



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV FYZIKY KONDENZOVANÝCH LÁTEK



DNA BIOSENSOR PRO DETEKCI GENOTOXICITY

Bakalářská práce

Dominika Kasarová

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.

Brno 2013

Bibliografický záznam

Autor: Dominika Kasarová
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav fyziky kondenzovaných látek

Název práce: DNA biosensor pro detekci genotoxicity

Studijní program: PřF B-FY Fyzika

Studijní obor: PřF BF Biofyzika

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.

Akademický rok: 2012/2013

Počet stran: 40

Klíčová slova: DNA, biosensor, mutagen, benzo[a]pyren,

Bibliographic Entry

Author	Dominika Kasarová Faculty of Science, Masaryk University Department of Condensed Matter Physics
Title of Thesis:	DNA biosensor for detection of genotoxicity
Degree programme:	PřF B-FY Physics
Field of Study:	PřF BF Biophysics
Supervisor:	doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.
Academic Year:	2012/2013
Number of Pages:	40
Keywords:	DNA, biosensor, mutagen, benzo[a]pyrene,

Abstrakt

Tato bakalářská práce studuje interakce DNA s genotoxiny, jako je benzo[a]pyren. Benzo[a]pyren se do struktury dsDNA váže interkalačně, co způsobuje její konformační změny, a tím dochází k odchylkám v replikaci DNA. Fragmenty DNA byly imobilizované na povrch uhlíkových elektrod a pomocí elektrochemických metod, jako je SW voltametrie, byly sledovány charakteristické signály oxidace guaninových a adeninových zbytků.

Abstract

This bachelor thesis studies interactions between DNA and genotoxins such as benzo[a]pyrene. Benzo[a]pyrene binds as an intercalating agent into dsDNA structure that causes its conformational changes and this leads to deviations in DNA replication. Fragments of DNA were immobilized onto carbon electrode surface and by means of electrochemical methods, such as SW voltammetry, were obtained characteristic signals from oxidation of guanine and adenine residues.



Masarykova univerzita

Přírodovědecká fakulta



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Student : Dominika Kasarová

Studijní program : Fyzika

Studijní obor : Biofyzika

Ředitel Ústavu fyziky kondenzovaných látek PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s tématem:

DNA biosensor pro detekci genotoxicity

DNA biosensor for detection of genotoxicity

Zásady pro vypracování:

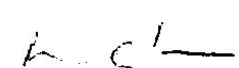
Molekuly dvouřetězcových fragmentů DNA imobilizovaných na povrchu uhlíkových elektrod vykazují při elektrochemickém měření charakteristické signály oxidace guaninových a adeninových zbytků. Struktura dsDNA je přitom narušována při jejich interakcích s genotoxickými látkami; ty se mohou na molekulu DNA vázat interkalací, do žlábků, elektrostaticky nebo kovalentně modifikovat jednotlivé báze. Tyto interakce lze pohodlně sledovat elektrochemicky, např. pomocí SWV („square wave voltammetry“). Cílem práce bude připravit různé varianty uhlíkových elektrod (tužkové - „penci“, síťotiskové či pastové), imobilizovat na jejich povrch dsDNA z telecího brzlíku a sledovat jejich elektrochemické parametry při interakcích s modelovými interkalátory (aromatické látky - PAH, interkalátory - ethidium). Před vlastní experimentální prací bude provedena literární rešerše (Web of Knowledge) na zadané téma. Práce může být vypracována v českém, nebo slovenském jazyce.

Vedoucí bakalářské práce : doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.

Datum zadání bakalářské práce : září 2012

Datum odevzdání bakalářské práce : dle harmonogramu ak. roku 2012/2013

V Brně dne 06. 02. 2013


prof. RNDr. Josef Humlíček, CSc.
ředitel Ústavu fyziky kondenzovaných látek
PřF MU

Zadání bakalářské práce převzal dne:


Podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Petru Skládalovi, CSc. za odborné vedení a užitečné připomínky.

Prohlášení

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

Brno 24. květen 2013

.....
Dominika Kasarová

Obsah

1	Úvod	5
2	Teoretická část	6
2.1	Biosensory	6
2.1.1	Biokatalytické sensory	6
2.1.2	Afinitní biosensory	7
2.2	Elektrochemická detekce	9
2.2.1	Voltametrie	9
2.2.2	Amperometrie	9
2.2.3	Konduktometrie	10
2.2.4	Potenciometrie	10
2.3	Konstrukce	11
2.4	Elektrody	12
2.5	DNA	14
2.6	DNA elektrochemický biosensor	14
2.7	Typy interakcí	16
2.8	Mutageny	17
2.8.1	Interkalátory	17
2.8.2	Indikátory vázající se elektrostaticky	19
2.8.3	Indikátory vázající se do žlábků	20
3	Praktická část	22
3.1	Úloha	22
3.2	Materiály	22
3.2.1	Reagenty a roztoky	22
3.2.2	Elektrody PGE	22
3.3	Imobilizace DNA	22
3.4	Interakce s benzopyrenem	23
3.5	Výsledky	24
3.5.1	Experiment 1	24
3.5.2	Experiment 2	25
3.5.3	Experiment 3	26
3.5.4	Experiment 4	27
3.5.5	Experiment 5	28

3.5.6	Experiment 6	29
3.5.7	Experiment 7	30
3.5.8	Porovnání 1	31
3.5.9	Porovnání 2	32
4	Závěr.....	33
5	Literatura.....	34

Seznam zkratek:

AFM	Atomic Force Microscopy, mikroskopie atomárních sil
A,T,G,C	adenin, tymin, guanin, cytosin
BaP	Benzo[a]pyren
DCMU	3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylkarbonyldiamid
DHS	N,N'-bis(3,4-dihydroxybenzyliden)-1,2-diaminobenzen
DMF	dimetylformamid
dsDNA	double-stranded deoxyribonucleic acid, dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina
GCE	glassy carbon electrode, skleněná elektroda
HOPG	highly oriented pyrolytic graphite, vysoce orientovaný pyrolytický grafit
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbon, cyklický aromatický uhlovodík
PGE	Pencil graphite electrode, tužková uhlíková elektroda
pM	pikomolární koncentrace
SPE	screen-printed electrode, sítotisková elektroda
ssDNA	single-stranded deoxyribonucleic acid, jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina
SWV	square wave voltammetry, voltametrie se superponovanou obdélníkovou vlnou

1 Úvod

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je důležitá molekula, která hraje primární roli v určování dědičných vlastností a uchovávání genetické informace nezbytné pro rozmnožování živých tvorů. Stala se předmětem mnohých výzkumů, které vedou k odhalení genetického kódu a sekvenování genomu a je hlavním objektem interakce s různými látkami, zejména léky. Tyto látky způsobují změny ve struktuře DNA nebo v pořadí bází, co vede k odchylkám v replikaci DNA, následně ke genetickým poruchám anebo k vzniku zhoubného bujení buněk. Proto je nezbytné objasnit faktory, které podmiňují afinitu a selektivitu v navazování molekul do DNA, identifikovat tyto chemické látky a určit jejich vliv, aby bylo vystavení jejich účinkům co nejmenší.

Stabilní, levné a adaptabilní analytické nástroje poskytují právě biosensory. Elektrochemické biosensory se vyznačují rychlou detekcí a vysokou citlivostí. Dvouřetězcová DNA imobilizovaná na povrchu uhlíkových elektrod vykazuje při elektrochemickém měření charakteristické signály, které vznikají při oxidaci guaninových a adeninových zbytků.

Práce se zabývá přípravou uhlíkových elektrod, imobilizací DNA a detekcí oxidačních signálů bází před a po interakci s interkalátorem benzo[a]pyrenem, který se vyskytuje běžně v ovzduší ve výfukových plynech automobilů, při spalování uhlí, organických materiálů (listů, tabáku) a dokonce i v grilovaných potravinách.

2 Teoretická část

2.1 Biosensory

Biosensor je analytický přístroj obsahující citlivý prvek biologického původu, který je buď součástí, nebo v těsném kontaktu s fyzikálně chemickým převodníkem. Poskytuje průběžný elektronický signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné nebo několika (skupiny) chemických látek ve vzorku. Látka, kterou analyzujeme, se nazývá analyt.

Biosensor má tři části:

- citlivý biologický element-bioreceptor, což může být biologický, biologicky derivovaný nebo biomimetický materiál. Bioreceptory je možno zařadit do dvou základních skupin:
 1. Biokatalytické (enzym, organela, buňka, tkáň, orgán, organismus), které analyt přeměňují v průběhu chemické reakce. Obvykle vystupuje analyt jako substrát enzymové reakce
 2. Bioafinitní (lektin, protilátka, nukleová kyselina, receptor), kde je analyt specificky vázán ve vznikajícím afinitním komplexu
- převodník nebo detekční element (fyzikálně-chemický, optický, piezoelektrický, akustický, elektrochemický, atd.), který detekuje a převádí výsledný signál vzniklý po interakci analytu s bioreceptorem na jiný, který se dá lehce měřit a kvantifikovat
- přidružená elektronika, která slouží na zobrazení měřených dat (1)(2)

2.1.1 Biokatalytické sensory

Ačkoli jsou známy různé typy rozpoznávacích prvků biosensorů, primárně se pro elektrochemické biosensory využívají enzymy kvůli jejich biokatalytické aktivitě a specifičnosti. (3) Biokatalytické sensory, které využívají enzymy jako rozpoznávací element, jsou kompaktní, lehce se používají a mají jednoduchý design. Je možné použít různé detekční konfigurace jako stacionární roztok vzorku proti míchanému nebo průtokovému uspořádání nebo analyt ve velkém objemu roztoku detekovat pomocí mikroelektrody. Biokatalytické sensory se lehce adaptují v klinických nebo průmyslových analýzách. Příkladem takového biokatalytického sensoru může být osobní měřič glukózy v krvi, široce využívány diabetiky.

