

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Anna Krbcová

VOLTAMETRICKÁ DETEKCE DNA A JEJÍHO POŠKOZENÍ
NA UHLÍKOVÉ KOMPOZITNÍ ELEKTRODĚ

Voltammetric Detection of DNA and Its Damage on a Carbon
Composite Electrode

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2022

Tato bakalářská práce byla vypracována v rámci Specifického vysokoškolského výzkumu (projekt SVV260560) a finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (projekt GAČR 20-01589S).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 23. 4. 2022

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky k mé práci. Dále děkuji za ochotu a trpělivost při konzultacích.

Abstrakt

V této bakalářské práci bylo optimalizováno použití uhlíkové kompozitní elektrody pro detekci poškození dvouvláknové DNA (dsDNA) pomocí UVC záření. Měření probíhalo pomocí dvou voltametrických technik, a to diferenční pulzní voltametrie a DC voltametrie ve tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla kompozitní elektroda z ultračistého grafitu (UTGE) ponořená do roztoku nízkomolekulární DNA izolované z lososích spermií o koncentracích 10; 1 a 0,5 mg/ml. Následné poškození dsDNA probíhalo pomocí UVC záření o vlnové délce 254 nm a bylo posuzováno porovnáním výšek oxidačních píků bází DNA mezi nepoškozenou a poškozenou dsDNA. Došlo se k závěru, že pro pozorování hlubší degradace DNA je třeba delší čas ozařování než námi zvolených 120 minut, avšak již při této době ozařování lze zaznamenat mírné poškození dsDNA a rozevírání dvoušroubovice.

Klíčová slova

DNA, poškození DNA, UV záření, DC voltametrie, diferenční pulzní voltametrie, kompozitní elektroda z ultračistého grafitu

Abstract

In this bachelor thesis, the use of a carbon composite electrode for the detection of double-stranded DNA (dsDNA) damage using UVC radiation was optimized. The measurement was performed using two voltammetric techniques, namely differential pulse voltammetry and DC voltammetry in a three-electrode system. The working electrode was an ultratrace graphite composite electrode (UTGE) immersed in a solution of low molecular weight salmon sperm dsDNA at concentrations of 10; 1 and 0,5 mg/mL. Subsequent damage to dsDNA was performed using UVC radiation at a wavelength of 254 nm and was assessed by comparing the heights of DNA base oxidation peaks between undamaged and damaged dsDNA. It was concluded that a longer irradiation time than our chosen 120 minutes was required to observe deeper DNA degradation, but that slight dsDNA damage and double helix opening can already be observed at this irradiation time.

Key words

DNA, DNA Damage, UV Radiation, DC Voltammetry, Differential Pulse Voltammetry, Ultratrace Graphite Composite Electrode

Seznam zkratk

A	adenin
CPD	cyklobutanové pyrimidinové dimery
DCV	DC voltametrie
DPV	diferenční pulzní voltametrie
dsDNA	dvouvláknová DNA
G	guanin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
NMR	nukleární magnetická rezonance
NPV	normální pulzní voltametrie
ssDNA	jednovláknová DNA
UTGE	elektroda z ultračistého grafitu
6-4PP	6-4 fotoprodukty

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část	8
2.1. DNA.....	8
2.1.1 Poškození DNA	9
2.1.2 Poškození DNA pomocí UV záření.....	10
2.2. Elektrochemické chování DNA	12
2.2.1 Oxidace DNA	12
2.3 Elektrochemické DNA senzory	15
2.4 DC voltametrie.....	16
2.5 Diferenční pulzní voltametrie.....	16
2.6 Pevné kompozitní elektrody	17
3. Experimentální část.....	19
3.1. Reagencie	19
3.2 Aparatura	19
4. Výsledky a diskuse	21
4.1. Optimalizace podmínek.....	21
4.2. Detekce poškození DNA pomocí UV záření	33
5. Závěr.....	35
6. Literatura.....	36

1. Úvod

Využití uhlíkových elektrod je díky jejich velké stabilitě, mechanické odolnosti, dlouhé životnosti a nízké pořizovací ceně vhodnou volbou ke zkoumání poškození DNA. Jelikož existuje mnoho látek a okolních vlivů poškozujících genetickou informaci, je třeba toto poškození co nejrychleji, nejlevněji a nejjednodušeji detekovat. Těmito požadavky se řídí i tato bakalářská práce, která se zabývá voltametrickou detekcí DNA a jejího poškození na kompozitní elektrodě z ultračistého grafitu (UTGE). K poškození dvouvláknové DNA (dsDNA) bylo zvoleno UVC záření o vlnové délce 254 nm a následné vyhodnocení probíhalo pomocí diferenční pulzní voltametrie v prostředí acetátového pufru (pH = 4,6).

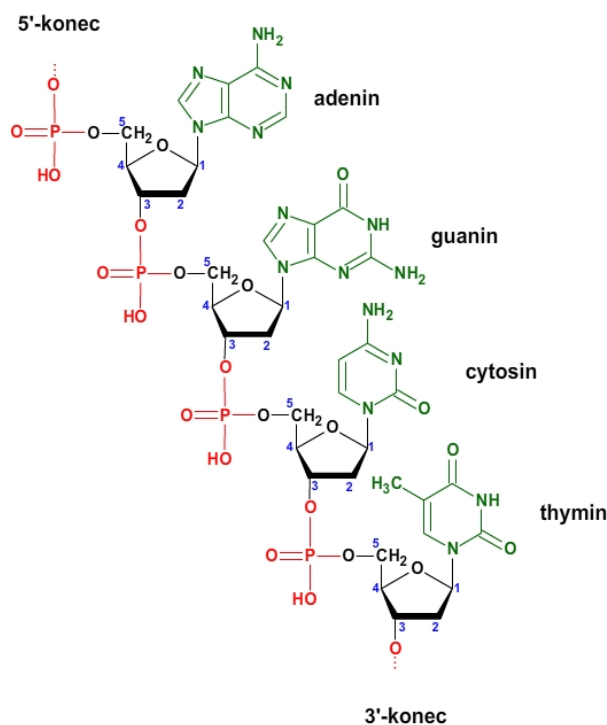
Cílem práce bylo optimalizovat podmínky pro použití elektrody z ultračistého grafitu právě k voltametrické detekci poškození DNA pomocí UVC záření.

2. Teoretická část

2.1. DNA

Deoxyribonukleová kyselina, též známá jako DNA (z anglického *deoxyribonucleic acid*), je lineární polymer tvořený z několika stavebních jednotek (obr. 1). Základem je pětiuhlíkatý monosacharid 2-deoxy- β -D-ribose. Dále je také tvořena zbytky kyseliny fosforečné – fosfátovými skupinami, které se díky fosfodiesterové vazbě váží na 3' a 5' konce příslušných pentos. Tvoří tak pentosofosfátovou páteř DNA. DNA je často nazývána nositelkou genetické informace, protože jsou v její struktuře jako důležité informační složky přítomné nukleové báze. Z pohledu chemika jsou to bazické deriváty dusíkatých heterocyklických sloučenin, a to pyrimidinu a purinu. Mezi pyrimidinové báze řadíme cytosin (C), thymin (T) a mezi purinové adenin (A), guanin (G). Při párování bází dochází k tomu, že se vytváří tři vodíkové můstky mezi guaninovým a cytosinovým zbytkem a dva vodíkové můstky mezi adeninovým a thyminovým zbytkem. Důležité je též zmínit N-glykosidovou vazbu, kterou jsou báze připojeny k deoxyribóze [1].

Purinové i pyrimidinové báze jsou díky přítomnosti konjugovaných dvojných vazeb molekuly rovinné a zároveň jsou schopny absorbovat UV záření, tím pádem v UV oblasti absorbuje i deoxyribonukleová kyselina. Absorpční maximum bylo stanoveno okolo 260 nm. Díky tomu jsme schopni sledovat změny v její struktuře [1].



Obrázek 1 – Primární struktura DNA, převzato z [2]

2.1.1 Poškození DNA

Je obecně známo, že se buněčná DNA vyskytuje především ve formě dvoušroubovice. Avšak může být přítomna i jako jednovláknová DNA, vlásenka či trojitá šroubovice. Výhodou elektrochemických metod je, že jsou schopny rozlišovat mezi jednotlivými sekundárními strukturami a zároveň se využívají ke studiu těchto mezistrukturních přechodů [3].

Poškození DNA způsobuje poruchy základních životních procesů a může vést ke změnám párování bází či mutacím. Akumulace mutací nebo jiných druhů poškození DNA zvyšuje riziko vzniku nádorů [4].

Mezi nejběžnější techniky, pomocí níž lze sledovat poškození DNA, patří: gelová elektroforéza, spektrofotometrie, hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetická rezonance či právě zmiňované elektrochemické metody [1].

Využití elektrochemických metod je v tomto ohledu velice rozmanité a slouží např. k detekci zlomů řetězce DNA a poškození bází nebo k detekci elektroaktivních látek, které interagují s DNA. V minulosti byla navržena řada elektrochemických senzorů pro detekci poškození DNA, avšak jejich citlivost byla velmi nízká [4]. Jedna z objevených metod popisuje redoxní indikátor pro přímou detekci poškození dvoušroubovice DNA za použití interkalátorů vázajících se specificky na imobilizovanou DNA a produkujících redoxní signál na uhlíkových elektrodách. Při degradaci DNA se signál tohoto indikátoru snížil kvůli jeho nižší afinitě k jednovláknové DNA. Metoda byla použita pro studium poškození DNA vyvolaného nitrofluoreny [5], sloučeninami cínu či arsenu nebo hydroxylovými radikály [6].

Další metodou je gelová elektroforéza, která se používá k izolaci, identifikaci a charakterizaci vlastností fragmentů DNA. Malé množství DNA lze vložit do jamky na jednom konci gelu v zařízení, které umožňuje průchod proudu tímto gelem. Jelikož je DNA záporně nabitá, bude migrovat ke katodě. Menší fragmenty DNA (např. právě ty vzniklé při poškození nativní struktury DNA) se budou pohybovat rychleji než fragmenty větší, dochází tedy k izolaci fragmentů na základě velikosti [7].

Hmotnostní spektrometrie je pro svou vysokou citlivost ideální metodou pro detekci, charakterizaci a stanovení malých množství aduktů DNA v biologickém materiálu, zejména v kombinaci s HPLC a kapilární elektroforézou. Hmotnostně spektrometrické metody jsou považovány za strukturně specifické, co se ale týče DNA aduktů, které vznikají při poškození DNA především *in vivo*, neumožňují exaktní určení jejich struktury [8].

Nukleární magnetická rezonance je analytická technika, která poskytuje informace o místním magnetickém poli kolem atomových jader. Lokální magnetické pole jádra je

ovlivněno vlastnostmi molekulární struktury jako je konstituce, konfigurace, konformace, mezimolekulární interakce atd. Přesně tyto výhody se rovněž při sledování poškození DNA často uplatňují. NMR může poskytnout informace o chemické struktuře, která nemá konkurenci s žádnou jinou analytickou metodou [9].

Při dalším sledování poškození DNA různými léky a polutanty bylo zjištěno, že nejvhodnější cíl pro oxidanty je báze guanin. Právě oxidační pík guaninového zbytku se často používá ke sledování poškození DNA [10]. Produkty oxidačního poškození DNA mohou být analyzovány v hydrolyzátech DNA pomocí HPLC [11].

Bylo očekáváno, že elektrochemické metody brzy doplní optickou detekci DNA a RNA v hybridizačních DNA senzorech [11]. Tyto senzory slouží k detekci hybridizace mezi dvěma vlákny DNA. Sledují se různé faktory, jedním z nich je např. elektroaktivita bází DNA. Detekce hybridizace DNA probíhá na povrchu elektrody nebo je elektrochemické měření odděleno od procesu hybridizace, který probíhá na jiném povrchu, než je povrch elektrody. Dalším faktorem pro detekci hybridizace DNA jsou elektroaktivní značky, kdy byl nejčastěji využíván ferrocen, kterým byla koncově značena hybridizační sonda [12].

2.1.2 Poškození DNA pomocí UV záření

Zkoumáním biologických účinků UV záření vznikly studie dokumentující poškození ozonové vrstvy a následné zvýšení přítomnosti UV-B záření (280–320 nm) na zemském povrchu. Cílem poškození způsobeného UV-B zářením je rovněž DNA. Přestože všechny biologické tkáně obsahují látky pohlcující UV záření (převážně nukleové kyseliny a proteiny) a rostliny produkují další pigmenty absorbující UV záření, žádná DNA v povrchové tkáni se nemůže zcela vyhnout expozici UV záření. Rostliny, stejně jako všechny živé organismy, musí mít určitou kapacitu pro opravu poškození DNA vyvolaného UV zářením. Protože rostliny jsou jedinečné ve své povaze při vystavení UV záření, je také možné, že si vyvinuly zvláště účinné mechanismy pro eliminaci poškození DNA vyvolaného UV zářením [13].

UV záření indukuje dvě nejhojnější mutagenní a cytotoxické léze DNA, jako jsou cyklobutanové pyrimidinové dimery (CPD) a 6-4 fotoprodukty (6-4PP) a jejich Dewarovy valenční izomery. Buňky vyvinuly řadu opravných nebo tolerančních mechanismů, aby čelily poškození DNA způsobeného UV zářením či jinými stresory. Po UV ozáření jsou CPD nejhojnější a pravděpodobně nejvíce cytotoxické léze, ale 6-4PP mohou mít závažnější, potenciálně letální, mutagenní účinky. Dewarovy izomery vznikají fotoizomerizací 6-4PP s vlnovými délkami delšími než 290 nm. UV zdroje obsahující vyšší podíl záření na hranici

mezi UV-B a UV-A, jako je sluneční UV záření, by měly produkovat vyšší podíl Dewarových izomerů, protože fotoizomerizace je nejúčinnější kolem 320 nm, což odpovídá UV absorpčnímu maximu 6-4PP [14].

Fotoreaktivace pomocí enzymu fotolyasa je jedním z nejdůležitějších a často se vyskytujících opravných mechanismů v různých organismech. Excizní reparace, kterou lze rozlišit na bazickou (BER) a nukletidovou (NER) excizní reparaci, také hraje důležitou roli při opravě DNA u několika organismů pomocí řady glykosylas, resp. polymeras. Dalšími mechanismy v organismech jsou: mutagenní oprava, rekombinantní oprava, kontrolní body buněčného cyklu, apoptóza a určité alternativní opravné cesty [14].

