



Biofyzikální ústav AVČR, Brno
Centrum biofyzikální chemie, bioelektrochemie a bioanalýzy



Elektrochemické DNA-biosenzory. Analýza nukleotidových sekvencí, mutací a polymorfismů

Miroslav Fojta

6.6.2007 Praha, kurz **Senzory**



Trocha historie...

DNA...

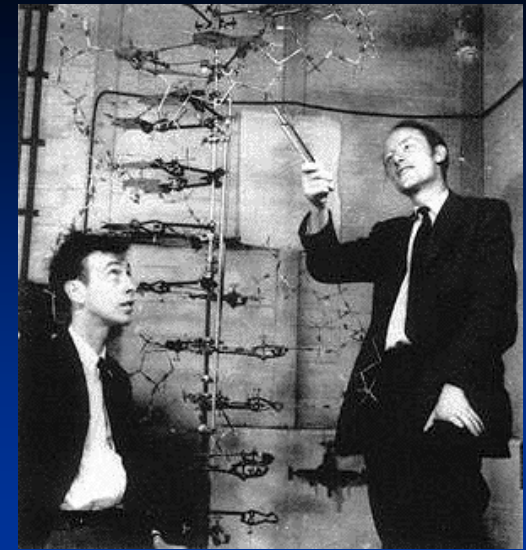
1869 Miescher: objev DNA jako do té doby neznámé složky buněk (leukocytů)

1944 Avery: DNA je zodpovědná za transformaci (změnu vlastností) buněk

1950 Herschey a Chase: DNA je genetickým materiálem buněk

Trocha historie...

Struktura DNA...

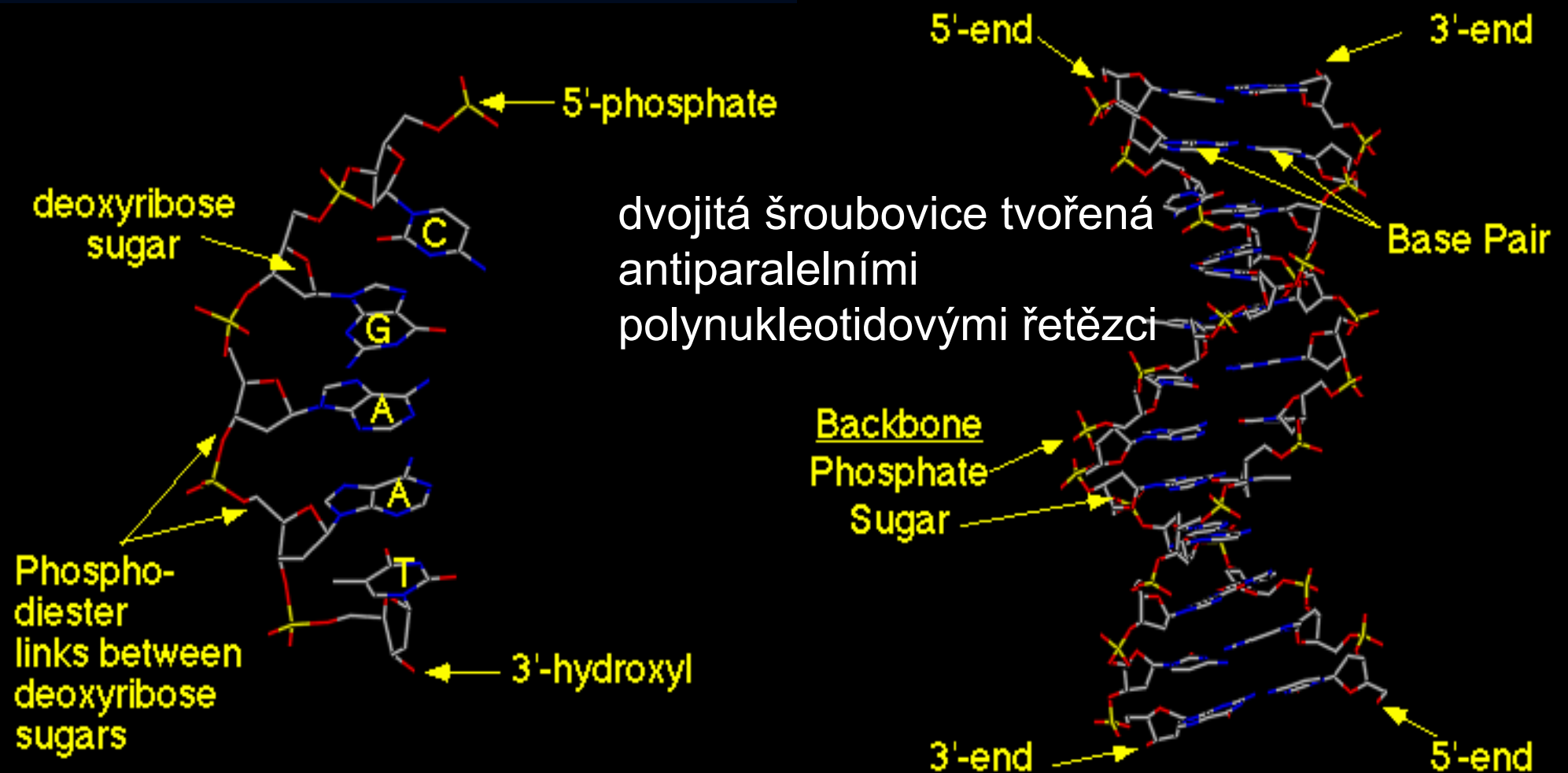


1953: James Watson, Francis Crick, Rosalind Franklin, Maurice Wilkins: dvoušroubovice DNA

1962: Nobelova cena (JW, FC, MW)

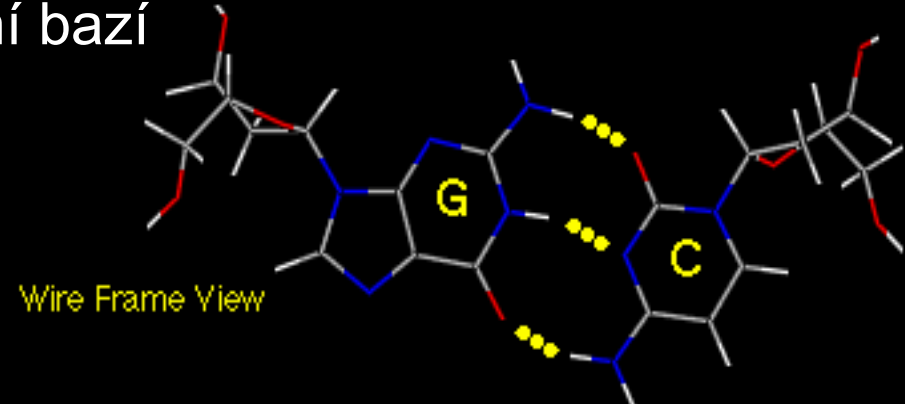
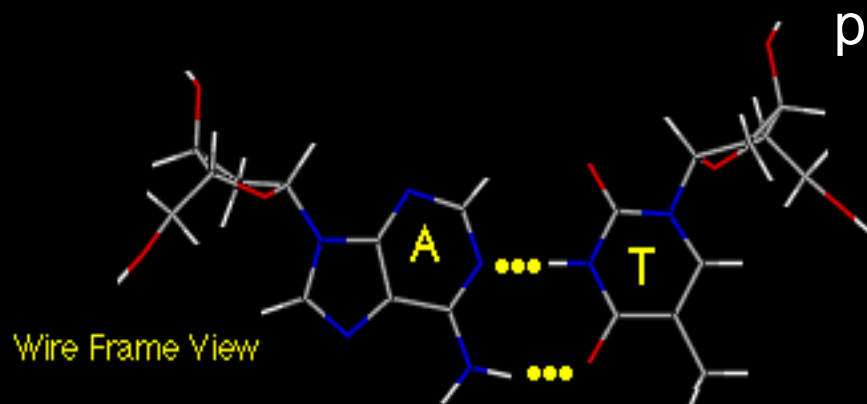
vysvětlení základních principů uchování, předávání a exprese dědičné informace





dvojitá šroubovice tvořená
antiparalelními
polynukleotidovými řetězci

párování bazí



Trocha historie...

Elektrochemická analýza nukleových kyselin



1958 – 1960 Emil Paleček: polarografie DNA

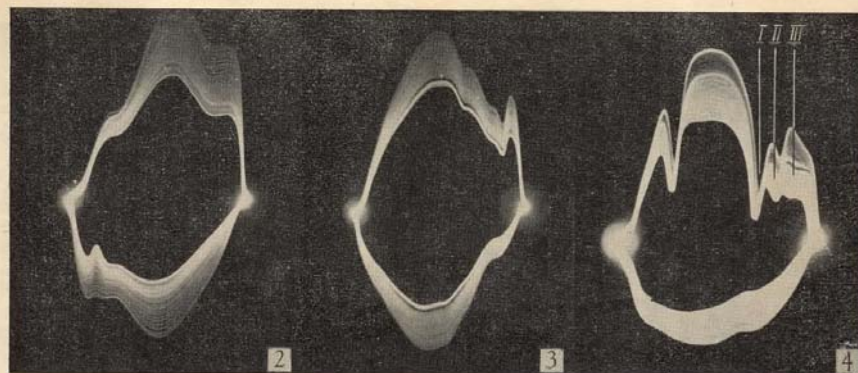


Fig. 2. 100 μ gm. deoxyribonucleic acid/ml. 1 M ammonium formate.
Fig. 3. Apurinic acid in 2 M ammonium formate (concentration corresponding to 2 mgm. of deoxyribonucleic acid).
Fig. 4. 900 μ gm. deoxyribonucleic acid + 5 μ gm. plasma albumin/1 ml. 10^{-3} M hexamine cobalt trichloride in 0.1 M ammonium chloride-ammonium hydroxide. Indentations due to cobalt, I; deoxyribonucleic acid, II; protein, III.

(Reprinted from *Nature*, Vol. 188, No. 4751, pp. 656-657, November 19, 1960)

Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid

PROCEEDING from my finding^{1,2} that nucleotides, nucleosides and the bases of nucleic acids can be analysed by alternating current oscillographic polarography³⁻⁵, I have also tried to study polymerized deoxyribonucleic acid by this method.

The apparatus used was a Polaroskop P 524 (Křížek, Praha). With this apparatus it is possible to plot dE/dt against E (Fig. 1). The analysis was carried out by means of the dropping mercury electrode in the same electrolytes as were used in my previous work^{1,2}. All measurements were carried out with specimens of deoxyribonucleic acid from calf thymus.

I have established that in a medium of molar ammonium formate, deoxyribonucleic acid shows an anodic indentation at the same potential as deoxyguanylic acid (Fig. 2). Other characteristics of both indentations are also analogous (dependence on direct voltage, temperature, concentration of the electrolyte), which appears to indicate that that due to

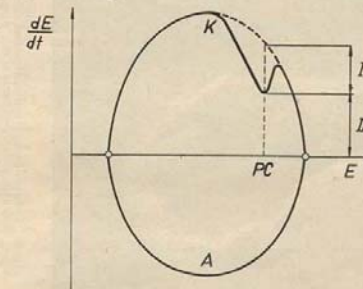


Fig. 1. Graph of dE/dt against E . The nature of the material analysed is characterized by the potential of the indentation (PC), which is somewhat similar to the polarographic half-wave potential. The quantity of the material is characterized by the depth of the indentation. For qualitative analysis, the height II, which can be measured much more easily, is generally measured. K , Cathodic part; A , anodic part.

mercury or amalgam electrodes

7,8 –dihydro guanine
formation



oxidation

G

-2.0

-1.0

CA

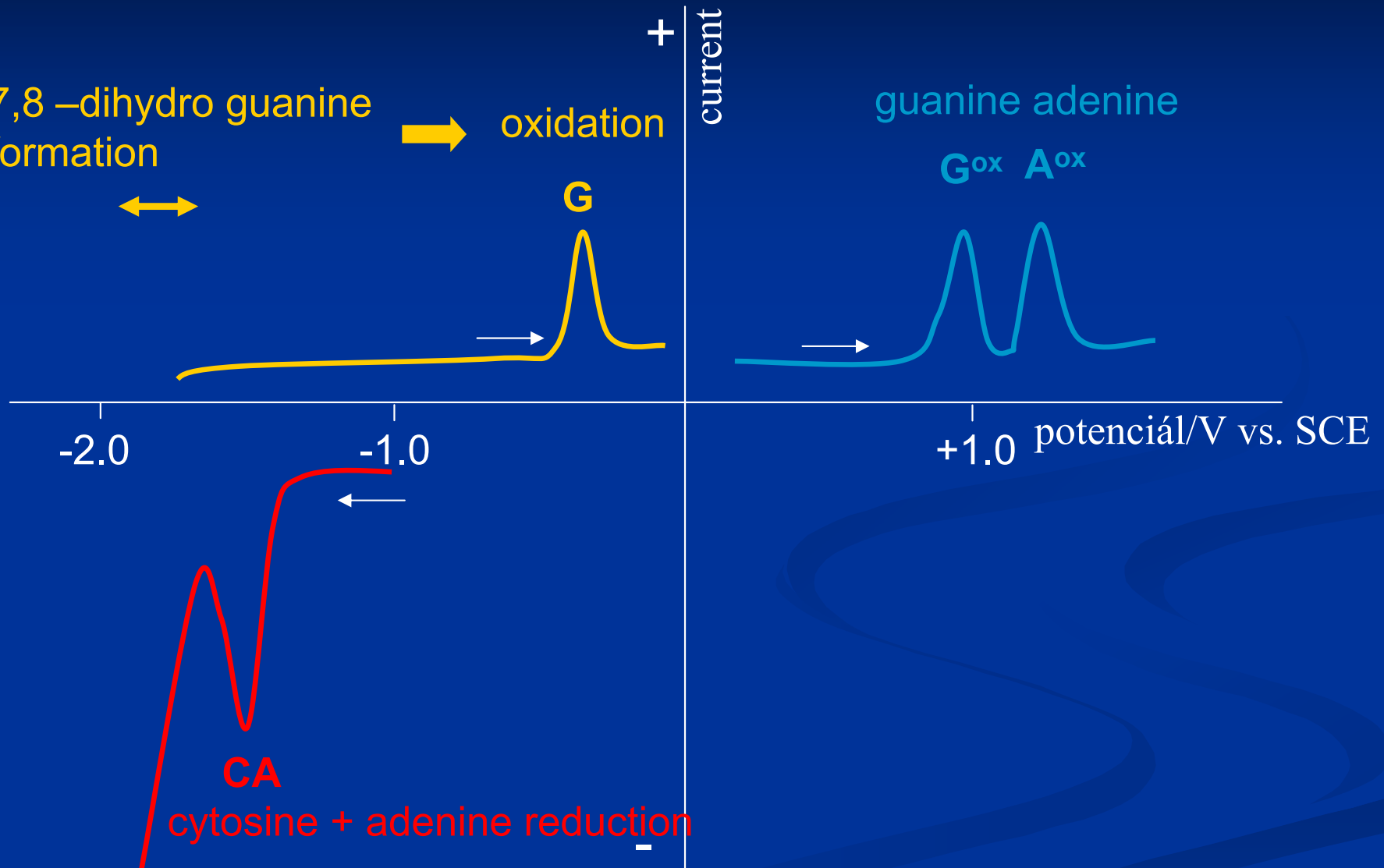
cytosine + adenine reduction

(primarily) carbon electrodes

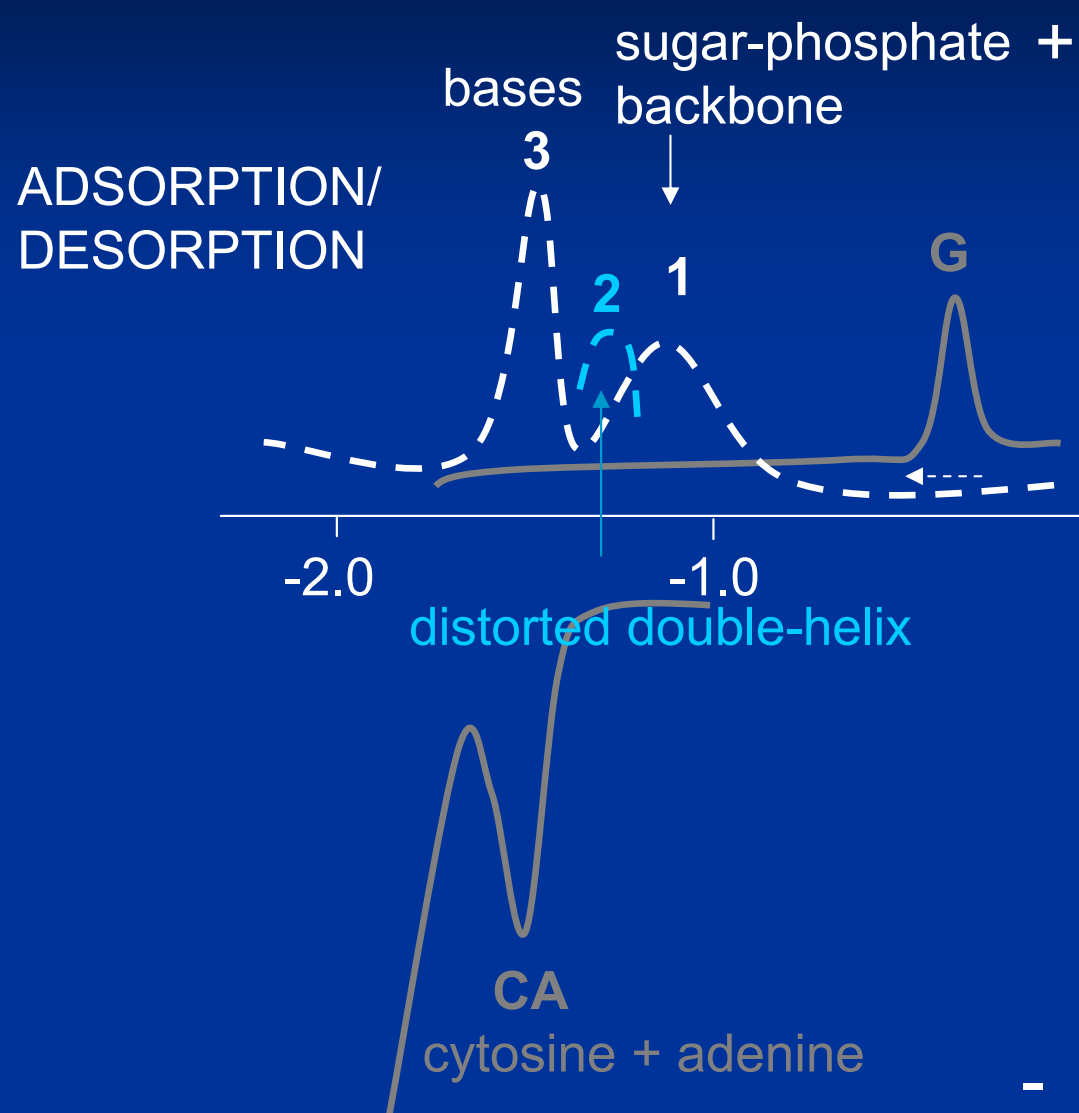
guanine adenine

G^{ox} A^{ox}

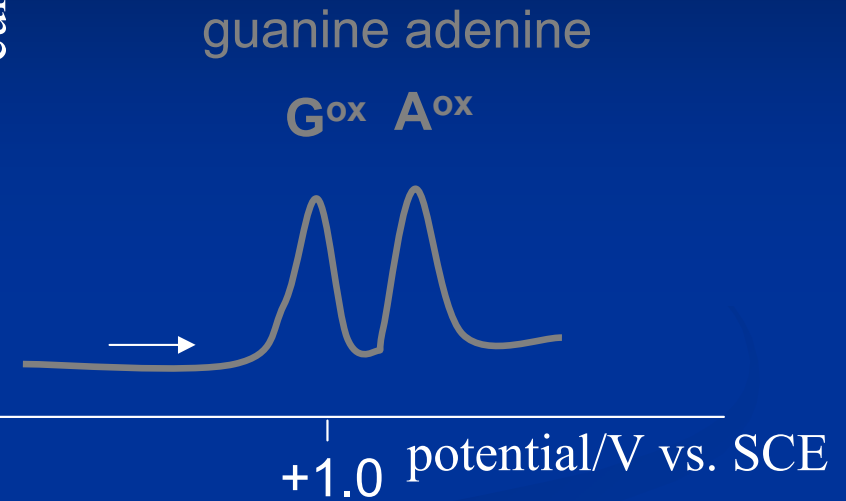
+1.0 potencial/V vs. SCE



mercury or amalgam electrodes



(primarily) carbon electrodes



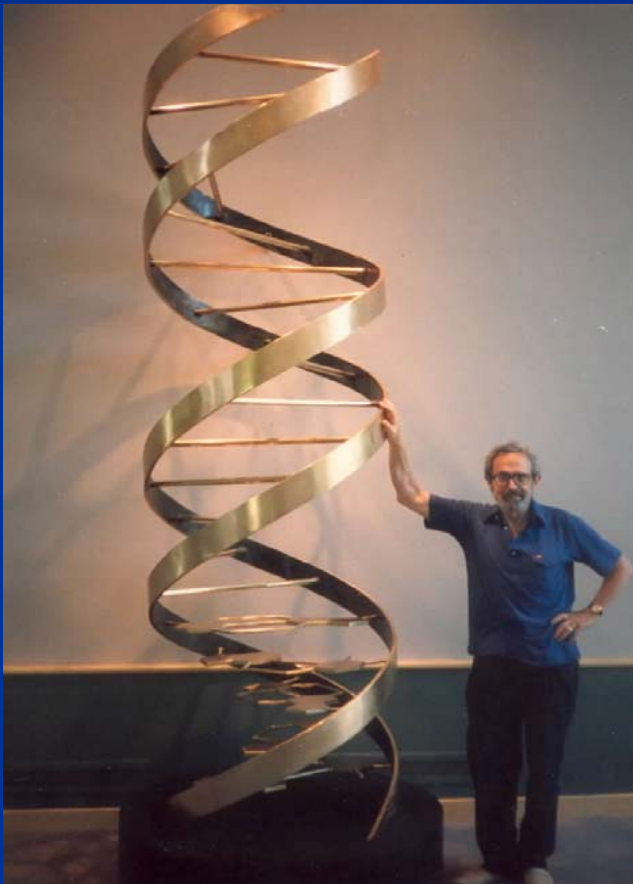
Elektrochemická analýza poskytuje informace