Biokatalytické sensory obsahují biologické části, jako jsou enzymy, celé buňky nebo části tkáně, které rozeznají cílový analyt a produkují elektroaktivní částice nebo jiný detekovatelný

produkt. (4) Enzymy pozůstávají hlavně z 20 přirozeně se vyskytujících aminokyselin, jsou to proteiny, které katalyzují biochemické reakce a mohou podstatně zvyšovat rychlost reakcí v porovnání s nekatalyzovaným průběhem. Enzym-substrátové interakce mohou být charakterizovány studiem jejich kinetiky. Při přípravě biokatalytického sensoru by se měly brát v úvahu parametry, jako je původ a dostupnost biologického komponentu a jeho pracovní a skladovací stabilita. Také citlivost na okolní podmínky jako je pH, teplota a míchání v průběhu experimentu by měla být minimální, stejně jako odchylky mezi jednotlivými měřeními co nejmenší. (3)(5)

Enzymy dokážou velmi selektivně detekovat jednotlivé substance ve složitějších roztocích jako je moč nebo krev díky své komplexní struktuře, kvůli které specificky vážou substrátové molekuly. Detekce se tímto stává časově nenáročná, méně pracná, vzorky nejsou náchylné na interferenci. Uspořádání aminokyselin v aktivním místě enzymu, se váže na konkrétní substrát, co vytváří katalytickou strukturu, která je selektivní pro jeden typ substrátových molekul. Mimo substrátové specifity enzymy vykazují specifitu účinku, kdy navázaný substrát podléhá přesně vymezené konverzi. Hodně enzymů včleňuje do své struktury i neproteinové chemické skupiny jako kofaktory nebo prostetické skupiny, které podporují jejich specifičnost. Některé enzymy s vlastní selektivitou dokážou tlumit signály, které vznikají interferencí ve složitějších vzorcích. Enzymatická aktivita je dále řízena látkami jako jsou aktivátory nebo inhibitory. (6)

Hodně biochemických analytů se neochotně detekuje enzymovými elektrodami kvůli nedostatku selektivních enzymů, které jsou přítomny pro ten který analyt, nebo kvůli analytu, který se běžně nevyskytuje v živých systémech. (7)(5)

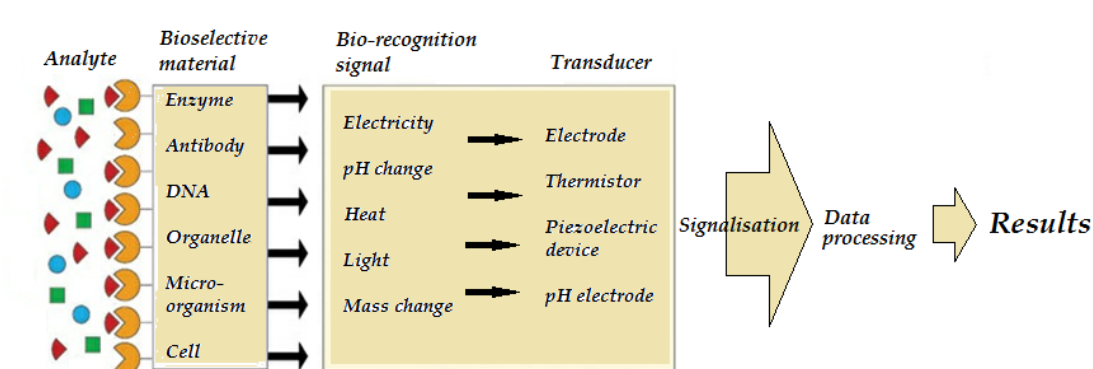
2.1.2 Afinitní biosensory

Afinitní biosensory využívají biomolekuly, jako jsou protilátky, membránové receptory, nebo oligonukleotidy. Tyto látky se vážou s cílovým analytem a produkují měřitelný elektrický signál. (4) Rozpoznávání molekul v afinitních biosensorech je určeno hlavně velikostí a tvarem vazebného místa pro komplementární struktury. Vysoká afinita a specifičnost biomolekul pro jeho ligand dělá tyto sensory velmi citlivými a selektivními. (7) Proces vázání jako například DNA hybridizace nebo vznik komplexů protilátka-antigen se řídí termodynamickými faktory. (4)

Immunosensory jsou afinitní sensory na bázi protilátek, kde detekce analytu, co může být antigen nebo haptén, se provádí jeho vazbou na specifickou oblast na protilátce. (8)

Elektrochemický převodník reaguje na navázání a převádí elektrický signál k výstupu, který může být zesílen, uchován a zobrazen. Komplementární oblasti protilátky a antigenu, které se spolu vážou, byly použity na výrobu protilátek v hostitelském organismu s vysokou specifíčností a afinitou. Immunosensory jsou mimo jiné známé pro jejich nízké detekční limity. (8) Immunoassay a immunosensory slouží pro kvantitativní i kvalitativní analýzu. Immunosensory mohou být použity na detekci stopové hladiny bakterií, virusů, léků, hormonů, pesticidů a mnoho dalších chemikálií. Immunosensorové aplikace zahrnují sledování bezpečnosti potravin vztahujících se k těžkým alergiím (např. na ořechy), detekci látek znečišťujících životní prostředí jako herbicidy a pesticidy ve vodě nebo v půdě, detekci biomedicínských látek jako warfarin, a sledování činidel biologických agens jako jsou toxiny, bakterie, viry a spóry. (7)(4)

Nukleové kyseliny se v porovnání s protilátkami používají méně často pro rozpoznávací element biosensoru. Rozpoznávání pomocí DNA nebo RNA fragmentů závisí buď na komplementárním párování bází mezi sekvencí nukleové kyseliny sensoru a zkoumaným analytem, nebo generování struktur nukleových kyselin, známých jako aptamery, které rozpoznávají trojrozměrné struktury, jako jsou například proteiny, a vážou se na ně. Afinitní DNA sondy se používají v medicíně na diagnostiku rakoviny, virových infekcí a genetických onemocnění. (7)



Obrázek 1: Princip biosensoru (9)

2.2 Elektrochemická detekce

Většina biosensorů využívá elektrochemickou detekci. (7)(4) Reakce, která se takto elektrochemicky monitoruje, generuje buď měřitelný proud (amperometrie), změnu napětí (potenciometrie) nebo mění vodivé vlastnosti mezi elektrodami (konduktometrie). (3)

Elektrochemie je povrchová technika, která nabízí určité výhody, jako to, že nezávisí pevně na reakčním objemu, a proto mohou být měřeny i velmi malé vzorky látek. Elektrochemická detekce může být použita na dosažení nízkých detekčních limitů v imunologických testech (immunoassay) bez přípravy nebo jen s malou přípravou vzorku. Detekce v homogenních imunologických testech, které nezahrnují separační krok na izolaci komplexu protilátka-antigen z uvolněných složek, není ovlivněna jinými složkami ve vzorku, jako jsou chromofory, fluorofory, a částice, které mohou interferovat se spektrofotometrickou detekcí. Proto se elektrochemické detekce mohou provádět na barevných nebo nečistých vzorcích, jako například krev, bez interference na červených krvinkách, hemoglobinu, bilirubinu nebo kapičkách tuku. (10) (11) Elektrochemicky měříme hlavně proud, napětí nebo impedanci.

Voltametrické a amperometrické metody aplikují napětí na pracovní elektrodu proti referenční elektrodě a měří se proud. Proud je výsledkem elektrolýzy prostřednictvím oxidace nebo redukce na pracovní elektrodě a je omezen množstvím molekul putujících k elektrodě. (12)

2.2.1 Voltametrie

Voltametrie je metoda, ve které je napětí měřeno přes určitý rozsah napětí. Odpověď vzniklého proudu je pík nebo plocha, která je úměrná koncentraci analytu ve vzorku. Voltametrické metody zahrnují lineární voltametrii, cyklickou voltametrii, hydrodynamickou, pulsní diferenciální, square-wave voltametrii, ac voltametrii, polarografii a stripping voltametrii. (12) Tyto metody mají obrovský dynamický rozsah, proto jsou vhodné pro kvantifikaci nízkých hladin.

2.2.2 Amperometrie

V amperometrii se měří změny elektrolytického proudu procházejícího článkem (13), které byly vyvolány oxidací nebo redukcí, v závislosti na čase, zatímco na pracovní elektrodě je udržováno konstantní napětí vzhledem k referenční elektrodě. (5) Amperometrii od voltametrie lze odlišit tak, že u amperometrie není přítomné proměnlivé napětí. Difusní

proud je přímo úměrný koncentraci elektroaktivní látky. (13) Technika je realizována tím, že se postupně stoupá s napětím až na požadovanou hodnotu a pak se změří proud, nebo se napětí udržuje na požadované hodnotě a vzorek prochází přes elektrodu. Proud je úměrný koncentraci elektroaktivních částic ve vzorku. Amperometrické biosensory umožňují selektivitu, ve které je oxidační nebo redukční detekční napětí charakteristické pro různé druhy analytu.

Díky své jednoduchosti je amperometrická detekce využívána biokatalytickými i afinitními biosensory. Fixní napětí při detekci má za následek zanedbatelný nabíjecí proud, čili proud potřebný na aplikaci napětí do systému. Tenhle proud minimalizuje signály na pozadí, které jinak nepříznivě ovlivňují limit detekce. Kromě toho, hydrodynamická amperometrie poskytuje značně zvýšený transport látky na povrch elektrody (12)(14), například když pracovní elektroda vzhledem k roztoku rotuje nebo vibruje, nebo proudí, nebo je mícháno okolní prostředí a vzorek pak obchází nehybné elektrody. (14)(15)(16)(17)(18) Elektrochemická detekce průtokovým systémem může být použita na monitorování v životním prostředí a průmyslových procesech, protože podmínky průtoku umožňují roztoku měnit se snadněji ve víceetapových testovacích postupech, což je výhodné na on-line monitorování.

2.2.3 Konduktometrie

Konduktometrie monitoruje změny elektrické vodivosti roztoku vzorku nebo média, například nanovláknů, v důsledku změny ve složení roztoku/média v průběhu chemické reakce. Konduktometrické biosensory často obsahují enzymy, u kterých generované nabitě produkty mají za následek lokální změny v iontové síle a tím zvýší vodivost. Ve zředěných roztocích silných (tj. úplně disociovaných) elektrolytů je měrná vodivost přímo úměrná koncentraci elektrolytu. Konduktometrie se používá v biosensorech na monitorování životního prostředí a v klinické analýze. (13) Například tyrosinázový biosensor byl vyvinut na měření stopových množství škodlivých látek jako DCMU (Diuron) a antracin a jejich metabolitů. Na principu konduktometrie pracuje i biosensor na detekci metamfetaminu v lidské moči. (19)(20)

2.2.4 Potenciometrie

Potenciometrie je založená na měření rovnovážného napětí elektrochemického článku při zanedbatelném proudu. Běžnými příklady jsou například skleněná pH elektrody a iontově selektivní elektrody jako K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- . (7)(4) Sensory využívají elektrochemickou

celu se dvěma referenčními elektrodami na měření potenciálu přes membránu, která selektivně reaguje s nabitým iontem. Tyto chemické sensory se můžou změnit na biosensory tak, že se pokryjí biologickým prvkem jako třeba enzymem, který katalyzuje reakci. Reakce pak poskytne ionty, které zachycuje elektroda ležící pod navázaným enzymem. Například, sensor pro penicilin se vyrábí pokrytím pH elektrody penicilinázou, která katalyzuje hydrolytické štěpení penicilinu a taky generuje vodíkové kationty. (21) Elektroda zaznamená změny pH na svém povrchu, což je nepřímé měření penicilinu. Unipolární transistory byly přizpůsobené chemickým sensorům začleněním do elektrochemické cely. (22)(23) Mohou být taky přetvořeny na biosensory tím, že se jejich povrch pokryje biologickým činidlem. (24)

2.3 Konstrukce

Elektrochemický sensor je částí elektrochemické cely, která je složena ze dvou nebo tří elektrod. Typický tří-elektrodový systém pozůstává z pracovní elektrody, vyrobené z chemicky stabilní a vodivé látky, jako je například platina, zlato nebo uhlík; referenční elektrody, obvykle pokovené stříbrem s vrstvou chloridu stříbrného a pomocné elektrody, vyrobené z platiny. Referenční elektroda je obvykle pak inertní ze strany redoxních reakcí za účelem udržování konstantního referenčního napětí. (3) Výhodou systému je to, že náboj vzniklý elektrolýzou putuje přes pomocnou elektrodu namísto referenční elektrody, což chrání referenční elektrodu, aby nezměnila svoje poločlánkové napětí.