2.2. Elektrochemické chování DNA

Schopnost nukleových kyselin přijímat či odevzdávat elektrony při interakci s elektrodami byla pozorována již v minulém století. Oxidace guaninových a adeninových zbytků v polynukleotidech na uhlíkových elektrodách byla zaznamenána kolem roku 1970. Krátce na to se začalo využívat voltametrických oxidačních signálů pro výzkum DNA a RNA [11].

V závislosti na materiálu elektrody a ostatních podmínkách se DNA může podrobit oxidaci/redukci nebo absorpčním/desorpčním procesům. Například adeninové, cytosinové a guaninové zbytky poskytují redoxní signály na rtuťových a pevných amalgámových elektrodách, zatímco zbytky purinových bází jsou oxidovatelné na elektrodách uhlíkových [11].

Změny ve struktuře dvoušroubovice DNA ovlivňují její elektrochemickou odpověď, např. narušením cukr-fosfátové kostry dvoušroubovice DNA dojde ke zpřístupnění skupin (nacházející se vedle konců řetězců), a podpoří se tak na potenciálu závislé odvíjení vlákna DNA na povrchu rtuťové elektrody [11].

První zmínky o schopnosti nukleových kyselin poskytovat analyticky použitelný elektrochemický oxidační či redukční signál byly publikovány na konci 50. let 20. století. Tyto signály vykazovaly zbytky bází v DNA či RNA. Adeninové a cytosinové zbytky poskytují redukční signály, kdežto guaninové zbytky poskytují anodický signál v důsledku oxidace produktu redukce guanosinu. Došlo také k vývoji dalších senzorů, např. pro detekci poškození DNA (kapitola 2.3) [11].

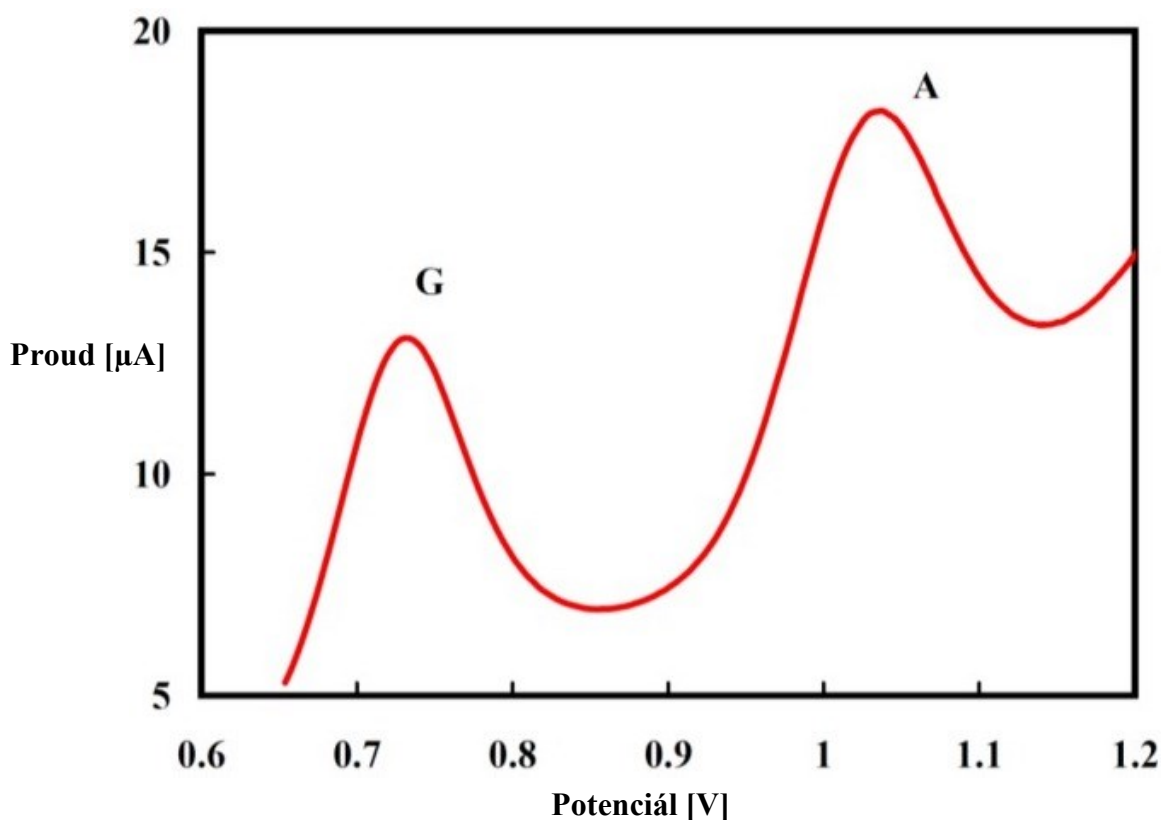
Nukleové kyseliny bývají dobře adsorbovány na povrch elektrody. Nevratná adsorpce byla pozorována na rtuťových a uhlíkových elektrodách. Příprava rtuťových či uhlíkových elektrod modifikovaných DNA spočívá v ponoření elektrody do roztoku DNA a následného promytí jejího povrchu. Redukce či oxidace DNA/RNA na rtuťových či uhlíkových elektrodách probíhá v adsorbovaném stavu. Zajímavostí je, že negativně nabitá DNA může zůstat adsorbována na rtuťové elektrodě s vysoce negativním potenciálem (okolo -2 V vůči nasycené kalomelové elektrodě). Na těchto elektrodách dochází k daleko silnější adsorpci peptidové nukleové kyseliny, jejíž páteř není nabitá [11].

2.2.1 Oxidace DNA

Schopnost nukleových kyselin přijímat či odevzdávat elektron při interakcích s elektrodami byla objevena před 60 lety. Na počátku docházelo k nedorozuměním, jelikož některé výzkumy považovaly DNA za elektroinaktivní. Ukázalo se, že zlaté elektrody, na

kterých byl zmiňovaný výzkum prováděn, jsou elektrodami vhodnými pro imobilizaci thiolovaných oligodeoxyribonukleotidů, avšak neznačená chromozomální DNA se špatně adsorbuje na povrch zlaté elektrody [11].

Přímá elektrochemická oxidace molekul DNA může poskytnout spolehlivý a finančně efektivní způsob kvantifikace produktů amplifikace DNA s velkým potenciálem pro navázání na mikrofluidiku. Obecně se uznává, že DNA je oxidovatelná na pevných elektrodách (uhlík, zlato, borem dopovaný diamant) prostřednictvím zbytků nukleobází. Všechny typy nukleobází podléhají nevratné oxidaci na uhlíkových elektrodách ve formě volných molekul a jako součást nukleosidů a nukleotidů. Cukerné a fosfátové skupiny posouvají oxidační signály nukleobází do oblasti pozitivnějších potenciálů. Na nemodifikovaných uhlíkových elektrodách molekula DNA produkuje většinou dva dobře rozlišitelné oxidační píky, a to při 0,7–0,9 V a 1,0–1,2 V vůči argentchloridové elektrodě (3 mol/l KCl) (obr. 2). Ty patří oxidaci guanosinu (obr. 3) a adenosinu (obr. 4) [15].

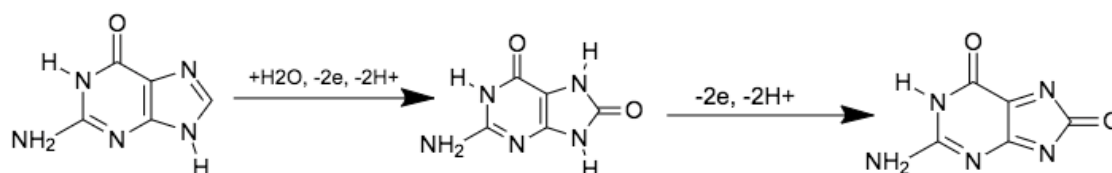


Obrázek 2 – Oxidační píky guaninových (G) a adeninových (A) zbytků přítomných v dsDNA, převzato z [16]

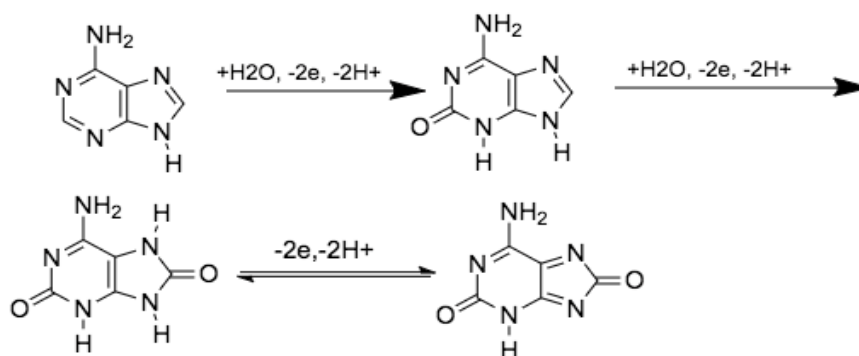
Byl popsán i případ oxidace thyminových a cytosinových zbytků na uhlíkových elektrodách při potenciálu okolo 1,5 V vůči argentchloridové elektrodě (3 mol/l KCl) [15]. Báze jako jsou guanin a adenin jsou daleko lépe oxidovatelné, jelikož jejich oxidační potenciály jsou méně pozitivní, než je tomu u cytosinu či thyminu [3].

Experimenty s nativní a denaturovanou DNA zároveň prokázaly zvyšující se elektrooxidační proudy při přechodu z dvouvláknové na jednovláknovou formu DNA. Vysvětlení plyne z předpokladu, že oxidace DNA na pevných elektrodách je spojena s adsorpcí molekul DNA na jejich povrchu. Pružnější polymerní řetězce jednovláknové DNA (ssDNA) lépe odpovídají nerovnému povrchu elektrod oproti tuhým molekulám dvouvláknové DNA (dsDNA), a to má za následek vyšší počet segmentů DNA v přímém kontaktu s povrchem elektrody. Tento předpoklad byl podpořen skutečností, že předpolarizace elektrody na kladných potenciálech (0,2–1,3 V vůči argentchloridové elektrodě (3 mol/l KCl)) po dobu až 15 min, která může podpořit adsorpci DNA, byla vyžadována k účinné registraci oxidačních signálů nativní a denaturované DNA, a dokonce malých oligonukleotidů na pevných elektrodách. Elektrooxidace dsDNA, u níž jsou nukleobáze skryty uvnitř dvoušroubovice DNA, a tudíž se předpokládá, že se stanou nepřístupnými pro jakékoliv elektrodové reakce, vyplývá pouze z částečné denaturace nebo degradace dsDNA v důsledku její adsorpce nebo předpolarizace. U uhlíkových elektrod nebyla experimentálně prokázána žádná denaturace či degradace dsDNA v důsledku interakce s povrchem elektrody. Je běžně známo, že se nativní DNA považuje za méně oxidovatelnou než denaturovaná, ale existují vědecké články, ve kterých je ukázáno, že dsDNA vykazuje podobné nebo dokonce vyšší oxidační proudy na uhlíkových elektrodách ve srovnání se ssDNA. Studie V. Brabce a J. Koudelky zabývající se závislostí proudu elektrooxidace DNA na molekulové hmotnosti DNA, kterou prováděli na pyrolytických grafitových elektrodách, ukazuje elektrooxidační proudy dsDNA srovnatelné s proudy pro ssDNA, jejíž molekulová hmotnost je 2krát nižší než dsDNA [15].

Chování nukleových kyselin bylo především sledováno na uhlíkových elektrodách, v posledních letech převážně na elektrodách z pyrolytického grafitu. Popularitu uhlíkové elektrody získaly především svou nízkou cenou, širokým oknem pracovních potenciálů, dobrou elektrickou vodivostí a díky relativně nízkým proudům pozadí [11].



Obrázek 3 – Reakční schéma elektrochemické oxidace guaninu, převzato z [11]



Obrázek 4 – Reakční schéma elektrochemické oxidace adeninu, převzato z [11]

2.3 Elektrochemické DNA senzory

Hlavní rolí DNA v buňkách je udržovat a správně vyjadřovat genetickou informaci. Poškození DNA v buňkách po interakcích s řadou chemických a fyzikálních činidel vyskytujících se v životním prostředí často vede k mutacím, které mohou následně vést k rozvoji např. rakoviny. Z tohoto důvodu je zásadní mít analytické metody schopné rychlé a citlivé detekce poškození DNA i látek poškozujících DNA. Vývoj a zlepšení těchto metod se staly zájmem mnoha vědeckých skupin. Existují zde dva základní přístupy při práci s DNA – první zahrnuje úplnou hydrolyzu DNA, po níž následuje separace složek DNA pomocí chromatografických technik a detekce poškození on-line různými způsoby. Druhý přístup používá DNA nehydrolyzovanou, kdy ji lze v takovéto formě snadno začlenit do senzorů s rychlou odezvou [16].

Elektrochemie nabízí řadu přístupů jak při detekci poškození DNA, tak při analýze činidel poškozujících DNA, přičemž nejčastěji využívá DNA nehydrolyzovanou. Mezi tyto přístupy řadíme: 1) měření faradaických DNA signálů na rtuťových nebo pevných elektrodách a 2) využití signálů elektroaktivních látek interagujících s DNA kovalentně nebo nekovalentně.

Elektrochemické studie interakcí s DNA využívají nejčastěji elektrody s povrchově ukotvenou DNA (tzv. DNA biosenzory), jejichž výhoda plyne ze specifčnosti, jednoduchosti provozu, rychlé odezvy, miniaturizace, nízké spotřeby energie a relativně nízké ceny.

V této práci se zabýváme druhou možností, tzv. *biosensingem*, kdy je interakce s DNA prováděna v roztoku a následně detekována elektrochemicky na pracovní elektrodě [17].

Jednoduchý elektrochemický senzor pro poškození DNA se skládá z elektrody a imobilizované DNA na jejím povrchu. V takovémto zařízení DNA představuje rozpoznávací vrstvu a je spojena s převodníkem signálu. Přestože ve srovnání s optickými metodami (např. molekulovou fluorescencí) je aplikace elektrochemických technik v oblasti biosenzorů DNA podstatně mladší, představuje dynamicky se rozvíjející oblast. Hlavním důvodem jsou relativně nízké náklady a požadavky na výkon, což představuje rychlý vývoj jednoduchých zařízení. Očekává se, že tyto senzory budou k dispozici pro rutinní lékařskou diagnostiku, analýzu životního prostředí atd. [16].

