

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Klára Stávková

VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÉHO DNA BIOSENZORU PŘI
DETEKCI POŠKOZENÍ DNA ZPŮSOBENÉHO GENOTOXICKÝM
2-NITROFLUORENEM

The Use of an Electrochemical DNA Biosensor in Detection of DNA
Damage Caused by Genotoxic 2-Nitrofluorene

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2014

Tato diplomová práce vznikla na základě výzkumu vedeného v rámci Univerzitního výzkumného centra „Supramolekulární chemie“ (projekt UNCE 204018/304018/2012). Tento výzkum byl finančně podpořen Grantovou agenturou České republiky (projekt GP13-23337P) a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze (projekt GAUK 430214/2014/B-CH/PřF).

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 v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 27. srpna 2014.

Klára Stávková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné připomínky k mé diplomové práci a také členům pracovní skupiny vedené Prof. Frankem–Michaelem Matysikem z Univerzity v Regensburgu v Německu. Dále děkuji svým rodičům, kteří mi umožnili studium na vysoké škole, a přátelům za všestrannou podporu.

Abstrakt

2-Nitrofluoren (NF) je považován za modelového zástupce nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků (NPAH) patřících do skupiny mutagenů a karcinogenů. Interakce DNA s genotoxickým 2-nitrofluorenem byla sledována pomocí elektrochemického DNA biosenzoru připraveného z elektrody ze skelného uhlíku (GCE) a nízkomolekulární DNA z lososích spermií. Použity byly techniky elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS), cyklická voltametrie (CV) a square-wave voltametrie (SWV). Za pomoci techniky EIS nebyla pozorována žádná poškozující interakce, která by způsobovala zlomy ve struktuře DNA. Pomocí CV byla ale zjištěna interkalace NF do struktury DNA za vzniku komplexu NF–DNA. Interkalace má za následek snížení počtu elektroaktivních míst schopných podléhat oxidaci, což bylo prokázáno technikou SWV, kdy docházelo ke snížení výšek píku guanosinu a adenosinu.

Z důvodu nebezpečného působení NF na strukturu DNA byla vyvinuta elektroanalytická metoda pro jeho stanovení a aplikovatelnost metody byla úspěšně ověřena na modelovém vzorku písku. Pro vývoj byla použita technika diferenční pulsní voltametrie (DPV) v prostředí směsi Brittonova-Robinsonova purfu o pH 7,0 a ethanolu v poměru 7:3 (v/v) a s pravidelnou předúpravou povrchu elektrody. Mez stanovitelnosti (L_Q) byla $1 \cdot 10^{-7}$ M.

Klíčová slova:

Elektrochemický DNA biosenzor

Elektroda ze skelného uhlíku

Nízkomolekulární DNA

2-Nitrofluoren

Voltametrie

Elektrochemická impedanční spektroskopie

Detekce poškození DNA

Vývoj analytické metody

Abstract

2-Nitrofluorene is a model representative of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (NPAH) which belongs to a group of mutagens and carcinogens. Interaction of DNA with genotoxic 2-nitrofluorene was monitored by an electrochemical DNA biosensor made of a glassy carbon electrode (GCE) and low molecular weight DNA from salmon sperm. Techniques used are electrochemical impedance spectroscopy (EIS), cyclic voltammetry (CV) and square-wave voltammetry (SWV). Using the EIS technique, no damage to DNA, which would cause strand breaks in DNA, was observed, whereas using the CV technique, the intercalation of NF to the structure of DNA was observed, leading to the formation of a NF–DNA complex. The intercalation results in a reduction of electroactive sites which can be oxidized. It was verified using the SWV technique, by which a decrease of the peak heights of adenosine and guanosine was observed.

Because of the dangerous effect of NF on the structure of DNA, an electroanalytical method for its determination was developed. An applicability of the method was successfully tested on a model sample of sand. For the development of the technique, differential pulse voltammetry (DPV) was used in a mixture of the Britton-Robinson buffer of pH 7.0 and ethanol in a ratio of 7:3 (v/v) and with a periodic pretreatment of the electrode surface. The limit of quantification (L_Q) was $1 \cdot 10^{-7}$ M.

Key words:

Electrochemical DNA biosensor

Glassy carbon electrode

Low molecular weight DNA

2-Nitrofluorene

Voltammetry

Electrochemical impedance spectroscopy

DNA damage detection

Analytical method development

Obsah

1. Úvod	8
1.1 Cíl práce	8
1.2 Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky	8
1.3 Studovaná látka 2-nitrofluoren	9
1.4 Elektrochemické DNA biosenzory	10
1.5 Výzkum 2-nitrofluorenu pomocí DNA biosenzorů	14
1.6 Srovnání poznatků o <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> přeměnách 2-nitrofluorenu	15
2. Experimentální část	17
2.1 Reagencie	17
2.2 Aparatura	18
2.3 Pracovní postupy	19
2.4 Postupy zpracování naměřených dat	22
3. Výsledky a diskuze	25
3.1 Optimalizace přípravy DNA biosenzoru	25
3.2 Vyšetřování interakce NF s DNA	29
3.3 Elektrochemické chování NF na holé a modifikované elektrodě	32
3.4 Voltametrické stanovení NF na elektrodě ze skelného uhlíku	37
3.4.1 Optimalizace pH	37
3.4.2 Opakovatelnost měření	40
3.4.3 Koncentrační závislost	41
3.4.4 Modelový vzorek	50
4. Závěr	52
5. Literatura	54

Seznam použitých zkratk a symbolů

NF	2-nitrofluoren
AF	2-aminofluoren
AAF	2-acetylaminofluoren
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
c	molární koncentrace [M]
c_{DNA}	koncentrace DNA
CV	cyklická voltametrie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA/GCE	elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná deoxyribonukleovou kyselinou
DPV	diferenční pulsní voltametrie
E_{acc}	potenciál akumulace DNA
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
EtOH	ethanol
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
L_Q	mez stanovitelnosti
M	[mol/l]
NPAHy	nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky
OH-NF	hydroxylovaný 2-nitrofluoren
PBS	fosfátový pufr
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
R	korelační koeficient
R_{CT}	odpor přenosu náboje [Ω]
SWV	square-wave voltametrie
t_{acc}	doba akumulace DNA
Z'	imaginární složka impedance [Ω]
$-Z''$	reálná složka impedance [Ω]

1. Úvod

1.1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout elektrochemický DNA biosenzor na bázi elektrody ze skelného uhlíku (GCE) a nízkomolekulární DNA z lososích spermií a pomocí tohoto DNA biosenzoru vyšetřit interakci DNA s genotoxickým NF, který v těle interaguje s DNA za vzniku DNA aduktů, a přispívá tak k rakovinotvornému bujení. Tento DNA biosenzor představuje levný a velmi rychlý způsob odhalení poškození DNA a interakce DNA s nebezpečnými látkami vyskytujícími se v životním prostředí.

Vzhledem k nebezpečným interkalacím NF do struktury DNA, které mění strukturu dvoušroubovice DNA a zanášejí tak do DNA mutace, bylo dalším cílem nalézt citlivou elektroanalytickou metodu pro stanovení NF a ověřit její aplikovatelnost na reálném vzorku.

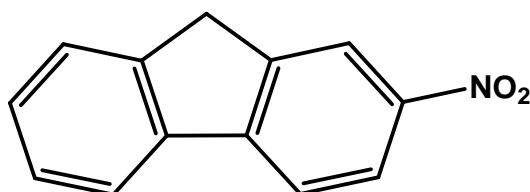
1.2 Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky

Během nedokonalého spalování organických látek vzniká celá řada zdraví ohrožujících látek, které jsou velkým problémem znečištění ovzduší a životního prostředí. Mezi tyto látky patří také nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAHy), které se řadí mezi přímé mutageny a karcinogeny, a vykazují tak nebezpečné účinky bez nutnosti projít aktivací pomocí mikrosomálních enzymů. Do ovzduší se uvolňují především výfukovými plyny z dieslových a benzínových motorů, spalováním černého uhlí, průmyslovou výrobou i cigaretovým kouřem¹. NPAHy setrvávají ve vzduchu naadsorbované na tuhé prachové částičky, pomocí kterých se mohou šířit na dlouhé vzdálenosti. V letních měsících, kdy vlivem teploty dochází k uvolňování těkavějších sloučenin do plynné fáze vzduchu, dochází ke zvýšení koncentrace NPAHů v ovzduší. Naopak v zimě se plynné NPAHy kondenzují na povrchu tuhých částic. V zimě zároveň může docházet ke zvýšení koncentrace NPAHů vytápěním domácností pevnými palivy. Koncentrace NPAHů v ovzduší se pohybuje v řádu desetin až stovek ng/m³ (cit.²). Z vody a půdy mohou být akumulovány do těla živých organismů a rostlin, a následně se tak dostávat do těla člověka konzumací této

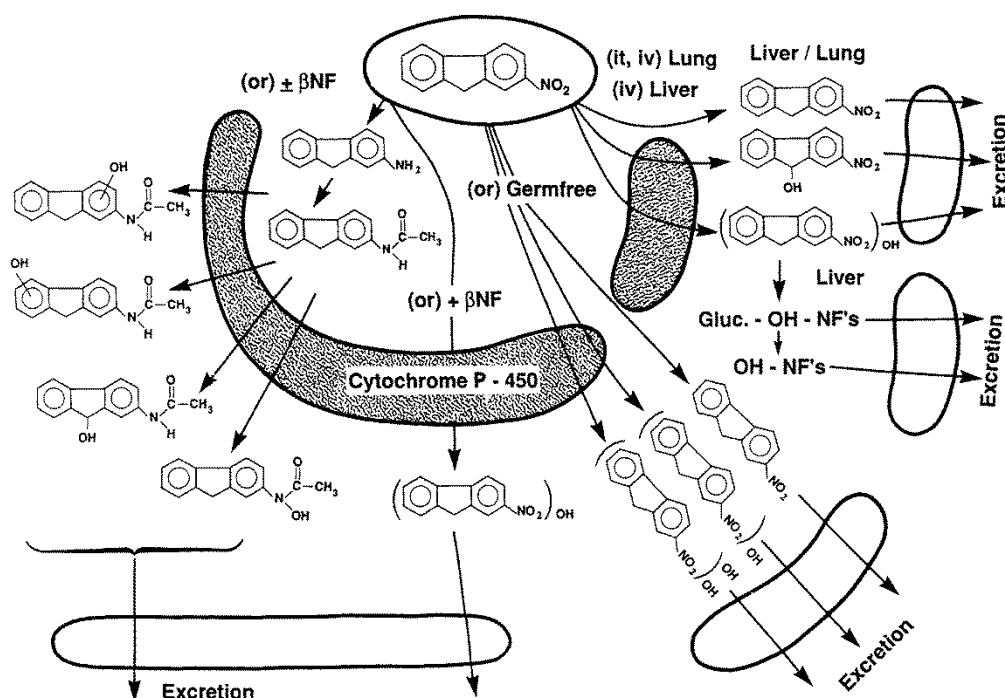
kontaminované potraviny. Potrava může být kontaminována také během úpravy, jako je pražení, pečení, grilování, sušení a uzení. Druhou cestou, jak NPAHy mohou vstupovat do těla člověka, je vdechováním vzduchu s tuhými částicemi¹⁻³.

1.3 Studovaná látka 2-nitrofluoren

Studovanou látkou je 2-nitrofluoren (NF, obr. 1.1). NF bývá považován za modelového zástupce nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků a za marker jejich výskytu. V ovzduší se nalézá buď volný, nebo naadsorbovaný na tuhé prachové částice³. Ačkoliv je NF chemicky stabilní látkou, v organismu podléhá intenzivnímu metabolismu (obr. 1.2). Prvním krokem metabolismu je redukce střevní mikroflórou na 2-aminofluoren (AF). AF dále v játrech podléhá acetylaci a vznikne 2-acetylaminofluoren (AAF). AF a AAF mohou být v játrech hydroxylovány a tyto hydroxylované formy, jež vykazují mutagenní účinky³⁻⁷, jsou poté díky své polaritě vylučovány ledvinami a trávicím systémem z těla ven. Nehydroxylované formy mohou pak interagovat s DNA za vzniku DNA aduktů. Ty představují poruchy, které se mohou po svém vzniku dlouhodobě zakonzervovat jako mutace a mohou časem přispívat k maligní transformaci buněk a nekontrolovanému buněčnému dělení. Z toho důvodu je NF považován za potencionální karcinogen. Bylo zjištěno, že indukuje nádorové bujení v mnoha orgánech, např. v játrech, žaludku, ledvinách, plicích, mléčných a slinných žlázách, tlustém střevě či konečníku^{3,8,9}.



Obr. 1.1 Strukturní vzorec 2-nitrofluorenu.



Obr. 1.2 Shrnutí metabolismu NFu v laboratorní kryse. Možné vstupy NFu do organismu: orální (or) vstup (popsaný v textu viz výše) a intratracheální (it) či intravaskulární (iv) vstup (studovány na izolovaných prokrvených plicích (lung) a játrech (liver)). NF podaný intratracheální cestou projde skrz plíce do krevního oběhu a nemetabolizovaný může postihnout celý organismus. V játrech i plicích je intravaskulárně podaný NF metabolizován na hydroxylovaný 2-nitrofluoren (OH-NF). Z jater je vylučován ve formě neškodných žlučových glukuronidů. β-naftoflavon (βNF) navodí zvýšenou činnost cytochromů P450, mění se produkce metabolitů z kvantitativního hlediska, vzniká více OH-NF. Nepřítomnost střevní mikroflóry (germfree) způsobuje nedostatek nitroredukcí, metabolismus je prováděn oxidativní cestou a metabolity jsou OH-NF. (převzato z literatury^{3,10}).

1.4 Elektrochemické DNA biosenzory

Hlavní rolí DNA v buňkách je udržet a správně vytvářet genetickou informaci. Poškození DNA v buňkách na základě interakce s řadou chemických i fyzikálních látek vyskytujících se v životním prostředí má často za následek mutace, které mohou vést až

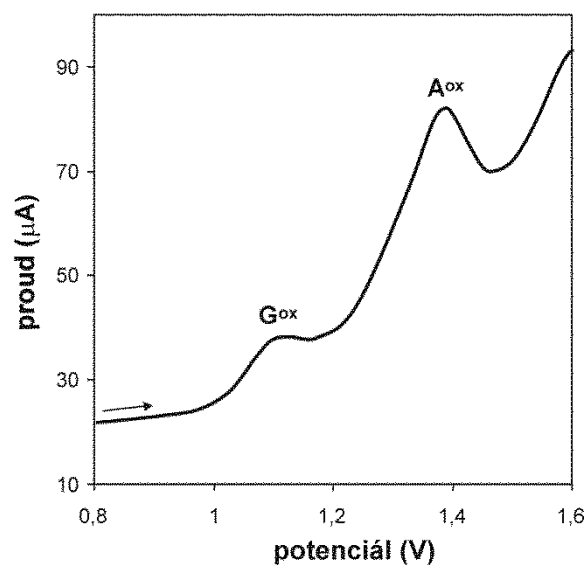
k rozvoji rakoviny. Je proto důležité disponovat analytickými metodami, které jsou schopné rychle a citlivě detekovat poškození DNA a přítomnost látek poškozujících DNA¹¹. Jednou z možností jsou elektrochemické DNA biosenzory¹²⁻²⁰. Ty mohou díky své citlivosti, jednoduchosti a nízkým finančním nákladům konkurovat technikách, pomocí kterých již byla interakce DNA s nejrůznějšími typy látek studována, jako např. gelovou elektroforézou²¹⁻²³, fluorescenční spektroskopií, NMR^{24,25} či UV-VIS spektroskopií.

Jednoduchý elektrochemický biosenzor se skládá z biologického materiálu a fyzikálně-chemického převodníku, na kterém je biologická složka pevně ukotvená – imobilizovaná. Biologická složka je schopna rozlišit přítomnost, aktivitu nebo koncentraci specifického analytu v roztoku. Vznikající signál je úměrný koncentraci analytu v roztoku a převodník ho převádí na měřitelný analytický signál^{20,26}.

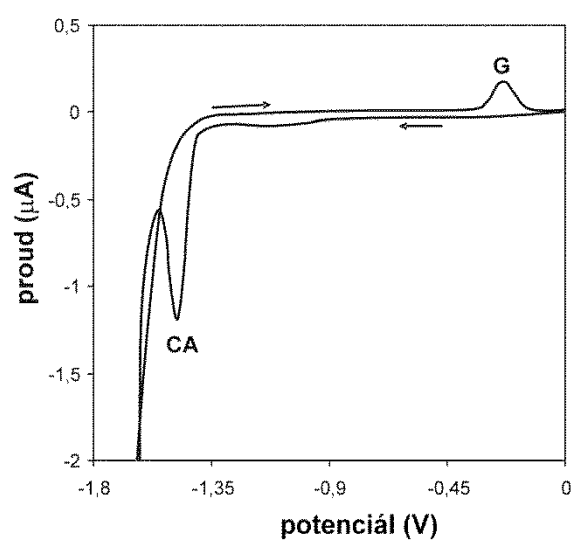
Elektrochemické senzory nabízejí rychlou možnost odhalení toxických a karcinogenních látek v životním prostředí²⁷ a potravin, hodí se jednak jak k detekci poškození DNA, tak i ke kvantitativnímu stanovení látek²⁸, které poškozování DNA způsobují. Prozatím byla tato zařízení použita pro detekci například polychlorovaných bifenyly, aflatoxinů, aromatických aminů²⁹, pesticidů³⁰ a protinádorových léčiv^{28,31}. Do budoucna se očekává aplikace biosenzorů i oblasti medicíny, k detekci mutací lidských genů či jako včasná diagnostika nemocí³².

Je-li DNA vystavena působení genotoxických látek, dochází v ní ke strukturním změnám a tyto změny mohou být sledovány pomocí elektrochemických signálů^{11,33}. Elektrochemické vlastnosti DNA jsou studovány již od 50. let 20. století, kdy český vědec Emil Paleček objevil elektrochemickou aktivitu nukleových kyselin na rtuťové elektrodě³⁴. Elektroaktivní složkou DNA jsou dusíkaté báze³⁵. Uhlíkové elektrody se využívají k měření při pozitivních potenciálech a pozorování anodických oxidačních dějů. Pozorovat lze pouze oxidační píky purinových bází guaninu a adeninu (obr. 1.3). Guanin se oxiduje kolem potenciálu 1,0 V, oxidace adeninu probíhá při 1,2 V. Po interakci DNA s toxickými látkami je výhodné sledovat pokles oxidačního píku guaninu z toho důvodu, že jeho oxidace předchází oxidacím dalších bází, a není tak zatížen ostatními reakcemi na elektrodě. K analýze DNA lze použít různých konstrukčních typů uhlíkových elektrod (pevné, pastové, kompozitní, filmové apod.) a uhlík lze také nejrůzněji modifikovat³³.