Dvou elektrodový systém má pouze pracovní a referenční elektrodu. Pokud je hustota proudu dostatečně nízká ($< \mu\text{A cm}^{-2}$), pak referenční elektroda může nést náboj bez vedlejších nepříznivých účinků. (5) Pro sensory se využívají oba typy elektrodových systémů, ačkoli obecně je preferovaný jednorázový dvouelektrodový systém, protože nevyžaduje dlouhodobou stabilitu referenční elektrody.

Elektrody se lehce miniaturizují. Součástí biosensorů můžou být i nanodráty, nanočástice a uhlíkové nanotrubičky. Zmenšování elektrod může vést k vyšší citlivosti. (3) Značnou výhodou zmenšování elektrod je fakt, že velikosti vzorků jsou omezeny a tím se požadují jenom malé objemy pro detekci. Detektory a jejich řídicí přístroje mohou být snadněji miniaturizovány za relativně nízkou cenu, proto je ve voltametrické omezený proud závislý na teplotě a detekční cela by měla být udržována na konstantní teplotě při kalibraci a měření vzorků, aby byly získány správné a přesné výsledky. (25)(26)(27)

2.4 Elektrody

K měření jsou zapotřebí tři elektrody:

- Pracovní

Na pracovní elektrody se používají ušlechtilé kovy jako je zlato nebo platina, sklený uhlík, grafit, vodivé polymery nebo organické vodivé soli. Lze zvolit použitelný rozsah tak, aby nedocházelo k elektrochemickému rozkladu materiálu elektrody nebo k interferenčním reakcím (rozklad pracovního pufru). Před samotným měřením je často důležitá příprava elektrody, jako je vyleštění povrchu brusnými prášky, opláchnutí a odstranění povrchových nečistot.

- Referenční

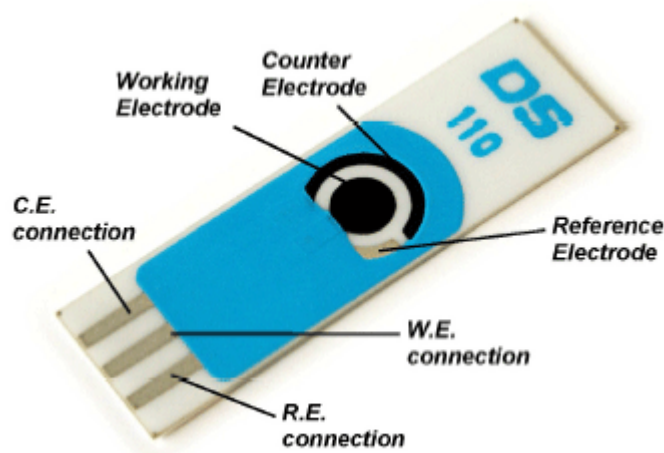
Slouží jako srovnávací bod pro měření, resp. nastavování potenciálu pracovních elektrod. Jejich vlastní potenciál je přesně definovaný a časově stálý. U amperometrických biosensorů se často používá holý povrch stříbra.

- Pomocné

Elektrochemicky neaktivní, jsou tvořeny dobrým vodičem, většinou s platinou, a musí mít dostatečně velkou plochu. Jsou ve formě drátku nebo plíšku, používá se i uhlíková tyčinka nebo nerezový drát. (28)

Sítotisková elektroda (SPE)

Technologie sítotisku (screen-printing) je technika, která se často používá při výrobě elektrod pro vývoj jednorázových elektrochemických biosensorů. Sítotisková elektroda je ploché zařízení založené na více vrstvách tisknutých materiálů ve formě past nebo „inkoustů“ na polyamidových, plastových, epoxy-ových nebo keramických substrátech na bázi oxidu hlinitého. (29)(30)(31)(32) Sítotisková technologie je jednou z nejdůležitějších pro výrobu jednorázových biosensorů díky svým velkým výhodám, jako jsou jednoduchost, univerzálnost, malé náklady, přenosnost, snadnost ovládání, malé rozměry a možnost masové výroby, což vede k rozvoji v různých aplikacích v oblasti elektroanalytické chemie. (33)



Obrázek 2: Sítotisková elektroda (34)

Tužková elektroda (PGE)

Tužková elektroda (PGE) pro DNA biosensory má několik výhod, jako je například zabránění křížové kontaminaci a ztrátě odezvy kvůli nečistotám na elektrodě. Pozůstává jednoduše z grafitové tuhy, na jednom konci které je odizolováno pracovní místo, a druhý konec je vodivě spojen s detektorem.

Iontově selektivní elektroda (ISE)

Potenciál iontově selektivní elektrody je řízen aktivitou iontu, pro jeho stanovení je elektroda určena. Mění se přibližně o 59/z milivoltů při změně koncentrace iontu o jeden řád. (13)

Skleněná elektroda

Skleněná elektroda je typ iontově selektivní elektrody vyrobené z dopovaných skleněných membrán citlivých na specifický iont. Většina z nich reaguje s ionty s jednotkovým nábojem, jako jsou H^+ , Na^+ , Ag^+ . Nejčastějšími skleněnými elektrodami jsou pH elektrody.

Vysoce orientovaný pyrolytický grafit (HOPG)

Vysoce orientovaný pyrolytický grafit dostaneme, pokud je pyrolytický grafit, získaný z chemické depozice uhlovodíků z plynné fáze, zahřátý na velmi vysokou teplotu a vystaven působení vysokého tlaku. Vzniklý materiál je nadále polykrystalický, ale vlastnostmi se blíží monokrystalu. (35)

2.5 DNA

DNA je biomolekula, která sestává ze dvou antiparalelních polynukleotidových řetězců, které se skládají z nukleotidů. Každý nukleotid je složen ze tří složek: cukru- deoxyribózy, fosfátového zbytku a jedné ze čtyř dusíkatých bází. Polymer tvořený fosfátem a cukrem reprezentuje cukr-fosfátovou páteř. Primární genová DNA je kódována pořadím purinových bází, adenin (A) a guanin (G), a pyrimidinových bází, cytosin (C) a thymin (T). Dva řetězce jsou spolu spojeny vodíkovými vazbami mezi jednotlivými bázemi, mezi A-T dvěma, a C-G třema. Sekundární struktura DNA tvoří helix, složen ze dvou komplementárně spojených antiparalelních řetězců, který je stabilizován vodíkovými můstky. Jeden závit je tvořen 10 páry bází. Díky fosfátovým zbytkům v cukr-fosfátové páteři nese molekula DNA záporný náboj.

2.6 DNA elektrochemický biosensor

DNA biosensory jsou integrované receptor-převodníkové zařízení, které používají DNA jako bioreceptor na měření specifických procesů probíhajících při vázání různých látek s DNA. (36) Díky rychlé detekci jsou oblíbené hlavně při monitorování nečistot v ovzduší, při výzkumu interakčních mechanismů léků s DNA, detekci poškození bází DNA v klinické analýze, nebo detekci specifických DNA sekvencí v lidských, virusových a bakteriálních nukleových kyselinách. Z elektrochemických převodníků, uhlíkové elektrody, jako třeba skleněné, vláknové, tužkové vykazují několik jedinečných vlastností. Široké potenciálové okno umožňuje citlivou elektrochemickou detekci oxidačního poškození DNA pomocí analýzy oxidačních píků DNA bází, které se během měření objevily.

Elektrochemická oxidace DNA na uhlíkové skleněné elektrodě, při použití pulsní voltametrie vykazuje dva oxidační píky, kvůli oxidaci guaninových a adeninových zbytků v cukr-fosfátové páteři DNA. (37)(38) Elektrochemické chování dsDNA a ssDNA ukazuje, že transportu elektronů zevnitř pevné struktury dsDNA je na povrch elektrody obtížnější, než z flexibilní struktury ssDNA, kde dusíkaté báze jsou k tomuto povrchu blíže. Drsnost povrchu elektrody způsobuje, že dsDNA má určité potíže při opisování kontur povrchu, zatímco molekuly ssDNA snadněji zapadnou do žlábků na povrchu, díky jejich flexibilitě. Elektrochemická oxidace na uhlíkových elektrodách ukázala, že všechny báze – guanin, adenin, thymin a cytosin – mohou být oxidovány na základě mechanismu závislého na pH.

Elektrochemická stabilizace elektrody ze skleněného uhlíku (GCE) umožní dosažení lepší separace píků a zvýšení proudů pro všechny typy DNA bází ve fosfátovém pufru o pH=7,4, což je hodnota blízká pH fyziologického roztoku. Bylo ukázáno, že pyrimidinové nukleosidy

a nukleotidy jsou elektroaktivní na GCE, a kromě lehké detekce purinových zbytků je současně možné detekovat oxidaci pyrimidinových zbytků v ssDNA.

Molekula DNA se při interakci s povrchem na něj adsorbuje. Adsorpce dsDNA je jakoby reversibilní a struktura DNA podstupuje konformační změny během imobilizace. Proces DNA imobilizace a stabilizace na povrch elektrody představuje klíčové aspekty ve výrobě DNA elektrochemických biosensorů, ovlivňovaných vlastnostmi DNA sondy, odpovědí sensoru a jeho výkonem. (39) Odlišné strukturní konformace adsorbované DNA mohou vést k různým interakcím s malými molekulami a ke změnám v přístupu léků do žlábků DNA.

Pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) byly na elektrodách z vysoce orientovaného pyrolytického grafitu (HOPG) popsány různé imobilizační procesy jednovrstvových a vícevrstvových DNA filmů. (40)(41)(42)(43) HOPG poskytuje zejména hladký povrch, což umožňuje detekci povrchových modifikací během adsorpce DNA. Přímým pozorováním povrchu elektrody bylo zjištěno, že vlastnosti DNA filmu a optimální elektrochemická odpověď DNA-biosensoru závisí na pH, složení pufru, iontové síle, procesu imobilizace, času adsorpce, užitém napětí, typu a koncentraci DNA. Při malých koncentracích formují tenké filmy dsDNA a ssDNA vrstvu, která se ve velké míře jeví jako síťová struktura jednotně pokrývající povrch elektrody HOPG. Tlustší filmy připravené jinými adsorpčními procesy představují jednotné a úplné pokrytí elektrody. DNA filmy v kyselějších pufrch poskytují lepší pokrytí povrchu elektrody DNA proti filmům v neutrálních roztocích, kvůli překrytí a superpozici molekul DNA. Interakce DNA s elektrodou jsou silnější a stabilnější pokud je napětí aplikováno během adsorpce.

Při adsorpci tenkých vrstev dsDNA povrch elektrody není zcela pokryt. Některé oblasti jsou odkryté a vznikají póry, což má za následek zavádějící výsledky při použití DNA elektrochemického biosensoru pro detekci interakcí DNA s léčivy. Molekuly léčiv mohou pronikat na odkryté oblasti na elektrodě a nespecificky se vázat. Takto se dvakrát podílí na elektrochemickém signálu, jednou z adsorbovaného léčiva na elektrodu a podruhé kvůli poškození imobilizované dsDNA, a proto jsou výsledné signály těžko rozeznatelné. Při použití hrubých filmů v DNA biosensorech, kde je elektroda zcela pokryta a tudíž je vyloučeno jakékoliv nežádoucí navázání léčiva k povrchu, je výsledný signál určen pouze interakcí této složky s dsDNA. (44)

2.7 Typy interakcí

Struktury DNA mají jednoduchou a dobře definovatelnou terciární strukturu v porovnání s proteiny. Struktura jednořetězcové ssDNA je více flexibilní než dvouřetězcová dsDNA, formy které jsou mnohem robustnější kvůli vodíkovým vazbám mezi jednotlivými bázemi. Tím se vytváří ve většině případů pravotočivá dvoušroubovice, kde báze jsou naskládány nad sebe podél její osy, a cukr-fosfátová páteř složená ze dvou antiparalelních řetězců formuje vnější část helixu. (45)(46) Naskládané báze v dvoušroubovici vytvářejí malý a velký žlábek, který se stává cílem pro navázání nízkomolekulárních proteinů.

