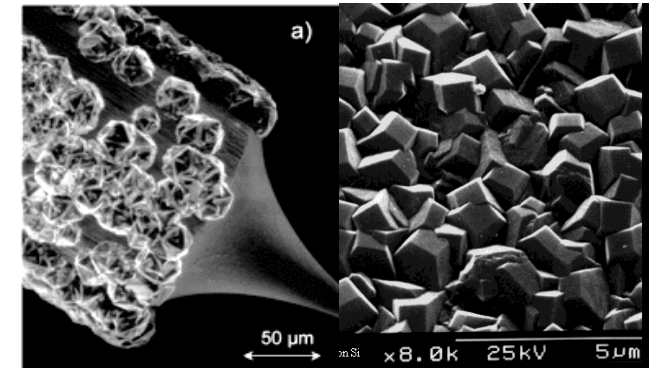


*biopolymeru,
klinické a environmentální analýzy:*

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



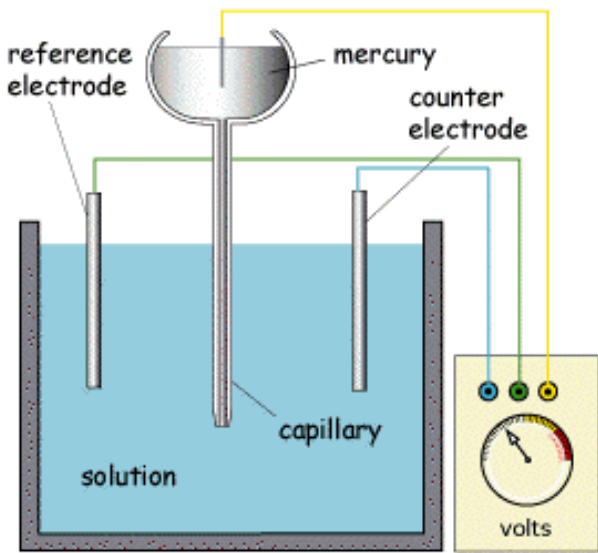
Karolina Schwarzová

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova

Miroslav Fojta

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

Elektrochemické metody ... polarografie



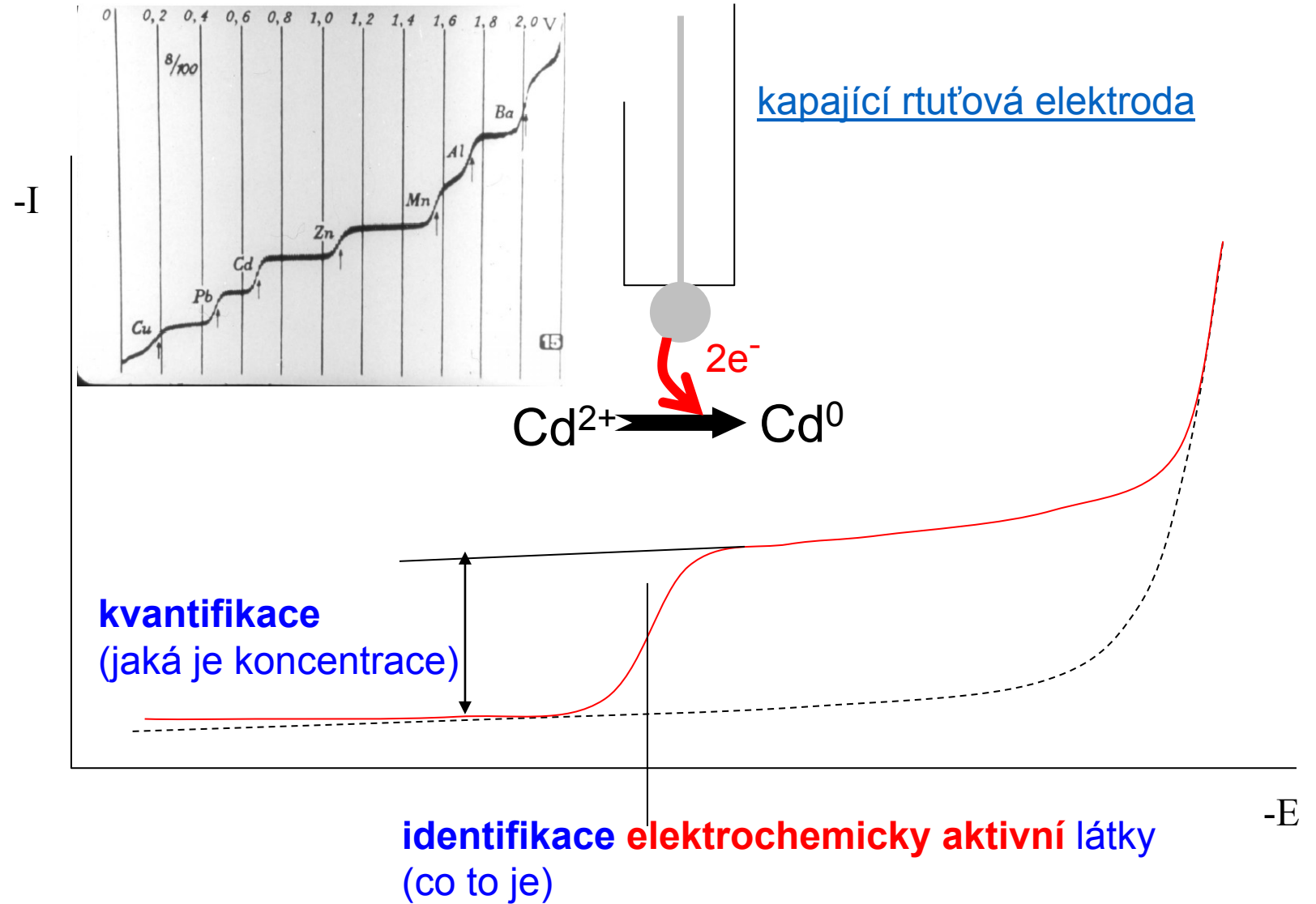
Jaroslav
Heyrovský



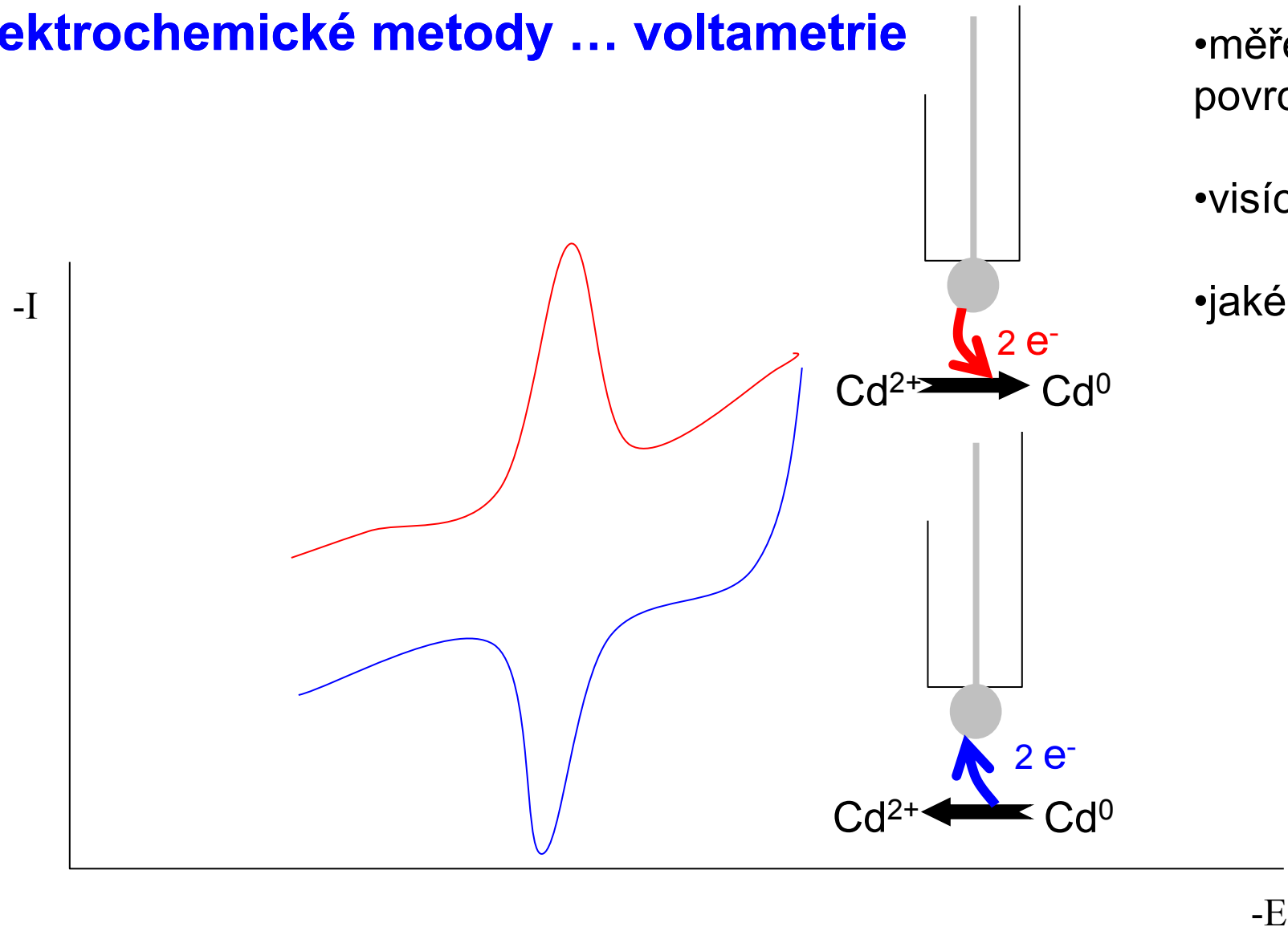
J. Heyrovský



Nobelova cena 1959



Elektrochemické metody ... voltametrie




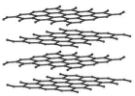

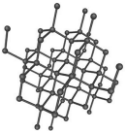
- měření na stacionárním povrchu
- visící rtuťová kapková elektroda
- jakékoli pevné elektrody

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?

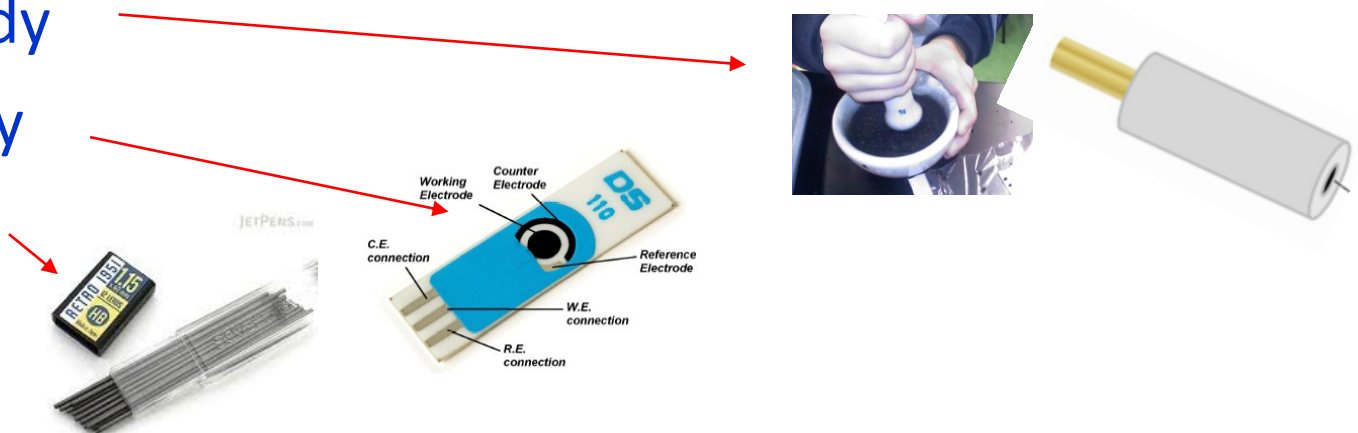
- rtuťové 
- pevné kovové (stříbrné, platinové, měděné, zlaté, bismutové, antimonové)      
- amalgamové (rtuť + jiný kov) 

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

- pastové elektrody

- tištěné elektrody

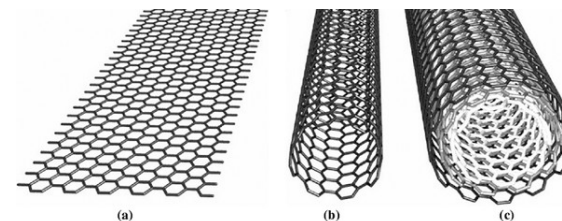
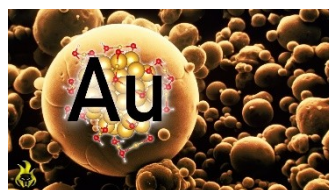
- pentilkové tuhy



Modifikace povrchů elektrod - příklady

- polyionty (elektrostatická adsorpce opačně nabitých analytů apod.)

- nanočástice, uhlíkové nanoobjekty

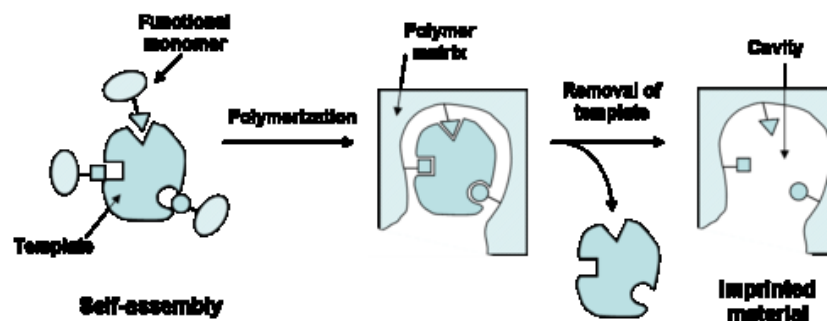


Source: Kreupl et al. (2004)

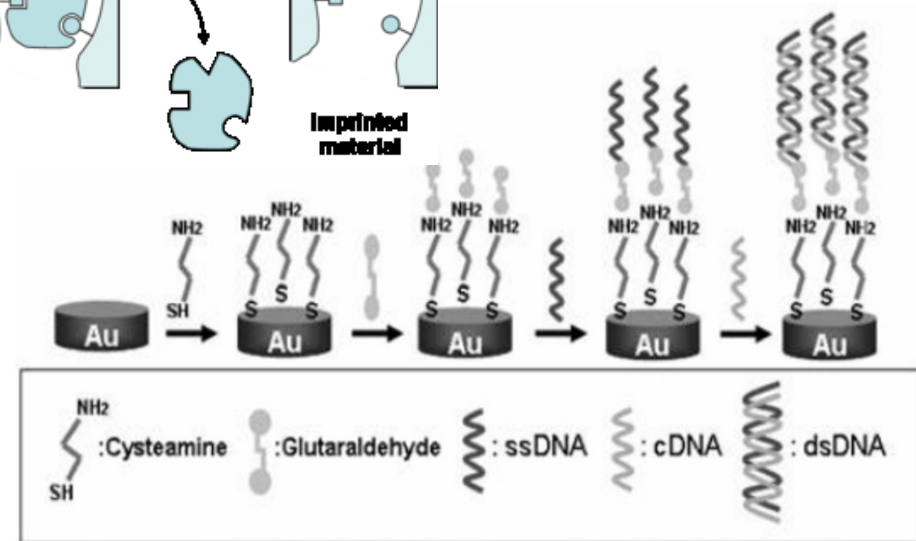
- vodivé polymery

(např. elektropolymerizovaný anilín a další aromatické aminy);

„molecular imprinting“

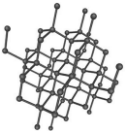

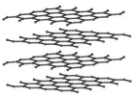



- immobilizace „bioreceptorů“ přes -SH skupiny (obvykle na zlatě)



Z čeho jsou pracovní elektrody?

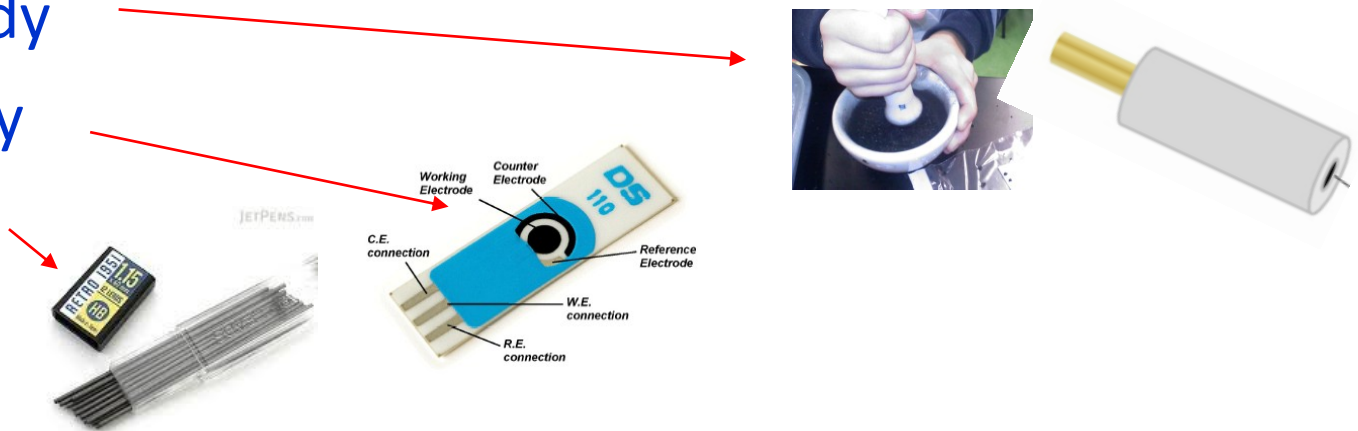
- rtuťové 
- pevné kovové (stříbrné, platinové, měděné, zlaté, bismutové, antimonové) 
- amalgamové (rtuť + jiný kov) 

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

- pastové elektrody

- tištěné elektrody

- pentilkové tuhy

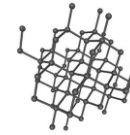


Z čeho jsou pracovní elektrody?

