

Chemicky modifikované elektrody

Chemicky modifikované elektrody

- Možnosti chemické modifikace
 - samoskladné monovrstvy (chemisorpce)
 - elektrody modifikované uhlíkovými nanotrubičkami či fullereny
 - zamíchání reaktivních složek do gelu
 - modifikace katalyzátorem elektrodové reakce (enzymy)
 - elektrochemické pokrytí vodivými filmy (vodivé polymery)
 - DNA modifikované elektrody – DNA biosensory

Chemicky modifikované elektrody

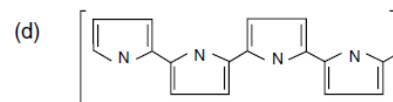
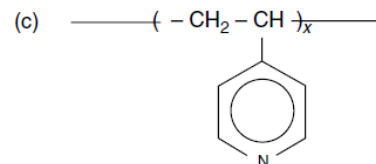
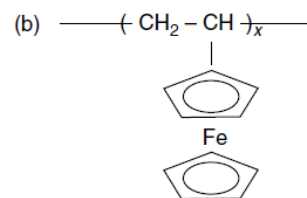
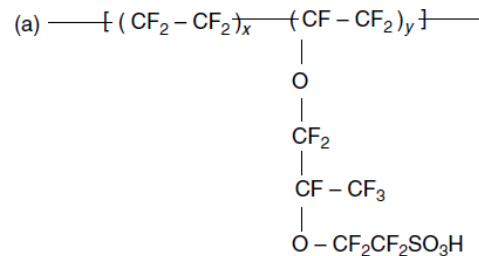
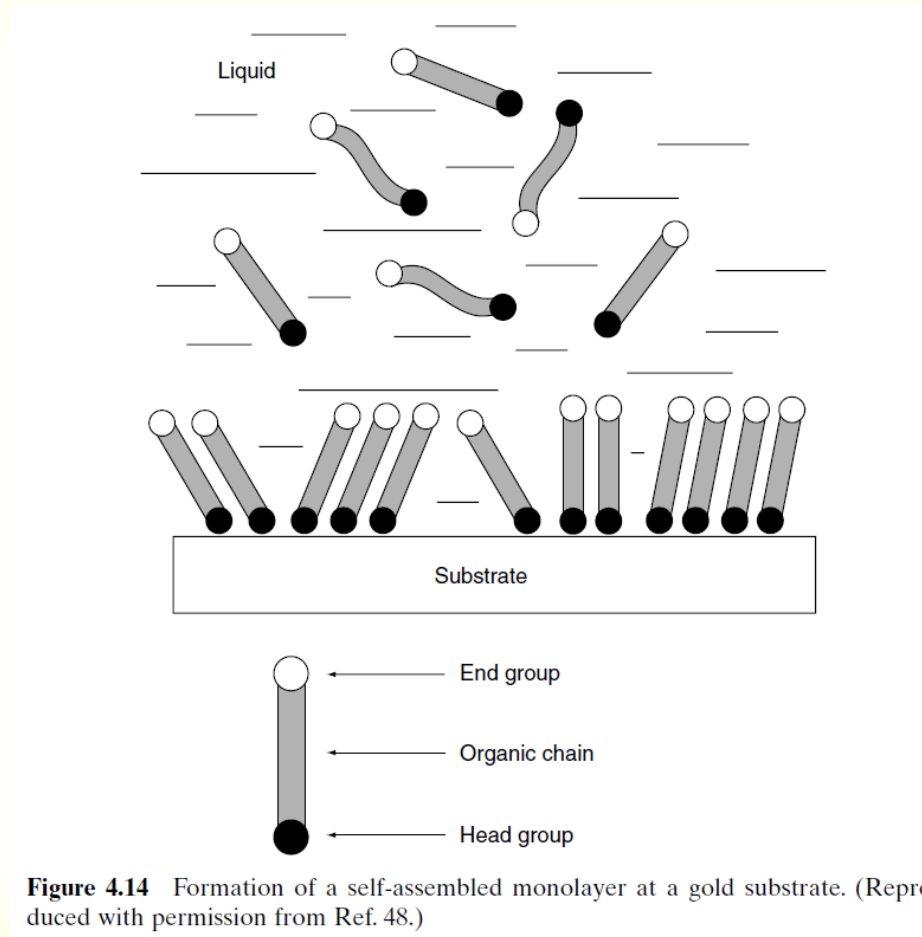


Figure 4.13 Structure of common polymeric coatings: (a) Nafion, (b) polyvinylferrocene; (c) polyvinylpyridine; (d) polypyrrole.

Samoskladné monovrstvy



Modifikace uhlíkovými nanomateriály

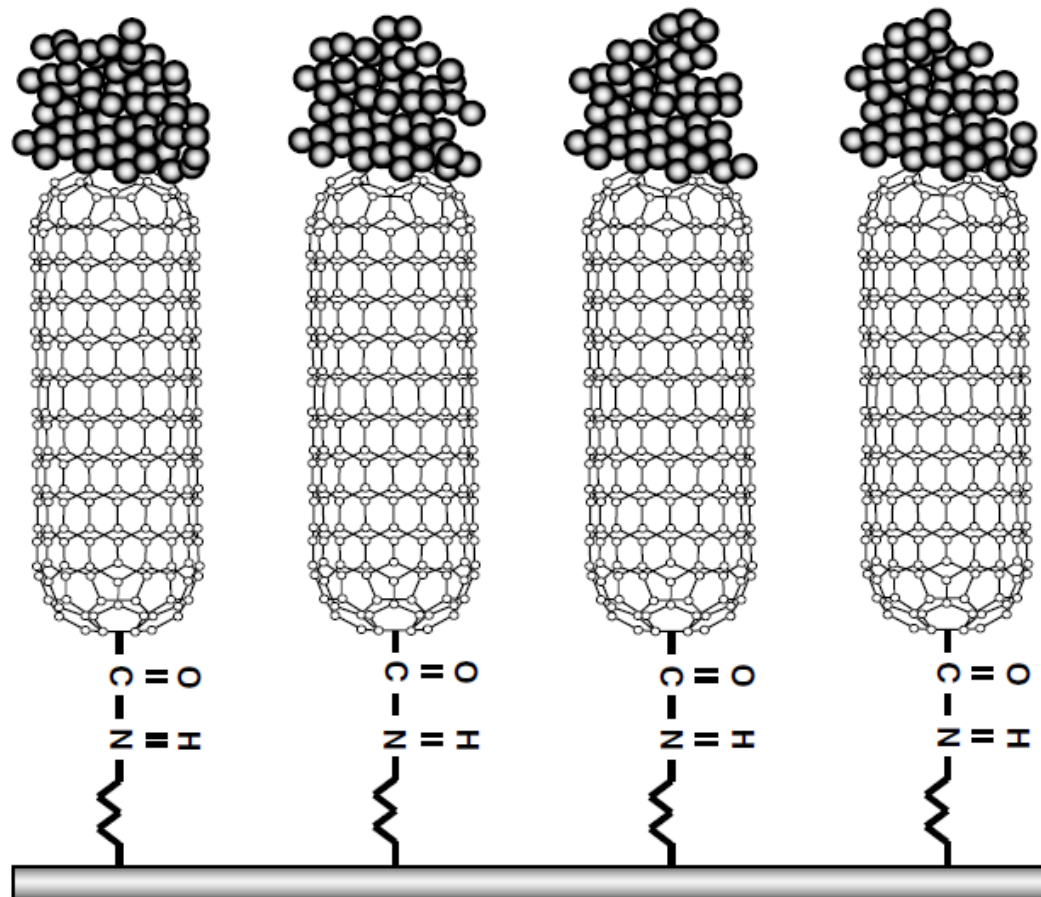


Figure 4.15 Nanoforest of vertically aligned CNT “trees” acting as molecular wires. (Reproduced with permission from Ref. 57.)

Modifikace katalyzátorem elektrodové reakce

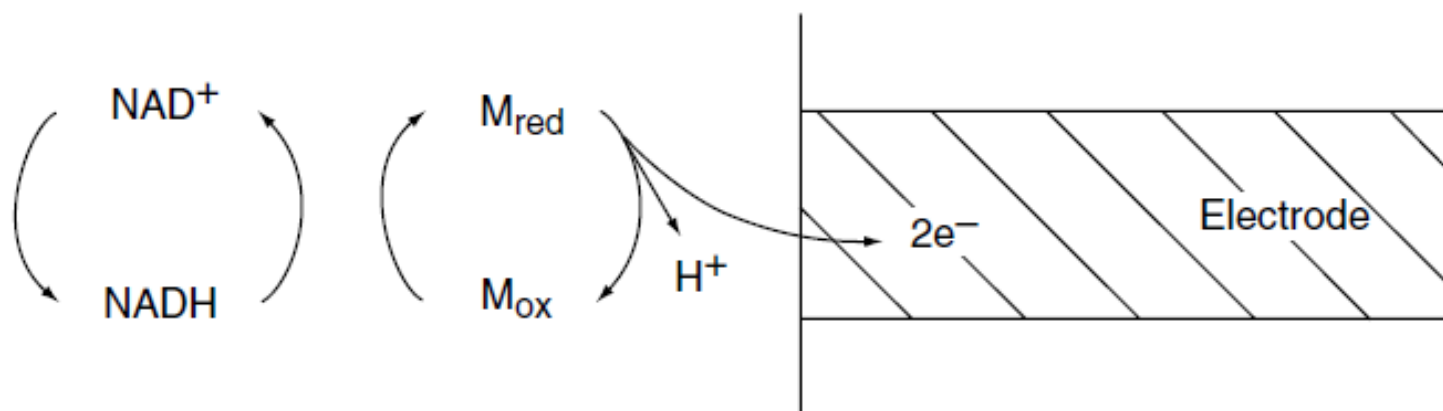
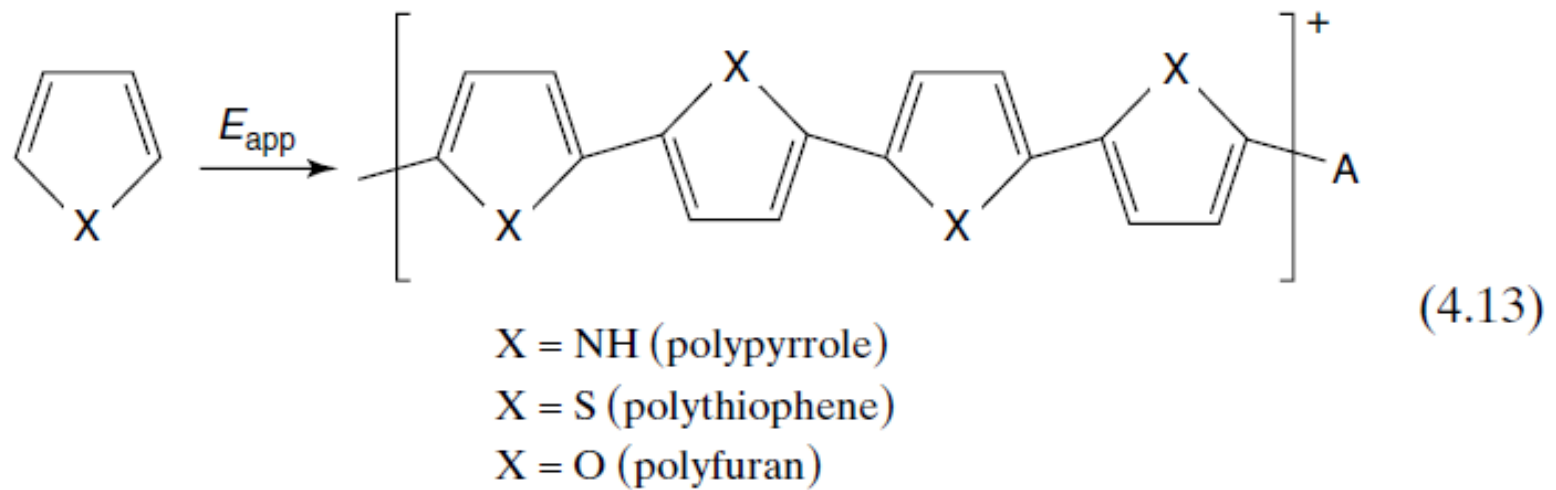


Figure 4.17 Electrocatalytic detection of NADH.

