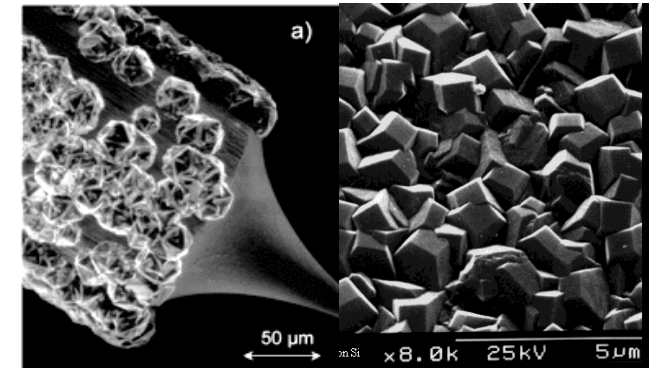


*biopolymeru,
klinické a environmentální analýzy:*

*Jak si správně vybrat aneb pár
příběhů
mezi rtutí a diamanty*



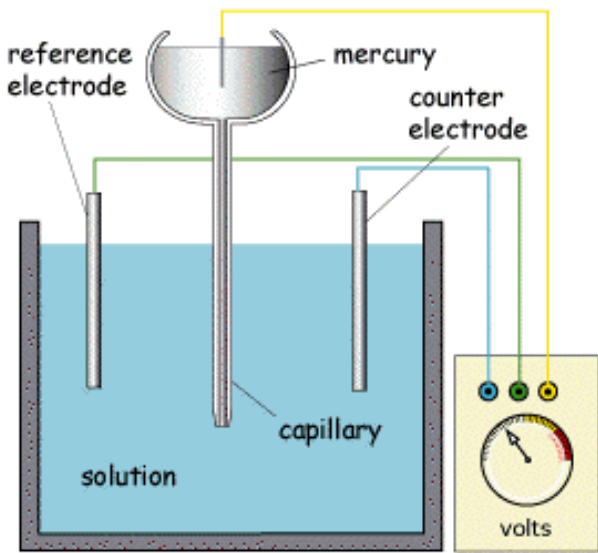
Karolina Schwarzová

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova

Miroslav Fojta

Biofyzikální ústav AVČR, v.v.i.; CEITEC, Masarykova univerzita

Elektrochemické metody ... polarografie



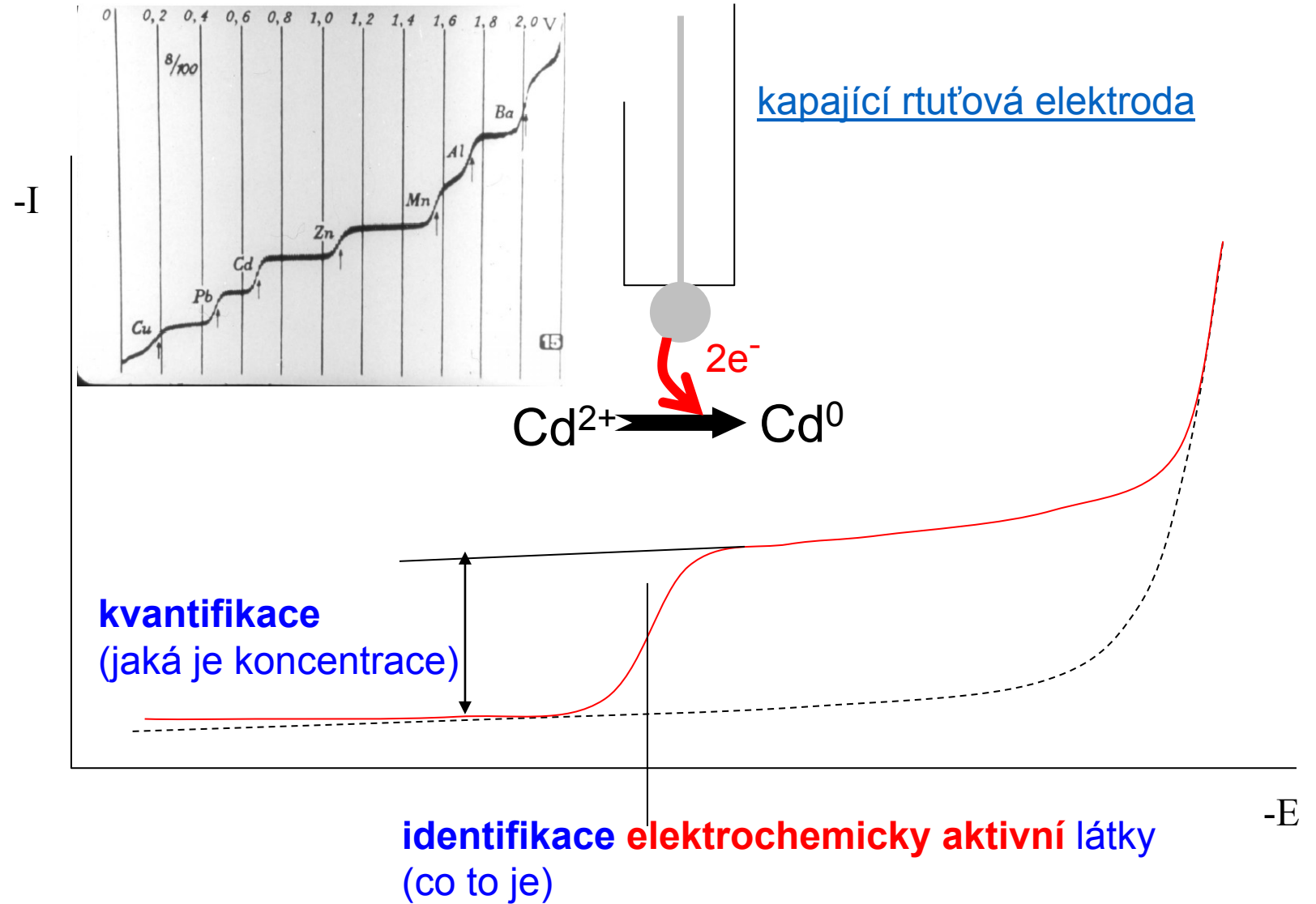
Jaroslav Heyrovský



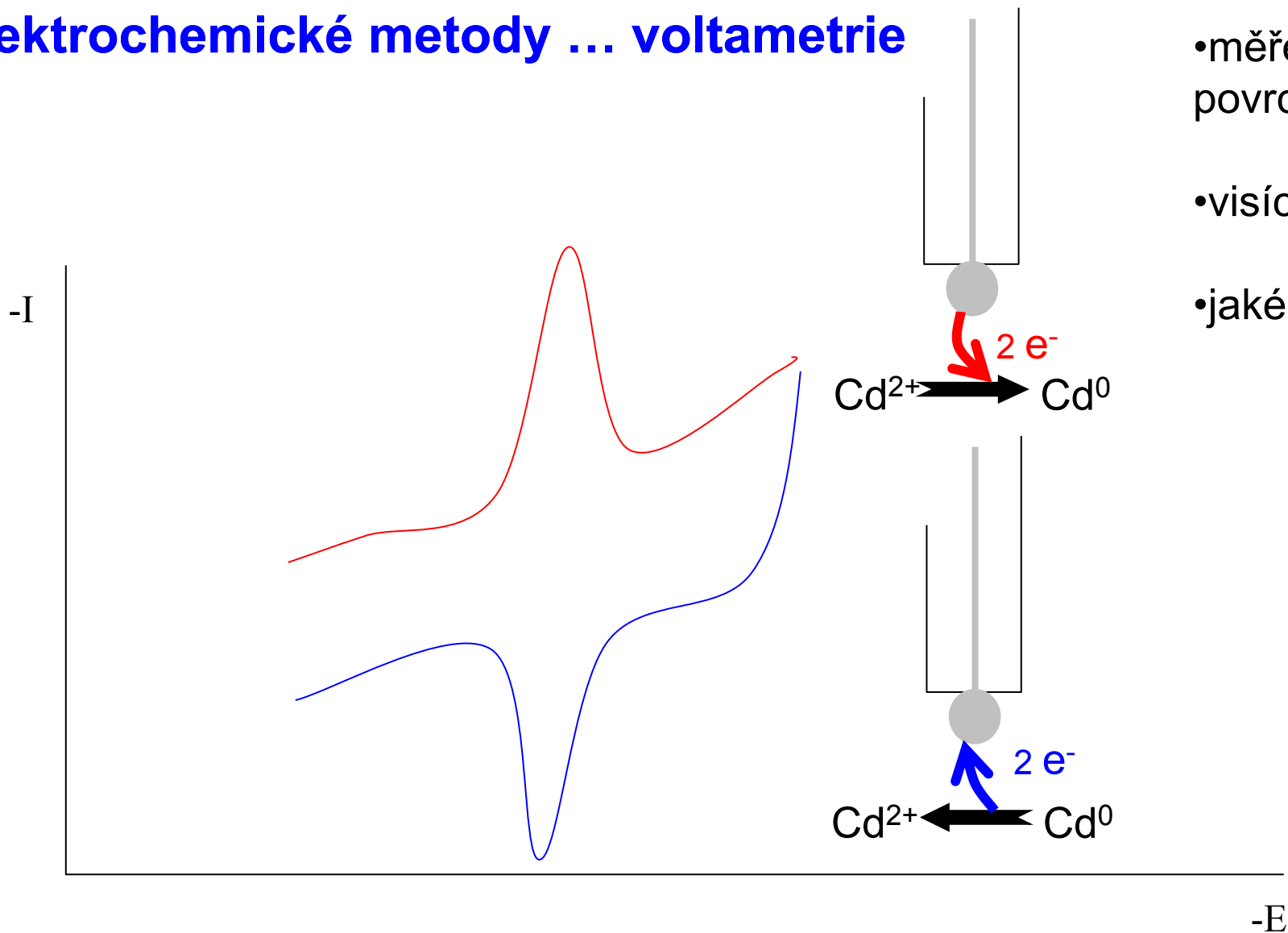
J. Heyrovský



Nobelova cena 1959



Elektrochemické metody ... voltametrie




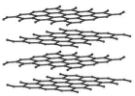

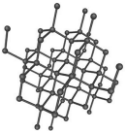
- měření na stacionárním povrchu
- visící rtuťová kapková elektroda
- jakékoli pevné elektrody

Osnova

- pracovní elektrody a jejich modifikace
- potenciálové okno a čím je omezeno
- adsorpce, pasivace, čištění a obnovování povrchu elektrody
 - adsorpce jako nepřítel a adsorpce jako kamarád
 - strukturní analýza nukleových kyselin pomocí adsorpčně-desorpčních dějů
- katalytické vylučování vodíku na rtuti
 - využití v elektroanalýze chemicky modifikovaných nukleových kyselin, polysacharidů a glykoproteinů
 - elektrochemie peptidů a bílkovin, Brdičkova reakce, katalytické vlastnosti nemodifikovaných proteinů – pík H
- pár poznámek k toxicitě rtuti

Z čeho jsou pracovní elektrody?

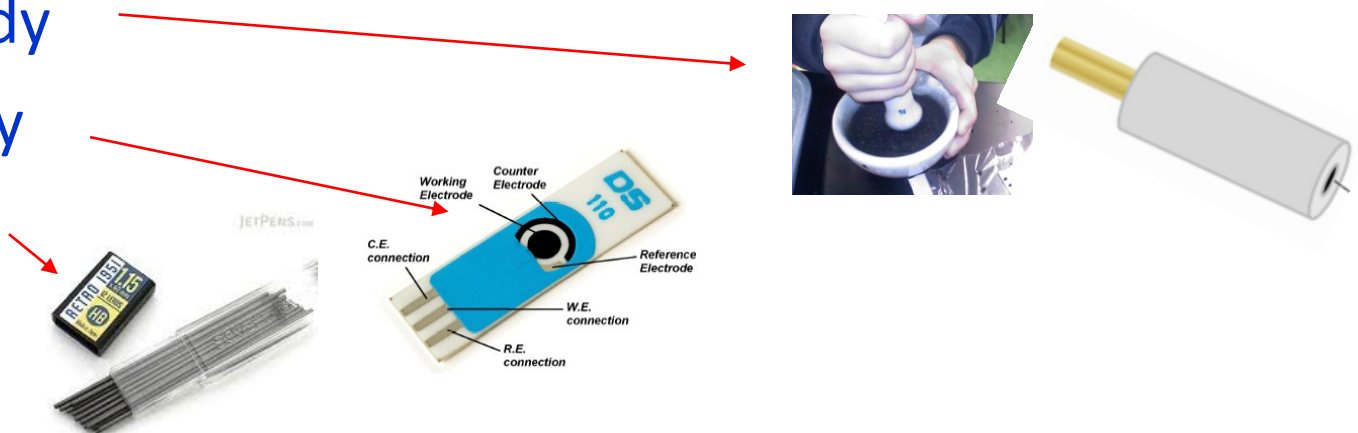
- rtuťové 
- pevné kovové (stříbrné, platinové, měděné, zlaté, bismutové, antimonové)      
- amalgamové (rtuť + jiný kov) 

- uhlíkové: různé formy grafitu (sp^2 uhlík), diamant (sp^3 uhlík)    

- pastové elektrody

- tištěné elektrody

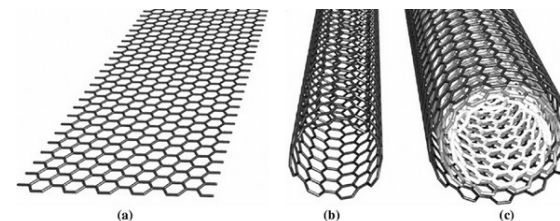
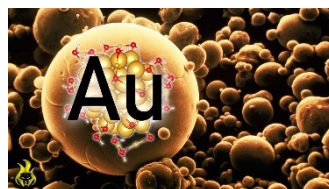
- pentilkové tuhy



Modifikace povrchů elektrod - příklady

- polyionty (elektrostatická adsorpce opačně nabitých analytů apod.)