2.4 DC voltametrie

DC voltametrie (DCV) (z anglického *direct current*) je technikou, při které se sleduje závislost proudu, který prochází pracovní elektrodou, na potenciálu vkládaném na tuto elektrodu ze zdroje vnějšího. Pracovní elektroda je ponořena do analyzovaného roztoku. Potenciál, který se vkládá na pracovní elektrodu se s časem lineárně mění. Tuto metodu lze považovat za stacionární při konstantním potenciálu, jelikož rychlost změny potenciálu je malá oproti rychlosti ustanovování rovnováhy elektrody [18].

2.5 Diferenční pulzní voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie (DPV) je voltametrická technika, podobná square-wave voltametii, se zvýšenou rozlišovací schopností faradaických proudů (přenos elektronů k a od elektrody). Tato technika je srovnatelná s normální pulzní voltametii (NPV) v tom, že potenciál je také superponován sérií pulzů. Liší se však od NPV, jelikož každý potenciálový pulz je pevně daný, využívá malé amplitudy (10–100 mV) a překrývá pomalu se měnící základní potenciál. Proud je měřen ve dvou bodech pro každý pulz, první bod těsně před aplikací pulzu a druhý na konci pulzu. Tato vzorkovací místa jsou vybrána tak, aby umožňovala eliminaci nefaradaického (nabíjecího) proudu. Rozdíl mezi měřeními proudu v těchto bodech pro každý pulz je určen a vyneseno proti základnímu potenciálu [19].

DPV na stacionárních pevných elektrodách je charakterizována tak, že proud po vložení potenciálu je ovlivněn všemi předchozími kroky od začátku celé sekvence potenciálu, změny platí pro jednu a tutéž elektrodu. Rovnice pro vlnu DPV je odvozena a počítána numericky pro vratné, zcela nevratné a kvazi-reverzibilní případy. Záznamy v DPV jsou vyjádřeny pěti parametry, z nichž dva jsou parametry kinetickými – konstantní rychlost elektrodové reakce a koeficient přenosu náboje. Další tři parametry se týkají křivky potenciálu a času. Proud a

potenciál píku se získávají pro různé kombinace těchto parametrů. V důsledku toho jsou popsána kritéria pro reverzibilní, kvazi-reverzibilní a zcela nevratné děje/voltametrické odezvy. Pro usnadnění kvantitativní analýzy DPV záznamů jsou jako funkce těchto parametrů získány přibližné rovnice pro proud a potenciál píku [20].

2.6 Pevné kompozitní elektrody

Charakteristikou pevných kompozitních elektrod (především pak těch na bázi uhlíku) je, že jsou velmi stabilní, mechanicky odolné, lze je leštit, elektrochemicky obnovovat jejich povrch, mají dlouhou životnost, lze je používat ve velmi pozitivních potenciálových oblastech a mají nízkou pořizovací cenu. Absolutní velikosti šumu a proudu pozadí bývají stejné jako u čistého vodiče, ale kompozitní elektroda má poměr signál/šum lepší. To je způsobeno tím, že elektrody s vodivými částicemi vázanými pojivem mají dobrou vodivost, přestože obsah částic vodivého materiálu v kompozitu je malý [21].

Jako většina elektrod i kompozitní materiály vykazují hůře reprodukovatelný a obnovovatelný povrch než elektrody rtuťové. Definice říká, že jednou z uvedených promísených látek je vodič a druhou izolátor. Izolátorovou fází je polymerický materiál (polyakrylát, epoxid, polyvinylchlorid, teflon aj.). Vodičem může být kov (stříbro, zlato) nebo jiný nekovový vodivý materiál (uhlík, nejčastěji grafit, nebo jeho další modifikace či jejich směsi) [21].

Vodivost kompozitního materiálu můžeme srovnat s vodivostí samotného kovového vodiče, i když obsah vodivých částic je malý (v rozmezí 10–60 %) [21].

Pro tuto práci byla použita pracovní elektroda z ultračistého grafitu (UTGE) vyrobená z polymeru PPEK (polyetherketon) o vnitřním průměru 2 mm. Tato elektroda je naplněna směsí ultračistého grafitu a epoxidovou pryskyřicí (obr. 5).



Obrázek 5 – pracovní kompozitní elektroda z ultračistého grafitu (UTGE); převzato z [22]

3. Experimentální část

3.1. Reagencie

Zásobní roztok DNA (Sigma) o koncentraci 10 mg/ml byl připraven tak, že bylo rozpuštěno 100 mg nízkomolekulární DNA z lososích spermii v 10 ml acetátového pufru (pH 4,6). Acetátový pufr o koncentraci 0,1 mol/l a pH 4,6 byl připraven rozpuštěním 13,6 g trihydrátu octanu sodného (99 %, Lach-Ner, ČR; $c = 0,1 \text{ mol/l}$), 5,7 ml kyseliny octové (99,8 %, Penta, ČR; $\rho = 1,050 \text{ g/cm}^3$) a doplněním deionizovanou vodou na celkový objem 1,0 l.

Následně byl připraven roztok DNA o koncentraci 10 mg/ml rozpuštěním 100 mg nízkomolekulární DNA z lososích spermii v 10 ml fosfátového pufru (pH 7,0). Fosfátový pufr o koncentraci 0,1 mol/l a pH 7,0 byl připraven rozpuštěním 5,37 g monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného (99 %, Lach-Ner, ČR) a 21,86 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného (99 %, Lach-Ner, ČR) v deionizované vodě na celkový objem 1,0 l.

Směs hexakynoželezitanu draselného (98 %, Lach-Ner, ČR) a trihydrátu hexakynoželezitanu draselného (99,5 %, Lach-Ner, ČR) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ byla připravena ve 100ml odměrné baňce rozpuštěním 0,04218 g $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a 0,03276 g $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ ve fosfátovém pufru o pH 7,0. Tento roztok sloužil pro CV kontrolu kvality oleštění povrchu pracovní elektrody v rozmezí potenciálů od 500 mV do -100 mV při použité rychlosti polarizace 50 mV/s (v práci není dále diskutováno).

Následně byly roztoky DNA o koncentraci 10 mg/ml v acetátovém a fosfátovém pufru ředěny na koncentrace 1 mg/ml a 0,5 mg/ml. Zároveň byly roztoky DNA skladovány v mrazničce při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ a před měřením byly vždy volně rozmrazovány za laboratorní teploty alespoň 10 minut.

Pro oleštění povrchu pracovní elektrody byla používána alumina (p.a., Lach-Ner, ČR; velikost částic 0,05 μm).

3.2 Aparatura

DC voltametrie a diferenční pulzní voltametrie byly měřeny na přístroji Eco-Tribo Polarograf (Polaro-Sensors, Praha) pomocí programu Polar Pro, verze 5.1. Analyzátor byl řízen stolním počítačem s operačním systémem Microsoft Windows XP (Microsoft Corporation, USA), intenzita míchání byla nastavena na „low“. Presentované grafy byly následně vytvořeny v programu Microsoft Excel pro Mac 2020, verze 16.43 (Microsoft Corporation, USA).

Všechna měření probíhala v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla

kompozitní elektroda z ultračistého grafitu (UTGE), kterou tvoří elektrodové tělo o vnějším průměru 7 mm vyrobené z PEEKu a elektrodový disk o vnitřním průměru 2 mm (obr. 5). Elektrodové tělo je naplněno směsí ultračistého grafitu a epoxidové pryskyřice (typ 6.1204.180, Metrohm, Švýcarsko). Referentní elektrodou byla elektroda argentchloridová (typ 10-20+, 3M KCl, Elektrochemické detektory, Turnov) a jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda (typ Pt 2+MV, Elektrochemické detektory, Turnov).

Rychlost polarizace u DCV byla zvolena 5, 10, 20, 50 a 100 mV/s. Pro každou rychlost polarizace bylo měření provedeno 5krát. U DPV bylo již kromě zmíněných rychlostí provedeno i měření při polarizačních rychlostech 200, 500, 1000 a 2000 mV/s. Též bylo vše měřeno 5krát.

Míchání analyzovaného roztoku bylo automaticky spuštěno před aktivací elektrody a trvalo zpravidla 30 s. Před každým měřením bylo třeba očistit povrch pracovní elektrody aluminou od produktů vzniklých předchozí reakcí. Leštění elektrody probíhalo mechanickým broušením povrchu uhlíkové elektrody o malé krystalky oxidu hlinitého, tzv. aluminy. Dochází tak k mechanickému odstranění nečistot a produktů předchozích elektrodových reakcí. Takto bylo provedeno měření pro všechny tři koncentrace DNA (10 mg/ml, 1 mg/ml a 0,5 mg/ml).

Poškození probíhalo pomocí UVC záření o vlnové délce 254 nm, které bylo produkováno UV lampou (P-LAB, ČR; výkon 15 W).

4. Výsledky a diskuse

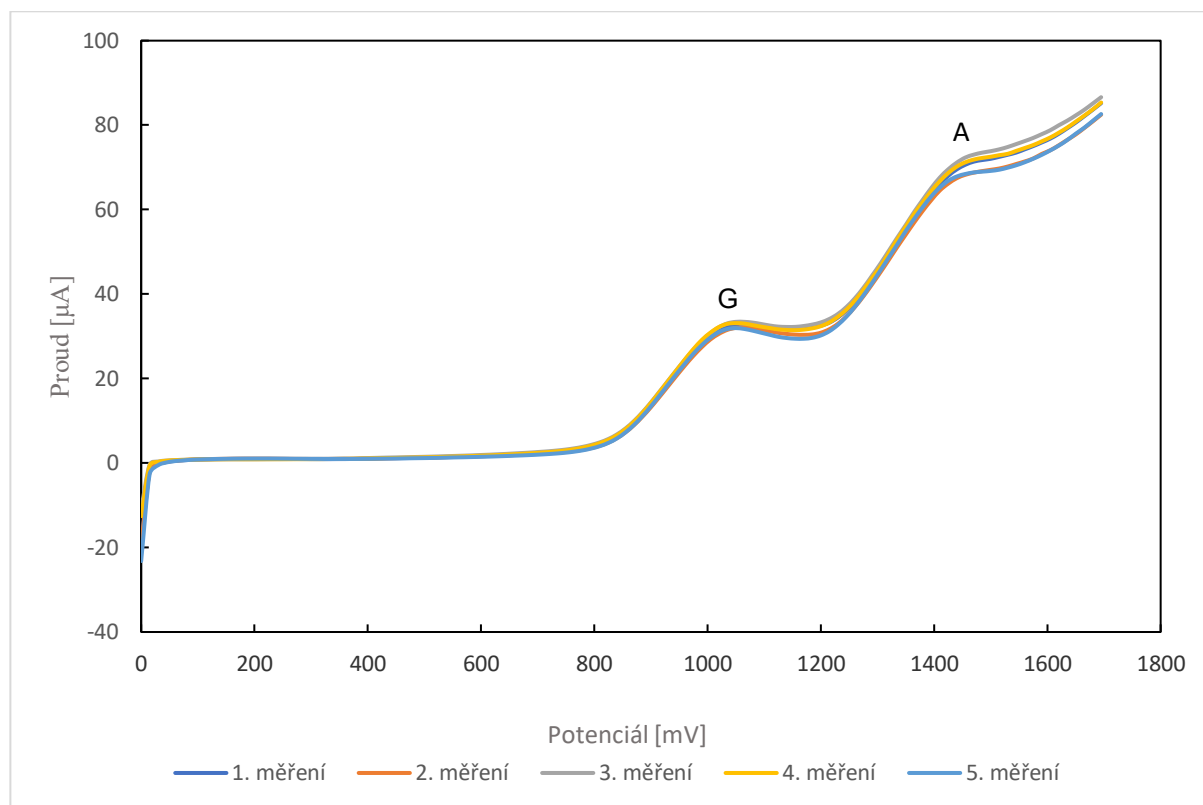
4.1. Optimalizace podmínek

Elektrochemické chování dsDNA na UTGE bylo vyšetřováno pomocí obou uvedených voltametrických technik (DPV a DCV) s cílem zaznamenat co nejvyšší a nejlépe vyvinuté odezvy oxidovatelných bází dsDNA, které by následně mohly být použity ke sledování jejího poškození. Jelikož se ve vodných roztocích vyskytuje dsDNA v nativní formě pouze v úzkém rozmezí hodnot pH (4–8), bylo její elektrochemické chování sledováno ve dvou zvolených prostředích o pH 4,6 a 7,0. Pro optimalizaci podmínek pro DPV a DCV měření bylo třeba zjistit opakovatelnost měření a dále byla sledována závislost výšky anodických píků bází přítomných ve struktuře dsDNA na rychlosti polarizace pracovní elektrody. Každé měření bylo proto provedeno 5krát pro obě techniky (DPV i DCV) a pro všechny tři koncentrace, při kterých bylo elektrochemické chování dsDNA studováno (0,5 mg/ml; 1 mg/ml; 10 mg/ml). Zároveň bylo využito dvou prostředí, a to 0,1 mol/l fosfátového pufru (pH 7,0) a 0,1 mol/l acetátového pufru (pH 4,6). Před každým měřením byla elektroda oleštěna aluminou.

