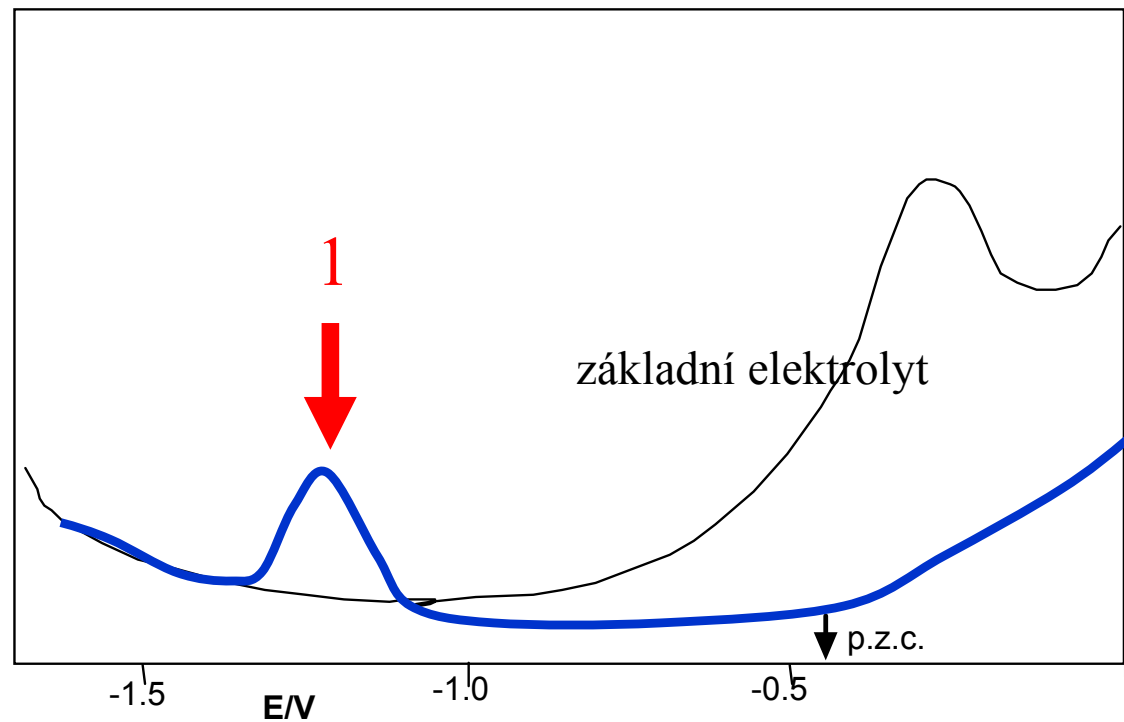
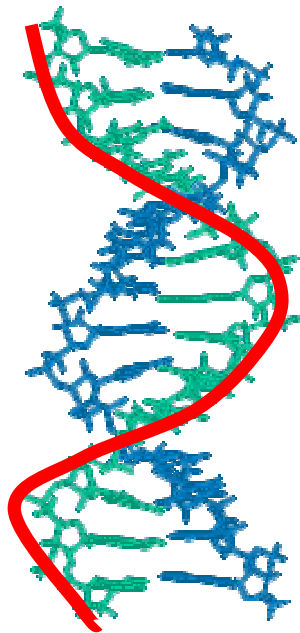
oxidační signály na uhlíkových elektrodách jsou méně citlivé ke struktuře DNA



Na **rtuťových elektrodách** v mírně alkalickém prostředí lze detekovat **adsorpčně-desorpční děje** (signály)

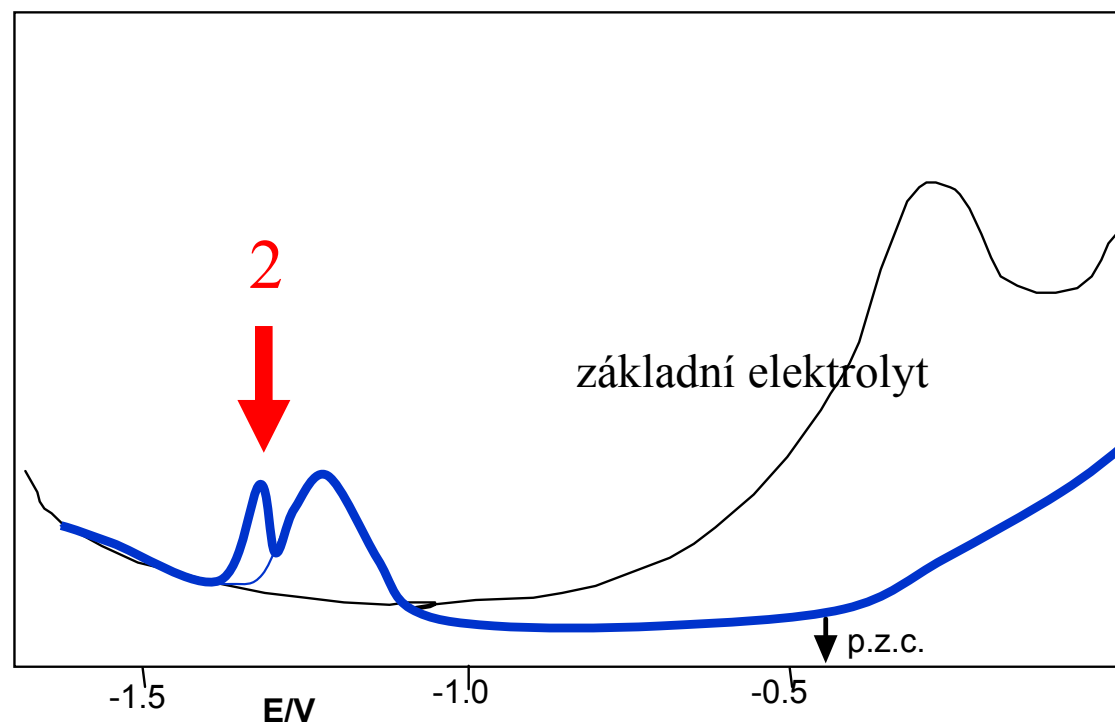
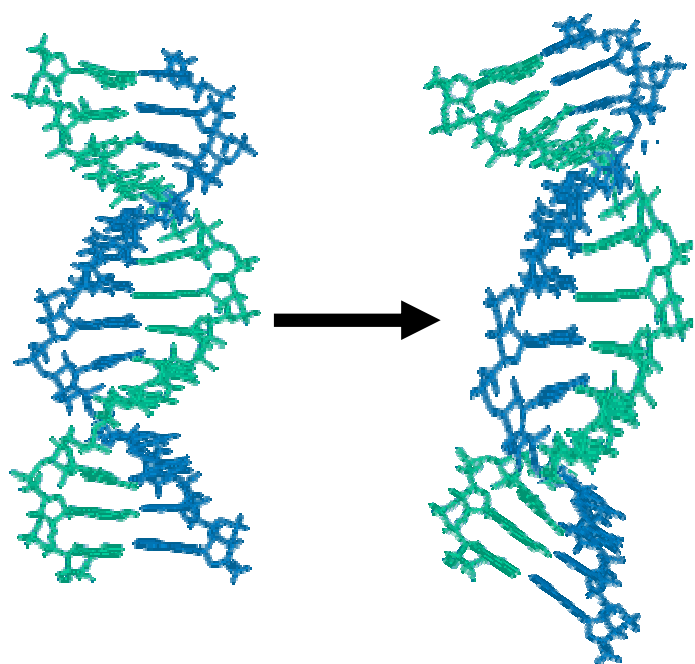
- v závislosti na podmínkách a na **struktuře DNA** se těchto dějů mohou účastnit jednotlivé složky DNA

-dvouřetězcová DNA poskytuje **pík 1** v souvislosti s adsorpcí DNA prostřednictvím cukrfofátové páteře

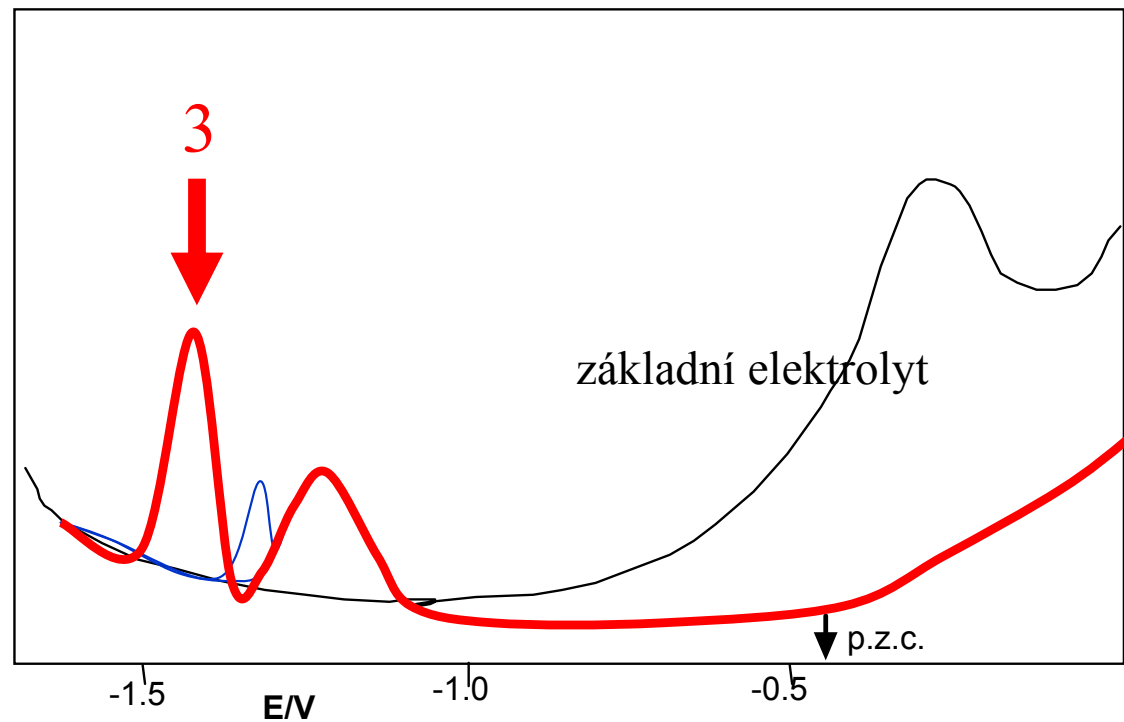
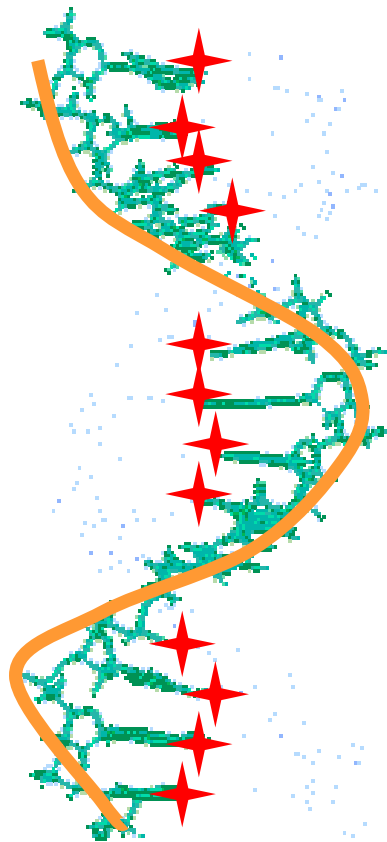


-distortované nebo poškozené oblasti dsDNA poskytují

pík 2

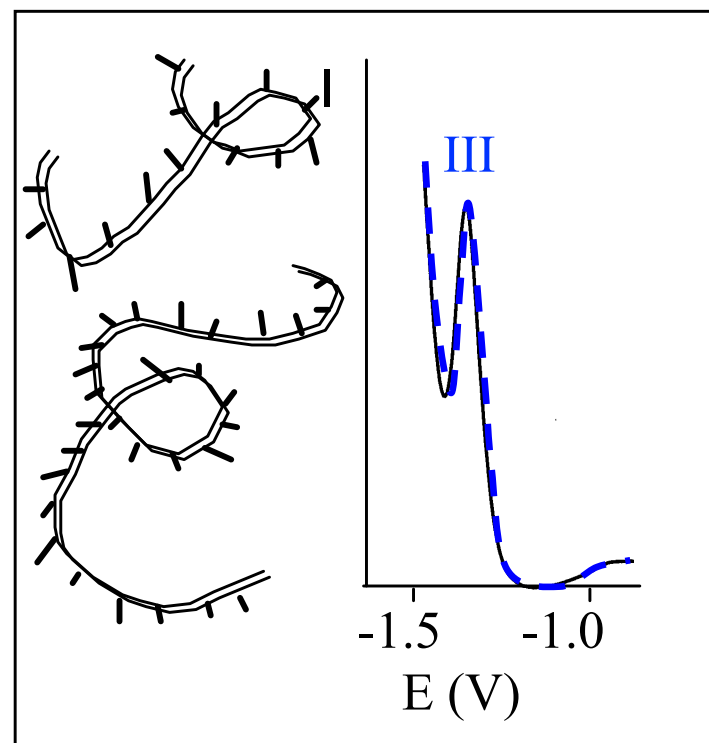
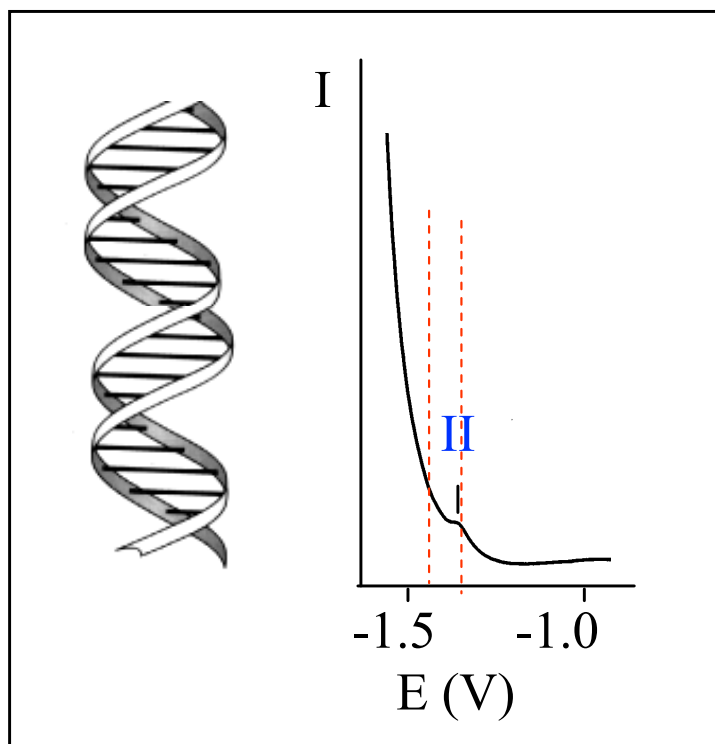


jednořetězcová (denaturovaná) DNA poskytuje
pík 1 (cukrfosfátová páteř) a **pík 3** související s
adsorpcí/desorpcí segmentů DNA prostřednictvím
volně přístupných bazí



diferenční pulsní polarografie

- kapající rtuťová elektroda
- hlavní metoda využívaná v oblasti elektrochemie DNA v 60. a 70. letech
- rozlišení ds a ssDNA – rozdíl v intenzitě i potenciálu příslušných signálů
- změny v intenzitě píku II indikují změny konformace dsDNA, zatímco vznik píku III přítomnost nespárovaných bazí (denaturovaných/ss úseků)



diferenční pulsní polarografie

- hlavní metoda využívaná v 60. a 70. letech
- rozlišení ds a ssDNA

- **peak II: vysoká citlivost k malým strukturálním změnám**
- **předdenaturační změny**

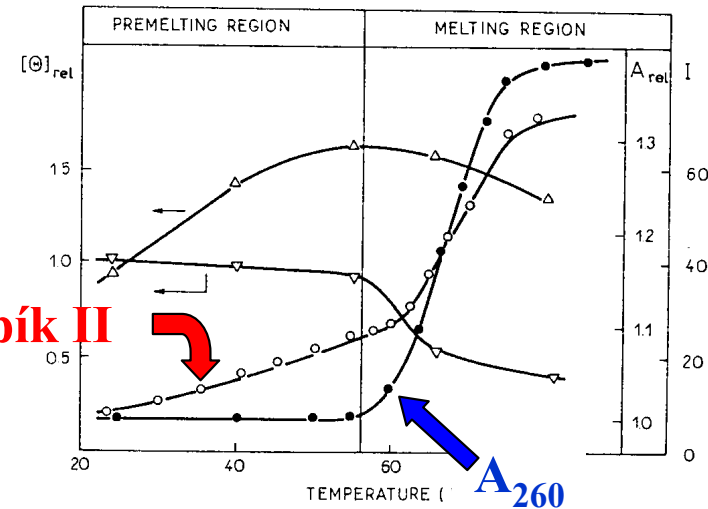
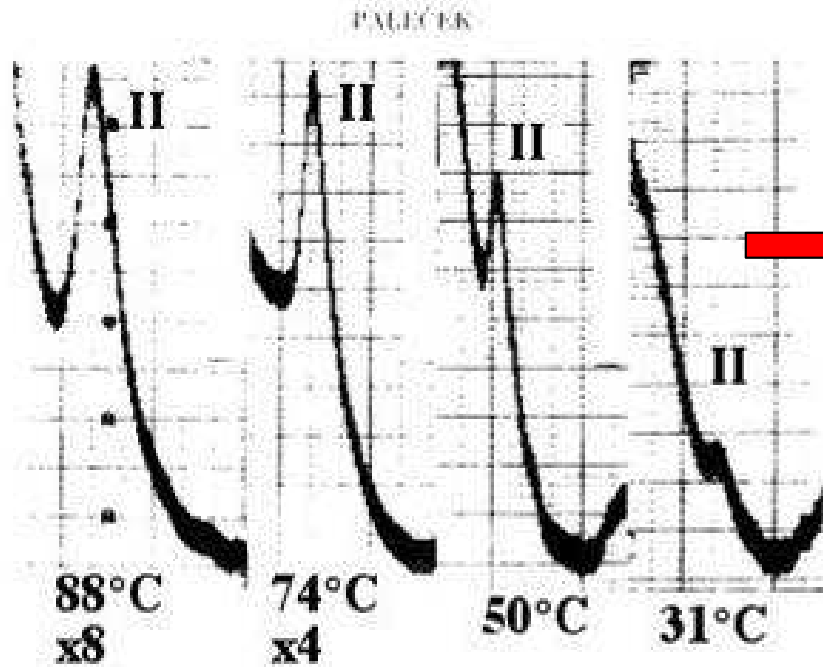


FIG. 2. Thermal transition of calf thymus DNA followed by circular dichroism (CD), derivative pulse polarography and spectrophotometry. CD: Δ — Δ , positive band (275 nm); ∇ — ∇ , negative band (245 nm); \circ — \circ , polarography; \bullet — \bullet , absorbance at 269 nm. θ_{rel} , the ratio between the ellipticity at the given temperature and at 25°C. A_{rel} , the ratio between the absorbance (260 nm) at the given temperature and the absorbance at 25°C. I, the height of the pulse-polarographic peak in divisions. Adapted from Paleček and Frič (21).

¹ Nonstandard abbreviations: CD, circular dichroism; ORD, optical rotatory dispersion; ds, double-stranded; ss, single-stranded.

diferenční pulsní polarografie

•poškození DNA:

➤zlomy (např. po ozáření ionizujícím zářením)

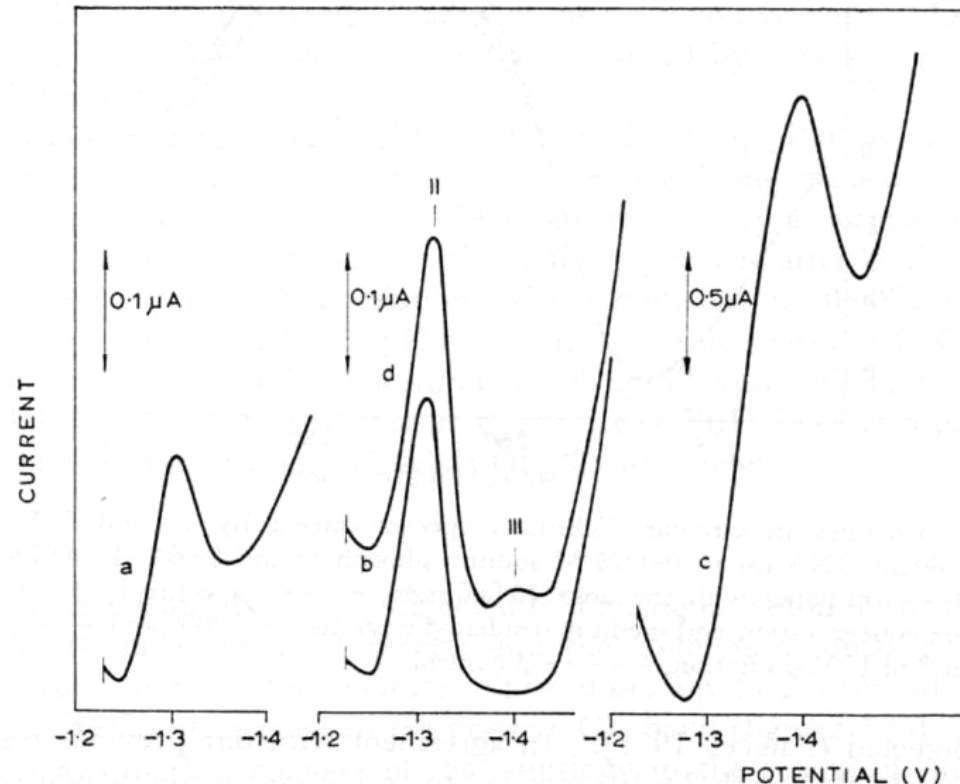


Figure 3. Differential pulse polarograms of DNA irradiated with ionizing radiation. DNA was irradiated in the concentration $460 \mu\text{g/ml}$ in the medium given in figure 1. (a) a control; (b) 10^4 rads; (c) 6×10^5 rads; (d) the sample (b) heated at 50°C for 6 min and quickly cooled. The differential pulse polarograms were measured in 0.3 M ammonium formate, 0.1 M sodium phosphate, pH 6.9 at DNA concentration $400 \mu\text{g/ml}$. Sensitivity of the apparatus was $1 \mu\text{A}$ in parts (a), (b) and (d), and $5 \mu\text{A}$ in part (c).

diferenční pulsní polarografie

•poškození DNA:

➤zlomy

➤poškození UV zářením

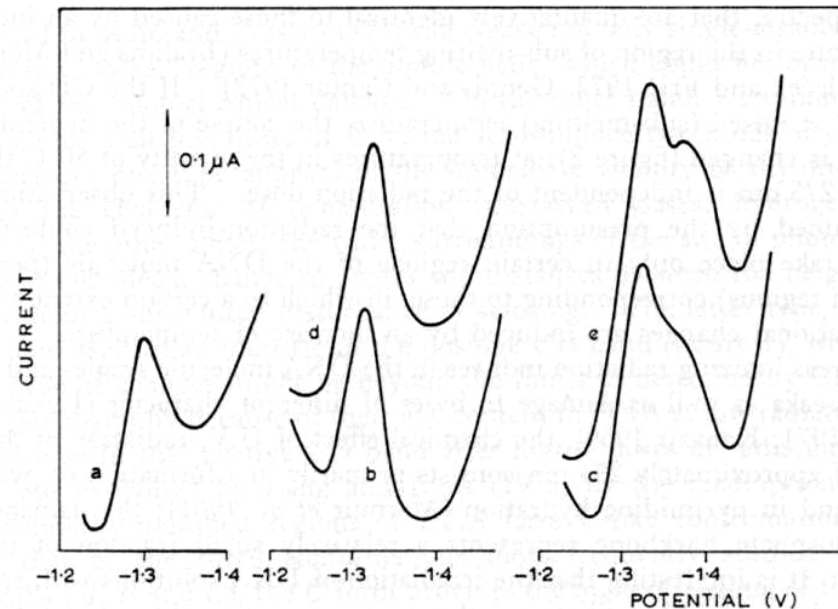


Figure 6. Differential pulse polarograms of DNA irradiated with U.V.-radiation. DNA was irradiated in the concentration $460 \mu\text{g/ml}$ in the medium given in figure 1. (a) a control; (b) $2.1 \times 10^4 \text{ erg mm}^{-2}$; (c) $6 \times 10^3 \text{ erg mm}^{-2}$; (d), (e) the samples (b) and (c), respectively, heated at 50°C for 6 min and quickly cooled. The differential pulse polarograms were measured under the conditions given in figure 3 with the apparatus sensitivity $1 \mu\text{A}$.

diferenční pulsní polarografie

•poškození DNA:

- zlomy
- poškození UV zářením
- **chemicky poškozená DNA**

Platinové komplexy

rozlišení typu strukturní změny
vlivem tvorby Pt-DNA aduktu

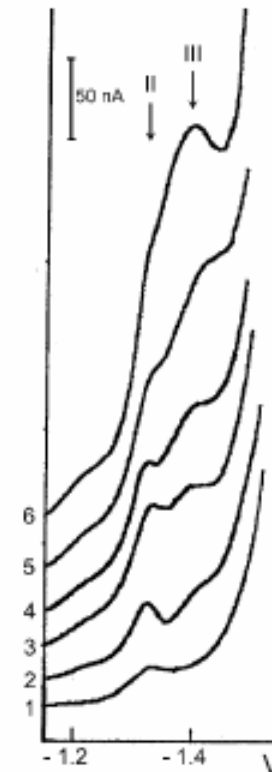


Fig. 7 Differential pulse polarographic analysis of CT-DNA modified by ORGANObisPt. DNA at a concentration of 0.4 mg/mL in 0.3 M ammonium formate with 0.01 M phosphate buffer, pH 6.8. *Curve 1*: control, unmodified DNA; *curves 2-6*: DNA modified by ORGANObisPt at $r_b = 0.001, 0.003, 0.005, 0.007, 0.01$, respectively; the *arrows* marked *II* and *III* indicate potentials E (against saturated calomel electrode) at which native or denatured DNA samples yielded DPP peaks II or III, respectively (see text)

omezení polarografických metod

- vysoké požadavky na množství analytu

⇒**obtíže při analýze dobře definovaných vzorků – vysoká cena nebo pracnost přípravy**
(oligonukleotidy, RNA, plasmidová DNA...)

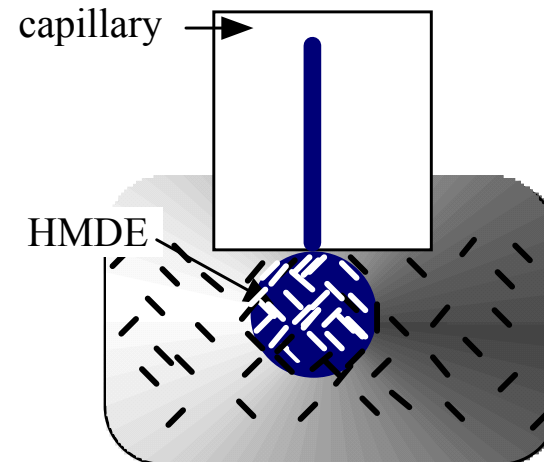
- složení analyzovaného roztoku je primárně určeno charakterem elektrodové reakce

⇒**omezený výběr experimentálních podmínek pro studium struktury DNA, jejích změn, interakcí DNA s jinými molekulami atd.**

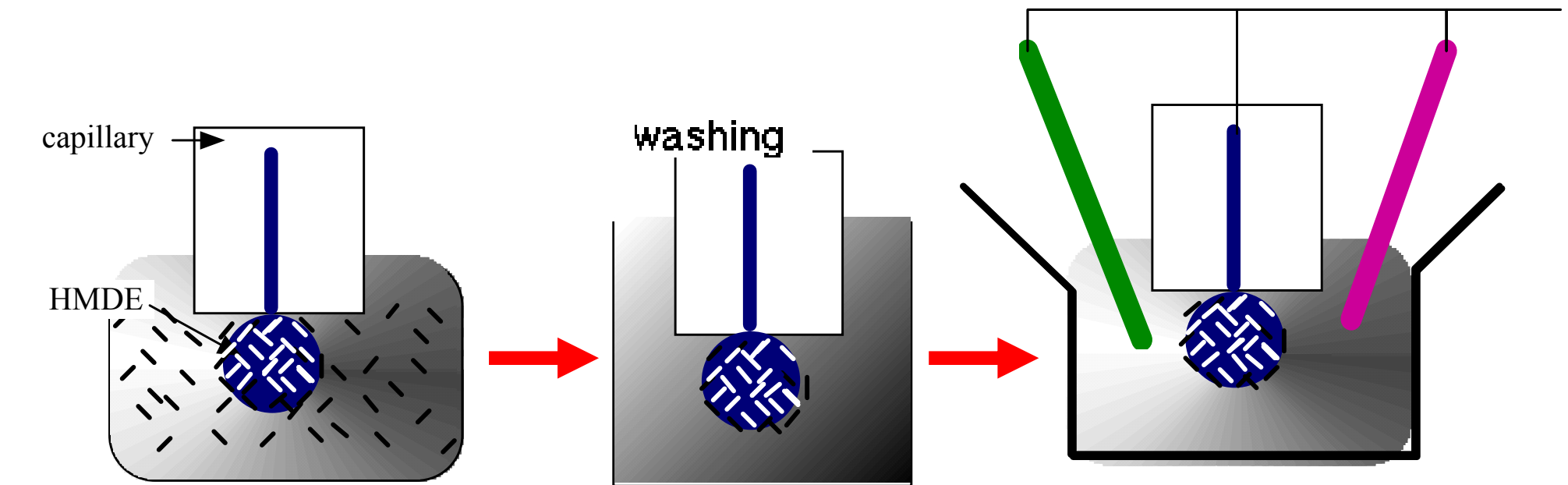
Biomakromolekuly jsou **silně adsorbovány**
na površích elektrod

- akumulace na povrchu
elektrody

• **adsorptivní stripping**
DNA: zvýšení citlivosti
analýzy (až 3 řády)



Adsorpce DNA na povrchu elektrod je natolik pevná, že vydrží **výměnu média**



adsorpce

přenos

přenos

měření v čistém
základním elektrolytu

Adsorptive

Transfer

Stripping

Zavedení **AdTS** („medium-exchange“, „ex-situ“) techniky otevřela zcela nové možnosti v elektrochemii NK:

-výrazné snížení objemu vzorku

-adsorbovat DNA na povrch elektrody lze i z jiného prostředí, než v jakém se měří

-odstranění interference látek, které se adsorbují slabě a lze je „odmýt“

➤ **vývoj elektrochemických biosenzorů**

pro poškození DNA

pro hybridizace DNA

Elektrochemická detekce poškození DNA

Proč je důležitá analýza poškození DNA? (a detekce DNA poškozujících, „genotoxických“ látek?)

DNA: genetický materiál

- uchování genetické informace
- její předávání potomstvu
- její přepis a překlad do struktury bílkovin

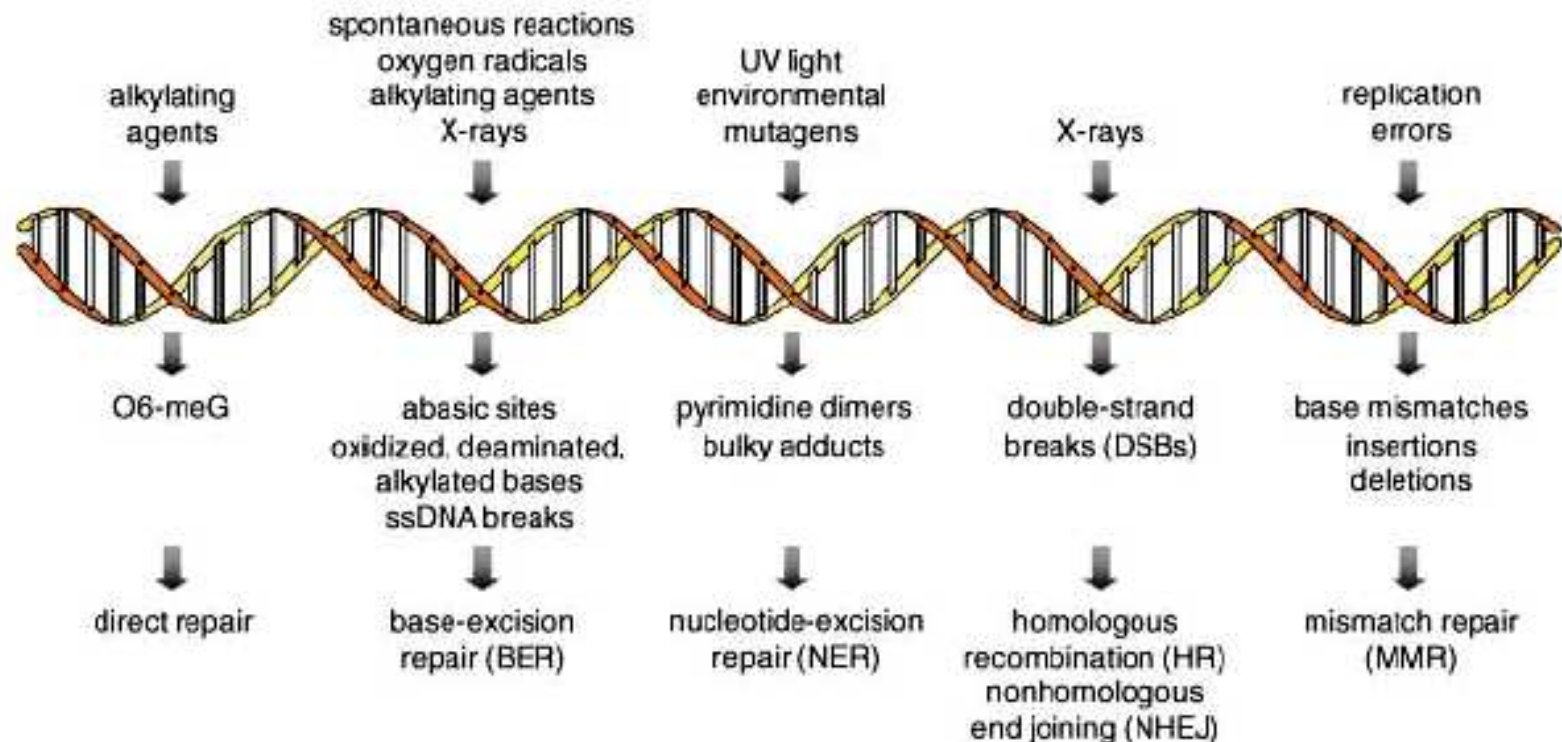
Poškození DNA:

- může vést ke změně genetické informace (mutace)
- zamezení její správné exprese
- **závažné zdravotní důsledky**

DNA v buňkách je neustále vystavena účinku řady chemických (nebo fyzikálních) činidel

- endogenní - produkty a meziprodukty metabolických přeměn
- exogenní - vlivy prostředí (záření, polutanty)
- buňky disponují nástroji na opravu poškozené DNA

Scharer, O. D. (2003) Chemistry and biology of DNA repair, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 2946-74.