- nanočástice, uhlíkové nanoobjekty

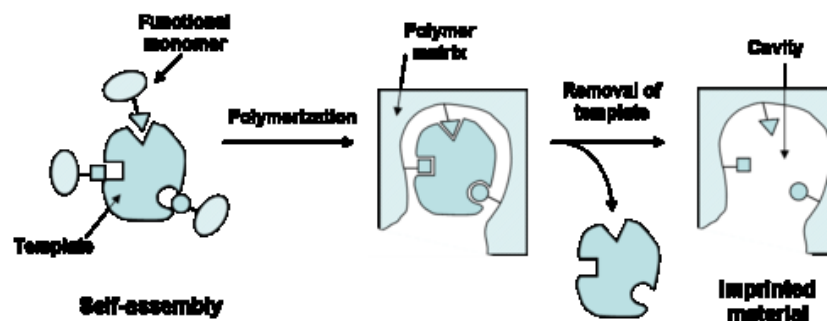


Source: Kreupl et al. (2004)

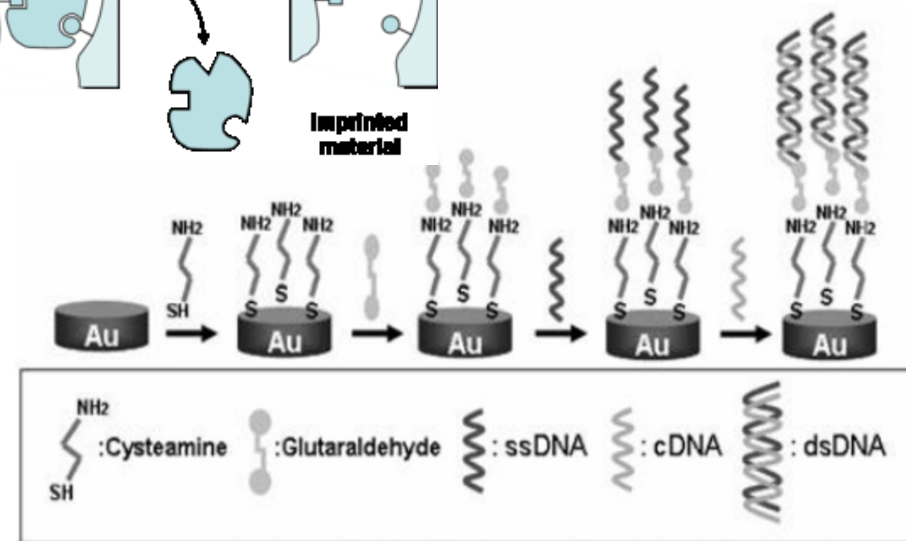
- vodivé polymery

(např. elektropolymerizovaný anilín a další aromatické aminy);

„molecular imprinting“


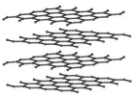

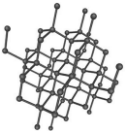


- immobilizace „bioreceptorů“ přes -SH skupiny (obvykle na zlatě)



Z čeho jsou pracovní elektrody?

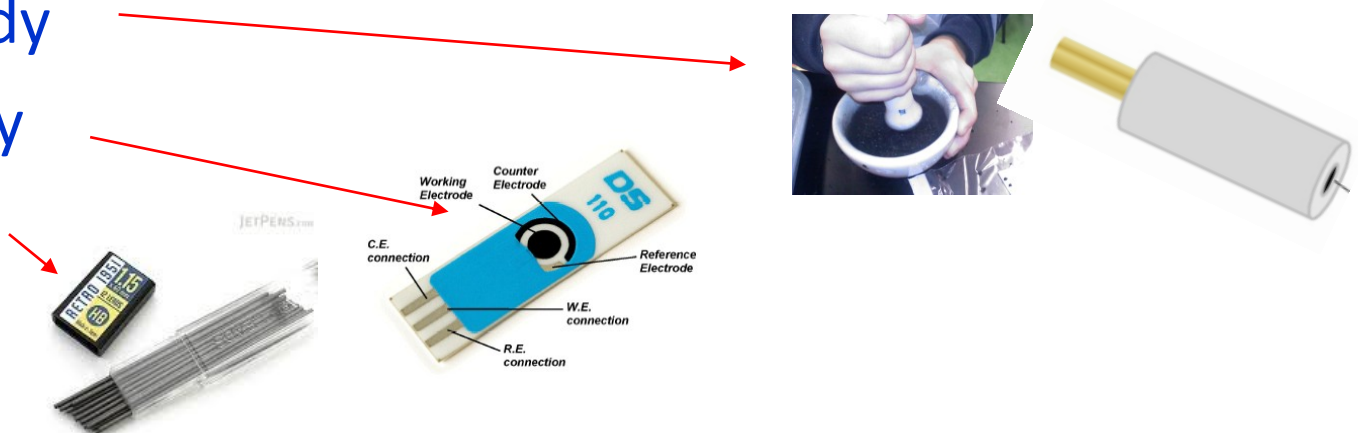
- rtuťové 
- pevné kovové (stříbrné, platinové, měděné, zlaté, bismutové, antimonové)      
- amalgamové (rtuť + jiný kov) 

- uhlíkové: různé formy grafitu (sp^2 uhlík), diamant (sp^3 uhlík)    

- pastové elektrody

- tištěné elektrody

- pentilkové tuhy

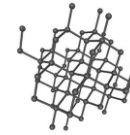


Z čeho jsou pracovní elektrody?

- **rtuťové**



- pevné kovové (stříbrné, platinové, měděné, zlaté, bismutové, antimonové)
- amalgamové (rtuť + jiný kov)

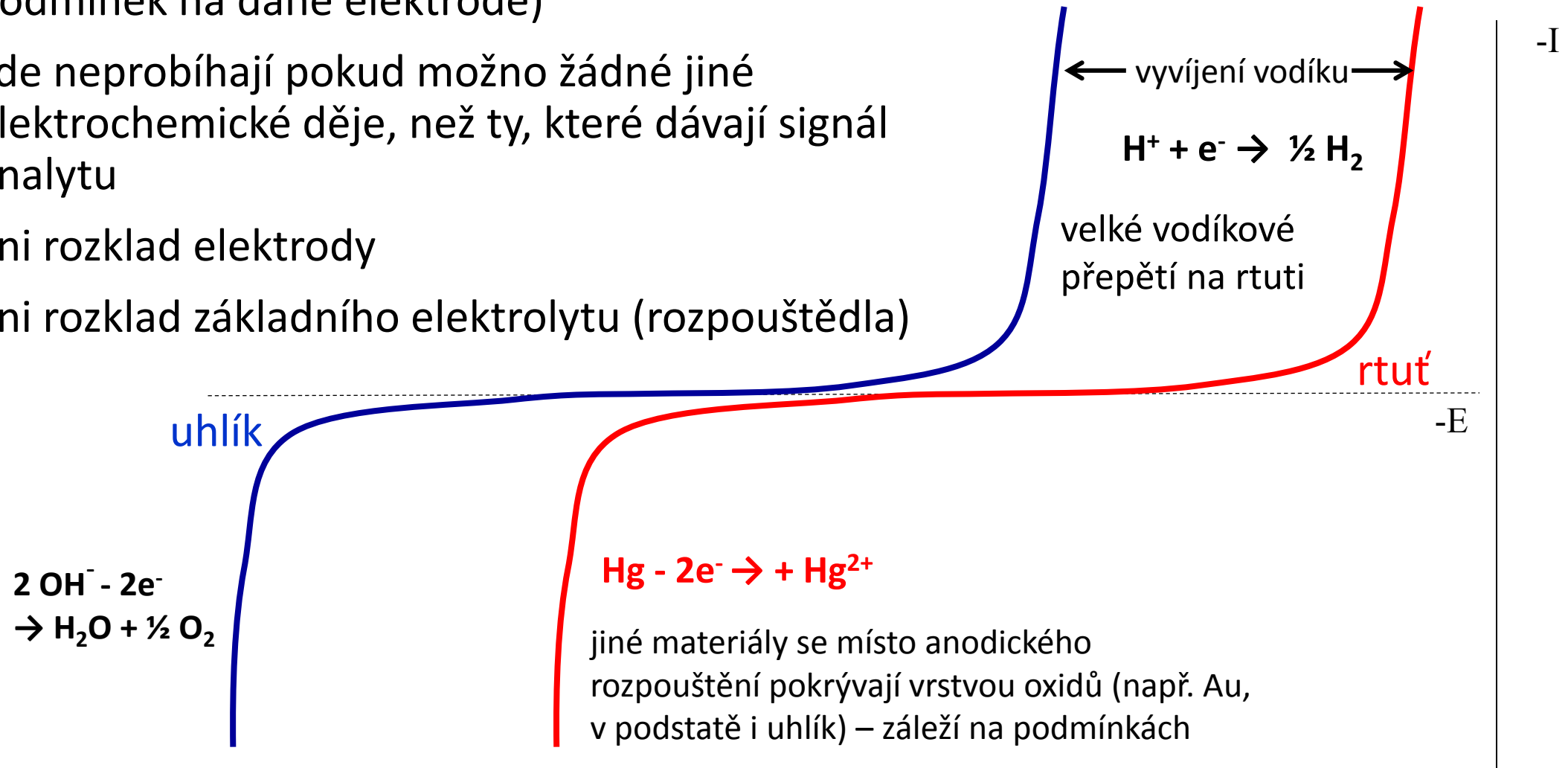


- uhlíkové: různé formy grafitu (sp^2 uhlík), **diamant (sp^3 uhlík)**
- pastové elektrody
- tištěné elektrody
- pentilkové

Méně znamená často více!

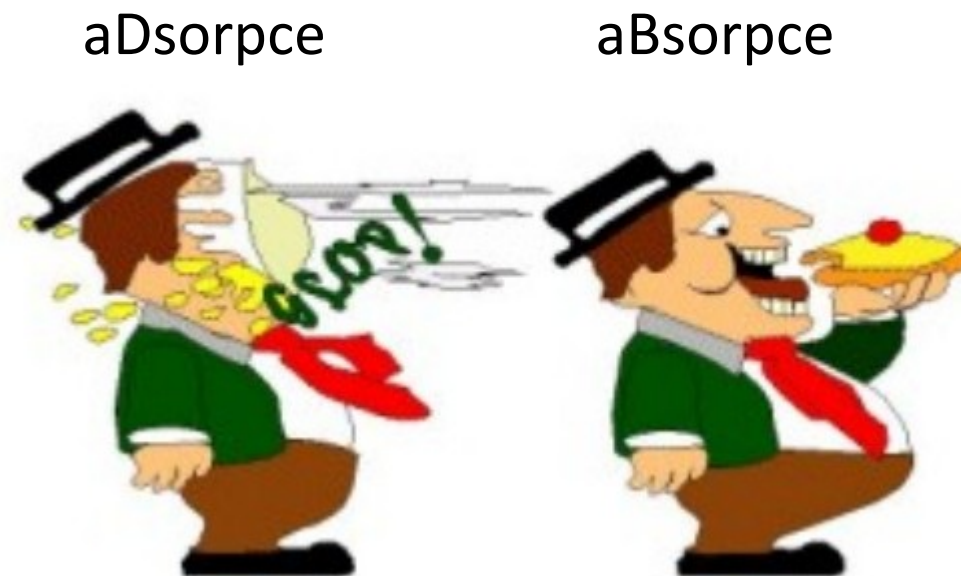
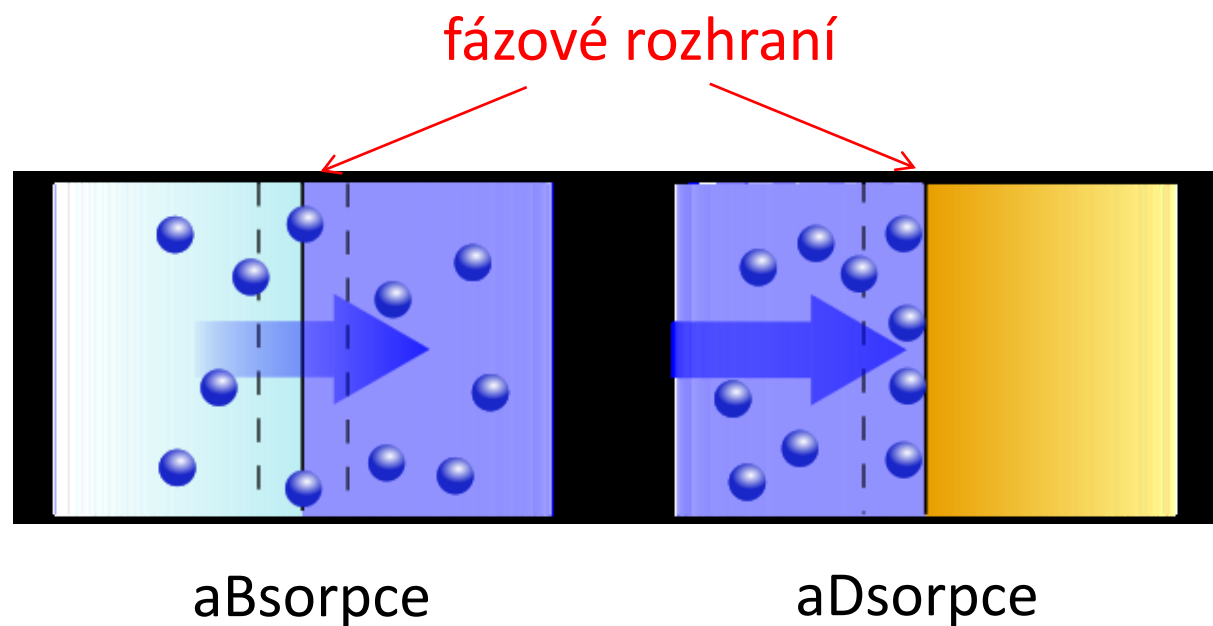
Potenciálové (pracovní) okno