DNA modifikovaná elektroda je připravena reagovat s redoxním indikátorem, před nebo po navázání do cílové DNA. Existují tři různé způsoby navázání elektrochemického indikátoru do DNA:

- **Elektrostatické interakce**
Indikátor je nabitý nábojem a v závislosti na tomto náboji převládají atraktivní interakce mezi záporně nabitou cukr-fosfátovou páteří DNA a kladně nabitým indikátorem, a repulsivní mezi záporně nabitým indikátorem.
- **Interkalační interakce**
Redoxní indikátor obsahuje planární aromatický kruh, který je vsunut mezi pár bází dsDNA. Interkalátory jako ethidium bromid, anthracykliny nebo metalointerkalátorové komplexy se vsunují mezi báze svými planárními aromatickými kruhy téměř svisle k ose dsDNA.
- **Navázání do žlábků**
Indikátor se váže buď do malého, nebo velkého žlábků ve struktuře dvouřetězcové DNA. Tento typ interakce je vzácný, protože většina známých indikátorů, schopných vázat se do žlábků, převážně interaguje s dsDNA kombinací výše uvedenými způsoby.

Elektrochemické indikátory, které jsou schopny se vázat se do žlábků nebo interkalačně, se vážou s vyšší afinitou do dsDNA, čímž umožňují lépe rozlišit, zda se jedná o strukturu ssDNA nebo dsDNA.

Neexistují žádná pravidla pro výsledný efekt hybridizace DNA s redoxním indikátorem. Všeobecně ale platí, že pozitivní posun voltametrických píků (viz.dále) patří hydrofobním interakcím mezi redoxním indikátorem a DNA bází, tj. interkalacím, a negativní posuny jsou

spojeny s elektrostatickými interakcemi mezi nabitou molekulou indikátoru a negativně nabitou cukr-fosfátovou páteří. (47)(48)(49) Pozorované mohou být také kombinované způsoby interakcí.

Pozitivní náboj interkalačního redoxního indikátoru dokáže rychleji interagovat s duplexní DNA, ale poskytuje vyšší nespecifikované signály z elektrostatických interakcí s ssDNA. (50)(51) Naopak indikátor se záporným nábojem potřebuje delší čas na interakci s dsDNA, ačkoli po interakci s ssDNA vykazuje zanedbatelné signály. (50)

2.8 Mutageny

V lidské DNA neustále vznikají mutace genů, které jsou základem genetické variability, a tím základní podmínkou evoluce života. Mutace jsou náhlé, náhodné a neusměrněné změny genetického materiálu, tj. DNA. Mutageny jsou látky nebo faktory, které zvyšují rychlost těchto změn v buňkách bakterií, rostlin a živočichů. Poznáme fyzikální, chemické nebo biologické mutageny, které mohou mít pozitivní nebo negativní vliv na genetickou informaci uloženou v DNA.

2.8.1 Interkalátory

2.8.1.1 *Ethidium bromid*

Ethidium bromid (EtBr), označovaný taky jako homidium bromid, je neradioaktivní fluorescenční barvivo, používané v molekulární biologii jako marker pro identifikaci a vizualizaci proužků nukleových kyselin v gelové elektroforéze. Je to tmavě červená krystalická látka, která po vystavení ultrafialovému záření světélkuje načervenalé až hnědě.

Na nukleové kyseliny se váže velmi intenzivně a specificky tím, že interkaluje svou plochou mezi ploché páry bází v molekule dsDNA. Ploché páry bází jsou ve dvoušroubovici uspořádány nad sebou jako mince a interkalace ethidia spočívá ve vsouvání jakoby další mince do stávajícího sloupce. Tímto je ethidium bromid schopen ovlivnit čtení genetické informace při replikaci DNA a vyvolávat posunové mutace v genetické informaci. Proto je považován za velmi silný mutagen, karcinogen a teratogen, a při práci s ním je nutno dodržovat základní bezpečnostní pravidla. (52)(53)



Obrázek 3: Struktura Ethidium bromidu (53)

2.8.1.2 Benzo[a]pyren

Benzo[a]pyren (BaP) je polycyklický aromatický uhlovodík (PAH), který je považován za jeden z mnohých potenciálních PAH karcinogenů a mutagenů. Jedná se o žlutě zbarvenou krystalickou látku. Je produktem nedokonalého spalování, můžeme jej najít ve slévárnách ocele, v závodech na výrobu koksu a hliníku (54), v cigaretovém kouři a v ovzduší díky výfukovým plynům automobilů. Nicméně stopy po BaP se najdou i v grilovaných potravinách. Koncentrace BaP klasifikuje stupně karcinogenity PAH ve vodě, ovzduší a jídle. (55)(56)

Benzo[a]pyren je prokarcinogen, jehož karcinogenní účinky závisí enzymatickým metabolismu konečného mutagenu. Nejprve je oxidován cytochromem P450 1A1 na benzo[a]pyren-7,8-epoxid. Tento produkt je metabolizován epoxid hydrolázou, která otvírá epoxidový kruh a vzniká benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol. Konečný karcinogen je vytvořen další reakcí s cytochromem P450 1A1 za vzniku benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxidu, který je takto připraven k navázání do DNA.

Tato molekula interkaluje do dsDNA a kovalentně se spojí s nukleofilní guaninovou bází. Rentgenovou krystalografií a NMR strukturní analýzou bylo zjištěno zkřivení DNA, co indukuje mutace v důsledku špatné replikace DNA.



(+)-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide

2.8.2.1 Hexakynoželezitan

(59)(60)(61)(62) Aplikace neutrálně nabitého řetězce nukleových kyselin jako sond imobilizovaných na elektrodu, umožnilo výrazný posun elektrochemického signálu po hybridizaci s komplementární sekvencí cílové DNA. (63)



2.8.2.2 Hexaamin rutenium

V porovnání s hexakynoželezitami se kationty hexaamin rutenium stechiometricky vážou na aniontovou fosfodiesterovou páteř DNA, což umožňuje kvantitativní detekci DNA na elektrodách. (58)(65)(66)(67) Tyto multivalentní kationty lehce nahrazují monovalentní kompenzační kationty z fosfátových skupin na DNA tím, že DNA-modifikovaná elektroda je ponořena do roztoku s nízkou iontovou silou.

Dalšími látkami vázajícími se elektrostaticky jsou například tris-bipyridin kobaltitý a tris-fenyl kobaltitý komplex, ačkoli se oba mohou vázat i interkalačně. Elektrostatická interakce je založena na negativním posunu hodnot redoxního potenciálu komplexů, které jsou navázány na DNA. (68) Přirozený přechod mezi interakcemi kobaltových komplexů a dsDNA z elektrostatických na interkalační se může dosáhnout zvýšením iontové síly a vhodnou volbou kovového ligandu. (69)

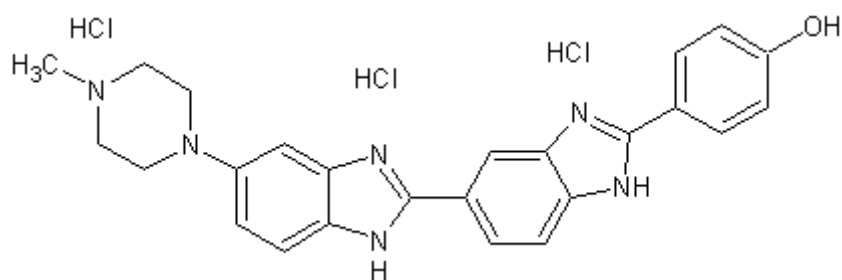
Elektrostatické interakce redoxních indikátorů jsou necitlivé na složení sekvencí DNA a osobitost struktury, pokud se jedná o ss nebo dsDNA. Za vhodných podmínek experimentu, elektrochemicky změřená koncentrace redoxního indikátoru je úměrná počtu fosfátových skupin přítomných na povrchu elektrody. Pomocí kationového redoxního indikátoru lze nezávisle měřit koncentraci DNA na povrchu elektrody. (58)(67)(70)

2.8.3 Indikátory vázající se do žlábků

Příklady výhradně do žlábků vázajících se indikátorů jsou vzácné, protože většinou se jedná o smíšené navazování kombinující vázání do žlábků a interkalační. Přesto se najdou některé případy.

2.8.3.1 Barvivo Hoechst 33258

Barvivo je známé tím, že se navazuje do malého žlábků na dsDNA. Tato vlastnost byla využita na vývoj genosensory založeného DNA sekvencí imobilizovaných na zlaté elektrody. Detekovaný proud po interakci barviva s dsDNA byl podstatně vyšší, než po interakci s ssDNA, což umožňuje detekovat DNA o koncentracích až $0,1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. (71) Nevýhodou tohoto barviva je ireversibilní oxidační elektrochemie. Avšak další optimalizace této metody umožnila autorům detekovat $10^4 - 10^6$ kopií genomu viru hepatitidy B pomocí jednorázových zlatých mikroelektrod. (72)



Obrázek 6: Bravivo Hoechst 33258 (73)

2.8.3.2 DHS

Dalším příkladem elektrochemického indikátoru, který se váže do žlábků je N,N'-bis(3,4-dihydroxybenzyliden)-1,2-diaminobenzen (DHS). Pozůstává ze dvou ortokinonových funkčních skupin a planárního aromatického kruhu a je schopen se vázat do malého žlábků dsDNA lépe než do ssDNA. DNA byla imobilizovaná na zlatou elektrodu přímou adsorpcí nebo přes alkanthiolový linker. Tímto se umožnila detekce 25-merních sekvencí *Helicobacteru pylori* o koncentraci 8,3 μM . (74)

3 Praktická část

3.1 Úloha

Úkolem bylo připravit různé druhy uhlíkových elektrod, například sítotiskové nebo tužkové, a imobilizovat na ně DNA. Takhle vzniklý DNA sensor byl vystaven působení genotoxických látek, v tomhle případě interaklátoru benzo[a]pyrenu. Pomocí elektrochemických metod – SWV voltametrie – byly měřeny oxidační signály adeninových a guaninových skupin.

3.2 Materiály

3.2.1 Reagenty a roztoky

K měření byl použitý acetátový pufr o koncentraci 0,1 M o pH=5, připraven z octanu sodného rozpuštěného v destilované vodě, DNA z telecího brzlíku o koncentraci 0,5 mg/ml v acetátovém pufru, fosfátový pufr o koncentraci 0,1 M a pH=7 a benzopyren rozpuštěn v dimethylformamidu (DMF) o výsledné koncentraci 0,5 mg/ml.

3.2.2 Elektrody PGE

Pracovní elektrody byly vyrobeny z tuh, které jsou složené z přírodního grafitu. V závislosti na obsahu pojiva se odvíjí jejich odolnost a fyzikální vlastnosti. Na experimenty byly použity tuhy H a HB o průměru 0,5 a 0,7 mm z každého druhu. Před samotným použitím byly očištěny od nečistot hadříkem a několikrát opláchnuty v acetonu. Pomocí parafilmu byl vymezen pracovní prostor na elektrodě asi 3 mm od jejího konce. Druhým koncem byl zprostředkován elektrický kontakt. Referenční elektroda byla zhotovena ze stříbra a pomocná z platiny. Obě byly před použitím očištěny brusným práškem. Na měření byl použitý přístroj PalmSens EMstat, na vyhodnocení software PSTrace.

