

Elektrochemická analýza NK a jejich složek

F. Jelen

ÚVOD-Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie

METODY ELEKTROCHEMICKÉ ANALÝZY

- POLAROGRAFIE
- VOLTAMETRIE
- PULZNÍ METODY
- CHRONOPOTECIOMETRIE
- ROZPOUŠTĚCÍ VOLTAMETRIE

NUKLEOVÉ KYSELINY

a) KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

přímá detekce

nepřímá

značky – OsO₄, echinomycin, ferocen

borátové struktury

depurinace

b) STRUKTURNÍ ANALÝZA

– rozvíjení na elektrodě

– detekce hybridizace

BÁZE NUKLEOVÝCH KYSELIN

Báze NK -rozpouštěcí voltametrie

Stanovení bází NK v přítomnosti Cu(II)

LABORATOŘ

BIOFYZIKÁLNÍ CHEMIE A MOLEKULÁRNÍ ONKOLOGIE

Zabývá se :

- 1. elektrochemií nukleových kyselin a bílkovin**
- 2. elektrochemickými biosensory DNA**
- 3. novými mikrometodami pro analýzu bílkovin**
- 4. tumor-supresorovými bílkoviny: jejich interakcemi in vitro a v buňkách**

P53: kontrola nádorového bujení

Gen p53 hraje důležitou úlohu při kontrole buněčného cyklu: při poškození buněčné DNA zabrání dělení buňky, dokud nedojde k opravě, nebo ji dovede k apoptóze. Tím také brání dělení malformovaných nádorových buněk a růstu nádorů. Mutace genu p53, která vede ke ztrátě jeho regulační funkce a antionkogenní aktivity, je nacházena u velké části lidských malignit a je považována za nejčastější genetickou poruchu vedoucí ke vzniku nádoru.

Proteiny (bílkoviny) jsou z

aminokyselin složené vysokomolekulární přírodní látky s relativní molekulární hmotností 103 až 106. Proteiny jsou podstatou všech živých organismů. V proteinech jsou aminokyseliny vzájemně vázány aminoskupinami – NH₂ a karboxylovými skupinami – COOH amidovou vazbou –NH–CO– (amidy), která se v případě proteinů nazývá peptidická vazba. Podle počtu aminokyselin v molekule rozlišujeme oligopeptidy (2–10 aminokyselin), polypeptidy (11–100) a proteiny (více než 100 aminokyselin).

Nukleové kyseliny jsou

makromolekulární látky tvořené polymerním řetězcem, který ve své struktuře uchovává genetickou informaci. Nukleové kyseliny se nalézají ve všech živých buňkách a virech. Nejběžnějšími nukleovými kyselinami jsou kyselina deoxyribonukleová (**DNA**) a kyselina ribonukleová (**RNA**). Polynukleotidový řetězec je z chemického hlediska polymerem nukleotidů. Tyto nukleotidy jak pro DNA, tak i pro RNA jsou vždy složeny ze čtyř druhů a jejich různým pořadím v řetězci lze dosáhnout nezměrného počtu kombinací. Právě sekvence (různý sled) jednotlivých druhů nukleotidů, který se nazývá tzv. primární strukturou, v sobě uchovává genetickou informaci.

Nukleotidy RNA obsahují a jsou zde kombinovány tyto čtyři báze: Cytosin (**C**), guanin (**G**), adenin (**A**) a uracil (**U**). Nukleotidy DNA obsahují a v DNA jsou kombinovány tyto čtyři báze: Cytosin (**C**), guanin (**G**), adenin (**A**) a thymin (**T**).

Vedoucí laboratoře:

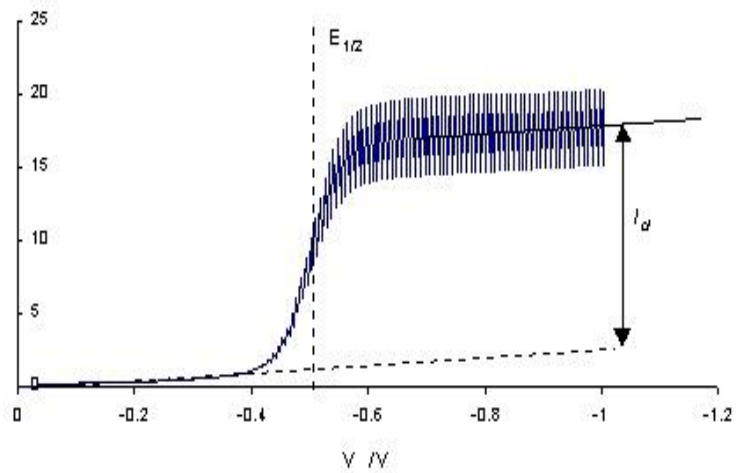
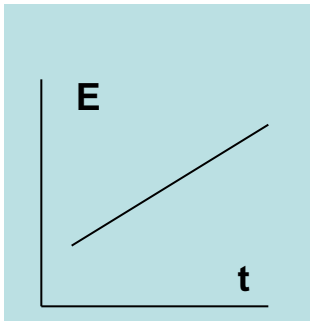
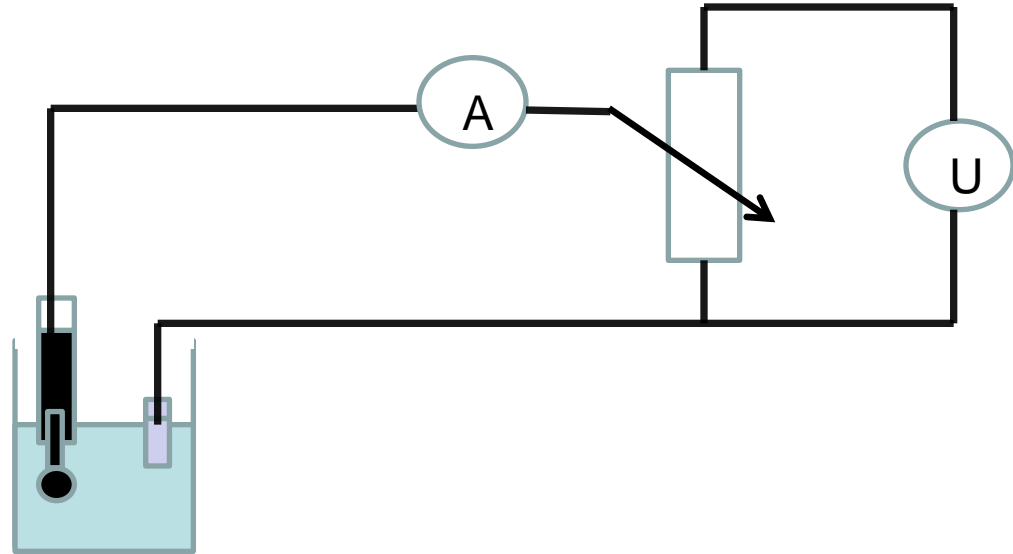
Doc. RNDr. Miroslav Fojta, PhD

POLAROGRAFIE

METODY

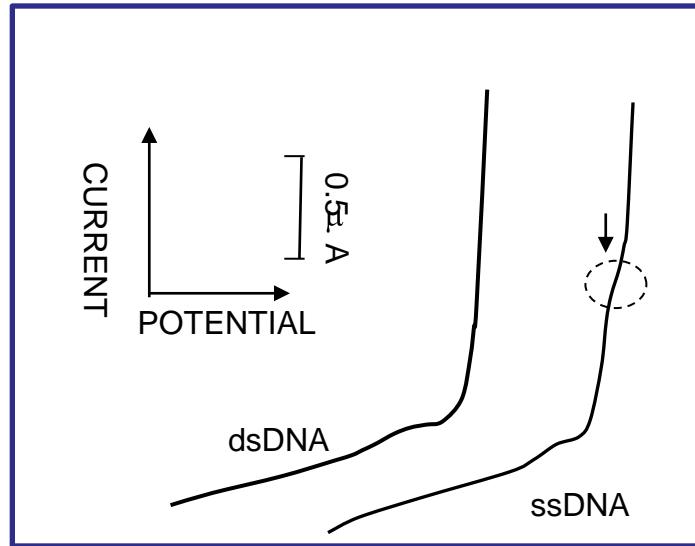
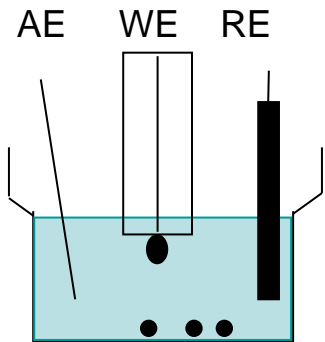
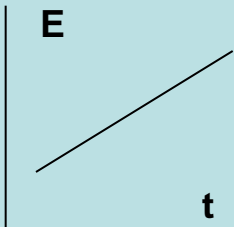
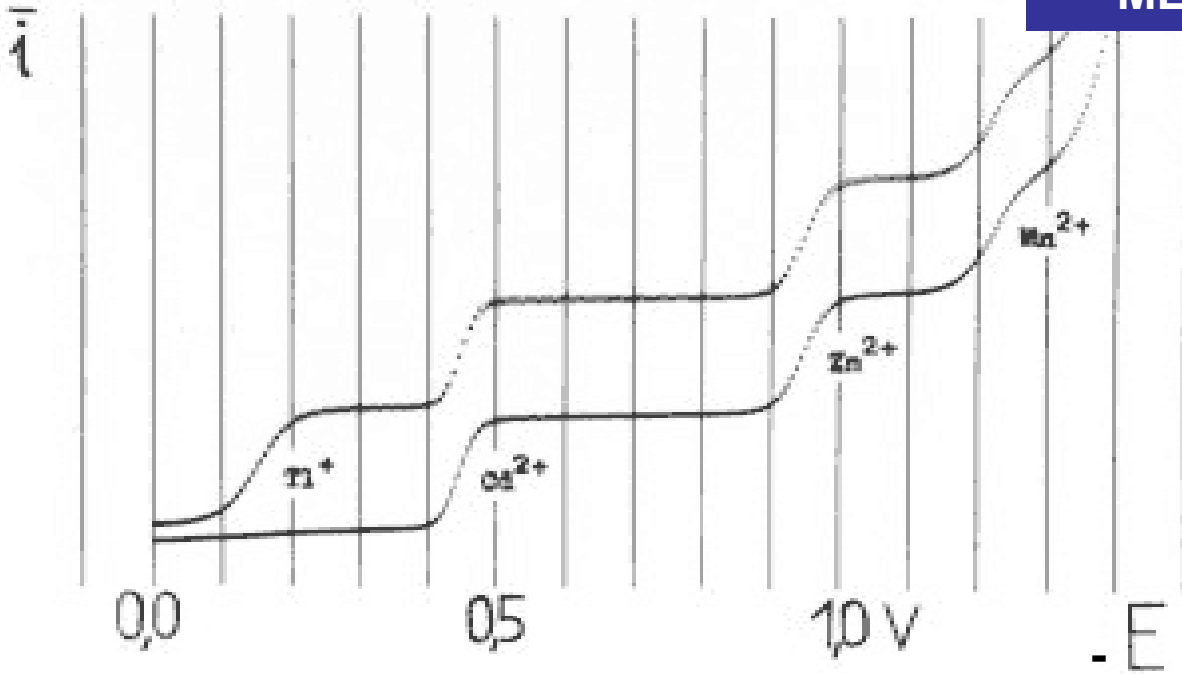


1890-1967



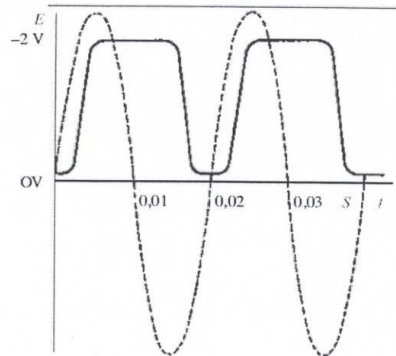
d.c. polarografie

METODY

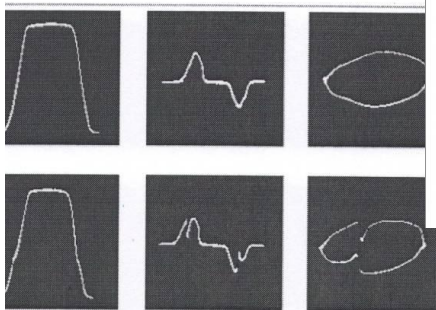


$$i_d = 708nD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}c$$

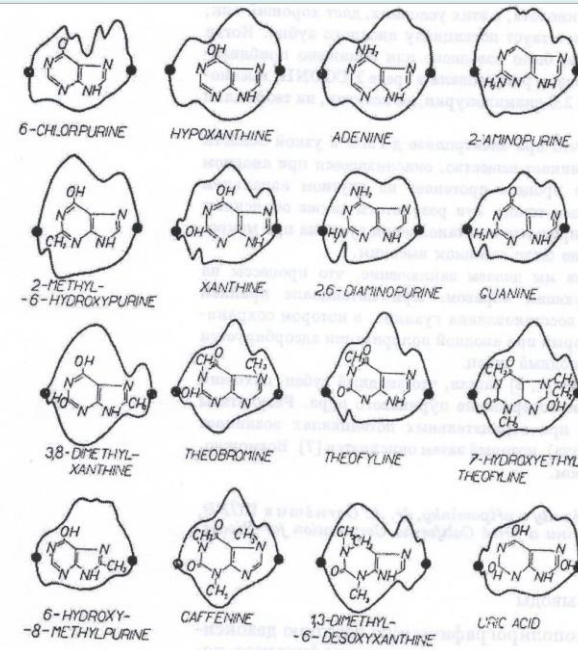
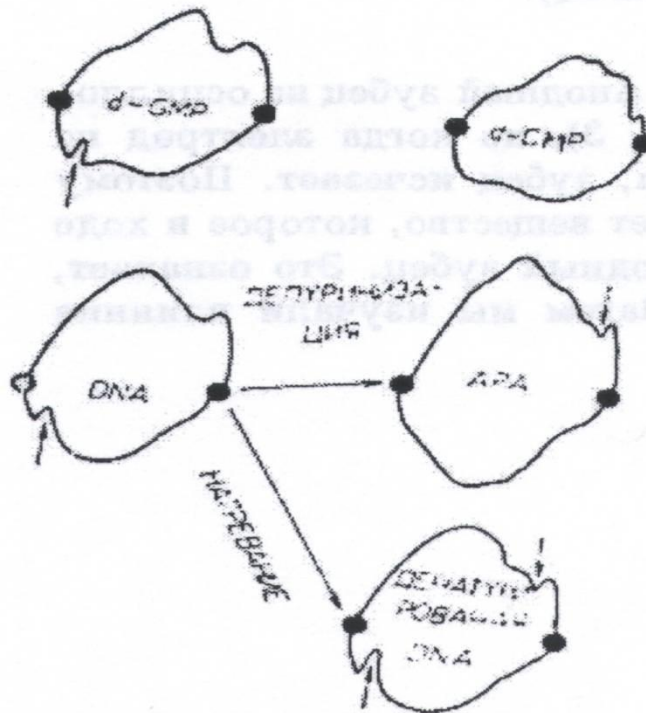
ILKOVIČOVA ROVNICE



r. 1. Schematické naznačení vzniku křivky $E = f(t)$ při polarizační elektrodě střídavým průběhem (průběh střídavého prouku kovaně)⁸

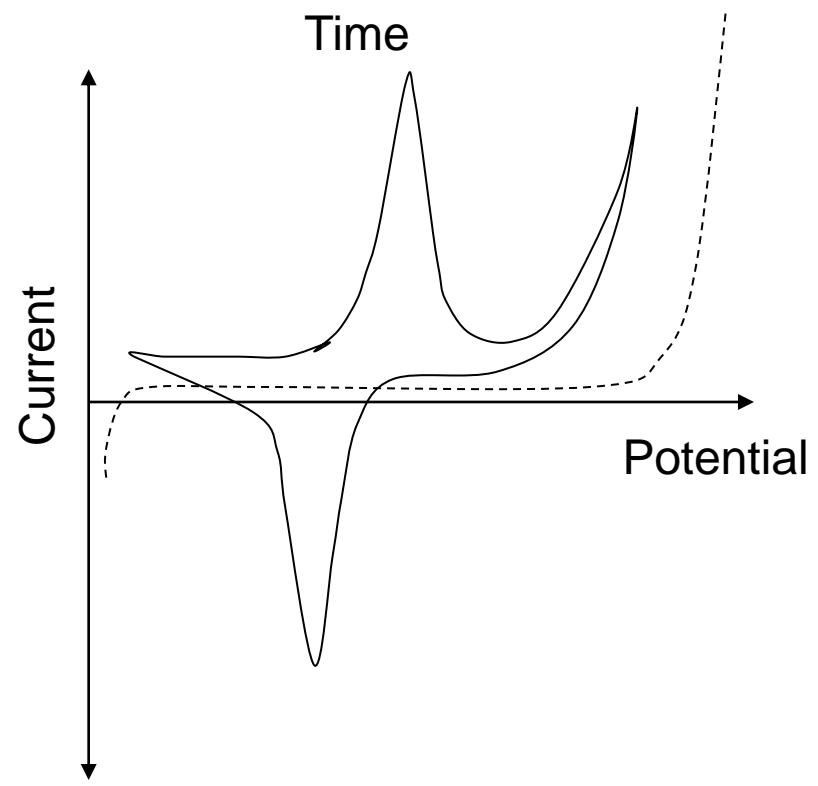
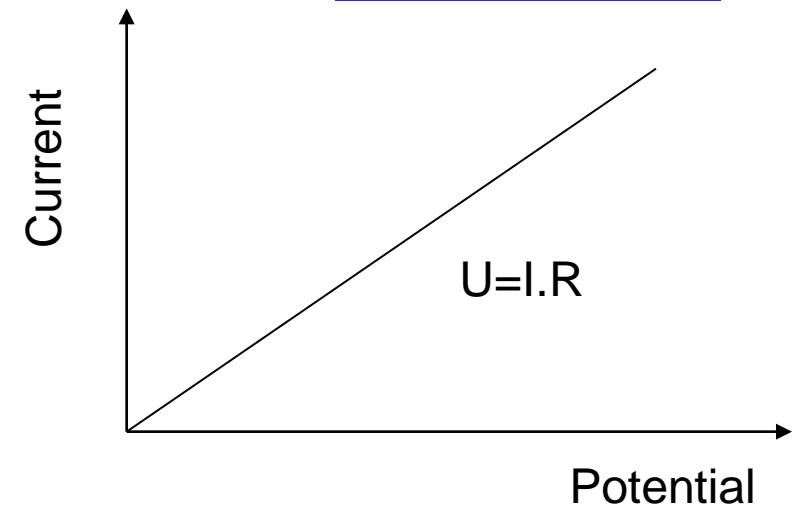
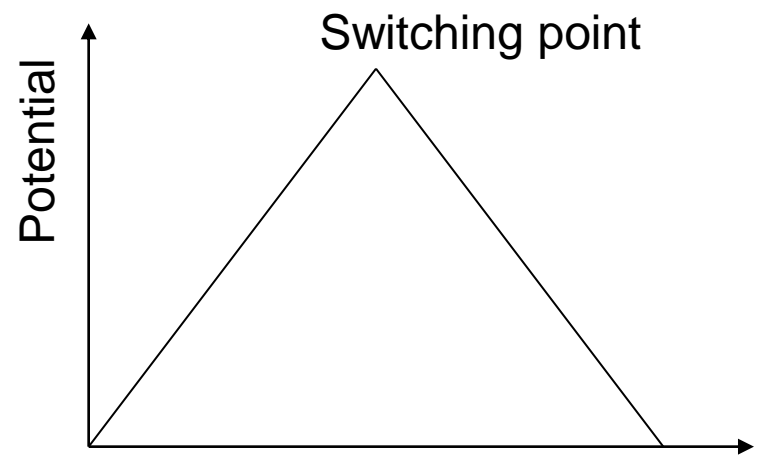


r. 2. Oscilogramy funkcí $E = f(t)$, $dE/dt = f(t)$ a $dE/dt = f(E)$; oře křivky 1 M-KOH, dole křivky 1 M-KOH s 10^{-3} M-Pb O_2^{2-} (cit.⁵)

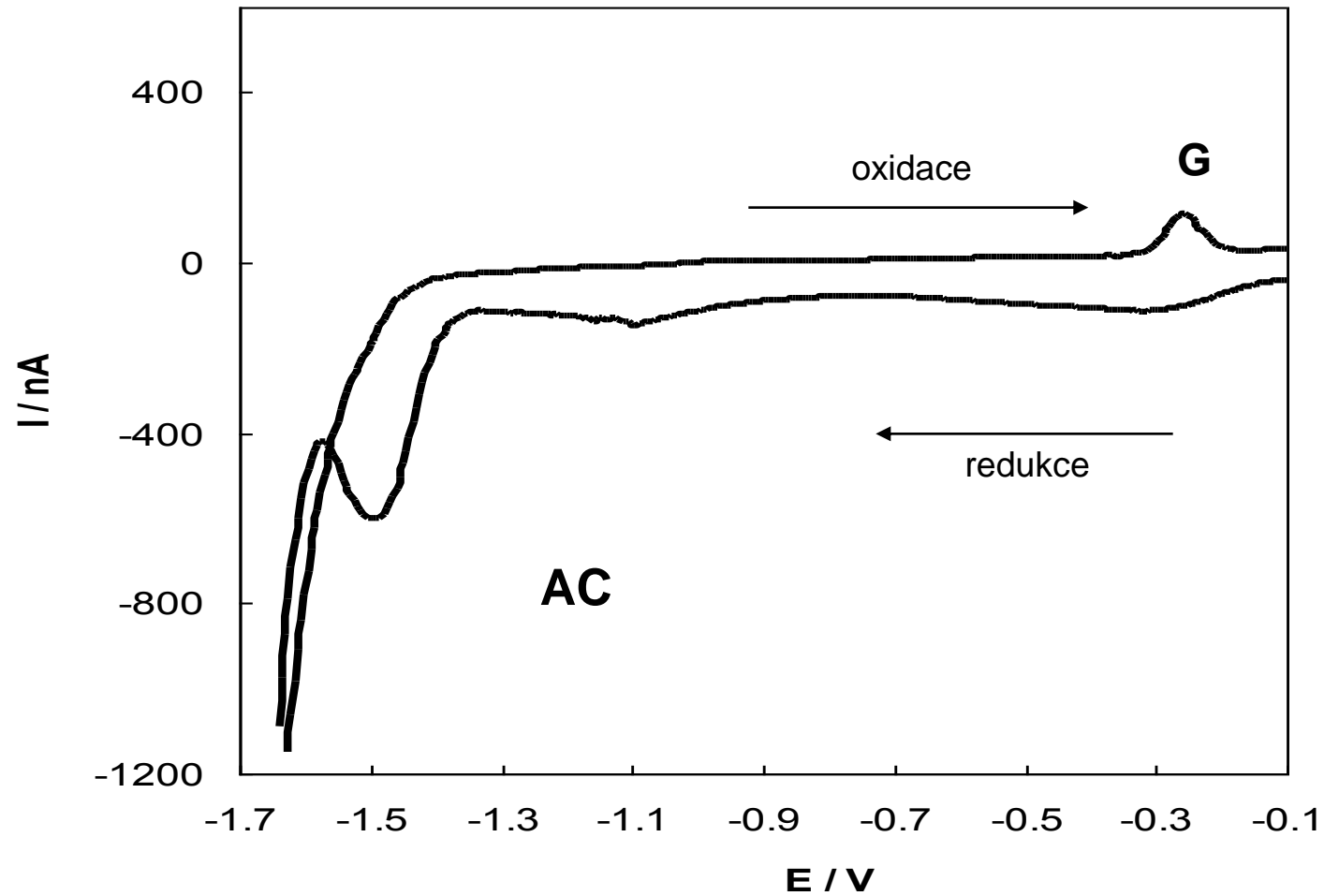


CYKLIKÁ VOLTAMMETRIE

METODY



REDUKČNÍ SIGNÁLY DNA



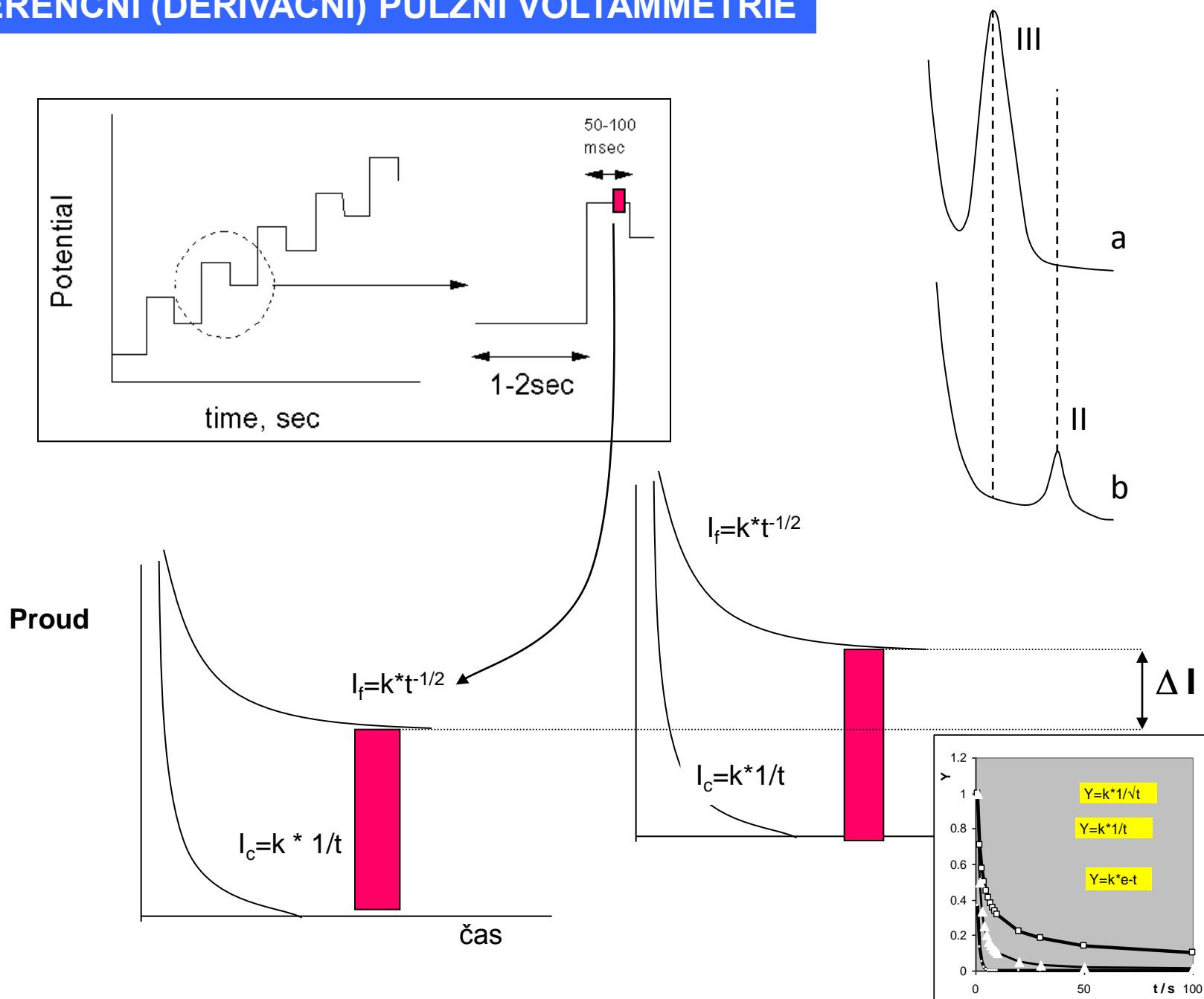
60 – 90 léta

Moderní voltametrické metody

- pulzní metody = difereční pulzní voltametrie
= square wave voltametrie
- chronopotenciometrické metody

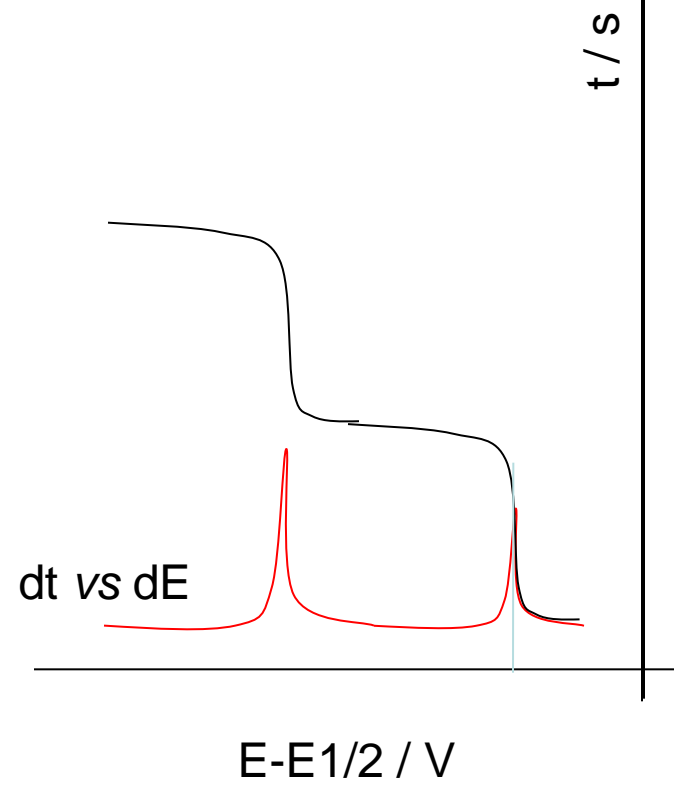
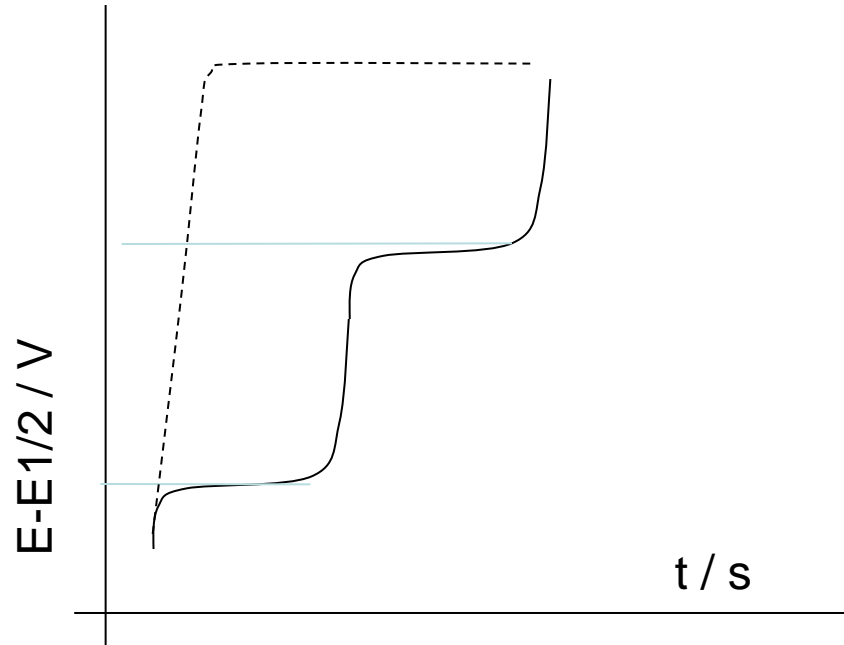
Použití HMDE (hanging mercury drop electrode)
Rozpouštěcí (stripping) voltametrie
Přenosová voltametrie

DIFFERENČNÍ (DERIVAČNÍ) PULZNÍ VOLTAMMETRIE

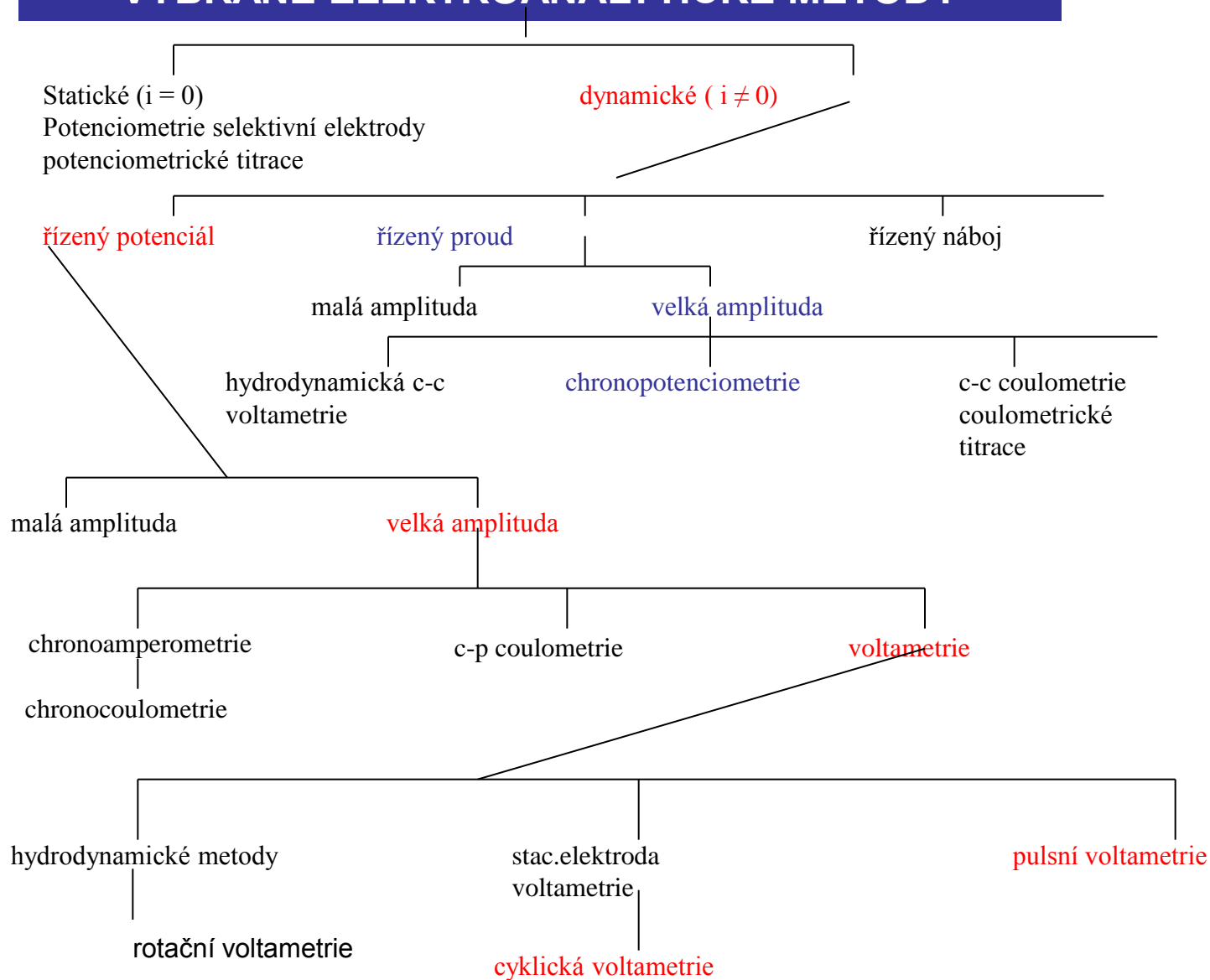


CHRONOPOTENCIOMETRIE

$i = \text{konst.}$



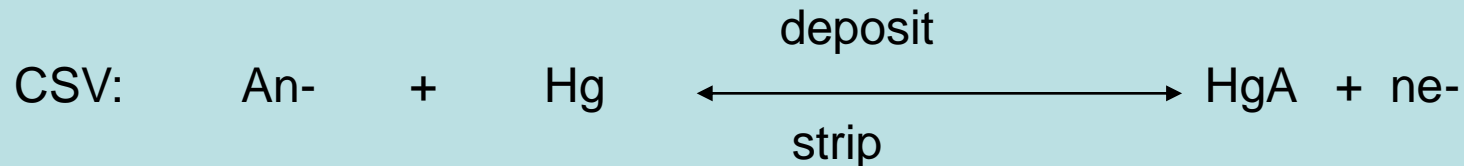
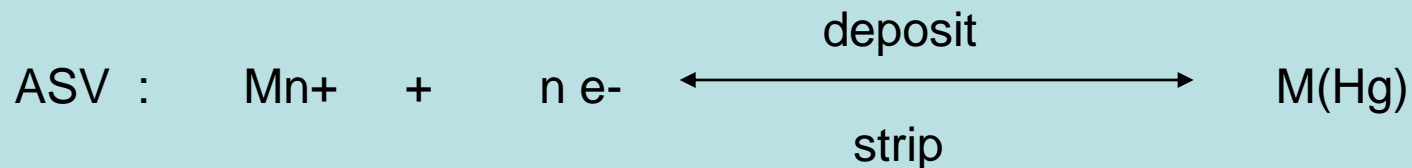
VYBRANÉ ELEKTROANALYTICKÉ METODY



ROZPOUŠTĚCÍ VOLTAMETRIE

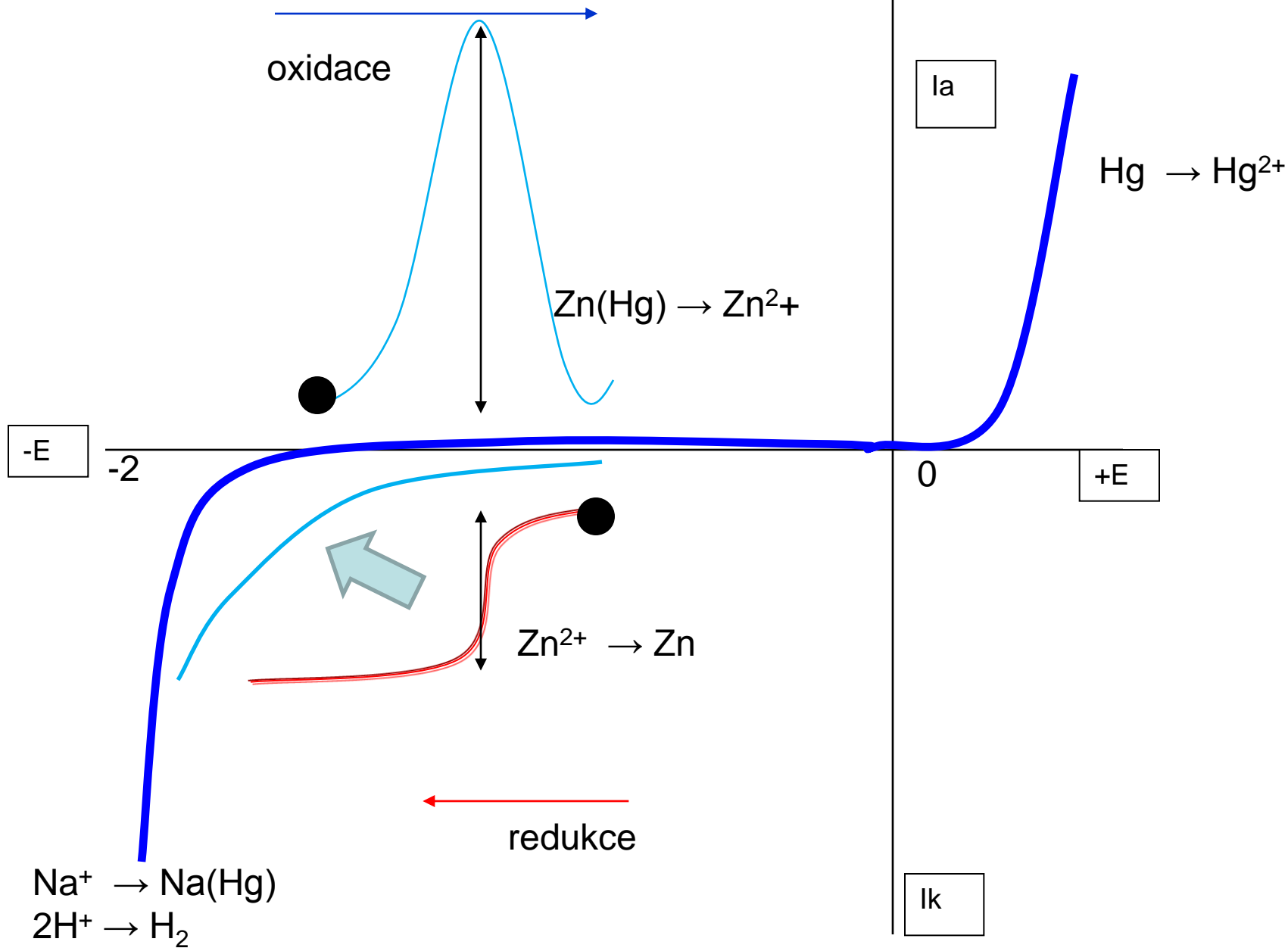
Rozpouštěcí voltametrie je elektrochemická metoda, která se s úspěchem používá tehdy, když koncentrace látky je velmi nízká a nelze ji standardním postupem stanovit. Podmínkou je, aby stanovovaná látka tvořila s elektrodou amalgamu, nebo na druhé straně špatně rozpustnou sůl. V prvním případě hovoříme o anodické rozpouštěcí voltametii - ASV, ve druhé o katodické rozpouštěcí voltametii - CSV.