- oblast potenciálů, kde „se dá něco změřit“ (za daných podmínek na dané elektrodě)
- kde neprobíhají pokud možno žádné jiné elektrochemické děje, než ty, které dávají signál analytu
- ani rozklad elektrody
- ani rozklad základního elektrolytu (rozpouštědla)



Adsorpce, pasivace a obnovování povrchu

- adsorpce je hromadění molekul nějaké látky (plynu, rozpuštěné látky) na povrchu (mezifází), např. elektrody
- adsorpce vs. absorpce



Adsorpce, pasivace a obnovování povrchu

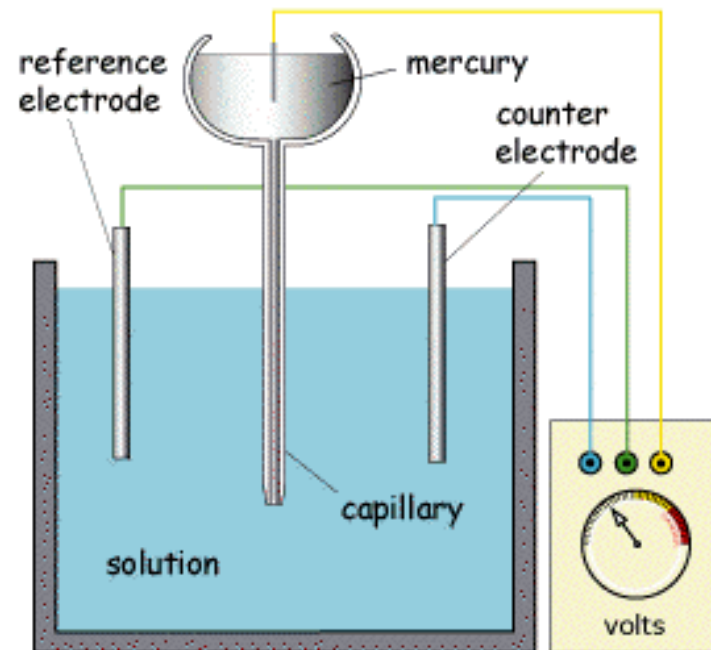
Adsorpce jako nepřítel:

- „*adsorption is nightmare of electrochemists*“: komplikace při studiu mechanismů elektrodových dějů
- adsorpce složek matrice, ve které stanovujeme látku, která nás zajímá, může zcela znemožnit analýzu (např. proteiny v biologických vzorcích)
- pasivace elektrody: často v důsledku blokování povrchu adsorbovanými produkty elektrochemických přeměn (ty mohou být polymerní, tudíž jsou adsorbovány silně)

Adsorpce, pasivace a obnovování povrchu

Obnovování povrchu:

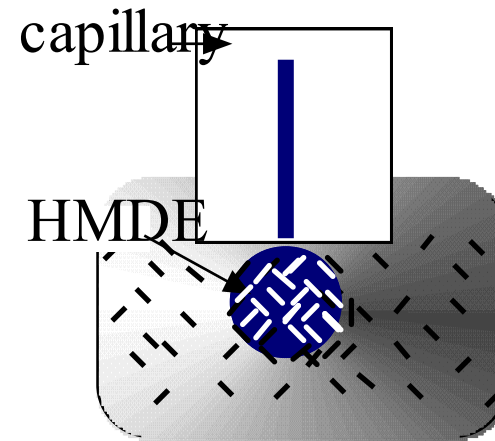
- v případě rtuťové kapkové elektrody **není problém** – nová kapka
- pevné elektrody:
 - mechanicky (obrousit, přešetřit)
 - chemicky (např. „*piranha solution*“)
 - elektrochemicky (anodicky nebo katodicky)
 - **většinou komplikace**



Adsorpce, pasivace a obnovování povrchu

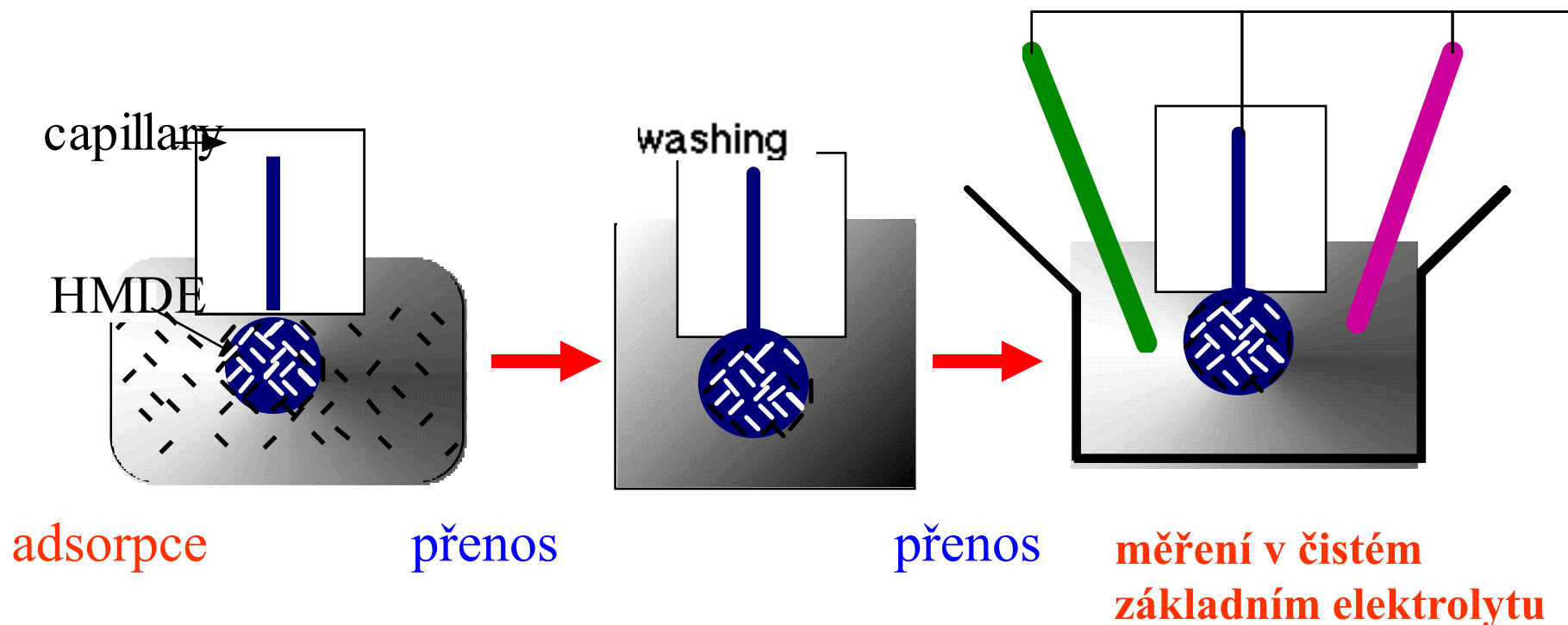
Adsorpce jako kamarád:

- akumulace analytu na povrchu elektrody
- **na povrchu rtuti se ochotně akumuluje řada organických látek a všechny biopolymery (hydrofobní povrch rtuti ve vodném prostředí: *similia similibus solvuntur* → hydrofobní molekuly (jejich části) se ochotně z vody adsorbují na rtuť)**
- o velikosti odezvy rozhoduje koncentrace na povrchu, nikoli koncentrace v roztoku!



- dostatečně pevná adsorpce: přenosové (ex-situ) elektroanalytické techniky

adsorpce DNA a jiných biopolymerů na povrchu elektrod je natolik pevná, že vydrží **výměnu média**



adsorpce

přenos

přenos

měření v čistém
základním elektrolytu

Adsorptive

Transfer

Stripping

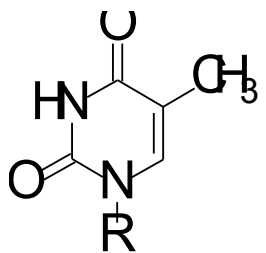
Adsorpce, pasivace a obnovování povrchu

Adsorpce jako kamarád:

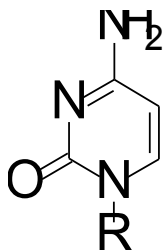
- adsorpčně/desorpční děje na povrchu elektrody lze měřit
- analyticky užitečné kapacitní (tensametrické) signály
- v případě nukleových kyselin na negativně nabitém povrchu rtuti jsou tyto signály vysoce citlivé k jejich struktuře
- rozhoduje, které složky DNA se adsorpčně-desorpčních procesů účastní

Co to jsou nukleové kyseliny?

pyrimidiny

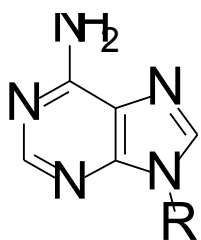


thymine (T)

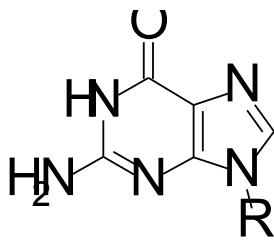


cytosine (C)

puriny



adenine (A)



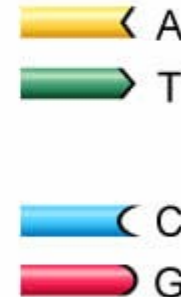
guanine (G)

dvoušroubovice DNA

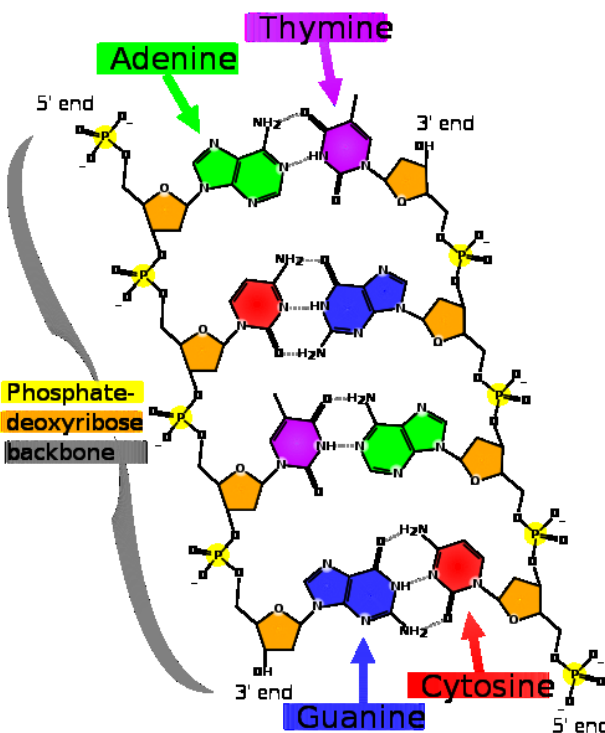
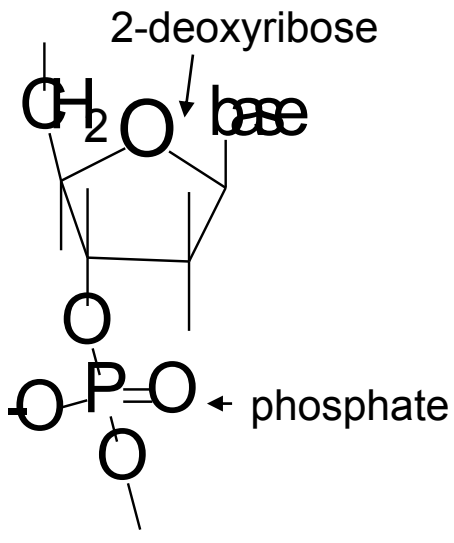


