MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AKADEMIE VĚD ČR, V. V. I.
ODDĚLENÍ BIOFYZIKÁLNÍ CHEMIE A MOLEKULÁRNÍ ONKOLOGIE

Značení DNA elektrochemicky aktivními skupinami a luminofory pro analýzu nukleotidových sekvencí

Disertační práce

Zdenka Dudová

Vedoucí práce: Mgr. Hana Pivoňková, PhD. Brno 2016

Bibliografický záznam

Autor:	Mgr. Zdenka Dudová
Název práce:	Značení DNA elektrochemicky aktivními skupinami a luminofory pro analýzu nukleotidových sekvencí
Studijní program:	Biochemie
Studijní obor:	Genomika a protetika
Vedoucí práce:	Mgr. Hana Pivoňková, PhD.
Akademický rok:	2015/2016
Počet stran:	54+27
Klíčová slova:	DNA, elektrochemie, elektrochemické značení, detekce SNP, PCR, zhášení fluorescence

Bibliographic Entry

Author:	Mgr. Zdenka Dudová
Title of Thesis:	Labeling of DNA with electrochemicaly-active moieties and luminophores for nucleotide sequences analysis
Degree programme:	Biochemistry
Field of Study:	Genomics and Proteomics
Supervisor:	Mgr. Hana Pivoňková, PhD.
Academic Year:	2015/2016
Number of Pages:	54+27
Keywords:	DNA, electrochemistry, electrochemical labeling, SNP detection, PCR, fluorescence quenching

© Zdenka Dudová, Masarykova Univerzita, 2016

Abstrakt

Elektrochemie nukleových kyselin (NK) je v dnešní době již etablovaný obor a ročně je publikováno stále více článků zabývajících se touto problematikou. Elektrochemickou analýzu je možné použít například ke zjišťování sekvencí nukleotidů v DNA, k detekci poškození DNA, k detekci interakce DNA s proteiny, stanovení mikroRNA (jednovláknové řetězce nekódující RNA o délce 22 nukleotidů, které se podílejí na regulaci genové exprese), apod. Propojení molekulární biologie, genomiky i proteomiky s elektrochemií je možné například pomocí syntézy NK značených elektrochemicky aktivními skupinami, kterých se pak využívá při detekci mutací, hybridizace sondy s cílovou molekulou v elektrochemických DNA-biosenzorech i minisekvenování krátkých molekul NK. Elektrodové materiály používané k měření jsou velmi rozmanité a vhodným výběrem elektrody je možné zjistit o zkoumaných NK široké spektrum informací. Tato práce je zaměřena na elektrochemické značení NK, studium interakcí DNA s jinými molekulami, a na využití elektrochemických metod k detekci jednonukleotidových polymorfismů (SNP). Dále jsme sledovali enzymatickou inkorporaci syntetických (modifikovaných) nukleosid trifosfátů do dlouhých řetězců DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), jejich vliv na stabilitu duplexu a obecné elektrochemické chování námi modifikované DNA. Současně jsme se zabývali podstatou interakcí DNA modifikované 7-deazaguaninem se Sybr Green I (SG), což je běžně používané fluorescenční barvivo pro detekci dvouřetězcové DNA, ale v přítomnosti 7-deazaguaninu (G*) je jeho fluorescence zhášena. Byla provedena optimalizace spektroskopického i elektrochemického stanovení interakce SG s nemodifikovanou i G*-modifikovanou DNA a bylo ukázáno, že SG se na modifikovanou DNA váže stejně jako na nemodifikovanou DNA. V neposlední řadě je část této práce věnována elektrochemickým metodám detekce jednonukleotidových polymorfismů v cDNA genu p53 pomocí elektrochemické metody využívající enzymové amplifikace signálu. Jednotlivé problematiky se úzce prolínají a jejich principy jsou shrnuty v teoretické části práce. Na závěr jsou zde uvedeny a okomentovány výsledky publikované v zahraničních impaktovaných časopisech.

Abstract

Electrochemistry of nucleic acids (NA) is nowadays an established discipline and every year there are published still more publications concerning at that field. Electrochemical analysis can be used to detect DNA sequence, for detection of DNA damage or an interaction of DNA with proteins, determination of microRNA and the like. Connection between molecular biology, genomics, proteomics and the electrochemistry is made by a synthesis of electrochemicaly active moieties labeled NA used for a detection of mutations, probe hybridization with target molecule in electrochemical DNA-biosensors and for minisequencing of short NA molecules. The electrode materials used for measurements are very diverse and by the right choice of the electrode is possible to find out a wide spectrum of information about analyzed NA. This work is focused on electrochemical labeling of NA, studying of interactions between DNA and other molecules and utilization of electrochemical methods for single nucleotide polymorphisms (SNPs) detection. There was studied enzymatic incorporation of synthetic (modified) nucleoside triphosphates into long strands of DNA by polymerase chain reaction (PCR) and the influence of such modifications on duplex stability and a its general electrochemical behavior in this work. Simultaneously, it was looking for a nature of the interaction of 7-deazaguanine (G*) modified DNA with SYBR Green I. Sybr Green I is a commonly used fluorescent dye for a detection of double-stranded DNA, but in the presence of G* is its fluorescence quenched. Spectroscopical and electrochemical determination of such interaction with unmodified or G*-modified DNA was optimized and the results showed that Sybr Green I interacts with both DNAs in the same way. Part of this work is devoted to electrochemical methods for detection of single nucleotide polymorphisms in cDNA p53 gene using enzymatic amplification reaction. Listed issues are closely interconnected and their principles are summarized in the theoretical part. In the end there is a part summarizes results published already in impacted scientific journals.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem kolegům z oddělení Biofyzikální chemie a molekulární onkologie, že mi poradili vždy, když jsem se ptala. Jmenovitě bych pak chtěla poděkovat Mgr. Luďku Havranovi, Dr., Mgr. Janu Špačkovi, Mgr. Medardu Plucnarovi, Mgr. Petru Orságovi a Mgr. Vlastimilu Tichému, PhD., kteří mi v nemnohém nejen poradili, ale i pomohli a často se mnou danou problematiku diskutovali. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Haně Pivoňkové, PhD. a Doc. RNDr. Miroslavu Fojtovi, CSc. za moudré rady a vedení mé práce. Též děkuji své skvělé rodině za trpělivost a za to, že mi poskytla potřebný čas k dokončení této disertační práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji disertační práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 12. května 2016 ……

Jméno Příjmení

Obsah

Seznam zkratek 9
Úvod 11
Teoretický přehled 13
1 Struktura a interakce DNA 13
2 Elektrochemické metody 14
2.1 Pracovní elektrody 14
2.2 Elektrochemická analýza DNA 17
2.3 Elektrodové děje jimž podléhají NK na rtuťových a uhlíkových elektrodách 20
2.4 Adsorptivní rozpouštěcí a přenosové techniky 23
3 Elektrochemické značení nukleových kyselin 24
3.1 Elektroaktivní značky nukleových kyselin 24
3.2 Enzymatická amplifikace signálu 25
3.3 Elektroaktivní fluorofory 26
4 Elektrochemické DNA-biosenzory 26
4.1 Vlastní elektroaktivita DNA 27
4.2 Elektroaktivní indikátory 28
4.3 Kovalentně vázané elektroaktivní značky nebo enzymy 28
4.4 Dvoupovrchové elektrochemické techniky 29
4.5 Detekce mutací a polymorfismů v sekvencích DNA 30
Cíle disertační práce 32
Seznam publikací 33
Výsledky a diskuse 34
1. Elektrochemické chování DNA modifikované 7-deazaguaninem a 7-deazaadeninem na visící rtuťové kapkové elektrodě. 34
2. Interakce fluorescenčního barviva SYBR Green I s přirozenou DNA a DNA modifikovanou 7-deazaguaninem studovaná fluorescenčními a elektrochemickými metodami 37
3. Detekce jednonukleotidového polymorfismu v genech pro hotspot mutantní *p53* proteiny a jejich exprese v lidské buněčné linii pomocí elektrochemické analýzy s použitím enzymu 41
Závěr 45
Literatura 46
Přílohy 54

Seznam zkratek

A	adenin
ACV	voltametrie s vnuceným střídavým napětím (*Alternating Current Voltammetry*)
AdSV	adsorptivní rozpouštěcí voltametrie (*Adsorptive Stripping Voltammetry*)
AdTSV	adsorptivní přenosová rozpouštěcí voltametrie (*Adsorptive Transfer Stripping Voltammetry*)
ALP	alkalická fosfatáza (*Alkaline Phosphatase*)
A^{ox}	oxidační pík adeninu
ASV	anodická rozpouštěcí voltametrie (*Anodic Stripping Voltammetry*)
C	cytosin
cDNA	komplementární DNA (*Complementary DNA*)
CSV	katodická rozpouštěcí voltametrie (*Cathodic Stripping Voltammetry*)
CV	cyklická voltametrie (*Cyclic Voltammetry*)
dATP	2'-deoxyadenosin trifosfát (*2'-Deoxyadenosine Triphosphate*)
dA*TP	7-deaza-2'-deoxyadenosin trifosfát (*7-Deaza-2'-Deoxyadenosine Triphosphate*)
dCTP	2'-deoxycytidin trifosfát (*2'-Deoxycytidine Triphosphate*)
DBT	magnetické částice s $(dT)_{25}$ na povrchu (*Dynabeads® $(dT)_{25}$*)
dGTP	2'-deoxyguanosin trifosfát (*2'-Deoxyguanosine Triphosphate*)
dG*TP	7-deaza-2'-deoxyguanosin trifosfát (*7-Deaza-2'-Deoxyguanosine Triphosphate*)
DME	kapající rtuťová elektroda (*Dropping Mercury Electrode*)
DNA	2'-deoxyribonukleová kyselina (*2'-Deoxyribonucleic Acid*)
dNTP	deoxyribonukleosid trifosfát (*Deoxyribonucleoside Triphosphate*)
DPV	diferenční pulsní voltametrie (*Differential Pulse Voltammetry*)
dsDNA	dvouvláknová DNA (*Double-Stranded DNA*)
dTTP	2'-deoxytymidin trifosfát (*2'-Deoxythymidine Triphosphate*)
G	guanin
G^{ox}	oxidační pík guaninu
HDME	visící rtuťová kapková elektroda (*Hanging Drop Mercury Electrode*)
LSV	lineární voltametrie (*Linear Sweep Voltammetry*)

NK	nukleová kyselina
MeSAE	pevná amalgámová elektroda (*metal solid amalgam electrode*)
ODNs	oligodeoxyribonukleotidy
PCR	polymerázová řetězová reakce (*Polymerase Chain Reaction*)
PEx	prodlužování primeru (*Primer Extension*)
PGE	elektroda z pyrolytického grafitu (*Pyrolytic Graphite Electrode*)
Pu/Pu*	purinové báze/7-deaza purinové báze
SAM	samoorganizovaná monovrstva (*Self-Assembled Monolayer*)
ssDNA	jednovláknová DNA (*Single-Stranded DNA*)
SWV	voltametrie se superponovaným pravoúhlým napětím (*Square Wave Voltammetry*)
tDNA	cílová DNA (*target DNA*)
wt	přirozená varianta (*Wild Type*)

Úvod

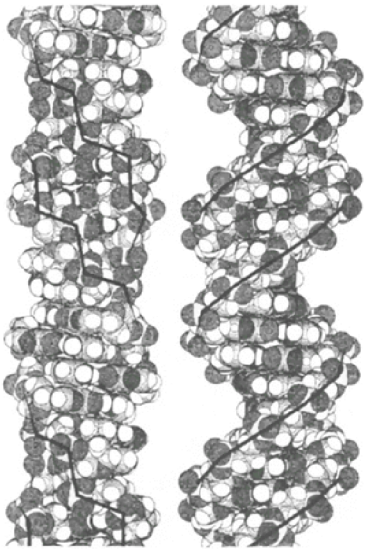
Deoxyribonukleová kyselina (DNA), resp. nukleová kyselina (NK), je komplexní biomakromolekula, jejíž struktura a interakce jsou intenzivně studovány především ve vztahu k její biologické roli. Před 150 lety byla DNA poprvé izolována Friedrichem Miescherem, který ji objevil v bílých krvinkách během studia proteinů a popsal její odlišnosti od proteinů [1]. V roce 1944 byla na základě mikrobiologických experimentů Fredericka Griffitha (1928) potvrzena DNA nositelkou genetické informace [2]. Studiem DNA a NK se zabývají obory molekulární biologie, genetiky, genomiky, proteomiky, (bio)chemie apod. Mezi hojně používané metody jejich studia, jako např. gelová elektroforéza, absorpční spektroskopie, radioaktivní a neradioaktivní značení DNA, restrikční analýza, amplifikace DNA a kombinace těchto principů, se dají zařadit i analytické metody založené na elektroaktivitě DNA. První zmínky o tom, že DNA na rtuťové elektrodě poskytuje elektrochemické redukční a oxidační signály, tedy že je elektroaktivní, byly publikovány na konci 50. a začátku 60. let 20. století [3-5]. Poprvé v roce 1958 publikoval Emil Paleček práci, v níž pomocí oscilografické polarografie se střídavým elektrickým proudem potvrdil elektroaktivitu DNA [3]. Následovalo studium vlastností DNA adsorbované na rtuťové elektrodě [6] a výsledky, které přinášely podrobnější informace o chování DNA v oblasti negativních elektrických potenciálů, kdy dochází k charakteristickým adsorpčně-desorpčním dějům [7, 8]. Na začátku 21. století se stala elektrochemie intenzivně se rozvíjejícím vědním oborem s příslibem zrychlení, zjednodušení a zlevnění analýzy NK. Na základě elektrochemické odezvy

(signálu) molekul DNA lze odhadnout jejich vyšší strukturu. Díky tomuto lze studovat strukturní přechody v NK, poškození (dvoušroubovice) DNA a interakce NK s dalšími (nejen) elektroaktivními molekulami. Elektroaktivní markery (značky) interagující s DNA nekovalentně (vazbou do velkého žlábku, interkalací) nebo kovalentně mohou být využity jako sondy pro detekci hybridizace nebo poškození DNA (DNA senzory), tzv. elektrochemické značky. V dnešní době, kdy jsou už snadno dostupné různé DNA polymerázy a (deoxy)ribonukleosid trifosfáty k syntéze molekul NK nebo oligodeoxyribonukleotidy (ODNs) o definované délce ve vysoké čistotě, stává se jednou ze základních analytických metod v oblasti analýzy NK, protože tyto krátké molekuly mohou sloužit jako vhodné modelové systémy pro optimalizaci metod pro studium přirozených NK. Velkou výhodou pro detekci syntetických řetězců jsou jejich chemické modifikace rozšiřující paletu analyticky užitečných elektrochemických signálů.

Teoretický přehled

1 Struktura a interakce DNA

DNA je přirozeně přítomna ve všech buněčných organismech, kde ji lze nalézt v podobě dvoušroubovice tvořené dvěma komplementárními vlákny. V roce 1953 byla popsána struktura DNA [9], která odpovídala dnešní formulaci formy B-DNA. Až o desítky let později byla pozorována levotočivá forma DNA, kterou je možné za určitých podmínek pozorovat na krátkých úsecích dvouřetězcové DNA [10, 11] (obr. 1). B-DNA je pravotočivá dvoušroubovice tvořena antiparalelními řetězci cukrfosfátové páteře. Na této páteři jsou glykosidicku vazbou vázány purinové (guanin, G; adenin, A) a pyrimidinové (cytosin, C; tymin, T) dusíkaté báze. Pořadím nukleobází je tvořen genetický kód podle kterého jsou syntetizovány bílkoviny.