V obou případech stanovovanou látku nahromadíme elektrochemicky na elektrodě buď ve formě amalgamy nebo ve formě sraženiny (špatně rozpustné soli) a posléze tyto formy elektrochemicky zrušíme, tím, že obrátíme směr polarizace. V obou případech začínáme měřit za půlvlnovým potenciálem reakce a platí následující rovnice:



Hg elektroda

ANODIC STRIPPING VOLTAMMETRY

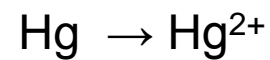


Hg elektroda

oxidace



la



-E

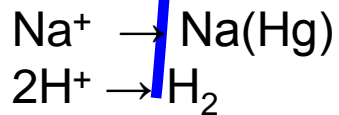
-2

0

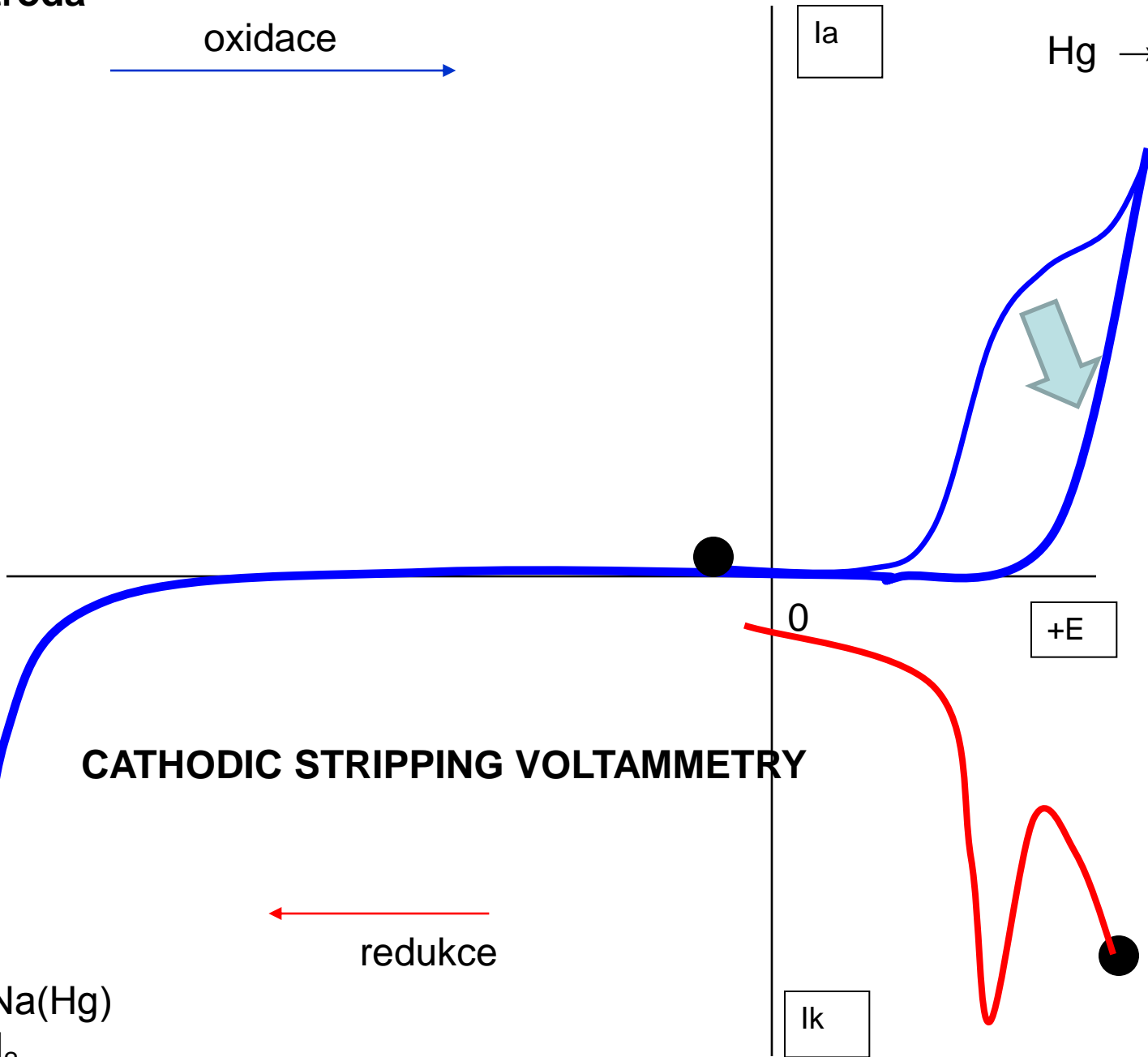
+E

CATHODIC STRIPPING VOLTAMMETRY

redukce



lk

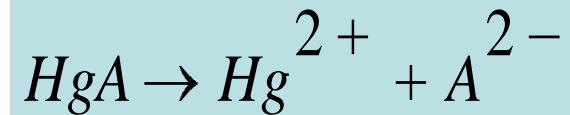


KATODICKÁ ROZPOUŠTĚCÍ VOLTAMETRIE

Citlivost metody se mění s množstvím látky vyloučené za jednotku času na elektrodě. Jak je to s polohou signálu, tj. s potenciálem píku.

Je dán rovnicí

$$E_p = E_{0, \text{Hg}^{2+}/\text{Hg}} + (RT/2F) \ln [\text{Hg}^{2+}]$$



Asoc. konstanta $K_1 = [\text{HA}^-] / [\text{H}^+][\text{A}^{2-}]$
Produkt rozpustnosti $K_s = [\text{Hg}^{2+}][\text{A}^{2-}]$

Po úpravách dostaneme

$$E_p = E_{0, \text{Hg}^{2+}/\text{Hg}} + 0.030(\log K_s + \log K_1 + \text{pH} + \log [\text{HA}^-])$$

Z rovnice vyplývá,

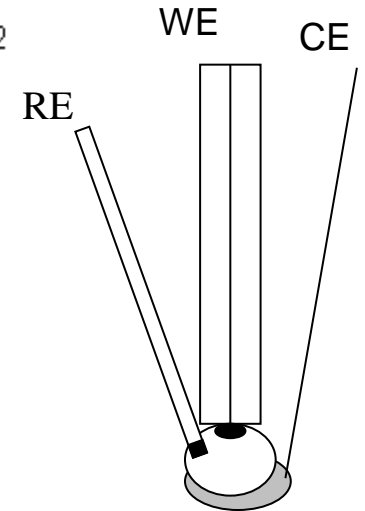
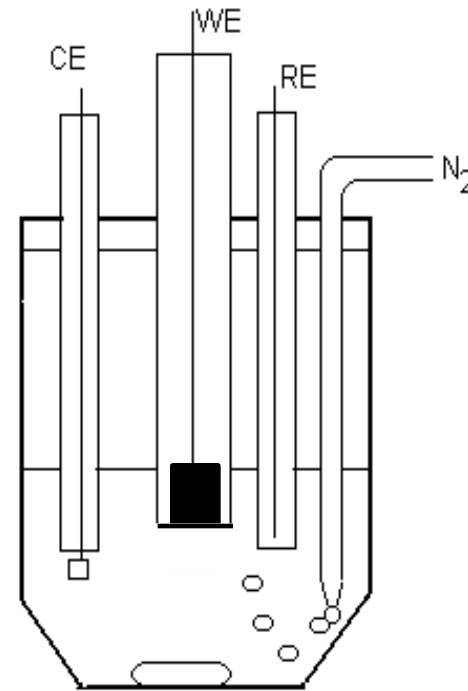
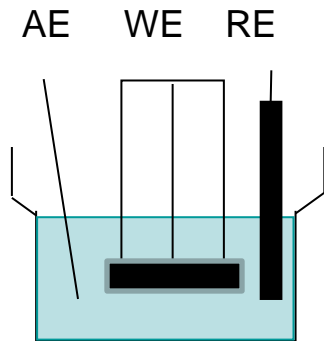
poloha bude negativnější - s rostoucím pH
s rostoucí koncentrací aniontu
s klesající rozpustností sloučeniny

poloha bude pozitivnější - s vyšší hodnotou asoc. konstanty

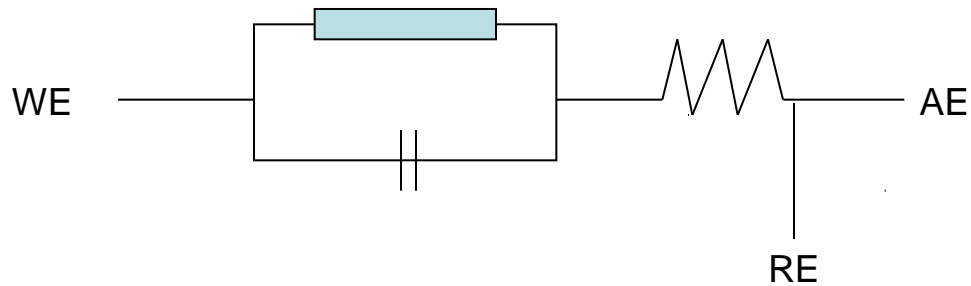
Elektrochemický měřicí systém

Elektrodový systém - pracovní elektroda WE
- referenční elektroda R
- pomocná elektroda AI

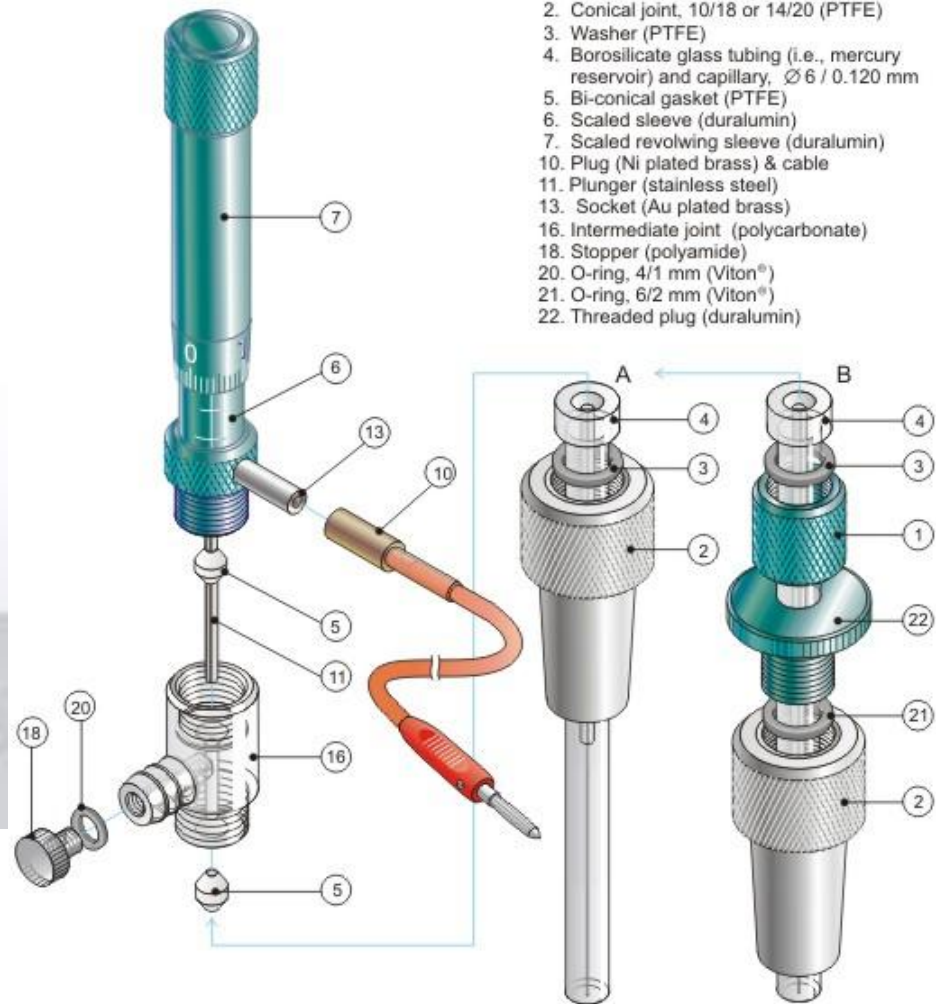
Elektrochemická nádobka



Náhradní elektrodové schéma



HMDE



1. ELEKTRODY V KONTAKTU S ROZTOKEM VLASTNÍCH IONTŮ

Dva případy

a) KOV v kontaktu vlastních iontů, např. $\text{Cu} | \text{Cu}^{2+}$

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln a_{M^{n+}} \quad (\text{Nernstova rovnice})$$

b) NEKOV v kontaktu vlastních iontů, např. $\text{H}_2 | \text{H}^+$ nebo $\text{Cl}_2 | \text{Cl}^-$

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{\text{H}_2}^{1/2}}{a_{\text{H}^+}}$$

2. KOVOVÉ ELEKTRODY v kontaktu aniontů, které tvoří špatně rozpustné soli

např. $\text{Hg} | \text{Hg}_2\text{Cl}_2 | \text{Cl}^-$ nebo $\text{Ag} | \text{AgCl} | \text{Cl}^-$

$$E = E^0 - \frac{RT}{F} \ln a_{\text{Cl}^-}$$

3. REDOXNÍ (INERTNÍ) ELEKTRODY

donor nebo akceptor elektronů, např. Hg, Au, Pt, carbonové el., oxidy polovodičů, atd.

4. MODIFIKOVANÉ ELEKTRODY

např. enzymové, přenos elektronů je zprostředkován

REDOXNÍ ELEKTRODY

ELEKTRODY

Materiál pracovních elektrod pro voltametrii

Výběr materiálu elektrody závisí na

- potenciálové oblasti, ve které bychom měli měřit
- na použitém rozpouštědle
- kvalitě a čistotě materiálu.

Výběr potenciálové oblasti souvisí s:

- rozkladem rozpouštědla
- rozkladem základního elektrolytu
- rozpouštěním elektrody

Rtuť:

Výhody:

Velmi vysoké záporné vodíkové přepětí

(měření k negativnějším potenciálům než ostatní elektrody)

Reprodukovatelnost měření

Hladkost povrchu

Nevýhody:

Patří mezi jedy

Vliv na životní prostředí

Uhlík

Uhlík existuje v různých vodivých formách. Elektrochemické reakce jsou pomalejší ve srovnání s kovovými, kinetika přenosu náboje je závislá na struktuře povrchu a jeho úpravě

Různé typy elektrod:

glassy carbon (příprava: karbonizace fenol-formaldehydových polymerů při 1000-3000 °C a vysokém tlaku, amorfni charakter, není vždy homogenní)

uhlíková vlákna (2-20 mm)

uhlíková čern

různé formy grafitu

– např. pastová elektroda

pyrolytický grafit (PG nebo HOPG, anisotropní vlastnosti, edge and basal plane)

UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODY (CPE)

-příprava CPE

- směs uhlíkového prášku a minerálního oleje

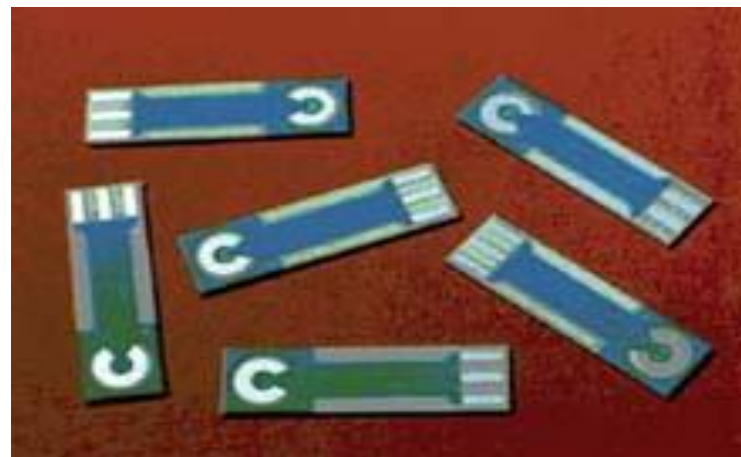
-modifikátory

- chemické sloučeniny a analytické reagenty
- ion-exchangery
- jílové minerály (zeolites)
- matrice obsahující křemík
- substraty z živých organismů

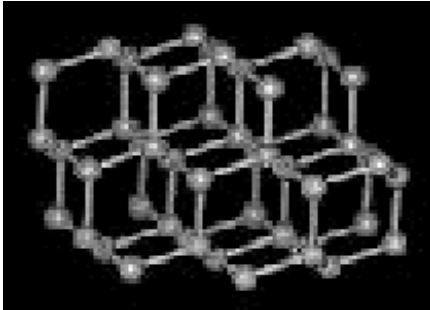
-charakteristiky

- fyzikálně-chemické
 - heterogenita (kompozitní charakter)
 - lipofilita (hydrofobicita)
 - nízký ohmický odpor (vysoká vodivost)
 - nestabilita v nevodných prostředích (desintegrace)
 - časové efekty (limitovaná životnost)

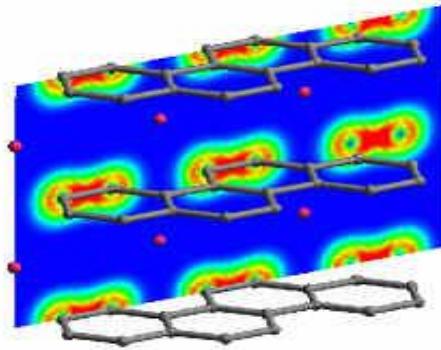
Screen-printed elektrody



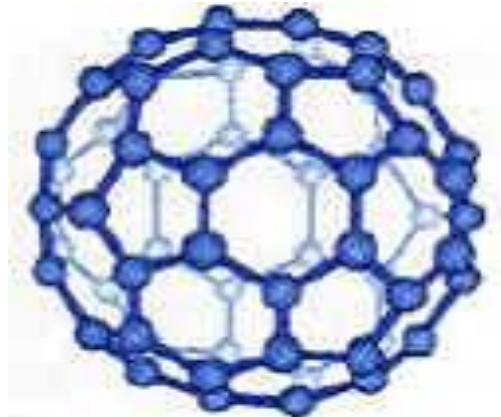
UHLÍKOVÉ NANOTRUBIČKY



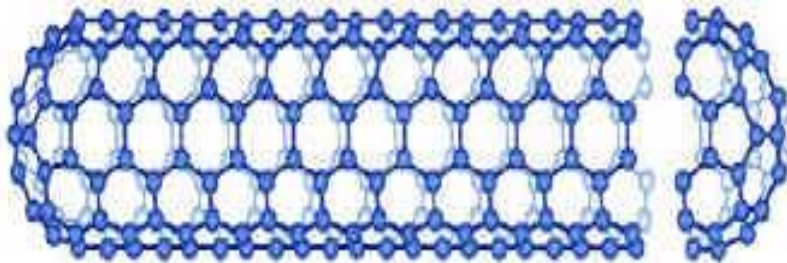
Diamond sp^3 bonding, hard and insulating



Graphite: sp^2 Bonding soft between graphene layers

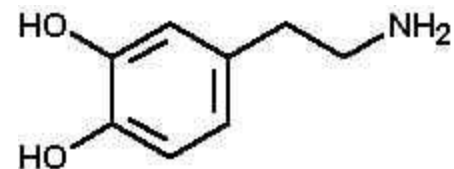
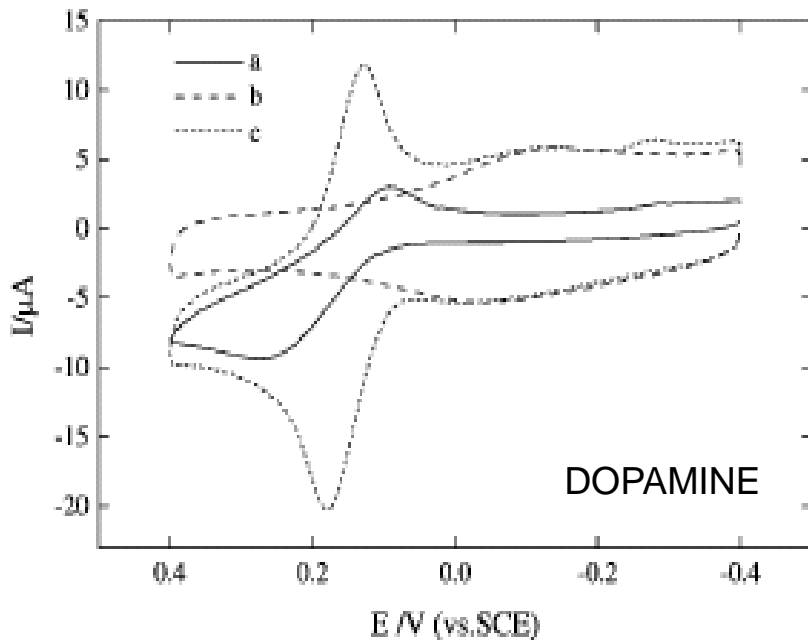


C60 “bucky-ball”: hollow sphere $\sim 1 \times 10^{-9}$ m (1nm) in diameter



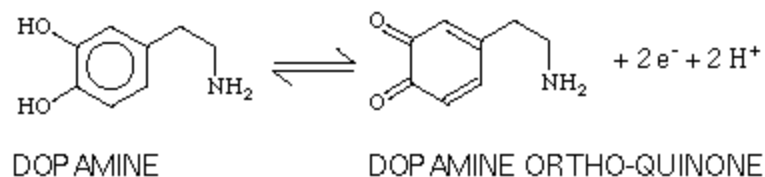
Carbon Nanotube:
1-50nm in diameter,
10 - 100
micrometer long

SWNT AND BIOMOLECULES



3,4 dihydroxyphenylethylamine

Electro-Oxidation of Dopamine



VIZMUTOVÉ ELEKTRODY

Charakteristika - nahrazují rtuťové elektrody

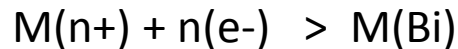
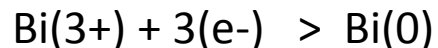
- stripping analýza
- nízkoteplotní amalgámy s mnoha kovy (např. Pb, Cd, Tl, Sb, In, Ga)

Konstrukce – ve většině případů uhlík jako podložka pro bizmutový film

- ve většině případů je to glassy carbon

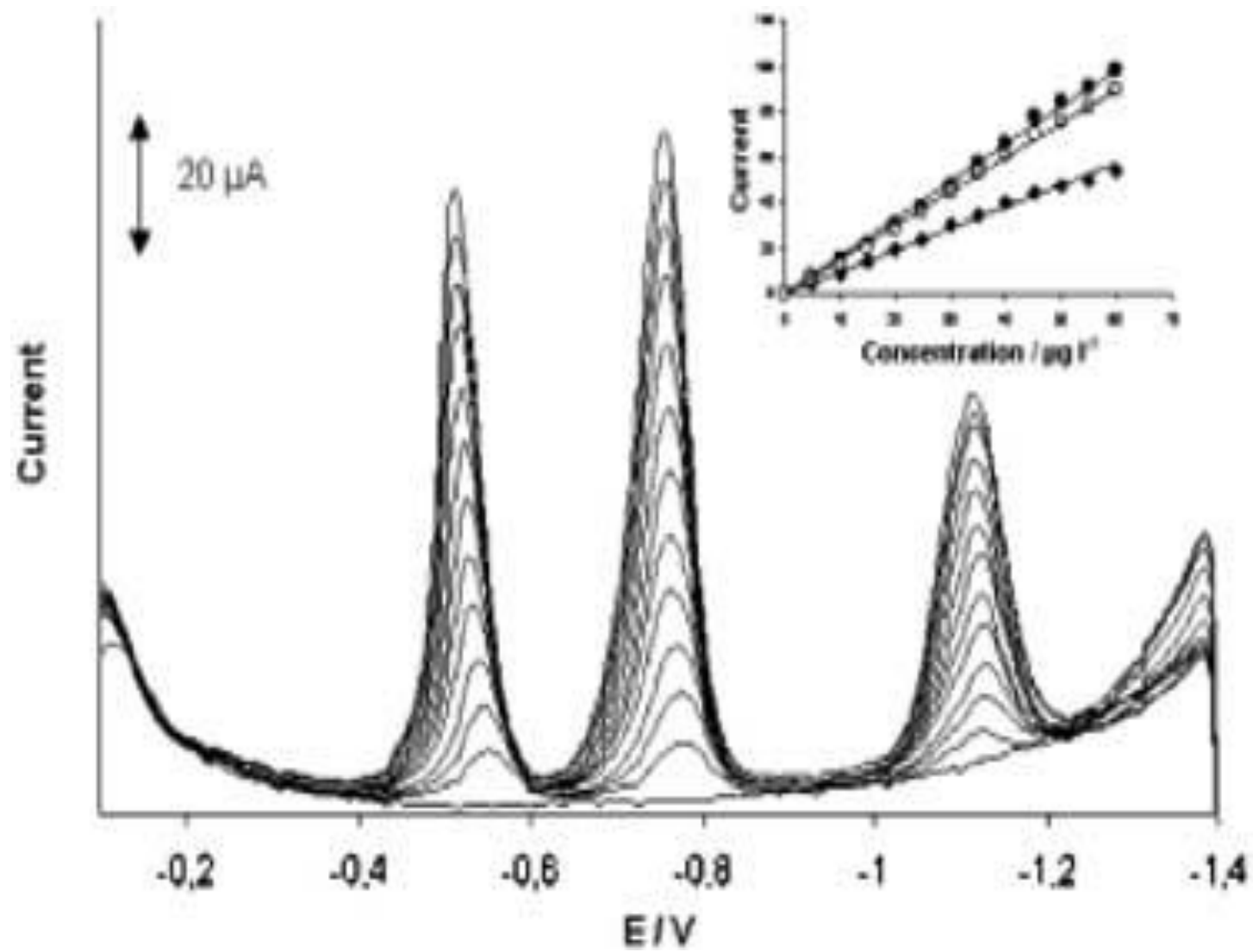
Film – se připravuje ex situ (prepokovování-preplated)

- nebo in situ (přidáním 0.25 – 1.0 ppm vizmutu(III) přímo ke vzorku za současné redukce vizmutu



Uhlíková pastová elektroda + Bi₂O₃ (preplated nebo mix s pastou)

„Hot“ vizmut elektroda



DIAMANTOVÉ, BOREM DOPOVANÉ ELEKTRODY - BDD

Charakteristika – jedná se o diamantový film dopovaný borem

- mechanická i chemická stabilita, nízký zbytkový proud a biokompatibilita (měření v živých tkáních)
- široké potenciálové okno, hodnoty kolem 3,5 V
- stanovení organických látek

Při elektrochemickém stanovení organických látek na pevných elektrodách dochází velmi často k ireverzibilní adsorpci reakčních produktů či některých složek vzorku na povrchu elektrody, což má za následek její pasivaci. Na adsorpci polárních látek jsou citlivé téměř všechny sp^2 uhlíkové elektrody. Je to způsobeno hlavně přítomností polárních skupin na jejich povrchu. BDD je díky svému sp^3 charakteru vůči adsorpci polárních látek na jeho povrchu značně rezistentní.

Pro použití BDDFE v elektrochemii organických látek existují dva hlavní směry: elektrochemická oxidace organických látek obsažených v odpadních vodách na BDD anodě založená na jejich úplné konverzi nebo destrukci a užití BDDFE jako elektrochemických senzorů ve voltametii nebo při ampérometrické detekci v průtokových metodách (HPLC, průtoková injekční analýza, kapilární elektroforéza).

Indium-cín oxid - ITO

Velký potenciálový rozsah poskytuje elektroda připravená vakuovým nanesením indium-cín oxidu – ITO na křemenné substrátu.

Byly studovány oxidační odezvy DNA měřené ITO elektrodami modifikovanými nitrocelulóзовými nebo nylonovými membránami nebo se samoorganizovanými monovrstvami dikarboxylátu. V těchto experimentech byla DNA navázána na elektrodu buď kovalentní vazbou nebo adsorpčními silami v modifikované vrstvě. Čistá ITO elektroda DNA neadsorbovala.

Oxidace guaninu v DNA byla zprostředkována redoxním chelátem kovu [Ru(bipy)3], který přenášel elektrony na povrch elektrody z DNA buď v roztoku nebo jako fixovaný na film modifikátoru. Rovněž byla použita metoda fixace redoxního mediátoru na ITO elektrodu modifikovanou elektro polymerizovaným poly[Ru(bipy)3] filmem.

TITANOVÉ ELEKTRODY

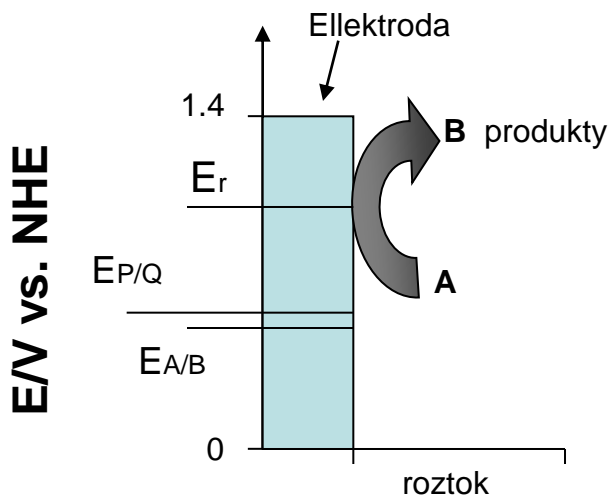
Polymorfy TiO_2 – anatas, rutil, brookit,
Zpravidla se používá single-krystal anatasu s vysokým stupněm
čistoty. Dají se připravit vypalované nanopásky TiO_2 (nanobelts)

Byly studovány oxidační odezvy adeninu a guaninu měřené
uhlíkovými elektrodami modifikovanými směsí anatasu a rutilu (3:1). V
těchto experimentech byly nukleobáze navázány na elektrodu
adsorpčními silami. Byl navržen mechanismus katalytické oxidace.

CHEMICKY MODIFIKOVANÉ ELEKTRODY

ELEKTRODY

A. NEMODIFIKOVANÉ



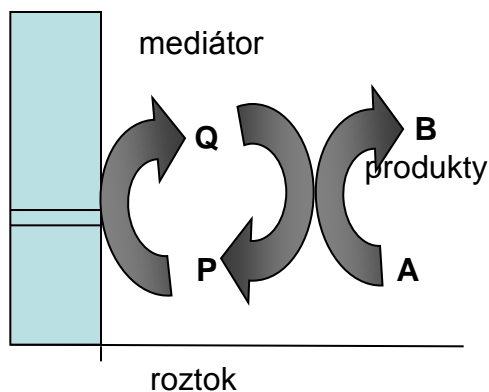
$$E_r - E_{A/B} = \eta_1$$

$$E_{P/Q} - E_{A/B} = \eta_2$$

Bez katalýzy

$$(\eta_1 \gg \eta_2)$$

B. HOMOGENNÍ

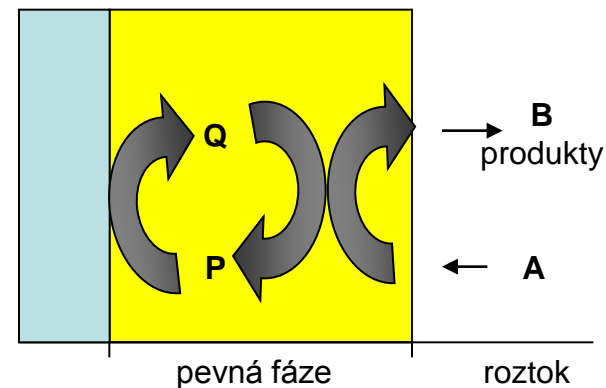


$$E_r = E_{P/Q} - E_{A/B}$$

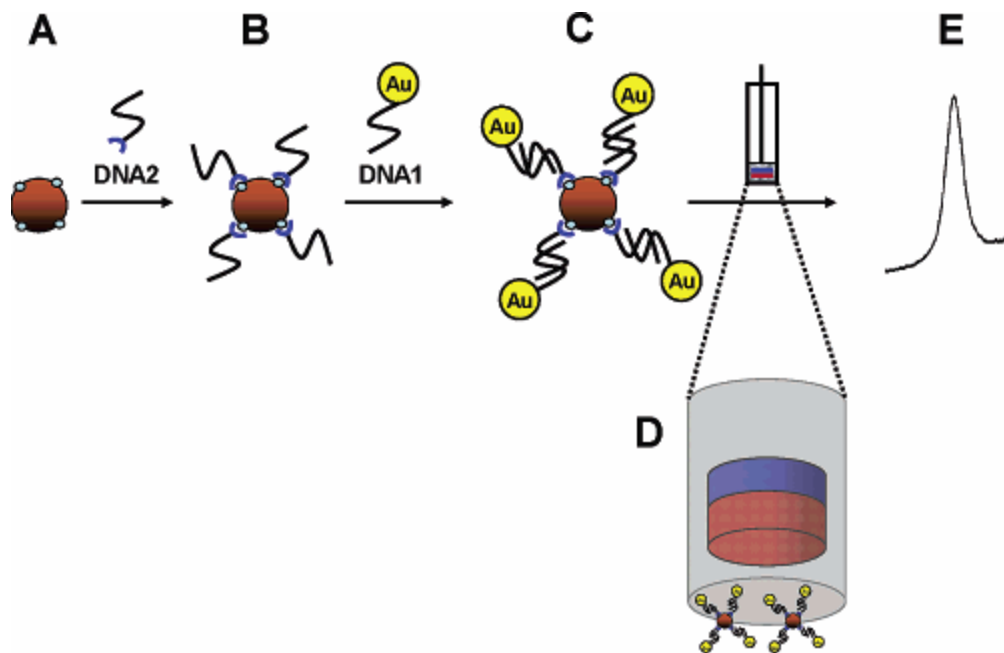
katalýza

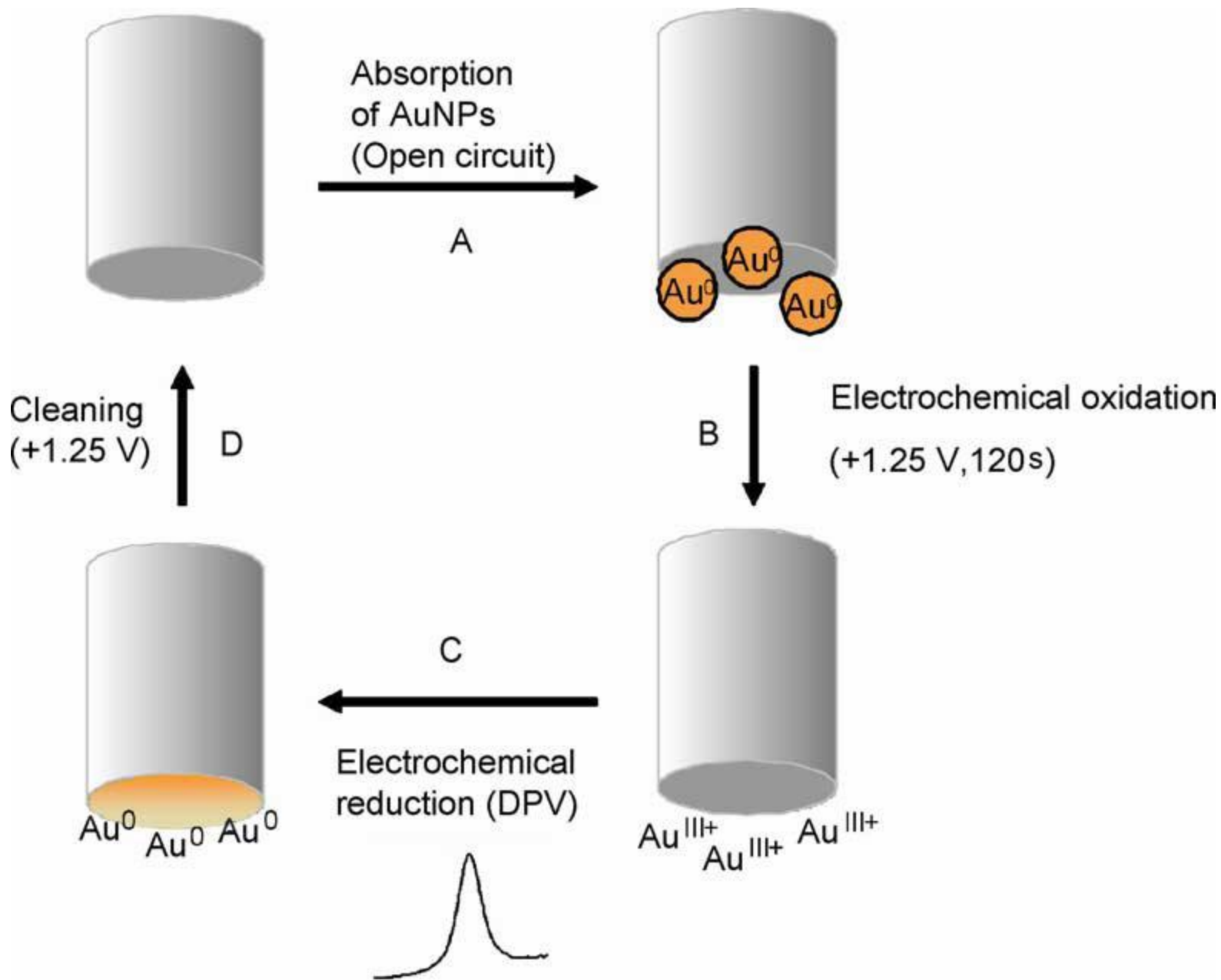
$$(\eta_1 = \eta_2)$$

C. HETEROGENNÍ



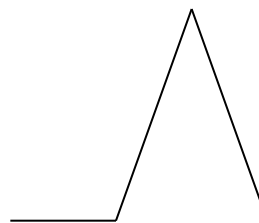
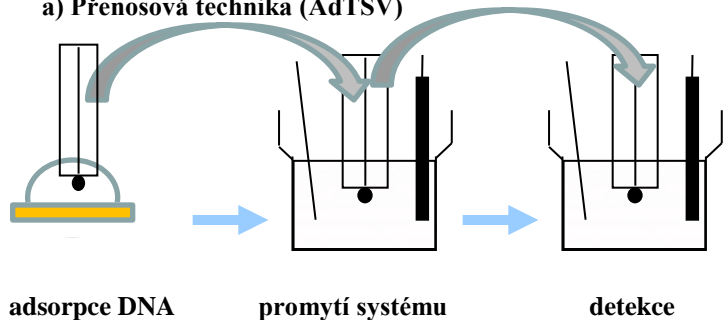
NANOČÁSTICE