3.3 Imobilizace DNA

Povrch elektrody PGE elektrody byl předem upravený použitím napětí +1,40 V na 500 sekund v acetátovém pufru (0,1 M, pH=5). Elektroda byla omyta destilovanou vodou a ponořena do fosfátového pufru (0,1 M, pH=7) a proměřením pomocí square wave voltametrie v rozsahu napětí +0,85 V až +1,40 V proti referenční elektrodě byl získán blank. Po omytí byla

ponožena do roztoku acetátového pufru obsahující dsDNA o koncentraci 0,5 mg/ml. dsDNA byla imobilizována pomocí amperometrie kolem 10, 20 nebo 30 minut při napětí +1,40 V. Po imobilizaci byla nenavázaná DNA omyta pomocí destilované vody a elektroda se lehce osušila hadříkem. Nakonec byla opět ponořena do fosfátového pufru, tentokrát s už navázanou DNA, a pomocí SWV při amplitudě napětí 60 mV, frekvenci 250 Hz, krokovým napětím 4 mV, a v rozsahu napětí +0,85 V až +1,40 V proti referenční elektrodě.

Při imobilizaci DNA na povrch sítotiskové elektrody byl postup téměř stejný, elektroda avšak nebyla ponořena do roztoku, ale samotný roztok byl nanesen na vodorovnou plochu elektrody.

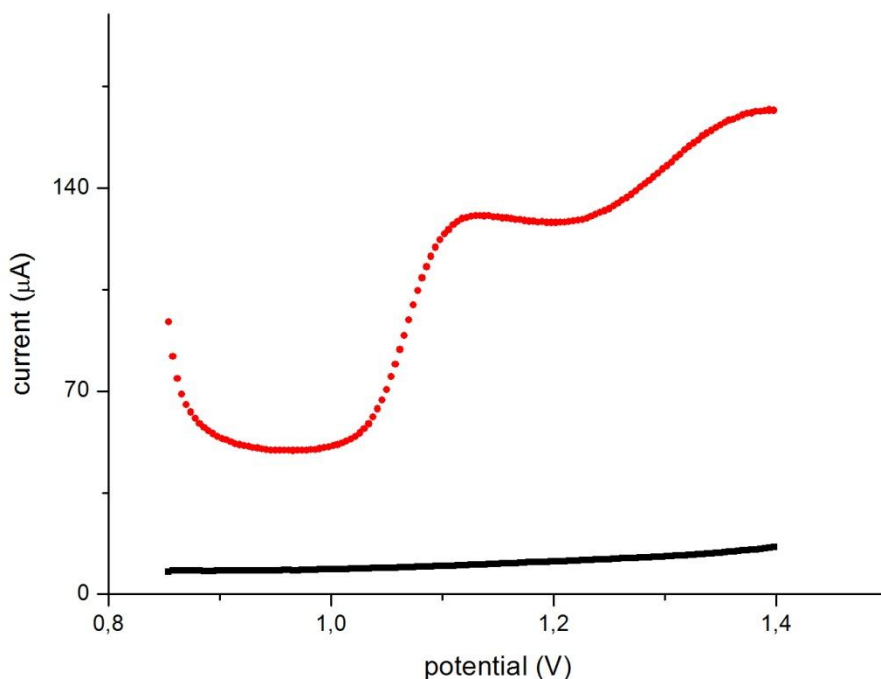
3.4 Interakce s benzopyrenem

K připravenému roztoku dsDNA byl přidán 1 μ l roztoku benzo[a]pyrenu v DMF a spolu byly oba promíchány. Na sítotiskovou elektrodu bylo naneseno 25 μ l roztoku s DNA s benzopyrenem a pomocí amperometrie se DNA nechala navazovat 20 nebo 30 minut. Po navázání byla zbytková DNA opláchnuta a elektroda osušena. Poté se pomocí SWV změřily signály za stejných podmínek jako bez benzopyrenu. Pro kontrolu bylo provedeno měření i po imobilizaci DNA pouze s DMF.

Imobilizace DNA s interkalovaným benzo[a]pyrenem nebyla prováděna s PGE elektrodami kvůli špatné odezvě DNA, tudíž bylo prakticky nemožné detekovat jakýkoliv oxidační pík a tím objektivně vyhodnotit případné další výsledky.

3.5 Výsledky

3.5.1 Experiment 1

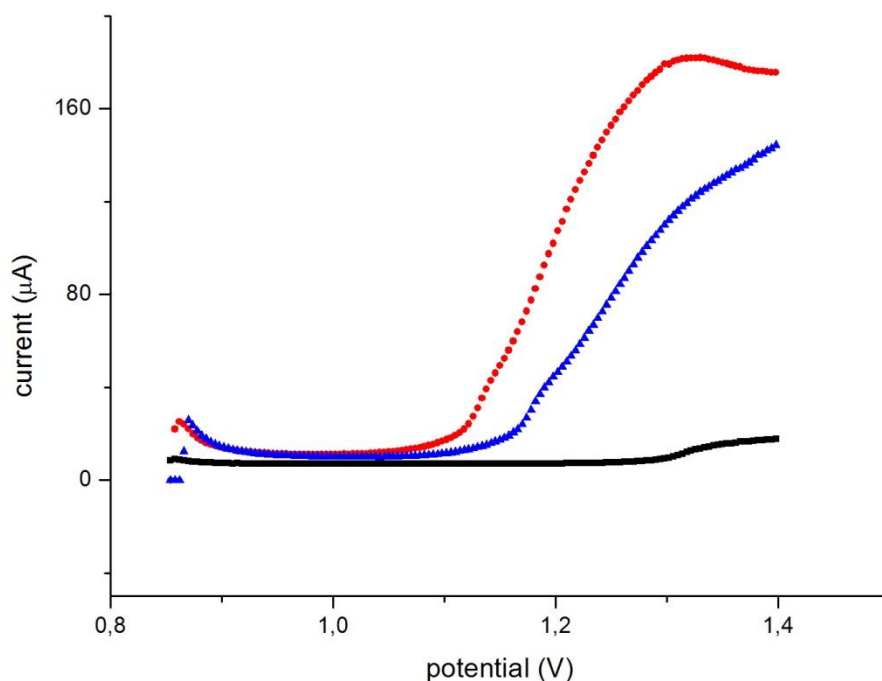


Obrázek 7: SW voltamogram získaný při oxidaci DNA ve fosfátovém pufru po 120 minutách měření.

V prvním případě imobilizace DNA na elektrodu trvala přibližně 9 minut. Zbytková DNA, která se nenařadila, se lehce omyla destilovanou vodou. Na elektrodu byl poté nanášen fosfátový pufr 0,1 M o pH=0,7. Po nanášení pufru můžeme vidět zvýšení proudu po interakci s DNA na elektrodě a zřetelný oxidační pík kolem +1,13 V. Pík se neobjevil ihned po nanášení na elektrodu, začal se objevovat postupně. Jak ho lze vidět na grafu, se ukázal zhruba po dvou hodinách, při frekvenci 160 Hz.

Během měření byly měněny podmínky měření. Křivky byly získávány pro různé frekvence a amplitudy napětí, a byl pozorován dosah těchto změn na výsledný signál. Bylo zjištěno, že změna frekvence nemá na průběh křivky téměř žádný vliv a změny amplitudy napětí způsobí celkové zvýšení proudu, ale tvar křivky zůstává zachován.

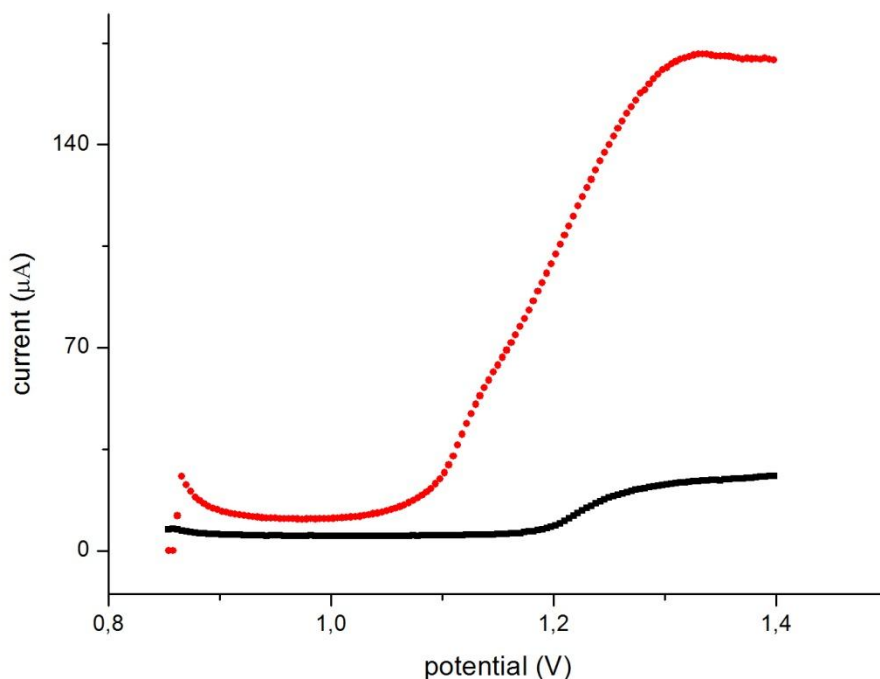
3.5.2 Experiment 2



Obrázek 9: SW voltamogram získanými oxidací DNA ve fosfátovém pufru po 30 a 60 minutách měření.

Ve druhém případě trvala imobilizace DNA o něco déle, přibližně 20 minut. Frekvence byla 250Hz. Červenou křivku jsme dostali po půlhodině měření, a lze vidět formování dvou oxidačních píků, jednoho kolem +1,15 V a druhého kolem +1,3 V. Modrou křivku jsme dostali zhruba po další půlhodině. Zde vidíme pokles proudu a píky už jsou méně zřetelné a jsou posunuty doprava směrem k vyššímu napětí.