- **rtuťové**



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

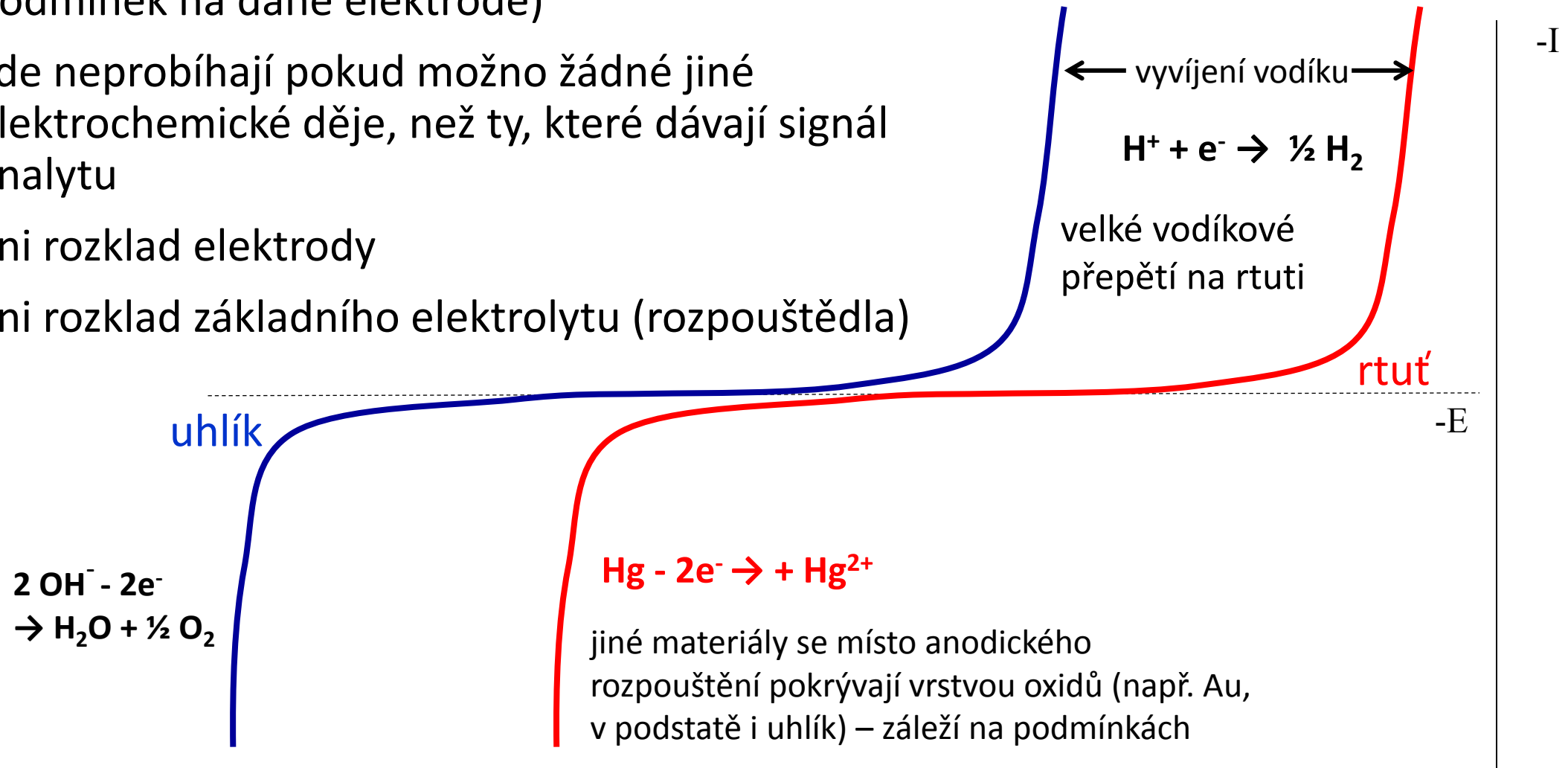


- uhlíkové: různé formy grafitu (sp^2 uhlík), **diamant (sp^3 uhlík)**
- pastové elektrody
- tištěné elektrody
- pentilkové

Méně znamená často více!

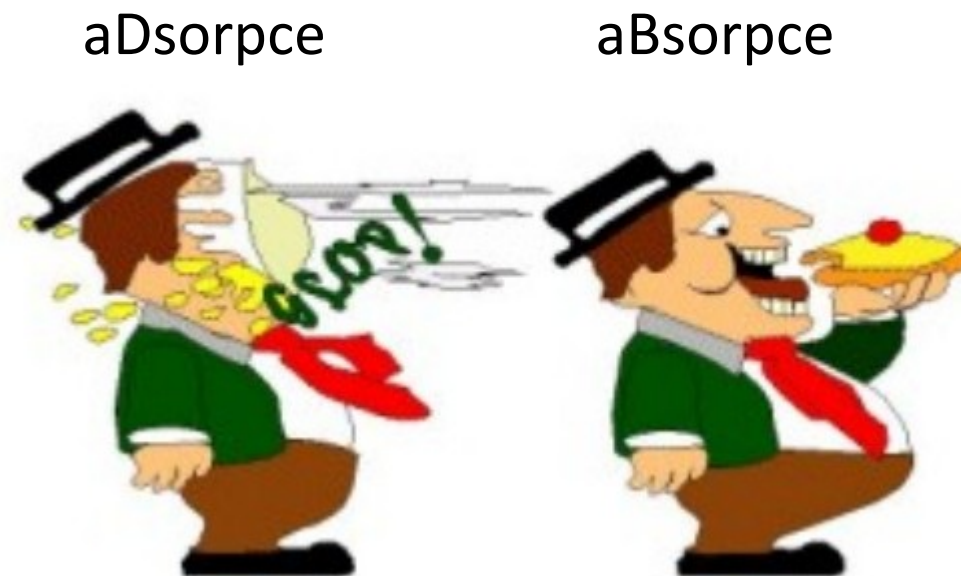
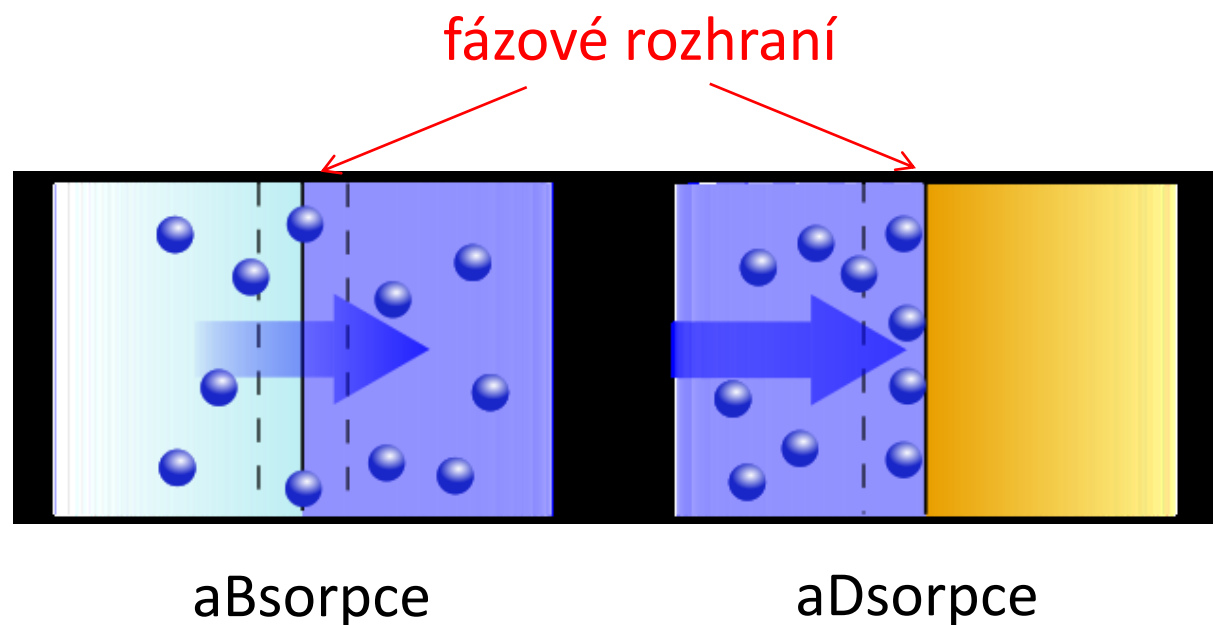
Potenciálové (pracovní) okno

- 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

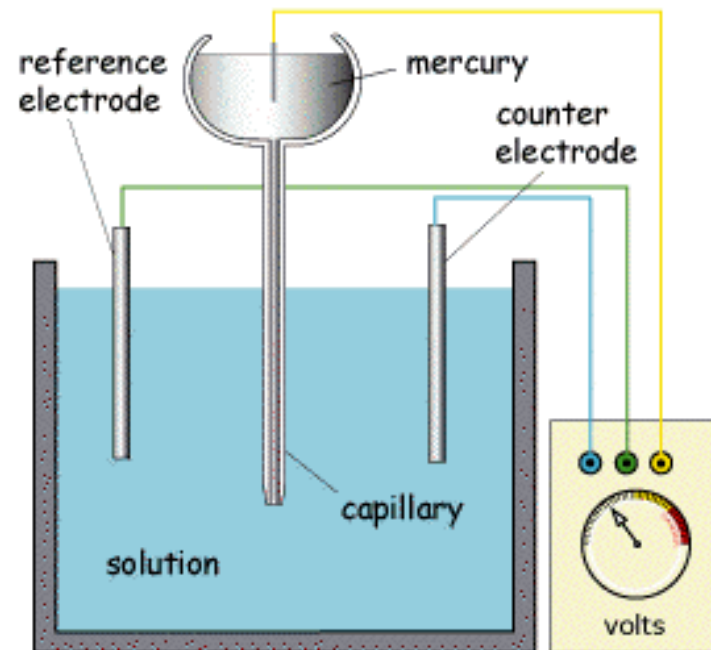
Adsorpce jako nepřítel:

- „*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:

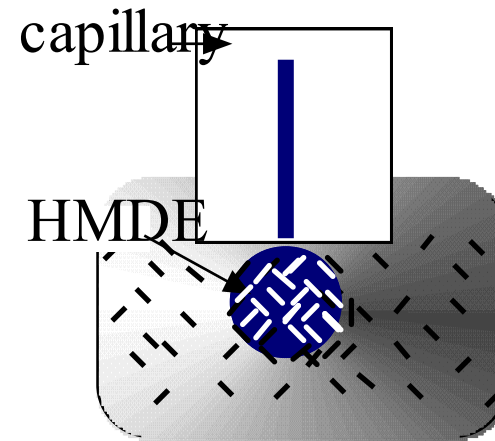
- v případě rtuťové kapkové elektrody **není problém** – nová kapka
- pevné elektrody:
 - mechanicky (obrousit, přešetřit)
 - chemicky (např. „*piranha solution*“)
 - elektrochemicky (anodicky nebo katodicky)
 - **většinou komplikace**



Adsorpce, pasivace a obnovování povrchu

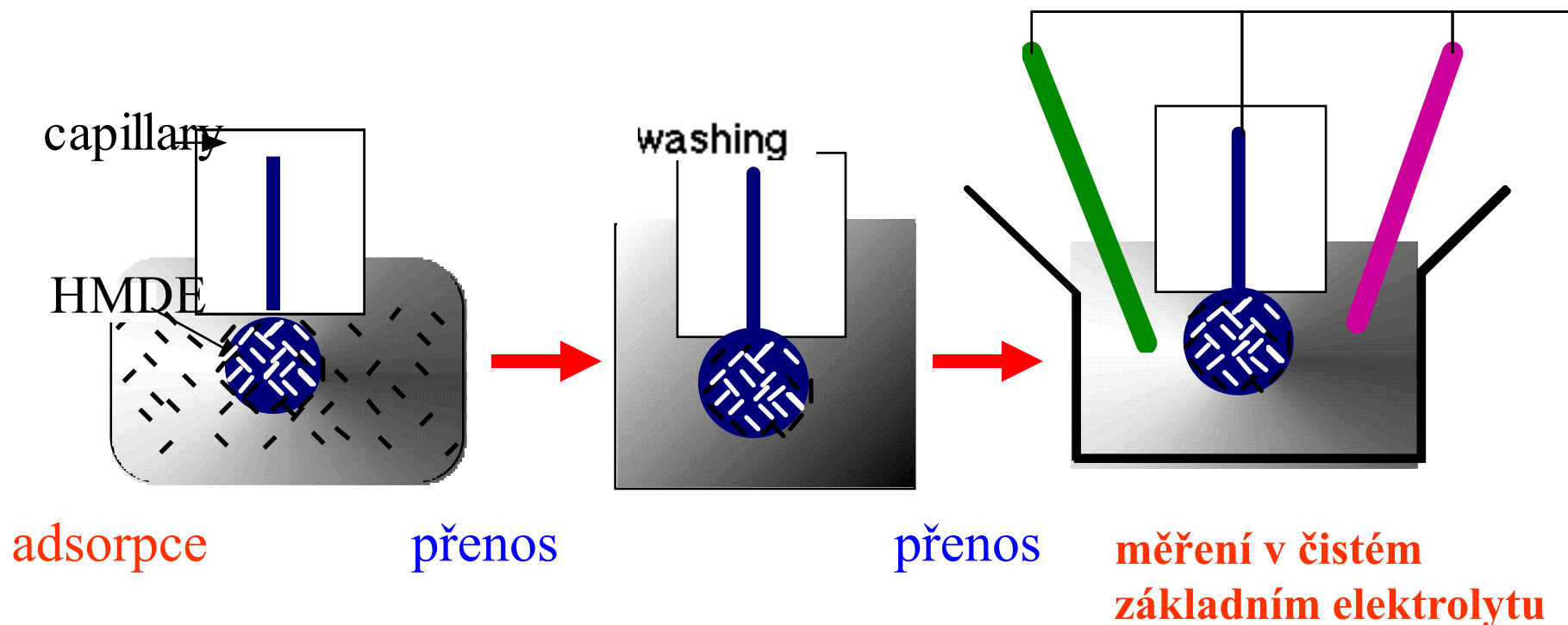
Adsorpce jako kamarád:

- 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

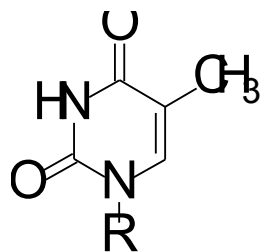
Adsorpce, pasivace a obnovování povrchu

Adsorpce jako kamarád:

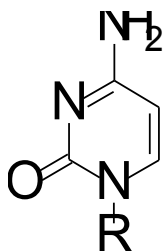
- adsorpčně/desorpční děje na povrchu elektrody lze měřit
- analyticky užitečné kapacitní (tensametrické) signály
- v případě nukleových kyselin na negativně nabitém povrchu rtuti jsou tyto signály vysoce citlivé k jejich struktuře
- rozhoduje, které složky DNA se adsorpčně-desorpčních procesů účastní

Co to jsou nukleové kyseliny?

pyrimidiny



thymine (T)

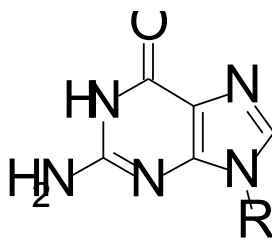


cytosine (C)



adenine (A)

puriny

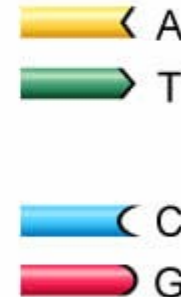


guanine (G)

dvoušroubovice DNA

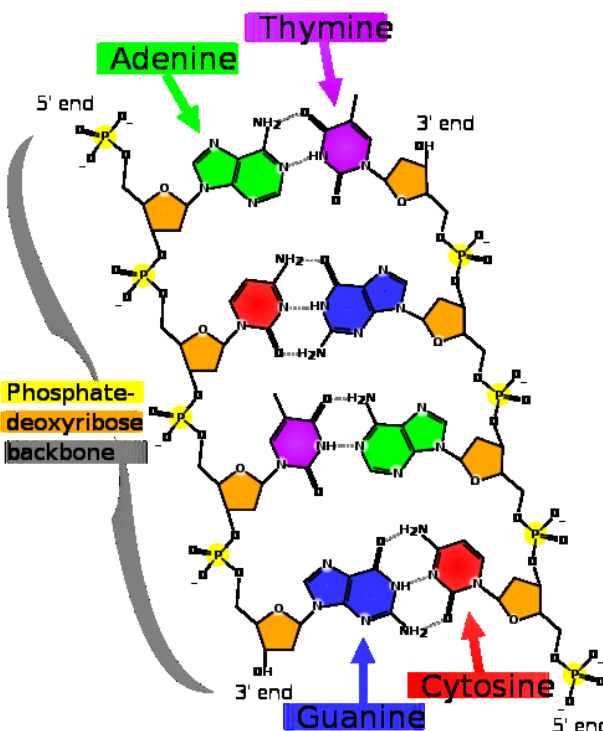
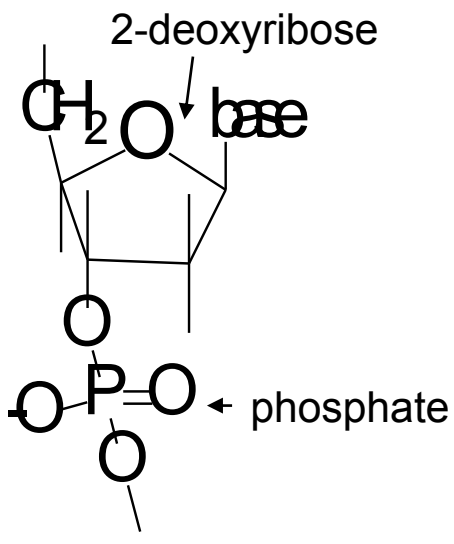
malý žlábek