Modifikace vodivými polymery



Chemicky modifikované elektrody

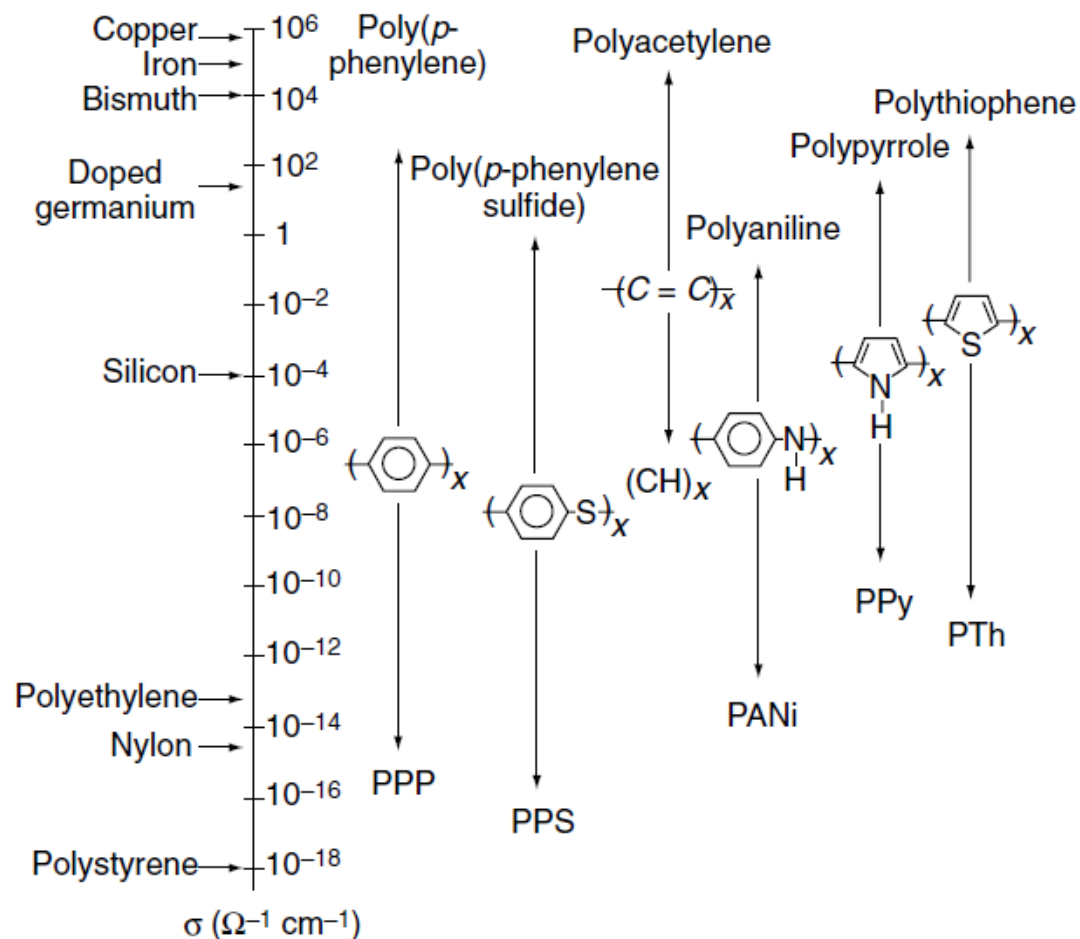


Figure 4.22 Conductivity ranges of common conducting polymers, along with their chemical structures. (Reproduced with permission from Ref. 95.)

Chemicky modifikované elektrody

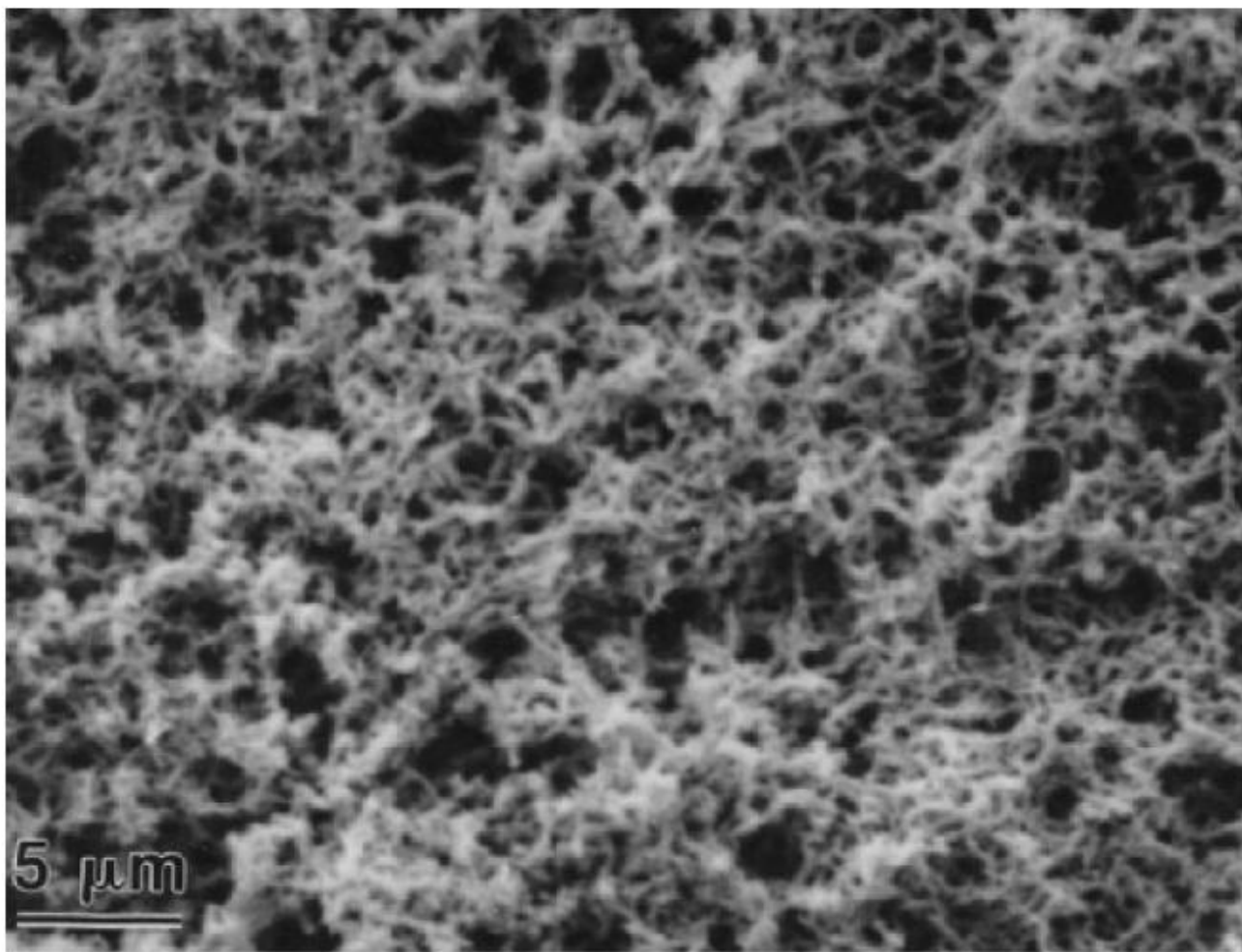


Figure 4.20 Scanning electron micrograph of a polyaniline-coated electrode.

Chemicky modifikované elektrody

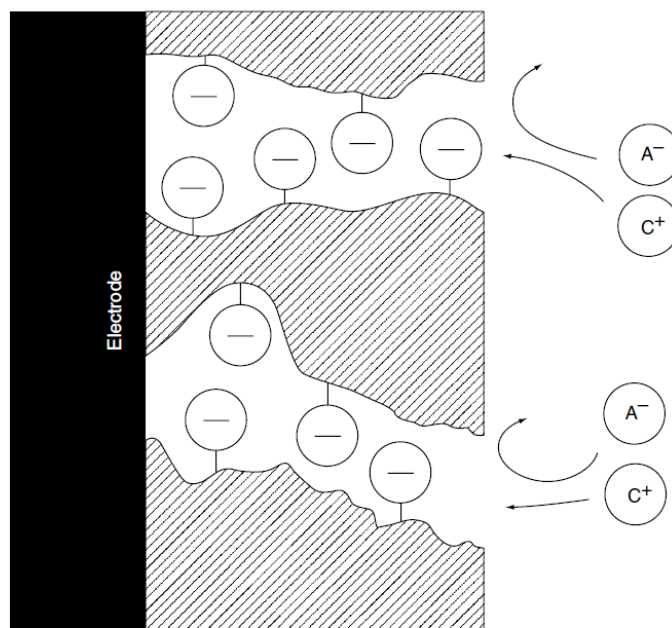


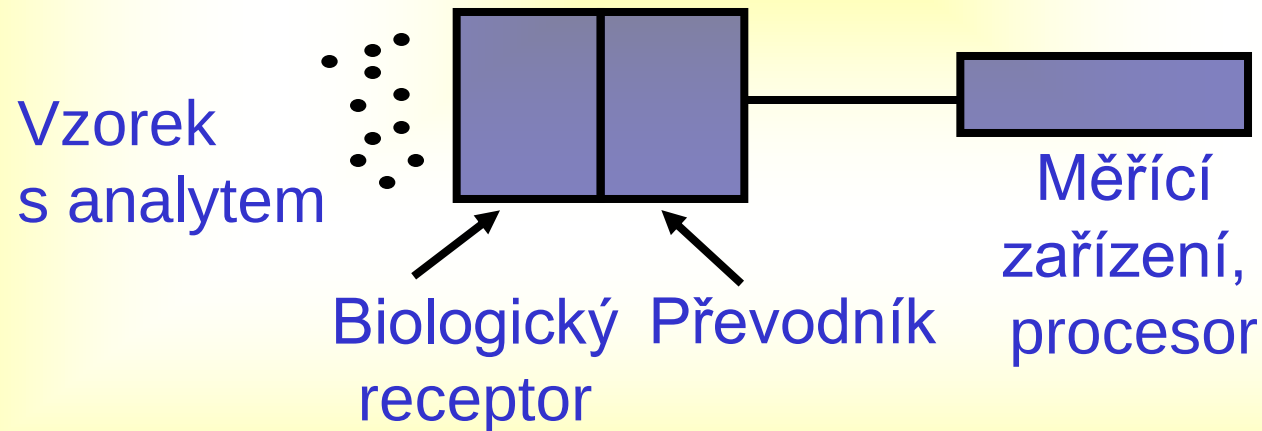
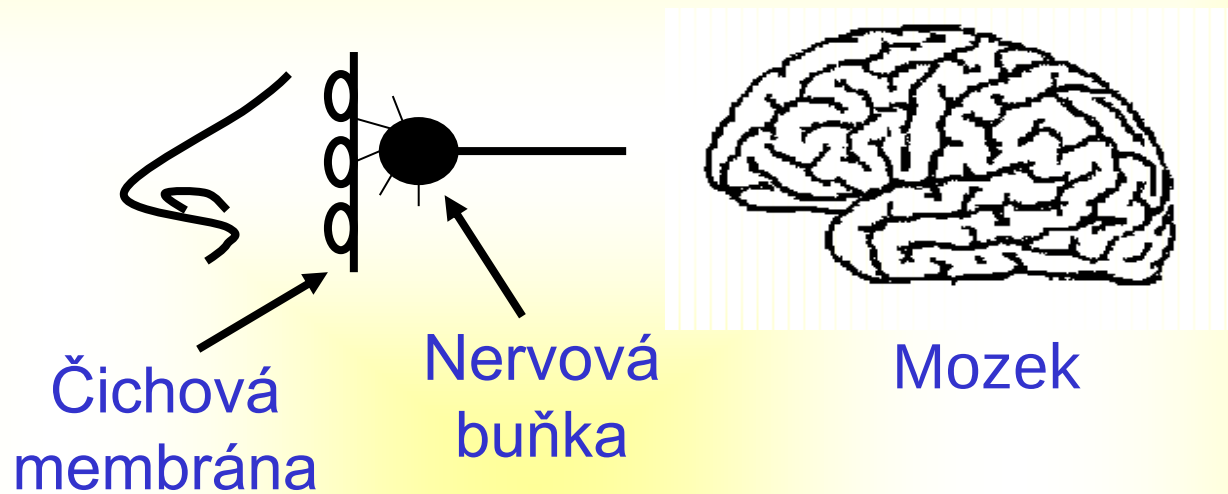
Figure 4.21 Use of negatively charged polymeric films for excluding anionic interferences.

TABLE 4.2 Commonly Used Membrane Barriers

Transport Mechanism	Membrane Barrier	Ref.
Size exclusion	Cellulose acetate	91
	Poly(1,2-diaminobenzene)	86
	Polyphenol	92
Hydrophobic barriers	Phospholipid	88
	Self-assembled thiols	89
Charge exclusion	Nafion	87
	Poly(ester sulfonic acid)	93
	Self-assembled thioctic acid	94
Mixed control	Cellulose acetate/Nafion	90

Biosenzory

Koncepce biosenzoru



Biosenzor je kompaktní analytické zařízení obsahující biologickou nebo od biologie odvozenou rozlišovací složku (receptor) integrovanou či úzce spojenou s fyzikálním či fyzikálně-chemickým převodníkem.

Obvyklou ***rolí biosenzoru*** je poskytovat diskrétní nebo kontinuální digitální elektronické signály, které jsou úměrné jednotlivému analytu nebo skupině analytů.

Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson, G.S. (1987) *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford.

Definice

Biologický receptor je makromolekula, buňka nebo tkáň schopná rozpoznat cílový analyt.