***Obr. 1**: Schéma sekundární struktury dvou forem DNA vyskytujících se v buňce. Levotočivá forma Z-DNA a její cik-cak uspořádání (vlevo) a většinová pravotočivá forma B-DNA (vpravo) s dobře odlišeným malým a velkým žlábkem (převzato z [12]).*

Navzájem komplementární řetězce jsou propojeny vodíkovými můstky mezi páry bází a vzniká tak dvoušroubovice. Pokud DNA vystavíme zvyšující se teplotě, dojde k destabilizaci vodíkových můstků mezi vlákny a rozpadu sekundární struktury DNA, dojde k denaturaci [13]. Pokud je sekundární struktura DNA obnovena, je tento proces nazýván renaturací [14]. Pokud denaturovanou (jednořetězcovou, ss) DNA smícháme se

specifickou komplementární sekvencí (sondou) a dojde ke spárování sondy a komplementárního úseku DNA, mluvíme o hybridizaci.

Pořadí nukleobází v řetězcích DNA udává i její sekundární strukturu. Poškození nebo mutace během replikace DNA mohou vést ke ztrátě její struktury a funkce. Pokud DNA ztratí své schopnosti správně interagovat s proteiny, transkripčními faktory, malými molekulami apod. může dojít k fatálnímu poškození buňky a důsledkům pro celý organismus [15, 16]. Analýza poškození DNA má velký biomedicínský význam a elektrochemie DNA může být v tomto směru velmi užitečná [17].

2 Elektrochemické metody

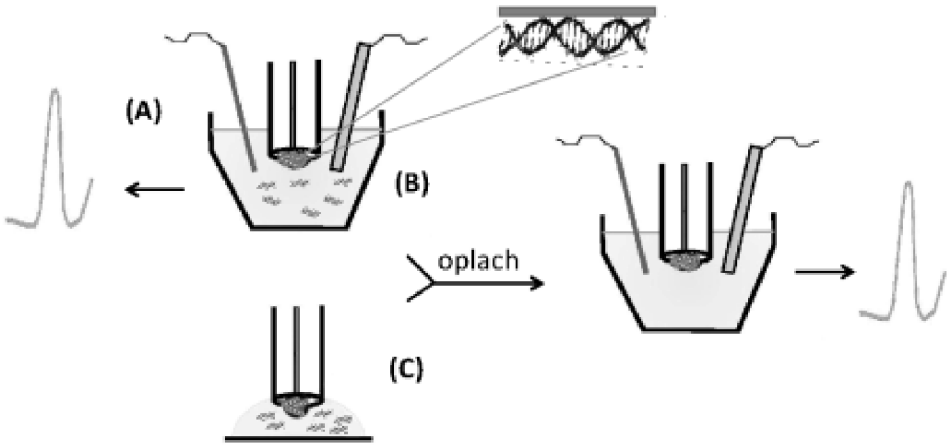
Pro elektroanalytická měření je základním komponentem pracovní elektroda zapojená do elektrického obvodu. K elektrochemické analýze NK se nejčastěji používá tříelektrodové uspořádání s pracovní, srovnávací (referentní) a pomocnou elektrodou. Pracovní elektroda je v kontaktu s analyzovanou látkou a měří její odezvu, referentní elektroda není polarizována procházejícím elektrickým proudem (dále jen proud) a má konstantní elektrický potenciál (dále jen potenciál), pomocná elektroda slouží ke srovnávání protékajícího proudu pracovní elektrodou. Elektrochemie NK je, stejně jako u ostatních elektroaktivních látek, založena na tom, že její molekula je schopna přijímat elektrony od pracovní elektrody (látka se redukuje) nebo jí elektrony odevzdávat (látka se oxiduje), případnou třetí možností je, že se látka na elektrodu specificky adsorbuje a následně se pod vlivem průchodu elektrického proudu elektrodou desorbuje nebo reorientuje [18]. Elektroaktivní složkou NK jsou dusíkaté báze, z nichž redukovatelné jsou pouze adenin (A), cytosin (C) a guanin (G), oxidovatelné jsou všechny báze, ale širší analytické uplatnění dosud našly spíše oxidační signály A a G.

2.1 Pracovní elektrody

V elektrochemii NK se využívá několik druhů pracovních elektrod. Volba pracovní elektrody se odvíjí od toho, v jakém prostředí a v jakém rozsahu potenciálů (potenciálovém okně) bude NK analyzována. Pokud jsou použity vodné elektrolyty, potenciálové okno je omezeno elektrolýzou vody probíhající na elektrodě a během anodického skenu dochází k vyvíjení kyslíku, katodický sken je omezen vyvíjením

vodíku. Oba tyto procesy jsou závislé na pH roztoku, ve kterém analýza probíhá (elektrolyt).

Zpočátku byla pro studium NK používána pouze rtuťová kapající elektroda (dropping mercury electrode, DME). V 70. letech 20. století se začala objevovat i stacionární (visící) kapková rtuťová elektroda (hanging mercury drop electrode, HMDE) [19, 20] a též uhlíkové elektrody [21]. Postupně byly a jsou využívány různorodé materiály pro výrobu pracovních elektrod, které lze vybírat dle potřeb zvolené analytické metody. Na obrázku 2 jsou ukázány tři obecné měřící postupy zobrazené na příkladu HMDE: (2A) konvenční technika, kdy probíhá adsorpce analyzované látky i její měření v jednom elektrolytu (AdSV); (2B, C) přenosová technika (AdTSV), při které je adsorpce oddělena od měření přenosem do čistého elektrolytu (podrobněji v 2.4).



***Obr. 2**: Při konvenční analýze (AdS, in situ), (A) DNA je adsorbovaná na elektrodu z analytické nádobky, v které probíhá jak adsorpce DNA na elektrodu tak i záznam voltamogramu. Při přenosové analýze (AdT, ex situ) je adsorpce a elektrodový proces oddělen. DNA je adsorbována na povrch (B) z elektrolytické cely nebo (C) z malé kapky roztoku DNA (cca 5 μl). DNA-modifikovaná elektroda je umyta a přenesena do nádobky se základním elektrolytem (neobsahujícím DNA), kde je voltamogram zaznamenán (převzato z [22]).*

2.1.1 Rtuťové pracovní elektrody

Na rtuťových elektrodách lze měřit jak redoxní, tak adsorpčně-desorpční (tenzametrické) děje NK (viz níže). Je ovšem nutno volit rozsah potenciálů tak, aby nejvyšší měřený potenciál nepřesáhl +0,1 V (oproti Ag|AgCl|3M KCl; všechny hodnoty potenciálů v této práci jsou vztaženy na argentchloridovou referentní elektrodu), protože

při positivnějších potenciálech dochází k rozpouštění rtuti. Pokud používáme kapající rtuťovou (DME) nebo stacionární (visící) kapkovou rtuťovou elektrodu (HMDE), což jsou kapalné elektrody, je jejich nespornou výhodou homogenita, snadná obnova, konstantní velikost povrchu, silná adsorpce NK na tyto elektrody a díky tomu vysoká citlivost.

Kromě kapkových rtuťových elektrod se pro elektrochemická měření v oblasti negativních potenciálů využívají také rtuťové filmové elektrody (MFE) a amalgamové elektrody. MFE se připravují elektrolytickou depozicí rtuťového filmu na povrch pevných elektrod, potenciálové okno je obdobné jako u kapalné rtuti [23, 24], avšak obnova jejich povrchu je složitější a citlivost detekce je nižší [25]. Obdobně na tom je využití amalgamových elektrod, což jsou slitiny amalgam tvořícího kovu (např. stříbro [26], zlato [27], měď [28]) a rtuti [29, 30]. Jednou z variant amalgámové elektrody je rtuťovým meniskem-modifikovaná amalgámová elektroda, jejíž vlastnosti jsou blízké vlastnostem HMDE [31].

2.1.2 Uhlíkové pracovní elektrody

Na rozdíl od výše uvedených rtuťových elektrod lze uhlíkové elektrody úspěšně používat při sledování oxidačních procesů probíhajících při kladných potenciálech. Redoxní (v případě NK oxidační) a tenzametrické děje lze na uhlíkových elektrodách měřit podobně jako na elektrodách rtuťových, ale nelze pomocí nich detekovat změny sekundární struktury DNA s takovou citlivostí., Proto jsou uhlíkové elektrody méně vhodné ke studiu malých poškození DNA [32]. Mezi uhlíkové elektrody se řadí pastové uhlíkové elektrody (CPE), elektrody ze skelného uhlíku (GCE), tištěné uhlíkové elektrody (SPCE), elektrody z pyrolytického grafitu (PGE), elektrody z vysoce orientovaného pyrolytického grafitu (HOPGE) a elektrody z grafitové tuhy [33].

2.1.3 Pevné kovové a jiné pracovní elektrody

Kovové pracovní elektrody používané v elektrochemické praxi jsou ze zlata, platiny [34], bismutu [35] nebo stříbra [36] a dále např. z oxidu india dopovaného cínem (ITO) [37]. Pravděpodobně největší uplatnění našly zlaté elektrody, které se i přes jejich složitou obnovu povrchu a zdlouhavou přípravu samoorganizujících se vrstev (self-assembling monolayer, SAM) chemisorpcí thiolovaných oligonukleotidů, obvykle využívají k přípravě (nejen elektrochemických) DNA biosenzorů [38-40].

K dispozici jsou i (komerčně dostupné) tištěné zlaté elektrody potažené SAM s imobilizovanými hybridizačními sondami [41].

2.2 Elektrochemická analýza DNA

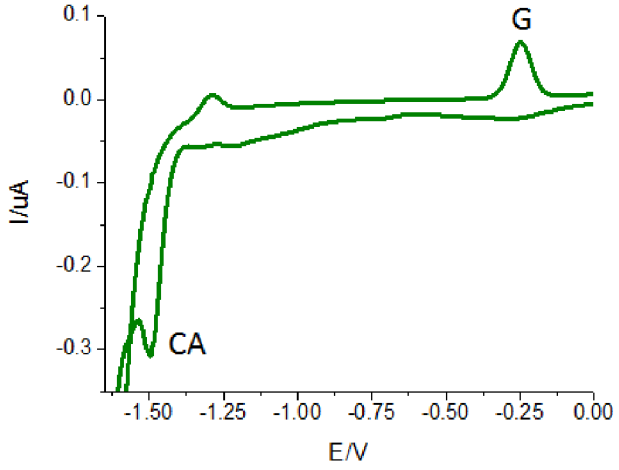
Existuje mnoho elektrochemických metod, které se dají uplatnit při analýze DNA. Obecně se dají rozdělit několika způsoby, např. podle toho, zda je na elektrodu vkládáno kontrolované elektrické napětí, resp. potenciál, a měřenou veličinou je proud procházející pracovní elektrodou (potenciostatické metody) nebo je kontrolován elektrický proud a měřenou veličinou je potenciál (galvanostatické metody). Ke galvanostatickým metodám se řadí chronopotenciometrie, při které jsou látky vyloučené v podobě depozitu na povrchu pracovní elektrody rozpouštěny za konstantního proudu v čase, a coulometrie, při které se měří celkový náboj prošlý elektrodou za daný čas. Z potenciostatických metod bych uvedla několik typů voltametrie, které se k analýze DNA, potažmo NK, používají nejčastěji. U voltametrických metod se měřený signál skládá z faradaických proudů v důsledku elektrodových reakcí a z nabíjecího proudu, který obecně omezuje citlivost techniky.

2.2.1 Lineární voltametrie (Linear Sweep Voltammetry, LSV)

Při LSV je měřena proudová odezva v závislosti na potenciálu lineárně se měnícím v čase.

2.2.2 Cyklická voltametrie (Cyclic Voltammetry, CV)

CV vychází z lineárně rostoucího potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu, který po dosažení maxima opět lineárně klesá. Přenos elektronů mezi elektrodou a měřenou látkou se projeví oxidačními a redukčními píky na voltamogramu (viz obr. 3). CV se používá také k prvotní analýze neznámých látek, protože na základě naměřených píků a jejich charakteru lze odhadnout povahu probíhajícího elektrochemického děje a jeho reverzibilitu. Pokud zkoumaná látka podléhá reverzibilní elektrodové reakci, je v anodickém směru od více negativních k pozitivnějším hodnotám potenciálů oxidována (je naměřen oxidační pík) a v katodickém směru redukována (je přítomen redukční pík), přičemž oba píky se vyskytují při velmi podobných hodnotách potenciálu. Tato cyklická reakce může být měřena i opakovaně.



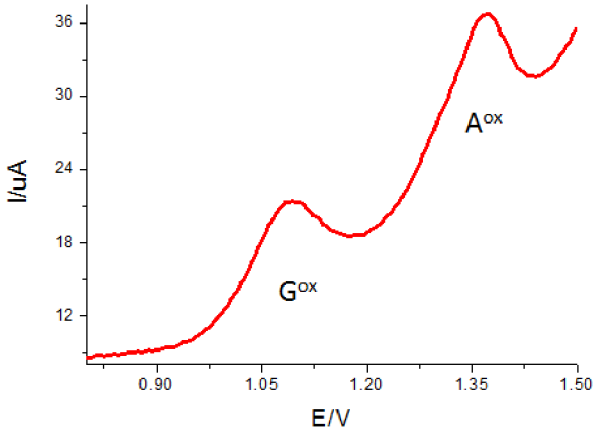
***Obr. 3**: Cyklický voltamogram PCR produktu měřený pomocí CV na HMDE, pík CA odpovídá přímo redukci A a C, pík G odpovídá oxidaci redukčního produktu G.*

2.2.3 Diferenční pulzní voltametrie (Differential Pulse Voltammetry, DPV)

DPV je pulzní metodou, při níž je hodnota proudu odečítána v přesně definovaném čase po vložení napěťového pulzu. V DPV jsou půlobdélníkové pulzy superponovány na napěťovou rampu lineárně se měnící v čase. K odečtení hodnoty proudu dochází těsně před vložením a těsně před ukončením pulzu (tímto způsobem je eliminován vliv nabíjecího proudu). Křivka voltamogramu, která je výsledkem měření, je rozdílem těchto hodnot.

2.2.4 Voltametrie se superponovaným pravoúhlým napětím (Square Wave Voltammetry, SWV)

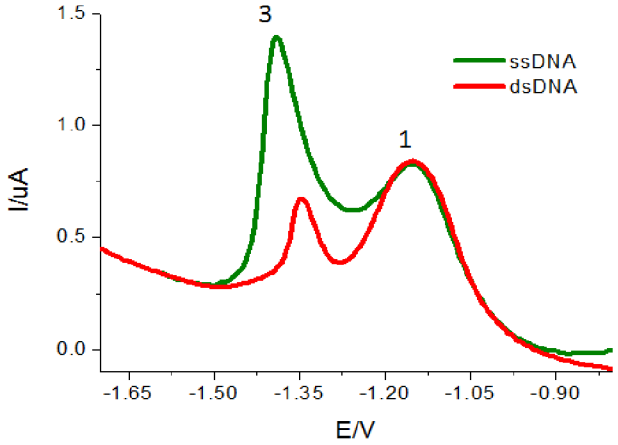
SWV je, stejně jako DPV, pulzní metoda, během níž je na elektrodu vnášen lineárně se měnící potenciál modulovaný napěťovými pulzy. Proud se měří na konci každého negativního a následujícího positivního pulsu (vzhledem k potenciálové rampě). Naměřené hodnoty se od sebe odečítají a hodnota proudu naměřená na konci pulsu odpovídá především faradickým dějům na elektrodě. U metody SWV je výhodou velmi efektivní odstínění šumu a použití u vzorků s nanomolárními koncentracemi. Je vhodná především k citlivé detekci reverzibilních elektrochemických dějů. Voltamogram získaný metodou SWV je na obrázku č. 4.



***Obr. 4**: Voltametrická křivka získaná metodou AdTS SWV při oxidaci purinových bází PCR produktu na elektrodě z pyrolytického grafitu.*

2.2.5 Voltametrie s vnuceným střídavým napětím (Alternating Current Voltammetry, ACV)

Během voltametrie s vnuceným (superponovaným) střídavým napětím je měřena proudová odezva pracovní elektrody v závislosti na lineárně se měnícím potenciálu, na který je superponováno střídavé napětí sinusového průběhu o malé amplitudě (~10 mV) a zvolené frekvenci (obvykle 50 – 240 Hz).



