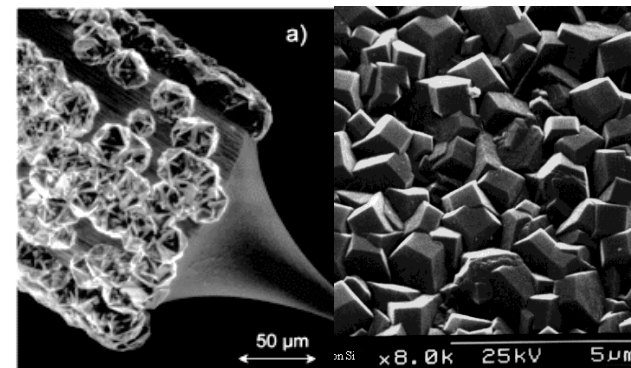
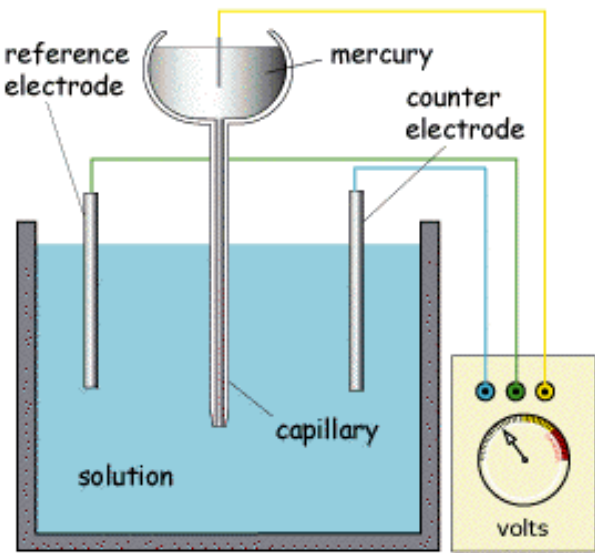


Elektrody ve službách výzkumu biopolymerů,



Elektrochemické metody ... polarografie



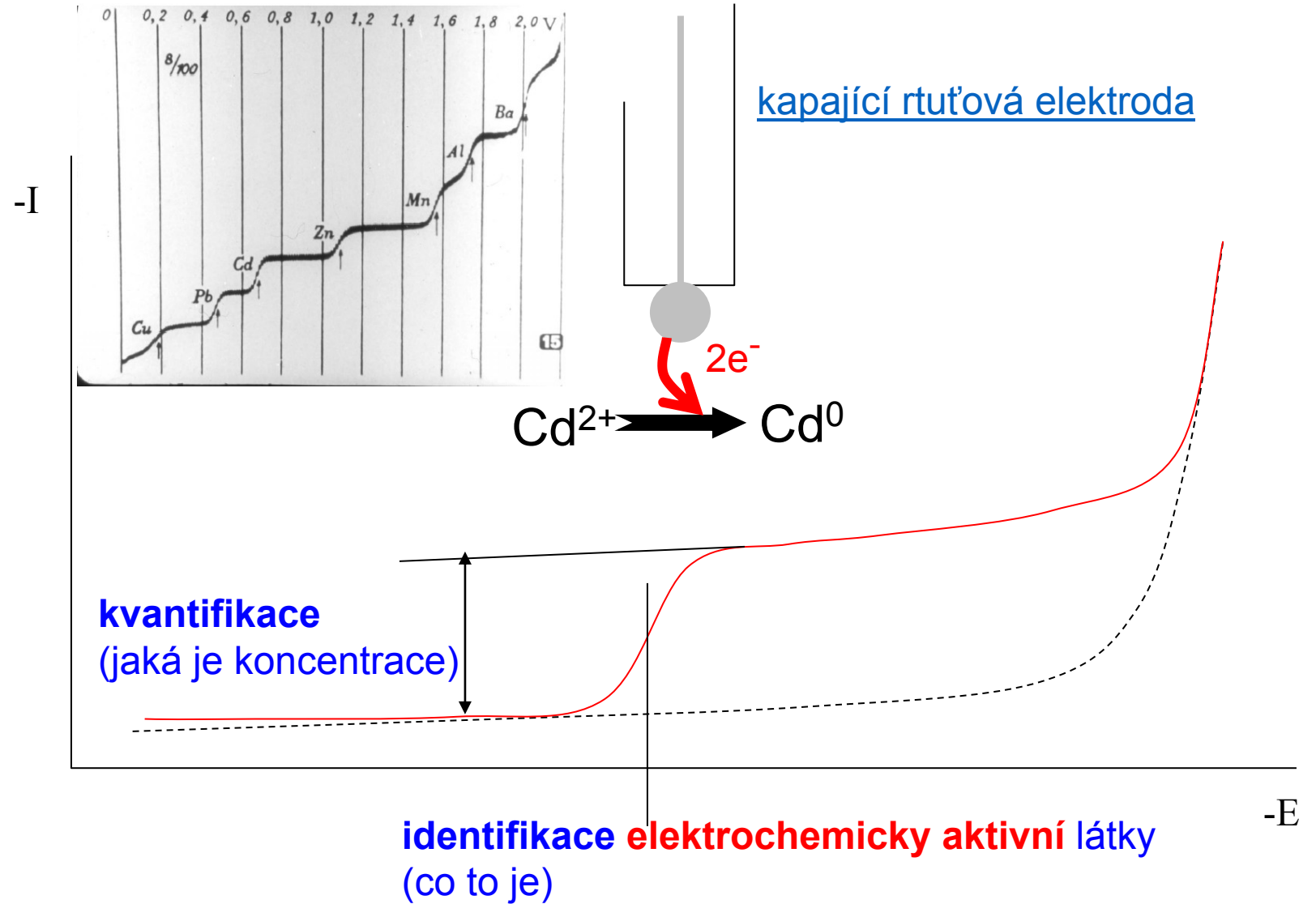
Jaroslav Heyrovský



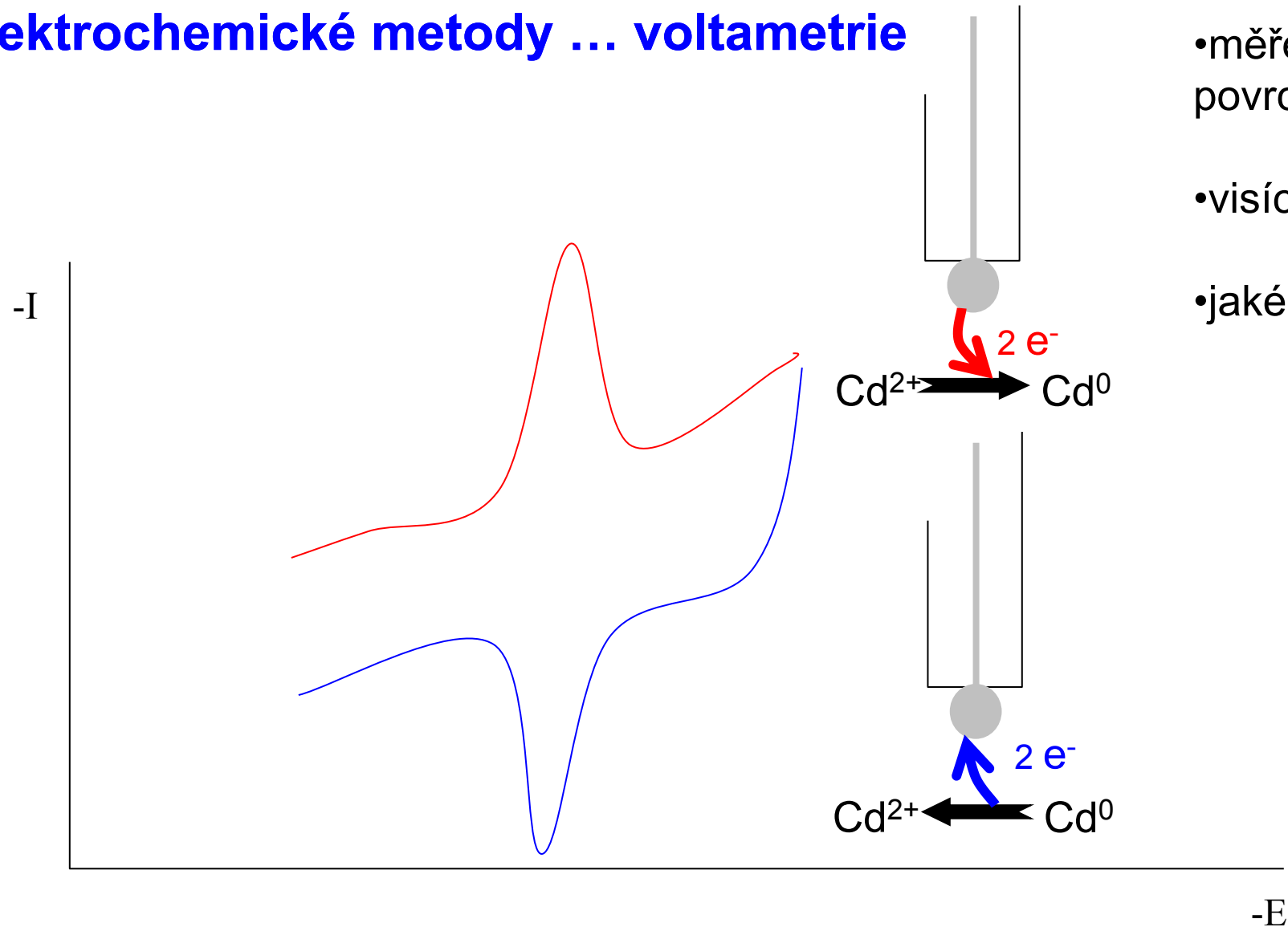
J. Heyrovský



Nobelova cena 1959




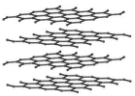

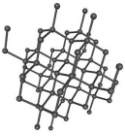
Elektrochemické metody ... voltametrie



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

Z čeho jsou pracovní elektrody?

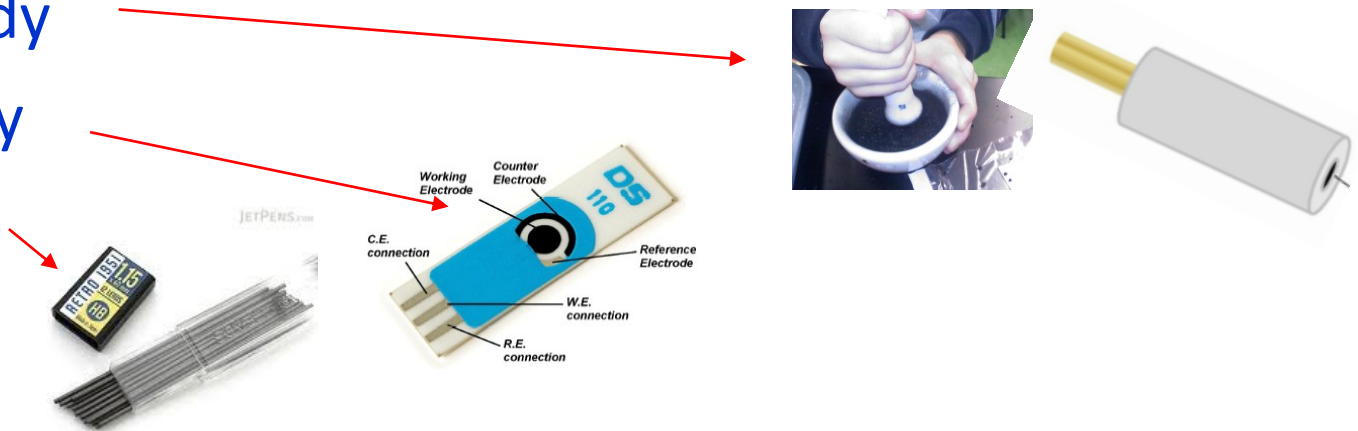
- rtuťové 
- pevné kovové (stříbrné, platinové, měděné, zlaté, bismutové, antimonové)      
- amalgamové (rtuť + jiný kov) 

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

- pastové elektrody

- tištěné elektrody

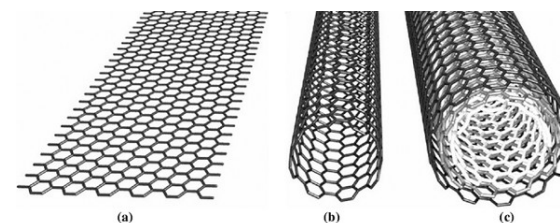
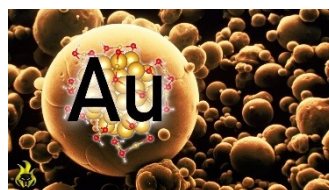
- pentilkové tuhy



Modifikace povrchů elektrod - příklady

- polyionty (elektrostatická adsorpce opačně nabitých analytů apod.)