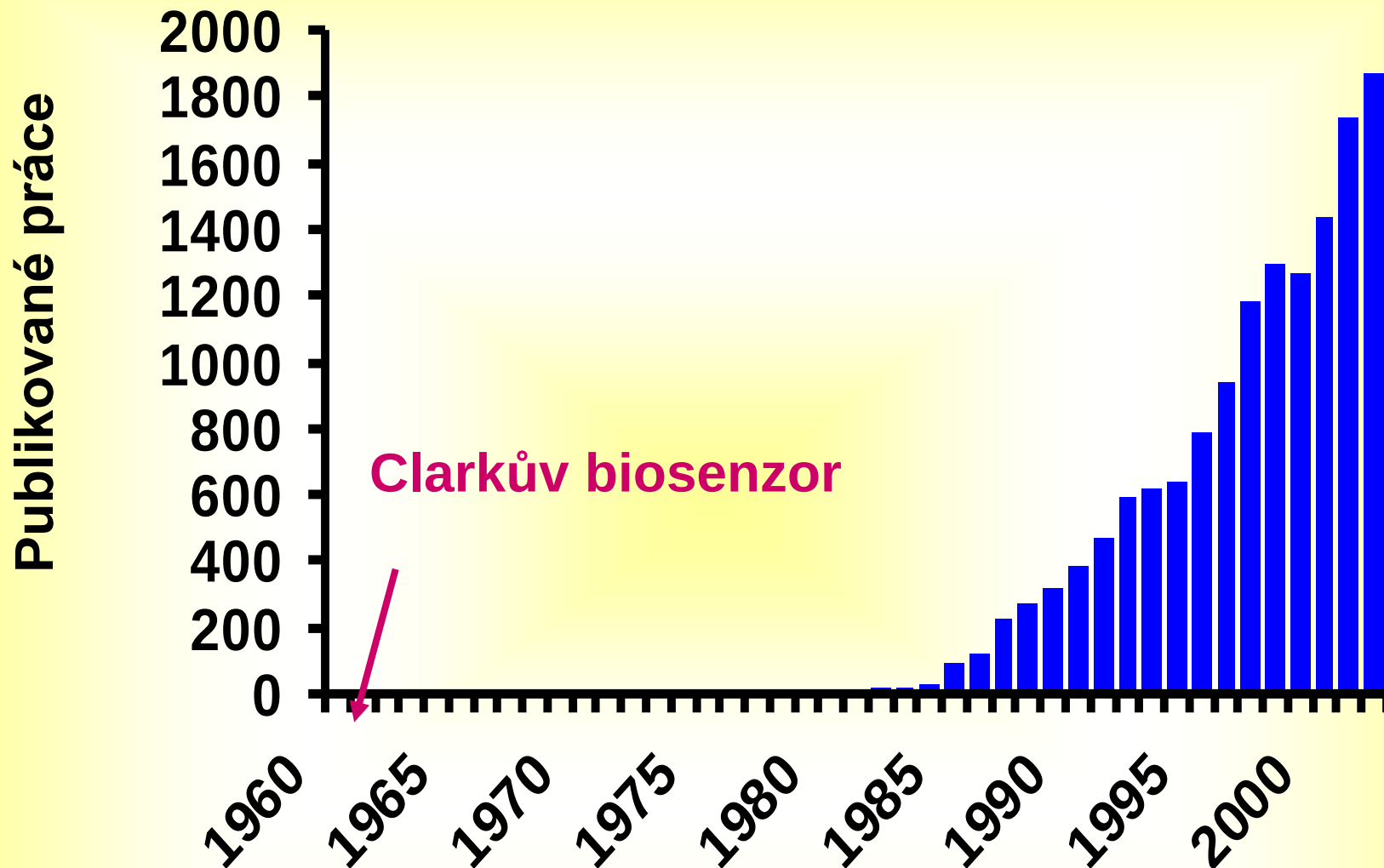
Převodník je zařízení schopné měnit signál biologického receptoru na měřitelný analytický signál.

Procesor konvertuje měřený signál na údaj (počet, barva, veličina), který může uživatel interpretovat.

Historie

- 1962, Clark a Lyons, **enzymová elektroda** na glukózu založená na **Clarkově kyslíkové elektrodě** (1956)
- 1969, Guilbault a Montalvo, **potenciometrická enzymová elektroda** na močovinu
- 1974, Mosbach a Danielsson, **termický enzymový senzor**
- 1975, **glukózový analyzátor**, Yellow Springs Instrument Company (Ohio)
Divis, **mikrobiální elektrody** na alkohol
Lubbers a Opitz, **optoda**, senzor na bázi optických vláken na oxid uhličitý a kyslík

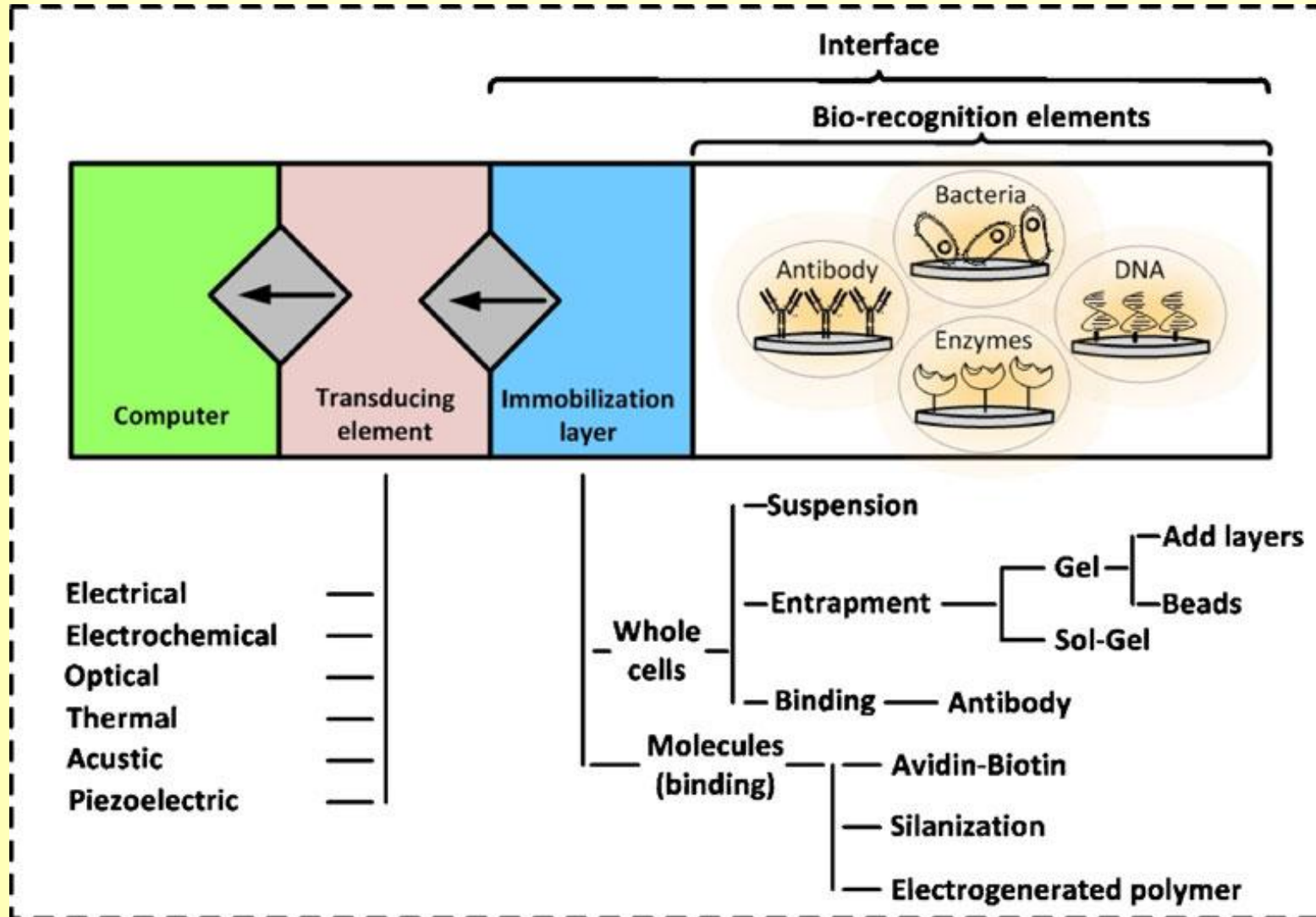
- 1976, Clemens a j., elektrochemický glukózový **biosensor v umělé slinivce**
Biostator (Miles, Elkhart)
- 1982, Shichiri a j., **jehlová enzymová elektroda**
pro podkožní implantaci
- 1970s, **imunosenzory** (vázání protilátky)
- 1983, Liedberg a j., povrchová plazmová rezonance
pro monitorování **afinitních reakcí v reálném čase**,
BIAcore (Pharmacia, Švédsko)
- 1986, **DNA** modifikovaná elektroda (Paleček)
- 1987, **tužkový měřič** pro domácí monitorování glukózy
v krvi, **MediSense** (Cambridge, USA),
175 milionů US\$ v r. 1996



Vývojová a publikační aktivita

Stavební součásti biosenzorů

Popis biosenzorů

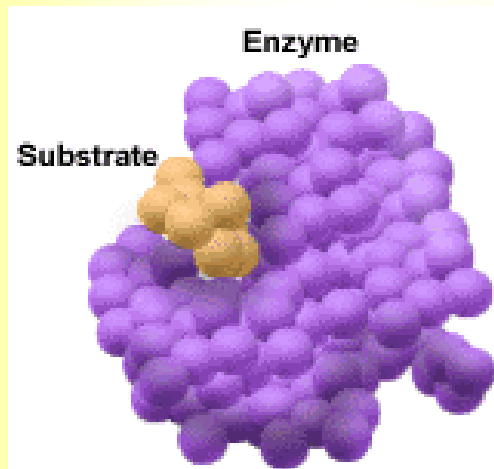


Ref.: E. Eltzov, R. S. Marks, Anal Bioanal Chem 2010

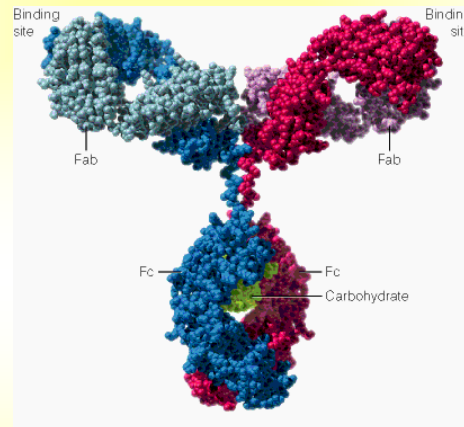
Biologické receptory

Poskytují biologické interakce:

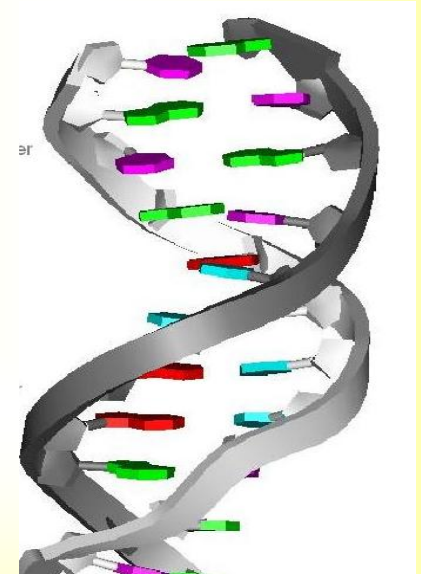
- vysoce specifické (rozdíly v jednom atomu)
- komplementární (zámek / klíč)
- slabé (nekovalentní)
- spontánní (samoskladné, self-assembly)



Enzym



Protilátka



Nukleová kyselina

Techniky imobilizace biosložky

Adsorpce (fyzikální, chemická) - jednoduchá,
nestabilní (1 den)

Mikroenkapsulace v inertní membráně (octan celulózy)
- adaptabilní, spolehlivá (1 týden)

Lipidové membrány (BLM) - specifické problémy

Zachycení v polymeru (polyakrylamid, polypyrrol) -
UV a gama sterilizace, zpomalení difúze

Zesít'ování (glutaraldehydem) - málo rigidní, omezení
difúze

Kovalentní vazba - nejstabilnější (1 rok)

Převodníky

Elektrické/Elektrochemické

- potenciometrické
- voltametrické /
ampérometrické
- „field effect“ tranzistory (FET)
- konduktometrické
- impedimetrické