Separáčn  metody p ed vlastn m m erenn 

a) P renosov technika (AdTSV)



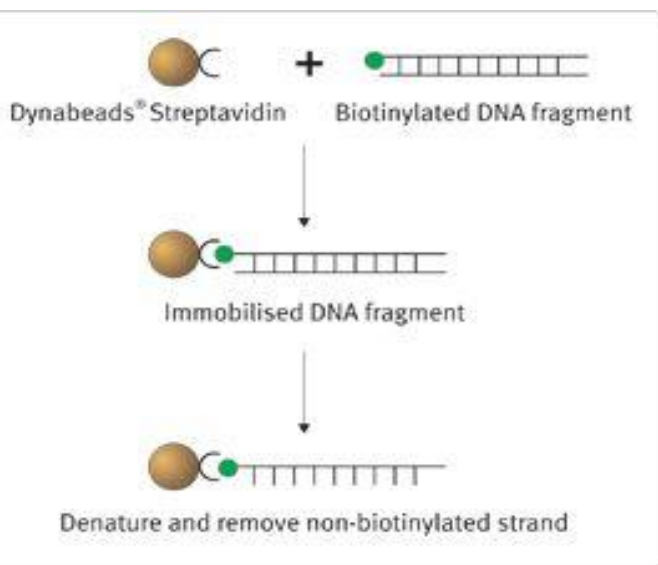
data

EVLS

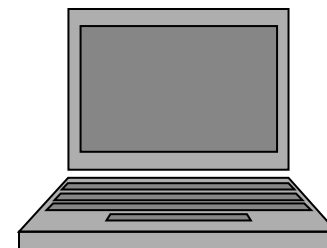
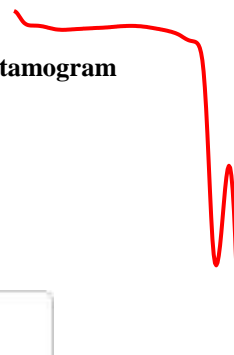
b) Magnetick  kuličky

DYNAL

- With primary antibody against specific cell surface antigens
- + With secondary antibody for use with primary antibody of your choice
- With specific surface functionality for direct coupling of your own ligand/target
- With surface charge for use in magnetic bead chromatography
- With protein A or protein G for Ig purification and immunoprecipitation
- + With streptavidin for use with a biotinylated probe/ligand/target
- With oligo-dT for isolation of polyadenylated mRNA
- With a silica-like surface for binding of total nucleic acids



voltamogram

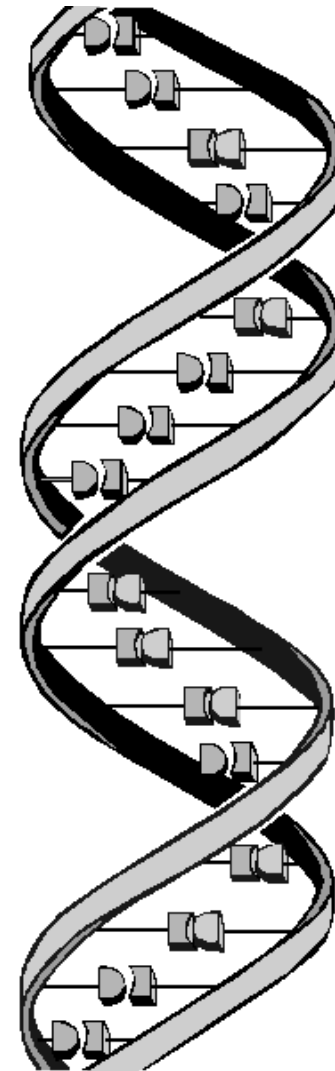
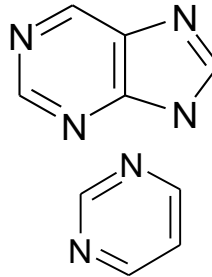


NUKLEOVÉ KYSELINY

- DNA
- RNA
- PNA

Báze NK

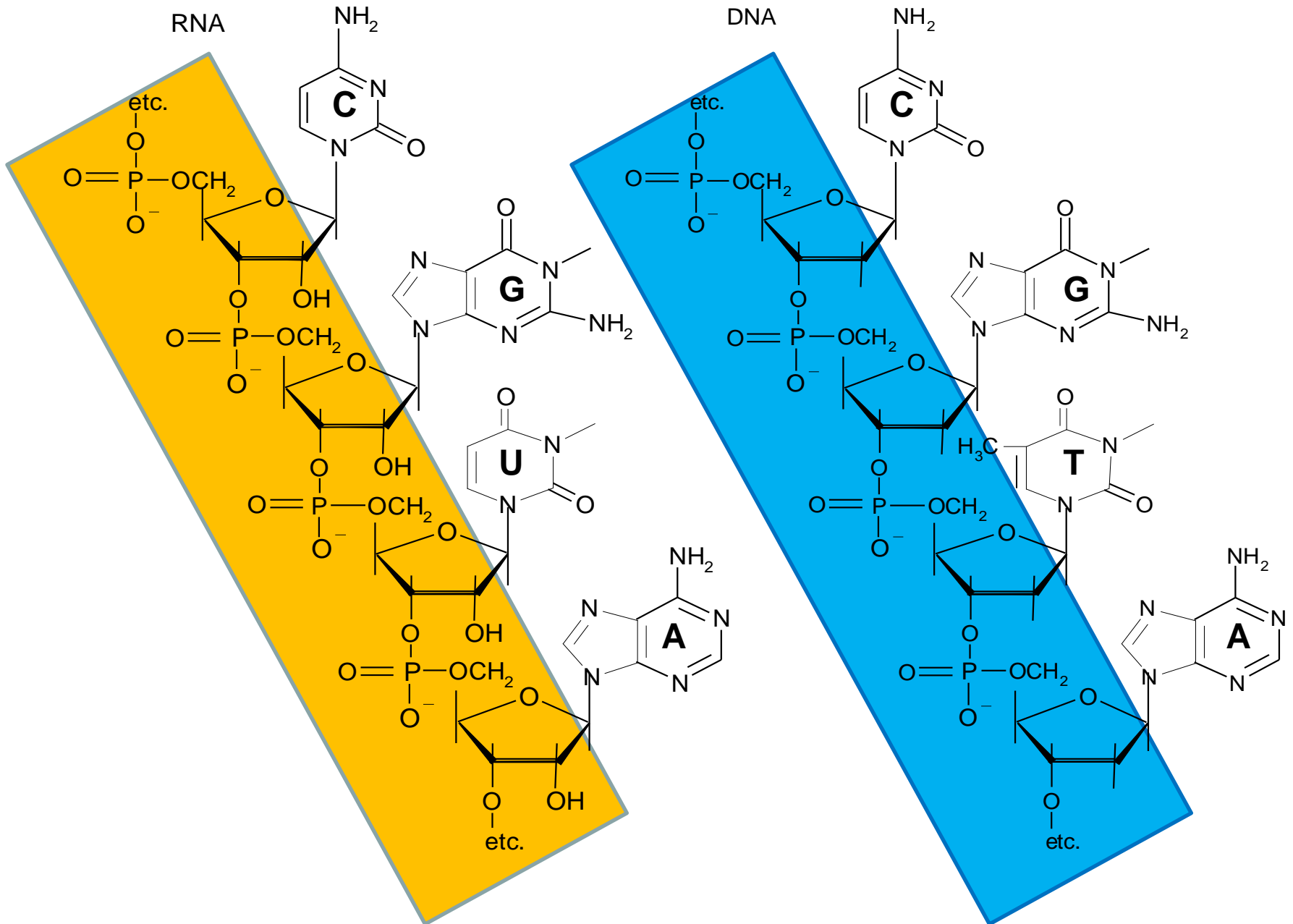
- | | | | |
|-------------------|---|------------|---|
| Adenin, A | } | puriny | } |
| Guanin, G | | | |
| Cytosin, C | } | pyrimidiny | } |
| Thymin, T | | | |
| Uracil, U | | | |



RNA vs DNA

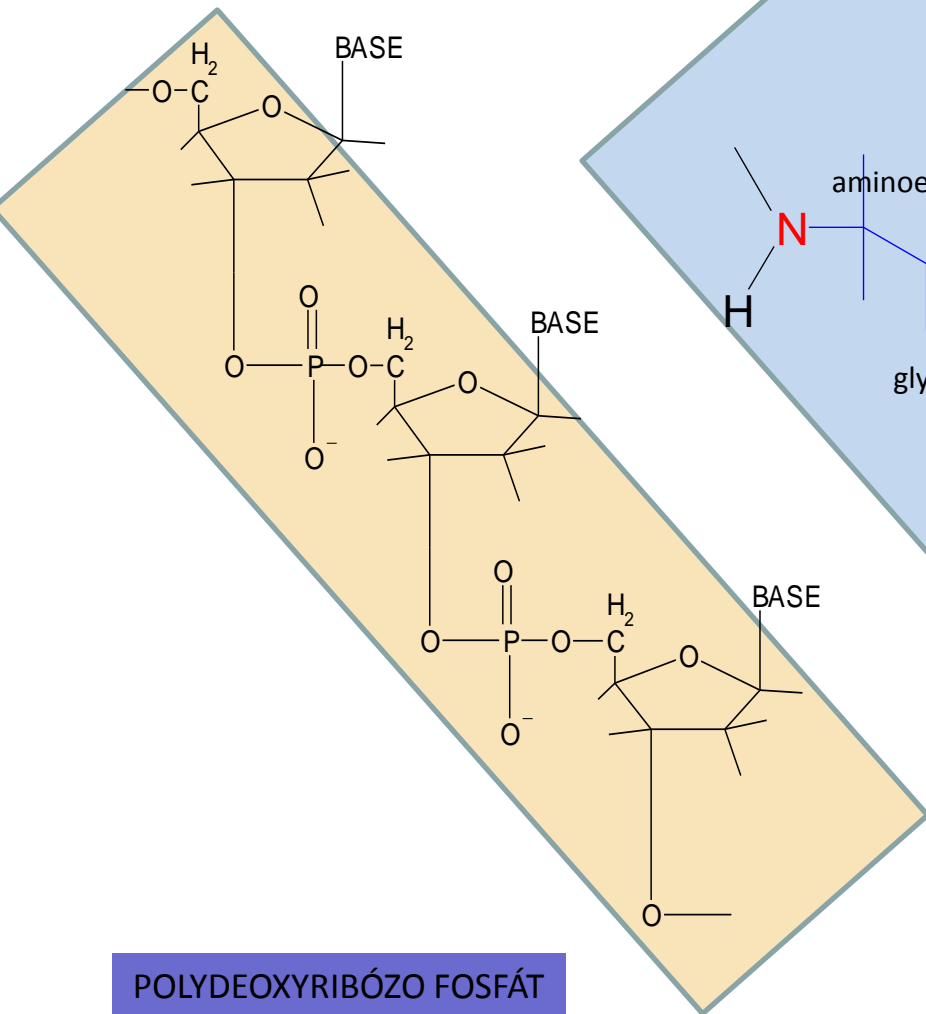
Ribonucleic acid

Deoxyribonucleic acid

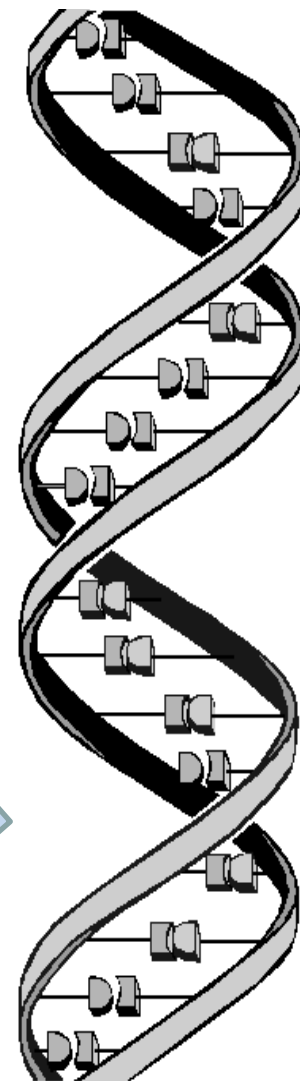
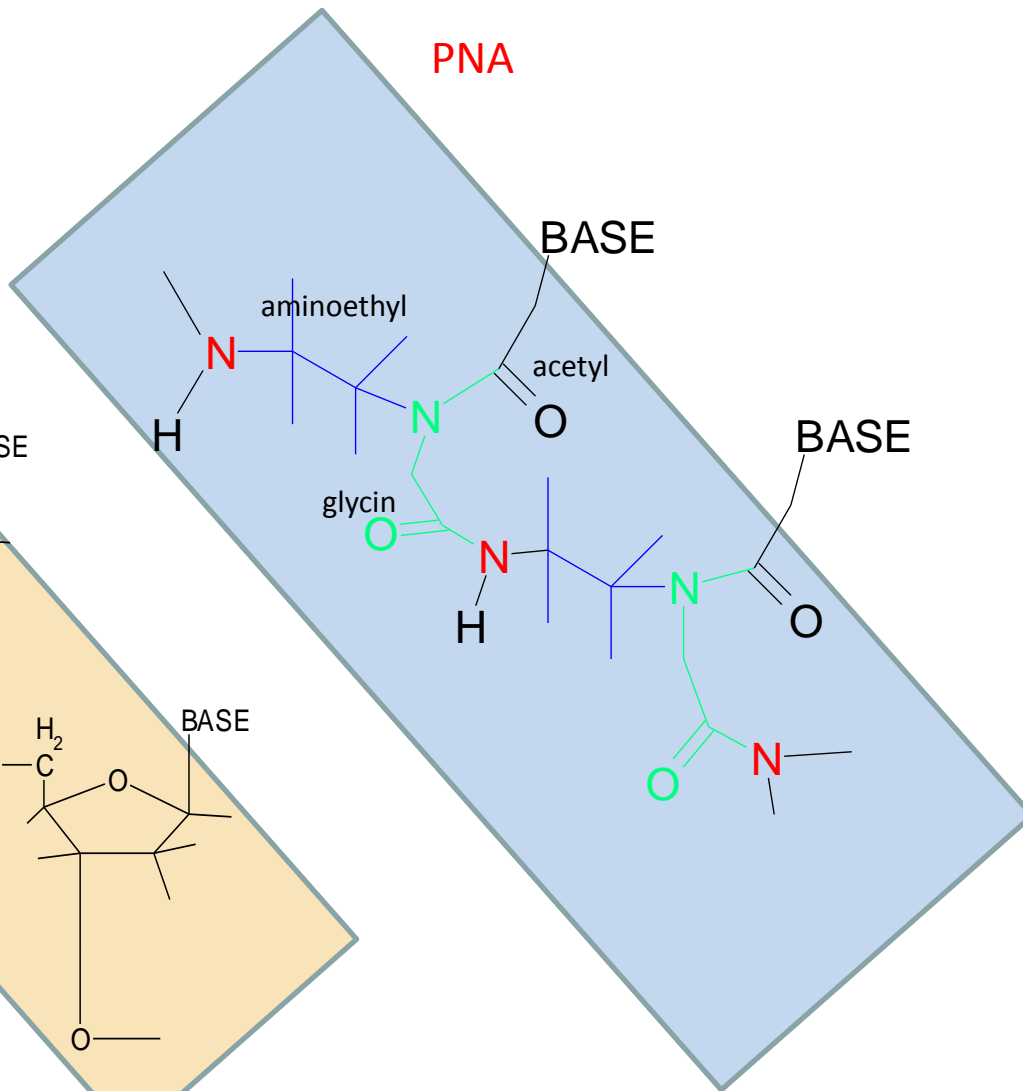


DNA x PNA

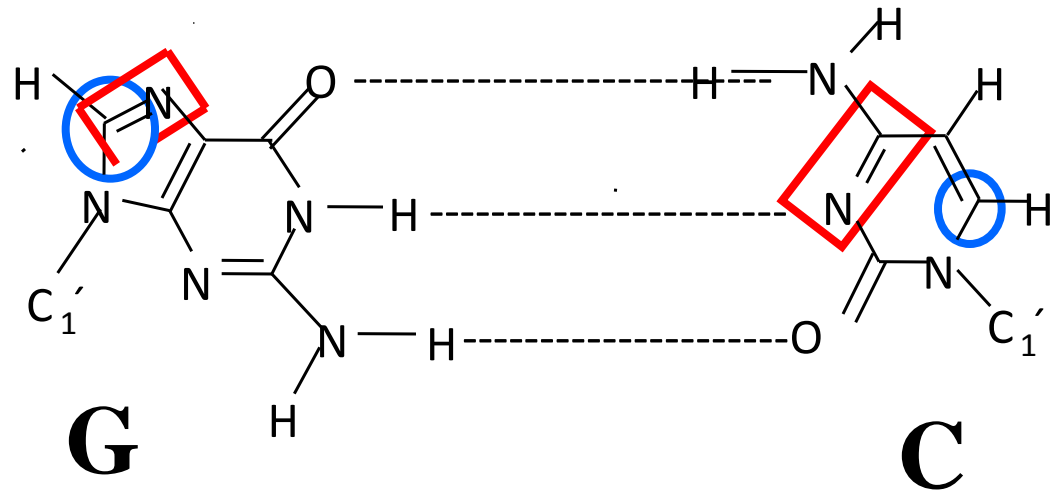
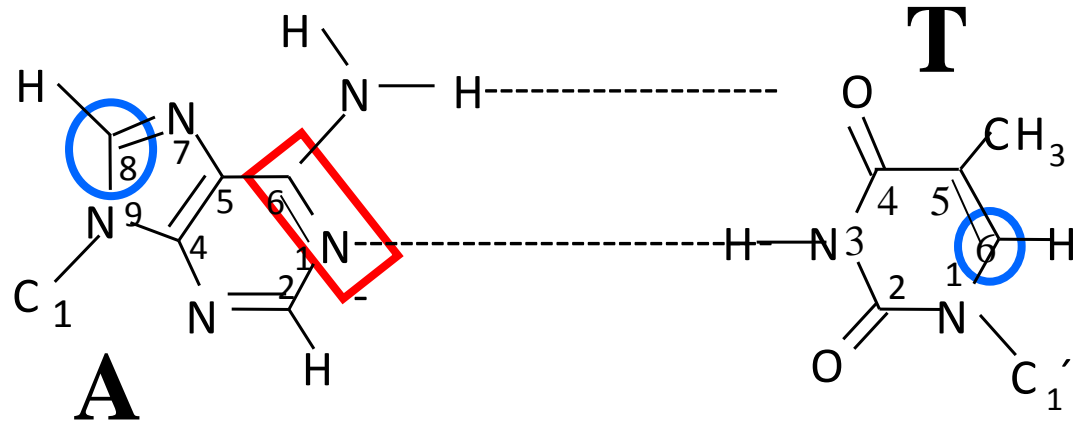
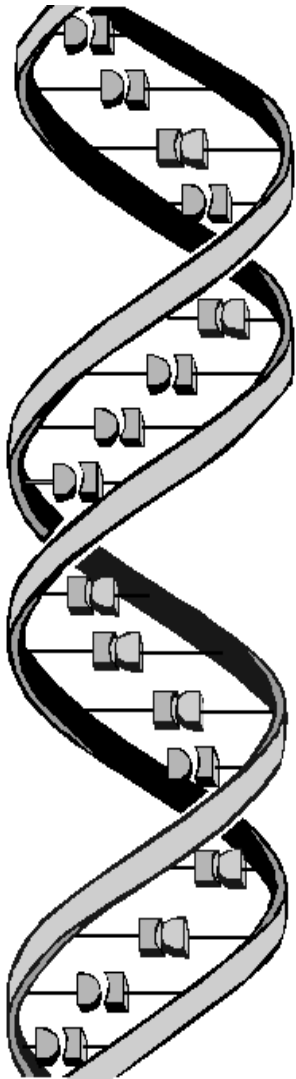
DNA



PNA



PÁROVÁNÍ BÁZÍ A REDOXNÍ MÍSTA

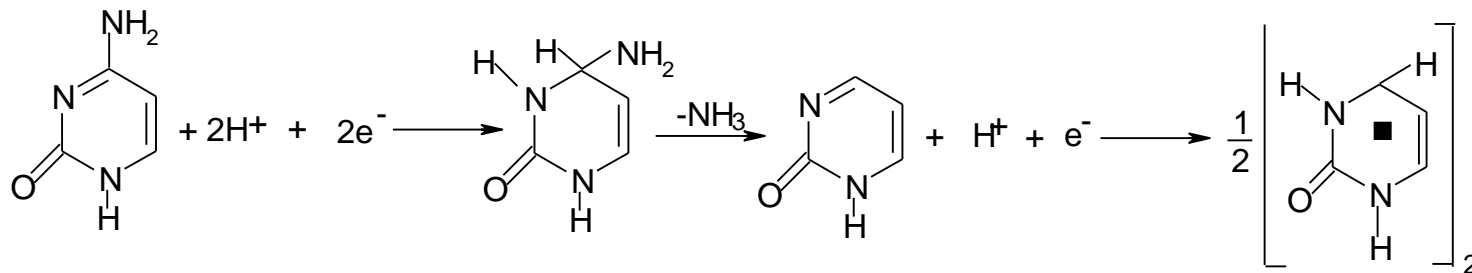


 REDUKČNÍ MÍSTA

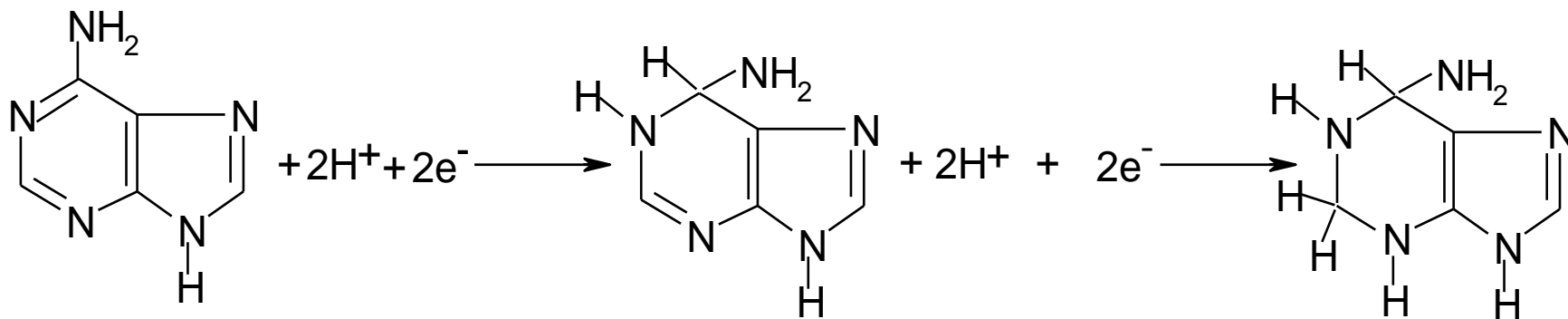
 OXIDAČNÍ MÍSTA

REDUKCE

C -CYTOSIN

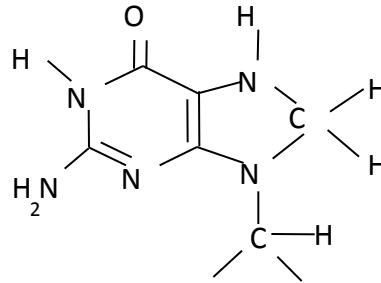
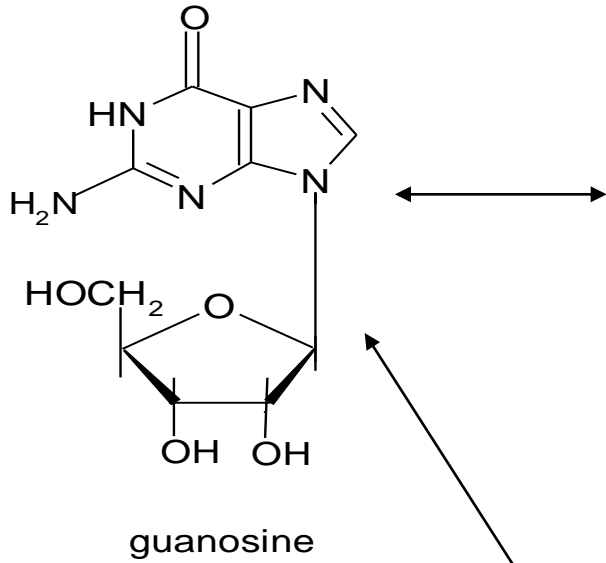


A -ADENIN

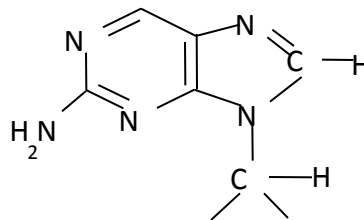


REDUKCE

Gua - GUANOSIN

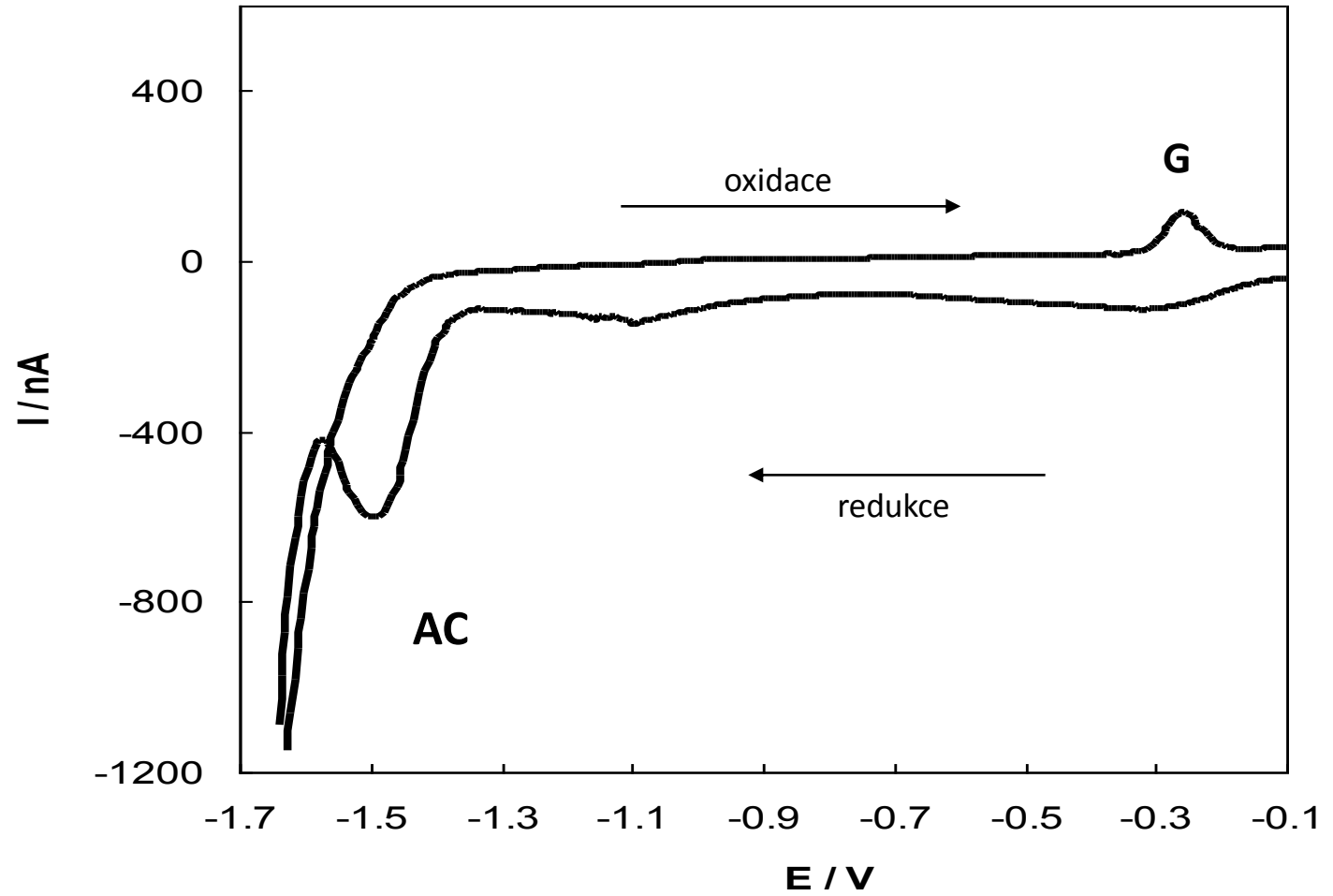


7,8-dihydroguanosine

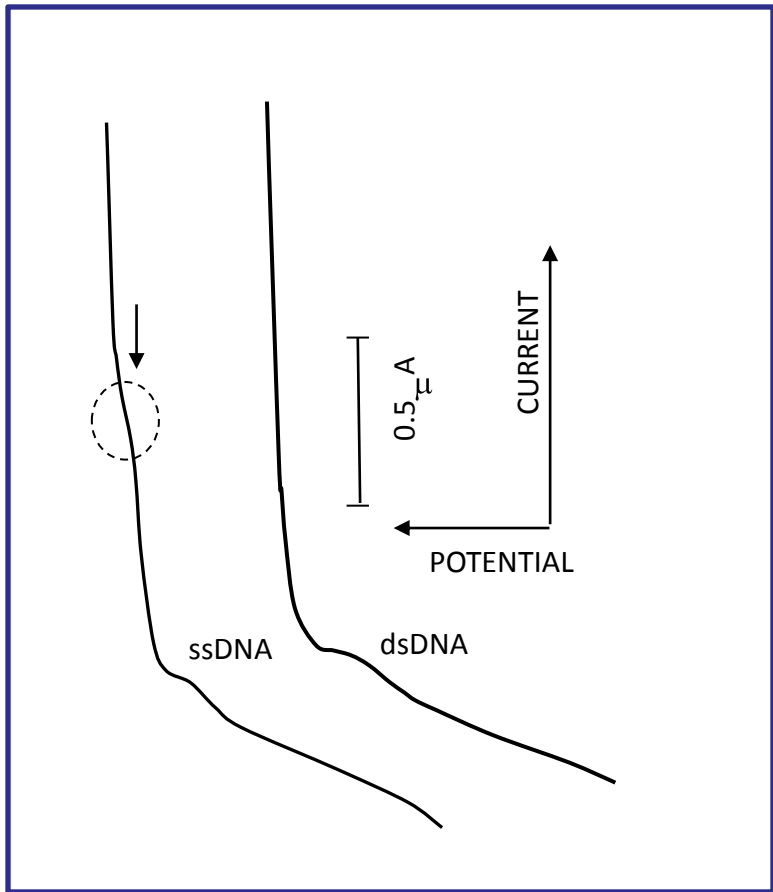


9-ribofuryl-2-aminopurine

REDUKČNÍ SIGNÁLY

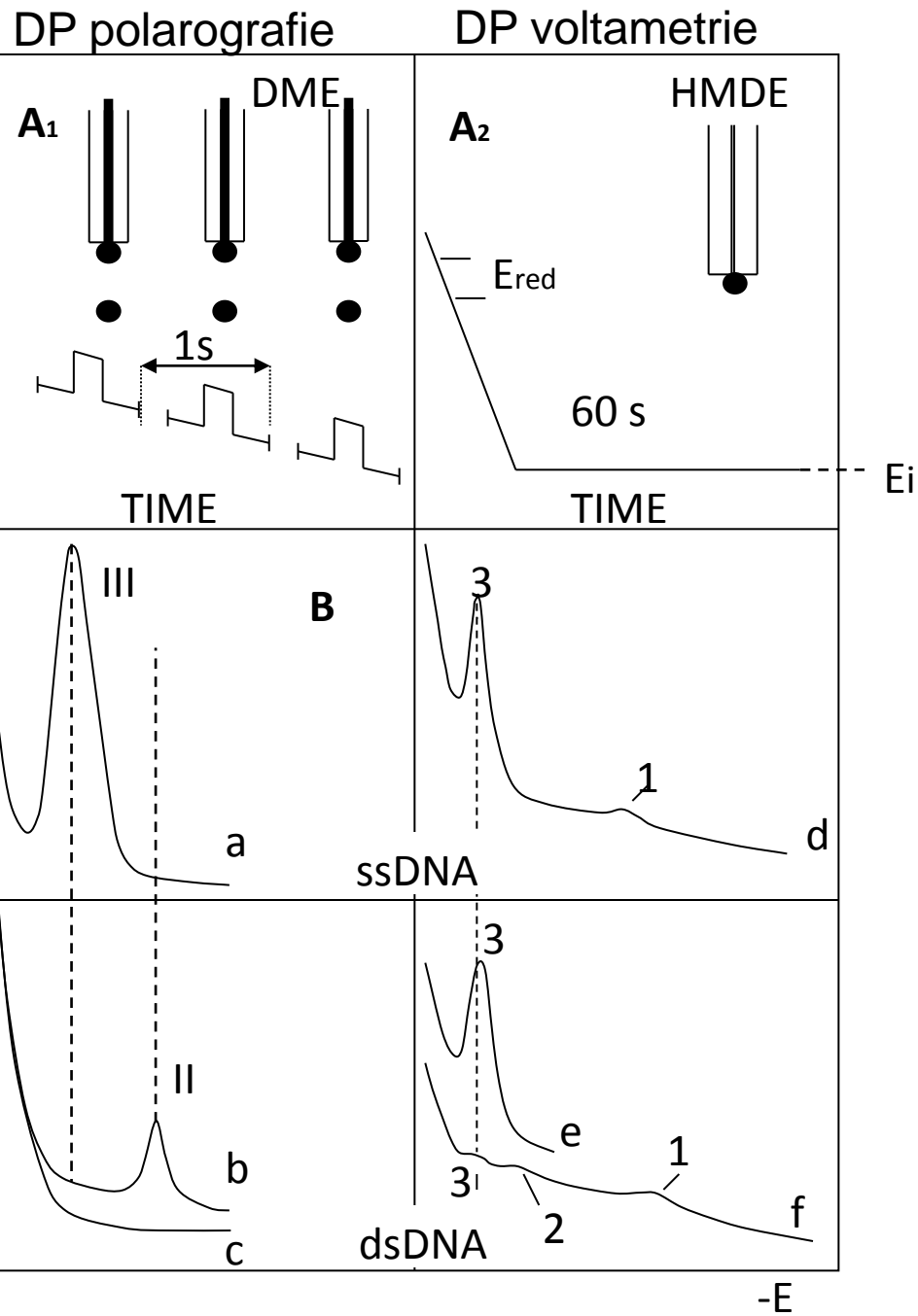


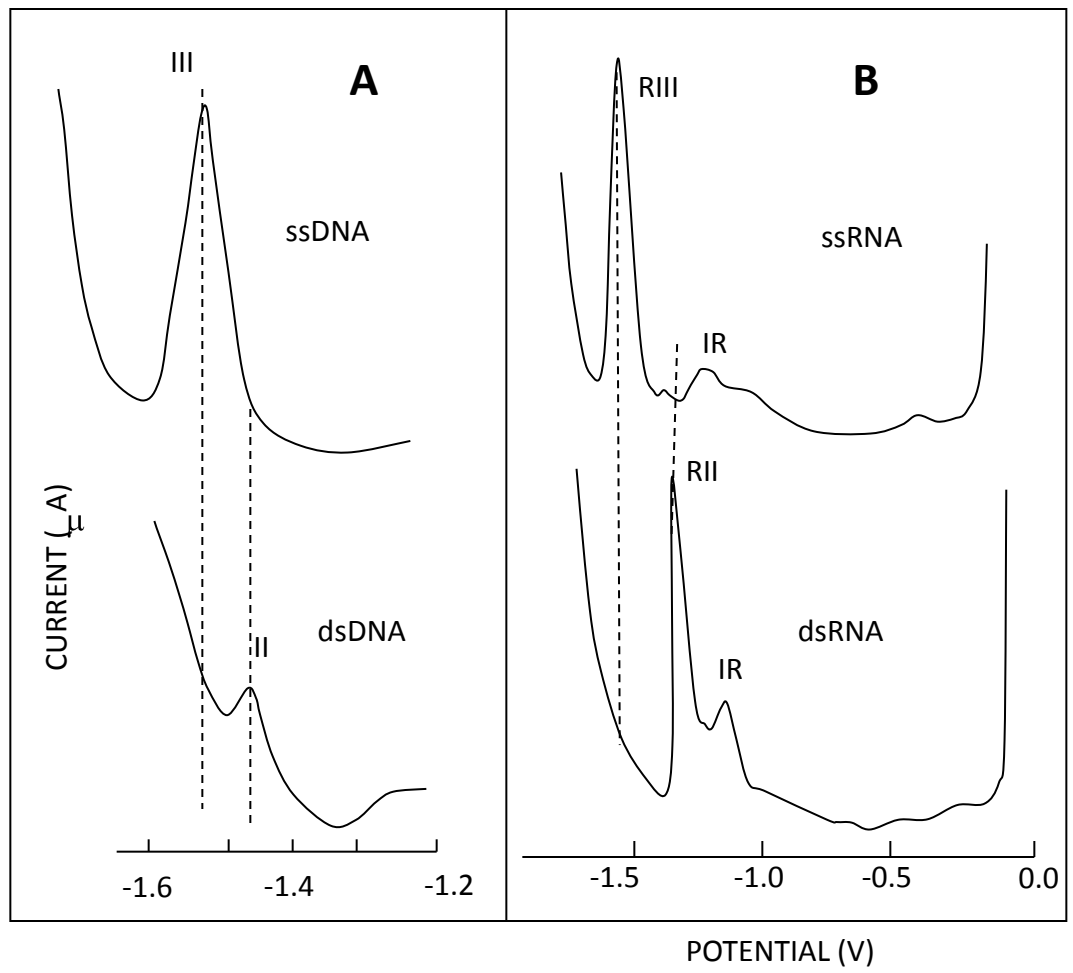
DC polarografie



SIGNAL APPLIED

RESPONSE OBTAINED

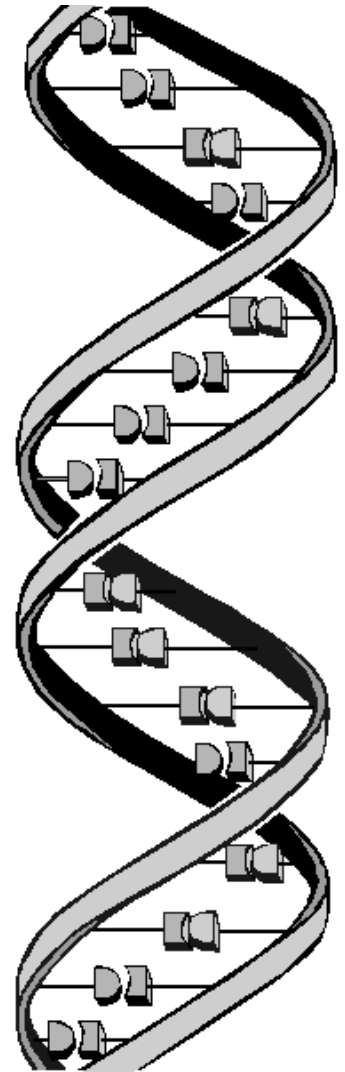




5'-TCCAGTAGTTCTAGAAAGGGAGTT-3'
5'-AACTCCCTTTCTAGAACTACTGGA-3'