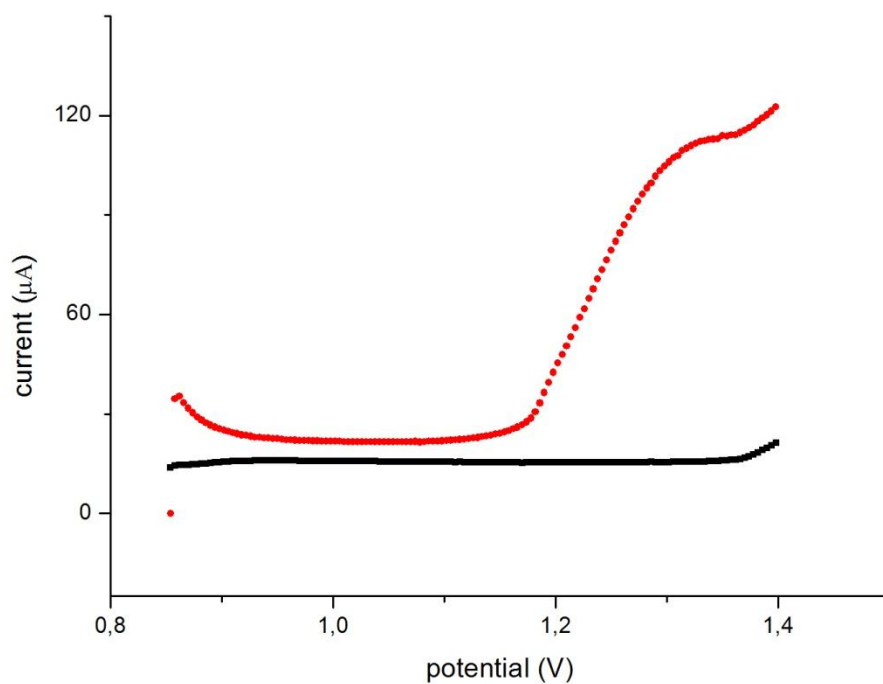
3.5.3 Experiment 3



Obrázek 10: SW voltamogram získaný při oxidaci DNA ve fosfátovém pufru po 30 minutách měření.

Ve třetím případě byla DNA navazována taky 20 minut. Je pozorována podobná křivka jako v předcházejícím případě, ačkoli píky jsou trochu méně zřetelné. Píky se začaly objevovat po 20 minutách měření, výsledná křivka viditelná na grafu byla získána po hodině působení fosfátového pufru. První pík se formuje opět kolem +1,13 V a druhý kolem +1,3 V, ale oba nejsou úplně rozeznatelné. Měření bylo prováděno na frekvenci 250 Hz.

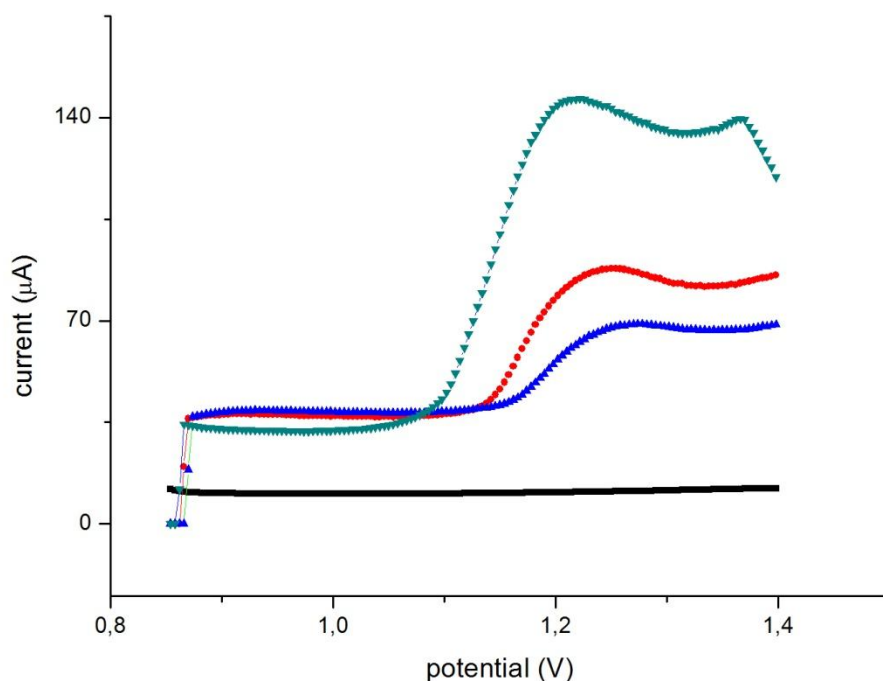
3.5.4 Experiment 4



Obrázek 11: SW voltamogram získaný při oxidaci DNA ve fosfátovém pufru po 30 minutách měření.

U tohoto experimentu byly podmínky podobné, doba navazování byla 20 minut, měření probíhalo při frekvenci 250 Hz. Výsledná křivka získaná po 30 minutách proměřování je podobná těm předcházejícím, ačkoli píky nejsou úplně dobře čitelné.

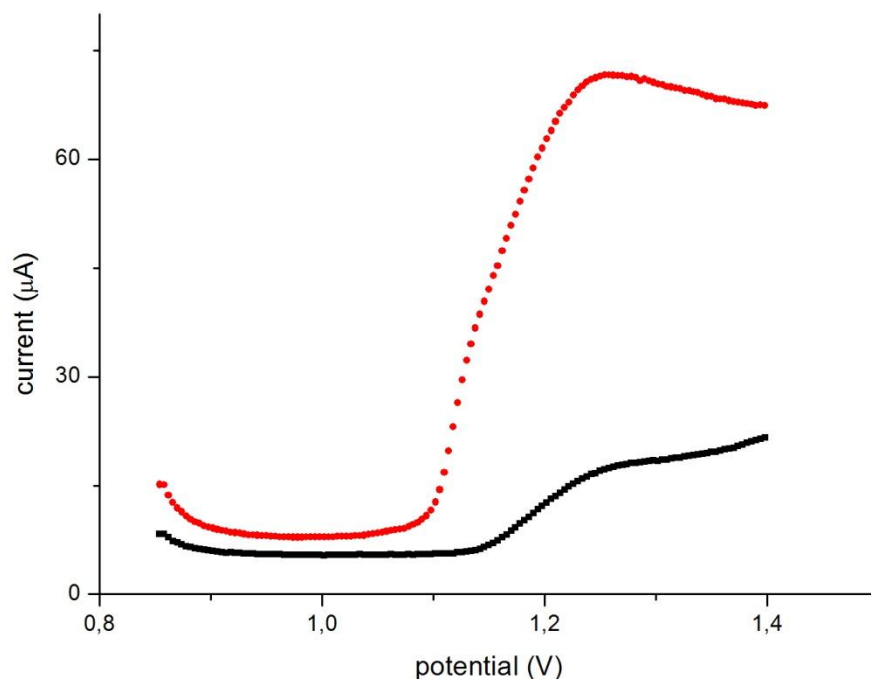
3.5.5 Experiment 5



Obrázek 12: SW voltamogram získaný při oxidaci DNA ve fosfátovém pufru po 10, 15 a 20 minutách měření.

V posledním experimentu se DNA navazovala cca 30minut. Po více než hodině měření byl k dispozici výsledek odpovídající červenému grafu. Je zde vidět jeden pík kolem +1,25 V. Po přibližně deseti minutách jsme získali modrou křivku, kde došlo ke snížení proudu a pík se trochu posunul směrem doprava. Ale po pár minutách dalšího proměřování byla získána zelená křivka se zřetelným píkem kolem +1,2 V. Proud se o hodně zvýšil. Druhý očekávaný pík nebyl v měření zaznamenán.

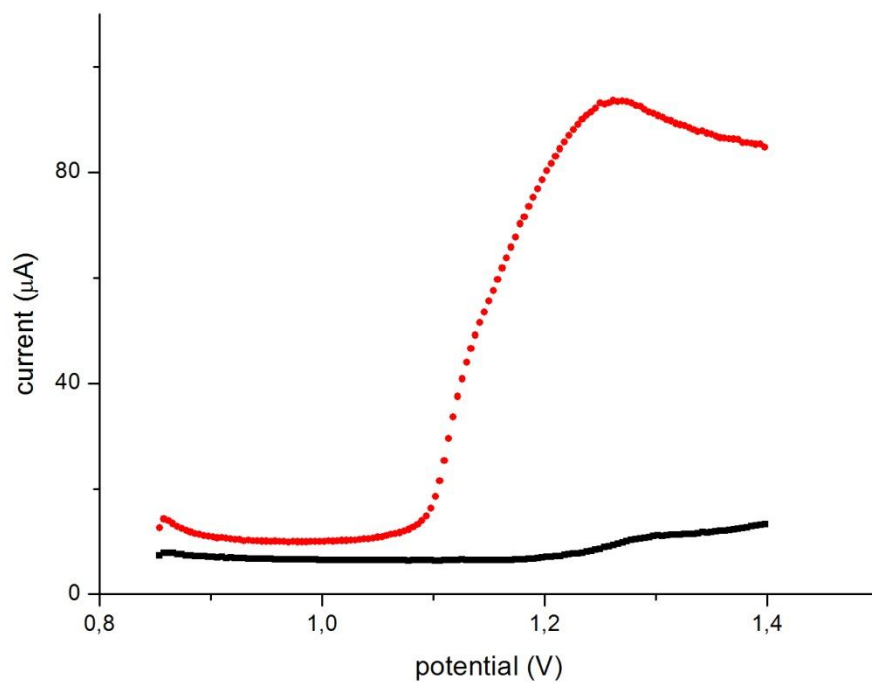
3.5.6 Experiment 6



Obrázek 13: SW voltamogram získaný při oxidaci DNA s navázaným BaP v roztoku DMF.

Při tomhle pokusu byl získán graf už s interkalovaným benzo[a]pyrenem v roztoku DMF v DNA. Podmínky se od předchozích pokusů nelišily, sice objem roztoku DNA nanesené na povrch elektrody byl o polovinu menší, tj. 25 μ l. DNA byla pro jistotu navazována 30 minut. Získaná červená křivka odpovídající výslednému signálu byla zaznamenána po přibližně 15 minutách proměřování. Lze zde vidět pík kolem +1,25 V. V okolí +1,15 V je možné vidět i mírné zakřivení, což by mohlo předpovídat formování druhého očekávaného píku.

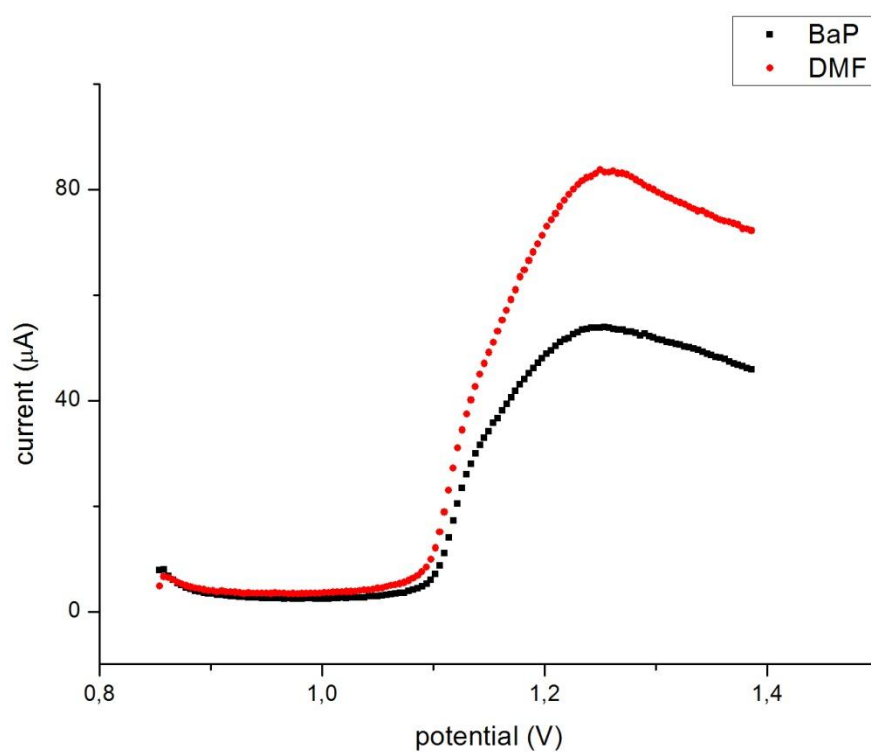
3.5.7 Experiment 7



Obrázek 14: SW voltamogram získaný při oxidaci DNA s DMF.