Na povrchu rtuťové elektrody dochází k irreverzibilní redukci cytosinu a adeninu okolo potenciálu $-1,45$ V proti argentchloridové referentní elektrodě (obr. 1.4). Guanin je redukovatelný až při potenciálech menších než $-1,6$ V a jeho pík tak není na elektrochemických záznamech viditelný³⁶. Zároveň totiž dochází k výraznému vylučování vodíku, čímž jsou překryty redukční proudy guaninu. Okolo potenciálu $-0,3$ V můžeme pozorovat až oxidaci 7,8-dihydrogenguaninu vzniklého redukcí guaninu. Abychom mohli pozorovat redukční píky thyminu a uracilu, musíme použít značně negativní potenciály, při kterých ale dochází k rozkladu základního elektrolytu (vody), a tedy i nevodné prostředí (dimethylsulfoxid, dimethylformamid). Tento přístup nenašel pro biochemické analýzy reálných vzorků DNA využití³³. Pomocí rtuťových elektrod jsou získávány kvalitní reprodukovatelné výsledky a tyto elektrody byly použity pro stanovení DNA jednak klasickými polarografickými metodami, voltametrií s lineárně rostoucím napětím, ale i pulsními voltametrickými metodami. Nejlepší reprodukovatelné výsledky poskytuje visící rtuťová kapková elektroda, ale amalgamové elektrody jsou vhodnější pro konstrukci DNA biosenzorů³³. Důvodem je především to, že během posledního desetiletí stále více rostou obavy z toxicity kapalné rtuti (pozornost je tedy věnována vývoji pevných elektrod, jako jsou amalgamové elektrody, kompozitní elektrody, uhlíkové pastové elektrody či borem dopované diamantové elektrody). Materiály složené z amalgámu neobsahují toxickou kapalnou rtuť, a produkují tudíž zanedbatelné množství rtuťových výparů ve srovnání s kapalnou rtutí či s hmotou, která se z kapalné rtuti skládá^{37,38}.



Obr. 1.3 Voltamogram oligonukleotidu s oxidačními píky guaninu (G^{ox}) a adeninu (A^{ox}) naměřený na elektrodě z pyrolytického grafitu (převzato z literatury³³).



Obr. 1.4 Cyklický voltamogram oligonukleotidu s redukčním píkem cytosinu a adeninu (CA) a oxidačním píkem (G) redukčního produktu guaninu (7,8-dihydrogenguanin) naměřený na visící rtuťové kapkové elektrodě (převzato z literatury³³).

1.5 Výzkum 2-nitrofluorenu pomocí DNA biosenzorů

Při elektrochemickém výzkumu interakcí 2-nitrofluorenu, jehož voltametrické chování bylo podrobně studováno např. v publikacích³⁷⁻⁴¹, a jeho biologických metabolitů⁴²⁻⁴⁶ s DNA (používá se DNA izolovaná z buněk živočichů, např. telecího brzlíku nebo lososích či sledích spermíí) byly prozatím použity DNA biosenzory s převodníky na bázi rtuti (visící rtuťová kapková elektroda⁴⁷ (HMDE)) a uhlíku (sítotisková uhlíková elektroda⁴⁸ (SPCE), uhlíková filmová elektroda⁴⁹). K detekci poškození DNA byly použity elektrochemické techniky square-wave voltametrie (SWV), diferenční pulzní voltametrie (DPV) a cyklická voltametrie (CV). Ve všech případech byly pozorovány změny voltametrických signálů dokazující poškození DNA zkoumaným xenobiotikem.

Pomocí biosenzoru sestaveného z SPCE⁴⁸ byly zjištěny dva druhy poškození DNA. První bylo způsobeno přímou interkalací nitrofluorenu do DNA. Pomocí SWV byly sledovány píky guaninu a adeninu. Oba tyto píky se po interakci DNA a NF snižují. Dochází k interkalaci látky mezi páry bází DNA. To má za následek snížení počtu elektroaktivních míst schopných podléhat oxidaci. Druhé poškození bylo způsobeno radikály s krátkou dobou života, které vznikají při elektrochemických redukcích nitroskupin. Během první fáze elektrochemické redukce NF se nitroskupina redukuje na hydroxylaminoskupinu, a vznikají tak radikály s krátkou dobou života ($\text{Ar-NO}_2\text{H}^\bullet$). Ty mohou interagovat s DNA a způsobovat její oxidativní poškození. Bylo pozorováno zvýšení adeninového a guaninového píku. Reaktivní radikály způsobují rozevření dvoušroubovice a větší přístupnost bází pro elektrochemickou oxidaci.

Na HMDE⁴⁷ modifikované DNA byly získány obdobné výsledky jako na SPCE. Technikou CV byl zaznamenán pokles adeninu a cytosinu v přítomnosti NF. Dvoušroubovice DNA je degradována na volné kousky, které se následně uvolní z povrchu elektrody. Tento pokles se dá dále vysvětlit částečnou depurinací DNA, po které volné báze adeninu v roztoku neposkytují žádný signál. I touto technikou bylo sledováno poškození DNA způsobené nitroanionovými radikály (Ar-NO_2^-). Byl pozorován pokles redukčních píků adeninu a cytosinu v důsledku zlomů v DNA, jejíž části se poté neudrží na povrchu elektrody a odpadávají. Nejčastějším indikátorem oxidativního poškození je guanin. Vzniklý 8-oxoguanin se nesprávně páruje s adeninem, a do DNA se tak následně začleňuje mutace. Z diferenčních pulsních

voltamogramů byl navržen mechanismus vazby NF do DNA. Na holé HMDE poskytuje NF dobře vyvinutý signál. Po přidavku DNA do roztoku vzniká komplex NF–DNA. Ten se díky DNA snadněji a silněji váže na povrch elektrody, a zvýší se tak proudová odezva NF. Pík se také posunuje k pozitivnějším hodnotám potenciálu, jelikož je komplex NF–DNA snáze redukovatelný. Při dalším přidavku DNA stále dochází k tvorbě komplexu, ovšem na elektrodu se konkurenčně váže nadbytečná DNA z roztoku, a proto dochází k poklesu voltametrické odezvy NF.

1.6 Srovnání poznatků o *in vivo* a *in vitro* přeměnách 2-nitrofluorenu

V předchozích kapitolách a mnohem podrobněji v bakalářské práci¹⁰ bylo ukázáno srovnání poznatků o *in vivo* a *in vitro* přeměnách NF. Výzkumem poškozování DNA *in vivo* se celosvětově zabývalo několik vědeckých týmů, především během 80. a 90. let minulého století. V publikovaných pracích byl poskytnut poměrně detailní popis nejen metabolických drah NF, ale také působení metabolitů NF na strukturu DNA^{3-9,50-58}. Rovněž bylo ukázáno, že elektrochemické DNA biosenzory představují jednoduše připravitelná, levná, citlivá a selektivní zařízení vhodná pro detekci poškození DNA *in vitro*. Je zřejmé, že výzkum prováděný za takto odlišných experimentálních podmínek (*in vivo* versus *in vitro*) s sebou nese riziko nižší korelace získaných poznatků.

Jelikož byl výzkum poškození DNA interakcí s NF a jeho metabolity pomocí elektrochemických DNA biosenzorů prováděn až v poslední době, týkají se získané poznatky především dvou sloučenin – matečného NF a jeho primárního *in vivo* metabolitu AF. Zde jsou uvedeny poznatky, které jsou *in vivo* a *in vitro* studii společné:

1. Při redukci NF vzniká jako redukční produkt AF.
2. Redukce NF na AF je ireversibilní proces.
3. Při přímé interakci AF s DNA vznikají silně vázané interkalační komplexy typu AF–DNA.

Pomocí elektrochemických DNA biosenzorů však byly získány i další poznatky, které při *in vivo* studiích nelze získat (nebyly vyvinuty příslušné metody pro takovýto typ studia) nebo jim nebyla věnována patřičná pozornost. Jedná se především o tato fakta:

1. Při elektrochemické redukci NF dochází v podmínkách srovnatelných s prostředím v buňkách (základní elektrolyty o iontové síle srovnatelné s iontovou silou fyziologického roztoku a v rozmezí pH 4,5 – 7,0) nejprve k tvorbě intermediátu (2-hydroxylaminofluoren), který je následně redukována na AF.

2. V prvním kroku elektrochemické redukce NF se na povrchu elektrody tvoří radikály s krátkou dobou života, které za aerobních podmínek zprostředkovávají oxidativní poškození DNA (či vznik zlomů ve vláknech dsDNA), které je známo i z *in vivo* studií (oxidační stres). Je tedy možné, že i v živých organismech existuje riziko tohoto typu poškození DNA, které může vézt ke vzniku DNA mutací.

3. Přímá interakce NF s DNA způsobuje jeho interkalaci do struktury DNA. Tento NF–DNA komplex by mohl při další replikaci DNA vést rovněž ke vzniku degenerované struktury DNA, popř. by mohl replikaci DNA zcela zamezit.

2. Experimentální část

V letním semestru 2014 jsem absolvovala studijní pobyt v zahraničí Erasmus na Univerzitě v Regensburgu (UR) v Německu na Fakultě chemie a farmacie, Katedře analytické chemie, chemo- a biosenzorů. Pracovala jsem v týmu Instrumentální analýzy pod vedením Prof. Franka–Michaela Matysika a diplomovou práci jsem zde dokončila.

Experimentální část byla tedy prováděna na dvou různých pracovištích. Optimalizace přípravy DNA biosenzoru, vyšetřování interakce NF s DNA a elektrochemické chování NF na holé a modifikované elektrodě byla měřena na PřF UK v Praze, a část těchto experimentů byla také zreprodukována na UR. Na UR bylo dále provedeno voltametrické stanovení NF na elektrodě ze skelného uhlíku.

Není-li uvedeno jinak, bylo v Německu pracováno s totožnými chemikáliemi.

2.1 Reagencie

Studovaná látka 2-nitrofluoren (98 %, Sigma-Aldrich, Německo). Zásobní roztok 2-nitrofluorenu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M byl připraven rozpuštěním 0,02112 g této látky v ethanolu (99,8 %, Lach-Ner, Česká Republika / 99,8 % Sigma-Aldrich, Německo) za pomoci ultrazvuku po dobu 2 minut. Zásobní roztok byl uchován za laboratorní teploty a ve tmě.

Nízkomolekulární DNA z lososích spermií (Sigma-Aldrich, Německo) byla uchovávána v lednici při teplotě 7 °C. Zásobní roztok této látky byl připravován rozpuštěním 10 nebo 100 mg v 1 ml fosfátového pufru. Zásobní roztok byl vždy připravován minimálně den předem a byl uchováván v plastových nádobkách typu Eppendorf v mrazícím boxu při teplotě -4 °C.

Fosfátový pufr o koncentraci 0,1 M byl připraven jako roztok 35,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (98,5 %, Lach-Ner, Česká Republika) a 13,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (> 98 %, Sigma–Aldrich, USA) v 1000 ml deionizované vody. pH roztoku bylo 6,7. Fosfátový pufr o koncentraci 0,1 M a pH 6,7 byl v Německu pro práci s DNA biosenzorem připraven jako roztok 15,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Německo) a 14,2 g Na_2HPO_4 (Merck, Německo). Pro techniku DPV byl fosfátový pufr o stejné koncentraci a pH 7,0 připraven z 22,8 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Německo) a 13,6 g KH_2PO_4

(Merck, Německo) z důvodu sražení prvního roztoku s ethanolem. Fosfátový pufr byl vždy uchováván za laboratorní teploty a ve tmě.

Redoxním indikátorem ($\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$) byla ekvimolární směs $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M. Byl připraven rozpuštěním 0,2112 g $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a 0,1646 g $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (oba 99 %, Lachema, Česká Republika) v 500 ml fosfátového pufru. Roztok byl uchováván za laboratorní teploty a ve tmě.

Brittonovy-Robinsonovy pufrы (BR pufrы) o potřebném pH byly připravovány mísením 0,2 M roztoku NaOH s roztokem obsahujícím 0,04 M kyselinu boritou, fosforečnou a octovou. Kyselá složka BR pufru byla připravena smísením 2,47 g H_3BO_3 , 2,30 ml 98% CH_3COOH a 2,50 ml 85% H_3PO_4 (všechny Merck, Německo). Roztok NaOH o koncentraci 0,2 M byl připraven rozpuštěním 8 g peciček NaOH (Merck, Německo). Roztoky byly uchovávány za laboratorní teploty a ve tmě.

Při přípravě roztoků byla používána deionizovaná voda (produkovaná systémem Millipore Milli-Q Plus, Millipore, USA). Veškeré používané roztoky, kromě zásobního roztoku DNA, byly uchovávány ve skleněných nádobách.

2.2 Aparatura

Cyklická voltametrie (CV), elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS), square-wave voltametrie (SWV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV) byly měřeny na přístroji MicroAutolab III/FRA 2 (Eco Chemie, Nizozemsko). Pro měření CV, SWV a DPV byl použit software GPES (General Purpose Electrochemical System), verze 4.9, a pro měření EIS byl použit software FRA (Frequency Response Analysis), verze 4.9. Micro Autolab III/FRA 2 byl řízen stolním počítačem s operačním systémem Microsoft Windows XP Professional. Měření probíhala ve tříelektrodovém zapojení sestávajícím se z pracovní elektrody ze skelného uhlíku (GCE) (průměr disku 3,0 mm, Metrohm, Švýcarsko), argentchloridové referentní elektrody (typ RAE 113, 3 mol/l KCl, Monokrystaly, ČR) a z platinové pomocné elektrody (typ PPE, Monokrystaly, ČR). Pro akumulaci DNA na povrch pracovní elektrody byl použit Eco-Tribo Polarograph (Polaro-Sensors, ČR) se softwarem Polar Pro, verze 5.1. V Německu byl k akumulaci DNA použit MicroAutolab III/FRA 2 (Eco Chemie, Nizozemsko).

2.3 Pracovní postupy

Optimalizace přípravy DNA biosenzoru

Postup č. 1: Povrch pracovní elektrody byl obnoven a aktivován jejím oleštění o utěrku z mikrovlákna (utěrka na čištění brýlí) a postupným vkládáním potenciálu (1,7 V a -0,5V, každý po dobu jedné minuty) v prostředí redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ v PBS. Roztok byl po celou dobu aktivace míchán pomocí magnetického míchadla.

Postup č. 2: Příprava DNA biosenzoru byla optimalizována za použití technik CV (polarizační rychlost 50 mV/s, potenciálový krok 5 mV, potenciálové rozmezí od 0 mV až 500 mV) a EIS (polarizační potenciál 225 mV, potenciálová amplituda 10 mV, frekvenční rozsah 0,1 – 5000 Hz – měřeno 51 bodů). Byla využita nepřímá detekce za použití redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ v PBS.

Postup č. 3: Potenciostatická akumulace DNA na GCE byla prováděna z roztoku DNA v PBS za optimálního potenciálu a času akumulace, čímž byl připraven vlastní DNA biosenzor (DNA/GCE). Roztokem DNA bylo po dobu akumulace mícháno elektrickým míchátkem. Byly proměřovány časové, potenciálové a koncentrační závislosti akumulace DNA na povrch elektrody. DNA byla akumulována z roztoků o koncentracích 0,1 mg/ml, 1 mg/ml a 10 mg/ml, v časovém rozsahu od 0,5 do 5 minut (od času 1 minuta vždy s jednodominutovým krokem) a rozmezí vkládaného potenciálu 0 – 800 mV (s krokem 100 mV). Byla také vyzkoušena samovolná akumulace z míchaného roztoku bez vloženého potenciálu. Elektroda byla po akumulaci opláchnuta v roztoku PBS. (Jako optimální podmínky akumulace DNA byl zvolen potenciál 500 mV, koncentrace DNA 10 mg/ml a čas akumulace 2 minuty.)

Vyšetřování interakce NF s DNA

Postup č. 1: Vliv ethanolu na naakumulovanou DNA na elektrodě byl zkoumán v elektrolytech s obsahem ethanolu 0 – 50 obj. % (s krokem 10 obj. %) ethanolu v PBS. Elektroda byla aktivována a za optimálních podmínek byl připraven vlastní biosenzor. Byl změřen cyklický voltamogram a impedanční spektrum v prostředí $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$. Po dobu 5 minut byl DNA biosenzor inkubován v prostředí ethanol/PBS a opět byl proměřen voltamogram a impedanční spektrum.

Postup č. 2: Pro vyšetření poškození DNA přímou interakcí s NF byla nejprve použita technika EIS. Na aktivovanou elektrodu byla za optimálních podmínek

naakumulována DNA a v prostředí $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ byla změřena EIS. Následovala inkubace DNA biosenzoru v roztoku $1 \cdot 10^{-4}$ M NF v 50% ethanolu v PBS po dobu 5 min a opět změření EIS v prostředí $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$. Akumulace DNA probíhala z roztoku o koncentraci 0,1 mg/ml, 1 mg/ml nebo 10 mg/ml.

Postup č. 3: Pro techniku SWV (polarizační rychlost 3 V/s, potenciálová amplituda 40 mV, potenciálový krok 15 mV, frekvence 200 Hz, potenciálové rozmezí 0 až 1600 mV) byla provedena vlastní optimalizace přípravy biosenzoru. Byl ponechán stejný potenciál akumulace 500 mV. Byly proměřeny koncentrace roztoku DNA 0,1 mg/ml, 1 mg/ml a 10 mg/ml. Pro optimální koncentraci 1 mg/ml byla proměřena časová závislost v rozsahu od 30 s do 5 minut a čas 30 s byl zvolen jako optimální.

Postup č. 4: Technikou SWV byla proměřena časová závislost (v rozsahu 10 – 60 minut s krokem 10 minut) pro inkubaci optimálně připraveného DNA biosenzoru v roztoku NF o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ M v PBS (1:9).

Postup č. 5: Technikou EIS byla proměřena časová závislost (10, 20, 40, 60 minut) pro inkubaci optimálně připraveného DNA biosenzoru v roztoku NF o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ M v PBS (1:9).

Elektrochemické chování NF na holé a modifikované elektrodě

Postup č. 1: Elektrochemické chování NF na holé a DNA modifikované elektrodě bylo zkoumáno pomocí techniky CV. Byl proměřen potenciálový rozsah 500 až -1400 mV. V roztoku $1 \cdot 10^{-4}$ M NF v 50% ethanolu v 0,1 M PBS byly změřeny voltamogramy na holé elektrodě a DNA biosenzoru připraveném za optimálních podmínek. Dále byl v 0,1 M PBS změřen voltamogram na DNA biosenzoru před a po jeho inkubaci po dobu 5 min v roztoku $1 \cdot 10^{-4}$ M NF v 50% ethanolu v 0,1 M PBS. Před vlastním měřením byl vždy roztok probublán dusíkem po dobu 5 min, aby se zabránilo rušivému vlivu rozpuštěného vzdušného kyslíku. Stejný postup byl zopakován pro koncentraci NF $1 \cdot 10^{-5}$ M v PBS.

Postup č. 2: Postup č. 1 byl proveden také s PBS o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ M.

Voltametrické stanovení NF na elektrodě ze skelného uhlíku technikou DPV

Parametry DPV: šířka pulsu 0,1 s, výška pulsu 50 mV a rychlost nárůstu potenciálu 0,02 V/s.