velký žlábek

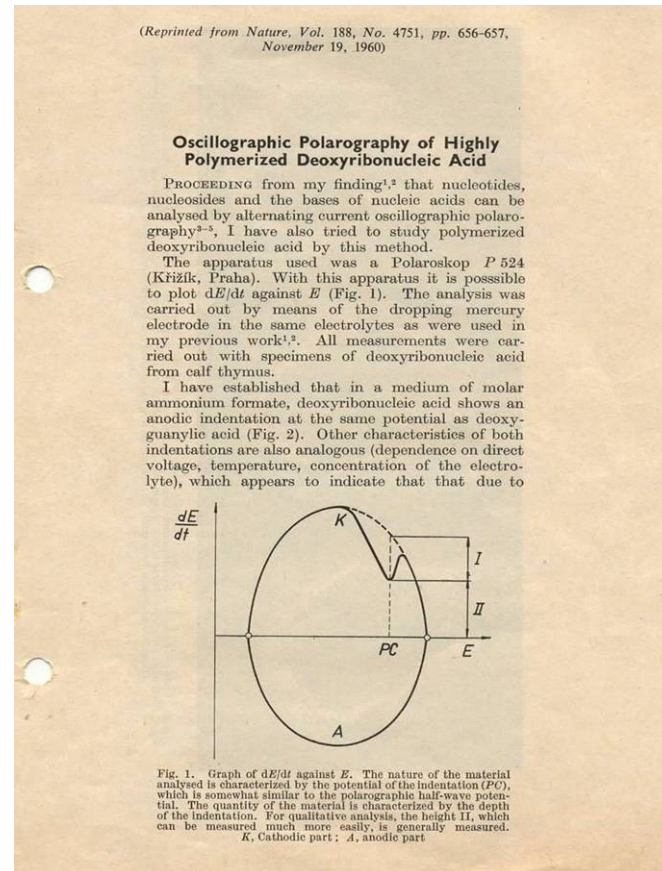


párování bází

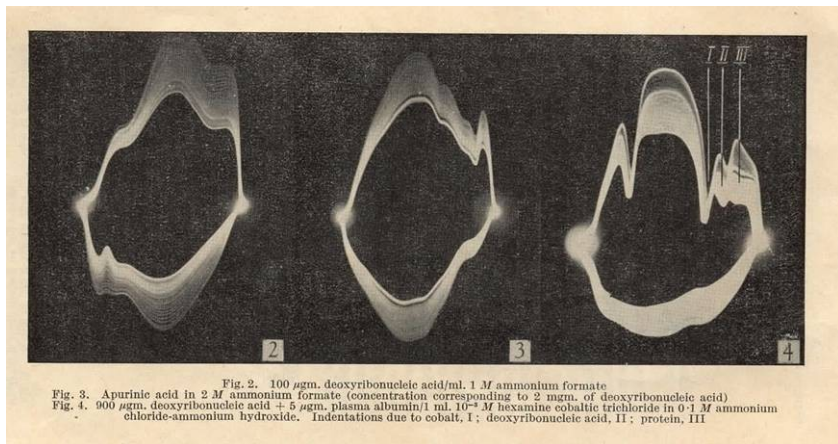
nukleotid



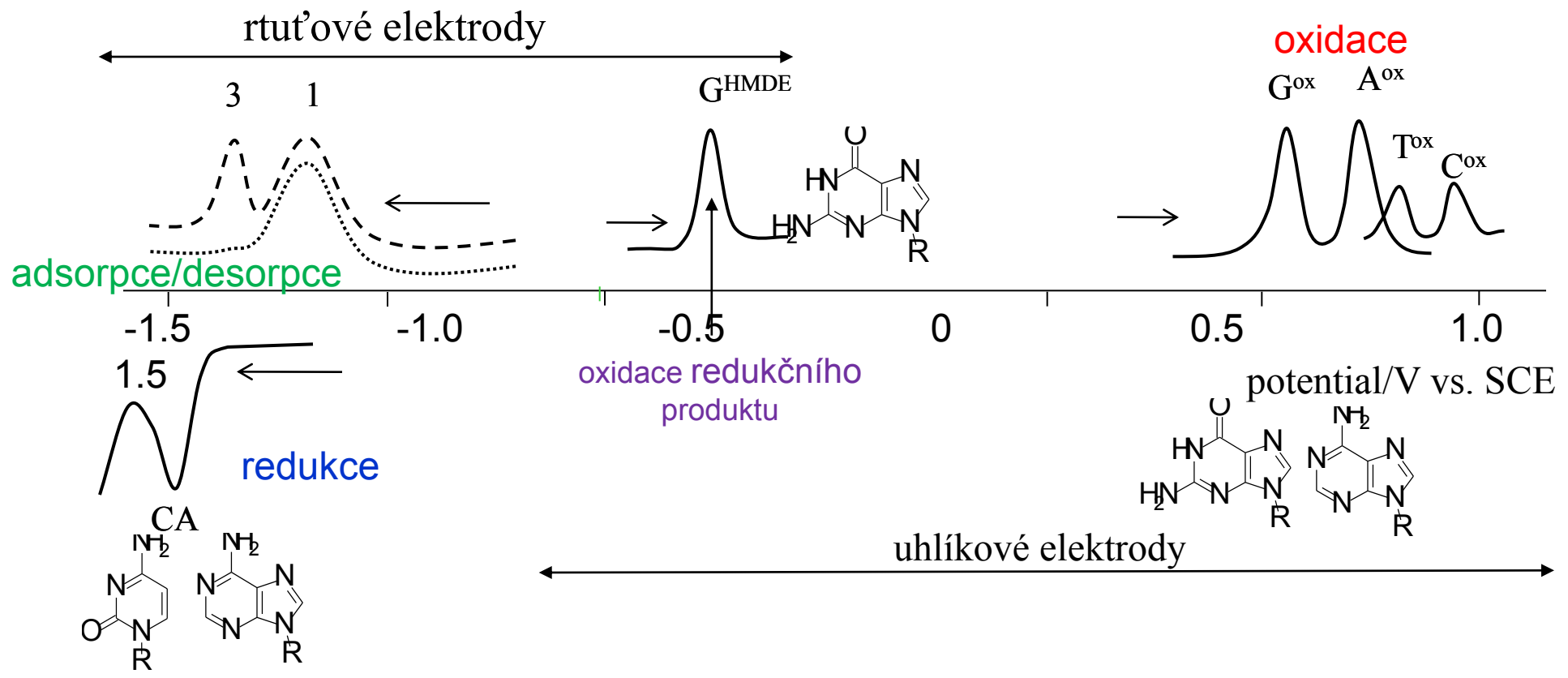
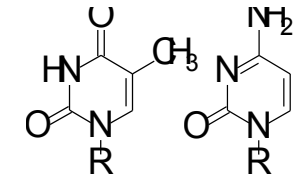
Emil Paleček (50. léta): objev polarografie DNA



Česká Hlava 2014



Přehled elektrochemie (přírodních) NK



Podrýváme dogmata...



Contents lists available at ScienceDirect

Electrochemistry Communications

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



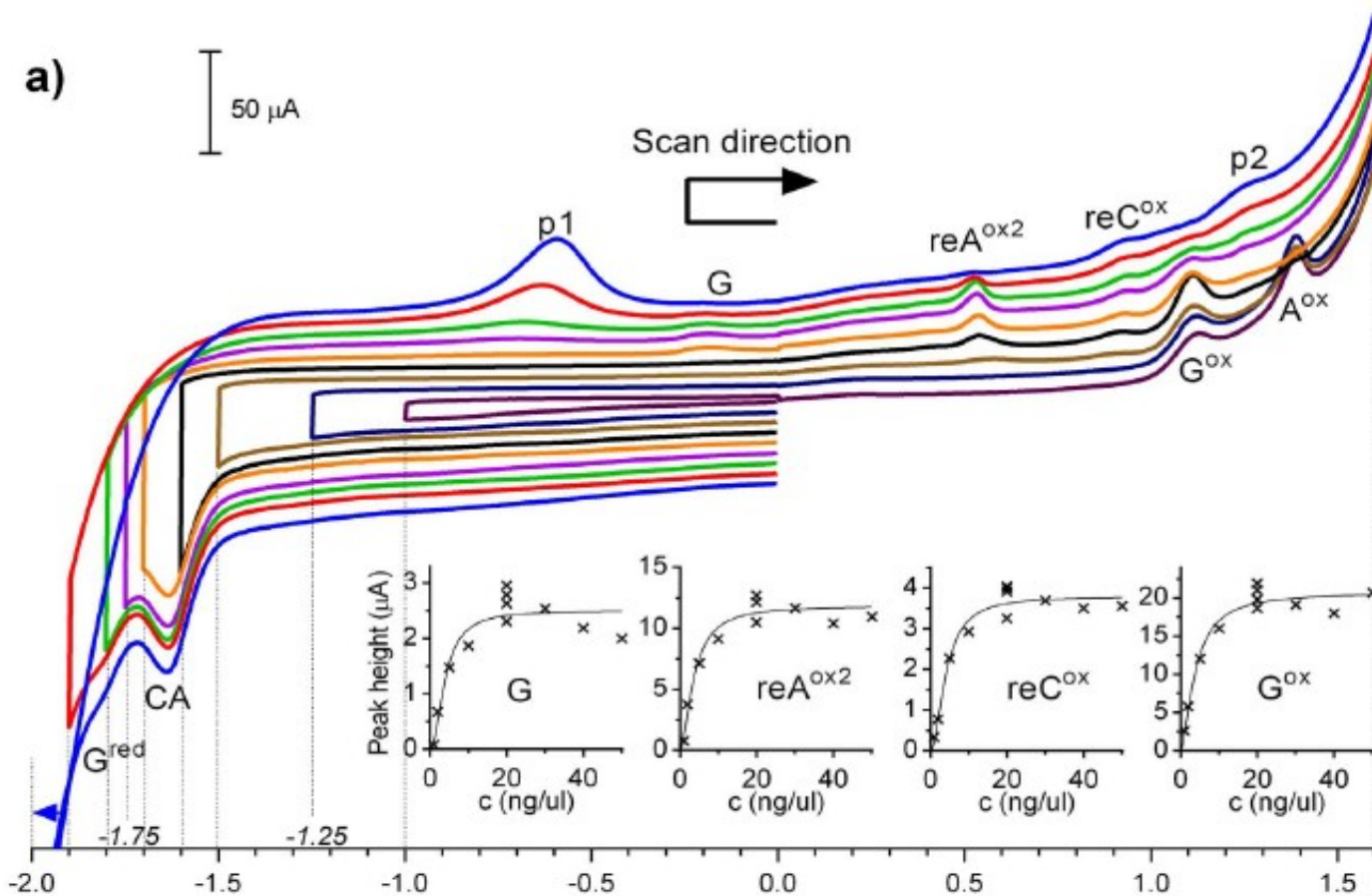
redukce bází na uhlíku

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

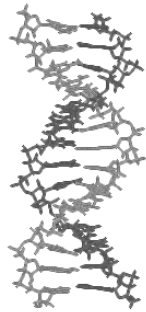


+ další možnosti detekce produktů redukce nebo oxidace bází

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

Adsorpčně-desorpční procesy DNA na negativně nabitém Hg povrchu

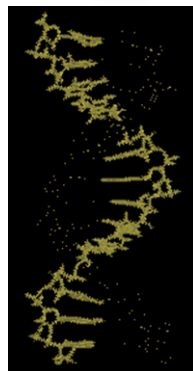
dvoušroubovice



deformovaná dvoušroubovice

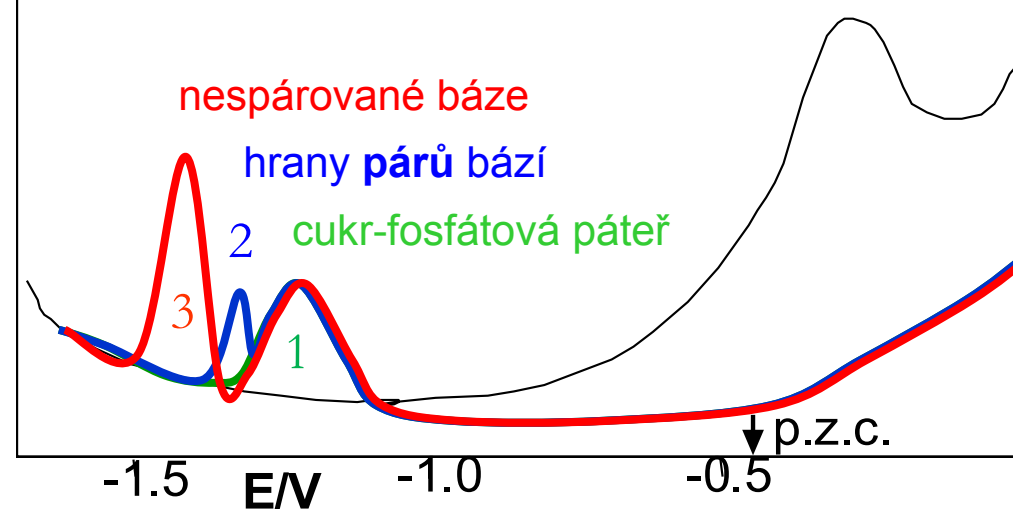


jednořetězcová DNA



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

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



Píky 2 a 3: informace o struktuře DNA

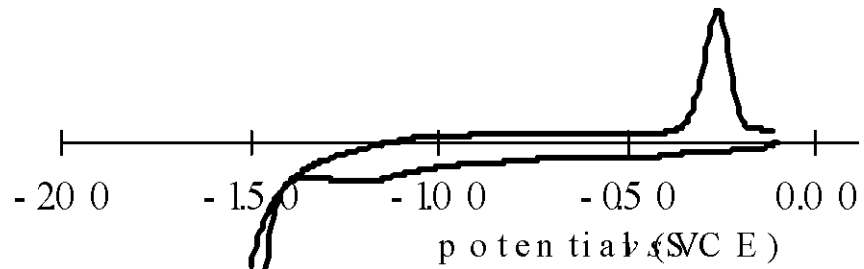
Nucleic acids are electrochemically reducible/oxidizable

- at mercury electrodes, bases A,C and G can be reduced; reduction of guanine is chemically reversible
- at carbon electrodes, purine bases can be oxidized
- sugar residues in nucleic acids can be oxidized at copper electrode

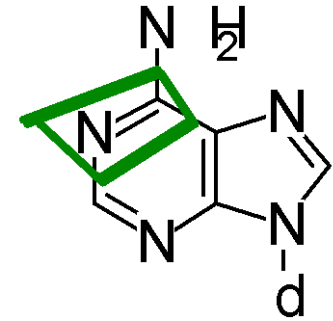
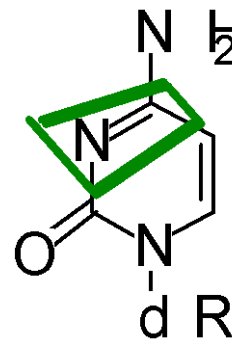
Nucleic acids are electrochemically reducible/oxidizable

- at mercury electrodes, bases A,C and G can be reduced; reduction of guanine is chemically reversible
- at carbon electrodes, ~~purine~~ ALL bases can be oxidized OR REDUCED
- sugar residues in nucleic acids can be oxidized at copper electrode

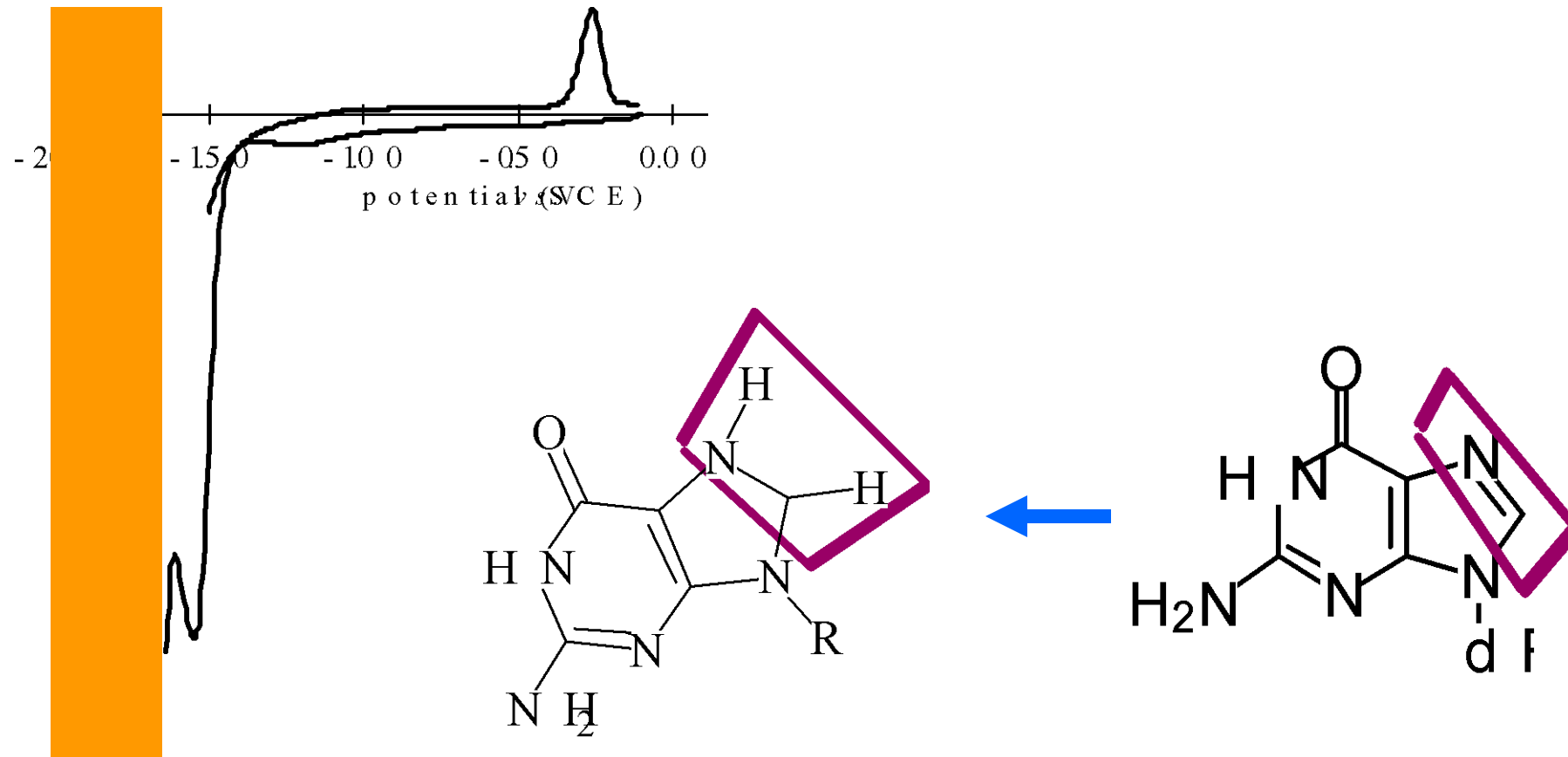
adenine and cytosine are irreversibly reduced