Akustické

- mikrováhy s křemenným
krystalem
- povrchové akustické vlny

Optické

- absorpční
- luminiscenční

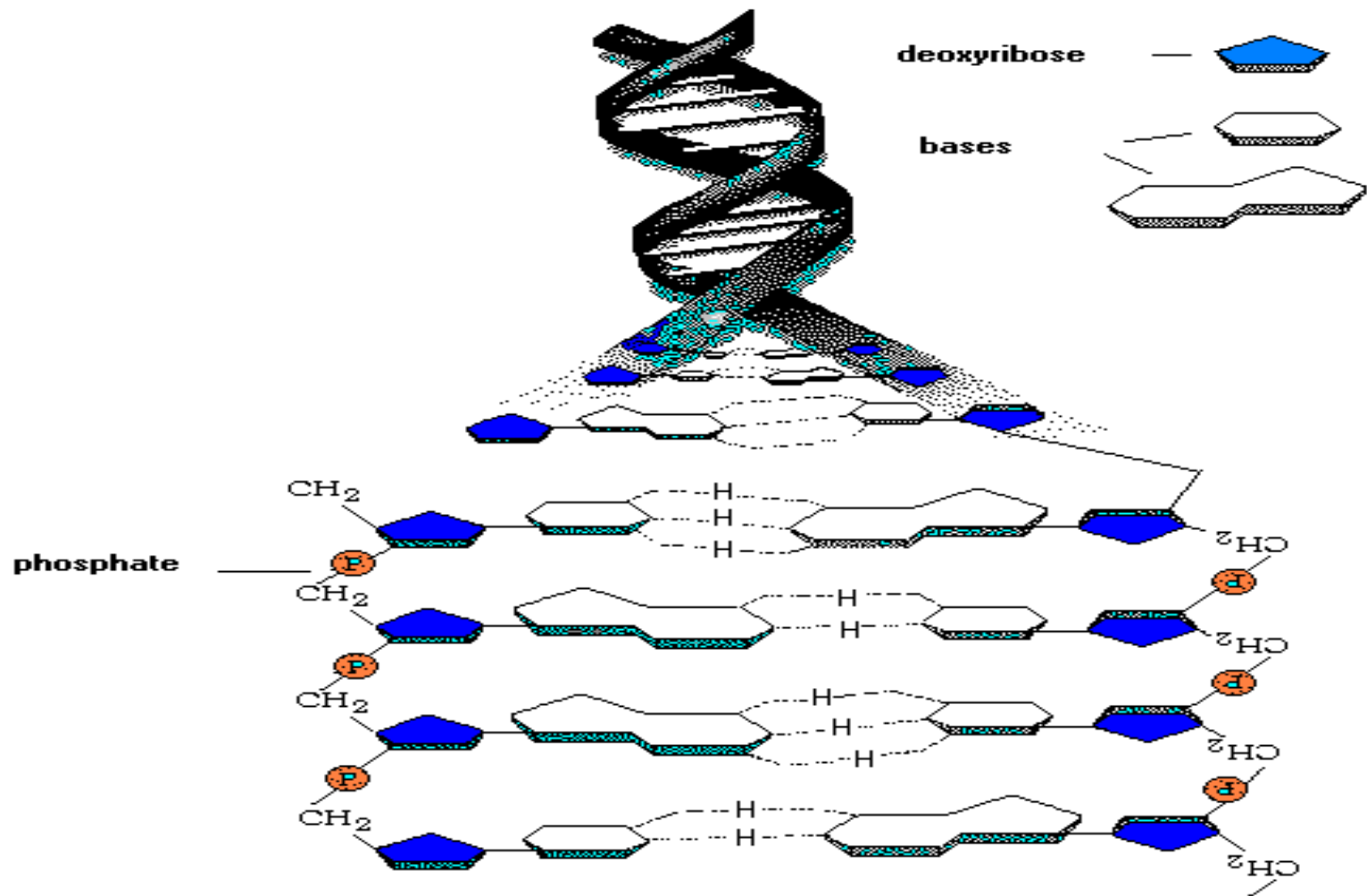
Termické

Opticko-elektronické

- povrchová plazmová rezonance (surface plasmon resonance)

DNA biosenzory

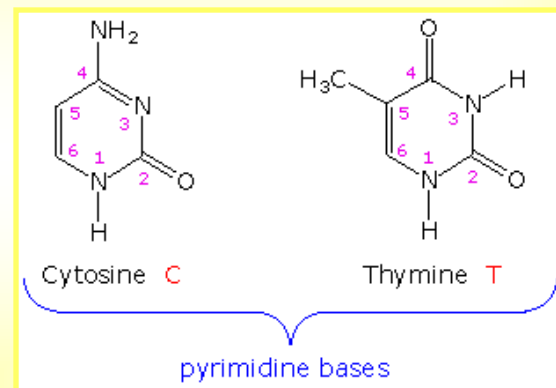
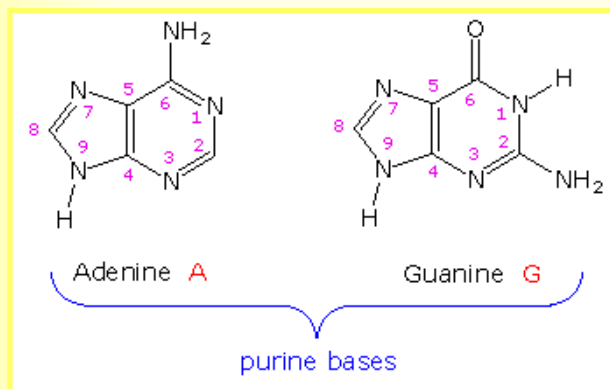
DNA biosenzory



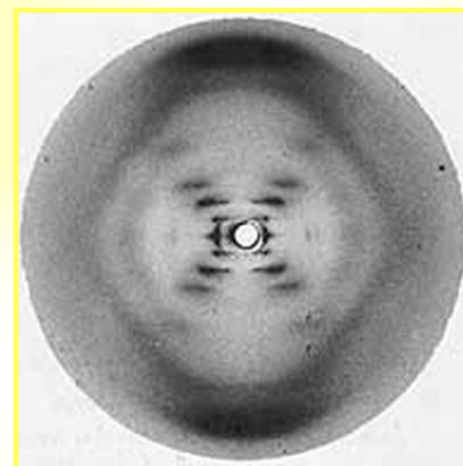
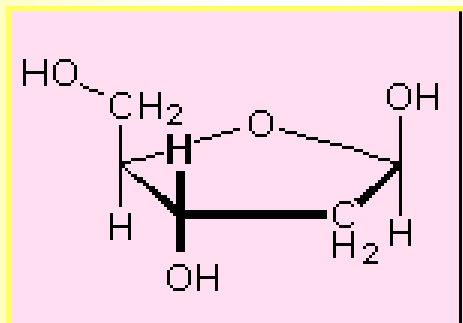
Dvouvláknová kyselina deoxyribonukleová

Primární struktura: složení DNA

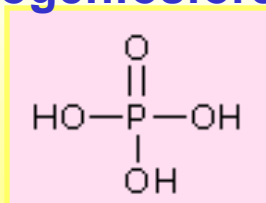
1. dusíkaté báze



2. cukr - deoxyribóza



3. zbytek kyseliny trihydrogenfosforečné



**Rosalind Franklin, Rentgenová
krystalografická analýza
pentózofosforečnanové kostry**

Nukleotidy se skládají ze tří složek:

- monosacharidu – D-ribózy nebo 2-deoxy-D-ribózy
- dusíkaté báze
 - purinu: adeninu, guaninu, ale i hypoxantinu
 - pyrimidinu: cytosinu, tyminu, uracylu, i methylcytosinu
- zbytku kyseliny fosforečné.

První dvě složky tvoří **nukleosid**.

Nukleotid je tedy nukleosid esterifikovaný kyselinou trihydrogenfosforečnou.

Historie

Objev DNA: 1868, švýcarský lékař Micher

Popis struktury: 1953, Watson a Crick

Elektroaktivita: 1958, E. Paleček

Povrchová aktivita: 1961, I.R. Miller

Hybridizace: 1963, J. Marmur

Přenos náboje: 1996, E.D.A. Stemp, J.K. Barton;
S. Priyadarshy, S.M. Risser, D.N. Beratan

Reaktivita DNA

Hybridizace

Denaturace

Asociační interakce

- interkalace
- vazba do velkého či malého žlábků
- elektrostatická vazba

Redoxní reakce (elektroaktivita)

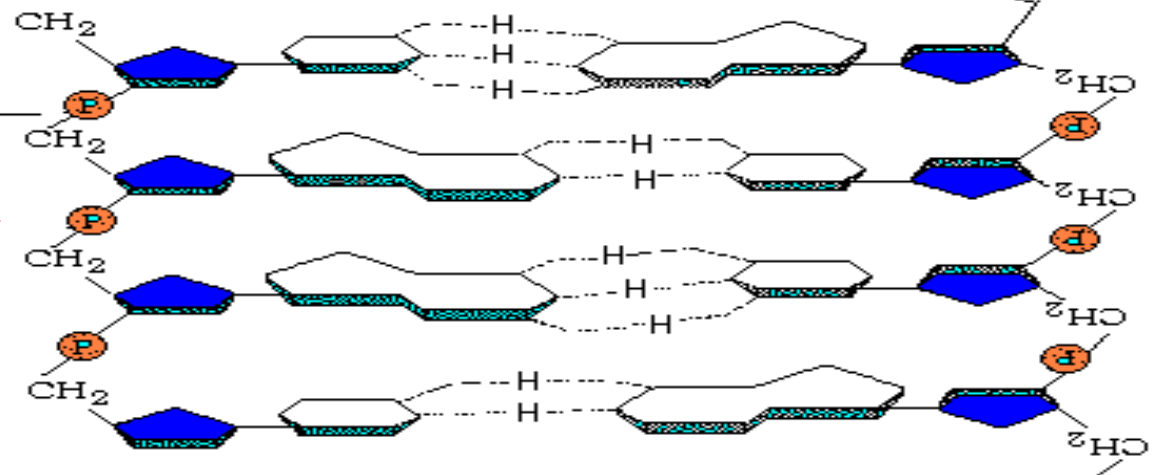
Elektrická vodivost

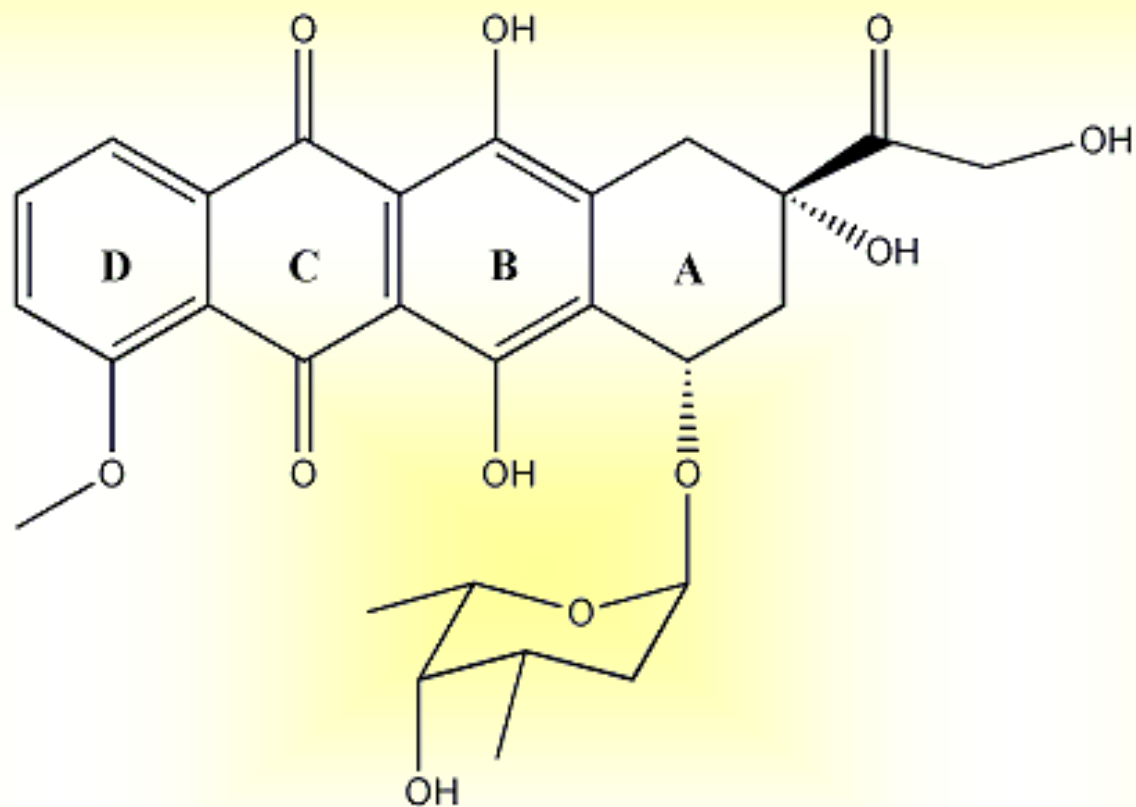
Asociační interakce s látkami malé molekulové hmotnosti

Interkalace – představuje vsunutí (vmezeření) hostující molekuly mezi páry bází dvoušroubovice. Typicky se vyskytuje u sloučenin s planární strukturou obsahující 3-4 aromatické kruhy.