- nanočástice, uhlíkové nanoobjekty

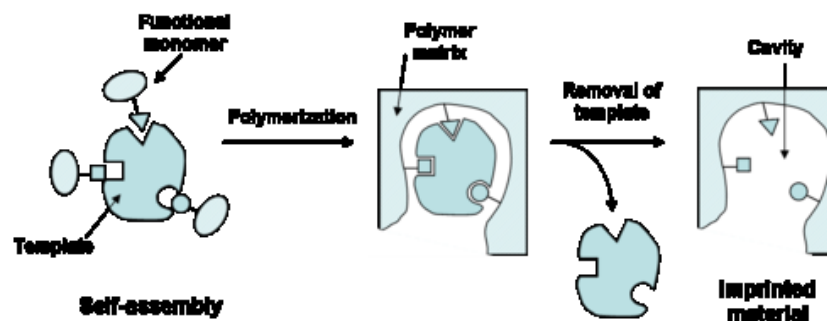


Source: Kreupl et al. (2004)

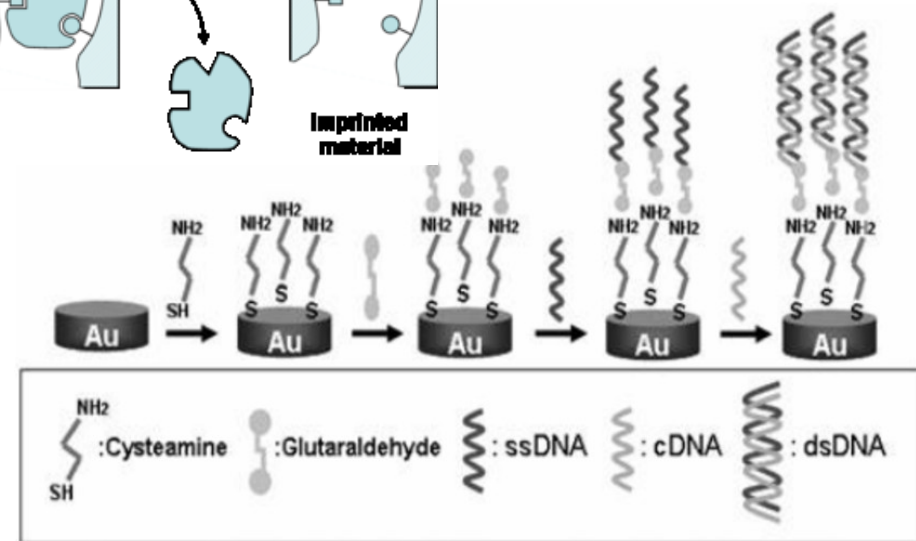
- vodivé polymery

(např. elektropolymerizovaný anilín a další aromatické aminy);

„molecular imprinting“


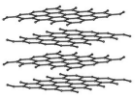

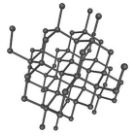


- immobilizace „bioreceptorů“ přes -SH skupiny (obvykle na zlatě)



Z čeho jsou pracovní elektrody?

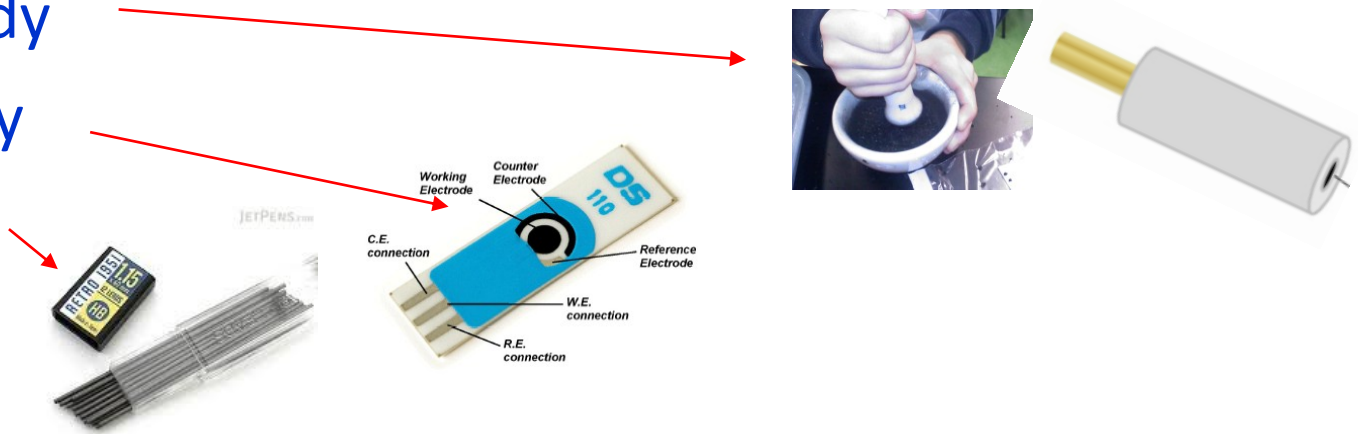
- rtuťové 
- pevné kovové (stříbrné, platinové, měděné, zlaté, bismutové, antimonové)      
- amalgamové (rtuť + jiný kov) 

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

- pastové elektrody

- tištěné elektrody

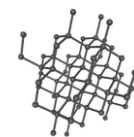
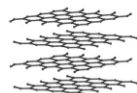
- pentilkové tuhy



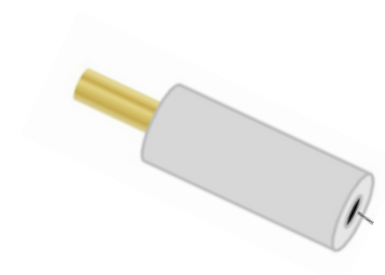
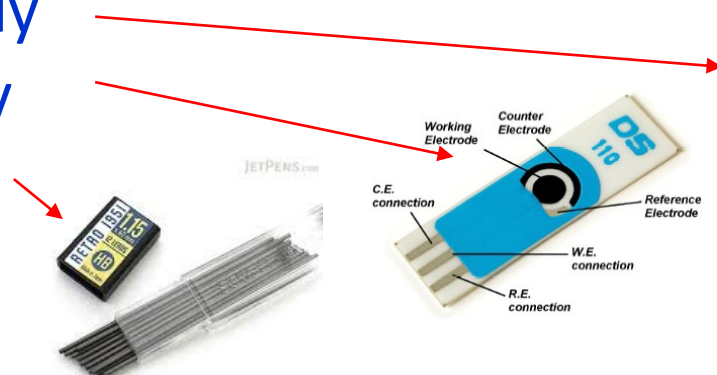
Jaké jsou naše oblíbené pracovní elektrody?



- rtuťové
- amalgamové (rtuť + jiný kov)

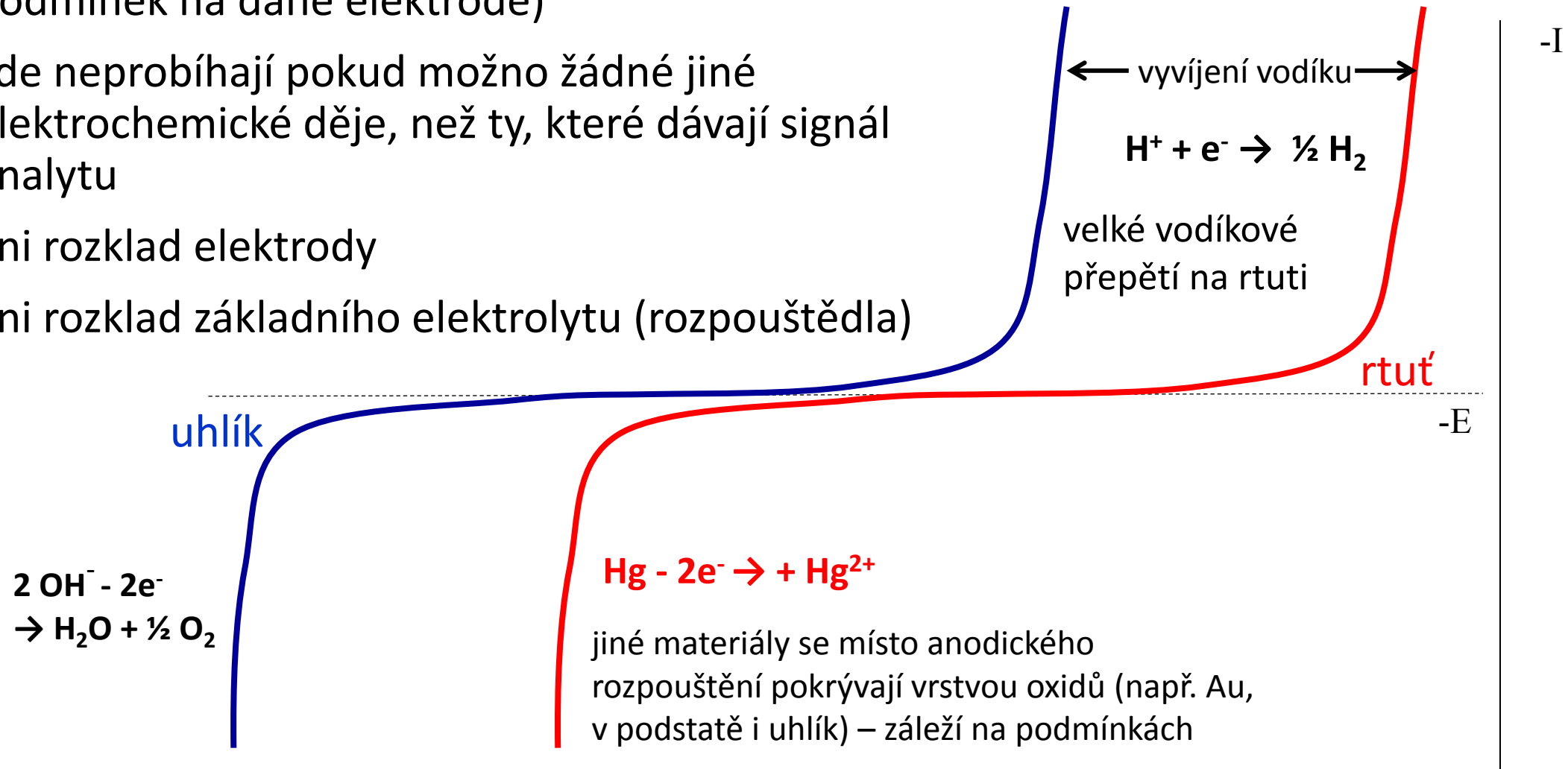


- uhlíkové: různé formy grafitu (sp^2 uhlík), diamant (sp^3 uhlík)
- pastové elektrody
- tištěné elektrody
- pentilkové tuhy