Nejčastější „produkty“ poškození DNA

přerušení cukrfosfátové páteře DNA

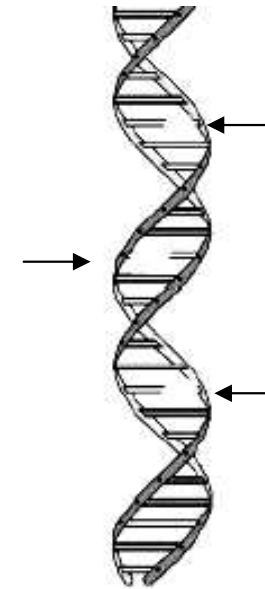


jednořetězcový zlom



dvouřetězcový zlom

přerušení
N-glykosidické
vazby



„abazická“ místa

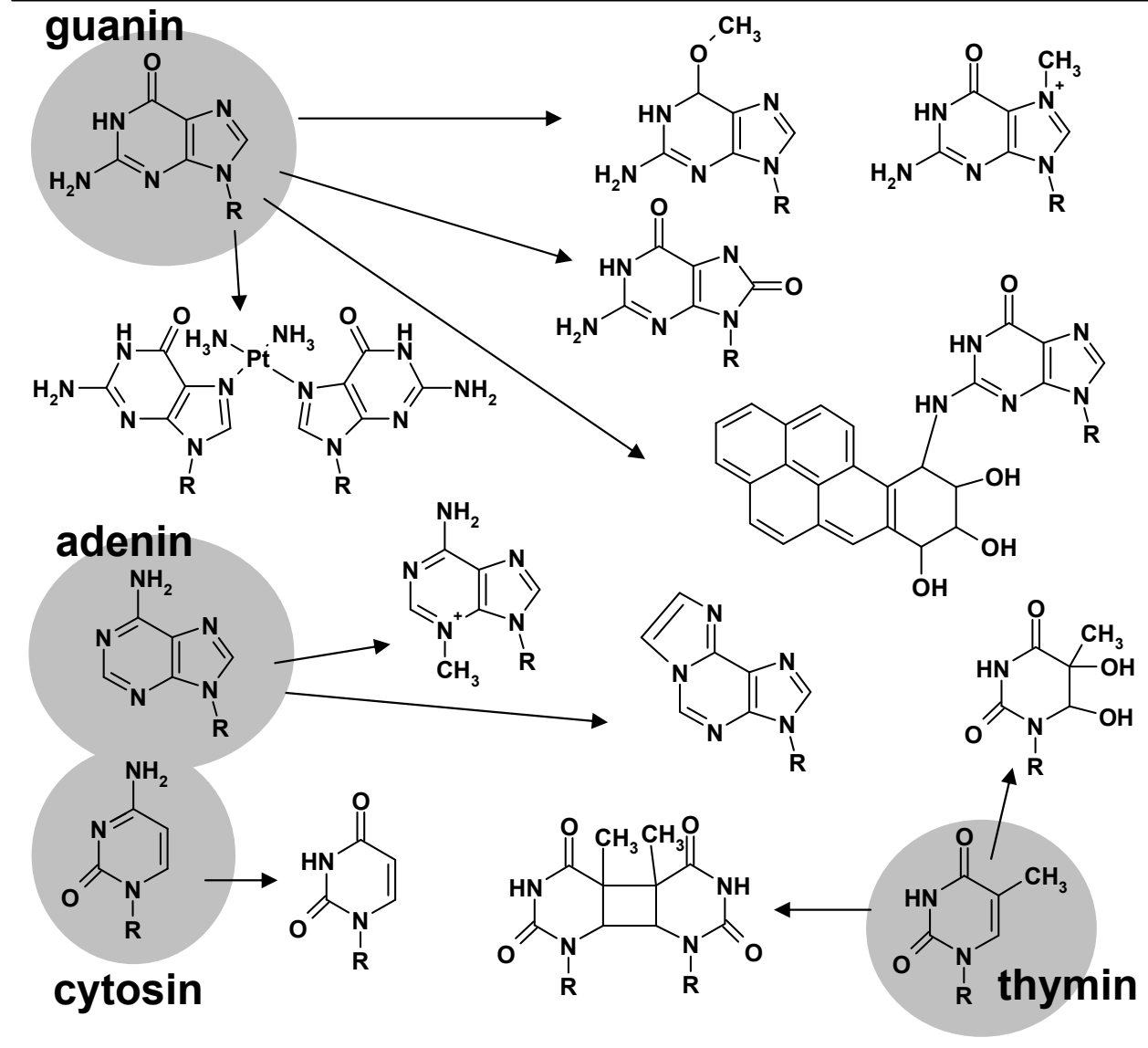
- kyslíkové radikály
- činnost nukleáz
- důsledek poškození bazí

- spontánní hydrolýza (depurinace)
- důsledek poškození bazí

Nejčastější „produkty“ poškození DNA

poškození bází:
chemické modifikace

- alkylace bází
- oxidativní poškození
- deaminace bází
- poškození UV zářením
(sluneční světlo)
- reakce s metabolicky
aktivovanými karcinogeny
- reakce s protinádorovými
léky



Metody využívané pro detekci poškození DNA

1. Metody založené na kompletní hydrolýze DNA a následném stanovení modifikovaných bazí pomocí chromatografických metod nebo hmotové spektrometrie

Metody využívané pro detekci poškození DNA

HPLC: detekce 8-oxoguaninu

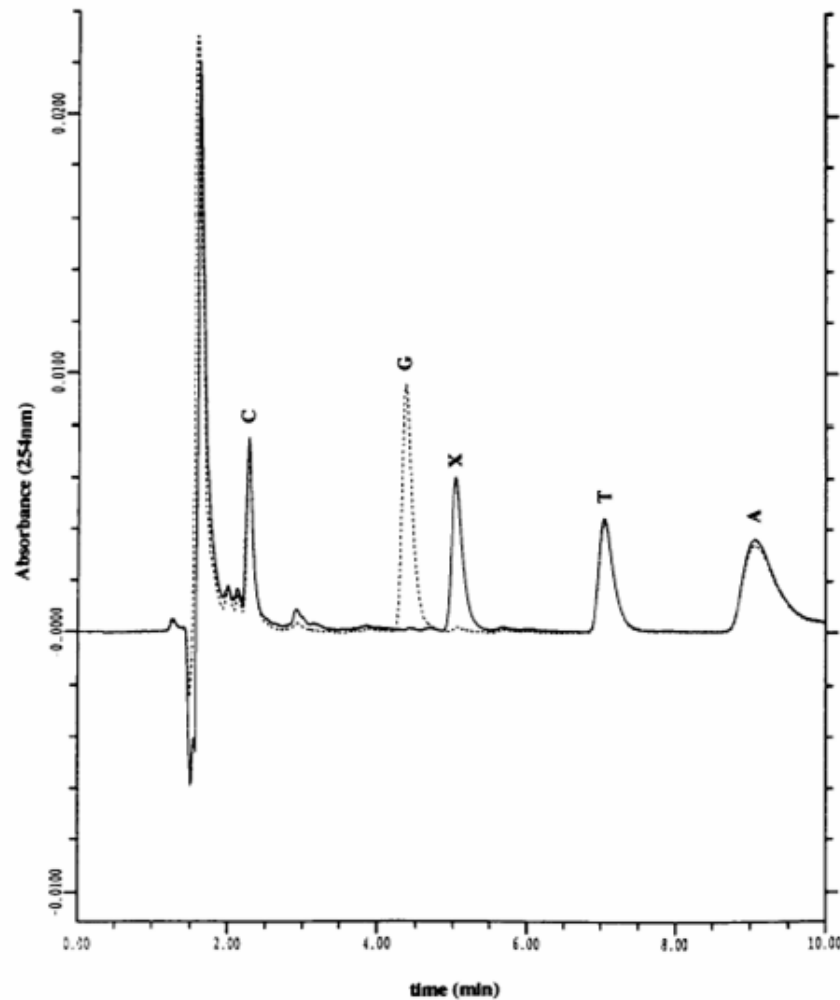


Fig. 4. Effect of guanase on bases derived from a formic acid hydrolysate of calf thymus DNA. Samples were : HPLC with UV detection prior to (---) and following (—) guanase treatment as described in Materials and Methods. G, guanine; X, xanthine; T, thymine; A, adenine.

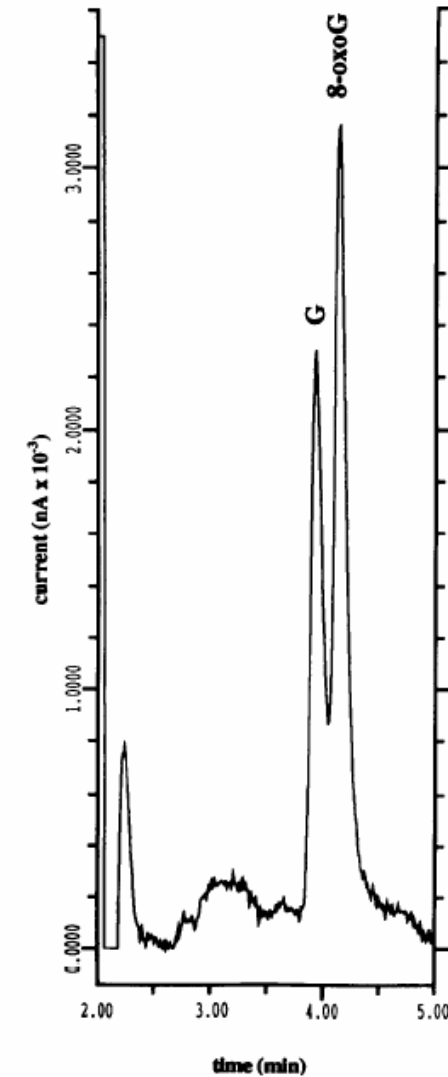
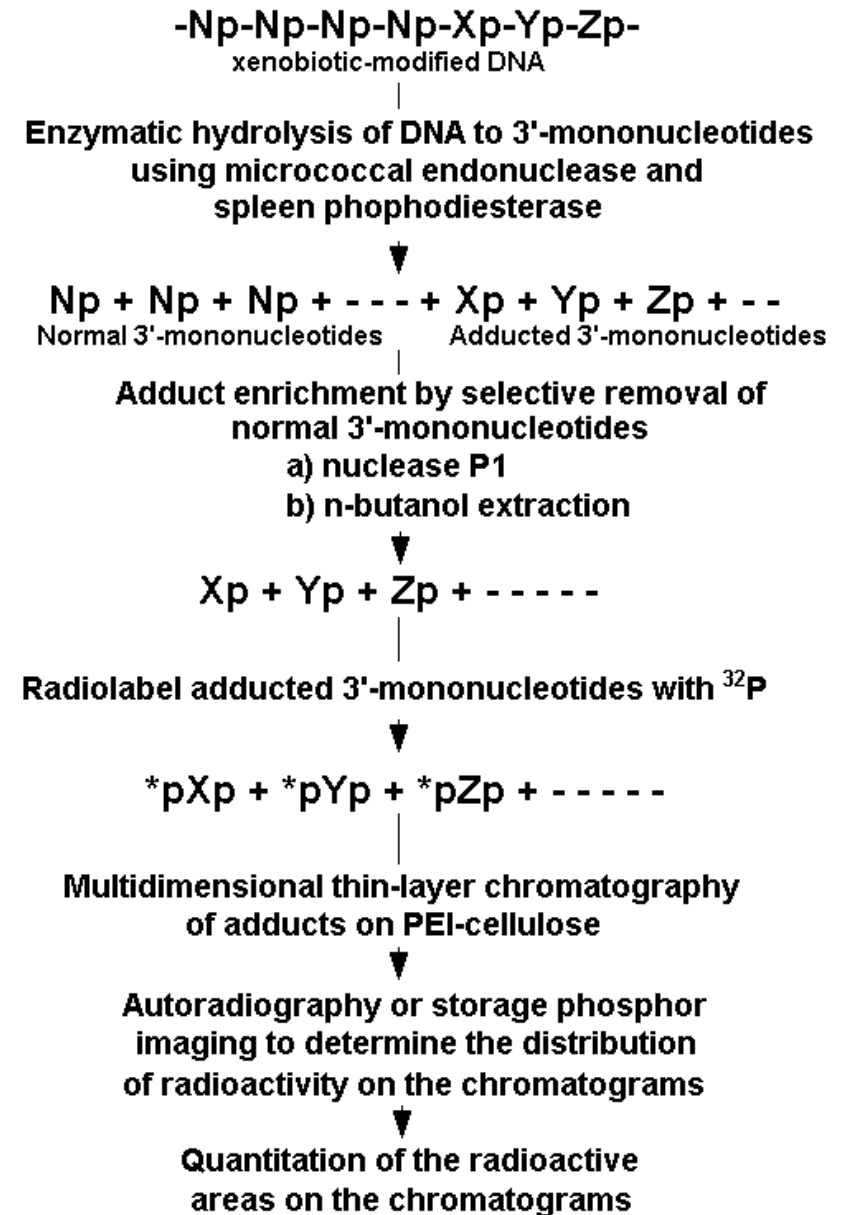
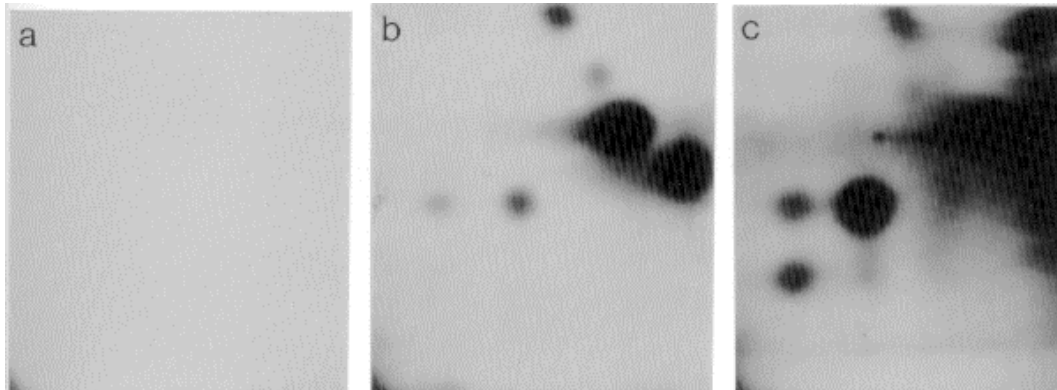


Fig. 1. Reversed-phase HPLC analysis, using electrochemical detection at +600 mV, of a solution containing 500 nM guanine (G) and 40 nM 8-oxoguanine (8-oxoG). Chromatographic conditions were as described in Materials and Methods except the mobile phase was 50 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH5.1 containing 2% methanol.

Metody využívané pro detekci poškození DNA

^{32}P -“postlabeling“



Metody využívané pro detekci poškození DNA

1. Metody založené na kompletní hydrolýze DNA a následném stanovení modifikovaných bazí pomocí chromatografických metod nebo hmotové spektrometrie
2. Sledování změn vlastností „celých“ molekul DNA (elektroforetické a imunochemické metody)

Metody využívané pro detekci poškození DNA

detekce zlomů:

relaxace plasmidové nadšroubovicové (sc) DNA

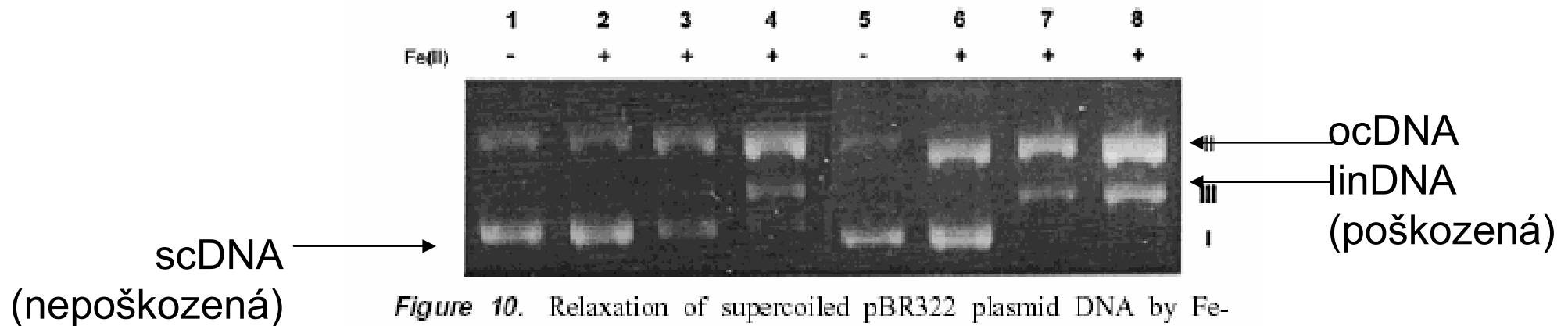


Figure 10. Relaxation of supercoiled pBR322 plasmid DNA by Fe(II)•deglycoBLM **11**. Lane 1, DNA + 10 μ M deglycoBLM; lane 2, 1 μ M deglycoBLM; lane 3, 5 μ M deglycoBLM; lane 4, 10 μ M deglycoBLM; lane 5, 10 μ M deglycoBLM **11**; lane 6, 1 μ M deglycoBLM **11**; lane 7, 5 μ M deglycoBLM **11**; lane 8, 10 μ M deglycoBLM **11**. Lanes 2–4 and 6–8 also contained 10 μ M Fe²⁺; essentially no cleavage was observed in the presence of Fe²⁺ alone.

Metody využívané pro detekci poškození DNA

detekce zlomů v jednotlivých buňkách:

„comet assay“ (dsb)

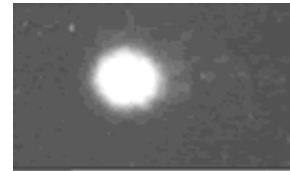


Fig.1 Unexposed control. Bundle of DNA (No-Tail)

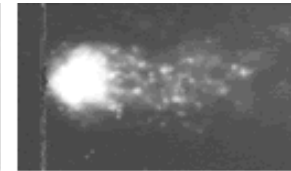


Fig.2 X-ray calibration 25.6 rads. DNA breaks are very obvious

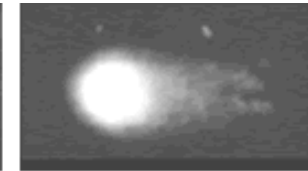
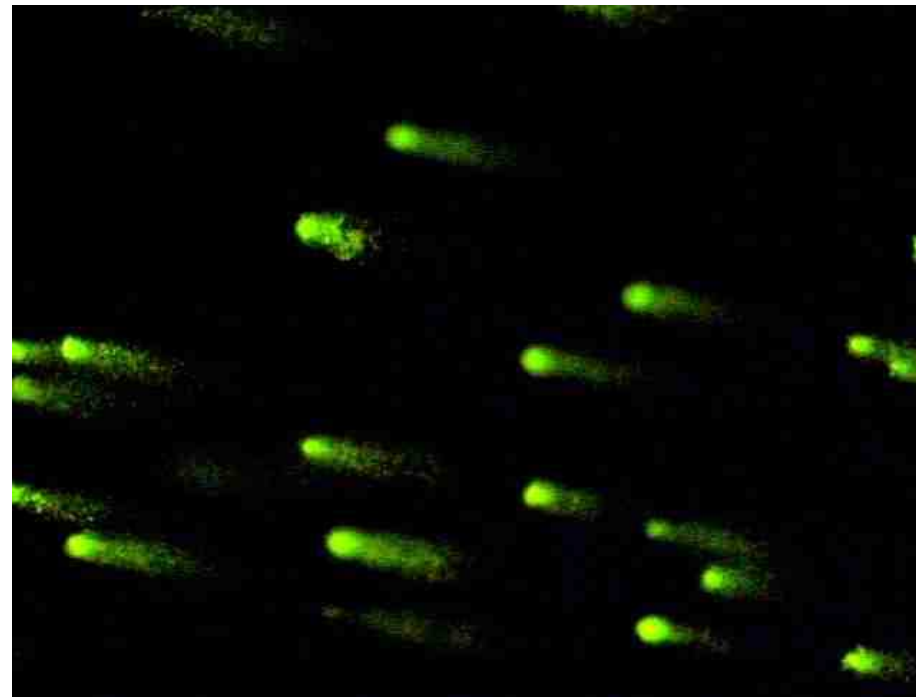


Fig.3 Cell Phone level microwave exposure 2hrs 2.45GHz reaching so called safe SAR levels Comet Tail = DNA Damage

„alkalická eluce“ (ssb + místa labilní vůči alkalické hydrolyze)



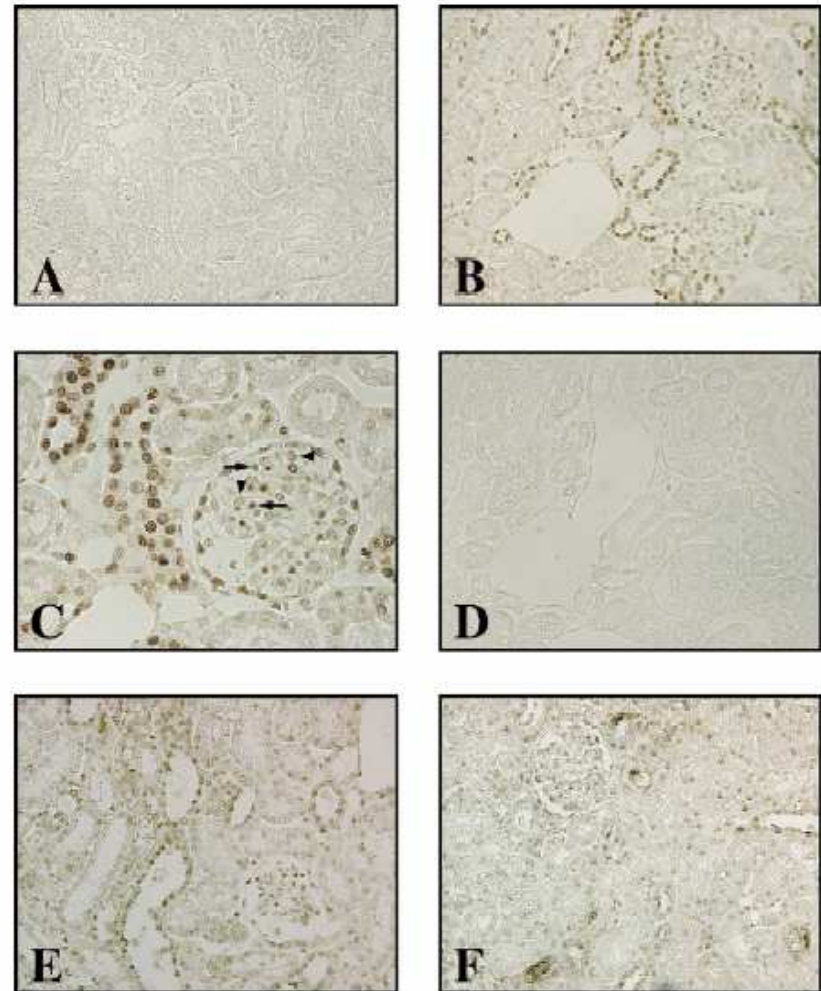
Metody využívané pro detekci poškození DNA

imunochemické metody

detekce poškozených bazí a aduktů,
proti nimž jsou k dispozici protilátky

➤ ELISA

➤ *In situ* techniky



Detekce 8-oxoguaninu *in situ* v tkáni ledviny

Elektrochemické metody lze využít v rámci obou skupin metod:

a) elektrochemická detekce ve spojení s HPLC nebo jinou separační metodou

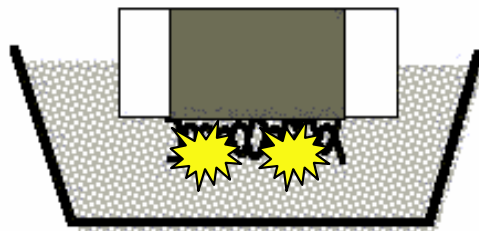
b) monitorování změn elektrochemických vlastností „celých“ molekul DNA

elektroda s povrchem modifikovaným DNA:

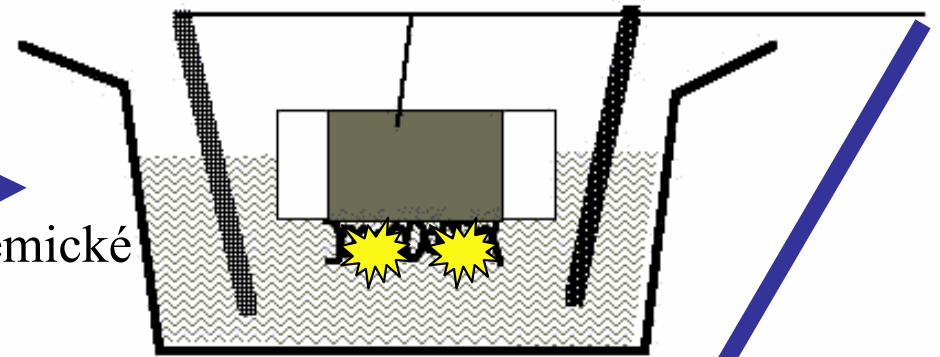
biosenzor pro poškození DNA/látky poškozující DNA

Elektrochemický senzor pro poškození DNA

interakce s „poškozující“ látkou



přenos do elektrochemické
nádoby

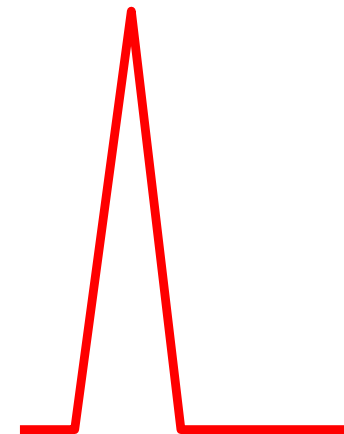


ponoření
do
analyzovaného
vzorku



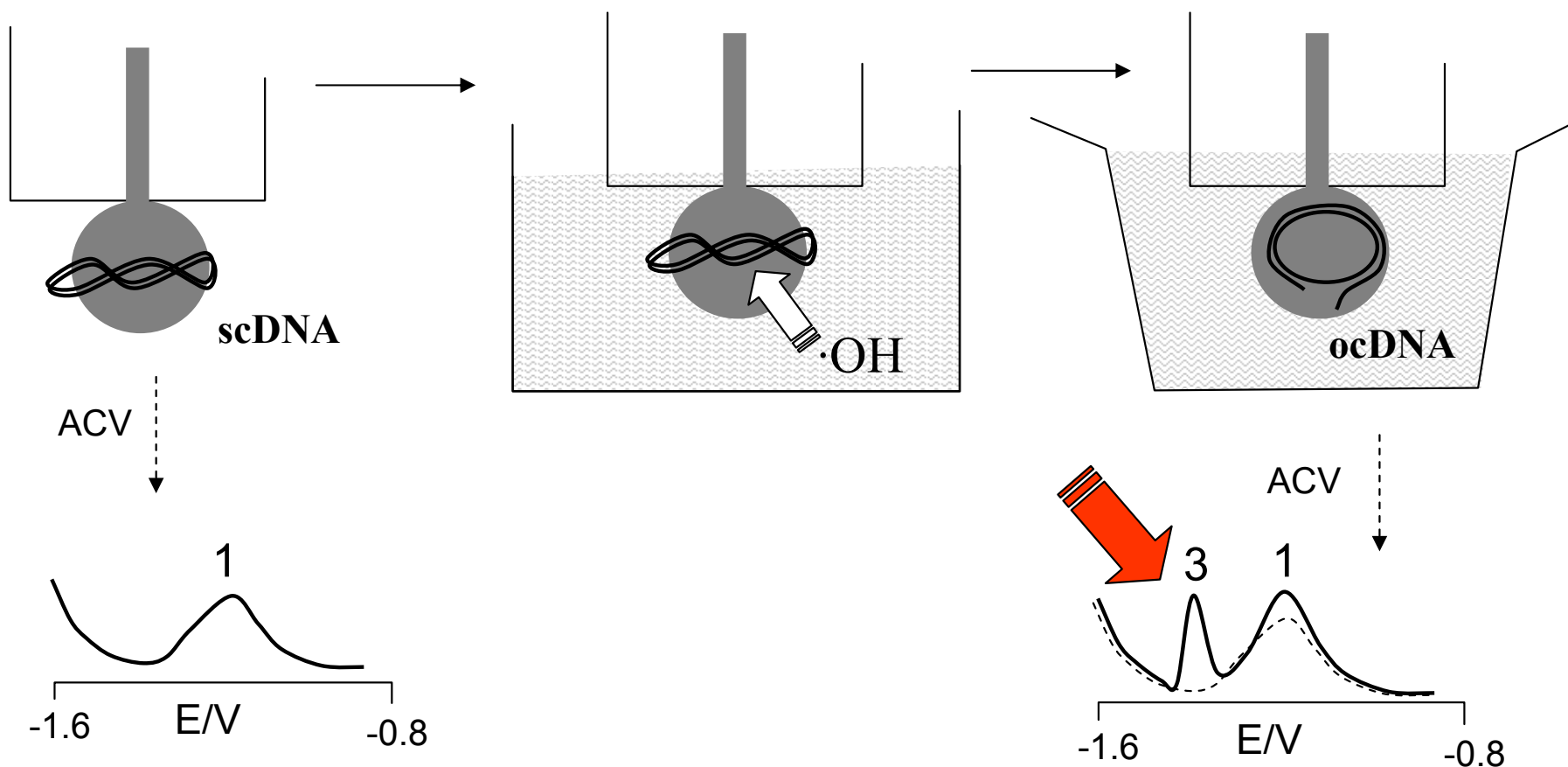
elektroda modifikovaná DNA

detekční krok
(měření signálu)



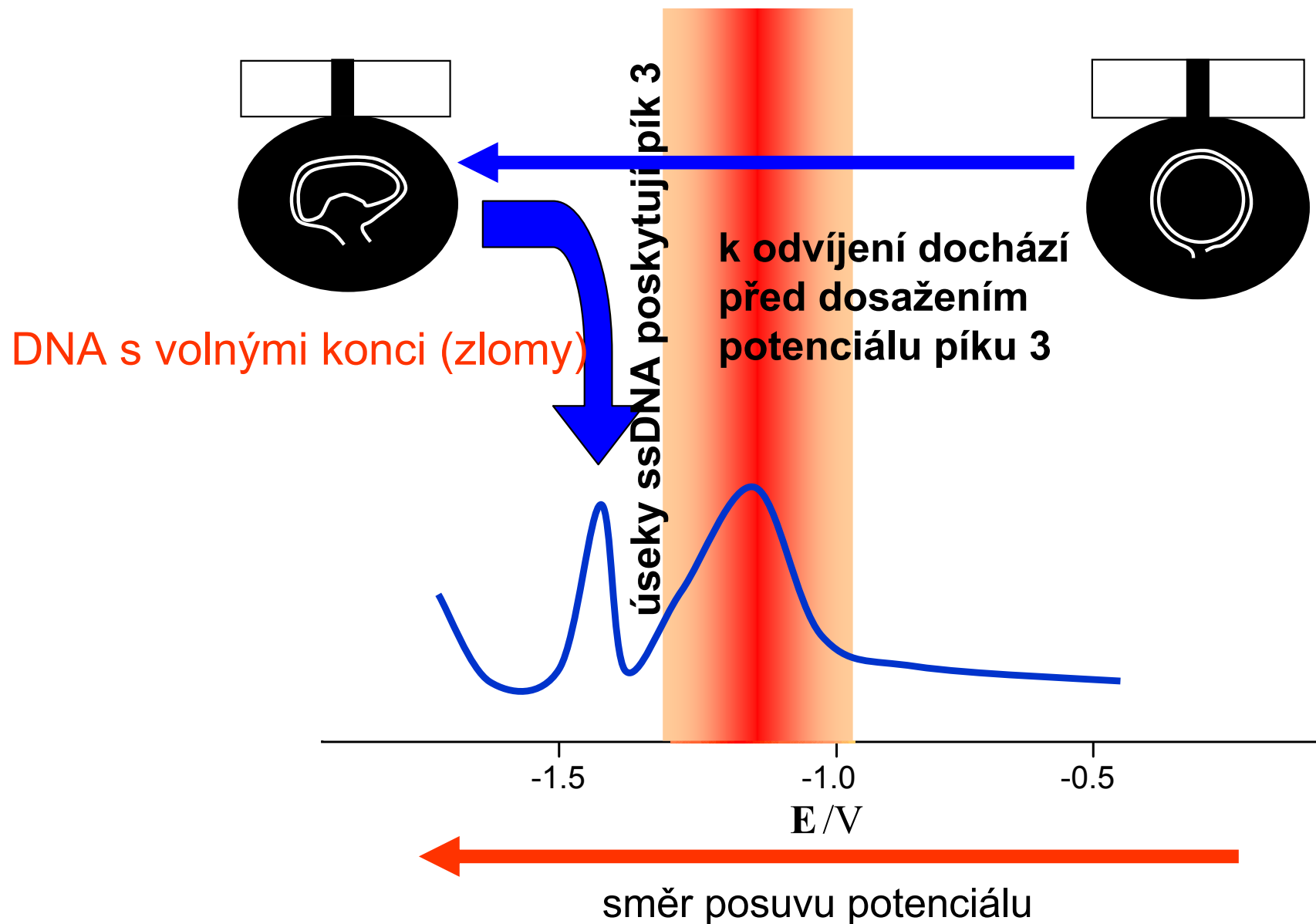
Detekce zlomů v DNA

Rtuťová elektroda modifikovaná kovalentně uzavřenou kružnicovou (nadšroubovicovou, sc) DNA: senzor pro látky indukující zlomy v DNA

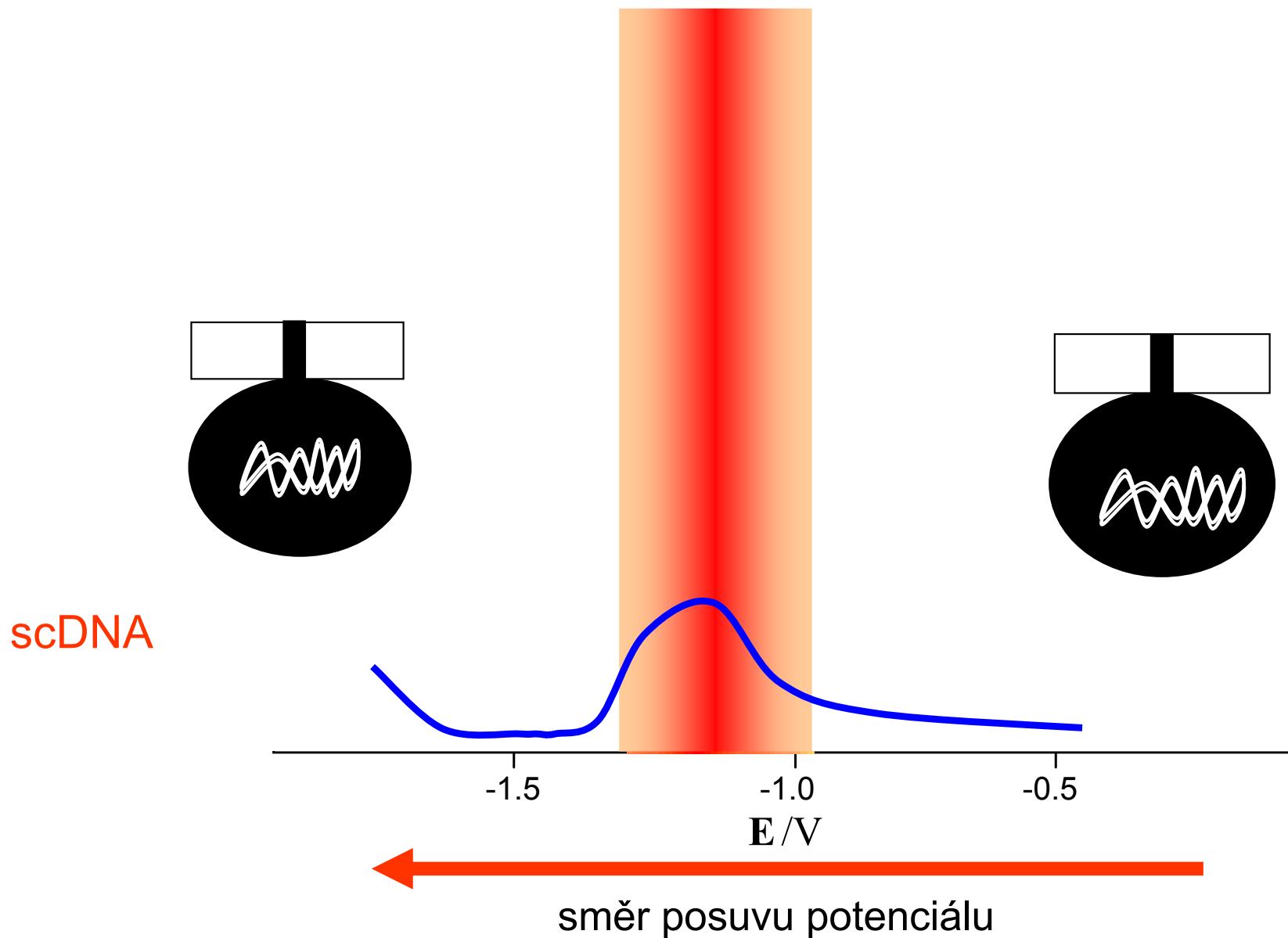


dsDNA s volnými konci (oc a lineární DNA), nikoli však scDNA, poskytují AC voltametrický **pík 3** (specifický pro ssDNA) díky **částečné denaturaci dvoušroubovice na povrchu elektrody**