V posledním případě, kdy do DNA byl nanesen 1 μ l pouze DMF bez benzo[a]pyrenu jako kontrolní vzorek, se při opět stejných podmínkách objevil pík kolem +1,25V. DNA byla navazována 30 minut a výsledná křivka byla získána po 20 minutách. Je zde také pozorovatelné jemné zakřivení kolem +1,15 V.

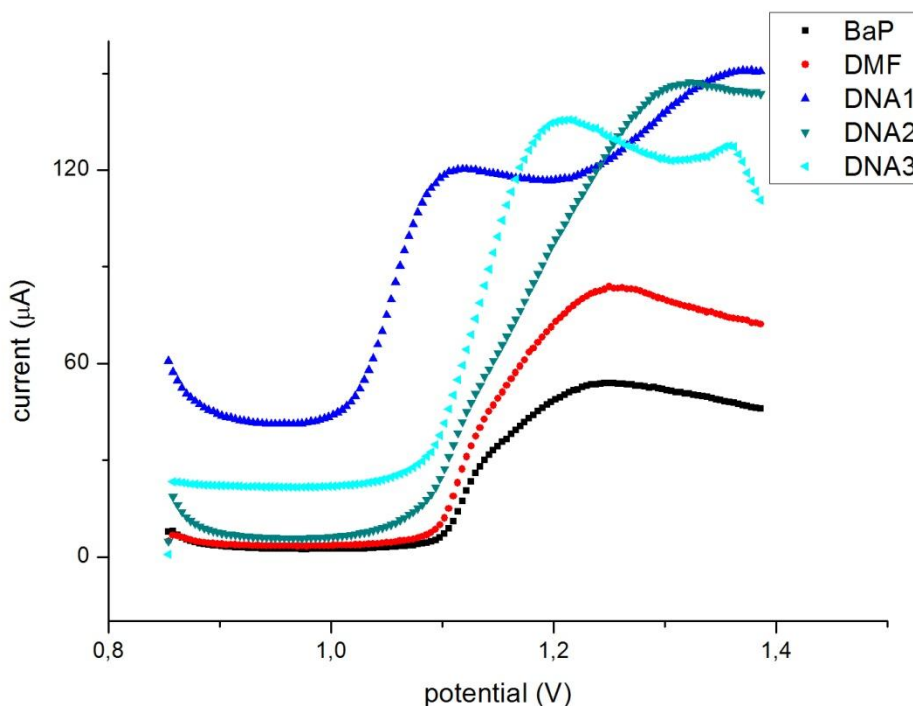
3.5.8 Porovnání 1



Obrázek 15: Porovnání SW voltamogramů získaných při oxidaci DNA s BaP a DNA pouze s DMF.

Následující křivky byly získány odečtením předešlých dvou křivek od jejich příslušných blanků. Černá křivka představuje DNA s navázaným benzo[a]pyrenem, kdežto červená je kontrolní získaná pouze z DNA s DMF. Je zde vidět, že kontrolní vzorek bez benzo[a]pyrenu vykazuje vyšší oxidační signály, ačkoli se očekával přesně opačný efekt. Z toho můžeme usoudit, že by benzo[a]pyren více stabilizoval DNA strukturu.

3.5.9 Porovnání 2



Obrázek 16: Porovnání SW voltamogramů získaných při oxidaci DNA, DNA s navázaným BaP a DNA pouze s DMF.

Na posledním grafu vidíme porovnání získaných křivek křivek z předešlých měření. Opět černá představuje DNA s interkalovaným benzo[a]pyrenem, červená je kontrolní vzorek pouze s DMF. Ostatní křivky v modrých odstínech představují signály pouze z oxidace DNA ve fosfátovém pufru. Je zde vidět, že všechny tři křivky, ačkoli měly stejné podmínky, vykazují různé signály. Podmínky se lišily pouze v délce navazování DNA. Oxidační píky byly získány po různě dlouhé době měření a u všech křivek je vidět určitý posun. Obecně lze však říci, že proti signálům získaným z oxidace DNA s BaP nebo jenom DMF, signály jsou téměř dvakrát vyšší, jako s interkalovaným benzo[a]pyrenem. Z těchto výsledků by se mohlo usoudit, že jak DMF tak BaP by mohly více stabilizovat DNA strukturu.

4 Závěr

Pomocí amperometrie byla DNA z telecího brzlíku imobilizována na síťotiskové elektrody a následně ve fosfátovém pufru pomocí SWV voltametrie byly změřeny odezvy. Při experimentech s elektrodami PGE nebyly zaznamenány žádné oxidační píky ani při prodloužení času navazování DNA a času oxidace ve fosfátovém pufru. Příčinou mohlo být nerovnoměrné, případně nedostatečné navázání DNA na povrch vyčleněného pracovního místa na elektrodě. Oproti tomu, na síťotiskových elektrodách byly získány výsledky, na kterých jsou rozeznatelné dva oxidační píky většinou kolem +1,15 a +1,25 V, které by mohly odpovídat oxidaci guaninu a adeninu v dvoušroubovici DNA. Při různě dlouhých časech navazování byly viditelné určité odchylky v posunu oxidačních píků v závislosti na okolních podmínkách. Také se zvyšováním doby působení fosfátového pufru se zvyšoval i detekovaný proud. Vzhledem ke konstrukci měření nebyla síťotisková elektroda ponořena do roztoku, ale směsi byly nanášeny přímo na elektrodu v kapkách o malých objemech, a kvůli dlouhým časům imobilizace DNA nebo měření s fosfátovým pufrům docházelo k mírnému vysychání roztoku z povrchu.

Po imobilizaci DNA s benzo[a]pyrenem a DNA s DMF byly zaznamenány píky kolem +1,25 V a mírné zakřivení i kolem +1,15 V, co je možné považovat za formování druhého píku. Celkově vykazovaly oxidační píky o hodně menší proud, z čehož vyplývá, že by benzo[a]pyren mohl stabilizovat strukturu DNA. Nutno ale dodat, že poslední dva pokusy byly prováděny s o polovinou menším množstvím roztoku DNA, tj. 25 μ l.

Lze shrnout, že interpretace dat elektrochemické odezvy DNA není jednoznačná a je patrný velký vliv experimentálních podmínek. Konstrukce DNA biosensoru tedy nebude tak jednoduchá, jak se v literatuře všeobecně předpokládá.

5 Literatura

1. *Electroanalysis* 3, 73. **G.A., Rechnitz.** 1991.
2. news-medical.net/health/Biosensors-What-are-Biosensors.aspx. [Online]
3. *Sensors*. **D. Grieshaber, R.MacKenzie, J.Voros and E.Reimhult.** 1400, 2008, Sv. 8.
4. *Analytical Electrochemistry*. **Wang, J.** Hoboken, New Jersey, USA : John Wiley and Sons VCH, 2006.
5. *Bioelectrochemistry Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*. **Barlett, P.N.** West Sussex, England : John Wiley and Sons, 2008.
6. *Enzymes*. **Copeland, R.A.** New York, NY, USA : John Wiley and Sons VCH, 2000.
7. *Chemical Sensors and Biosensors*. **Eggins, B.R.** West Sussex, England : John Wiley and Sons, 2002.
8. *TrAc, Trends Anal. Chem.* . **N.J. Ronkainen-Matsuno, J.H. Thomas, H.B. Halsall and W.R. Heineman.** 213, 2002, Sv. 21(4).
9. <http://www.intechopen.com/source/html/43507/media/image1.png>. [Online]
10. *Electroanalytical Methods of Biological Materials*. **C.A. Wijayawardhana, H.B. Halsall and W.R. Heineman.** 329-365, New York : A.Brajter-Toth, J.Q. Chambers, Marcel Dekker, 2002.
11. *Clin. Chem.* **H.Yao, S.H. Jenkins, A.J. Pesce, H.B. Halsall and W.R. Heineman.** 1432, Washington, D.C. : autor neznámý, 1993, Sv. 39.
12. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. **P.T. Kissinger, and W.R. Heineman.** New York, NY, USA : Marcel Dekker Inc, 1996.
13. <http://web.vscht.cz/koplikr/Elektrochem.pdf>. [Online]
14. *Electroanalysis*. **M. Trojanowicz, M. Szewczynska and M Wcislo.** 347, 2003, Sv. 15(5-6).
15. *J. Electroanal. Chem.* **C.A. Wijayawardhana, S. Purushothama, M.A. Cousino, H.B. Halsall and W.R. heineman.** 2, 1999, Sv. 468.
16. *Anal. Chim. Acta.* **C.A.Wijayawardhana, H.B. Halsall and W.R. Heineman.** 3, 1999, Sv. 399.
17. *Crit. Rev. Anal. Chem.* . **Maquieira, R.Puchades and A.** 195, 1996, Sv. 26(4).

18. *J. Agric Food Chem.* **T. Jiang, H.B. Halsall and W.R. Heineman.** 1098, 1995, Sv. 43.
19. **T.M. Anh, S.V. Dzyadevych, M.C.Van, N.J. Renault, C.N. Duc and J.-M. Chovelon.** 365, místo neznámé : *Talanta*, 2004, Sv. 63.
20. **K. Yagiuda, A. Hemmi, S. Ito, Y. Asano, Y. Fushinuki, C.Y. Chen and I. Karube.** 703, místo neznámé : *Biosens. Bioelectron.*, 1996, Sv. 11(8).
21. **G.J. Papariello, A.K. Mukherji and C.M. Shearer.** 790, místo neznámé : *Anal. Chem.* , 1973, Sv. 45.
22. **C. Colapicchioni, A. Barabaro, F. Porcelli and I. Giannini.** 245, místo neznámé : *Sens. Actuators, B*, 1991, Sv. 4.
23. **A. Barbaro, C. Colapicchioni, E. Davini, G. Mazzamurro, A. Piotto and F. Porcelli.** 402, místo neznámé : *Adv. Mater.*, 1992, Sv. 4(6).
24. **Janata, S. Caras and J.** 1935, místo neznámé : *Anal. Chem.* , 1980, Sv. 52.
25. *Microchem. J.* **J.T. Thomas, N.J. Ronkainen-Matsuno, S. Farrell, H.B. Halsall and W.R. Heineman.** 262, 2003, Sv. 74.
26. *Anal. Bioanal. Chem.* **S. Farrell, N.J. Ronkainen-Matsuno, h.B. Halsall and W.R. Heineman.** 358, 2004, Sv. 379.
27. *J. Chem. Educ.* **Heineman, P.T. Kissinger and W.R.** 702, 1983, Sv. 60(9).
28. <http://orion.chemi.muni.cz/pskl/vyuka/Biosensory.pdf>. [Online]
29. *Anal. Chim. Acta.* **R. Nagata, S.A. Clark, K. Yokoyama, E. Tamiya, I. Karube.** 157-164, 1995, Sv. 304(2).
30. *Electrochem. Commun.* **S. Miserere, S. Ledru, N. Ruille, S. Griveau, M. Boujtita, F. Bedioui.** 238-244, 2006, Sv. 8(2).
31. *Biosens. Bioelectron.* **M. Yang, J. Jiang, Y. Yang, X. Chen, G. Shen, R. Yu.** 1791-1797, 2006, Sv. 21(9).
32. —. **S. Ledru, N. Ruille, M. Boujtita.** 1591-1598, 2006, Sv. 21(8).
33. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566306004416>. [Online]
34. http://www.dropsens.com/en/img/productos/screen_printed_elect2.gif. [Online]

35.

https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/16300/2010_BP_Hrazdira_Matej_107253.pdf?sequence=1. [Online]

36. *Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification*. **Thevenot, D.R., a další.** 2333-2348, místo neznámé : Pure Appl. Chem., 1999, Sv. 71.