Vazba do velkého či malého žlábků - je vázání ploché molekuly měsícovitého tvaru (nespojené heterocykly) do exteriéru dvoušroubovice (podél řetězce).

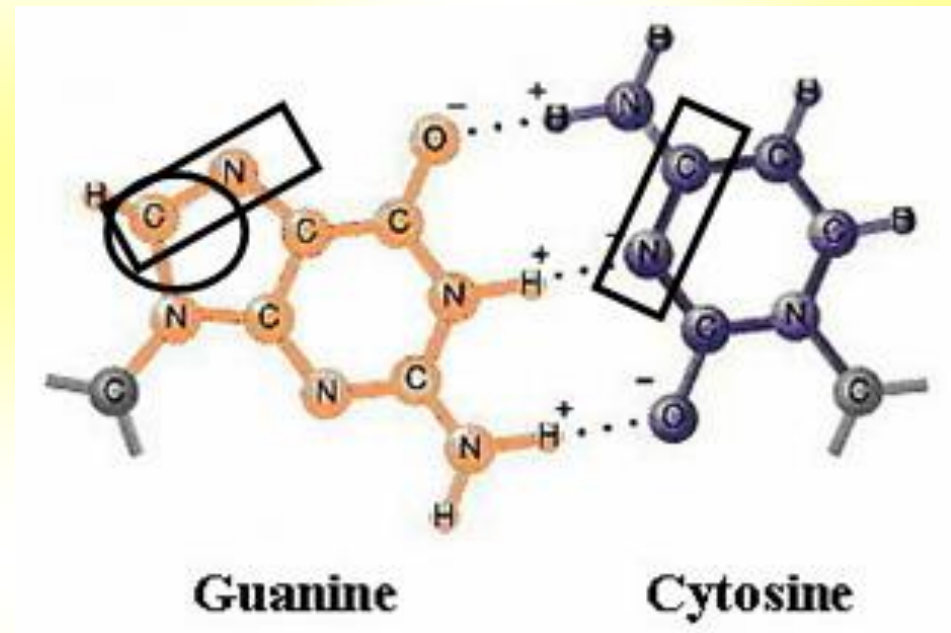
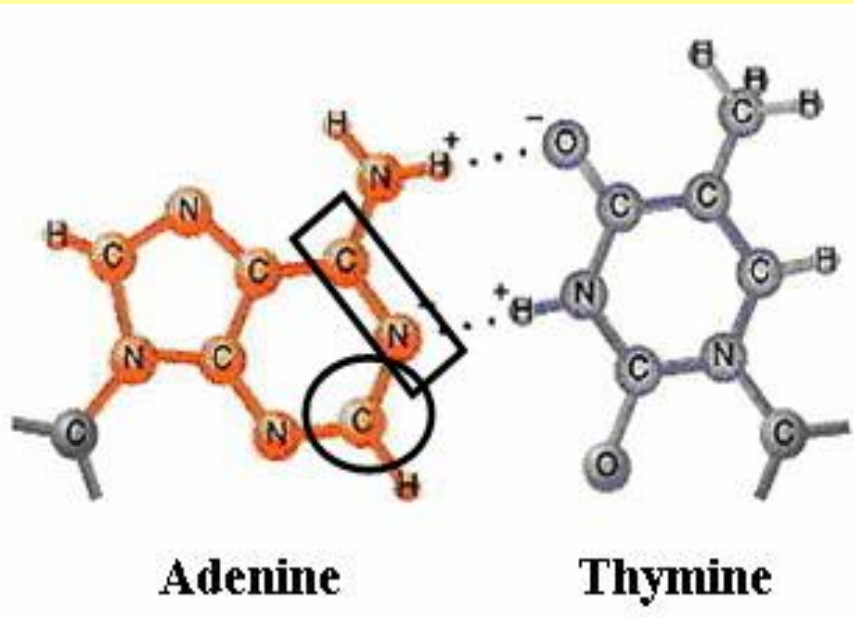
Elektrostatická vazba – vzniká mezi kladným nábojem hostující molekuly a záporným nábojem kostry DNA.





Struktura léčiva doxorubicinu vhodná pro interkalaci

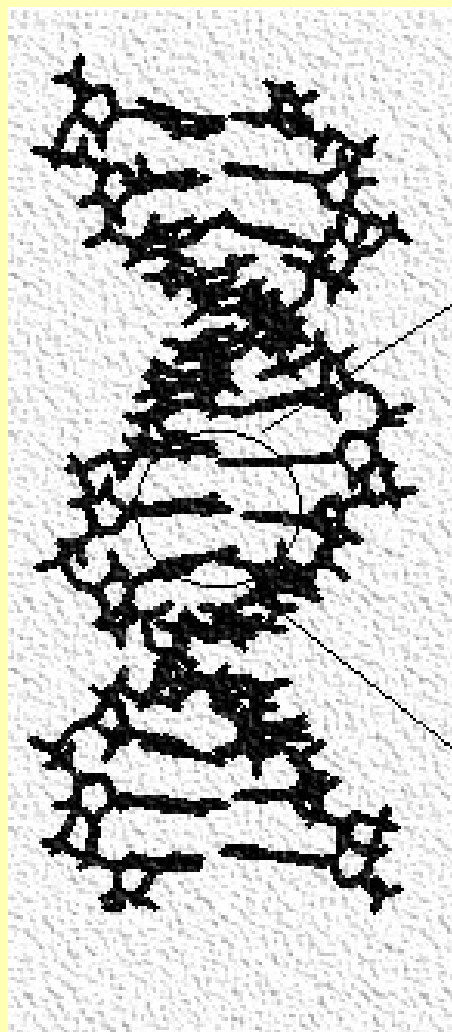
Redoxní (elektrochemická) aktivita DNA



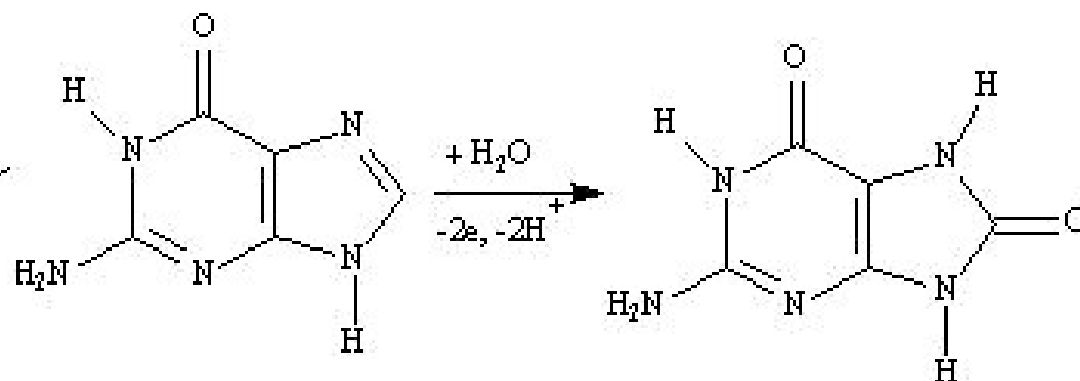
Oxidation site



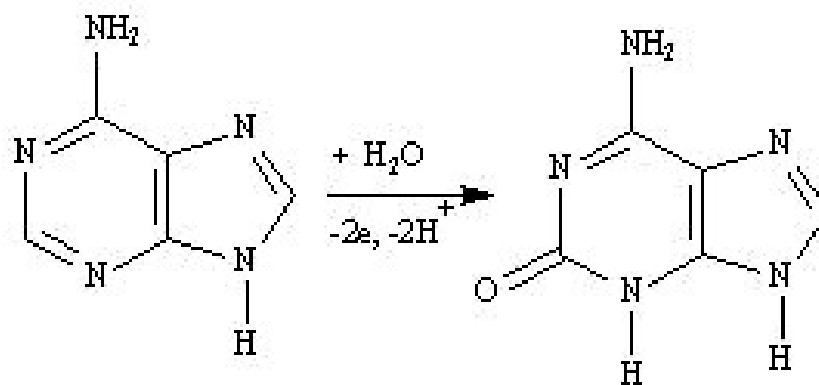
Reduction site



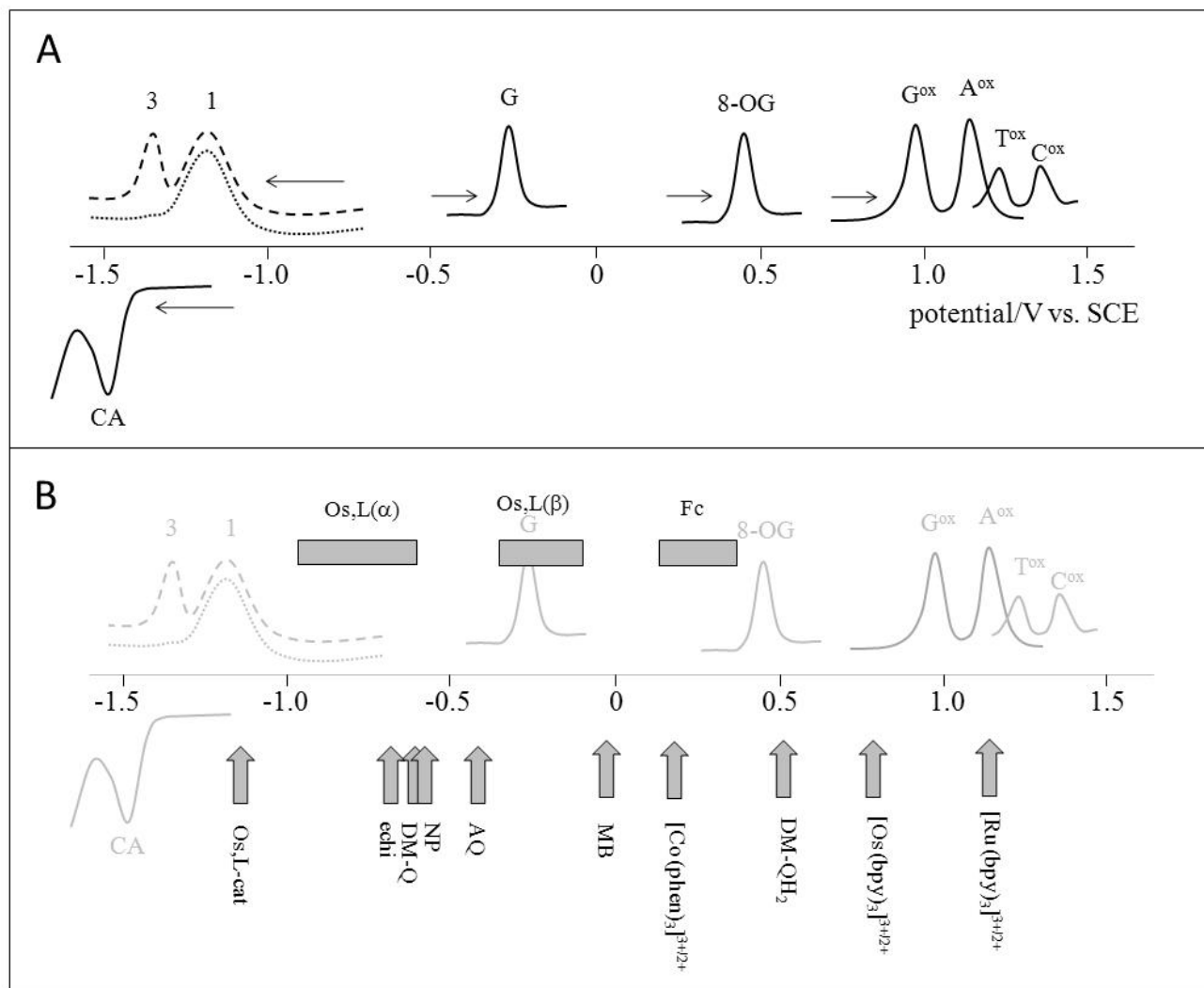
guanine oxidation



adenine oxidation



Oxidace purinových bází



A. Schéma elektrochemické odezvy DNA.

B. Schéma redoxních potenciálů některých elektroaktivních látek používaných jako DNA značky nebo indikátory.

Imobilizace DNA na povrch elektrody

Adsorpce (na Hg, Au, Ag, Pt, C, oxidy kovů):

Nanostrukturované filmy na SPE:

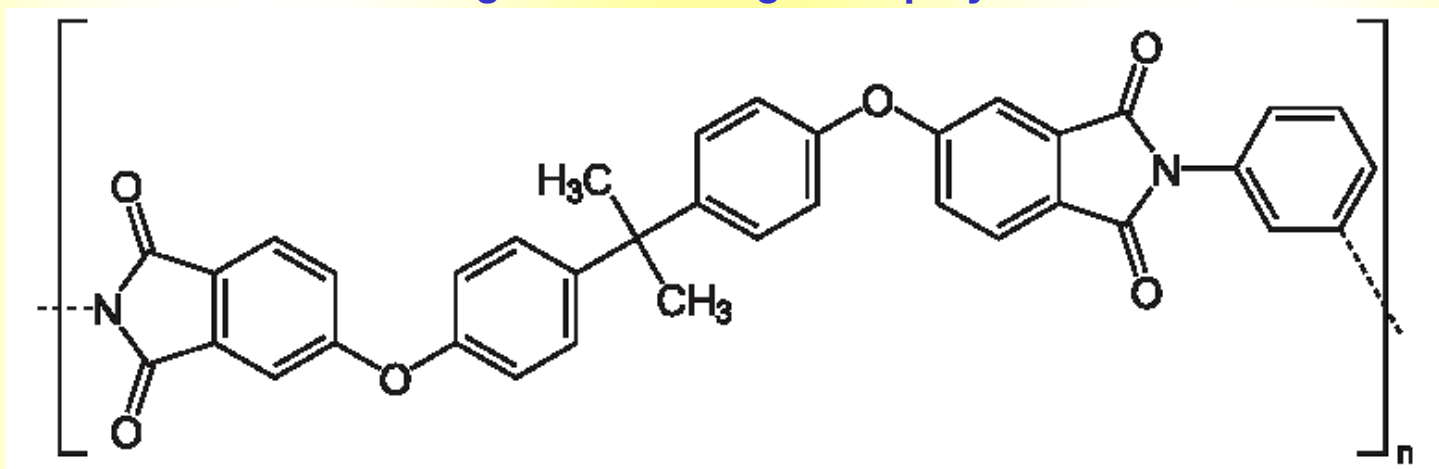
uhlíkové nanotrubičky (MWNT)

1 mg MWNT / 2 ml DMF – slabá disperze

1 mg MWNT / 2 ml 1% SDS

1 mg MWNT / 2 ml 1% chitosan

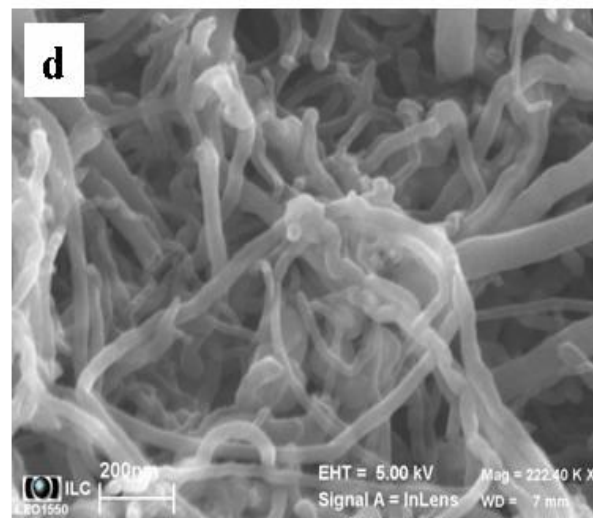
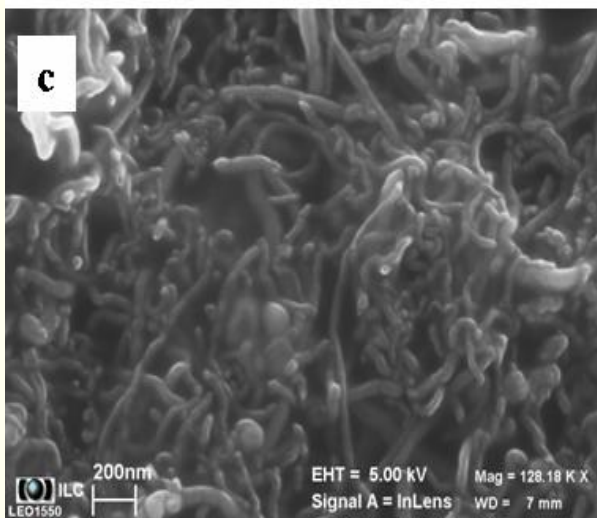
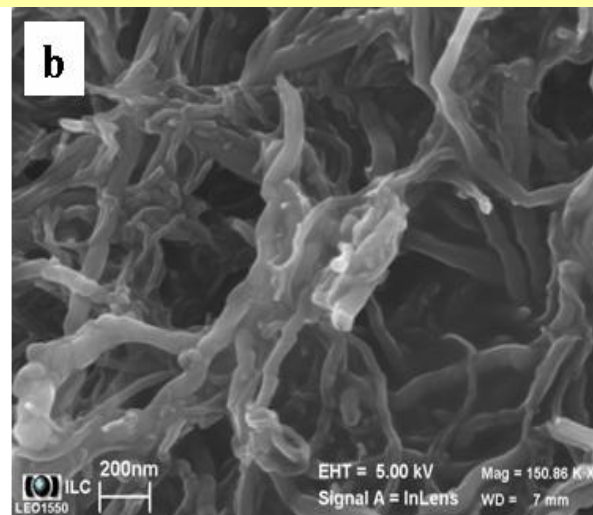
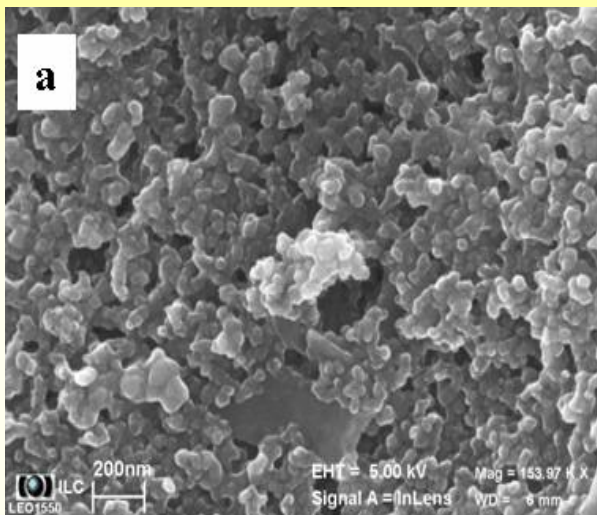
1 mg MWNT / 1 mg 50 % polyetherimid + 0.25 ml EtOH



Chemická vazba:

Thiolové deriváty nukleotidů na Au, Ag elektrodě

Pomocí DNA báze na C nebo Pt elektrodě

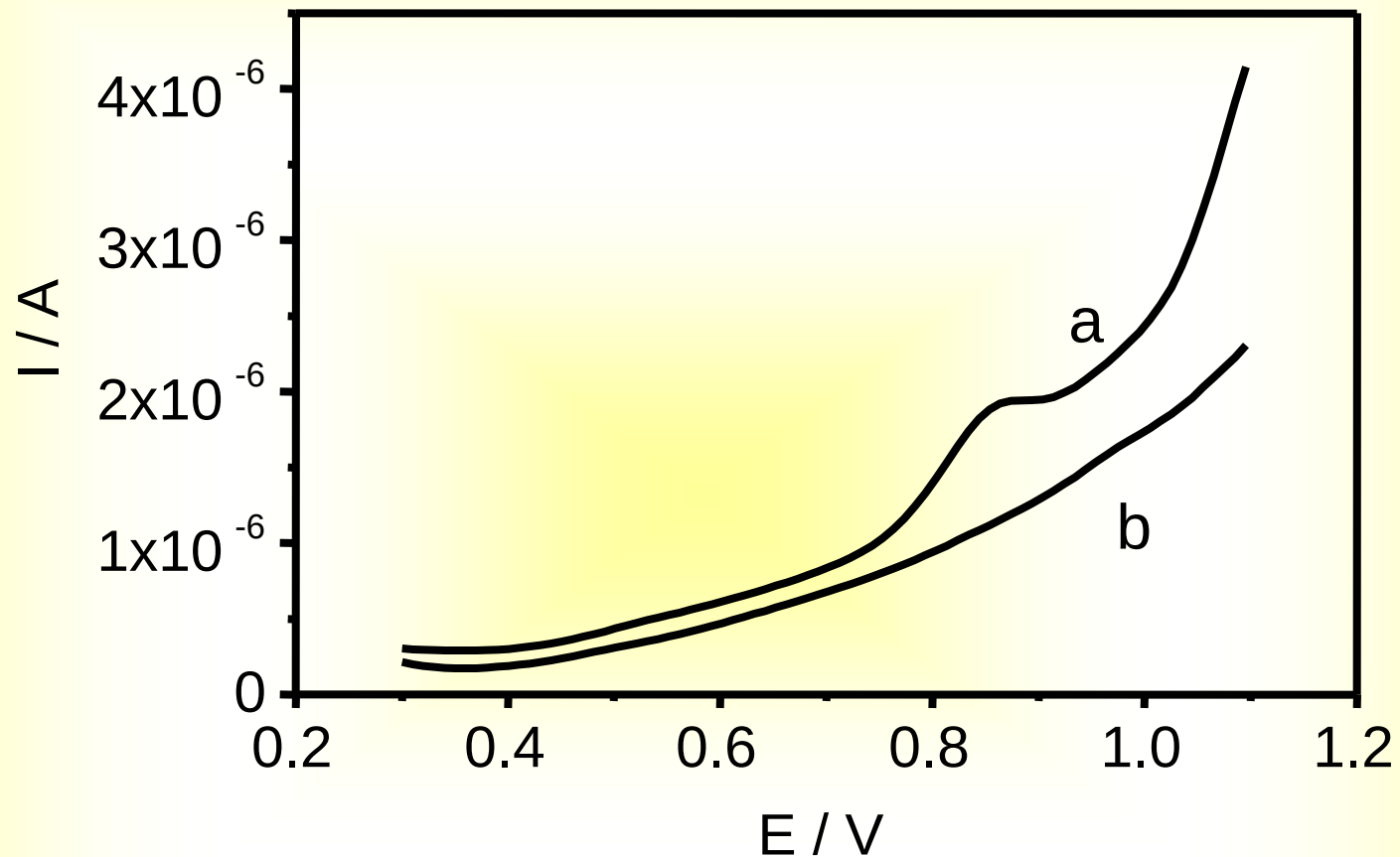


SEM snímky DNA/SPE (a), MWNT/SPE (b), DNA/MWNT/SPE (c) a DNA-MWNT/SPE (d).

Způsoby detekce využívané u elektrických / elektrochemických DNA biosenzorů

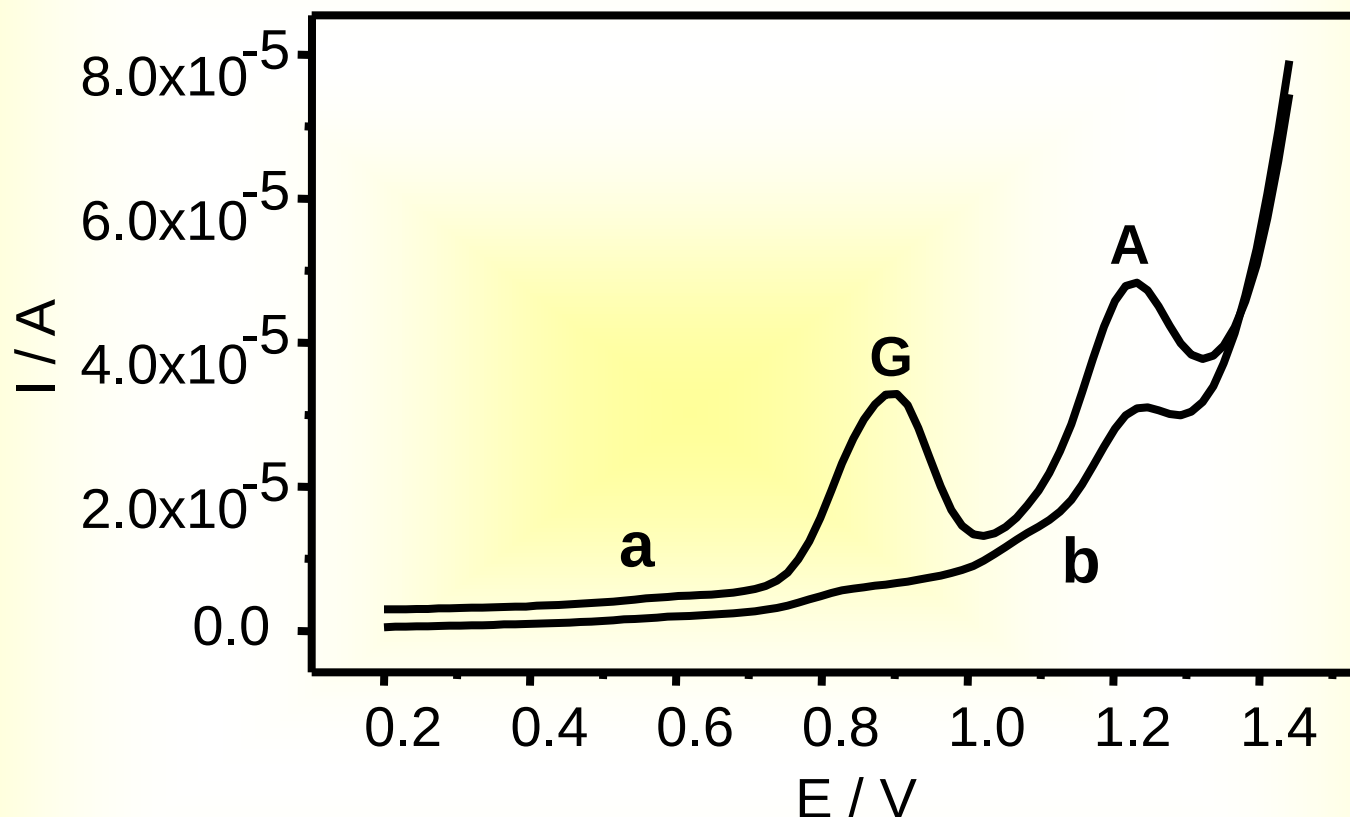
- vlastní signály DNA - elektroaktivita bází (guanin a adenin)
- zprostředkování přenosu náboje při oxidaci guaninu redoxním mediátorem (komplexy Ru(III)),
- elektroaktivita DNA indikátoru/analytu nekovalentně vázaného na DNA (indikátor může detekovat vazbu neelektroaktivního analytu),
- redoxní indikátor v roztoku jako $K_3[Fe(CN)_6]$,
- kovalentně vázané redoxní značky DNA
- elektrochemická impedanční spektroskopie elektrodového povrchu modifikovaného DNA (impedimetrický biosenzor).