Postup č. 1: Při měření pH závislosti byly roztoky připraveny následujícím způsobem: do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 5 ml BR pufru o příslušném pH, 1 ml zásobního roztoku 2-nitrofluorenu v ethanolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M a poté byla baňka doplněna po rysku ethanolom. Takto připravené roztoky byly promíchány a převedeny do měřicí nádoby. Následně byl roztok zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem za stálého míchání, aby došlo k odstranění bublinek, které ulpěly na povrchu elektrody. Před vlastní nádobku byla zařazena promývačka obsahující směs pufru a ethanolu v takovém poměru, v jakém byly tyto složky přítomny v základním elektrolytu. Před vlastním měřením roztoku obsahujícího NF byla vždy změřena křivka základního elektrolytu, tedy roztoku BR pufru o příslušném pH a ethanolu v poměru 1:1 (v/v). pH, které poskytovalo nejlépe vyhodnotitelné voltamogramy, bylo proměřeno 20krát.

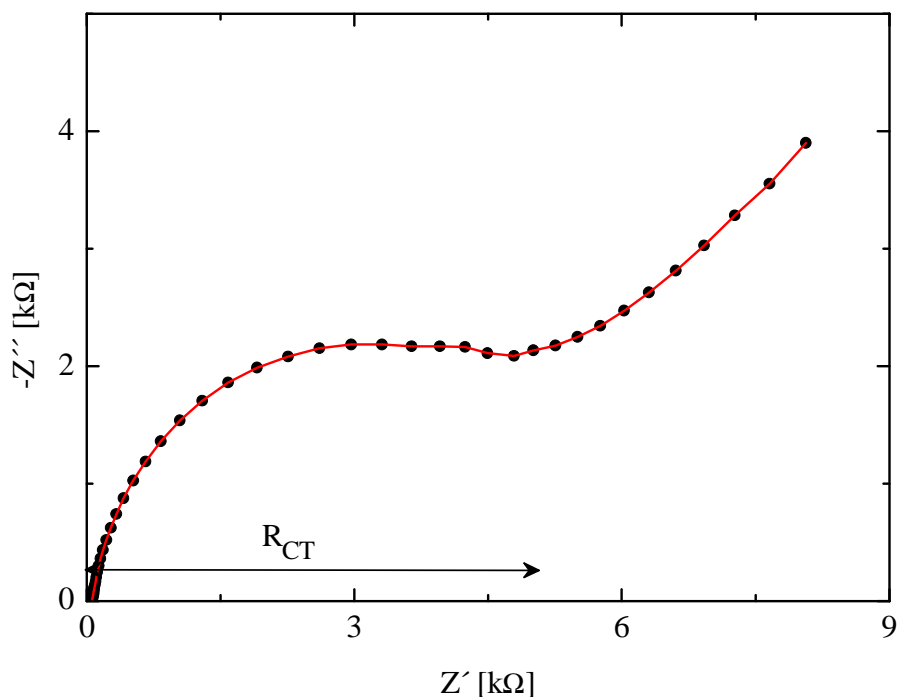
Postup č. 2: Pro konstrukci kalibračních závislostí bylo postupováno shodně s postupem č. 1, ale roztoky o koncentračních řádech 10^{-7} M a 10^{-6} M byly připraveny spikováním pomocí zásobních roztoků NF o koncentracích $1 \cdot 10^{-4}$ nebo $1 \cdot 10^{-3}$ M do roztoku základního elektrolytu. Nejnižší vyhodnotitelná koncentrace byla změřena 10krát. Byla proměřena závislost proudu na obsahu ethanolu (0 – 50 %) v roztoku základního elektrolytu a také vliv oleš'ování elektrody mezi jednotlivými změnami koncentrace kalibračního roztoku.

Postup č. 3: Modelový vzorek, 3 g písku, byl převeden do extrakční nádoby. Ke vzorku bylo přidáno vypočítané potřebné množství zásobního roztoku NF o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M nebo $1 \cdot 10^{-4}$ M. Po odpaření ethanolu byly přidány 3 ml ethanolu jako extrakčního činidla. Roztokem bylo třepáno a poté byl odebrán 1 ml extraktu a převeden do voltametrické nádoby. Roztok ve voltametrické nádobce ve výsledku obsahoval PBS a ethanol v poměru 7:3. Byla ověřena výtěžnost extrakce koncentrací $(1 - 10) \cdot 10^{-7}$ M a $(1 - 10) \cdot 10^{-6}$ M NF.

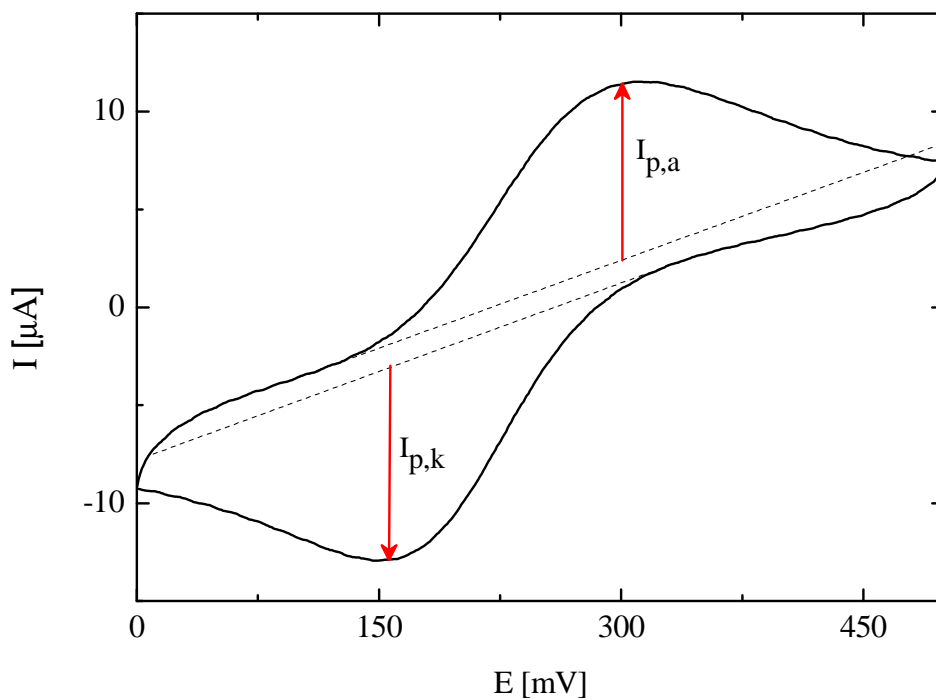
Pokud není uvedeno jinak, všechny křivky byly měřeny třikrát a elektroda byla při přesouvání mezi jednotlivými roztoky důkladně opláchnuta deionizovanou vodou.

2.4 Postupy zpracování naměřených dat

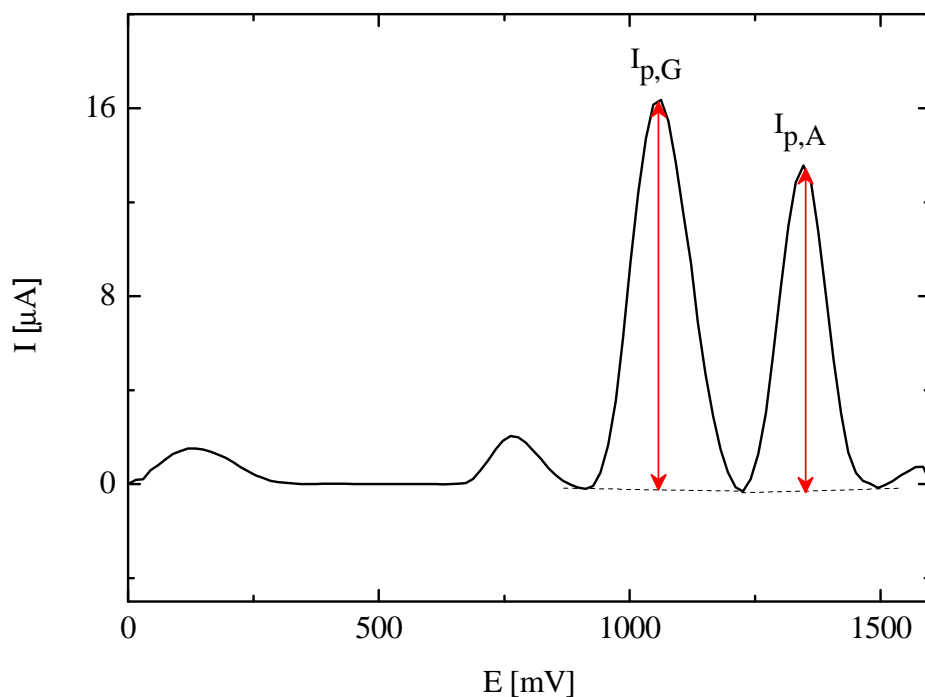
K potřebným výpočtům a tvorbě grafů uvedených v této práci bylo použito programu Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA) a OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, USA). Konfidenční pásy (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$) u kalibračních přímk byly vytvořeny v programu Origin Pro 8.0. Mez stanovitelnosti (L_Q) byla počítána dle IUPAC jako koncentrace odpovídající desetinásobku směrodatné odchylky voltametrického stanovení NF (pro počet měření $n = 10$) o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky⁵⁹. Ukázky vyhodnocování křivek pro jednotlivé techniky jsou znázorněny na obrázcích 2.1 – 2.4.



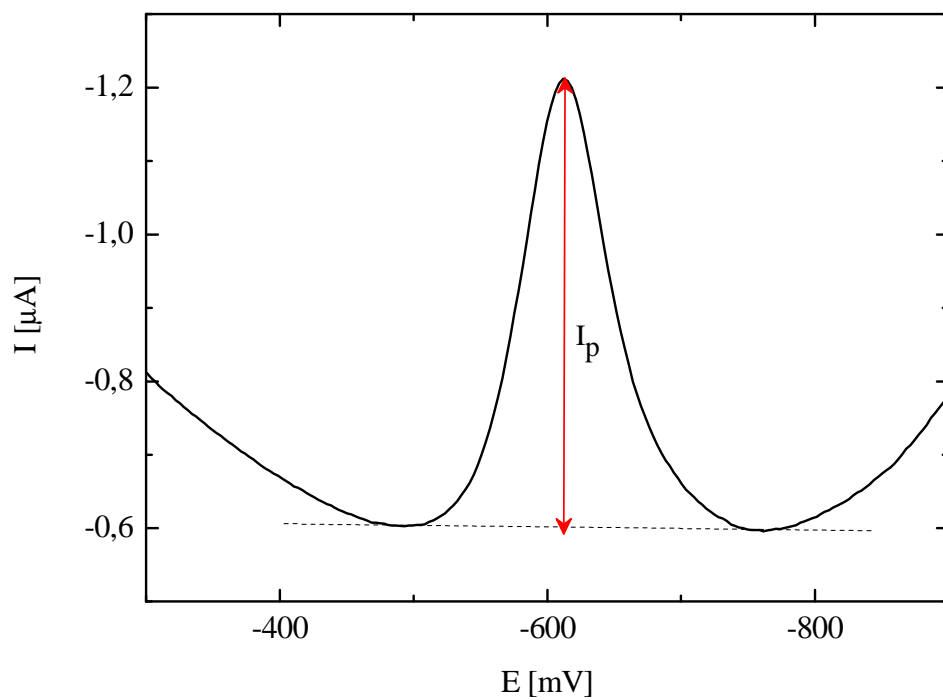
Obr. 2.1 Ukázka vyhodnocování EIS. Černé body – impedanční spektrum, červená křivka – proložení spektra. R_{CT} – odpor proti přenosu náboje.



Obr. 2.2 Ukázka vyhodnocování CV. $I_{p,a}$ – výška anodického píku, $I_{p,k}$ – výška katodického píku.



Obr. 2.3 Ukázka vyhodnocování SWV. $I_{p,G}$ – výška píku guanosinu, $I_{p,A}$ – výška píku adenosinu. Voltamogram je korigovaný na základní linii.



Obr. 2.4 Ukázka vyhodnocování DPV. I_p – výška píku NF.

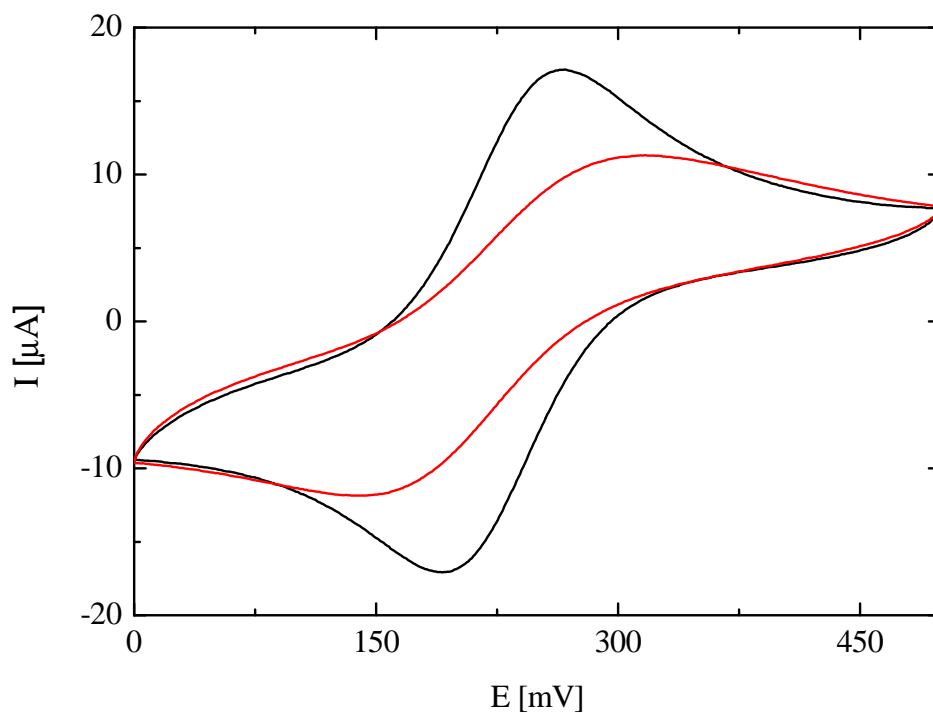
3. Výsledky a diskuze

3.1 Optimalizace přípravy DNA biosenzoru

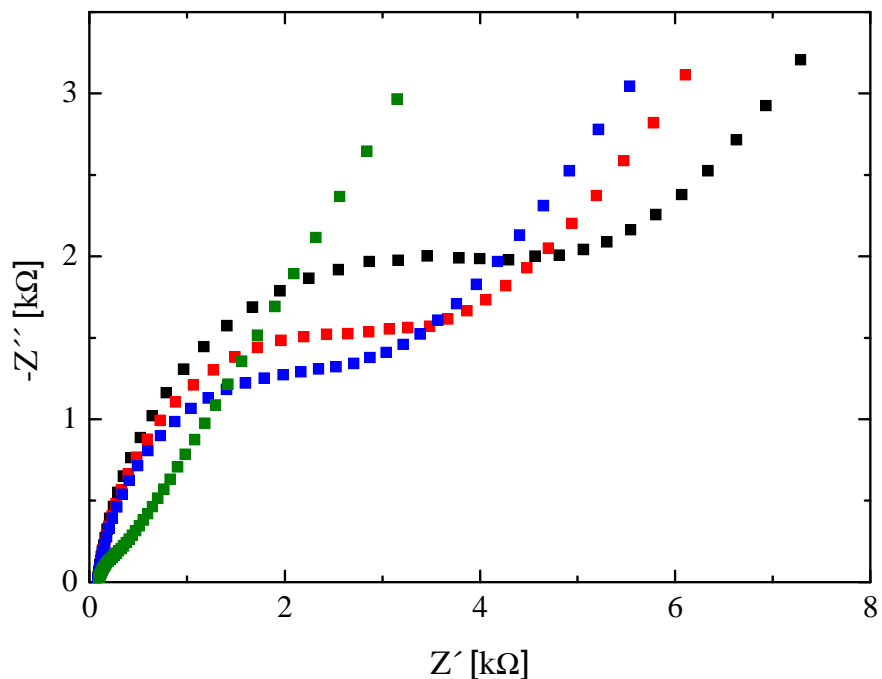
Před samotnou přípravou DNA biosenzoru a optimalizací jeho přípravy bylo nejprve potřeba vymezit potenciálové okno proměřované cyklickou voltametrií a optimalizovat předúpravu povrchu elektrody. Potenciálové okno bylo vymezeno v rozmezí potenciálů od 0 do 500 mV (při potenciálech nižších než 0 mV dochází k odpadávání navázané DNA vlivem odpudivých interakcí mezi záporně nabitou cukr–fosfátovou kostrou DNA a elektrodou s vloženým záporným potenciálem; při potenciálech vyšších než 500 mV dochází k elektrochemické oxidaci bází DNA). Nejúčinnější aktivace elektrody byla prováděna vkládáním nejprve potenciálu 1,7 V a poté –0,5 V vždy po dobu jedné minuty. Před aktivací byla elektroda očištěna o utěrku z mikrovlákn (utěrka na čištění brýlí) proto, aby byla z povrchu elektrody odstraněna DNA z předchozího měření a aby po vložení potenciálů neodpadávala do roztoku, ve kterém probíhalo měření. Přítomnost zbytků DNA v tomto roztoku by mohla vést k její zpětné akumulaci na elektrodu. Po přípravě biosenzoru a měření CV v rozsahu potenciálů –300 – 700 mV pomocí tohoto biosenzoru bylo pozorováno dlouhodobé ustálené množství naakumulované DNA na elektrodě. CV bylo potřeba proměřit v průměru desetkrát, než došlo k ustálení proměřovaných křivek. Signál biosenzoru narůstal, což znamenalo, že z něj část DNA odpadávala. Změnou rozmezí rozsahu potenciálů (nově od 0 do 500 mV) odpadávání ustalo.