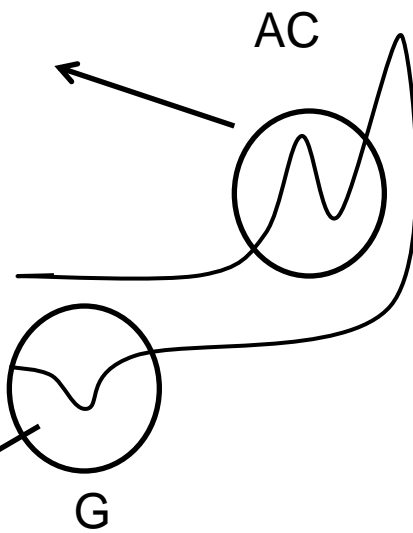
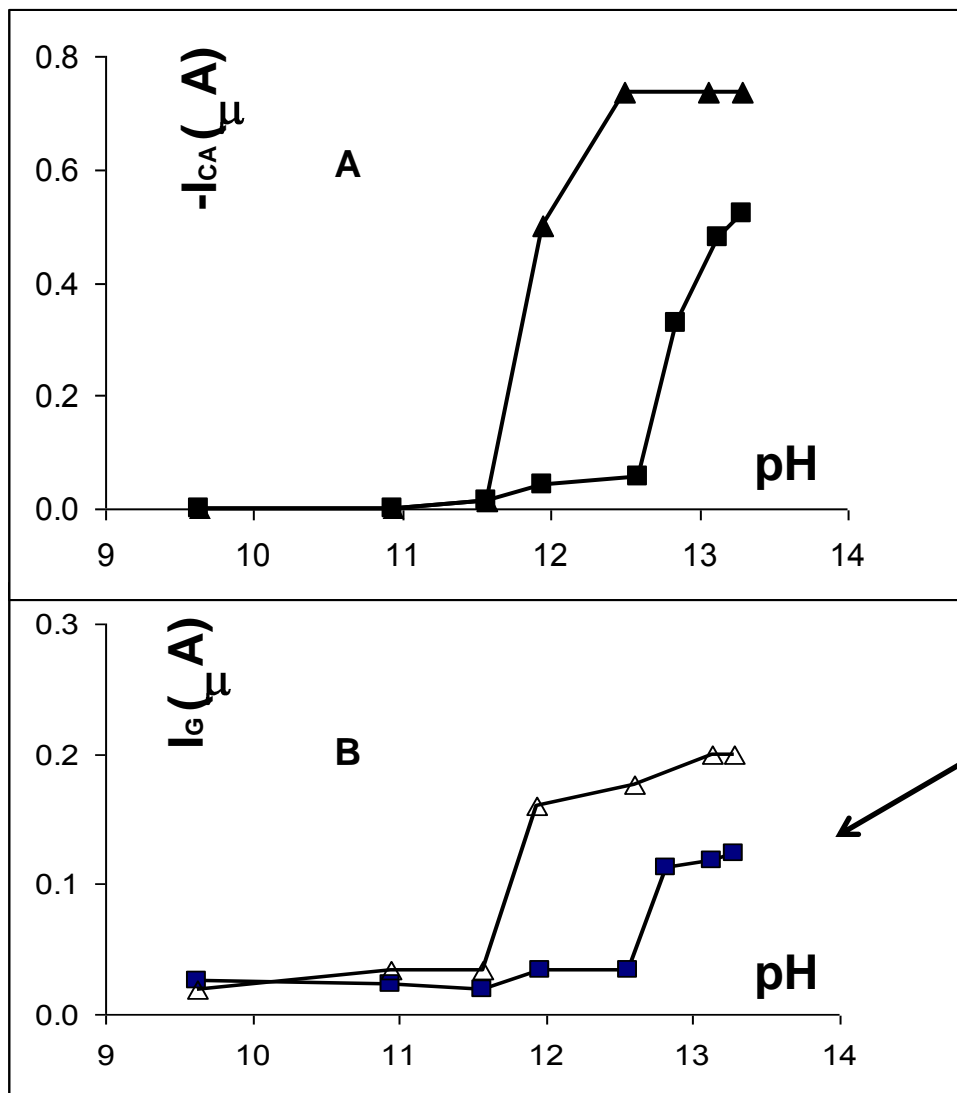
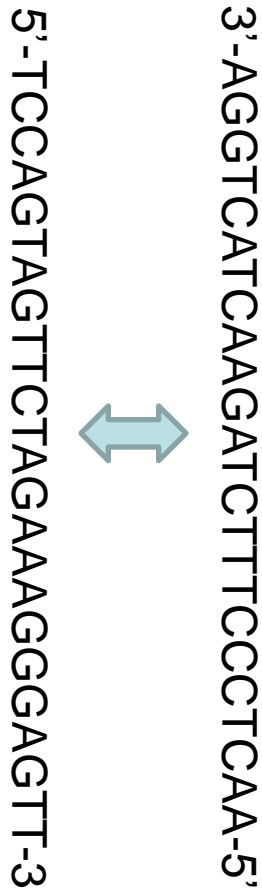
5'-TCCAGTAGTTCTAGAAAGGGAGTT-3'
|||||
3'-AGGTCATCAAGATCTTTCCCTCAA-5'

- A) Denaturace
- B) Hybridizace
- C) Depurinace
- D) Adsorpce

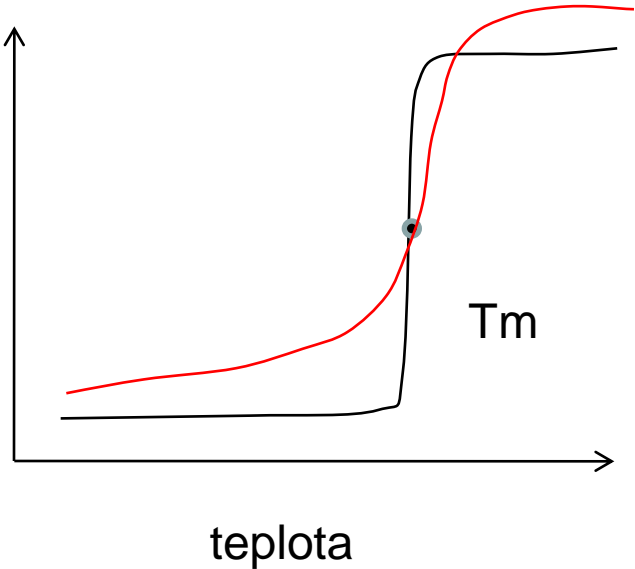


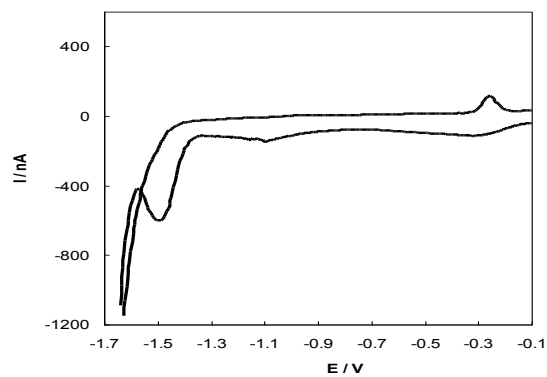
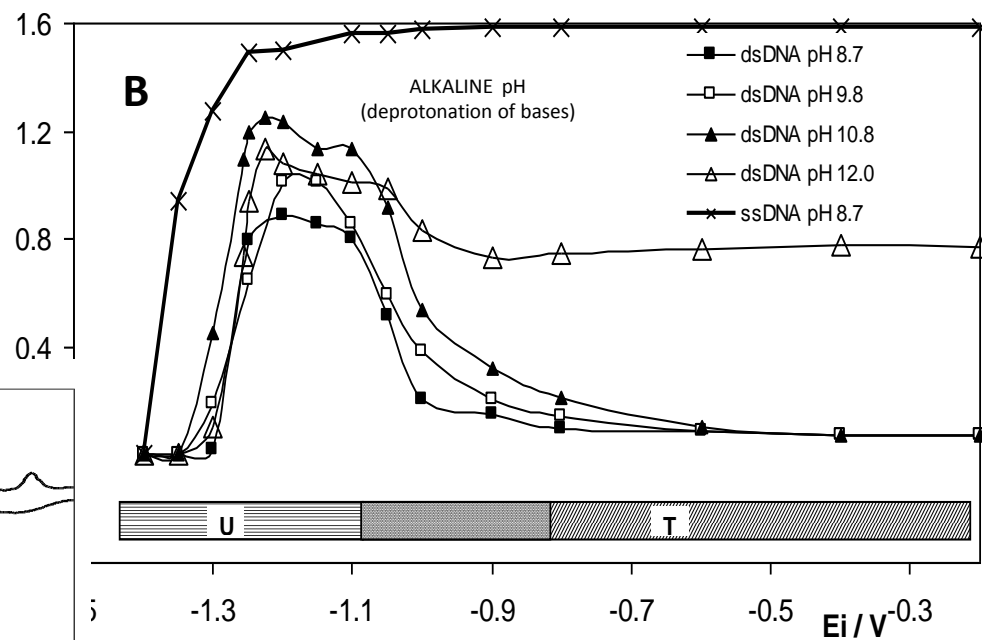
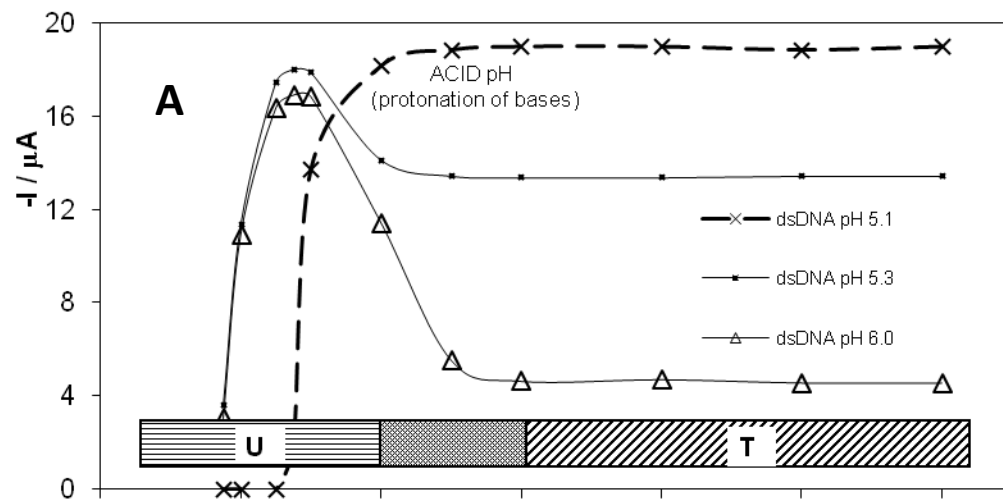
Denaturace

a) změna pH (alkalická denaturace)



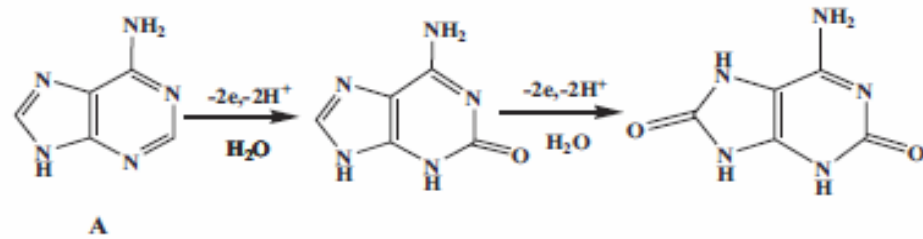
Denaturace



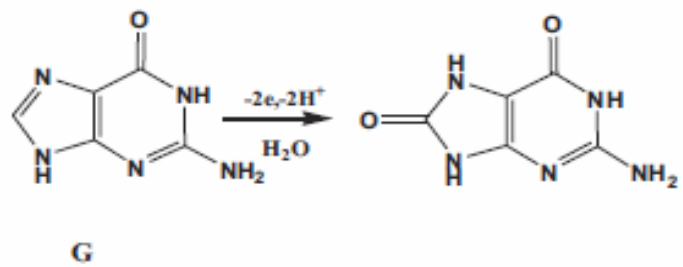


OXIDACE

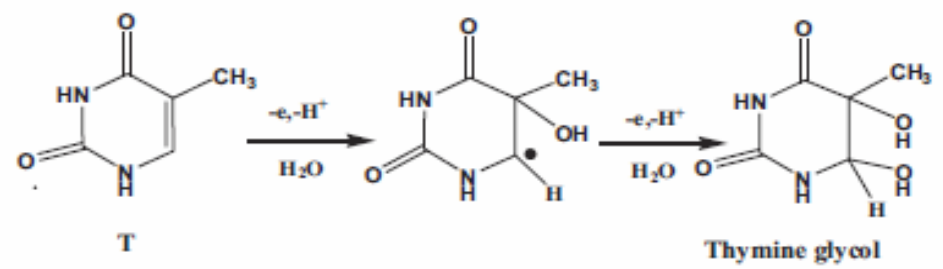
A - ADENINE



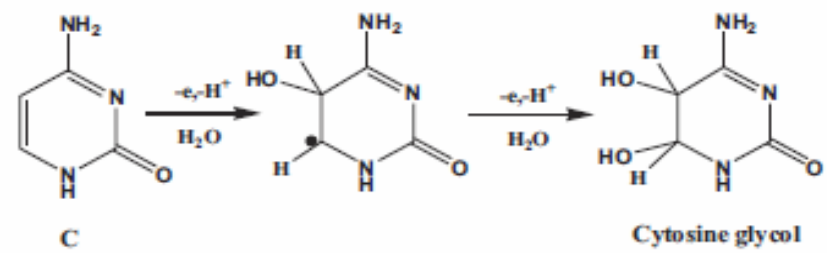
G - GUANINE



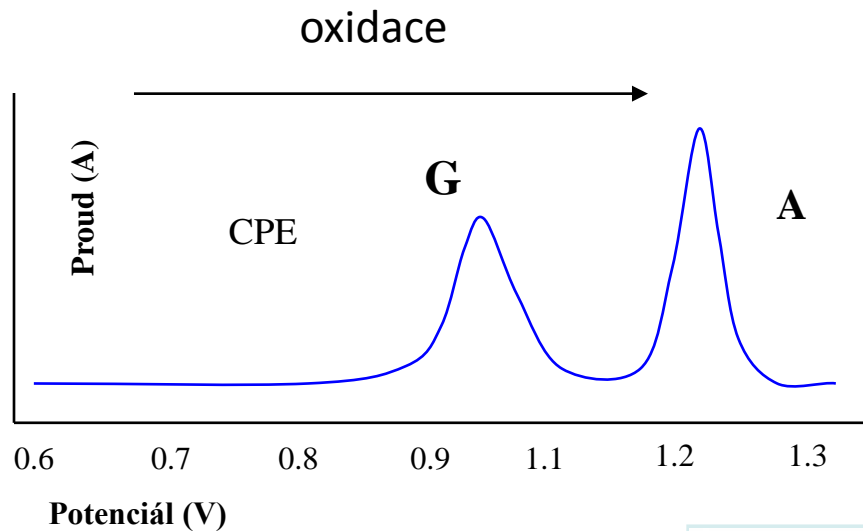
T - THYMINE



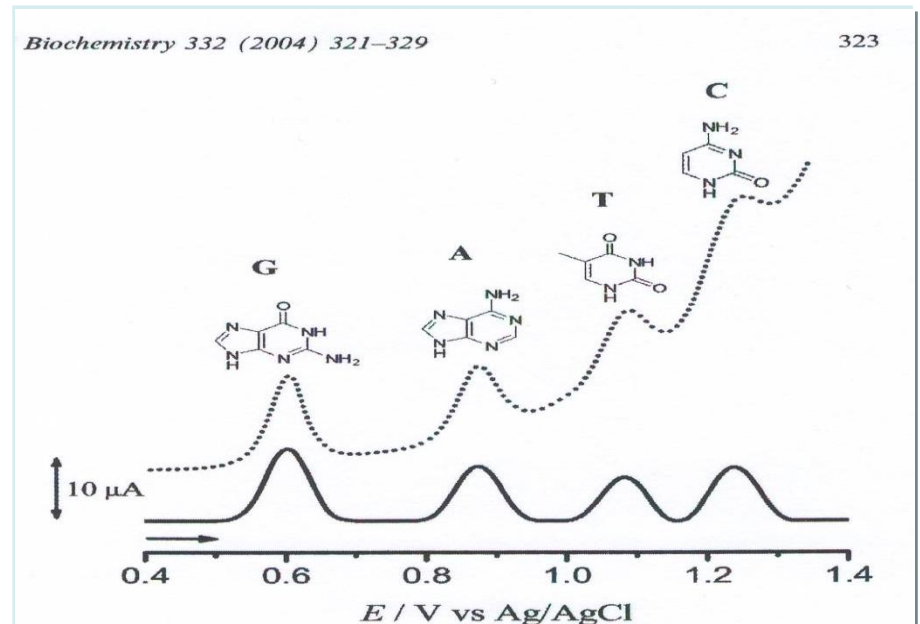
C - CYTOSIN



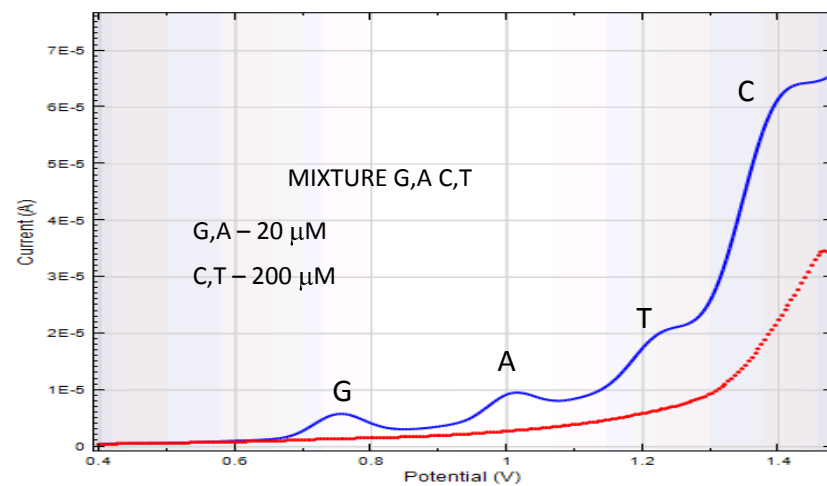
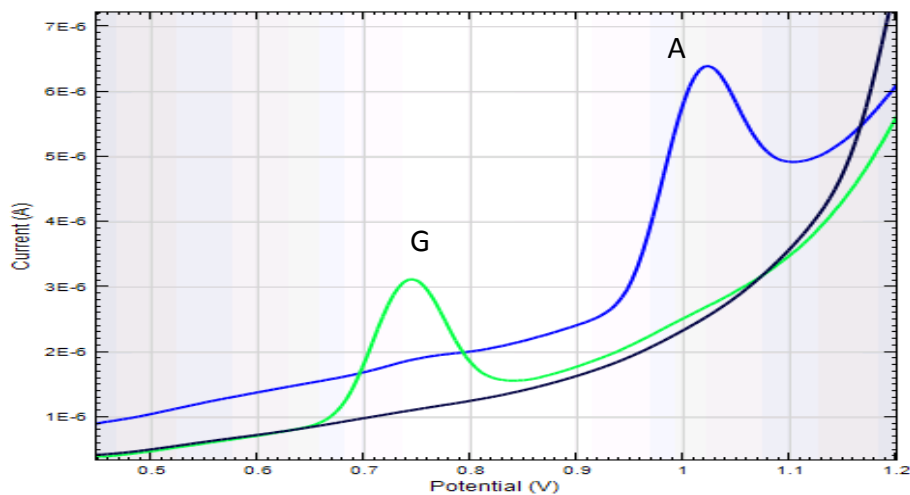
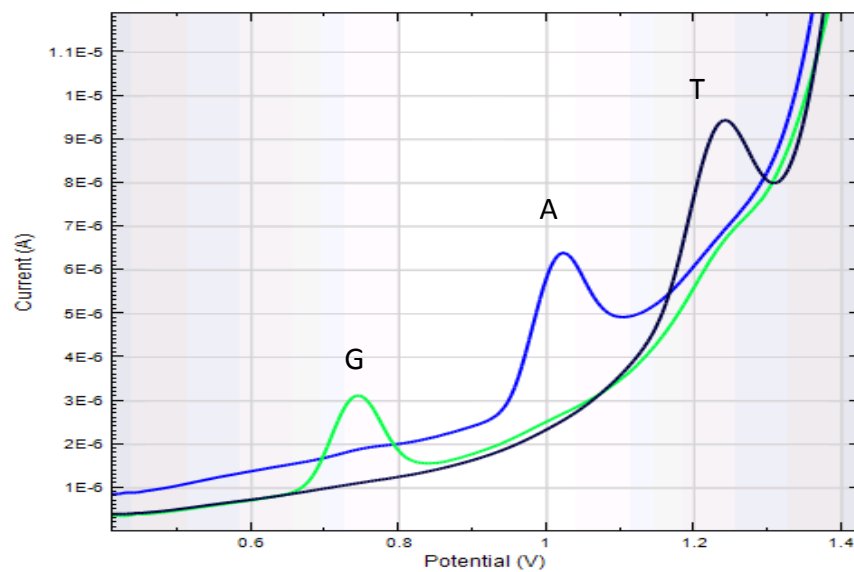
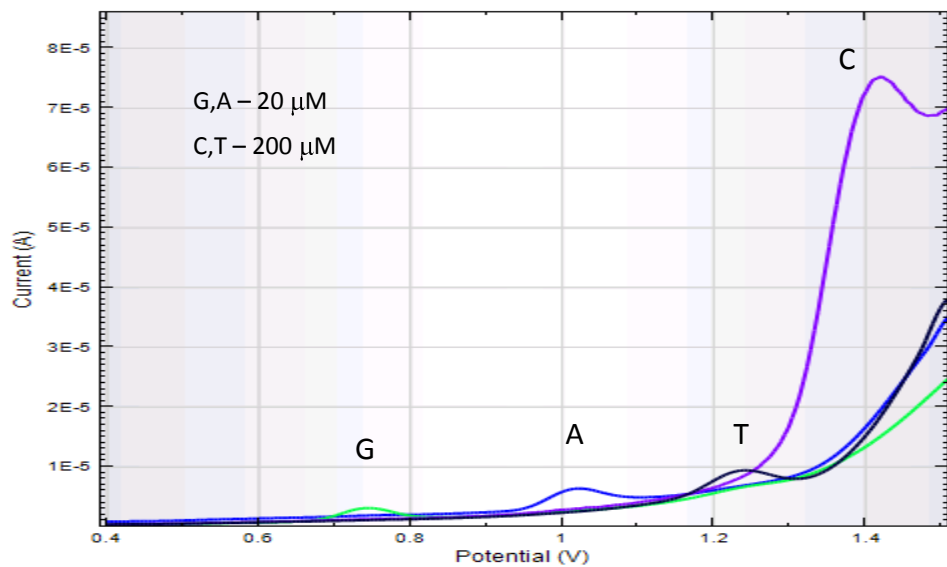
OXIDAČNÍ SIGNÁLY

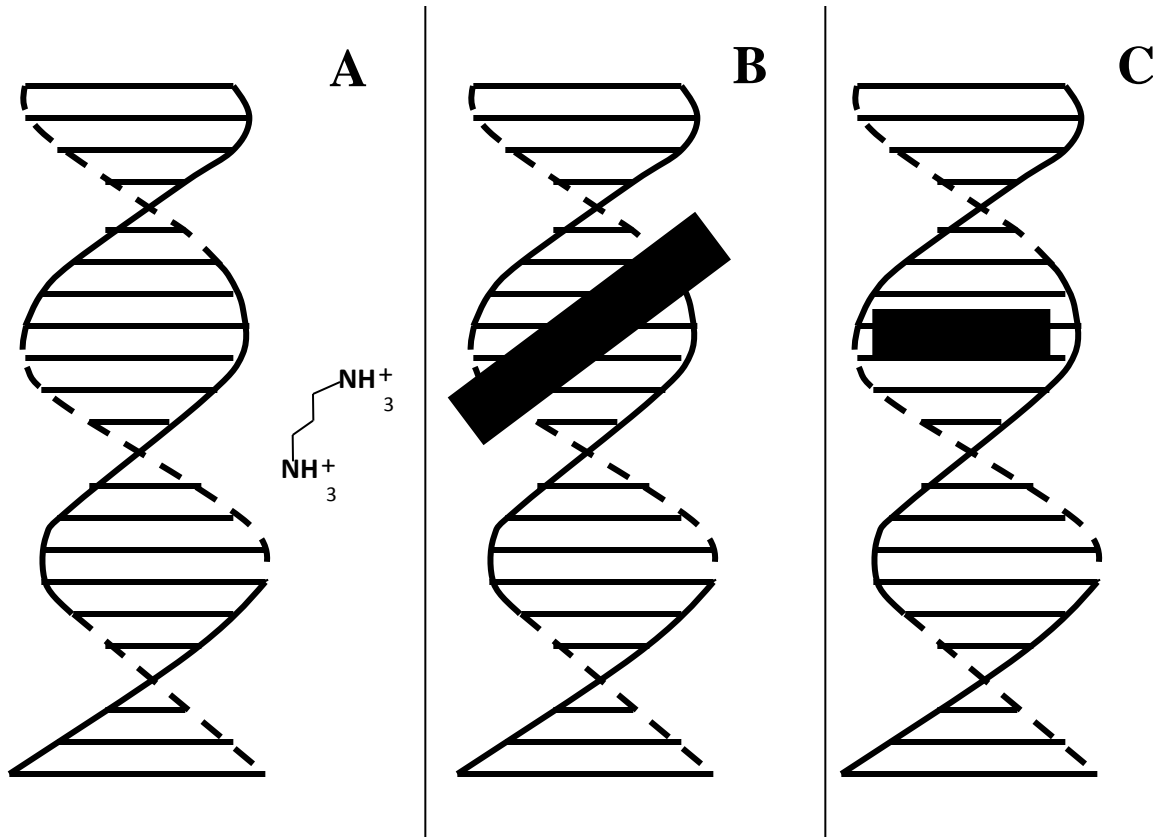


Brett A.M. et al., *Anal Biochem.* 332 (2004) 321. Differential pulse voltammogram obtained with a 3-mm diameter GCE electrode for the mixture of $2 \cdot 10^{-5}$ M guanine (G) and adenine (A), $2 \cdot 10^{-4}$ M thymine (T) and cytosine (C) in pH 7.4, 0.1 M phosphate buffer supporting electrolyte. (. . .) Recorded voltammogram; (—) baseline-corrected voltammogram. Pulse amplitude 50 mV; pulse width 70 ms; scan rate 5m Vs⁻¹.



BÁZE, CPE, SQW-80 Hz, 0.1M fosfát pufr pH=6.4, tA 120s





(A) elektrostatická interakce

(B) vazba do malého žlábků dvoušroubovice DNA

(C) interkalace do dvoušroubovice

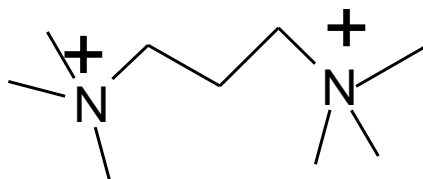
A. ELEKTROSTATICKÁ INTERAKCE

- externí interakce podél dvoušroubovic
- příčinou jsou elektrostatické síly

Příklady:

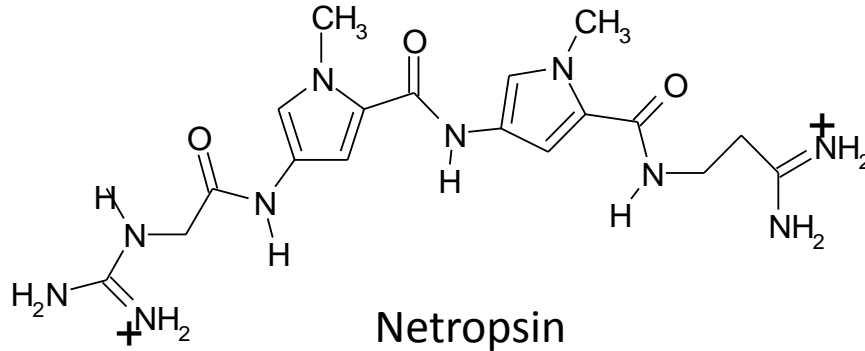
Ionty Na^+ , Mg^{2+} ,

Nebo látky typu:



B. VAZBA DO ŽLÁBKU (GROOVE-BINDING INTERACTION)

-přímá interakce molekuly s na hranách párů bází malého nebo velkého žlábků



Distamycin

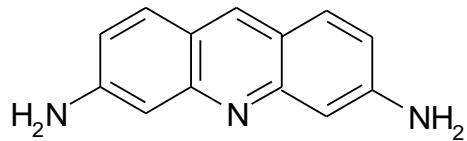
Hoechst 33258

SN 6999

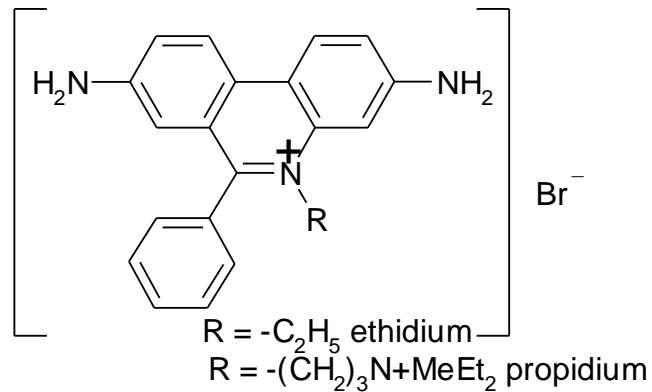
Cloroquine

C. INTERKALÁTORY

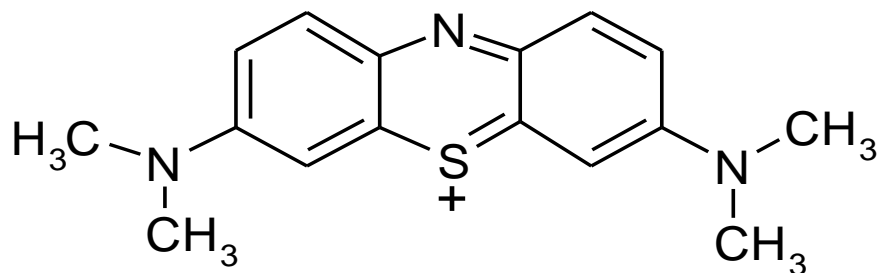
- planární aromatické struktury, které se vmezeřují mezi páry bází NK
- obecně jsou favorizovány G.C páry



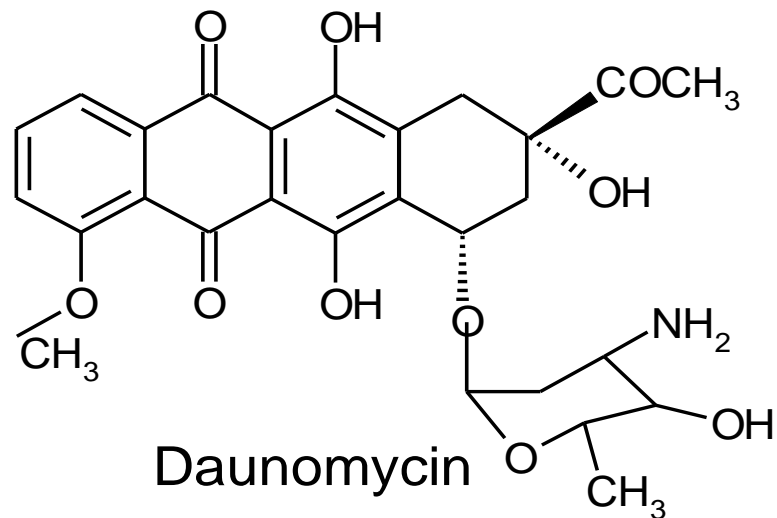
Proflavine



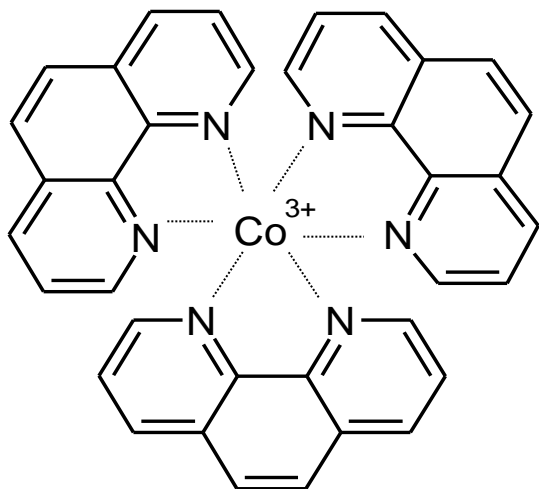
Ethidium bromid



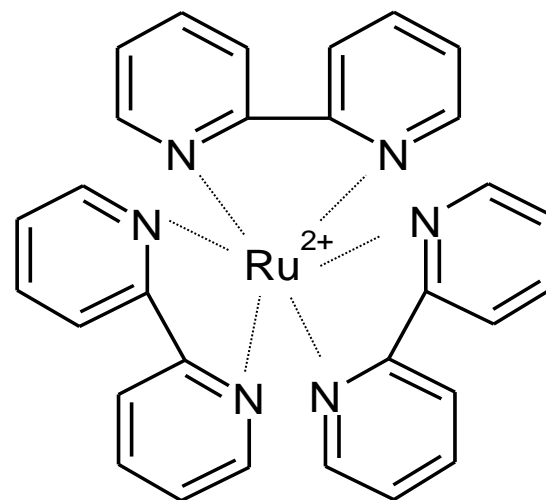
Methylene blue (MB)