- o struktuře NK a jejích změnách
- o poškození DNA
- chemické modifikaci NK
- o interakcích NK s různými (elektrochemicky aktivními i neaktivními) látkami
- o hybridizaci DNA

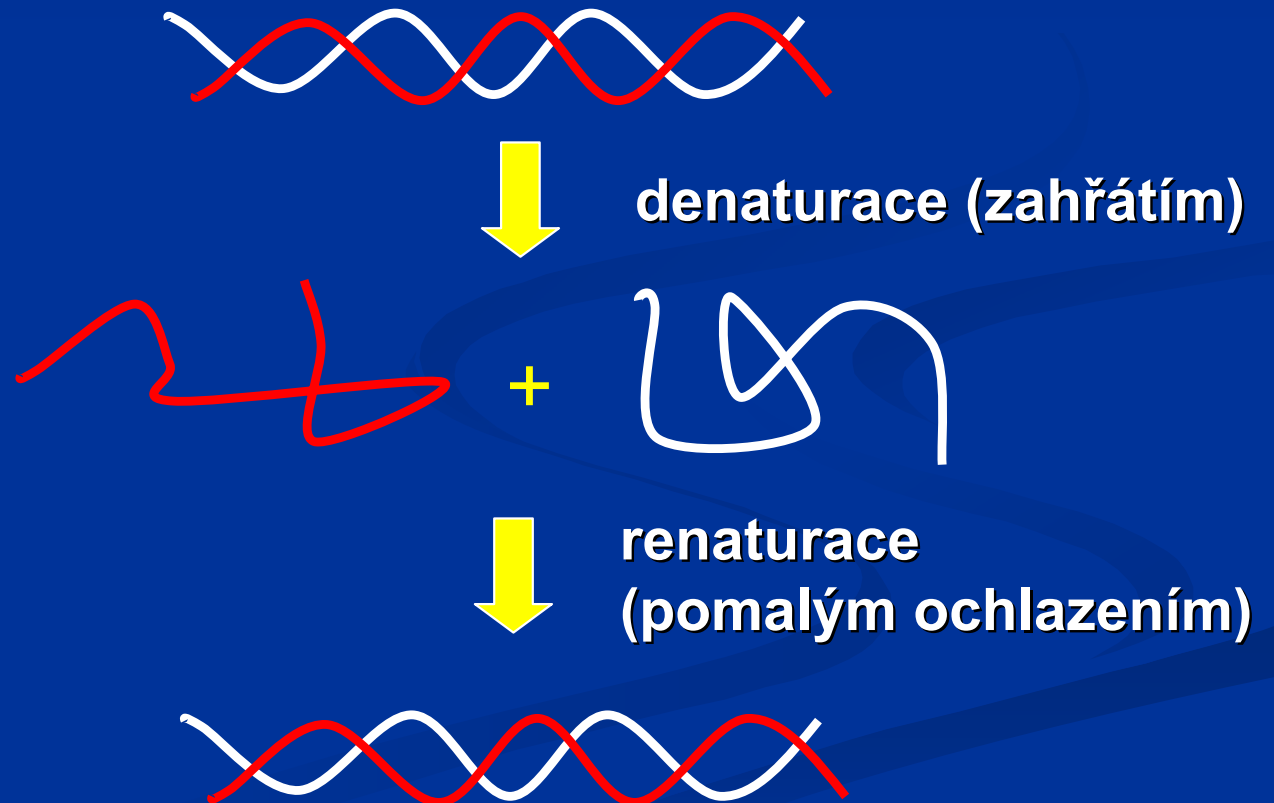
Hybridize DNA

Trocha historie...

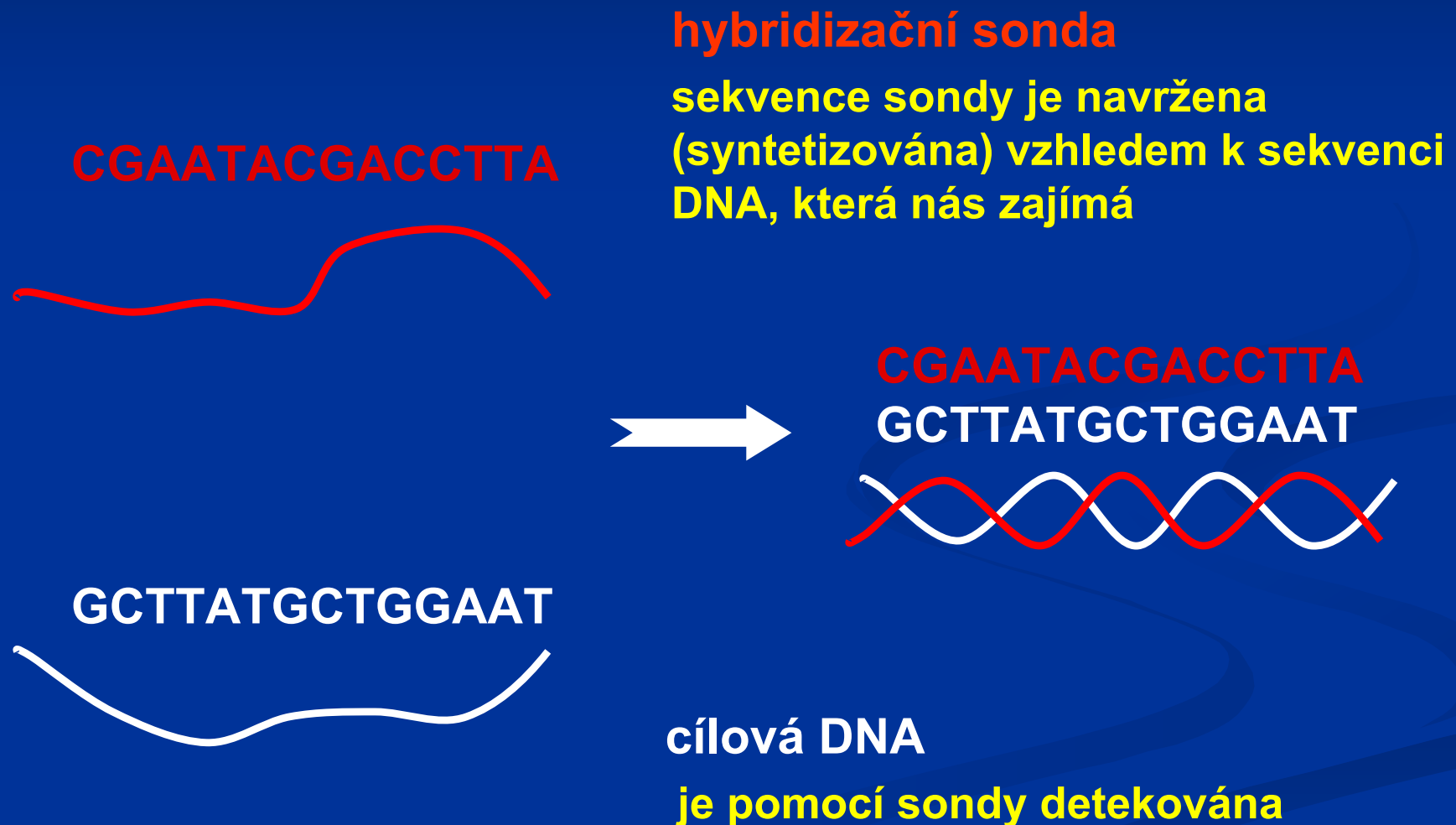
Hybridizace DNA



1963 Julius Marmur: renaturace DNA



Hybridizace DNA (RNA) je založena na principu tvorby dvoušroubovice ze dvou komplementárních řetězců



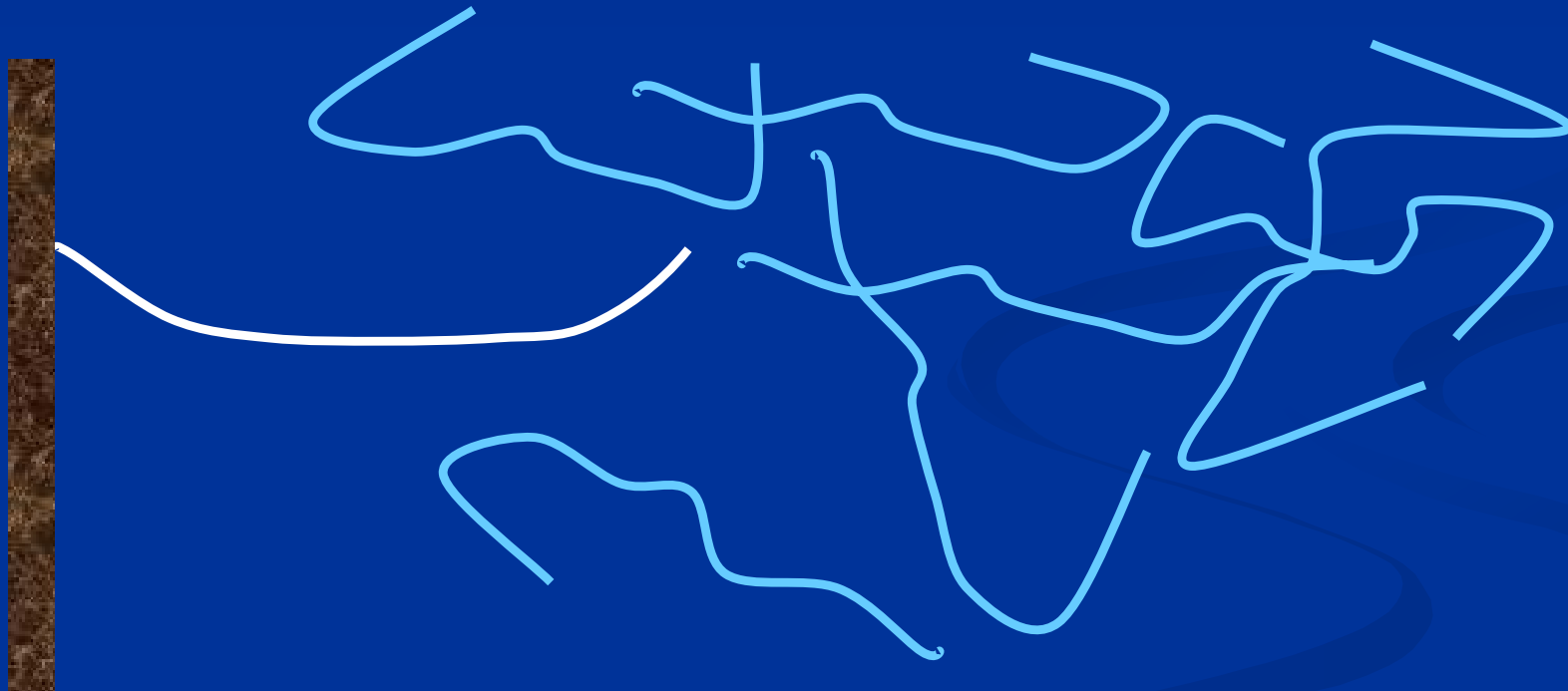
Hybridizace DNA (RNA) je založena na principu tvorby dvoušroubovice ze dvou komplementárních řetězců

Tento princip je v různém uspořádání využíván při řadě rutinních analýz:

- detekce a identifikace určitých nukleotidových sekvencí
- detekce mutací, „polymorfismů“ v určitých úsecích genomu
- sledování exprese genů
-
- detekce patogenů, diagnostika, forenzní medicína...

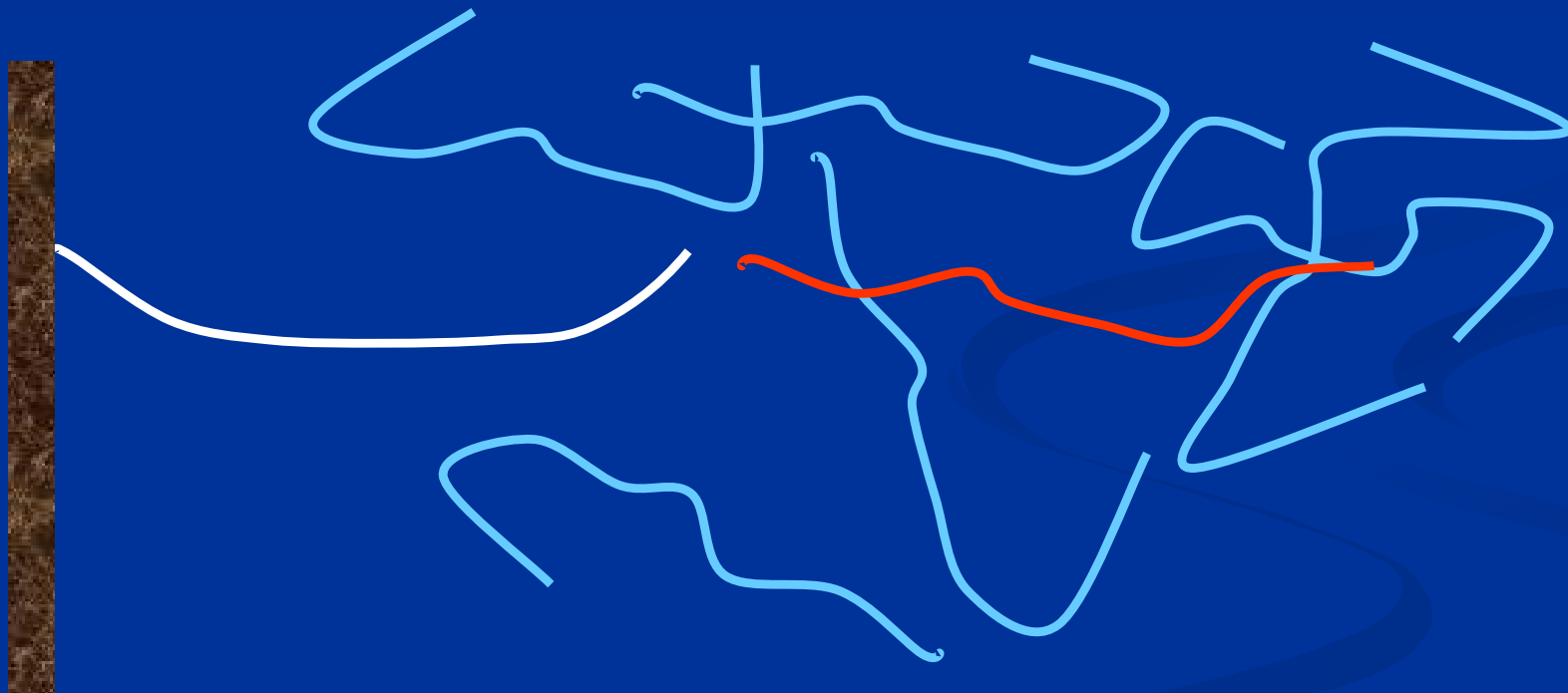
Z praktických důvodů je výhodné zakotvit jeden z řetězců („sondu“) na povrchu

imobilizovaná sonda je vystavena analyzovanému vzorku DNA (RNA)



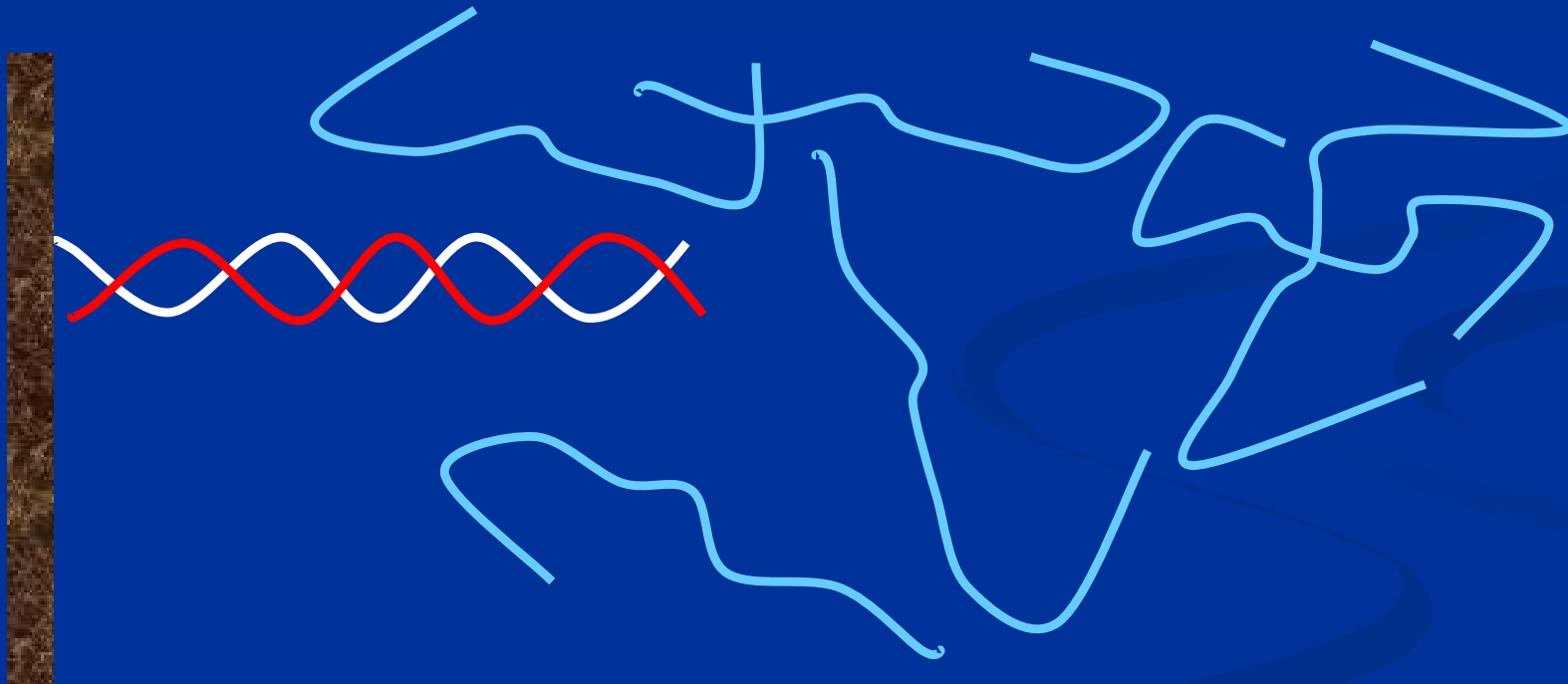
pokud vzorek obsahuje vlákno DNA (RNA) o sekvenci komplementární k sondě („cílovou sekvencí“), vytvoří se na povrchu dvoušroubovice („duplex“, „hybrid“)

Z praktických důvodů je výhodné zakotvit jeden z řetězců („sondu“) na povrchu



pokud vzorek obsahuje vlákno DNA (RNA) o sekvenci komplementární k sondě („cílovou sekvenci“), vytvoří se na povrchu dvoušroubovice („duplex“, „hybrid“)

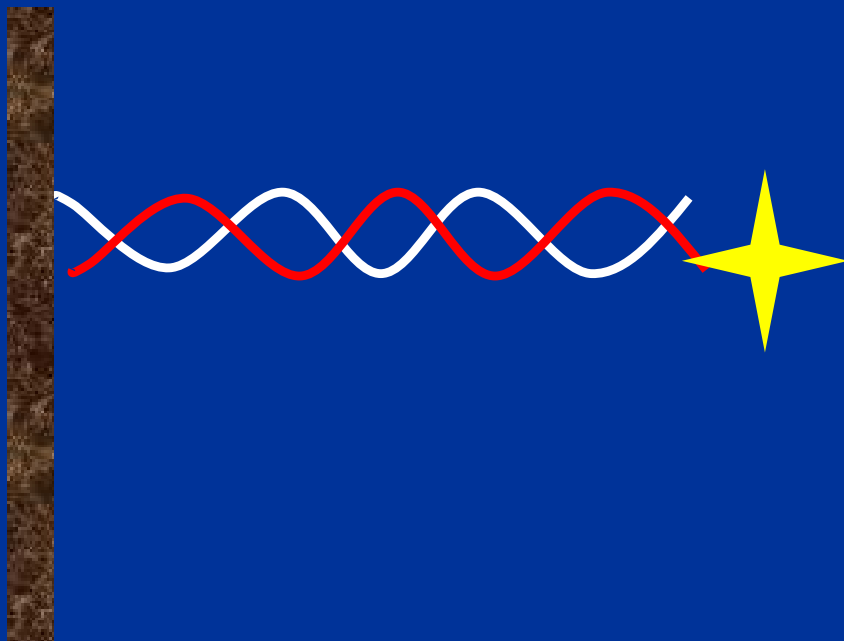
nespecifické molekuly DNA jsou poté odstraněny (odmyty)



pokud vzorek obsahuje vlákno o sekvenci komplementární k sondě („cílovou sekvenci“), vytvoří se na povrchu dvoušroubovice („duplex“, „hybrid“)

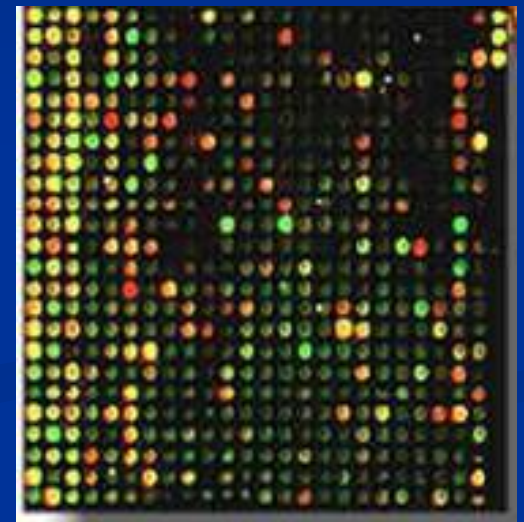
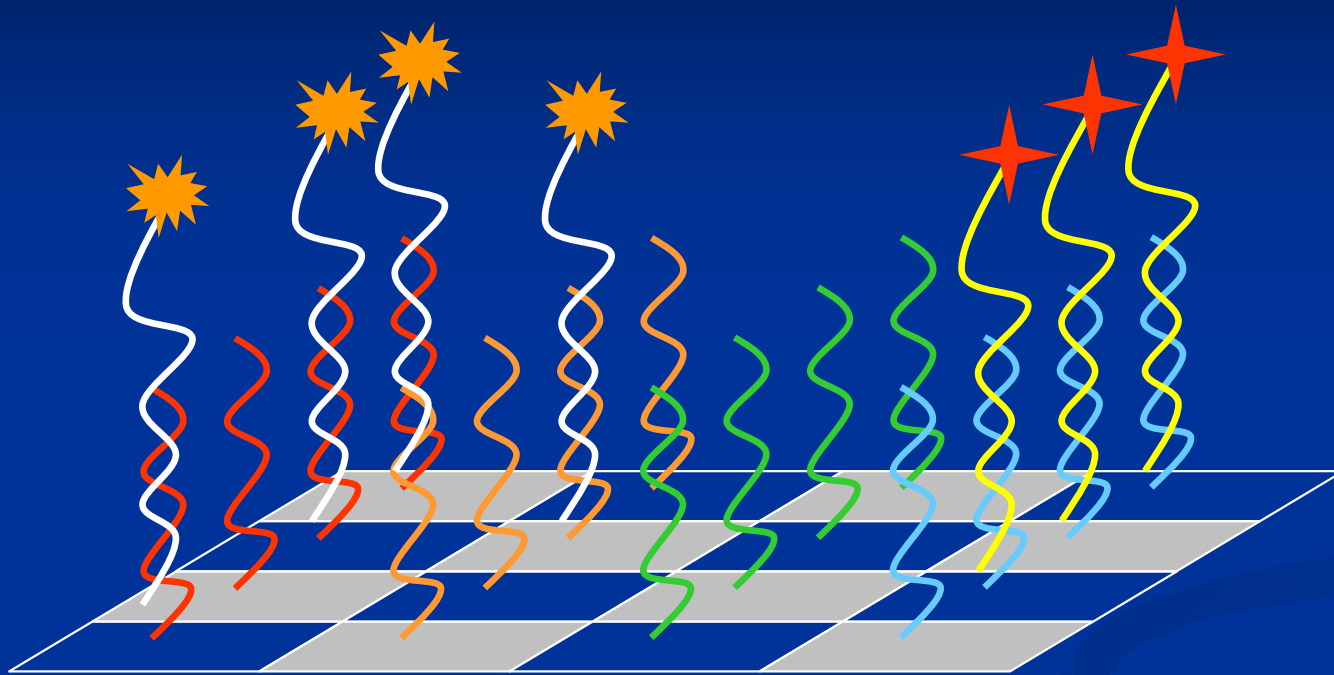
nespecifické molekuly DNA jsou poté odstraněny (odmyty)

následuje detekční krok, při kterém je zjištěno, zda došlo k hybridizaci



výhodné je cílovou DNA označit dobře detekovatelnou značkou (radionuklidem, fluoroforem...)