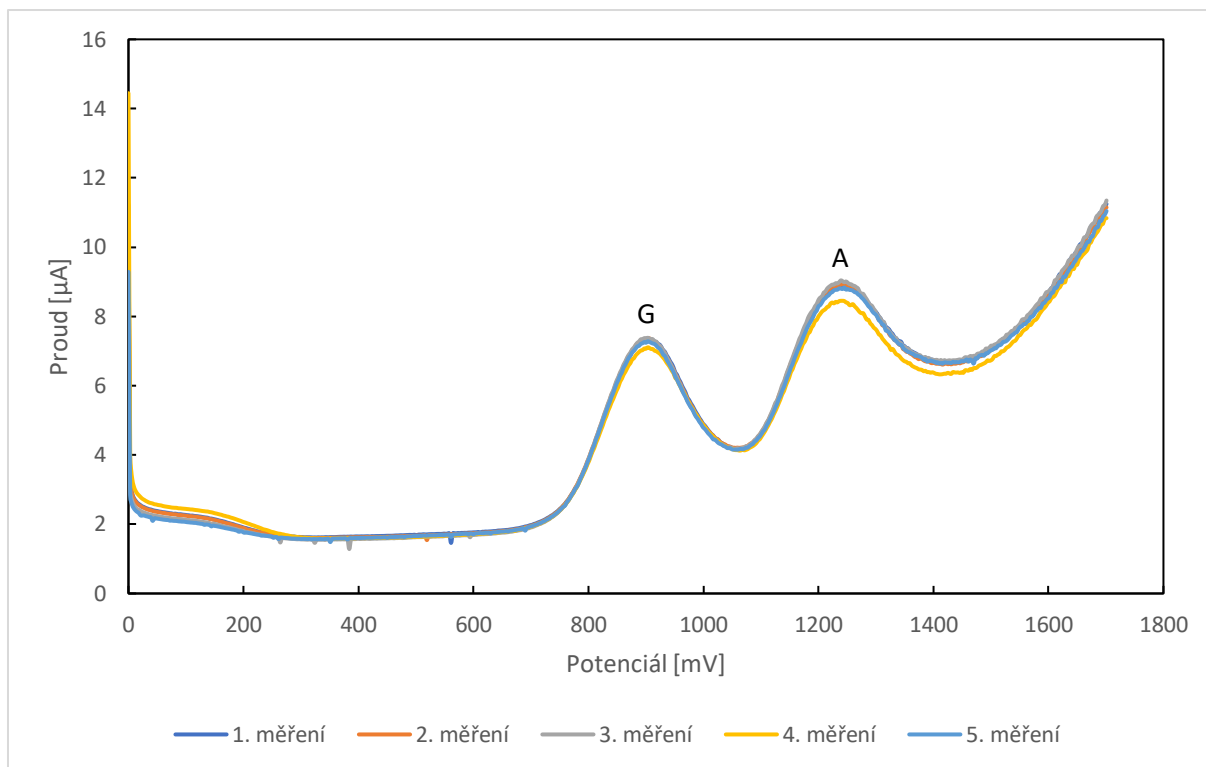
Rychlosti polarizace byly zvoleny pro DPV 5, 10, 20, 50 a 100 mV/s, což je běžný rozsah polarizačních rychlostí, při kterých lze spolehlivě zaznamenávat voltametrické křivky při udržování ostatních parametrů DPV techniky neměnných. Pro DCV kromě již zmíněných rychlostí byly použity i rychlosti 200, 500, 1000 a 2000 mV/s. Jak bylo uvedeno, pro každou rychlost bylo měření provedeno 5krát (vzorové voltamogramy jsou ukázány pro ilustraci na obr. 6 a 8 pro DCV a obr. 7 a 9 pro DPV) a z průměrných výšek píků v závislosti na použité rychlosti polarizace byly sestrojeny následující grafy (obr. 10–19). V grafech jsou též vyznačeny chybové úsečky, které představují intervaly spolehlivosti.

Na uvedených voltamogramech (obr. 6 a 7) jsou pomocí technik DCV a DPV zaznamenány anodické píky guanosinu a adenosinu, které jsou přítomné ve struktuře dsDNA a které odpovídají elektrochemickým přeměnám ukázaným na obr. 3 a 4. Měření probíhalo při nejvyšší koncentraci DNA (10 mg/ml) a jako prostředí byl zvolen acetátový pufr o pH 4,6. Jak lze vidět z obr. 6, pík guanosinu dosahuje svého maxima (12,1 μ A) při potenciálu přibližně 1050 mV a pík adenosinu (11,3 μ A) při potenciálu okolo 1455 mV. Při DPV (obr. 7) byly pozorovány píky guanosinu o výšce 4,1 μ A při potenciálu 912 mV a píky adenosinu o výšce 3,5 μ A při potenciálu 1243 mV. Měření bylo provedeno vždy 5krát pro obě techniky, a to z toho důvodu, aby byla zjištěna opakovatelnost měření. U obou technik bylo zvoleno vyhodnocení signálů odečtem výšky píku od spojnice minim před píkem a za píkem. Po každém měření probíhalo oleštění elektrody z důvodu popsaného v kapitole 3.2. Na obr. 6 probíhalo měření při

rychlosti polarizace 200 mV/s a na obr. 7 při rychlosti polarizace 20 mV/s, které se z hlediska opakovatelnosti jeví pro DCV a DPV jako optimální (bude dále diskutováno v kapitole 5). Odchylku v opakovatelnosti lze pozorovat u DCV křivky č. 5, kdy důvodem odlišnosti mohlo být nedostatečné oleštění elektrody od produktů předchozího měření. To stejné lze pozorovat na obr. 7 u DPV křivky č. 4.

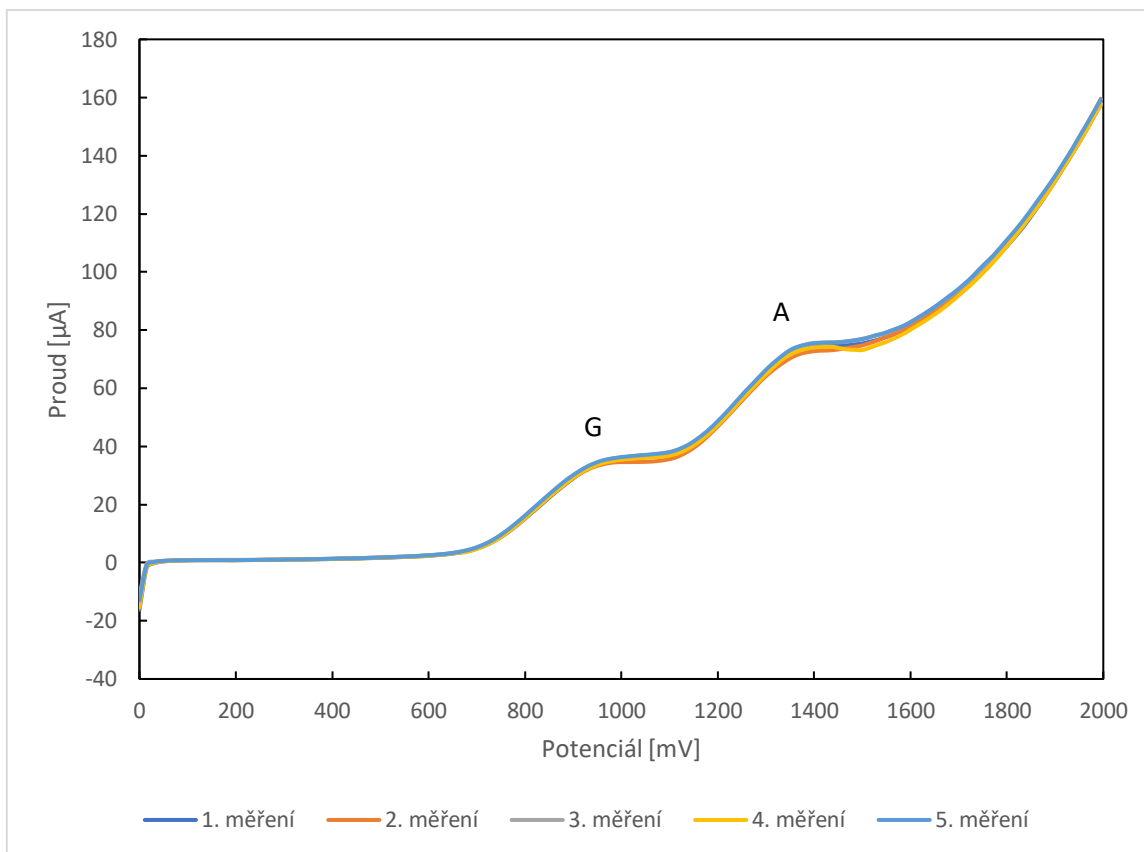


Obrázek 6 – DC voltamogramy dsDNA o $c_m = 10 \text{ mg/ml}$ (rychlost polarizace 200 mV/s, prostředí 0,1 mol/l acetátového pufru o pH 4,6) zaznamenané na UTGE; DNA poskytuje 2 píky – označené G (pík guanosinu), A (pík adenosinu)

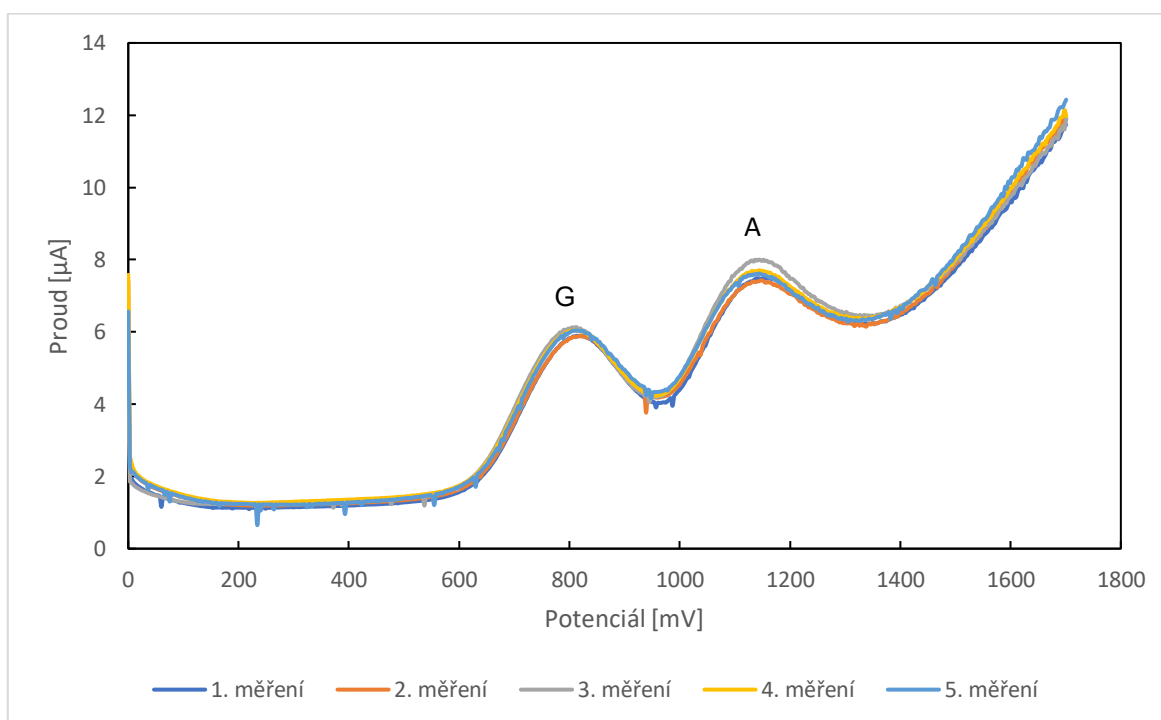


Obrázek 7 – DP voltamogramy dsDNA o $c_m = 10 \text{ mg/ml}$ (rychlost polarizace 20 mV/s , prostředí $0,1 \text{ mol/l}$ acetátového pufru o pH 4,6) zaznamenané na UTGE; DNA poskytuje 2 píky – označené G (pík guanosinu), A (pík adenosinu)

Následující dva grafy (obr. 8 a 9) znázorňují voltamogramy pro techniky DCV a DPV v prostředí $0,1 \text{ mol/l}$ fosfátového pufru o pH 7,0. Jak lze vidět z obr. 8, pík guanosinu ($8,9 \text{ } \mu\text{A}$) dosahuje svého maxima při potenciálu 960 mV a pík adenosinu ($12,1 \text{ } \mu\text{A}$) při potenciálu 1365 mV . Při porovnání DC voltamogramů (obr. 6 a 8) si lze všimnout, že v obou prostředích píky guanosinu a adenosinu dosahují podobných potenciálů píku, tedy okolo $900\text{--}1100 \text{ mV}$ pro guanosin a $1300\text{--}1500 \text{ mV}$ pro adenosin, přičemž posun potenciálu píků je daný pouze hodnotou pH použitého základního elektrolytu – při vyšší hodnotě pH ($7,0$) jsou píky posunuty k negativnějším potenciálům, což značí, že báze dsDNA podléhají snadnější elektrochemické oxidaci. Na obr. 9, který znázorňuje použití techniky DPV v prostředí fosfátového pufru, pozorujeme pík guanosinu ($2,8 \text{ } \mu\text{A}$) při potenciálu 816 mV a pík adenosinu ($2,5 \text{ } \mu\text{A}$) při potenciálu 1146 mV . To stejné platí pro maxima píků u techniky DPV (obr. 7 a 9). Na obr. 9 technika DPV v prostředí fosfátového pufru o pH $7,0$ poskytuje signály s poměrně velkými záškuby, které byly pravděpodobně způsobeny přepínáním zesilovacích prvků v použitém elektrochemickém analyzátoru.