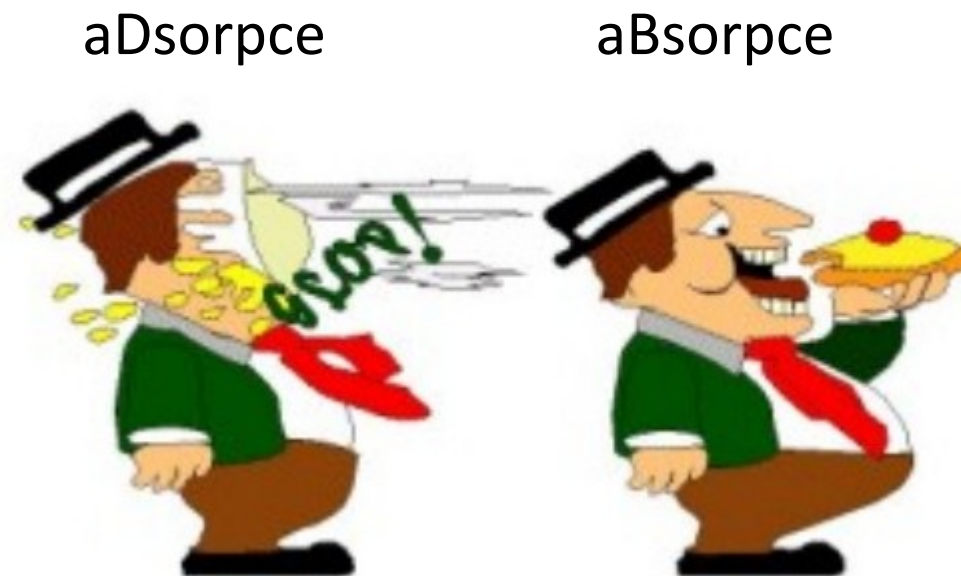
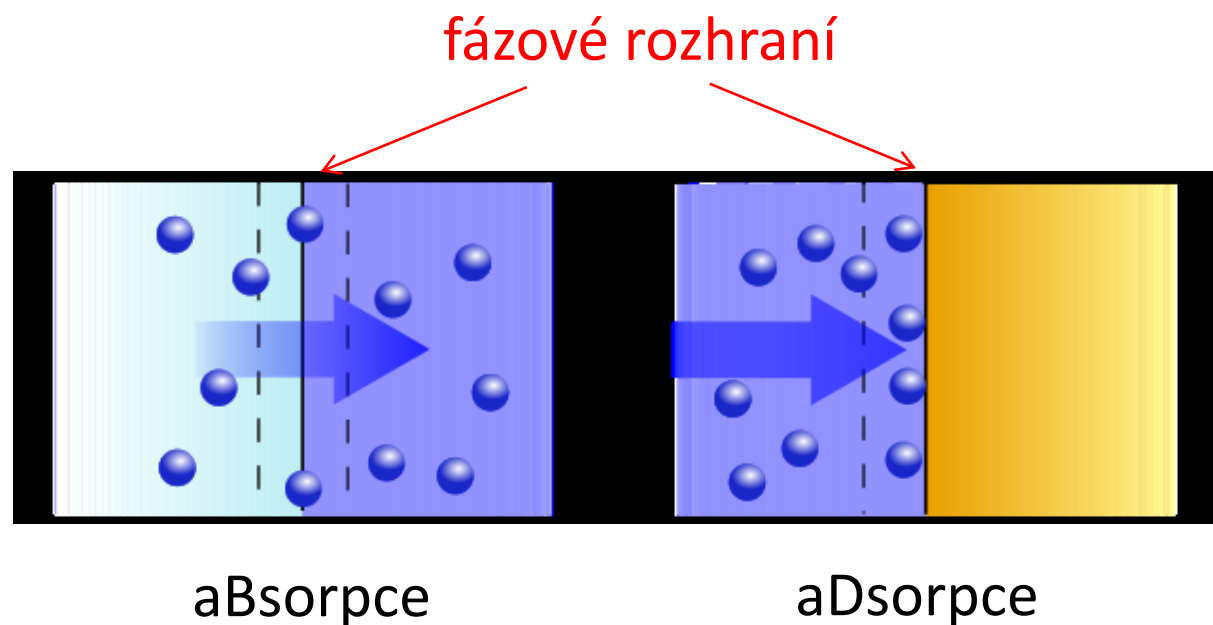
Potenciálové (pracovní) okno

- 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

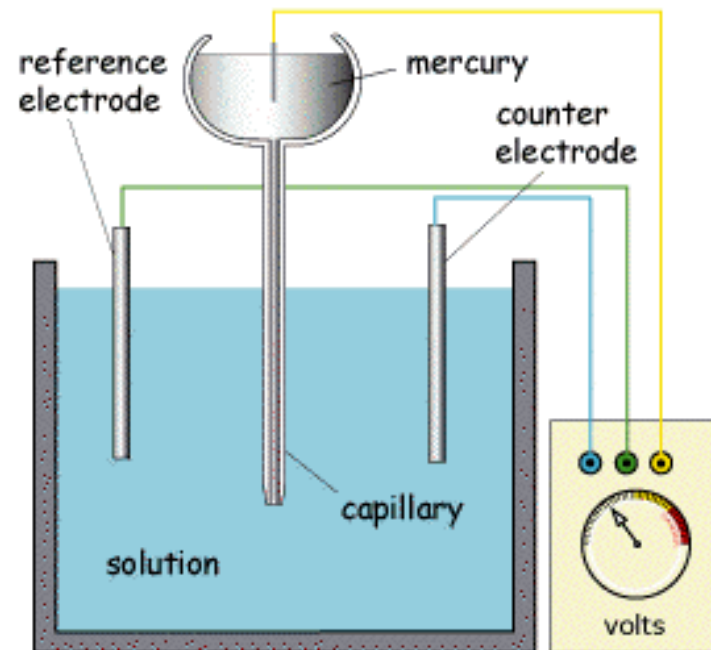
Adsorpce jako nepřítel:

- „*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:

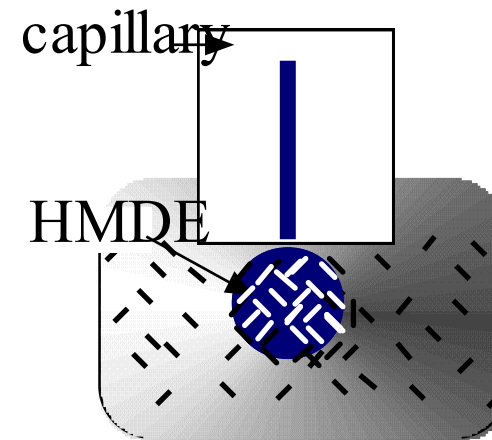
- v případě rtuťové kapkové elektrody **není problém** – nová kapka
- pevné elektrody:
 - mechanicky (obrousit, přešetřit)
 - chemicky (např. „*piranha solution*“)
 - elektrochemicky (anodicky nebo katodicky)
 - **většinou komplikace**



Adsorpce, pasivace a obnovování povrchu

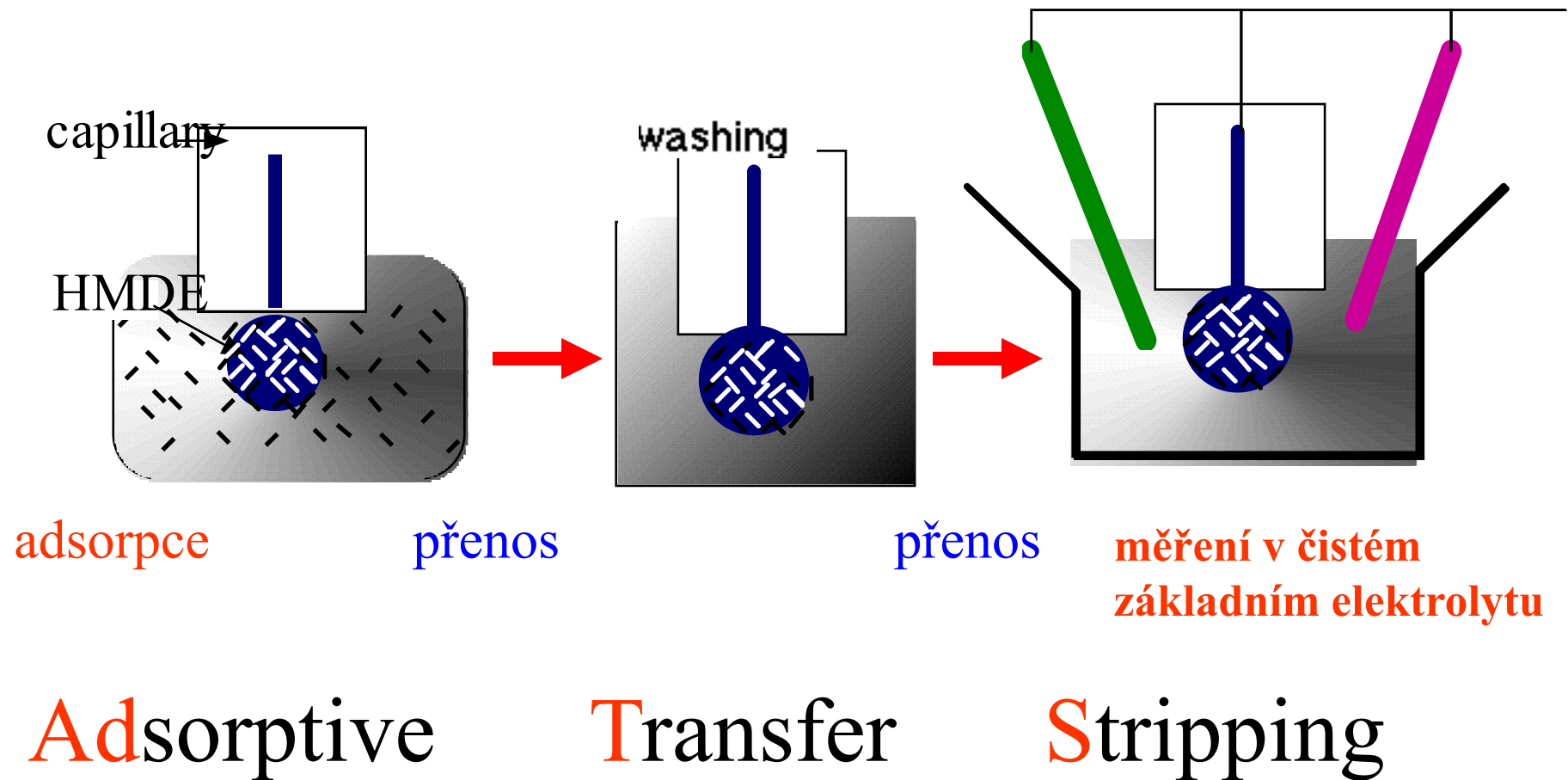
Adsorpce jako kamarád:

- 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, 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

puriny

dvoušroubovice DNA

thymine (T)

cytosine (C)

adenine (A)

guanine (G)

malý žlábek

velký žlábek

A

T

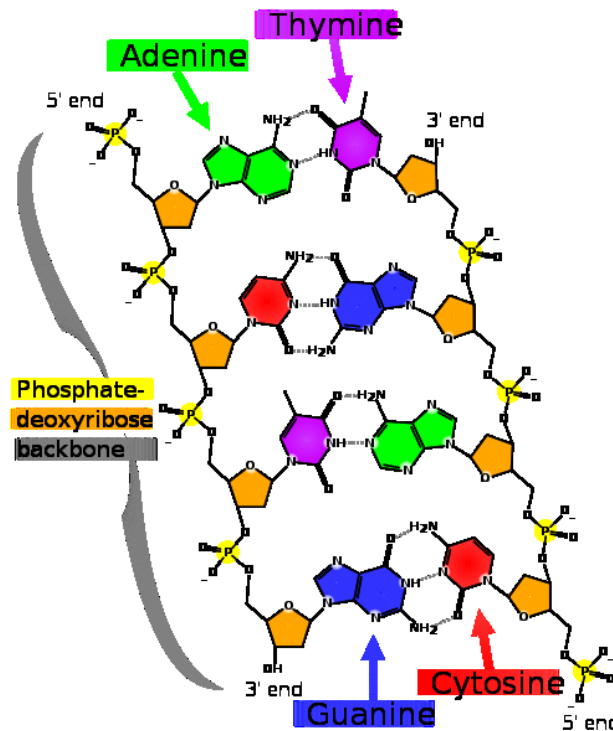
C

G

nukleotid

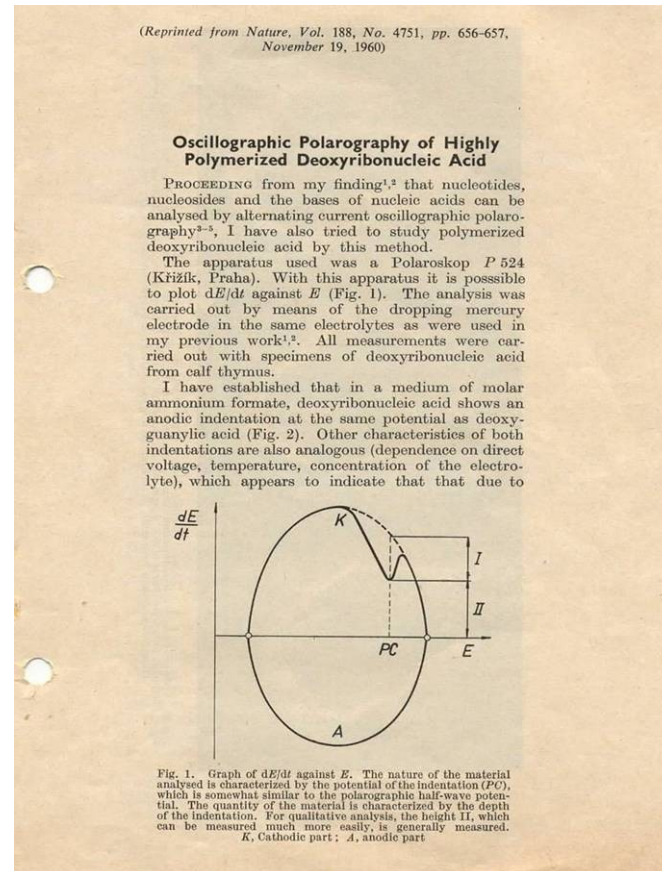
2-deoxyribose

← phosphate

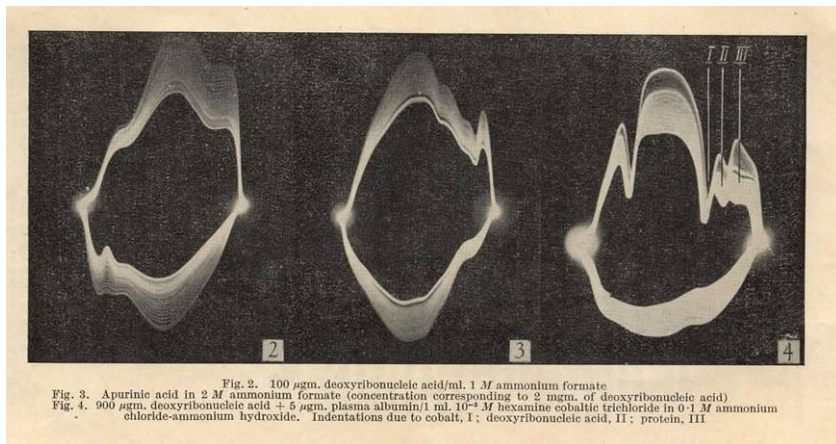


párování bází

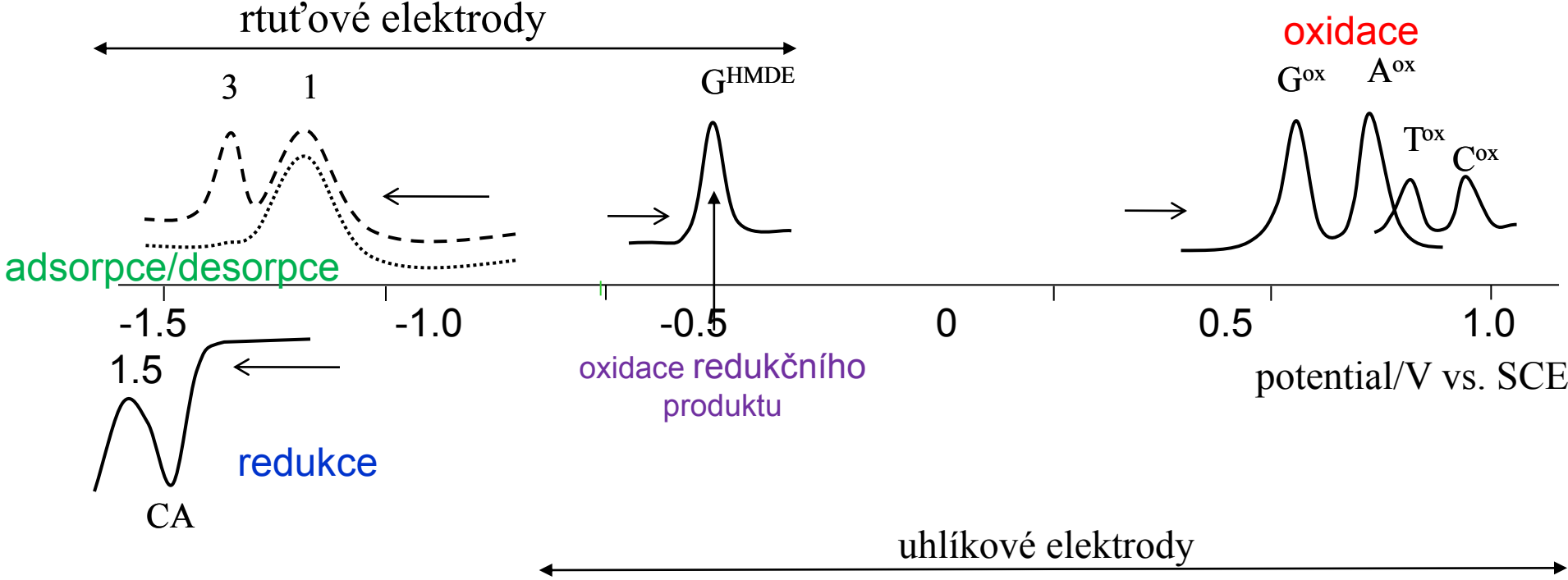
Emil Paleček (50. léta): objev polarografie DNA



Česká Hlava 2014



Přehled elektrochemie (přírodních) NK



Podrýváme dogmata...



Contents lists available at ScienceDirect

Electrochemistry Communications

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



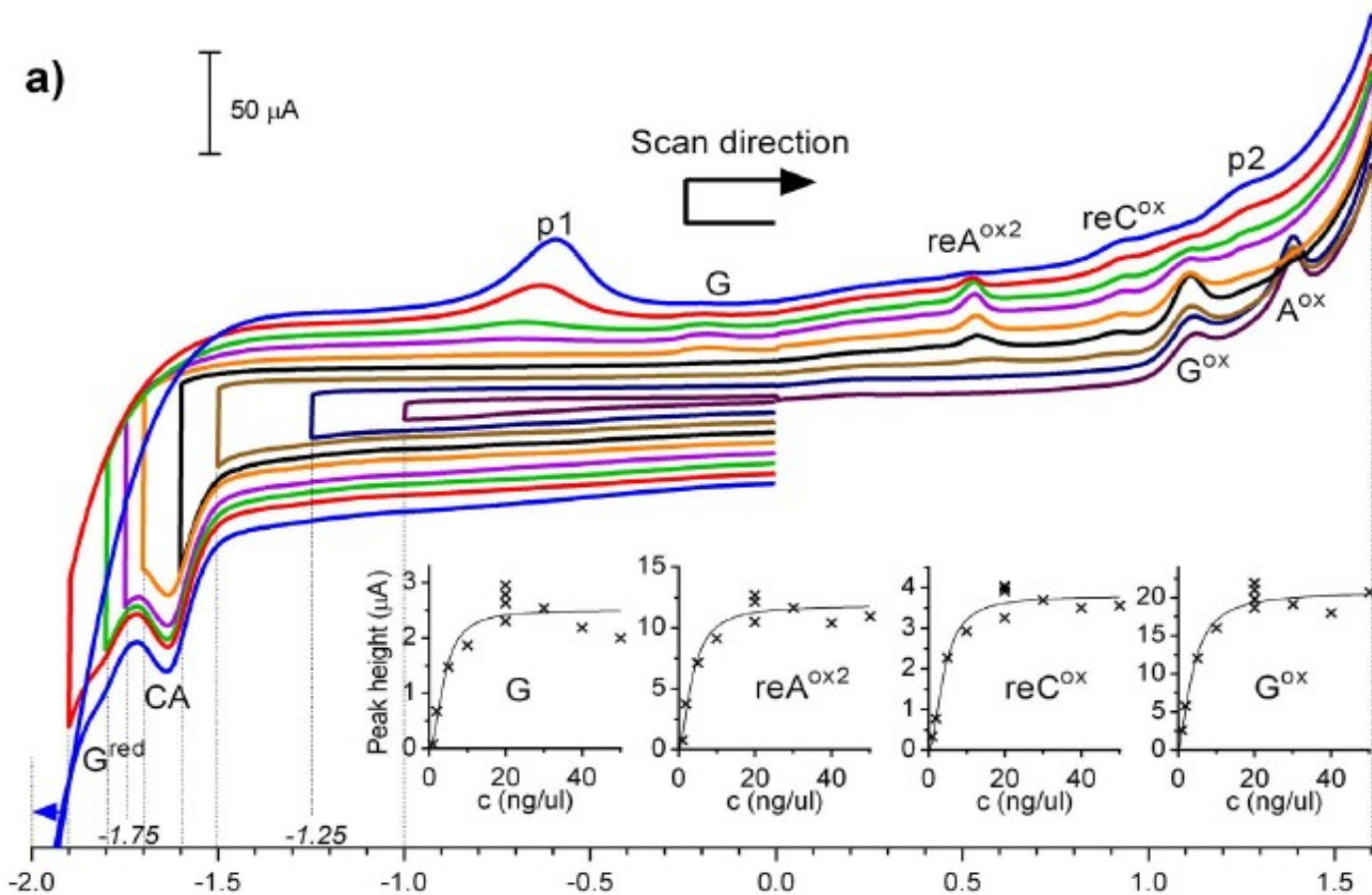
redukce bází na uhlíku

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



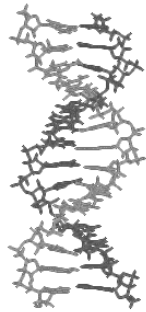
+ další možnosti detekce produktů redukce nebo oxidace bází