malý žlábek

velký žlábek

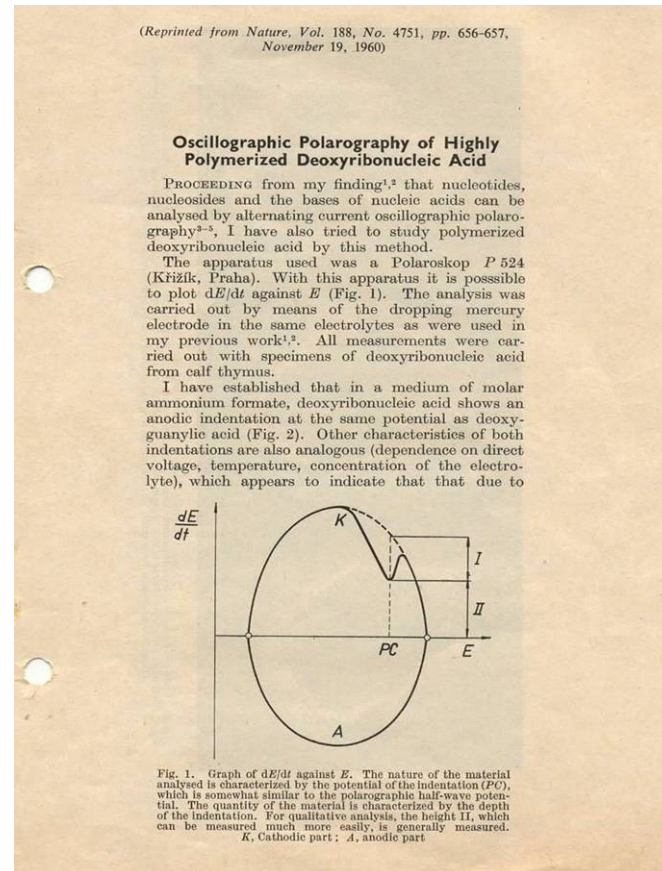


nukleotid

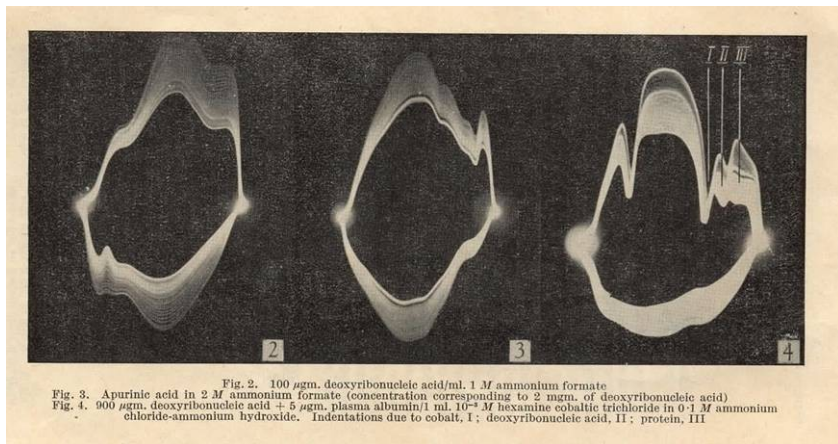


párování bází

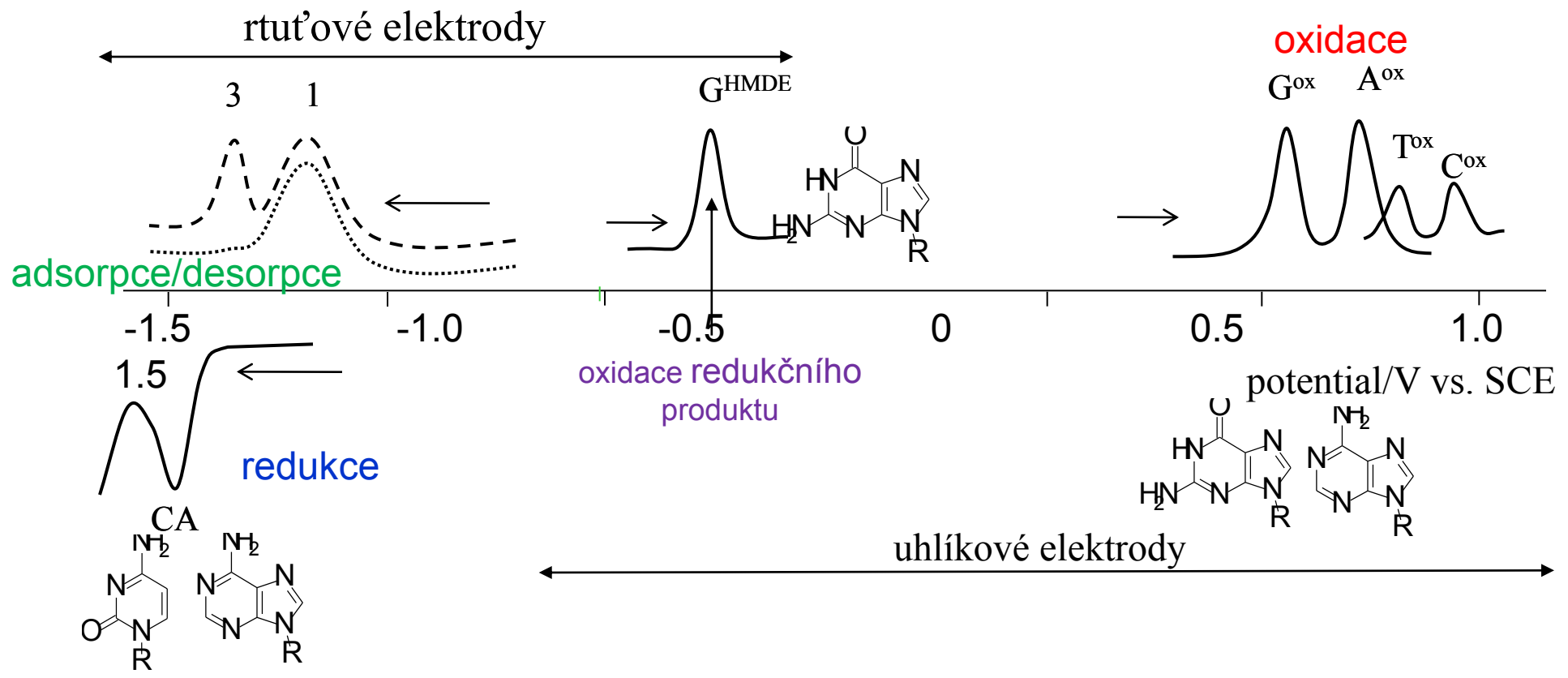
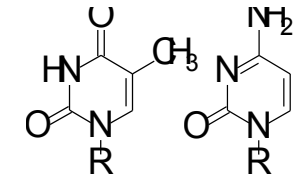
Emil Paleček (50. léta): objev polarografie DNA



Česká Hlava 2014



Přehled elektrochemie (přírodních) NK



Podrýváme dogmata...



Contents lists available at ScienceDirect

Electrochemistry Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/elecom



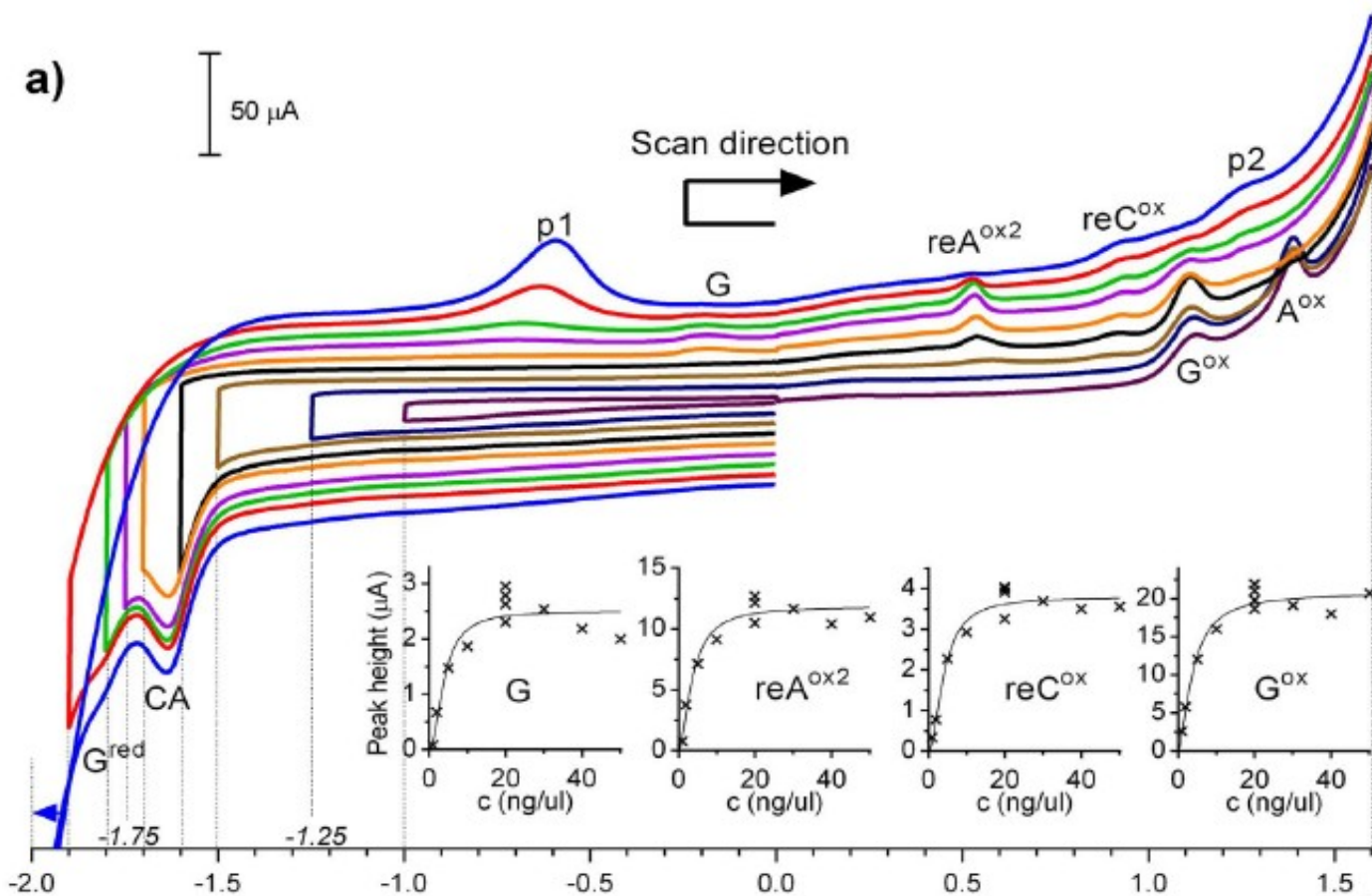
redukce bází na uhlíku

Label-free detection of canonical DNA bases, uracil and 5-methylcytosine in DNA oligonucleotides using linear sweep voltammetry at a pyrolytic graphite electrode



Jan Špaček*, Aleš Daňhel, Stanislav Hasoň, Miroslav Fojta

Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Královopolská 135, CZ-612 65 Brno, Czech Republic



+ další možnosti detekce produktů redukce nebo oxidace bází

obyčejná grafitová elektroda: „méně je někdy více“ ...

Adsorpčně-desorpční procesy DNA na negativně nabitým Hg povrchu

- cukr-fosfátová páteř DNA je negativně nabitá
- báze jsou relativně hydrofobní

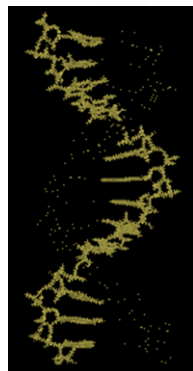
dvoušroubovice



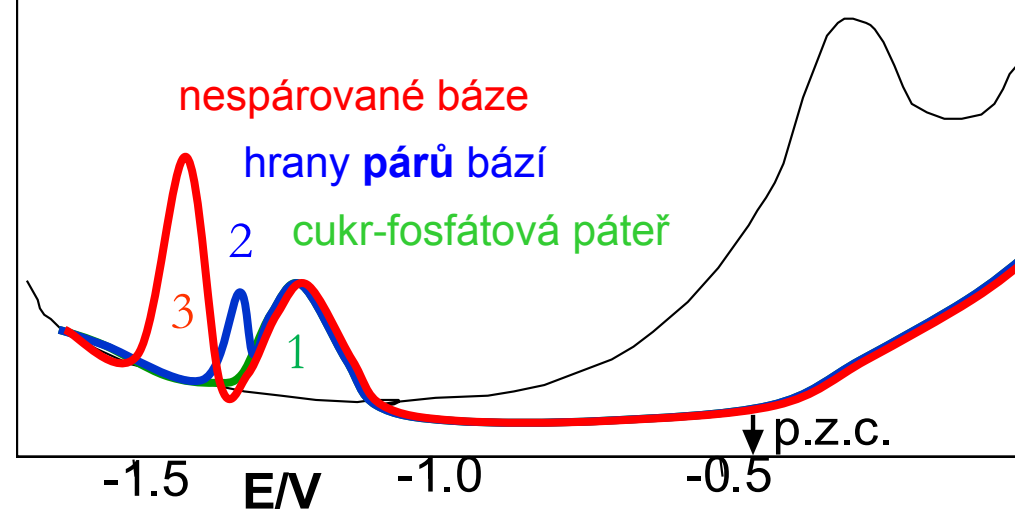
deformovaná dvoušroubovice



jednořetězcová DNA



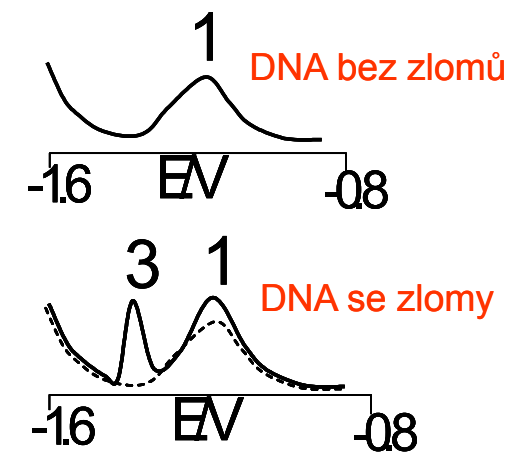
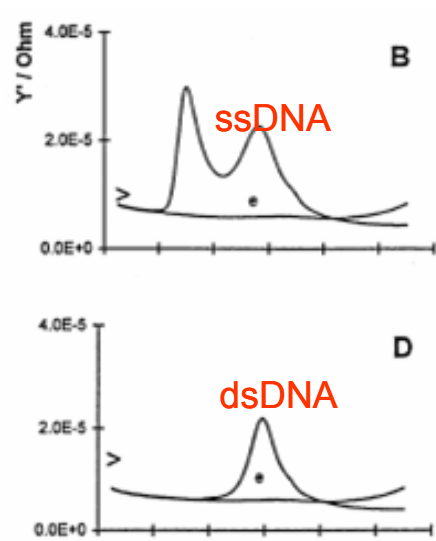
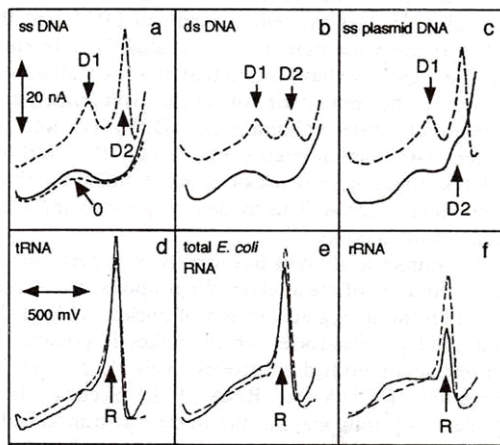
Složky DNA, které mohou vstoupit do kontaktu s povrchem elektrody:



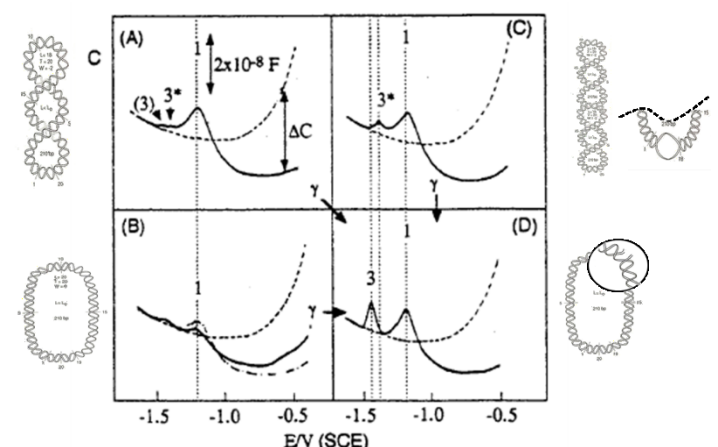
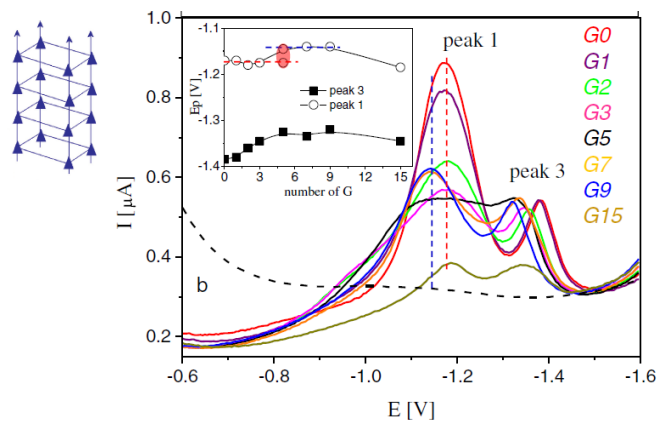
Píky 2 a 3: informace o struktuře DNA

Strukturální analýza nukleových kyselin pomocí adsorpce/desorpce

RNA vs. DNA

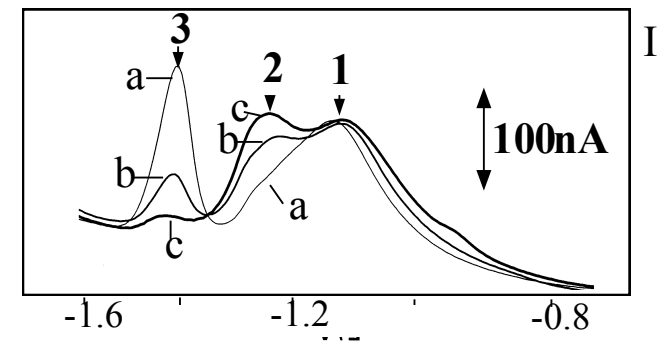


DNA kvadruplexy



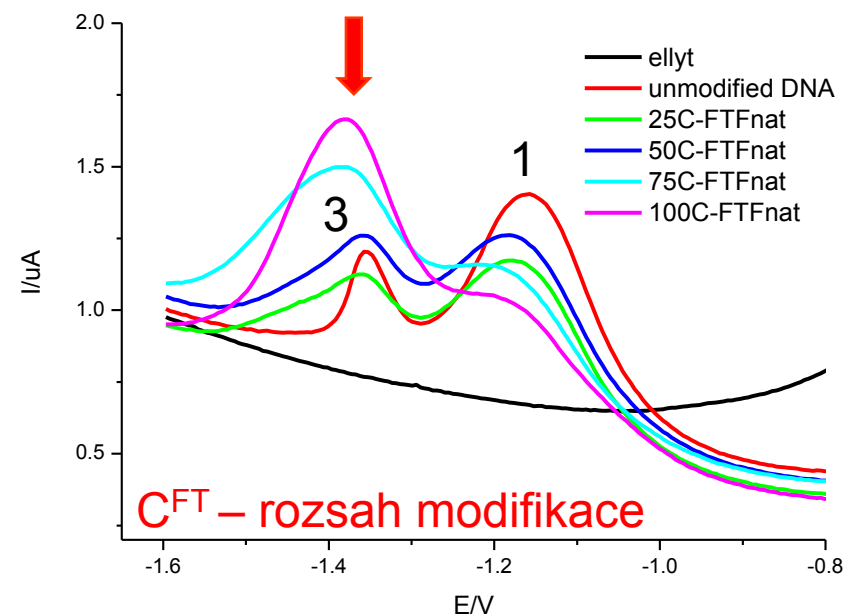
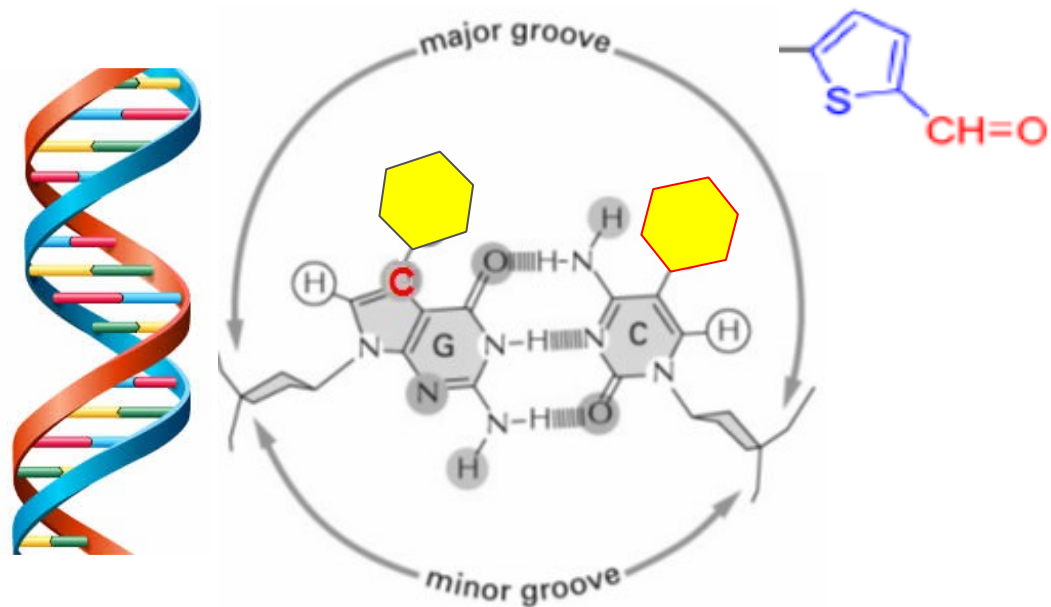
superhelikální DNA

interkalace: interakce DNA s léčivý



Modifikace DNA ve velkém žlábu

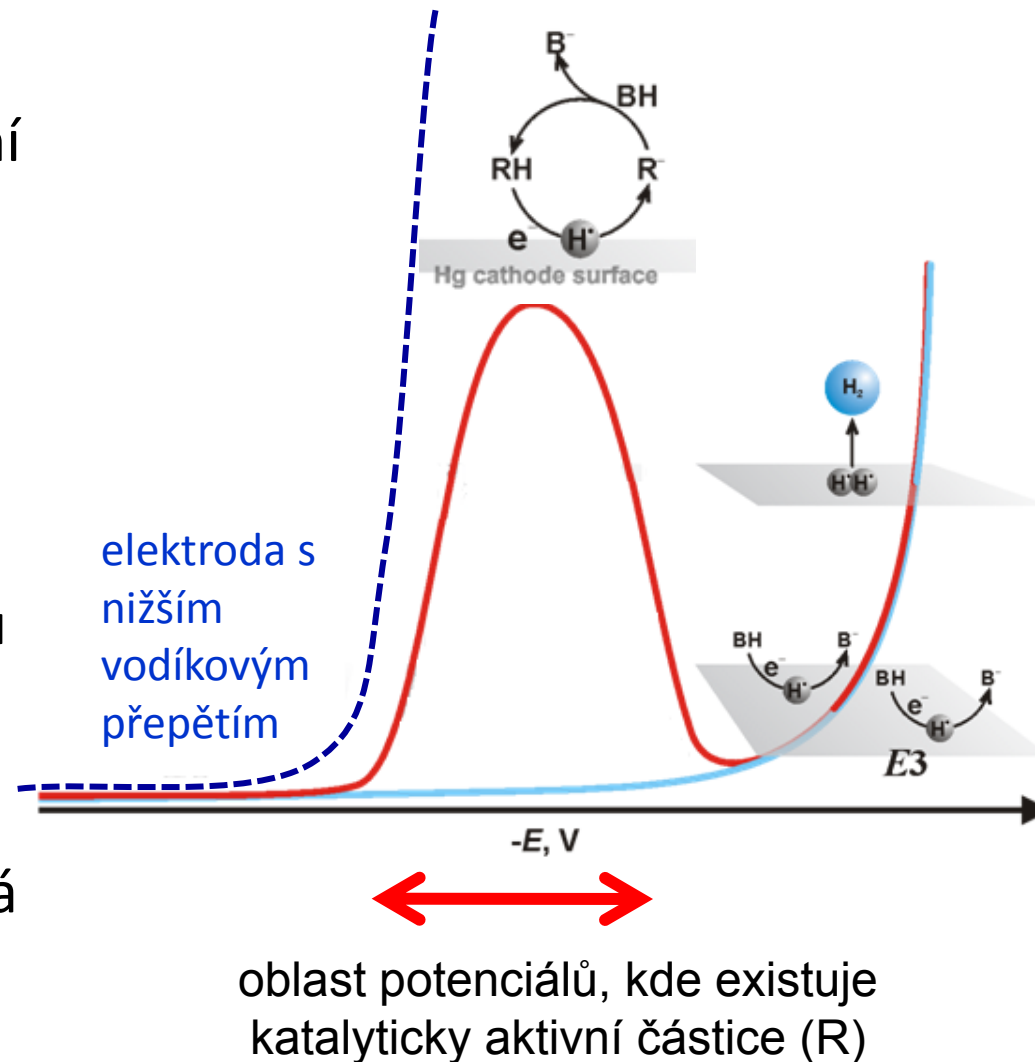
- příprava funkcionalizovaných DNA – značení, studium DNA-protein interakcí apod.
- objemné aromatické skupiny navázané na báze tak, že jsou přístupné přes velký žlábek
- ovlivní adsorpčně-desorpční chování dvouřetězcové DNA



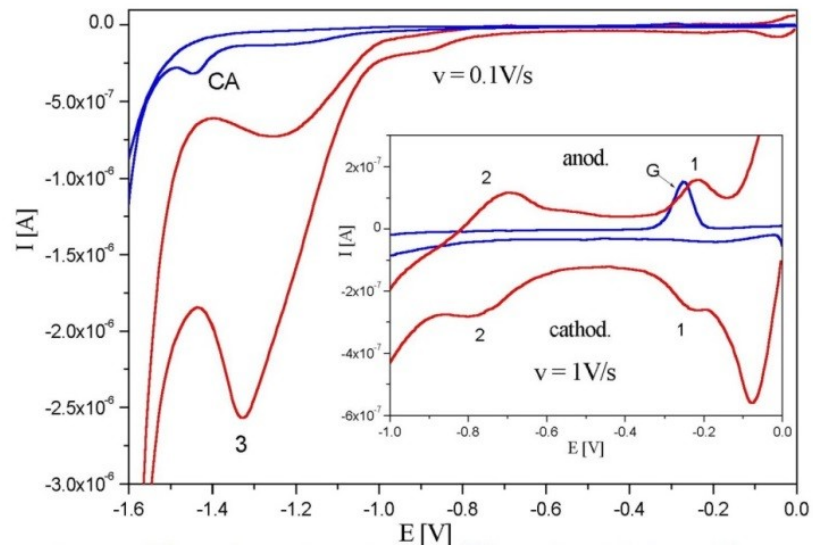
Katalytické vylučování vodíku na rtuťových elektrodách