Daunomycin



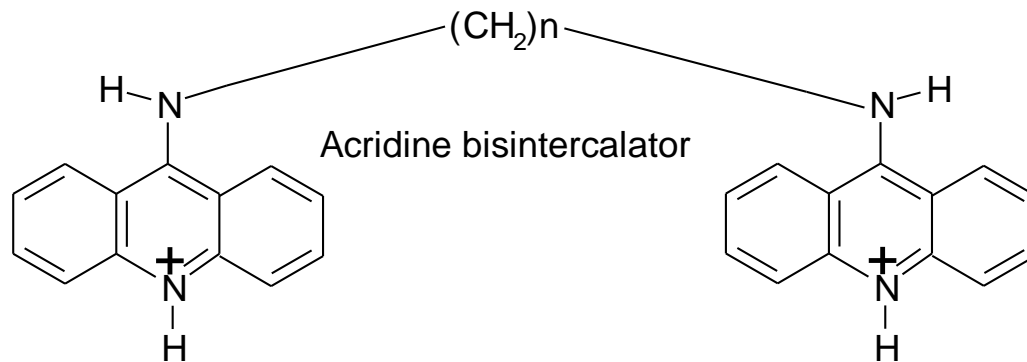
Co(phen)₃³⁺



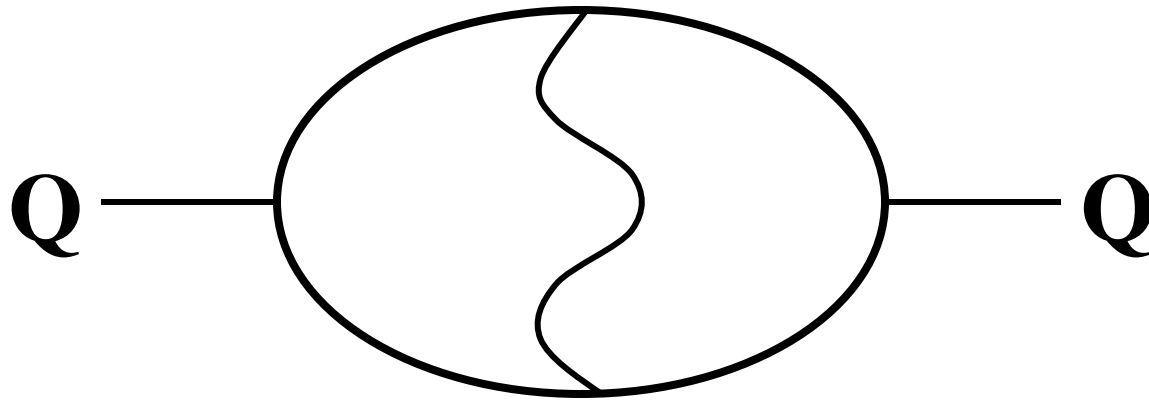
Ru(bipy)₃²⁺

C.1 BIS- INTERKALÁTORY

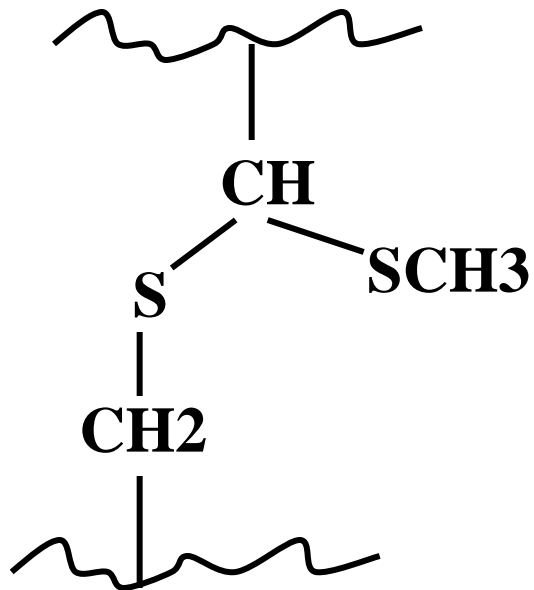
- dva planární aromatické struktury, které se vmezeřují mezi páry bází NK
- obecně jsou favorizovány G.C páry
- délka spojovacího linkeru určuje vzdálenost vazby
- přírodní bis-interkalátory – chinoxalinová protinádorová antibiotika



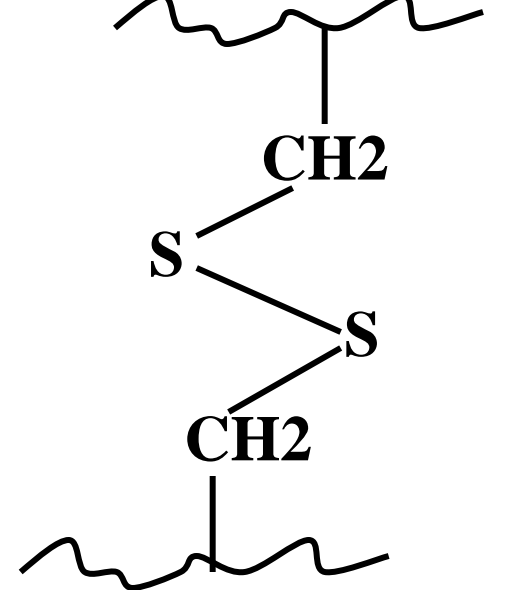
CHINOXALINOVÁ ANTIBIOTIKA



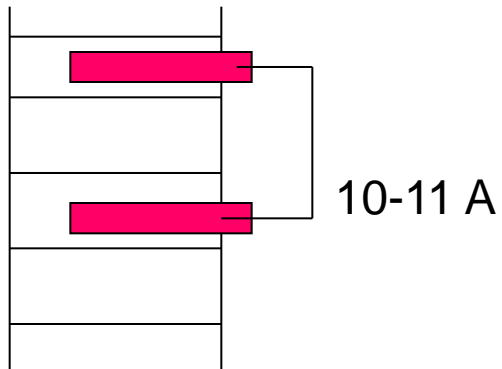
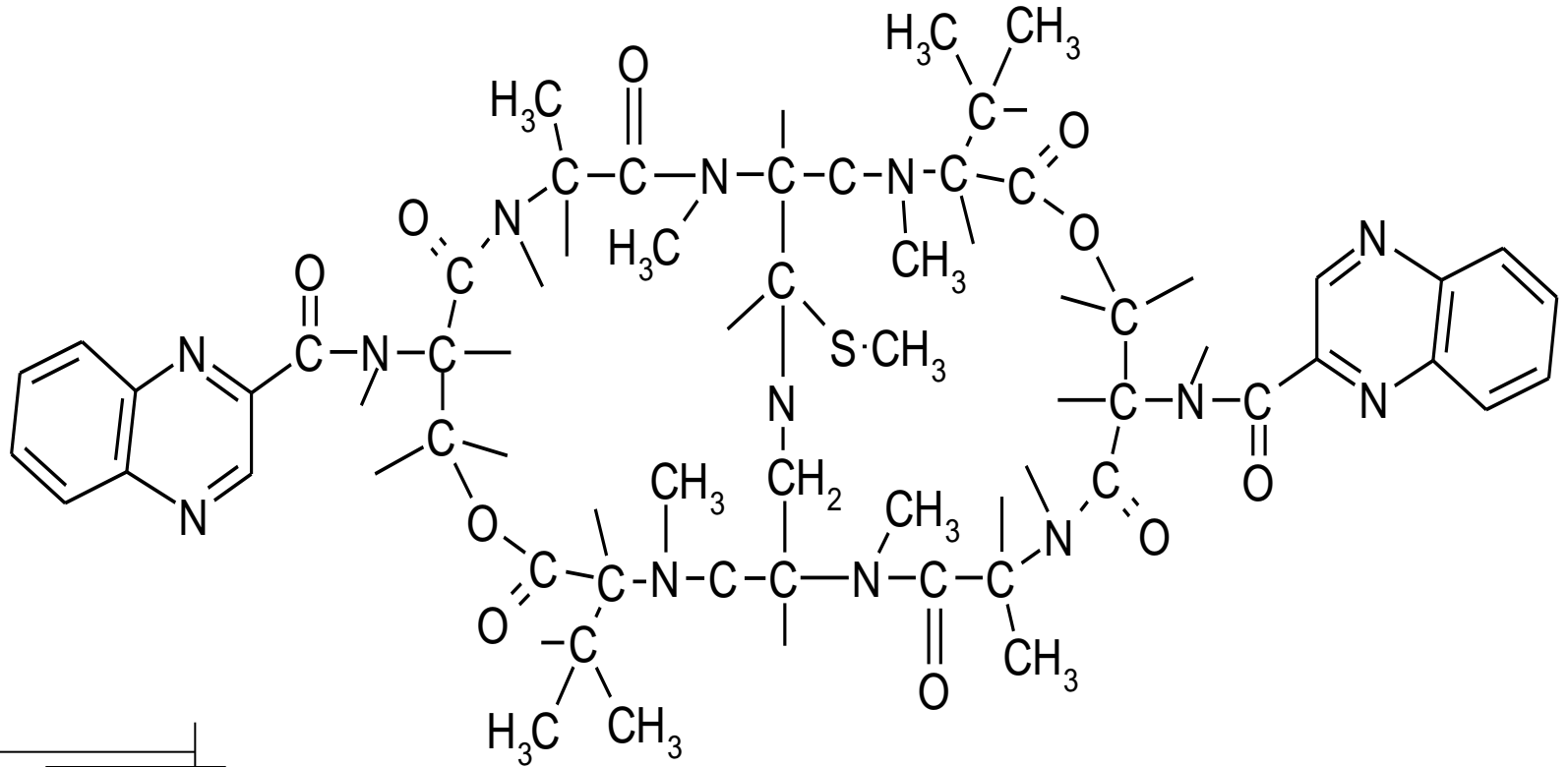
ECHINOMYCIN



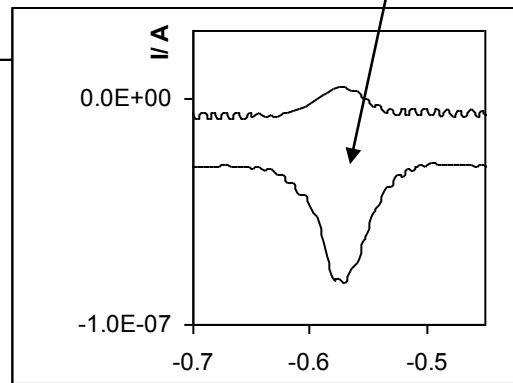
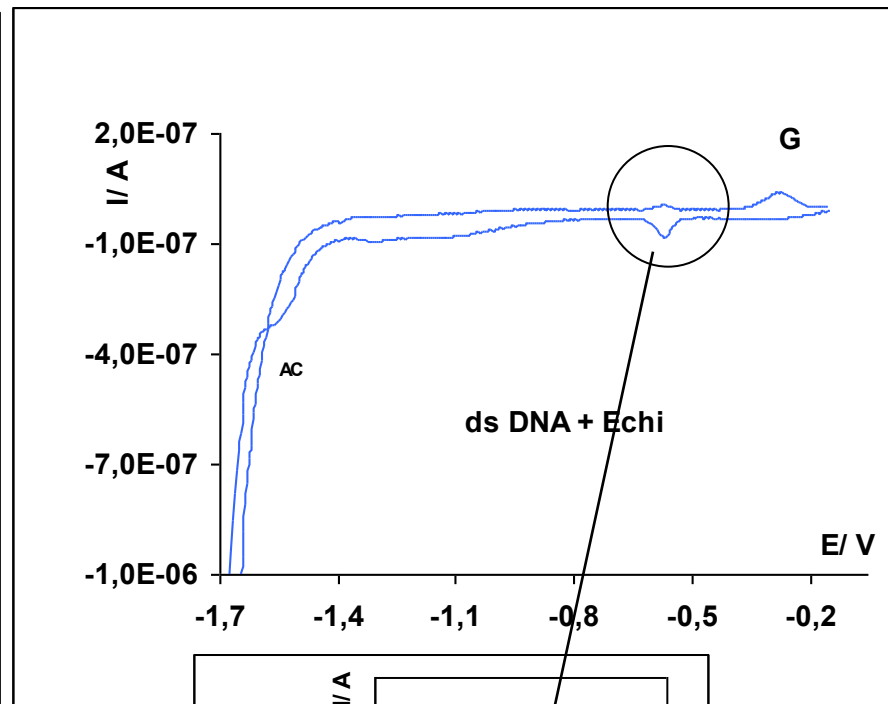
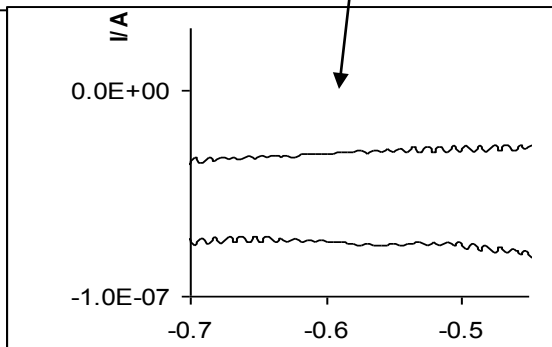
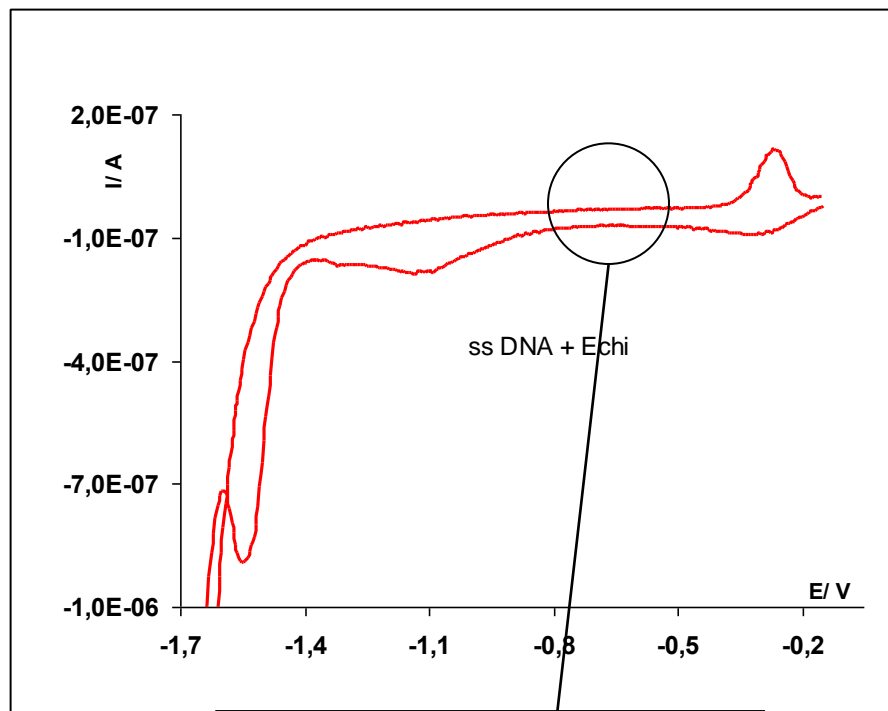
TRIOSTIN A

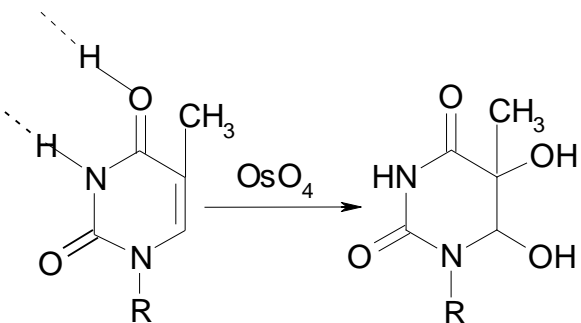


Echinomycin



ssDNA, dsDNA - echinomycin

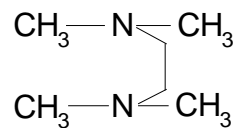




a

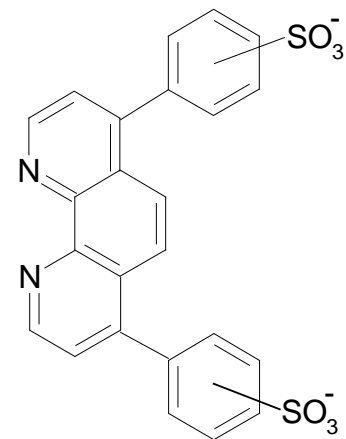
A

B



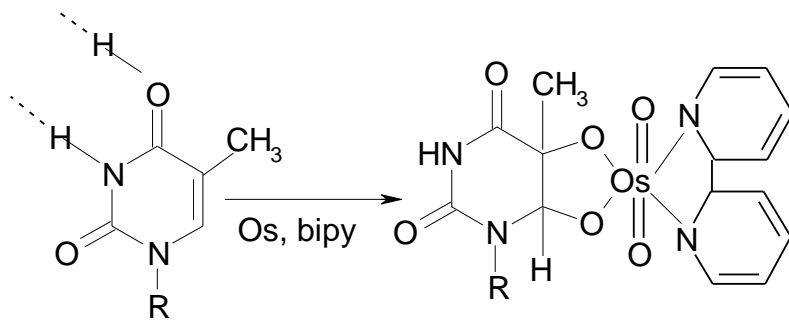
tetramethylethylenediamine
(temed)

1

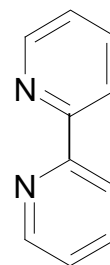


4

bathophenanthroline disulfonic acid
(bpdS)

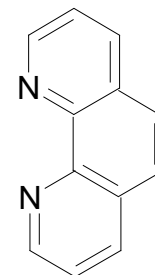


b



bipyridine

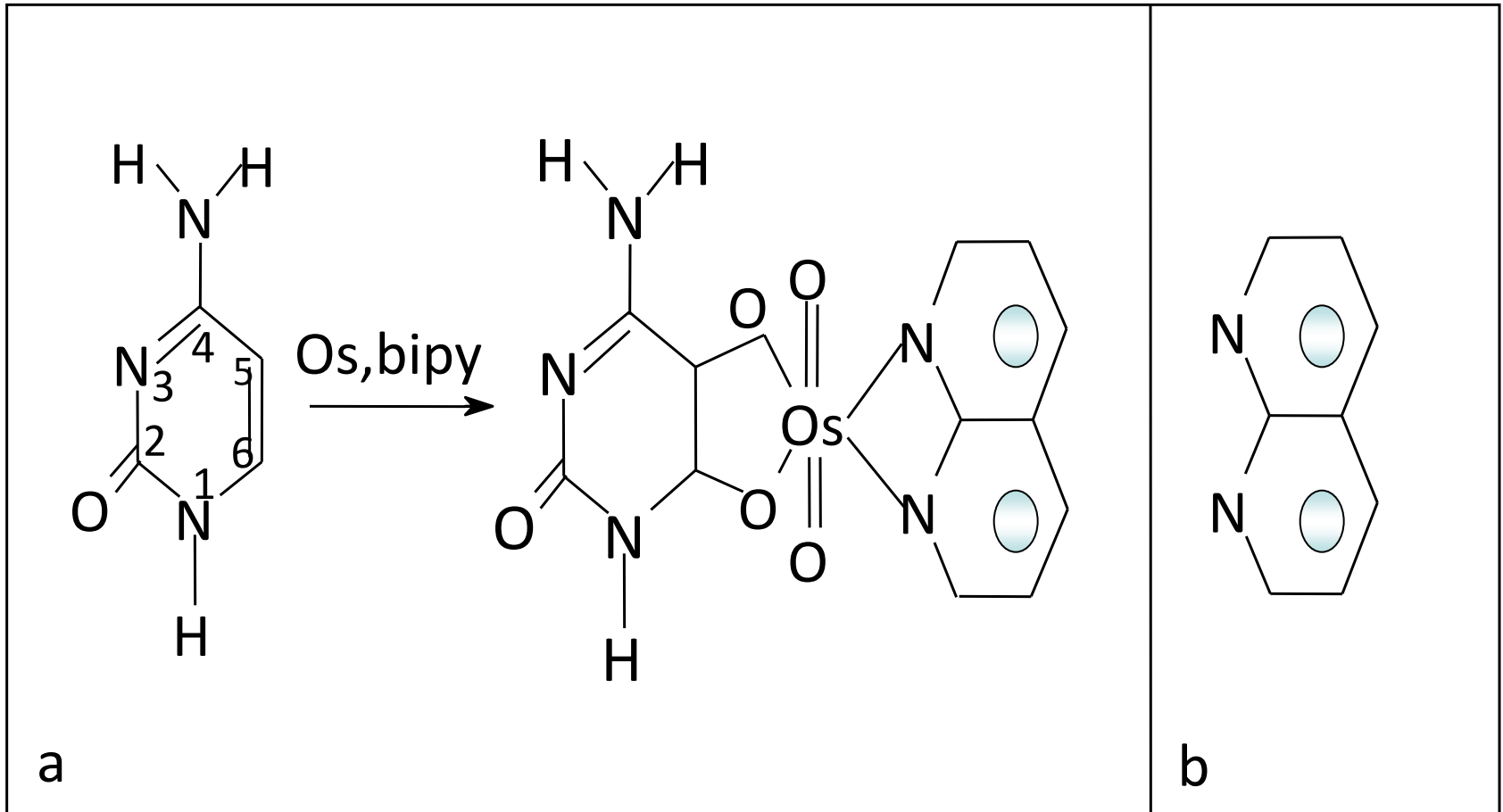
2



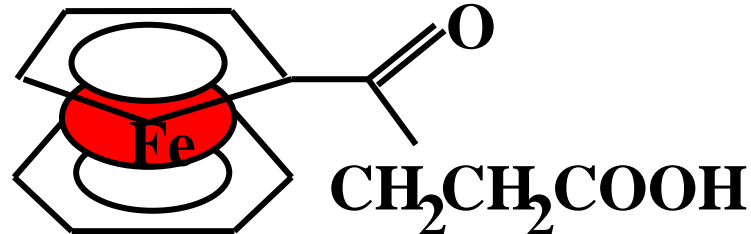
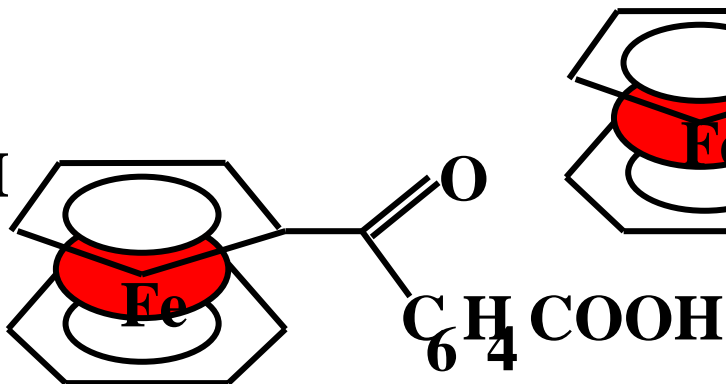
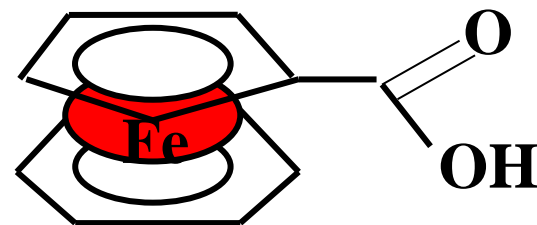
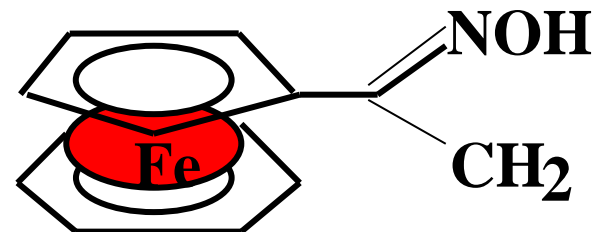
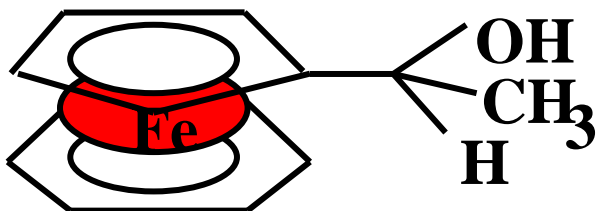
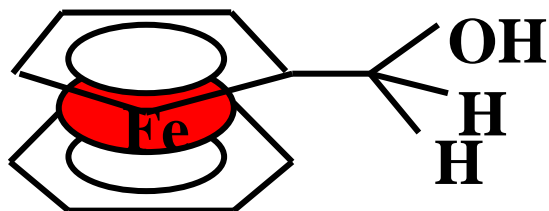
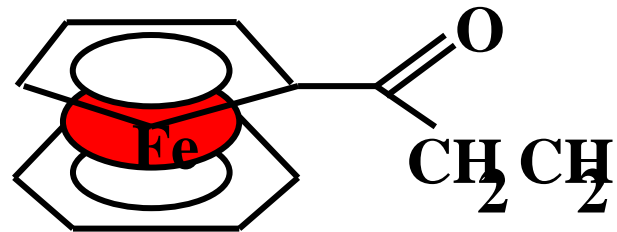
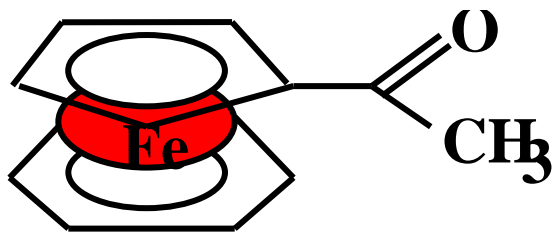
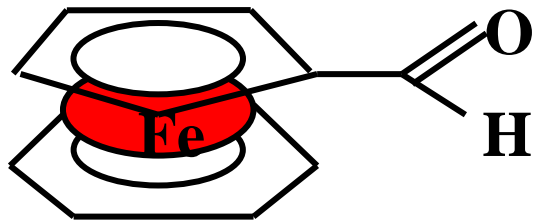
phenanthroline

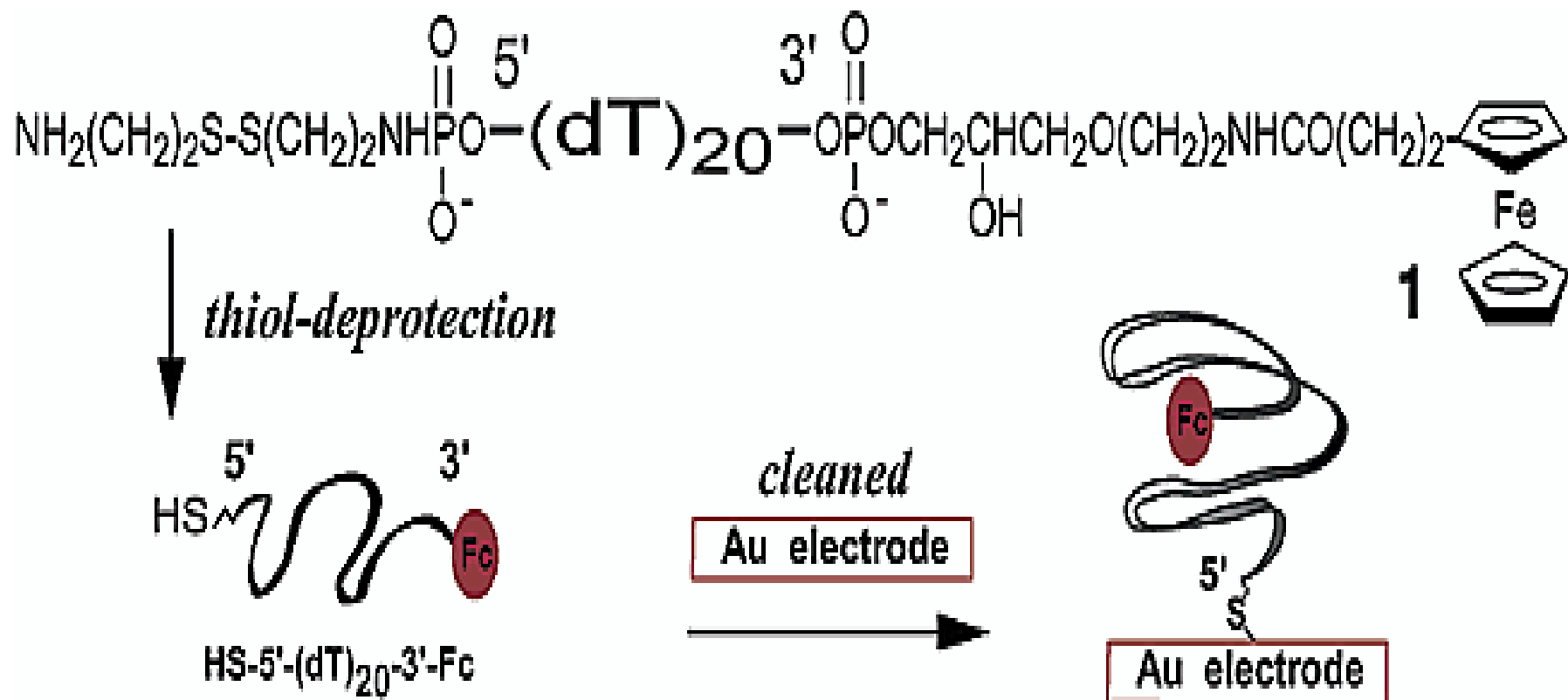
3

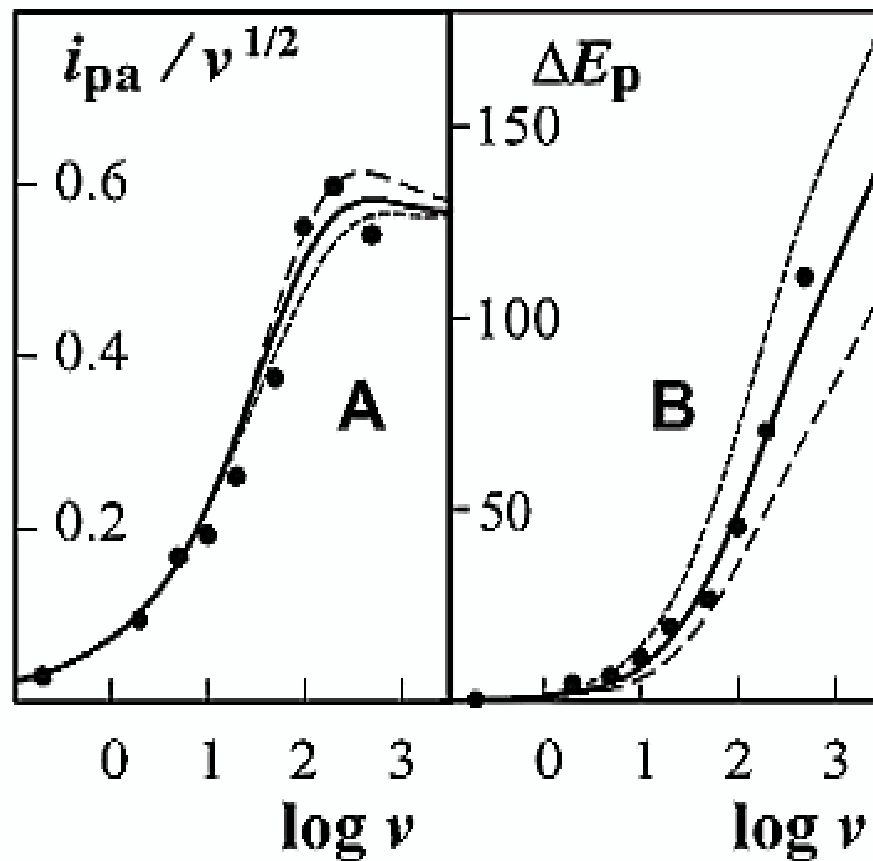
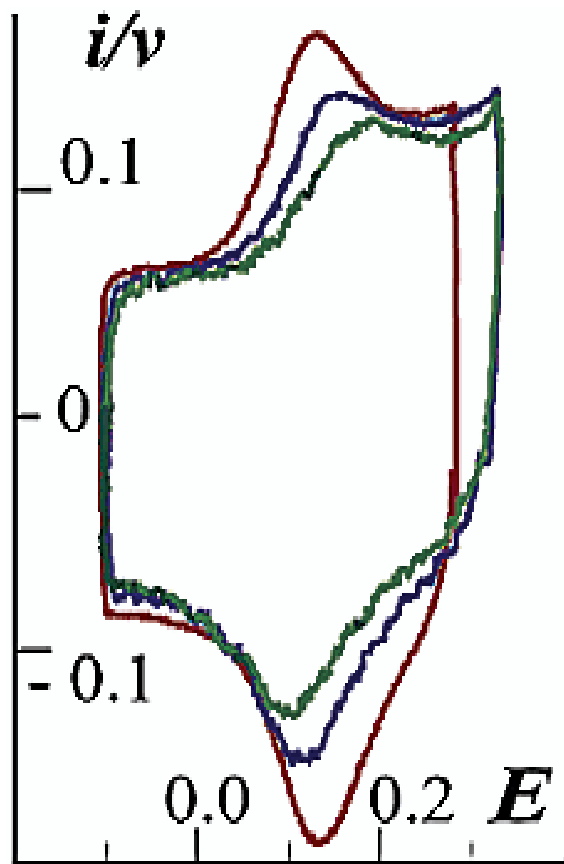
Osmium oxide-bipyridin adukt

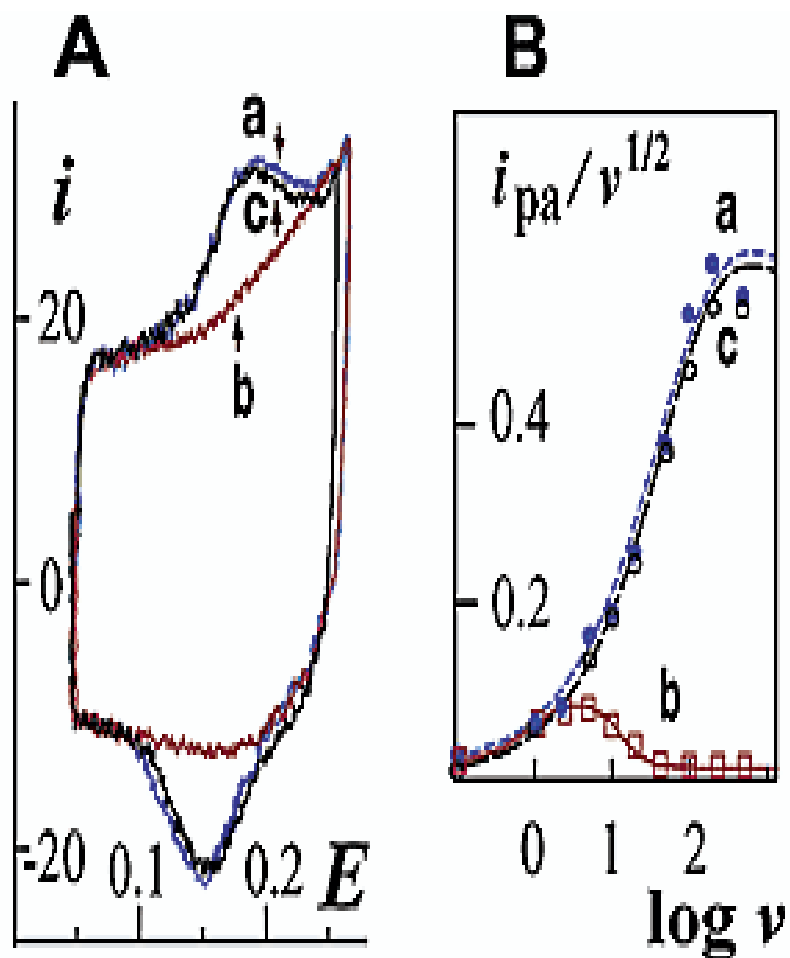
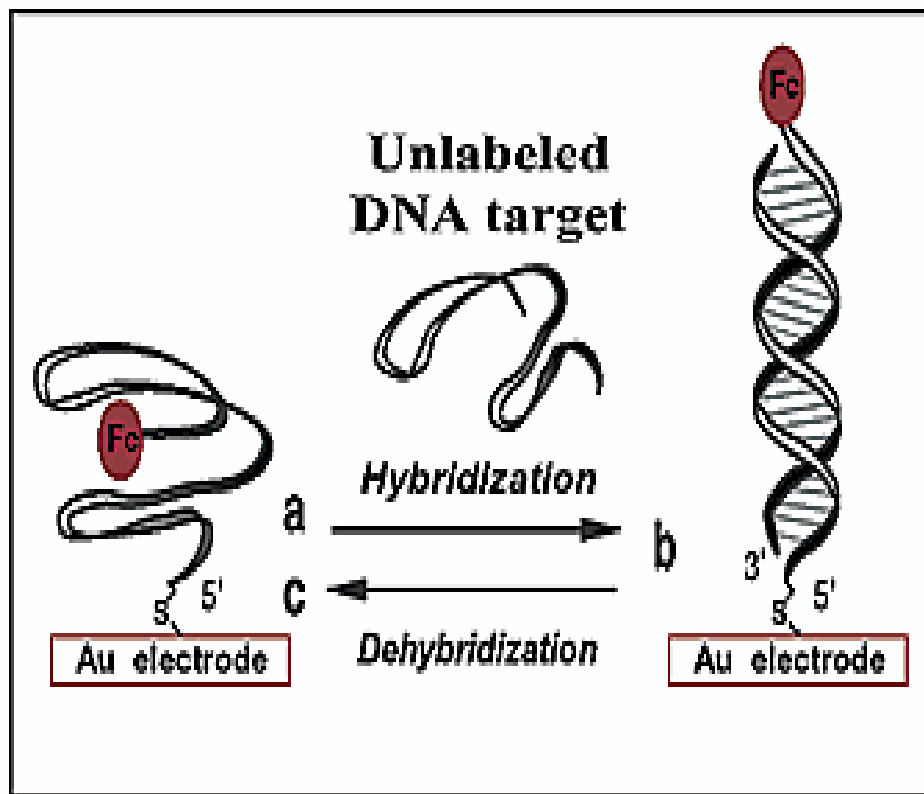