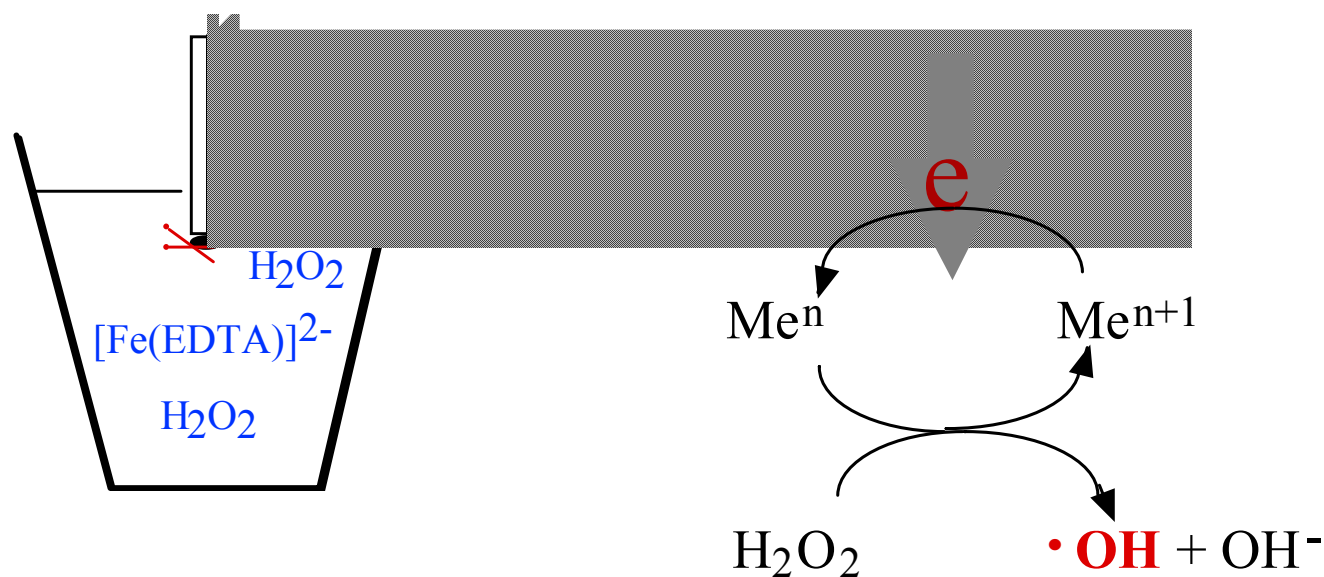
Odvíjení dvoušroubovice DNA probíhá na povrchu rtuťové elektrody v oblasti potenciálů okolo -0.2 V – tzv. „**oblast U**“



Odvíjení dvoušroubovice DNA probíhá na povrchu rtuťové elektrody v oblasti potenciálů okolo -0.2 V – tzv. „**oblast U**“



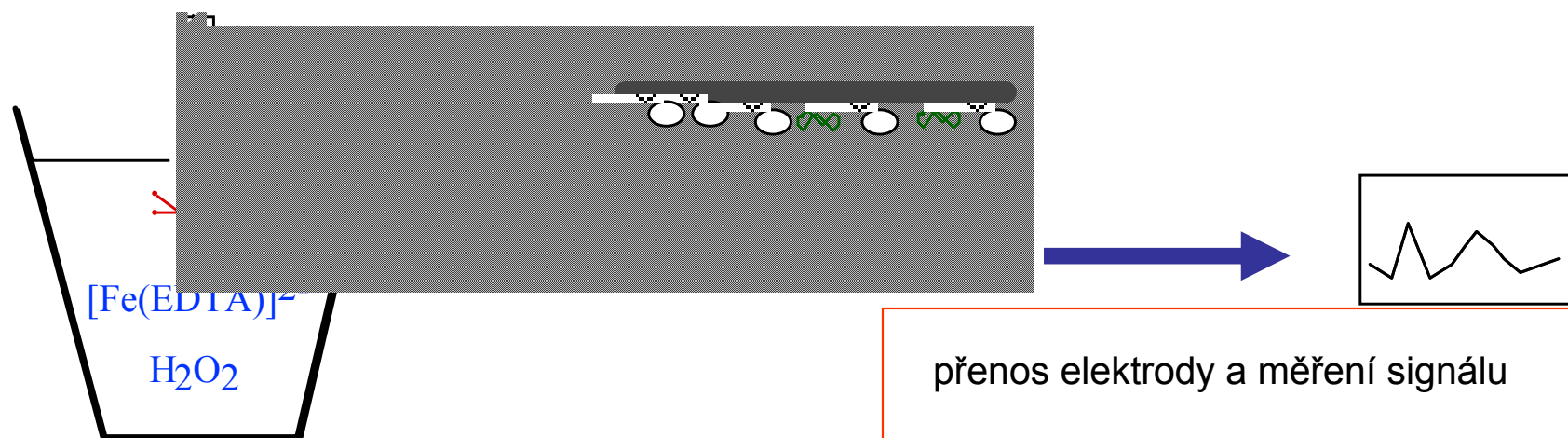
Štěpení na DNA na povrchu elektrod lze elektrochemicky „modulovat“



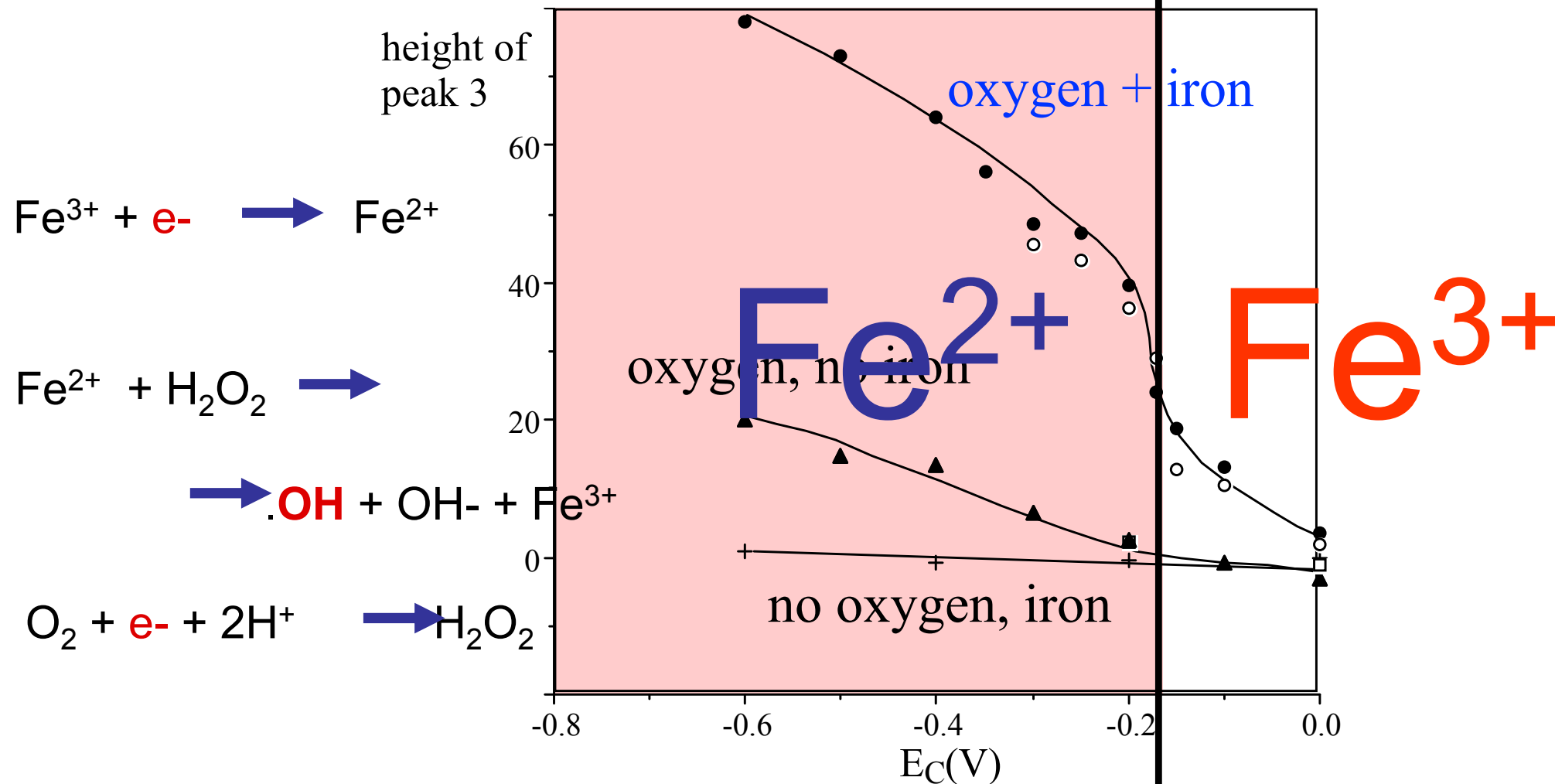
Např. hydroxylové radikály (nebo jiné reaktivní formy kyslíku) lze vytvořit přes elektrochemicky kontrolované Fentonovy a Haber-Weissovy reakce

Elektroda s scDNA na povrchu se vloží do roztoku např. komplexu Fe/EDTA a H_2O_2 (nebo O_2), a na určitou dobu se vloží příslušný potenciál

Štěpení na DNA na povrchu elektrod lze elektrochemicky „modulovat“

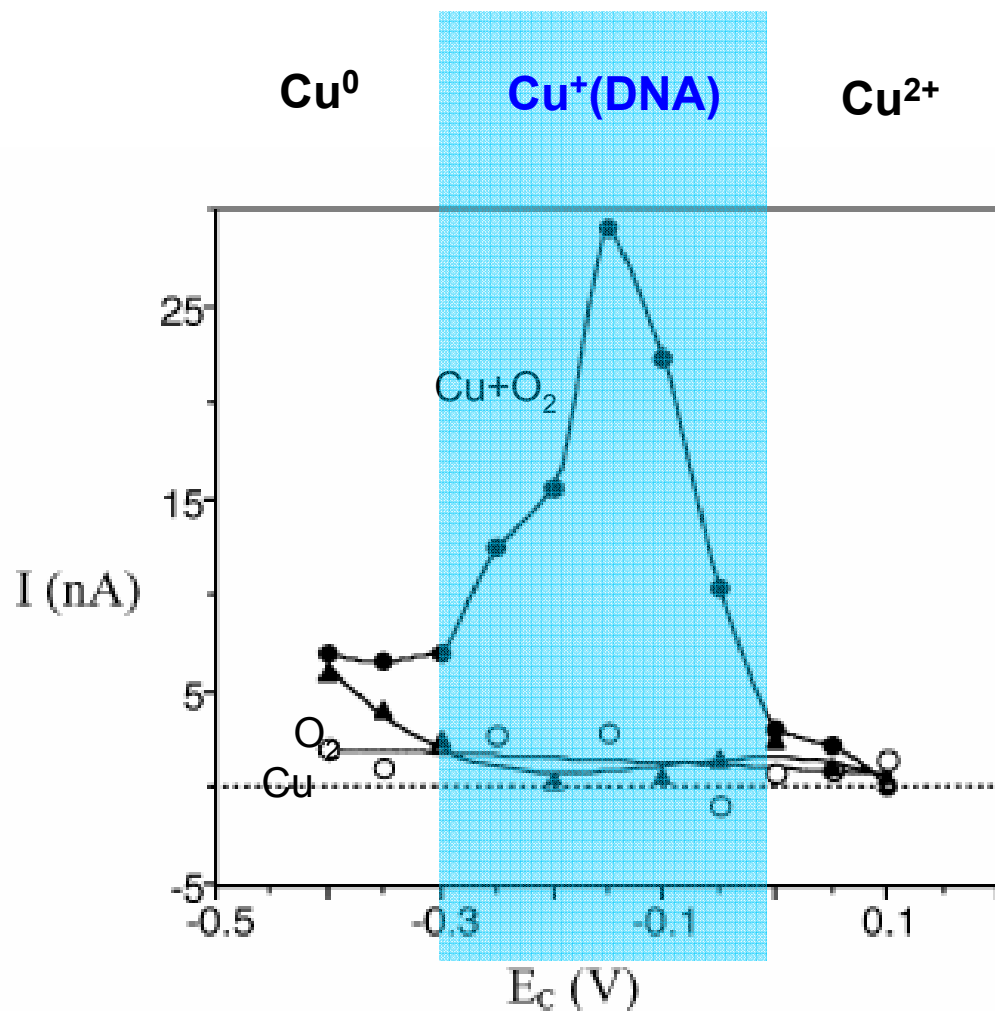


Intenzita píku 3 (tj. stupeň poškození DNA, množství vytvořených zlomů) závisí na vloženém potenciálu:

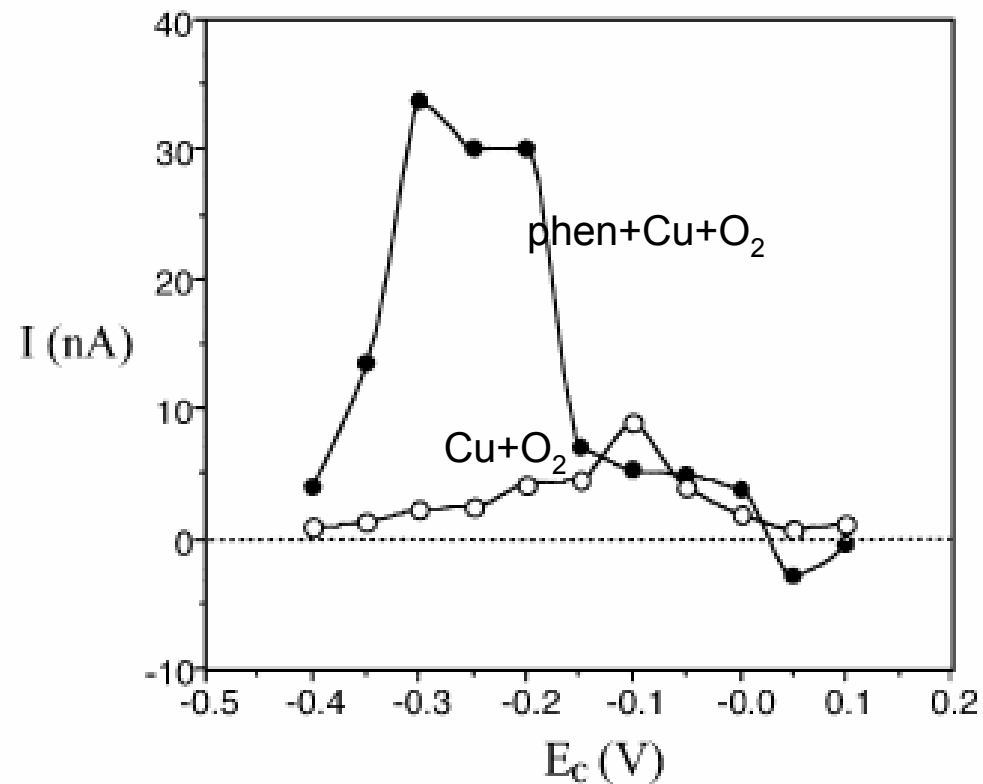


pokud je potenciál dostatečně negativní pro redukci Fe(III) na Fe(II) (a kyslíku na peroxid vodíku) tvoří se OH radikály a probíhá štěpení DNA

V přítomnosti mědi (a kyslíku) dochází k poškození DNA v úzkém rozmezí potenciálu, kde mohou probíhat reakce vedoucí k tvorbě ROS za účasti **měďných iontů** (ty jsou při těchto potenciálech stabilizovány vazbou na baze DNA):



1,10-fenatrolin, ligand stabilizující Cu^+ , účinek mědi zesiluje a posouvá k negativnějším potenciálům



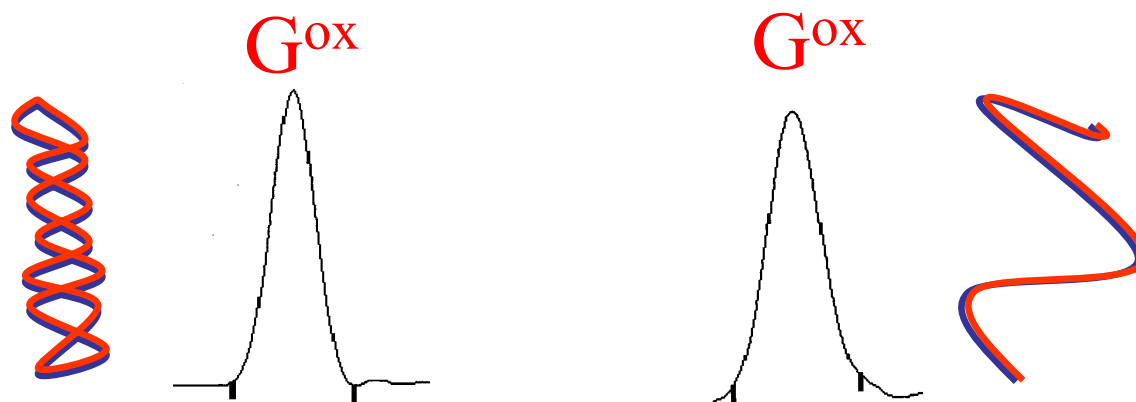
Lze citlivě detekovat zlomy v DNA pomocí jiných elektrod než HMDE?

měření oxidačního signálu guaninu na uhlíkové elektrodě

(nejčastější „label-free“ přístup v elektrochemické analýze DNA)

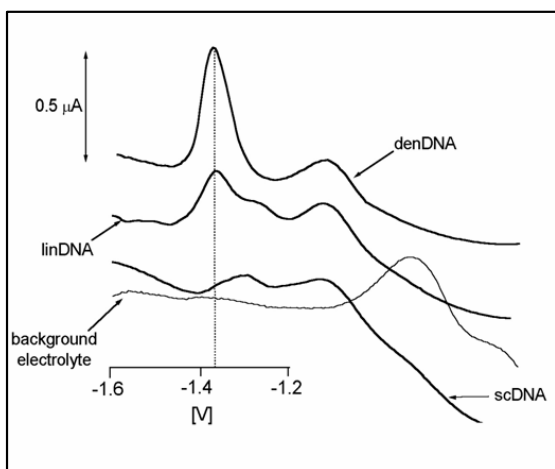
není pro detekci jednotlivých zlomů dostatečně citlivé

- malý rozdíl intenzity signálů produkovaných ss a dsDNA
- absence „povrchové denaturace“ DNA
- prakticky totožná odezva sc, oc a lineární DNA

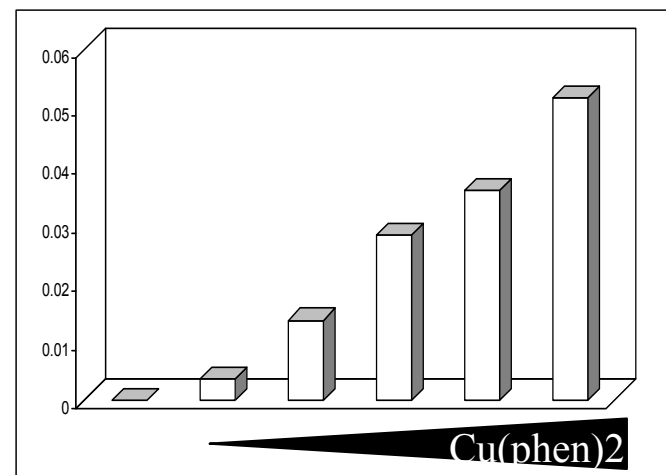


MOŽNOSTI NAHRAZENÍ KAPKOVÉ Hg ELEKTRODY:

- rtuťové filmové elektrody (Kubičárová 2000)
- pevné amalgamové elektrody (Cahová-Kuchaříková, Fadrná, Yosypchuk, Novotný 2004)



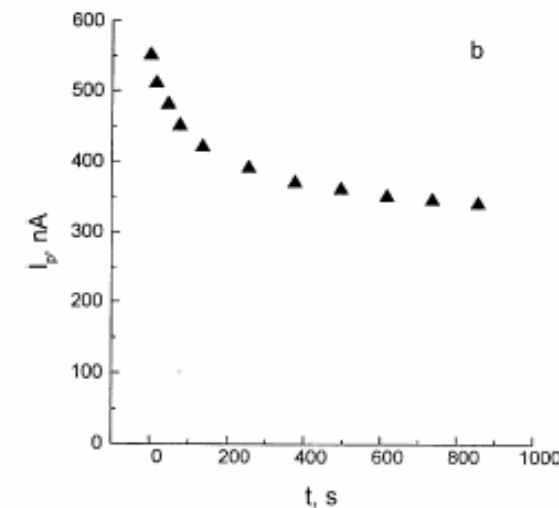
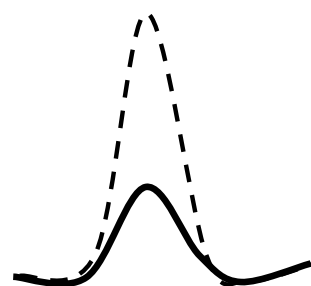
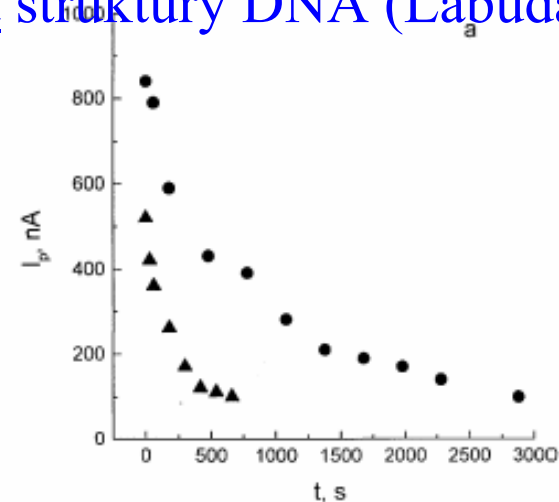
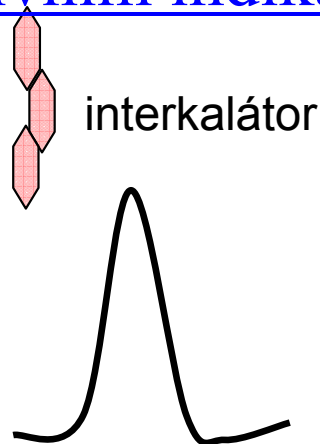
AC voltametrické křivky sc, lineární a ss plasmidové DNA na AgSAE.



závislost výšky píku 3 na koncentraci chemické nukleázy Cu(phen)₂

Detekce degradace DNA pomocí uhlíkových elektrod:

- metoda založená na elektroaktivním indikátoru struktury DNA (Labuda a kol.)



pokles signálu v závislosti na době vystavení DNA senzoru chemické nukleáze $\text{Cu}(\text{phen})_2$

Detekce degradace DNA pomocí uhlíkových elektrod:

- metoda založená na elektroaktivním indikátoru struktury DNA (Labuda a kol.)

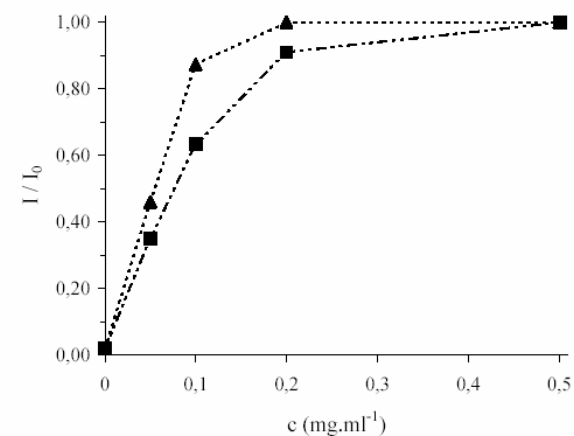
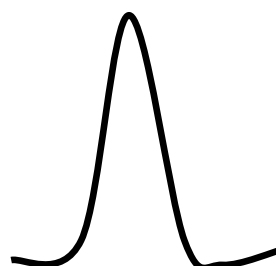
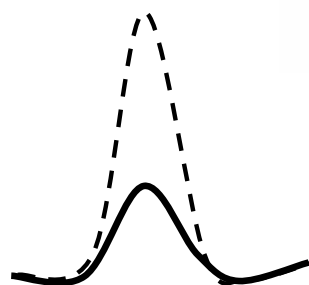


Figure 3. Antioxidative effect of rosmarinic acid (\blacktriangle) and caffeic acid (\blacksquare) in cleavage mixture on the relative marker signal at the DNA/SPE. Incubation of the sensor in 2×10^{-4} M FeSO_4 , 4×10^{-4} M EDTA, 9×10^{-3} M H_2O_2 in 10 mM phosphate buffer pH 7.0 with 10 % of methanol at the electrode potential of -0.5 V for 5 min. Other conditions as in Figure 1.



ochranný efekt antioxidantů

Detekce poškození bazí DNA

- metody založené na ztrátě elektrochemické aktivity modifikovaných bazí

- obvykle guanin

- alkylační činidla, hydrazinové deriváty, cytostatika, PCB, akridinové deriváty

- měření signálu G na uhlíkové nebo rtuťové elektrodě

Jedná se o signal-off metodu:
je nutno, aby frakce
poškozených guaninů přesáhla
relativní chybu měření

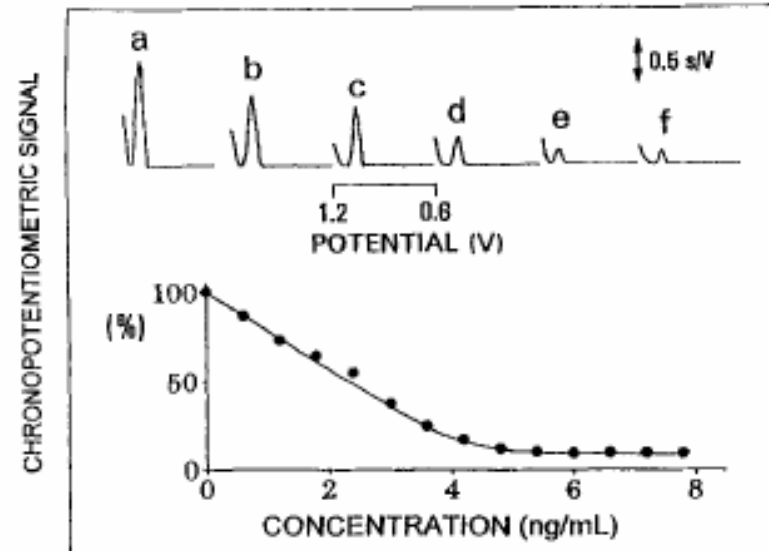
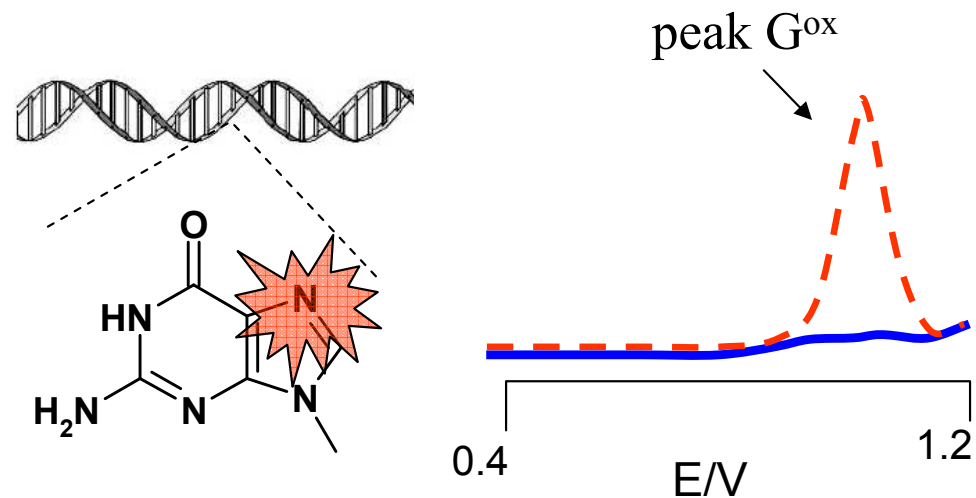
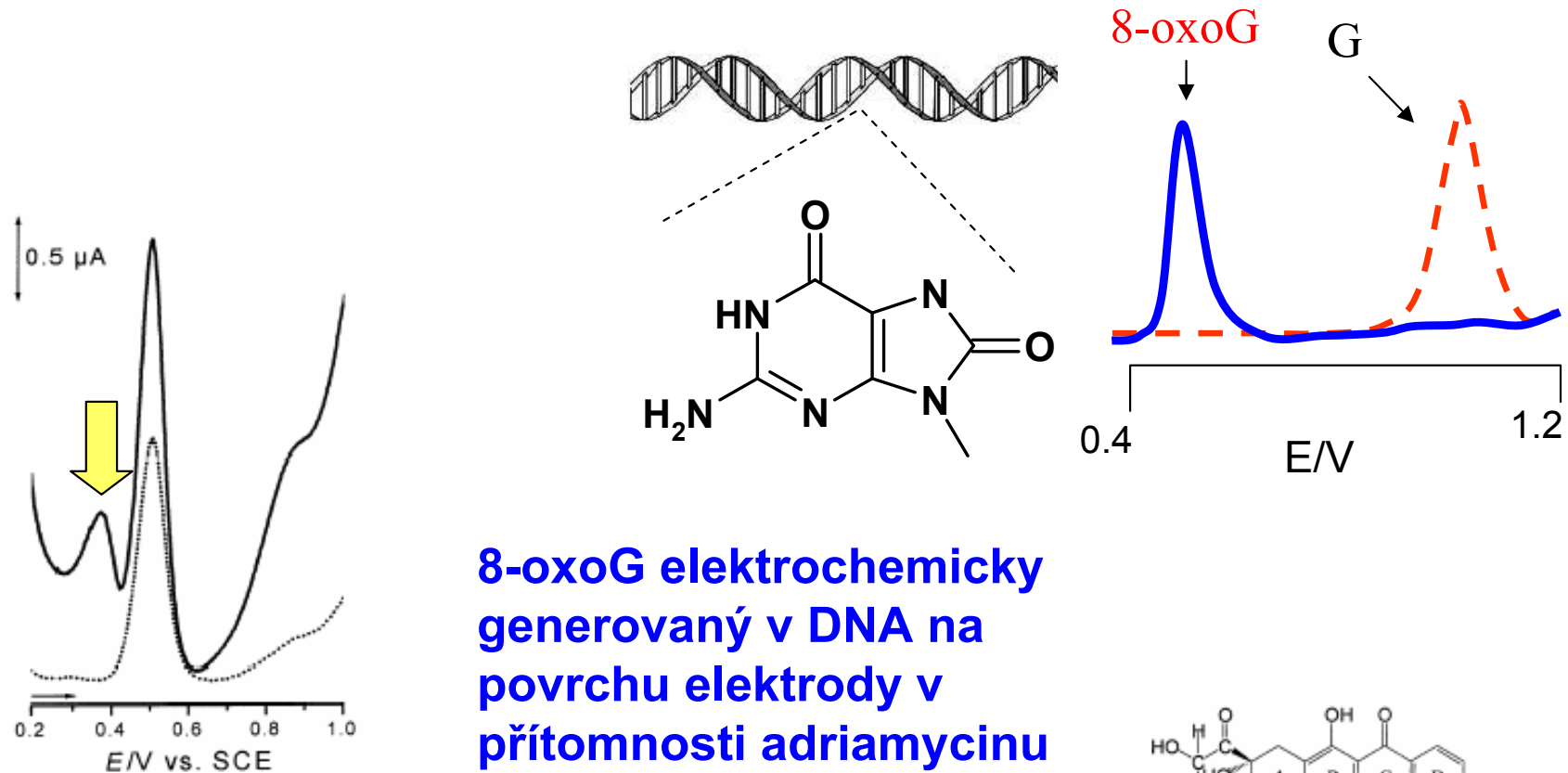


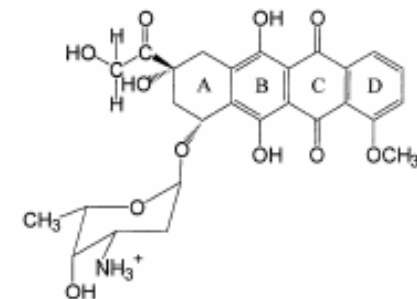
Fig. 6. Chronopotentiometric response of the DNA carbon paste biosensor for increasing levels of dimethylhydrazine in $1.2 \mu\text{g l}^{-1}$ steps (b)–(f), along with the resulting calibration plot. Also shown (a) is the response of the sensor prior to the hydrazine addition. Interaction time, 10 min. (See [21] for details.)

- některé modifikované baze poskytují specifické signály při potenciálech odlišných od signálů původních bazí
- 8-oxoguanin



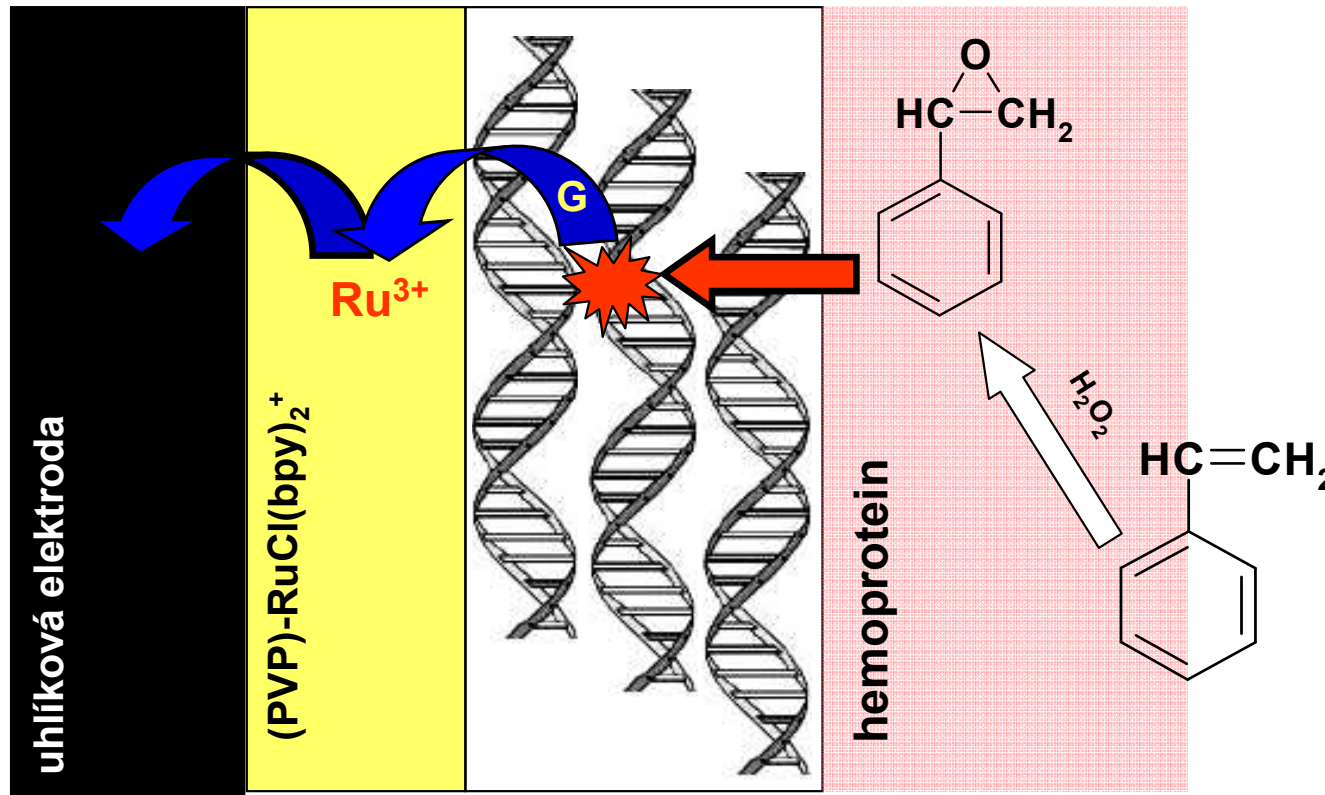
8-oxoG elektrochemicky generovaný v DNA na povrchu elektrody v přítomnosti adriamycinu

Fig. 8. Differential pulse voltammograms in pH 4.5 0.1 M acetate buffer obtained with a thin layer dsDNA-modified GCE after being immersed in a 5 μM adriamycin solution during 3 min and rinsed with water before the experiment in buffer: (···) without applied potential; (—) after applying a potential of -0.6 V during 60 s. Pulse amplitude 50 mV, pulse width 70 ms, scan rate 5 mV s⁻¹. First scans.