Katalytické vylučování vodíku na rtuťových elektrodách

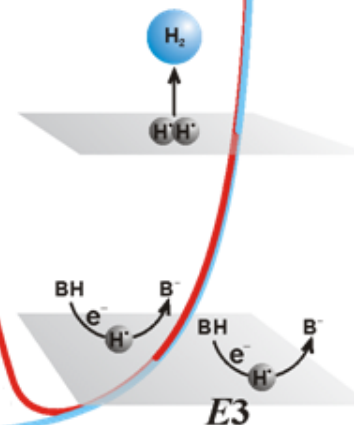
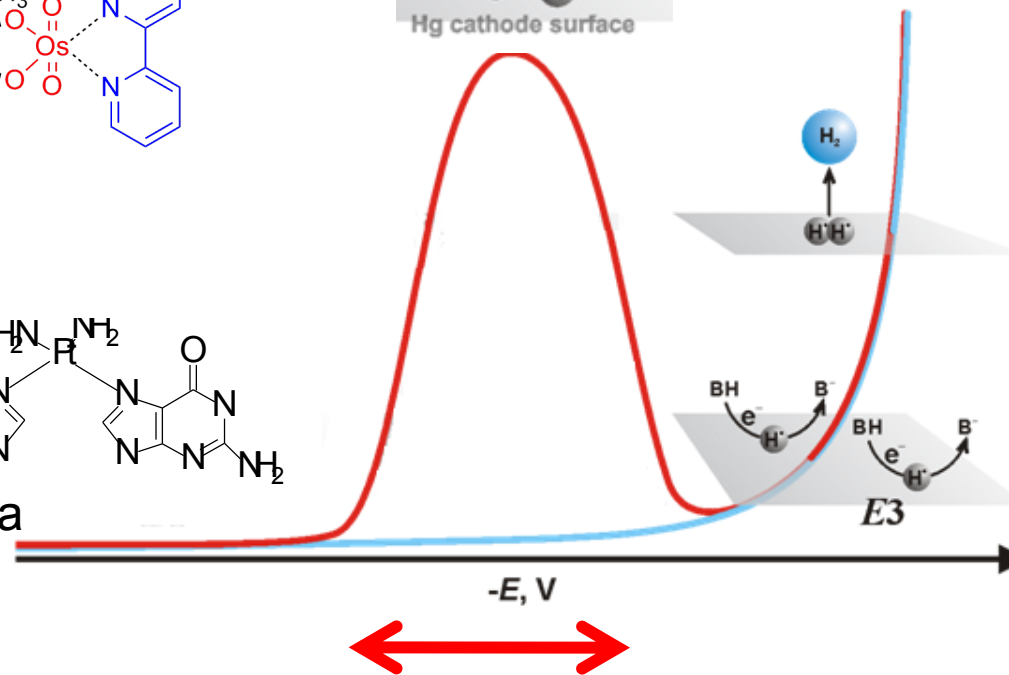
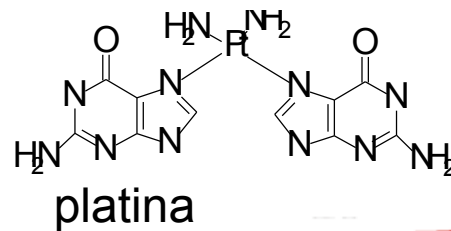
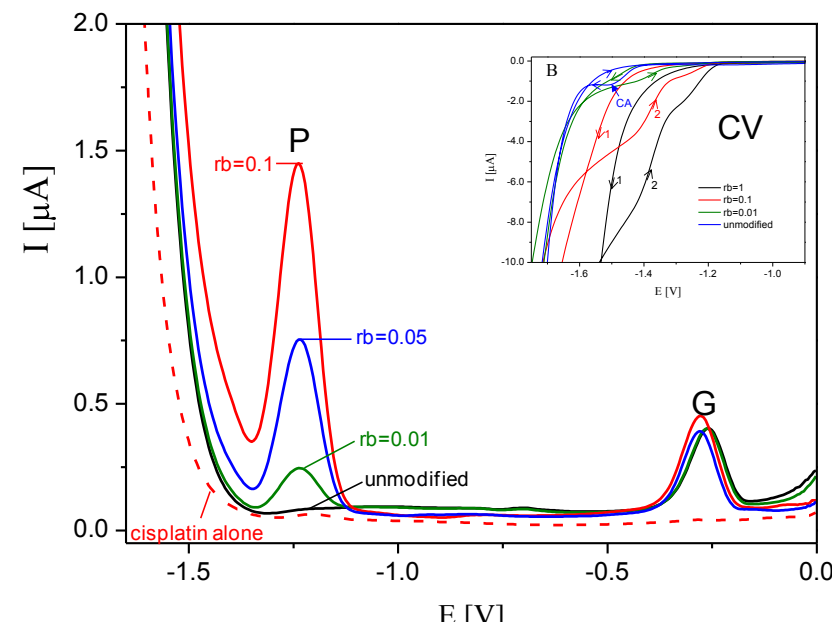
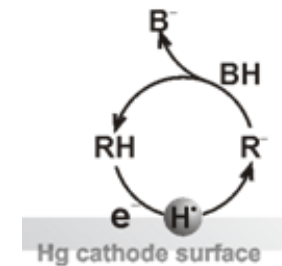
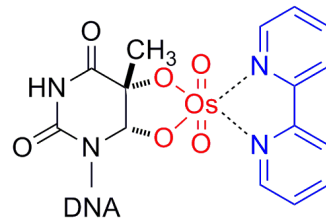
- lze měřit díky dostatečně vysokému vodíkovému přepětí (=vysoká aktivační energie pro redukci protonů H^+)
- katalýza: obecně usnadnění nějakého procesu snížením aktivační energie
- katalyzátory elektrochemicky generované v určité oblasti potenciálů
- katalyzátor se nepotřebává \rightarrow zprostředkuje redukci mnoha protonů \rightarrow velký elektronový výtěžek \rightarrow vysoká citlivost



Katalytické vylučování vodíku doprovázející redukcí komplexů přechodných kovů/jejich aduktů s DNA

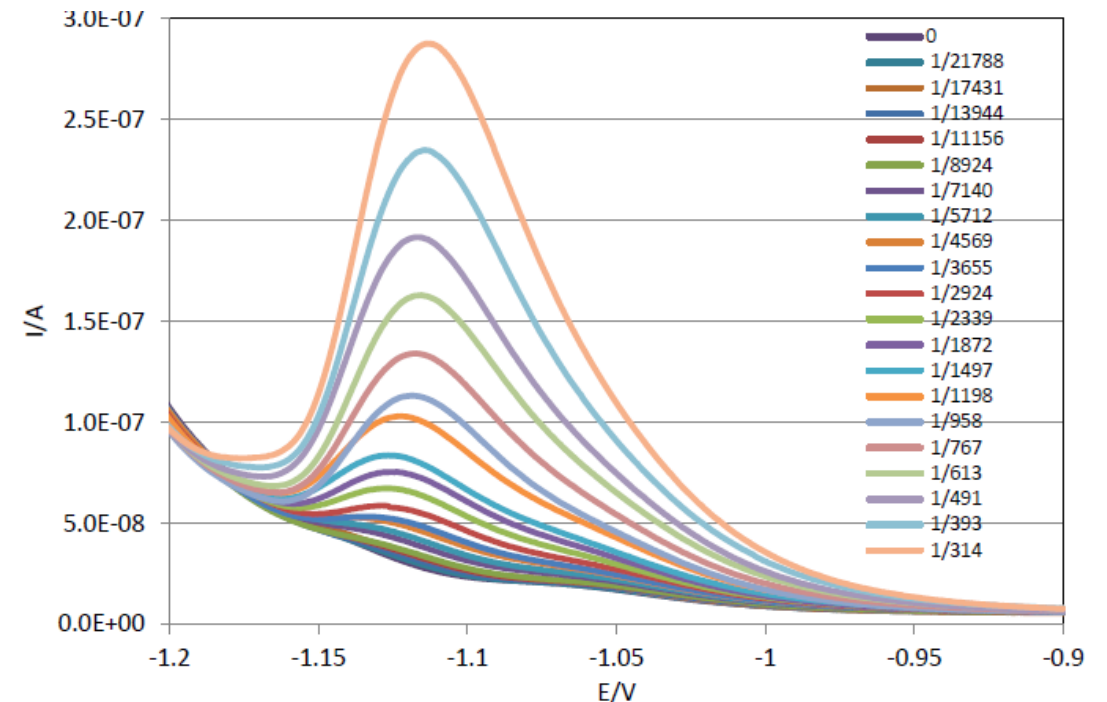


osmium



Nepřirozené páry bazí pro rozšíření genetického kódu: extrémně citlivé stanovení pomocí elektrokatalýzy na rtuti

- vývoj semisyntetických organismů schopných replikovat nepřirozené páry bází (Romesberg et al)
- rozšíření písmen genetické abecedy na šest
- kódování nepřirozených aminokyselin, syntéza nepřirozených proteinů
- nová úroveň biotechnologií, vývoj léků
- potřeba stanovovat jednoduše, přesně a citlivě malá množství nepřirozených bp v nadbytku normální DNA
- **elektrochemie na rtuťové elektrodě se ukazuje jako nejlepší volba!**



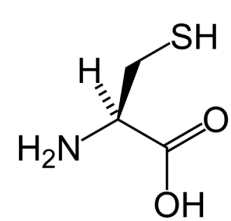
Elektrochemie proteinů



-prakticky od objevu polarografie

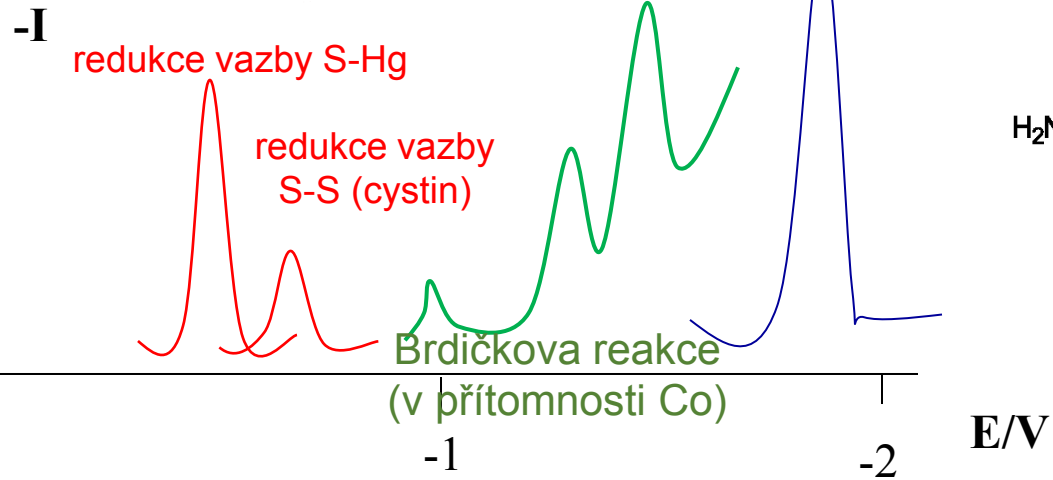
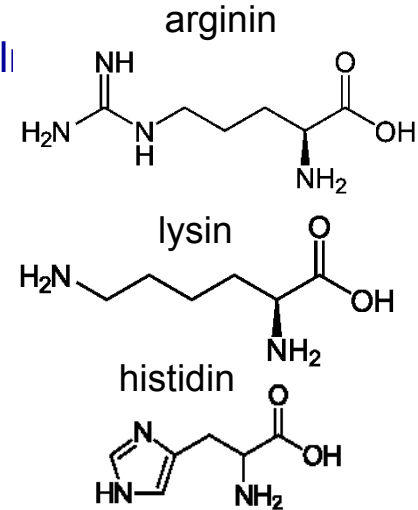
-odvozena od elektrochemie jejich složek, tj. aminokyselin

RTUŤOVÉ ELEKTRODY



katalytické vylučování vodíku

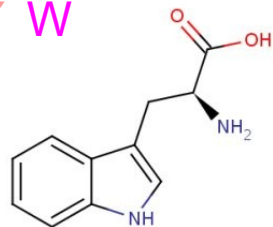
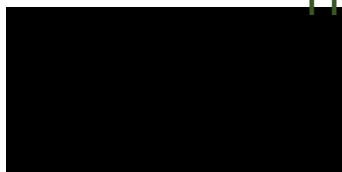
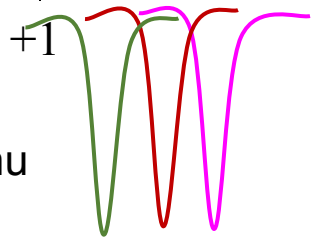
prenatiová vlna
pík H



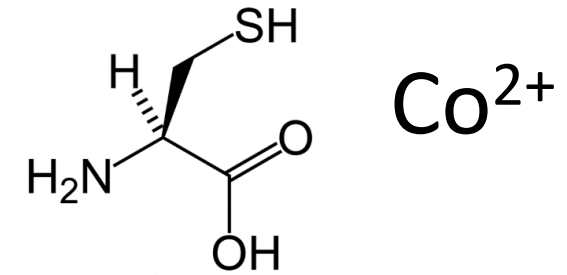
signály peptidů a proteinů obsahujících cystein (cystin)