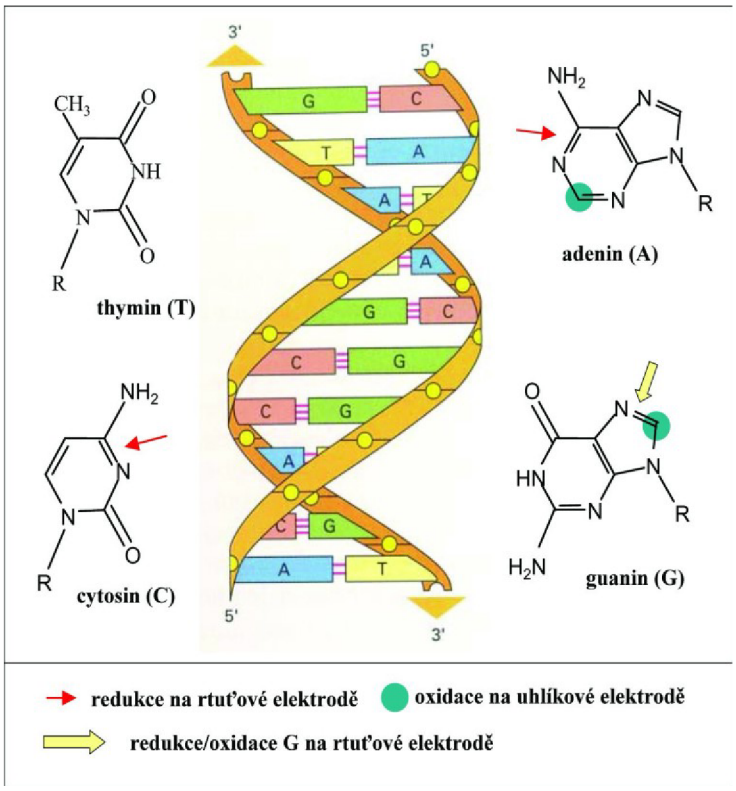
***Obr. 5**: Obrázek voltamogramu AdTS ACV jednořetězcové (ssDNA, zelená) a dvouřetězcové (dsDNA, červená) DNA měřených na HMDE ve směru od méně negativních do více negativních potenciálů. Pík 1 odpovídá desorpci cukrfosfátové páteře a pík 3 odpovídá desorpci nukleobází.*

Jak bylo zmíněno výše, měřený signál se skládá z faradaických a nabíjecích proudů. Odseparování těchto dvou druhů proudů je možné měřením pomocí fázově citlivé ACV v modech *phase-in* a *phase-out*. Velikost a tvar maxima výrazně závisí na rychlosti přenosu náboje, tzn. reverzibilitě procesu. ACV je využívána zejména pro měření tensametrických (kapacitních) signálů vznikajících během adsorpčně-desorpčních dějů na rtuťových nebo amalgámových elektrodách.

2.3 Elektrodové děje jimž podléhají NK na rtuťových a uhlíkových elektrodách

Procesy, které probíhají na elektrodách mezi měřenou látkou a elektrodovým povrchem, je možné měřit celou řadou elektrochemických metod (viz níže). Pokud jsou tyto děje důsledkem elektrolýzy v difúzní vrstvě na povrchu elektrody (rozhraní měřícího elektrolytu a elektrody), nazýváme je redoxními, případně faradaickými, protože se řídí Faradayovým zákonem (množství elektrochemicky přeměněných elektroaktivních skupin závisí přímo úměrně na elektrickém proudu procházejícím elektrolytem a na čase, po který elektrický proud procházel). Procesy, které jsou zaznamenány ve dvojvrstvě mezi NK a elektrodou po polarizaci elektrody elektrickým proudem odpovídají adsorpci a desorpci NK, nazývají se tenzametrické nebo kapacitní, protože dochází ke změně hodnoty (kapacity) proudu, kterým je elektroda polarizována.

Z obrázku č. 6 je patrno, že primární redukční místa A a C (červené šipky) jsou uložena směrem do středu dvoušroubovice DNA v důsledku čehož se nativní DNA na rtuťových elektrodách za určitých podmínek jeví jako elektrochemicky inaktivní. Naproti tomu denaturovaná DNA poskytuje na rtuťových elektrodách výrazné signály, protože volně přístupné báze se na elektrodu velmi dobře adsorbují. Primární oxidační místo A a část imidazolového kruhu molekuly G zodpovědné za jeho elektrochemickou aktivitu na obou typech elektrod jsou lokalizovány směrem ven z dvoušroubovice v jejích žlábcích. Přístupnost těchto míst se projevuje relativně malými rozdíly elektrochemické odezvy nativní a denaturované DNA související s redox přeměnami příslušné báze na rtuťové i uhlíkové elektrodě [42].



***Obr. 6**: Dvoušroubovice DNA a strukturní vzorce adeninu, thyminu, cytosinu a guaninu s vyznačenými skupinami, které podléhají redoxním přeměnám na rtuťové a uhlíkové elektrodě za vzniku analyticky využitelných signálů. Orientace vzorců bází odpovídá jejich orientaci v dvoušroubovici (převzato z [43]).*

2.3.1 Redoxní děje

Elektrochemická redukce nukleobází je možná v kyselém pH v protonizovaném stavu. V mírně kyselém nebo neutrálním prostředí lze na rtuťových elektrodách získat redukční signály A, C a G. T resp. U se ve vodných elektrolytech jeví jako neaktivní [7, 44]. K redukci A a C vázaných v řetězci NK o náhodné sekvenci dochází na HMDE při téměř shodném potenciálu okolo -1,5 V a jejich společný signál se označuje jako pík CA (obr. 3). Pík G detekovaný na HMDE při anodickém skenu okolo potenciálu -0,3 V, je vlastně signálem oxidace redukčního produktu této báze. K redukci G dochází při velmi negativních potenciálech (min. -1,6 V) [45-47]. Na jiných než rtuťových a amalgámových elektrodách není možné redukci G provést kvůli jejich nedostatečnému potenciálovému oknu v katodické oblasti.

Oxidaci (purinových) nukleobází lze měřit pouze na uhlíkových a zlatých elektrodách, protože báze jsou ochotny odevzdávat elektrony až při potenciálech okolo

+1 V, a to na amalgamových a rtuťových elektrodách není možné, jelikož rtuť a další složky amalgamů se rozpouští již při +0,2 V [30]. Hodnoty potenciálů, při kterých dochází k redukci nebo oxidaci DNA na rtuťových a uhlíkových elektrodách jsou shrnuty v tabulce 1 [17].

***Tab. 1**: Redukce a oxidace adeninu, guaninu a cytosinu na elektrodách ([17]; upraveno)*

DNA báze	Elektrodový materiál	Elektrodový proces	Potenciál vs. SCE	Citlivost ke struktuře DNA
Adenin	Rtuť	Redukce	-1.5	+++
	Uhlík	Oxidace	+1.2 [a]	+
Guanin	Rtuť	Red/ox [b]	-0.3 [b]	+
	Uhlík, ITO	Oxidace	+1.0 [a]	+
Cytosin	Rtuť	Redukce	-1.5	+++

[a] významná závislost na materiálu uhlíkové elektrody a použitého elektrolytu;
[b] guanin je redukován na rtuťových elektrodách při potenciálech nižších než -1.6 V a jeho redukční produkt, 7,8-dihydroguanin, může být oxidován zpět na guanin a poskytovat anodický pík G kolem potenciálu -0,3 V;

2.3.2 Adsorpčně-desorpční děje

Adsorpce a desorpce NK na rtuťových nebo amalgámových elektrodách je ovlivněna nábojem elektrody a hodnotou vkládaného potenciálu. Pokud nejsou negativně nabité fosfáty v řetězci dostatečně odstíněny (při nízké iontové síle), váže se DNA na povrch elektrody v oblasti potenciálů, ve kterých povrch elektrody nese pozitivní náboj, elektrostaticky cukrfosfátovou páteří, zatímco v oblasti negativního náboje elektrody dochází k odpuzování dvouřetězcové DNA a elektrody. Pokud je zajištěno dostatečné vysycení záporných nábojů cukrfosfátové páteře, dsDNA se chová jako neutrální molekula a nedochází k odpuzování mezi jednotlivými molekulami DNA ani mezi DNA a elektrodou, čímž se zvýší i pokrytí elektrody.

V závislosti na struktuře DNA lze pak na rtuti naměřit tři tenzametrické signály [48] jejichž charakter závisí na tom, jaká složka molekuly DNA se adsorpčně-desorpčních dějů účastní [18]. Jednořetězcová i dvouřetězcová DNA poskytuje kolem potenciálu -1,2 V tzv. pík 1 odpovídající desorpci cukrfosfátové páteře. Pokud se na povrch elektrody adsorbují zbytky bází v ssDNA nebo v dsDNA obsahující jednořetězcové úseky, dochází k jejich desorpci při více negativních potenciálech, a to v oblasti kolem -1,4 V; přitom se objevuje tzv. pík 3. Nativní, nadšroubovicová (sc) DNA pík 3 neposkytuje, protože nemá žádné volné báze, které by se mohly adsorbovat na elektrodu. Pokud v některých místech dsDNA došlo k odvinutí dvoušroubovice, ale

nikoli k rozpadu párů bází (např. vlivem vmezeření interkalátoru), okraje bází mohou interagovat s povrchem elektrody a dávat další specifický signál označovaný jako pík 2 kolem -1,3 V [49].

2.4 Adsorptivní rozpouštěcí a přenosové techniky

Pod pojmem rozpouštěcí technika je skryta metoda využívající schopnosti stanovované látky se silně adsorbovat a akumulovat na povrchu rtuťových nebo uhlíkových elektrod. Díky akumulaci byla značně zvýšena citlivost detekce, což umožňuje práci se vzorky s velmi nízkými koncentracemi např. DNA [50]. Nejdříve je vzorek na povrchu elektrody zakoncentrován při vhodném potenciálu a poté je při jiném potenciálu katodicky nebo anodicky „rozpouštěn“, tzn., že elektroaktivní složka je redukována nebo oxidována. Vzorek je měřen v závislosti na průchodu elektrického proudu. . Pozn.: pojem „rozpouštění“ („*stripping*“) je převzat z analýzy kovů a malých molekul, kdy dochází skutečně k rozpouštění (anodické oxidaci, desorpci) akumulovaného analytu při měření analytického signálu.

Dalším krokem ke snižování množství vzorku pro elektrochemickou analýzu bylo oddělení akumulačního a detekčního kroku. Zatímco konvenční měření bez přenosu (adsorptivní rozpouštěcí voltametrie, AdSV) jsou celá prováděna v roztoku s analytem, ve kterém jsou ponořeny elektrody, přenosové techniky jsou založeny na adsorpci analytu na pracovní elektrodu z velmi malých objemů (v řádu mikrolitrů) a následném přenosu do základního elektrolytu, v němž už stanovovaná látka není přítomna [51]. Tato technika se nazývá adsorpční přenosová rozpouštěcí voltametrie (AdTSV) a její nespornou výhodou je, že adsorbovat DNA na elektrodu lze v podstatě z libovolného prostředí. Mezi adsorpcí a měřením lze DNA-modifikovanou elektrodu omýt od volné DNA nebo ji vystavit působení jiných látek, např. interkalátorů, enzymů, hybridizačních sond, kovalentně se vázajících látek apod. Adsorpce NK na povrch elektrody je dostatečně silná na to, aby takovými přenosy nebyla oslabena NK z elektrody odstraněna. O elektrodách s akumulovanou DNA na povrchu pak hovoříme jako o elektrodách modifikovaných DNA.

3 Elektrochemické značení nukleových kyselin

3.1 Elektroaktivní značky nukleových kyselin

Přesto, že jsou NK elektrochemicky aktivní a jejich redoxní i tenzametrické signály lze využít v mnoha analytických metodách, vhodným doplněním detekce DNA na základě její vlastní elektroaktivity jsou metody založené na nekovalentní interakci DNA s elektrochemicky aktivním indikátorem. Tyto interakce mohou být elektrostatické, strukturně nespecifické (vně dvoušroubovice), mohou mít charakter vazby do žlábku dvoušrobovice nebo vmezeření (interkalace) mezi páry bází v dsDNA. Další možností je kovalentní modifikace NK elektroaktivními skupinami, zavedenými chemickými reakcemi přirozených složek NK, nebo inkorporací modifikovaných nukleotidů pomocí enzymů. Všeobecně je při použití značek zvýšena selektivita a citlivost detekce a zároveň lze volit elektrodu dle potřeb analýzy ze širšího spektra elektrodových materiálů (shrnuto v [42]).

3.1.1 Nekovalentně interagující redoxní indikátory

Nekovalentní elektroaktivní značky jsou akumulovány na/v molekule DNA, která je adsorbována na povrchu elektrody. Velmi často jsou používány látky vmezeřující se do DNA (interkalátory), což jsou z velké části protinádorová léčiva [52-54] a současně/nebo heterocyklické sloučeniny [55, 56]. Mezi interakce na povrchu molekuly DNA patří elektrostatické interakce s kovovými komplexy [57-59] a interakce s látkami vázajícími se do malého nebo velkého žlábku dvoušroubovice [60-62]. Pomocí těchto indikátorů je možné rozlišit dsDNA od ssDNA na základě jejich rozdílné afinity k té i oné formě DNA.

3.1.2 Kovalentně navázané elektroaktivní značky

Mezi první kovalentně vázané elektrochemicky aktivní skupiny využité pro značení DNA patří komplexy oxidu osmičelého s dusíkatými ligandy pyridinem [63] a 2,2´-bipyridinem [64], které se dají využít ke studiu lokálních struktur nadšroubovicové DNA [65]. Později začal být ke kovalentnímu značení hybridizačních sond hojně využíván ferocen [66-68], kovalentně vázané komplexy ruthenia [69], platiny [70], organické redukovatelné nebo oxidovatelné skupiny jako nitrofenyl ($-NO_2$) nebo

aminofenyl (-NH_2) [71] a též zmiňovaný daunomycin (jinak používaný jako interkalátor), který lze přes linker navázat např. k N2 guaninu [72]. Kovalentně značené sondy lze využít v analogických detekčních principech jako všeobecně užívané optické metody, např. DNA biosenzory [73]. Elektrochemická detekce je ale obecně levnější a neméně citlivá alternativa [74].

3.1.3 Enzymatická inkorporace elektrochemicky značených nukleotidů

Dodatečné značení bází v přirozené DNA je pro zvýšení signálu samotné DNA a detekci případných poškození nebo vzniku lokálních struktur velmi přínosná (viz výše). Avšak pomocí prodlužování primeru (primer extension, PEx) [75] nebo PCR [71] lze s využitím polymeráz podle přirozené templátové DNA začlenit do nově vznikajících řetězců DNA nukleotidy, které byly kovalentně naznačeny již před inkorporací. Elektrochemicky aktivní značka je většinou navázána na zvolenou bázi přes linker [69, 76, 77]. Je ale možné použít i analogy bází, které nenarušují Watson-Crickovo párování bází, jejich signál se objevuje v jiné oblasti potenciálů a lze jej tedy snadno odlišit od signálu neznačené DNA [78].