Poškození DNA může vést ke změně přístupnosti okolních bazí (v dsDNA) pro elektrochemickou reakci

- detekce pomocí DPP na základě píku II
- **senzor pro testování toxicity (Rusling a kol.)**

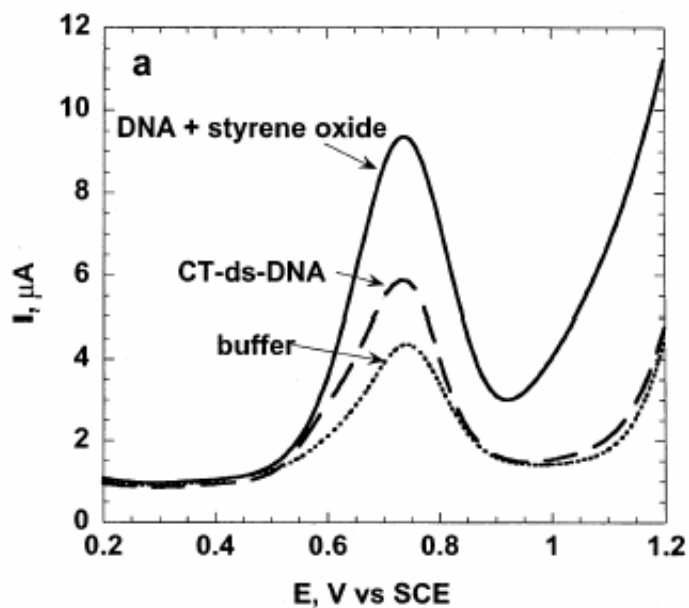


- během difuze testované látky skrz vrstvu hemového proteinu dochází k její enzymatické přeměně („metabolická aktivace“)
- vytvoří se adukt s DNA

- tím se rozvolní dvoušroubovice a usnadní přenos elektronů ze sousedních zbytků G na elektrodu prostřednictvím Ru mediátoru:

NÁRŮST SIGNÁLU

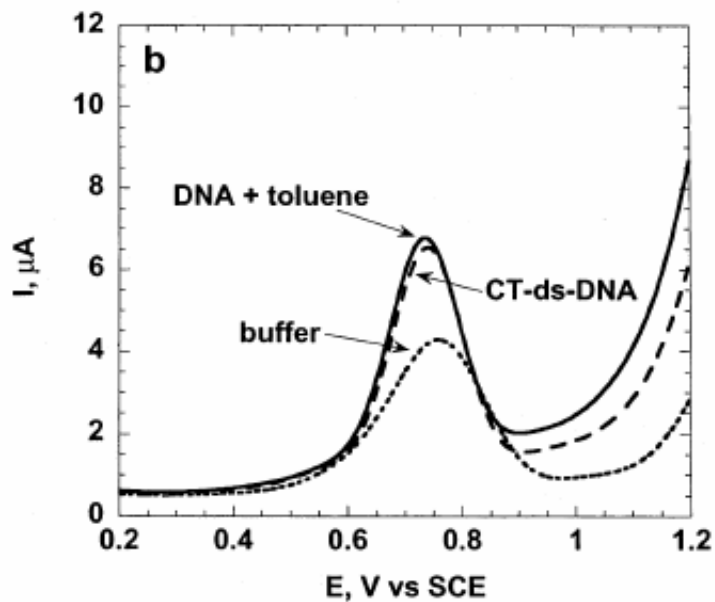
Senzor pro testování toxicity (Rusling a kol.):



STYREN

- během difuze testované látky skrz vrstvu hemového proteinu dochází k její enzymatické přeměně („metabolická aktivace“)

- vytvoří se adukt s DNA



TOLUEN

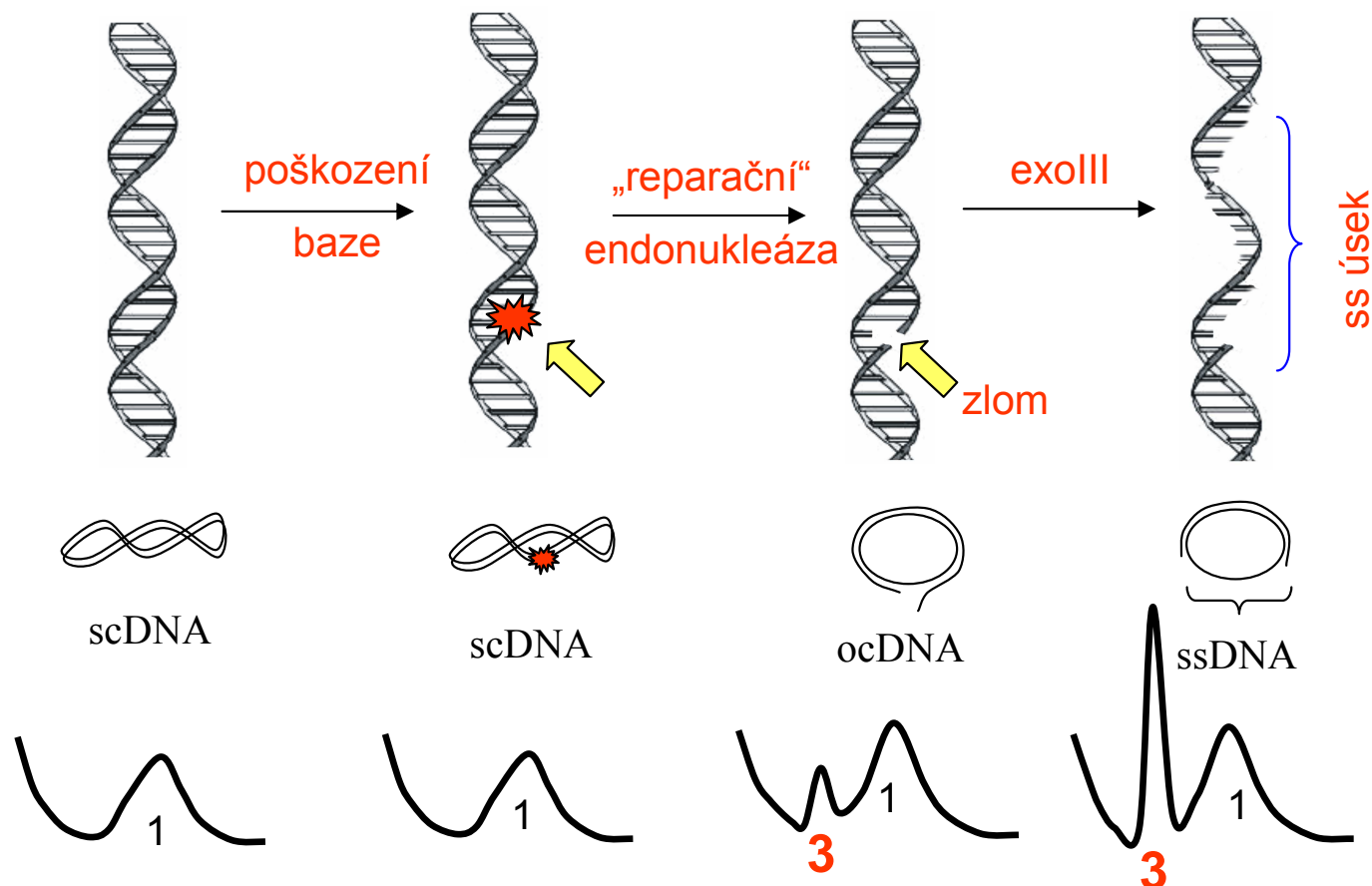
(není substrátem pro enzymatickou aktivaci)

- tím se rozvolní dvoušroubovice a usnadní přenos elektronů ze sousedních zbytků G na elektrodu prostřednictvím Ru mediátoru:

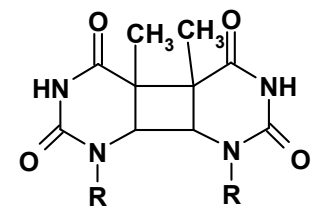
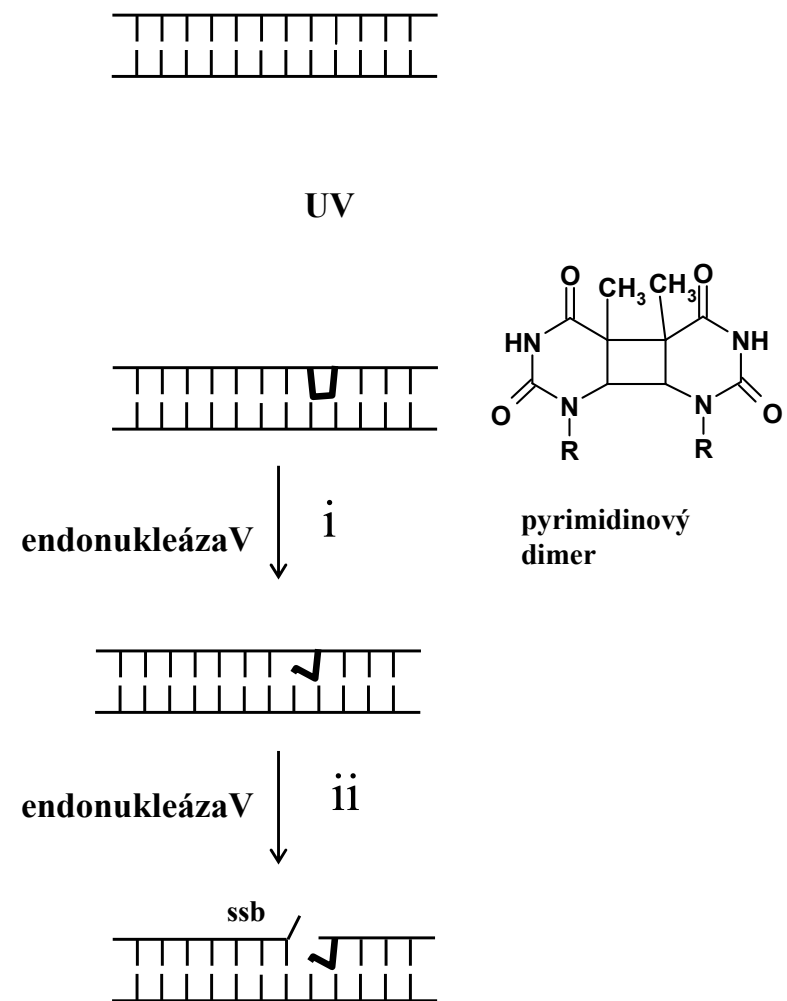
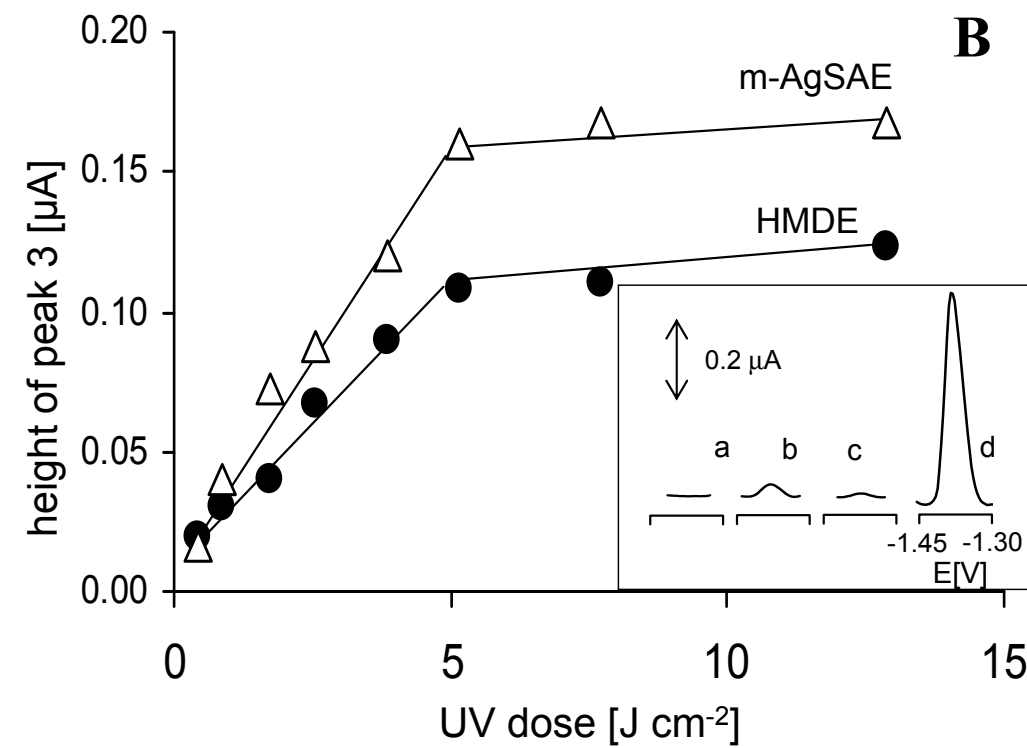
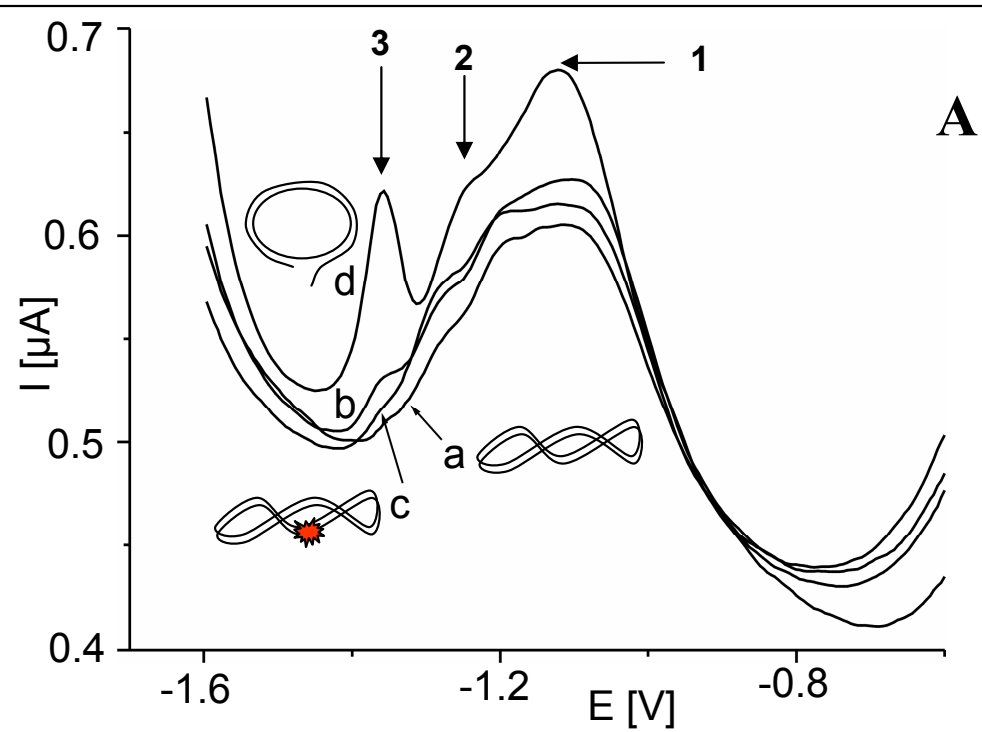
NÁRŮST SIGNÁLU

Detekce poškození bazí pomocí kombinace specifických endonukleáz a elektrochemické detekce

- enzymy účastnící se opravných procesů rozpoznávají poškozené baze
- převedení poškozených bazí na zlomy



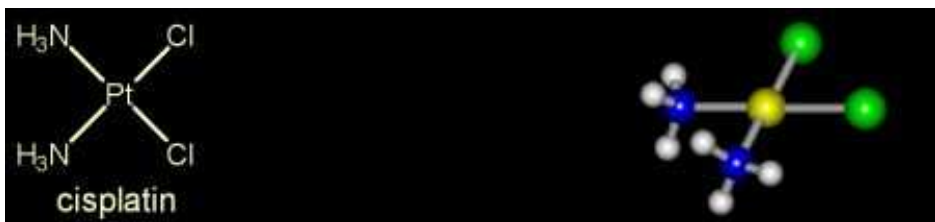
- a – scDNA
- b – scDNA inkubovaná s endoV
- c – UV ozářená scDNA
- d – UV+endoV



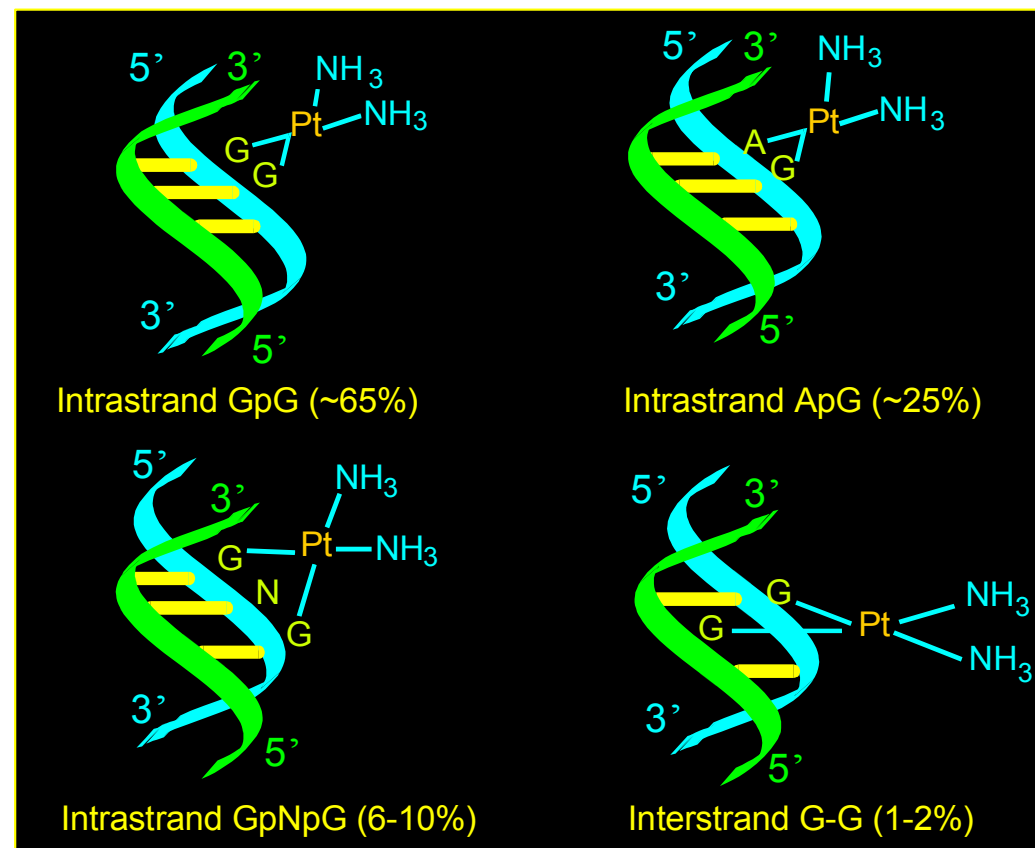
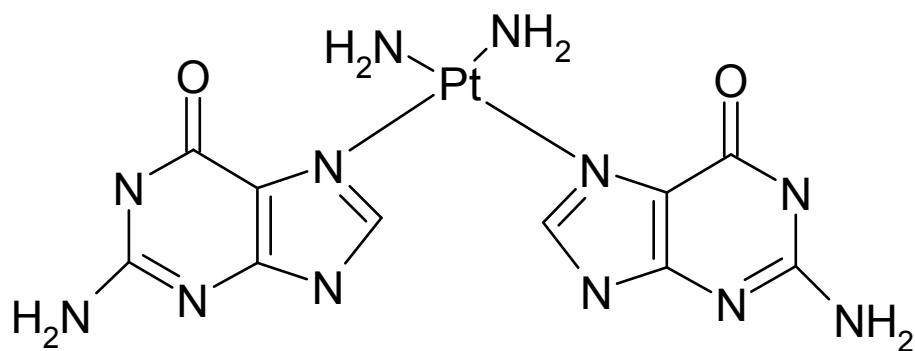
Adukty DNA s elektrochemicky aktivními látkami

- poškození DNA vs. značení DNA (vnášení elektroaktivních markerů do molekul DNA)
- **adukty nukleových kyselin s přechodnými kovy**
 - redox přechody kovových iontů
 - katalytické vylučování vodíku na rtuťových a amalgamových elektrodách

cisplatina



- ✓ protinádorové léčivo
- ✓ účinek je připisován tvorbě kovalentních aduktů s DNA
- ✓ zejména bifunkční adukty - „kroslinky“ mezi dvěma G nebo mezi G a A

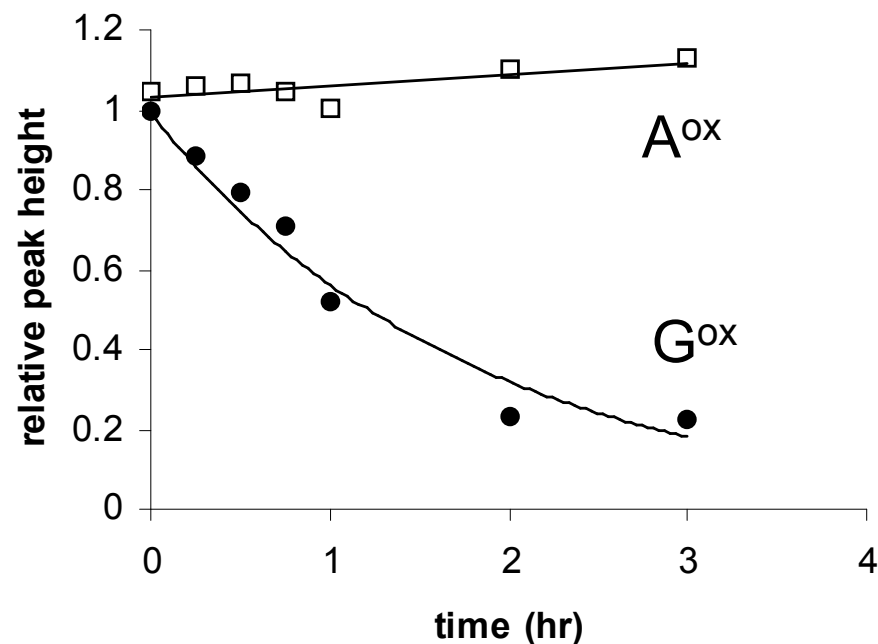
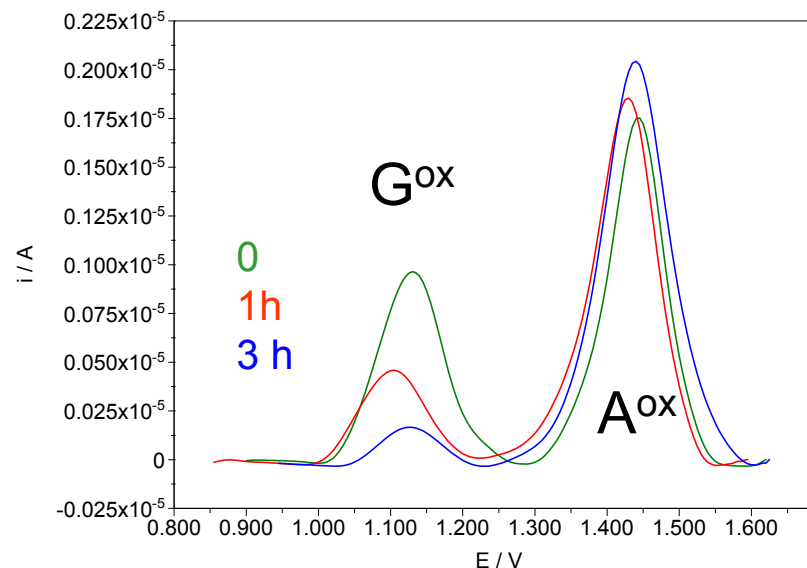


cisplatina

při vysokém stupni
modifikace lze pozorovat
**úbytek oxidačního signálu
guaninu** na uhlíkové
elektrodě

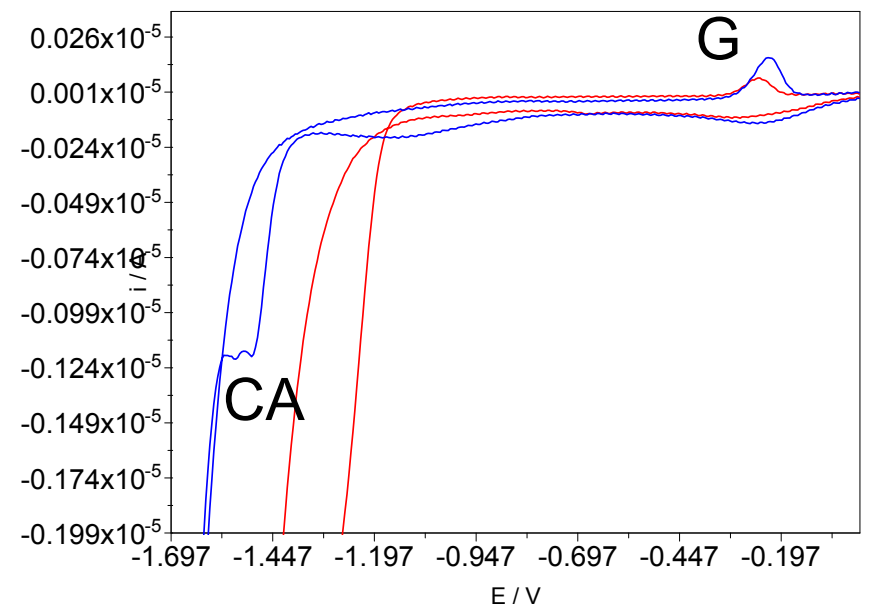
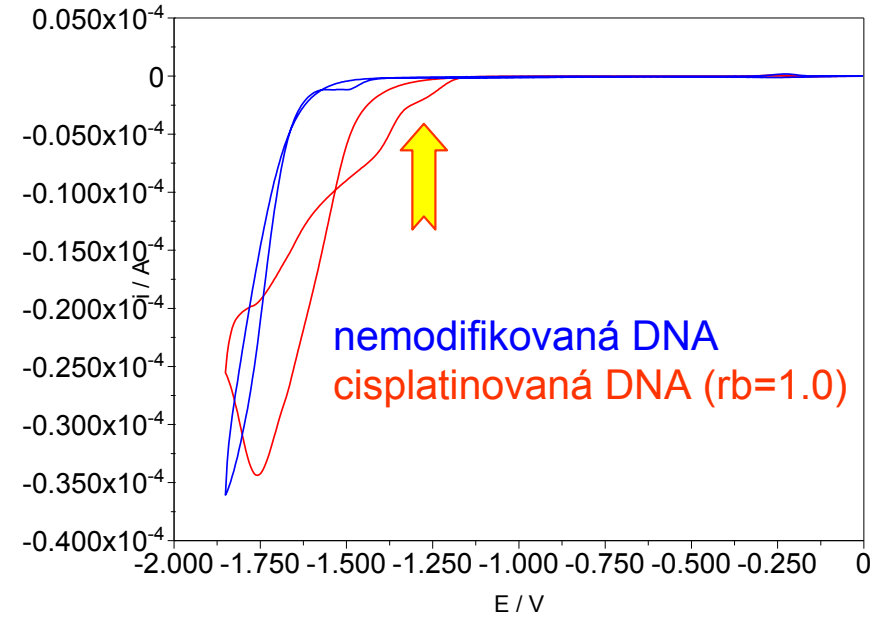
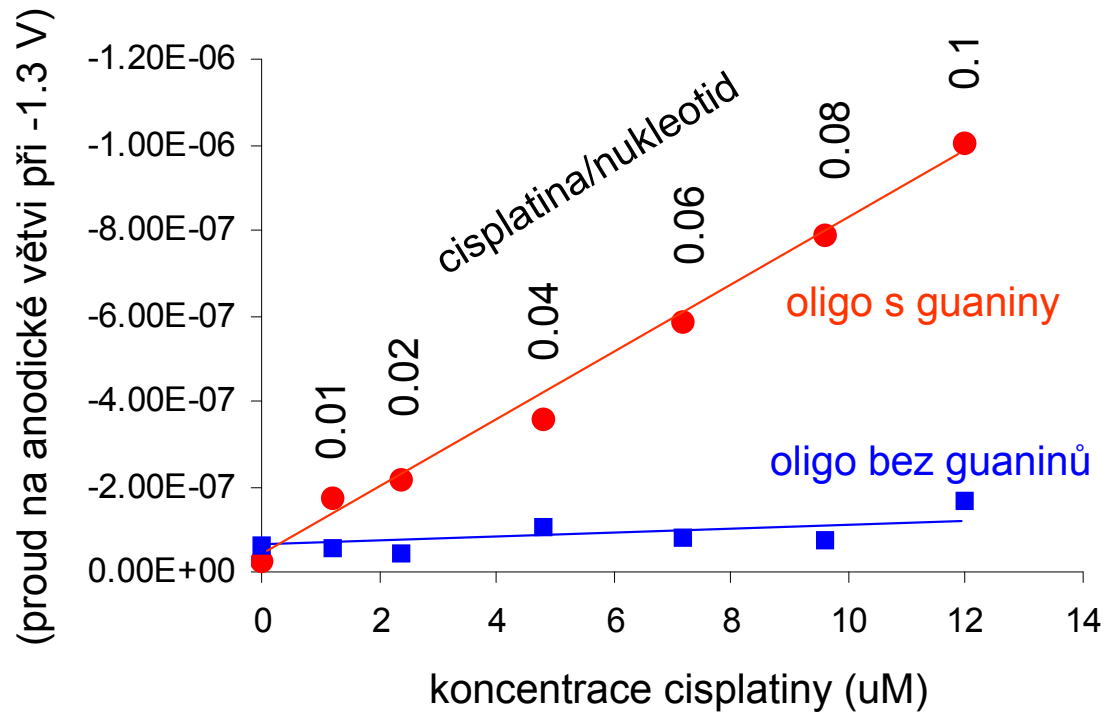
(30 μM cisplatina, poměr
cisplatina/nukleotid $r_b=1.0$,
časová závislost)

pro r_b menší než 0.1 nejsou
změny ve výšce píku
 G^{ox} významné



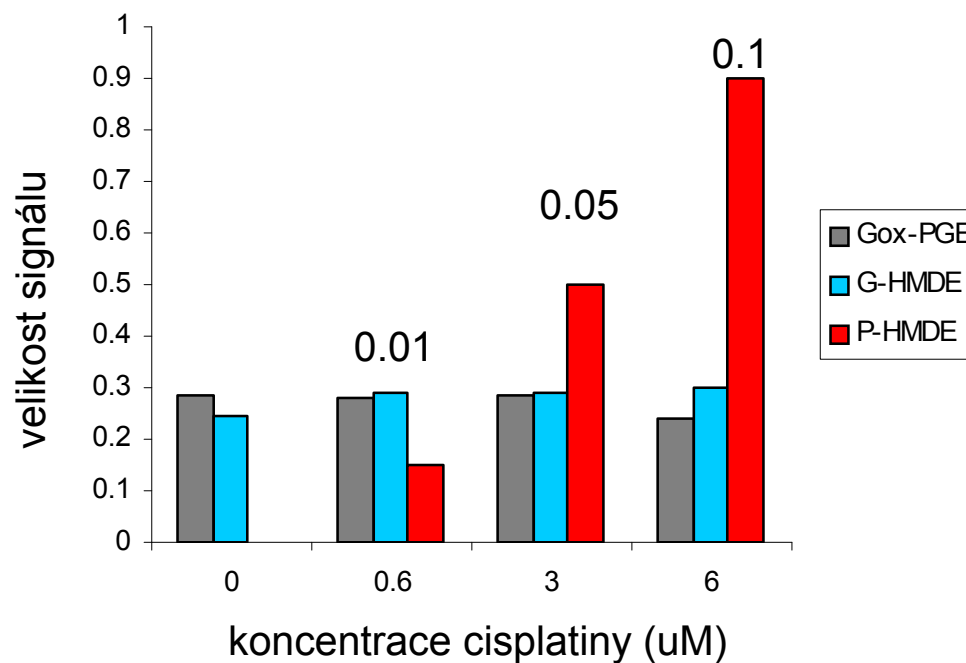
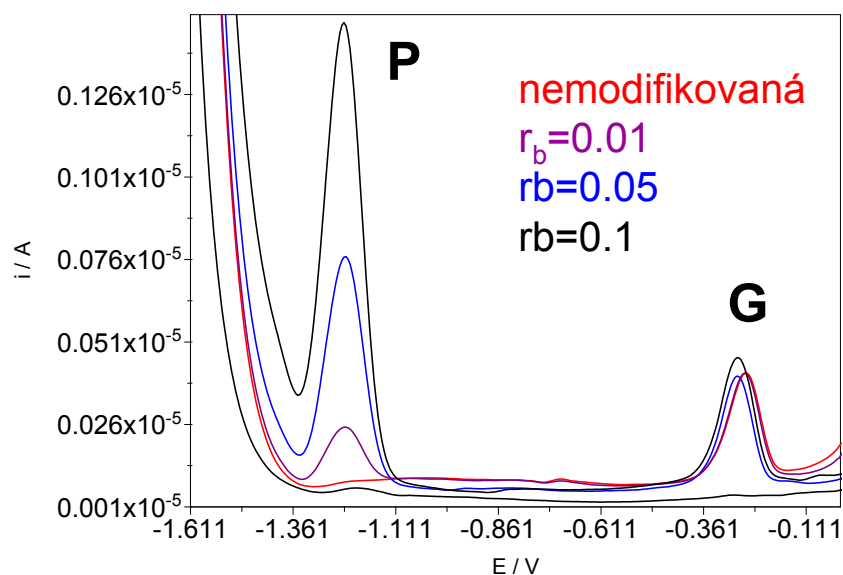
cisplatina

na rtuťové elektrodě
katalyzuje DNA modifikovaná
cisplatinou (produkty její
redukce) vyvíjení vodíku



cisplatina

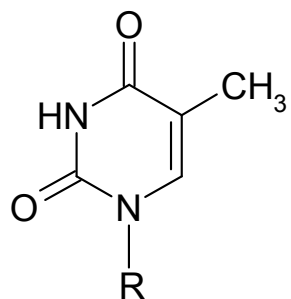
square-wave voltametrie: srovnání změn signálu se stupněm platinace DNA



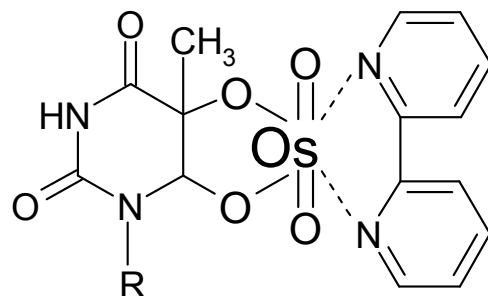
měřit nově vznikající signál je vždy lepší, než sledovat změnu intenzity zanikajícího signálu (pokud to systém umožňuje)

Komplexy OsO_4 jako elektroaktivní markery DNA

Modifikace DNA komplexy oxidu osmičelého

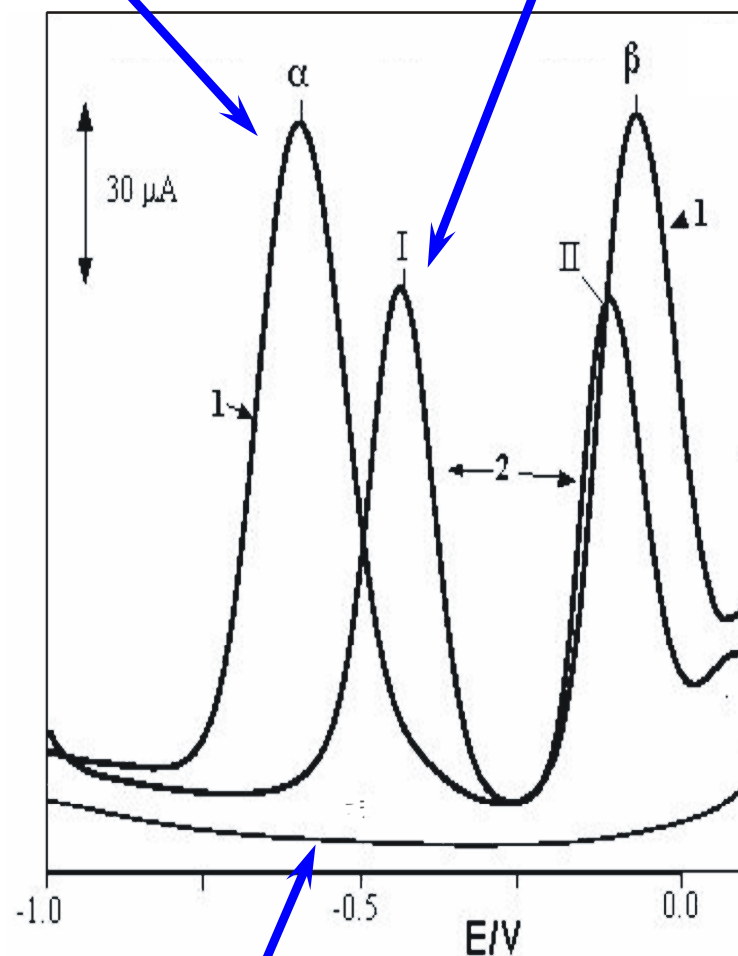


Os, bipy



DNA-Os,bipy

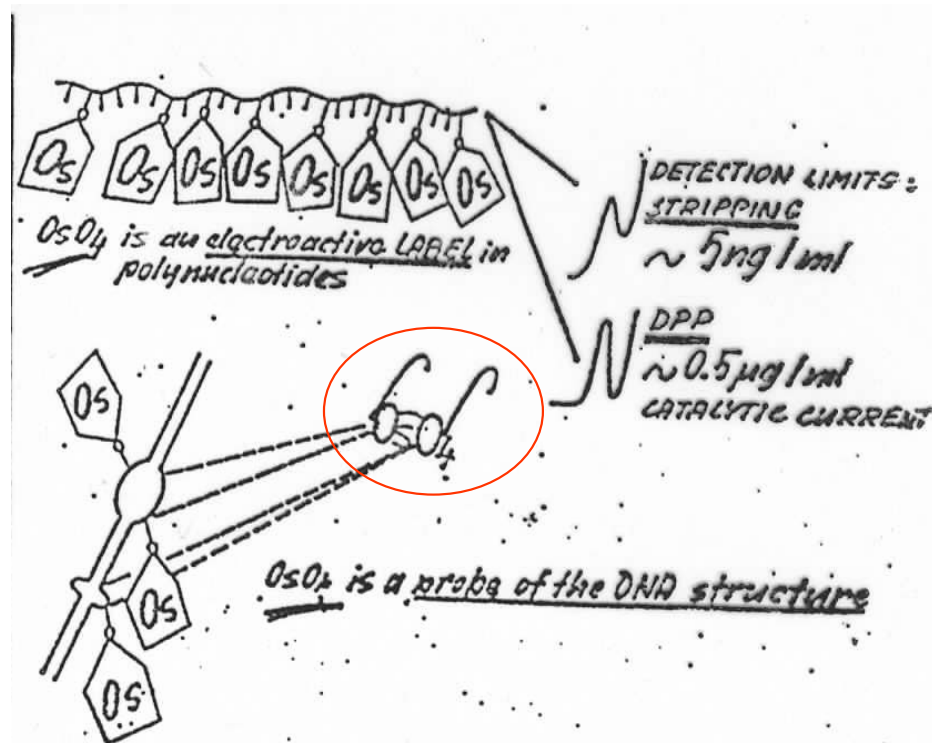
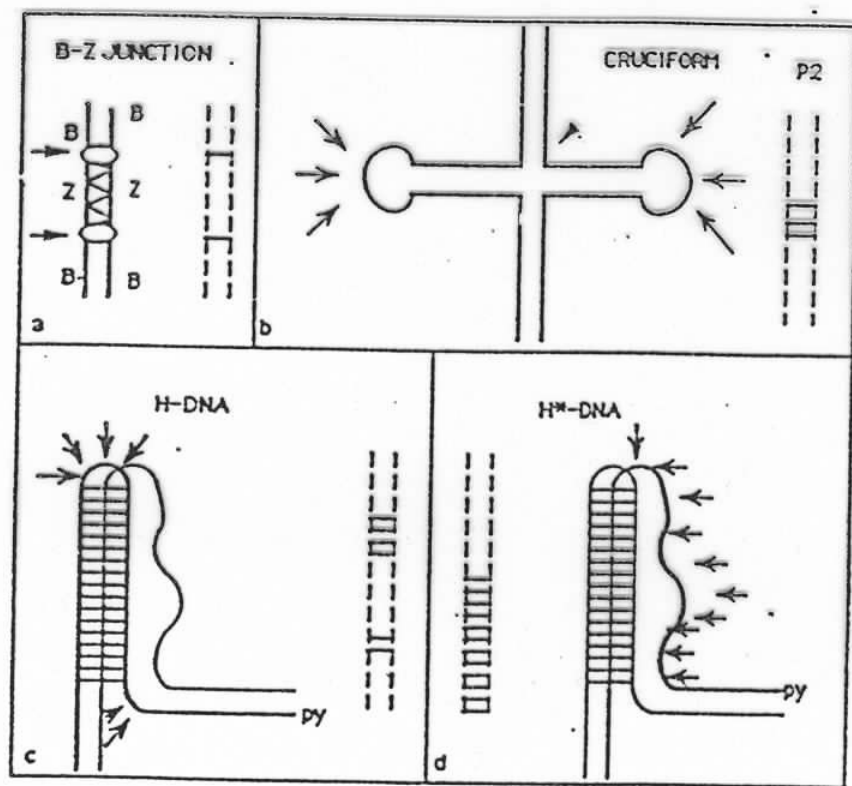
volný Os,bipy