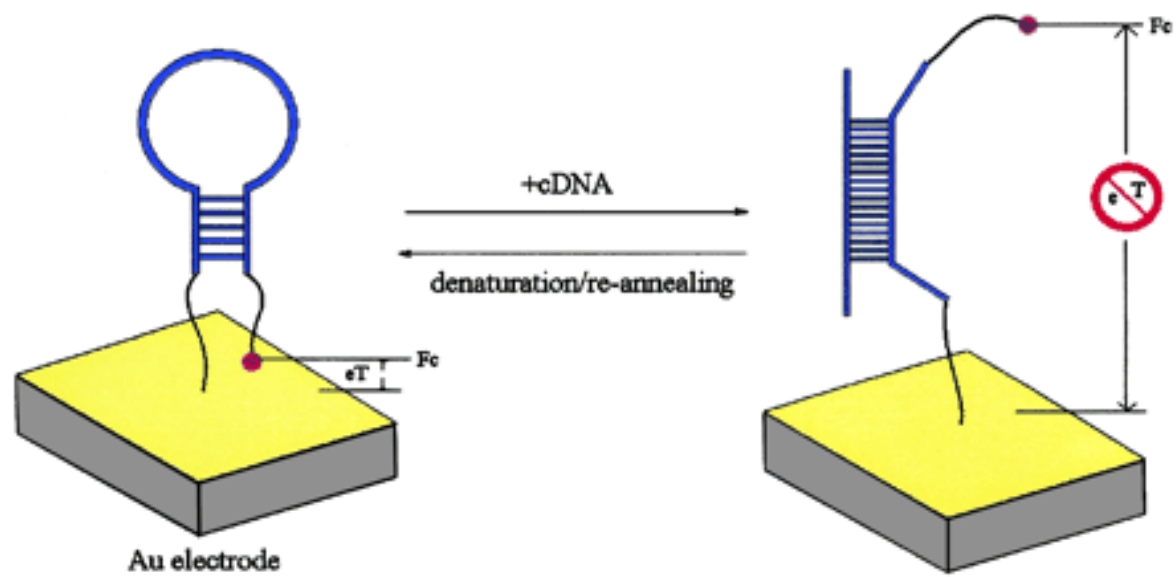
DERIVÁTY FEROCENU

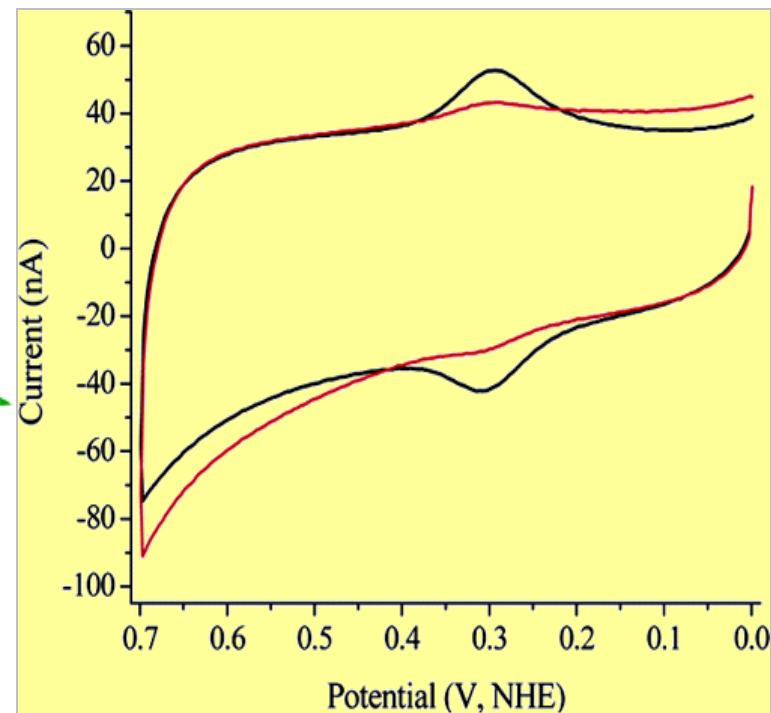
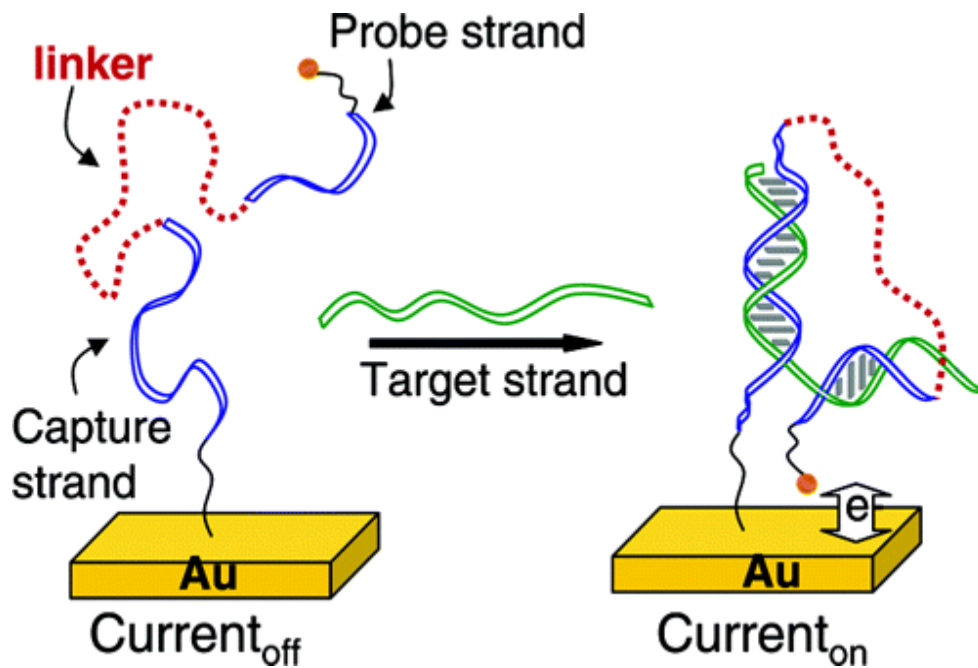






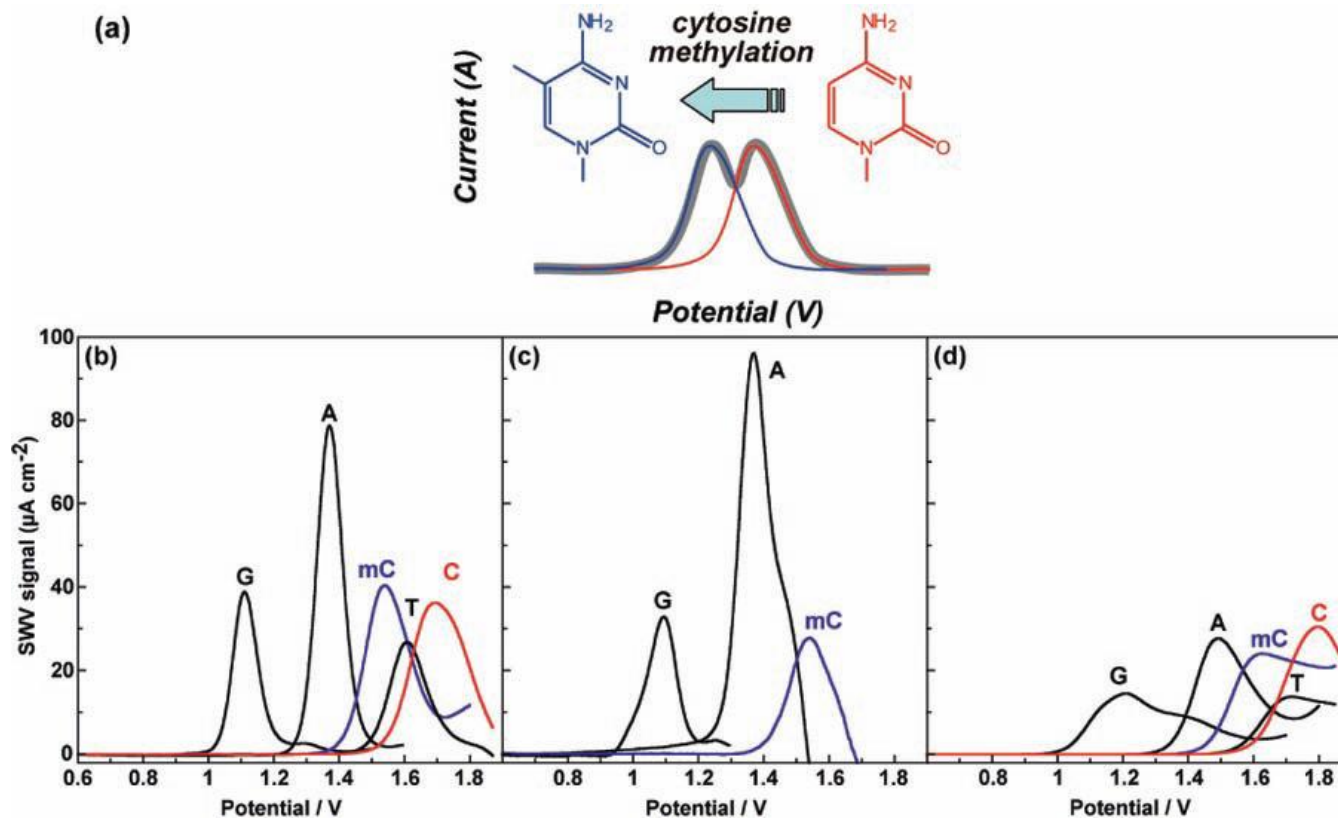






Scheme 1. Electrochemical Detection of Target Nucleic Acid Sequences
Using a DNA Wrap Assay as Opposed to a Conventional Sandwich Assay

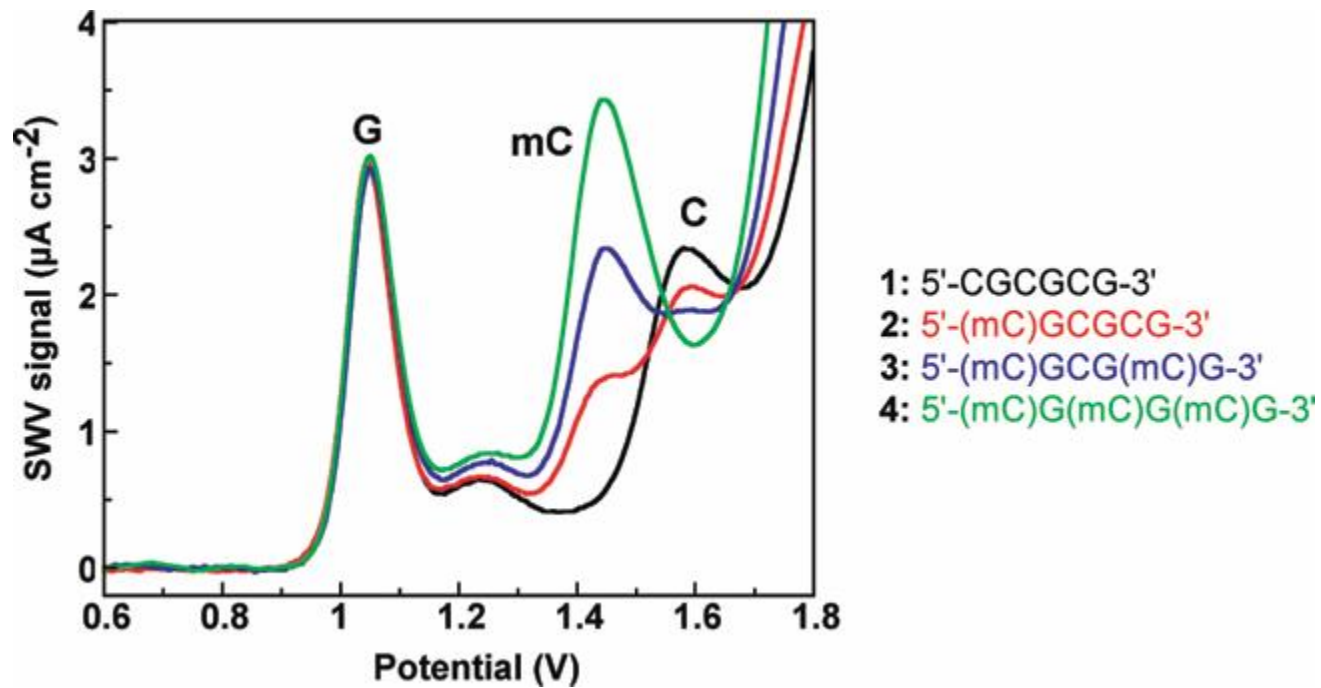
Figure 1 Cyclic voltammograms of 5'-Fc-DNA-PEG-DNA-SH-3' modified gold ball electrodes in the absence (red) and presence (black) of target DNA (200 nM). (Conditions: 100 mV/s, 25 mM phosphate buffer, 100 mM NaCl, pH 7.0).



A Nanocarbon Film Electrode as a Platform for Exploring DNA Methylation

Dai Kato,^{†,^} Naoyuki Sekioka,^{†,‡} Akio Ueda,^{†,§} Ryoji Kurita,[†] Shigeru Hirono,^{jj} Koji Suzuki,^{#,^} and Osamu Niwa*

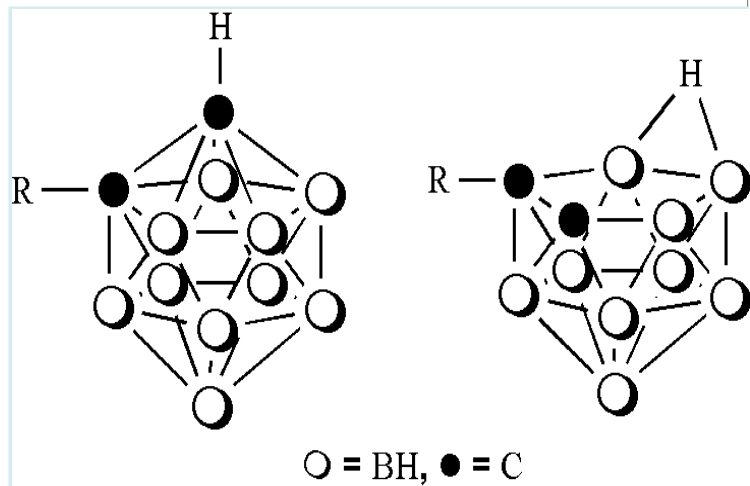
J. AM. CHEM. SOC. 9 VOL. 130, NO. 12, 2008 3717



A Nanocarbon Film Electrode as a Platform for Exploring DNA Methylation

Dai Kato,^{†,^} Naoyuki Sekioka,^{†,‡} Akio Ueda,^{†,§} Ryoji Kurita,[†] Shigeru Hirono,^{jj} Koji Suzuki,^{#,^} and Osamu Niwa*

J. AM. CHEM. SOC. 9 VOL. 130, NO. 12, 2008 3717



2'-O-(*o*-carboran-1-yl)methyloligonucleotides
2'-CBM-oligonucleotide).

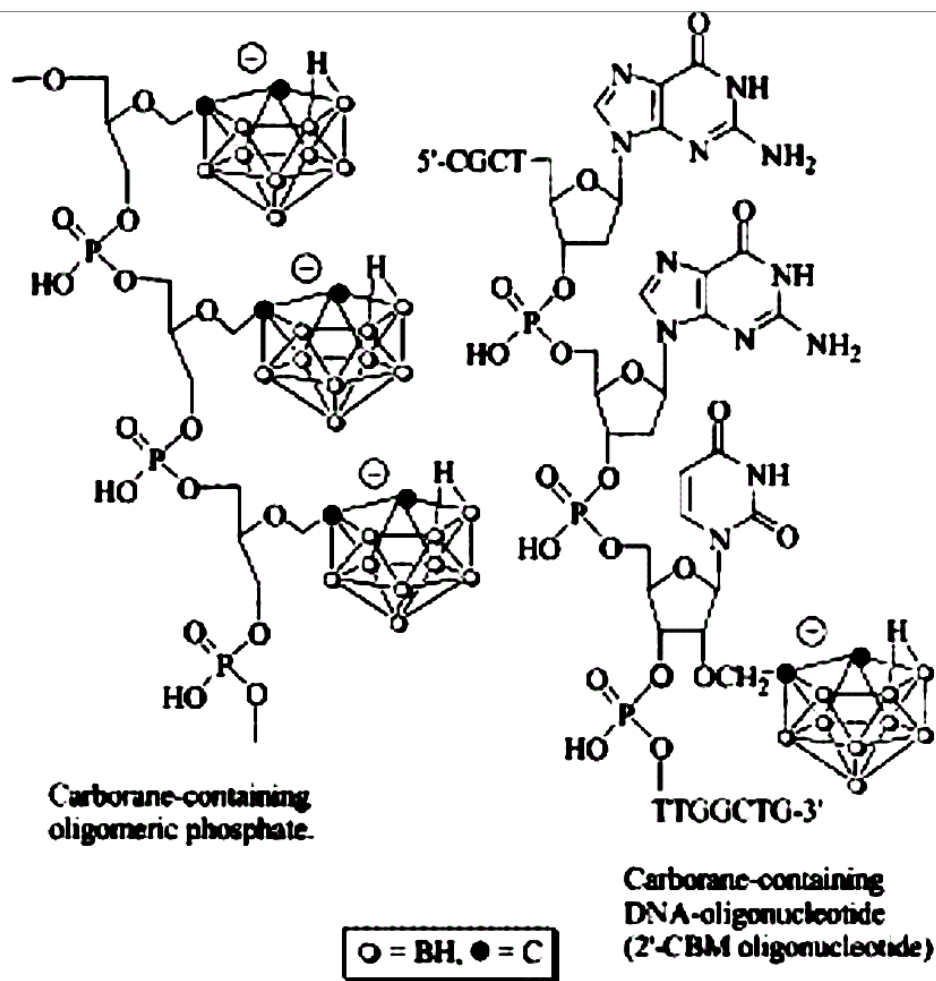
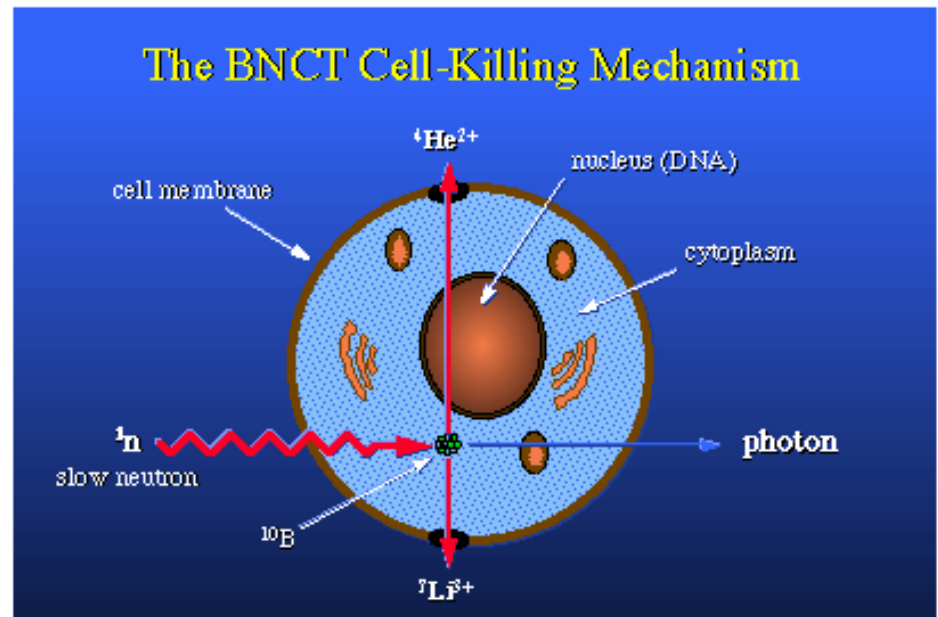
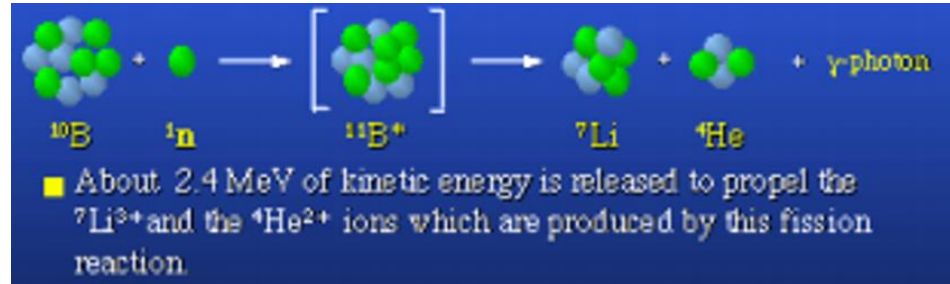
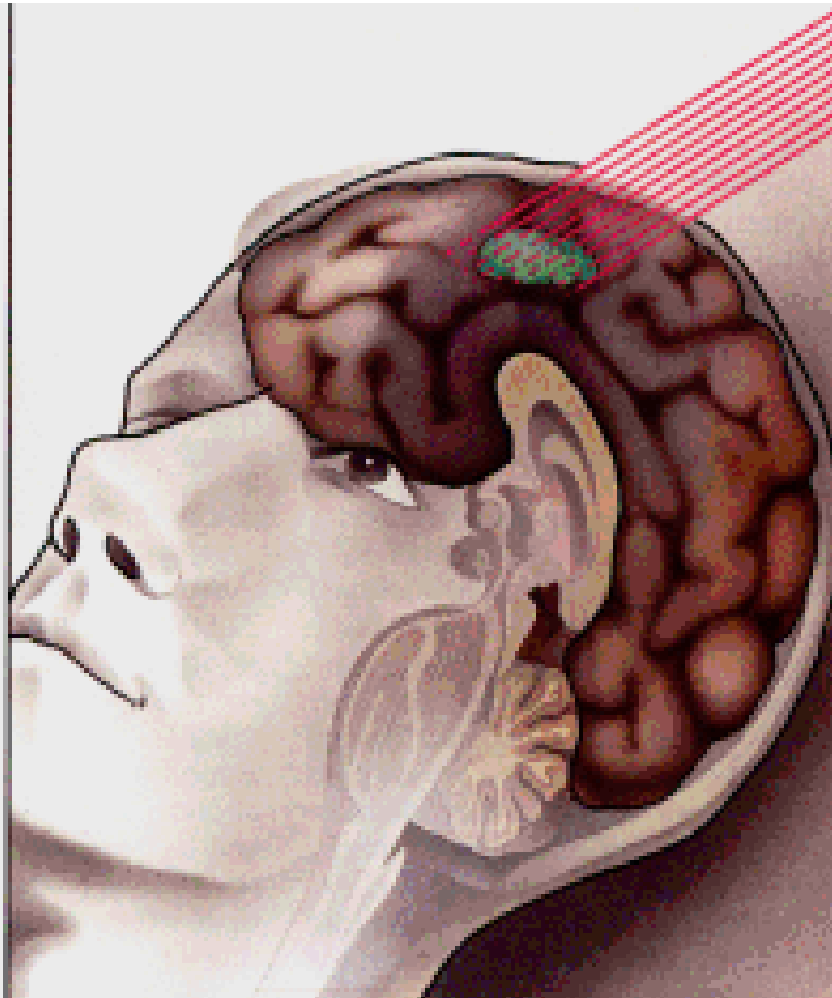


Figure 2. Example of oligomeric *nido*-carborane phosphate diester (refs.[28,29]) and oligonucleotide containing *nido*-carborane group (ref.[33])

BNCT nádorú

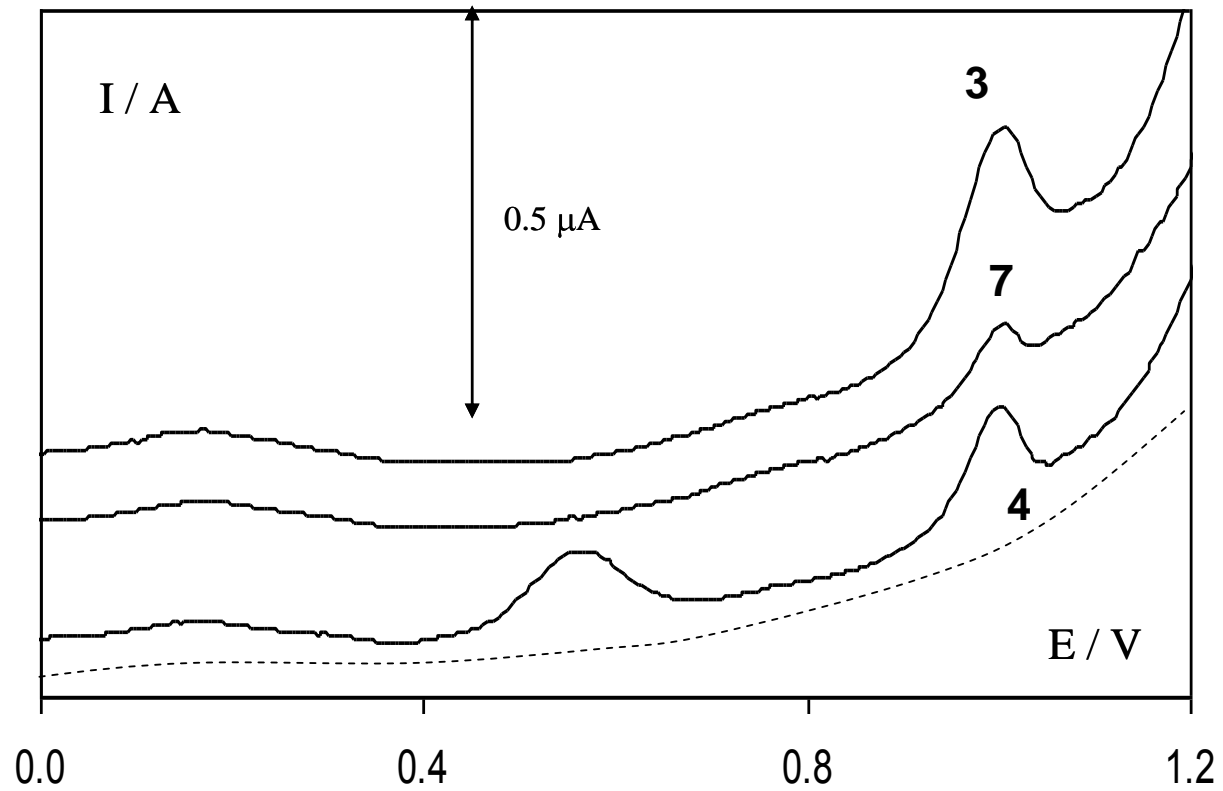


A *Number of bases*

<i>ODN</i>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
T	5'-(A) ₂₅	A	A	A	A	C	G	G	C	G	A	T	C	T	A	G	T	G	C	-3'
RP-3	5'-	G	C	A	C	T	A	G	A	T	C	G	C	C	G	T	T	T	T	-3'
RP-4	5'-	G	C	A	C	T	A	G	A	T	C	G	C	C	G	T	U-L1	U-L1	T	-3'
RP-5	5'-	G	C	A	C	T	A	C	T	C	G	C	C	G	T	U-L1	U-L1	T	-3'	2-MM
RP-6	5'-	C	C	G	C	G	G	A	C	A	T	C	G	T	G	C	U-L1	U-L1	T	-3'
RP-7	5'-	^{L2} -G	C	A	C	T	A	G	A	T	C	G	C	C	G	T	T	T	T	-3'

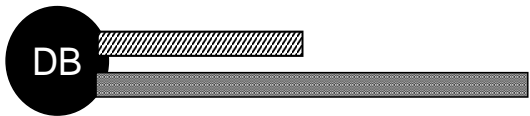
B *Number of bases*

<i>ODN</i>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
T1	5'-	G	C	A	C	T	A	C	T	T	C	G	C	C	G	T	U-L1	U-L1	T	-3'	
CP1	5'-biot	A	A	A	A	C	G	G	C	G	A	A	G	T	A	G	T	G	C	-3'	
CP2	5'-biot	A	A	A	A	C	G	G	C	G	T	A	G	T	A	G	T	G	C	-3'	1-MM
CP3	5'-biot	A	A	A	A	C	G	G	C	T	A	G	T	A	G	T	G	C	-3'	2-MM	

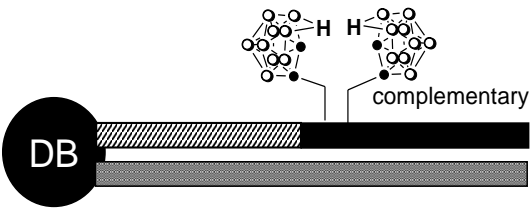




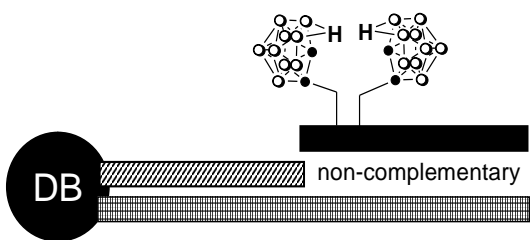
....TTTTTTTTTTT (CP)



....TTTTTTTTTTT
AAAAAAAAAAAAACGGCGATCTAGTGC (T)



....TTTTTTTTTTTUU TGCCGCTAGATCAG
AAAAAAAAAAAAACGGCGATCTAGTGC



TUUTGCCGCTAGATCAG (RP)
TTTTTTTTTTT
AAAAAAAAAAAAAGCACGATGTCCGCGG

B

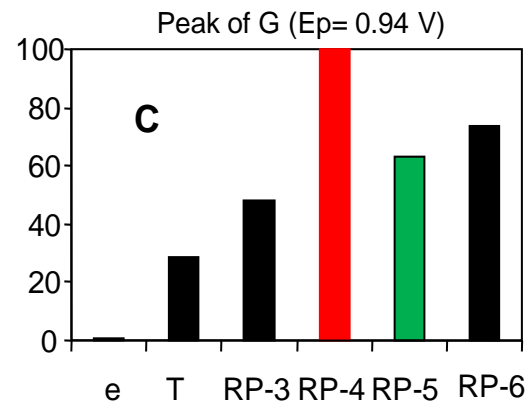
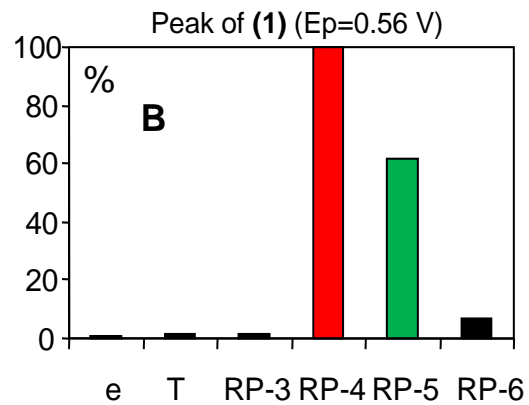
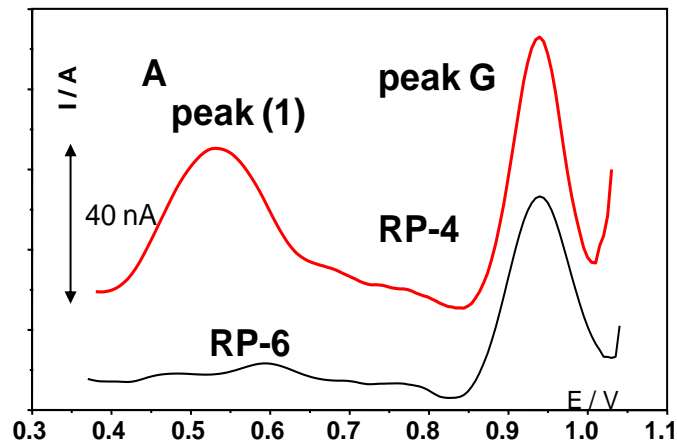


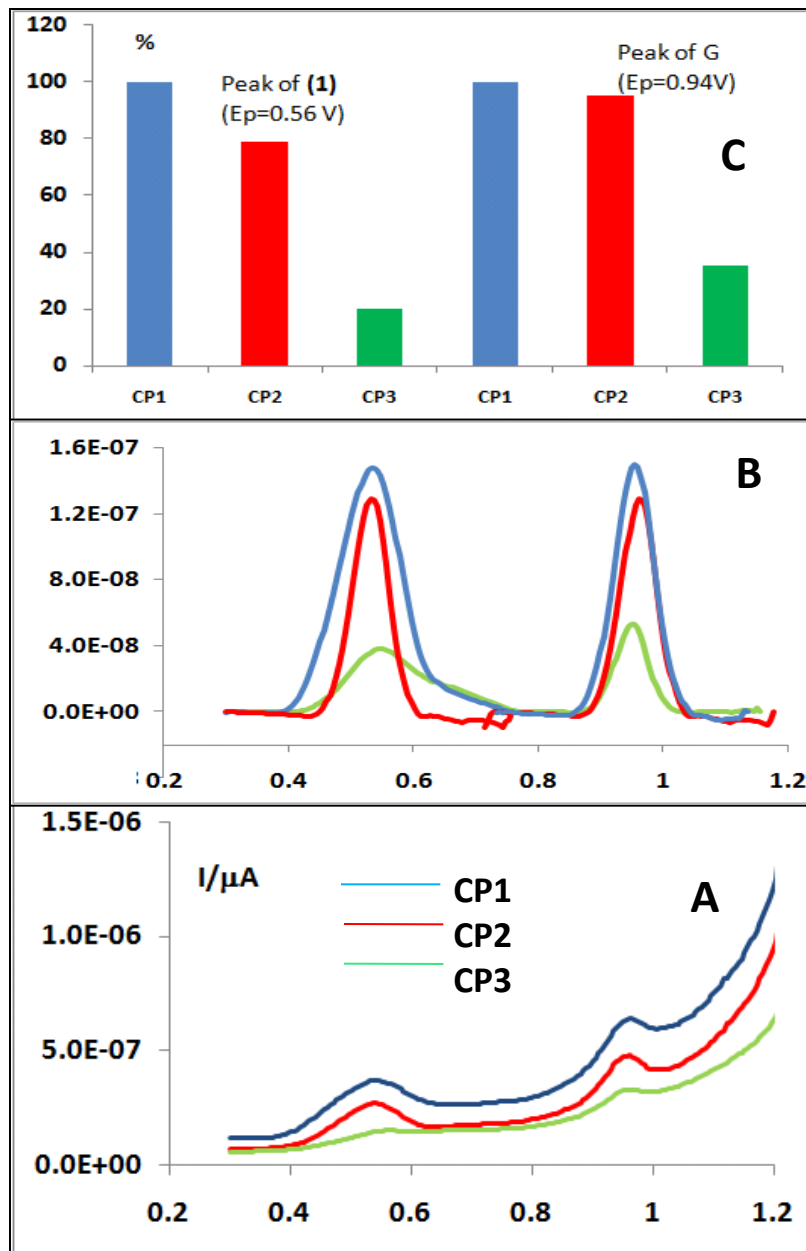
-biotin-AAAACGGCGAAGTAGTGC (CP1)

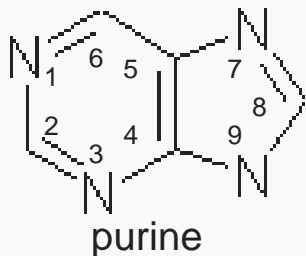


-biotin-AAAACGGCGAAGTAGTGC (CP1)
 TUUTGCCGCTTCATCAG (T1)





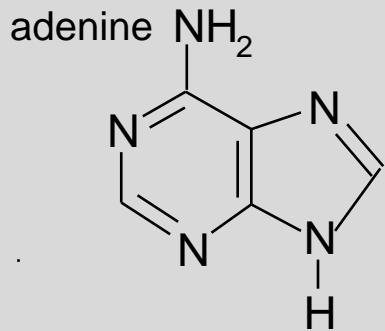




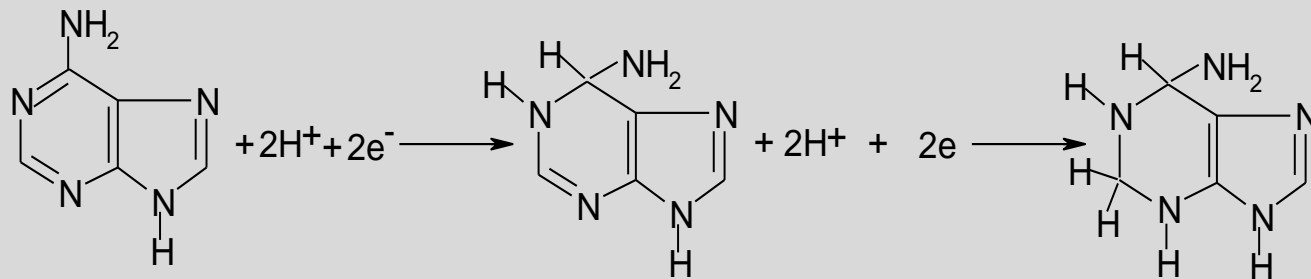
Elektrochemie purinových derivátů

- elektroanalytické vlastnosti (kvantitativní analýza)
- elektrochemické vlastnosti (redox mechanismy, adsorpce)
- druhy elektrod

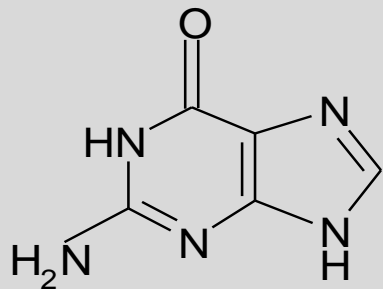
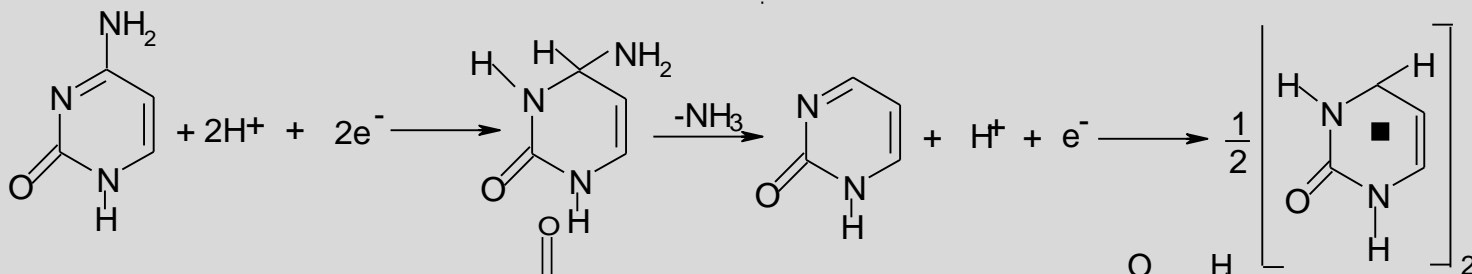
Elving, Dryhurst, Janík, Zuman, Paleček, Goyal, Czochralska, Nurnberg, Malfoy, Sequaris, Vetterl, Retter, Brabec, DeLevie Wang, Florence, Sawamoto, Brett, Trnková.....