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

Adsorpčně-desorpční procesy DNA na negativně nabitém Hg povrchu

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

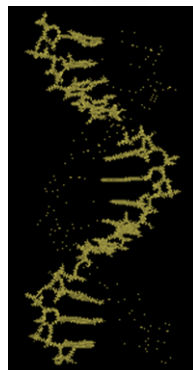
dvoušroubovice



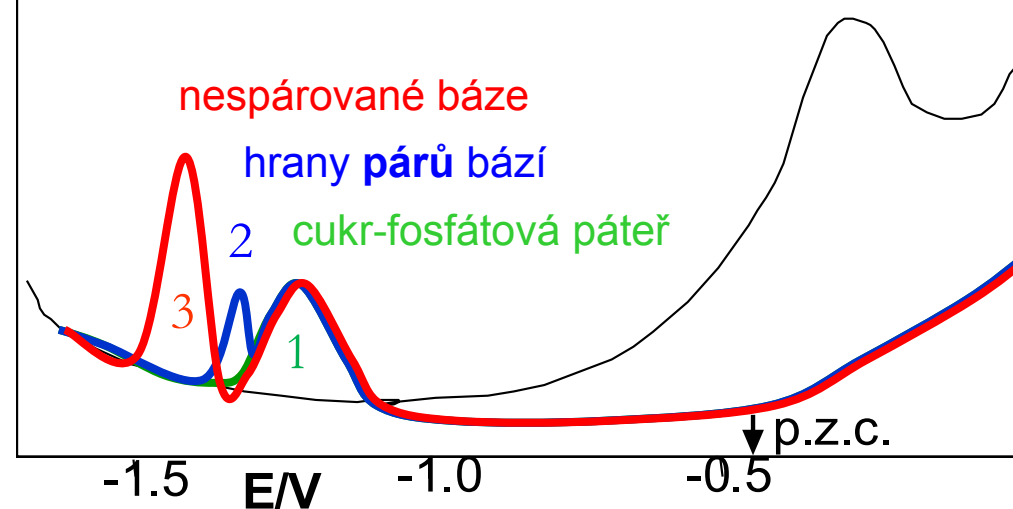
deformovaná dvoušroubovice



jednořetězcová DNA



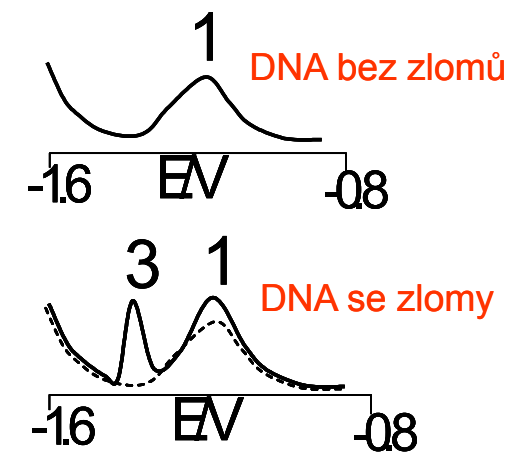
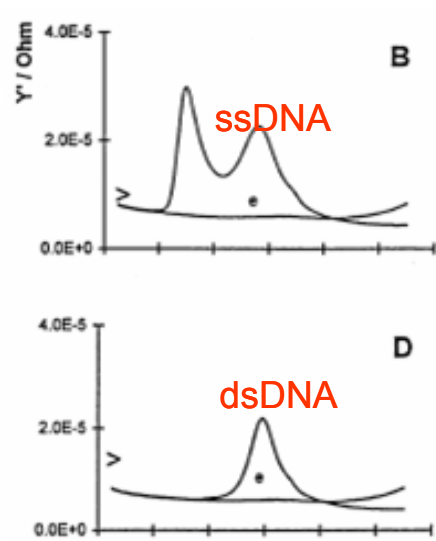
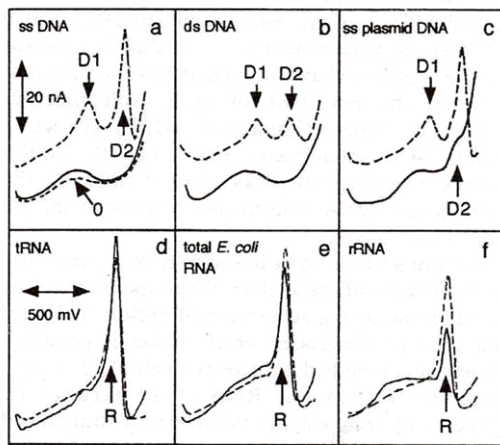
Složky DNA, které mohou vstoupit do kontaktu s povrchem elektrody:



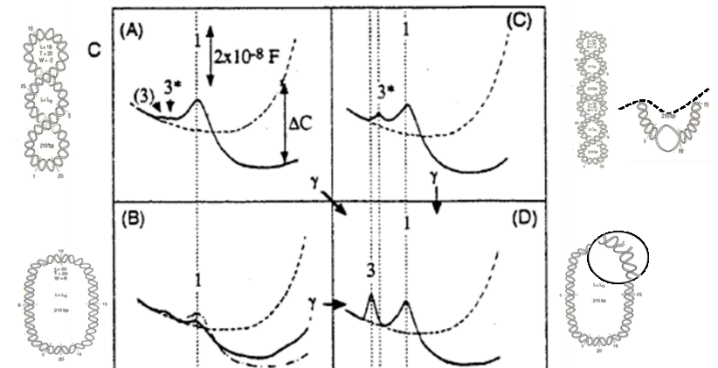
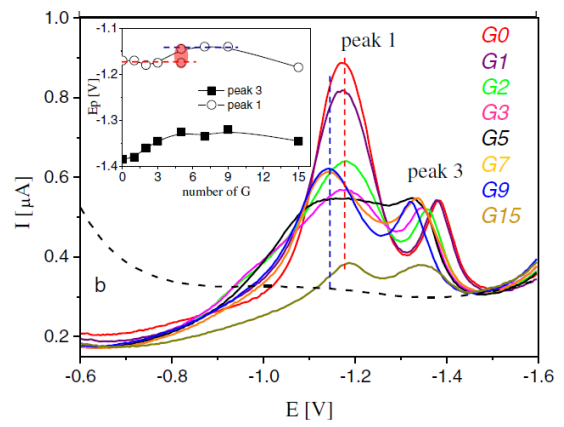
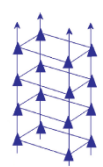
Píky 2 a 3: informace o struktuře DNA

Strukturální analýza nukleových kyselin pomocí adsorpce/desorpce

RNA vs. DNA

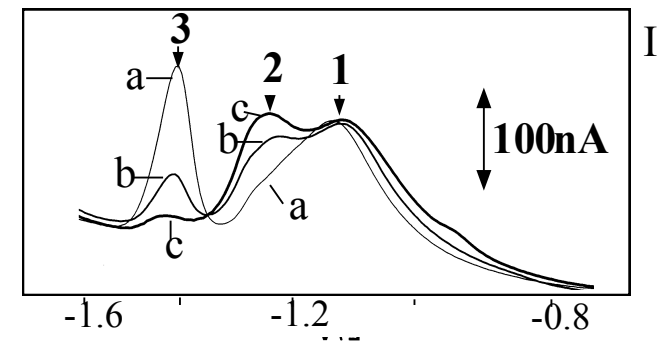


DNA kvadruplexy



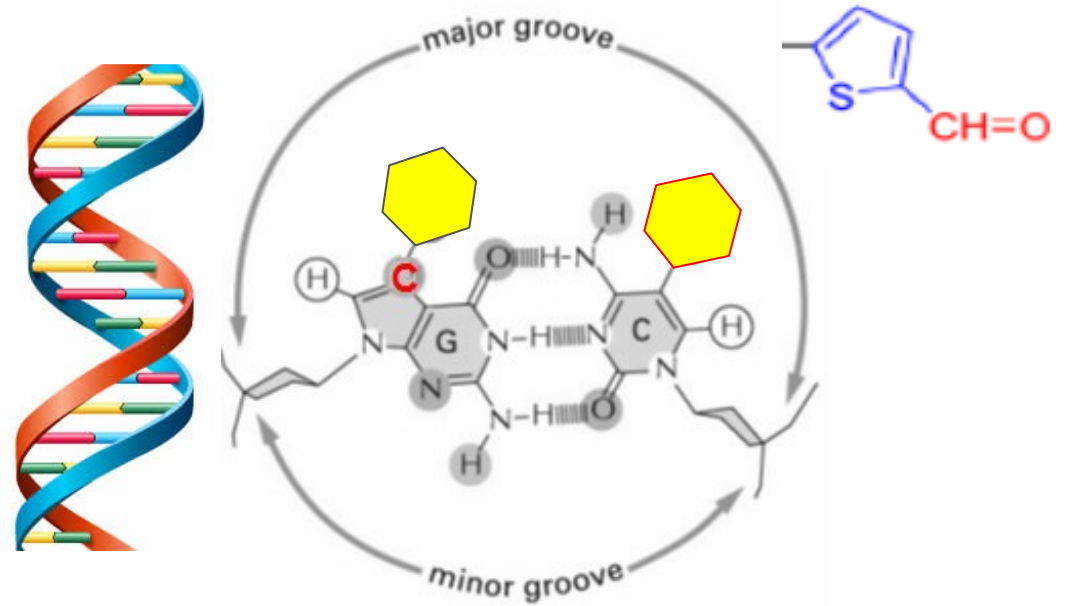
superhelikální DNA

interkalace: interakce DNA s léčivý



Modifikace DNA ve velkém žlábk

- 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

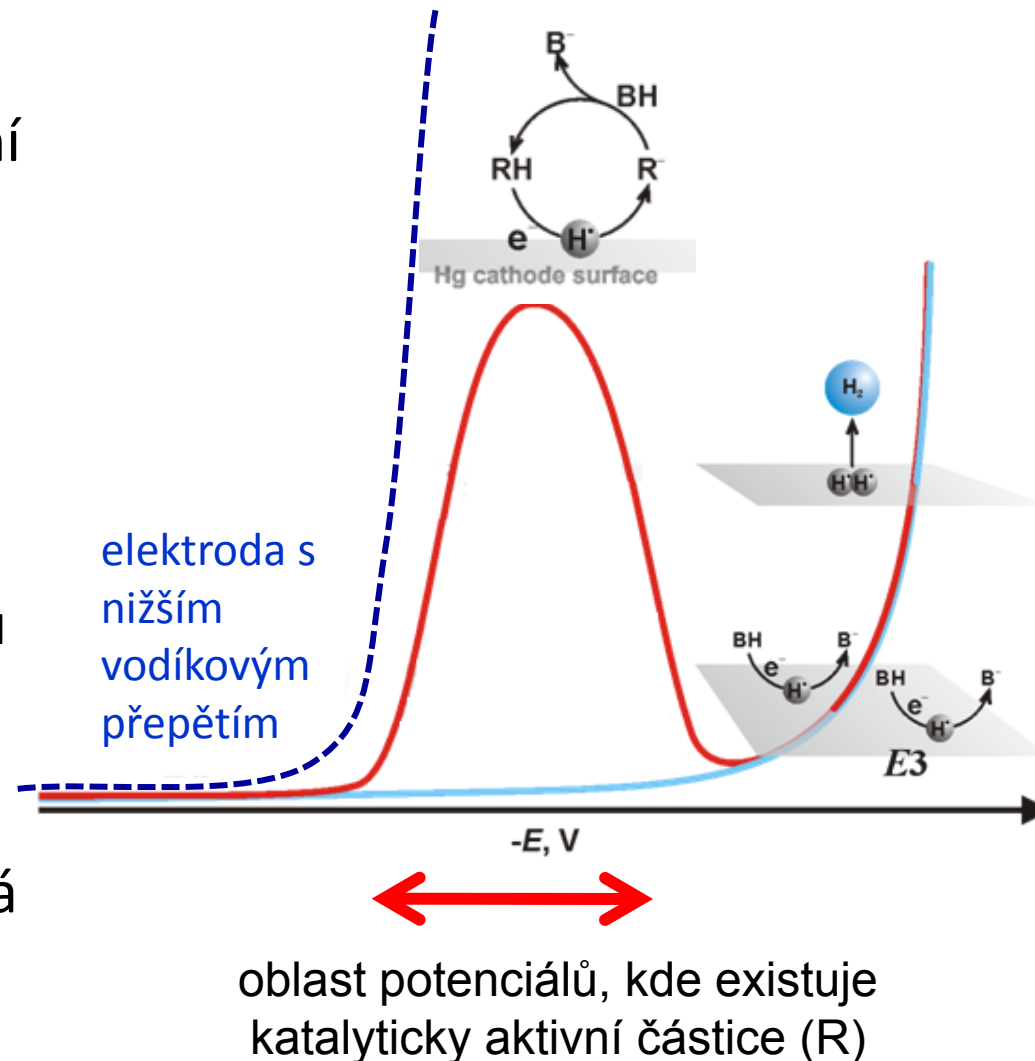


C^{FT} – rozsah modifikace

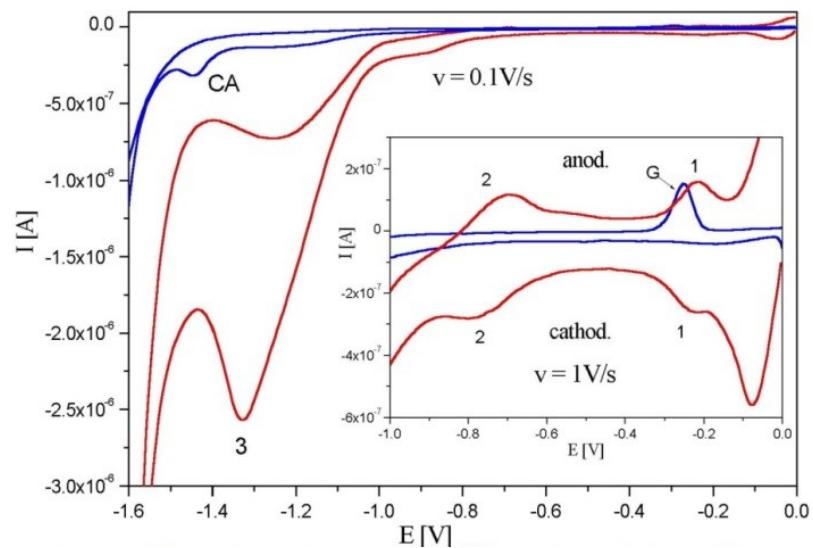
Katalytické vylučování vodíku na rtuťových elektrodách