Rychlého a opakovatelného pokrytí povrchu elektrody kompaktní vrstvou DNA bylo dosaženo její akumulací z roztoku o koncentraci 10 mg/ml po dobu 2 min při potenciálu akumulace 500 mV. Při potenciálu 500 mV byl pozorován dostatečně velký pokles voltametrických píků (obr. 3.1) a dostatečně kontrastní nárůst R_{CT} (obr. 3.2) oproti holé elektrodě bez naakumulované DNA. Větší nárůst R_{CT} než při akumulaci při 500 mV byl pozorován při akumulaci při potenciálech 600, 700 a 800 mV. Tyto potenciály se však blíží potenciálům oxidace guanosinu a adenosinu, a proto nebyly použity pro akumulaci DNA. Struktura DNA by jimi mohla být ovlivňována již během akumulace. Ze stejného důvodu, jako byl vybrán optimální potenciál akumulace, byla vybrána koncentrace DNA 10 mg/ml. Doba akumulace 2 min byla zvolena proto, že nárůst R_{CT} a pokles píku jsou při tomto čase už dostatečně velké (obr. 3.1 a 3.3). Při této

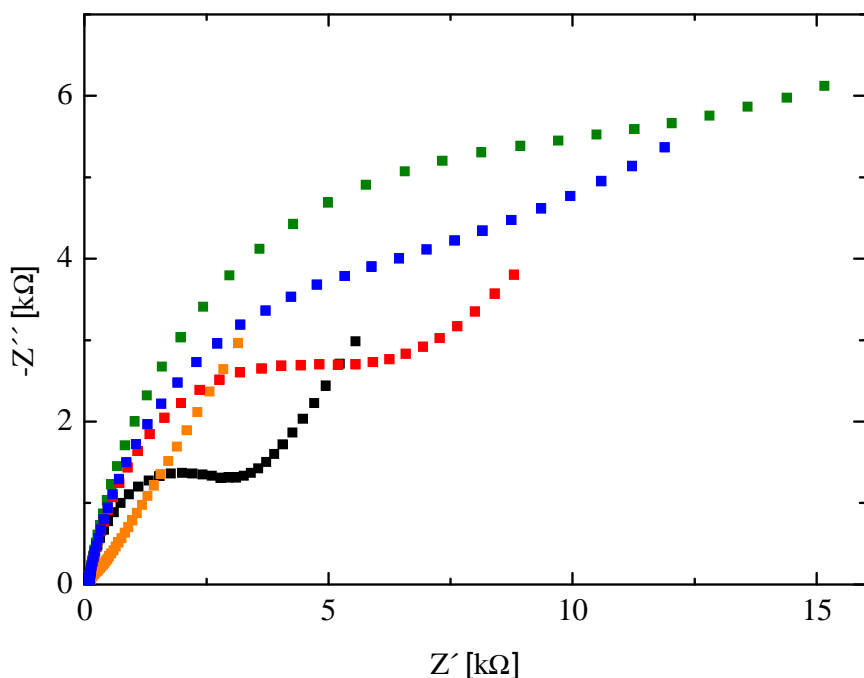
době akumulace bylo také dosaženo nejlepší opakovatelnosti přípravy DNA biosenzoru s relativní směrodatnou odchylkou 5,3 %, která je znázorněna v regulačním diagramu na obr. 3.4.



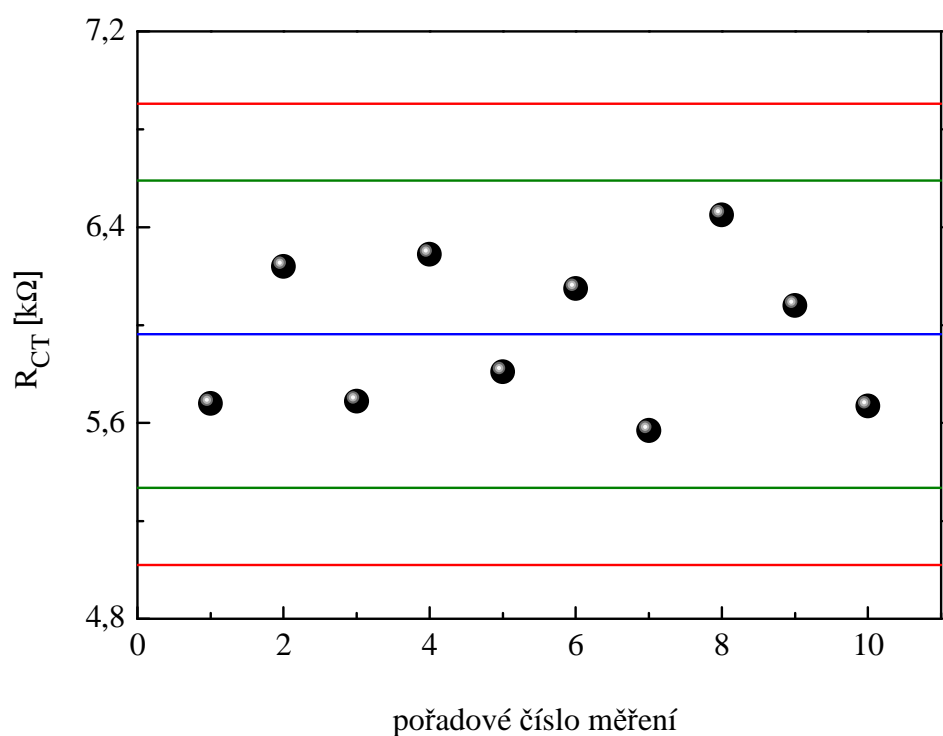
Obr. 3.1 Cyklický voltamogram získaný v roztoku redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) v PBS na DNA biosenzoru (červená křivka) připraveném akumulací z roztoku 10 mg/ml DNA při potenciálu 500 mV trvajícím 2 min a na nemodifikované GCE (černá křivka).



Obr. 3.2 Nyquistův graf získaný v roztoku redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) v PBS na DNA biosenzoru. Biosenzor připraven akumulací z roztoku 1 mg/ml DNA v PBS trvající 5 min. Potenciál akumulace E_{aac} : 100 mV – modré body ($R_{\text{CT}} = 2,6 \text{ k}\Omega$), 300 mV – červené body ($R_{\text{CT}} = 3,2 \text{ k}\Omega$), 500 mV – černé body ($R_{\text{CT}} = 4,4 \text{ k}\Omega$), Nemodifikovaná GCE – zelené body ($R_{\text{CT}} = 253 \Omega$).



Obr. 3.3 Nyquistův graf získaný v roztoku redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) v PBS na DNA biosenzoru. Biosenzor připraven akumulací z roztoku 10 mg/ml DNA v PBS při potenciálu 500 mV. Doba akumulace t_{acc} : 30 s – černé body ($R_{\text{CT}} = 2,9 \text{ k}\Omega$), 120 s – červené body ($R_{\text{CT}} = 5,8 \text{ k}\Omega$), 180 s – modré body ($R_{\text{CT}} = 7,7 \text{ k}\Omega$), 300 s – zelené body ($R_{\text{CT}} = 10,6 \text{ k}\Omega$). Nemodifikovaná GCE – oranžové body ($R_{\text{CT}} = 253 \Omega$).

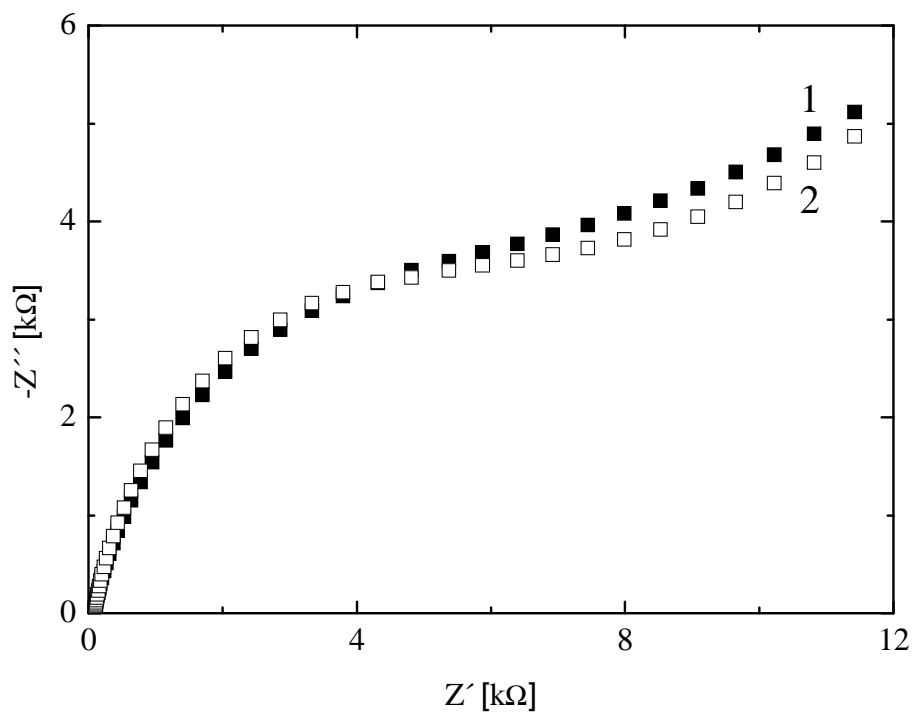


Obr. 3.4 Regulační diagram opakovatelnosti akumulace DNA. Biosenzor připraven akumulací z roztoku 10 mg/ml DNA v PBS při potenciálu 500 mV trvající 2 min. V regulačním diagramu je znázorněna průměrná hodnota (modrá křivka) a varovné (zelené křivky) (průměr $\pm 2\sigma$) a regulační (červené křivky) meze (průměr $\pm 3\sigma$). Relativní směrodatná odchylka 5,3 %.

3.2 Vyšetřování interakce NF s DNA

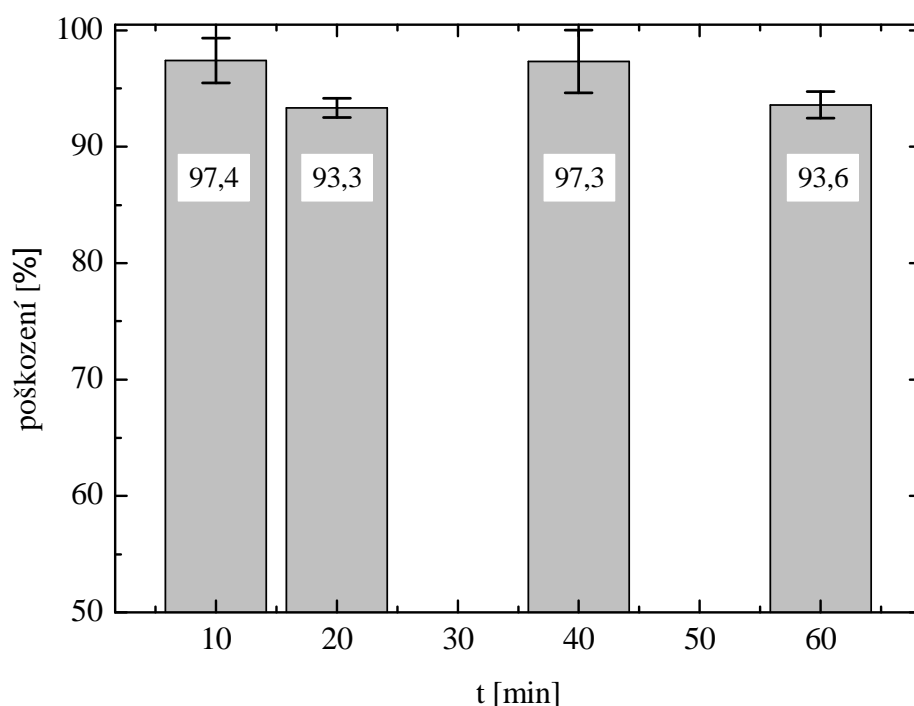
Byl prověřen vliv podílu ethanolu v roztoku (do obsahu 50 obj. % ethanolu v PBS) na DNA naakumulovanou na elektrodě. Pomocí CV a EIS nebylo v žádném z těchto roztoků pozorováno poškození DNA (při inkubační době 5 min). Díky tomu bylo umožněno zkoumání poškozování DNA z roztoku NF o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M, který je při této koncentraci rozpuštěný právě v 50 % ethanolickém roztoku v PBS.

Při detekci poškození DNA na elektrodě pomocí EIS nedošlo k významné změně chování biosenzoru před ani po pětiminutové inkubaci DNA biosenzoru v roztoku NF o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M (obr. 3.5). Z toho lze usoudit, že mezi DNA a NF nedochází k poškozující interakci, v jejímž důsledku by docházelo ke zlomům ve struktuře DNA, což by mělo za následek odpadávání DNA z povrchu elektrody. Pomocí EIS byl také zkoumán vliv koncentrace akumulárního roztoku DNA na pozorovatelnost poškozování DNA. Vysoká koncentrace by mohla způsobovat nadbytek DNA na elektrodě, přičemž by NF mezi jednotlivá vlákna DNA těžce pronikal a nemohl by tak způsobovat poškození DNA. Bylo akumulováno z roztoků o koncentracích DNA 10 mg/ml, 1 mg/ml a 0,1 mg/ml. Při žádné z uvedených koncentrací DNA nebylo pozorováno poškození DNA.



Obr. 3.5 Nyquistův graf získaný v roztoku redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v PBS na DNA biosenzoru před (1) a po 5 min inkubaci (2) v roztoku $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l NF v 50% ethanolu. Biosenzor připraven akumulací z roztoku 10 mg/ml DNA v PBS při potenciálu 500 mV trvající 2 min.

Dále bylo prověřováno poškození DNA při delších inkubacích DNA biosenzoru v roztoku NF o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ M v 0,1 M PBS. V časové závislosti do jedné hodiny není pomocí techniky EIS pozorovatelné prokazatelné poškození DNA, která by v důsledku jednořetězcových zlomů odpadávala z povrchu elektrody, a umožnila tak lepší přístup elektronů redoxního indikátoru k povrchu elektrody (obr. 3.6). Vzhledem k tomu, že v časové ose nebyl pozorován žádný sestupný trend, a vzhledem k velmi velké citlivosti techniky nemůže říci, že by DNA byla NF poškožována formou jednořetězcových zlomů ve struktuře.

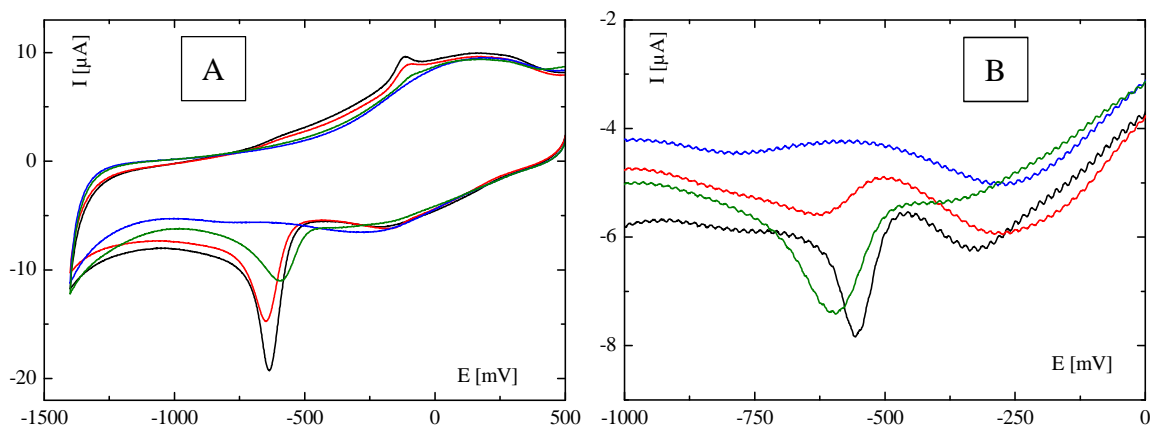


Obr. 3.6 Závislost poškození DNA naakumulované na elektrodě na čase inkubace DNA biosenzoru v roztoku $1 \cdot 10^{-5}$ M NF. Měřené technikou EIS. 100 % představuje DNA biosenzor před inkubací v roztoku NF. Biosenzor připraven akumulací z roztoku 10 mg/ml DNA v PBS při potenciálu 500 mV trvající 2 min.

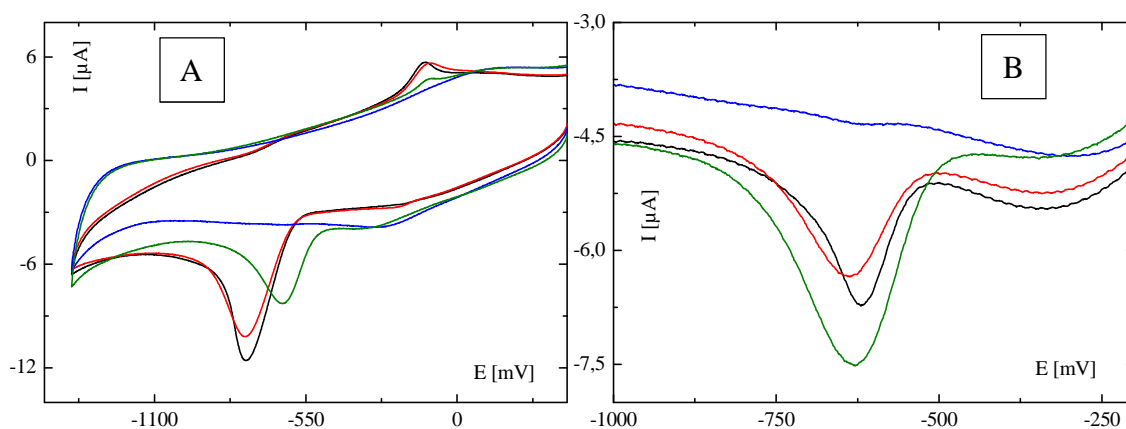
3.3 Elektrochemické chování NF na holé a modifikované elektrodě

Pomocí CV byla zjištěna interkalace NF do struktury DNA. Při měření na holé elektrodě v prostředí roztoku $1 \cdot 10^{-4}$ M NF v 50% ethanolu v 0,1 M PBS poskytuje NF dobře vyvinutý pík odpovídající redukci přítomné nitroskupiny (obr. 3.7A, černá křivka). Při měření na DNA biosenzoru se tento pík zmenšuje a posouvá se směrem k negativnějším potenciálům (obr. 3.7A, červená křivka). DNA naakumulovaná na elektrodě znesnadňuje přístup NF k povrchu elektrody, a tím i znesnadňuje jeho redukci. DNA biosenzor inkubovaný 5 min v roztoku $1 \cdot 10^{-4}$ M NF v 50% ethanolu v 0,1 M PBS a následně přenesený do 0,1 M PBS poskytuje zmenšený pík při pozitivnějším potenciálu (obr. 3.7A, zelená křivka). NF se interkaloval do struktury DNA za vzniku komplexu, který se redukuje snadněji než volný NF, což je chování typické pro DNA interkalátory⁴⁸. Obdobný experiment byl proveden v inkubačním roztoku NF bez přítomnosti ethanolu, protože ethanol by mohl ve zvýšeném množství (50 %) denarovat nativní DNA. Kvůli omezené rozpustnosti NF ve vodě musela být jeho koncentrace snížena na $1 \cdot 10^{-5}$ M. Ve vodných pufrch docházelo k posunu redukčního píku NF k negativnějším hodnotám potenciálu, což znamená, že NF je k DNA vázán elektrostatickými silami (obr. 3.7B, zelená křivka). Obsah ethanolu v roztoku rozhoduje o tom, zda se NF do struktury DNA interkaluje, či se ke kostře DNA váže elektrostatickými interakcemi.

Dále byl zkoumán vliv koncentrace roztoku PBS ($5 \cdot 10^{-3}$ M), a tedy iontové síly roztoku, na interkalaci NF do DNA (obr. 3.8). Iontová síla nemá na interkalaci téměř žádný vliv, elektrostatickou interakci ale ovlivňuje. Čím je iontová síla roztoku menší, tím je pík navázaného NF větší, protože se touto interakcí váže na kostru DNA více NF, což vyplývá z faktu, že na kostře DNA je mnohem více interakčních míst než uvnitř dvoušroubovice DNA⁴⁸.