3.2 Enzymatická amplifikace signálu

Obecně je výhodné pro amplifikaci signálu využít jako značky enzymy. Enzymatická přeměna substrátu na produkt, který se liší od substrátu svými elektrochemickými vlastnostmi, může posloužit jako nepřímá detekce interakce DNA s konkrétními molekulami. Nejčastěji jsou v elektrochemii DNA využívány peroxidázy a alkalická fosfatáza (ALP). Tyto enzymy mají široké spektrum substrátové specifity. ALP například dokáže přeměnit 1-naftylfosfát na elektrochemicky aktivní naftol oxidovatelný na uhlíkových elektrodách [79, 80]. Peroxidázu je možné využít společně s uhlíkovými [81] nebo ITO [82] elektrodami, na kterých je možné měřit oxidaci substrátu za současné přeměny peroxidu vodíku na vodu. Enzymy jsou většinou k DNA připojeny prostřednictvím afinitní vazby (strept)avidin-biotin, kdy biotin je navázaný na DNA a se (strept)avidinem je konjugovaný enzym. Komerčně dostupné jsou také enzymy konjugované se sekundárními protilátkami, přes které je možné vyvázat z roztoku primární protilátku navázanou na příslušnou molekulu zájmu. Případné biosenzory využívající při detekci protilátky a enzymovou katalýzou, jsou citlivou a

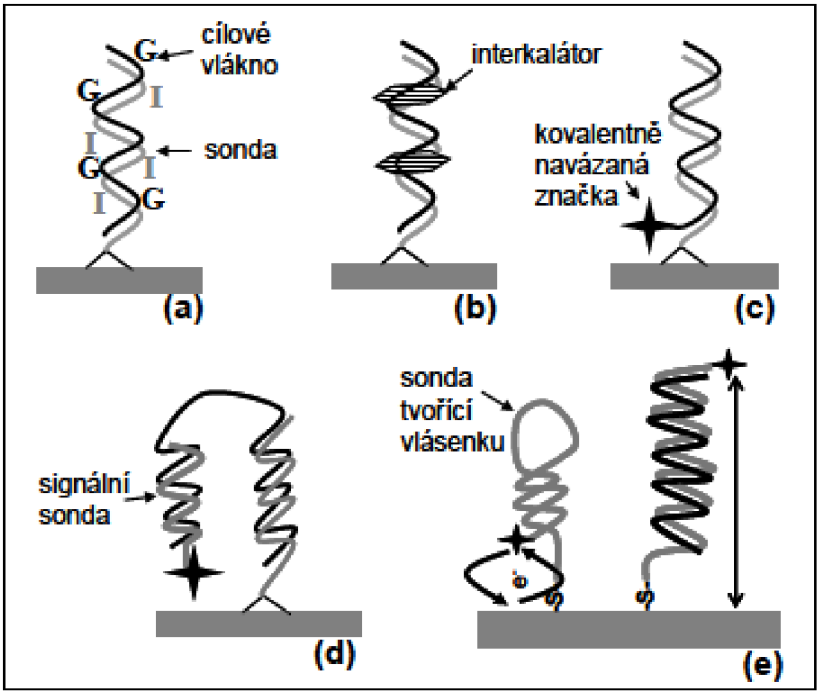
vysoce specifickou alternativou ELISA metodám, které běžně využívají kolorimetrickou detekci výsledného produktu [83, 84].

3.3 Elektroaktivní fluorofory

Fluorescenční značky a sondy patří mezi tzv. nevlastní fluorofory. Na NK se váží buď kovalentně přes skupiny postranních řetězců NK (v tomto případě bývají označovány jako „značky“) nebo nekovalentně a po navázání mění své fluorescenční vlastnosti („sondy“). Princip interakce s NK je podobný jako u elektrochemicky aktivních značek a sond [85, 86]. Některé fluorescenčně aktivní molekuly jsou zároveň detekovatelné elektrochemicky a naopak [87-90]. Studium nově syntetizovaných fluorescenčních molekul dnes už tedy zahrnuje i elektrochemické metody [62, 89] a elektrochemie tím rozšiřuje své pole působnosti na další aplikace.

4 Elektrochemické DNA-biosenzory

Biosenzory jsou obvykle složeny z biologického rozpoznávacího prvku propojeného s převodníkem signálu, který dokáže rozpoznanou událost (interakci biomolekul na povrchu) převést na měřitelnou fyzikální veličinu. Na povrch elektrody lze adsorbovat různé vrstvy vodivých i nevodivých látek a to ireversibilně, kovalentně přes vhodný linker nebo samoorganizací komponentních molekul (podrobně v [91]). Elektrochemické DNA-biosenzory jsou elektrody s imobilizovanými, obvykle jednořetězcovými, molekulami DNA (ssDNA) o definované sekvenci (sondy) nebo elektrody s imobilizovanou cílovou DNA (tDNA), které lze ponořit do roztoku se značenou sondou (shrnuto v [92]). Pro detekci hybridizace sondy s cílovou DNA lze použít následující přístupy, které jsou shrnuty v obrázku č. 7.



Obr. 7.: *Principy využívané při vývoji DNA-biosenzorů pro hybridizaci DNA.*
(a) *Sonda zakotvená na povrchu elektrody obsahuje místo zbytků guaninu zbytky hy-poxanthinu (I = inosin, tj. nukleosid hypoxanthinu).* ***(b)*** *Příklad látky selektivně vyhledávající duplex vzniklý na povrchu elektrody, jejíž signál je následně detekován.* ***(c)*** *Cílové vlákno je kovalentně modifikováno elektrochemicky aktivní skupinou.* ***(d)*** *Na povrchu elektrody je vytvořen molekulární „sendvič“ z imobilizované sondy, cílového vlákna a druhé, signální sondy.* ***(e)*** *Elektrochemický „molekulární maják“ (převzato z [93]).*

4.1 Vlastní elektroaktivita DNA

Jsou-li v hybridizační sondě nahrazeny guaninové zbytky hypoxantinem (derivátem purinu párujícím se s cytosinem, ale poskytující elektrochemický signál při jiném potenciálu než G [94]), objeví se pík oxidace G až po hybridizaci s DNA, která tuto bázi obsahuje [95] (Obr. 7a). Existuje i varianta se zprostředkováním oxidace guaninu v hybridizované DNA mediátory, např. komplexy ruthenia na zlaté, nebo ITO elektrodě [96]. Jinou možností je využití rozdílu diferenciální kapacity elektrodové dvojvrstvy v důsledku tvorby duplexu DNA [97]. Na pozitivně nabité uhlíkové elektrody se ssDNA váže elektrostaticky cukr-fosfátovou páteří, takže báze zůstávají přístupné pro hybridizaci, kdežto na rtuťovou elektrodu se báze naadsorbují tak, že nejsou pro komplementární řetězec dosažitelné a k interakci nedojde [98].

4.2 Elektroaktivní indikátory

Tento přístup využívá elektroaktivních látek, které se vážou na dvouřetězcovou DNA (dsDNA) s výrazně vyšší afinitou než na ssDNA. Mezi tyto látky patří interkalátory (Obr. 7b) a látky vázající se do malého nebo velkého žlábku dvoušroubovice. Pokud na povrchu elektrody vznikla dvouřetězcová DNA, projeví se to na výšce signálu interkalátoru v důsledku jeho akumulace ve vrstvě duplexu [54]. Citlivější detekce hybridizace bylo dosaženo s tzv. bisinterkalátory, které obsahují dvě interkalující se skupiny kovalentně spojené linkerem o vhodné délce a vážou se na DNA s vyší afinitou díky kooperativnímu efektu [99].

4.3 Kovalentně vázané elektroaktivní značky nebo enzymy

Pokud je k hybridizační sondě nebo cílové DNA kovalentně připojena elektroaktivní značka nebo enzym (přeměňující substrát na elektrochemicky aktivní produkt), je možné rozpoznat přítomnost jejich nositele bez ohledu na nukleotidové složení jednoho nebo druhého vlákna (Obr. 7c). Pokud je tedy signál značky nebo enzymového produktu přítomen, víme, že došlo na povrchu elektrody k hybridizaci DNA. Pokud potřebujeme detekovat DNA se známou sekvencí, vhodnou metodou je tzv. sendvičová (dvoukroková) analýza využívající dvou hybridizačních sond (Obr. 7d). Vlákno tDNA je nejprve hybridizováno se záchytnou sondou imobilizovanou na povrchu elektrody a ve druhém kroku s druhou, signální sondou značenou elektrochemicky aktivní skupinou [100] nebo enzymem [80].

Redoxní značky lze navázat i přímo na jednotlivé nukleobáze a následně je inkorporovat do DNA pomocí DNA polymeráz technikami prodlužování primeru nebo PCR [101]. Nukleosidtrifosfátů značených různými redox aktivnímu skupinami bylo již mnohokrát využito k tzv. „vícebarevnému“ elektrochemickému značení DNA [69, 100, 102]. Mezi tyto elektroaktivní značky řadíme např. komplexy oxidu osmičelého [76, 100], ferocen [66, 75], nitrofenyl a aminofenyl [71] a další. Enzymy katalyzující konverzi inaktivního substrátu na elektrochemicky aktivní produkt jsou nejčastěji peroxidáza z křenu selského [84] nebo alkalická fosfatáza [103].

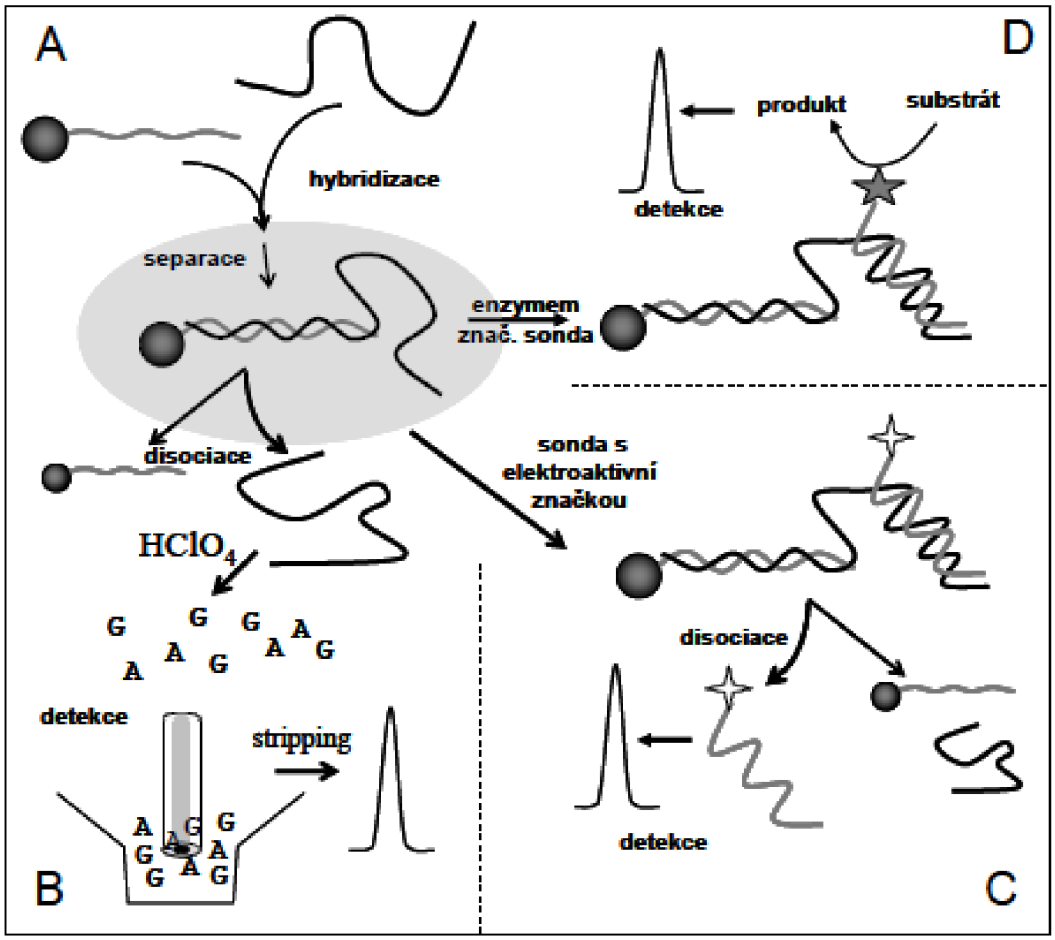
Elektrochemickou obdobou fluorescenčních molekulárních majáků je imobilizovaná sonda v podobě vlásenky, která nese na svém druhém konci elektroaktivní značku (Obr. 7e). Pokud sonda zhybridizuje s komplementárním

řetězcem tDNA, ztratí formu vlásenky, dojde k oddálení elektrochemické značky od povrchu elektrody a vymizí elektrochemický signál [104].

4.4 Dvoupovrchové elektrochemické techniky

Poprvé byly mikročástice z paramagnetického materiálu použity pro hybridizaci DNA v souvislosti s elektrochemickou detekcí v roce 2001 v americké laboratoři Josepha Wanga [105] a nezávisle v české laboratoři Emila Palečka [106]. Pokud chceme detekovat konkrétní vlákno DNA nebo RNA ve vzorku, je z praktických důvodů výhodné jeden z hybridizujících řetězců, ať sondu nebo NK, imobilizovat na nějakém povrchu. Pokud je takovým povrchem měřící elektroda, mluvíme o elektrochemickém biosenzoru pro hybridizaci DNA (viz výše). Chceme-li zjednodušit optimalizaci detekční metodiky a zvýšit účinnost zachycení analyzovaného vlákna DNA ze vzorku, je vhodné oddělit hybridizační a elektrochemickou část detekce a optimalizovat podmínky zvlášť. Magnetické mikročástice jsou pro tento účel výborným nástrojem [107]. Příklady jednotlivých detekčních technik používaných v kombinaci s imobilizací DNA na magnetických částicích jsou uvedeny v obrázku č. 8.

Ve srovnání s běžnou pracovní diskovou (či kapkovou) elektrodou s hladkým povrchem mají magnetické částice velký souhrnný povrch, čímž dojde k vychytání většího množství studované DNA. Komerčně dostupné magnetické mikročástice na svém povrchu nesou různé biorekogniční prvky (streptavidin, oligo$(T)_{25}$, protilátku, proteiny vázající protilátky apod.). Pomocí vhodného afinitního adaptoru a jeho specifického protějšku navázaného na studovaném úseku DNA, např. systém streptavidin-biotin, oligo$(T)_{25}$-oligo$(A)_{25}$, protilátka-protein, je tDNA navázána na tuto částici. V následujícím kroku je možné tDNA pomocí magnetu přitáhnout ke stěně mikrozkumavky a separovat je tak od supernatantu. Opakováním magnetoseparační procedury je možno částice promýt od nežádoucích složek a případně zakoncentrovat. Hybridizované řetězce tDNA nebo sondy lze z magnetického nosiče oddělit a stanovit je pomocí libovolné elektrody a elektrochemické techniky [103, 108].



***Obr. 8**: Příklady elektrochemických dvoupovrchových technik detekce hybridizace DNA. **(A)** cílové vlákno DNA je zachyceno na magnetickém nosiči s imobilizovanou sondou. Tuto proceduru lze kombinovat s různými detekčními technikami, např.: **(B)** stanovení zachycené cílové DNA založené na její částečné kyselé hydrolýze a detekci purinových bází rozpouštěcími voltametrickými metodami; **(C)** využití signální sondy značené elektrochemicky aktivní skupinou (např. Os,L). **(D)** využití signální sondy značené enzymem přeměňujícím inaktivní substrát na elektrochemicky aktivní produkt; (převzato z [93]).*

4.5 Detekce mutací a polymorfismů v sekvencích DNA

Zda je určitý gen v určitém místě mutovaný, či zda se v jeho sekvenci vyskytuje jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism, SNP) je možné zjistit i použitím elektrochemických metod. Je-li u pacienta podezření na konkrétní genovou mutaci nebo polymorfismus, můžeme zvolit nepřímou metodu identifikace, jako je hybridizace analyzované DNA se speciální sondou komplementární k dané

sekvenci. Pokud je ve vzorku očekávaná DNA přítomna, vznikne plně komplementární homoduplex. V opačném případě dojde ke vzniku méně stabilního heteroduplexu a jeho sníženou stabilitu ve srovnání s homoduplexem je možno detekovat jakoukouli z metod vhodných pro rozlišení jednořetězcové a dvouřetězcové DNA, včetně výše zmíněných elektrochemických technik [72]. K detekci chybných párů bází lze využít také proteinů, které se na taková místa vážou, např. MutS. Za použití dvoupovrchové techniky byl stanoven signál tyrosinu, potažmo proteinu a tedy polymorfismu na PGE [109].

Další možný postup pro detekci SNP, ve kterém je kromě jiných detekčních principů s výhodou využita elektrochemická detekce, je inkorporace komplementárního značeného nukleotidu naproti nukleotidu v testovaném místě. Této inkorporace docílíme pomocí metody prodloužení primeru, kdy je k templátové DNA přidán primer končící jeden nukleotid „před“ předpokládaným místem bodové mutace spolu se značeným dNTP párujícím se s bází v místě mutace (polymorfismu) v tDNA a s polymerázou [102]. Podobně lze využít značení dNTP biotinem, na který je následně navázán konjugát streptavidinu s vhodným enzymem schopným přeměnit neaktivní substrát na elektrochemicky aktivní produkt [103, 110]. V principu lze pracovat se čtyřmi různě značenými dNTP a v jednom kroku odlišit všechny možné varianty změny v sekvenci [102].