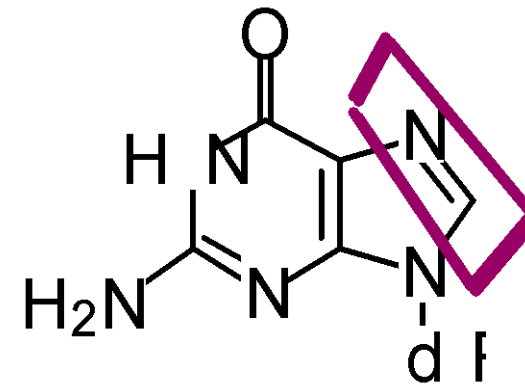
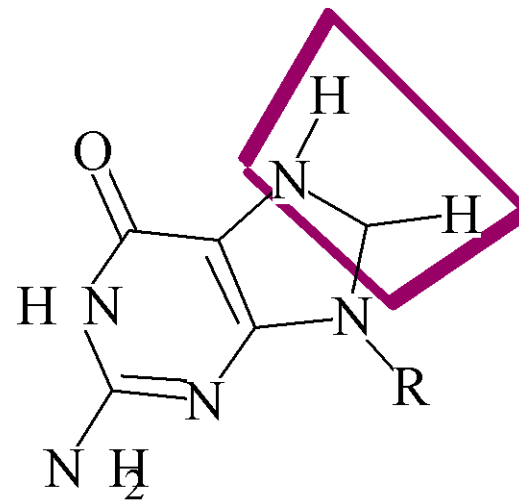
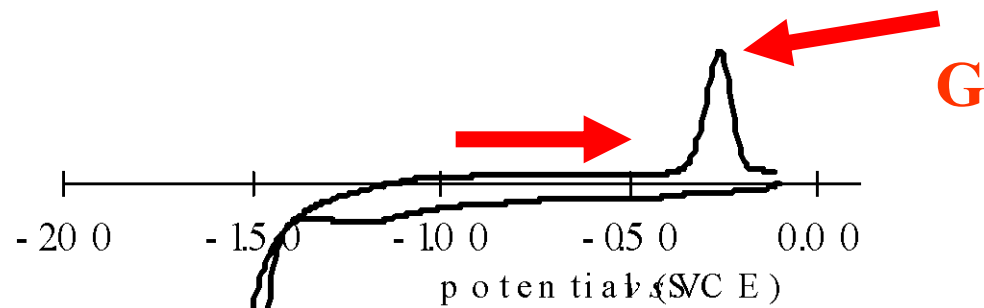
CA



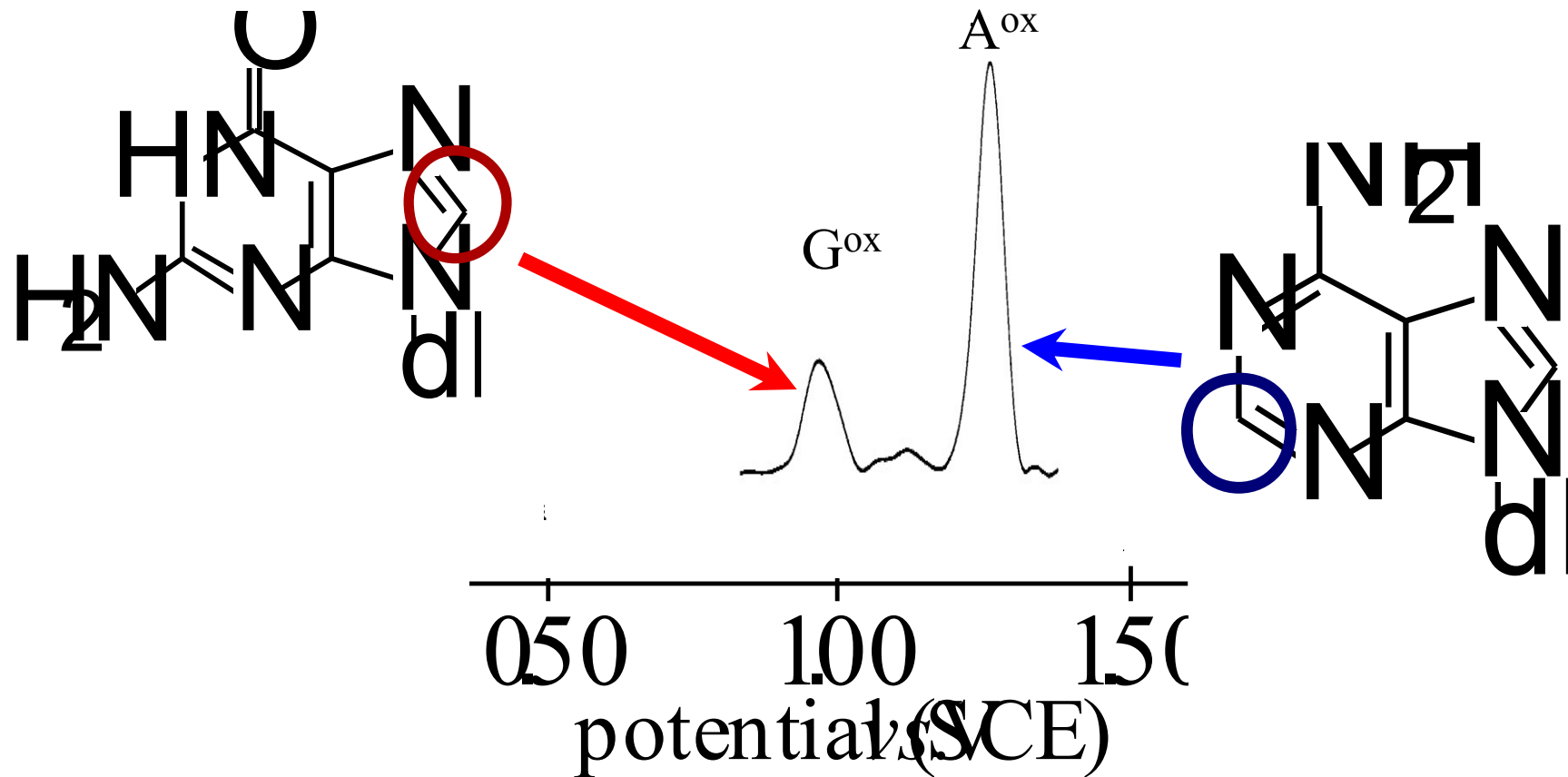
guanine is reduced at even more negative potentials...



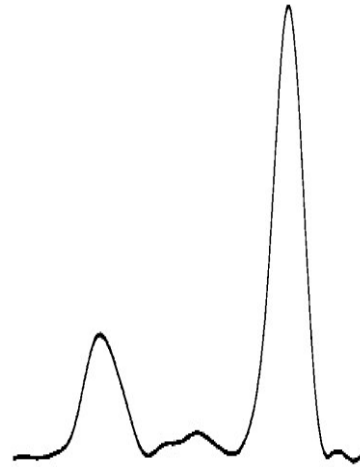
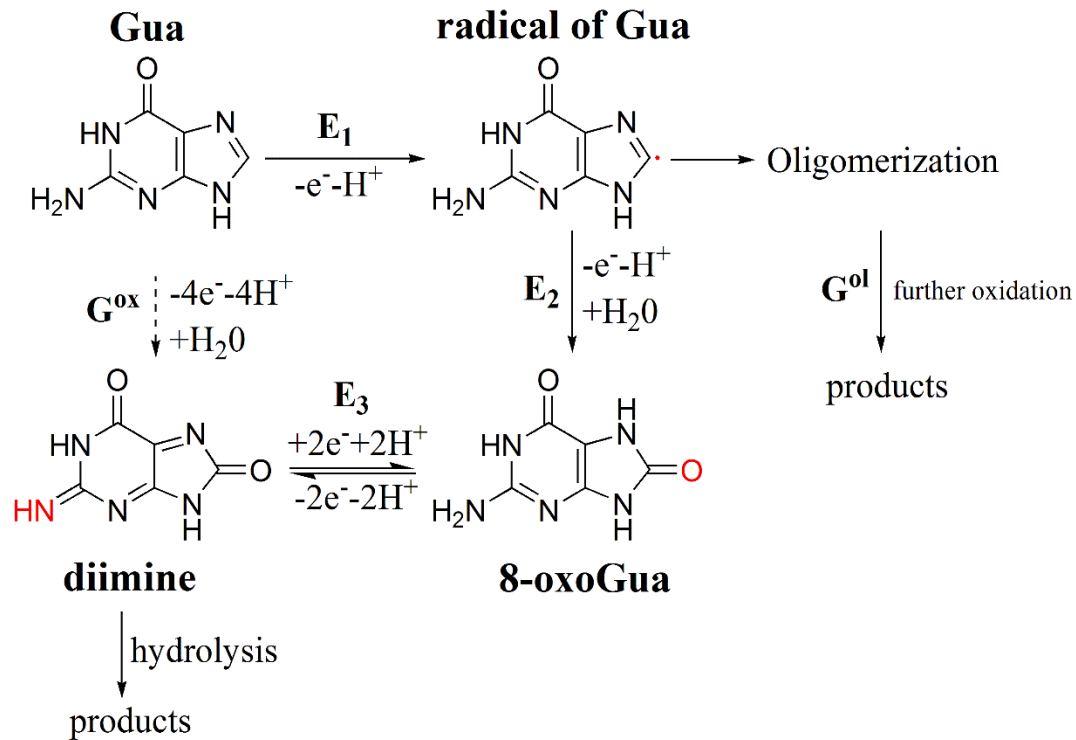
...and its reduction product yields an anodic peak in cyclic voltammetry



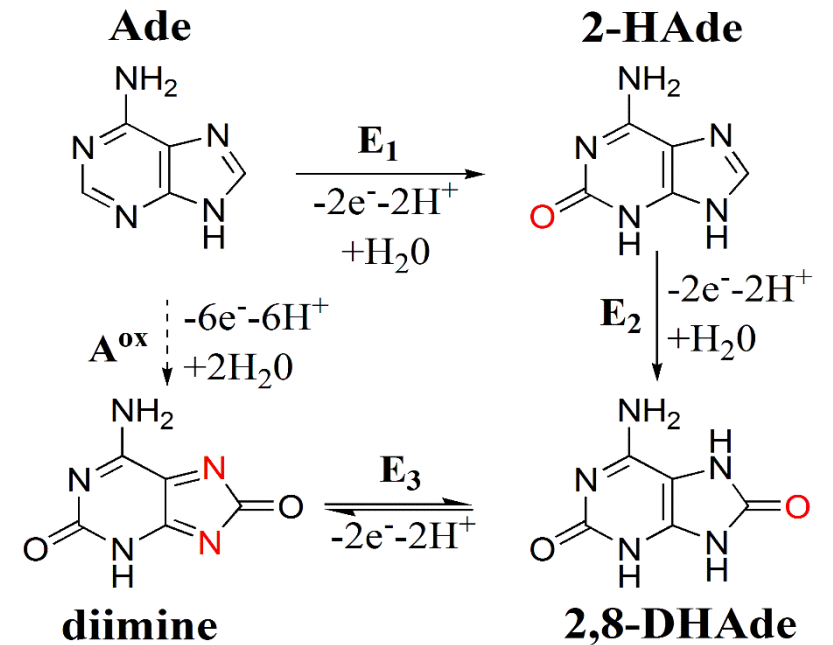
Guanine and adenine residues yield specific oxidation peaks at carbon electrodes



Guanine and adenine residues yield specific oxidation peaks at carbon electrodes

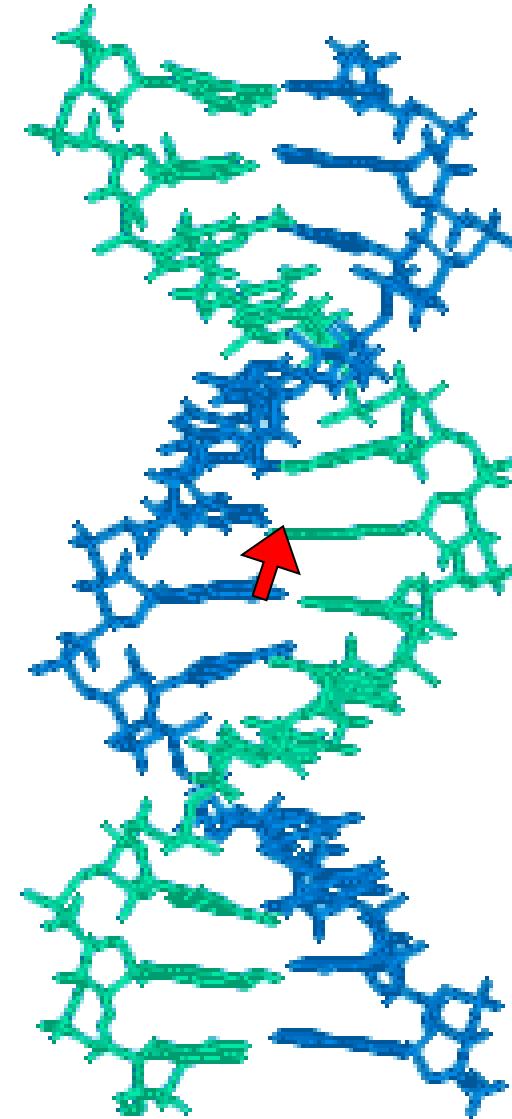
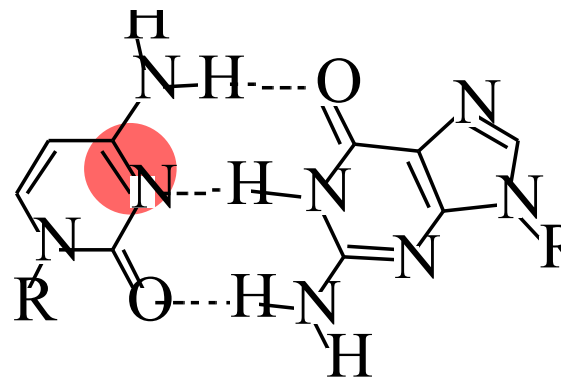
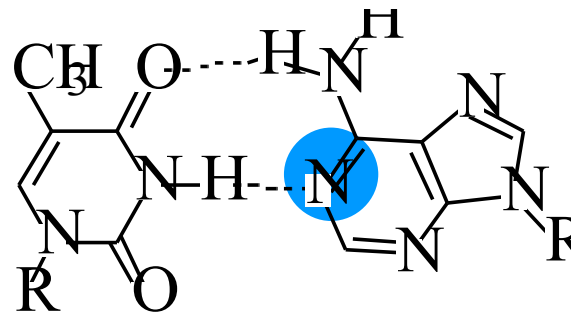


0.50 1.00 1.50
potential (SCE)

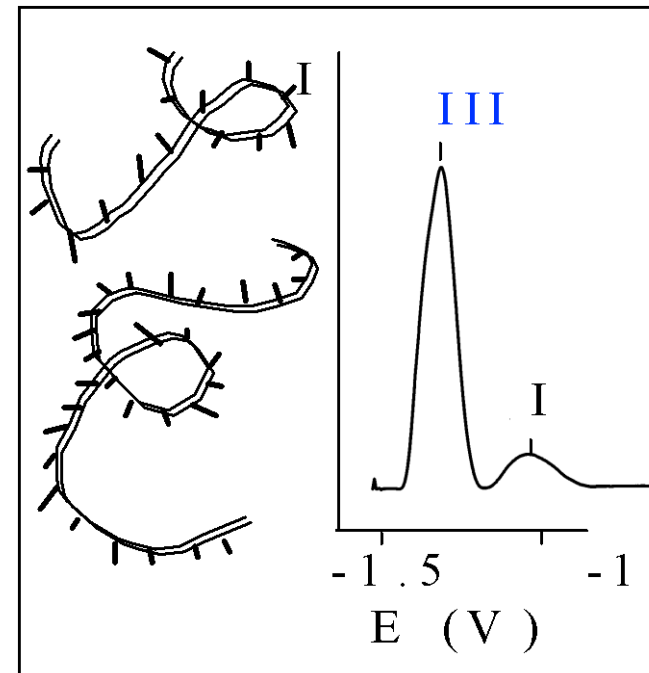
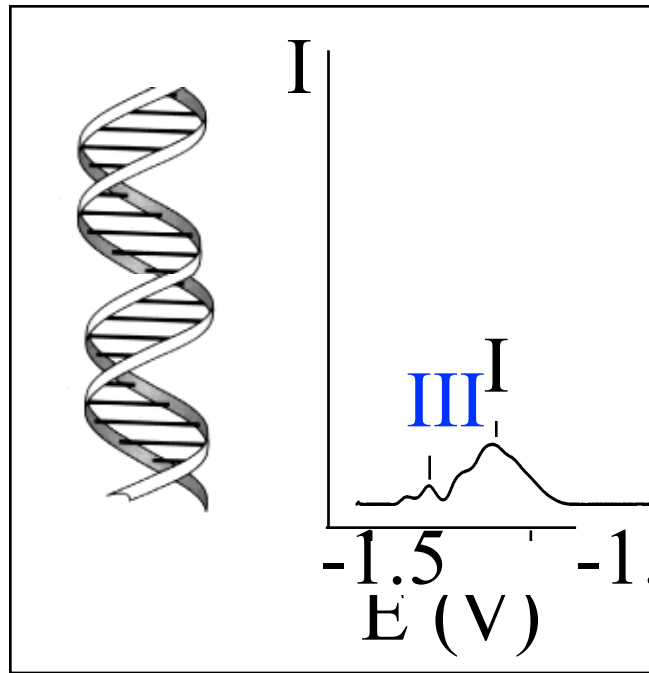


Reduction DNA signals at the mercury electrodes are strongly influenced by DNA structure

- this is due to location of the **A** and **C** electroactive within the Watson-Crick hydrogen bonding system



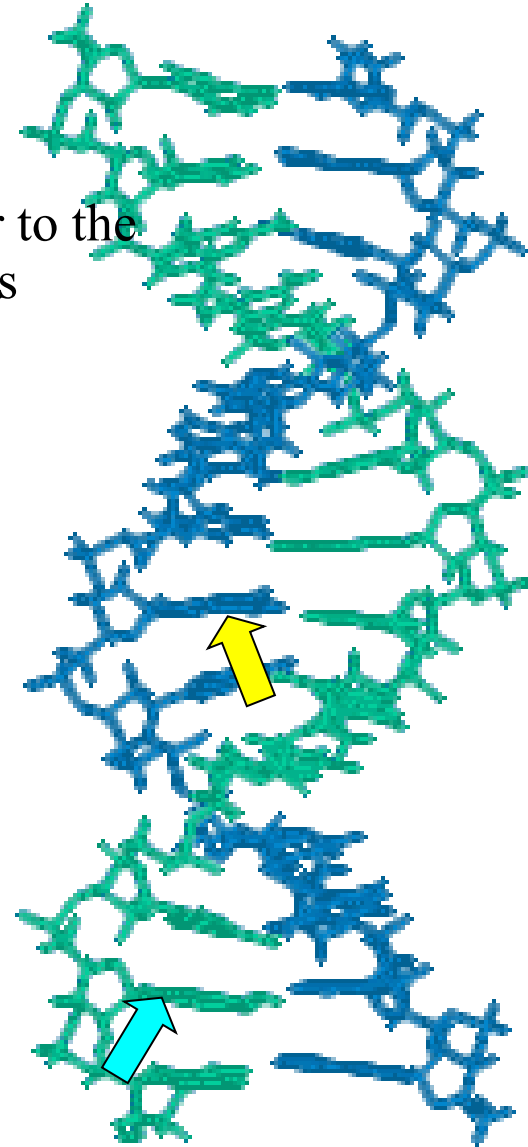
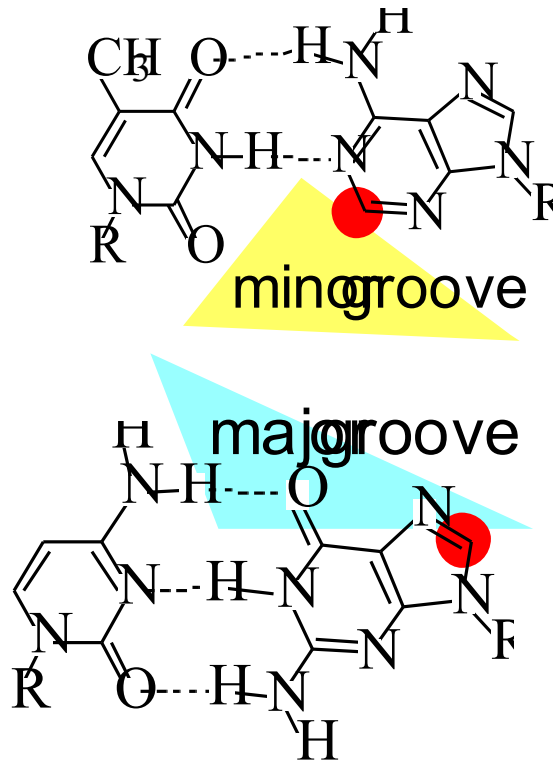
Reduction DNA signals at the mercury electrodes are strongly influenced by DNA structure