DNA „čipy“ („arrays“):



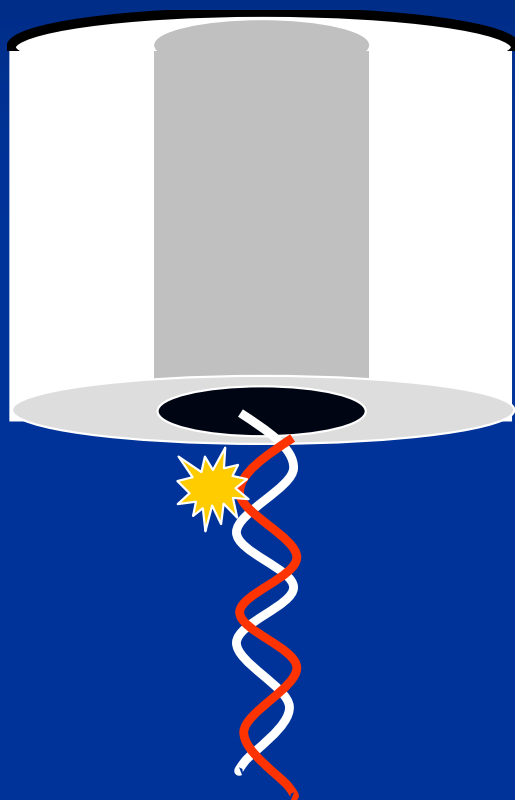
- aplikace mnoha sond současně
- aplikace různých (různě“barevných“) fluorescenčních značek – vysoce paralelní analýza
- komerčně dostupné přístroje (Affymetrix...)

Proč vývoj elektrochemických biosenzorů?

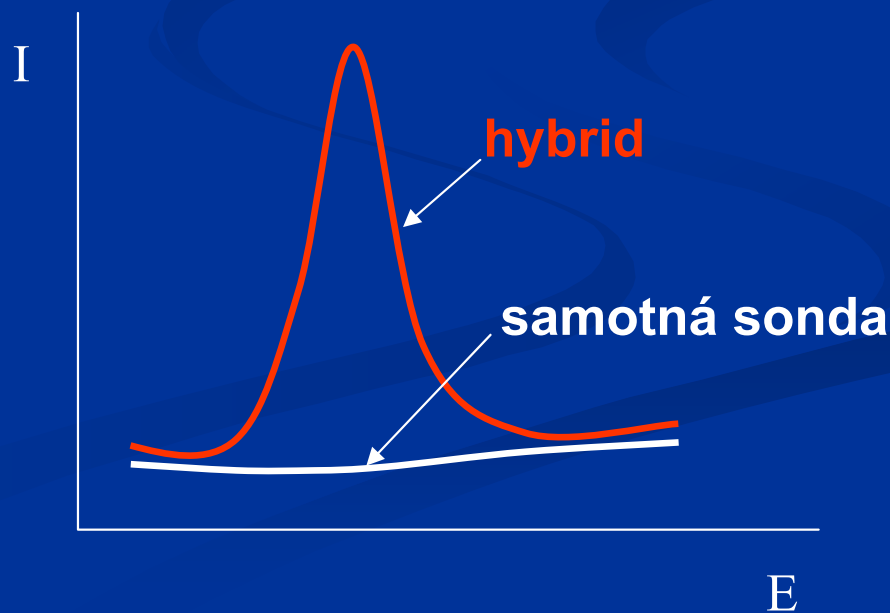
- rozvoj genomiky v souvislosti s dokončením sekvencování lidského genomu
- sekvence lidského genomu tak, jak je stanovena, je **průměrná**
- analýza **individuálních odchylek** (polymorfismy, mutace) je důležitá (mj. pro diagnostiku dědičných chorob, sledování mutací v důležitých genech, výběr vhodné terapie...)
- klasické metody sekvenování DNA jsou zdlouhavé a obtížné
- analýza pomocí hybridizace DNA je výrazně efektivnější
- komerčně dostupné fluorescenční analyzátory (ve spojení s DNA čipy) jsou nákladné a tudíž vhodné spíše pro specializovaná pracoviště
- potřeba nových, účinných, široce dostupných detekčních metod
- v současné době se zdá, že k tomuto cíli by mohla vést cesta přes využití elektrochemických metod

Elektrochemický senzor pro hybridizaci DNA:

elektroda se zakotvenou hybridizační sondou na povrchu

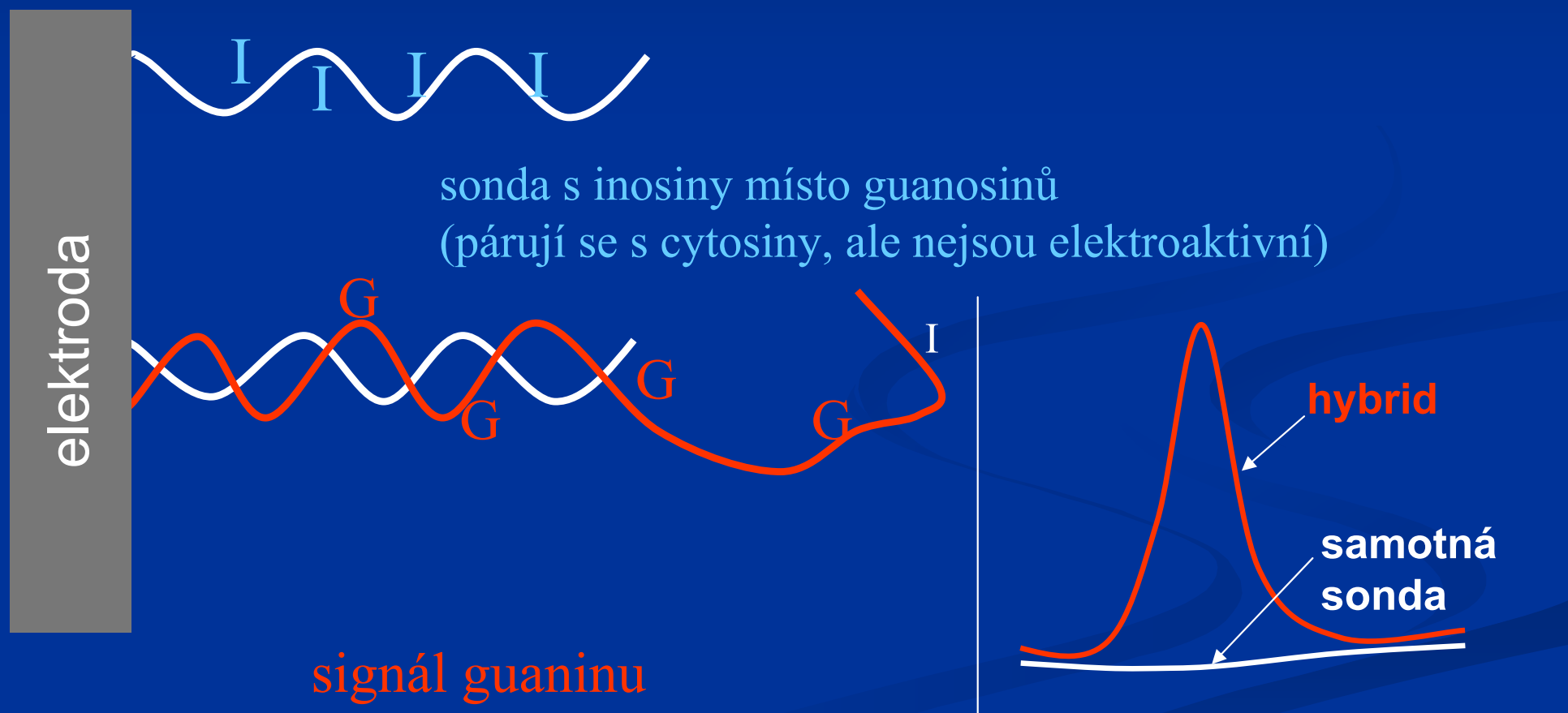


- hybridizace s cílovou DNA se provede stejně jako v případě optických senzorů
- odezvou na hybridizační událost je **elektrochemický (proudový) signál**



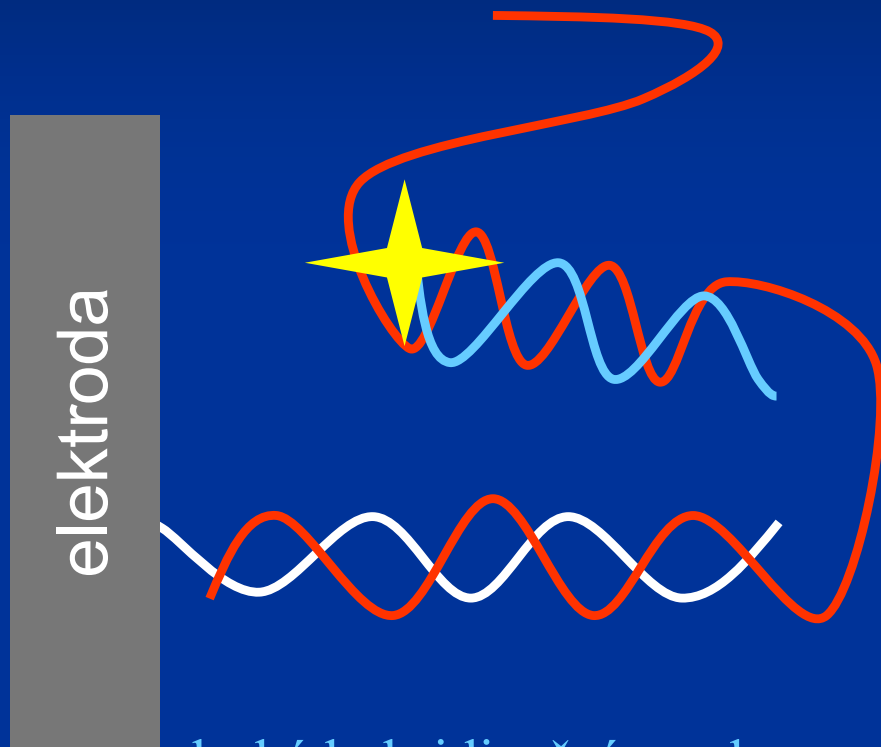
Příklady elektrochemických senzorů pro hybridizaci DNA

**využití vlastní elektroaktivity cílové DNA
(např. oxidačního signálu guaninu)**



Příklady elektrochemických senzorů pro hybridizaci DNA

signální (reporterové) sondy



druhá hybridizační sonda, modifikovaná elektroaktivní značkou, rozpoznávající sekvenci v cílové DNA poblíž sondy zakotvené na elektrodě

Příklady elektrochemických senzorů pro hybridizaci DNA

princip „molekulárního majáku“



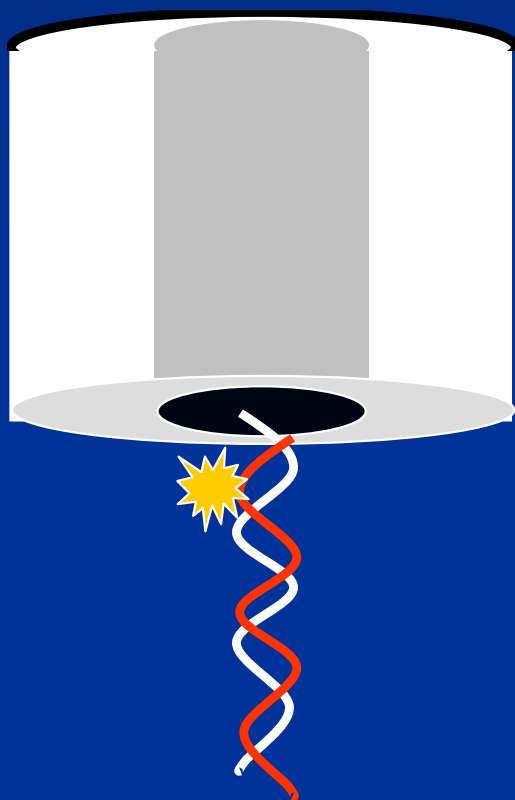
po hybridizaci se značka oddálí od povrchu a signál zmizí

„Signal off“ and „signal on“ odpověď



- při analýze reálných vzorků DNA (delší, přirozeně dvojřetězcové molekuly, obvykle amplifikované pomocí PCR) je málokdy výtěžek hybridizace (tj. „obsazení“ hybridizační sondy cílovým vláknem) blízko 100 %
- „signal on“ techniky jsou proto spolehlivější

Elektrochemický senzor pro hybridizaci DNA: elektroda se zakotvenou hybridizační sondou na povrchu

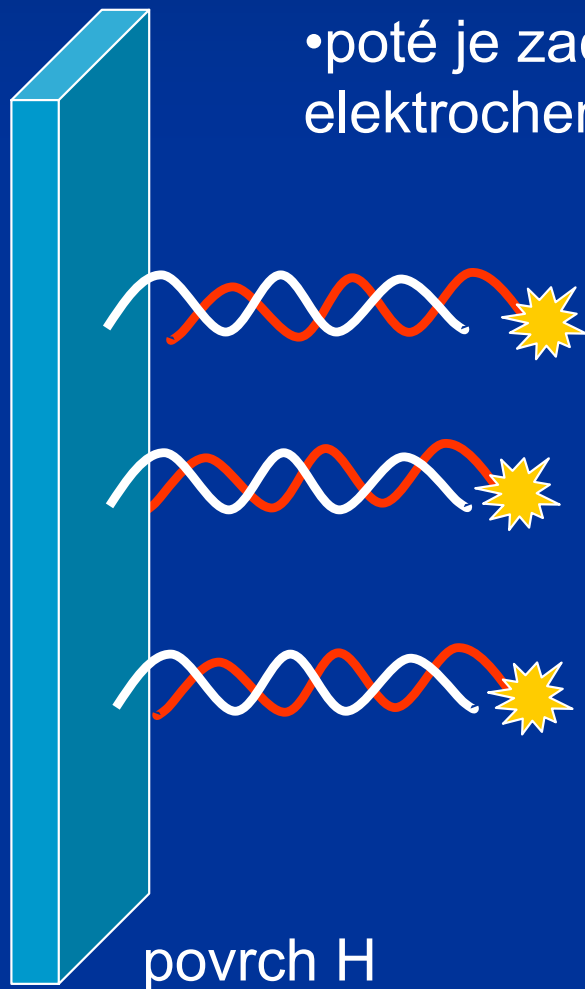


tzv. **jednopovrchová metoda** (hybridizační i detekční krok probíhá na stejném povrchu elektrody)

to vyžaduje hledat takové podmínky, za kterých je pracovní povrch vhodný jak pro hybridizaci DNA, tak pro elektrochemické měření

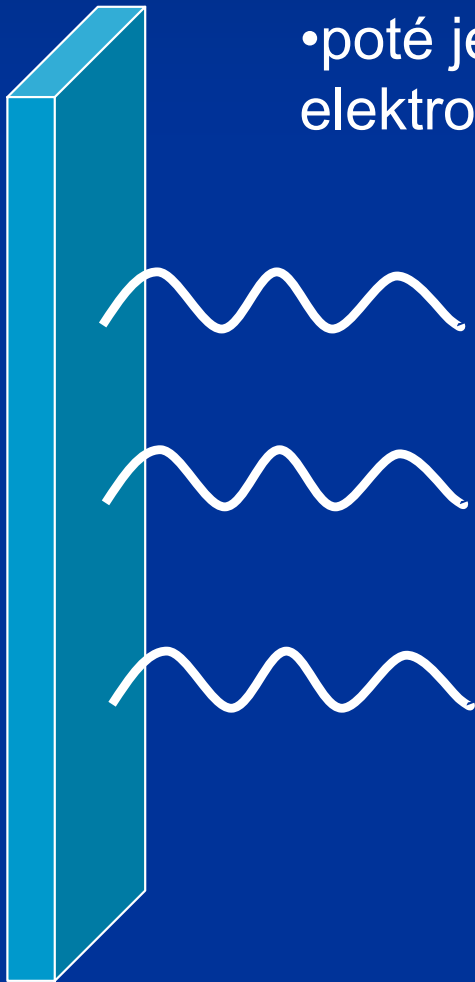
Dvoupovrchová strategie:

- hybridizace se provede na jednom povrchu (H), který pro tento účel optimalizován; nemusí mít vlastnosti elektrody
- účinné zachycení a separace cílové DNA
- poté je zachycená cílová DNA z povrchu H uvolněna a elektrochemicky stanovena

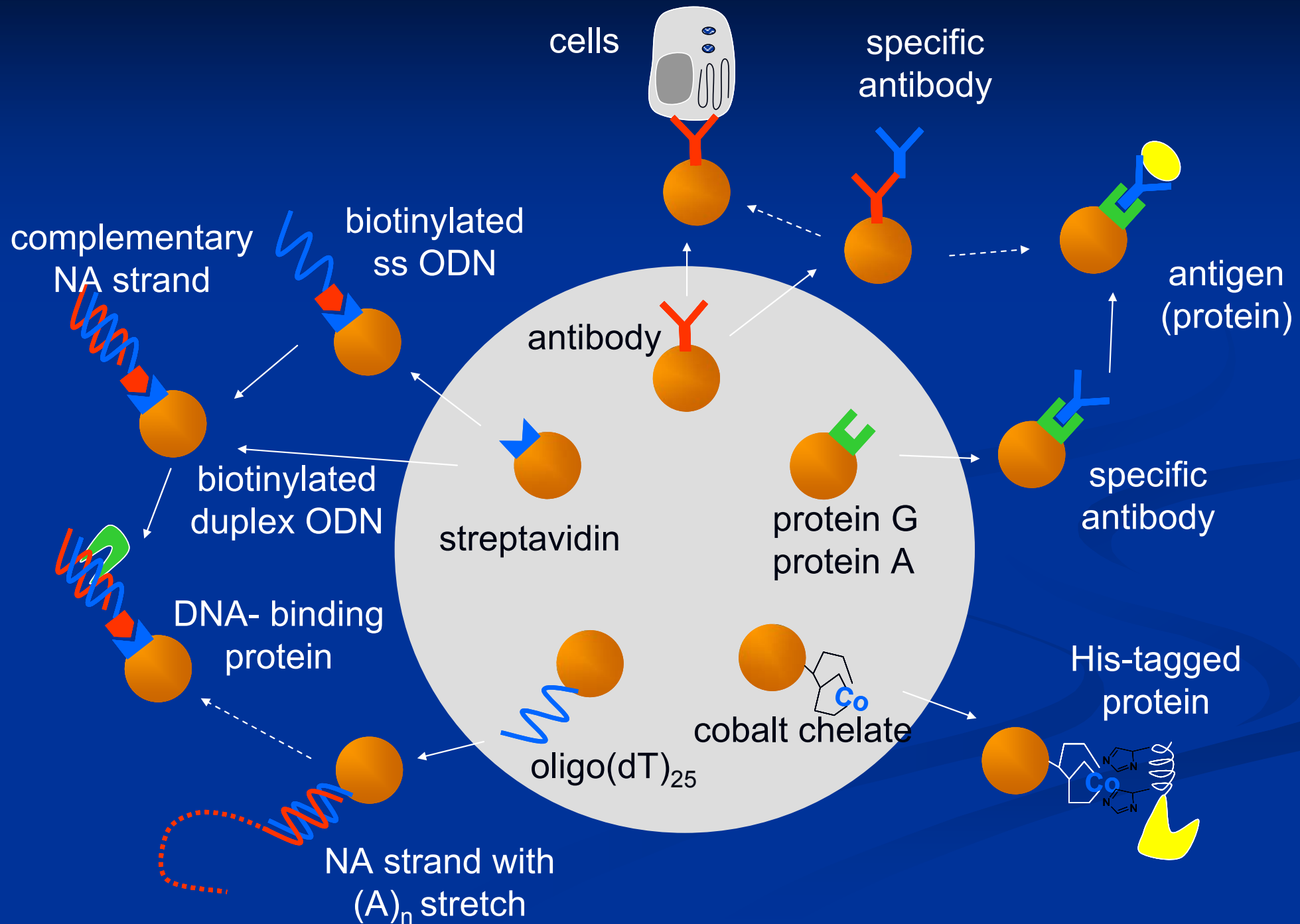


Dvoupovrchová strategie:

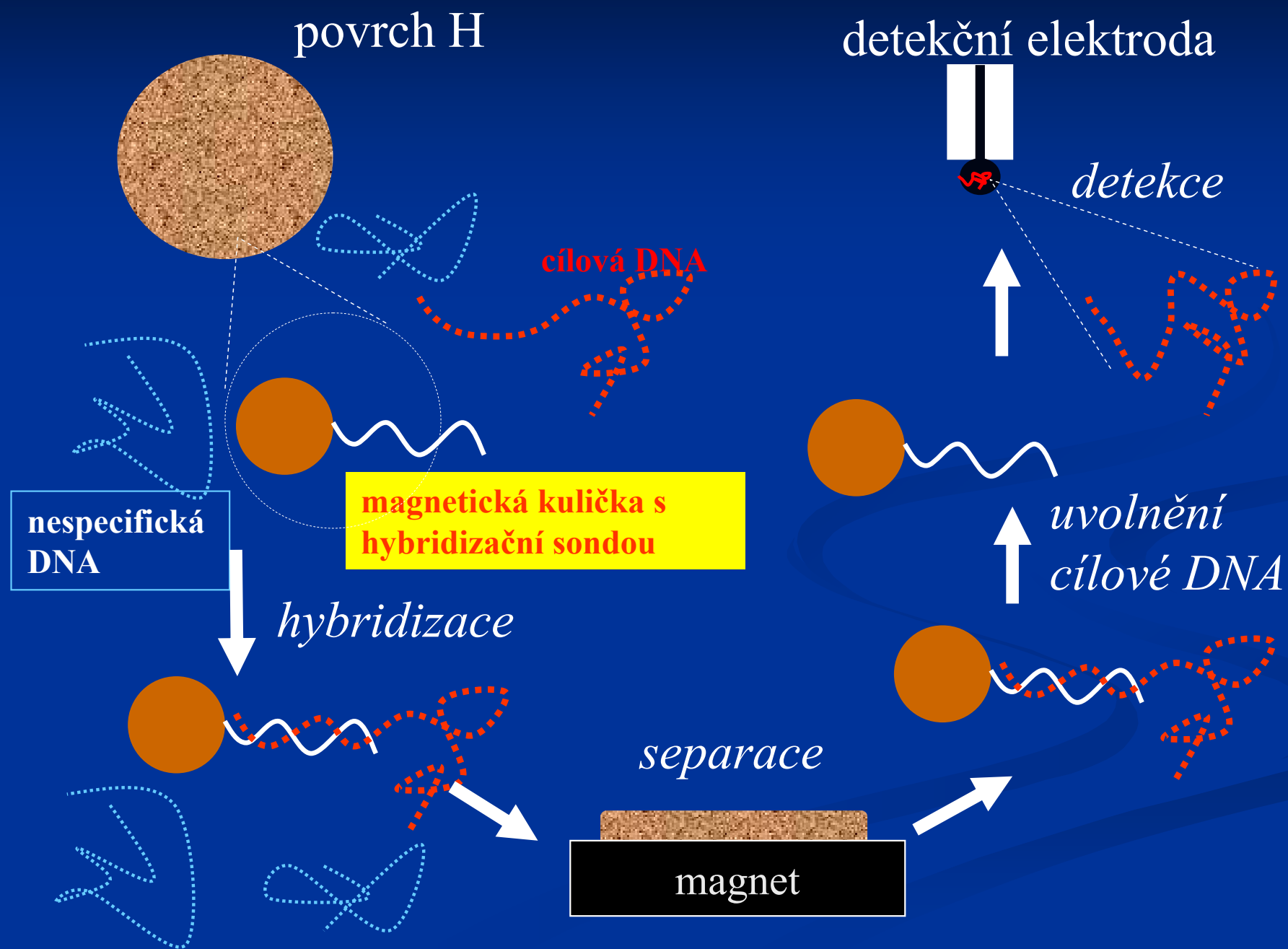
- hybridizace se provede na jednom povrchu (H), který pro tento účel optimalizován; nemusí mít vlastnosti elektrody
- účinné zachycení a separace cílové DNA
- poté je zachycená cílová DNA z povrchu H uvolněna a elektrochemicky stanovena



Magnetické mikročástice nesoucí „biorekogniční prvky“



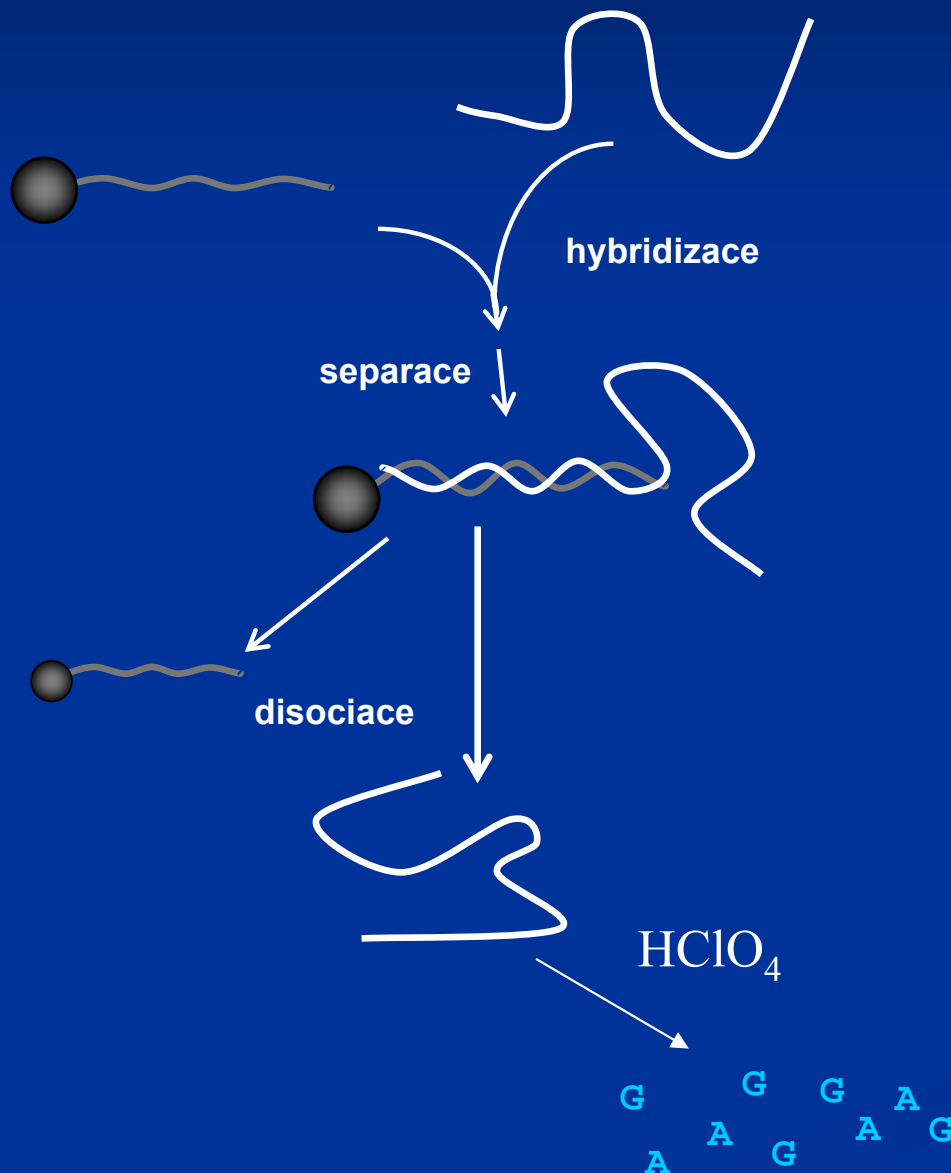
Hybridizace DNA na magnetických nosičích



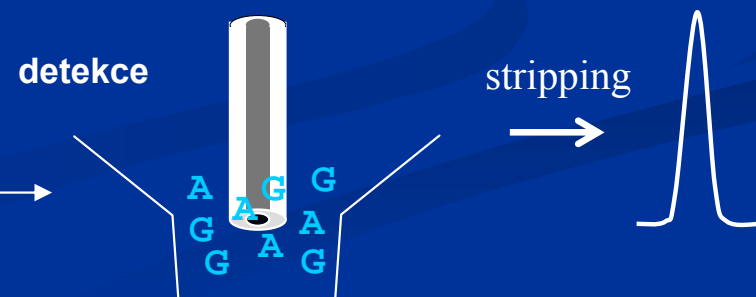
Dvoupovrchová strategie: detekční přístupy

- metody založené na vlastní elektrochemické aktivitě DNA nebo jejích složek („label-free“)
- metody založené na značení cílových DNA nebo signálních sond (příklady)
 - komplexy oxidu osmičelého a jiné kovalentně vázané značky
 - enzymy
 - nanočástice a „kvantové tečky“
 - mikročástice „plněné“ elektrochemicky aktivními látkami
 - uhlíkové nanotrubičky nesoucí elektroaktivní značky nebo enzymy
- amplifikace signálu: zavedení většího počtu molekul/atomů značky do každé signální sondy, katalytické efekty

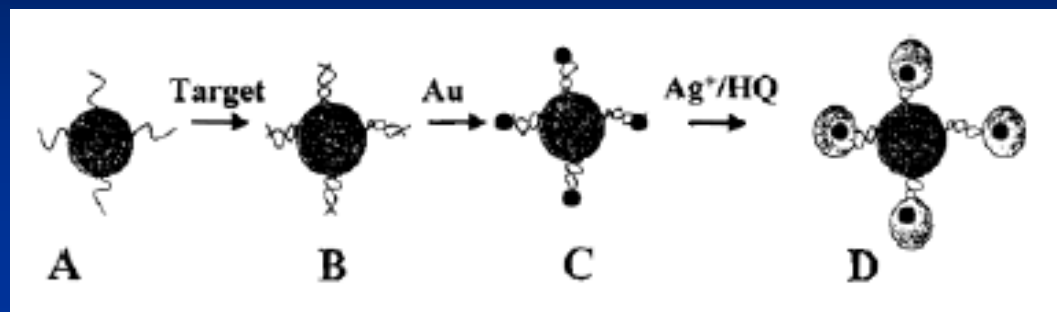
„Label-free“ detekce purinových bazí uvolněných z cílové DNA



- rtuťové a stříbrné amalgamové elektrody: CSV (nerozpustné sloučeniny purinů se rtutí)
- akumulace komplexů purinů s Cu(I) (elektroredukce Cu^{2+} z roztoku nebo oxidace Cu^0 z materiálu CuSAE)
 - Hg a amalgamové eldy: katodický stripping (redukce Cu)
 - uhlíkové elektrody: anodická oxidace akumulovaných purinů

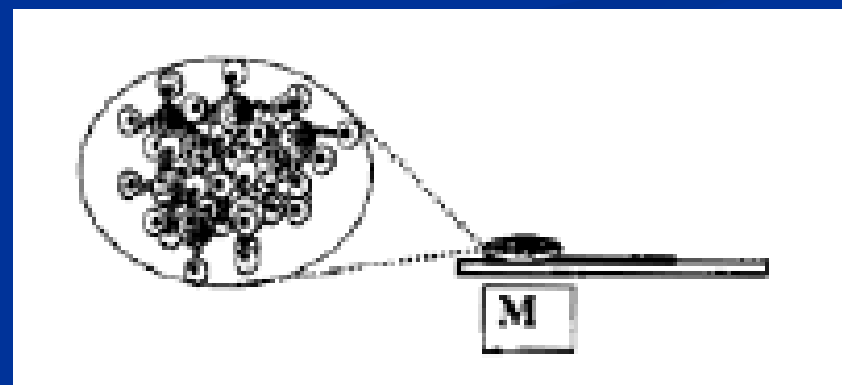


nanočástice jako značky pro DNA (J. Wang):



- A. magnetické částice s DNA sondou
- B. biotinylovaná cílová DNA
- C. zlaté nanočástice se streptavidinem
- D. vyloučení stříbra na zlatě

Částice „pospojované“ hybridizovanou DNA jsou magnetem přitaženy k elektrodě a stříbro je stanoveno elektrochemicky



J. Wang et al. J. AM. CHEM. SOC. 2002, 124, 4208-4209

„elektroactive beads“ (J. Wang):

990 *Langmuir*, Vol. 19, No. 4, 2003

Letters

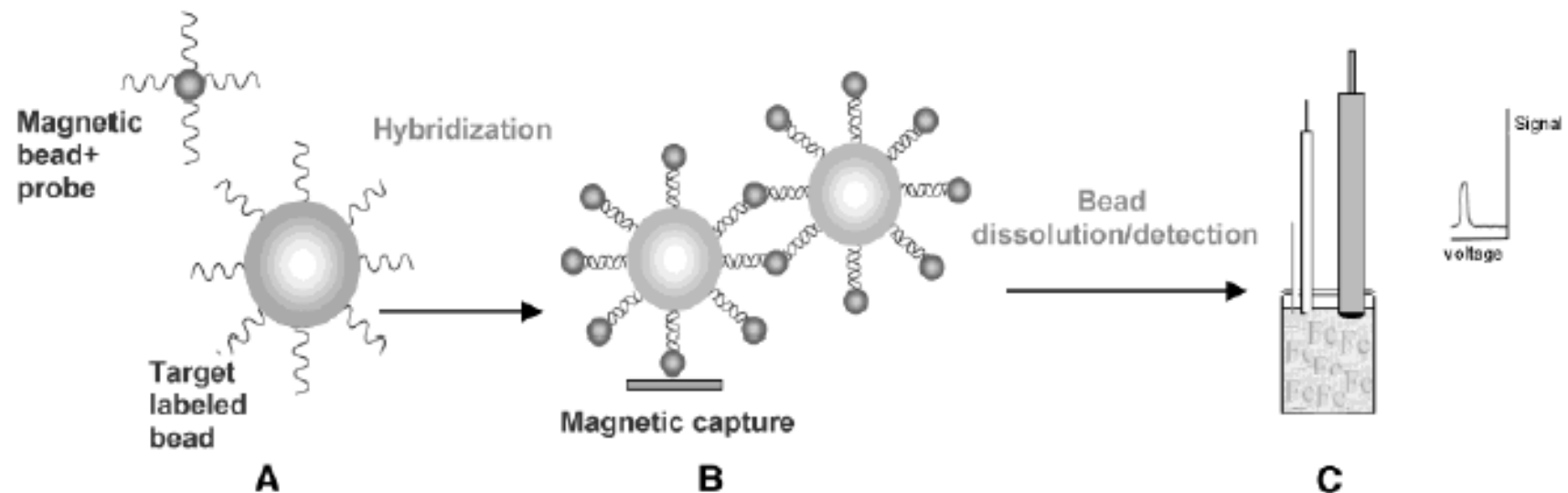


Figure 1. Steps involved in the new genoelectronic protocol: (A) Introduction of probe-coated magnetic beads and target-labeled electroactive beads. (B) Hybridization and magnetic separation. (C) Dissolution of the spheres in acetonitrile, release of the marker, and its chronopotentiometric detection at a glassy carbon electrode. Fc represents the ferrocene marker.

...citlivost 5.1×10^{-21} mol level (31 000 molekul)...

Electrochemical Coding Technology for Simultaneous Detection of Multiple DNA Targets

Joseph Wang,* Guodong Liu, and Arben Merkoçi

Department of Chemistry and Biochemistry, New Mexico State University, Las Cruces, New Mexico 88003-8001

Received December 10, 2002; E-mail: joewang@nmsu.edu

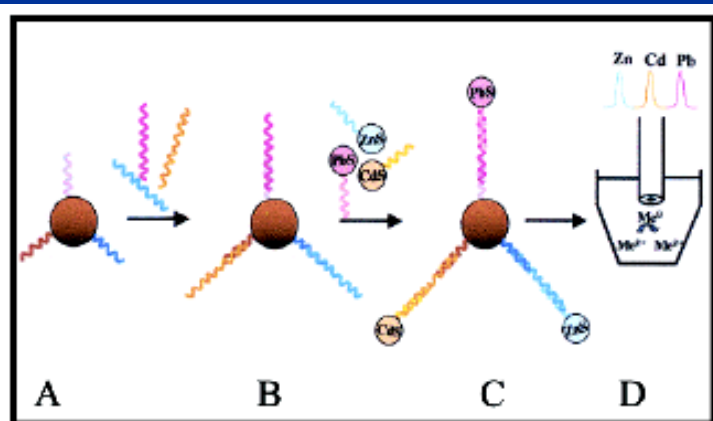
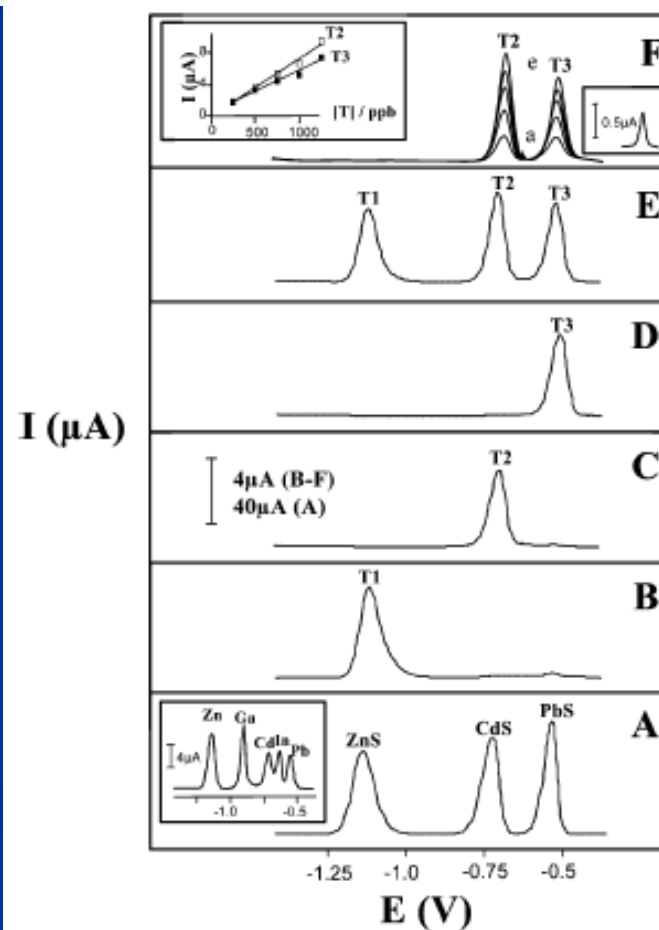
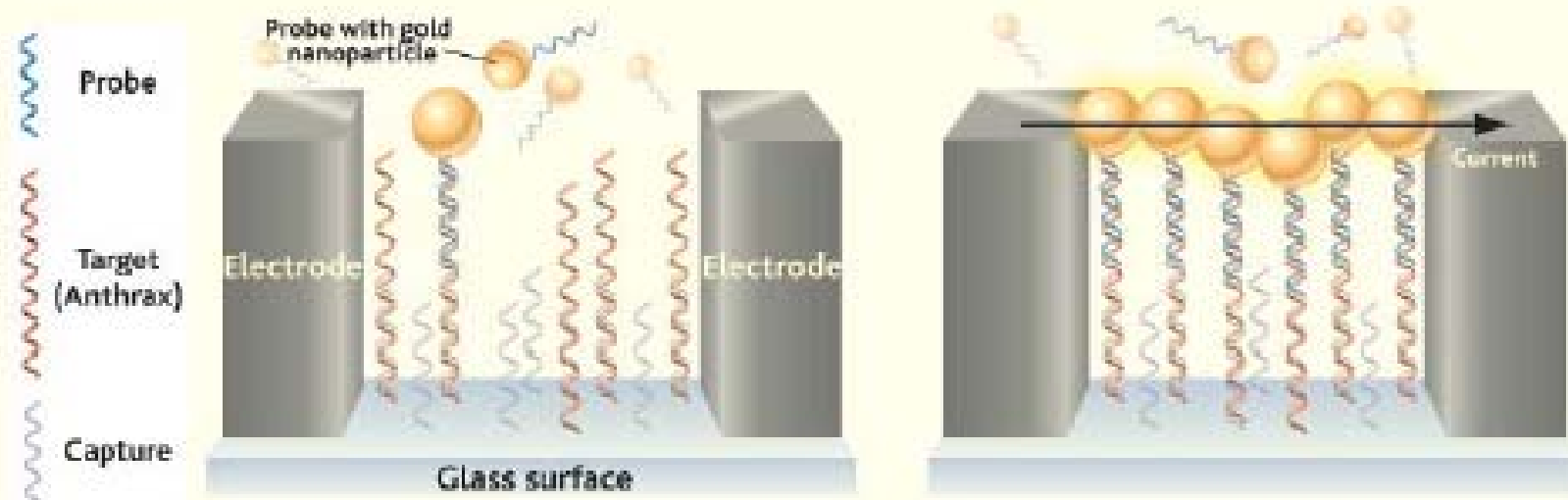


Figure 1. Multi-target electrical DNA detection protocol based on different inorganic colloid nanocrystal tracers. (A) Introduction of probe-modified magnetic beads. (B) Hybridization with the DNA targets. (C) Second hybridization with the QD-labeled probes. (D) Dissolution of QDs and electrochemical detection.