Cíle disertační práce

1. Prozkoumat elektrochemické vlastnosti DNA modifikované enzymaticky inkorporovanými elektrochemicky aktivními značkami

2. Prozkoumat možnosti optického stanovení modifikované DNA

3. Ověřit interakci modifikované DNA s jinými (makro)molekulami

Seznam publikací

1. Dudova, Z.; Spacek, J.; Tomasko, M.; Havran, L.; Pivonkova, H.; Fojta, M., Electrochemical behavior of 7-deazaguanine- and 7-deazaadenine-modified DNA at the hanging mercury drop electrode. *Monatshefte Fur Chemie* **2016**, *147* (1), 3-11.

2. Dudova, Z.; Spacek, J.; Havran, L.; Pivonkova, H.; Fojta, M., Interactions of fluorescent dye SYBR Green I with natural and 7-deazaguanine-modified DNA studied by fluorescence and electrochemical methods. *Monatshefte Fur Chemie* **2016,** *147* (1), 13-20.

3. Horakova, P.; Simkova, E.; Vychodilova, Z.; Brazdova, M.; Fojta, M., Detection of Single Nucleotide Polymorphisms in p53 Mutation Hotspots and Expression of Mutant p53 in Human Cell Lines Using an Enzyme-Linked Electrochemical Assay. *Electroanalysis* **2009,** *21* (15), 1723-1729.

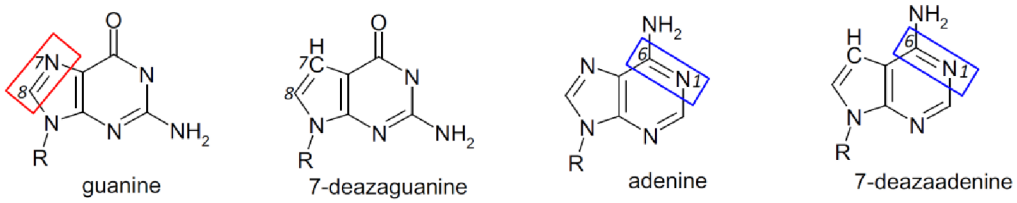
Výsledky a diskuse

Tato část práce obsahuje stručné souhrny publikovaných prací. Ty jsou následně přiloženy v plném znění ve formě reprintů.

1. Elektrochemické chování DNA modifikované 7-deazaguaninem a 7-deazaadeninem na visící rtuťové kapkové elektrodě.

Dudova, Z.; Spacek, J.; Tomasko, M.; Havran, L.; Pivonkova, H.; Fojta, M., Electrochemical behavior of 7-deazaguanine- and 7-deazaadenine-modified DNA at the hanging mercury drop electrode. Monatshefte Fur Chemie 2016, 147 (1), 3-11.

7-deazapuriny (Pu*) jsou analogy přirozených purinových bází, ve kterých byl atom dusíku N7 zaměněn za CH skupinu (obr. 9). Výhodou Pu* je to, že netvoří Hoogstenovy páry (nejsou přítomny v triplexech a kvadruplexech) ačkoliv Watson-Crickovo párování je u nich běžné jako u přirozených purinů. Již dříve bylo publikováno, že elektrochemický signál oxidace 7-deazaguaninu (G*) a 7-deazaadeninu (A*) přítomných v PCR produktech měřených na elektrodě z pyrolytického grafitu (pyrolytic graphite electrode, PGE) se posouvá do nižších potenciálů než jsou oxidační potenciály přirozených guaninů (G) a adeninů (A) [111].



***Obr. 9**: Strukturní vzorce přirozených purinových nukleobází a jejich analogů. Červený obdélník ohraničuje redoxní místo guaninu, modré obdélníky zvýrazňují místo redukce adeninu a 7-deazaadeninu na rtuťové elektrodě. 7-deazaguanin redoxním procesům nepodléhá (viz. text).*

V této práci jsme se zabývali měřením faradaických signálů cyklickou voltametrií (CV) a tensametrických signálů za použití voltametrie s vnuceným

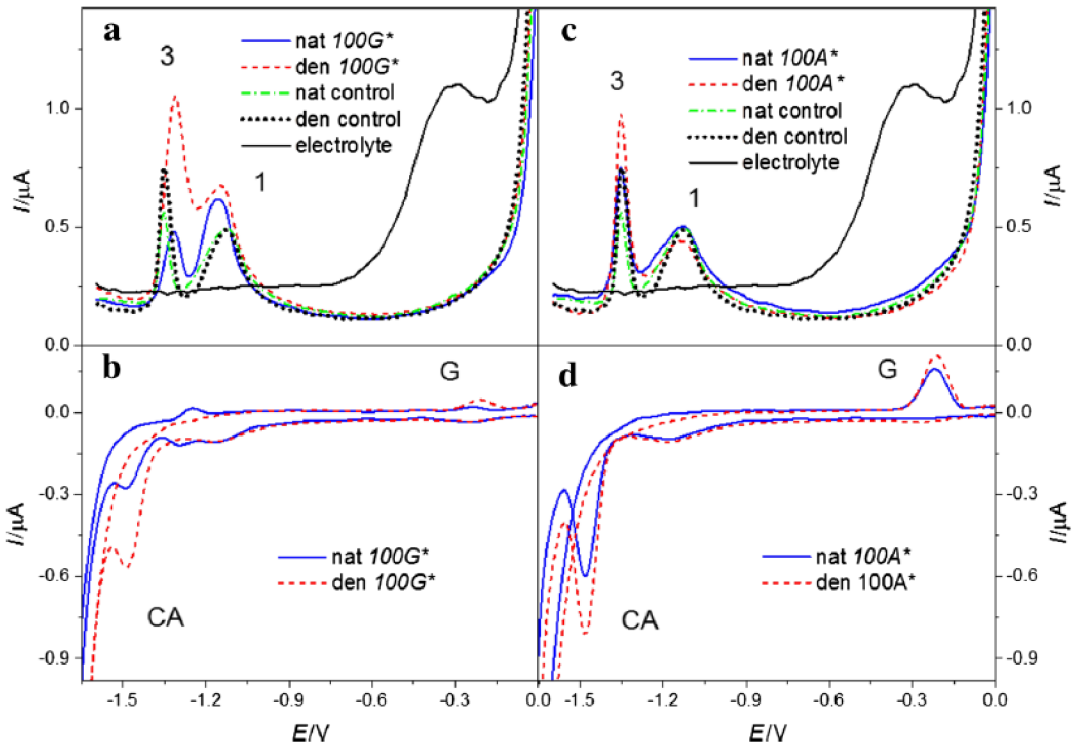
střídavým napětím (alternating current voltammetry, ACV) DNA modifikované G* a A* na visící kapkové rtuťové elektrodě (Hanging Drop Mercury Electrode, HMDE).

Při měření přirozených a 7-deaza deoxyribonukleosid trifosfátů adeninu (dATP) a guaninu (dGTP), resp. dA*TP a dG*TP pomocí CV v roztoku bez přítomnosti dalších nukleobází jsme porovnávali redukční a oxidační procesy korespondujících bází na HMDE. Při nastavení bodu obratu na potenciál -1,85 V jsme v případě dGTP pozorovali ireversibilní anodický pík G kolem -0,23 V, který odpovídá oxidaci redukčního produktu guaninu (7,8-dihydroguanin) [47, 112]. Vzhledem k tomu, že redoxní reakce probíhají u guaninu na dvojné vazbě mezi atomy N7=C8 v imidazolovém kruhu guaninu (G), předpokládali jsme, že tyto procesy nebudou na G* probíhat, protože je u něj N7 atom nahrazen CH skupinou. Vskutku jsme žádný pík analogický píku G nenaměřili. Adenin (A) v dATP a A* v dA*TP poskytoval v obou případech ireversibilní katodické píky způsobené redukcí dvojné vazby mezi atomy N1 a C6 v potenciálech kolem -1,48 V.

Následující měření jsme prováděli již na PCR produktech nemodifikovaných i modifikovaných G* a A* v několika stupních modifikace: 25, 50, 75 a 100 %. Nemodifikovanou DNA pro jednoduchost označujeme *0G**, varianty modifikace pak *25G**, *50G**, *75G** a *100G** dle procent nahrazených Pu*. *100A** DNA se chovala na HMDE velice podobně jako nemodifikovaná kontrolní DNA. Specifické rozdíly jsme našli v lepší separaci redukčního píku cytosinu a adeninu (pík CA) od proudů pozadí během měření CV, v nárůstu výšky píku 3 denaturované i nativní *100A** měřením ACV, což značí lepší přístup bází k povrchu HMDE a lze usuzovat na to, že přítomnost A* destabilizuje dvoušroubovici DNA na povrchu elektrody (obr. 10 c, d). Denaturační analýzou jsme potvrdili, že tato modifikace zvyšuje náchylnost dsDNA k denaturaci i v roztoku.

Během měření *100G** DNA jsme pozorovali značně potlačený anodický pík G (který z důvodu přítomnosti G v primerech použitých pro PCR nebyl nikdy zcela nulový) a částečně snížený pík CA (i když se obsah C a A v modifikované DNA nezměnil). ACV měření odhalila značný vliv G* na adsorpně-desorpční chování DNA. Nejnápadnější byl tento efekt u *100G**, kde se projevil potenciálovými posuny tenzametrických píků a výrazně změněným tvarem AC voltamogramu. Výška píku 3 *100G** duplexu výrazně poklesla v porovnání s denaturovanou *100G** i s kontrolní dsDNA, což je zajímavé v souvislosti s již dříve publikovanou studií týkající se

párování C:G* [113]. V této studii se autoři zabývají alternativními elektrickými vlastnostmi G* heterocyklu a ztrátou kationtů vázaných ve velkém žlábku nemodifikované DNA vlivem náhrady dusíku v poloze 7 CH skupinou. Tato modifikace by totiž mohla ovlivnit organizaci solí a vody ve velkém žlábku duplexu. Denaturační analýza prokázala též destabilizaci duplexu nahrazením nativních guaninů G*, avšak nižší než v případě *100A**.



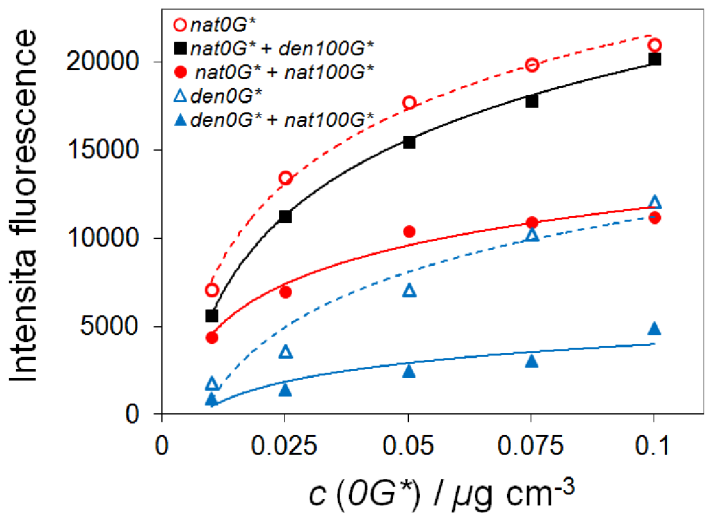
***Obr. 10**: Voltamogramy elektrochemických signálů nativních a denaturovaných PCR produktů s obsahem 100 % G* (**a, b**) nebo 100 % A* (**c, d**). Ukázány jsou voltamogramy naměřené AdTS ACV (**a, c**) a AdTS CV (**b, d**).*

2. Interakce fluorescenčního barviva SYBR Green I s přirozenou DNA a DNA modifikovanou 7-deazaguaninem studovaná fluorescenčními a elektrochemickými metodami

Dudova, Z.; Spacek, J.; Havran, L.; Pivonkova, H.; Fojta, M., Interactions of fluorescent dye SYBR Green I with natural and 7-deazaguanine-modified DNA studied by fluorescence and electrochemical methods. Monatshefte Fur Chemie ***2016,*** *147 (1), 13-20.*

Obecně jsou fluorescenční barviva hojně využívána v molekulární biologii k detekci NK v gelech [114, 115] a roztocích [116], při určování nukleázové nebo telomerázové aktivity [117, 118], ve fluorescenčních zobrazovacích technikách [119], při průtokové cytometrii [120-122], během polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR) [123, 124] nebo v biočipech [125]. Sybr Green I (SG) je jedním z fluorescenčních barviv, které po interakci s dvouřetězcovou (double-stranded, ds) DNA zvýší svou fluorescenci až 1000krát [116, 126]. SG interaguje s dsDNA ve dvou módech: při nízkém poměru SG:DNA dochází především k interkalaci SG, avšak při vysokém poměru se SG váže do malého žlábku dsDNA [126] za přispění elektrostatických stabilizačních sil [127]. Již dříve byly publikovány práce, ve kterých je popsáno, že pokud jsou v dsDNA nahrazeny přirozené guaniny (G) 7-deazaguaniny (G*) nebo jeho deriváty, dochází k fluorescenčnímu zhášení SG [111, 128].

V této práci se pak zabýváme porovnáním interakce SG s nativní i denaturovanou, nemodifikovanou DNA a DNA, ve které bylo nahrazeno určité procento přirozených guaninů 7-deazaguaniny. Zvolili jsme zastoupení 25, 50, 75 a 100 % G* na místo G, které jsme do DNA inkorporovali enzymaticky pomocí PCR. Nemodifikovanou DNA označujeme *0G**, varianty modifikace pak *25G**, *50G**, *75G** a *100G** dle procent nahrazených guaninů G*.

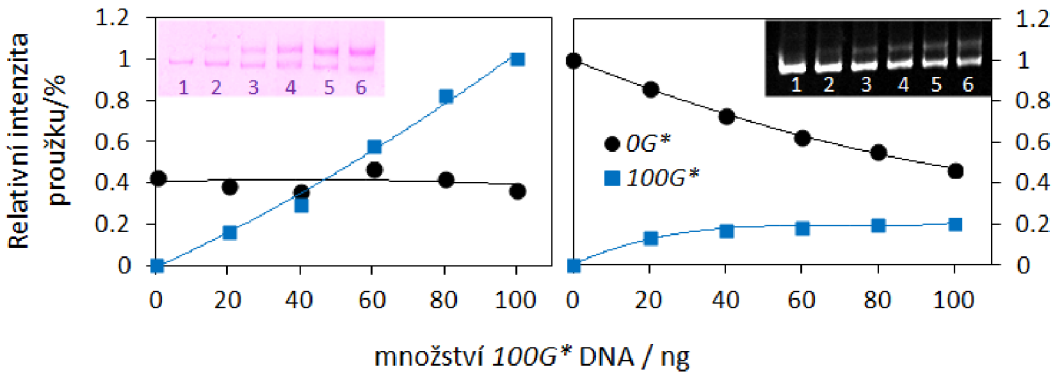


***Obr. 11**: Graf relativních intensit fluorescence naměřených po smíchání nativní (nat) a denaturované (den) 0*G DNA v koncentracích uváděných v grafu s nat nebo den 100G* DNA o stálé koncentraci 0,05 μg ml^{-1}.*

Zhášení fluorescence SG v přítomnosti G*-modifikované DNA jsme využili pro srovnání interakce SG s nemodifikovanými a modifikovanými ss a ds DNA v roztoku. K tomu byly navrženy kompetiční experimenty, jejichž výsledky jsou shrnuty v obr. 11. Intenzita fluorescence vzorku *100G** byla shodná s volným SG v roztoku bez přítomnosti DNA. Ke studiu vlivu *100G** DNA na *0G** DNA-SG komplex v jednom roztoku jsme zvolili uspořádání kdy byla ke konstantnímu množství nativní nebo denaturované *100G** DNA přidávána nemodifikovaná DNA (obr. 11). Přídavkem nativní *0G** DNA k nativní *100G** DNA došlo k poklesu fluorescence o 45 % v porovnání se samotnou nativní *0G** DNA (obr. 11 prázdné a plné kroužky).