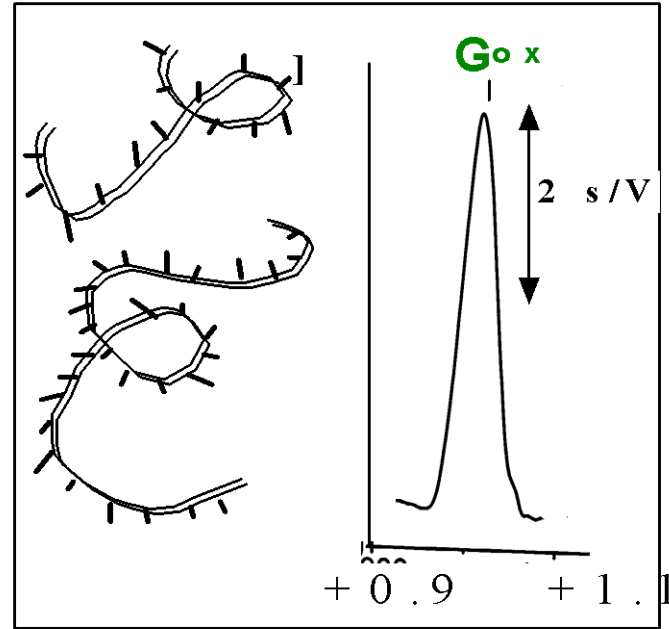
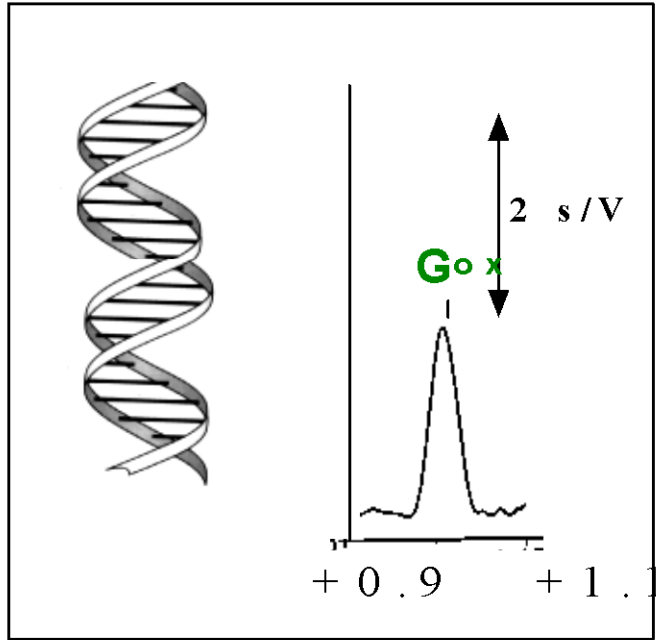
square-wave voltammetry

DNA oxidation at carbon electrodes is less influenced by DNA structure

- oxidation sites of guanine and adenine in dsDNA are located closer to the double helix surface and are accessible via the double helix grooves



DNA oxidation at carbon electrodes is less influenced by DNA structure

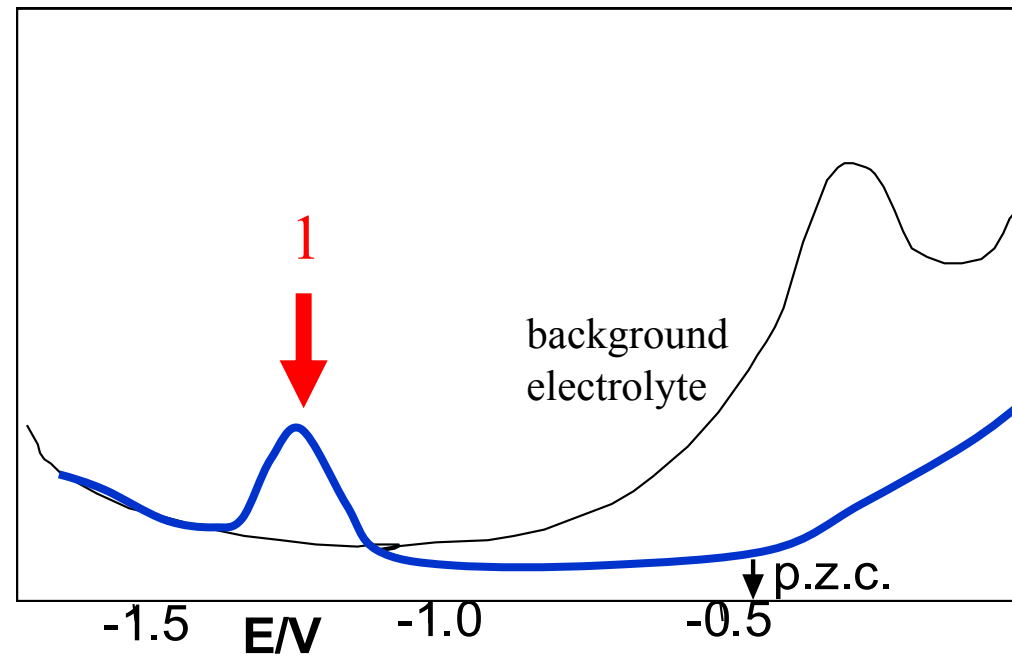
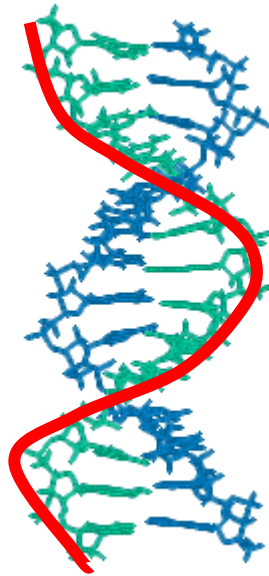


chronopotentiometry

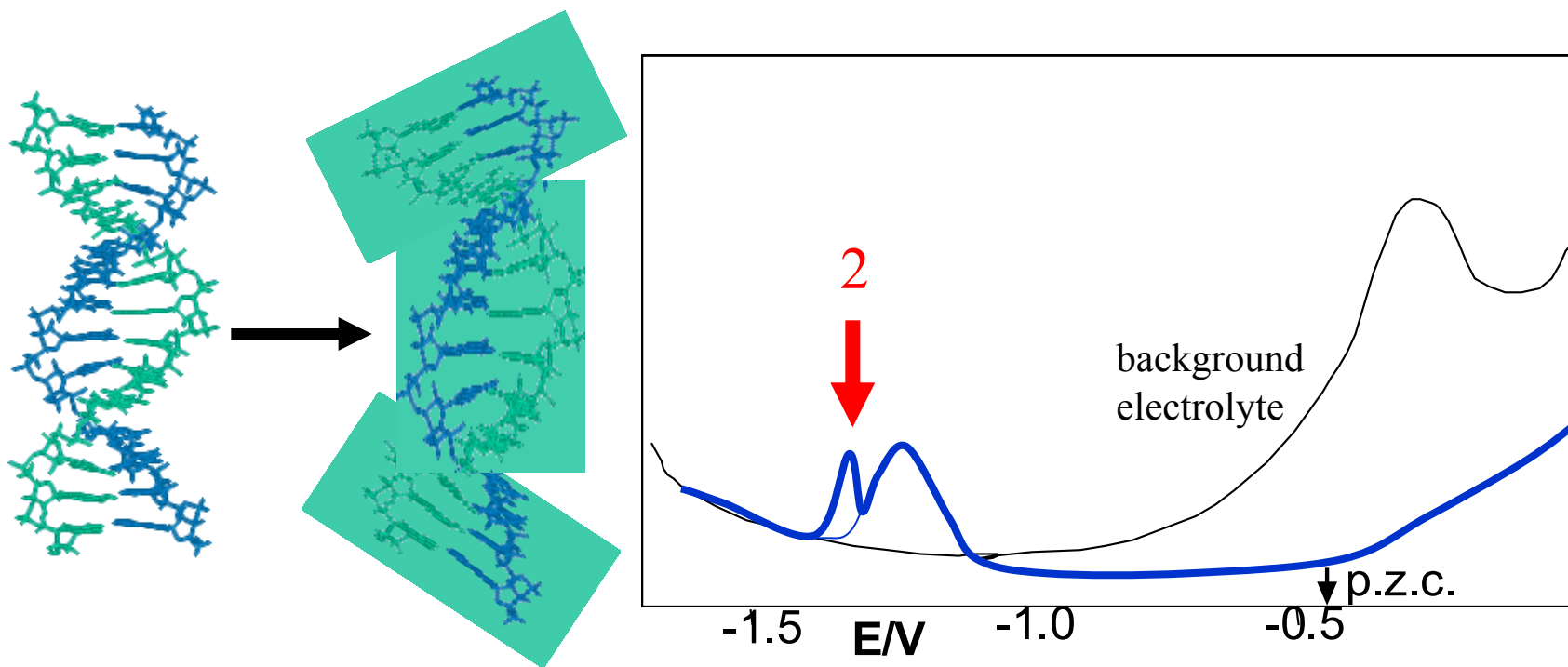
At mercury electrodes in weakly alkaline media, **adsorption-desorption (tensammetric) signals** of nucleic acids can be detected (e.g., using AC polarography, voltammetry, impedance)

- depending on the conditions and on **DNA structure**, individual components of the polynucleotide chains may be involved in adsorption/desorption processes

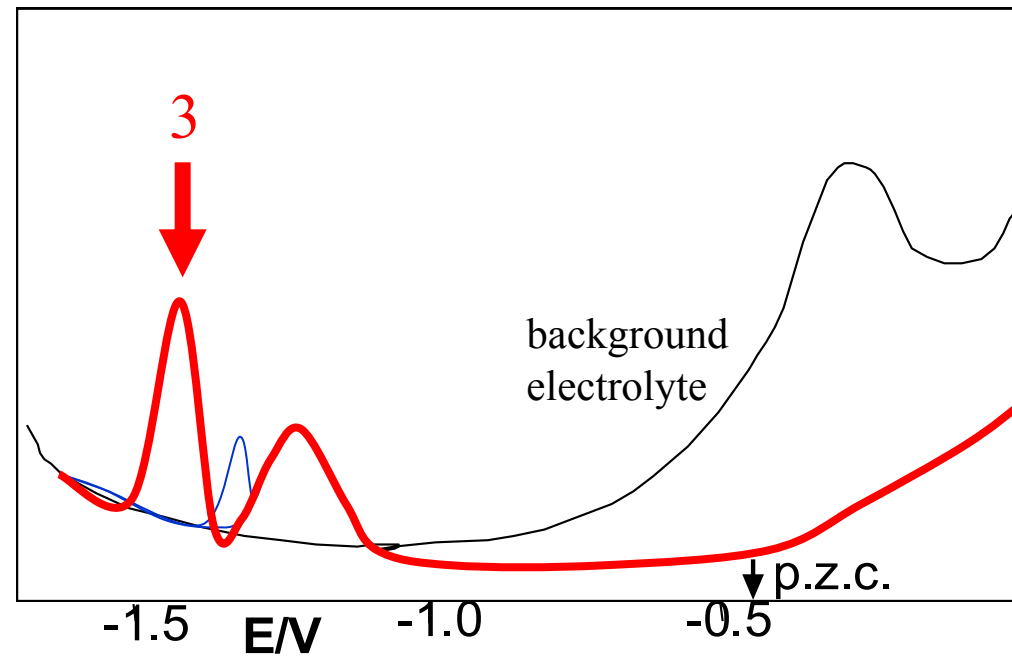
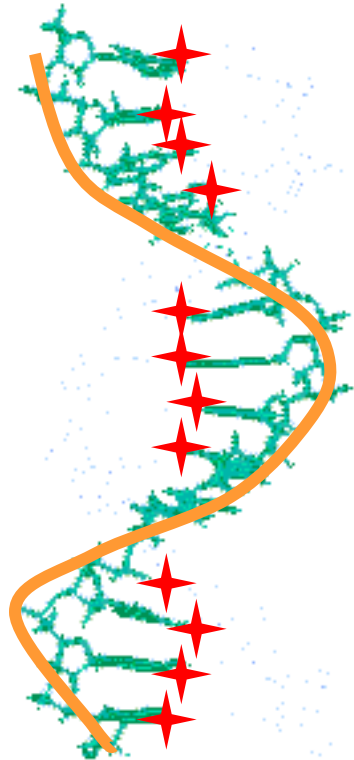
-at moderate ionic strength, **double-stranded DNA** yields **peak 1** due to desorption/reorientation of DNA segments adsorbed via the sugar-phosphate backbone



-distorted or regions of double-stranded DNA yield **peak 2**
(edges of base pairs involved in a stronger adsorption)



single-stranded (denatured) DNA yields peak 1 (due to the sugar-phosphate backbone) and ss-specific **peak 3** due to desorption/reorientation of DNA segments adsorbed via **freely accessible bases**



Summary of adsorption-desorption processes of DNA on negatively charged Hg surface

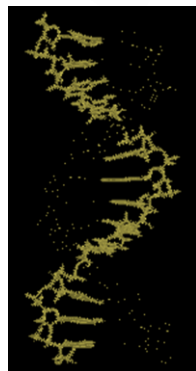
double helix



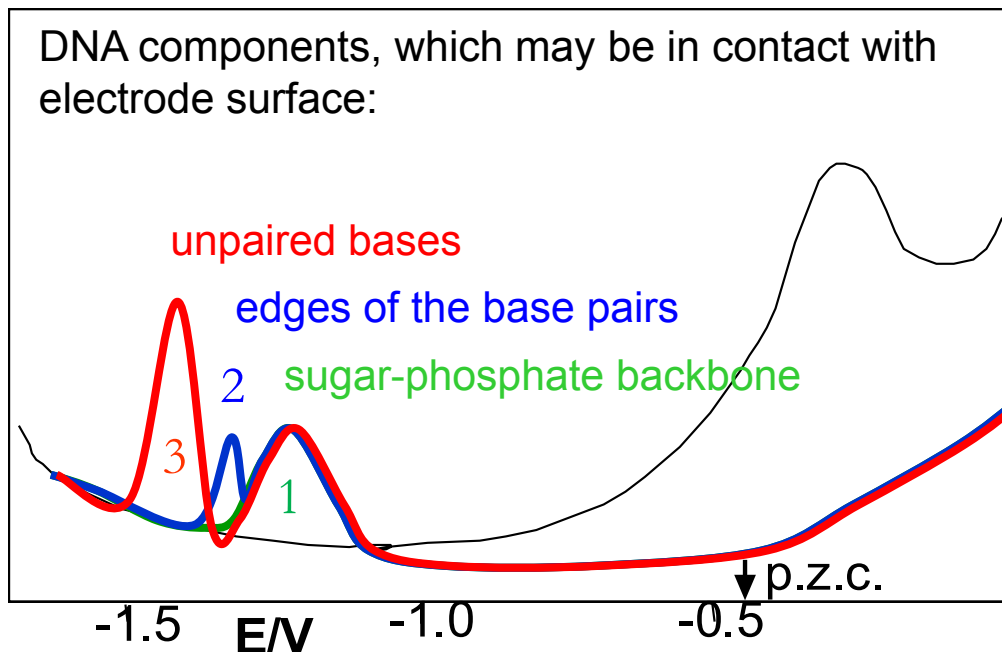
deformed double helix



single-stranded DNA

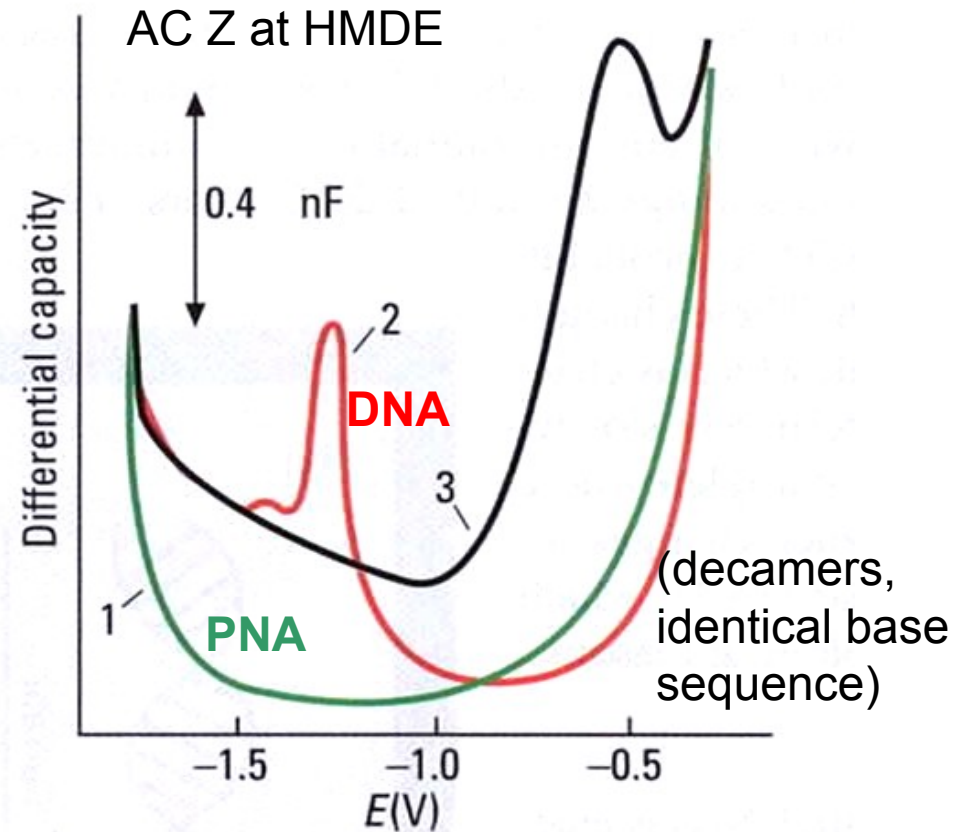
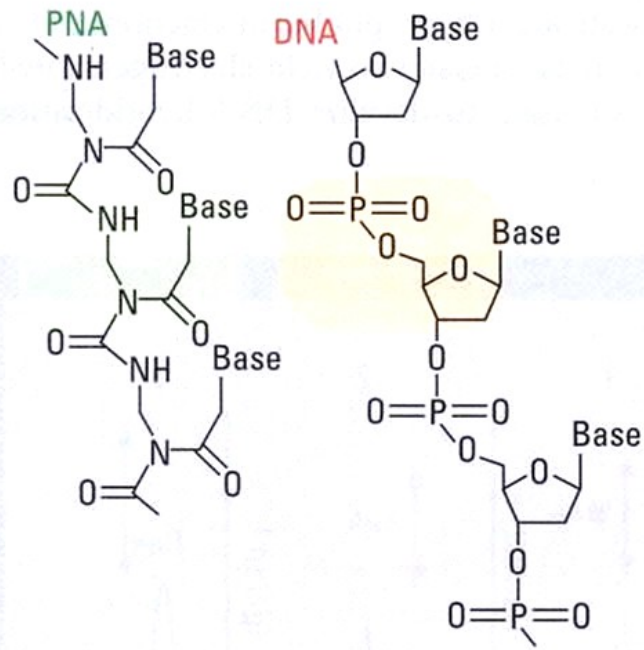