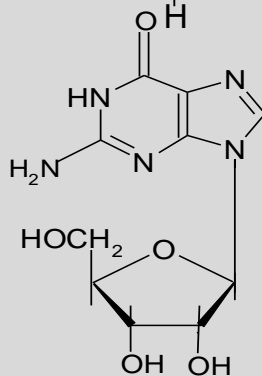
REDUKCE



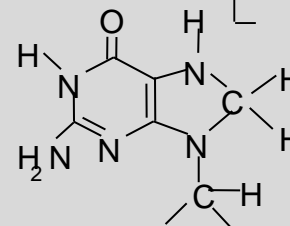
C-CYTOSIN



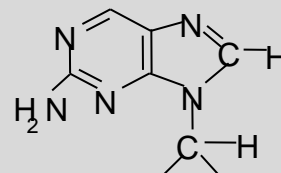
G-GUANINE



guanosine



7,8-dihydroguanine

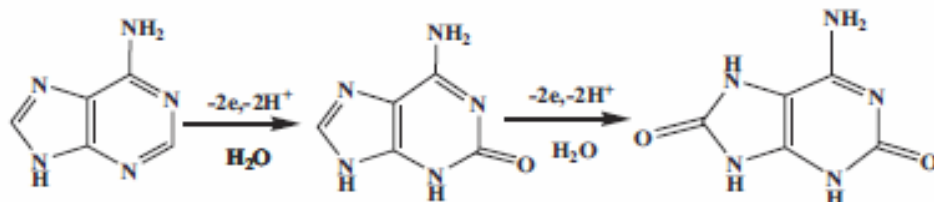


9-ribose-2-aminopurine

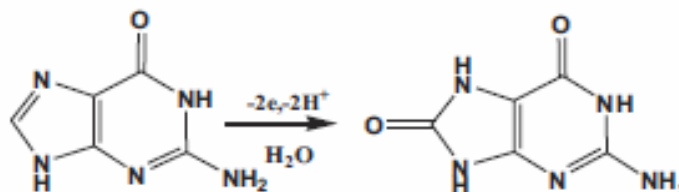
TABLE 3-2 Half-Wave Potentials for Purine DC Polarographic Reductions at DME in Aqueous Solutions

Name	Wave ^a	pH Range	$E_{1/2}$ (V versus SCE)	Reference
Purine	I	0 to ca. 11 ^b	-0.697 - 0.083 pH	71, 72
	II	0 to ca. 11	-0.902 - 0.080 pH	71, 72
Adenine	I	1-6	-0.975 - 0.090 pH	71
Hypoxanthine	I	5.7 ^c	-1.61	71
Guanine	NR ^d			
6-Methylpurine	I	1.0-3.9	-0.820 - 0.079 pH	73
		3.9-6.0	-0.745 - 0.091 pH	73
	II	2.5-6.0	-0.915 - 0.082 pH	73
		3.9-5.9	-0.765 - 0.162 pH	73
	III	6.0-7.4	-0.785 - 0.095 pH	73
6-Methoxypurine	I	2.5-4.2	-0.825 - 0.105 pH	73
		4.2-5.5	-0.535 - 0.174 pH	73
6-Methylaminopurine	I	1.0-6.5	-0.995 - 0.081 pH	73
6- <i>n</i> -Hexylaminopurine	I	1.0-2.5	-0.995 - 0.076 pH	73
		2.5-3.7	-1.105 - 0.047 pH	73
		3.7-6.5	-0.995 - 0.076 pH	73
6-Benzylaminopurine	I	2.0-4.8	-0.995 - 0.067 pH	73
		4.8-6.4	-0.805 - 0.106 pH	73
6-Phenylaminopurine	I	2.5-4.7	-0.915 - 0.072 pH	73
		4.7-7.9	-0.640 - 0.131 pH	73
6-Dimethylaminopurine	I	2.0-4.5	-1.025 - 0.068 pH	73
		4.5-6.4	-0.930 - 0.089 pH	73
		1.0-4.0	-0.990 - 0.072 pH	73
2-Oxyl-6-aminopurine (isoguanine)	I	4.6-7.2	-0.820 - 0.109 pH	73
		7.2-9.6	-1.210 - 0.055 pH	73
		8.5-9.1	-0.705 - 0.104 pH	73
6-Thiopurine (6-mercaptapurine)	I	0-5	-0.79 - 0.116 pH	84
		0-2.3	-1.00 - 0.048 pH	84
	III	5-8	-1.29 - 0.027 pH	84
	IV	9.1 ^e	-1.74	84
Purine-6-sulfinic acid	I	1-9.1	-0.37 - 0.094 pH	84
		8-12.3	-0.79 - 0.075 pH	84
		3.6-9	-0.99 - 0.080 pH	84
Purine-6-sulfonic acid	I	1-7	-0.45 - 0.078 pH	84
		3.6-12.5	-0.675 - 0.079 pH	84
	III	1-9	-0.98 - 0.064 pH	84
	IV	9.1 ^e	-1.45	84
Purine-2,6-disulfonic acid	I _a ^f	0-4.75	-0.53 - 0.103 pH	84
		0-3.5	-0.68 - 0.084 pH	84
	III	0-3.5	-0.82 - 0.077 pH	84
	IV _a	0-4.75	-1.01 - 0.062 pH	84
	I _b	6.8-12.75	-0.89 - 0.058 pH	84
	IV _b	6.8-10.7	-0.86 - 0.086 pH	84

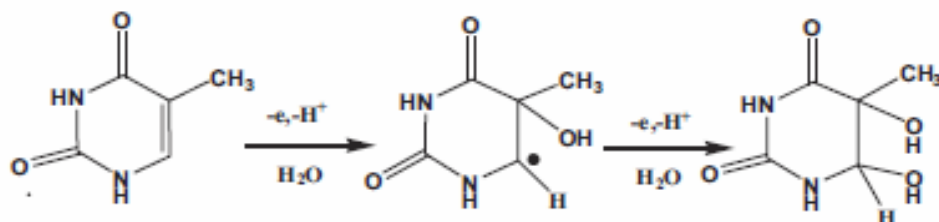
OXIDACE



A

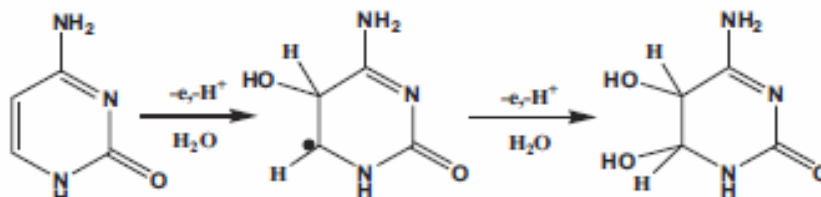


G



T

Thymine glycol



C

Cytosine glycol

TABLE 3-10 Linear E_p versus pH Relationships for Oxidation of Some Purines at the Stationary Pyrolytic Graphite Electrode^a

Compound	Peak	pH Range	E_p (V versus SCE)	Reference
Purine		0–14	NO ^b	116
Theobromine (3,7-dimethyl- xanthine)	I	2.3–5.5	1.67 – 0.064 pH	121, 170
Caffeine (1,3,7-trimethyl- xanthine)	I	2.3–5.5	1.59 – 0.042 pH	121, 170
Adenine	I	3.6–10	1.39 – 0.051 pH ^c	190
	I	0–12	1.338 – 0.063 pH ^d	192
Theophylline (1,3-dimethyl- xanthine)	I	4–9	1.35 – 0.069 pH ^e	121, 172
	II	2.3–8.5	1.45 – 0.056 pH	
1,7-Dimethyl- xanthine	I	0–12.5	1.31 – 0.059 pH	121
Hypoxanthine	I	0–5.7	1.27 – 0.067 pH ^f	116
3-Methylxanthine	I	5.5–12.5	1.20 – 0.056 pH ^e	121
	II	0–11.9	1.27 – 0.050 pH	
7-Methylxanthine	I	7–12.5	1.19 – 0.049 pH ^e	121
	II	0–12.5	1.22 – 0.042 pH	
Guanine	I	0–12.5	1.12 – 0.065 pH	207
Xanthine	I	0–12.5	1.07 – 0.060 pH	121
Isoguanine	I	2 M H ₂ SO ₄	1.05 ^{f,g}	116
1-Methylxanthine	I	0–12.5	1.05 – 0.049 pH	121
6-Thiopurine	I	2–8	0.51 – 0.047 pH ^e	
	II	0–12	0.81 – 0.052 pH	218
	III	2–10	1.88 – 0.136 pH	
2,6-Dithiopurine	I	1–8	0.61 – 0.057 pH ^e	226
	II	4.7–9	1.26 – 0.062 pH	
	III	4.7–12.5	1.86 – 0.100 pH	
Uric acid	I	2.3–5.7	0.59 – 0.073 pH ^{f,h}	116
	I	0–12	0.76 – 0.069 pH	119
2-Thiopurine	I	0–9	0.36 – 0.049 pH	225
	II	4–13	1.83 – 0.082 pH	

^a Except where otherwise stated the scan rate was 3.3 mV sec⁻¹.

^b Not oxidized.

^c Scan rate, 60 mV sec⁻¹.

^d Scan rate, 5 mV sec⁻¹.

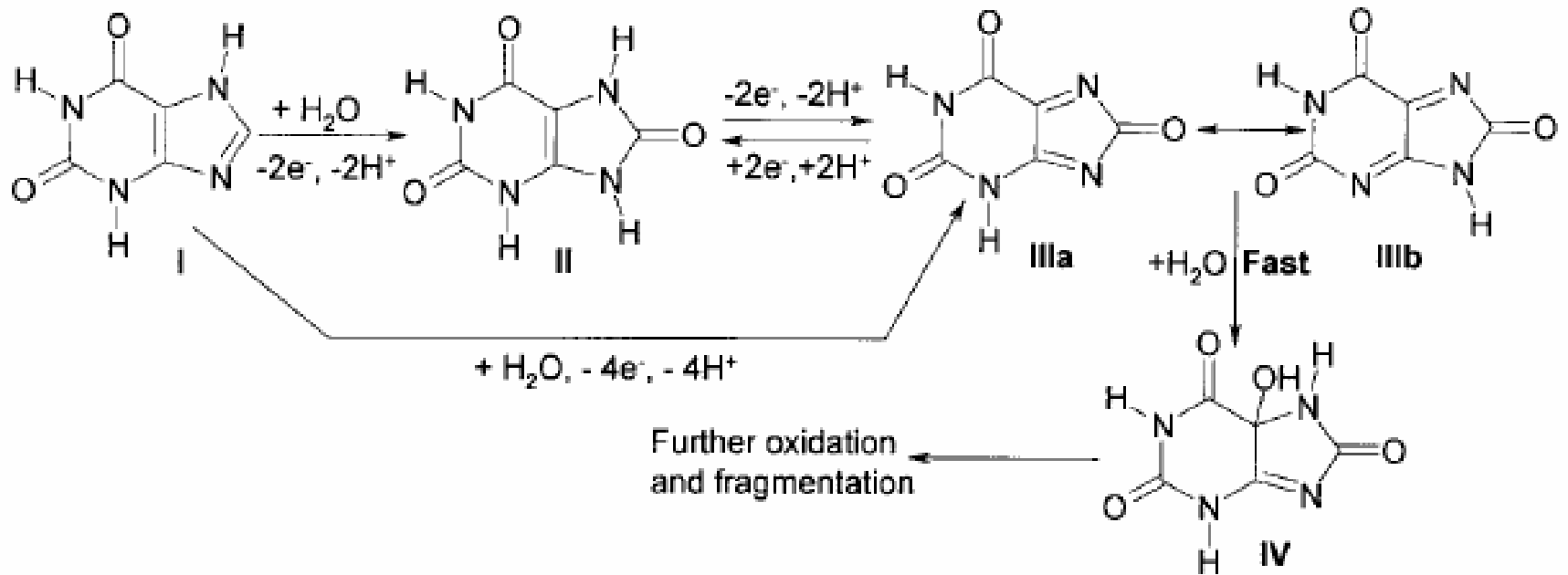
^e Adsorption peak.

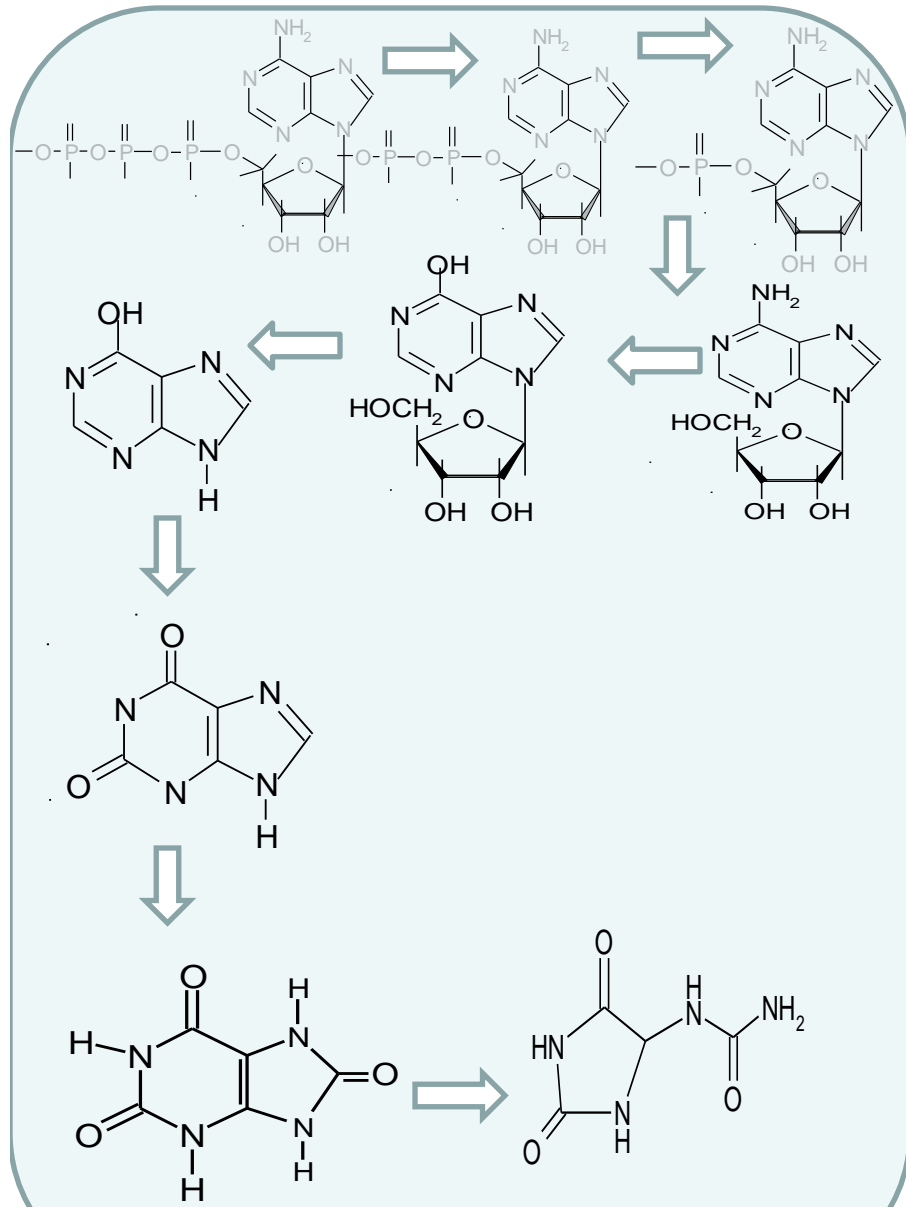
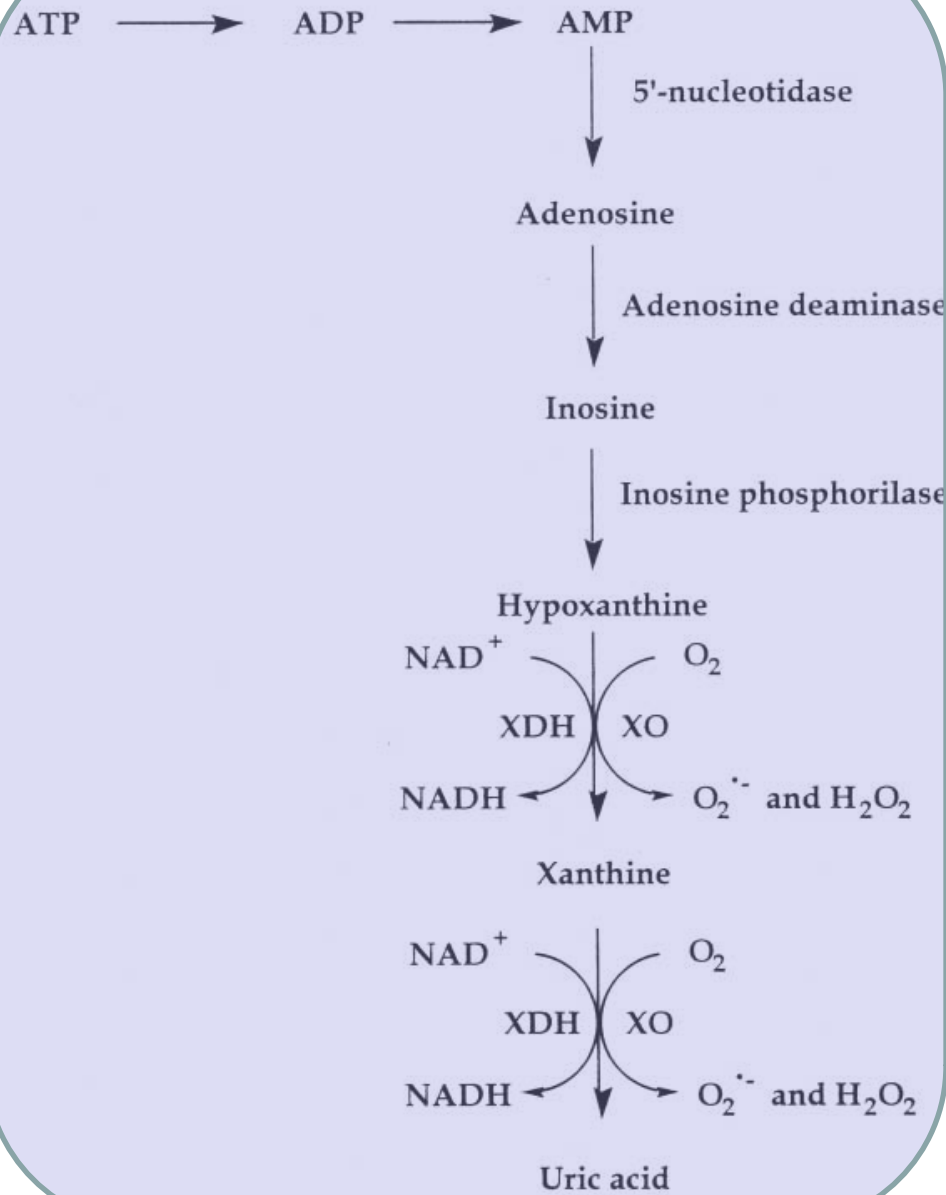
^f Equation for the half-peak potential, $E_{p/2}$, at wax-impregnated spectroscopic graphite electrode.

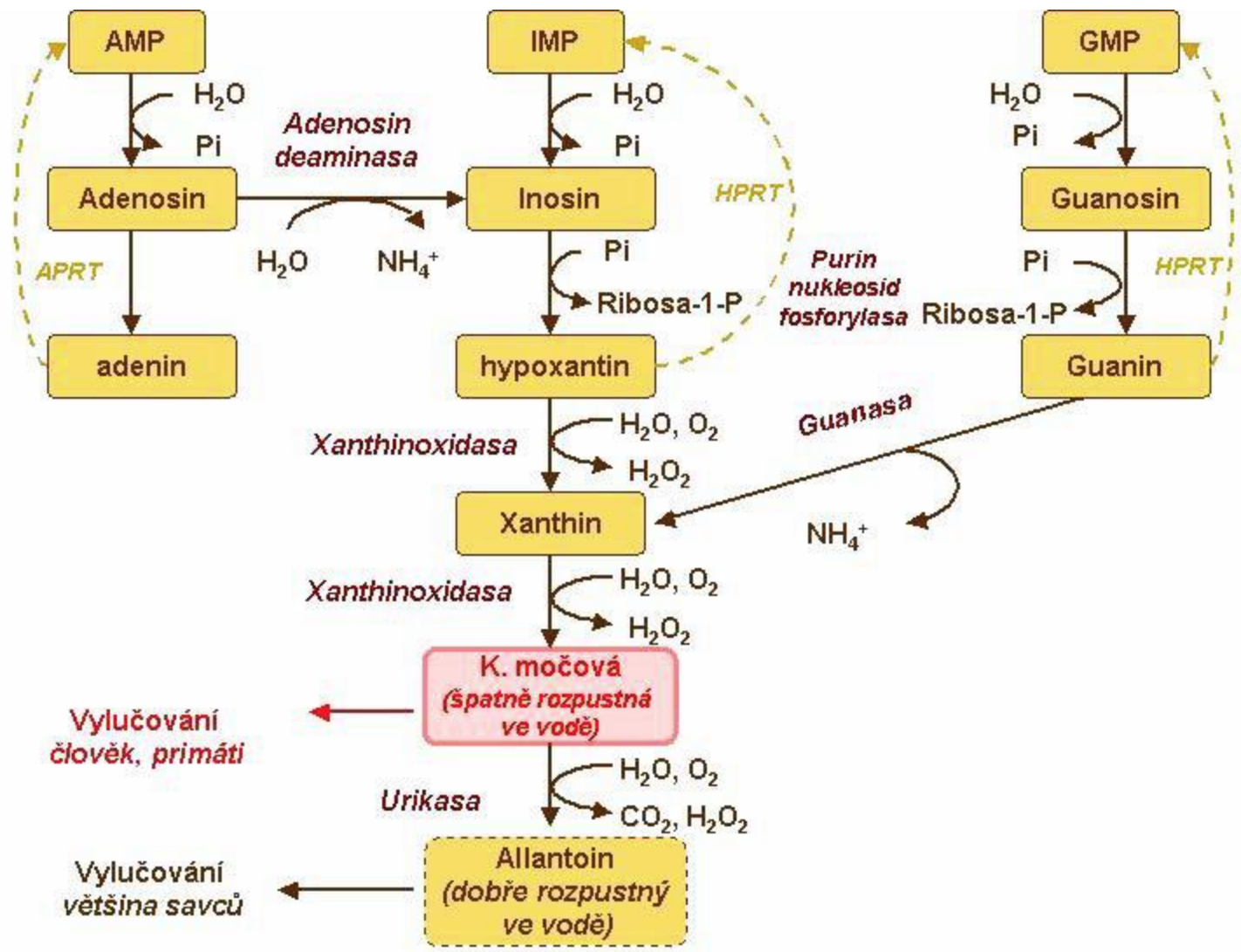
^g Only one data point available.

^h Equation based on three data points.

Xanthine oxidation





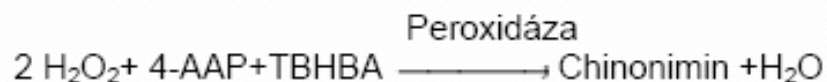


Deficit hypoxanthin-fosforibosyltransferázy (HPRT), částečný = Kelley-Seegmillerův syndrom, kompletní = Lesch-Nyhanův syndrom
Deficit adeninfosforibosyltransferázy (APRT), 2,8 - dihydroxyadeninová litiáza
Deficit xanthinoxidázy (XOD), dědičná xanthinurie
Deficit adenosindeaminázy (ADA)
Zvýšená aktivita adenosindeaminázy (ADA)
Deficit purinnukleosidfosforylázy (PNP)
Deficit myoadenyládeaminázy (M-AMPDA)
Deficit adenylosukcinátlyázy (ASase)
Deficit molybdenového kofaktoru – deficit sulfioxidázy SO, xanthinoxidázy XOD
Familiární juvenilní hyperurikemická nefropatie (FJHN)
Zvýšená aktivita fosforibosyldifosfátsynthetázy (PRPPs)
Primární dna
Dědičná renální hypourikémie
Deficit inosintrifosfát pyrofosfohydrolázy (ITP)

Kyselina močová je hlavním produktem katabolismu purinových nukleosidů, adenosinu a guanosinu. Puriny z katabolismu nukleových kyselin přijímaných potravou jsou přímopřeměňovány na kyselinu močovou. Denní syntéza kyseliny močové je asi 400 mg, zdroje z potravy přispívají dalšími 300 mg. Nadměrná produkce kyseliny močové může mít za následek zvýšenou syntézu prekurzorů purinu. Asi 75 % vylučované kyseliny močové odchází močí. Většina zbývajících množství je vylučována do zažívací soustavy, kde se působením bakteriálních enzymů rozkládá na allantoin a další sloučeniny. Prevalence hyperurikémie je vysoká, zvláště v západní Evropě a Severní Americe. Životní styl má vliv na míru hyperurikémie; určujícím faktorem jsou především stravovací návyky, pravidelná konzumace alkoholu, nedostatečná tělesná aktivita a užívané léky. Hyperurikémie se dělí na dva typy - primární a sekundární: nadměrná produkce kyseliny močové a snížené vylučování kyseliny močové ledvinami. Hyperurikémie má následující komplikace: akutní záchvat dny, chronickou dnu postihující měkké tkáně a onemocnění ledvin. Ke dně dochází při precipitaci urátu sodného z přesycených tělesných tekutin.

PRINCIP POSTUPU

Kyselina močová je oxidována na allantoin enzymem urikázou za vzniku H₂O₂. Peroxid reaguje se 4-aminoantipyrinem (4-AAP) a kyselinou 2,4,5-tribrom-3-hydroxybenzoovou (TBHBA) za přítomnosti peroxidázy a vytváří chinoniminové barvivo. Výsledná změna absorbance při 510 nm (500 - 550 nm) je přímo úměrná koncentraci kyseliny močové ve vzorku. (3, 4).

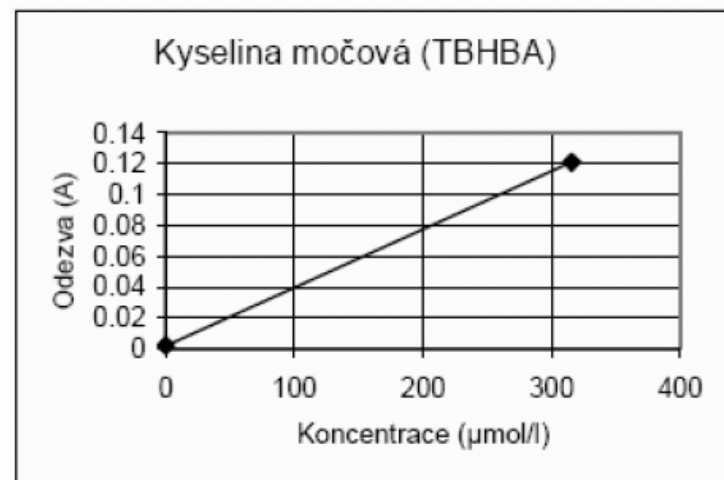


PŘEDPOKLÁDANÉ HODNOTY (1)

Sérum, dospělí:

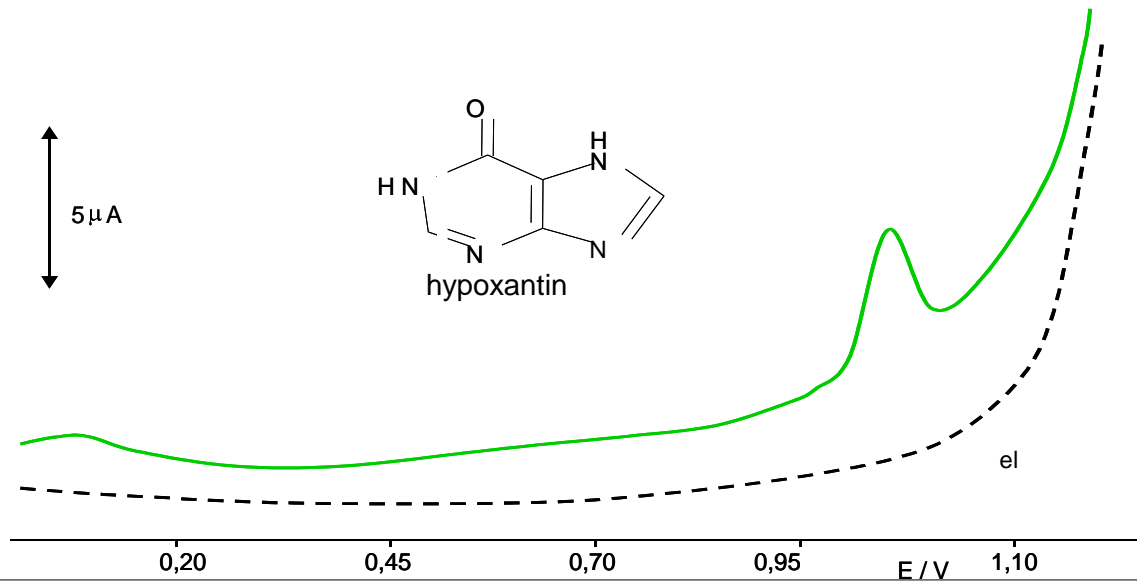
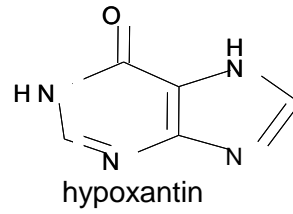
Muži: 210 – 420 μmol/l (3.5 – 7.2 mg/dl)

Ženy: 150 – 350 μmol/l (2.6 – 6.0 mg/dl)



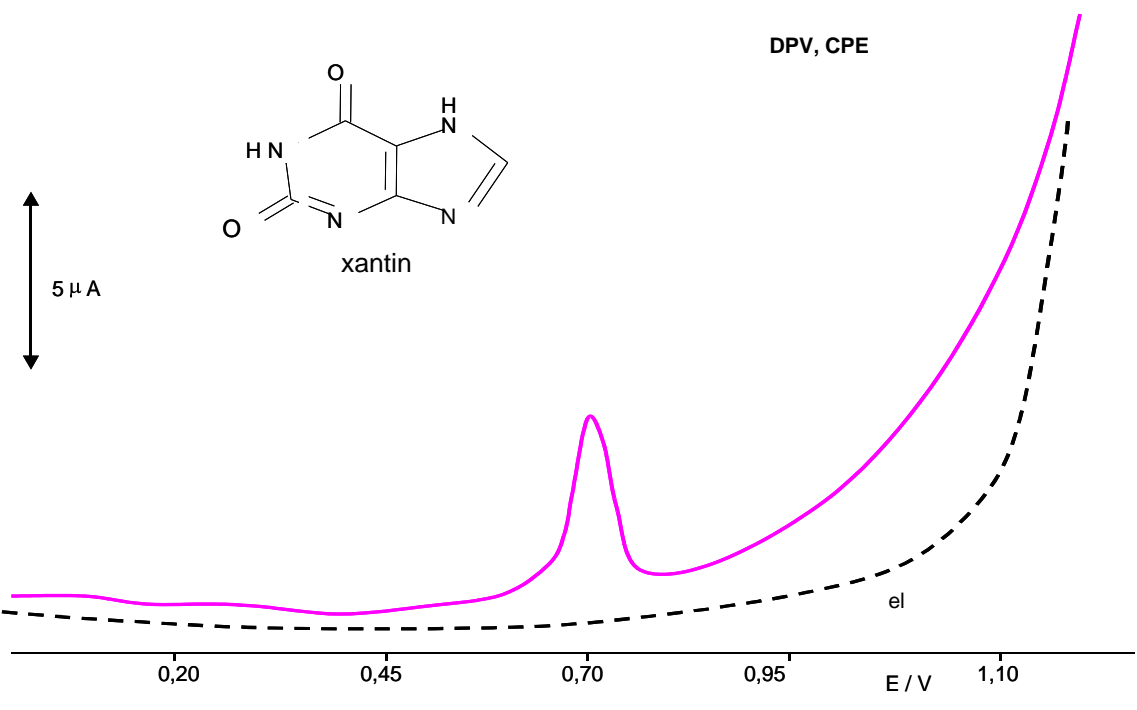
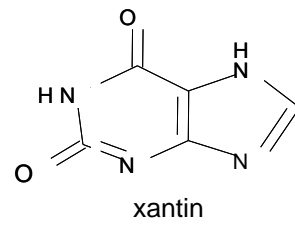
DPV, CPE

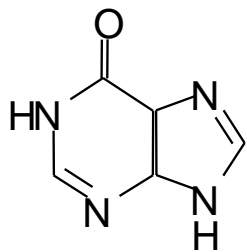
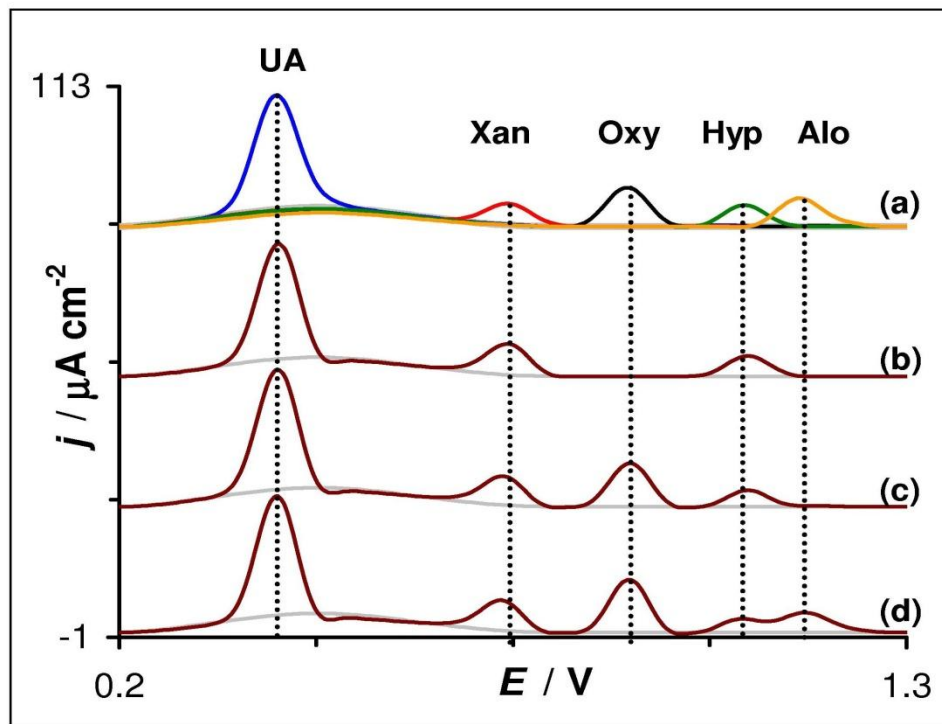
5 μ A



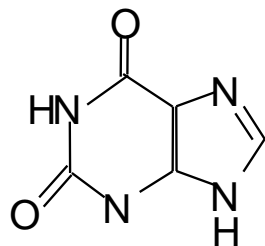
DPV, CPE

5 μ A

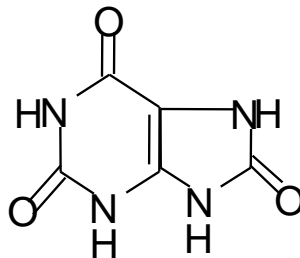




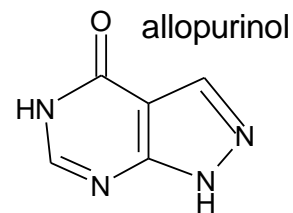
hypoxanthine



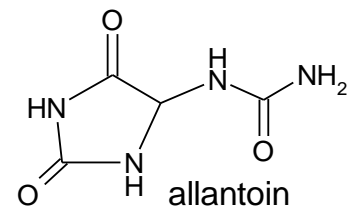
xanthine



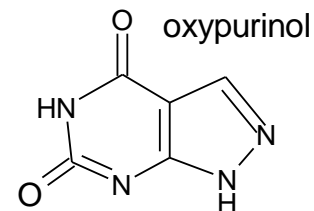
2,6,8 - trihydroxypurin



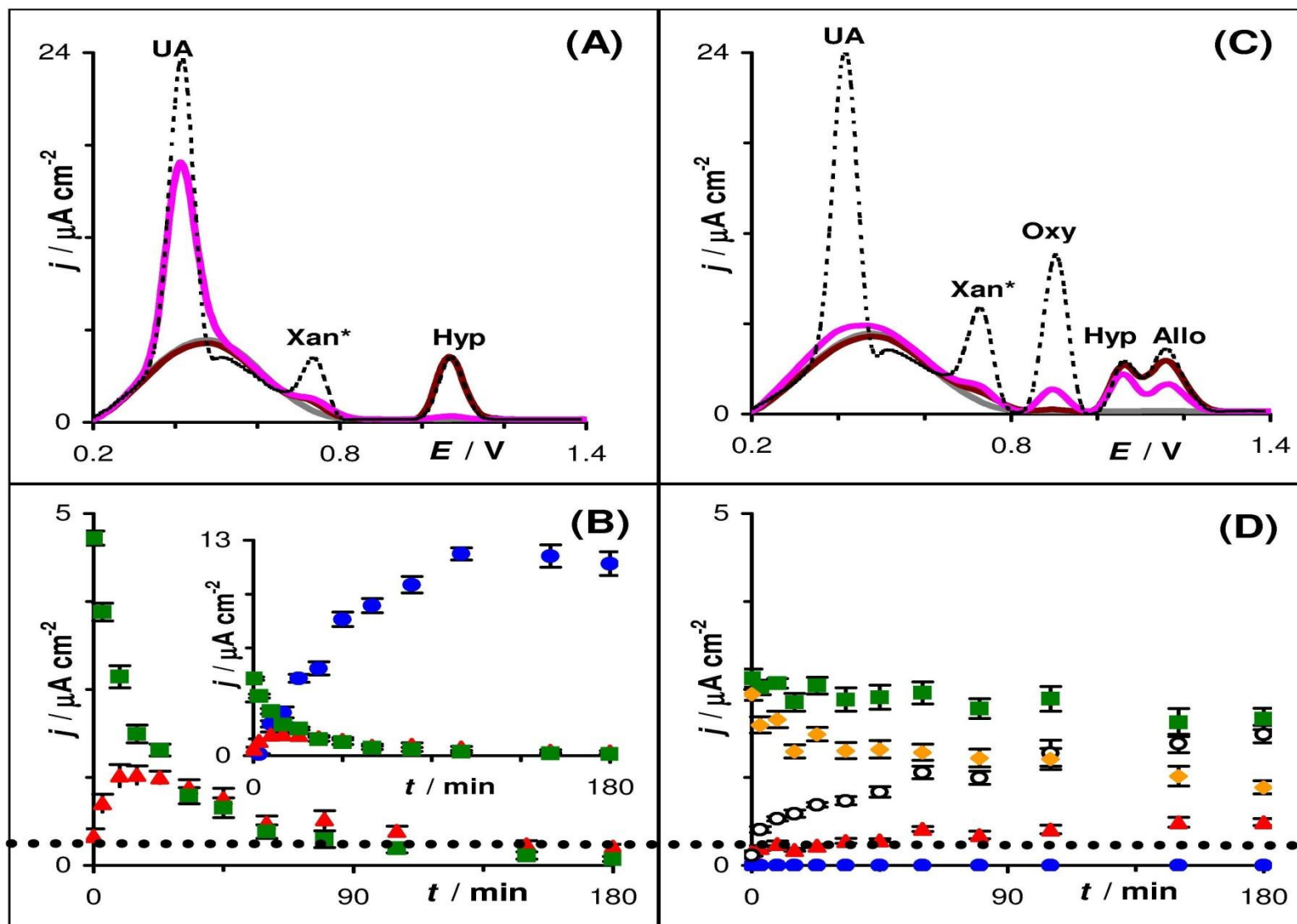
allopurinol

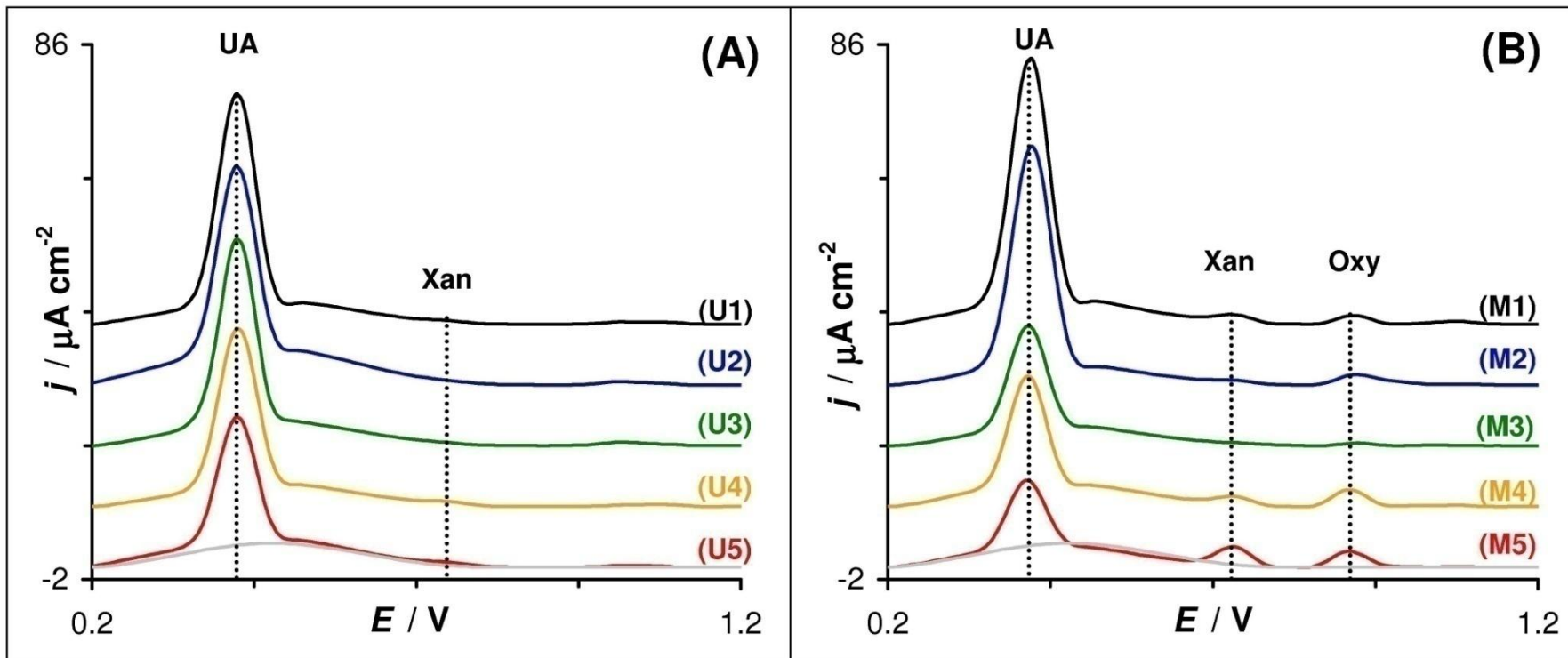


allantoin



oxypurinol





Potraviný	Obsah purinů (mg/100g)	Potraviný	Obsah purinů (mg/100g)
Maso, uzeniny		Celozrnný chléb	14
Hovězí	40	Bílé pečivo	8
Telecí	40	Ovesné vločky	30
Vepřové	48	Brambory, luštěniny, zelenina	
Skopové	46	Brambory	6
Kuřecí	40	Čočka	70
Králíčí	38	Hrách	45
Zvěřina	35-39	Fazole	44
Šunka	24	Celer	10
Anglická slanina	25	Cibule	1
Vnitřnosti		Fazolové lusky	5
Játra	95	Zelený hrášek	80
Ledvinky	80	Chřest	14
Jazyk	55	Kapusta	6
Telecí brzlík	400	Kedlubny	5
Ryby		Květák	10
Kapr	54	Mrkev	2
Losos	22	Okurky	3
Pstruh	56	Pór	3
Sardinky	120	Rajčata	4
Sled'	69	Reveň	4
Štika	48	Ředkvičky	6
Mléko, vejce		Řepa červená	5
Mléko	1	Salát hlávkový	5
Vejce	2	Špenát	23
Bílek	1	Zelí bílé	5
Žloutek	5	Zelí červené	8
Tuky, ořechy, kakao		Houby	5
Kakaový prášek	1900	Ovoce	
Mandle	9	Borůvky	2
Lískové ořechy	10	Hrušky	1
Vlašské ořechy	8	Jablka	1
Mouka, pekárenské výrobky		Jahody	5