V analogickém pokusu s přídavkem denaturované *0G** DNA k nativní *100G** DNA byl naměřen fluorescenční signál o 73 % nižší v porovnání se samotnou denaturovanou *0G** (obr. 11 prázdné a plné trojúhelníky). Tyto pokusy potvrzují silnou selektivitu SG k dvouřetězcové DNA [126, 127] a zároveň ukazují slabou interakci SG s denaturovanou DNA.

Podobných výsledků jsme dosáhli elektroforézou na nativním polyakrylamidovém gelu (PAGE), kde se SG používá k fluorescenčnímu barvení k detekci DNA fragmentů DNA. Do startů na gelu jsme vždy nanesli vzorek s konstantním množstvím *0G** DNA spolu s narůstajícím množstvím *100G** v každém startu.

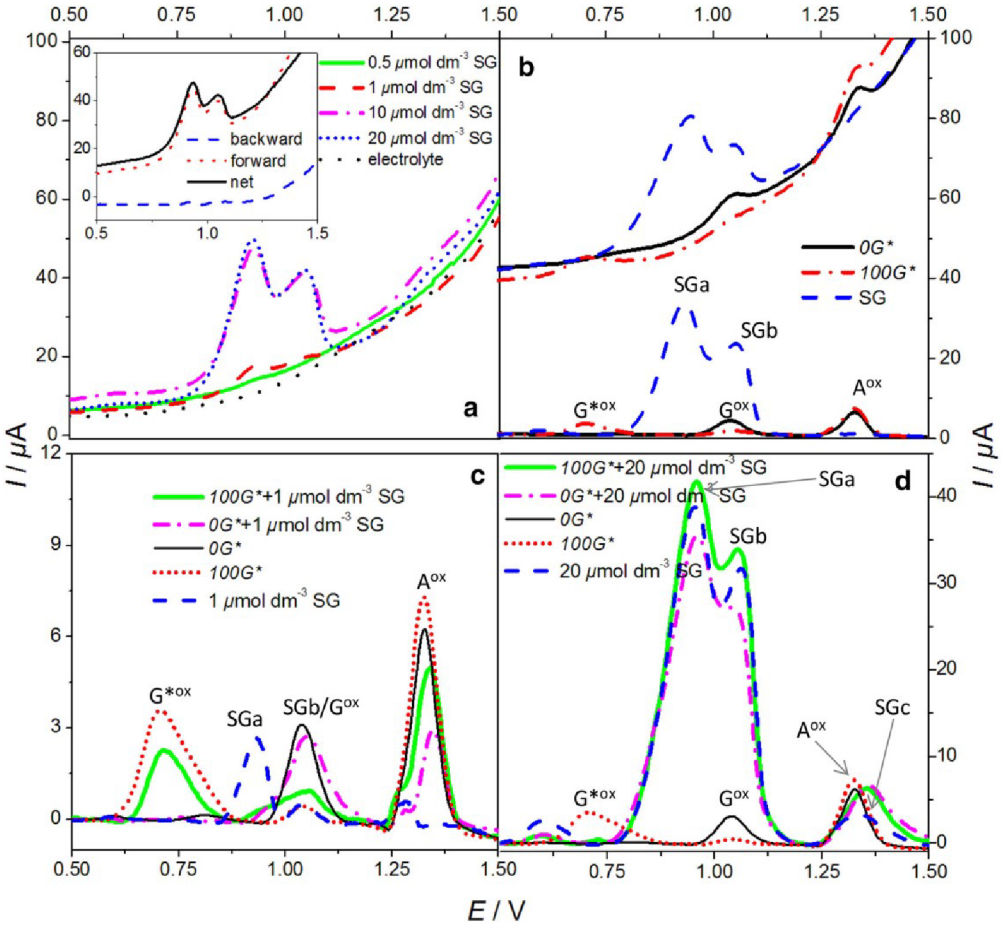


***Obr. 12**: Vliv přídavku rostoucího množství 100G* DNA k neměnnému množství (40 ng) 0G* DNA na relativní intenzitu proužku v PAGE. 100G* DNA vykazuje nižší elektroforetickou mobilitu a odpovídá hornímu proužku, 0G* odpovídá spodnímu proužku. DNA byly naneseny na gel v následujících poměrech 0G*/100G*: 1 – 40:0; 2 – 40:20; 3 – 40:40; 4 – 40:60; 5 – 40:80; 6 – 40:100 ng. Vlevo je sken gelu, který byl obarven pomocí Stains All, vpravo je gel se vzorky předbarvenými SG vizualizován pomocí fluorescence.*

Po nabarvení gelu barvivem Stains All, které barví bez rozdílu nemodifikovanou i G*-modifikovanou DNA [111], byla intenzita proužku *0G** konstantní ve všech startech a *100G** narůstající (obr. 12). Po obarvení vzorků v gelu SG byly změřeny odlišné intenzity proužků v gelu ve srovnání s barvením Stains All. Intenzita fluorescence *100G** byla po barvení SG konstantní, zatímco *0G** plynule klesala s narůstajícím množstvím *100G** (obr. 12 vpravo). Tyto výsledky odrážely distribuci molekul SG (1,25 molekuly SG na 1 nukleotid *0G** DNA) mezi soutěžícími *0G** a *100G** DNA, což vedlo ke snížení počtu molekul SG navázaných na nemodifikovanou DNA a k následnému snížení její fluorescence.

Elektrochemickou oxidaci SG na pastové uhlíkové elektrodě (CPE) dříve popsal Girousi et al. [129]. My jsme zvolili elektrochemické stanovení interakce SG a DNA voltametrií se superponovaným pravoúhlým napětím (square wave voltammetry, SWV) na elektrodě z pyrolytického grafitu (pyrolytic graphite electrode, PGE). Měřením oxidace samotného SG na PGE jsme získali píky SGa (+0,93 V) a SGb (+1,04 V). Pík SGb byl nepatrný při nízkých koncentracích SG ($\leq$ 1 µmol l^{-1}) zatímco při koncentraci SG $\leq$ 5 µmol l^{-1} došlo ke srovnatelnému nárůstu obou píků (obr. 13). Analýzu chování SG na PGE jsme provedli ve dvou módech: (1) adsorptivní rozpouštěcí voltametrií (AdSV) kdy SG byl přítomen v měřícím elektrolytu (akumulace SG adsorpcí z roztoku),

a (2) adsorptivní přenosovou voltametrií (AdTS) kdy SG byl naadsorbován na PGE, elektroda byla poté opláchnuta vodou a přenesena do měřícího pufru. Vzhledem k tomu, že aplikace AdS i AdTS technik vedly ke shodné křivce závislosti výšky píku na koncentraci SG, ze které byla patrná silná adsorpce SG na povrch elektrody, zvolili jsme úspornější variantu AdTS pro následnou analýzu SG-DNA interakce.



***Obr. 13**: Elektrochemická analýza SG v roztoku a v komplexu s dsDNA pomocí SWV na PGE v acetátovém pufru, pH 5. (a) AdS SW voltamogramy SG měřené při jeho různých koncentracích; Inset ukazuje net SW voltamogram a obě jeho složky pro demonstraci ireversibility oxidačního procesu SG. (b) AdTS SW voltamogramy (před a po baseline korekci) SG, 0G* a 100G* dsDNA. (c-d) AdTS SW voltamogramy SG, 0G* nebo 100G* dsDNA, komplexy DNA s SG ve dvou koncentracích po baseline korekci. Koncentrace DNA byla vždy 15 μg ml^{-1}, doba adsorpce 60 s.*

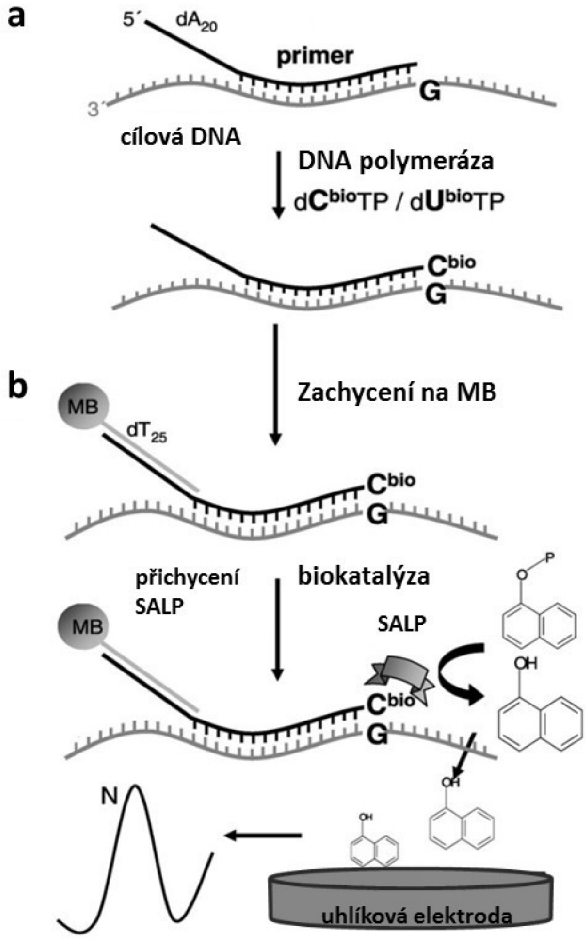
Zajímavým výsledkem měření AdTS SWV na PGE bylo to, že při nízkých koncentracích SG došlo k potlačení píku SGa v obou případech interakce SG s *0G** i *100G** DNA a naopak při vysokých koncentracích SG byl potlačen pík G^{*ox} (což značí silnou adsorpci SG molekul na elektrodu a zamezení akumulace DNA) (obr. 13 c, d). Pík G^{ox} je bohužel ve stejné oblasti potenciálu jako píky SGa a SGb, nelze ho tedy vyhodnotit.

Závislost výšky píku SGa na koncentraci SG v přítomnosti nemodifikované i modifikované DNA dává obdobnou titrační křivku pro oba typy interakce a dá se tudíž usuzovat na stejnou afinitu SG molekul k *0G** i *100G** DNA. Zatímco fluorescenčí pokusy byly použity pro nepřímé potvrzení vazby SG na *100G** DNA snížením fluorescenčního signálu *0G** DNA, elektrochemická analýza nám poskytla měřitelný signál pro detekci interakce SG s DNA nezávislý na modifikaci DNA.

3. Detekce jednonukleotidového polymorfismu v genech pro hotspot mutantní *p53* proteiny a jejich exprese v lidské buněčné linii pomocí elektrochemické analýzy s použitím enzymu

Horakova, P.; Simkova, E.; Vychodilova, Z.; Brazdova, M.; Fojta, M., Detection of Single Nucleotide Polymorphisms in p53 Mutation Hotspots and Expression of Mutant p53 in Human Cell Lines Using an Enzyme-Linked Electrochemical Assay. Electroanalysis ***2009,*** *21 (15), 1723-1729.*

V této práci je popsána metoda detekce SNP v cDNA mutantní *p53* exprimované v lidské buněčné linii za použití techniky reverzně-transkripční PCR v kombinaci s prodlužováním primeru (primer extension, PEx) a elektrochemickou analýzou. Elektrochemická detekce následovala po enzymové přeměně elektrochemicky neaktivního substrátu na elektroaktivní produkt pomocí enzymu navázaného na prodlouženém primeru imobilizovaném na magnetických mikročásticích pomocí afinitního systému biotin-straptavidin (viz obr. 14).



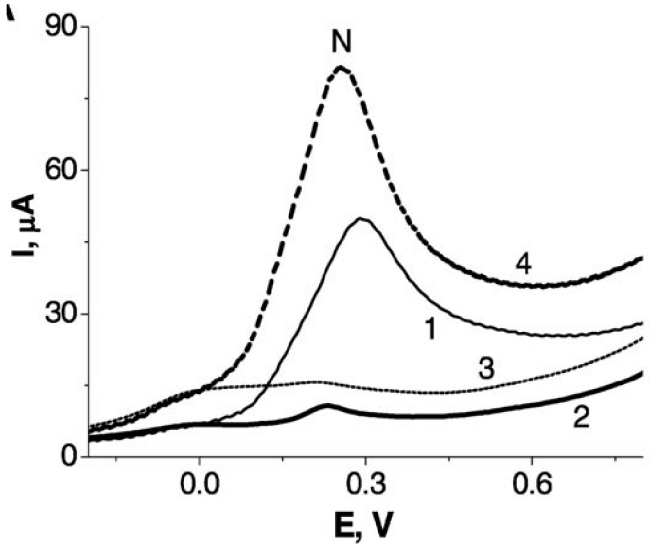
***Obr. 14**: Schéma postupu detekce SNP pomocí enzymatické přeměny substrátu na produkt a elektrochemická detekce. (a) Inkorporace dN^{bio}TP do DNA pomocí primer extension (PEx). Primer je hybridizován s tDNA a prodloužen polymerázou o jeden dN^{bio}TP dle sekvence templátu. (b) Enzymem zprostředkovaná elektrochemická analýza na magnetických mikročásticích (MB). Po hybridizaci a prodloužení sondy je PEx produkt zachycen na MB, následně je povrch MB blokován a biotin inkorporovaných dN^{bio}TP je konjugován se streptavidinem-vázanou alkalickou fosfatázou (SALP). Po omytí je substrát 1-naftyl fosfát enzymaticky přeměněn na elektroaktivní 1-naftol, který je voltametricky měřen na uhlíkové elektrodě a je získán pík označený jako „N“.*

Nejprve byla z buněčné linie izolována celková RNA, reverzní transkripcí byla následně získána komplementární DNA (cDNA), která byla amplifikována za použití genově-specifických primerů. Produkty PCR byly využity jako templáty pro PEx reakci, která probíhala v nadbytku primeru za přítomnosti termostabilní polymerázy a biotinem značeného cytosinu (C, dC^{bio}TP) nebo uracilu (U, dU^{bio}TP). Sondou pro detekci případného jednonukleotidového polymorfismu (SNP, bodové mutace) v cílové

DNA (tDNA) byl primer s dA_{20} přesahem na 5`-konci, jehož 3`-konec byl prodloužen o jeden značený nukleotid v závislosti na nukleotidu přítomném v polymorfním místě tDNA (obr. 14a).

Oligo(A) přesah byl využit pro izolaci PEx produktu z reakčního roztoku pomocí magnetických částic nesoucích oligo(T) řetězec na svém povrchu. Biotin na 3`-konci prodlouženého primeru jsme využili pro afinitní reakci s konjugátem streptavidin-alkalické fosfatázy (SALP). SALP přeměňuje elektro-inaktivní 1-naftyl fosfát na elektroaktivní 1-naftol, který posloužil jako důkaz o přítomnosti enzymu, resp. biotinové značky a tedy daného nukleotidu, resp. SNP v komplementárním řetězci tDNA. Elektrochemická detekce 1-naftolu byla provedena na elektrodě z pyrolytického grafitu (PGE) metodou lineární voltametrie (LSV).

Pokud byla v testovaném místě přirozená (wt) sekvence s guaninem (G) a do reakce jsme přidali $dC^{bio}TP$, byla do DNA zároveň s komplementárním cytosinem inkorporována značka potřebná pro detekci signálu (biotin jako adaptor pro navázání SALP). Pokud však k wt sekvenci byl spolu s polymerázou přidán $dU^{bio}TP$, který nebyl komplementární s wt sekvencí, potřebný biotin nebyl v sondě přítomen a měření poskytla nulový nebo jen minoritní signál (obr. 15).