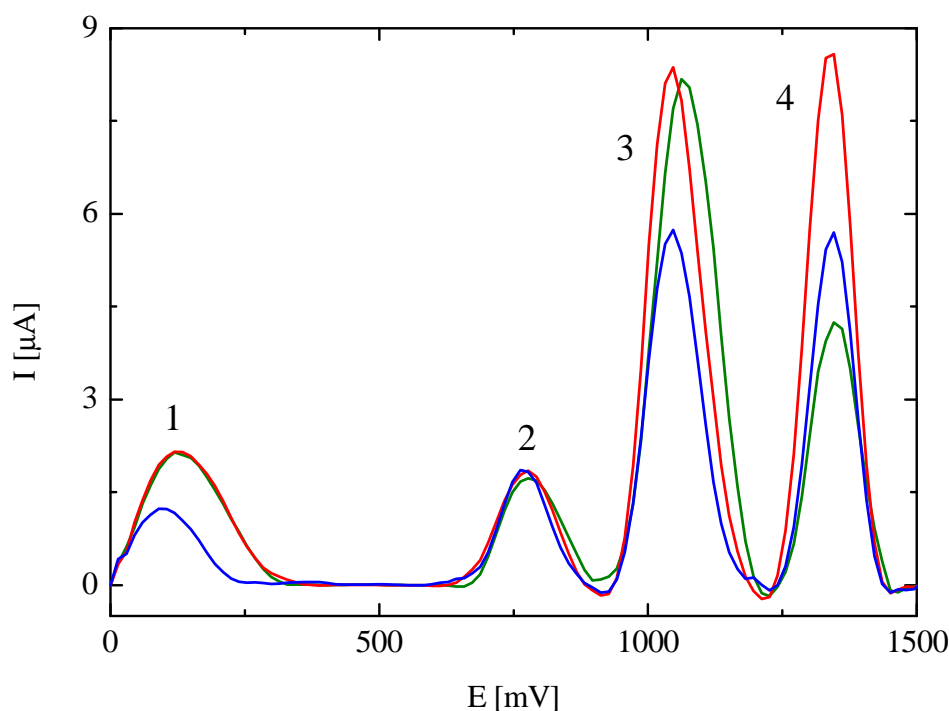


Obr. 3.7 CV voltamogramy změřené v roztoku $1 \cdot 10^{-4}$ M NF v 50% ethanolu v 0,1 M PBS (A) a $1 \cdot 10^{-5}$ M NF v 0,1 M PBS (B) na GCE (černá) a DNA/GCE (červená) a cyklické voltamogramy změřené v 0,1 M PBS před (modrá) a po pětiminutové inkubaci (zelená) DNA/GCE v roztoku $1 \cdot 10^{-4}$ M NF v 50% ethanolu v 0,1 M PBS (A) a v roztoku $1 \cdot 10^{-5}$ M NF v 0,1 M PBS (B). Pro přehlednost je na grafu vpravo zobrazen pouze výřez z dopředného skenu cyklického voltamogramu.

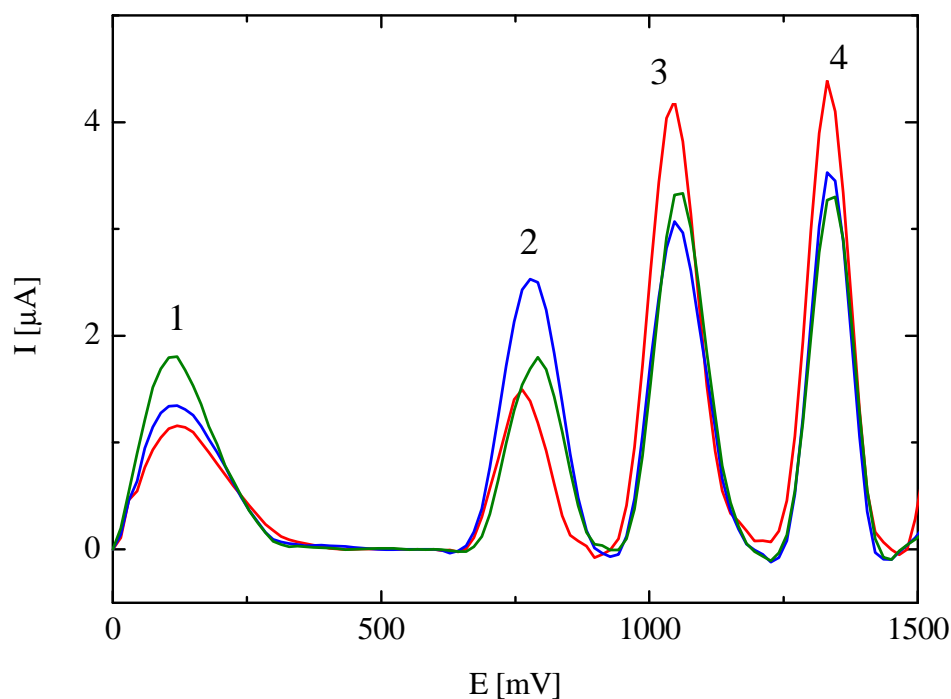


Obr. 3.8 CV voltamogramy změřené v roztoku $1 \cdot 10^{-4}$ M NF v 50% ethanolu v $5 \cdot 10^{-3}$ M PBS (A) a $1 \cdot 10^{-5}$ M NF v $5 \cdot 10^{-3}$ M PBS (B) na GCE (černá) a DNA/GCE (červená) a cyklické voltamogramy změřené v $5 \cdot 10^{-3}$ M PBS před (modrá) a po pětiminutové inkubaci (zelená) DNA/GCE v roztoku $1 \cdot 10^{-4}$ M NF v 50% ethanolu v $5 \cdot 10^{-3}$ M PBS (A) a v roztoku $1 \cdot 10^{-5}$ M NF v $5 \cdot 10^{-3}$ M PBS (B). Pro přehlednost je na grafu vpravo zobrazen pouze výřez z dopředného skenu cyklického voltamogramu.

Před samotným použitím techniky SWV pro vyšetřování poškození DNA musela být pro tuto techniku optimalizována příprava DNA biosenzoru. SWV voltamogramy naakumulované DNA poskytují čtyři píky. Při potenciálu 135 mV je pozorován pík pravděpodobně odpovídající preoxidaci grafitu samotné elektrody. Při potenciálu 760 mV je pozorovatelný pík kratších oligonukleotidů DNA, které jsou snadněji oxidovatelné. Guanosin je oxidován při potenciálu 1050 mV a adenosin 1330 mV. Jako optimální parametry akumulace byly zvoleny koncentrace akumulčního roztoku DNA 1 mg/ml (obr. 3.9) a doba akumulace 30 sekund (obr. 3.10). Příprava DNA biosenzoru za těchto podmínek poskytovala nejvyšší a přibližně stejně velké píky guanosinu a adenosinu. Pro pík guanosinu bylo dosaženo opakovatelnosti měření $s_r = 2,4 \%$ ($n = 10$) a pro pík adenosinu $s_r = 1,5 \%$ ($n = 10$). Delší časy akumulace poskytovaly nižší píky bází DNA, pravděpodobně z důvodu nadbytku DNA na elektrodě, kdy tento nadbytek brání snadné oxidaci bází. Potenciál akumulace byl ponechán 500 mV.

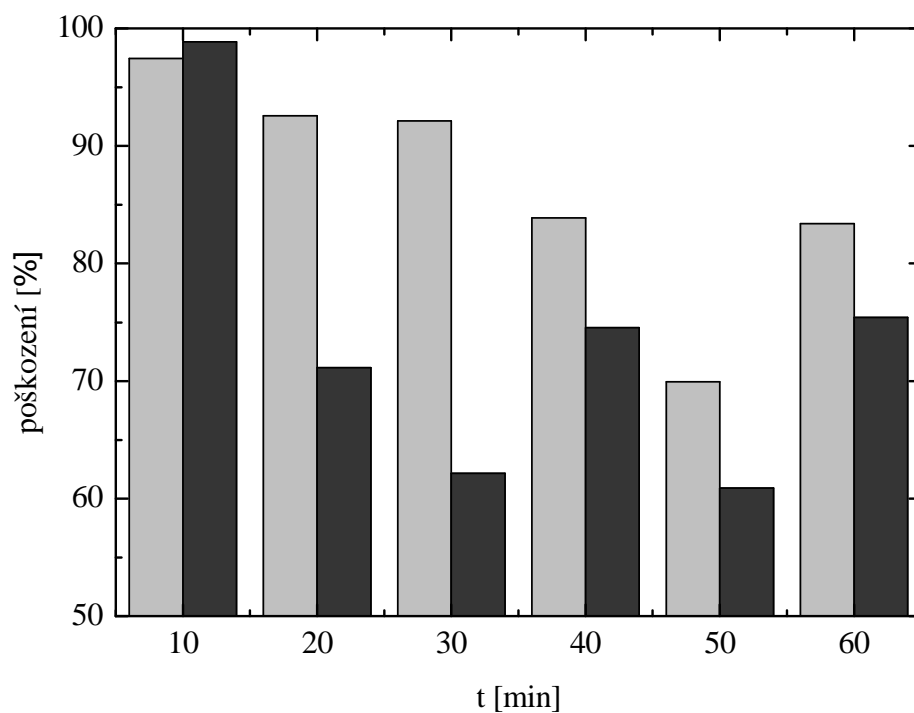


Obr. 3.9 SWV voltamogramy měřené v 0,1 M PBS. Biosenzor připraven akumulací při potenciálu 500 mV trvající 2 min. Koncentrace akumulčního roztoku DNA 10 mg/ml (zelená křivka), 1 mg/ml (červená křivka) a 0,1 mg/ml (modrá křivka) mg/ml. Křivka 1 – preoxidace grafitu elektrody, 2 – oxidace krátkých oligonukleotidů DNA, 3 – oxidace guanosinu, 4 – oxidace adenosinu.



Obr. 3.10 SWV voltamogramy měřené v 0,1 M PBS. Biosenzor připraven akumulací z roztoku 1 mg/ml DNA v PBS při potenciálu 500 mV. Doba akumulace 30 sekund (červená křivka), 2 minuty (modrá křivka) a 5 minut (zelená křivka). Křivka 1 – preoxidace grafitu elektrody, 2 – oxidace krátkých oligonukleotidů DNA, 3 – oxidace guanosinu, 4 – oxidace adenosinu.

Technikou SWV bylo pozorováno poškození DNA. Docházelo ke snížení guanosinového i adenosinového píku v důsledku interkalace NF do struktury DNA. Interkalace NF mezi páry bází DNA má za následek snížení počtu elektroaktivních míst podléhajících oxidaci. V časové závislosti inkubace DNA biosenzoru v roztoku $1 \cdot 10^{-5}$ M NF v PBS nebyl v poškození pozorován žádný pravidelný trend (obr. 3.11), avšak lze pozorovat, že obecně s rostoucím časem inkubace dochází k celkovému poklesu píků guanosinu a adenosinu.



Obr. 3.11 Závislost poškození DNA naakumulované na elektrodě na čase inkubace DNA biosenzoru v roztoku $1 \cdot 10^{-5}$ M NF. Měření technikou SWV. 100 % představuje DNA biosenzor před inkubací v roztoku NF. Biosenzor připraven akumulací z roztoku 1 mg/ml DNA v PBS při potenciálu 500 mV trvající 30 s.

3.4 Voltametrické stanovení NF na elektrodě ze skelného uhlíku

3.4.1 Optimalizace pH

Vliv pH na chování 2-nitrofluorenu byl sledován technikou DPV za použití roztoků BR pufru o daném pH smíchaném s ethanolem v poměru 1:1. Koncentrace NF v těchto roztocích činila $1 \cdot 10^{-4}$ M. Voltametrické chování studované látky bylo změřeno v rozsahu pH použitého pufru 1,0 až 13,0. Roztok o pH 1,0 byl připraven úpravou kyselé složky BR pufru přidávkem 0,1 M HCl; pro pH 13,0 byl použit 0,2 M NaOH (nejedná se o teoretické hodnoty pH, ale o hodnoty zjištěné pH-metrem). V závislosti na pH elektrolytu byly pozorovány dva nebo tři voltametrické píky. Pro účely práce byl vždy vyhodnocován pouze druhý pík, který odpovídá jednokrokové čtyřelektronové redukci NF na 2-hydroxylaminofluoren. V alkalickém prostředí ($\text{pH} \geq 8,0$) byla pozorována redukce NF dvoukrokovým mechanismem: v prvním kroku dochází k redukci NF za vzniku relativně stabilního nitroanion radikálu, ve druhém kroku dochází k tříelektronové redukci na 2-hydroxylaminofluoren. Vlna, která se objevuje před píkem NF v celém rozsahu pH odpovídá redukci 2-hydroxylaminofluorenu, který vznikl během opakovaných měření⁴⁷.

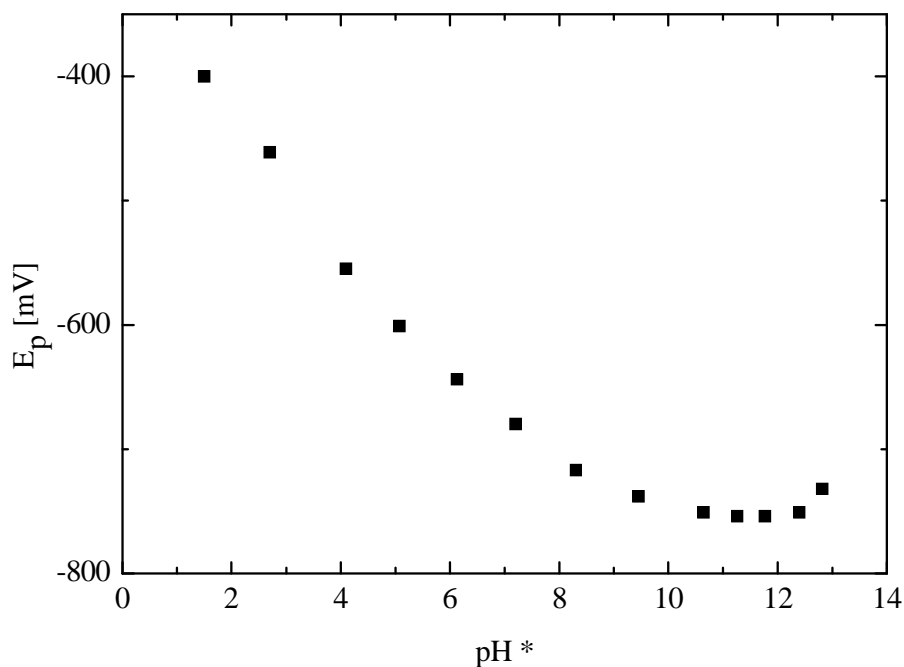
Pro techniku DPV bylo jako optimální zvoleno prostředí BR pufru o pH 7,0. V tomto prostředí pH poskytovala látka nejvyšší a nejlépe vyhodnotitelný pík. Naměřené hodnoty proudu píku I_p a potenciálu píku E_p pro daná pH jsou uvedeny v tab. 3.1. Na obrázcích 3.13 a 3.14 jsou znázorněny voltamogramy pro jednotlivé hodnoty pH. Pro přehlednost jsou v 3.13 obrázku znázorněny křivky pro lichá pH, a v obrázku 3.14 pro pH sudá. Závislost hodnoty E_p na pH je graficky znázorněna na obr. 3.12. S rostoucím pH lze pozorovat, že se potenciál píku posouvá k zápornějším hodnotám až do $\text{pH} = 10,0$, při $\text{pH} = 11,0$ zůstává stejné jako při $\text{pH} 10,0$, a pro $\text{pH} 12,0$ a $13,0$ se zase posouvá zpět ke kladnějším hodnotám.

Tab. 3.1

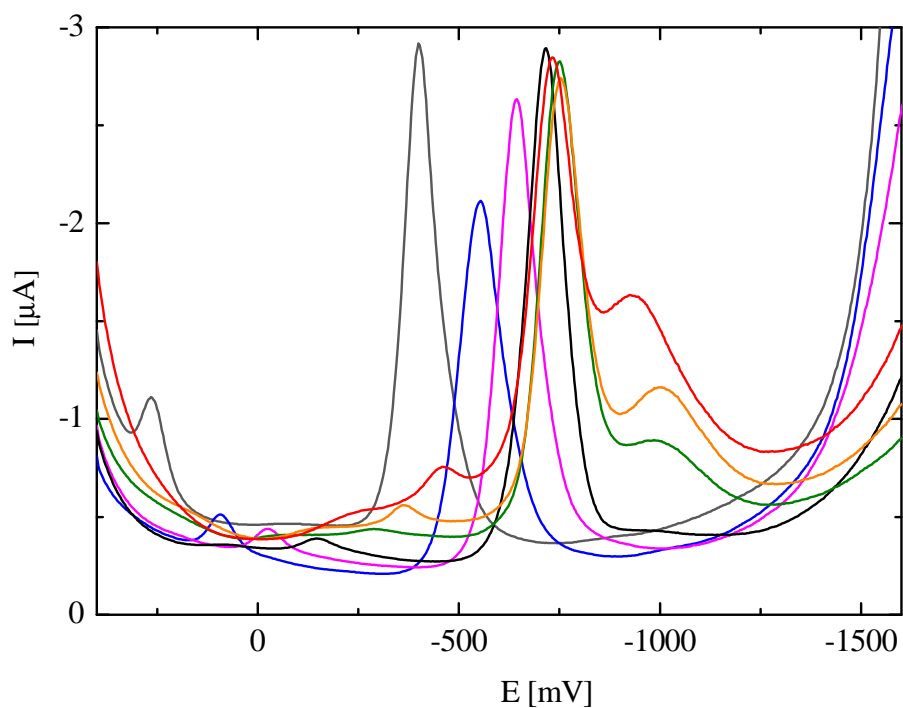
Hodnoty pH použitého BR pufru a pH* výsledné směsi pufr:ethanol v poměru 1:1 (v/v) a odpovídající hodnoty potenciálu píku E_p a proudu píku I_p .

pH	pH*	E_p [mV]	I_p [μ A]
1,0 ^a	1,5	-400	-2,50
2,0	2,7	-461	-2,13
3,0	4,1	-555	-1,89
4,0	5,1	-601	-1,99
5,0	6,1	-644	-2,35
6,0	7,2	-680	-2,43
7,0	8,1	-717	-2,61
8,0	9,5	-738	-2,33
9,0	10,6	-751	-2,38
10,0	11,3	-754	-2,25
11,0	11,8	-754	-2,19
12,0	12,4	-751	-2,24
13,0 ^b	12,8	-732	-2,13

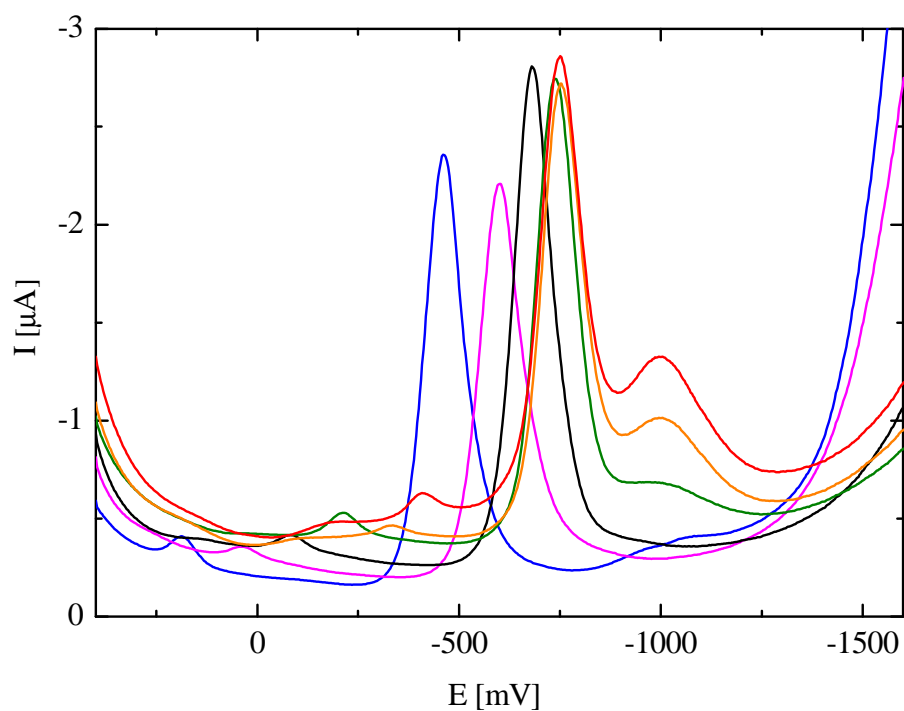
a – realizováno pomocí 0,1 M HCl, b – realizováno pomocí 0,2 M NaOH



Obr. 3.12 Závislost potenciálu E_p na výsledném pH* měřená technikou DPV na GCE v roztoku NF ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ M) v prostředí BR pufru o příslušném pH v poměru s ethanolem 1:1.