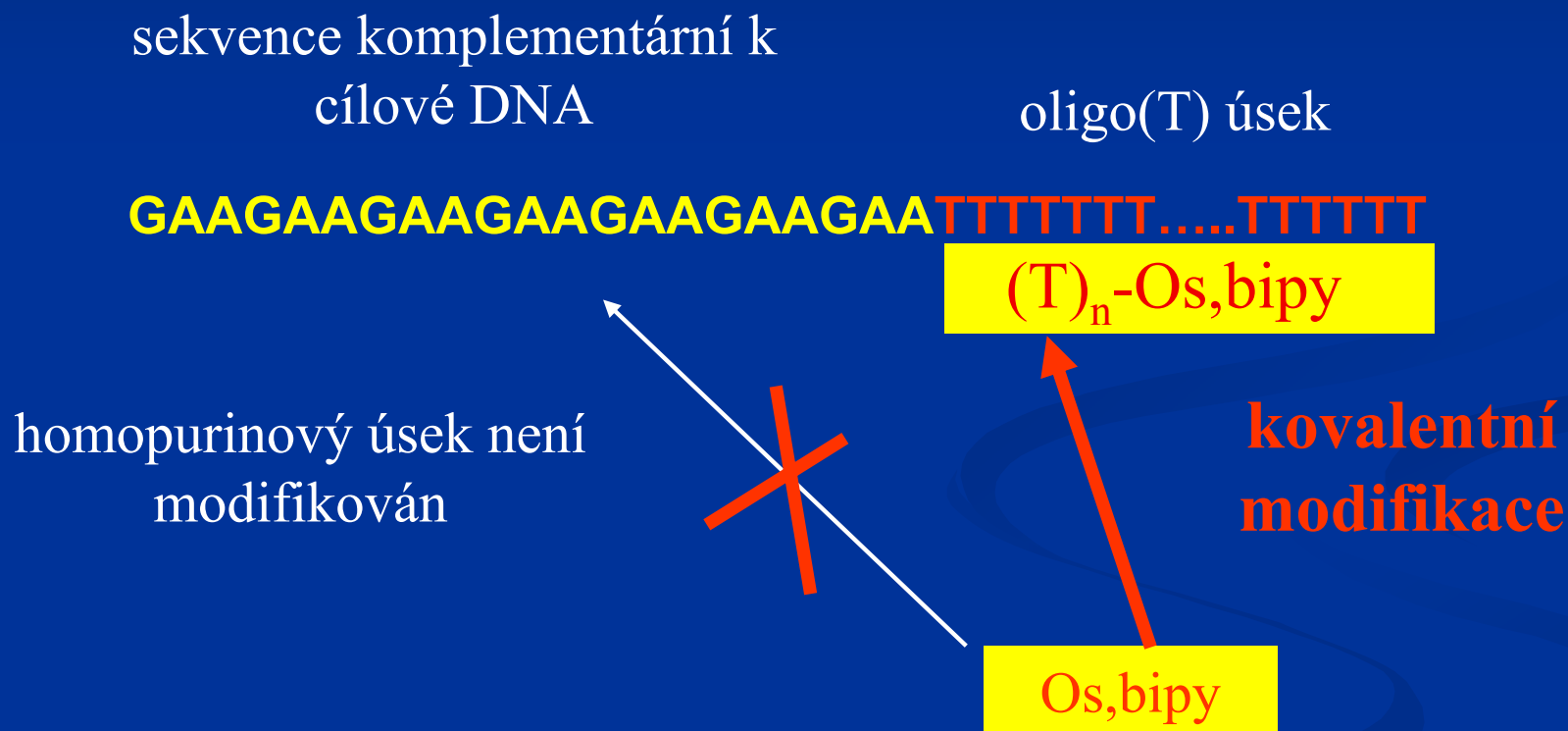
„golden gate“ (Ch. Mirkin):



Golden gate. New technique detects target DNA (here, anthrax) by using it to link fixed "capture strands" with "probe strands" attached to current-carrying gold nanoparticles.

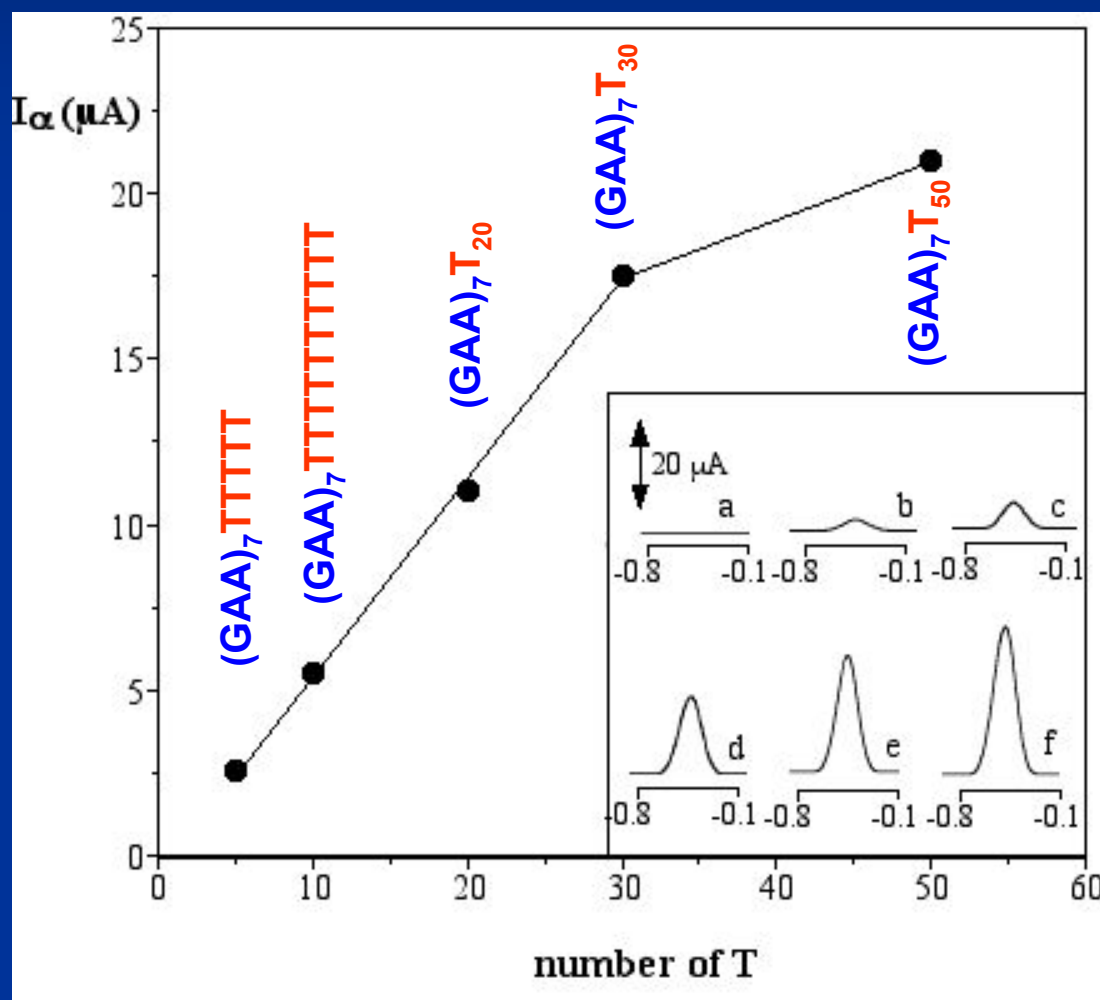
Komplexy OsO_4 jako elektroaktivní značky při analýze hybridizace DNA

- Os-bipy značené **signální sondy**



- jednoduchá příprava **bez potřeby speciálního vybavení a zkušeností v oblasti organické syntézy**

- Os-bipy značené **signální sondy** pro elektrochemické hybridizační senzory

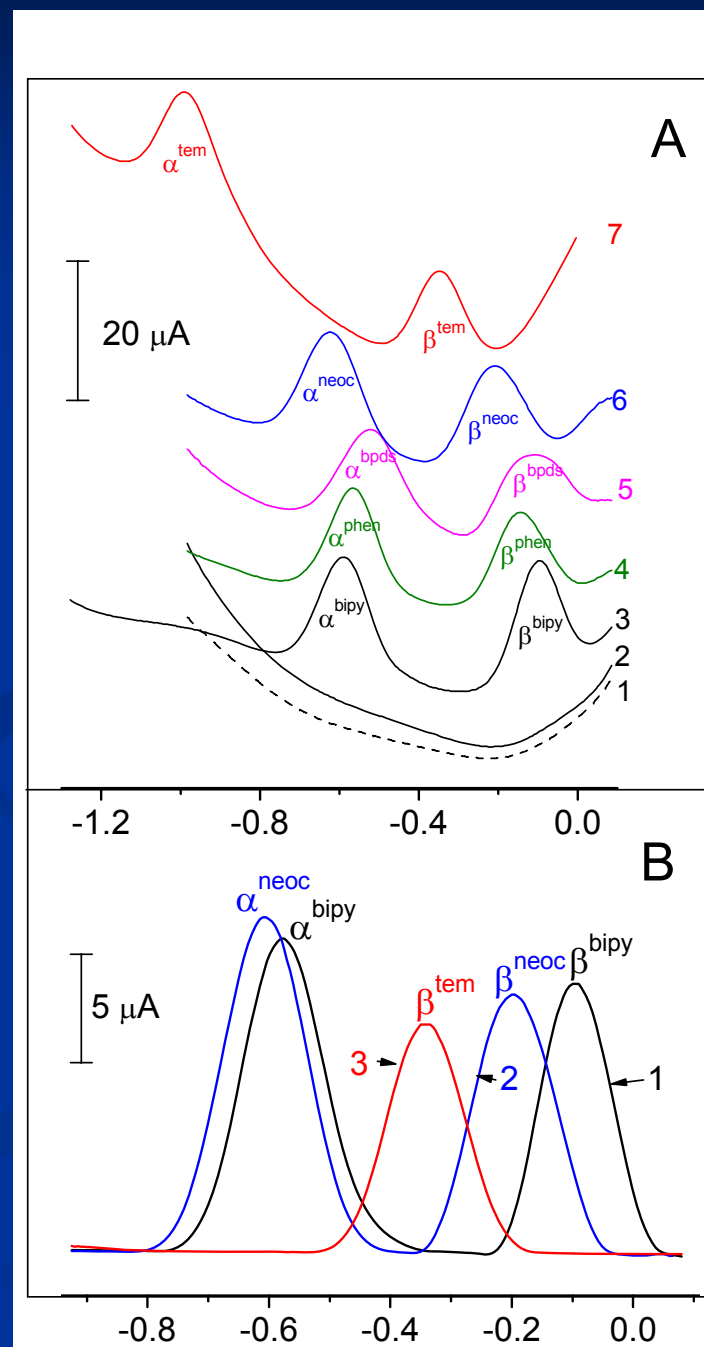
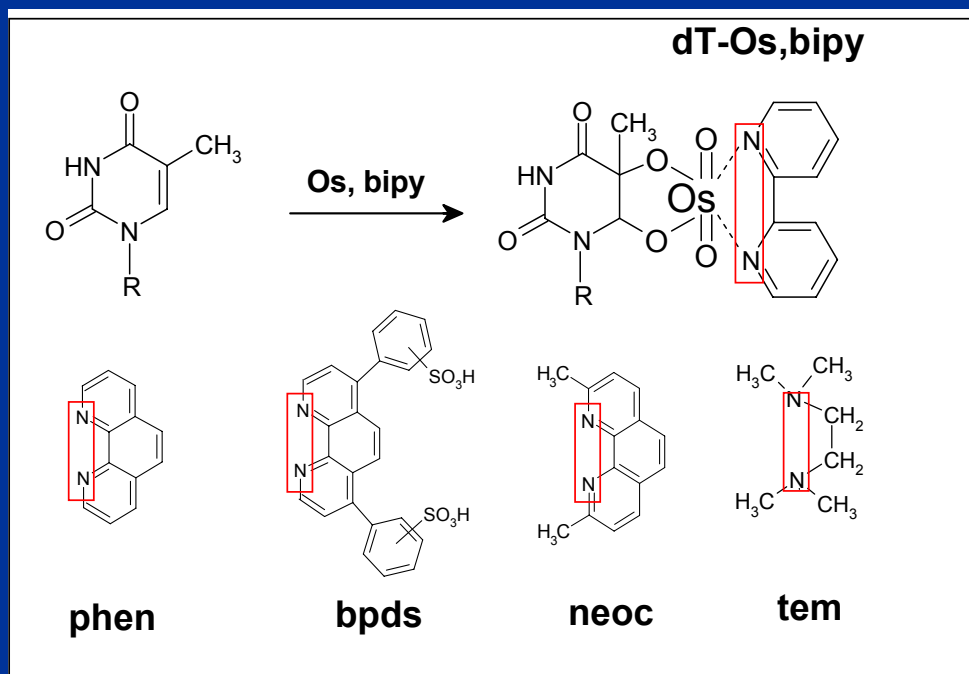


signál roste s počtem
modifikovaných thyminů

ZVÝŠENÍ CITLIVOSTI

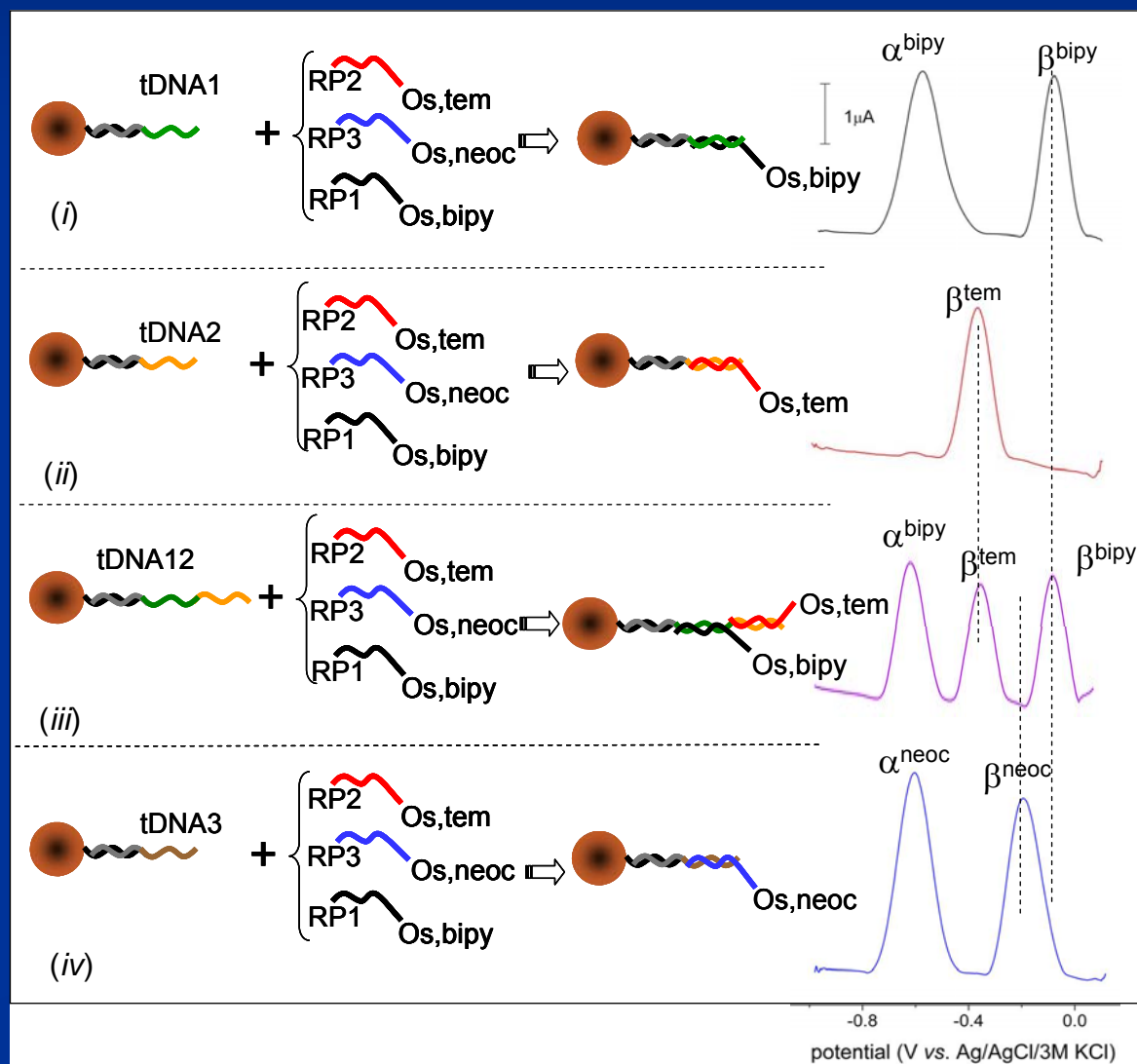
„Vícebarevné“ elektrochemické značení DNA pomocí Os,L

- elektrochemické signály DNA-Os,L obsahující jiné ligandy než bipy:



„Vícebarevné“ elektrochemické značení DNA pomocí Os,L

- rozdílů v potenciálech lze využít při hybridizaci DNA: analýza více sekvencí současně



Pomocí Os,L lze v principu značit jakoukoli signální sondu

RRRRRRRRRRRRRRRRRRRRTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

homopurinová

2 mM Os_{s,L}; 37 °C; 6h

[illegible]

CCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

**bez thyminů,
s cytosiny**

2 mM Os_{s,L}; 20 °C, 2h

CGCCGCCGCCGCCGCCGCCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

OS,
OS,
OS,
OS,
OS,
OS,
OS,
OS,
OS,
OS,
OS,
OS,

mírnější reakční podmínky

všechny baze

GGATGGGCCTCCGGTCATGAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
bio-CCTACCCGGAGGCCAAGTAC ,

ochrana thyminů v duplexu

2 mM Os,bipy; 20 °C, 2h

bio-CCTACCCGGAGGCCAAGTAC

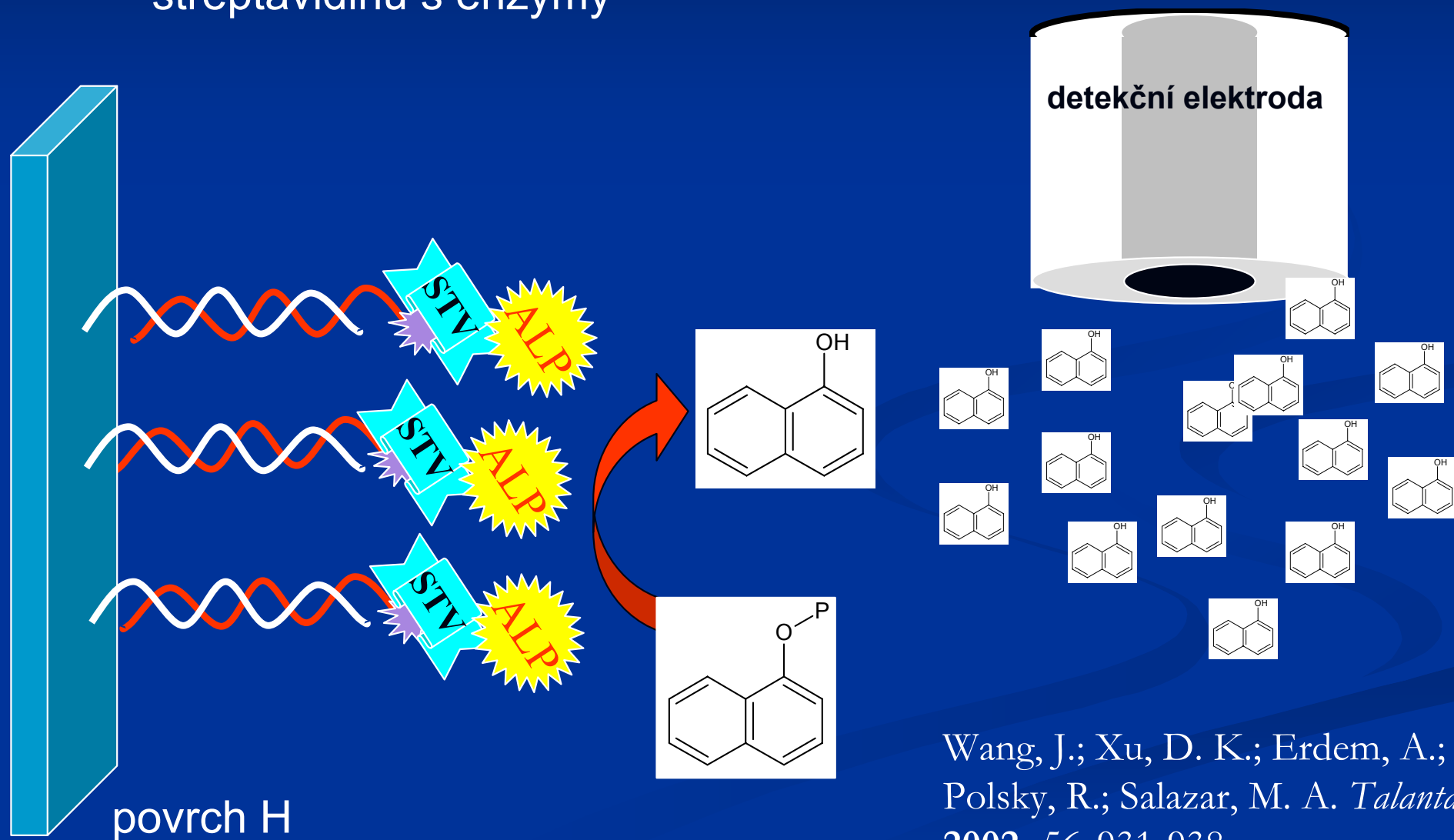
separace řetězců

DBstv **bio**-CCTACCCGGAGGCCAAGTAC

GGATGGGCCTCCGGTTCATGAA TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
os, os, os, os, os, os, os, os, os, os, os, os, os, os, os, os,

Biokatalytická amplifikace signálu (enzymové značky)

- obvykle biotinem značené DNA v kombinaci s konjugáty streptavidinu s enzymy



Wang, J.; Xu, D. K.; Erdem, A.;
Polsky, R.; Salazar, M. A. *Talanta*
2002, 56, 931-938.