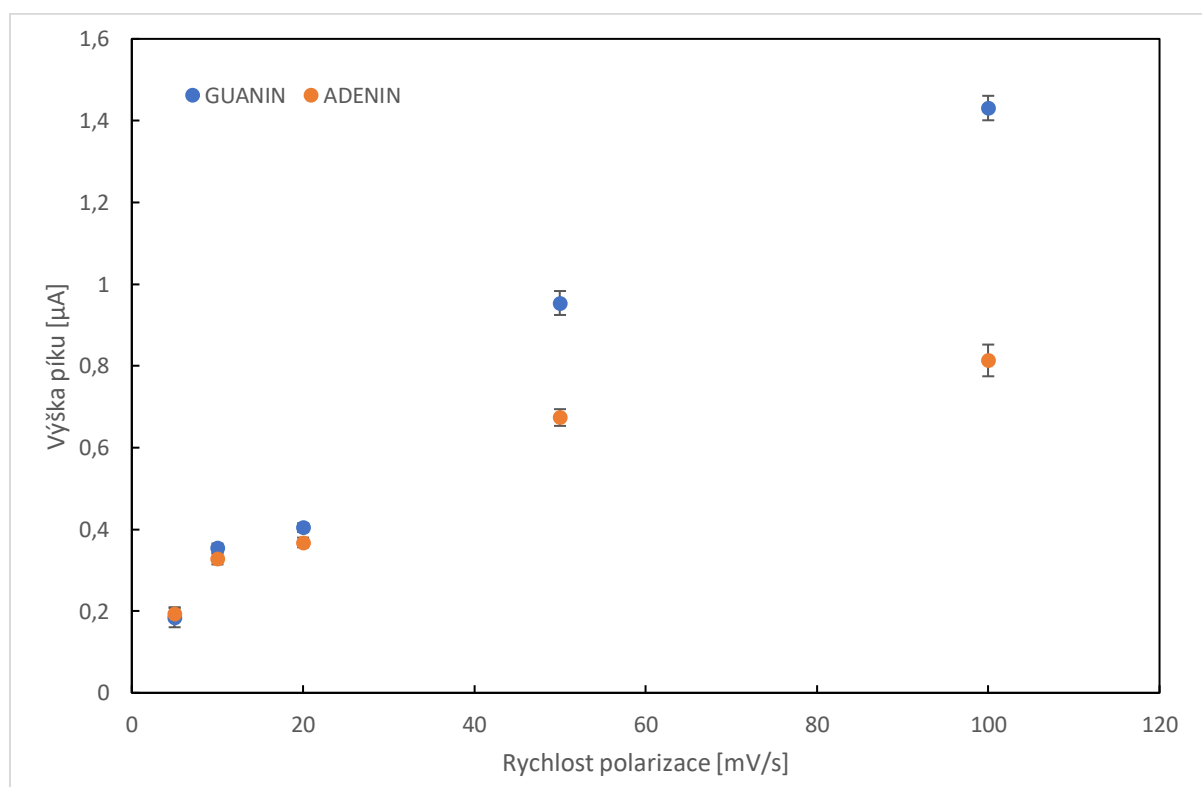


Obrázek 8 – DC voltamogramy dsDNA o $c_m = 10 \text{ mg/ml}$ (rychlost polarizace 200 mV/s , prostředí $0,1 \text{ mol/l}$ fosfátového pufru o $\text{pH } 7,0$) zaznamenané na UTGE; DNA poskytuje 2 píky – označené G (pík guanosinu), A (pík adenosinu)

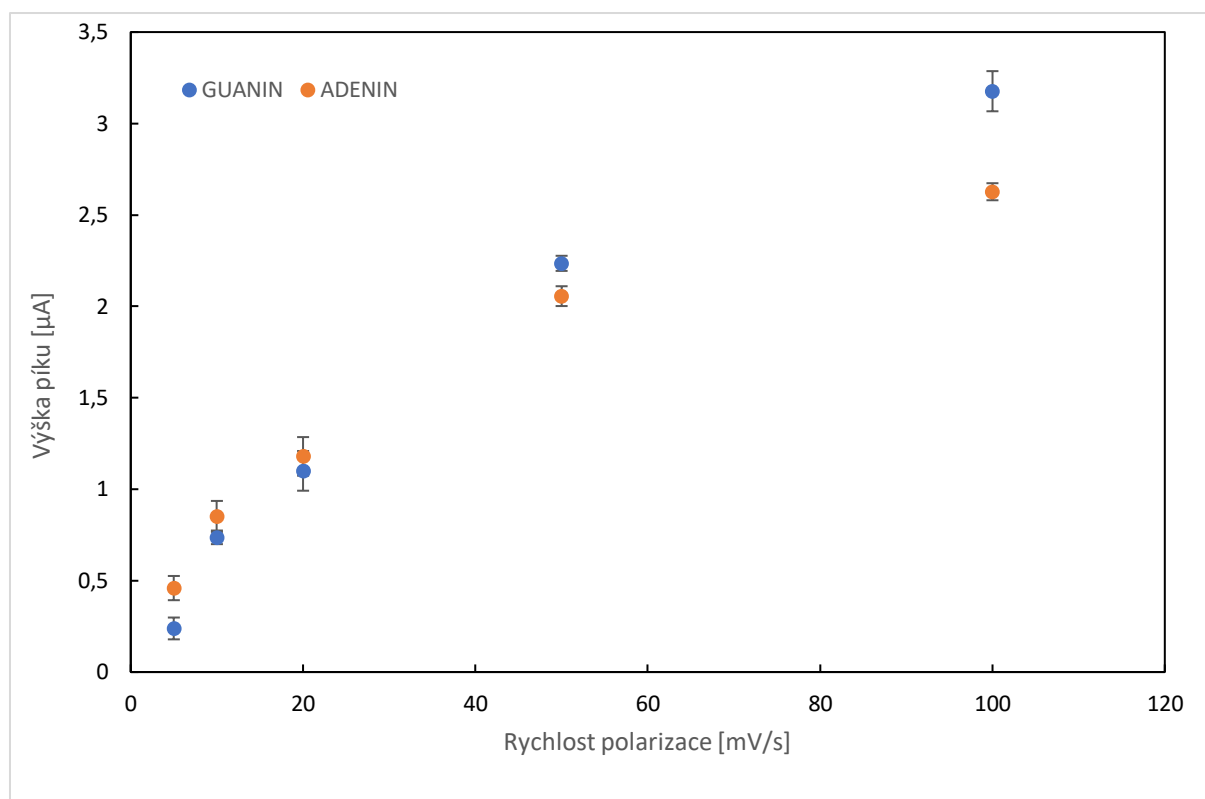


Obrázek 9 – DP voltamogramy dsDNA o $c_m = 10 \text{ mg/ml}$ (rychlost polarizace 20 mV/s , prostředí $0,1 \text{ mol/l}$ fosfátového pufru o $\text{pH } 7,0$) zaznamenané na UTGE; DNA poskytuje 2 píky – označené G (pík guanosinu), A (pík adenosinu)

Obr. 10 a 11 zobrazují závislosti výšky píku guaninových a adeninových zbytků dsDNA o stejné koncentraci (0,5 mg/ml, což byla nejnižší zkoumaná koncentrace dsDNA) i měření probíhalo pomocí stejné techniky (DPV). Odlišnost je pouze v použitých prostředích o pH 4,6 (obr. 10) a 7,0 (obr. 11). Při rychlosti polarizace 5 mV/s v prostředí acetátového pufru dosahují výšky adeninových a guaninových zbytků okolo 0,2 μA , kdežto ve fosfátovém pufru výška adeninového zbytku má hodnotu až 0,5 μA . Na obr. 10 jsou výšky píku guaninových zbytků větší než výšky píku adeninových zbytků pro rychlosti polarizace 5 (zde přibližně shodně velké), 10 a 20 mV/s. Na obr. 11 je tomu naopak. Pro rychlost polarizace 100 mV/s je výška píku guaninového zbytku v prostředí fosfátového pufru až dvojnásobně větší než v prostředí acetátového pufru. Pík adeninového zbytku je trojnásobný v prostředí fosfátového pufru. Obecně lze tedy pozorovat, že nejvyšší DPV odezvy pro tuto koncentraci dsDNA byly získány pro obě báze ve fosfátovém pufru o pH 7,0 při rychlosti polarizace 100 mV/s.

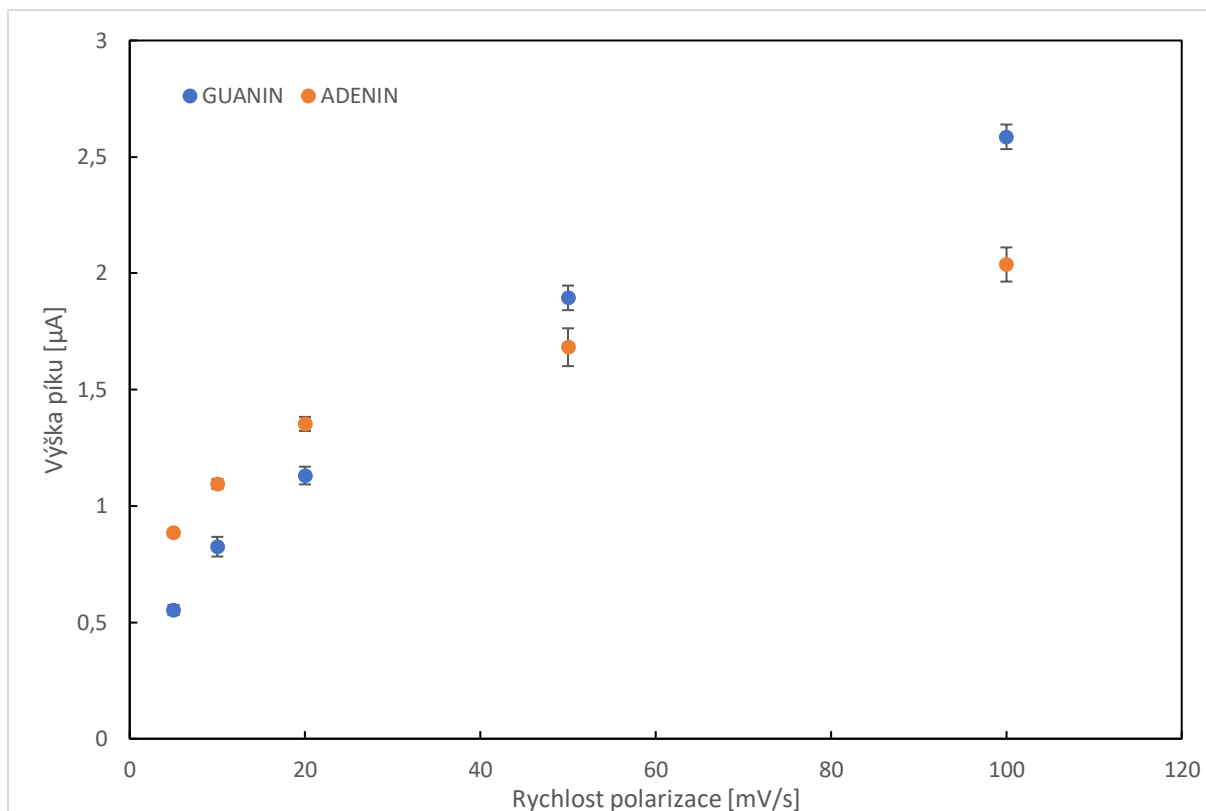


Obrázek 10 – Závislost výšky píku guaninových a adeninových zbytků dsDNA ($c_m = 0,5 \text{ mg/ml}$) na rychlosti polarizace zaznamenaná pomocí DPV na UTGE v prostředí acetátového pufru (pH 4,6). V grafu jsou vyznačeny chybové úsečky představující interval spolehlivosti ($n = 5$)

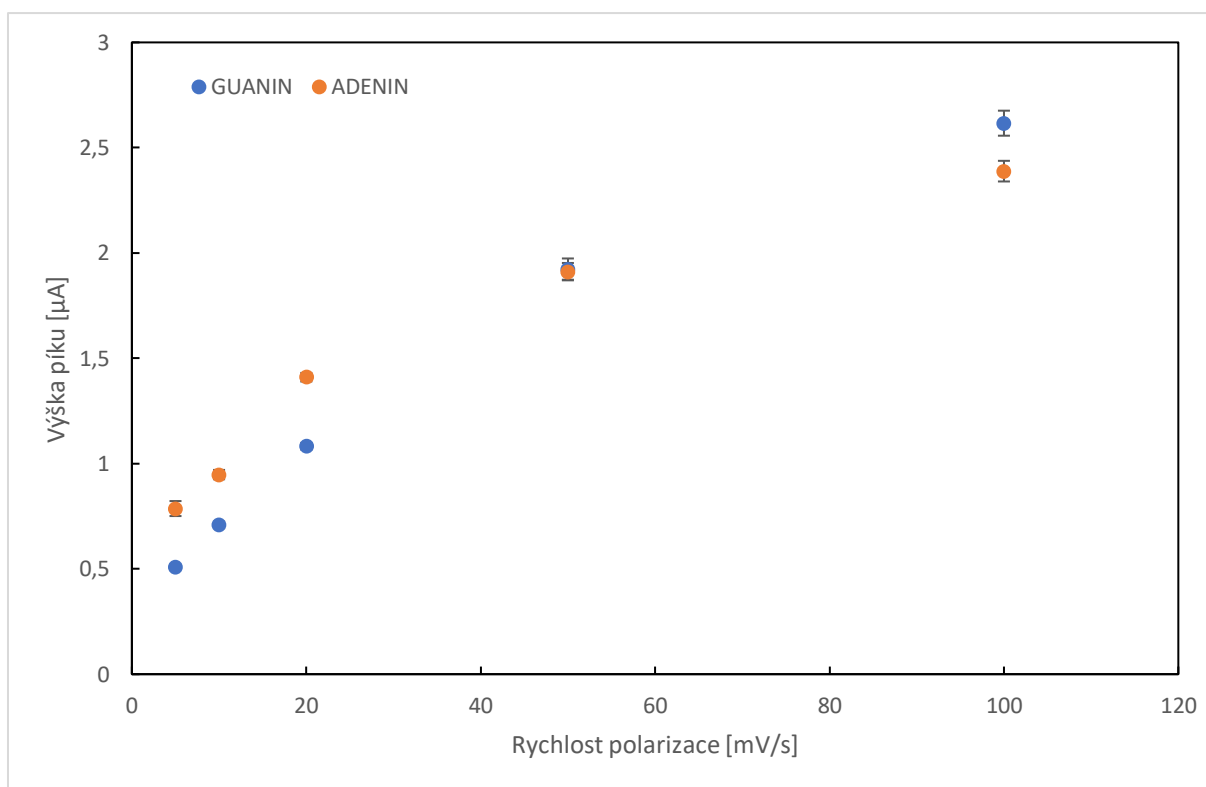


Obrázek 11 – Závislost výšky píku guaninových a adeninových zbytků dsDNA ($c_m = 0,5 \text{ mg/ml}$) na rychlosti polarizace zaznamenaná pomocí DPV na UTGE v prostředí fosfátového pufru (pH 7,0). V grafu jsou vyznačeny chybové úsečky představující interval spolehlivosti ($n = 5$)

Při zvýšení koncentrace dsDNA z 0,5 mg/ml na 1 mg/ml (obr. 12 a 13) jsou při nižších rychlostech polarizace výšky píků adeninových zbytků v obou prostředích větší než výšky píků guaninových zbytků. Pro rychlosti polarizace 50 mV/s a 100 mV/s dochází k obměně tohoto trendu – guaninové zbytky poskytují větší hodnoty výšek píků než zbytky adeninové. Výšky píků pro obě prostředí jsou oproti koncentraci dsDNA 0,5 mg/ml srovnatelné. Pravděpodobně je povrch UTGE pokryt podobným množstvím dsDNA, přestože je její koncentrace v roztoku dvojnásobná (0,5 vs. 1 mg/ml), což by znamenalo, že při nižší koncentraci dsDNA se uplatňuje větší míra její adsorpce na elektrodový povrch.