Katalytické vylučování vodíku na rtuťových elektrodách

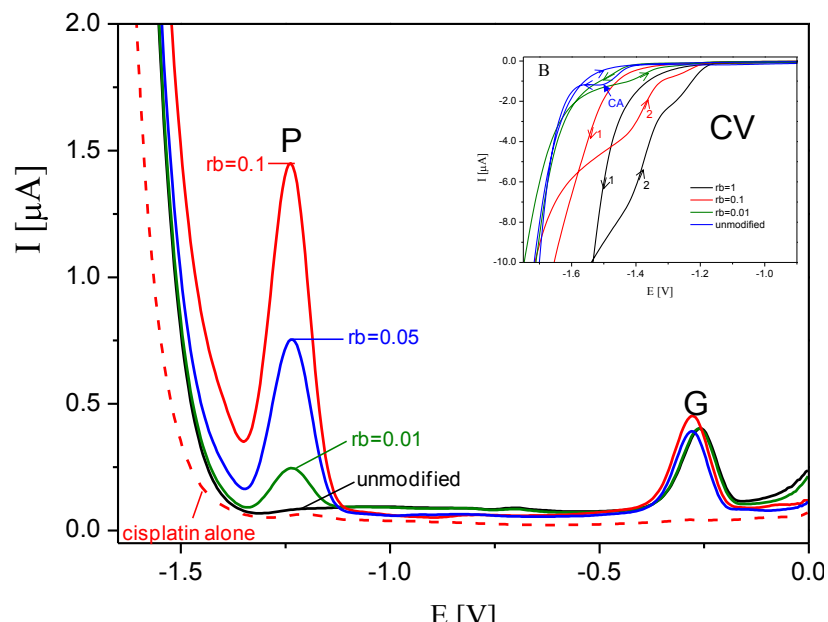
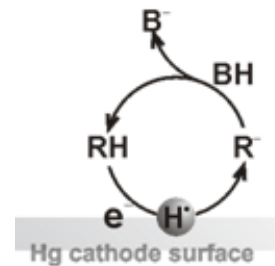
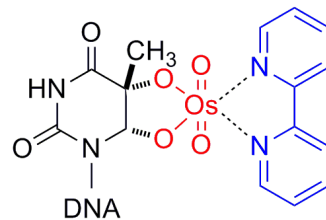
- lze měřit díky dostatečně vysokému vodíkovému přepětí (=vysoká aktivační energie pro redukci protonů H^+)
- katalýza: obecně usnadnění nějakého procesu snížením aktivační energie
- katalyzátory elektrochemicky generované v určité oblasti potenciálů
- katalyzátor se nepotřebovává \rightarrow zprostředkuje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



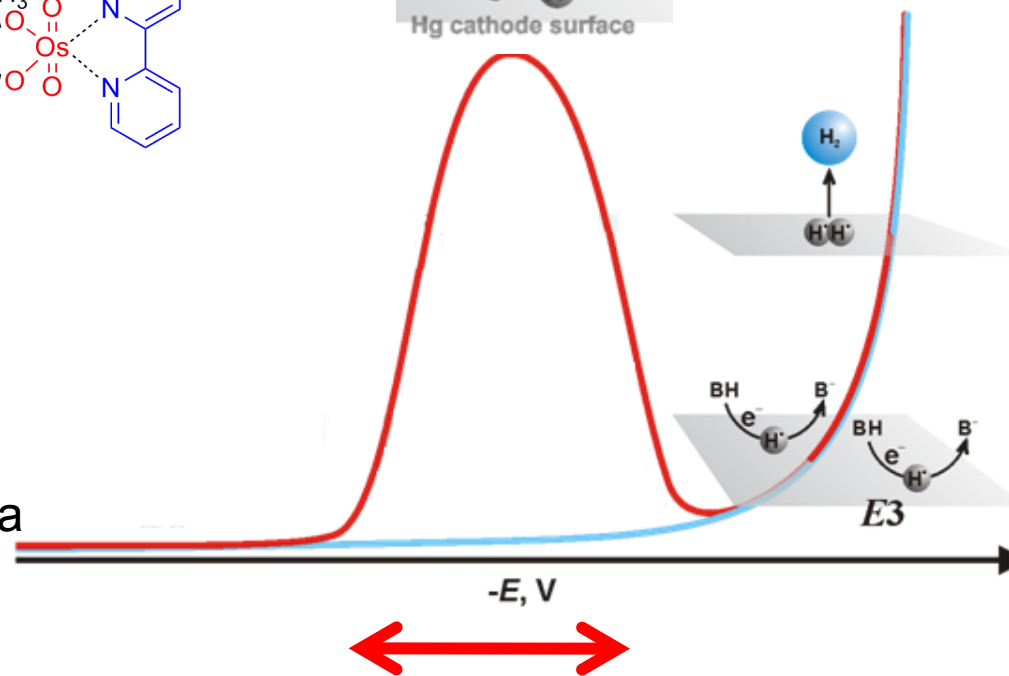
Katalytické vylučování vodíku doprovázející redukcí komplexů přechodných kovů/jejich aduktů s DNA



osmium

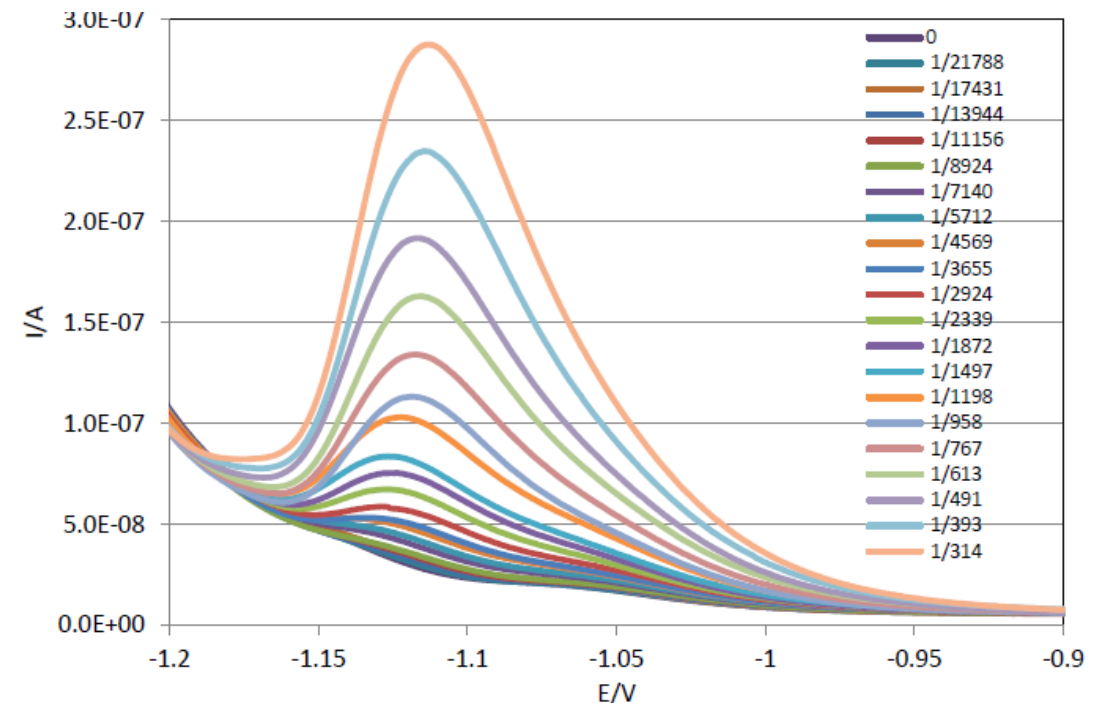


platina



Nepřirozené páry bází 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!**



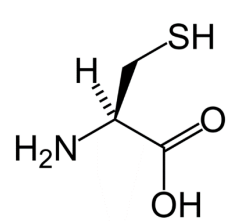
Elektrochemie proteinů



-prakticky od objevu polarografie

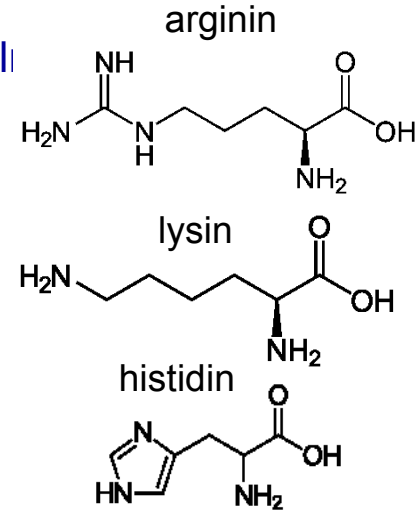
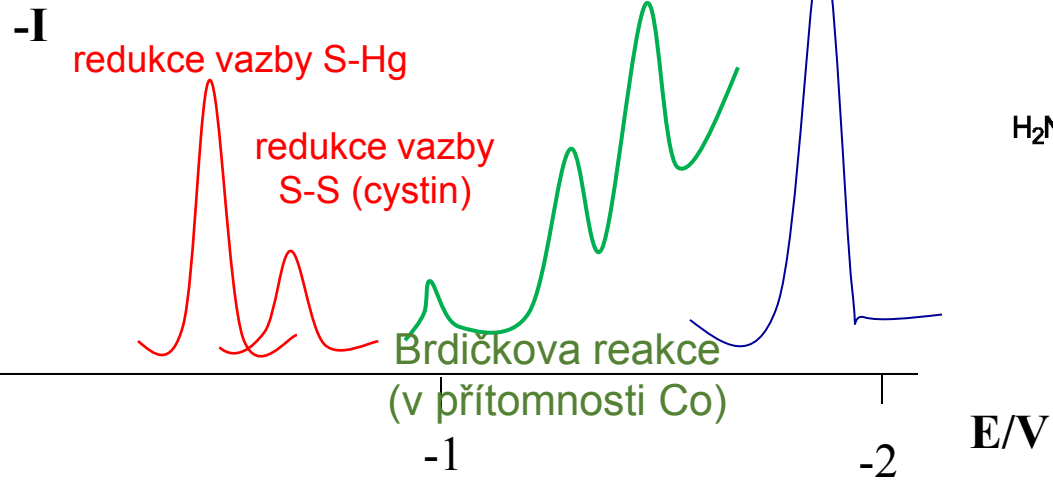
-odvozena od elektrochemie jejich složek, tj. aminokyselin