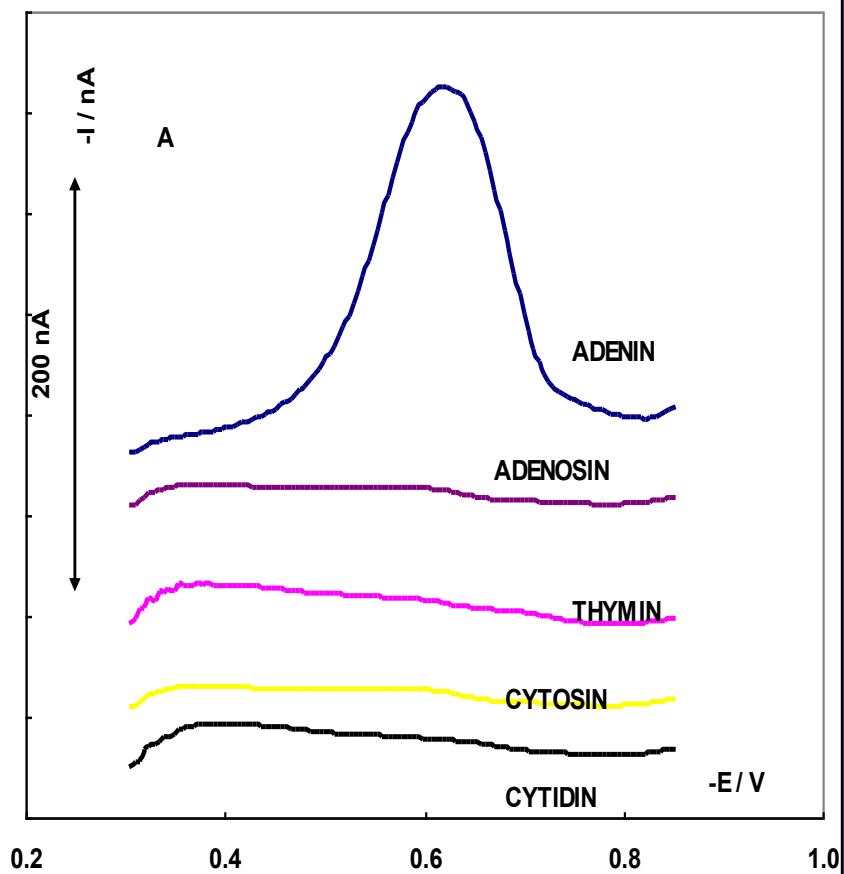
ANALÝZA BÁZÍ V PŘÍTOMNOSTI Cu(II)

Je-li Cu(II) redukována na Cu(I) v přítomnosti **purinových bází** jako je adenin nebo guanin, Cu(I) reaguje s těmito bázemi a tvoří komplexy, které se akumulují na povrchu rtuťové nebo uhlíkové elektrody.

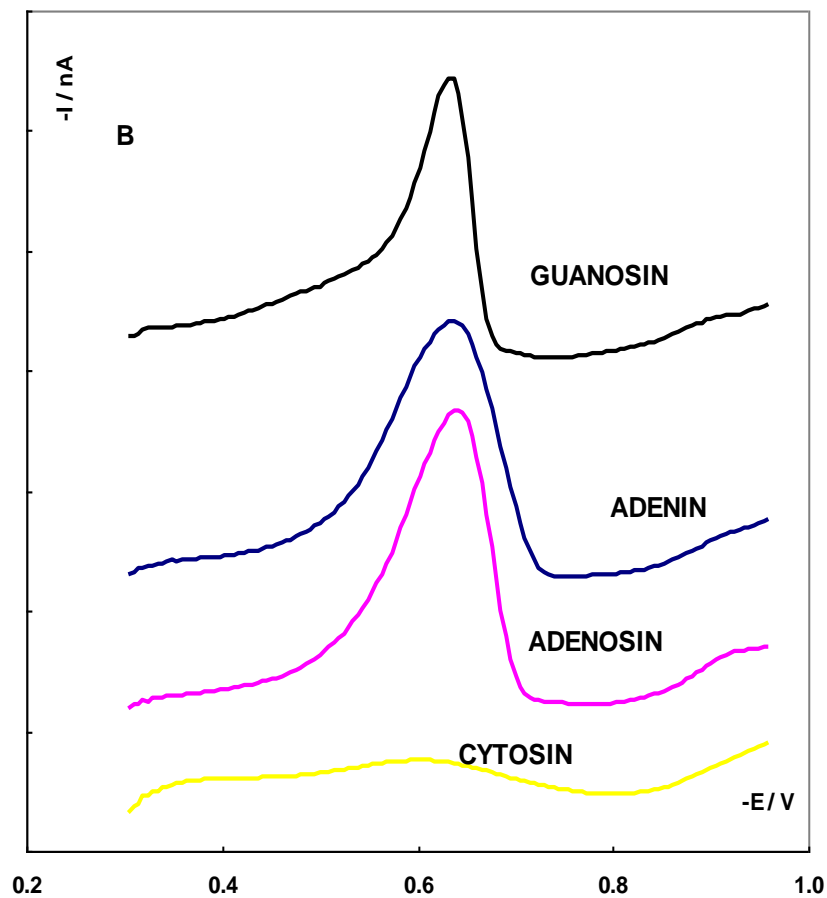
Cu(I) v komplexu se může **redukovat na Cu(0)** za použití katodické rozpouštěcí voltametrie a rtuťové elektrody, nebo **oxidovat na Cu(II)** za použití anodické rozpouštěcí voltametrie a uhlíkové elektrody.

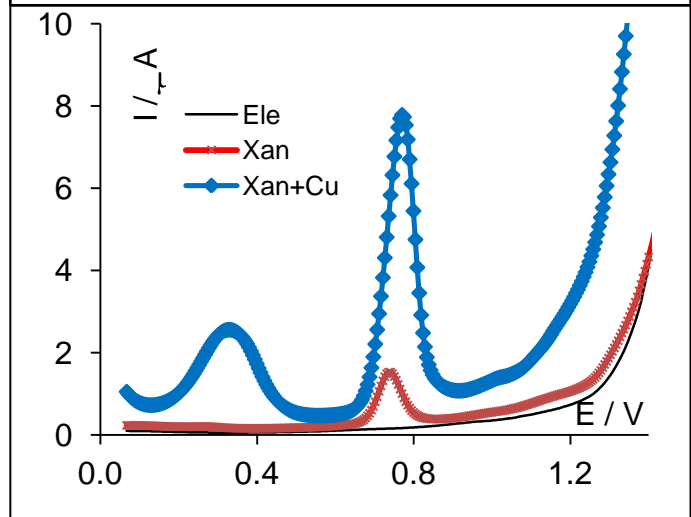
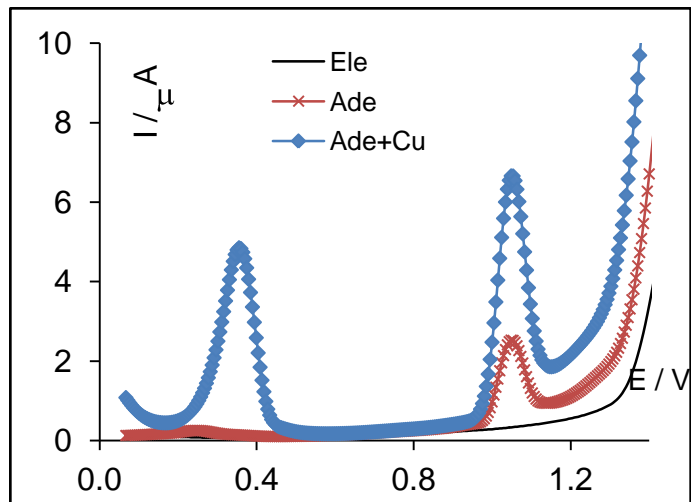
V obou případech výška voltametrického signálu je závislá na množství purinových bází v roztoku, koncentraci Cu(II) , akumulčním potenciálu a době akumulace.

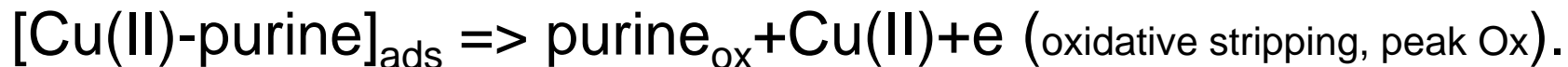
NEHYDROLYZOVANÉ BÁZE A NUKLEOZIDY



HYDROLYZOVANÉ BÁZE A NUKLEOZIDY

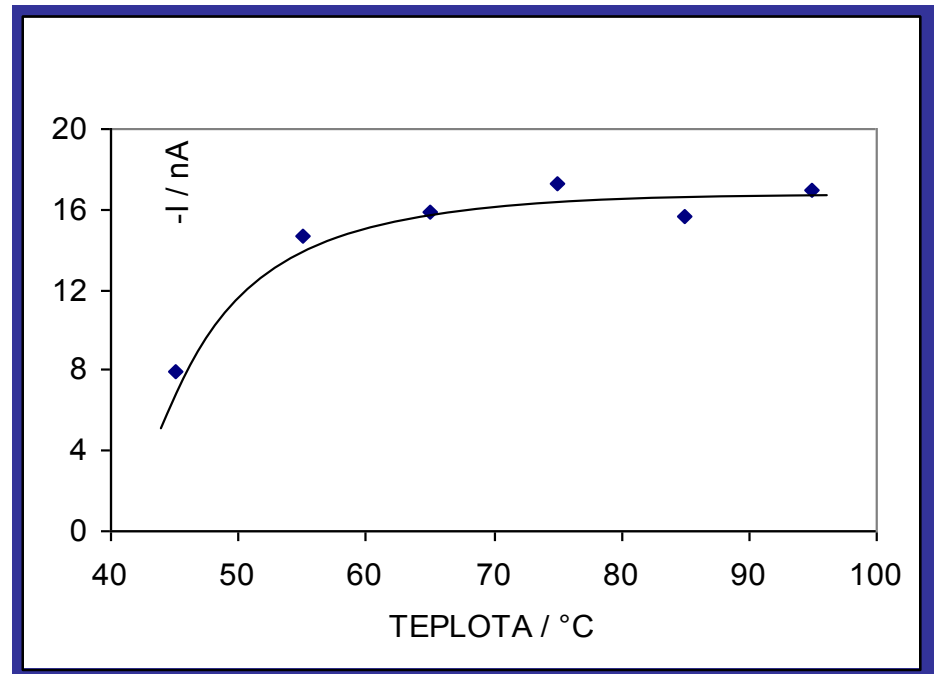
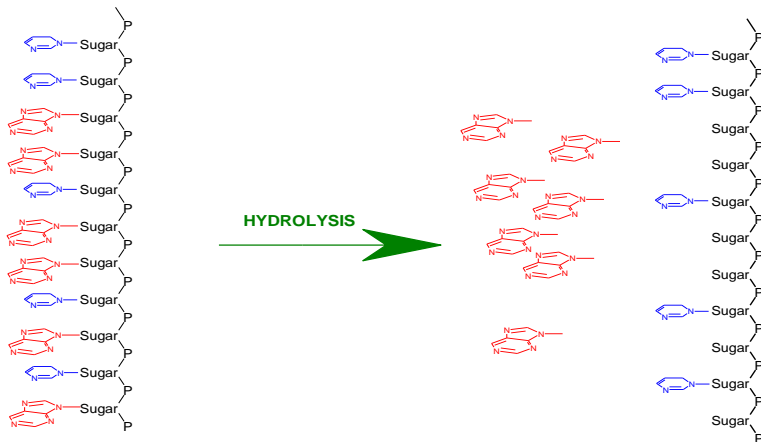




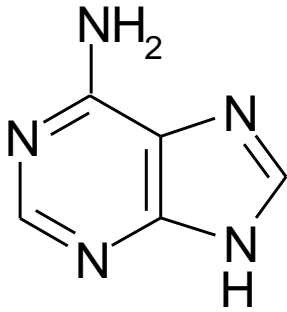


HYDROLÝZA DNA, OLIGONUKLEOTIDŮ, NUKLEOTIDŮ A NUKLEOSIDŮ

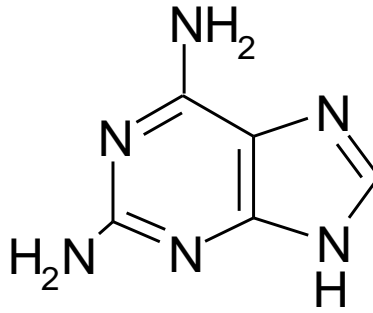
Hydrolýza DNA, oligonukleotidů a nukleozidů se provádí přidáním 20 μl of 1 M kyseliny chloristé ke stejnému objemu těchto látek, jejichž koncentrace byla 4 μM (vztaženo na monomerní jednotku) a zahřátím na 75 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 min. Po vychlazení, jsou vzorky neutralizovány NaOH a přídavky smíchány se základním elektrolytem a provedeno voltametrické měření. Závislost voltametrického signálu na teplotě je ukázána níže.



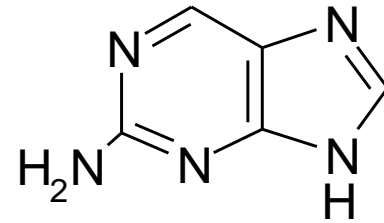
Deriváty PUR



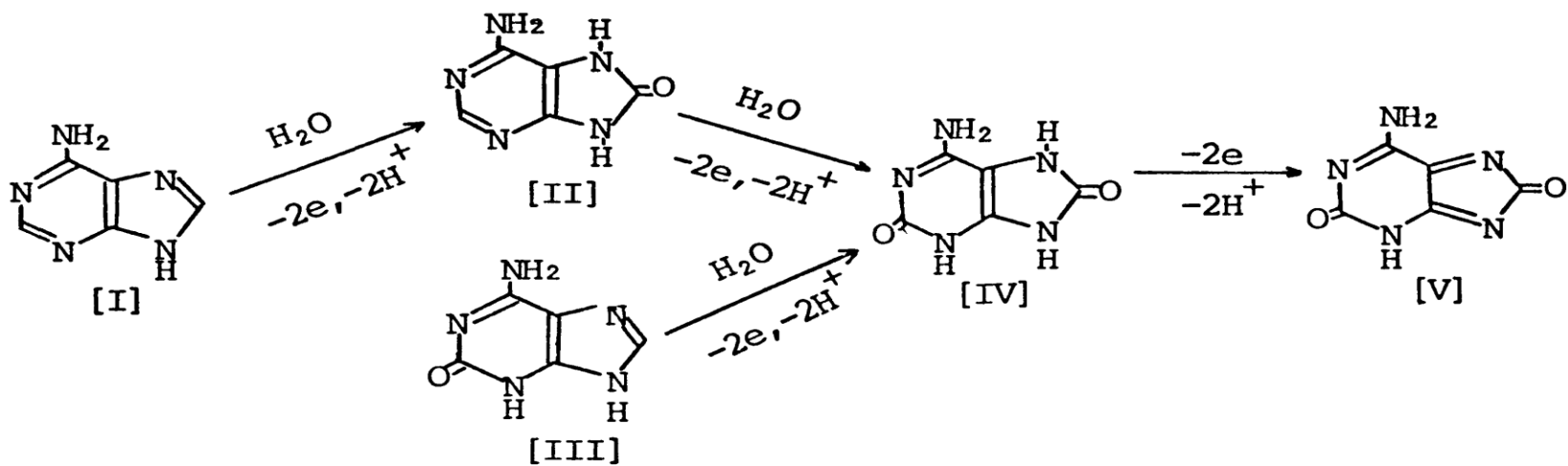
6-amino-purine



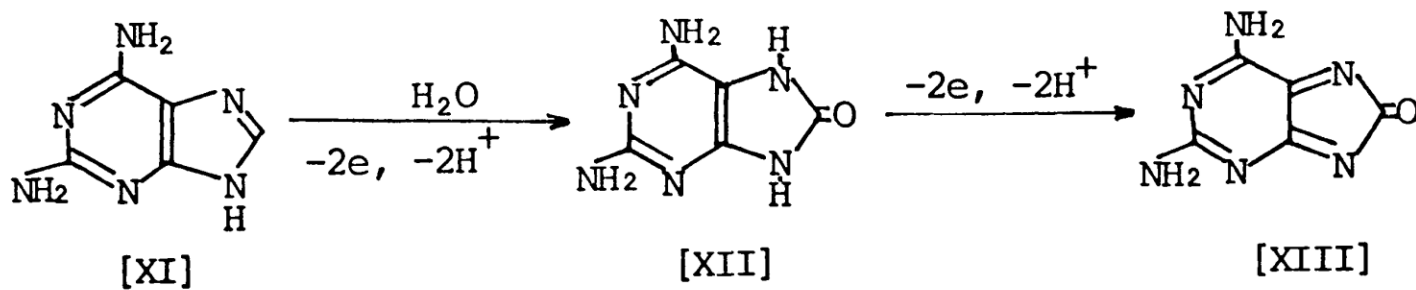
2,6- diamino-purine

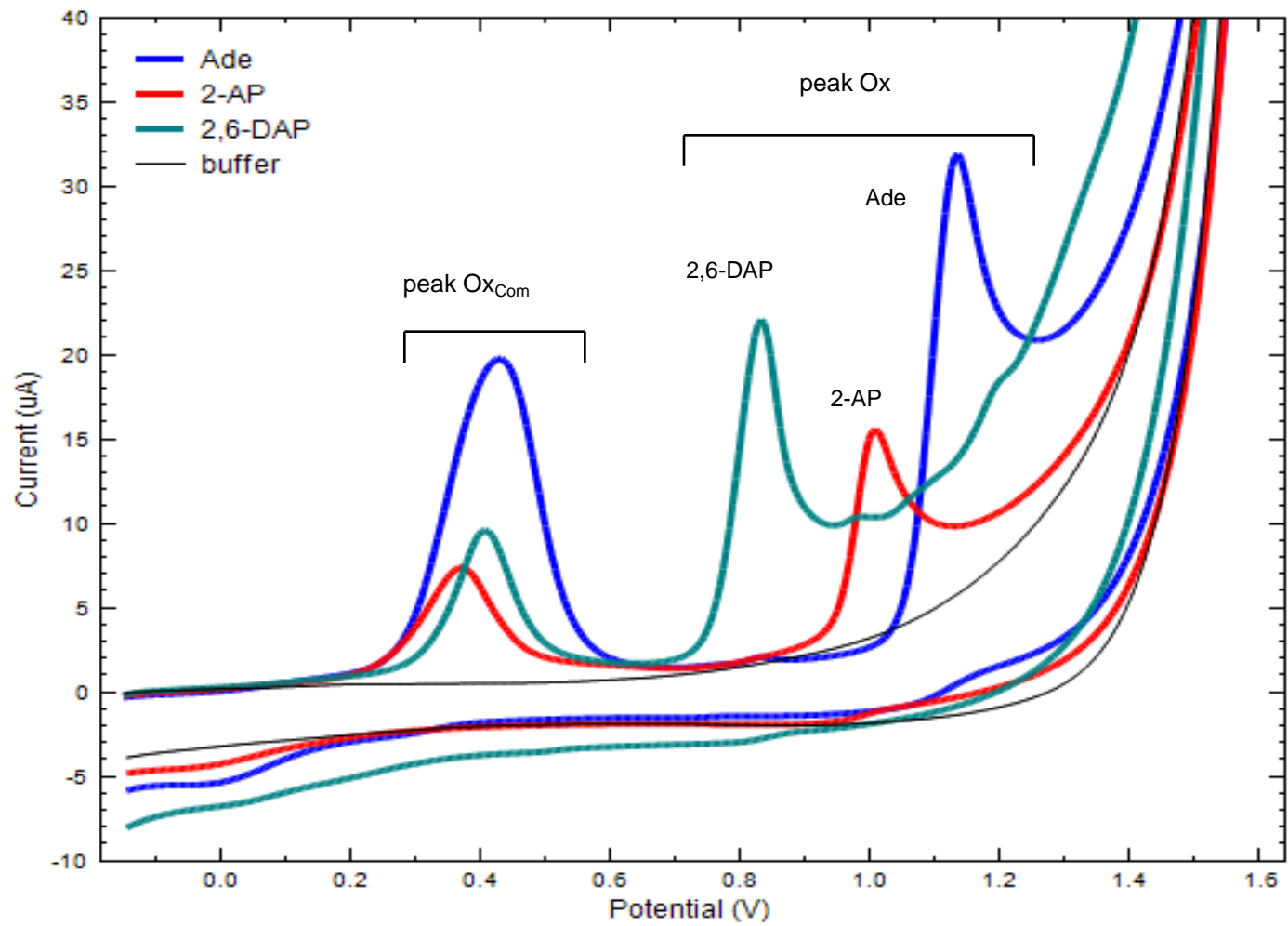


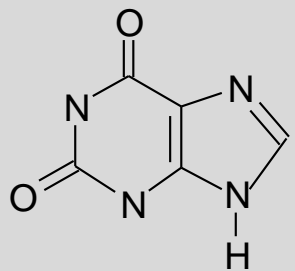
2-amino-purine



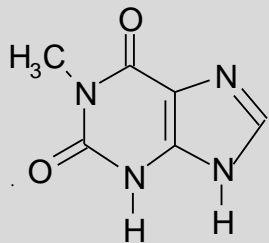
[VIII]







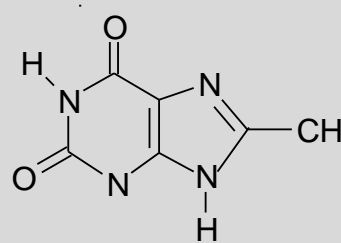
xanthine



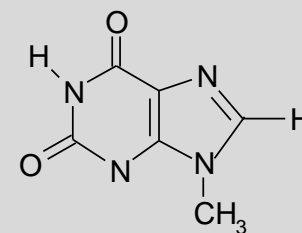
1-methylxanthine



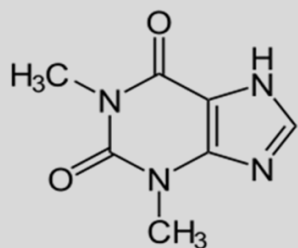
3-methylxanthine



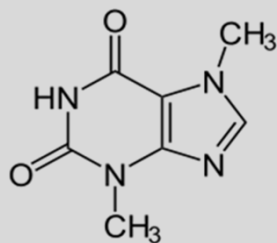
8-methylxanthine



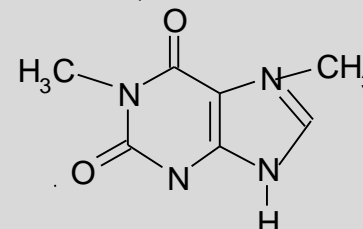
9-methylxanthine



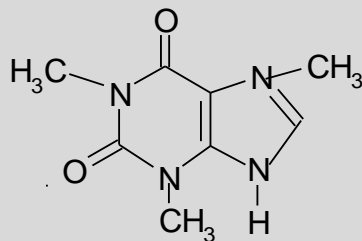
Theophylline
(1,3-dimethylxanthine)



Theobromine
(3,7-dimethylxanthine)



Paraxanthine
(1,7-dimethylxanthine)



caffeine

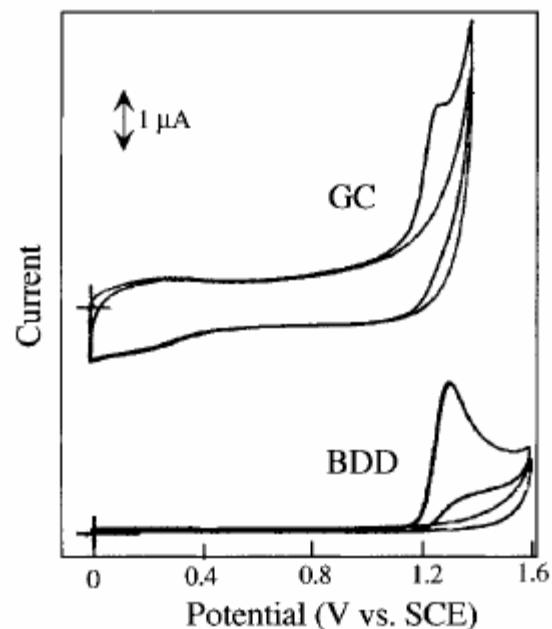
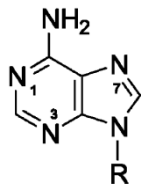
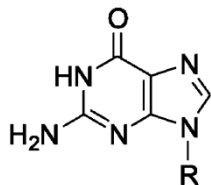


Fig. 1. Cyclic voltammograms for theophylline at a) BDD electrode and b) GC electrode at pH 1.8. Concentration, 50 μM ; sweep rate, 20 mV s^{-1} .

<i>Compound</i>	<i>pH range</i>	<i>E_p [V vs. SCE]</i>	<i>R²</i>
Xanthine	1.8–8.0	1.18–0.071 pH	0.9811
	9.0–12.0	0.65–0.043 pH	0.9819
Theophylline	1.8–9.0	1.3–0.052 pH	0.9763
	9.0–12.0	0.93–0.040 pH	0.9765
Theobromine	1.8–8.9	1.47–0.032 pH	0.9791
Caffeine	1.8–7.5	1.47–0.19 pH	0.9788



A

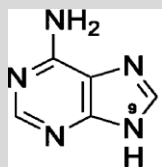
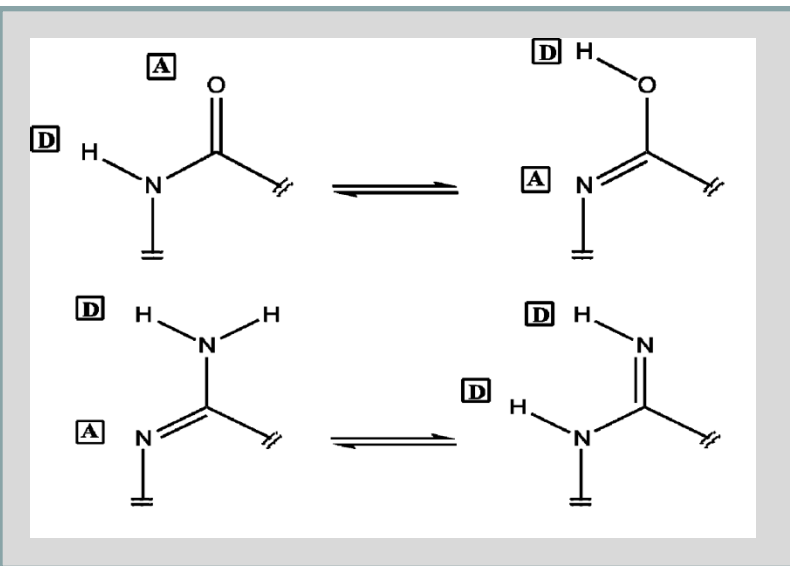


G

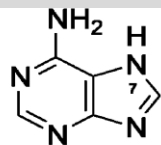
U nukleobazí je běžná **prototropní tautomerie** typu **keto - enol a amin - imin**

$$\Delta G = -RT \ln K_t$$

$$\Delta G = -nFE$$

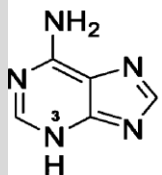


9H - amino

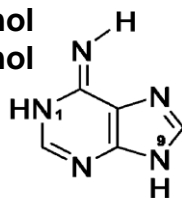


7H - amino

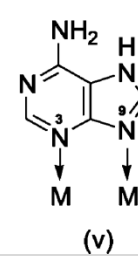
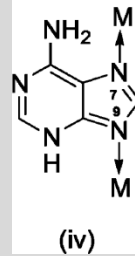
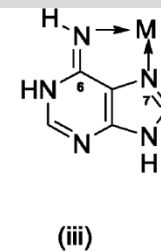
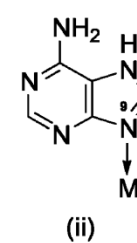
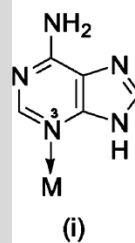
0
~31 kJ/mol
~35 kJ/mol
~52 kJ/mol



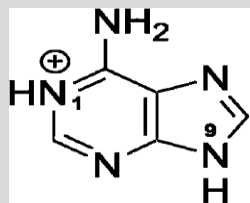
3H - amino



1H, 9H - imino (*anti*)



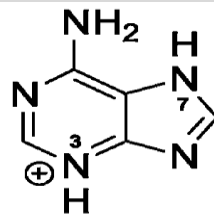
ADENIN



1H, 9H

0

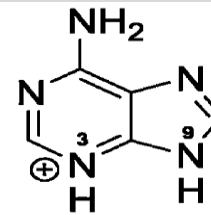
(i)



3H, 7H

1.9 kJ/mol

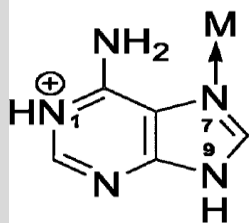
(ii)



3H, 9H

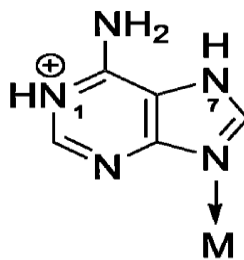
8.2 kJ/mol

(iii)



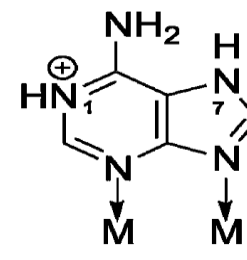
1H, 9H

(iv)



1H, 7H

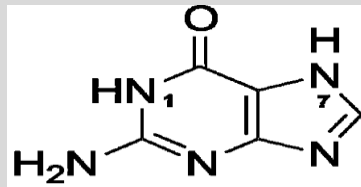
(v)



1H, 7H

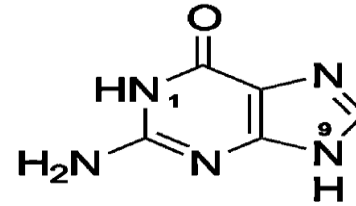
(vi)

GUANIN



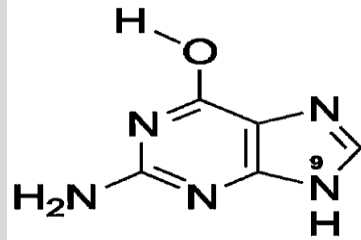
1H, 7H – keto

(i)



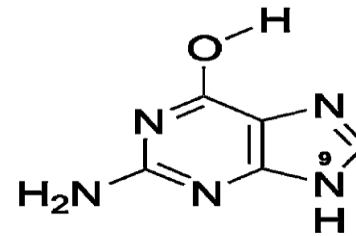
1H, 9H – keto

(ii)



6H, 9H – enol (*trans*)

(iii)

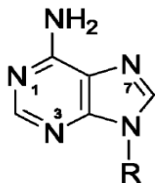


6H, 9H – enol (*cis*)

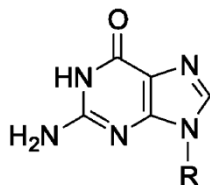
(iv)

Protonace vs deprotonace

BÁZE	POLOHA	pKa	
ADENIN	N1	4.1	
	N9	9.8	
HYPOXANTIN	N7	1.9	
	N1	8.8	
GUANIN	N7	3.3	
	N1	9.4	



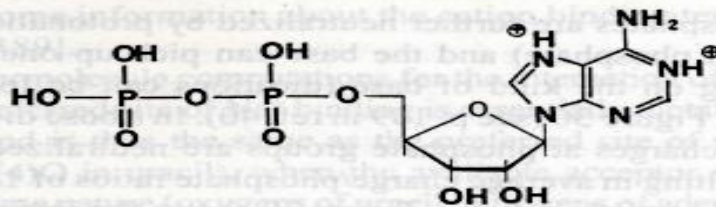
A



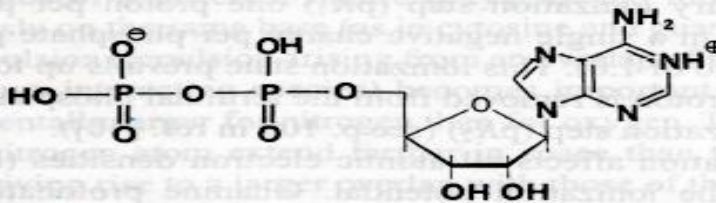
G

Base	Dication	pK ₁	Cation	pK ₂	Neutral
Ade	N1, N7	-0.35	N1	4.19	
Gua		0	N7	3.2	
Cyt		-	N3	4.5	
Thy		-	C4O	0	
Ura		-	C4O	0.5	
	Neutral	pK ₃	Anion	pK ₄	Dianion
Ade		9.8	N9	-	
Gua		9.6	N1/C6O	12.5	N1/C6O, N9
Cyt		12.2	N1/C2O	-	
Thy		9.8	N1/C2O or N3/C4O	13	N1/C2O and N3/C4O
Ura		9.5	N1/C2O or N3/C4O	13	N1/C2O and N3/C4O

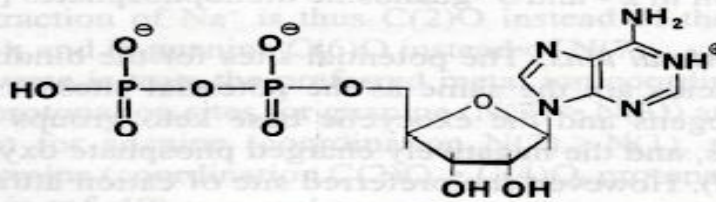
pH Δ 1



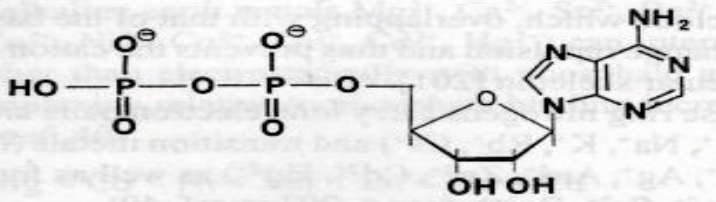
pH Δ 2



pH 3.8



pH 6.8



pH ~12.5