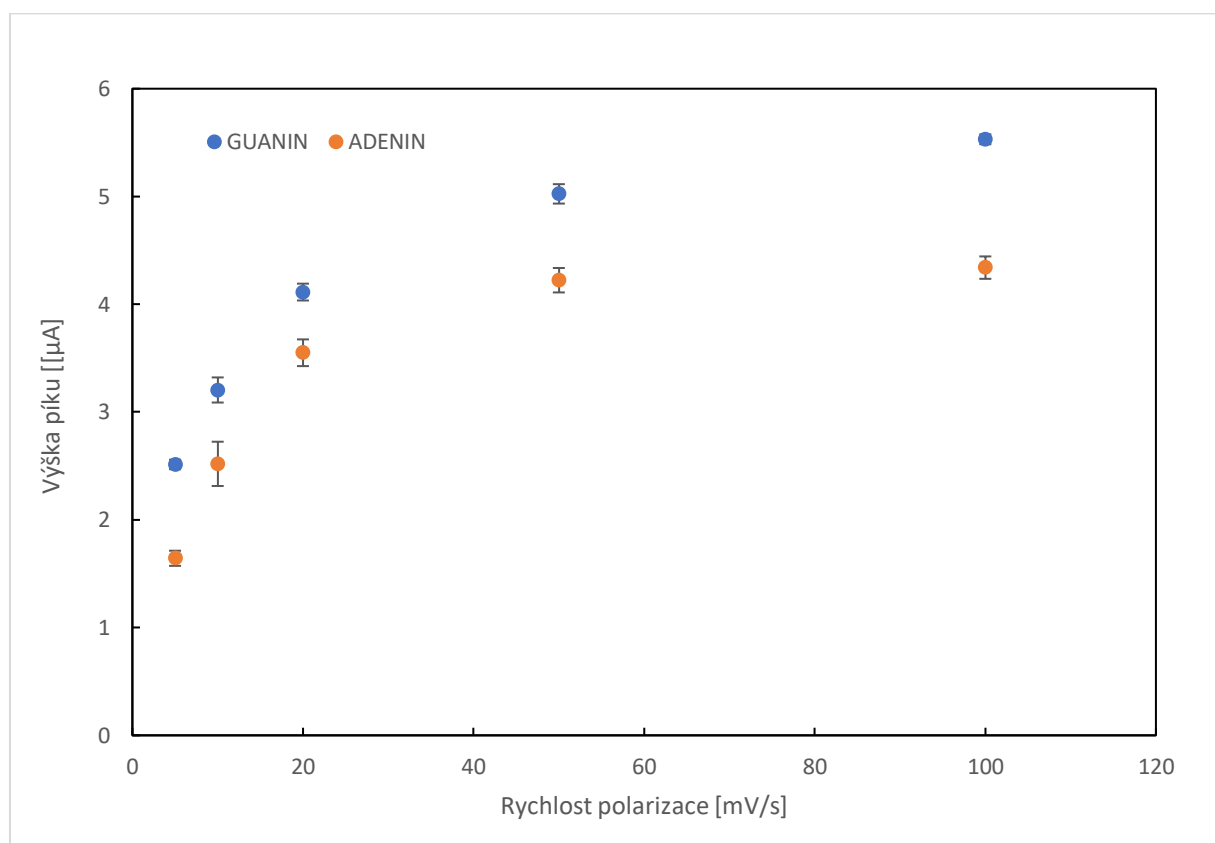


Obrázek 12 – Závislost výšky píku guaninových a adeninových zbytků dsDNA ($c_m = 1 \text{ mg/ml}$) na rychlosti polarizace zaznamenaná pomocí DPV na UTGE v prostředí acetátového pufru (pH 4,6). V grafu jsou vyznačeny chybové úsečky představující interval spolehlivosti ($n = 5$)

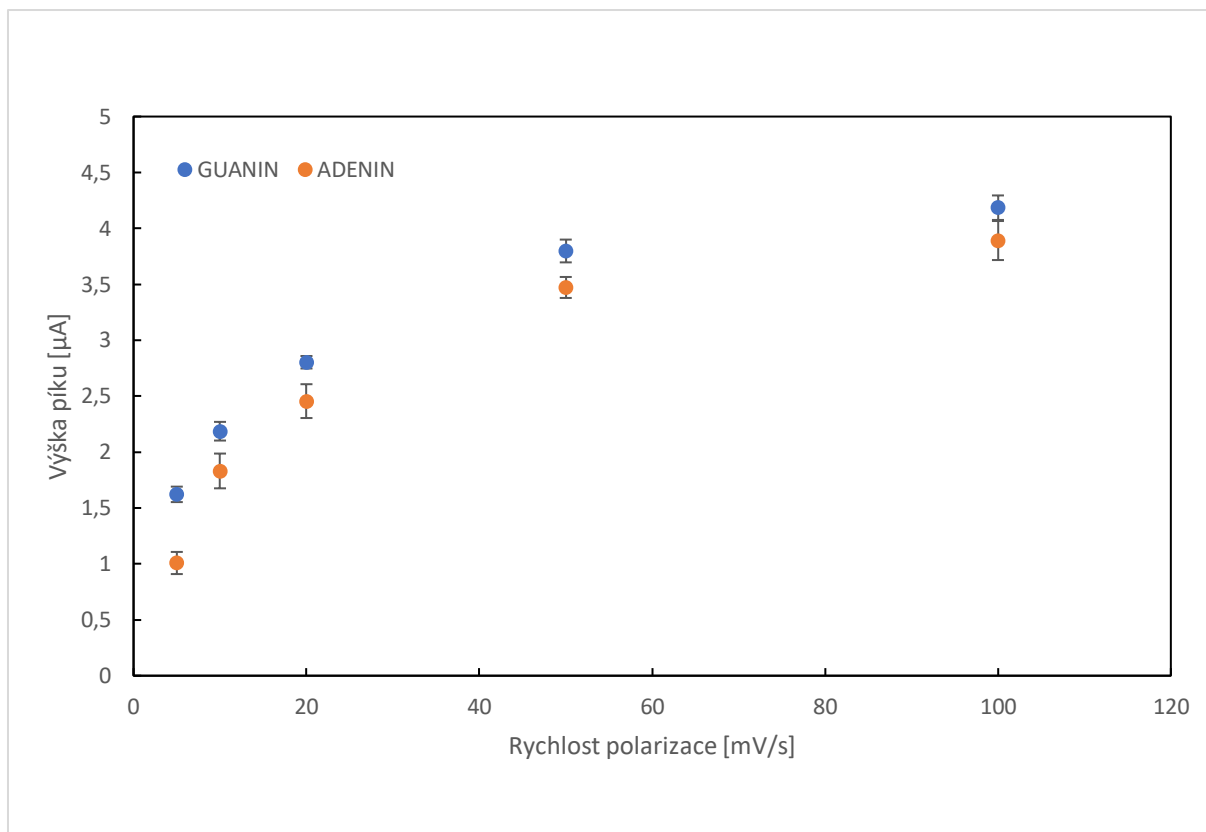


Obrázek 13 – Závislost výšky píku guaninových a adeninových zbytků dsDNA ($c_m = 1 \text{ mg/ml}$) na rychlosti polarizace zaznamenaná pomocí DPV na UTGE v prostředí fosfátového pufru (pH 7,0). V grafu jsou vyznačeny chybové úsečky představující interval spolehlivosti ($n = 5$)

Pro nejvyšší použitou koncentraci dsDNA (10 mg/ml) dosahují guaninové zbytky vyšších hodnot výšky DPV píků než zbytky adeninové (obr. 14 a 15), tomu tak u předchozích koncentrací v nízkých rychlostech polarizace nebylo. Pro rychlost polarizace 100 mV/s dosahuje výška píku guaninového zbytku v prostředí acetátového pufru 5,5 μA a v prostředí fosfátového pufru 4,0 μA . U koncentrace dsDNA 0,5 mg/ml byly naměřeny vyšší hodnoty proudu píků v prostředí fosfátového pufru, kdežto u koncentrace dsDNA 10 mg/ml nacházíme vyšší hodnoty proudu píků v prostředí pufru acetátového. Přestože se jedná o koncentraci 10krát vyšší než v případě koncentrace 1 mg/ml, není nárůst výšky píků ani zdaleka desetinasobný (2,5 μA vs. 5,5 μA při 100 mV/s pro guanosin v acetátovém pufru a 2,6 μA vs. 4,0 μA při 100 mV/s pro guanosin ve fosfátovém pufru).



Obrázek 14 – Závislost výšky píku guaninových a adeninových zbytků dsDNA ($c_m = 10 \text{ mg/ml}$) na rychlosti polarizace zaznamenaná pomocí DPV na UTGE v prostředí acetátového pufru (pH 4,6). V grafu jsou vyznačeny chybové úsečky představující interval spolehlivosti ($n = 5$)

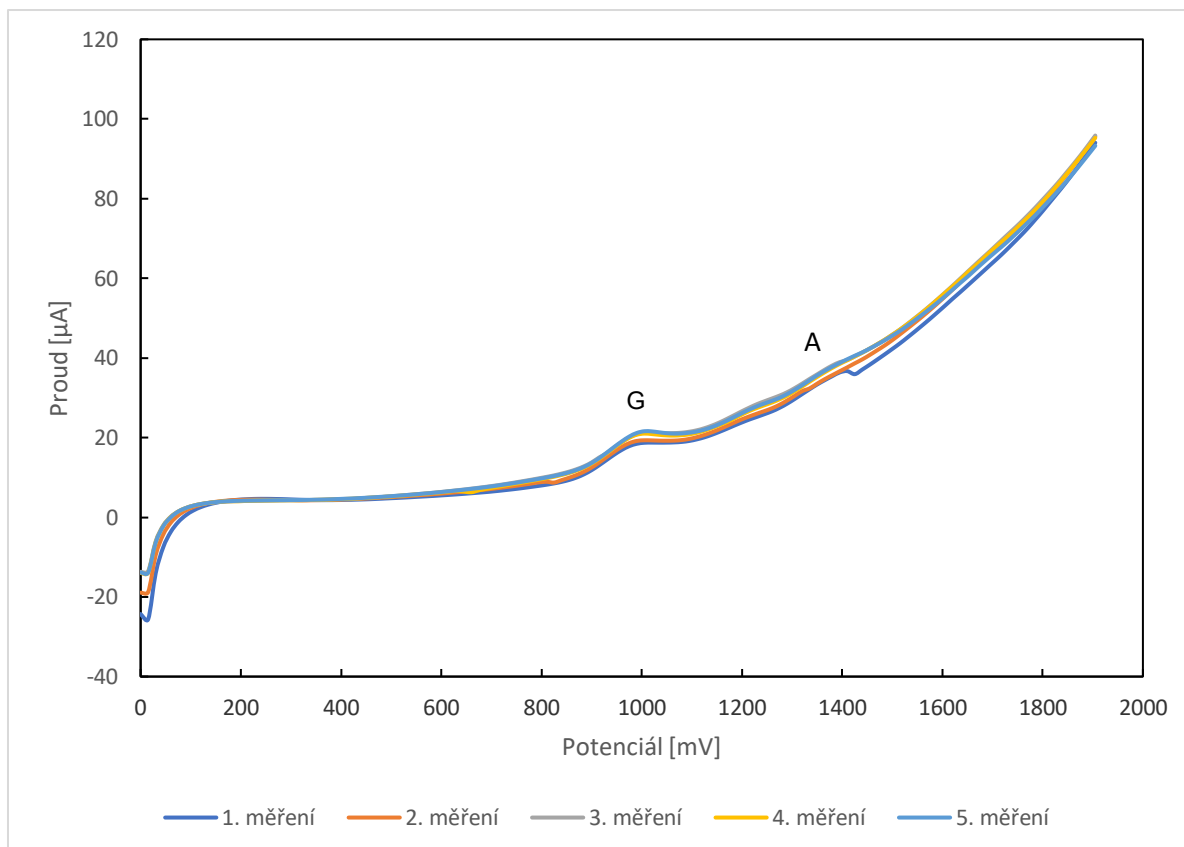


Obrázek 15 – Závislost výšky píku guaninových a adeninových zbytků dsDNA ($c_m = 10 \text{ mg/ml}$) na rychlosti polarizace zaznamenaná pomocí DPV na UTGE v prostředí fosfátového pufru (pH 7,0). V grafu jsou vyznačeny chybové úsečky představující interval spolehlivosti ($n = 5$)