- sugar-phosphate backbone of DNA is negatively charged
- bases are relatively hydrophobic



Peaks 2 and 3: information about DNA structure

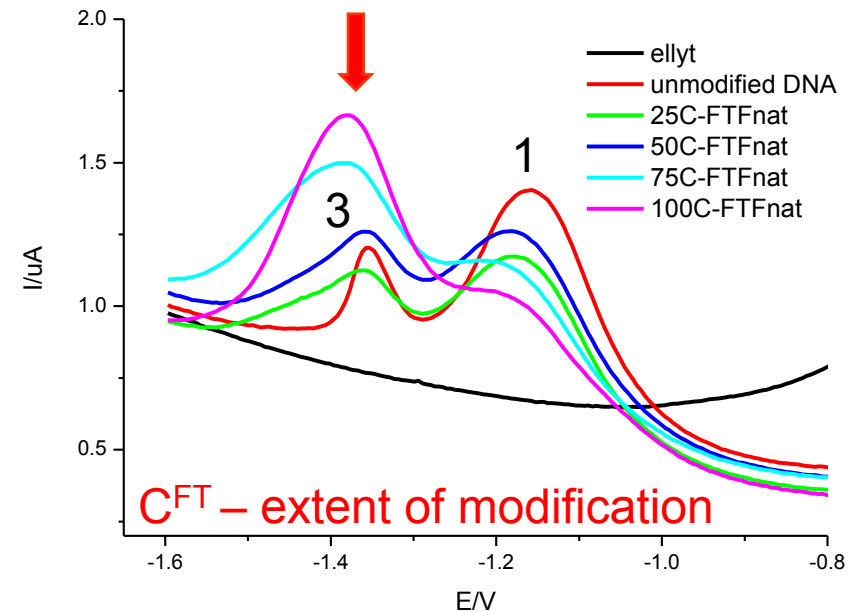
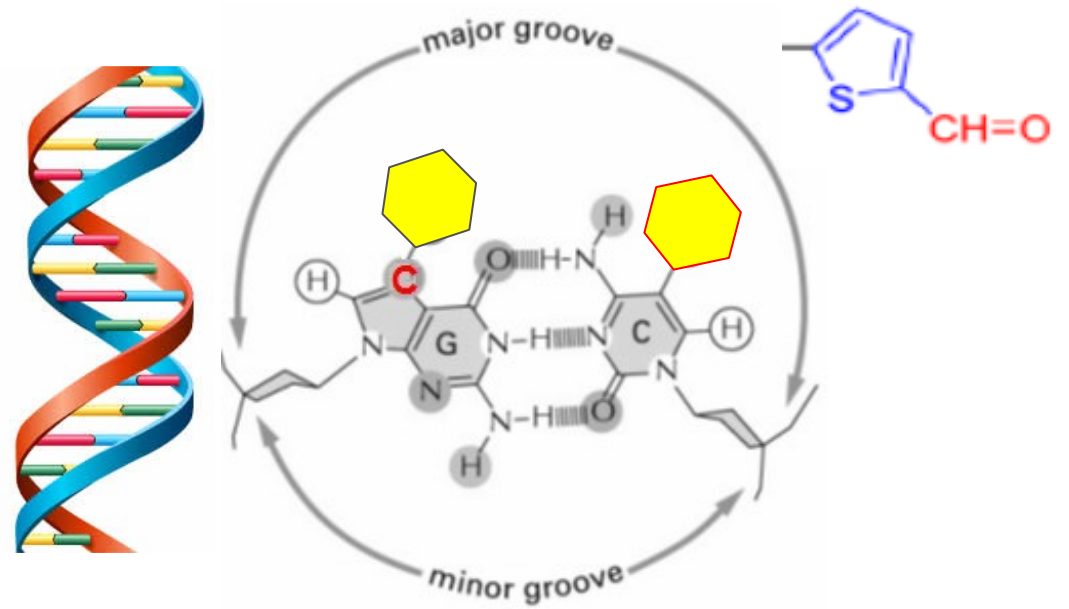
Adsorption/desorption behavior of DNA at electrodes is strongly related to negative charge of its sugar-phosphate backbone (together with a strong adsorption of nucleobases via hydrophobic forces)



peptide nucleic acid: DNA analogue with neutral backbone

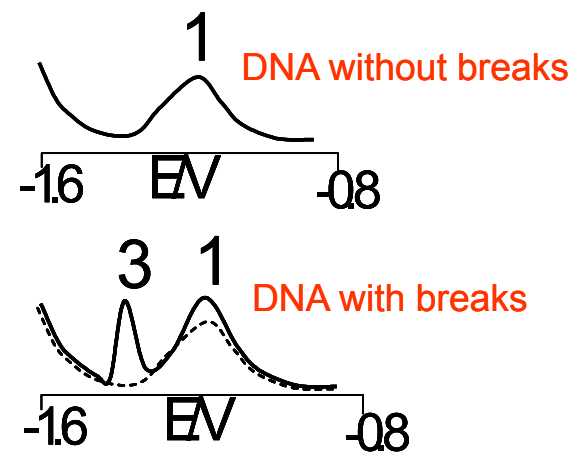
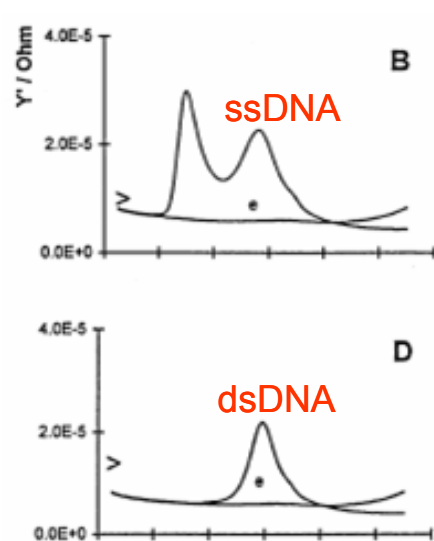
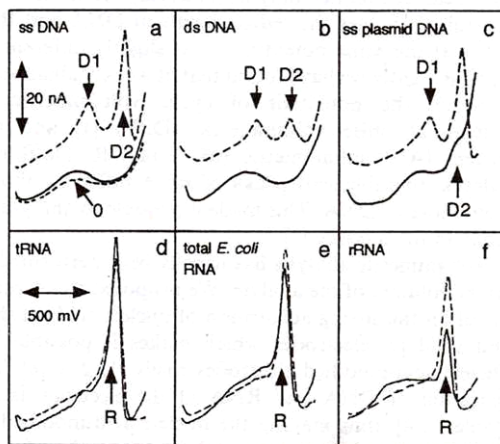
Modification of DNA in major groove

- preparation of functionalized DNA – labeling, studying DNA-protein interactions etc.
- bulky aromatic groups bound to bases so that they are accessible through the major groove
- affects adsorption-desorption behavior of double-stranded DNA

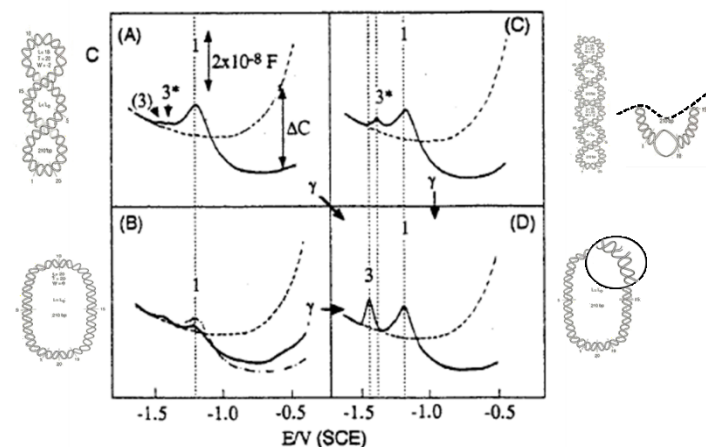
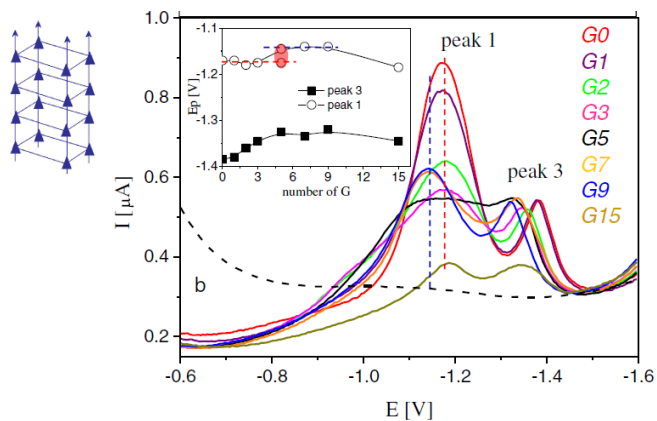


Structural analysis of nucleic acids using adsorption/desorption

RNA vs. DNA

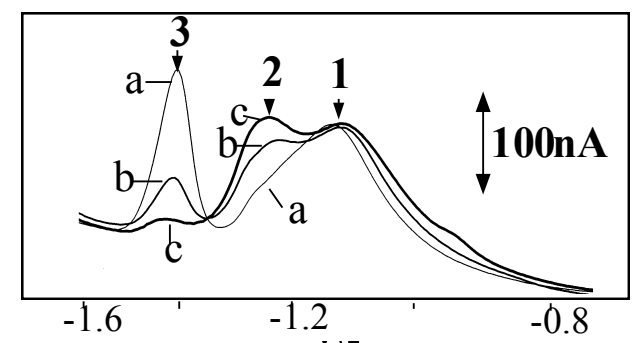


DNA quadruplexes



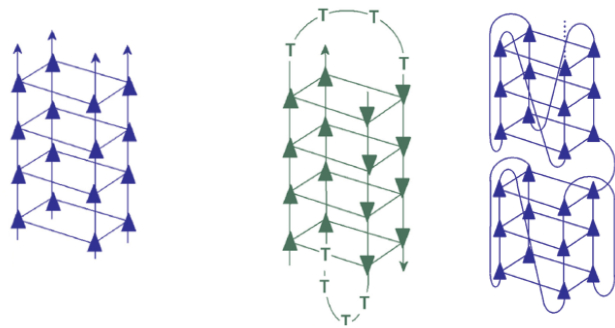
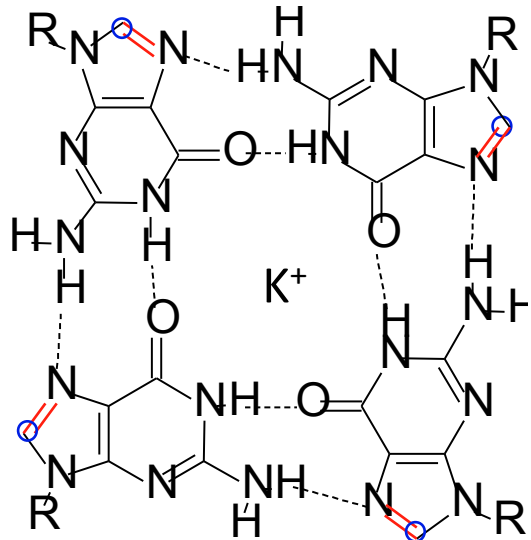
superhelical DNA

intercalation: interaction of DNA with drugs

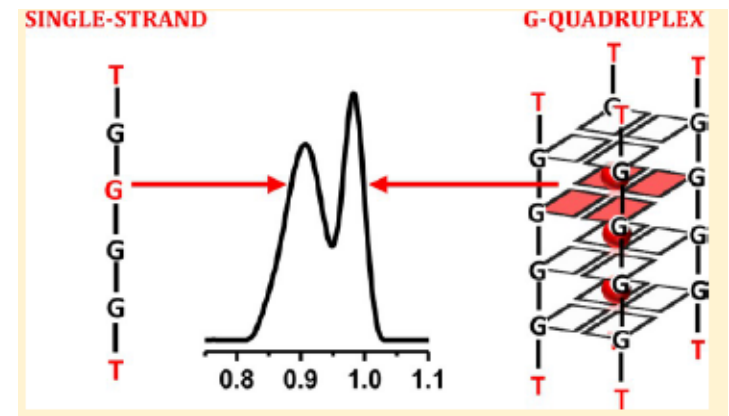
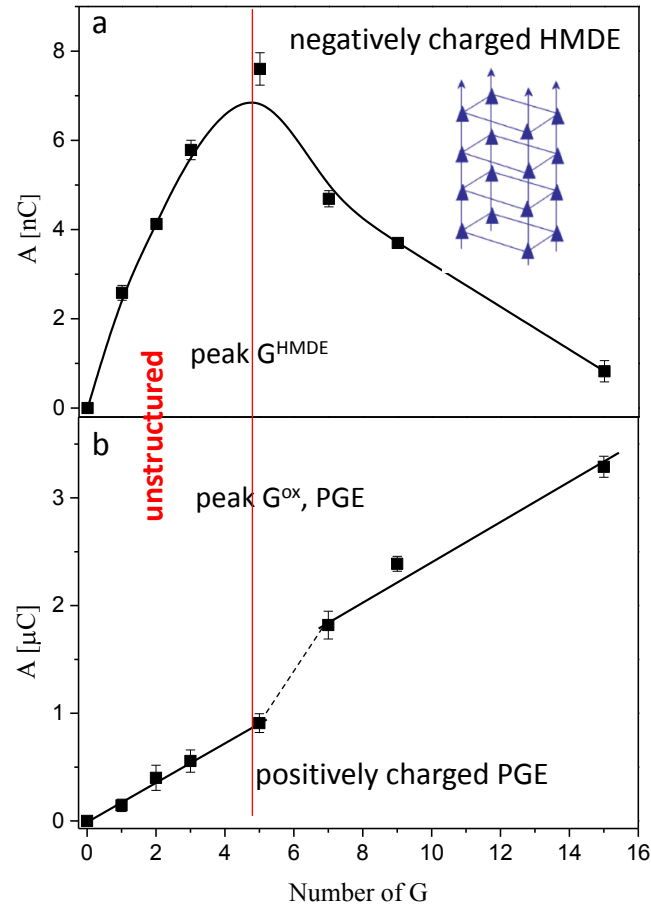


Effects of DNA structure beyond the duplex: guanine quadruplexes

guanine tetrad



15-mers with increasing length of dG_n stretches

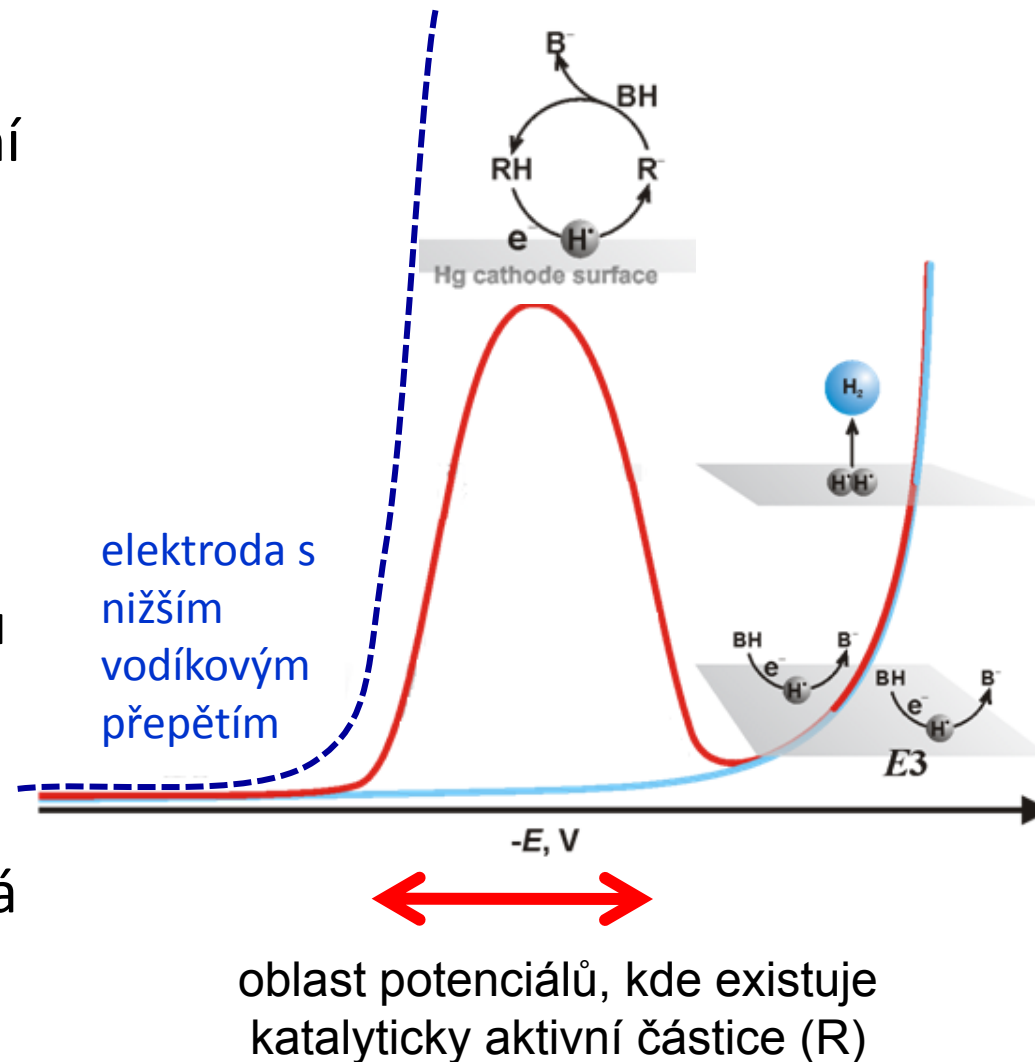


Ana Brett et al. (e.g. Anal Chem 2014)