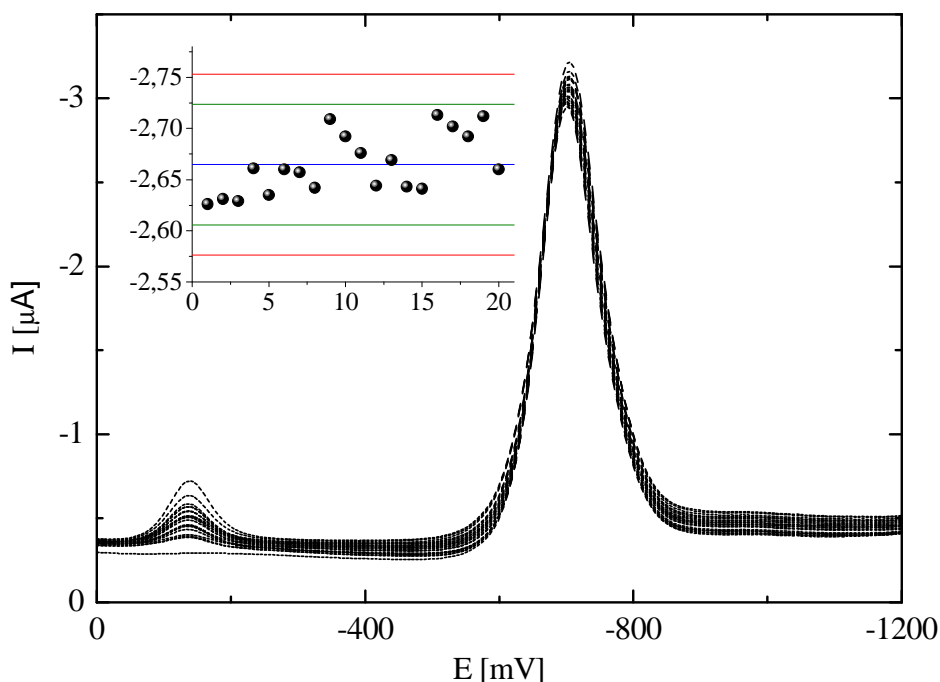
Obr. 3.13 DP voltamogramy NF ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ M) na GCE v prostředí BR pufr:ethanol v poměru 1:1 (v/v). Hodnoty pH BR pufru: 1,0 (šedá), 3,0 (modrá), 5,0 (růžová), 7,0 (černá), 9,0 (zelená), 11,0 (oranžová), 13,0 (červená).



Obr. 3.14 DP voltamogramy NF ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ M) na GCE v prostředí BR pufr:ethanol v poměru 1:1(v/v). Hodnoty pH BR pufru: 2,0 (modrá), 4,0 (růžová), 6,0 (černá), 8,0 (zelená), 10,0 (oranžová), 12,0 (červená).

3.4.2 Opakovatelnost měření

Při koncentraci NF $1 \cdot 10^{-4}$ M byla technikou DPV na GCE změřena opakovatelnost dvaceti po sobě jdoucích stanovení NF v rozsahu potenciálů od 400 do -2100 mV v prostředí BR pufru o pH 7 ve směsi s ethanolem v poměru 1:1 (v/v). Mezi každým měřením byl roztok po dobu cca 15 sekund probublán dusíkem. Na obr. 3.15 jsou pro přehlednost znázorněny voltamogramy v rozmezí potenciálů 0 až -1200 mV. Na vloženém obrázku je graf opakovatelnosti pro proud píků. Získaná hodnota s_r byla 1,1 %.



Obr. 3.15 DP voltamogramy NF ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ M) při měření opakovatelnosti 20 měření v prostředí BR pufru o pH 7 v poměru s ethanolem 1:1. Vložený graf představuje regulační diagram závislosti hodnoty I_p při opakovatelnosti stanovení na pořadovém čísle měření. V regulačním diagramu je znázorněna průměrná hodnota (modrá křivka) a varovné (zelené křivky) (průměr $\pm 2\sigma$) a regulační (červené křivky) meze (průměr $\pm 3\sigma$). Vyhodnocení bylo provedeno na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

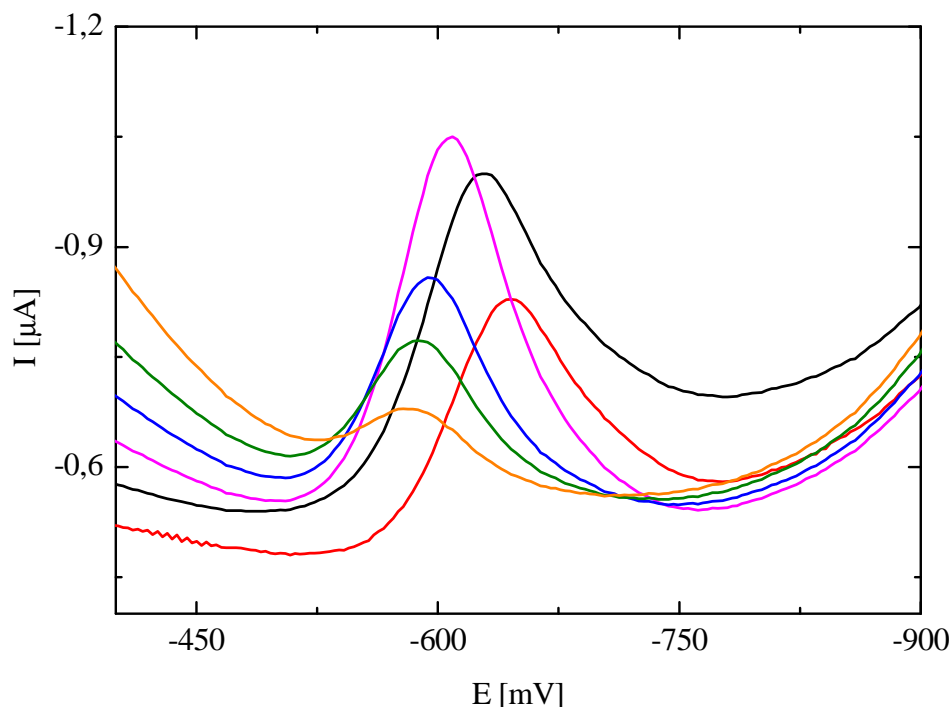
3.4.3 Koncentrační závislost

Byly proměřeny kalibrační závislosti NF na GCE technikou DPV. Bylo pracováno v prostředí optimálního pH 7,0. Při pokusu o vyhodnocování nejmenších koncentrací byl v BR pufru zpozorován pík, který interferoval s píkem samotného NF, a zabraňoval tak vyhodnocení těchto nejmenších koncentrací. Namísto BR pufru byl tedy dále používán fosfátový pufr o koncentraci 0,1 M a stejném pH. Kalibrační závislosti NF byly proměřeny v koncentračních rozmezích $(1 - 10) \cdot 10^{-7}$ M a $(1 - 10) \cdot 10^{-6}$ M. Byl studován vliv obsahu ethanolu a také vliv olešťování elektrody před jednotlivými změnami koncentrace v roztoku na kalibrační závislosti (obr. 3.17 – 3.24).

Při koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ M NF byla proměřena závislost výšky píku NF na poměru PBS a ethanolu v roztoku (obr. 3.16 a tab. 3.2). Nejvyšší proudovou odezvu vykazoval NF v roztoku s obsahem ethanolu 30 %. Pro obsah ethanolu 0, 30, 50 % byly změřené celé koncentrační závislosti ve výše uvedeném koncentračním rozmezí.

Tab. 3.2 Hodnoty obsahu ethanolu v roztoku PBS:ethanol a odpovídající hodnoty potenciálu píku E_p a proudu píku I_p NF ($c = 1 \cdot 10^{-5}$ M).

obsah ethanolu	E_p [mV]	I_p [nA]
50 %	-643	-296
40 %	-627	-397
30 %	-609	-510
20 %	-594	-288
10 %	-588	-180
0 %	-588	-69,1



Obr. 3.16 DP voltamogramy NF ($c = 1 \cdot 10^{-5}$ M) na neregenerované GCE v prostředí PBS:ethanol s obsahem ethanolu 50 % (červená), 40 % (černá), 30 % (růžová), 20 % (modrá), 10 % (zelená), 0 % (oranžová).

Nejlepších výsledků bylo dosaženo při měření v roztocích s obsahem 30 obj. % ethanolu. S leštěním elektrody mezi jednotlivými změnami koncentrace byla naměřena nejnižší koncentrace $1 \cdot 10^{-7}$ M NF a bylo dosaženo nejvyšší citlivosti. Proto byl tento roztok dále vybrán pro stanovování NF v modelových vzorcích písku.

Olešřování elektrody způsobuje změnu kalibrační závislosti z lineární na polynomickou druhého stupně. Polynomická závislost byla také získána v případě modelového vzorku písku. Pravděpodobně je to dáno adsorpcí látky na čerstvě obnažený povrch elektrody. Adsorpční proud spolu s příspěvkem difúzního proudu navýší proud celkový, čímž dochází ke zvýšení směrnice kalibrační závislosti, která ovšem není lineární.

Dosažené výsledky měření – rovnice kalibračních závislostí, hodnoty korelačních koeficientů a mezí stanovitelnosti – jsou shrnuty v tab. 3.3 a 3.4. Meze stanovitelnosti získané výpočtem dle IUPAC jsou v některých případech až o jeden koncentrační řád nižší než nejnižší reálně stanovitelná koncentrace. Tato skutečnost je zapříčiněna

způsobem výpočtu meze stanovitelnosti, který pracuje s opakovatelností stanovení jako hlavní mírou nejistoty signálu. Například při metodě využívající měření v roztoku 50% ethanolu bez leštění elektrody byla jako nejmenší koncentrace naměřena $4 \cdot 10^{-7}$ M, koncentrace $2 \cdot 10^{-7}$ M již stanovitelná nebyla. Vypočtená mez stanovitelnosti přesto vychází o řád nižší ($3 \cdot 10^{-8}$ M). Z tohoto důvodu byla nejmenší naměřená koncentrace zvolena jako experimentálně zjištěná mez stanovitelnosti.

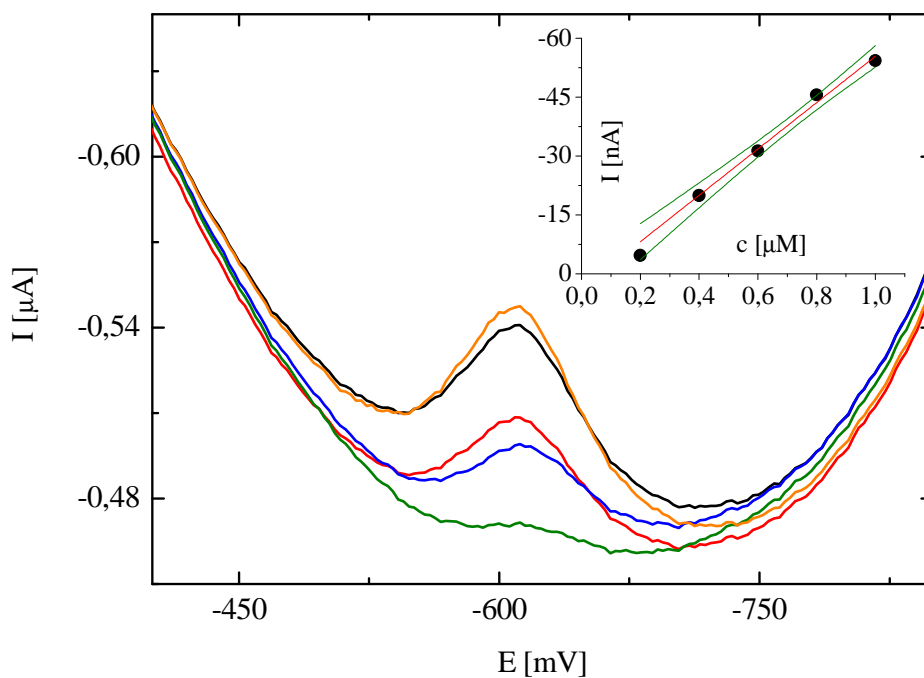
Tab. 3.3 Parametry kalibračních přímek pro stanovení NF v prostředí PBS pufru s proměnným obsahem ethanolu a v závislosti na ošetřování elektrody. Parametry kalibrační přímky po extrakci NF z modelového vzorku písku. Měřeno pomocí DPV na GCE.

Obsah ethanolu, ošetřování elektrody	c [M]	Rovnice kalibrační závislosti	R ²
30 %, bez leštění	$(0,2-10) \cdot 10^{-6}$	$I_p = -66,3 c + 7,78^a$	0,998
30 %, leštění	$(0,1-10) \cdot 10^{-6}$	$I_p = -2,06 c^2 - 86,6 c + 22,0^a$	0,994
50 %, bez leštění	$(0,4-10) \cdot 10^{-6}$	$I_p = -24,2 c + 4,60^a$	0,996
50 %, leštění	$(0,4-10) \cdot 10^{-6}$	$I_p = -0,476 c^2 - 25,3 c + 3,54^a$	0,996
písek 30 %, leštění	$(0,1-10) \cdot 10^{-6}$	$I_p = -40,2 c^2 - 379 c + 21,3^b$	0,999

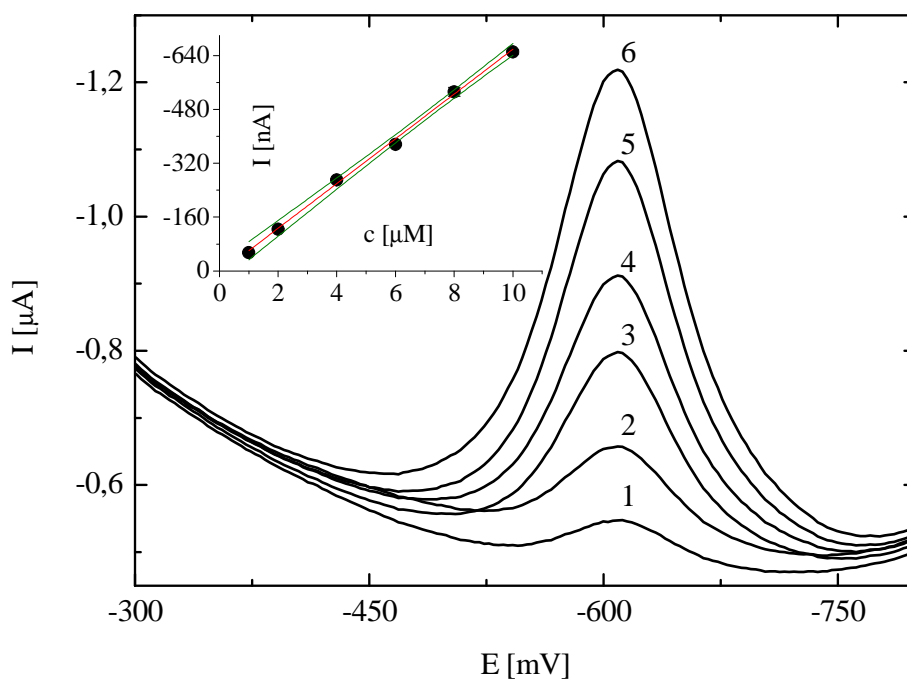
^a I_p [nA], c² [μM²], c [μM], ^b I_p [nA], c² [μg²/g²], c [μg/g]

Tab. 3.4 Mez stanovitelnosti experimentálně zjištěná a dle IUPAC.