UHLÍKOVÉ ELEKTRODY

elektrochemická oxidace tryptofanu, tyrozinu a histidinu

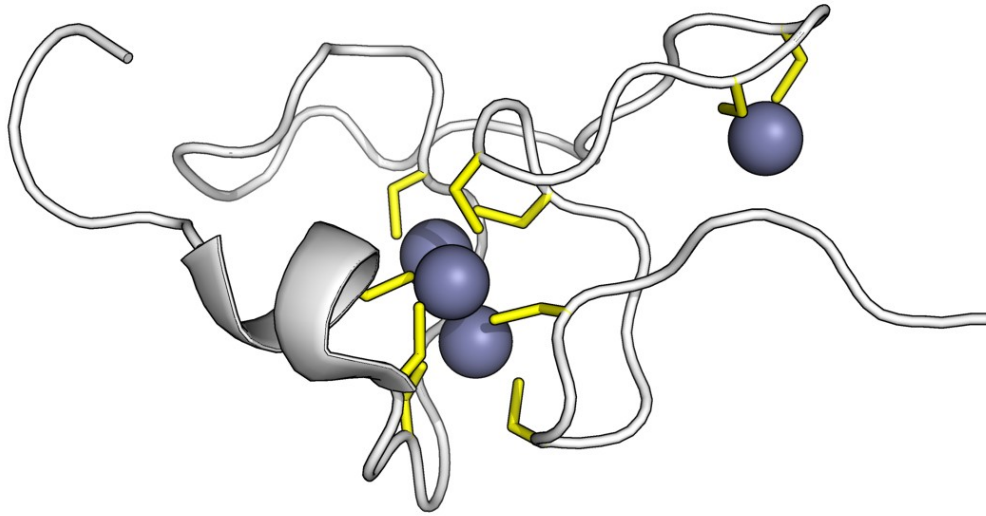


Brdičkova reakce



- nutná přítomnost **cysteinu** a iontů **kobaltu**
- ne úplně pochopený mechanismus: katalytické děje i přímá redukce stabilních komplexů (Cys)_nCo(II)
- 2-3 charakteristické „vlny“, jejich intenzita závisí na počtu cysteinových zbytků, jejich přístupnosti, prostředí, ve kterém se nacházejí v rámci molekuly proteinu (okolní AK atd.)
- z (bio)analytického hlediska zaslouží tato technika zvláštní pozornost v souvislosti s **proteiny a peptidy bohatými na cystein: metalothioneiny, fytochelatiny**

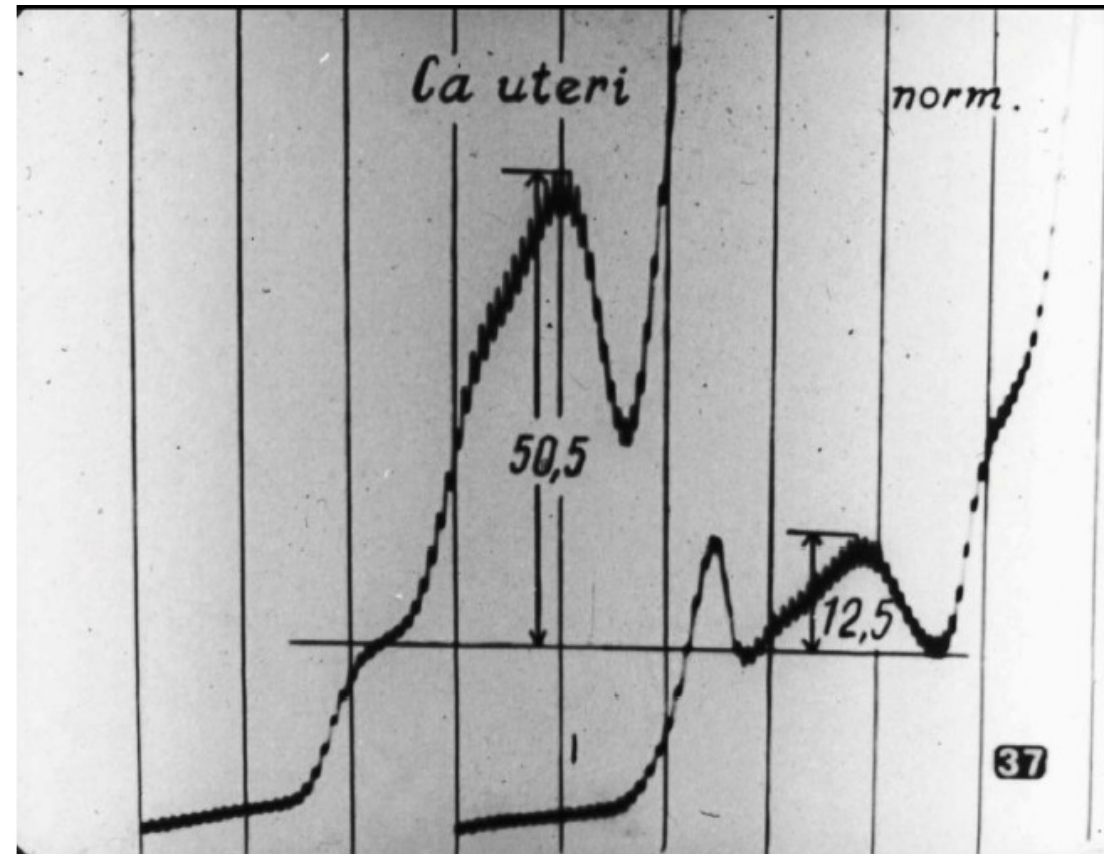
Jednoduché stanovení metalothioneinů a fytochelatinů



metalothionein (komplex se zinečnatými ionty)

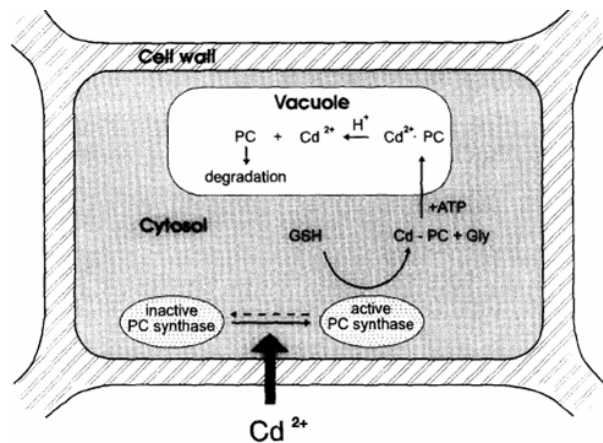
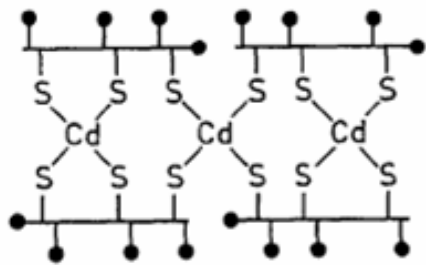
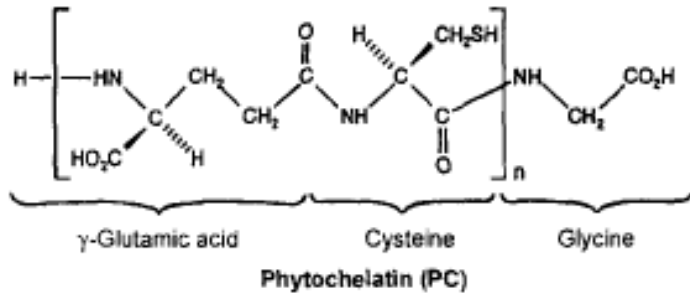
- kdysi poměrně rozšířený diagnostický test
- R. Kizek a kol. (MENDELU)
- rakovina a metalothioneiny

Brdičkova reakce a diagnostika rakoviny?

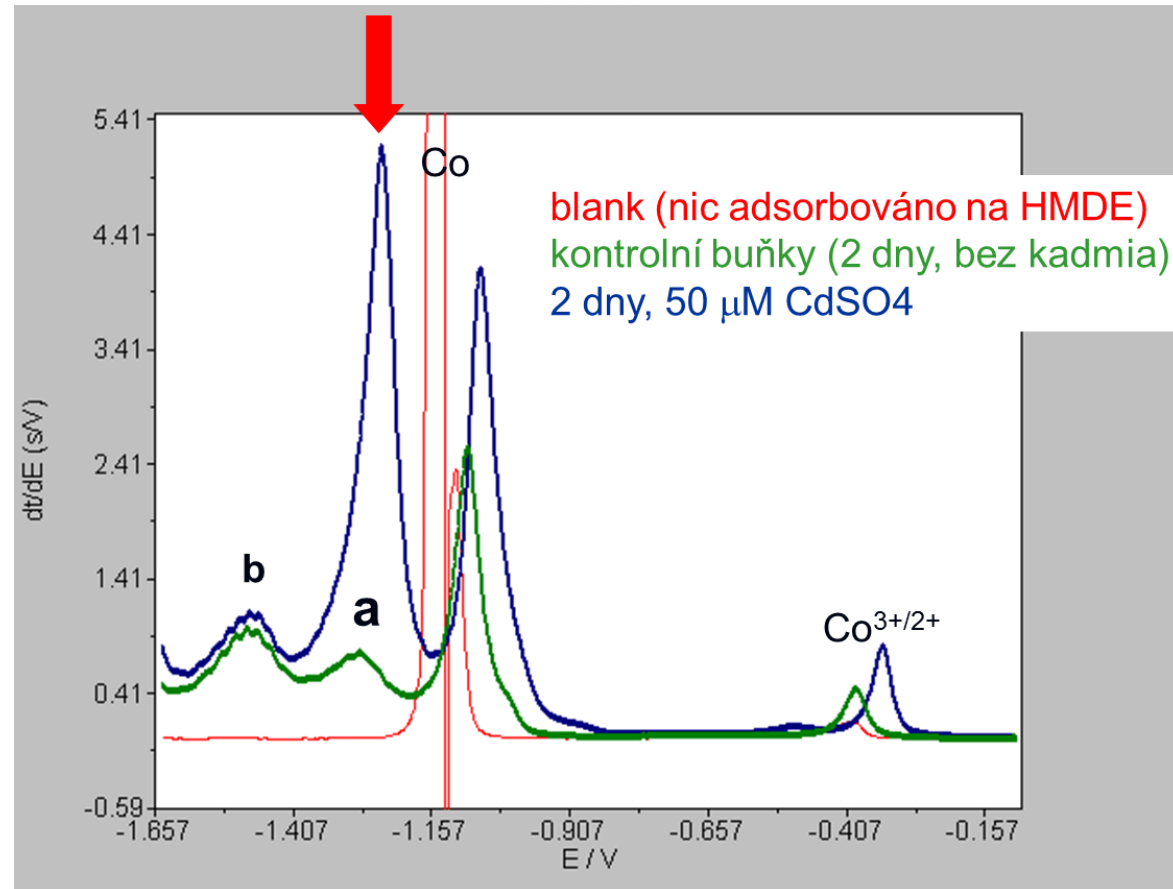


Jednoduché stanovení metalothioneinů a fytochelatinů

fytochelatiny: každá cca druhá AK cystein

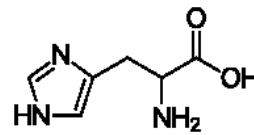
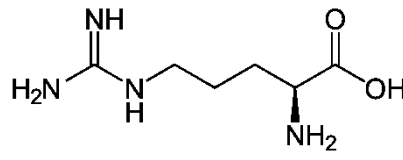
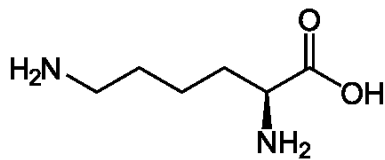


Lze fytochelatiny stanovit elektrochemicky
co nejjednoduším způsobem?