RTUŤOVÉ ELEKTRODY

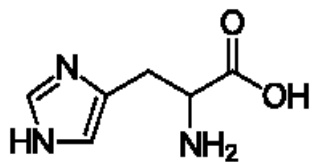
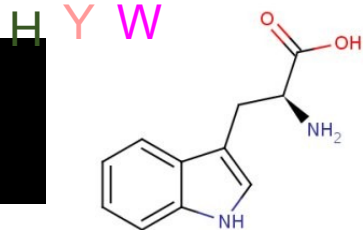
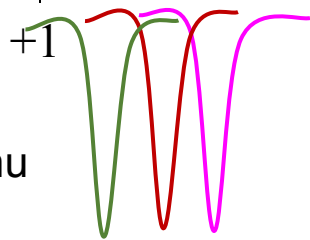


katalytické vylučování vodíku

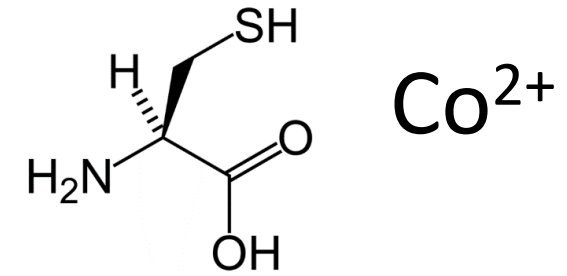
prenatriová vlna pík H



UHLÍKOVÉ ELEKTRODY +1
elektrochemická oxidace tryptofanu, tyrozinu a histidinu

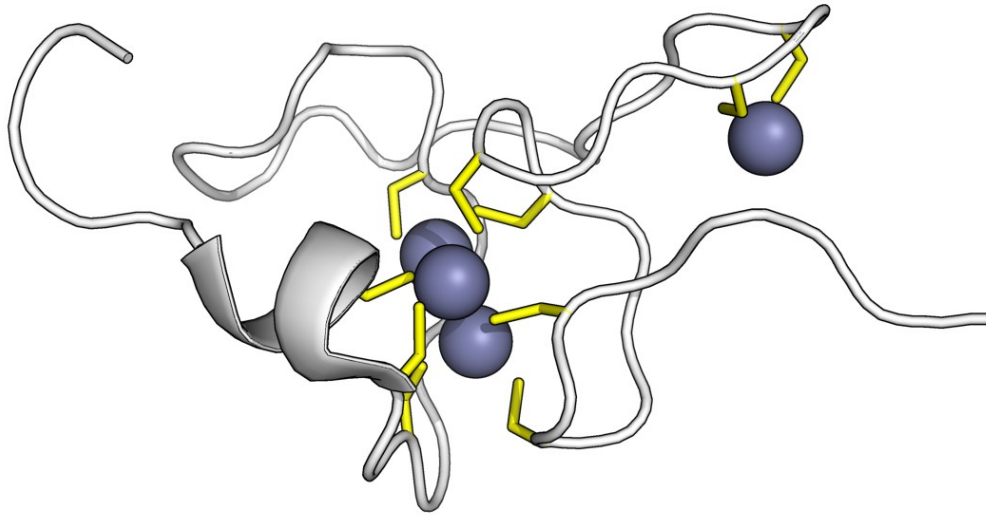


Brdičkova reakce



- 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**

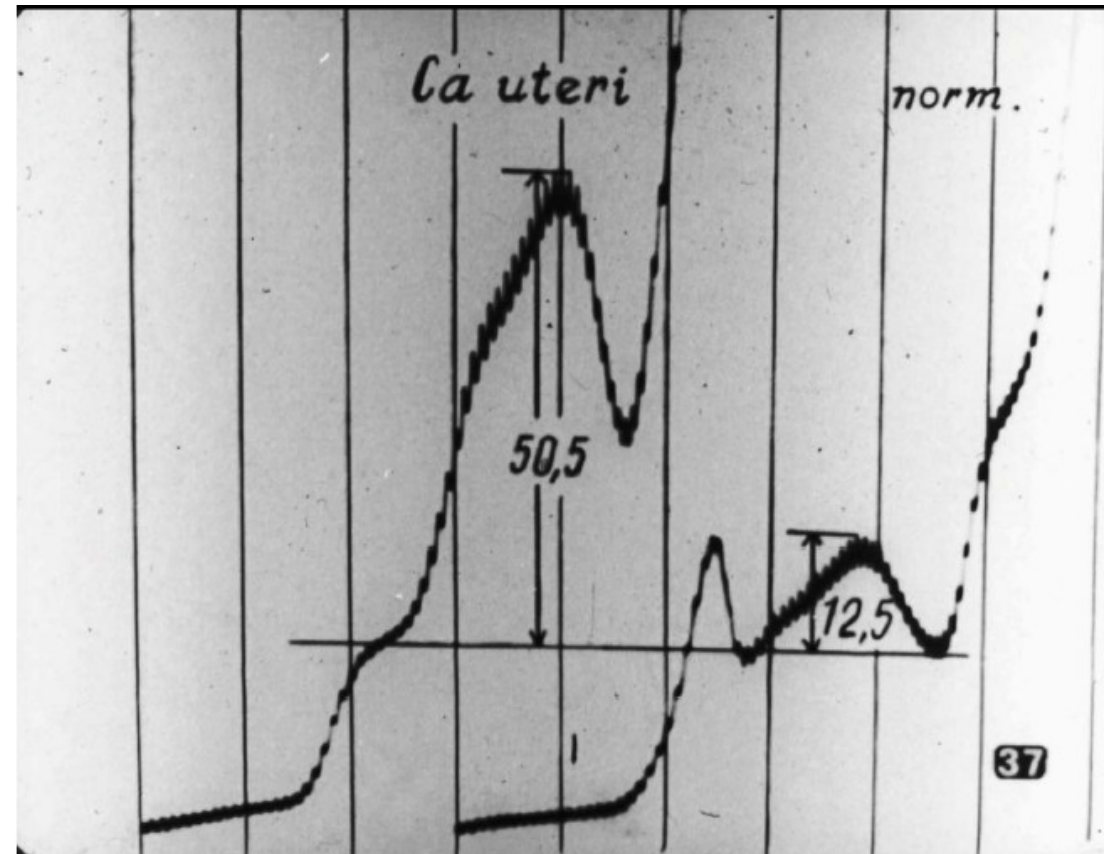
Jednoduché stanovení metalothioneinů a fytochelatinů



metalothionein (komplex se zinečnatými ionty)

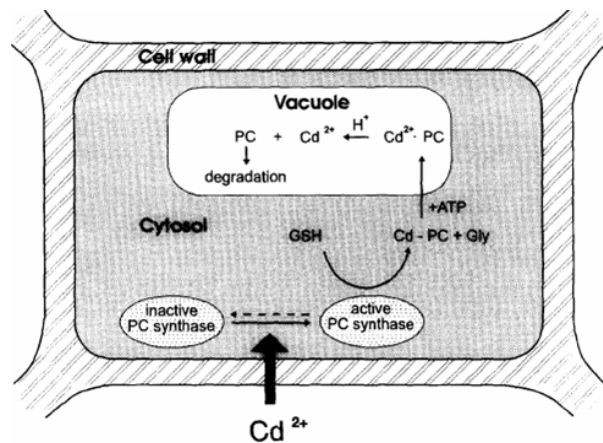
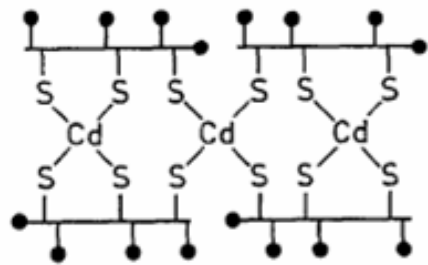
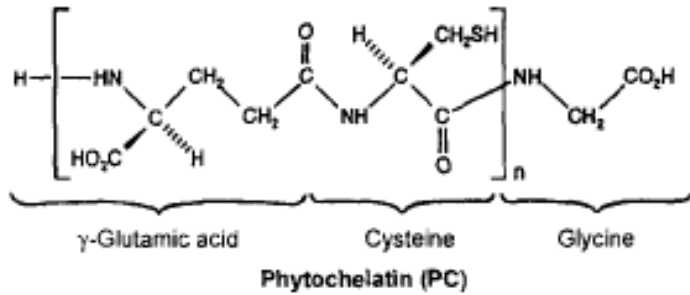
- kdysi poměrně rozšířený diagnostický test
- R. Kizek a kol. (MENDELU)
- rakovina a metalothioneiny

Brdičkova reakce a diagnostika rakoviny?

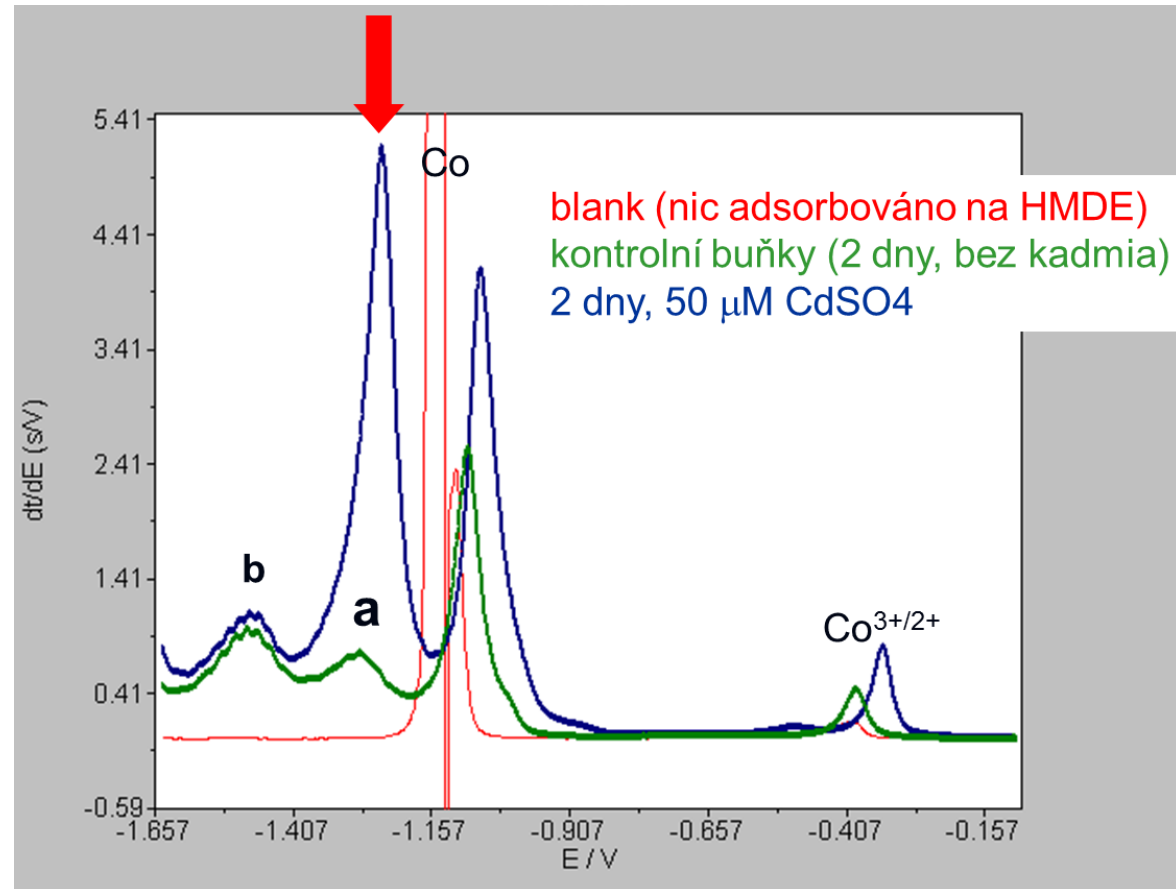


Jednoduché stanovení metalothioneinů a fytochelatinů

fytochelatiny: každá cca druhá AK cystein

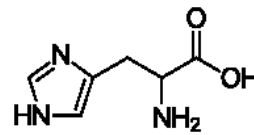
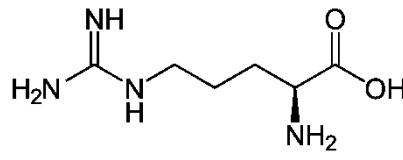
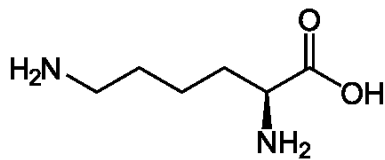


Lze fytochelatiny stanovit elektrochemicky
co nejjednoduším způsobem?