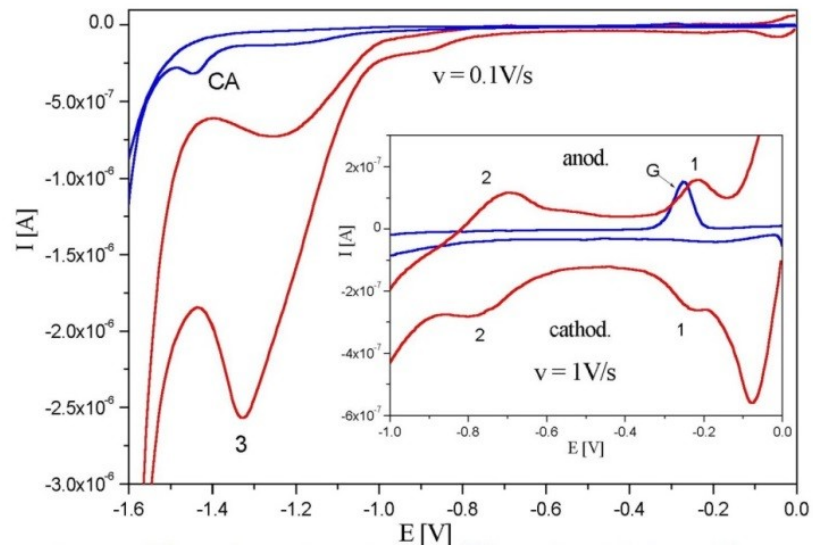
Katalytické vylučování vodíku na rtuťových elektrodách

Katalytické vylučování vodíku na rtuťových elektrodách

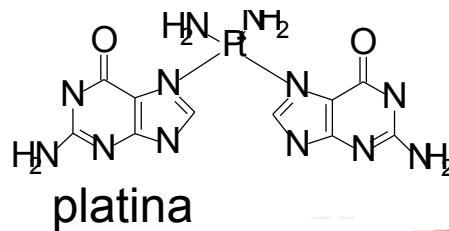
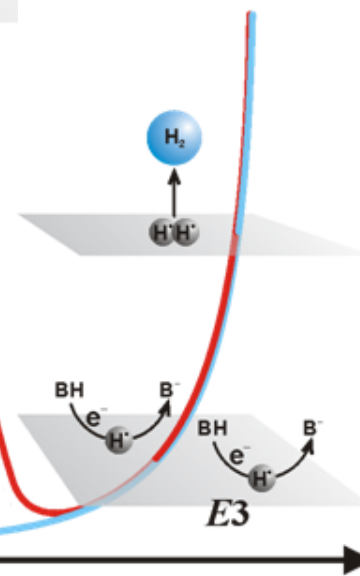
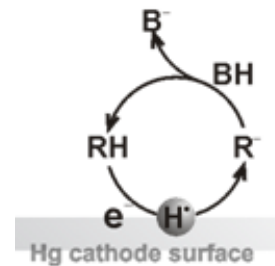
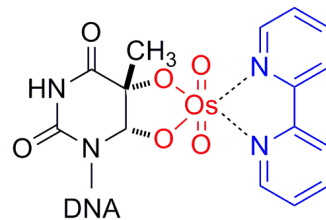
- lze měřit díky dostatečně vysokému vodíkovému přepětí (=vysoká aktivační energie pro redukci protonů H^+)
- katalýza: obecně usnadnění nějakého procesu snížením aktivační energie
- katalyzátory elektrochemicky generované v určité oblasti potenciálů
- katalyzátor se nepotřebává \rightarrow zprostředkuje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



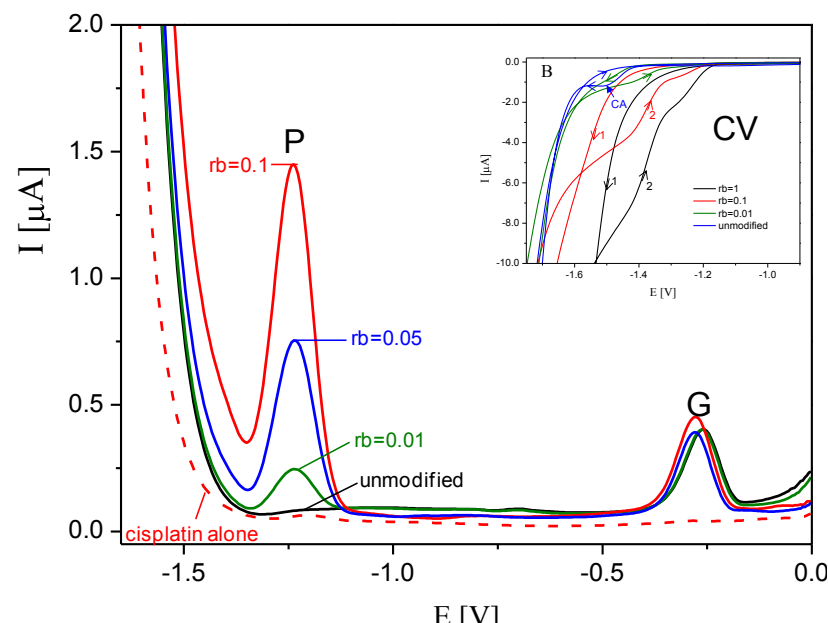
Katalytické vylučování vodíku doprovázející redukcí komplexů přechodných kovů/jejich aduktů s DNA



osmium

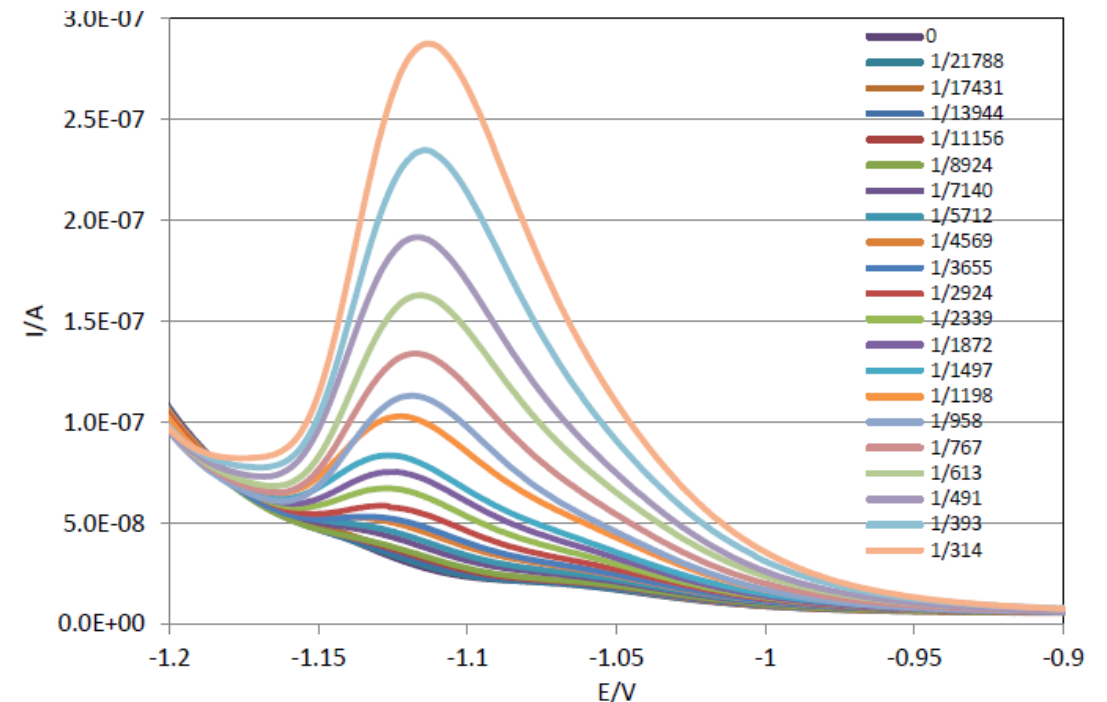


platina



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!**



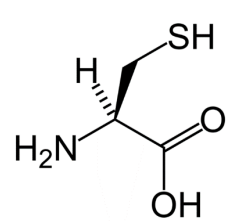
Elektrochemie proteinů



-prakticky od objevu polarografie

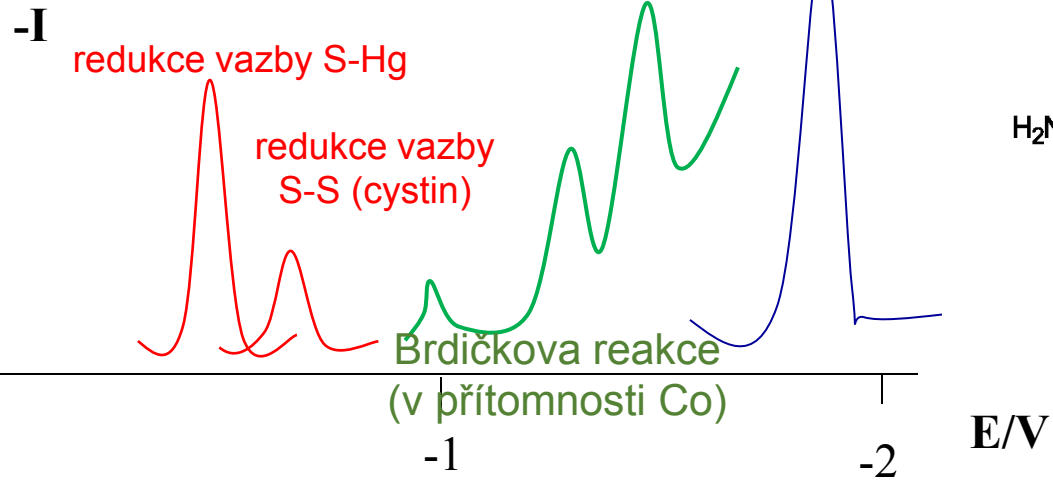
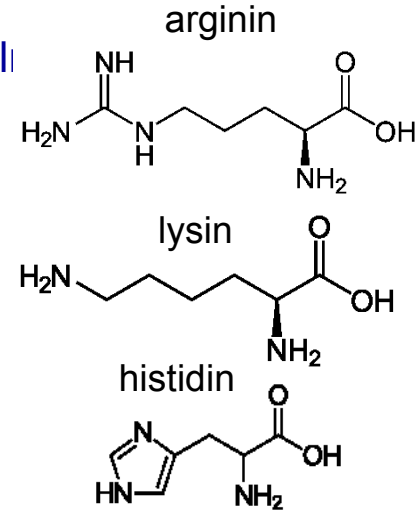
-odvozena od elektrochemie jejich složek, tj. aminokyselin

RTUŤOVÉ ELEKTRODY



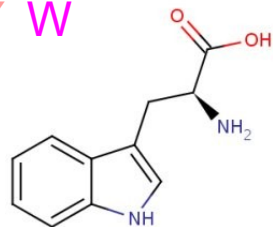
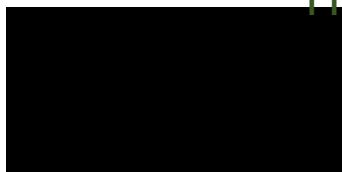
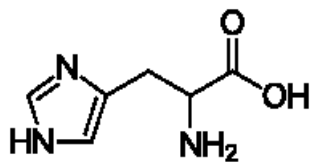
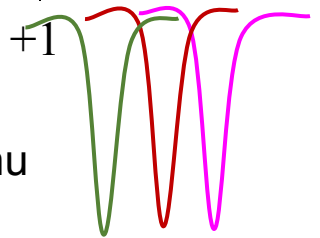
katalytické vylučování vodíku

prenatiová vlna
pík H

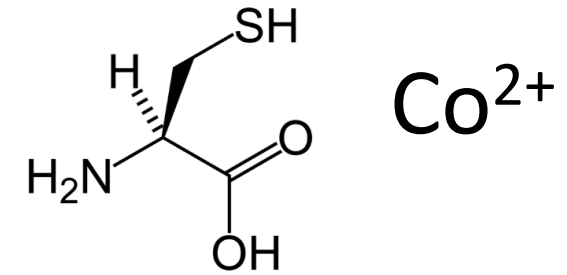


UHLÍKOVÉ ELEKTRODY

elektrochemická oxidace tryptofanu, tyrozinu a histidinu

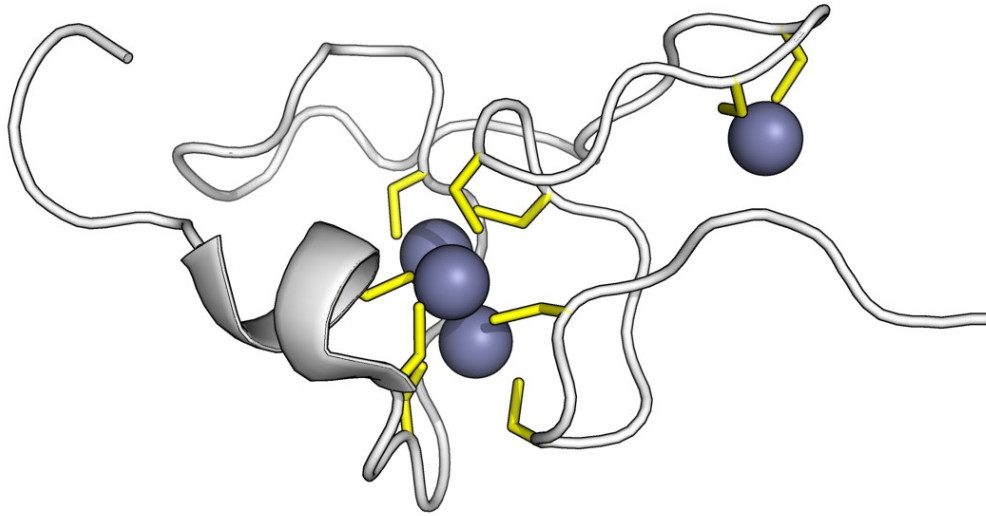


Brdičkova reakce



- 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**

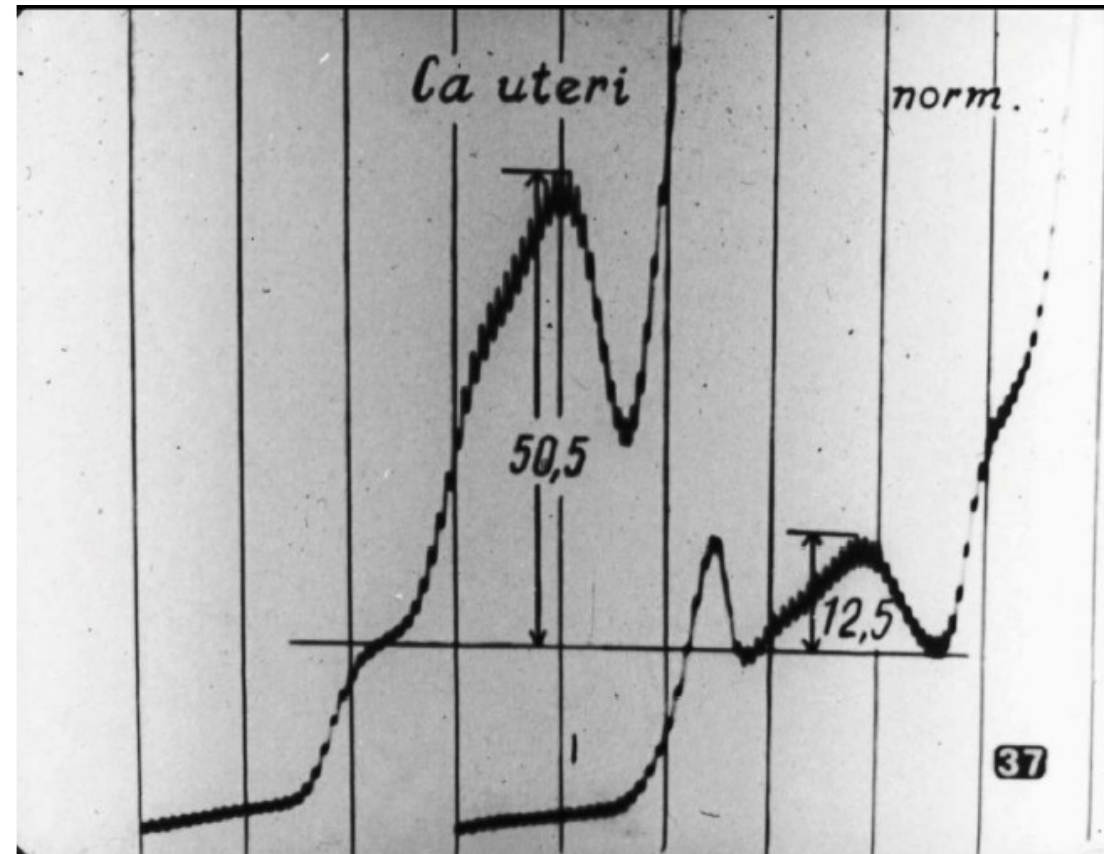
Jednoduché stanovení metalothioneinů a fytochelatinů



metalothionein (komplex se zinečnatými ionty)

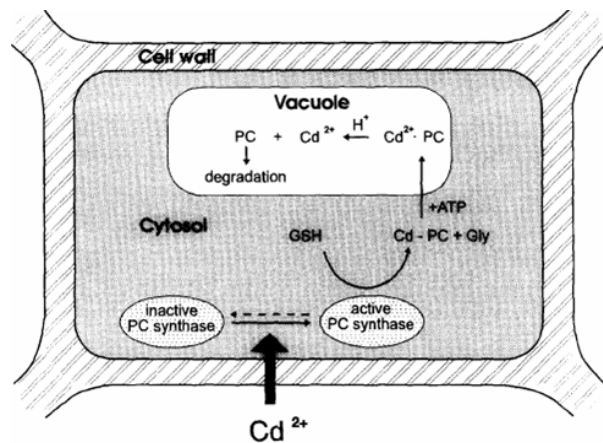
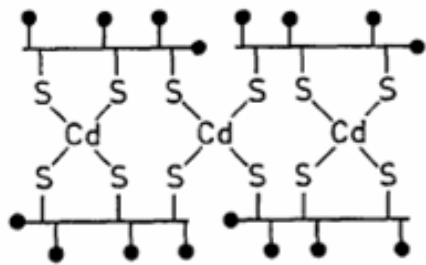
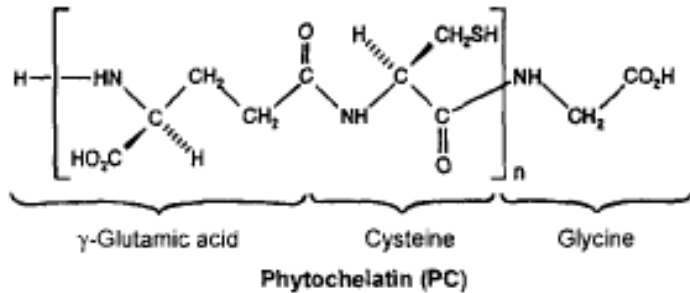
- kdysi poměrně rozšířený diagnostický test
- R. Kizek a kol. (MENDELU)
- rakovina a metalothioneiny

Brdičkova reakce a diagnostika rakoviny?