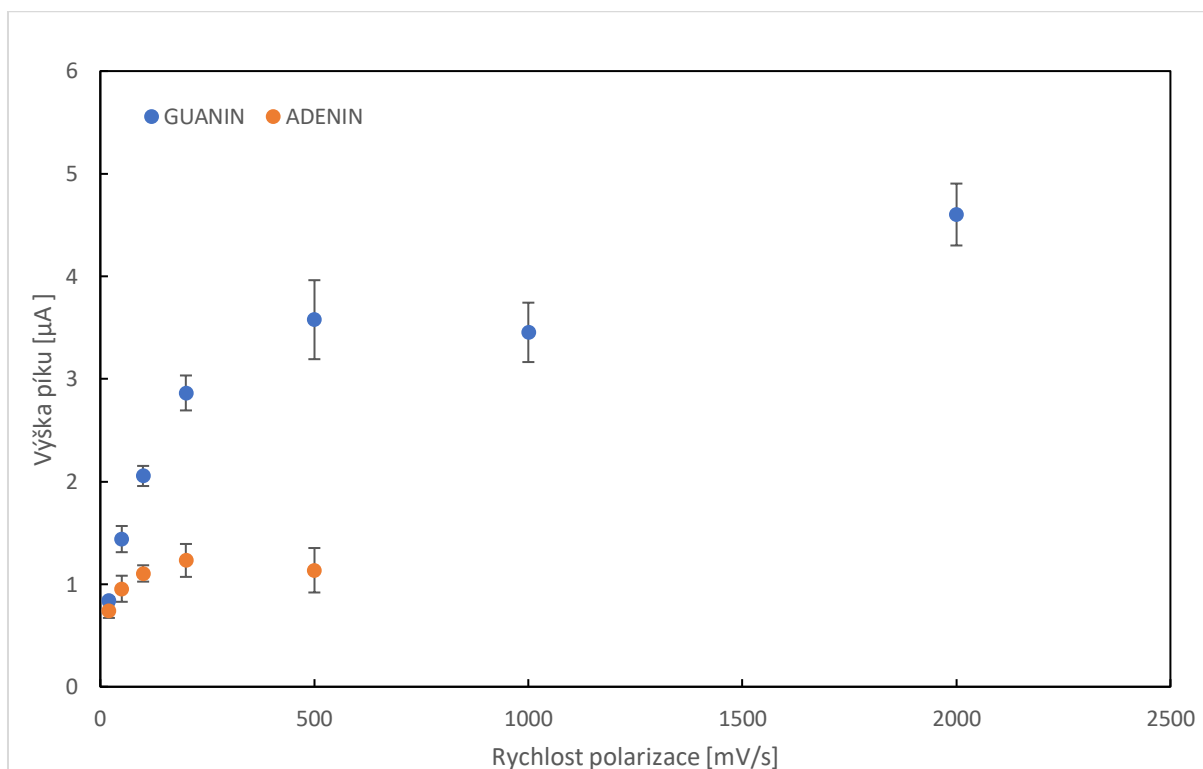
Až doposud byly na uvedených grafech prezentovány výsledky při rychlostech polarizace do 100 mV/s použitelných při DPV. U techniky DCV bylo možné vyšetřovat tyto závislosti v rozšířeném rozsahu rychlostí polarizace, tedy od 5 až do 2000 mV/s. Na obr. 17 byly zaznamenány hodnoty výšek DCV píků pro adeninové zbytky pouze po rychlost 500 mV/s, při vyšších rychlostech nebylo možné píky vyhodnotit díky nekvalitním signálům. Zároveň ve vyšších rychlostech polarizace dosahovaly voltametrické signály relativně nízké opakovatelnosti. Výšky píku adeninových zbytků získávají ve fosfátovém pufru při koncentraci dsDNA 0,5 mg/ml a rychlosti polarizace 500 mV/s až šestnásobek hodnoty z acetátového pufru. Pro guaninové zbytky je za stejných podmínek nárůst přibližně dvojnásobný.

Vyhodnocování měření ve vyšších rychlostech polarizace (500, 1000 a 2000 mV/s) probíhalo obtížněji, jelikož signály guaninových a adeninových zbytků neměly dostatečnou kvalitu pro správné vyhodnocení (viz obr. 16).

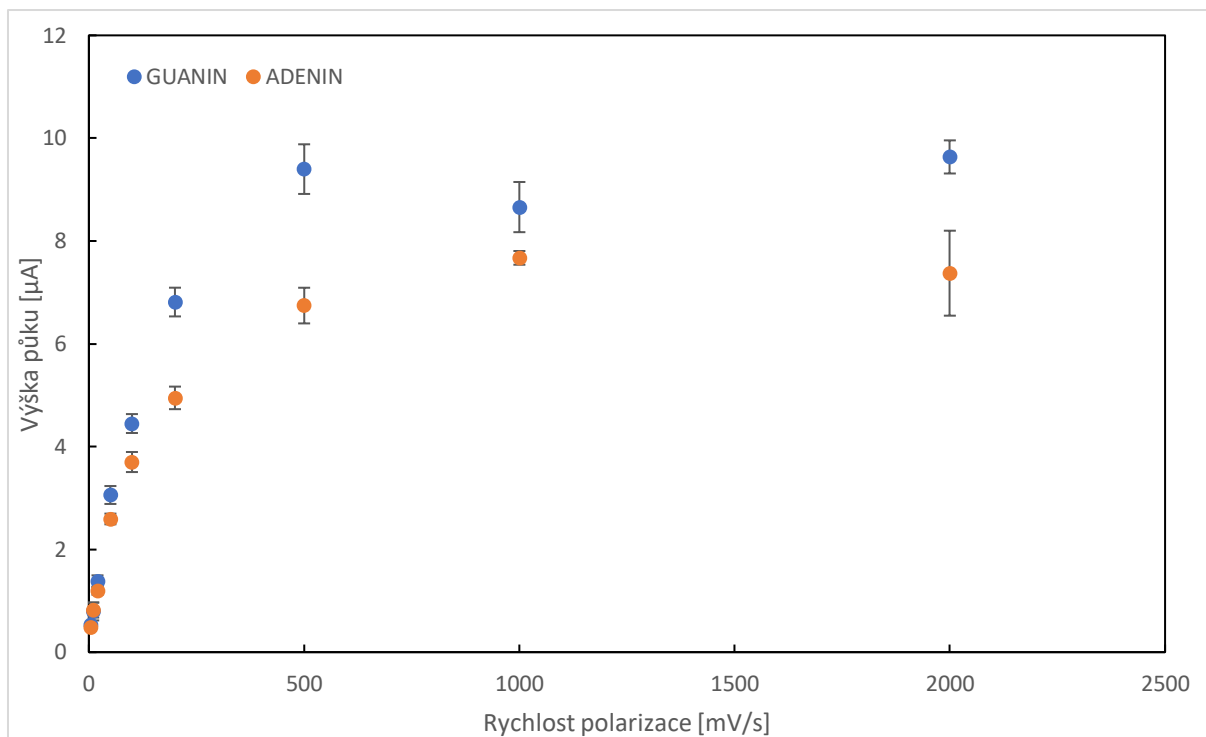
Závislosti výšky píku guaninových a adeninových zbytků dsDNA ($c_m = 1 \text{ mg/ml}$) na rychlosti polarizace zaznamenaná pomocí DCV na UTGE v prostředí acetátového i fosfátového pufru nejsou z důvodu přehlednosti prezentace výsledků v této práci ukázány – získané charakteristiky jsou obdobné jako na obr. 17 a 18.



Obrázek 16 – DC voltamogramy dsDNA o $c_m = 0,5 \text{ mg/ml}$ (rychlost polarizace 1000 mV/s , prostředí $0,1 \text{ mol/l}$ acetátového pufru o pH 4,6) zaznamenané na UTGE; DNA poskytuje 2 píky – označené G (pík guanosinu), A (pík adenosinu)



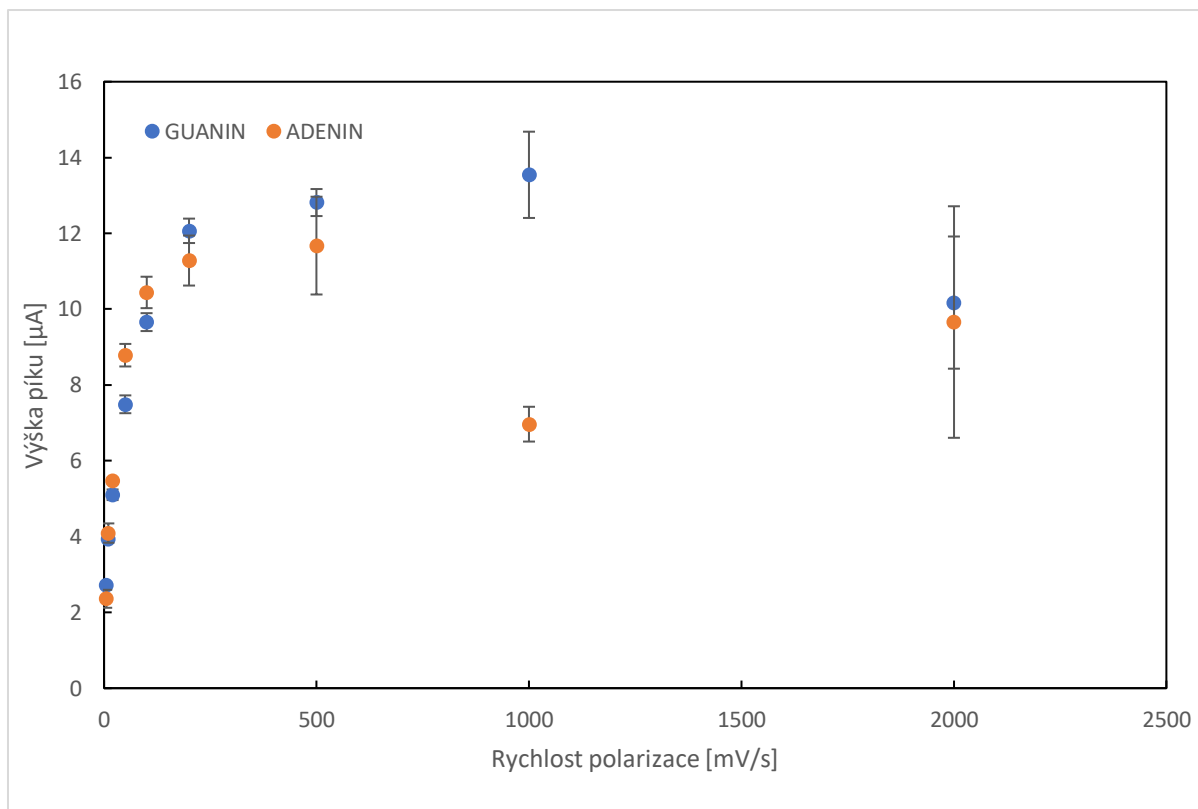
Obrázek 17 – Závislost výšky píku guaninových a adeninových zbytků dsDNA ($c_m = 0,5 \text{ mg/ml}$) na rychlosti polarizace zaznamenaná pomocí DCV na UTGE v prostředí acetátového pufru (pH 4,6). V grafu jsou vyznačeny chybové úsečky představující interval spolehlivosti ($n = 5$)



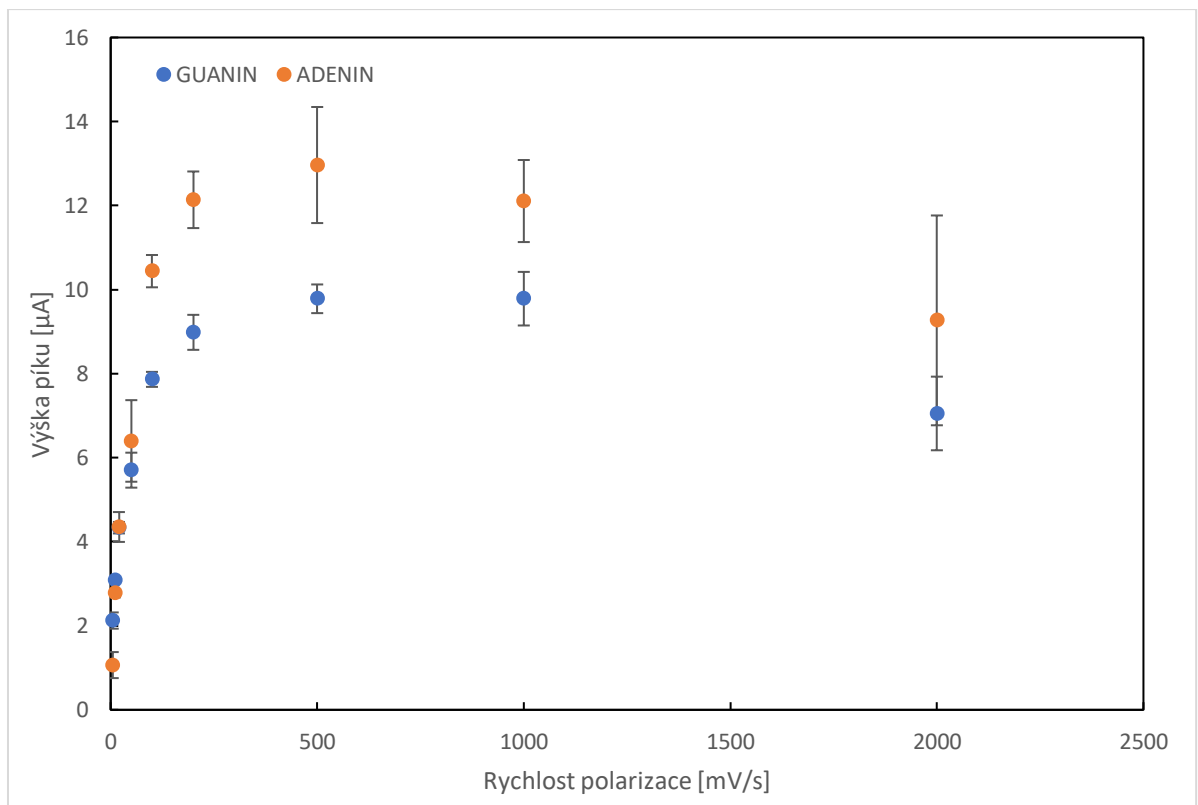
Obrázek 18 – Závislost výšky píku guaninových a adeninových zbytků dsDNA ($c_m = 0,5 \text{ mg/ml}$) na rychlosti polarizace zaznamenaná pomocí DCV na UTGE v prostředí fosfátového pufru (pH 7,0). V grafu jsou vyznačeny chybové úsečky představující interval spolehlivosti ($n = 5$)

I při použití techniky DCV byly zkoumány závislosti výšky píku studovaných bází dsDNA na změně rychlosti polarizace při použití nejvyšší koncentrace dsDNA 10 mg/ml (obr. 19 a 20). Na obr. 19 je vidět velký pokles výšky píku adeninového zbytku při rychlosti polarizace vyšší než 1000 mV/s. Závislost na koncentraci je lineární do rychlosti polarizace 100 mV/s pro obě prostředí, následuje prudký pokles výšek píku pro oba nukleotidové zbytky (viz obr. 20). Ve vyšších rychlostech polarizace si lze všimnout velkých chybových úseček. Jak již bylo zmíněno, variabilita výsledků byla pravděpodobně způsobena tím, že se signály ve vyšších rychlostech polarizace velmi špatně vyhodnocují.