Enzymem značené uhlíkové nanotrubičky (carbon nanotubes) (J. Wang)

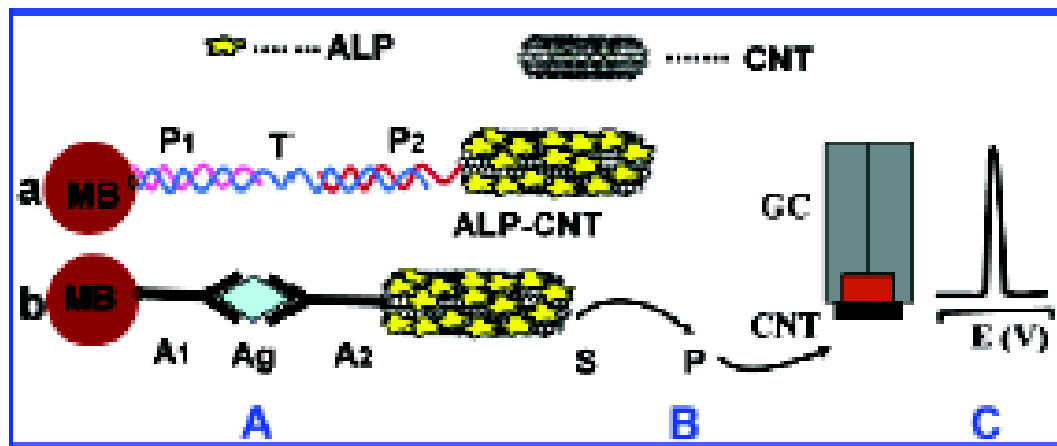
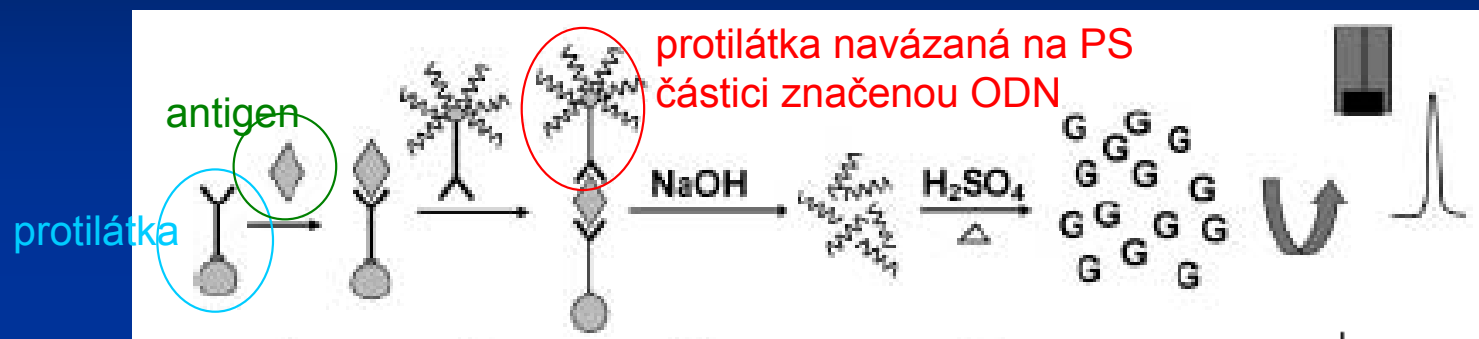


Figure 1. Schematic representation of the analytical protocol: (A) Capture of the ALP-loaded CNT tags to the streptavidin-modified magnetic beads by a sandwich DNA hybridization (a) or Ab–Ag–Ab interaction (b). (B) Enzymatic reaction. (C) Electrochemical detection of the product of the enzymatic reaction at the CNT-modified glassy carbon electrode; MB, Magnetic beads; P₁, DNA probe 1; T, DNA target; P₂, DNA probe 2; Ab₁, first antibody; Ag, antigen; Ab₂, secondary antibody; S and P, substrate and product, respectively, of the enzymatic reaction; GC, glassy carbon electrode; CNT, carbon nanotube layer.

...citlivost: lze detekovat méně než 1000 molekul cílové DNA...

využití DNA pro značení protilátek

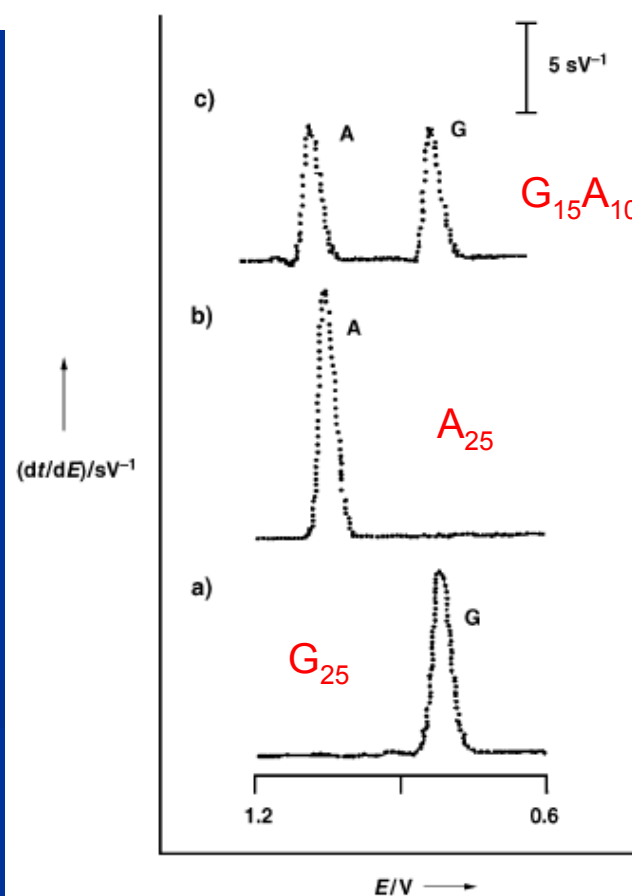
(DNA=zde značka: „výměna úloh“ ☺)



Immunoassays for Proteins

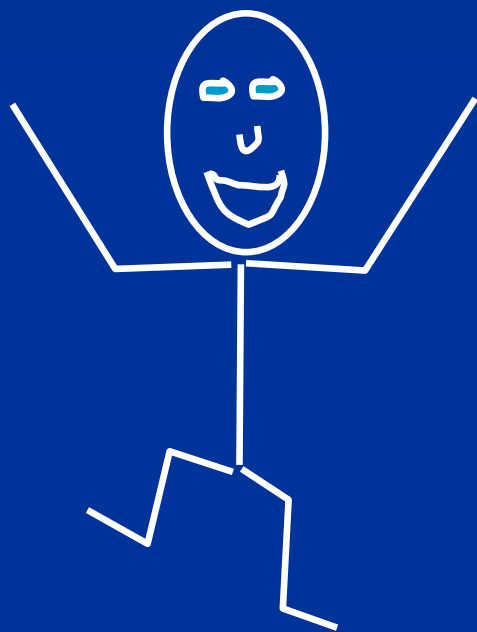
DNA-Based Amplified Bioelectronic Detection and Coding of Proteins**

Joseph Wang,* Guodong Liu, Bernard Munge, Lin Lin, and Qiyu Zhu
Angew. Chem. Int. Ed. 2004, 43, 2158–2161



Analýza **reálných vzorků DNA** amplifikovaných **pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)**

Hurá!! Umím rozlišit
komplementární a
nekomplementární sekvenci
DNA s $10^{-??}$ -molovým
množstvím syntetického
oligonukleotidu!



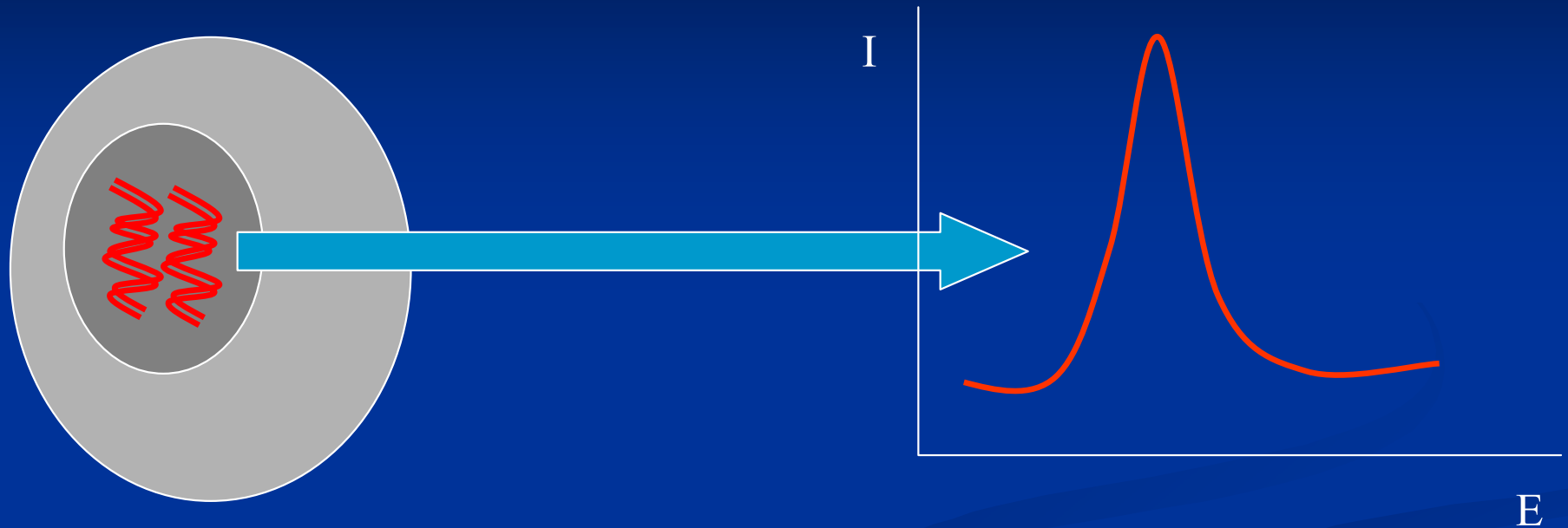
elektrochemik

Super... tak teď mi to ukaž s
přírozenou genomovou DNA...



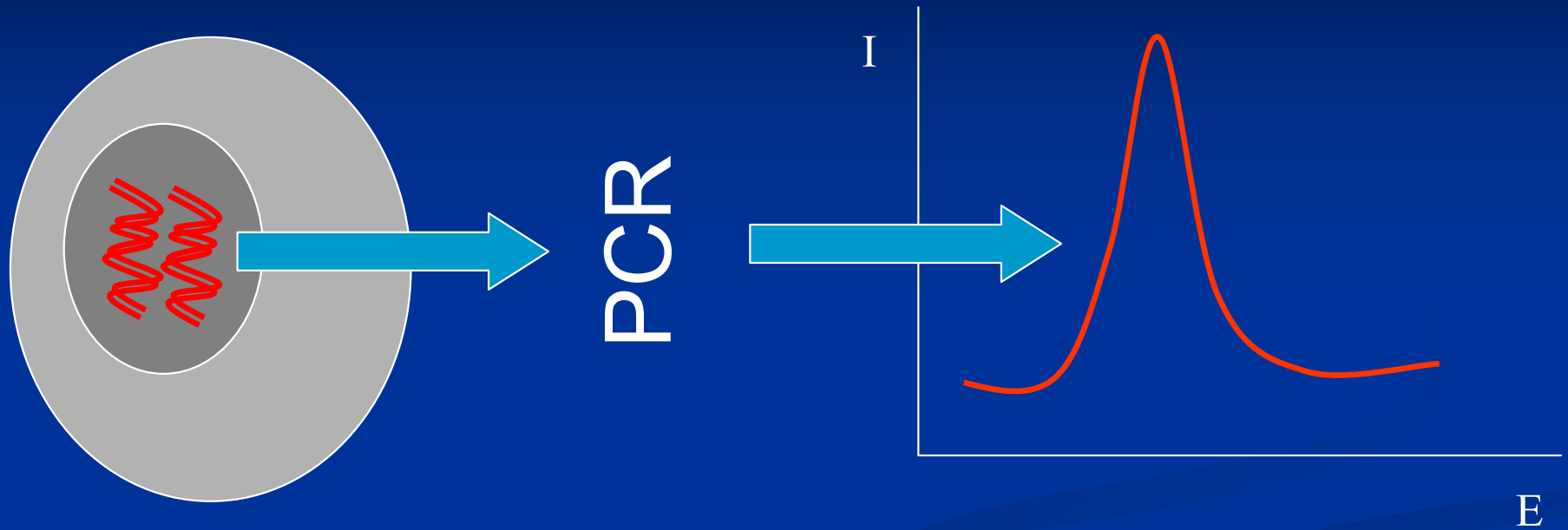
biolog

■ Přímá hybridizační analýza s genomovou DNA?



- to vyžaduje (v případě jednokopiových sekvencí) rozlišit **a úsek DNA dlouhý několik málo desítek nukleotidů mezi třemi miliardami bp** (v lidském genomu), tj. cca $1:10^8$
- v biologické matrici je to velmi obtížné

- Amplifikace DNA pomocí PCR



- klíčová technika současné molekulární biologie

PCR=replikace DNA *in vitro*



genomová DNA
(templát pro PCR)

PCR=replikace DNA *in vitro*



tepelná denaturace dvoušrobovice

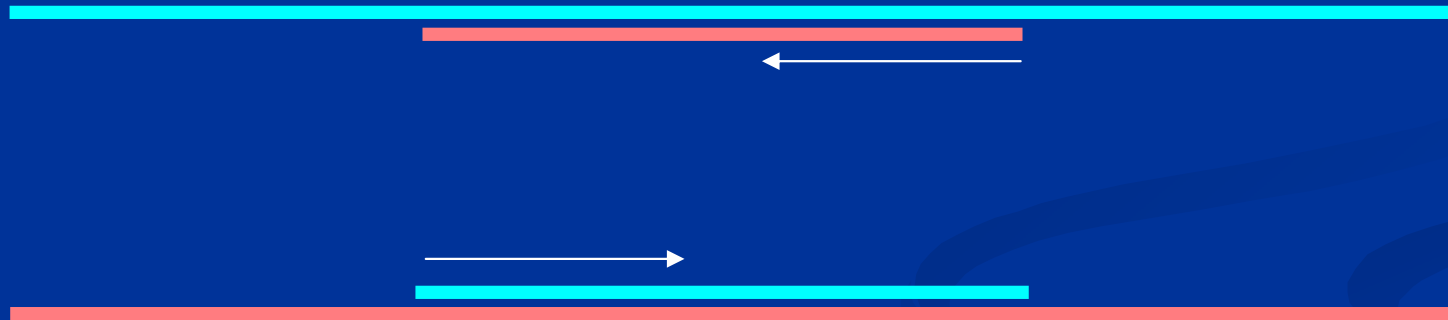
PCR=replikace DNA *in vitro*



+ DNA polymeráza + dNTP



PCR=replicate DNA *in vitro*



PCR=replikace DNA *in vitro*

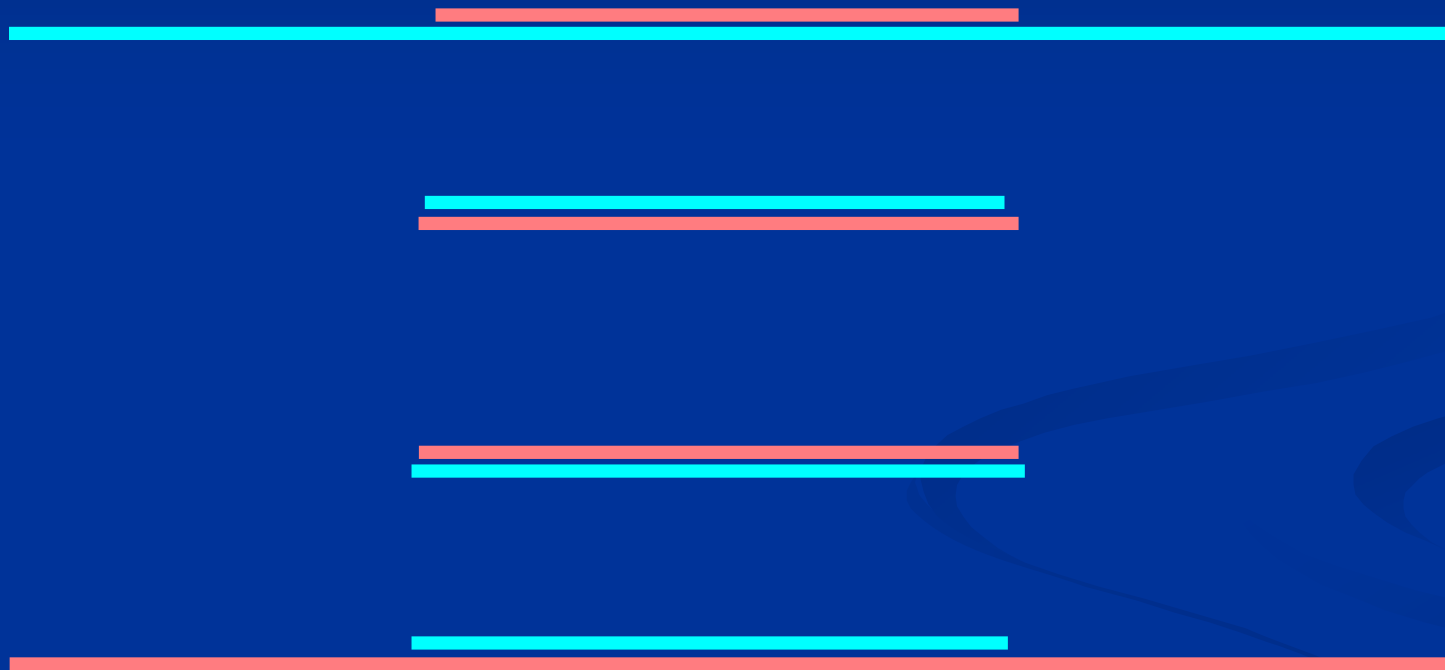


tepelná denaturace dvoušrobovice

PCR=replicate DNA *in vitro*



PCR=replikace DNA *in vitro*



atd.... (počet kopií úseku „mezi“ primery roste geometrickou řadou)

PCR=replikace DNA *in vitro*

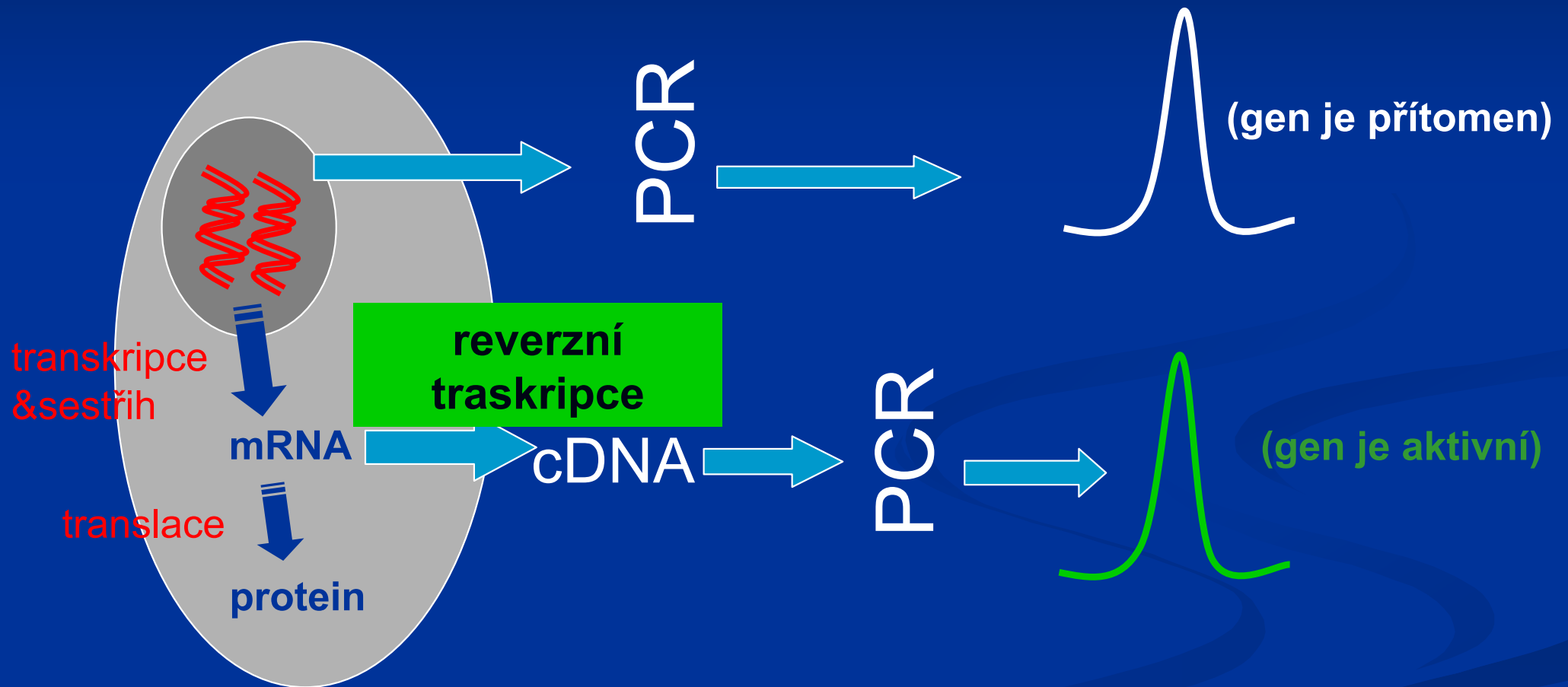
smíchá se DNA templát, primery
směs NTP, termostabilní DNA
polymeráza a proces se automaticky
cykluje



PCR=replikace DNA *in vitro*

- pomocí této techniky lze připravit mnoho kopií přesně definovaných úseků DNA získané z biologického materiálu a ty pak použít pro analýzu
- genetická diagnostika, usvědčování pachatelů, otců a nemravných prezidentů, Jurský park...
- detekce genové exprese: kombinace PCR s reverzní transkripcí mRNA

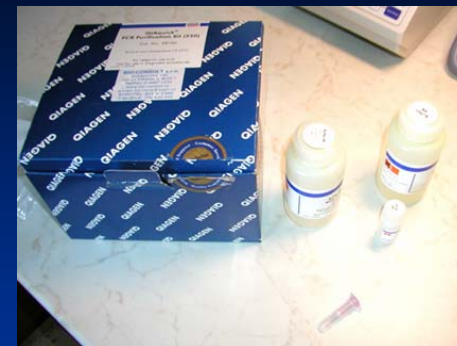
analýza exprese genů



Detekce PCR produktu pomocí hybridizace na tištěných elektrodách

produkt PCR (neznačený)