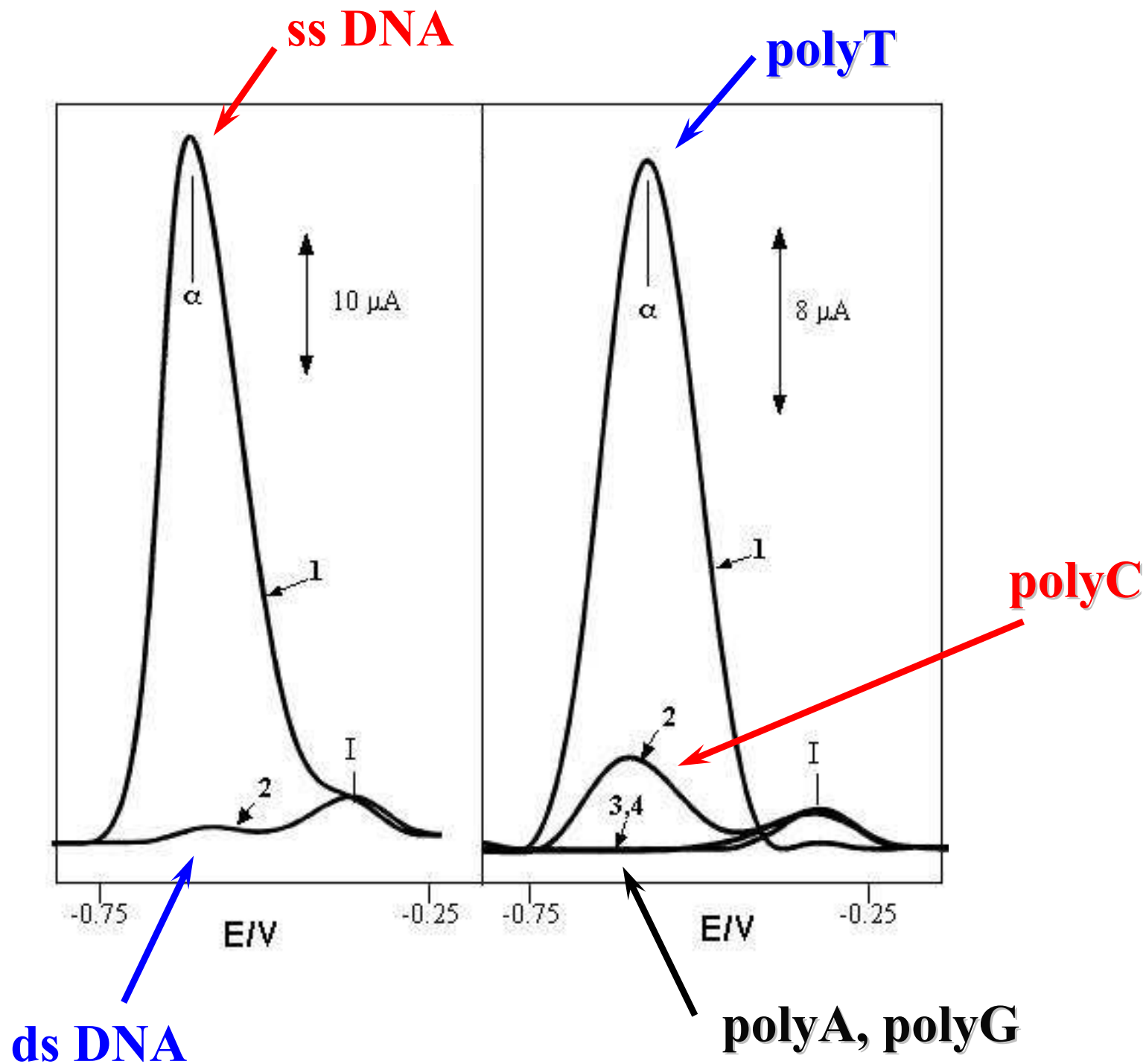
nemodifikovaná DNA

Os,L: chemické strukturní sondy

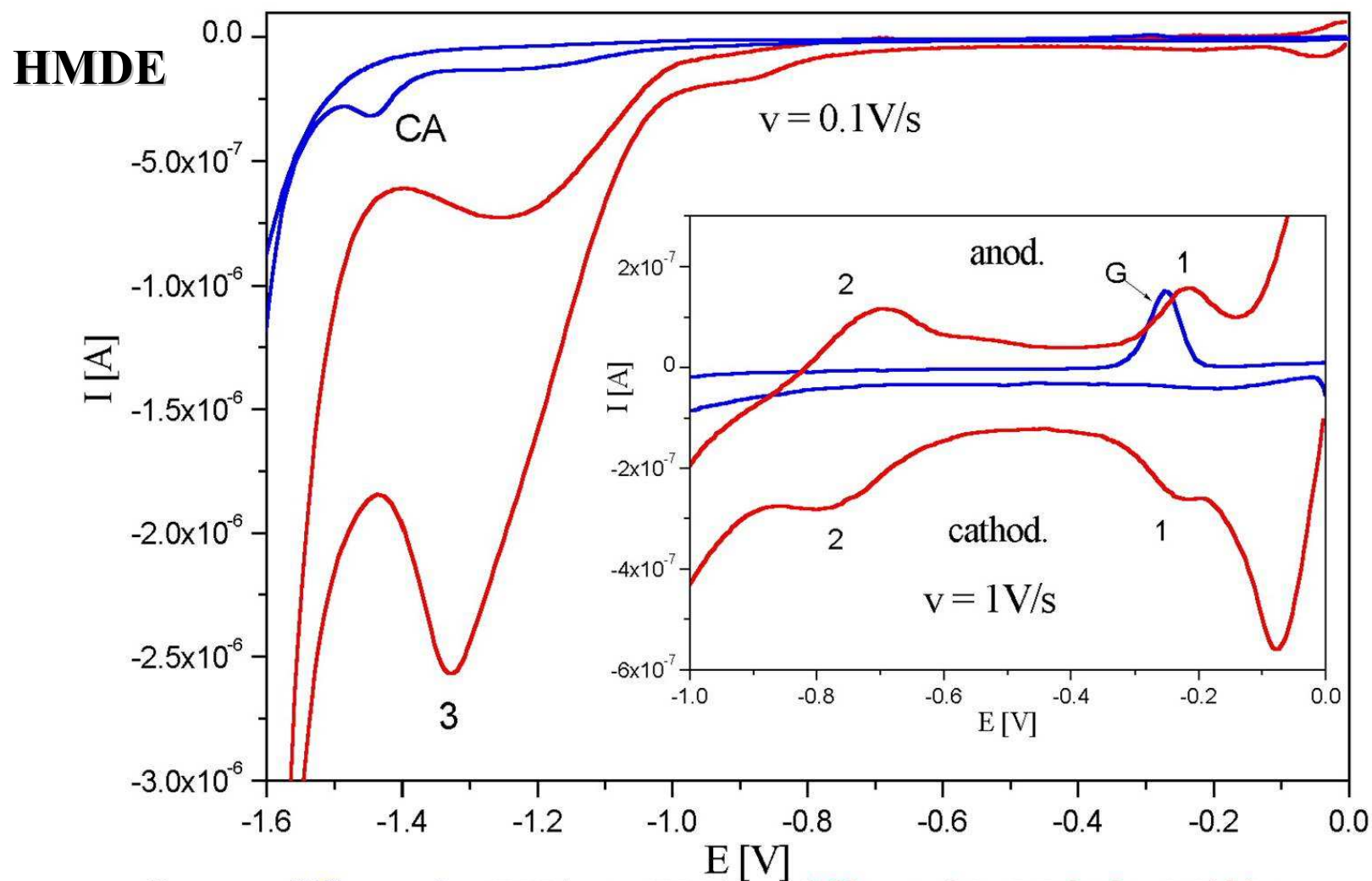
- DNA může obsahovat distortované nebo jednořetězcové (lokálně „denaturované) oblasti
- např. v negativně nadšroubovicové DNA: tvorba tzv. otevřených lokálních struktur
- báze v těchto oblastech mohou vstupovat do reakcí s vhodnými činidly



PGE



Adukty DNA s Os,L jsou elektrochemicky aktivní



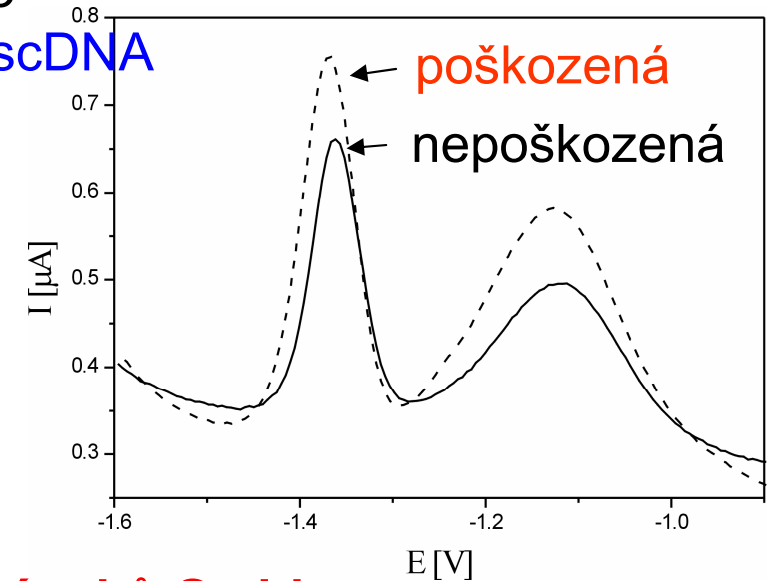
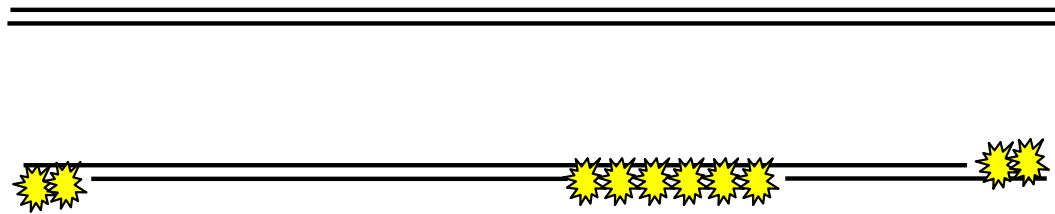
Cv nemodifikované ss DNA a ss DNA modifikované 2mM OsO_4 , 2,2'-bipy

(24h, 26°C), základní elektrolyt: 0.3M mravenčan amonný a 0.05 M fosfát (pH=6.98),

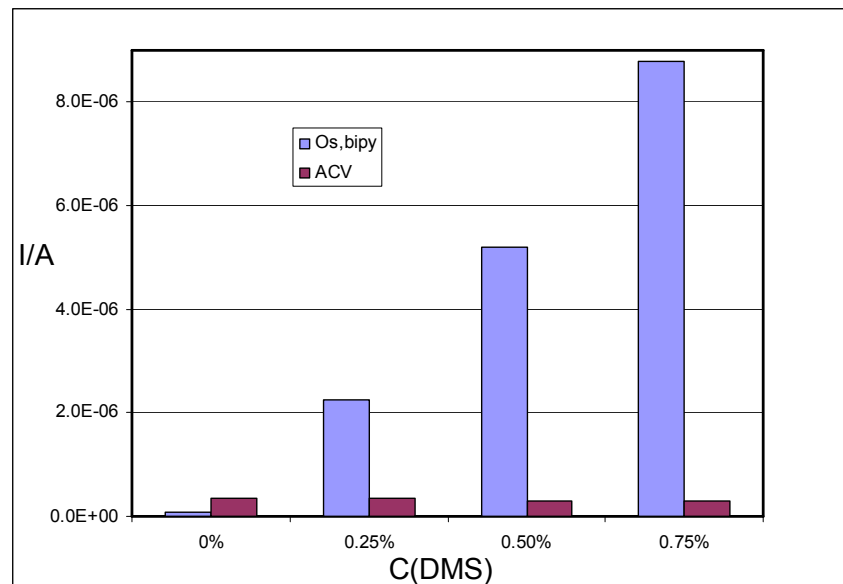
$C = 10 \mu\text{g/mL}$, $t_a = 1 \text{ min.}$

Využití komplexů OsO4 pro detekci poškození DNA

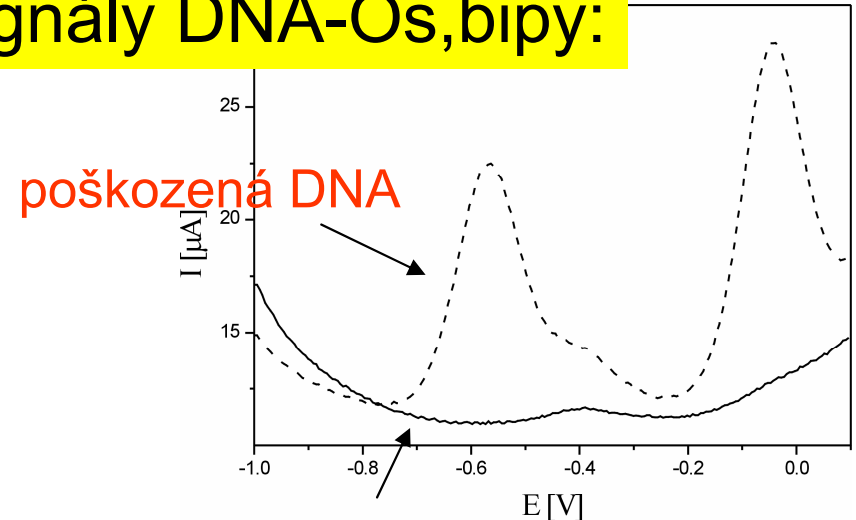
Lineární chromosomální DNA (snáze dostupná než scDNA):
sama o sobě poskytuje výrazný AC voltametrický pík 3 –
mnohem nižší citlivost detekce zlomů/ss úseků než s scDNA



jiný způsob detekce: **selektivní modifikace ss úseků Os,bipy**



Signály DNA-Os,bipy:



nepoškozená DNA

Obstojí elektrochemická detekce poškození DNA ve srovnání s jinými metodami?

srovnání citlivostí:

- *hmotová spektroskopie*: 20-50 femtomolů TT dimeru/1 poškození na 10^5 bazí (I.D. Podmore, et al. *Photochem Photobiol* **1996**, 64, 310-5).
- *ELISA*: okolo 1 fmol TT dimeru (M.S. Cooke, I.D. et al, *Journal of Immunological Methods* **2003**, 280, 125-133)
- *HPLC*: po hydrolýze DNA – obvykle uváděná citlivost 1 poškozená base mezi 10^7 nepoškozených
- *32P postlabeling*: jednotky femtomolů aduktu
- *stanovení ssb (nebo poškozených bazí po jejich enzymatickém převedení na ssb) elektrochemicky na rtuťové elektrodě: 1 zlom na 2×10^5 nukleotidů; vzhledem k použitému množství DNA (50 ng 3 kb plasmidu) jde o méně než 1 fmol produktu poškození*

Obstojí elektrochemická detekce poškození DNA ve srovnání s jinými metodami?

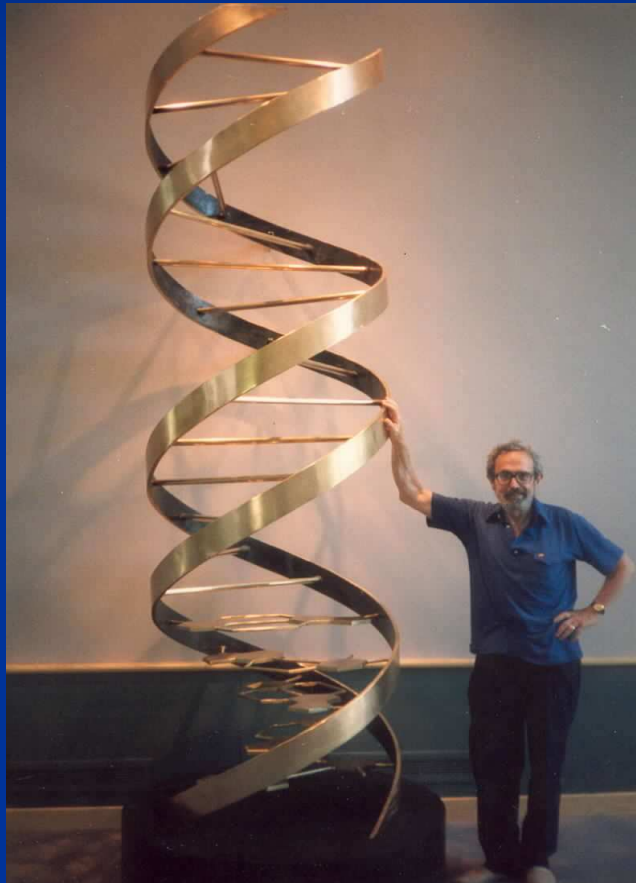
další výhody:

- *rychlost analýzy*
- *relativně nenákladné zařízení*
- *snadno kvantifikovatelná data*

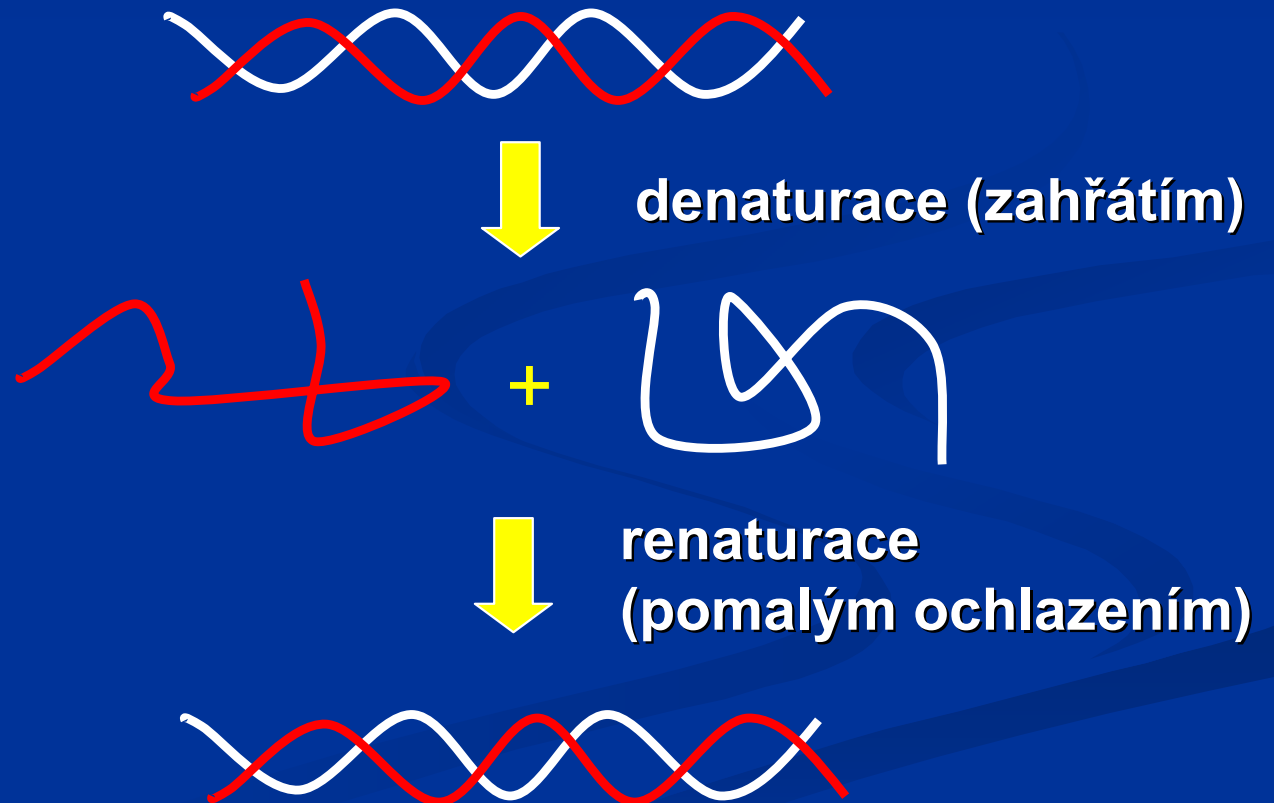
Hybridizace DNA

Trocha historie...

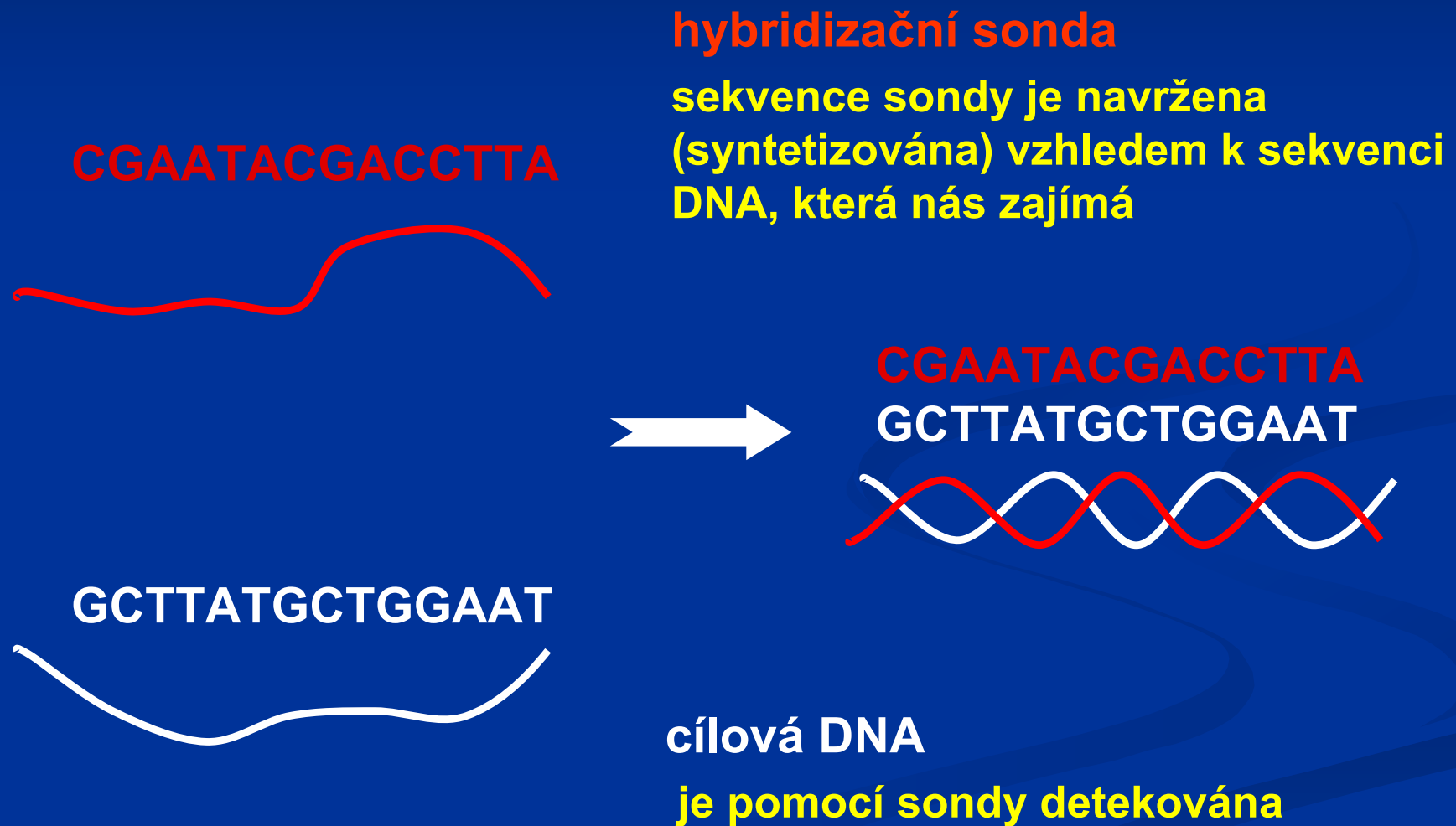
Hybridizace DNA



1963 Julius Marmur: renaturace DNA



Hybridizace DNA (RNA) je založena na principu tvorby dvoušroubovice ze dvou komplementárních řetězců



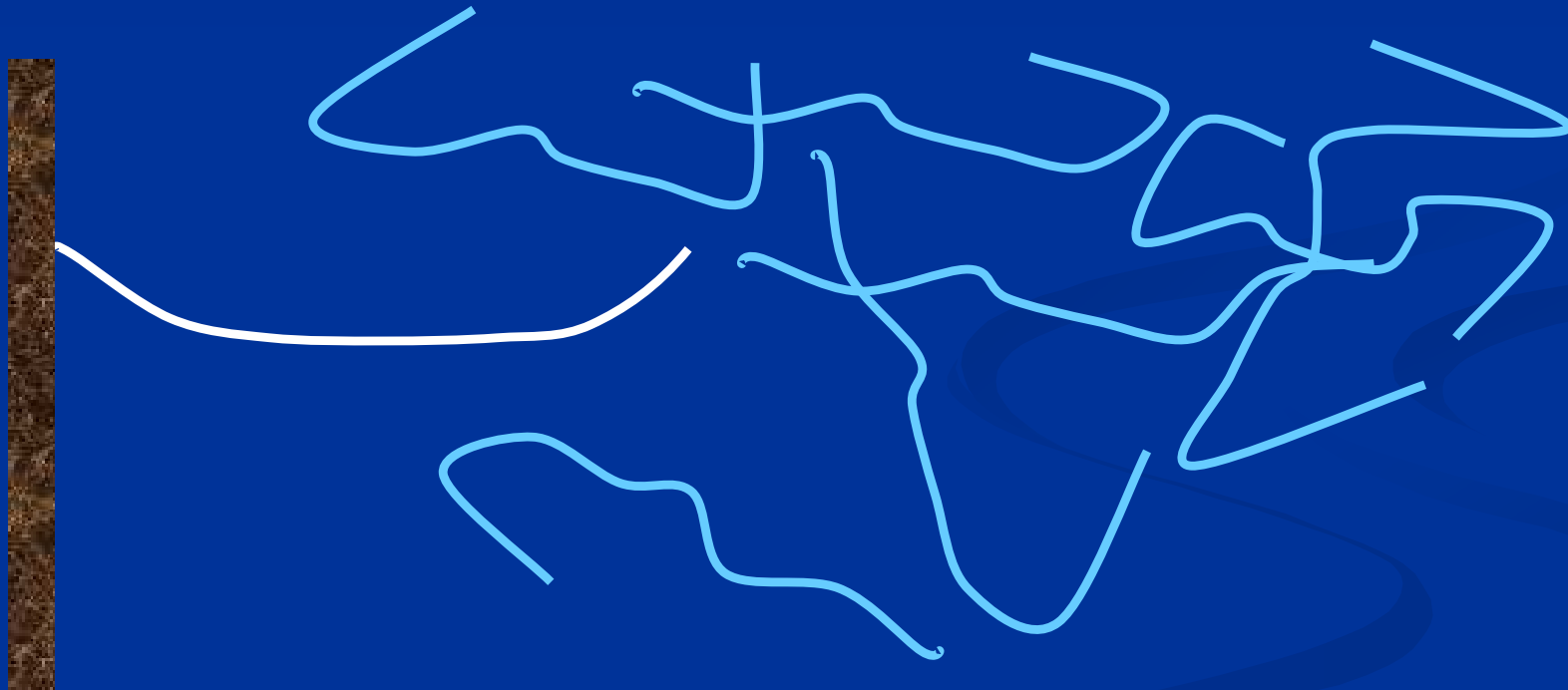
Hybridizace DNA (RNA) je založena na principu tvorby dvoušroubovice ze dvou komplementárních řetězců

Tento princip je v různém uspořádání využíván při řadě rutinních analýz:

- detekce a identifikace určitých nukleotidových sekvencí
- detekce mutací, „polymorfismů“ v určitých úsecích genomu
- sledování exprese genů

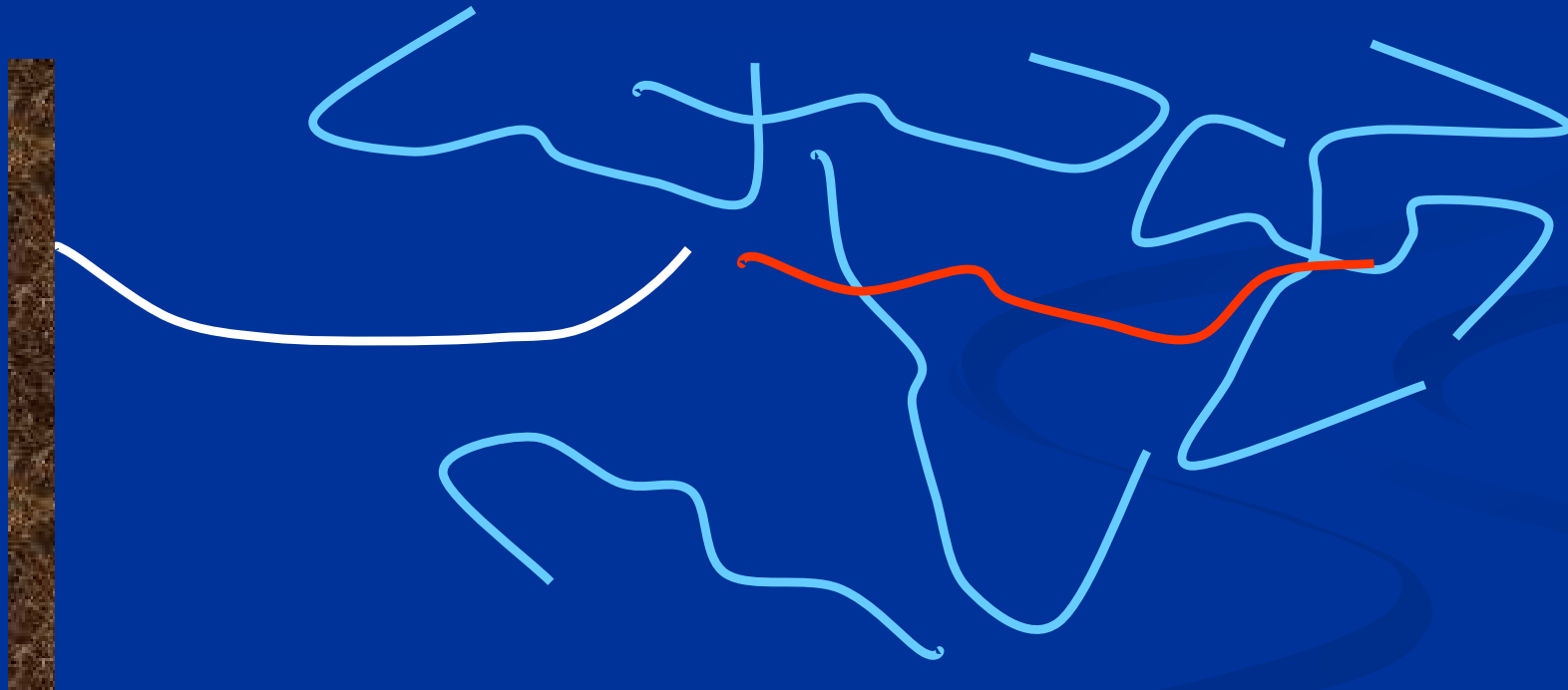
Z praktických důvodů je výhodné zakotvit jeden z řetězců („sondu“) na povrchu

imobilizovaná sonda je vystavena analyzovanému vzorku DNA (RNA)



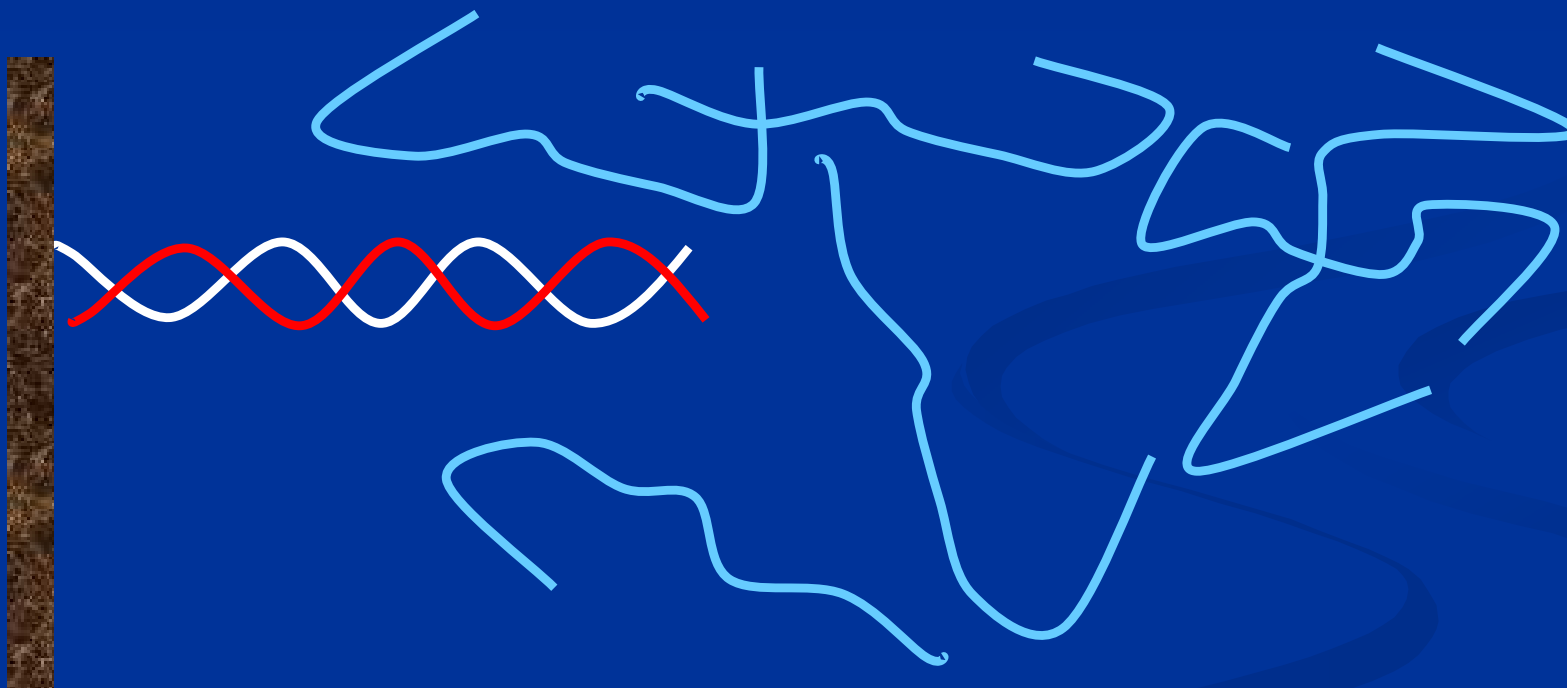
pokud vzorek obsahuje vlákno DNA (RNA) o sekvenci komplementární k sondě („cílovou sekvenci“), vytvoří se na povrchu dvoušroubovice („duplex“, „hybrid“)

Z praktických důvodů je výhodné zakotvit jeden z řetězců („sondu“) na povrchu



pokud vzorek obsahuje vlákno DNA (RNA) o sekvenci komplementární k sondě („cílovou sekvenci“), vytvoří se na povrchu dvoušroubovice („duplex“, „hybrid“)

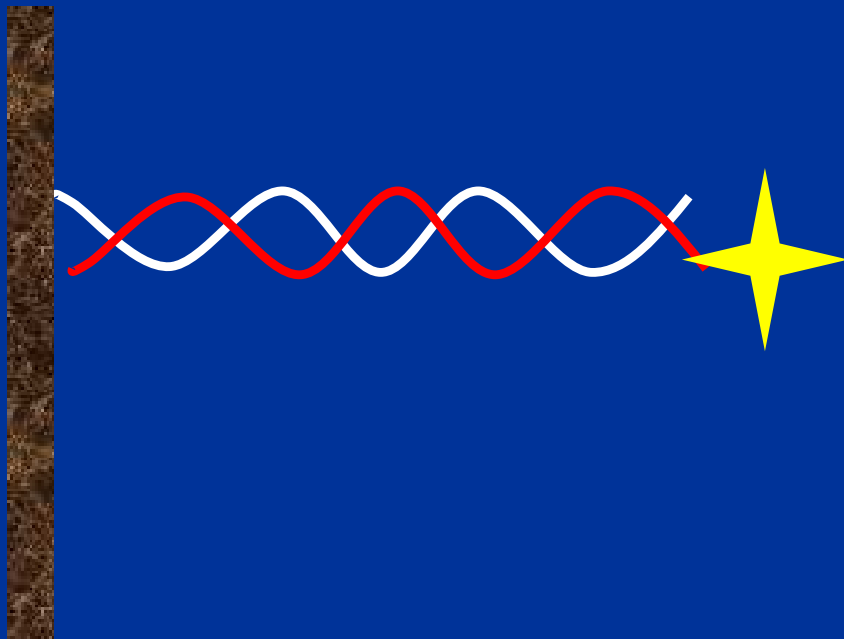
nespecifické molekuly DNA jsou poté odstraněny (odmyty)



pokud vzorek obsahuje vlákno o sekvenci komplementární k sondě („cílovou sekvenci“), vytvoří se na povrchu dvoušroubovice („duplex“, „hybrid“)

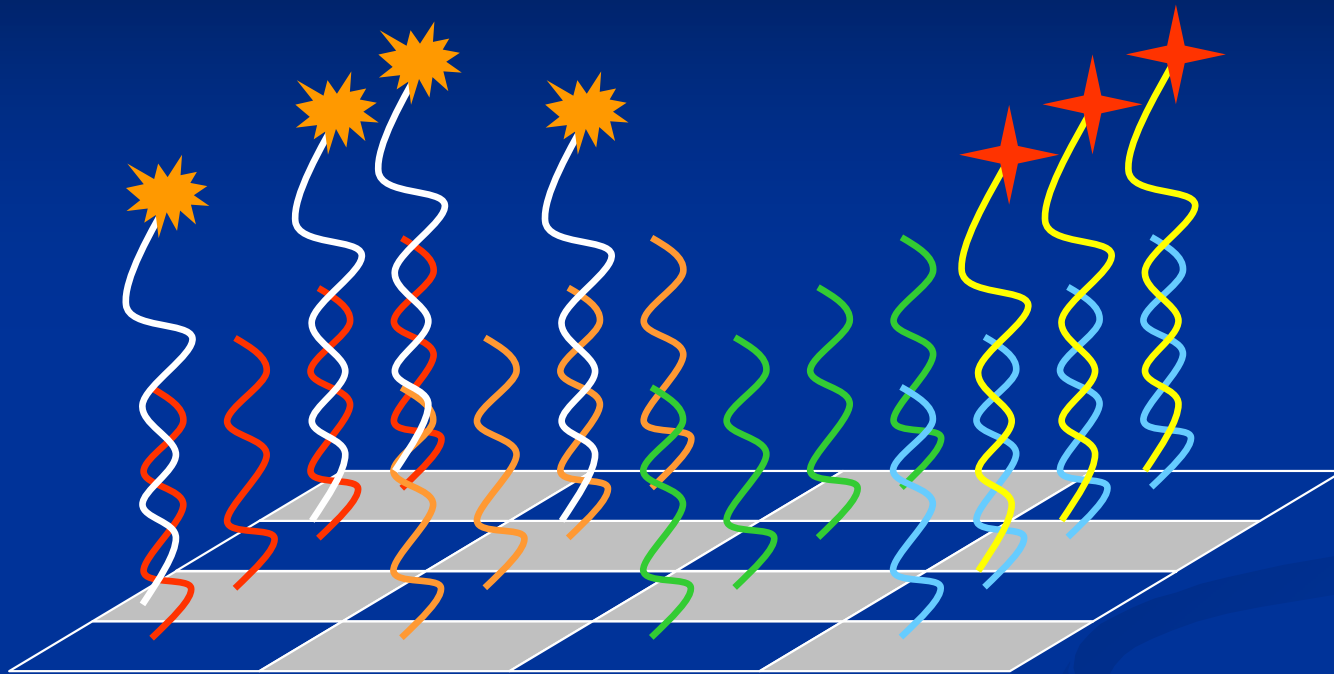
nespecifické molekuly DNA jsou poté odstraněny (odmyty)

následuje detekční krok, při kterém je zjištěno, zda došlo k hybridizaci



výhodné je cílovou DNA označit dobře detekovatelnou značkou (radionuklidem, fluoroforem...)

DNA „čipy“ („arrays“):

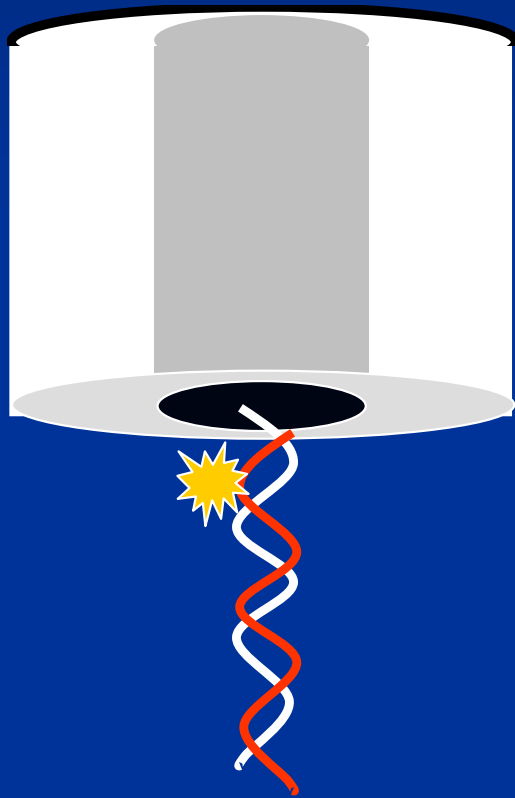


- aplikace mnoha sond současně
- aplikace různých (různě“barevných“) fluorescenčních značek – vysoce paralelní analýza
- komerčně dostupné přístroje (Affymetrix...)

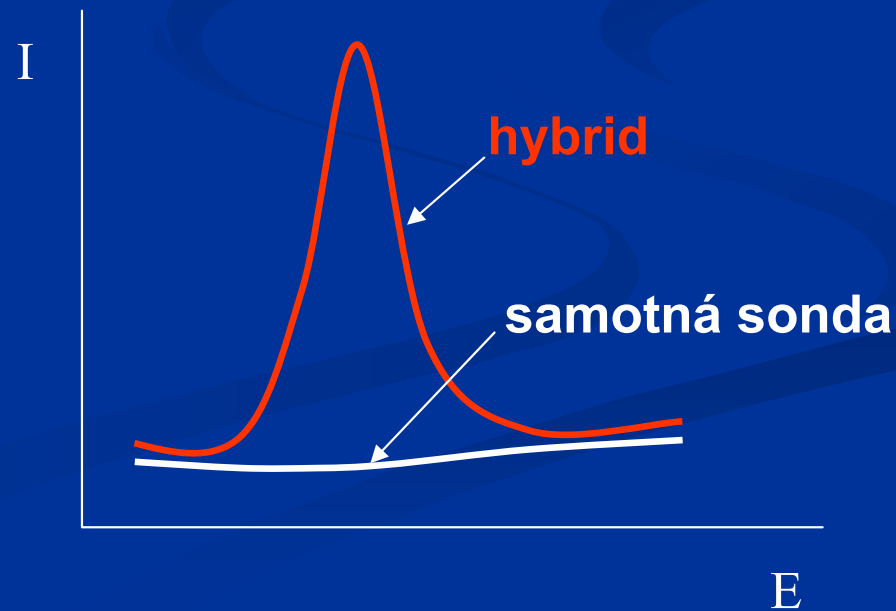
Proč vývoj elektrochemických biosenzorů?

- rozvoj genomiky v souvislosti s dokončením sekvencování lidského genomu
- sekvence lidského genomu tak, jak je stanovena, je **průměrná**
- analýza **individuálních odchylek** (polymorfismy, mutace) je důležitá (mj. pro diagnostiku dědičných chorob, sledování mutací v důležitých genech, výběr vhodné terapie...)
- klasické metody sekvenování DNA jsou zdlouhavé a obtížné
- analýza pomocí hybridizace DNA je výrazně efektivnější
- komerčně dostupné fluorescenční analyzátory (ve spojení s DNA čipy) jsou nákladné a tudíž vhodné spíše pro specializovaná pracoviště
- potřeba nových, účinných, široce dostupných detekčních metod
- v současné době se zdá, že k tomuto cíli by mohla vést cesta přes využití elektrochemických metod

Elektrochemický senzor pro hybridizaci DNA: elektroda se zakotvenou hybridizační sondou na povrchu

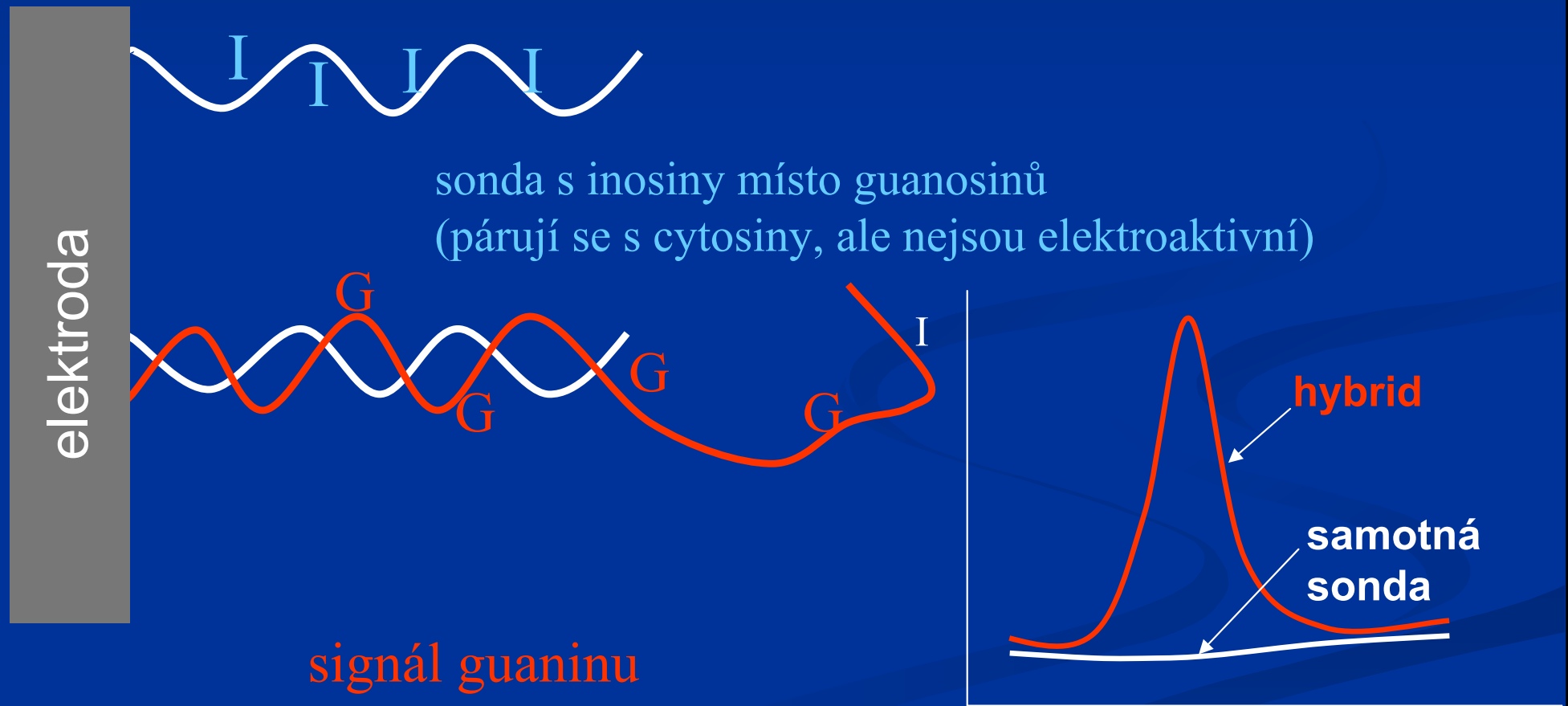


- hybridizace s cílovou DNA se provede stejně jako v případě optických senzorů
- odezvou na hybridizační událost je **elektrochemický (proudový) signál**



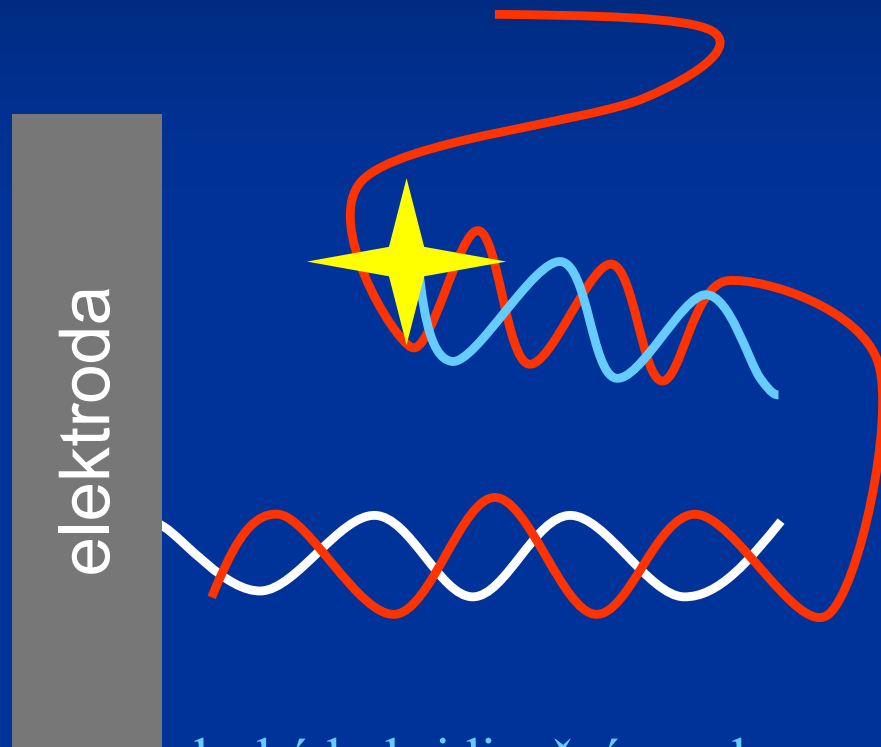
Příklady elektrochemických senzorů pro hybridizaci DNA

využití vlastní elektroaktivity cílové DNA (např. oxidačního signálu guaninu)



Příklady elektrochemických senzorů pro hybridizaci DNA

signální (reporterové) sondy



druhá hybridizační sonda, modifikovaná elektroaktivní značkou, rozpoznávající sekvenci v cílové DNA poblíž sondy zakotvené na elektrodě

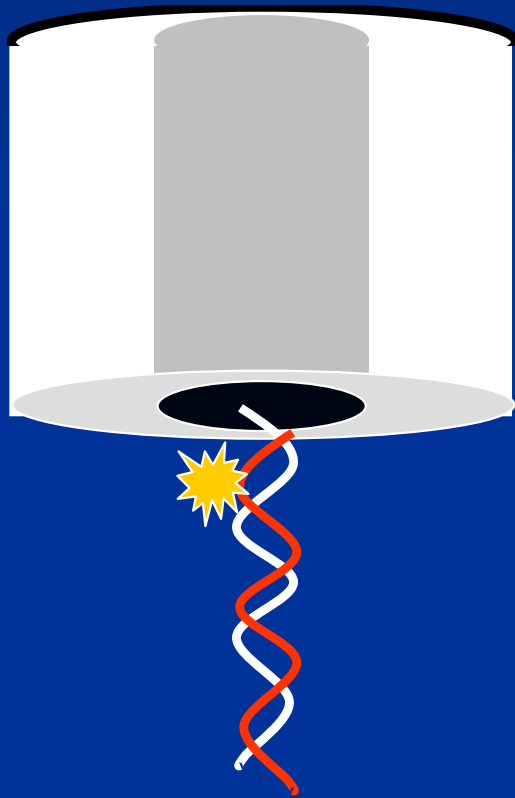
Příklady elektrochemických senzorů pro hybridizaci DNA

princip „molekulárního majáku“



po hybridizaci se značka oddálí od povrchu a signál zmizí

Elektrochemický senzor pro hybridizaci DNA: elektroda se zakotvenou hybridizační sondou na povrchu

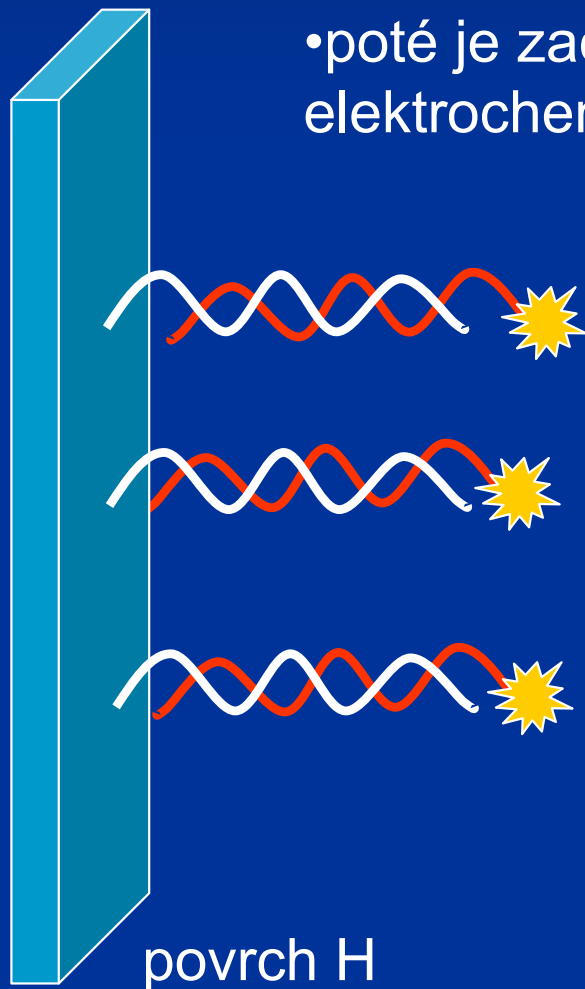


tzv. **jednopovrchová metoda** (hybridizační i detekční krok probíhá na stejném povrchu elektrody)

to vyžaduje hledat takové podmínky, za kterých je pracovní povrch vhodný jak pro hybridizaci DNA, tak pro elektrochemické měření

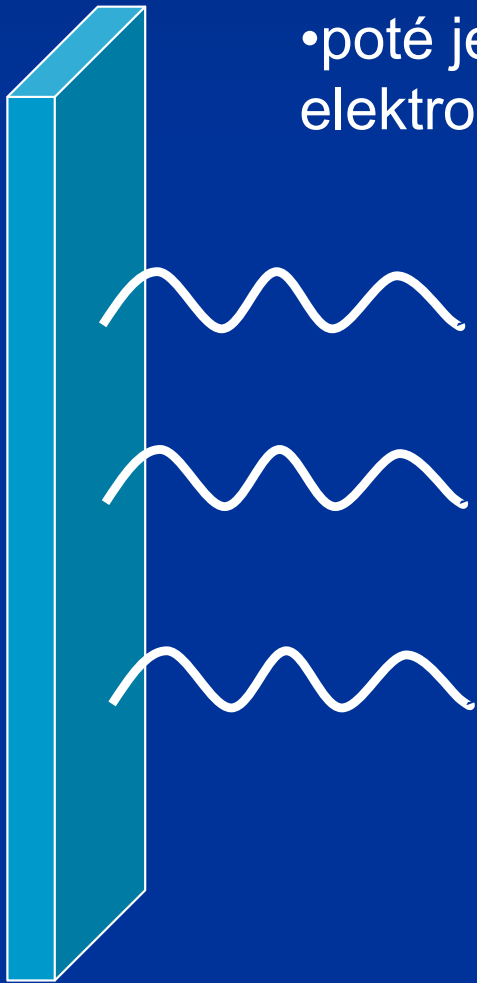
Dvoupovrchová strategie:

- hybridizace se provede na jednom povrchu (H), který pro tento účel optimalizován; nemusí mít vlastnosti elektrody
- účinné zachycení a separace cílové DNA
- poté je zachycená cílová DNA z povrchu H uvolněna a elektrochemicky stanovena

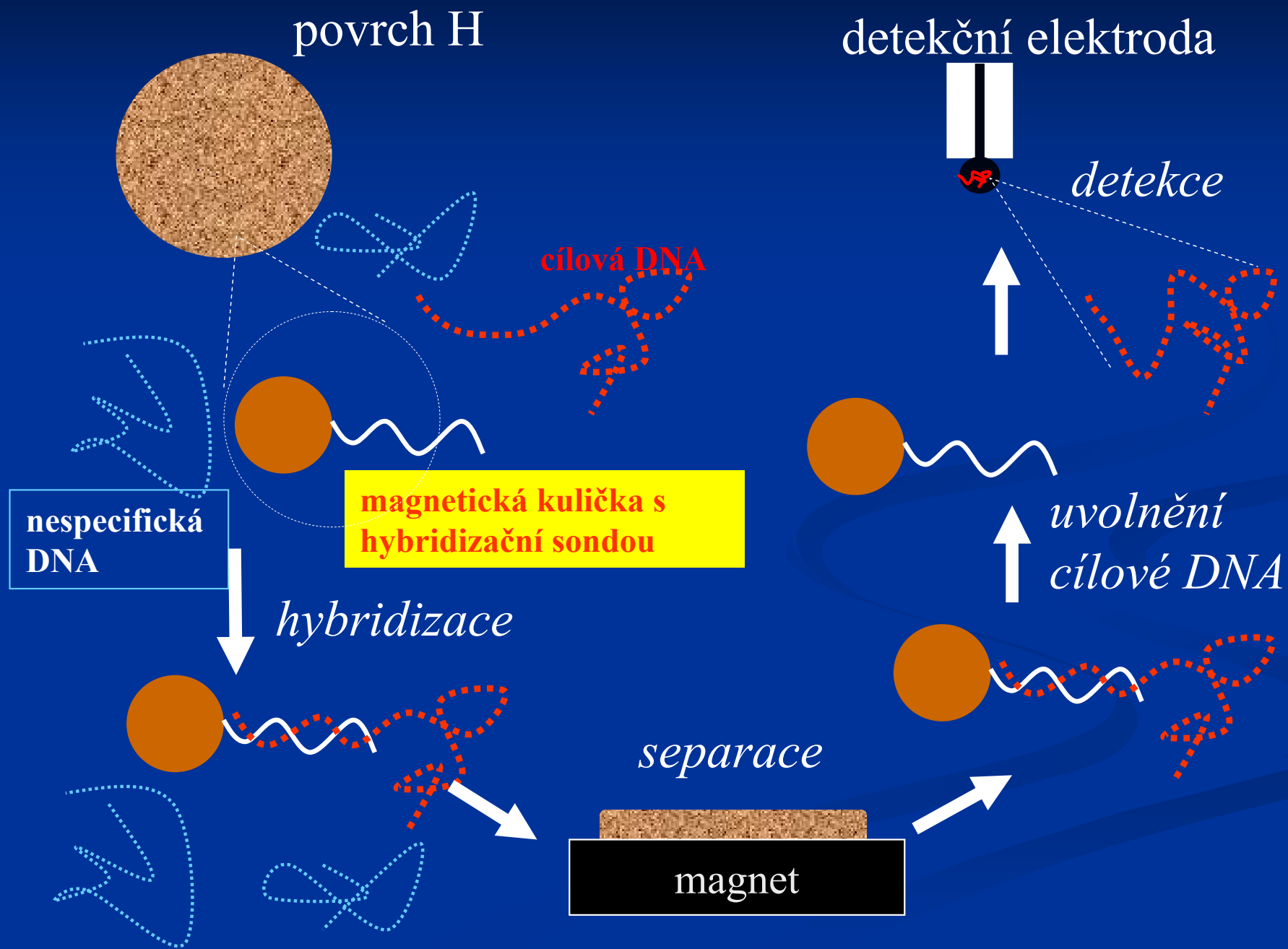


Dvoupovrchová strategie:

- hybridizace se provede na jednom povrchu (H), který pro tento účel optimalizován; nemusí mít vlastnosti elektrody
- účinné zachycení a separace cílové DNA
- poté je zachycená cílová DNA z povrchu H uvolněna a elektrochemicky stanovena



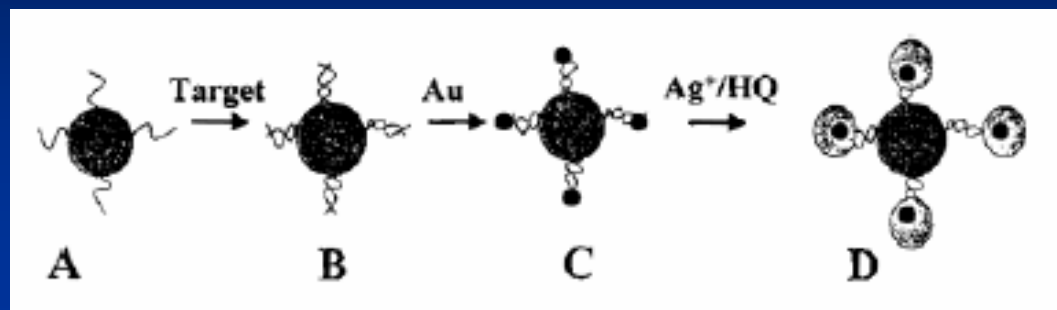
Dvoupovrchová strategie: využití magnetických nosičů



Dvoupovrchová strategie:

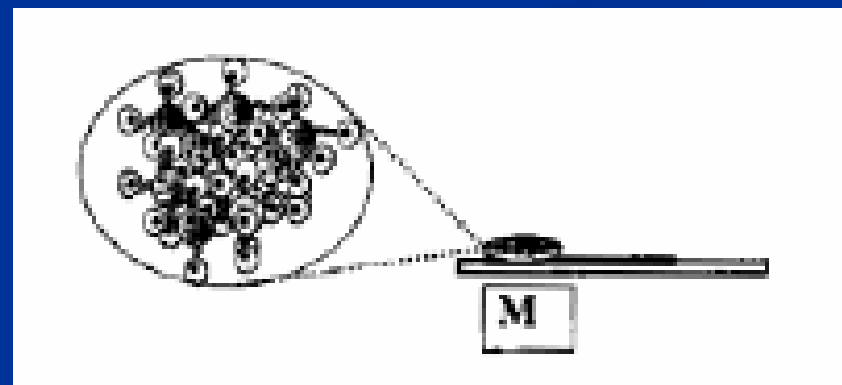
- metody založené na vlastní elektrochemické aktivitě DNA nebo jejích složek („label-free“)
- metody založené na značení cílových DNA nebo signálních sond:
 - komplexy oxidu osmičelého
 - enzymy
 - kovové a metalsulfidové nanočástice
 - mikročástice „plněné“ elektrochemicky aktivními látkami
 - uhlíkové nanotrubičky značené enzymy

nanočástice jako značky pro DNA (J. Wang):



- A. magnetické částice s DNA sondou
- B. biotinylovaná cílová DNA
- C. zlaté nanočástice se streptavidinem
- D. vyloučení stříbra na zlatě

Částice „pospojované“ hybridizovanou DNA jsou magnetem přitaženy k elektrodě a stříbro je stanoveno elektrochemicky



J. Wang et al. J. AM. CHEM. SOC. 2002, 124, 4208-4209

„elektroaktivní kuličky“ (J. Wang):

990 *Langmuir*, Vol. 19, No. 4, 2003

Letters

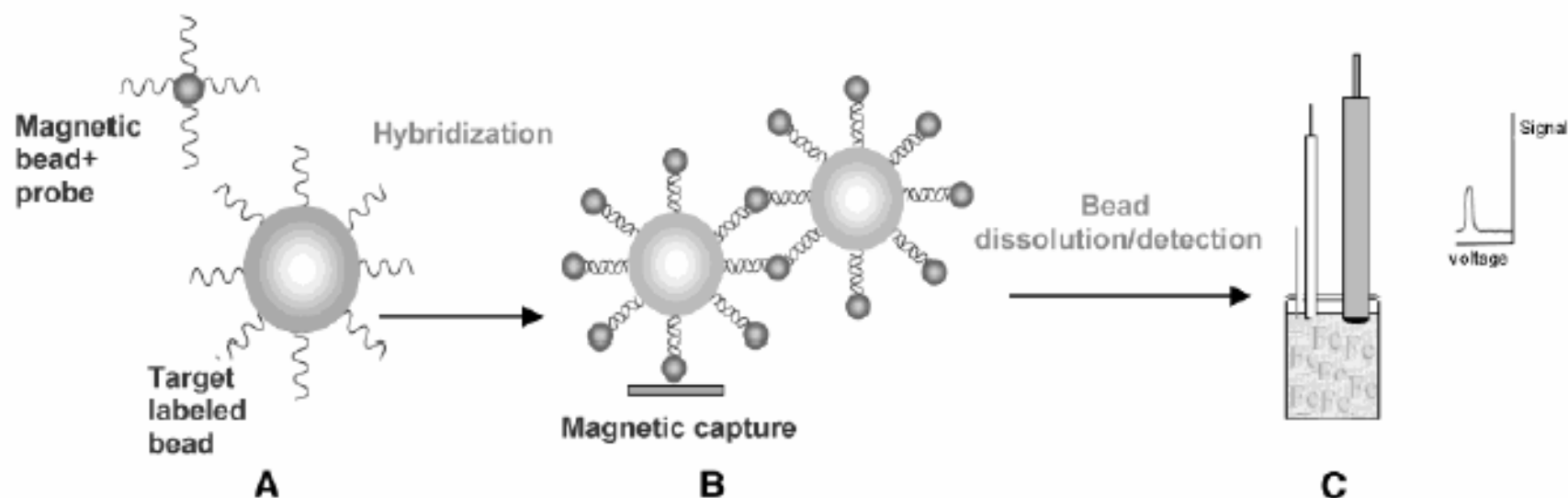


Figure 1. Steps involved in the new genoelectronic protocol: (A) Introduction of probe-coated magnetic beads and target-labeled electroactive beads. (B) Hybridization and magnetic separation. (C) Dissolution of the spheres in acetonitrile, release of the marker, and its chronopotentiometric detection at a glassy carbon electrode. Fc represents the ferrocene marker.

...citlivost 5.1×10^{-21} mol level (31 000 molekul)...

Electrochemical Coding Technology for Simultaneous Detection of Multiple DNA Targets

Joseph Wang,* Guodong Liu, and Arben Merkoçi

Department of Chemistry and Biochemistry, New Mexico State University, Las Cruces, New Mexico 88003-8001

Received December 10, 2002; E-mail: joewang@nmsu.edu

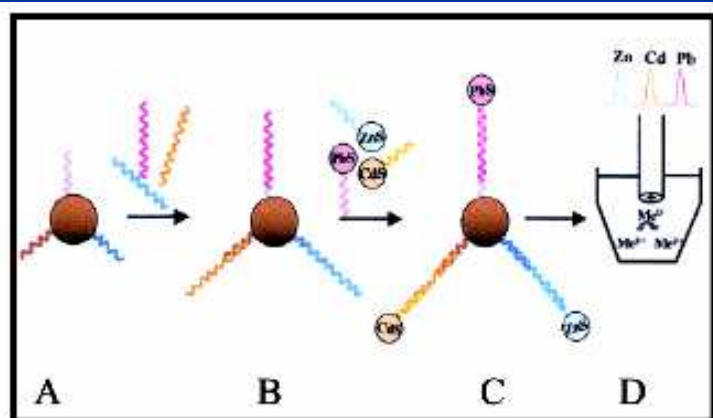
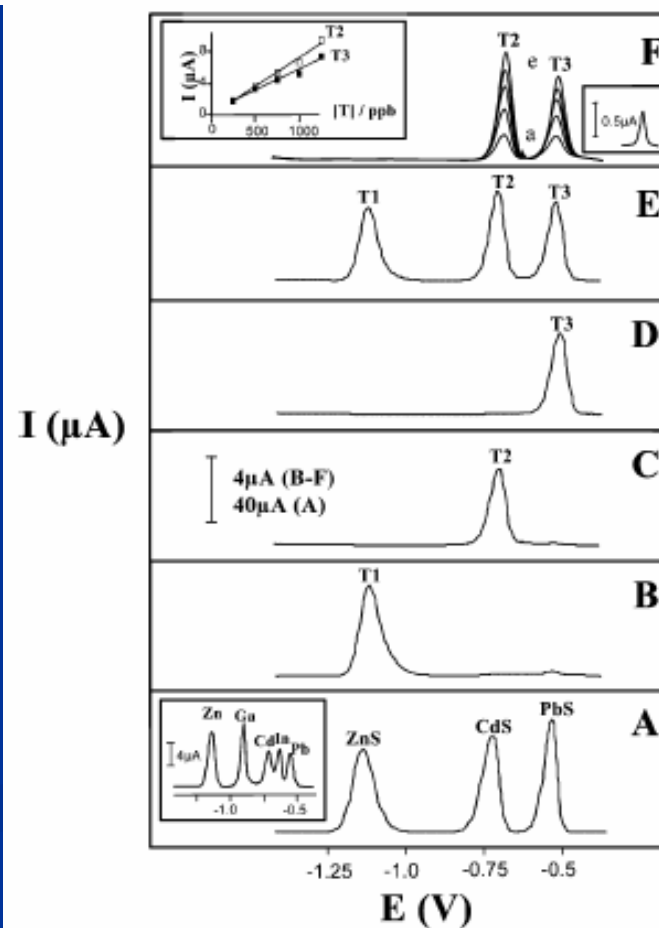
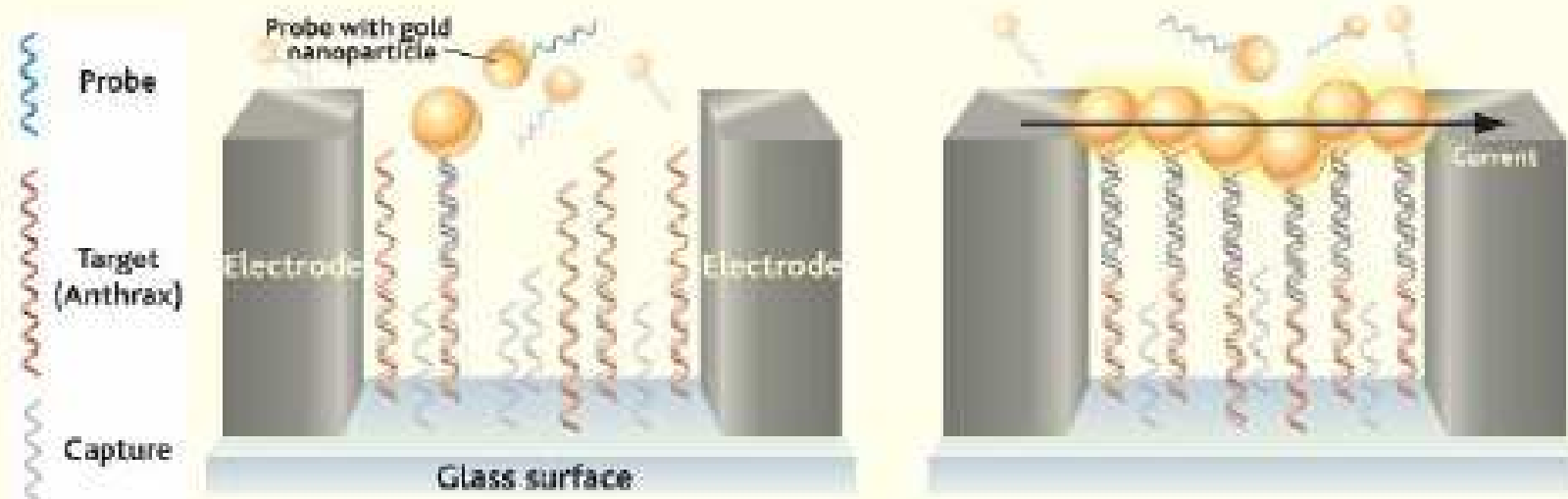


Figure 1. Multi-target electrical DNA detection protocol based on different inorganic colloid nanocrystal tracers. (A) Introduction of probe-modified magnetic beads. (B) Hybridization with the DNA targets. (C) Second hybridization with the QD-labeled probes. (D) Dissolution of QDs and electrochemical detection.



„golden gate“ (Ch. Mirkin):



Golden gate. New technique detects target DNA (here, anthrax) by using it to link fixed "capture strands" with "probe strands" attached to current-carrying gold nanoparticles.

Label-Free “Digital Detection” of Single-Molecule DNA Hybridization with a Single Electron Transistor

Louis C. Brousseau, III



Figure 1. Illustration of the concept of “digital detection” of oligonucleotide hybridization.

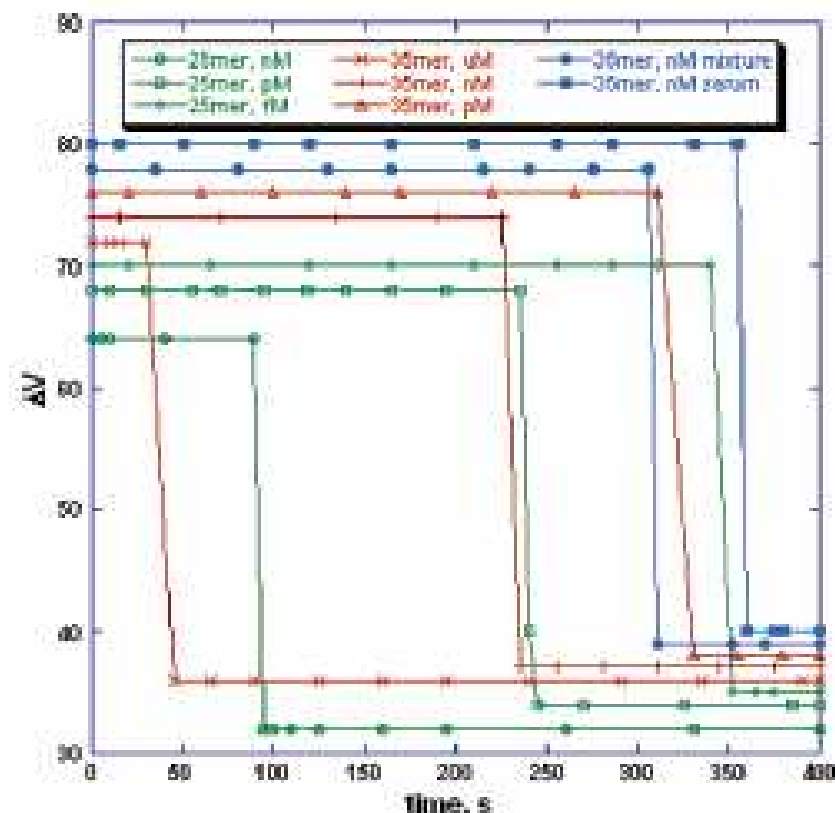
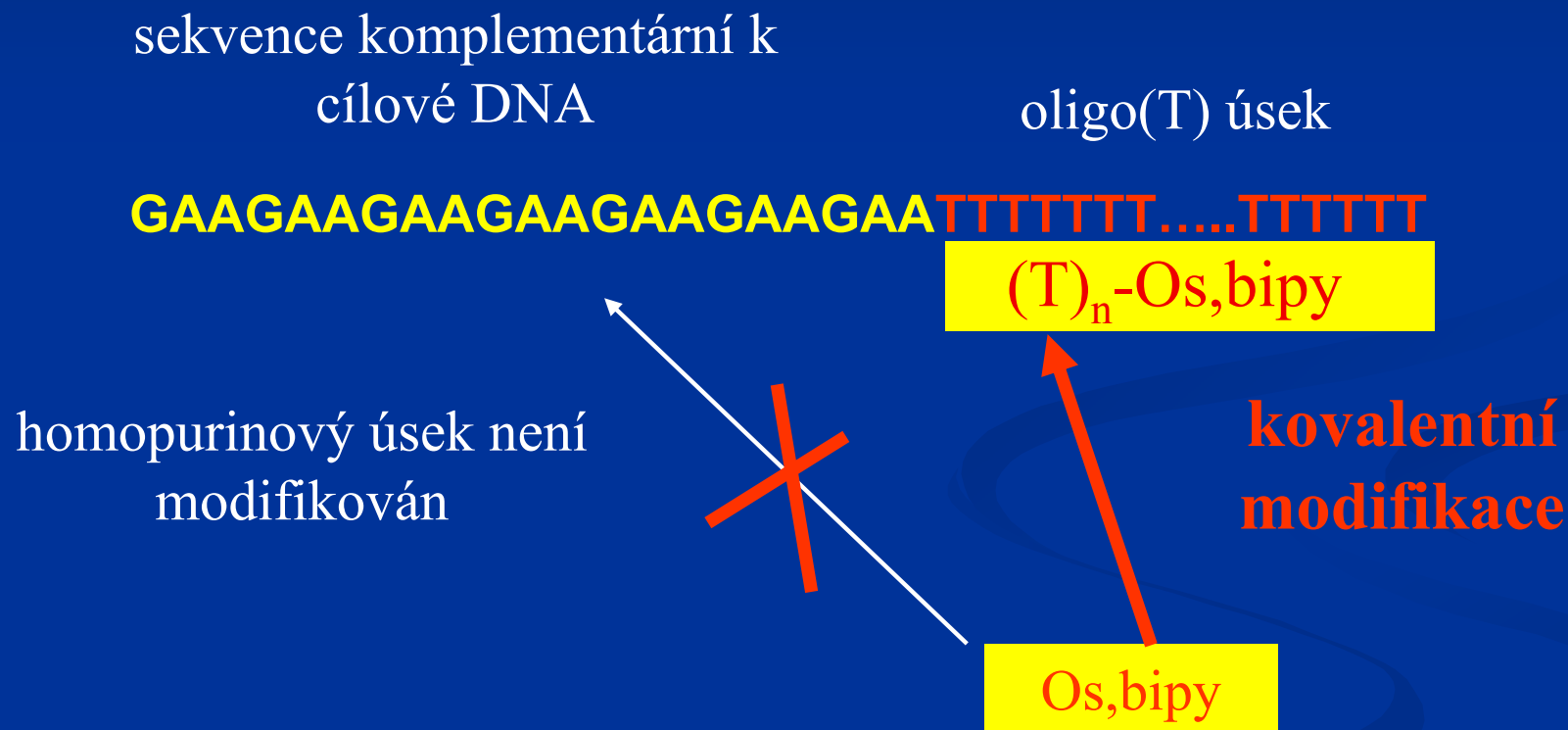


Figure 2. SET response to addition of various concentrations of matched target oligos in PBS, illustrating decrease in ΔV upon binding.

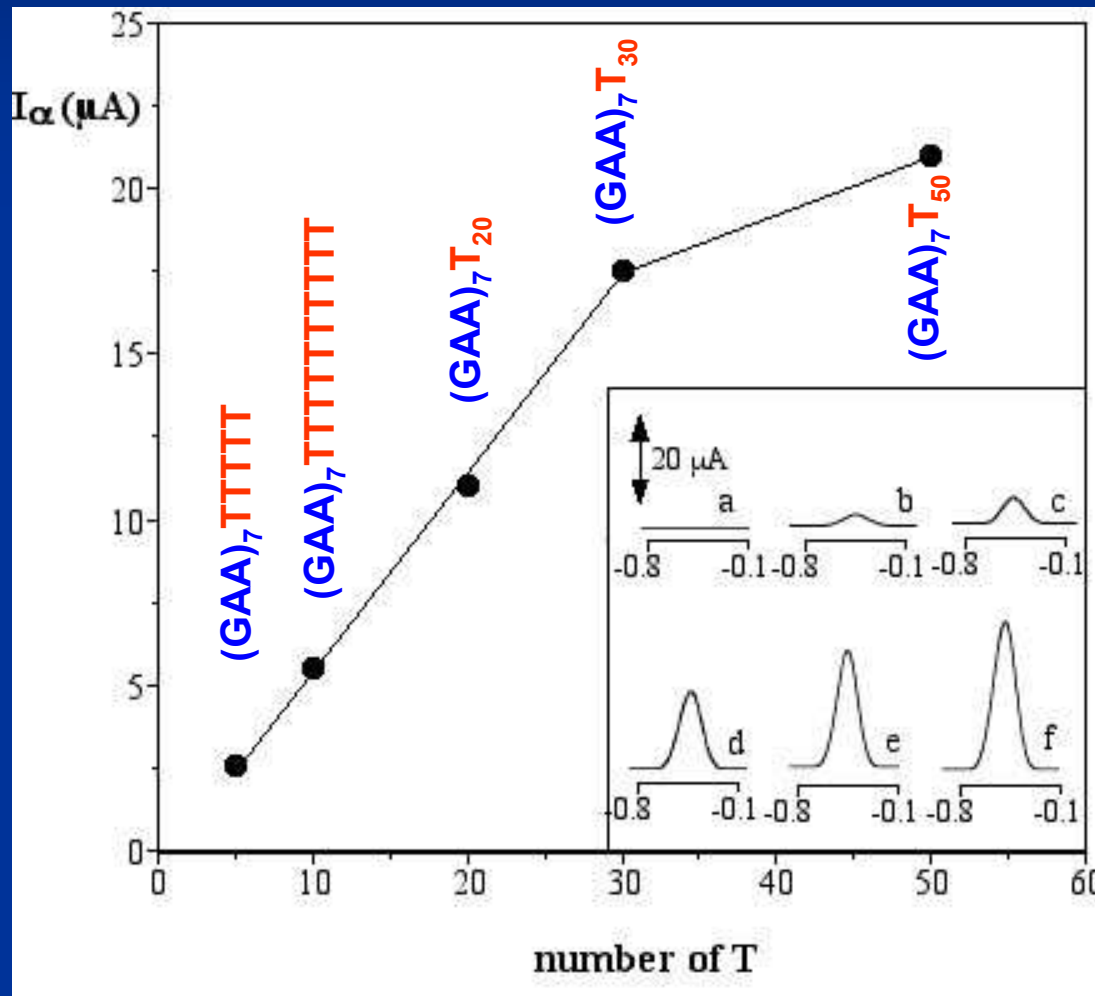
Komplexy OsO_4 jako elektroaktivní značky při analýze hybridizace DNA

- Os-bipy značené **signální sondy**



- jednoduchá příprava **bez potřeby speciálního vybavení a zkušeností v oblasti organické syntézy**

- Os-bipy značené **signální sondy** pro elektrochemické hybridizační senzory

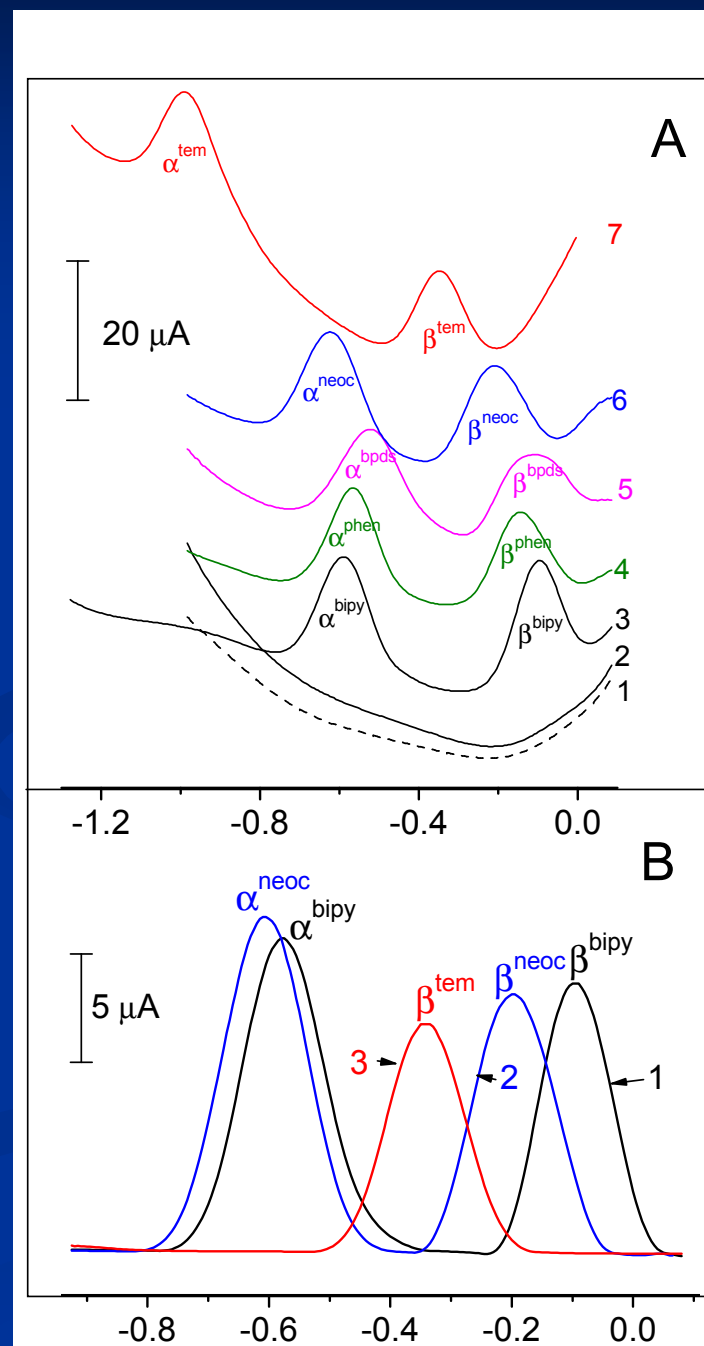
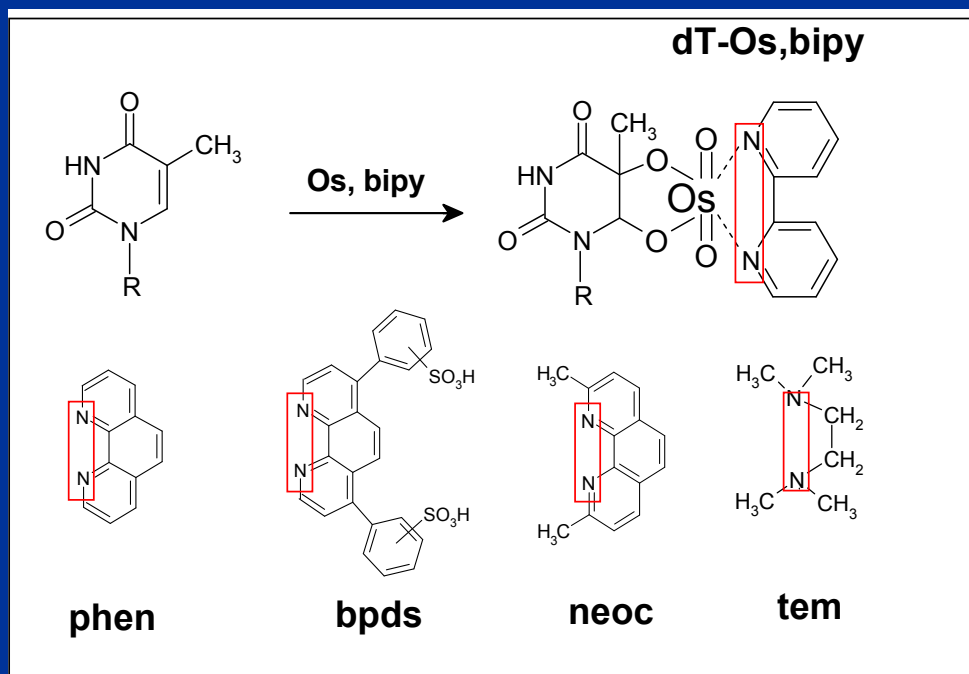


signál roste s počtem modifikovaných thyminů

ZVÝŠENÍ CITLIVOSTI

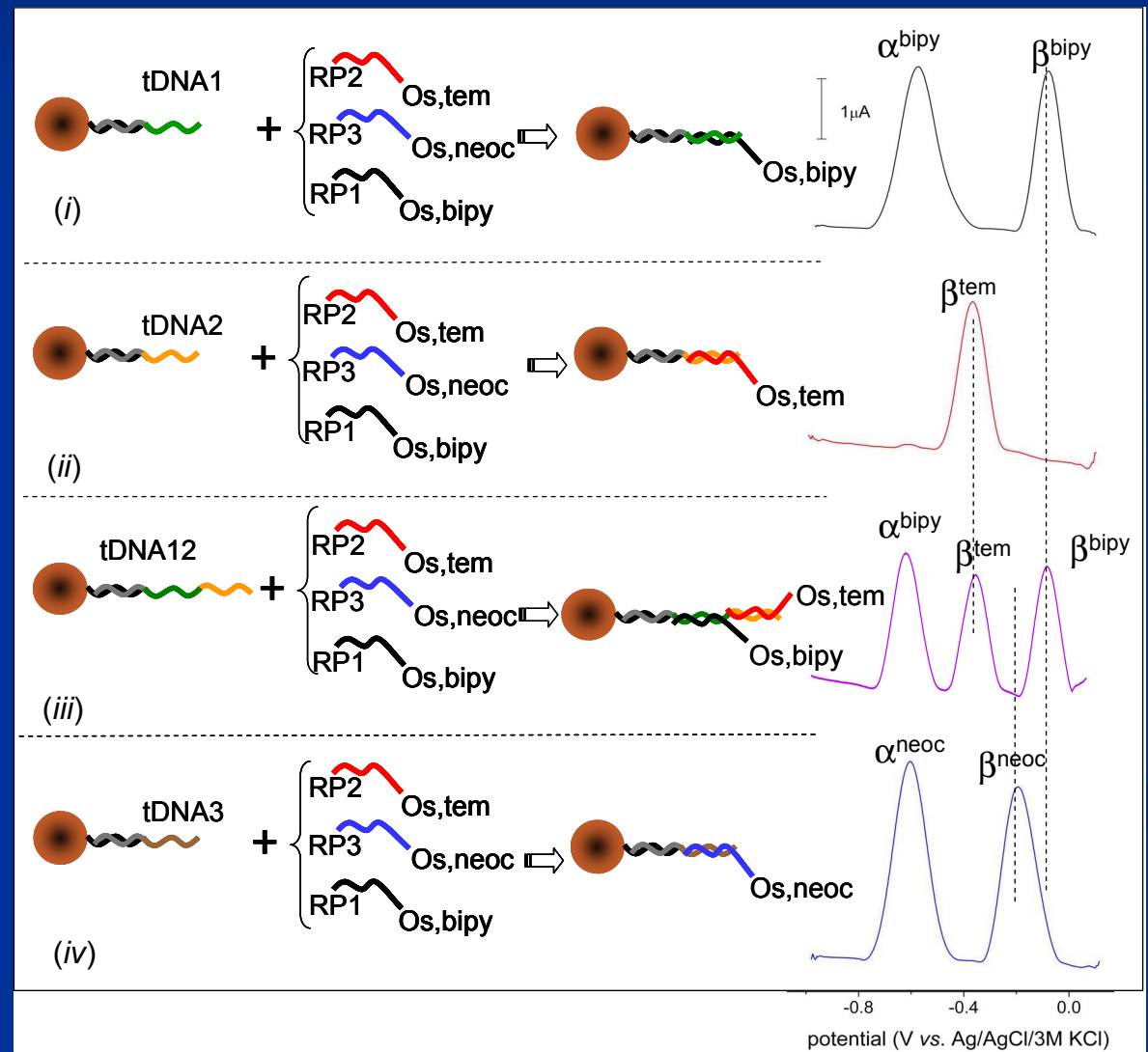
„Vícebarevné“ elektrochemické značení DNA pomocí Os,L

- elektrochemické signály DNA-Os,L obsahující jiné ligandy než bipy:



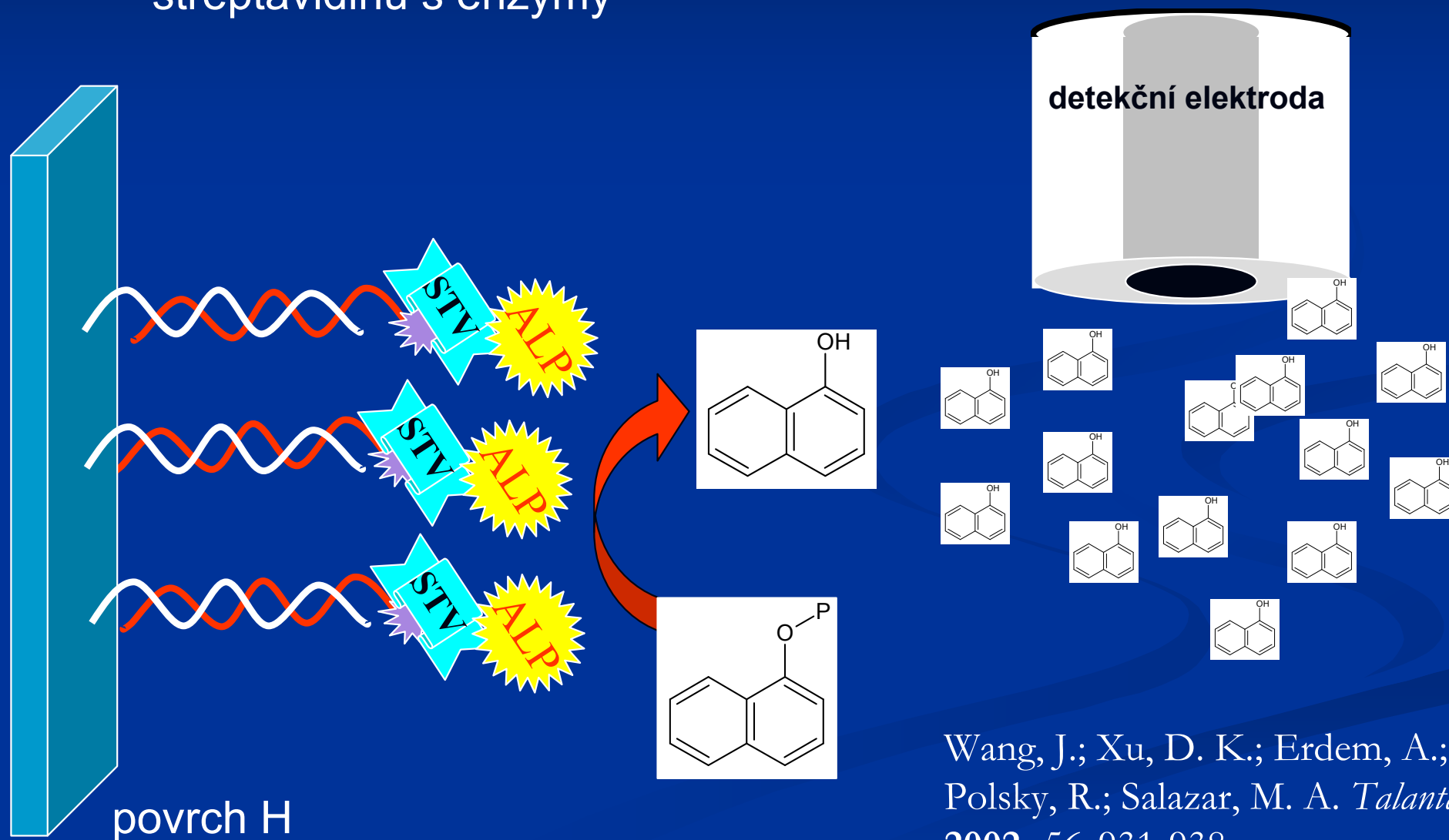
„Vícebarevné“ elektrochemické značení DNA pomocí Os,L

- rozdílů v potenciálech lze využít při hybridizaci DNA: analýza více sekvencí současně



Biokatalytická (enzymová) amplifikace signálu

- obvykle biotinem značené DNA v kombinaci s konjugáty streptavidinu s enzymy



Wang, J.; Xu, D. K.; Erdem, A.;
Polsky, R.; Salazar, M. A. *Talanta*
2002, 56, 931-938.

Enzymem značené uhlíkové nanotrubičky (carbon nanotubes) (J. Wang)

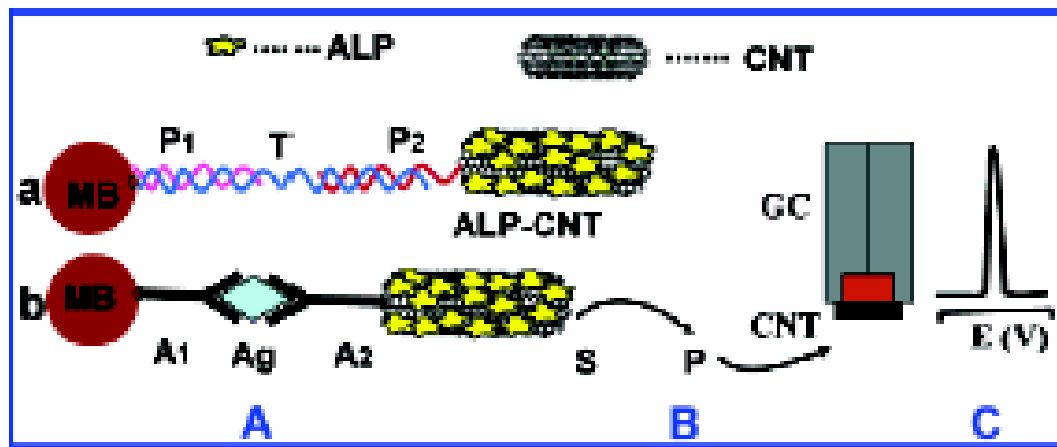
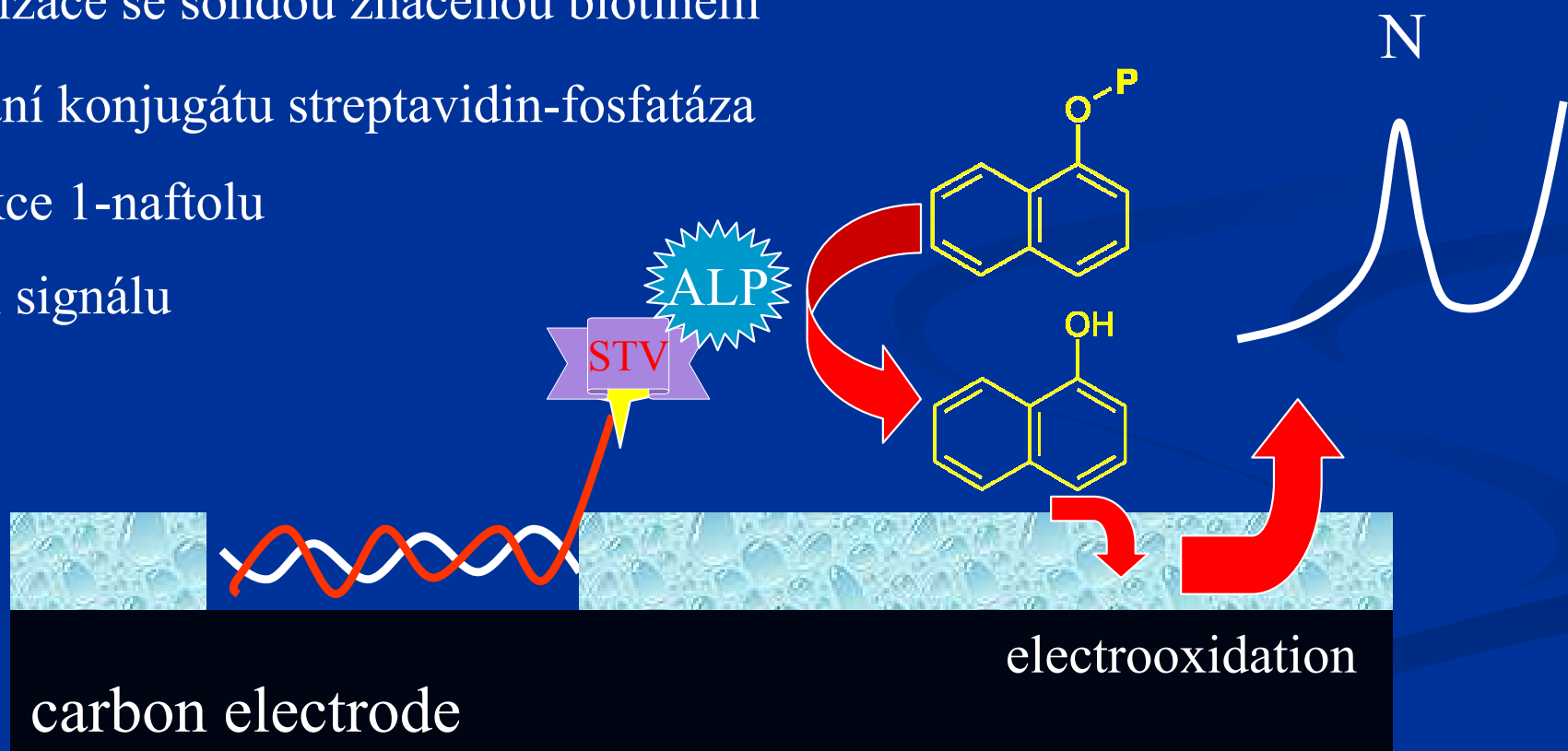


Figure 1. Schematic representation of the analytical protocol: (A) Capture of the ALP-loaded CNT tags to the streptavidin-modified magnetic beads by a sandwich DNA hybridization (a) or Ab–Ag–Ab interaction (b). (B) Enzymatic reaction. (C) Electrochemical detection of the product of the enzymatic reaction at the CNT-modified glassy carbon electrode; MB, Magnetic beads; P₁, DNA probe 1; T, DNA target; P₂, DNA probe 2; Ab₁, first antibody; Ag, antigen; Ab₂, secondary antibody; S and P, substrate and product, respectively, of the enzymatic reaction; GC, glassy carbon electrode; CNT, carbon nanotube layer.

...citlivost: lze detekovat méně než 1000 molekul)...

Analogický systém lze využít i v “jednopovrchovém uspořádání” (tj. pracovní elektroda = současně povrch, na kterém se hybridizuje)

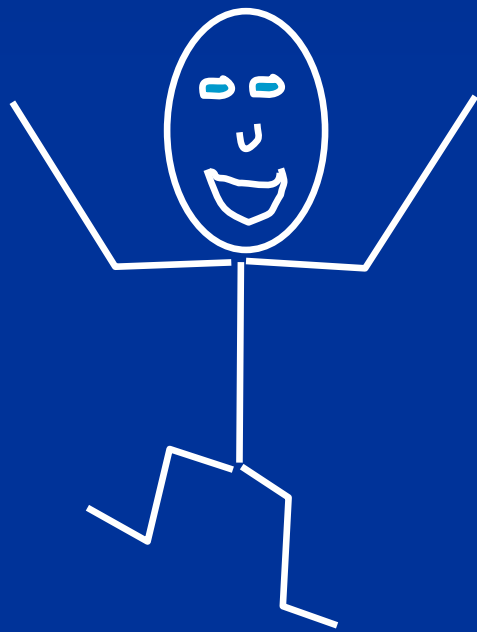
- adsorpce cílové DNA
- blokování povrchu (5 % BSA)
- hybridizace se sondou značenou biotinem
- navázání konjugátu streptavidin-fosfatáza
- produkce 1-naftolu
- měření signálu



Analogický systém lze využít i v “jednopovrchovém uspořádání”
(tj. pracovní elektroda = současně povrch, na kterém se hybridizuje)

- využitelný pro analýzu **reálných vzorků DNA**
amplifikovaných **pomocí polymerázové řetězové reakce**
(PCR)

Hurá!! Umím rozlišit
komplementární a
nekomplementární sekvenci
DNA s $10^{-??}$ -molovým
množstvím syntetického
oligonukleotidu!



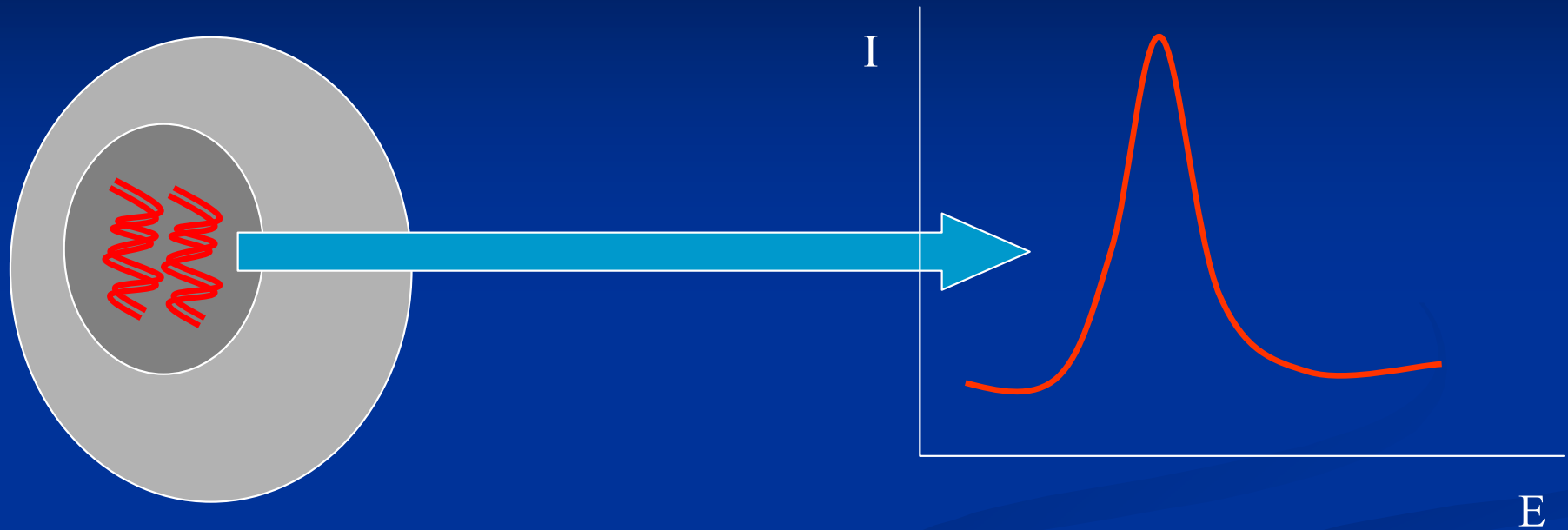
elektrochemik

Super... tak teď mi to ukaž s
přírozenou genomovou DNA...



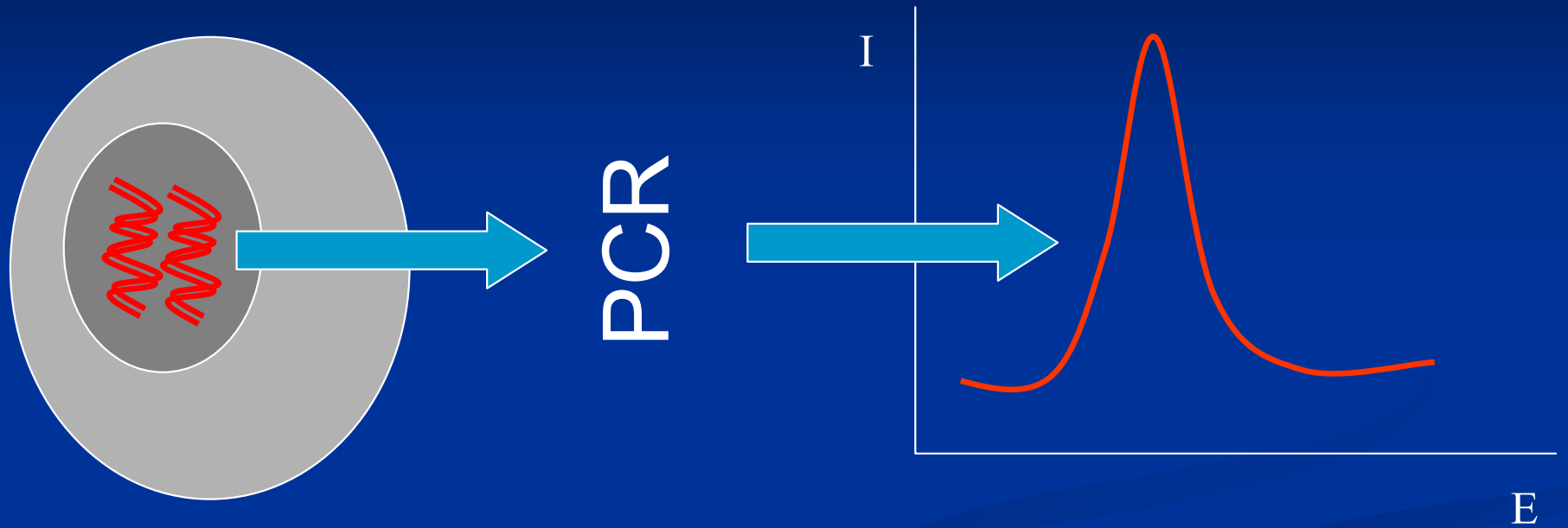
biolog

■ Přímá hybridizační analýza s genomovou DNA?



- to vyžaduje (v případě jednokopiových sekvencí) rozlišit **a úsek DNA dlouhý několik málo desítek nukleotidů mezi třemi miliardami bp** (v lidském genomu), tj. cca $1:10^8$
- v biologické matrici je to velmi obtížné

- Amplifikace DNA pomocí PCR



- klíčová technika současné molekulární biologie

PCR=replikace DNA *in vitro*



genomová DNA
(templát pro PCR)

PCR=replikace DNA *in vitro*



tepelná denaturace dvoušrobovice

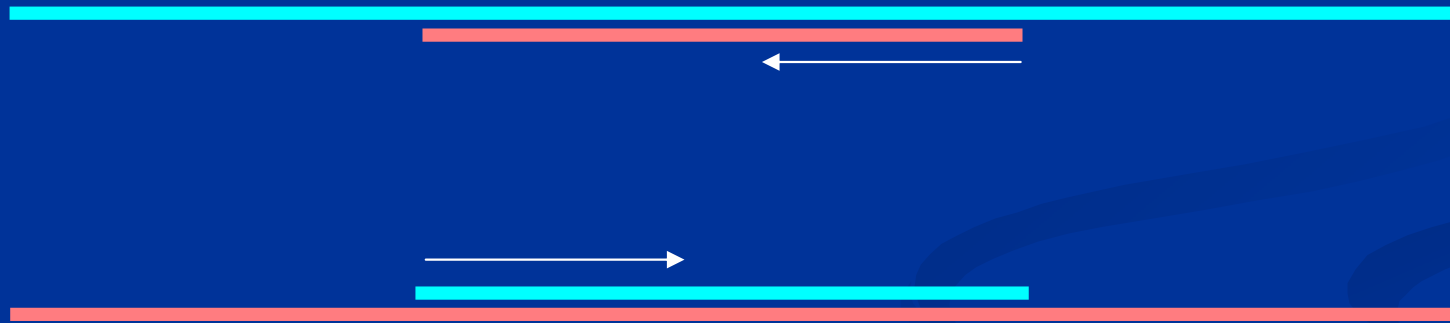
PCR=replikace DNA *in vitro*



+ DNA polymeráza + dNTP



PCR=replikace DNA *in vitro*



PCR=replikace DNA *in vitro*

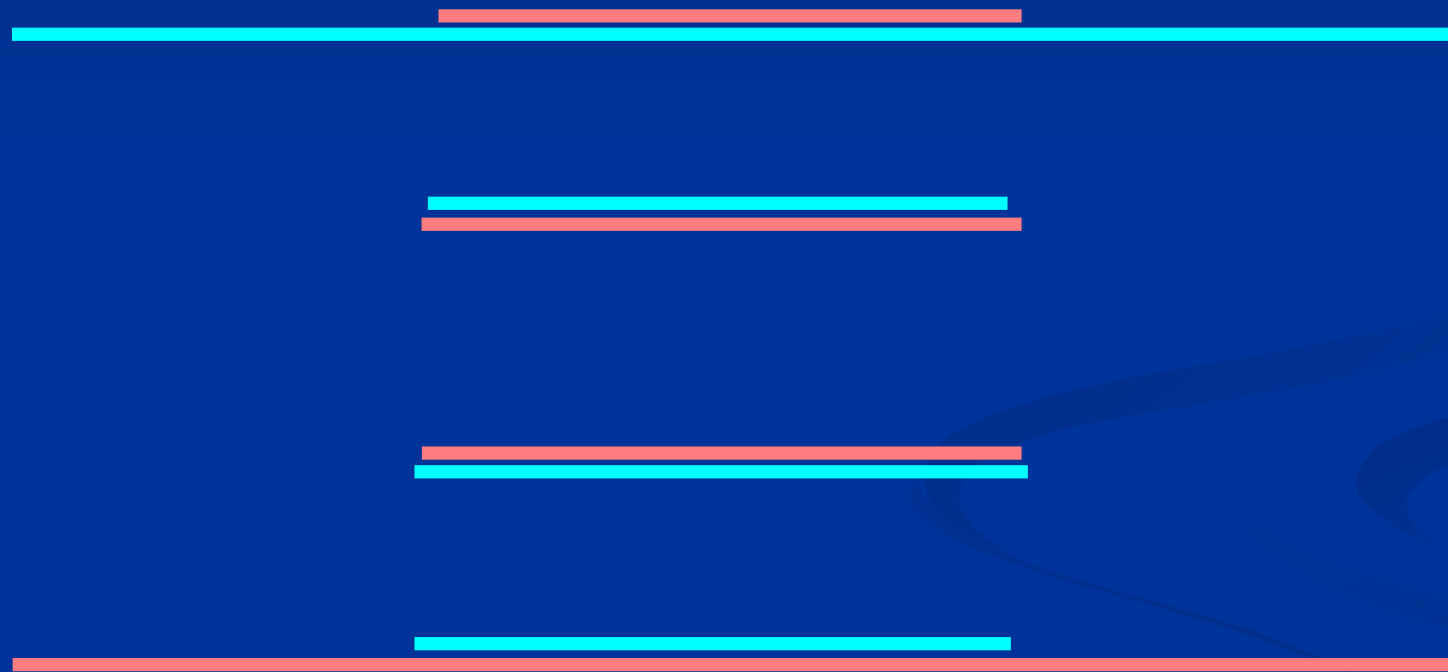


tepelná denaturace dvoušrobovice

PCR=replikace DNA *in vitro*



PCR=replikace DNA *in vitro*



atd.... (počet kopií úseku „mezi“ primery roste geometrickou řadou)

PCR=replicace DNA *in vitro*

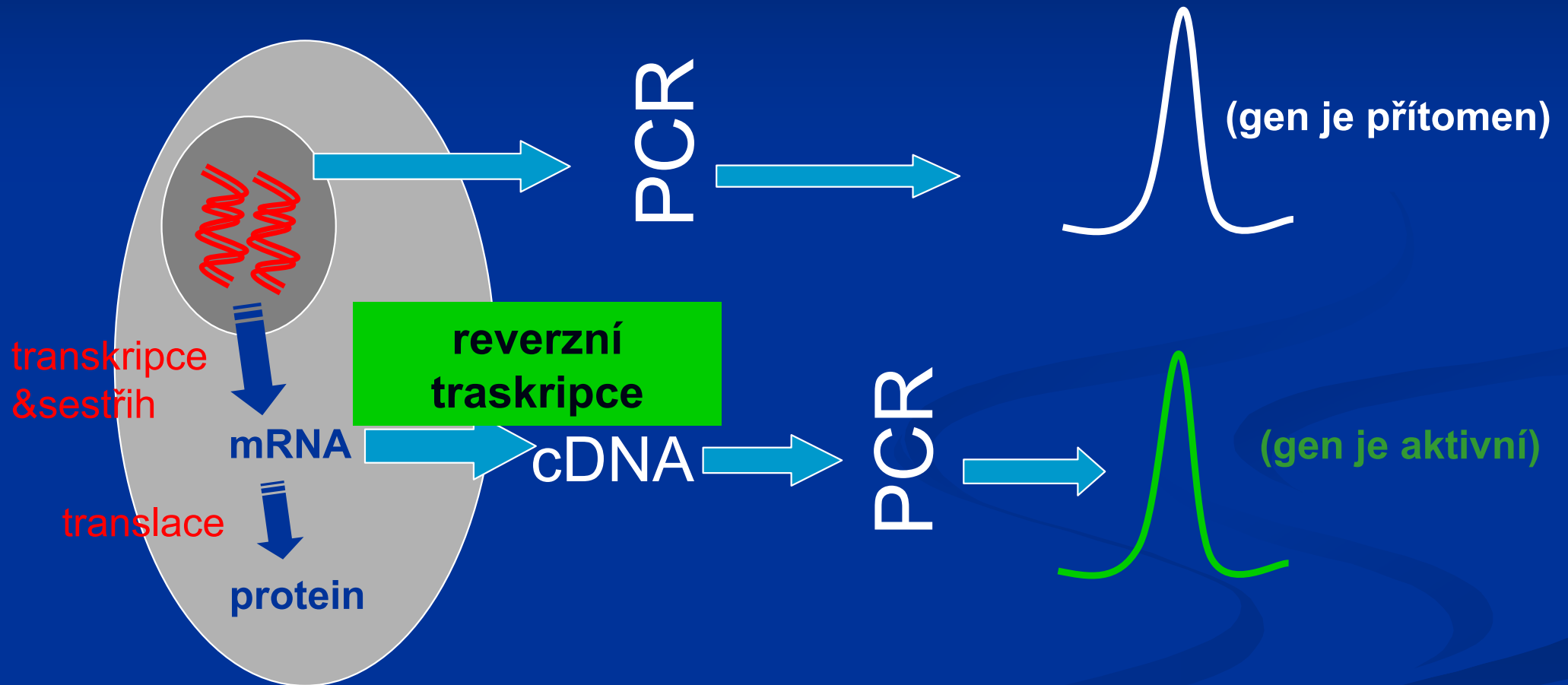
smíchá se DNA templát, primery
směs NTP, termostabilní DNA
polymeráza a proces se automaticky
cykluje



PCR=replikace DNA *in vitro*

- pomocí této techniky lze připravit mnoho kopií přesně definovaných úseků DNA získané z biologického materiálu a ty pak použít pro analýzu
- genetická diagnostika, usvědčování pachatelů, otců a nemravných prezidentů, Jurský park...
- detekce genové exprese: kombinace PCR s reverzní transkripcí mRNA

analýza exprese genů



Detekce PCR produktu pomocí hybridizace na tištěných elektrodách

produkt PCR (neznačený)



denaturace
(NaOH)



adsorpce na
elektrodu
(NaOH)



**jednoduché
předčištění
pomocí kitu**



**blokování povrchu elektrody (BSA)
hybridizace biotinylované sondy**

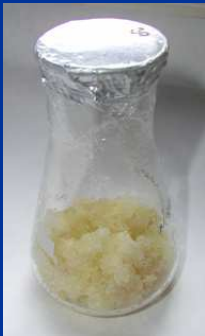


navázání konjugátu streptavidin-fosfatáza, produkce 1-naftolu, elchem. měření

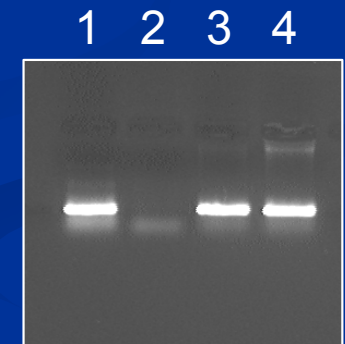
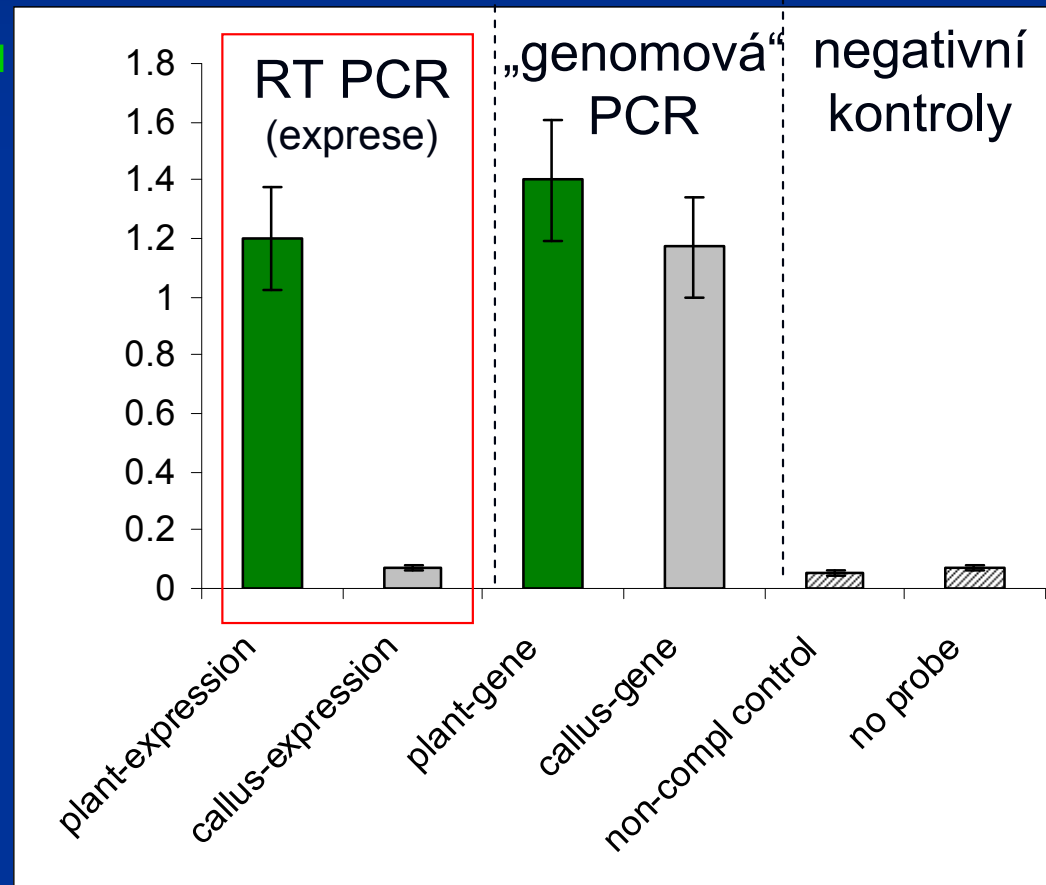
Analýza exprese genů

gen *rbcL* : účast ve fotosyntéze, exprimován jen v zelených částech rostlin

zelená rostlina tabáku



tabákový kalus

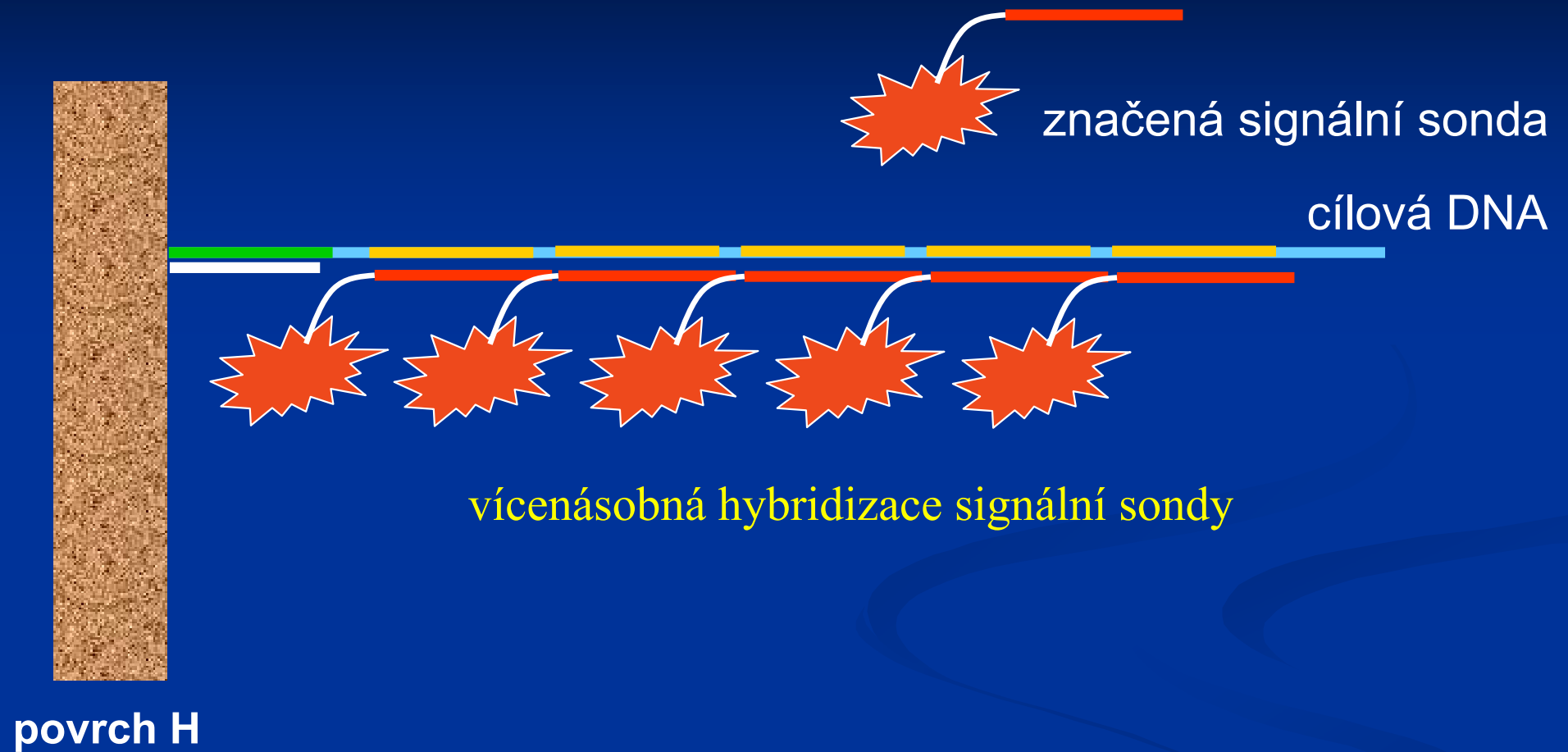


Elektrochemické stanovení délky repetitivní sekvence v DNA (počtu opakování základní jednotky)

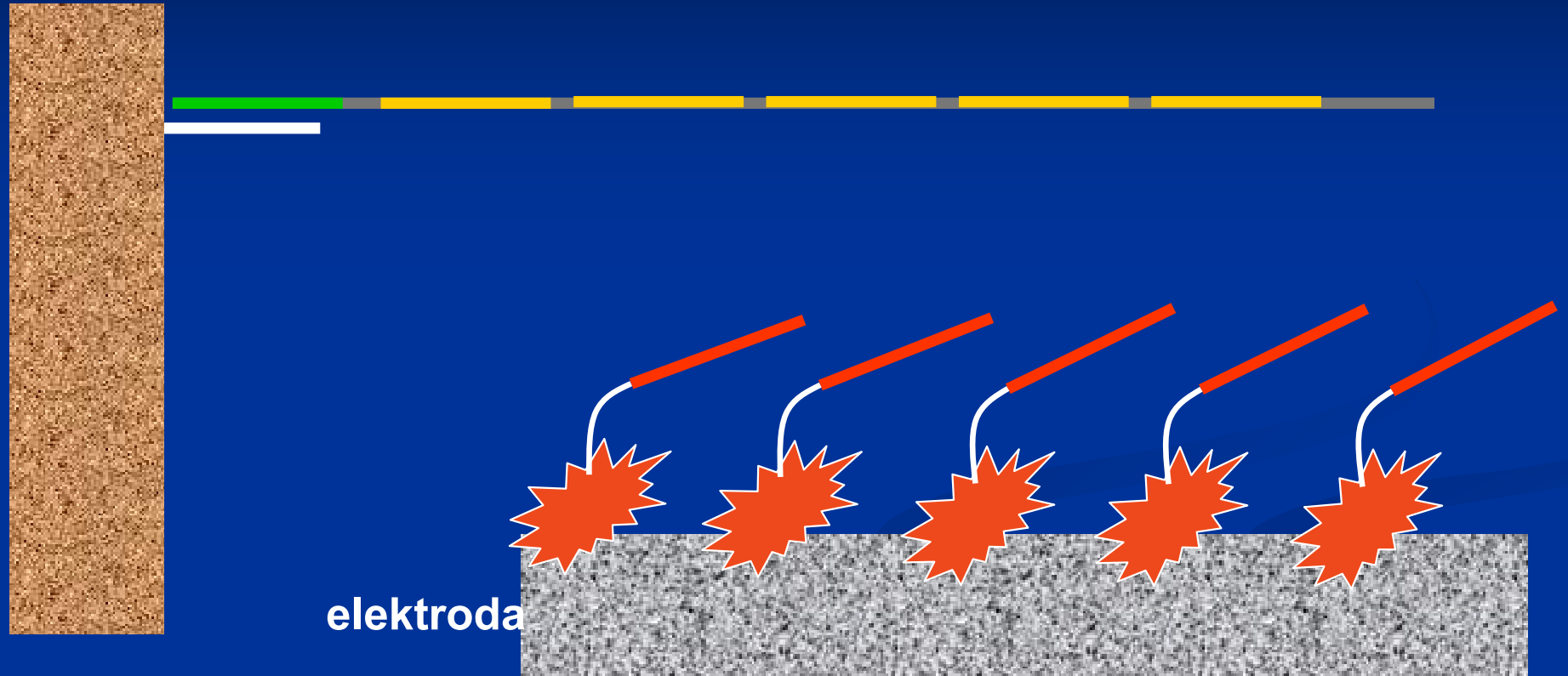
Expanze trinukleotidových opakování:
dědičné neurodegenerativní choroby

- myotonická dystrofie (CAG)
- syndrom fragilního chromozómu X (CGG)
- Friedreichova ataxie (GAA)

diagnostika na úrovni DNA: stanovení počtu opakování



- akumulace značky v důsledku opakování sekvence rozpoznávané signální sondou



povrch H

- množství molekul signální sondy závisí délce repetitivní sekvence
- signál roste s počtem opakování

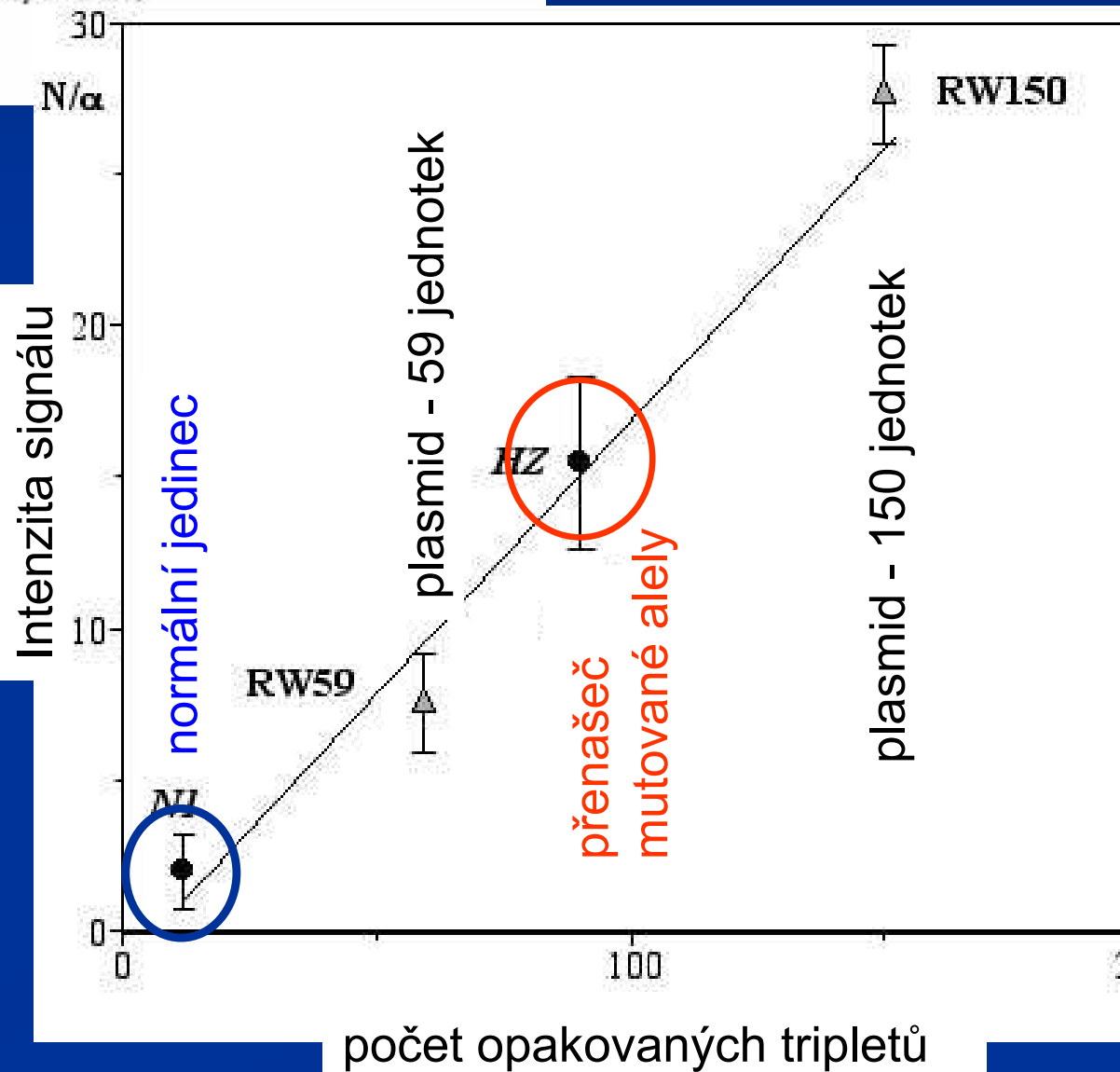
Electrochemical Detection of DNA Triplet Repeat Expansion

Miroslav Fojta,* Ludek Havran, Marie Vojtiskova, and Emil Palecek*

*Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Kralovopolska 135,
612 65 Brno, Czech Republic*

Received March 3, 2004. E-mail: fojta@ibp.cz; palecek@ibp.cz

GAA•TTC (Friedreichova ataxie)



Detekce bodových mutací a jednonukleotidových polymorfismů

Záměna jediného „písmene“ genetické abecedy v určitých místech genomu může mít závažné zdravotní důsledky, pokud

- mutace zabrání správné expresi důležitého genu
- mutovaný gen kóduje nefunkční protein
- mutovaný gen kóduje protein s pozměněnou funkcí

diagnostika na úrovni DNA

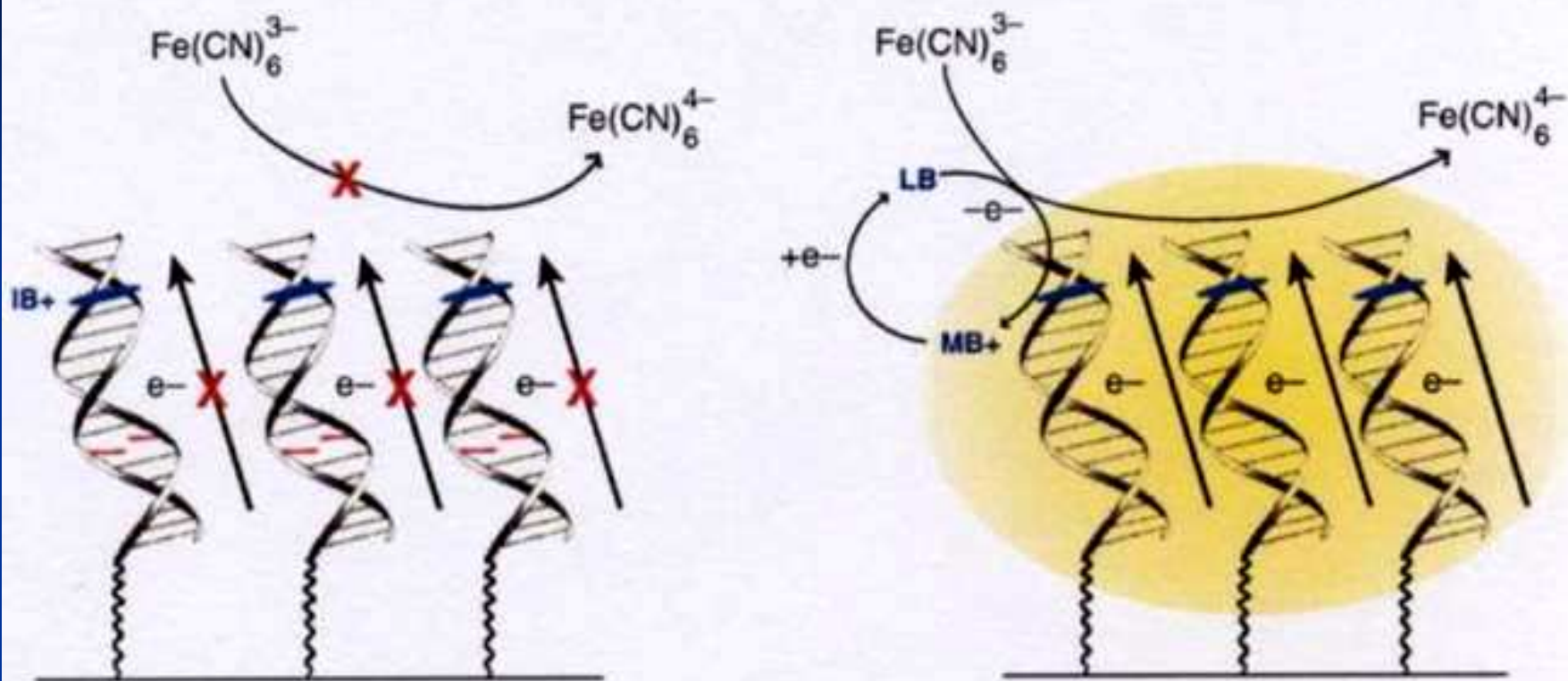
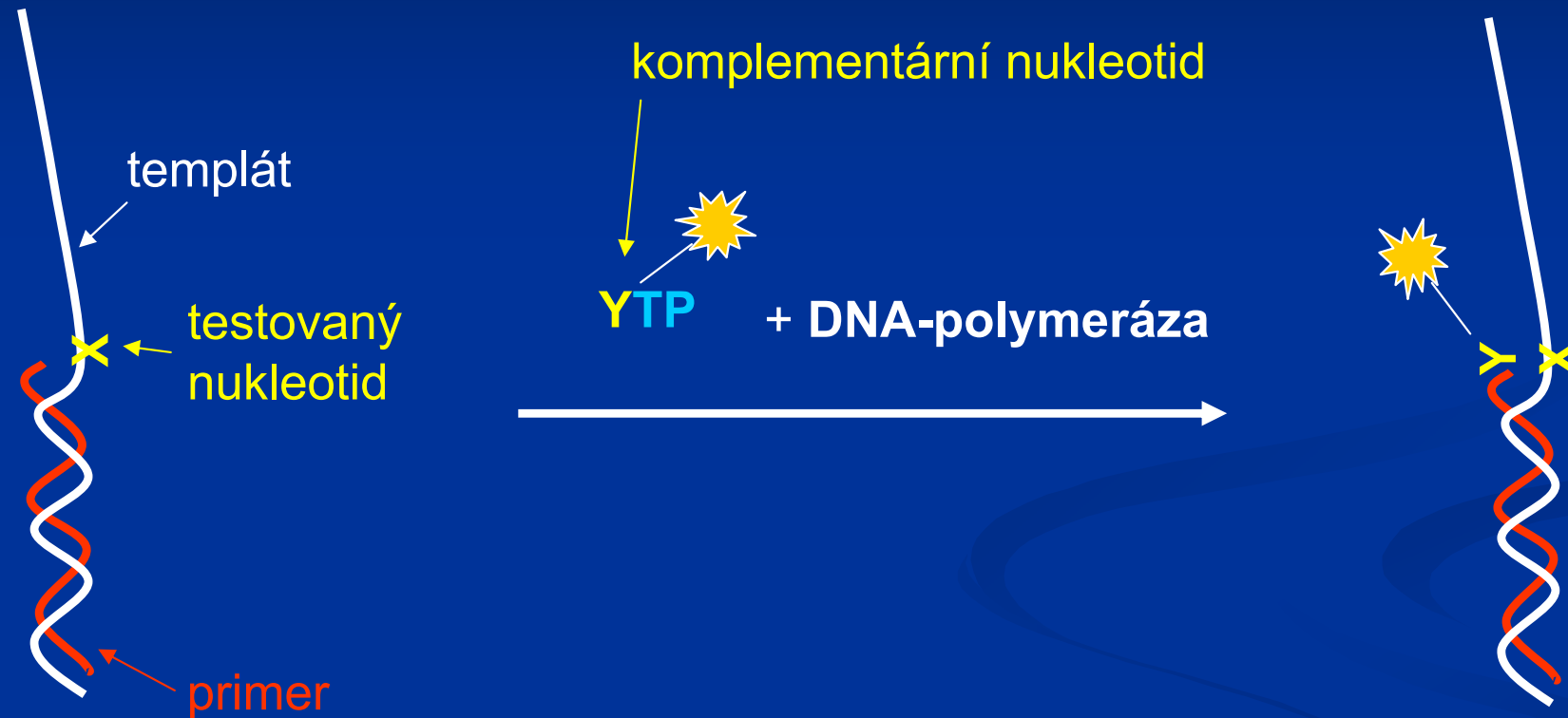


Figure 5 Electrochemical assay for mismatches through DNA-mediated charge transport. On the right is shown an electrode modified with well-matched duplex DNA. Current flows through the well-stacked DNA to reduce methylene blue (MB^+) intercalated near the top of the film, to leucomethylene blue (LB). LB goes on to reduce ferricyanide in solution, thereby regenerating MB^+ catalytically, leading to an amplification of the hybridization signal. In the case of a DNA film containing mismatched duplexes (left), current flow through the DNA duplex is attenuated, MB^+ is not reduced, and the catalytic signal is lost.

■ „DNA minisequencing“



- značka je zavedena pouze v případě přítomnosti komplementární báze v sousedství primeru
- optická značka („APEX“), elektroaktivní značka, biotin-streptavidin-enzym
- jednopovrchově (Patolsky a Willner) nebo dvoupovrchově (MF a kol.)
- amplifikace v PCR cyklu

závěrem...

- většina zmíněných systémů velmi dobře pracuje laboratorních podmínkách a na úrovni modelových vzorků DNA (syntetické oligonukleotidy)
- řada z nich byla úspěšně aplikována i při analýze „skutečných“ cílových DNA (úseků různých genů amplifikovaných pomocí PCR), včetně aplikací v oblasti lékařské diagnostiky (detekce genomové DNA patogenních organismů, mutací v důležitých lidských genech, genové exprese na modeleových systémech apod.)
- některé metody (zejména ty, které jsou založené na využití nanočástic nebo CNT jako značek pro DNA) dosahují extrémně vysokých citlivostí (v řádu 1000 molekul cílové DNA)

budoucnost...

hlavní cíl:

- vývoj elektrochemických zařízení umožňujících citlivou, specifickou, rychlou a levnou detekci hybridizace DNA

výzvy:

- spolehlivá analýza PCR-amplifikovaných cílových DNA
- možnost detekce neamplifikovaných cílových sekvencí
- spolehlivá detekce bodových mutací
- inkorporace elektrochemické detekce do zařízení typu „DNA arrays“, „chips“; **lab-on-a-chip**

Poděkování



- Emil Paleček
 - František Jelen
 - Luděk Havran
 - Petr Pečinka
 - Katka Cahová
 - Pavel Kostečka
 - Jenda Vacek
 - Hanka Pivoňková
 - Michal Masařík
 - Tomáš Mozga
 - Táňa Kubičárová
 - Jana Fulnečková
 - Iva Salajková
 - Yvonka Koudelková
 - Alena Kouřilová
 - Hana Chroustová
 - Lída Římánková
-
- GAČR (203/04/1325)
 - GAAV (IAA4004402)
 - MPO (1H-PK/42)
 - MŠMT (LC06035)



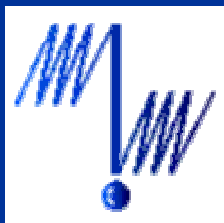
Poděkování



Univerzita Pardubice
Renáta Šelešovská
Ladislav Novotný
Karel Vytřas
Petra Brázdilová



**Masarykova
univerzita Brno**
Libuše Trnková



UFCH JH
Tomáš Navrátil
Bogdan Yosypchuk
Michael Heyrovský
Ivana Šestáková

Díky....



**Děkuji
za pozornost**