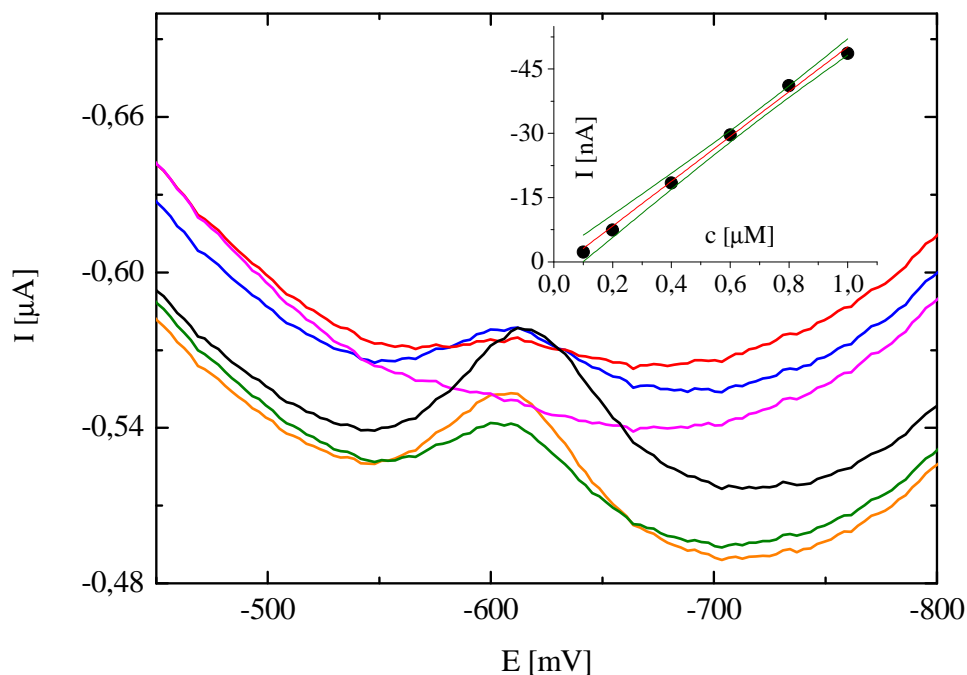
Obsah EtOH, ošetřování elektrody	Nejnižší naměřitelná koncentrace [μM]	L _Q dle IUPAC [μM]
30 %, bez leštění	0,2	0,08
30 %, leštění	0,1	0,04
50 %, bez leštění	0,4	0,03
50 %, leštění	0,4	0,16
písek 30 %, leštění	0,1	0,04



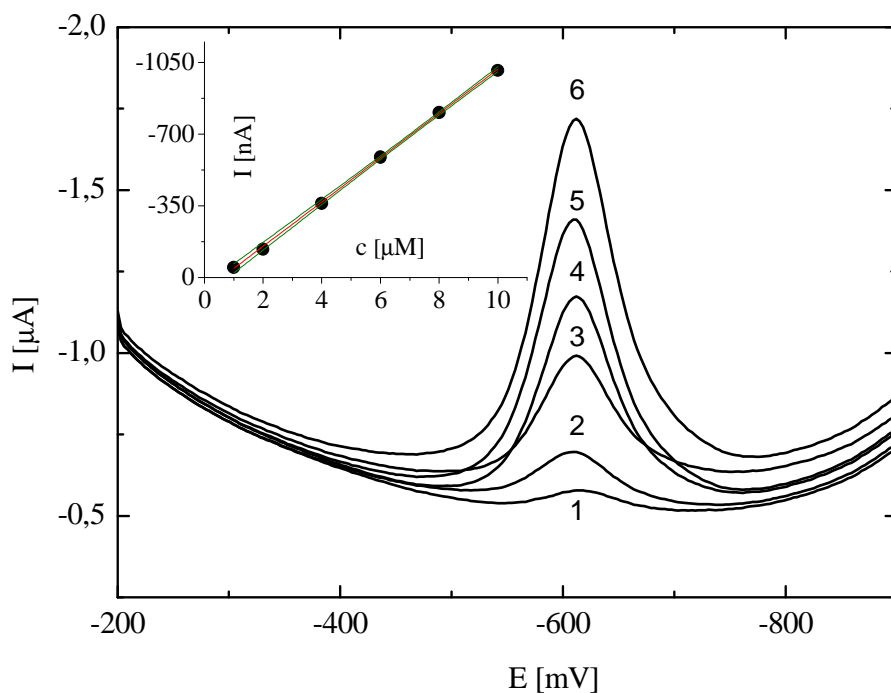
Obr. 3.17 DP voltamogramy NF na neregenerované GCE v prostředí PBS pufru ve směsi s ethanolem v poměru 7:3 (v/v). Koncentrace NF: 0,2 (zelená), 0,4 (modrá), 0,6 (červená), 0,8 (černá), 1 (oranžová) μM . Příslušná kalibrační závislost je zobrazena na vloženém grafu, konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



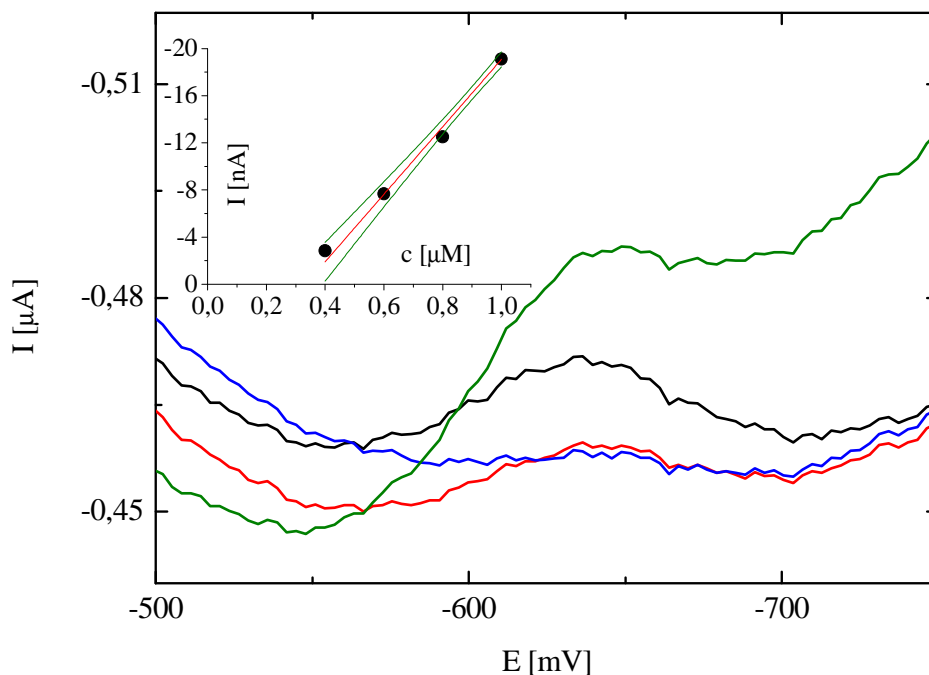
Obr. 3.18 DP voltamogramy NF na neregenerované GCE v prostředí PBS pufru ve směsi s ethanolem v poměru 7:3 (v/v). Koncentrace NF 1 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5), 10 (6) μM . Příslušná kalibrační závislost je zobrazena na vloženém grafu, konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



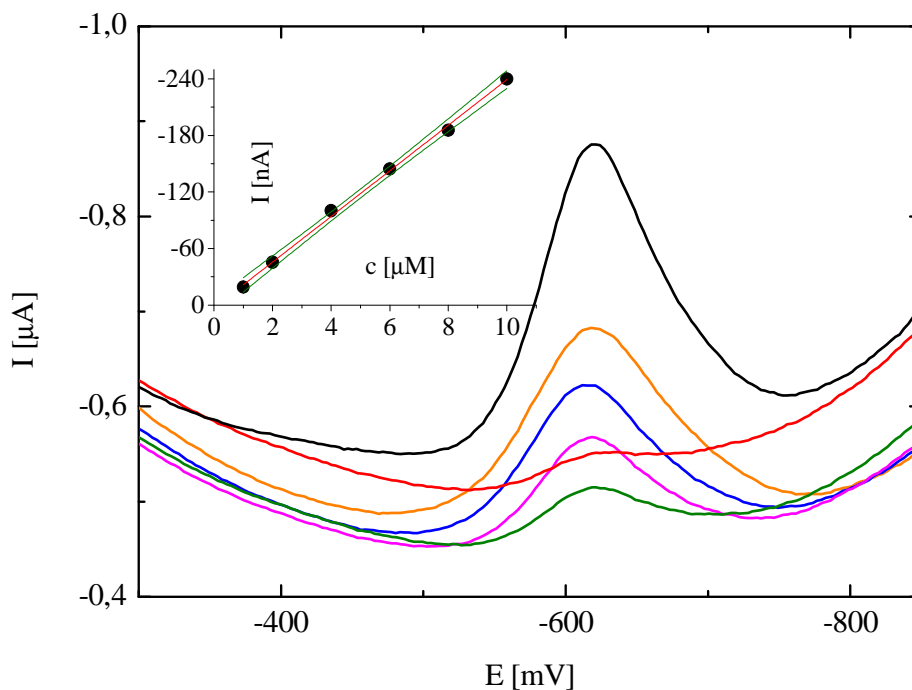
Obr. 3.19 DP voltamogramy NF na GCE v prostředí PBS pufru ve směsi s ethanolem v poměru 7:3 (v/v). Koncentrace NF 0,1 (růžová), 0,2 (červená), 0,4 (modrá), 0,6 (zelená), 0,8 (oranžová), 1 (černá) μM . Elektroda byla před každou změnou koncentrace oleštěna. Příslušná kalibrační závislost je zobrazena na vloženém grafu, konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



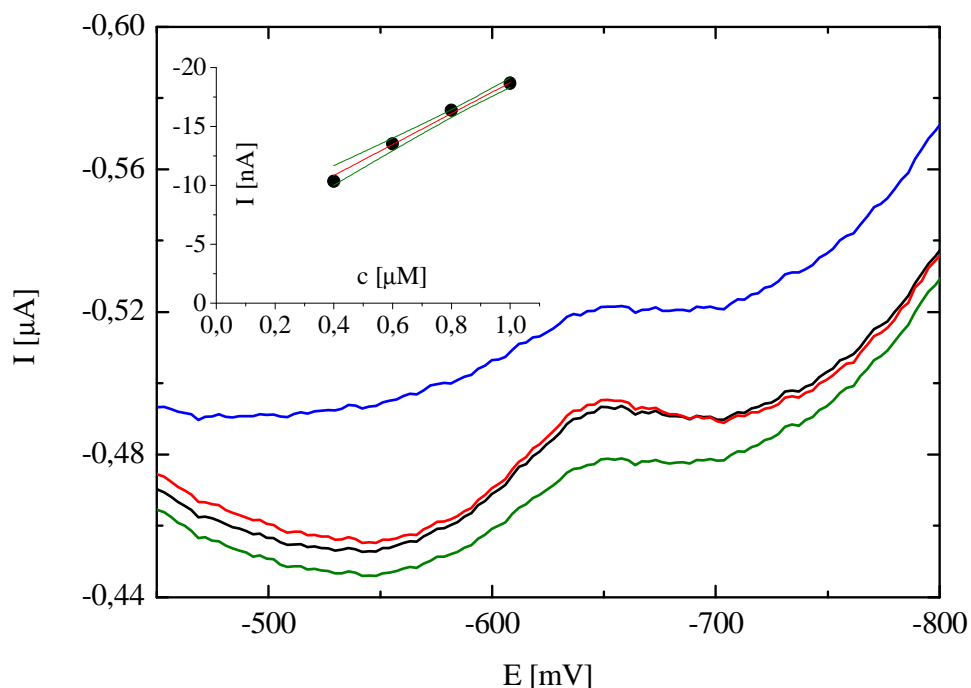
Obr. 3.20 DP voltamogramy NF na GCE v prostředí PBS pufru ve směsi s ethanolem v poměru 7:3 (v/v). Koncentrace NF 1 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5), 10 (6) μM . Elektroda byla před každou změnou koncentrace oleštěna. Příslušná kalibrační závislost je zobrazena na vloženém grafu, konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



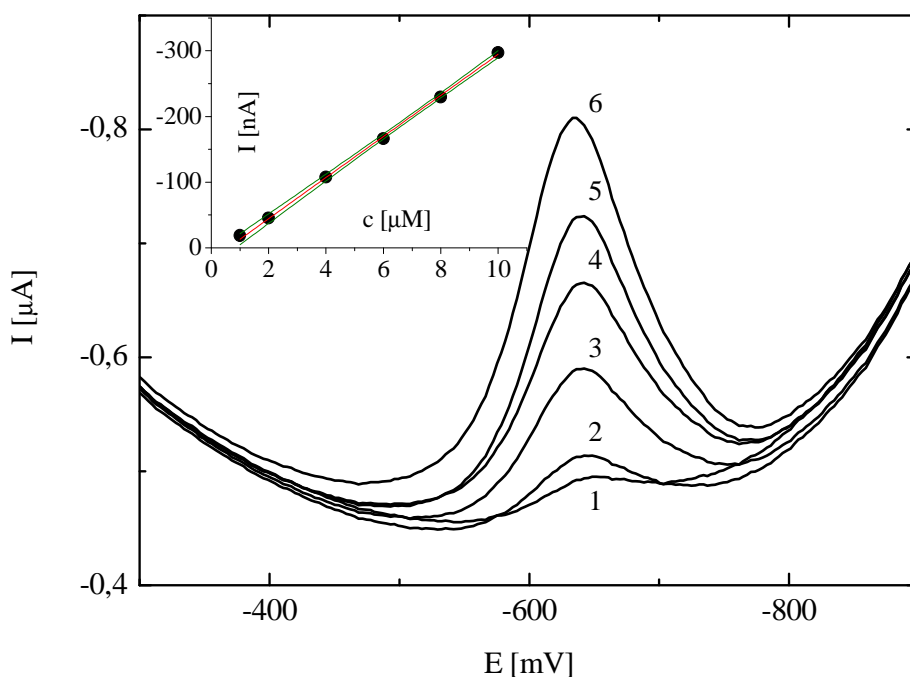
Obr. 3.21 DP voltamogramy NF na neregenerované GCE v prostředí PBS pufru ve směsi s ethanolem v poměru 1:1 (v/v). Koncentrace NF: 0,4 (modrá), 0,6 (červená), 0,8 (černá), 1 (zelená) μM . Příslušná kalibrační závislost je zobrazena na vloženém grafu, konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



Obr. 3.22 DP voltamogramy NF na neregenerované GCE v prostředí PBS pufru ve směsi s ethanolem v poměru 1:1 (v/v). Koncentrace NF 1 (červená), 2 (zelená), 4 (růžová), 6 (modrá), 8 (oranžová), 10 (černá) μM . Příslušná kalibrační závislost je zobrazena na vloženém grafu, konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

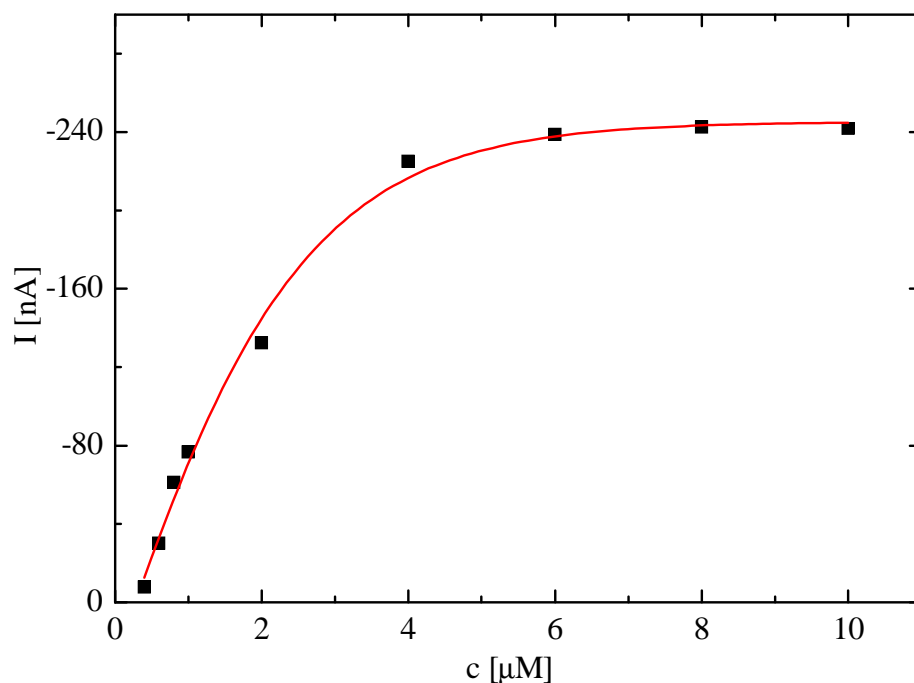


Obr. 3.23 DP voltamogramy NF na GCE v prostředí PBS pufru ve směsi s ethanolem v poměru 1:1 (v/v). Koncentrace 2 NF: 0,4 (modrá), 0,6 (zelená), 0,8 (černá), 1 (červená) μM . Elektroda byla před každou změnou koncentrace oleštěna. Příslušná kalibrační závislost je zobrazena na vloženém grafu, konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



Obr. 3.24 DP voltamogramy NF na GCE v prostředí PBS pufru ve směsi s ethanolem v poměru 1:1 (v/v). Koncentrace NF 1 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5), 10 (6) μM . Elektroda byla před každou změnou koncentrace oleštěna. Příslušná kalibrační závislost je zobrazena na vloženém grafu, konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Kalibrační závislost v samotném pufru PBS byla měřena z toho důvodu, abychom zjistili, zda jsme schopni stanovovat NF v modelových vzorcích vody. Lineární kalibrační závislosti bylo dosaženo pouze v koncentračním rozmezí $4 - 8 \cdot 10^{-7}$ M, což je pro stanovování NF v modelových vzorcích vody nedostačující. Z kalibrační závislosti celého rozsahu koncentrací (obr. 3.25) je patrné, že v řádech 10^{-6} M dochází k výraznému zakřivení závislosti, která se poté stane konstantní. Tato ztráta citlivosti metody je dána omezenou rozpustností NF ve vodě. Měření bylo vyzkoušeno za podmínek regenerace elektrody olešťováním před každou změnou koncentrace a také bez regenerace, ale oběma postupy byly získány shodné výsledky. Pro stanovování NF ve vodných modelových vzorcích se tedy nepodařilo vyvinout metodu na stanovení.



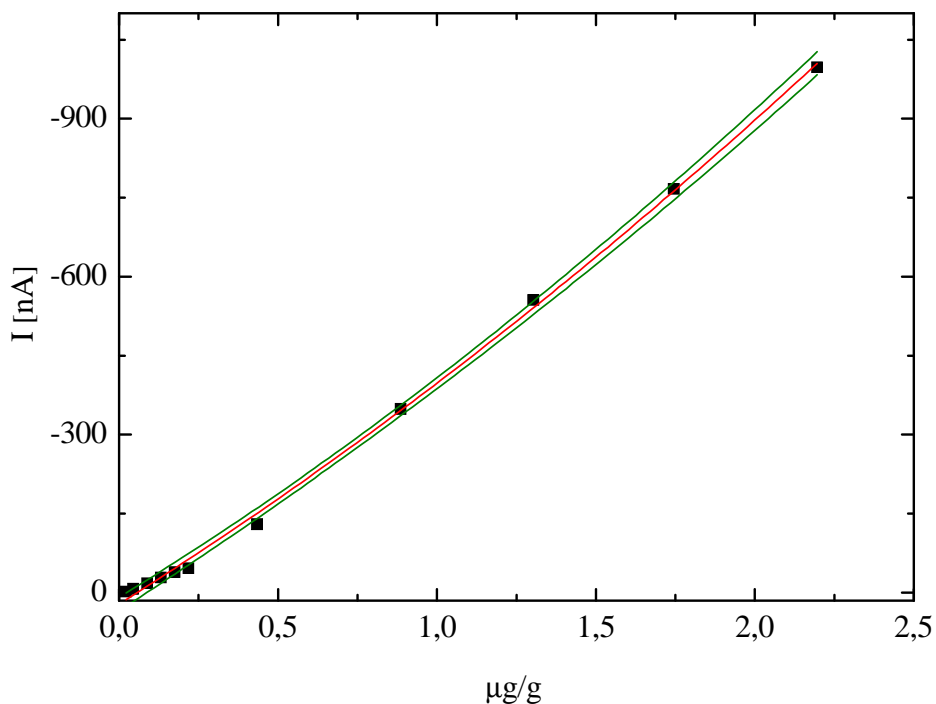
Obr. 3.25 Kalibrační závislost (0,1 – 10 μM) NF na GCE v prostředí PBS pufru. Měřeno metodou DPV. Elektroda byla před každou změnou koncentrace olešťena.