**jednoduché
předčištění
pomocí kitu**



**denaturace
(NaOH)**



**adsorpce na
elektrodu
(NaOH)**

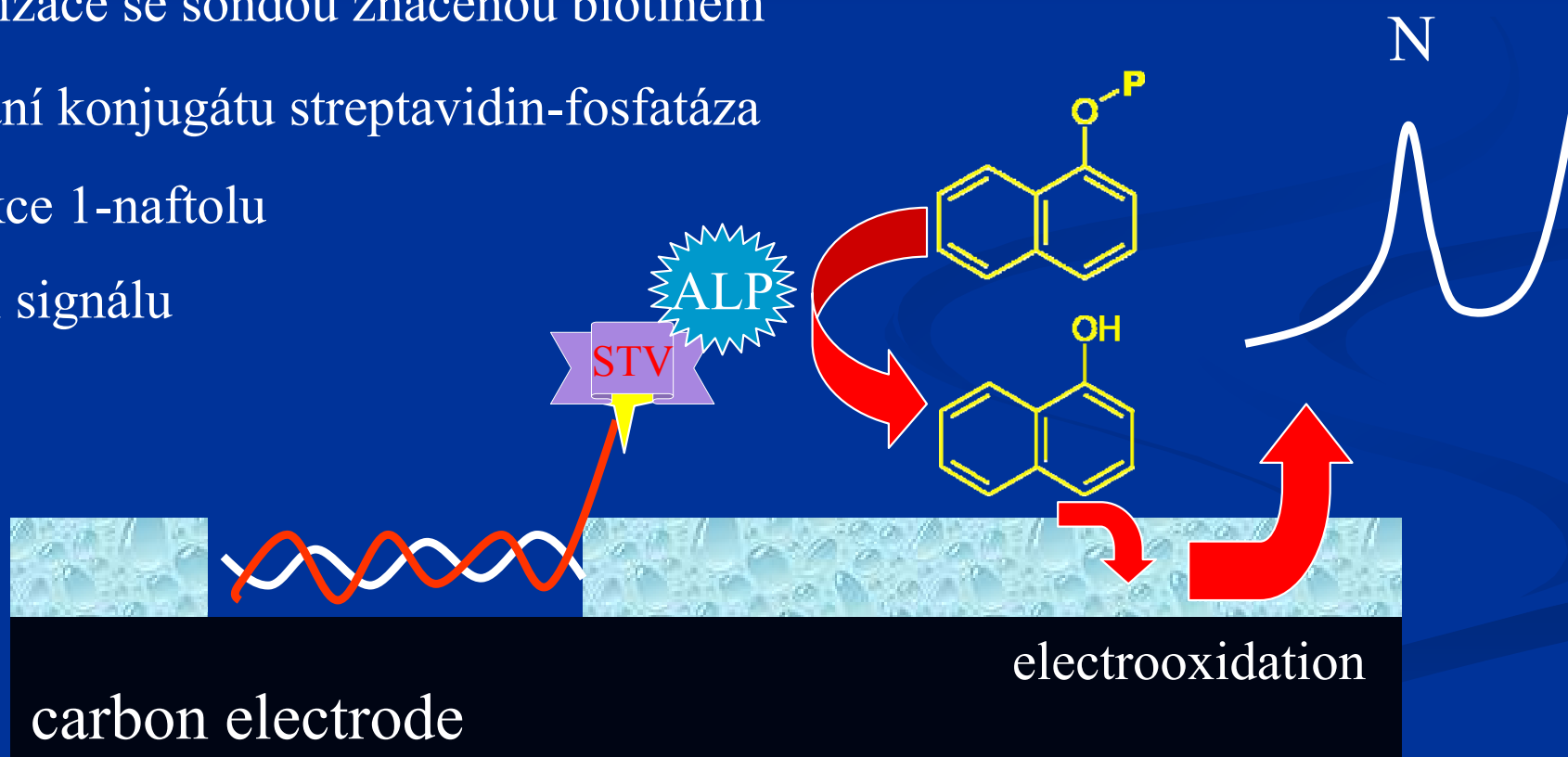


**blokování povrchu elektrody (BSA)
hybridizace biotinylované sondy**



navázání konjugátu streptavidin-fosfatáza, produkce 1-naftolu, elchem. měření

- adsorpce cílové DNA
- blokování povrchu (5 % BSA)
- hybridizace se sondou značenou biotinem
- navázání konjugátu streptavidin-fosfatáza
- produkce 1-naftolu
- měření signálu



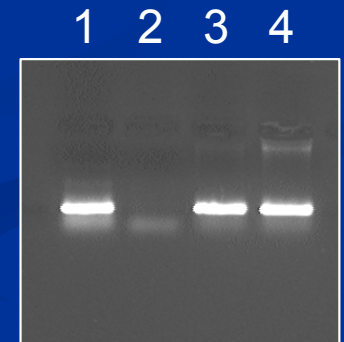
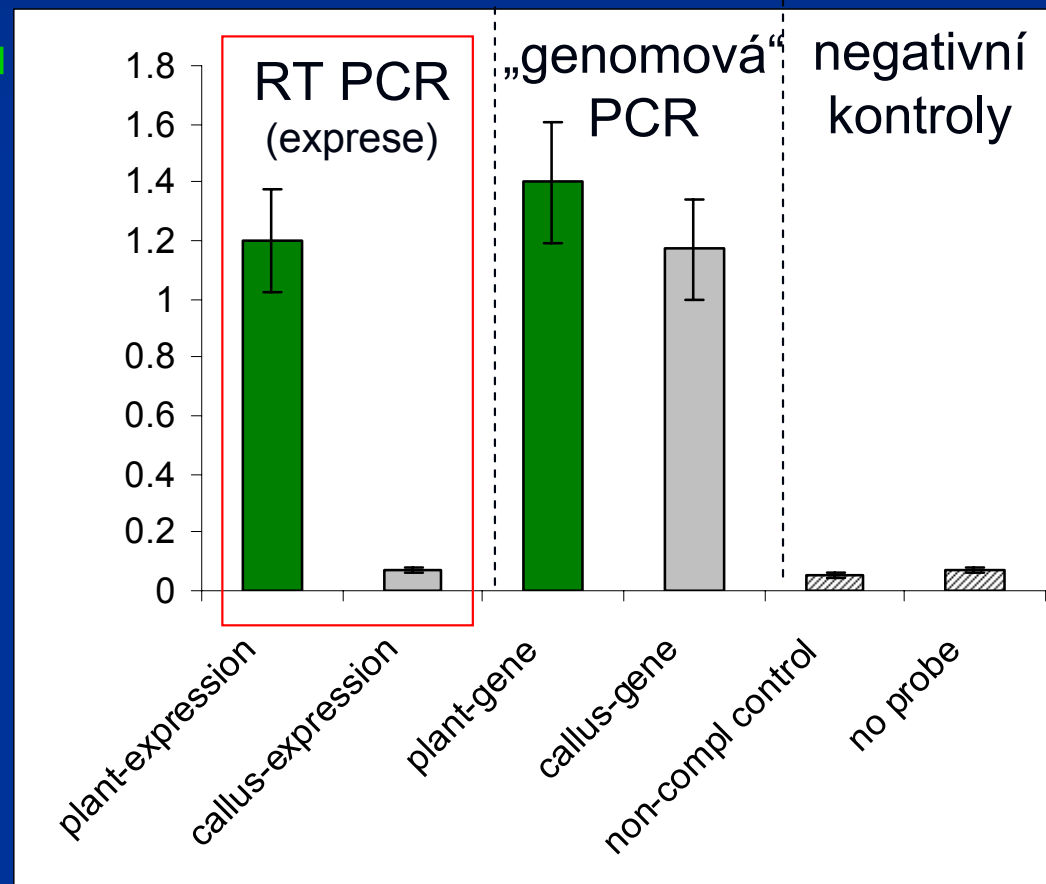
Analýza exprese genů

gen *rbcL* : účast ve fotosyntéze, exprimován jen v zelených částech rostlin

zelená rostlina tabáku



tabákový kalus



Detekce mutací a polymorfismů

Mutace: změna v nukleotidové sekvenci DNA

(záměna páru bazí za jiný, inserce nebo delece jednotlivých párů bazí či delších úseků)

AGCCGATTAACTTAGCTTAGT
TCGGCTAATTGAATCGAATCT

záměna párů GC za AT

AGCCGATTAGCTTAGCTTAGT
TCGGCTAATCGAATCGAATCT

AGCCGATTACTTAGCTTAGT
TCGGCTAATGAATCGAATCT

delece páru GC

AGCCGATTAGCCTTAGCTTAGT
TCGGCTAATCGGAATCGAATCT

inserce páru CG

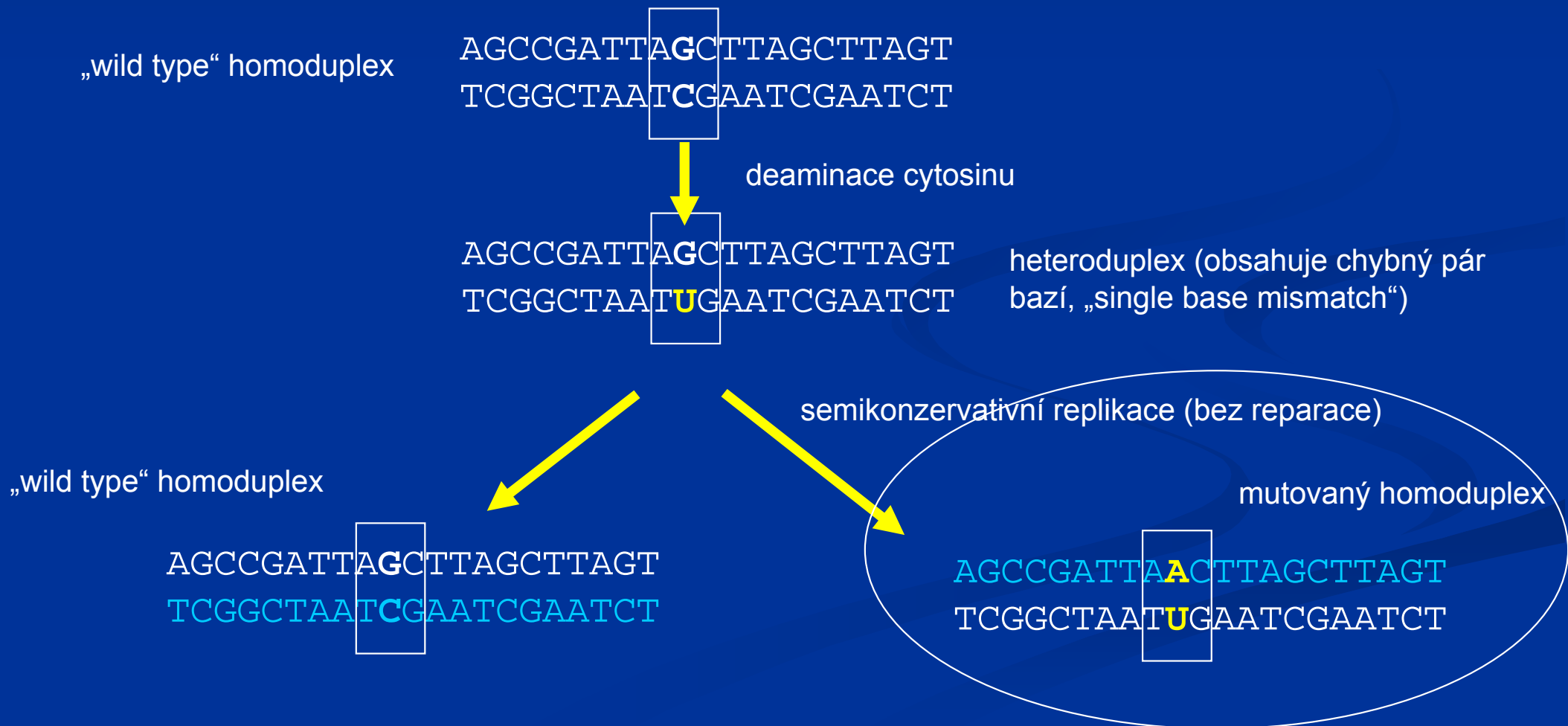
Záměna jediného „písmene“ genetické abecedy v určitých místech genomu může mít závažné zdravotní důsledky, pokud

- mutace zabrání správné expresi důležitého genu
- mutovaný gen kóduje nefunkční protein
- mutovaný gen kóduje protein s pozměněnou funkcí

diagnostika na úrovni DNA

Poškození DNA, mutace, léze, „mismatche“...?

- mutace vznikají v důsledku poškození DNA, které nebylo před replikací (syntézou dceřinných vláken DNA) opraveno např.



Poškození DNA, mutace, léze, „mismatche“...?

- **mutace vznikají v důsledku poškození DNA, které nebylo před replikací opraveno**, event. v důsledku replikačních chyb
- **poškozením DNA ještě k mutaci nedochází** (obvykle je včas, tj. před replikací opraveno – „léze“ a „mismatche“ jsou rozpoznány reparačními systémy)
- **DNA s mutovanou nukleotidovou sekvencí není „poškozená“**: všechny páry bazí jsou „v pořádku“ (ani reparační systémy je nerozpoznají), ale **genetická informace je pozměněna** (jiné pořadí nukleotidů)

Detekce bodových mutací

- metody založené na rozdílné stabilitě homoduplexů a heteroduplexů (chybné páry bazí snižují teplotu „tání“ DNA)
- metody založené na sledování specifických vlastností mutované DNA, resp. heteroduplexů tvořených wt a mutovaným vláknem



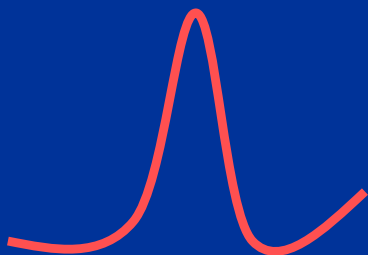
25 °C

homoduplex

heteroduplex



hybridizační signál je pozorován

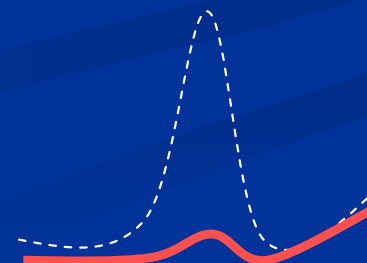


heteroduplex není stabilní

50 °C



hybridizační signál není v ideálním případě pozorován
(v reálné situaci je **snížen**: výtěžek hybridizace je
oproti perfektnímu duplexu nižší, **nebývá nulový**)



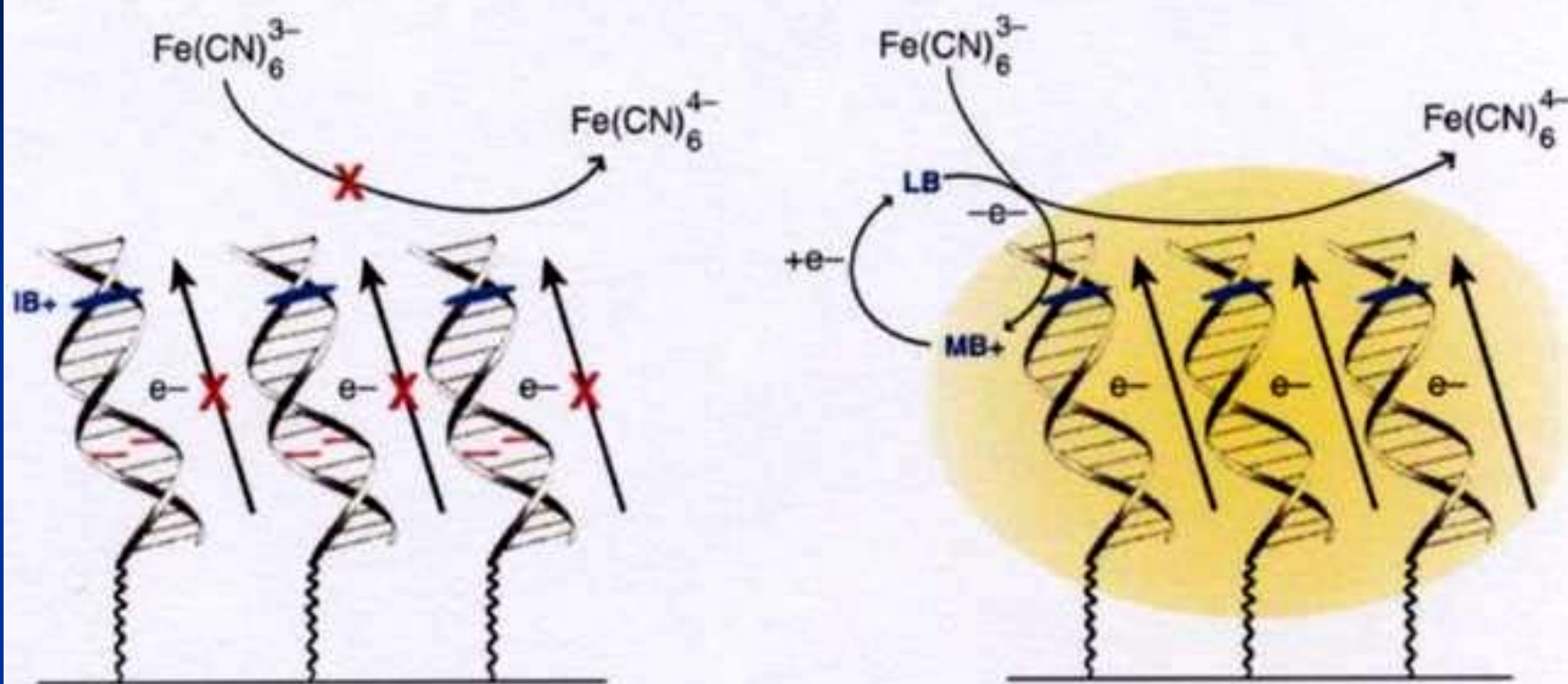
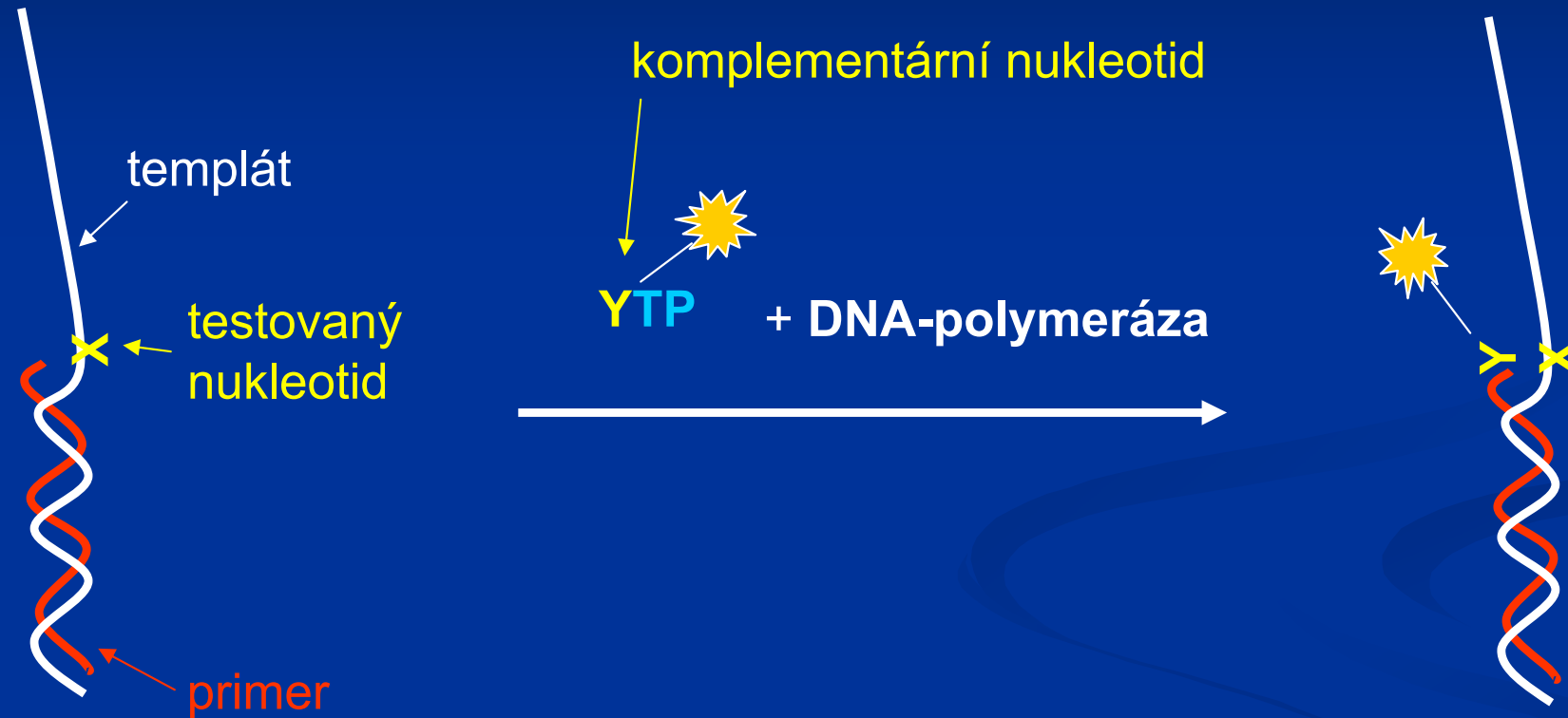


Figure 5 Electrochemical assay for mismatches through DNA-mediated charge transport. On the right is shown an electrode modified with well-matched duplex DNA. Current flows through the well-stacked DNA to reduce methylene blue (MB^+) intercalated near the top of the film, to leucomethylene blue (LB). LB goes on to reduce ferricyanide in solution, thereby regenerating MB^+ catalytically, leading to an amplification of the hybridization signal. In the case of a DNA film containing mismatched duplexes (left), current flow through the DNA duplex is attenuated, MB^+ is not reduced, and the catalytic signal is lost.