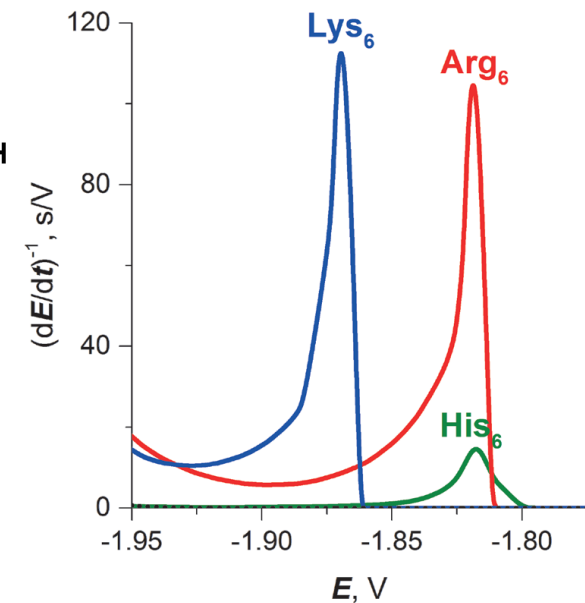
pík H a strukturně citlivá analýza proteinů

- katalytický proces na rtuťové elektrodě (aminokyseliny nesoucí labilním proton: lyzin, arginin, histidin)

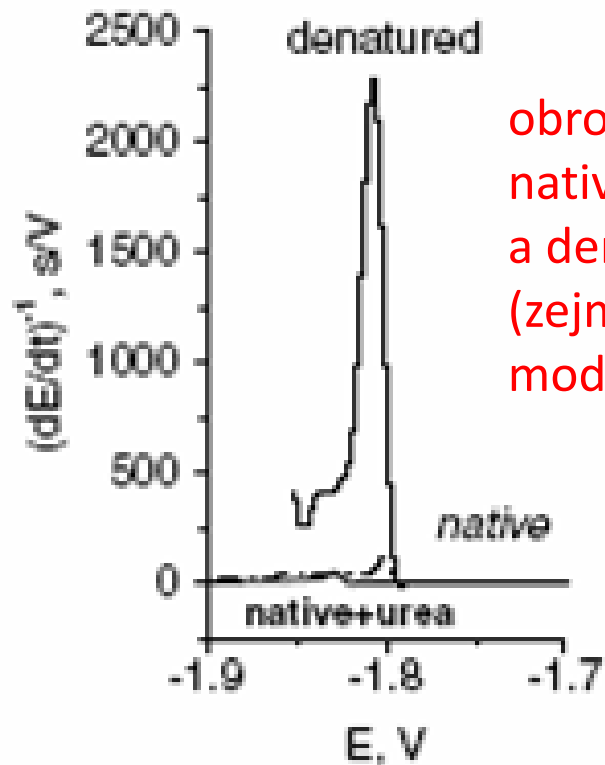


- vysoká citlivost detekce peptidů a bílkovin
- citlivost k

- agregaci bílkovin
- denaturaci bílkovin („unfolding“)
- změnám redox stavu peptidů a bílkovin (-SH vs. -S-S-)
- záměnám jednotlivých aminokyselin (rozlišení standardních a mutantních bílkovin)

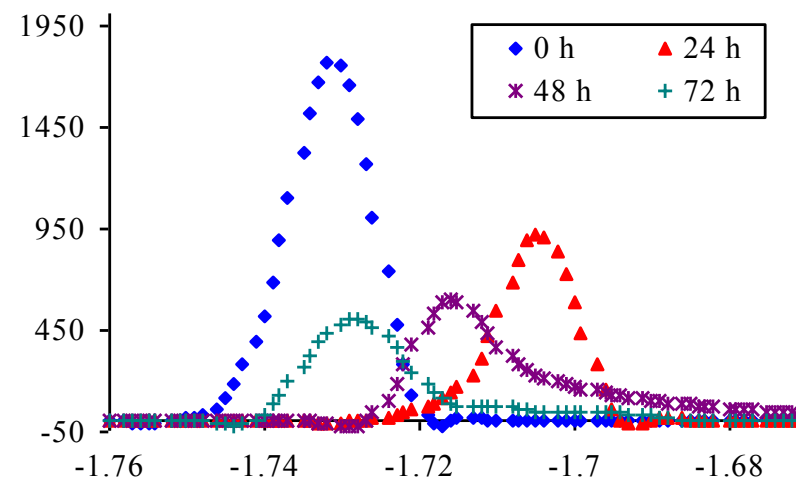


pík H a strukturně citlivá analýza proteinů



obrovský rozdíl mezi
nativními
a denaturovanými proteiny
(zejm. na HMDE
modifikované DTT)

agregace α -synucleinu (Parkinsonova choroba):
elektrochemie unikátně rozliší časně fáze agregace



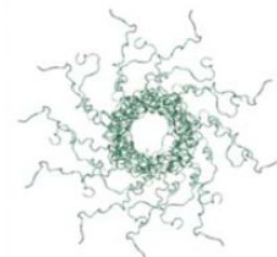
(b)



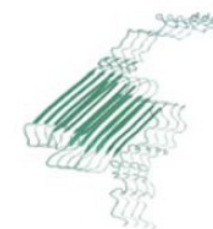
Native monomer



Unfolded monomer

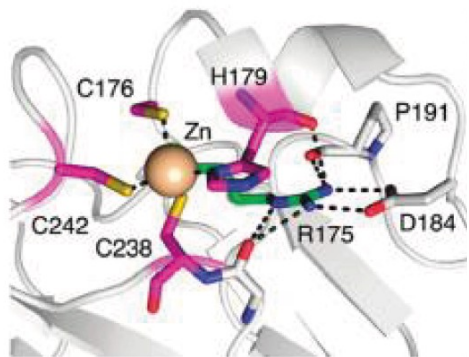


Oligomer



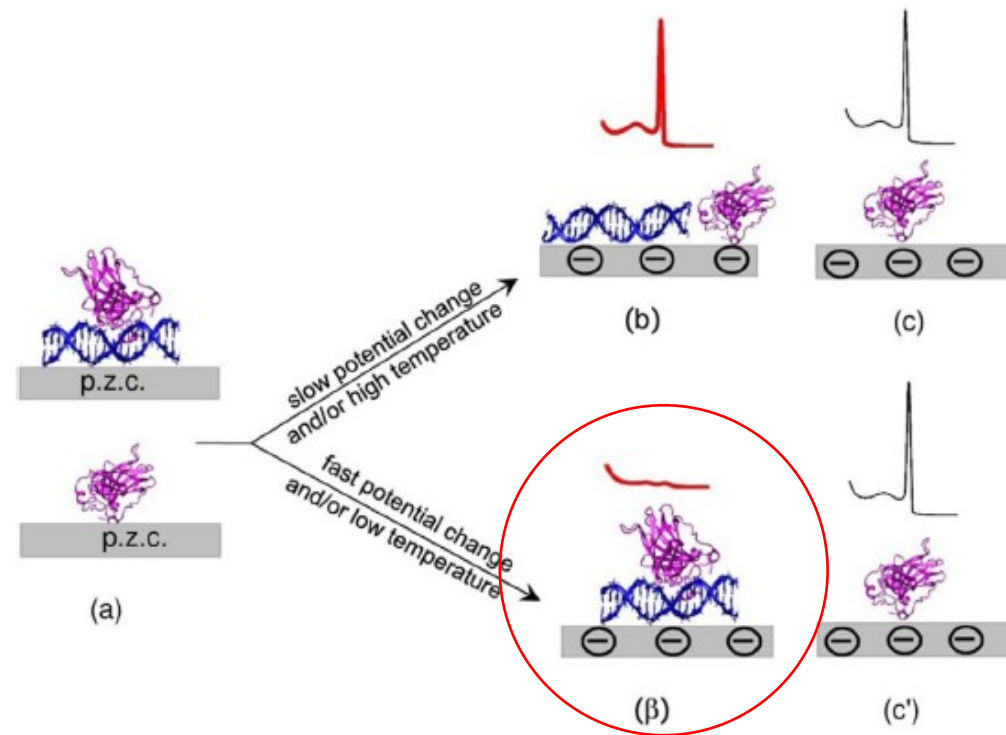
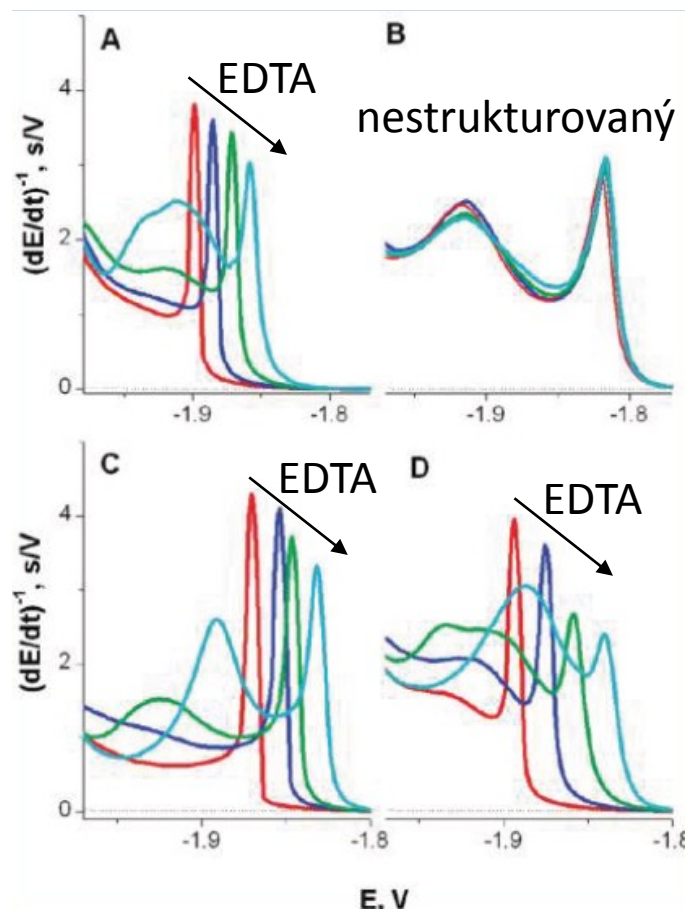
Fibril

pík H a strukturně citlivá analýza proteinů



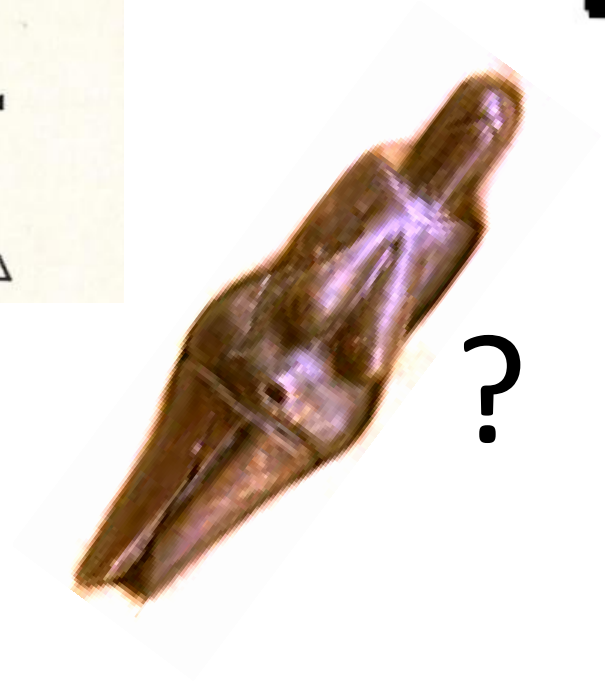
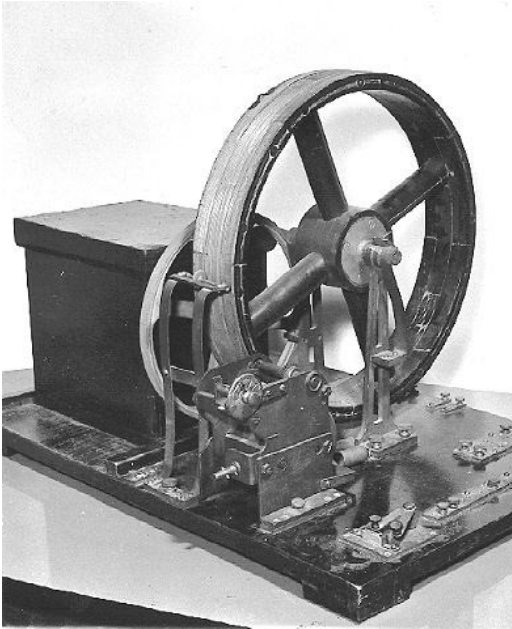
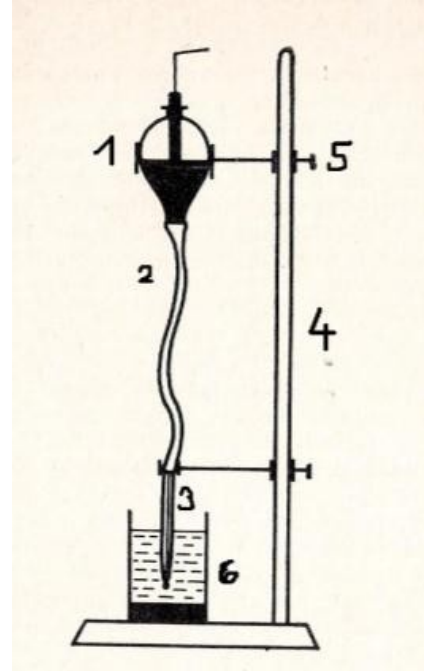
„unfolding“ proteinů
v důsledku odstranění
strukturně významného
iontu zinku

(protein p53,
inkubace s EDTA; srovnání
s trvale nestrukturovaným
mutantem)



DNA-protein interakce
(specifický komplex p53-DNA nedává
pík H)

rtuťová elektroda – exponát do muzea? **NE!**



Toxicita rtuti



- rtuť je toxická, ale v jaké formě?
- kovová rtuť: chemicky stálá, tudíž bezpečná
- páry: pozor na chronickou otravu, při náhodném nadýchání plně reverzibilní
- soli a jejich roztoky: toxické
- organické sloučeniny: TOXICKÉ!!!
- státy EU i jiné zakazují rtuťové elektrody (s kovovou rtutí), ale nezakazují „úsporné žárovky“
- alternativy – rtuťové filmy (sic!), amalgamy, bismut



Na rtuť z teploměru hasiči s respirátory??

Lidi neblázněte!!!

NAVÍC TOXICKÉ JSOU I JINÉ VĚCI!

Druhá tvář dnešní přednášky

- diamanty: téma dozajista netoxické a biokompatibilní 😊