37. *Electrochemistry of DNA, Comprehensive Chemical Kinetics, Applications of Kinetic Modeling*. **Oliveira Brett, A.M., Serrano, S.H.P. a Piedade, J.A.P.** 91-119, Oxford, UK : R.G. Compton, G. Hancock, Elsevier, 1999, Sv. 37.

38. *DNA-based biosensors, Comprehensive Analytical Chemistry. Biosensors and Modern Specific Analytical Techniques*. **Oliveira Brett, A.M.** 179-208, místo neznámé : L. Gordon, 2005, Sv. 44.

39. *Electrochemical genosensor design: immobilization of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods*. **Pividori, M.I., Merkoci, A. a Alegret, S.** 291-303, místo neznámé : Biosens. Bioelectron, 2000, Sv. 15.

40. *Effect of pH and applied potential on the adsorption of DNA on highly oriented pyrolytic graphite electrodes. Atomic force microscopy surface characterisation*. **Oliveira-Brett, A.M. a Chiorcea, A.-M.** 178-183, místo neznámé : Electrochem. Commun., 2003, Sv. 5.

41. *Atomic force microscopy of DNA immobilized onto a highly oriented pyrolytic graphite electrode surface*. **Oliveira-Brett, A.M. a Chiorcea, A.-M.** 3830-3839, místo neznámé : Langmuir, 2003, Sv. 19.

42. *DNA imaged on a HOPG electrode surface by AFM with controlled potential*. **Oliveira-Brett, A.M. a Chiorcea, A.-M.** místo neznámé : Bioelectrochem., 2004.

43. *Atomic force microscopy characterisation of an electrochemical DNA-biosensor*. **Oliveira-Brett, A.M. a Chiorcea, A.-M.** 229-232, místo neznámé : Bioelectrochem., 2003, Sv. 63.

44. *Electrochemical DNA sensors for detection of DNA damage*. **Diculescu, V.C., Paquim, A.-M. C. a Oliveira Brett, A.-M.** 377-393, Coimbra, Portugal : Sensors, 2005, Sv. 5.

45. *Nucleic Acid Geometry and Dynamics*. **Sarma, R.H.(Ed.).** New York : Pergamon Press, 1980.

46. *Stacking Interactions and intercalative DNA binding, Comp. Methods Enzymol.* **Gago, F.** 14, 277-292, 1998.

47. *Voltametric studies of the interaction of tris(1,10-phenantroline)cobalt(III) with DNA.* **M.T., Carter a Bard, A.J.** 7528-7530, místo neznámé : J.Am.Chem.Soc, 1987, Sv. 109.
48. *Voltametric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris-chelated complexes of cobalt(III) and iron(II) with 1,10-phenantroline and 2,2'-bipyridine .* **Carter, M.T., Rodriguez, M. a Bard, A.J.** 8901-8911, místo neznámé : J.Am.Chem.Soc., 1989, Sv. 111.
49. *Electrochemical studies of the interaction of metal chelates with DNA 4. Voltammetric and electrogenerated chemiluminescent studies of the interaction of tris(2,2'-bipyridine)osmium(II) with DNA.* **Rodriguez, M. a Bard, A.J.** 2658-2662, místo neznámé : Anal.Chem., 1990, Sv. 62.
50. *A comparison of cationic and anionic intercalators for the electrochemical transduction of DNA hybridization via long range electron transfer.* **Wong, E.L.S, rohkin, P. a Gooding, J.J.** 648-654, místo neznámé : Electrochem. Commun, 2004, Sv. 6.
51. *DNA interactions with a methylene blue redox indicator depend on the DNA length and are sequence specific.* **Farjami, E., a další.** 1443-1448, místo neznámé : analyst, 2010, Sv. 135.
52. <http://www.purdue.edu/rem/hmm/ethidbr.htm>. [Online] 2010.
53. <http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/EtBr.htm>. [Online]
54. *Compendium Method TO-13A.* Cincinnati, OH, USA : Environmental Protection Agency (EPA) of the United States of America, 1999.
55. *Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.* **Bjorseth, A.** New York : Marcel Dekker, 1983.
56. *J. Air Waste. Manage .* **J.P. Butler, G.B. Post, P.J. Liroy, J.M. Waldman, A. Greenberg.** 970, 1993, Sv. 43.
57. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0e/Benzo%28a%29pyrene_metabolism.svg. [Online]
58. *Electrochemical Quantitation of DNA immobilized on gold.* **Steel, A.B., Herne, T.M. a Tarlov, M.J.** 4670-4677, místo neznámé : Anal. Chem. , 1998, Sv. 70.
59. *Electrochemical detection of single-nucleotide mismatches: application of M-DNA.* **Long, Z.-T., a další.** 4059-4065, místo neznámé : Anal. Chem., 2004, Sv. 76.

60. *Effect of probe density and hybridization temperature on the response of an electrochemical hairpin-DNA sensor.* **Kjallman, T.H.M., a další.** 9460-9466, místo neznámé : Anal. Chem., 2008, Sv. 80.
61. *Effect of serum on an RNA aptamer-based electrochemical sensor of theophylline.* **Ferapontova, E. a Gothelf, K.V.** 4279-4283, místo neznámé : Langmuir, 2009, Sv. 25.
62. *Electrochemical transduction of liposome-amplified DNA sensing.* **Patolsky, F., Lichtenstein, A. a Willner, I.** 940-943, místo neznámé : Angew. Chem. Int. Ed., 2000, Sv. 39.
63. *Peptide nucleic acid probes for sequence-specific DNA biosensors.* **J., Wang, a další.** 7667-7670, místo neznámé : J. Am. Chem. Soc., 1996, Sv. 118.
64.
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/ec/HexacyanidoferratIII_2.svg/175px-HexacyanidoferratIII_2.svg.png. [Online]
65. *Sequence-specific biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators.* **Millan, K.M. a Mikkelsen, S.R.** 2317-2323, místo neznámé : Anal. Chem., 1993, Sv. 65.
66. *DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to human immunodeficiency virus.* **Wang, J., a další.** 2629-2634, místo neznámé : Anal. Chem., 1996, Sv. 68.
67. *Electrochemical interrogation of DNA monolayers on gold surfaces.* **Lao, R., a další.** 6475-6480, místo neznámé : Anal. Chem., 2005, Sv. 77.
68. *Micromethod for the investigation of the interactions between DNA and redox active molecules.* **Pang, D.W. a Abruña, H.D.** 3162-3169, místo neznámé : Anal. Chem., 1998, Sv. 70.
69. *Voltammetric measurements of the interaction of metal complexes with nucleic acids.* **Aslanoglu, M., a další.** 1791-1798, místo neznámé : Analyst, 2000, Sv. 125.
70. *Characterization of mismatched DNA hybridization via a redox-active diviologen bound in the PNA-DNA minor groove.* **Hvastkovs, E.G. a Buttry, D.A.** 3839-3844, místo neznámé : Langmuir, 2009, Sv. 25.
71. *Sequence specific gene detection with a gold electrode modified with DNA probes and an electrochemically active dye.* **Hashimoto, K., Ito, K. a Ishimori, Y.** 3830-3833, místo neznámé : Anal. Chem., 1994, Sv. 66.

72. *microfabricated disposable DNA sensor for detection of hepatitis B virus DNA*. **Hashimoto, K., Ito, K. a Ishimori, Y.** 220-225, místo neznámé : Sens. Actuators B, 1998, Sv. 46.
73. <http://aatbio.com/graph/G17520.gif>. [Online]
74. *Comprehensive study of interactions between DNA and new electroactive Schiff base ligands. Application to the detection of singly mismatched Helicobacter pylori sequences*. **Revenga-Parra, M., a další.** 2675-2681, místo neznámé : Biosens. Bioelectron. , 2007, Sv. 22.
75. *Solution structure of a cis-opened (10R)-N6-deoxyadenosine adduct of (9S,10R)-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in a DNA duplex*. **Volk DE, Thivyanathan V, Rice JS, Luxon BA, Shah JH, Yagi H, Sayer JM, Yeh HJ, Jerina DM, Gorenstein DG.** 1410-20, místo neznámé : Biochemistry, 2003 February 18, Sv. 42(6).
76. *Overstretching B-DNA: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules*. **Smith, S.B., Cui, Y. a Bustamante, C.** 795-799, místo neznámé : Science, 1996, Sv. 271.
77. *Synthesis and electrochemical studies of an anthraquinone-conjugated nucleoside and derived oligonucleotides*. **Jakobsen, M.F., Ferapontova, E.E. a Gothelf, K.V.** 905-908, místo neznámé : Org. Biomol. Chem., 2009, Sv. 7.
78. *Electrochemical biosensing of DNA with capture probe covalently immobilized onto glassy carbon surface*. **Teh, H.F., a další.** 23-29, místo neznámé : Anal. Chim. Acta, 2005, Sv. 551.
79. *Scanning electrochemical microscopy imaging of DNA microarrays using methylene blue as a redox-active intercalator*. **Wain, A.J. a Zhou, F.** 5155-5160, místo neznámé : Langmuir, 2008, Sv. 24.
80. *Electrochemical biosensor for detection of BCR/ABL fusion gene using locked nucleic acid on 4-aminobenzenesulfonic acid-modified glassy carbon electrode*. **Chen, J., a další.** 8028-8034, místo neznámé : Anal. Chem., 2008, Sv. 80.
81. *The detection of DNA deamination by electrocatalysis at DNA-modified electrodes*. **Ostatná, V., a další.** 205-210, místo neznámé : Bioelectrochemistry, 2005, Sv. 67.
82. *Oligonucleotides from a duplex with non-helical properties on a positively charged surface*. **Lemeshko, S.O., a další.** 3051-3058, místo neznámé : Nucleic Acids Res., 2001, Sv. 29.

83. *Hairpin DNA probe based on electrochemical biosensor using methylene blue as hybridization indicator*. **Jin, Y., a další.** 1126-1130, místo neznámé : Biosens. Bioelectron., 2007, Sv. 22.
84. *Electrochemical interrogation of interaction between surfaceconfined DNA and methylene blue*. **D., Pan., a další.** 2671-2680, místo neznámé : Sensors, 2007, Sv. 7.
85. *Electrochemical biosensor for detection of BCR/ABL fusion gene based on hairpin locked nucleic acid probe*. **Lin, L., a další.** 1650-1653, místo neznámé : Electrochem. Commun., 2009, Sv. 11.
86. *Electrochemistry of Methylene Blue bound to a DNA-modified electrode*. **Kelley, S.O., a další.** 31-37, místo neznámé : Bioconjug. Chem., 1997, Sv. 8.
87. *Mutation detection by electroanalysis at DNA-modified electrodes*. **Boom, E.M., a další.** 1096-1100, místo neznámé : Nat. Biotech., 2000, Sv. 18.