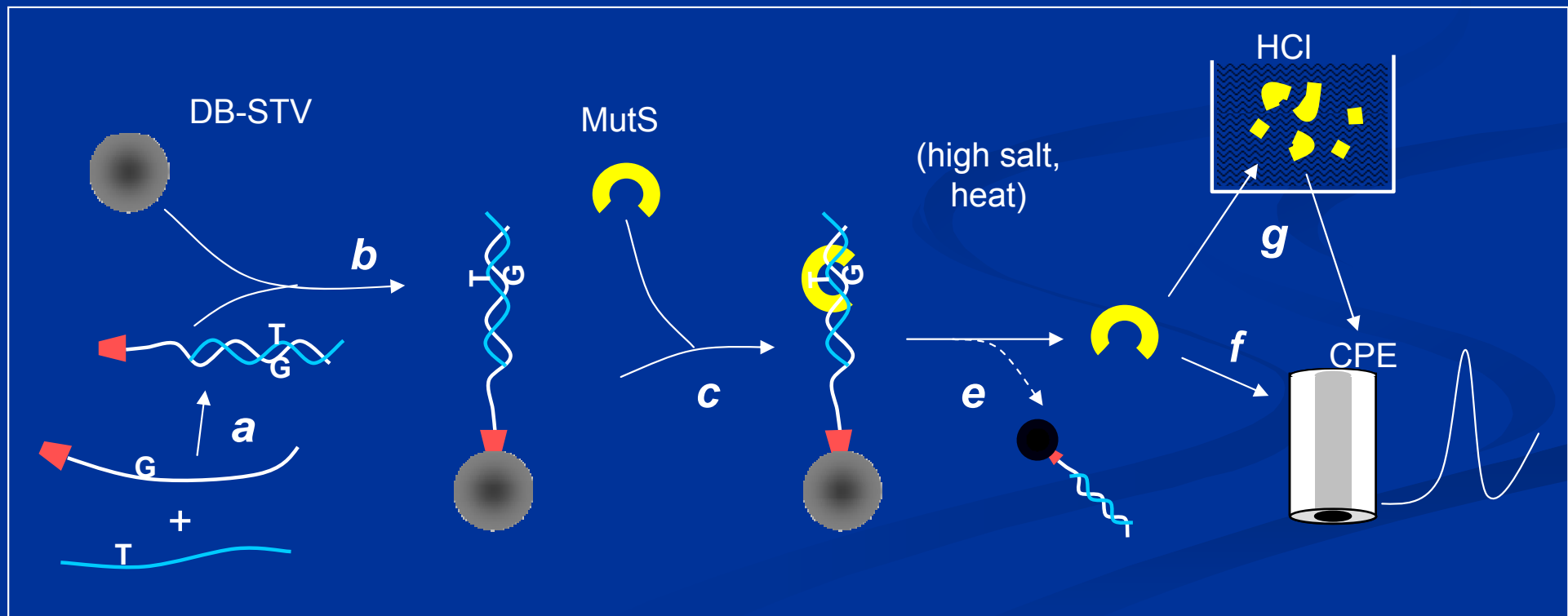
Metody založené na „primer extension“: „DNA minisequencing“



- značka je zavedena pouze v případě přítomnosti komplementární baze v sousedství primeru
- optická značka („APEX“), elektroaktivní značka, biotin-streptavidin-enzym
- jednopovrchově (Patolsky a Willner) nebo dvoupovrchově (MF a kol.)
- amplifikace v PCR cyklu

protein MutS

- bílkovina rozpoznávající chybné páry bazí – součást reparčních systémů
- DS technika: interakce heteroduplexů DNA s mutS na magnetickém nosiči, poté elektrochemická detekce proteinu



Expanze trinukleotidových opakování

Trinukleotidová opakování

- sekvence $(CGG)_n$, $(GAA)_n$, $(CAG)_n$
- značně rozšířené v genomu
- „mikrosatelity“
- nestabilita: tendence k prodlužování (expanzi)
- možný mechanismus:

replikace DNA

Trinukleotidová opakování

- sekvence $(CGG)_n$, $(GAA)_n$, $(CAG)_n$
- značně rozšířená v genomu
- „mikrosatelity“
- nestabilita: tendence k prodlužování (expanzi)
- možný mechanismus:



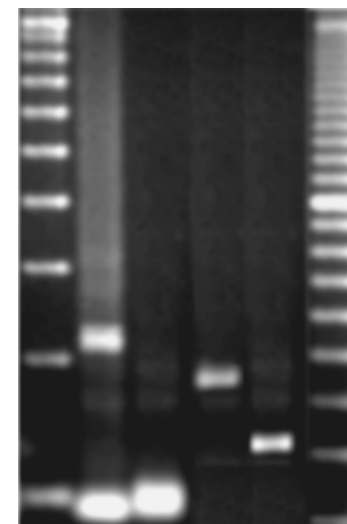
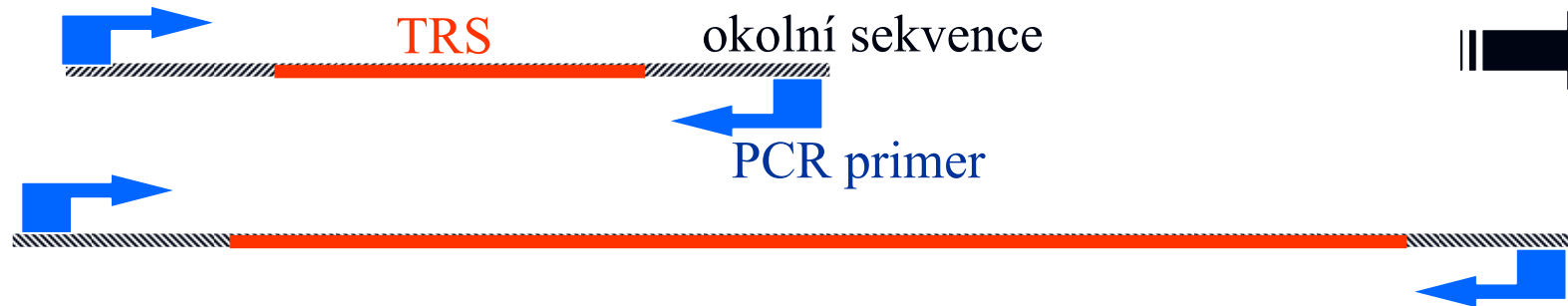
replikace DNA

Dědičné neurodegenerativní choroby:

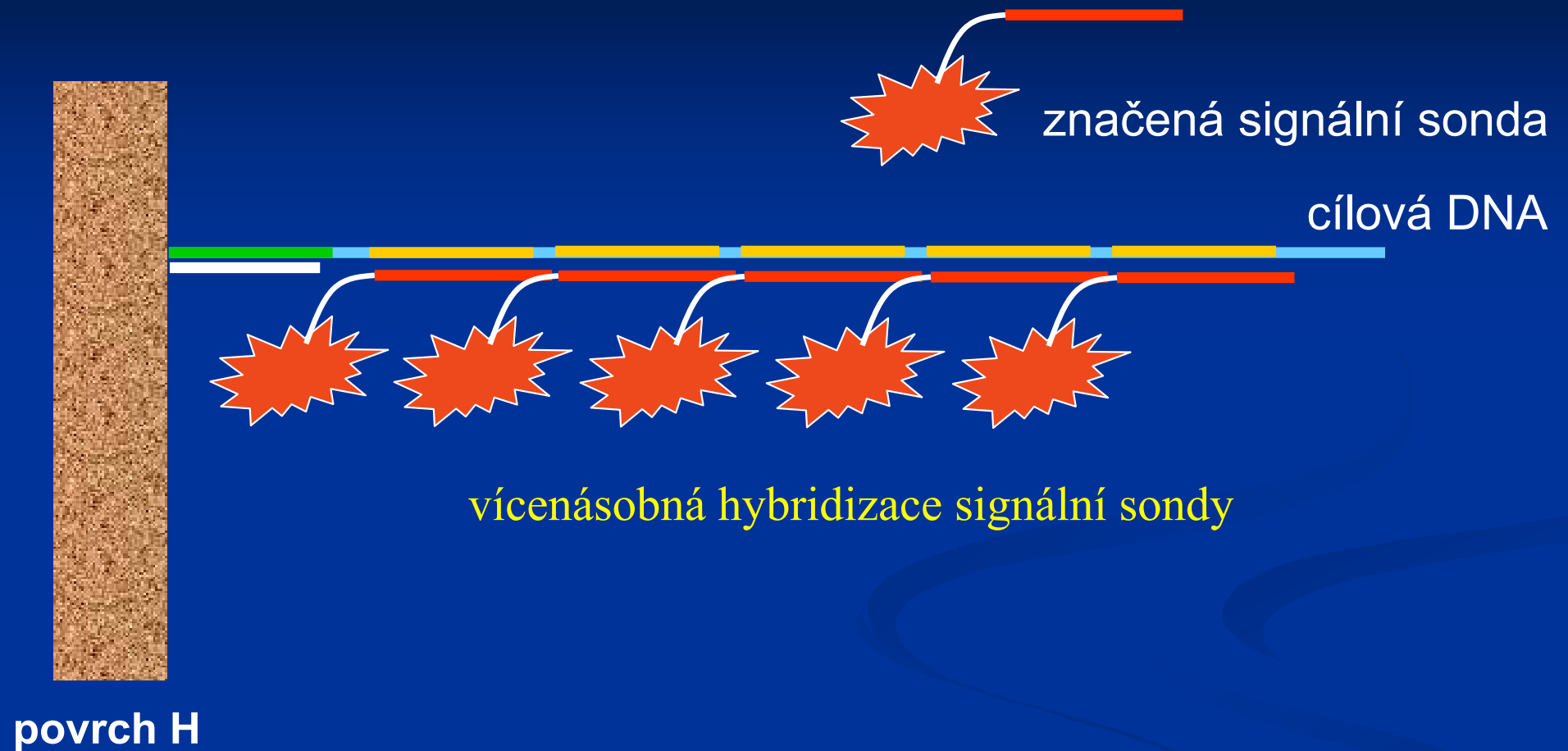
- souvislost s expanzí trinukleotidových opakování
 - myotonická dystrofie (CAG)
 - syndrom fragilního chromozómu X (CGG)
 - Friedreichova ataxie (GAA)
-
- expanze z několika desítek do několika stovek tripletů
 - v UTR: brání transkripci příslušných genů
 - v transkribovaných sekvencích: např. (CAG)_n je překládán do polyglutaminových úseků – vzniká defektní protein

Dědičné neurodegenerativní choroby:

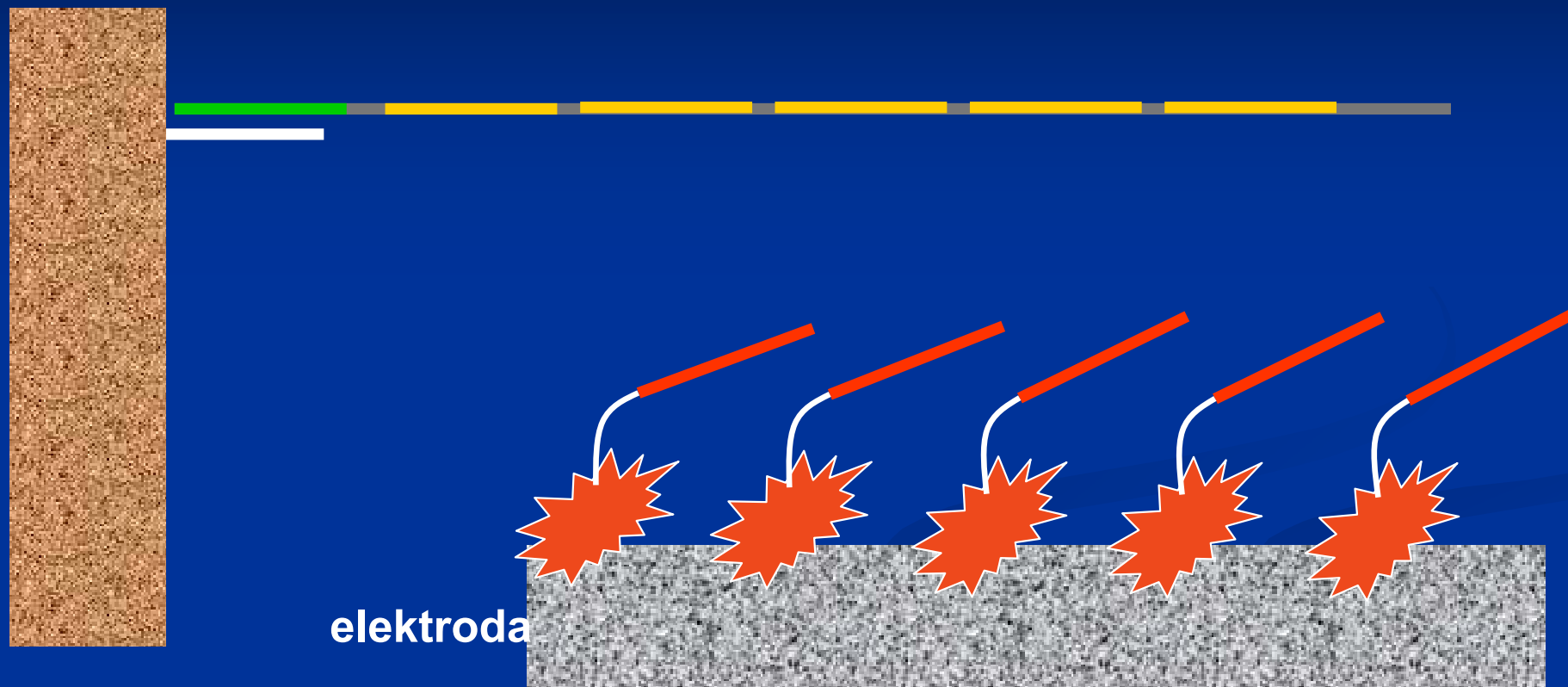
- diagnostika na úrovni DNA: stanovení délky trinukleotidové repetice
- PCR amplifikace lokusu obsahujícího trinukleotidovou repetici a následné stanovení délky amplikonu



**Elektrochemické stanovení délky repetitivní
sekvence v DNA
(počtu opakování základní jednotky)**



- akumulace značky v důsledku opakování sekvence rozpoznávané signální sondou



povrch H

elektroda

- množství molekul signální sondy závisí délce repetitivní sekvence
- signál roste s počtem opakování

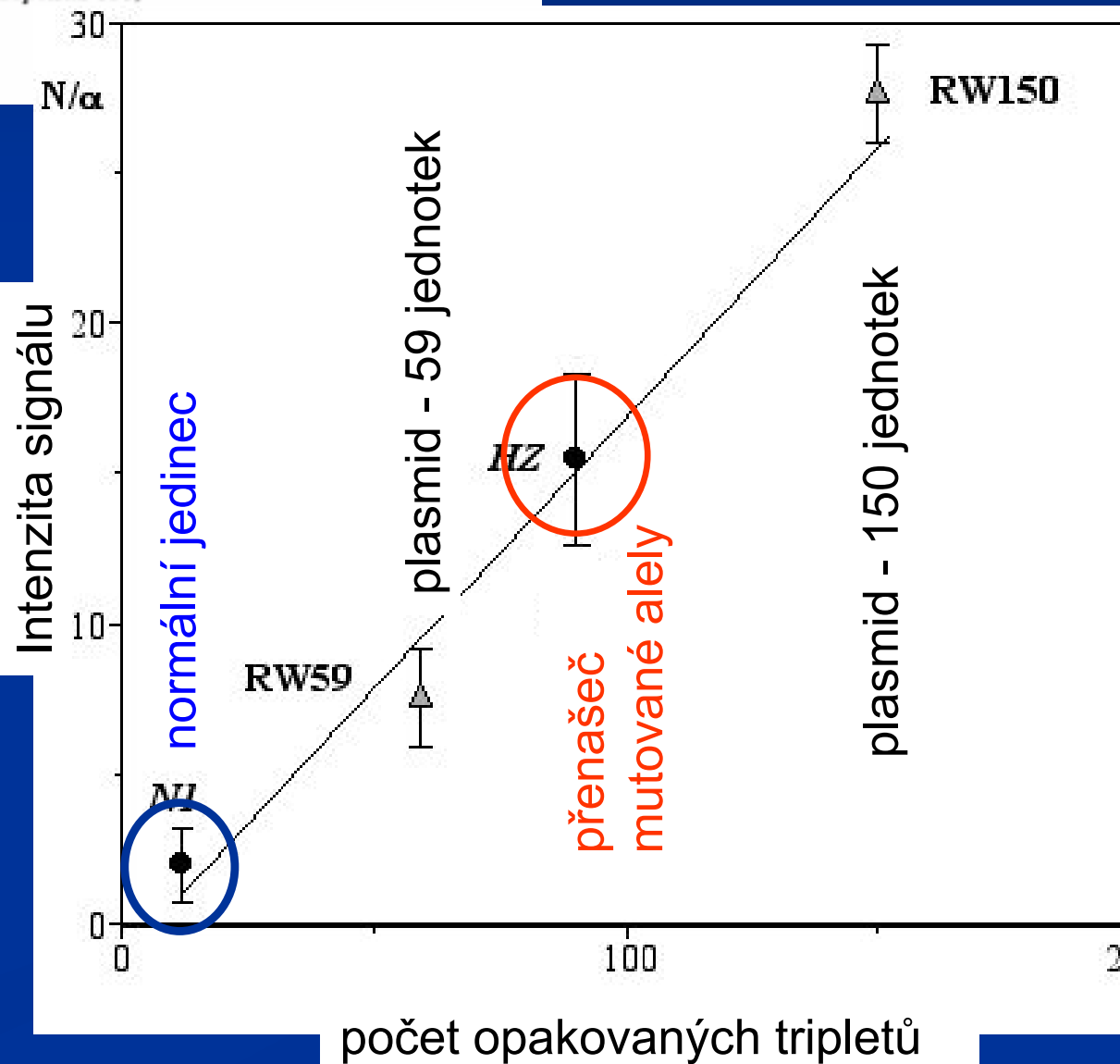
Electrochemical Detection of DNA Triplet Repeat Expansion

Miroslav Fojta,* Ludek Havran, Marie Vojtiskova, and Emil Palecek*

*Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Kralovopolska 135,
612 65 Brno, Czech Republic*

Received March 3, 2004; E-mail: fojta@ibp.cz; palecek@ibp.cz

GAA•TTC (Friedreichova ataxie)



závěrem...

- většina zmíněných systémů velmi dobře pracuje laboratorních podmínkách a na úrovni modelových vzorků DNA (syntetické oligonukleotidy)
- řada z nich byla úspěšně aplikována i při analýze „skutečných“ cílových DNA (úseků různých genů amplifikovaných pomocí PCR), včetně aplikací v oblasti lékařské diagnostiky (detekce genomové DNA patogenních organismů, mutací v důležitých lidských genech, genové exprese na modeleových systémech apod.)
- některé metody (zejména ty, které jsou založené na využití nanočástic nebo CNT jako značek pro DNA) dosahují extrémně vysokých citlivostí (v řádu 1000 molekul cílové DNA)

budoucnost...

hlavní cíl:

- vývoj elektrochemických zařízení umožňujících citlivou, specifickou, rychlou a levnou detekci hybridizace DNA

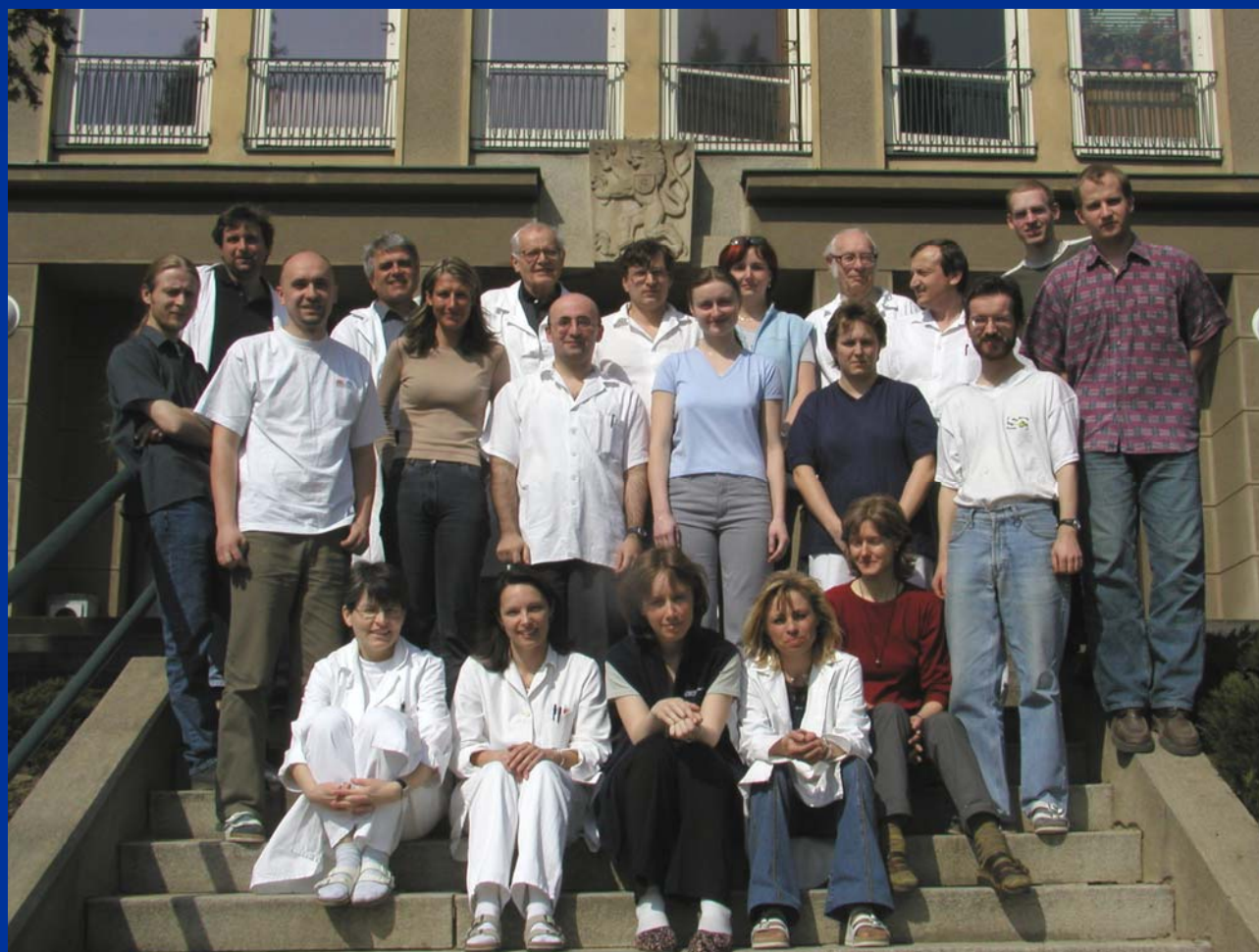
výzvy:

- spolehlivá analýza PCR-amplifikovaných cílových DNA
- možnost detekce neamplifikovaných cílových sekvencí
- spolehlivá detekce bodových mutací
- inkorporace elektrochemické detekce do zařízení typu „DNA arrays“, „chips“; **lab-on-a-chip**

Poděkování



- Emil Paleček
 - František Jelen
 - Luděk Havran
 - Petr Pečinka
 - Katka Cahová
 - Pavel Kostečka
 - Jenda Vacek
 - Hanka Pivoňková
 - Michal Masařík
 - Tomáš Mozga
 - Táňa Kubičárová
 - Jana Fulnečková
 - Iva Salajková
 - Yvonka Koudelková
 - Alena Kouřilová
 - Hana Chroustová
 - Lída Římánková
-
- GAČR (203/04/1325)
 - GAAV (IAA4004402)
 - MPO (1H-PK/42)
 - MŠMT (LC06035)



Poděkování



Univerzita Pardubice

Renáta Šelešovská
Ladislav Novotný
Karel Vytřas
Petra Brázdilová

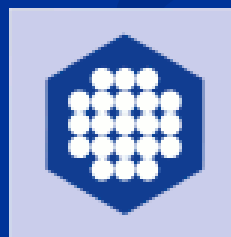


**Masarykova
univerzita Brno**
Libuše Trnková



UFCH JH

Tomáš Navrátil
Bogdan Yosypchuk
Michael Heyrovský
Ivana Šestáková



UOCHB

Michal Hocek
Milan Vrábel
Hana Cahová

**Děkuji
za pozornost**