Signál guaninu DNA



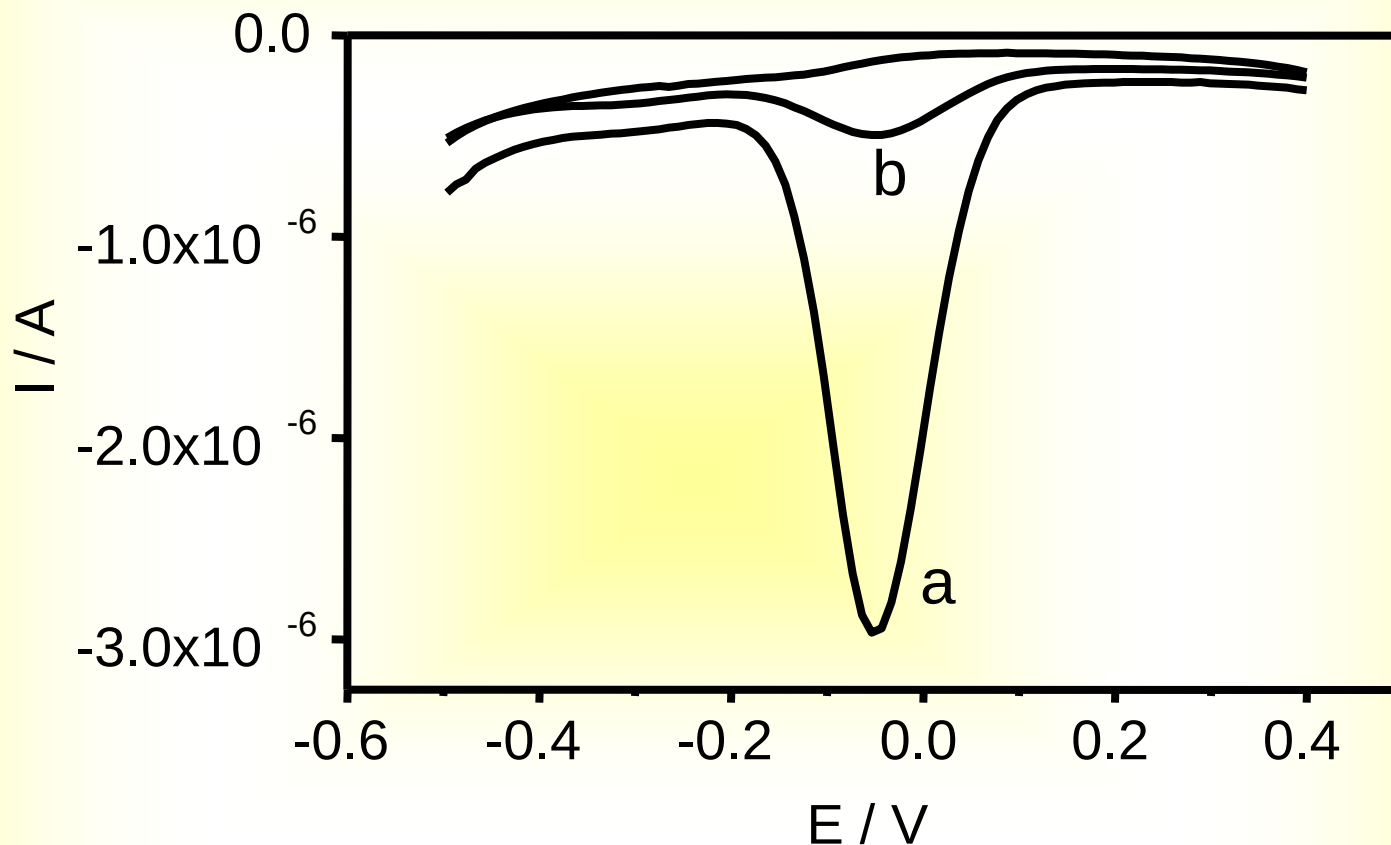
DPV signál guaninu na DNA/SPE (a) a SPE (b).
Podmínky: 0,50 mol/l octanový pufr pH 5,0.

Signály guaninu a adeninu DNA v přítomnosti redoxního mediátoru



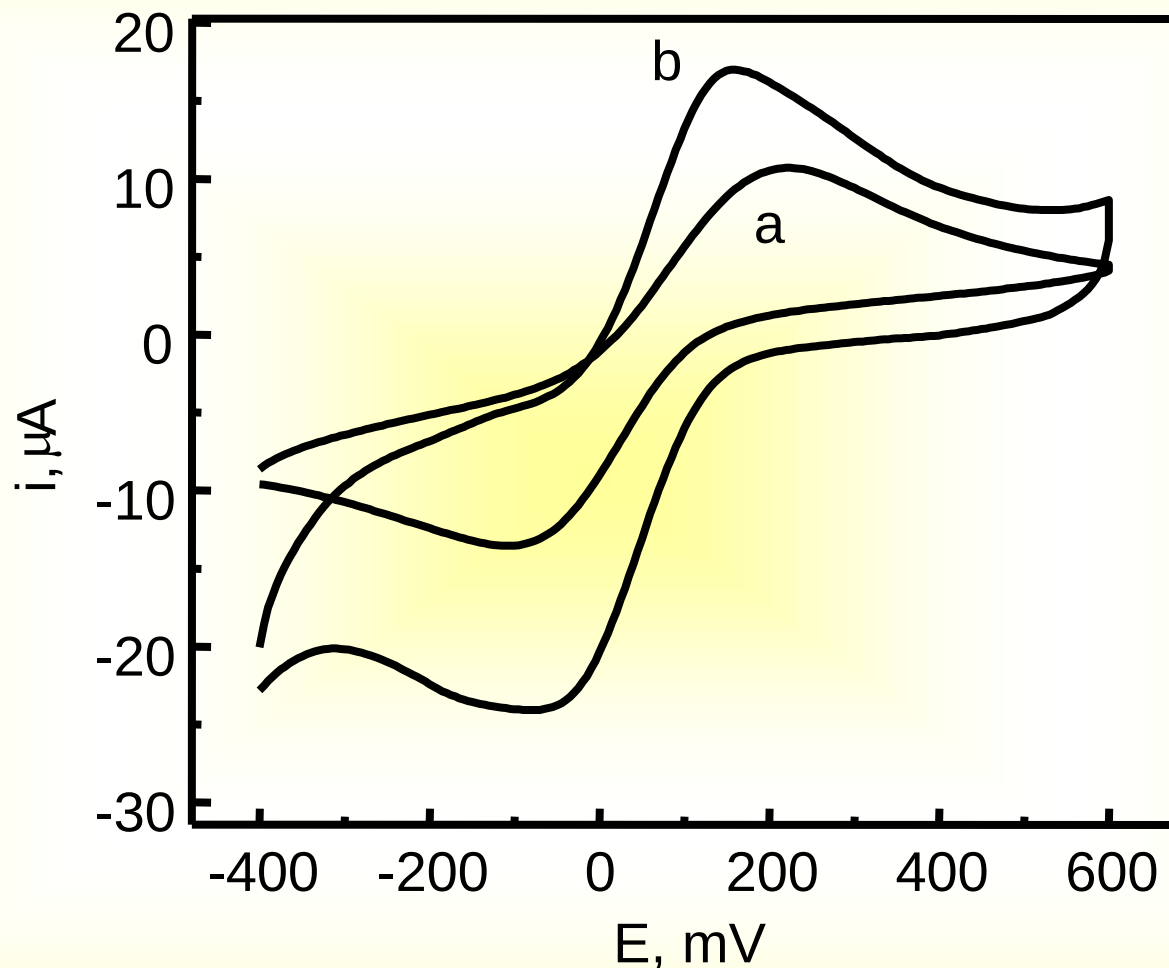
DPV signál guaninu (G) a adeninu (A) na DNA/SPE
v $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l } [\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (a) a v čistém $0,1 \text{ mol/l PBS}$ (b).

Signál elektrochemického indikátoru DNA



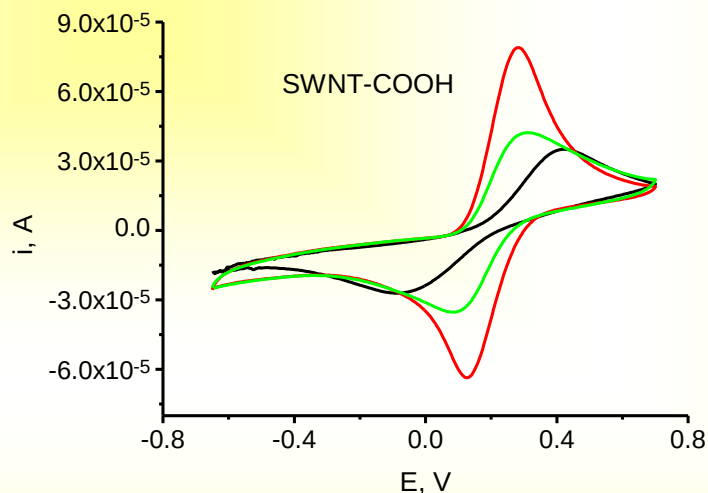
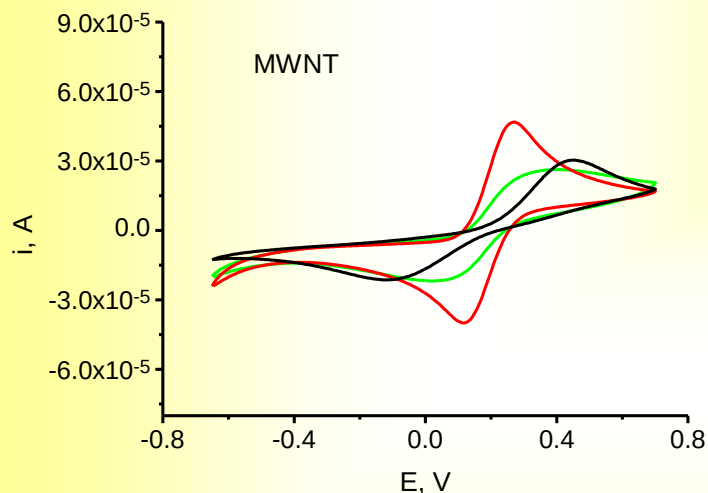
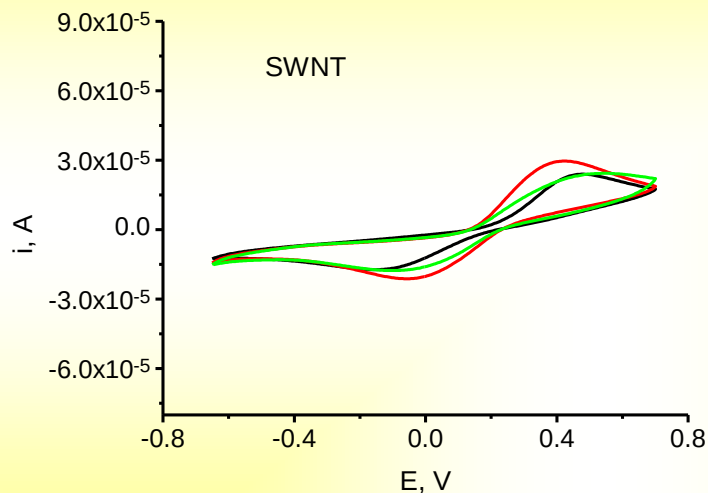
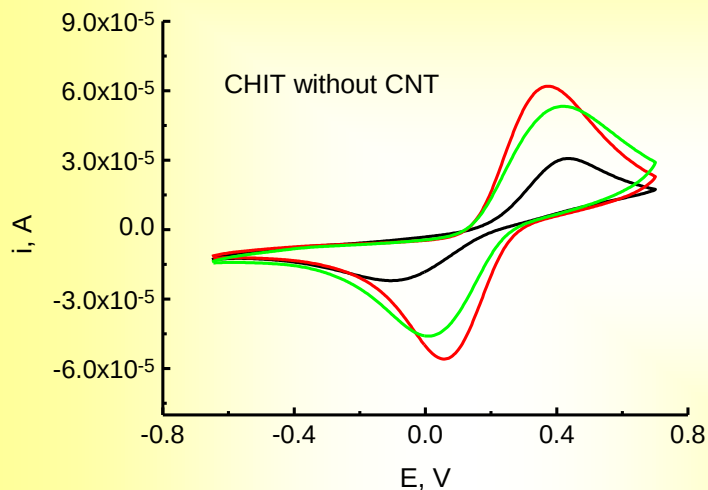
DPV signál indikátoru $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ na DNA/SPE (a)
a SPE (b). Podmínky: $5 \cdot 10^{-7}$ mol/l $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$,
 $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l PBS, pH 7,04, akumulace 120 s.