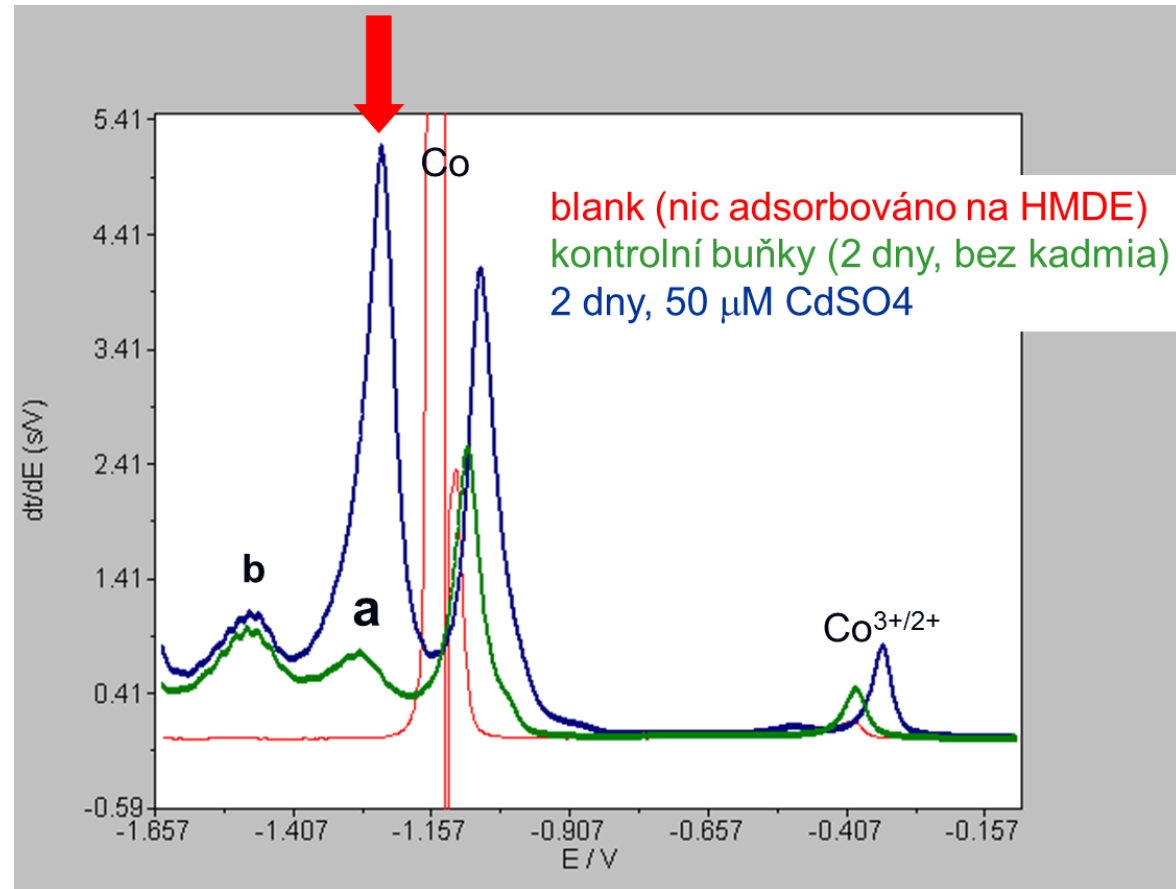


Jednoduché stanovení metalothioneinů a fytochelatinů

fytochelatiny: každá cca druhá AK cystein

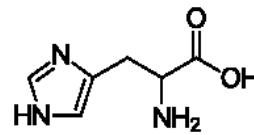
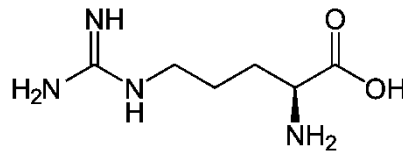
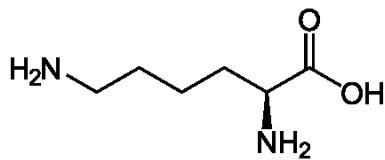


Lze fytochelatiny stanovit elektrochemicky
co nejjednoduším způsobem?



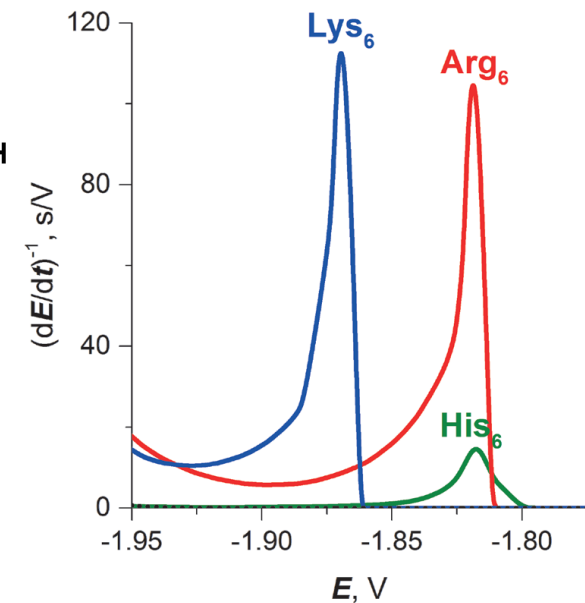
pík H a strukturně citlivá analýza proteinů

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

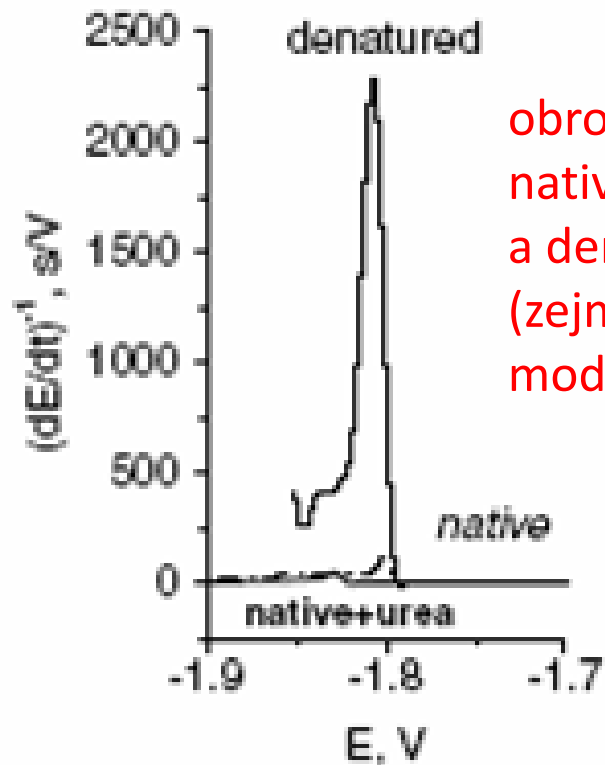


- vysoká citlivost detekce peptidů a bílkovin
- citlivost k

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

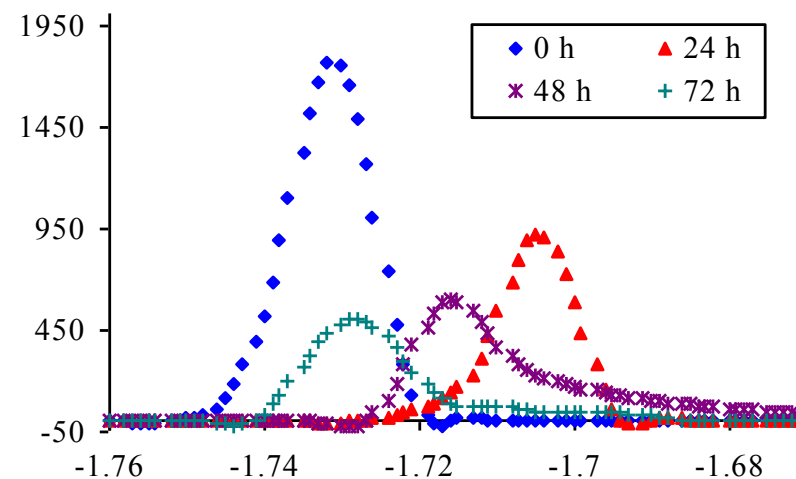


pík H a strukturně citlivá analýza proteinů



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

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



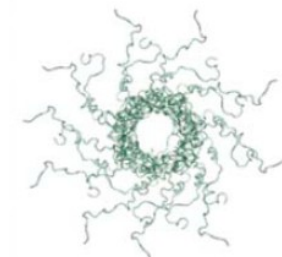
(b)



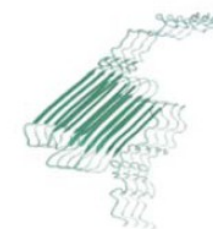
Native monomer



Unfolded monomer

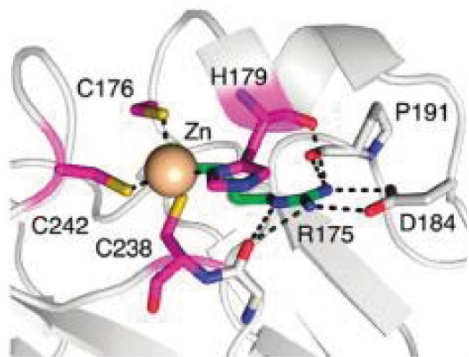


Oligomer



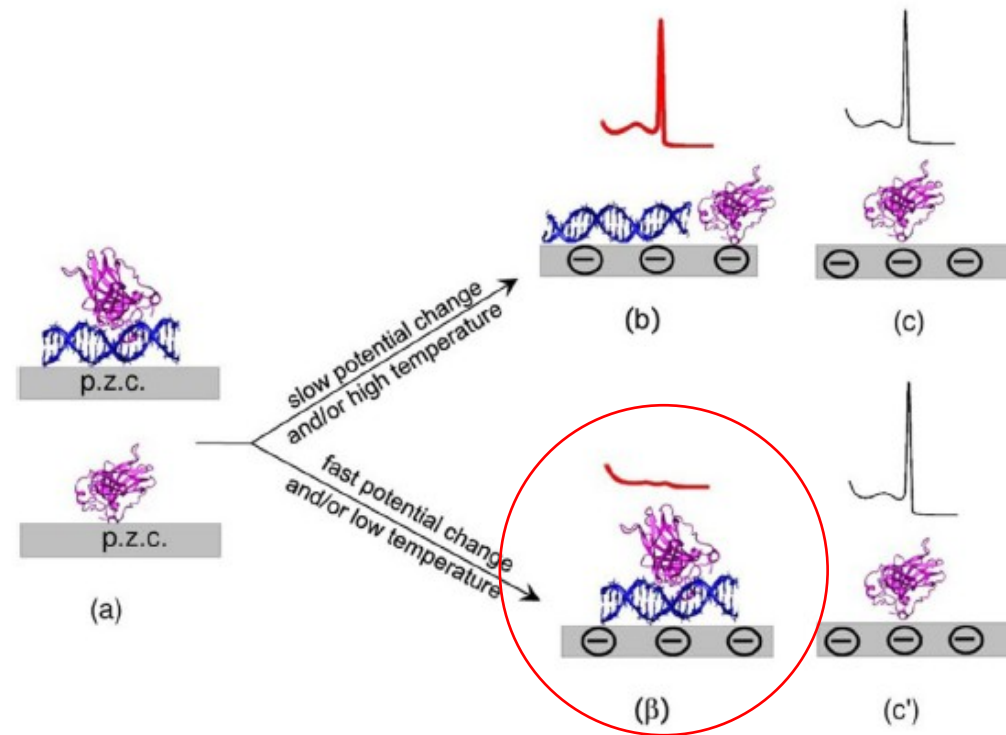
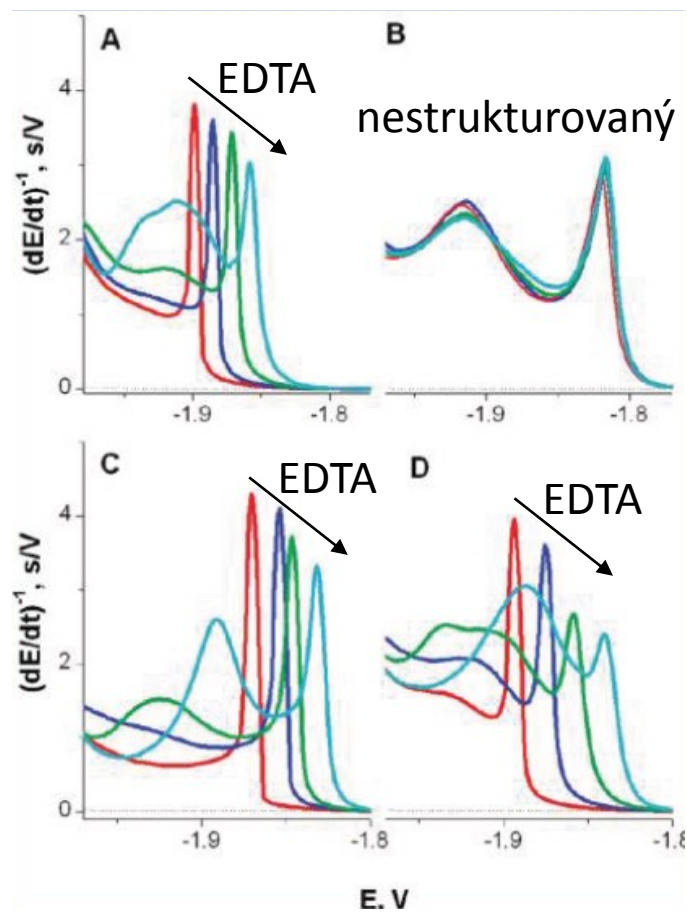
Fibril

pík H a strukturně citlivá analýza proteinů



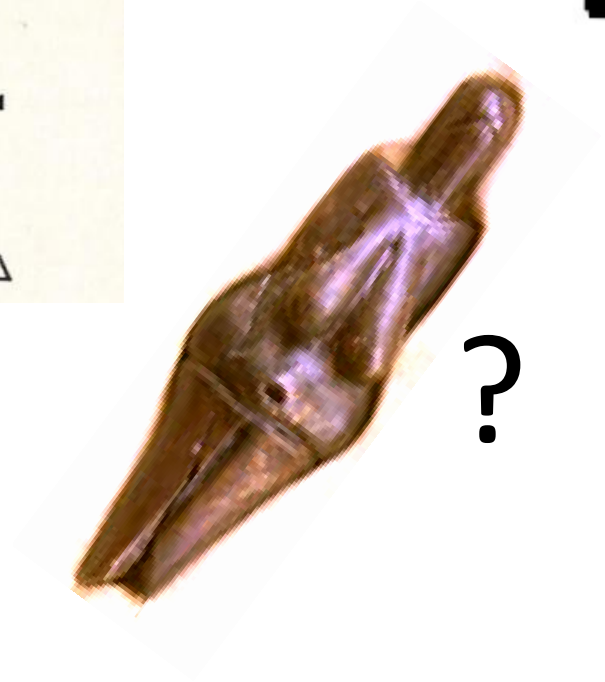
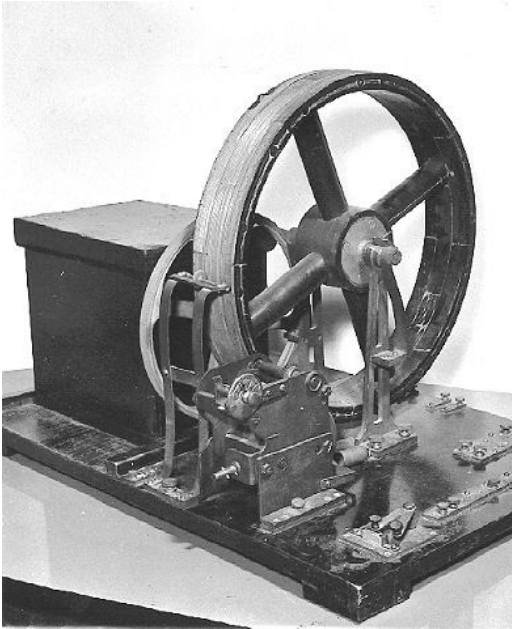
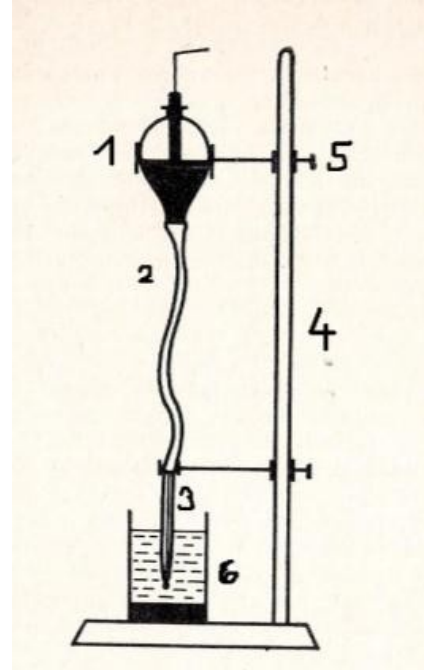
„unfolding“ proteinů
v důsledku odstranění
strukturně významného
iontu zinku

(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 😊