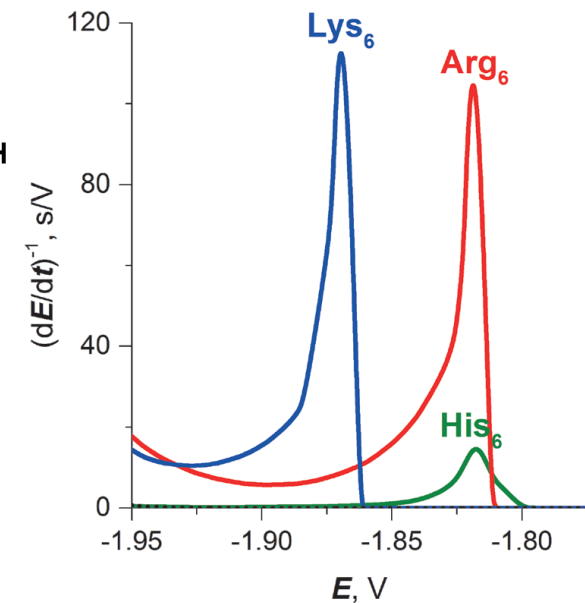
pík H a strukturně citlivá analýza proteinů

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

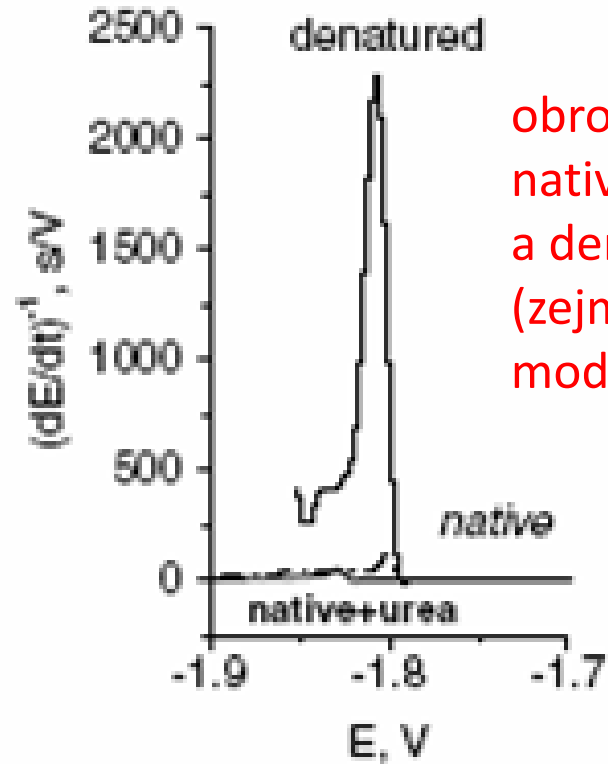


- vysoká citlivost detekce peptidů a bílkovin
- citlivost k

- 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

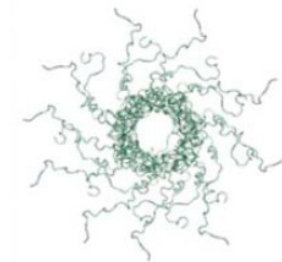
(b)



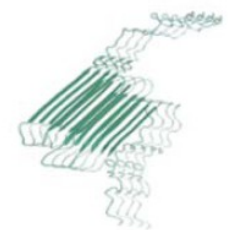
Native monomer



Unfolded monomer

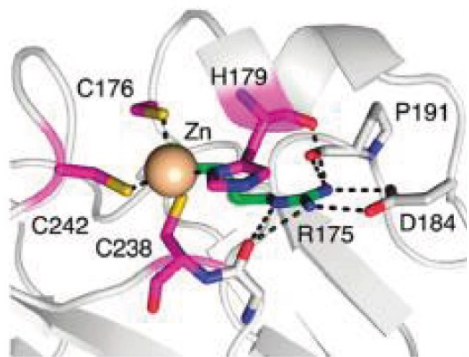


Oligomer



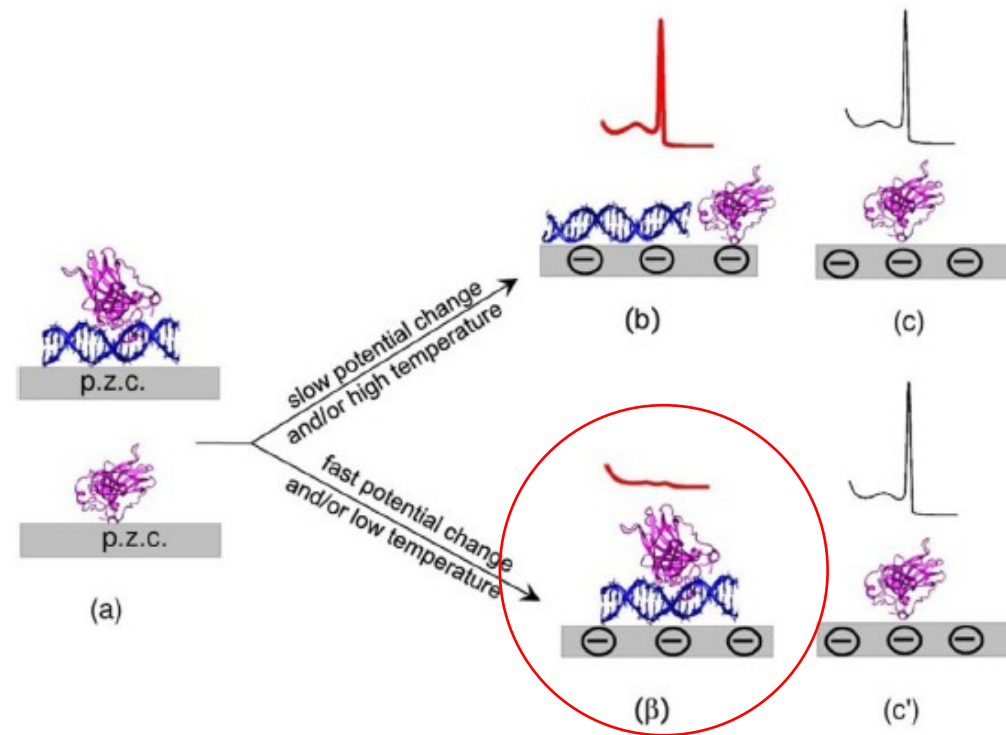
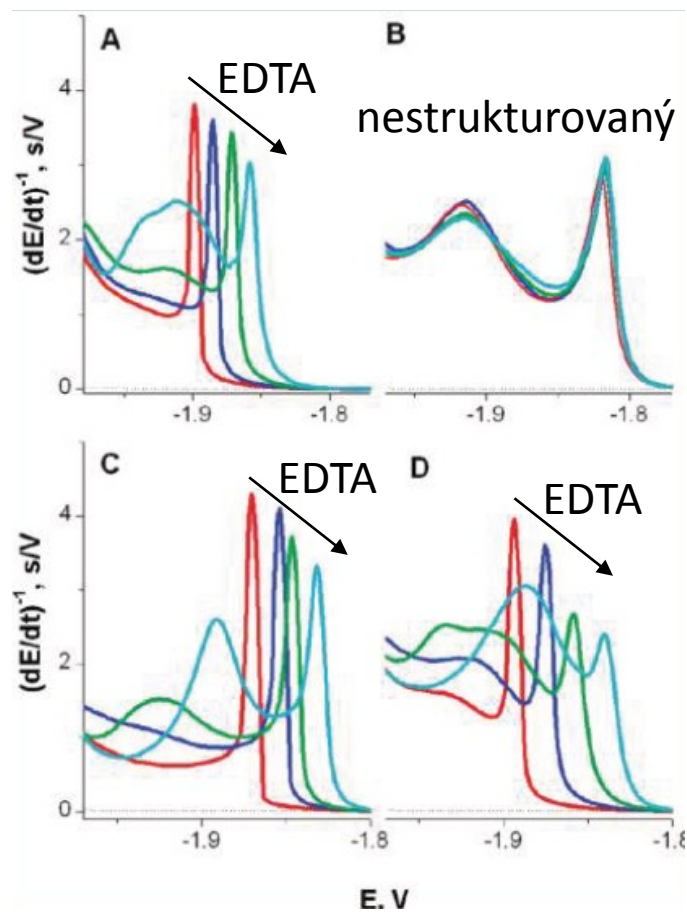
Fibril

pík H a strukturně citlivá analýza proteinů



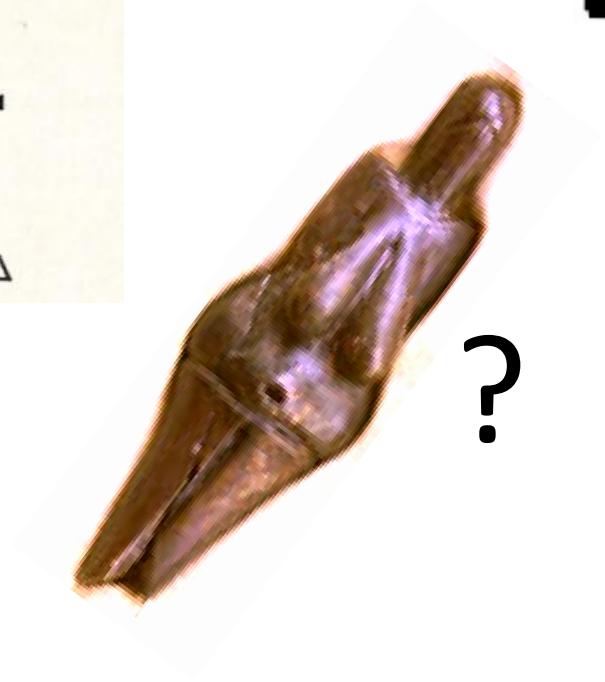
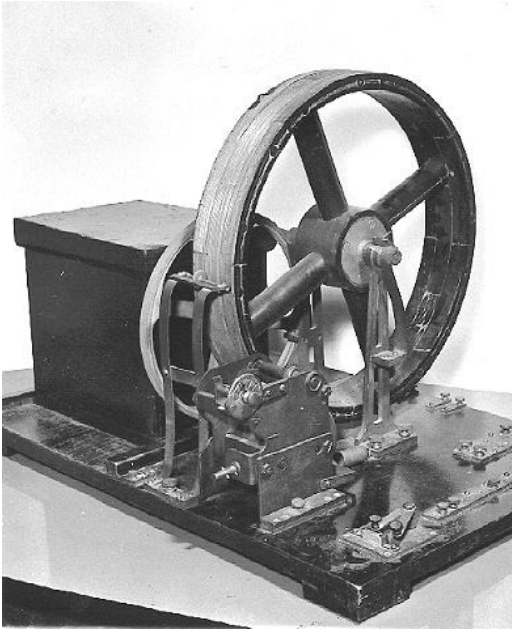
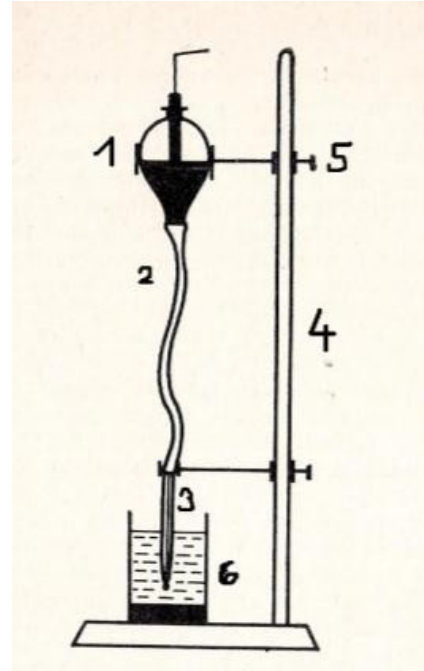
„unfolding“ proteinů
v důsledku odstranění
strukturně významného
iontu zinku

(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??
TOXICKÉ JSOU I JINÉ VĚCI!