Signál indikátoru $K_3[Fe(CN)_6]$ v roztoku



CV signál 1 mmol/l $K_3[Fe(CN)_6]$ na DNA/SPE (a) a SPE (b)
v 0,1 mol/l PBS pH 7,0.

CV na různých kompositech CNT–chitosan



CV 1 10^{-3} mol/l $K_3[Fe(CN)_6]$ a $K_4[Fe(CN)_6]$ v 0,1 mol/l PBS pH 7,0; 50 mV/s.

Holá SPCE (--), CNT–CHIT/SPCE (--), DNA / CNT–CHIT / SPCE (--)

Ref.: A. Ferancová, J. Labuda et al., Acta Chim. Slovaca, 2008, 1, 58-71.

Asociace DNA s látkami o nízké molekulové hmotnosti

Příklady:

Komplexy kovů $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, $[\text{Cu}(\text{phen})_3]^{3+}$, $[\text{Cu}(\text{TAAB})]^{2+}$

Léčiva - antidepressiva (fenothiazinové deriváty), lokální anestetika (estery kyseliny fenyلكarbamové),

Chemikálie - deriváty katechinu a akridinu, deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků (amino-, hydroxy- a nitro- pyreny a bifenyly), deriváty chinazolinů

Vyšetřuje se:

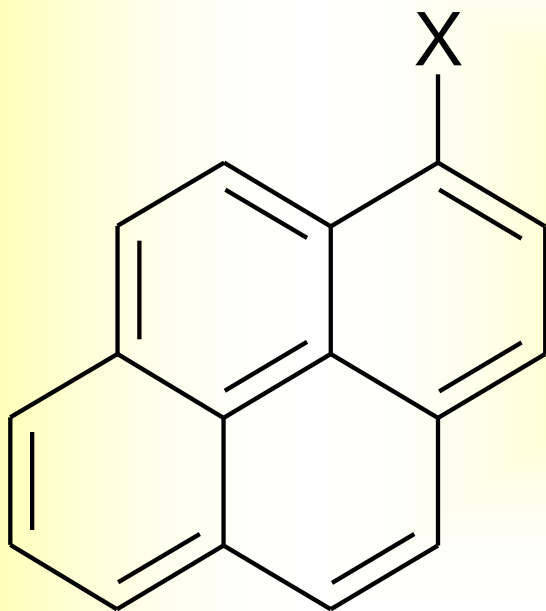
⇒ Charakter vazby, mírné poškození DNA

⇒ Racionální navrhování léčiv

⇒ Analytické postupy založené na prekoncentraci

Příklad: DNA a deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků

(pyreny, bifenyly, atd.)



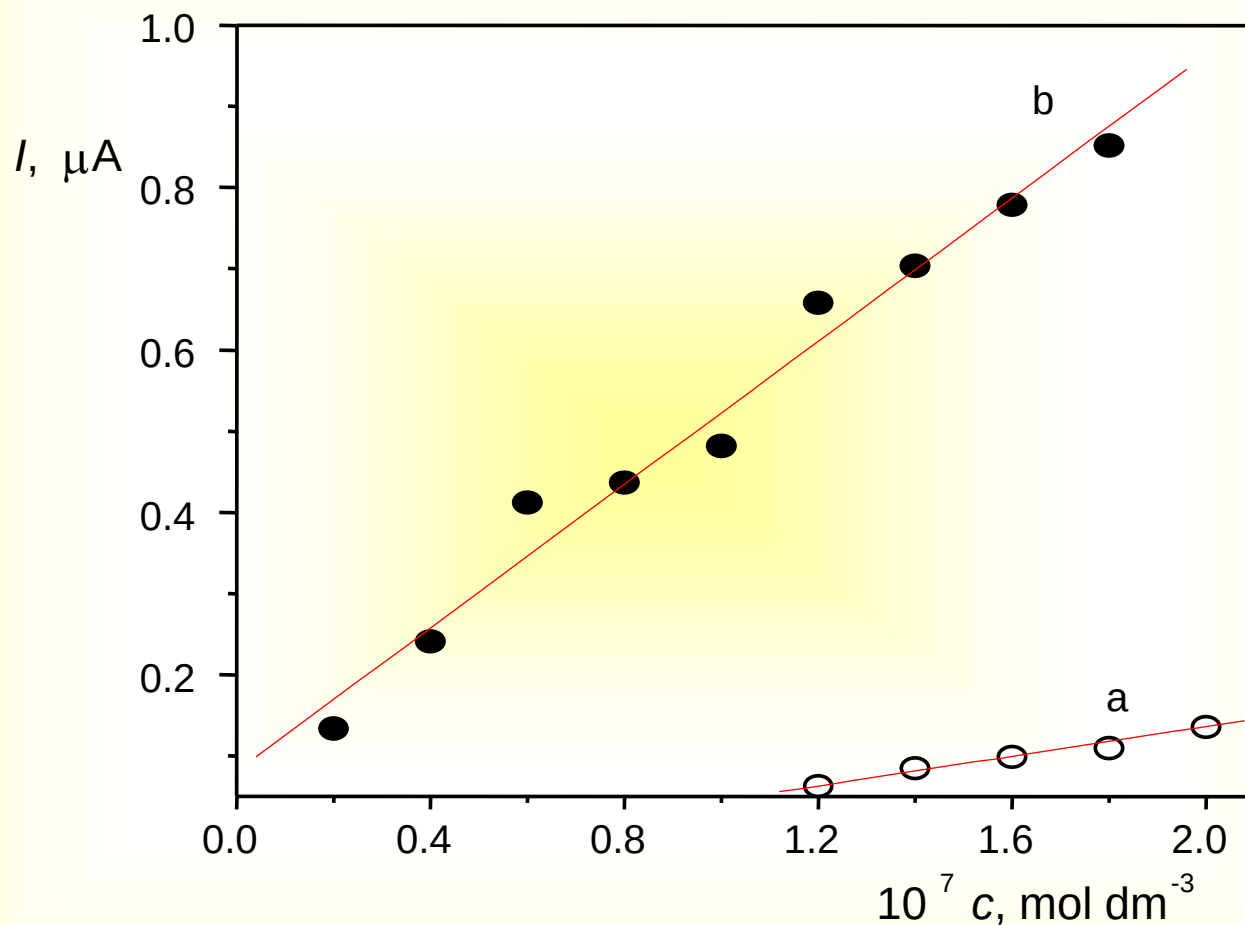
X je NH_2

OH

NO_2

Ref.: A. Ferancová et al., Bioelectrochemistry, 67, 191 (2005).

DPV kalibrační závislost pro 1-aminopyren



180 s akumulace na SPE (a), DNA/SPE (b)
z 0,02 mol/l octanového pufru pH 5,0 s 1% DMSO

Poškození DNA

■ mírné strukturní změny

- asociační interakce s hostujícími molekulami

■ silná degradace (zlomy vláken)

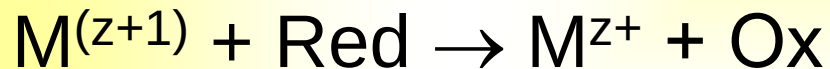
- **reaktivní druhy kyslíku** (ROS jako O_2^- , $OH^\cdot$, 1O_2 , H_2O_2 , $ROOH$), RNS a RSS při **oxidačním stresu**)
- chemické nukleázy
- UV světlo, ionizující záření

■ chemické změny bází DNA

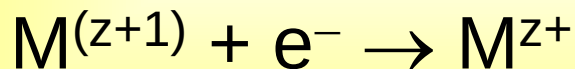
- alterace 1 báze (depurinace, deaminace, alkylace, inserce nukleotidu, inkorporace analogu báze)
- alterace 2 bází (tyminový dimer, kovalentní můstek)
- příčná spojení (mezi bázemi jednoho nebo protějšího řetězce, mezi DNA a proteiny, např. histony)

Tvorba radikálů kyslíku

Reakce Fentonova a Haber Weissova typu

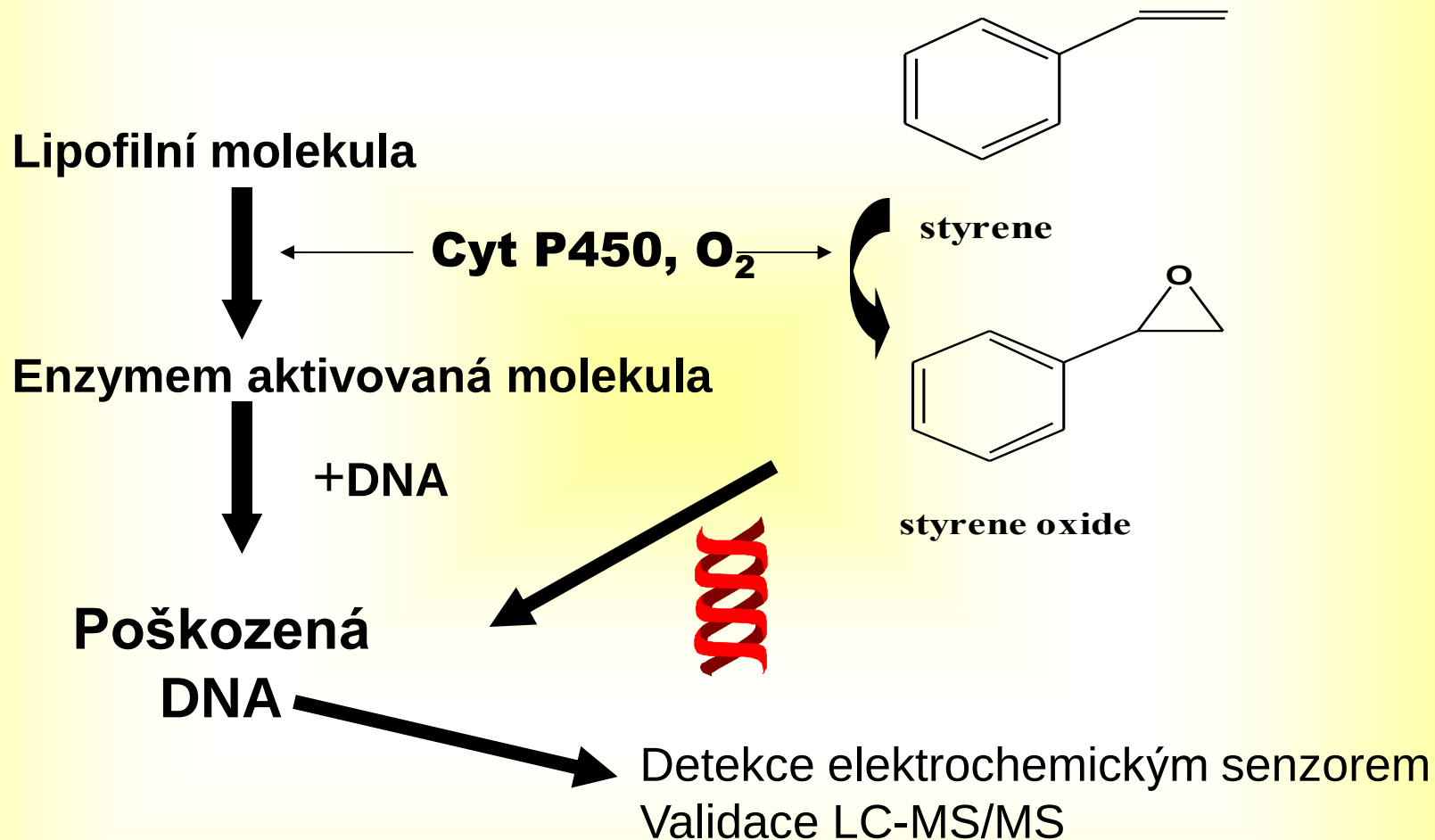


Red = kyselina askorbová,
polyfenoly,
glutathion



elektrochemicky

Enzymatická aktivace látky při screeningu chemické toxicity



Ref.: A. Magweru, J. F. Rusling et al., Electroanalysis 16, 1132 (2004),
Anal. Chem. 76, 5557 (2004)