3.4.4 Modelový vzorek

Jako pevná reálná matrice byl vybrán písek s velikostí částic menších než 1 mm a byla zjišťována výtěžnost kapalinové extrakce v koncentračních rozmezích $(1 - 10) \cdot 10^{-7}$ a $(1 - 10) \cdot 10^{-6}$ M měřené technikou DPV na GCE ošetřované olešťováním před měřením jednotlivých koncentrací. Jelikož je výše popsána metoda stanovení NF na GCE prováděna v roztoku obsahujícím ethanol, byl ethanol použit také jako extrakční činidlo. Výtěžnost extrakce pro jednotlivé koncentrace je uvedena v tab. 3.5. Obr. 3.26 ukazuje polynomickou závislost kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí, parametry jsou uvedeny v tab. 3.3 (viz. výše, str. 44), koncentrace byla přepočtena na jednotky $\mu\text{g/g}$ za pomoci hustoty pro 30% vodný roztok ethanolu⁶⁰. Tyto výsledky dokazují praktickou využitelnost vyvinuté metody pro stanovení NF pomocí GCE v pevném modelovém vzorku písku.

Tab. 3.5 Hodnoty spikované koncentrace do modelového vzorku písku, zpětně vyextrahované koncentrace a procentuální výtěžnosti extrakce.

Přidaná koncentrace [μM]	Naměřená koncentrace [μM]	Výtěžnost extrakce [%]
0,1	0,096	96,38
0,2	0,192	96,02
0,4	0,385	96,19
0,6	0,577	96,10
0,8	0,760	95,04
1	0,952	95,22
2	1,891	94,53
4	3,860	96,49
6	5,676	94,60
8	7,760	95,04
10	9,568	95,68



Obr. 3.26 Kalibrační závislost NF po extrakci z modelového vzorku písku. Měřeno v prostředí PBS ve směsi s ethanolem v poměru 7:3 (v/v) na GCE. Elektroda byla před každou změnou koncentrace oleštěna. Konfidenční pásy jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

4. Závěr

Tato práce se zabývá vývojem jednoduchého elektrochemického DNA biosenzoru, realizovaného pomocí elektrody ze skelného uhlíku (GCE) a nízkomolekulární DNA z lososích spermií. Tento biosenzor je následně využit pro detekci poškození DNA genotoxickým 2-nitrofluorenem (NF). Pro detekci poškození DNA způsobeného touto látkou bylo využito tří elektrochemických technik – elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS), cyklické voltametrie (CV) a square-wave voltametrie. Za pomoci EIS byla sledována změna odporu přenosu náboje (R_{CT}), který nám podává informaci o změnách na povrchu elektrody. Poškození DNA ve formě jednořetězcových zlomů, v důsledku kterých by DNA z povrchu elektrody odpadávala, by bylo pozorováno zmenšením R_{CT} oproti DNA biosenzoru před inkubací v roztoku NF. Pokles R_{CT} po inkubaci nebyl ovšem v našem případě pozorován v tak velké míře, abychom mohli s jistotou říci, že 2-nitrofluoren poškozuje DNA zlomy v její struktuře. Naopak technikami CV a SWV byla prokázána interkalace NF do struktury DNA. NF se chová jako DNA interkalátor, interkaluje do struktury DNA za vzniku komplexu, který se redukuje snadněji než volný NF. Interkalace má za následek snížení počtu elektroaktivních míst schopných podléhat oxidaci, což bylo pozorováno za pomoci SWV poklesem výšky píku guanosinu ($I_{p,G}$) a adenosinu ($I_{p,A}$).

Z důvodu prokázané nebezpečnosti NF pro DNA bylo dále studováno elektrochemické chování NF za účelem vyvinout novou, jednoduchou a citlivou elektrochemickou metodu pro jeho stanovení v reálných vzorcích. Byla použita technika diferenční pulsní voltametrie (DPV). Byla proměřena pH závislost v Brittonově-Robinsonově pufru a jako optimální pH bylo zvoleno pH 7,0. Při tomto pH pufru ve směsi s ethanolem v poměru 1:1 (v/v) byla testována opakovatelnost měření, která měla hodnotu 1,1 % ($n = 20$). Z důvodu nečistoty v BR pufru, která znemožňovala vyhodnocování nejmenších koncentrací NF, byl dále používán fosfátový pufr o stejném pH. Byla změřena závislost výšky píku NF na obsahu ethanolu v roztoku. Nejvyšší pík poskytoval NF v roztoku obsahujícím 30 obj. % ethanolu. Byly proměřeny celé rozsahy koncentrací pro podíly 0, 30 a 50 obj. % ethanolu za podmínek regenerace elektrody oleštěním o aluminový prášek a utěrku z mikrovlákna před každou změnou koncentrace roztoku a poté bez regenerace během celého měření.

Pro stanovení NF za použití techniky DPV byl určen PBS pufr o $\text{pH} = 7,0$, ve směsi s ethanolem v poměru 7:3 (v/v). Před každým měřením by GC elektroda měla být ošetřena oleštěním o aluminový prášek na plstěné podložce a o utěrku z mikrovlákna (utěrka na čištění brýlí). Mez stanovitelnosti (L_Q) za těchto podmínek byla $1 \cdot 10^{-7}$ M. Tato metoda může být aplikována na stanovení NF v pevných vzorcích. Použitelnost metody byla ověřena na modelovém vzorku. Byla provedena extrakce z reálné matrice písku. Extrakce byla provedena v celém kalibračním rozmezí a bylo dosaženo výtěžnosti 94,53 – 96,49 %.. Vyvinutá metoda stanovení vyžaduje z důvodu nízké rozpustnosti NF ve vodě přítomnost organického rozpouštědla (ethanolu). Při analýze v elektrolytech obsahujících pouze vodu je kalibrační závislost lineární pouze v koncentračním rozmezí $4 - 8 \cdot 10^{-7}$ M, což je nedostatečné pro aplikovatelnost metody na reálné vzorky.

5. Literatura

- (1) Holoubek, I.: *Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) v prostředí*; Český ekologický ústav a Odbor ekologických rizik a monitoringu MŽP ČR: Praha, 1996; Vol. 1.
- (2) Kocourek, V.: *Nitrované polycyklické uhlovodíky (nitro-PAH): environmentální karcinogeny*; Vědecký výbor fytosanitárního a životního prostředí: Praha, 2004.
- (3) Moller, L. In-vivo metabolism and genotoxic effects of nitrated polycyclic aromatic-hydrocarbons. *Environ. Health Perspect.* **1994**, *102*, 139-146.
- (4) Ueda, O.; Kitamura, S.; Kubo, R.; Yano, Y.; Kanzaki, Y.; Fujimoto, T.; Tatsumi, K.; Ohta, S. Metabolism of 2-nitrofluorene, 2-aminofluorene and 2-acylaminofluorenes in rat and dog and the role of intestinal bacteria. *Xenobiotica* **2001**, *31*, 33-49.
- (5) Ueda, O.; Kitamura, S.; Huruse, Y.; Saito, T.; Kanzaki, Y.; Yano, Y.; Tatsumi, K.; Ohta, S. Metabolism of 2-nitrofluorene, an environmental pollutant, and 2-acetylaminofluorene in fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **2001**, *66*, 371-378.
- (6) Moller, L.; Gustafsson, J. A. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of 2-nitrofluorene and its derivatives. *Biological Mass Spectrometry* **196**, *13*, 681-688.
- (7) Moller, L.; Rafter, J.; Gustafsson, J. A. Metabolism of the carcinogenic air pollutant 2-nitrofluorene in the rat. *Carcinogenesis* **1987**, *8*, 637-645.
- (8) Moller, L.; Zeisig, M. DNA adduct formation after oral administration of 2-nitrofluorene and N-acetyl-2-aminofluorene, analyzed by 32P-TLC and 32P-HPLC. *Carcinogenesis* **1993**, *14*, 53-59.
- (9) Cui, X.-S.; Eriksson, L. C.; Möller, L. Formation and persistence of DNA adducts during and after a long-term administration of 2-nitrofluorene. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **1999**, *442*, 9-18.
- (10) Stavkova, K. Působení genotoxického 2-nitrofluorenu a jeho metabolitů na DNA in vivo a možnosti výzkumu tohoto působení pomocí elektrochemických DNA biosenzorů in vitro. (Bakalářská práce). Univerzita Karlova v Praze, 2012.
- (11) Palecek, E.; Fojta, M.; Tomschik, M.; Wang, J. Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. *Biosensors and Bioelectronics* **1998**, *13*, 621-628.

- (12) Shen, H.; Shao, X.; Xu, H.; Li, J.; Pan, S. In vitro study of DNA interaction with trichlorobenzenes by spectroscopic and voltammetric techniques. *International Journal of Electrochemical Science* **2011**, *6*, 532-547.
- (13) Wang, Q.; Gao, F.; Yuan, X.; Li, W.; Liu, A.; Jiao, K. Electrochemical studies on the binding of a carcinogenic anthraquinone dye, Purpurin (C.I. 58 205) with DNA. *Dyes and Pigments* **2010**, *84*, 213-217.
- (14) Wang, Y. X.; Ni, Y. N.; Kokot, S. Investigation of the interaction of carbofuran and DNA by voltammetry and fluorescence with the aid of chemometrics. *Chinese Chemical Letters* **2010**, *21*, 963-967.
- (15) Hajian, R.; Ekhlesi, E.; Daneshvar, R. Spectroscopic and electrochemical studies on the interaction of epirubicin with fish sperm DNA. *E-Journal of Chemistry* **2012**, *9*, 1587-1598.
- (16) Hajian, R.; Tavakol, M. Interaction of anticancer drug methotrexate with DS-DNA analyzed by spectroscopic and electrochemical methods. *E-Journal of Chemistry* **2012**, *9*, 471-480.
- (17) Radi, A.; Wahdan, T.; Anwar, Z.; Mostafa, H. Electrochemical and spectroscopic studies on the interaction of gatifloxacin, moxifloxacin and sparfloxacin with DNA and their analytical applications. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 2665-2671.
- (18) Bagni, G.; Osella, D.; Sturchio, E.; Mascini, M. Deoxyribonucleic acid (DNA) biosensors for environmental risk assessment and drug studies. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *573-574*, 81-89.
- (19) Arotiba, O.; Owino, J.; Songa, E.; Hendricks, N.; Waryo, T.; Jahed, N.; Baker, P.; Iwuoha, E. An electrochemical DNA biosensor developed on a nanocomposite platform of gold and poly(propyleneimine) dendrimer. *Sensors* **2008**, *8*, 6791-6809.
- (20) Skladal, P.: *Biosenzory*; Masarykova univerzita v Brně: Brno, 2002.
- (21) Morris, I. D.; Ilott, S.; Dixon, L.; Brison, D. R. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction* **2002**, *17*, 990-998.
- (22) Lee, R. F.; Steinert, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **2003**, *544*, 43-64.

- (23) Hook, S. E.; Lee, R. F. Genotoxicant induced DNA damage and repair in early and late developmental stages of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* embryo as measured by the comet assay. *Aquatic Toxicology* **2004**, *66*, 1-14.
- (24) Gao, X.; Stassinopoulos, A.; Gu, J.; Goldberg, I. H. NMR studies of the post-activated neocarzinostatin chromophore-DNA complex. Conformational changes induced in drug and DNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1995**, *3*, 795-809.
- (25) Sandstrom, K.; Warmlander, S.; Leijon, M.; Graslund, A. ¹H NMR studies of selective interactions of norfloxacin with double-stranded DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *304*, 55-59.
- (26) Barek, J.; Peckova, K.; Vyskocil, V. Kam směřují moderní elektroanalytické metody 50 let po udělení Nobelovy ceny za polarografii. *Chemické listy* **2009**, *103*, 889-893.
- (27) Lucarelli, F.; Palchetti, I.; Marrazza, G.; Mascini, M. Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples. *Talanta* **2002**, *56*, 949-957.
- (28) Rauf, S.; Gooding, J. J.; Akhtar, K.; Ghauri, M. A.; Rahman, M.; Anwar, M. A.; Khalid, A. M. Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, *37*, 205-217.
- (29) Palecek, E.; Wang, J.; Scheller, F.: *Electrochemistry of nucleic acids and proteins*; Elsevier: Amsterdam, 2005.
- (30) Abreu, F. C.; Goulart, M. O. F.; Oliveira Brett, A. M. Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2002**, *17*, 913-919.
- (31) Wang, J.; Ozsoz, M.; Cai, X. H.; Rivas, G.; Shiraishi, H.; Grant, D. H.; Chicharro, M.; Fernandes, J.; Palecek, E. Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1998**, *45*, 33-40.
- (32) Fojta, M. Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1449-1463.
- (33) Vacek, J.; Havran, L.; Fojta, M. Electrochemical analysis of DNA damage, hybridization and interactions. *Chemické listy* **2011**, *105*, 15-26.

- (34) Palecek, E. Fifty years of nucleic acid electrochemistry. *Electroanalysis* **2009**, *21*, 239-251.
- (35) Jelen, F.; Fojta, M.; Paleček, E. Voltammetry of native double-stranded, denatured and degraded DNAs. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1997**, *427*, 49-56.
- (36) Jelen, F.; Palecek, E. Chemically reversible electroreduction of guanine in a polynucleotide chain. *Biophysical Chemistry* **1986**, *24*, 285-290.
- (37) Vyskocil, V.; Navratil, T.; Polaskova, P.; Barek, J. Voltammetric determination of genotoxic nitro derivatives of fluorene and 9-fluorenone using a mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 2034-2042.
- (38) Vyskocil, V.; Navratil, T.; Danhel, A.; Dedik, J.; Krejцова, Z.; Skvorova, L.; Tvrdikova, J.; Barek, J. Voltammetric determination of selected nitro compounds at a polished silver solid amalgam composite electrode. *Electroanalysis* **2011**, *23*, 129-139.
- (39) Vyskocil, V.; Barek, J. Mercury electrodes-possibilities and limitations in environmental electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2009**, *39*, 173-188.
- (40) Prchal, V.; Vyskocil, V.; Danhel, A.; Barek, J.; Wang, J. The use of a hanging mercury drop electrode modified with octane-1-thiol in voltammetric analysis of genotoxic environmental pollutants. *Chemické listy* **2011**, *105*, 217-224.
- (41) Yosypchuk, O.; Karasek, J.; Vyskocil, V.; Barek, J.; Peckova, K. The use of silver solid amalgam electrodes for voltammetric and amperometric determination of nitrated polyaromatic compounds used as markers of incomplete combustion. *TheScientificWorldJournal* **2012**, *2012*, 231986.
- (42) Vyskocil, V.; Barek, J. Polarographic and voltammetric study of genotoxic 2,7-dinitrofluoren-9-one and its determination using mercury electrodes *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2009**, *74*, 1675-1696.
- (43) Hajkova, A.; Vyskocil, V.; Danhel, A.; Wang, J.; Barek, J. Polarographic and voltammetric determination of genotoxic 2-aminofluoren-9-one at mercury electrodes. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2011**, *76*, 1775-1790.

- (44) Hajkova, A.; Vyskocil, V.; Berek, J. Determination of genotoxic 2-aminofluoren-9-one using polarographic and voltammetric methods. *Chemické listy* **2012**, *106*, S21-S27.
- (45) Hajkova, A.; Hranicek, J.; Berek, J.; Vyskocil, V. Voltammetric determination of trace amounts of 2-aminofluoren-9-one at a mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 295-302.
- (46) Hajkova, A.; Vyskocil, V.; Berek, J. Voltammetric determination of trace amounts of 2-aminofluoren-9-one with preconcentration of the analyte by solid-phase extraction. *Chemické listy* **2013**, *107*, 234-240.
- (47) Krejcová, Z. Voltametrické studium interakce genotoxického 2-nitrofluorenu s DNA na visící rtuťové kapkové elektrodě. (Diplomová práce). Univerzita Karlova v Praze, 2011.
- (48) Vyskocil, V.; Labuda, J.; Berek, J. Voltammetric detection of damage to DNA caused by nitro derivatives of fluorene using an electrochemical DNA biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *397*, 233-241.
- (49) Vyskocil, V.; Berek, J. Voltammetric DNA biosensor based on a microcrystalline natural graphite-polystyrene composite transducer. *Procedia Chemistry* **2012**, *6*, 52-59.
- (50) Ueda, O.; Kitamura, S.; Ohta, S. Metabolism of 2-nitrofluorene, an environmental pollutant, by liver preparations of sea bream, *Pagrus major*. *Xenobiotica* **2002**, *32*, 667-682.
- (51) Moller, L.; Zeisig, M.; Midtvedt, T.; Gustafsson, J. A. Intestinal microflora enhances formation of DNA adducts following administration of NF and 2-AAF. *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 857-861.
- (52) Fujimoto, T.; Kitamura, S.; Sanoh, S.; Sugihara, K.; Yoshihara, S. i.; Fujimoto, N.; Ohta, S. Estrogenic activity of an environmental pollutant, 2-nitrofluorene, after metabolic activation by rat liver microsomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *303*, 419-426.
- (53) Moller, L.; Corrie, M.; Midtvedt, T.; Rafter, J.; Gustafsson, J. A. The role of the intestinal microflora in the formation of mutagenic metabolites from the carcinogenic air pollutant 2-nitrofluorene. *Carcinogenesis* **1988**, *9*, 823-830.

- (54) Moller, L.; Tornquist, S.; Beije, B.; Rafter, J.; Toftgard, R.; Gustafsson, J. A. Metabolism of the carcinogenic air pollutant 2-nitrofluorene in the isolated perfused rat lung and liver. *Carcinogenesis* **1987**, *8*, 1847-1852.
- (55) Moller, L.; Torndal, U.-B.; Eriksson, L. C.; Gustafsson, J. A. The air pollutant 2-nitrofluorene as initiator and promoter in a liver model for chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis* **1989**, *10*, 435-440.
- (56) Moller, L.; Zeisig, M.; Toftgard, R. Lack of initiating capacity of the genotoxic air pollutant 2-nitrofluorene in the mouse skin two-stage carcinogenesis system. *Carcinogenesis* **1993**, *14*, 1723-1725.
- (57) Moller, L.; Cui, X.-S.; Torndal, U.-B.; Eriksson, L. C. Preneoplastic lesions and DNA adduct formation of the airborne genotoxic agents 2-nitrofluorene and 2, 7-dinitrofluorene. *Carcinogenesis* **1993**, *14*, 2627-2632.
- (58) Beije, B.; Moller, L. Correlation between induction of unscheduled DNA synthesis in the liver and excretion of mutagenic metabolites in the urine of rats exposed to the carcinogenic air pollutant 2-nitrofluorene. *Carcinogenesis* **1988**, *9*, 1465-1470.
- (59) Miller, J. N.; Miller, J. C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*; Pearson Education: Harlow, 2005; Vol. 5. .
- (60) Dizechi, M.; Marschall, E. Viscosity of some binary and ternary liquid mixtures. *Journal of Chemical & Engineering Data* **1982**, *27*, 358-363.