***Obr. 15**: Voltamogramy oligonukleotidů obsahujících přirozenou nebo mutantní sekvenci G245S vyskytující se v hotspot mutantech p53 naměřené pomocí LSV na PGE v uhličitanovém pufru, pH 9,5. (1) wt+$dC^{bio}TP$, (2) wt+$dU^{bio}TP$, (3) mut+$dC^{bio}TP$, (4) mut+$dU^{bio}TP$.*

V rámci této práce byly testovány různé DNA polymerázy, abychom docílili co nejpřesnější a nejspolehlivější analýzy *p53* mutantních hotspot míst R273H, G245S a R273C. Nakonec byla vybrána termostabilní sekvenáza, protože vykazovala optimální poměr chybovosti a inkorporace správné biotinem-značené nukleobáze. Využili jsme výhod dvoupovrchové techniky založené na paramagnetických mikročásticích k odmytí nezreagovaných látek z PEx směsi od již prodloužených primerů a v kombinaci s RT-PCR a případným opakováním PEx reakce jsme získali spolehlivý systém kompatibilní s lab-on-chip konceptem.

Závěr

V této práci jsme se zabývali konstrukcí modifikovaných DNA, jejich elektrochemickými vlastnostmi, interakcemi s malými molekulami (Sybr Green I) a analytickým využitím. Pozornost byla věnována enzymatické inkorporaci modifikovaných nukleotidů do DNA pomocí prodlužování primeru (PEx) a pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Ke studiu modifikované DNA byly využity dva typy elektrod a různé voltametrické metody vybrané s ohledem na typ analýzy.

Na stacionární kapkové rtuťové elektrodě (HMDE) byla provedena analýza PCR produktů, do kterých byly enzymaticky inkorporovány 7-deazapuriny (7-deazaadenin a 7-deazaguanin) o délce několika stovek bází. Výsledkem byl podrobnější popis elektrochemického chování takto modifikované DNA na rtuťové elektrodě a jejích adsorpčně-desorpčních a oxidačně-redukčních vlastností.

Následně byla studována interakce DNA modifikované 7-deazaguaninem (kdy až 100 % přirozených guaninových bází bylo nahrazeno jejich 7-deaza analogem) s fluorescenčním barvivem Sybr Green I (SG), jehož fluorescenční záření je zhášeno v přítomnosti 7-deazaguaninu. Měřením samotného SG na elektrodě z pyrolytického grafitu byly stanoveny dva analytické signály dobře separované od píku 7-deazaguaninu, který se dá využít k dalším podrobnějším studiím vzájemných interakcí. Zároveň se nám podařilo elektrochemicky detekovat rozdíl aktivity volných molekul SG volně v roztoku a v komplexu s DNA. Studiem komplexů SG-DNA v různých módech uspořádání bylo potvrzeno, že SG molekuly mají velmi podobnou afinitu k oběma porovnávaným druhům DNA, modifikované i nemodifikované. Dále z našich výsledků vyplynulo, že zhášení fluorescence SG nastává v důsledku interakce s G*-modifikovanou DNA a není odrazem slabé interakce s touto DNA.

V neposlední řadě je v této práci uveden účinný způsob detekce jednonukleotidového polymorfismu pomocí inkorporace biotinylovaných dNTP a enzymatické produkce elektroaktivního indikátoru probíhající na paramagnetických mikročásticích. Indikátor je poté stanoven jednoduchou elektrochemickou analýzou. s využitím elektrochemické detekce. Takovéto nebo podobné „dvoupovrchové“ detekční techniky lze využít při biochemických analýzách vzorků kdy je potřeba odstranit nespecifické proteiny a molekuly DNA, aby neovlivňovaly výsledek.

Literatura

1. Dahm, R., *Friedrich Miescher and the discovery of DNA.* Developmental Biology, 2005. **278**(2): p. 274-288.
2. Avery, O.T., C.M. MacLeod, and M. McCarty, *Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii.* Journal of Experimental Medicine, 1944. **79**(2): p. 137-158.
3. Palecek, E., *Oszillographische Polarographie Der Nucleinsauren Und Ihrer Bestandteile.* Naturwissenschaften, 1958. **45**(8): p. 186-187.
4. Palecek, E., *Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid.* Nature, 1960. **188**(4751): p. 656-657.
5. Palecek, E., *Oscillographic Polarography of Deoxyribonucleic Acid Degradation Products.* Biochimica Et Biophysica Acta, 1961. **51**(1): p. 1-&.
6. Miller, I.R., *Structure of DNA and Rna in Water-Mercury Interface.* Journal of Molecular Biology, 1961. **3**(3): p. 229-+.
7. Fojta, M., *Mercury electrodes in nucleic acid electrochemistry: Sensitive analytical tools and probes of DNA structure. A review.* Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 2004. **69**(4): p. 715-747.
8. Vacek, J., L. Havran, and M. Fojta, *Electrochemical Analysis of DNA Damage, Hybridization and Interactions.* Chemicke Listy, 2011. **105**(1): p. 15-26.
9. Watson, J.D. and F.H.C. Crick, *Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.* Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-738.
10. Rich, A., A. Nordheim, and A.H.J. Wang, *The Chemistry and Biology of Left-Handed Z-DNA.* Annual Review of Biochemistry, 1984. **53**: p. 791-846.
11. Rich, A. and S.G. Zhang, *Z-DNA: the long road to biological function.* Nature Reviews Genetics, 2003. **4**(7): p. 566-572.
12. Herbert, A. and A. Rich, *Left-Handed Z-DNA: Structure and Function*, in *Structural Biology and Functional Genomics*, E.M. Bradbury and S. Pongor, Editors. 1999, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 53-72.
13. Rice, S.A. and P. Doty, *The Thermal Denaturation of Desoxyribose Nucleic Acid.* Journal of the American Chemical Society, 1957. **79**(15): p. 3937-3947.
14. Marmur, J. and P. Doty, *Thermal Renaturation of Deoxyribonucleic Acids.* Journal of Molecular Biology, 1961. **3**(5): p. 585-&.
15. Scharer, O.D., *Chemistry and biology of DNA repair.* Angewandte Chemie-International Edition, 2003. **42**(26): p. 2946-2974.
16. Friedberg, E.C., *DNA damage and repair.* Nature, 2003. **421**(6921): p. 436-440.
17. Fojta, M., *Electrochemical sensors for DNA interactions and damage.* Electroanalysis, 2002. **14**(21): p. 1449-1463.
18. Palecek, E. and M. Fojta, *Electrochemical DNA Sensors.* Bioelectronics: From Theory to Applications, 2005: p. 127-192.
19. Valenta, P. and P. Grahmann, *Electrochemical Behavior of Natural and Biosynthetic Polynucleotides at Mercury-Electrode .1. Adsorption of Denatured Deoxyribonucleic-Acid at Hanging Mercury Drop Electrode.* Journal of Electroanalytical Chemistry, 1974. **49**(1): p. 41-53.

20. Valenta, P. and H.W. Nurnberg, *Electrochemical Behavior of Natural and Biosynthetic Polynucleotides at Mercury-Electrode .2. Reduction of Denatured DNA at Stationary and Dropping Mercury Electrodes.* Journal of Electroanalytical Chemistry, 1974. **49**(1): p. 55-75.
21. Brabec, V., *Nucleic-Acid Analysis by Voltammetry at Carbon Electrodes.* Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1981. **8**(4): p. 437-449.
22. Palecek, E., V. Ostatna, and Z. Pechan, *Fifty Five Years of Nucleic Acid Electrochemistry.* Chemicke Listy, 2014. **108**(5): p. 490-499.
23. Kudr, J., et al., *Simultaneous Automatic Electrochemical Detection of Zinc, Cadmium, Copper and Lead Ions in Environmental Samples Using a Thin-Film Mercury Electrode and an Artificial Neural Network.* Sensors, 2015. **15**(1): p. 592-610.
24. Svarc-Gajic, J. and Z. Stojanovic, *Determination of histamine in cheese by chronopotentiometry on a thin film mercury electrode.* Food Chemistry, 2011. **124**(3): p. 1172-1176.
25. Fadrna, R., et al., *Use of polished and mercury film-modified silver solid amalgam electrodes in electrochemical analysis of DNA.* Electroanalysis, 2005. **17**(5-6): p. 452-459.
26. Kucharikova, K., et al., *Detecting DNA damage with a silver solid amalgam electrode.* Electroanalysis, 2004. **16**(5): p. 410-414.
27. Waite, T.J., et al., *An investigation into the suitability of bismuth as an alternative to gold-amalgam as a working electrode for the in situ determination of chemical redox species in the natural environment.* Electroanalysis, 2006. **18**(12): p. 1167-1172.
28. Jelen, F., et al., *Label-free determination of picogram quantities of DNA by stripping voltammetry with solid copper amalgam or mercury electrodes in the presence of copper.* Analytical Chemistry, 2002. **74**(18): p. 4788-4793.
29. Yosypchuk, B. and L. Novotny, *Electrodes of nontoxic solid amalgams for electrochemical measurements.* Electroanalysis, 2002. **14**(24): p. 1733-1738.
30. Yosypchuk, B., et al., *Use of solid amalgam electrodes in nucleic acid analysis.* Electroanalysis, 2002. **14**(21): p. 1488-1493.
31. Yosypchuk, B., et al., *Voltammetric behavior of osmium-labeled DNA at mercury meniscus-modified solid amalgam electrodes. Detecting DNA hybridization.* Electroanalysis, 2006. **18**(2): p. 186-194.
32. Boussicault, F. and M. Robert, *Electron transfer in DNA and in DNA-related biological processes. Electrochemical insights.* Chemical Reviews, 2008. **108**(7): p. 2622-2645.
33. Cai, X.H., et al., *Evaluation of different carbon electrodes for adsorptive stripping analysis of nucleic acids.* Electroanalysis, 1996. **8**(8-9): p. 753-758.
34. Lau, C., et al., *Electrochemistry of nicotinamide adenine dinucleotide (reduced) at heated platinum electrodes.* Analytica Chimica Acta, 2005. **554**(1-2): p. 74-78.
35. Adamovski, M., et al., *Self-assembled monolayers on bismuth electrodes.* Electrochemistry Communications, 2006. **8**(6): p. 932-936.
36. Kizek, R., et al., *Silver electrode as a sensor for determination of zinc in cell cultivation medium.* Analytical Biochemistry, 2002. **301**(1): p. 8-13.
37. Popovich, N.D., et al., *Electrochemical sensor for detection of unmodified nucleic acids.* Talanta, 2002. **56**(5): p. 821-828.

38. Herne, T.M. and M.J. Tarlov, *Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces.* Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(38): p. 8916-8920.
39. Doneux, T., et al., *Optimization of the Probe Coverage in DNA Biosensors by a One-Step Coadsorption Procedure.* Chemelectrochem, 2014. **1**(1): p. 147-157.
40. Doneux, T., et al., *Adsorption of 2-mercaptobenzimidazole on a Au(111) electrode.* Electrochimica Acta, 2005. **50**(21): p. 4275-4282.
41. Umek, R.M., et al., *Electronic detection of nucleic acids - A versatile platform for molecular diagnostics.* Journal of Molecular Diagnostics, 2001. **3**(2): p. 74-84.
42. Fojta, M., et al., *Redox Labels and Indicators Based on Transition Metals and Organic Electroactive Moieties for Electrochemical Nucleic Acids Sensing.* Current Organic Chemistry, 2011. **15**(17): p. 2936-2949.
43. Vacek, J., et al., *Elektrochemické metody v analýze nukleových kyselin a bílkovin.* Československý časopis pro fyziku, 2006(56): p. 293-304.
44. Tomschik, M., et al., *Reduction and oxidation of peptide nucleic acid and DNA at mercury and carbon electrodes.* Journal of Electroanalytical Chemistry, 1999. **476**(1): p. 71-80.
45. Kubicarova, T., et al., *Voltammetric and chronopotentiometric measurements with nucleic acid-modified mercury film on a glassy carbon electrode.* Electroanalysis, 2000. **12**(17): p. 1390-1396.
46. Fadrna, R., et al., *Voltammetric determination of adenine, guanine, and DNA using liquid mercury free polished silver solid amalgam electrode.* Analytical Letters, 2004. **37**(3): p. 399-413.
47. Trnkova, L., M. Studnickova, and E. Palecek, *Electrochemical-Behavior of Guanine and Its Derivatives .1. Fast Cyclic Voltammetry of Guanosine and Calf Thymus DNA.* Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1980. **7**(4): p. 643-658.
48. Fojta, M., et al., *Adsorptive transfer stripping AC voltammetry of DNA complexes with intercalators.* Electroanalysis, 2000. **12**(12): p. 926-934.
49. Fojta, M., et al., *Two superhelix density-dependent DNA transitions detected by changes in DNA adsorption/desorption behavior.* Biochemistry, 1998. **37**(14): p. 4853-4862.
50. Fojta, M., et al., *Electrochemical stripping techniques in analysis of nucleic acids and their constituents.* Current Analytical Chemistry, 2008. **4**(3): p. 250-262.
51. Palecek, E. and I. Postbieglova, *Adsorptive Stripping Voltammetry of Biomacromolecules with Transfer of the Adsorbed Layer.* Journal of Electroanalytical Chemistry, 1986. **214**(1-2): p. 359-371.
52. Jelen, F., A. Erdem, and E. Palecek, *Cyclic voltammetry of echinomycin and its interaction with double-stranded and single-stranded DNA adsorbed at the electrode.* Bioelectrochemistry, 2002. **55**(1-2): p. 165-167.
53. Cheng, G.F., et al., *A sensitive DNA electrochemical biosensor based on magnetite with a glassy carbon electrode modified by muti-walled carbon nanotubes in polypyrrole.* Analytica Chimica Acta, 2005. **533**(1): p. 11-16.
54. Karadeniz, H., et al., *Echinomycin and cobalt-phenanthroline as redox indicators of DNA hybridization at gold electrodes.* Frontiers in Bioscience, 2006. **11**: p. 1870-1877.
55. Gu, J.Y., X.J. Lu, and H.X. Ju, *DNA sensor for recognition of native yeast DNA sequence with methylene blue as an electrochemical hybridization indicator.* Electroanalysis, 2002. **14**(13): p. 949-954.

56. Rosu, F., et al., *Positive and negative ion mode ESI-MS and MS/MS for studying drug-DNA complexes.* International Journal of Mass Spectrometry, 2006. **253**(3): p. 156-171.
57. Millan, K.M., A. Saraullo, and S.R. Mikkelsen, *Voltammetric DNA Biosensor for Cystic-Fibrosis Based on a Modified Carbon-Paste Electrode.* Analytical Chemistry, 1994. **66**(18): p. 2943-2948.
58. Maruyama, K., et al., *DNA sensor with a dipyridophenazine complex of osmium(II) as an electrochemical probe.* Analytical Chemistry, 2002. **74**(15): p. 3698-3703.
59. Hou, P., et al., *Detection of methylation of human p16(Ink4a) gene 5 '-CpG islands by electrochemical method coupled with linker-PCR.* Nucleic Acids Research, 2003. **31**(16).
60. Sufen, W., P. Tuzhi, and C.F. Yang, *Electrochemical studies for the interaction of DNA with an irreversible redox compound - Hoechst 33258.* Electroanalysis, 2002. **14**(23): p. 1648-1653.
61. Hajian, R. and M. Tavakol, *Interaction of Anticancer Drug Methotrexate with DS-DNA Analyzed by Spectroscopic and Electrochemical Methods.* E-Journal of Chemistry, 2012. **9**(1): p. 471-480.
62. Shaghaghi, M., et al., *Studies of interaction between terbium(III)-deferasirox and double helix DNA by spectral and electrochemical methods.* Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014. **120**: p. 467-472.
63. Palecek, E. and M.A. Hung, *Determination of Nanogram Quantities of Osmium-Labeled Nucleic-Acids by Stripping (Inverse) Voltammetry.* Analytical Biochemistry, 1983. **132**(2): p. 236-242.
64. Lukasova, E., F. Jelen, and E. Palecek, *Electrochemistry of Osmium Nucleic-Acid Complexes - a Probe for Single-Stranded and Distorted Double-Stranded Regions in DNA.* General Physiology and Biophysics, 1982. **1**(1): p. 53-70.
65. Paleček, E., *[8] Probing DNA structure with osmium tetroxide complexes in vitro*, in *Methods in Enzymology*. 1992, Academic Press. p. 139-155.
66. Ihara, T., et al., *Ferrocene-oligonucleotide conjugates for electrochemical probing of DNA.* Nucleic Acids Research, 1996. **24**(21): p. 4273-4280.
67. Uto, Y., et al., *Electrochemical analysis of DNA amplified by the polymerase chain reaction with a ferrocenylated oligonucleotide.* Analytical Biochemistry, 1997. **250**(1): p. 122-124.
68. Sato, S., et al., *Ferrocenylnaphthalene Diimide-Based Electrochemical Detection of Aberrant Methylation in hTERT Gene.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014. **174**(3): p. 869-879.
69. Vrabel, M., et al., *Base-Modified DNA Labeled by [Ru(bpy)(3)](2+) and [Os(bpy)(3)](2+) Complexes: Construction by Polymerase Incorporation of Modified Nucleoside Triphosphates, Electrochemical and Luminescent Properties, and Applications.* Chemistry-a European Journal, 2009. **15**(5): p. 1144-1154.
70. Wang, F. and J.W. Liu, *Platinated DNA oligonucleotides: new probes forming ultrastable conjugates with graphene oxide.* Nanoscale, 2014. **6**(12): p. 7079-7084.
71. Cahova, H., et al., *Aminophenyl- and nitrophenyl-labeled nucleoside triphosphates: Synthesis, enzymatic incorporation, and electrochemical detection.* Angewandte Chemie-International Edition, 2008. **47**(11): p. 2059-2062.