Závěrem této kapitoly je možné shrnout, že pro sledování voltametrických signálů na UTGE je možné úspěšně využít jak techniku DPV, tak i techniku DCV, a to za různých experimentálních podmínek. Z pohledu získaných tvarů voltametrických píků guanosinu a adenosinu a jejich výsledných výšek se jako vhodnější jeví použití techniky DPV, a to při rychlosti polarizace 20 mV/s v prostředí 0,1 mol/l acetátového pufru o pH 4,6. Tyto podmínky byly dále využity ke sledování poškození dsDNA pomocí UVC záření. Aby bylo možné citlivěji sledovat změny při poškození struktury dsDNA, byla v dalších experimentech používána koncentrace dsDNA 1 mg/ml, u níž se předpokládá, že povrch UTGE nebude ještě zcela zasycen navázanou dsDNA, tudíž drobné změny ve struktuře DNA budou lépe pozorovatelné.



Obrázek 19 – Závislost výšky píku guaninových a adeninových zbytků dsDNA ($c_m = 10$ mg/ml) na rychlosti polarizace zaznamenaná pomocí DCV na UTGE v prostředí acetátového pufru (pH 4,6). V grafu jsou vyznačeny chybové úsečky představující interval spolehlivosti ($n = 5$)



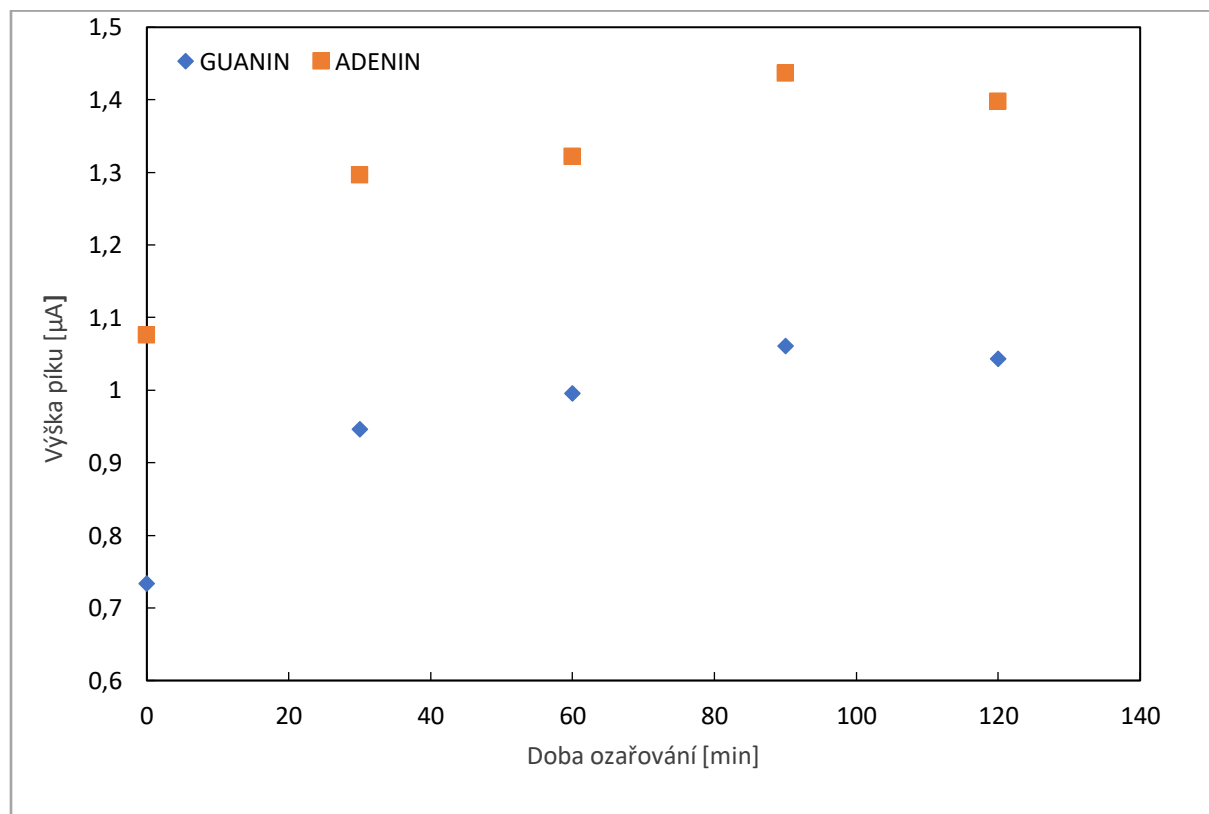
Obrázek 20 – Závislost výšky píku guaninových a adeninových zbytků dsDNA ($c_m = 10$ mg/ml) na rychlosti polarizace zaznamenaná pomocí DCV na UTGE v prostředí fosfátového pufru (pH 7,0). V grafu jsou vyznačeny chybové úsečky představující interval spolehlivosti ($n = 5$)

4.2. Detekce poškození DNA pomocí UV záření

Poškození DNA pomocí UVC záření o vlnové délce 254 nm ve vzdálenosti 1 cm od zdroje záření (roztok byl umístěn na skleněné misce obdélníkového tvaru o velikosti, která odpovídala velikosti emisního okna UV lampy) probíhalo ve 30minutových intervalech po dobu 2 hodin. Byl zvolen roztok DNA o koncentraci 1 mg/ml v prostředí 0,1 mol/l acetátového pufru o pH 4,6.

Tento roztok byl před ozářením analyzován ve voltametrické cele pomocí DPV na UTGE při rychlosti polarizace 20 mV/s, kdy lze při srovnání hodnot výšek píků guanosinu a adenosinu získaných za stejných podmínek na obr. 12 zaznamenat pokles výšek píků (oproti výškám píků guanosinu a adenosinu při čase ozařování 0 minut na obr. 21). Tento rozdíl je dán především tím, že měření probíhala s odstupem času a povrch UTGE mohl být odlišnou kvalitou.

Následně byl roztok navrácen do skleněné misky a ozářen UVC zářením o vlnové délce 254 nm po dobu 30 min. Po uplynutí 30 minut došlo ve voltametrické cele k zaznamenání DP voltamogramů za stejných podmínek jako před ozářením. Po každém měření byla elektroda oleštěna o aluminu. Jak již bylo řečeno, tento postup byl opakován po dobu 2 hodin, kdy vždy po 30 minutách byl roztok vyjmut, proměřen a následně znovu vložen pod UV lampu. Při celém experimentu bylo kontrolováno, že se objem studovaného roztoku DNA při manipulaci a jeho ozařování významně nemění.



Obrázek 21 – Závislost výšky píku guaninových a adeninových zbytků dsDNA ($c_m = 1$ mg/ml) na době ozařování zaznamenaná pomocí DPV na UTGE v prostředí acetátového pufru (pH 4,6).

Na obr. 20 si lze všimnout postupného nárůstu výšek píků guanosinu a adenosinu s dobou ozařování, to se však začíná měnit po 120 min, kdy dochází k mírnému poklesu. Prvotní nárůst s dobou ozařování 30–90 min lze vysvětlit tím, že se dvoušroubovice DNA mírně poškozuje a rozevívá. To je důsledkem přerušení fosfodiesterových vazeb v dsDNA vlivem působení UVC záření, kvůli čemuž následně dochází k eliminaci vodíkových můstků mezi jednotlivými páry bází. To vše má za následek destabilizaci elektrostatické přitažlivosti mezi záporně nabitou cukr-fosfátovou kostrou dsDNA a kladně nabitým povrchem elektrody, která umožňuje přístup volně difundující DNA přistoupit k povrchu elektrody či na něj být adsorbována i prostřednictvím samotných nukleobází, díky čemuž mohou narůstat výšky píků guanosinu a adenosinu. Po delším ozařování pokles výšek píků indikuje celkovou chemickou degradaci částí či celých nukleobází UV zářením, což vede ke snížení koncentrace nukleobází detekovatelných pomocí elektrochemických metod [23].

Výše uvedený pilotní experiment byl proveden jako potvrzení schopnosti DPV na UTGE zaznamenat změny ve voltametrických odezvách guanosinu a adenosinu při poškození dsDNA pomocí UVC záření. V rámci navazujícího výzkumu bude věnována pozornost detailnějšímu výzkumu dalších možností UTGE při monitorování poškození DNA vlivem různých poškozujících činidel.

5. Závěr

Tato bakalářská práce měla za cíl optimalizovat použití uhlíkové kompozitní elektrody (UTGE) pro stanovení dvouvláknové DNA (dsDNA) a následné využití při detekci poškození dsDNA ozařováním UVC zářením.

Při celkové optimalizaci voltametričkého stanovení guanosinu a adenosinu pro potřeby detekce poškození dsDNA byl důraz kladen na čtyři základní parametry – prostředí základního elektrolytu (použity 0,1 mol/l acetátový pufr o pH 4,6 a 0,1 mol/l fosfátový pufr o pH 7,0), koncentrace dsDNA (použity 0,5 mg/ml, 1 mg/ml a 10 mg/ml), rychlost polarizace UTGE a voltametričká technika měření (použity DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV)).

Jako optimální prostředí pro následnou voltametričskou detekci poškození dsDNA bylo zvoleno prostředí 0,1 mol/l acetátového pufru o pH 4,6 (dosahuje se zde vyšších hodnot výšky píku nukleotidových zbytků), optimální koncentrací dsDNA je 10 mg/ml (voltametričké odezvy guanosinu a adenosinu jsou nejvyšší), optimální technikou je DPV (za stejných podmínek získány oproti DCV vyšší, lépe vyhodnotitelné a opakovatelnější voltametričké píky guanosinu a adenosinu), u níž je optimální rychlost polarizace 20 mV/s. Zároveň je třeba před každým měřením pracovní elektrodu oleštit o aluminu, abychom docílili opakovatelných výsledků.

Za optimálních podmínek byl proveden pokus o DP voltametričskou detekci poškození dsDNA na UTGE. Poškození dsDNA bylo provedeno UVC zářením o vlnové délce 254 nm po dobu 2 hodin. Na voltamogramy bylo možné nejprve pozorovat nárůst výšek píků guanosinu a adenosinu (od 30. do 90. minuty ozařování) v důsledku mírného poškození a rozevírání dsDNA a následně pak pokles výšek píků (od 90. do 120. minuty ozařování) v důsledku celkové chemické degradace nukleobází UV zářením, což vedlo ke snížení koncentrace nukleobází detekovatelných pomocí jejich elektrooxidace.

6. Literatura

1. **Kodíček, M., Valentová, O., Hynek, R.:** *Biochemie – chemický pohled na biologický svět*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2018.
2. **Studium biochemie.** [Online] [Citace: 11. 11. 2021], dostupný z: <http://www.studiumbiochemie.cz/na.html>.
3. **Chiorcea-Paquim, A.M., Oliveira-Brett, A.M.:** DNA electrochemical biosensors for in situ probing of pharmaceutical drug oxidative DNA damage. *Sensors*. 2021, sv. 21, č. 4, str. 1125.
4. **Paleček, E.:** Past, present and future of nucleic acids in electrochemistry. *Talanta*. 2002, sv. 56, č. 5, str. 809.
5. **Vyskočil, V., Labuda, J., Berek, J.:** Voltammetric detection of damage to DNA caused by nitroderivates of fluorene using an electrochemical DNA biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, sv. 397, str. 233.
6. **Paleček, E., Bartošík, M.:** Electrochemistry of nucleic acids. *Chemical Reviews*. 2012, sv. 112, č. 6, str. 3427.
7. **Carter, M., Shieh, J.C.:** v knize *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. Academic Press, Oxford 2010, str. 207–227.
8. **Linhart, I., Novák, J.:** Deriváty purinových bází jako indikátory poškození DNA. *Chemické Listy*. 2002, sv. 96, č. 5, str. 279.
9. **Tampieri, A., Szabó, M., Medina, F., Gulyás, H.:** (2021) A brief introduction to the basics of NMR spectroscopy and selected examples of its applications to materials characterization. *Physical Sciences Reviews*. 2020, sv. 6, č. 1, čl. 20190086.
10. **de los Santos Álvarez, P., Lobo Castañón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tuñón-Blanco, P.:** Electrochemistry of nucleic acids at solid electrodes and its applications. *Electroanalysis*. 2004, sv. 16, č. 15, str. 1193.
11. **Paleček, E., Scheller, F., Wang, J.:** *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins*. Elsevier, Amsterdam 2005.
12. **Vacek, J., Havran, L., Fojta, M.:** Elektrochemická analýza poškození, hybridizace a dalších interakcí DNA. *Chemické Listy*. 2011, sv. 105, č. 1, str. 15.
13. **Britt, A. B.:** Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation. *Plant Physiology*. 1995, sv. 108, č. 3, str. 891.
14. **Sinha, R.P., Hader, D.P.:** UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2002, sv. 1, č. 4, str. 225.

15. **Suprum, E.V., Kutsudova, G.R., Khmeleva, S., Radko, S.P.:** Towards deeper understanding of DNA electrochemical oxidation on carbon electrodes. *Electrochemistry Communications*. 2021, sv. 124, čl. 106947.
16. **Fojta, M.:** Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. *Electroanalysis*. 2002, sv. 14, č. 21, str. 1449.
17. **Němčková, K., Labuda, J., Milata, V., Blaškovičová, J., Sochr, J.:** Interaction of DNA and mononucleotides with theophylline investigated using electrochemical biosensors and biosensing. *Bioelectrochemistry*. 2018, sv.123, str. 182.
18. **ČR, Národní knihovna:** *Ptejte se knihovny*. [Online] 20. 5. 2008. [Citace: 10. 11. 2021], dostupný z: <https://www.ptejteseknihovny.cz/dotazy/analyticka-chemie>.
19. **Kounaves, S.P.:** *Voltammetric Techniques*. [Online] [Citace: 30. 9. 2021], dostupný z: <https://www.brown.edu/Departments/Engineering/Courses/En123/Lectures/potentiostat.pdf>.
20. **Aioki, K., Tokuda, K., Matsuda, H.:** Theory of different pulse voltammetry at stationary planar electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1984, sv. 175, č. 1–2, str. 1.
21. **Štulík, K., Barek, J.:** *Senzory*. [Online] [Citace 08. 3. 2022], dostupný z: <https://old.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/senzory.pdf>.
22. **Metrohm:** *Ultra Trace Electrode Tip*. [Online] [Citace: 5. 10. 2021], dostupný z: <https://www.metrohm.com/cs-cz/produkty/61204180>.
23. **Svitková, V., Labuda, J., Vyskočil, V.:** Batch injection analysis with amperometric detection for DNA biosensing applications. *Electroanalysis*. 2019, sv. 31, č. 10, str. 2001.