72. Kelley, S.O., et al., *Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA.* Nucleic Acids Research, 1999. **27**(24): p. 4830-4837.
73. Heller, M.J., *DNA microarray technology: Devices, systems, and applications.* Annual Review of Biomedical Engineering, 2002. **4**: p. 129-153.
74. Palecek, E. and J. Wang, *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins - Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics Preface.* Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics, 2005. **1**: p. Xv-Xvii.
75. Brazdilova, P., et al., *Ferrocenylethynyl derivatives of nucleoside triphosphates: Synthesis, incorporation, electrochemistry, and bioanalytical applications.* Chemistry-a European Journal, 2007. **13**(34): p. 9527-9533.
76. Vrabel, M., et al., *Purines bearing phenanthroline or bipyridine ligands and their Ru-II complexes in position 8 as model compounds for electrochemical DNA labeling - Synthesis, crystal structure, electrochemistry, quantum chemical calculations, cytostatic and antiviral activity.* European Journal of Inorganic Chemistry, 2007(12): p. 1752-1769.
77. Balintova, J., et al., *Anthraquinone as a Redox Label for DNA: Synthesis, Enzymatic Incorporation, and Electrochemistry of Anthraquinone-Modified Nucleosides, Nucleotides, and DNA.* Chemistry-a European Journal, 2011. **17**(50): p. 14063-14073.
78. Dudova, Z., et al., *Electrochemical behavior of 7-deazaguanine- and 7-deazaadenine-modified DNA at the hanging mercury drop electrode.* Monatshefte Fur Chemie, 2016. **147**(1): p. 3-11.
79. Kourilova, A., et al., *DNA hybridization on membrane-modified carbon electrodes.* Analytical Letters, 2005. **38**(15): p. 2493-2507.
80. Fojta, M., et al., *Electrochemical detection of DNA triplet repeat expansion.* Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(21): p. 6532-6533.
81. Azek, F., et al., *Hybridization assay at a disposable electrochemical biosensor for the attomole detection of amplified human cytomegalovirus DNA.* Analytical Biochemistry, 2000. **284**(1): p. 107-113.
82. Kang, H.J., et al., *Strategy for Low Background-Current Levels in the Electrochemical Biosensors Using Horse-Radish Peroxidase Labels.* Electroanalysis, 2009. **21**(24): p. 2647-2652.
83. Tran, H.V., et al., *An electrochemical ELISA-like immunosensor for miRNAs detection based on screen-printed gold electrodes modified with reduced graphene oxide and carbon nanotubes.* Biosensors & Bioelectronics, 2014. **62**: p. 25-30.
84. Campbell, C.N., et al., *Enzyme-amplified amperometric sandwich test for RNA and DNA.* Analytical Chemistry, 2002. **74**(1): p. 158-162.
85. Chen, J.H., et al., *Synthesis and Properties of Fluorescence Dyes: Tetracyclic Pyrazolo[3,4-b]Pyridine-Based Coumarin Chromophores with Intramolecular Charge Transfer Character.* Journal of Organic Chemistry, 2012. **77**(7): p. 3475-3482.
86. Flechsig, G.U., et al., *Electrochemical DNA hybridization detection using the fluorescence quenching label dabcyl.* Electrochemistry Communications, 2005. **7**(10): p. 1059-1065.

87. Lai, R.Y., et al., *Synthesis, cyclic voltammetric studies, and electrogenerated chemiluminescence of a new donor-acceptor molecule: 3,7-[bis[4-phenyl-2-quinolyl]]-10-methylphenothiazine.* Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(37): p. 9112-9118.
88. Quinton, C., et al., *Design of New Tetrazine-Triphenylamine Bichromophores - Fluorescent Switching by Chemical Oxidation.* European Journal of Organic Chemistry, 2012(7): p. 1394-1403.
89. Saeed, A., et al., *Spectroscopic and electrochemical behavior of newly synthesized high fluorescent symmetric 4 '-nitrophenyl-3,4,9,10-perylenebisdiimide-azo hybrid dyes.* Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2015. **151**: p. 72-79.
90. Dudova, Z., et al., *Interactions of fluorescent dye SYBR Green I with natural and 7-deazaguanine-modified DNA studied by fluorescence and electrochemical methods.* Monatshefte Fur Chemie, 2016. **147**(1): p. 13-20.
91. *Allen J. Bard and Larry R. Faulkner, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, New York: Wiley, 2001, 2nd ed.* Russian Journal of Electrochemistry. **38**(12): p. 1364-1365.
92. Teles, F.R.R. and L.R. Fonseca, *Trends in DNA biosensors.* Talanta, 2008. **77**(2): p. 606-623.
93. Fojta, M., *Elektrochemické DNA-biosensory. Analýza nukleotidových sekvencí, mutací a polymorfismů.*, in *Senzory*. 2007, VŠCHT Praha. p. 109-124.
94. Wang, Y. and L.-l. Tong, *Electrochemical sensor for simultaneous determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on poly (bromocresol purple) modified glassy carbon electrode.* Sensors and Actuators B: Chemical, 2010. **150**(1): p. 43-49.
95. Ozkan, D., et al., *Allele-specific genotype detection of factor V Leiden mutation from polymerase chain reaction amplicons based on label-free electrochemical genosensor.* Analytical Chemistry, 2002. **74**(23): p. 5931-5936.
96. Steichen, M., et al., *Electrochemical DNA hybridization detection using peptide nucleic acids and [Ru(NH3)(6)](3+) on gold electrodes.* Biosensors & Bioelectronics, 2007. **22**(9-10): p. 2237-2243.
97. Xu, Y., et al., *Probing DNA hybridization by impedance measurement based on CdS-oligonucleotide nanoconjugates.* Electroanalysis, 2004. **16**(1-2): p. 150-155.
98. Cai, X.H., et al., *Electrochemical analysis of formation of polynucleotide complexes in solution and at electrode surfaces.* Analytica Chimica Acta, 1997. **344**(1-2): p. 65-76.
99. Xie, H., N.C. Tansil, and Z.Q. Gao, *A redox active and electrochemiluminescent threading bis-intercalator and its applications in DNA assays.* Frontiers in Bioscience-Landmark, 2006. **11**: p. 1147-1157.
100. Fojta, M., et al., *"Multicolor" electrochemical labeling of DNA hybridization probes with osmium tetroxide complexes.* Analytical Chemistry, 2007. **79**(3): p. 1022-1029.
101. Hocek, M. and M. Fojta, *Cross-coupling reactions of nucleoside triphosphates followed by polymerase incorporation. Construction and applications of base-functionalized nucleic acids.* Organic & Biomolecular Chemistry, 2008. **6**(13): p. 2233-2241.
102. Di Giusto, D.A., et al., *Multipotential electrochemical detection of primer extension reactions on DNA self-assembled monolayers.* Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(13): p. 4120-4121.

103. Horakova, P., et al., *Detection of Single Nucleotide Polymorphisms in p53 Mutation Hotspots and Expression of Mutant p53 in Human Cell Lines Using an Enzyme-Linked Electrochemical Assay.* Electroanalysis, 2009. **21**(15): p. 1723-1729.
104. Li, B., et al., *Sensitive HIV-1 detection in a homogeneous solution based on an electrochemical molecular beacon coupled with a nafion-graphene composite film modified screen-printed carbon electrode.* Biosensors & Bioelectronics, 2014. **52**: p. 330-336.
105. Wang, J., D.K. Xu, and R. Polsky, *Magnetically-induced solid-state electrochemical detection of DNA hybridization.* Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(16): p. 4208-4209.
106. Palecek, E., M. Fojta, and F. Jelen, *New approaches in the development of DNA sensors: hybridization and electrochemical detection of DNA and RNA at two different surfaces.* Bioelectrochemistry, 2002. **56**(1-2): p. 85-90.
107. Palecek, E. and M. Fojta, *Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing.* Talanta, 2007. **74**(3): p. 276-290.
108. Kostecka, P., et al., *Voltammetry of osmium-modified DNA at a mercury film electrode application in detecting DNA hybridization.* Bioelectrochemistry, 2004. **63**(1-2): p. 245-248.
109. Masarik, M., et al., *Label-free voltammetric detection of single-nucleotide mismatches recognized by the protein MutS.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **388**(1): p. 259-270.
110. Patolsky, F., A. Lichtenstein, and I. Willner, *Detection of single-base DNA mutations by enzyme-amplified electronic transduction.* Nature Biotechnology, 2001. **19**(3): p. 253-257.
111. Pivonkova, H., et al., *Direct Voltammetric Analysis of DNA Modified with Enzymatically Incorporated 7-Deazapurines.* Analytical Chemistry, 2010. **82**(16): p. 6807-6813.
112. Studnickova, M., et al., *Reduction of Guanosine at a Mercury-Electrode.* Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1989. **21**(1): p. 83-86.
113. Ganguly, M., et al., *A study of 7-deaza-2 '-deoxyguanosine-2 '-deoxycytidine base pairing in DNA.* Nucleic Acids Research, 2007. **35**(18): p. 6181-6195.
114. Jin, X., F. Dong, and V.L. Singer, *SYBR(R) green I nucleic acid gel stain provides a sensitive fluorescent method for detecting gel mobility shift products.* Faseb Journal, 1996. **10**(6): p. 751-751.
115. Kiltie, A.E. and A.J. Ryan, *SYBR Green I staining of pulsed field agarose gels is a sensitive and inexpensive way of quantitating DNA double-strand breaks in mammalian cells.* Nucleic Acids Research, 1997. **25**(14): p. 2945-2946.
116. Vitzthum, F., et al., *A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system.* Analytical Biochemistry, 1999. **276**(1): p. 59-64.
117. Iida, R., et al., *Detection of isozymes of deoxyribonucleases I and II on electrophoresed gels with picogram sensitivity using SYBR Green I.* Electrophoresis, 1998. **19**(14): p. 2416-2418.
118. Wege, H., et al., *SYBR Green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity.* Nucleic Acids Research, 2003. **31**(2).

119. Iwabuchi, S., et al., *Simultaneous detection of near-field topographic and fluorescence images of human chromosomes via scanning near-field optical/atomic-force microscopy (SNOAM).* Nucleic Acids Research, 1997. **25**(8): p. 1662-1663.
120. Brussaard, C.P.D., D. Marie, and G. Bratbak, *Flow cytometric detection of viruses.* Journal of Virological Methods, 2000. **85**(1-2): p. 175-182.
121. Tamburini, S., et al., *Accurate flow cytometric monitoring of Escherichia coli subpopulations on solid food treated with high pressure carbon dioxide.* Journal of Applied Microbiology, 2014. **117**(2): p. 440-450.
122. Qu, L.L., et al., *Simultaneous Multi-response Optimization and Capillary Electrophoresis with Laser Induced Fluorescence Detector for Rapid Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria.* Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese, 2009. **30**(6): p. 1121-1127.
123. Wittwer, C.T., et al., *The LightCycler(TM) a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control.* Biotechniques, 1997. **22**(1): p. 176-181.
124. Simpson, D., et al., *Retinal VEGF mRNA measured by SYBR Green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR.* Molecular Vision, 2000. **6**(22): p. 178-183.
125. Balsam, J., et al., *Thousand-fold fluorescent signal amplification for mHealth diagnostics.* Biosensors & Bioelectronics, 2014. **51**: p. 1-7.
126. Zipper, H., et al., *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications.* Nucleic Acids Research, 2004. **32**(12).
127. Dragan, A.I., et al., *SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA.* Journal of Fluorescence, 2012. **22**(4): p. 1189-1199.
128. Menova, P., et al., *Fluorescence Quenching in Oligonucleotides Containing 7-Substituted 7-Deazaguanine Bases Prepared by the Nicking Enzyme Amplification Reaction.* Bioconjugate Chemistry, 2015. **26**(2): p. 361-366.
129. Ioannou, A.K., et al., *Electroanalytical study of SYBR Green I and ethidium bromide intercalation in methylated and unmethylated amplicons.* Analytica Chimica Acta, 2010. **657**(2): p. 163-168.

Přílohy

Příloha 1

Dudova, Z.; Spacek, J.; Tomasko, M.; Havran, L.; Pivonkova, H.; Fojta, M., Electrochemical behavior of 7-deazaguanine- and 7-deazaadenine-modified DNA at the hanging mercury drop electrode. *Monatshefte Fur Chemie* **2016**, *147* (1), 3-11.

Příloha 2

Dudova, Z.; Spacek, J.; Havran, L.; Pivonkova, H.; Fojta, M., Interactions of fluorescent dye SYBR Green I with natural and 7-deazaguanine-modified DNA studied by fluorescence and electrochemical methods. *Monatshefte Fur Chemie* **2016,** *147* (1), 13-20.

Příloha 3

Horakova, P.; Simkova, E.; Vychodilova, Z.; Brazdova, M.; Fojta, M., Detection of Single Nucleotide Polymorphisms in p53 Mutation Hotspots and Expression of Mutant p53 in Human Cell Lines Using an Enzyme-Linked Electrochemical Assay. *Electroanalysis* **2009,** *21* (15), 1723-1729.

Příloha 1

Dudova, Z.; Spacek, J.; Tomasko, M.; Havran, L.; Pivonkova, H.; Fojta, M., Electrochemical behavior of 7-deazaguanine- and 7-deazaadenine-modified DNA at the hanging mercury drop electrode. *Monatshefte Fur Chemie* **2016**, *147* (1), 3-11.

$IF_{2016} = 1.326$

Prohlašuji, že jsem se na této práci podílela provedením rešerše, převážnou většinou experimentálních měření, vyhodnocováním výsledků a přípravou samotné publikace.

Podpis Zdenky Dudové:

Podpis Hany Pivoňkové:

Podpis Miroslava Fojty:

Příloha 2

Dudova, Z.; Spacek, J.; Havran, L.; Pivonkova, H.; Fojta, M., Interactions of fluorescent dye SYBR Green I with natural and 7-deazaguanine-modified DNA studied by fluorescence and electrochemical methods. *Monatshefte Fur Chemie* **2016,** *147* (1), 13-20.

$IF_{2016} = 1.326$

Prohlašuji, že jsem v rámci této práce provedla rešerši, většinu experimentálních měření, vyhodnocení a zpracování výsledků, následnou přípravu samotné publikace.

Podpis Zdenky Dudové:

Podpis Hany Pivoňkové:

Podpis Miroslava Fojty:

Příloha 3

Horakova, P.; Simkova, E.; **Vychodilova, Z**.; Brazdova, M.; Fojta, M., Detection of Single Nucleotide Polymorphisms in p53 Mutation Hotspots and Expression of Mutant p53 in Human Cell Lines Using an Enzyme-Linked Electrochemical Assay. *Electroanalysis* **2009,** *21* (15), 1723-1729.

IF_{2016} = 2.409

Prohlašuji, že jsem v rámci této práce provedla část experimentálních měření.

Podpis Zdenky Dudové:

Podpis Hany Pivoňkové:

Podpis Miroslava Fojty: