

ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE mRNA IZOLOVANÉ Z ROSTLINNÝCH PLETIV ZA VYUŽITÍ PARAMAGNETICKÝCH MIKROČÁSTIC

Věnováno padesátému výročí udělení Nobelovy ceny Prof. Jaroslavu Heyrovskému

DALIBOR HÚSKA^{a,*}, VOJTĚCH ADAM^{a,b},
LIBUŠE TRNKOVÁ^c a RENÉ KIZEK^a

^a Ústav chemie a biochemie, ^b Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^c Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
kizek@sci.muni.cz

Došlo 10. 4. 2009, přepracováno 8.10.09, přijato 2.11.09.

Klíčová slova: magnetická separace, messenger RNA, elektrochemický senzor, bioelektrochemie, DNA, eliminační voltametrie

Úvod

Paramagnetické mikro- a nanočástice jsou – vzhledem k jejich široké působnosti od separace a izolace celých buněk (bakterií), proteinů, virových částic, nukleových kyselin až po magnetickou zobrazovací rezonanci a magnetickou hypertermii – stále častěji využívány v pokročilých technologiích. Mezi ně bezesporu patří i technologie senzorů, neboť jednoduché, selektivní a citlivé senzory a biosenzory představují unikátní nástroje pro rychlou detekci vybraného analytu i v poměrně složité matrici^{1–6}. Unikátnost nabývá na významu, pokud existuje možnost napojení vhodného a spolehlivého senzoru do automatizovaného režimu, který umožňuje snížení kontaminace vzorku a experimentálních chyb způsobených lidským faktorem, což je důležité i v analýze nukleových kyselin (DNA, RNA) jak pro účely diagnostické, tak kriminalistické⁷. Proto odběr vzorku a následná izolace analytu představuje jeden z klíčových momentů analýzy. Vzhledem ke stále zvětšujícímu se tlaku na snížení množství materiálu dostupného k analýze (vlás, kapka krevního séra či krve, několik málo buněk tkáně) výrazným způsobem narůstá možnost kontaminace vzorku personálem.

Získaný falešně pozitivní výsledek pak může ovlivnit závěry vyšetřování nebo návrh léčebného postupu. Možnou změnu do procesu izolace nukleových kyselin mohou přinést paramagnetické částice⁸. Ukazuje se, že propojení paramagnetických částic s elektrochemickou detekcí umožňuje izolaci sledovaných molekul^{9–14}. Celou izolaci je možné rozdělit do tří samostatných kroků vázaných na tři různé povrchy. První krok je podmíněn povrchem, kdy dochází k interakci mezi vzorkem (nukleovou kyselinou) a paramagnetickou částicí, druhý krok povrchem, kdy k separaci dochází díky interakci magnetu a paramagnetických částic, zatímco nevázané molekuly jsou ze systému vymyty. Poslední krok – detekce – je reprezentovaný povrchem vysoce účinného elektrochemického detektoru (obr. 1).

Kromě DNA je nejčastěji studovanou nukleovou kyselinou RNA, konkrétněji pak RNA významná pro sledování exprese genů (mRNA – messenger RNA). Magnetická separace nabízí velmi elegantní cestu jak zachycovat cílenou nukleovou kyselinu z krve, kosti, kostní dřeni, buněčných kultur, rostlinných pletiv a dalších biologických materiálů před dalším zpracováním, jako je např. její amplifikace nebo detekce. Molekula mRNA je na 3'-konci ukončena řetězcem z 50–250 adenin-nukleotidů (polyadenylační sekvence). Pomocí této sekvence můžeme velmi snadno mRNA zachytit na paramagnetické mikročástice nesoucí řetězec thyminů (obr. 1). Následnou tepelnou denaturací lze zachycenou mRNA z paramagnetických částic uvolnit a následně s ní dále pracovat za využití analytických nebo molekulárně-biologických technik^{15,16}.

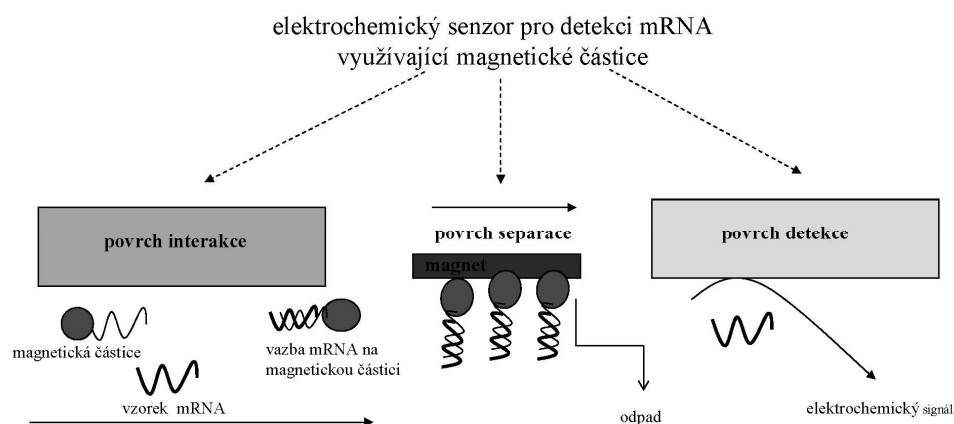
Cílem této práce je ukázat aplikaci paramagnetických částic jako základ jednoduchého elektrochemického senzoru pro analýzu mRNA.

Experimentální část

Chemikálie: Roztoky polyadenylové kyseliny (poly(A)) byly připravovány ze zásobního roztoku o koncentraci 100 μM z lyofilizované poly(A) ($0,5 \text{ mg ml}^{-1}$) $M_r = 400\,000$ (Sigma-Aldrich, USA). Oligonukleotidy s řetězcem 25, 30, 35, 40 adeninů byly syntetizovány společností Sigma-Aldrich (USA) a přečištěny metodou HPLC. Koncentrace zásobních roztoků byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm na přístroji Specord 210 (Analytic Jena, Německo).

Pufry použité pro experimenty: a) fosfátový pufr: 0,1 M-NaCl + 50 mM-Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄ a 0,2 M-NaCl + 100 mM Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄; b) acetátový pufr: 0,2 M-CH₃COOH + 0,2 M-CH₃COONa. Ostatní použité chemikálie byly získány v čistotě ACS od společnosti Sigma-Aldrich.

* Dalibor Húska získal 3. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2009 za nejlepší studentskou práci v oboru analytická chemie.



Obr. 1. Elektrochemický senzor pro detekci mRNA využívající paramagnetické částice. Jednotlivé kroky ukazující záchyt, oddělení a stanovení mRNA pomocí paramagnetických částic: interakce (probíhá interakce mezi paramagnetickou částicí a nukleovou kyselinou), separace (dochází k oddělení specificky zachycených molekul od ostatních), detekce (stanovení zachycené molekuly nukleové kyseliny)

Paramagnetické mikročástice byly zakoupeny od společnosti Dynal Biotech ASA (Norsko). Povrch těchto mikročástic je modifikován navázáním oligonukleotidové sekvence (dT)25. Velikost částic je $2,80 \pm 0,20 \mu\text{m}$.

Elektrochemická detekce na rtuťové elektrodě: Elektrochemické stanovení s visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE; plocha kapky $0,40 \text{ mm}^2$) jako pracovní elektrodou bylo provedeno pomocí přístroje AUTOLAB analyzátor (EcoChemie, Holandsko), ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byla používána pracovní cela s tříelektrovým zapojením. Referenční elektroda byla Ag/AgCl/3 M-KCl a pomocná elektroda byla uhlíková tyčinka. Základní elektrolyt acetátový pufr (pH 5,0). LSV parametry: počátek a konec potenciálového okna: 0 V a $-1,65 \text{ V}$, potenciálový krok: 5 mV , rychlost polarizace: 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 a 600 mV s^{-1} .

Eliminační voltametrie: metoda EVLS (eliminační voltametrie s lineárním skenem) byla uskutečněna programem evls.exe (vytvořen na Ústavu chemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity), z LSV (voltametrie s lineárním skenem) křivek registrovaných při různých rychlostech polarizace. Získané EVLS záznamy byly hodnoceny dle dřívě publikovaných prací^{17–25}.

Postup izolace: Izolace poly(A) byla prováděna pomocí paramagnetických částic Dynabeads Oligo (dT)25 od firmy Dynal Biotech ASA (Norsko). Zachycení nukleových kyselin polyA, ODN (oligonukleotidů) a mRNA na paramagnetické částice spočívá v hybridizaci mezi řetězcem adeninu, kterým je tvořena polyA a řetězcem thyminu ukotveným na povrchu paramagnetických částic. Paramagnetické částice byly přitahovány magnetickým stojanem MPC-S (Magnetic Particle Concentrator) firmy Dynal Biotech ASA (Norsko). Všechny experimenty s paramagnetickými částicemi byly prováděny za sterilních podmínek, které zajišťoval RNA/DNA UV cleaner box UVT-S-AR (Biosan, Litva). Pro centrifugaci a třepání

vzorků byla využita centrifuga multi-spin MSC-3000 firmy Biosan, Riga, Lotyšsko, která byla umístěna v RNA/DNA UV boxu UVT-S-AR. Proces denaturace probíhal za konstantní teploty $85 \text{ }^\circ\text{C}$ za využití přístroje Thermomixer 5355 Comfort/ Compact (Eppendorf, Hamburg, Německo).

In vitro kultivace rostlin: Obilky kukuřice odrůdy Gila (hybrid F1) byly sterilizovány v roztoku 5% chlornanu sodného v biohazard boxu od firmy Schoeller Instruments, Praha. Poté byly omyty v destilované vodě. Takto připravené obilky byly klíčeny na vlhkém filtračním papíru po dobu sedmi dnů ve tmě při $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Následně byla každá vyklíčená obilka umístěna do skleněné zkumavky s kultivačním médiem obsahujícím CdCl_2 (0, 5, 10, 25, 50 a $100 \mu\text{M}$). Kultivační médium, připravené podle Murashige-Skooga²⁶, obsahovalo pevnou složku, kterou tvořil gerlit. Takto připravené experimentální rostliny byly umístěny do kultivačního boxu (Sanyo, Tokyo, Japonsko) s 14h osvětlením 8000 luxů, teplotou vzduchu $22 \text{ }^\circ\text{C}$ a 60% vlhkostí vzduchu a 10 h ve tmě s teplotou vzduchu $18 \text{ }^\circ\text{C}$ a 60% vlhkostí. Všechny experimenty byly uskutečněny ve třech nezávislých opakováních. Všechny chemikálie použité pro kultivaci byly zakoupeny od společnosti Duchefa (Nizozemí). Suspenzní kultura tabáku linie BY-2 byla udržována v tekutém MS médiu. Suspenze (20 ml) v 50ml Erlenmeyerových baňkách byla umístěna na třepačce Enviromental Shaker – Incubator ES-20 od firmy Biosan Riga, Lotyšsko, za těchto kultivačních podmínek: tma, teplota $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, 135 ot min^{-1} . Subkultivace byla prováděna po 3 nebo 4 dnech přenesením 2 resp. 1 ml suspenze do čerstvého média.

Statistická analýza dat. Úseky a směrnice kalibračních křivek studovaných nukleových kyselin byly testovány t-testem ($P < 0,05$) programem STATISTICA.CZ 8.0 (StatSoft CR, Praha, Česká republika).

Výsledky a diskuse

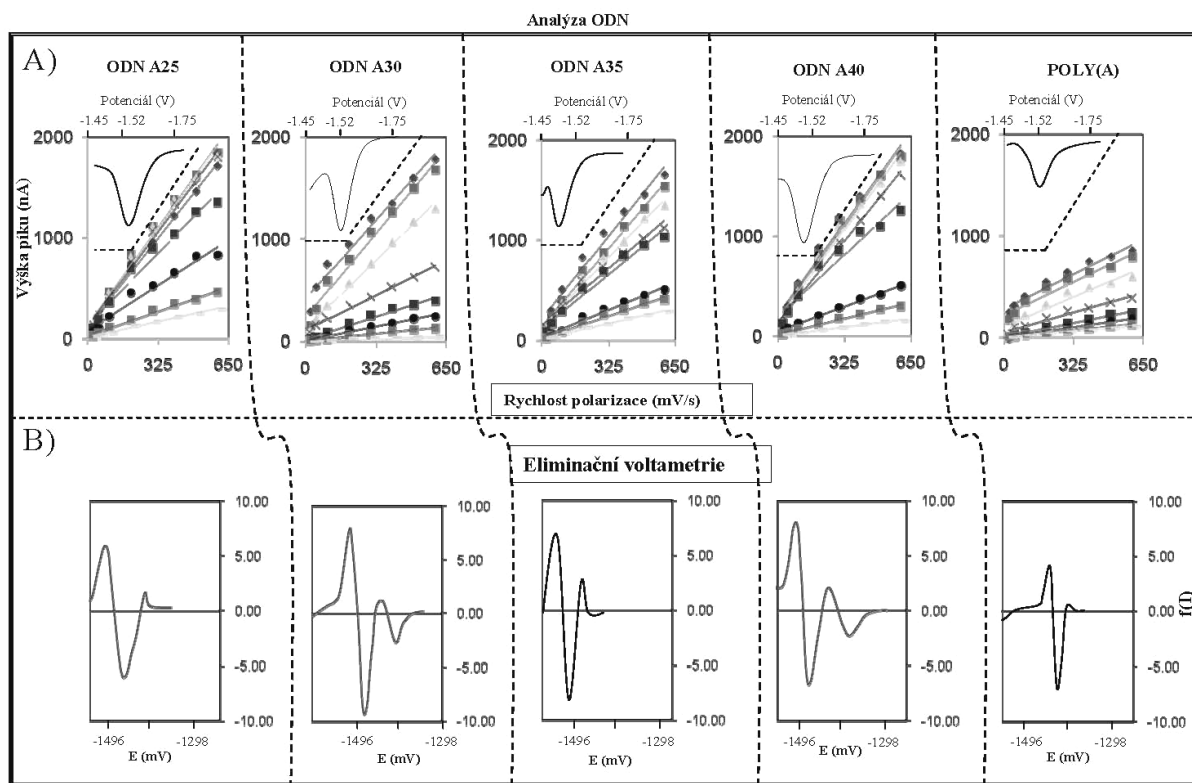
Isolace mRNA za využití paramagnetických mikročastic

Pro izolaci nukleových kyselin byly vypracovány různé postupy vycházející z odstranění interferujících proteinů a následného vysrážení alkoholem nebo ionty těžkých kovů. Klasická izolace vykazuje stále nejvyšší výtěžky nukleové kyseliny, ale je časově náročná a vnáší do postupu řadu systematických chyb způsobených lidským faktorem. Tento závažný problém je řešen několika různými způsoby, především za využití pevných sorbentů a nejnověji pomocí paramagnetických miničastic, resp. mikročastic. Využití paramagnetických mikročastic pro poloautomatizovanou izolaci nukleových kyselin bylo nedávno popsáno v práci Huska a spol.²⁷ Zkráceně je možné postup shrnout do následujících kroků: ze zásobního roztoku se odebere 10 μl mikročastic do mikrozkuřavky, která se přenese do magnetického stojanu, přidá se 20 μl promývacího roztoku (0,1 M-NaCl + 50 mM- Na_2HPO_4 + 50 mM- NaH_2PO_4). Následně se mikrozkuřavka přesune ze stojanu a krátce protřepe tak, aby se paramagnetické částice

v promývacím roztoku dostatečně rozptýlily. Následuje série kroků za použití přístroje multispin MSC-3000, u kterého se střídá centrifugace s třepáním. Oba procesy se 6 \times opakují. Po odstranění zbylého promývacího roztoku se k paramagnetickým částicím přidá hybridizační roztok, který je složen z 0,5 M-NaCl, 0,1 M fosfátového pufru a 0,6 M guanidium thiokyanátu. Celkový objem hybridizačního roztoku i se vzorkem je 30 μl . Hybridizace probíhá opět na přístroji multi-spin MSC-3000 po dobu 40 min. Po hybridizaci následuje stejné promytí paramagnetických částic, které se opět 3 \times opakuje. Promyté paramagnetické částice s navázanou nukleovou kyselinou se umístí na Thermomixer 5355 a při teplotě 85 $^\circ\text{C}$ po dobu 5 min probíhá denaturace. Poté se paramagnetické částice přitáhnou magnetickým stojanem a roztok obsahující pouze mRNA se odsaje a přenese do nové sterilní mikrozkuřavky.

Elektrochemická detekce mRNA

V naší práci jsme využili dostupné paramagnetické částice Dynabeads Oligo (dT)₂₅, které mají na svém povrchu ukotven oligonukleotidový řetězec složený z thyminů. Principem izolace je pak komplementarita mezi



Obr. 2. (A) LSV záznamy ODN A25, A30, A35, A40 a poly(A) na HMDE. Jednotlivé přímky ukazují závislost výšky signálu na rychlosti polarizace mV s^{-1} při koncentracích 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625; 0,078125; 0,039063 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Všechny voltamogramy ve výseku byly získány při koncentraci 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. (B) Eliminační voltamogramy čtvrté eliminační funkce pro studované oligonukleotidy o koncentraci 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (rychlosti polarizace 100, 200 a 400 mV s^{-1})

Tabulka I
Závislost výšky signálu studovaných oligonukleotidů na jejich koncentraci

Data	Potenciál píku [V]	Rovnice kalibrační přímky	R ²	Rozsah linearity [μM]	LOD ^a [nM]	LOQ ^b [nM]	Relativní směrodatná odchylka [%; n = 3]
polyA ^{25 mV/s}	-1,32 ± 0,01	I = 48,98c - 4,992 ^(*)	0,975	0,15–1,25	0,40	1,3	4,2
polyA ^{50 mV/s}	-1,34 ± 0,01	I = 109,0c + 1,663 ^(*)	0,981	0,15–1,25	0,03	0,1	4,5
polyA ^{100 mV/s}	-1,38 ± 0,01	I = 179,5c + 1,768 ^(*)	0,993	0,15–1,25	0,02	0,07	4,0
polyA ^{200 mV/s}	-1,37 ± 0,02	I = 239,2c + 31,56	0,997	0,15–1,25	0,25	0,85	5,1
polyA ^{300 mV/s}	-1,37 ± 0,01	I = 320,6c + 51,60	0,998	0,15–1,25	0,30	1,0	5,3
polyA ^{400 mV/s}	-1,38 ± 0,02	I = 336,1c + 80,85	0,999	0,15–1,25	0,50	1,7	5,1
polyA ^{500 mV/s}	-1,39 ± 0,01	I = 343,7c + 118,0	0,994	0,15–1,25	0,69	2,3	5,3
polyA ^{600 mV/s}	-1,39 ± 0,01	I = 380,7c + 132,3	0,993	0,15–1,25	0,70	2,3	5,2
PRŮMĚR			0,991		0,36	1,2	4,8
A40 ^{25 mV/s}	-1,38 ± 0,03	I = 421,8c - 12,48 ^(*)	0,996	0,03–0,30	0,12	0,40	4,6
A40 ^{50 mV/s}	-1,40 ± 0,03	I = 811,6c - 27,39 ^(*)	0,982	0,03–0,30	0,14	0,50	5,4
A40 ^{100 mV/s}	-1,41 ± 0,03	I = 1363c - 42,26 ^(*)	0,971	0,03–0,30	0,12	0,40	5,2
A40 ^{200 mV/s}	-1,42 ± 0,04	I = 2345c - 70,56 ^(*)	0,953	0,03–0,30	0,12	0,40	4,3
A40 ^{300 mV/s}	-1,43 ± 0,04	I = 2794c - 57,65 ^(*)	0,967	0,03–0,30	0,10	0,35	5,0
A40 ^{400 mV/s}	-1,44 ± 0,04	I = 3402c - 61,17 ^(*)	0,967	0,03–0,30	0,07	0,25	4,9
A40 ^{500 mV/s}	-1,45 ± 0,04	I = 3478c - 30,47 ^(*)	0,973	0,03–0,30	0,04	0,15	4,7
A40 ^{600 mV/s}	-1,46 ± 0,05	I = 4020c - 37,69 ^(*)	0,985	0,03–0,30	0,04	0,15	4,6
PRŮMĚR			0,974		0,09	0,30	4,8
A35 ^{25 mV/s}	-1,39 ± 0,02	I = 226,1c + 2,869 ^(*)	0,953	0,03–0,30	0,03	0,10	5,3
A35 ^{50 mV/s}	-1,40 ± 0,03	I = 497,3c - 4,347 ^(*)	0,971	0,03–0,30	0,04	0,15	5,4
A35 ^{100 mV/s}	-1,42 ± 0,03	I = 792,0c + 14,47 ^(*)	0,911	0,03–0,30	0,04	0,15	4,3
A35 ^{200 mV/s}	-1,50 ± 0,18	I = 1425c + 52,39 ^(*)	0,970	0,03–0,30	0,07	0,25	4,9
A35 ^{300 mV/s}	-1,44 ± 0,04	I = 1855c + 78,39 ^(*)	0,965	0,03–0,30	0,09	0,30	5,6
A35 ^{400 mV/s}	-1,45 ± 0,04	I = 2269c + 102,5 ^(*)	0,967	0,03–0,30	0,09	0,30	5,1
A35 ^{500 mV/s}	-1,46 ± 0,04	I = 2507c + 132,4 ^(*)	0,968	0,03–0,30	0,11	0,40	5,3
A35 ^{600 mV/s}	-1,45 ± 0,03	I = 2680c + 159,3 ^(*)	0,974	0,03–0,30	0,12	0,40	5,8
PRŮMĚR			0,960		0,07	0,25	5,2
A30 ^{25 mV/s}	-1,34 ± 0,01	I = 63,88c + 0,391 ^(*)	0,990	0,03–0,30	0,01	0,04	5,3
A30 ^{50 mV/s}	-1,36 ± 0,02	I = 127,2c + 1,224 ^(*)	0,984	0,03–0,30	0,02	0,07	5,0
A30 ^{100 mV/s}	-1,38 ± 0,03	I = 266,9c + 2,652 ^(*)	0,974	0,03–0,30	0,02	0,07	4,8
A30 ^{200 mV/s}	-1,40 ± 0,03	I = 519,3c + 13,17 ^(*)	0,974	0,03–0,30	0,05	0,17	4,6
A30 ^{300 mV/s}	-1,41 ± 0,03	I = 802,0c + 5,260 ^(*)	0,992	0,03–0,30	0,01	0,04	5,3
A30 ^{400 mV/s}	-1,42 ± 0,04	I = 1015c + 6,956 ^(*)	0,990	0,03–0,30	0,01	0,04	5,4
A30 ^{500 mV/s}	-1,42 ± 0,04	I = 1126c + 16,43 ^(*)	0,972	0,03–0,30	0,03	0,10	5,1
A30 ^{600 mV/s}	-1,41 ± 0,01	I = 1236c + 19,39 ^(*)	0,975	0,03–0,30	0,03	0,10	4,9
PRŮMĚR			0,981		0,02	0,07	5,1

^a Mez detekce (Limit of Detection – LOD) určený jako 3 signál/šum (S/N), kde N vyjadřuje směrodatnou odchylku šumu, ^b mez stanovitelnosti (Limit of Quantification – LOQ) určený jako 10 S/N, I – proudová výška píku (nA), c – koncentrace studované nukleové kyseliny (μg ml⁻¹), ^(*) – úsek rovnice kalibrační křivky studovaných nukleových kyselin je statisticky nevýznamný (P < 0,05)

Tabulka I
Pokračování

Data	Potenciál píku [V]	Rovnice kalibrační přímky	R ²	Rozsah linearity [μM]	LOD ^a [nM]	LOQ ^b [nM]	Relativní směrodatná odchylka [%; n = 3]
A25 ^{25 mV/s}	-1,38 ± 0,01	I = 308,3c + 6,087 ^(*)	0,942	0,03–0,30	0,04	0,14	5,4
A25 ^{50 mV/s}	-1,41 ± 0,03	I = 570,1c + 6,739 ^(*)	0,995	0,03–0,30	0,02	0,07	5,6
A25 ^{100 mV/s}	-1,43 ± 0,04	I = 1105c + 20,13 ^(*)	0,986	0,03–0,30	0,04	0,14	5,0
A25 ^{200 mV/s}	-1,44 ± 0,04	I = 2108c + 52,69 ^(*)	0,965	0,03–0,30	0,05	0,17	5,2
A25 ^{300 mV/s}	-1,45 ± 0,04	I = 2672c + 72,78 ^(*)	0,995	0,03–0,30	0,05	0,17	4,7
A25 ^{400 mV/s}	-1,46 ± 0,04	I = 3010c + 120,5 ^(*)	0,987	0,03–0,30	0,08	0,27	4,3
A25 ^{500 mV/s}	-1,47 ± 0,05	I = 3746c + 128,2 ^(*)	0,977	0,03–0,30	0,07	0,24	4,1
A25 ^{600 mV/s}	-1,47 ± 0,05	I = 3881c + 162,6 ^(*)	0,992	0,03–0,30	0,08	0,27	4,6
PRŮMĚR			0,980		0,05	0,17	4,9

^a Mez detekce (Limit of Detection – LOD) určený jako 3 signál/šum (S/N), kde N vyjadřuje směrodatnou odchylku šumu, ^b mez stanovitelnosti (Limit of Quantification – LOQ) určený jako 10 S/N, I – proudová výška píku (nA), c – koncentrace studované nukleové kyseliny (μg ml⁻¹), ^(*) – úsek rovnice kalibrační křivky studovaných nukleových kyselin je statisticky nevýznamný (P < 0,05)

oligoT řetězcem a poly(A) řetězcem obsaženým na polyadenylační sekvenci, jenž je součástí každé molekuly mRNA (obr. 1). Lze tak získat 100% čistou molekulu mRNA. V našem experimentu jsme nejdříve sledovali interakci paramagnetických částic se syntetickými oligonukleotidy (ODN) o různé délce řetězce (25, 30, 35, 40 a poly(A)). Izolované molekuly jednotlivých ODN (podrobný postup je uveden v části materiálu a metody) byly následně elektrochemicky analyzovány voltametrií s lineárním skenem při různých rychlostech polarizace (25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 a 600 mV s⁻¹) a době akumulace ODN na HMDE 240 s (obr. 2A). Potenciál píku se pohyboval kolem -1,3 až -1,4 V (vs. Ag/AgCl/3 M-KCl). Podrobné elektroanalytické hodnocení studovaných ODN je uvedeno v tab. I a tab. II.

Kalibrační křivky (I_p v závislosti na koncentraci ODN) byly lineární (R² = od 0,960 do 0,991, detaily v tab. I). Úseky získaných kalibračních křivek byly statisticky testovány. Statisticky významné úseky kalibračních křivek byly naměřeny pouze v případě poly(A) za vyšších rychlostí polarizace. Průměrné limity detekce se pohybovaly od 0,020 do 0,360 nM (3 S/N) a limity kvantifikace od 0,080 do 1,200 nM (10 S/N). Relativní směrodatná odchylka stanovení jednotlivých ODN kolísala od 4,8 do 5,2 %.

Na základě zhodnocení získaných voltametriických dat (ze závislosti log I_p na log v) bylo možné potvrdit, že se jedná o adsorpci kontrolovaný elektrodový proces. Na základě směrnice přímek potenciálu píku vs. logaritmu rychlosti polarizace jsme vypočetli hodnoty součinu koeficientu přenosu náboje a počtu elektronů vstupujících do nejpomalejšího kroku (αn) pro ireverzibilní elektrodový proces redukce (tab. II). Celkový počet vyměněných elektronů při elektroredukci bázi nukleových kyselin byl 2.

Pomocí navrženého elektrochemického senzoru jsme sledovali hladinu mRNA izolované z rostlin tabáku a kukuřice kultivovaných v podmínkách explantátové kultury. Pro experiment bylo použito velmi malé množství vzorku (okolo 100 mg) ve třech nezávislých opakováních. Na paramagnetických částicích izolovaná mRNA poskytla redukční píky (cytosinu a adeninu) lineárně závislé na výšce píku a rychlosti polarizace (R² = 0,999) a αn bylo podobné jako u syntetických ODN (1,73 a 1,74). Pro přesnější charakterizaci elektrodového procesu s přenosem náboje v adsorbovaném stavu byla voltametriická data podrobena eliminační proceduře. Získané eliminační voltamogramy pomocí funkce E4 (eliminace kinetického a kapacitního proudu a zachování proudu difúzního) jsou ukázány na obr. 2B. Podle tvaru signálu (pík-protipík) je patrné, že se nukleové kyseliny na povrchu elektrody chovají jako adsorbované částice.

In vitro kultivované rostliny kukuřice v přítomnosti kademnatých iontů

Navrženým postupem byla izolována mRNA ze suspenzní kultury BY2 tabáku a z rostlin kukuřice bez ovlivnění Cd(II). Na získaných voltametriických záznamech byly pozorovány dobře rozlišené píky při potenciálu kolem -1,5 V (vs. Ag/AgCl/3 M-KCl) jak je ukázáno na obr. 3A. Izolované molekuly mRNA tabáku a kukuřice byly následně elektrochemicky analyzovány voltametrií s lineárním skenem při různých rychlostech polarizace (25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 a 600 mV s⁻¹) a době akumulace ODN na HMDE 240 s (obr. 3A). Elektrochemické chování mRNA izolované z rostlin tabáku a kukuřice je podrobně popsáno v tab. III. Pozorované změny pravděpodobně

Tabulka II

Elektrochemické chování oligonukleotidů na HMDE po jejich separaci za využití paramagnetických mikročastic

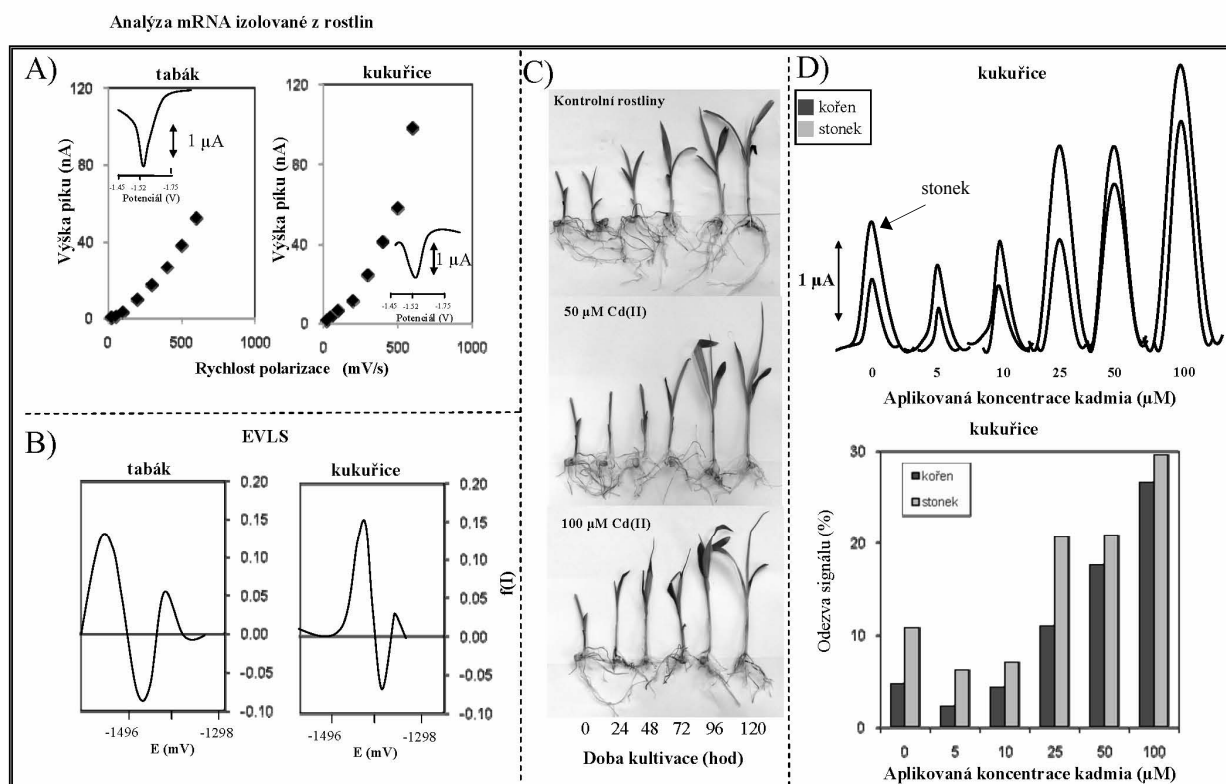
Nukleová kyselina	Rovnice A ^a	Elektroodový proces ^b	R ²	Rovnice B ^c	α ^d	αn ^d
polyA ⁵ $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,398 \log v + 1,825$	0,602	0,996	$E_p = 0,088 \log v + 1,172$	0,39	1,73
polyA ^{2,5} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,468 \log v + 1,594$	0,283	0,995	$E_p = 0,061 \log v + 1,229$	0,56	1,72
polyA ^{1,25} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,717 \log v + 0,838$	0,274	0,972	$E_p = 0,049 \log v + 1,257$	0,69	1,74
polyA ^{0,6} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,726 \log v + 0,598$	0,274	0,952	$E_p = 0,048 \log v + 1,262$	0,69	1,77
polyA ^{0,3} $\mu\text{g/ml}$	$I = 1,137 \log v - 0,687$	-0,137	0,979	$E_p = 0,048 \log v + 1,260$	0,69	1,77
polyA ^{0,15} $\mu\text{g/ml}$	$I = 1,152 \log v - 0,861$	-0,152	0,978	$E_p = 0,046 \log v + 1,264$	0,70	1,83
polyA ^{0,08} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,987 \log v - 0,585$	0,013	0,983	$E_p = 0,046 \log v + 1,258$	0,72	1,78
polyA ^{0,04} $\mu\text{g/ml}$	$I = 1,069 \log v - 0,861$	-0,69	0,972	$E_p = 0,045 \log v + 1,254$	0,78	1,68
PRŮMĚR		0,058	0,978		0,65	1,75
A40 ⁵ $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,759 \log v + 1,173$	0,241	0,995	$E_p = 0,061 \log v + 1,342$	0,57	1,71
A40 ^{2,5} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,817 \log v + 1,015$	0,183	0,995	$E_p = 0,060 \log v + 1,339$	0,57	1,72
A40 ^{1,25} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,803 \log v + 1,033$	0,197	0,998	$E_p = 0,073 \log v + 1,273$	0,48	1,68
A40 ^{0,6} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,784 \log v + 1,032$	0,216	0,997	$E_p = 0,055 \log v + 1,293$	0,64	1,69
A40 ^{0,3} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,725 \log v + 1,121$	0,275	0,989	$E_p = 0,057 \log v + 1,285$	0,60	1,72
A40 ^{0,15} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,717 \log v + 0,686$	0,283	0,998	$E_p = 0,048 \log v + 1,287$	0,70	1,76
A40 ^{0,08} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,877 \log v + 0,055$	0,123	0,998	$E_p = 0,049 \log v + 1,265$	0,71	1,70
A40 ^{0,04} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,967 \log v - 0,452$	0,033	0,996	$E_p = 0,048 \log v + 1,264$	0,70	1,76
PRŮMĚR		0,187	0,996		0,63	1,72
A35 ⁵ $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,737 \log v + 1,191$	0,263	0,994	$E_p = 0,065 \log v + 1,347$	0,52	1,75
A35 ^{2,5} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,780 \log v + 1,022$	0,22	0,998	$E_p = 0,085 \log v + 1,274$	0,39	1,79
A35 ^{1,25} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,739 \log v + 1,078$	0,261	0,998	$E_p = 0,050 \log v + 1,319$	0,70	1,69
A35 ^{0,6} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,717 \log v + 1,080$	0,283	0,996	$E_p = 0,050 \log v + 1,312$	0,67	1,76
A35 ^{0,3} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,816 \log v + 0,791$	0,184	0,993	$E_p = 0,051 \log v + 1,307$	0,67	1,73
A35 ^{0,15} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,899 \log v + 0,233$	0,101	0,993	$E_p = 0,052 \log v + 1,268$	0,64	1,76
A35 ^{0,08} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,988 \log v - 0,090$	0,012	0,994	$E_p = 0,042 \log v + 1,288$	0,81	1,74
A35 ^{0,04} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,941 \log v - 0,128$	0,059	0,971	$E_p = 0,042 \log v + 1,283$	0,85	1,65
PRŮMĚR		0,173	0,992		0,65	1,73
A30 ⁵ $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,529 \log v + 1,774$	0,471	0,983	$E_p = 0,061 \log v + 1,325$	0,53	1,83
A30 ^{2,5} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,719 \log v + 1,245$	0,281	0,984	$E_p = 0,065 \log v + 1,295$	0,52	1,75
A30 ^{1,25} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,762 \log v + 1,003$	0,238	0,997	$E_p = 0,064 \log v + 1,257$	0,51	1,80
A30 ^{0,6} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,650 \log v + 1,045$	0,35	0,996	$E_p = 0,076 \log v + 1,220$	0,42	1,84
A30 ^{0,3} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,960 \log v - 0,018$	0,04	0,995	$E_p = 0,050 \log v + 1,259$	0,68	1,74
A30 ^{0,15} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,981 \log v - 0,295$	0,019	0,994	$E_p = 0,048 \log v + 1,262$	0,70	1,76
A30 ^{0,08} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,964 \log v - 0,537$	0,036	0,992	$E_p = 0,050 \log v + 1,258$	0,68	1,74
A30 ^{0,04} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,998 \log v - 1,074$	0,002	0,987	$E_p = 0,050 \log v + 1,261$	0,75	1,59
PRŮMĚR		0,180	0,991		0,59	1,75

^a Rovnice A – vliv rychlosti polarizace (v) na výšku píku (I), závislost $\log I$ na $\log v$, ^b elektroodový proces určený jako rozdíl mezi teoretickou hodnotou 1 – hodnota směrnice přímky, ^c rovnice B vliv rychlosti polarizace (v) na potenciál píku (E_p), závislost E_p na $\log v$, ^d $\alpha = 47,7/E_p - E_p/2$; α – koeficient přenosu náboje

Tabulka II
Pokračování

Nukleová kyselina	Rovnice A ^a	Elektroodový proces ^b	R ²	Rovnice B ^c	α ^d	αn ^d
A25 ⁵ $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,880 \log v + 0,807$	0,12	0,992	$Ep = 0,058 \log v + 1,356$	0,59	1,73
A25 ^{2,5} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,913 \log v + 0,770$	0,087	0,992	$Ep = 0,056 \log v + 1,357$	0,59	1,79
A25 ^{1,25} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,841 \log v + 0,946$	0,159	0,998	$Ep = 0,061 \log v + 1,347$	0,54	1,81
A25 ^{0,6} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,845 \log v + 0,918$	0,155	0,999	$Ep = 0,063 \log v + 1,338$	0,55	1,69
A25 ^{0,3} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,840 \log v + 0,843$	0,16	0,993	$Ep = 0,050 \log v + 1,307$	0,65	1,81
A25 ^{0,15} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,830 \log v + 0,661$	0,17	0,989	$Ep = 0,050 \log v + 1,305$	0,69	1,71
A25 ^{0,08} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,897 \log v + 0,190$	0,103	0,997	$Ep = 0,041 \log v + 1,290$	0,87	1,66
A25 ^{0,04} $\mu\text{g/ml}$	$I = 0,989 \log v - 0,253$	0,011	0,995	$Ep = 0,043 \log v + 1,286$	0,77	1,79
PRŮMĚR		0,121	0,994		0,65	1,75

^a Rovnice A – vliv rychlosti polarizace (v) na výšku piku (I), závislost $\log I$ na $\log v$, ^b elektroodový proces určený jako rozdíl mezi teoretickou hodnotou 1 – hodnota směrnice přímky, ^c rovnice B vliv rychlosti polarizace (v) na potenciál piku (Ep), závislost Ep na $\log v$, ^d $\alpha = 47,7/Ep - Ep/2$; α – koeficient přenosu náboje



Obr. 3. (A) Závislost výšky signálu (nA) na rychlosti polarizace. Křivky ve výseku byly získány po izolaci mRNA z rostlin kukuřice a suspenzní kultury tabáku. Navážka vzorku byla 0,2 g. (B) Eliminací voltamogramy čtvrté eliminační funkce pro reálné vzorky při rychlostech polarizace 100, 200 a 400 mV s^{-1} . (C) Fotografie rostlin kukuřice vystavených abiotickému stresu způsobenému kadmiovými ionty. V závislosti na době kultivace a koncentraci Cd(II) . (D) LSV záznamy reálných vzorků mRNA z tabáku a kukuřice na HMDE. Závislost na koncentraci kadmiových iontů (μM) a odezvy signálu (%)

Tabulka III

Elektrochemické chování mRNA izolované z rostlin tabáku a kukuřice pomocí paramagnetických mikročásteček na HMDE

Nukleová kyselina	Rovnice A ^a	Elektrodový proces ^b	R ²	Rovnice B ^c	α ^d	αn ^d
mRNA ^{tabák}	$I = 1,685c - 2,937$	-0,685	0,999	$I = 0,043c + 1,264$	0,80	1,73
mRNA ^{kukuřice}	$I = 1,274c - 1,700$	-0,274	0,976	$I = 0,047c + 1,260$	0,72	1,74

^a Rovnice A – vliv rychlosti polarizace (v) na výšku píku (I), závislost $\log I$ na $\log v$, ^b elektrodový proces určený jako rozdíl mezi teoretickou hodnotou I – hodnota směrnice přímky, ^c rovnice B vliv rychlosti polarizace (v) na potenciál píku (E_p), závislost E_p na $\log v$, ^d $\alpha = 47,7/(E_p - E_p/2)$; α – koeficient přenosu náboje

souvisí s více složitými procesy na pracovních elektrodách a také se sekvencí izolovaných mRNA (cit.²⁸). Čtvrtá funkce EVLS u mRNA tabáku a kukuřice opět ukazuje typický obrázek adsorbované částice – signál ve tvaru píku-protipíku (obr. 3B).

V dalším experimentu byly sledovány rostliny kukuřice vystavené abiotickému stresu způsobenému kadmnatými ionty. Z růstové charakteristiky bylo zřejmé, že se zvyšující se koncentrací kadmnatých iontů a dobou kultivace byl růst rostlin inhibován a rostliny vykazovaly morfologické rozdíly (menší počet listů, degradované části listů, celková inhibice růstu) na rozdíl od rostlin kontrolních (obr. 3C).

Histochemicky byly sledovány změny v pletivech (thiolových a flavonoidních sloučenin). $K_3[Fe(CN)_6]$ je v pletivech redukováno látkami s volnými –SH skupinami na modře zbarvené redukční produkty. U kontrolních rostlin byla přítomnost látek s volnými –SH skupinami omezena pouze na rhizodermis (pokožka kořene). Vyšší syntéza látek s –SH skupinami byla pozorována v případě 10 μM koncentrace Cd(II). Naopak téměř žádné látky s volnými –SH skupinami nebyly prokázány u dvou nejvyšších koncentrací kadmia. Zde bylo pozorováno, že v buňkách mezodermis docházelo k syntéze červeně zbarvených látek, tj. látek ze skupiny polyfenolů s výraznými antioxidačními vlastnostmi (další podrobnosti jsou uveřejněny v práci Húska a spol.²⁷).

Vliv zvyšující se koncentrace Cd(II) na rostliny kukuřice v nadzemní i podzemní části ukazuje obr. 3D. V horní části jsou zobrazeny voltamogramy izolované mRNA ze stonkové a kořenové části kukuřice po ovlivnění Cd(II) v prvním dni experimentu. Obsahy mRNA jsou přepočteny na koncentraci poly(A) podle kalibrační křivky tab. I. Množství izolované mRNA se pohybovalo od 10 do 30 $\mu g\ ml^{-1}$ po jejich přepočtu na polyA. Z výsledků se dá předpokládat, že rostliny vystavené abiotickému stresu jsou nuceny zvýšit syntézu různých biologicky aktivních molekul, jako jsou sloučeniny obsahující volné –SH skupiny (glutathion, fytochelatin, proteiny podobné metalothioneinu). Řada takových molekul je syntetizována chemickou reakcí, avšak enzymy účastníci se těchto reakcí jsou genově regulovány. Z těchto příčin je možné pozorovat zvýšenou expresi určité skupiny genů, které povedou k nárůstu hladiny celkové mRNA (transkriptomu)

v rostlinách. V takto velmi dobře charakterizované mRNA je možné hledat specifickou sekvenci konkrétního genu. V oblasti stresové reakce na kadmnaté ionty u rostlin jsou to geny spojené s aktivitou thiolových sloučenin (glutathionu a fytochelatinu).

Závěr

Isolace a detekce nukleových kyselin bude hrát stále významnější roli v oblasti trvale udržitelných průmyslově využitelných technologií. Navrhovaný postup využívající paramagnetické částice ve spojení s elektrochemickou detekcí je pro takové účely velmi vhodný. Při působení stresového faktoru v podobě kadmnatých iontů dochází ke zvyšování množství mRNA ve vzorcích.

Prezentované výsledky bylo možné získat za podpory projektů GA ČR 102/08/1546 a INCHEMBIOL MSM0021622412. Za histochemické analýzy autoři děkují Doc. Petrovi Babulovi z FF VFU v Brně.

LITERATURA

- Adam V., Petřelová J., Potěšil D., Lubal P., Zehnálek J., Sures B., Kizek R.: Chem. Listy 99, 353 (2005).
- Kizek R., Vacek J., Trnková L., Klejdus B., Kubáň V.: Chem. Listy 97, 1003 (2003).
- Kravčuková P., Mareková M., Ostro A.: Chem. Listy 102, 15 (2008).
- Polohová V., Šnejdárková M.: Chem. Listy 102, 173 (2008).
- Vopálenský P., Ruml T., Kotrba P.: Chem. Listy 101, 468 (2007).
- Zajoncová L., Šebela M.: Chem. Listy 101, 36 (2007).
- Húska D., Hubálek J., Adam V., Kizek R.: Electroanalysis 29, 4964 (2008).
- Paleček E., Fojta M.: Talanta 74, 276 (2007).
- Paleček E., Fojta M., Jelen F.: Bioelectrochemistry 56, 85 (2002).
- Paleček E., Jelen F.: Crit. Rev. Anal. Chem. 32, 261 (2002).
- Paleček E., Kizek R., Havran L., Billová S., Fojta M.:

- Anal. Chim. Acta 469, 73 (2002).
12. Paleček E., Masařík M., Kizek R., Kuhlmeier D., Hassmann J., Schulein J.: Anal. Chem. 76, 5930 (2004).
 13. Paleček E., Billová S., Havran L., Kizek R., Miculková A., Jelen F.: Talanta 56, 919 (2002).
 14. Húska D., Adam V., Trnková L., Kizek R.: J. Magn. Magn. Mater. 321, 1474 (2009).
 15. Húska D., Křížková S., Adam V., Hubálek J., Trnková L., Průša R., Havel L., Kizek R.: Tumor Biol. 28, 124 (2007).
 16. Průša R., Kukačka J., Vajtr D., Húska D., Alba J., Adam V., Kizek R.: Clin. Chem. 54, A156 (2008).
 17. Mikelová R., Trnková L., Jelen F.: Electroanalysis 19, 1807 (2007).
 18. Mikelová R., Trnková L., Jelen F., Adam V., Kizek R.: Electroanalysis 19, 348 (2006).
 19. Jelen F., Kouřilová A., Hason S., Kizek R., Trnková L.: Electroanalysis 21, 439 (2008).
 20. Dračka O.: J. Electroanal. Chem. 402, 19 (1996).
 21. Skopalová J., Navrátil T.: Chem. Anal. 52, 961 (2007).
 22. Trnková L.: Chem. Listy 95, 518 (2001).
 23. Trnková L., Jelen F., Petrlová J., Adam V., Potěšil D., Kizek R.: Sensors 5, 448 (2005).
 24. Trnková L., Kizek R., Dračka O.: Electroanalysis 12, 905 (2000).
 25. Trnková L., Jelen F., Postbieglová I.: Electroanalysis 15, 1529 (2003).
 26. Murashige T., Skoog F.: Physiol. Plant. 15, 473 (1962).
 27. Húska D., Hubálek J., Adam V., Vajtr D., Horna A., Trnková L., Havel L., Kizek R.: Talanta 79, 402 (2009).
 28. Trnková L., Postbieglová I., Holík M.: Bioelectrochemistry 63, 25 (2003).

D. Húska^a, V. Adam^{a,b}, L. Trnková^c, and R. Kizek^a
(^aDepartment of Chemistry and Biochemistry, ^bDepartment of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University, Brno, ^cDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno):
Electrochemical Detection of mRNA Isolated from Plant Tissues Using Paramagnetic Microparticles

The aim of this study was to utilize paramagnetic microparticles in isolation of mRNA using electrochemical detection. In this way mRNA from maize seedlings treated with a Cd(II) salt was isolated. The interaction of paramagnetic particles with synthetic oligo- and polynucleotides of various chain lengths was investigated. The average detection limits were 0.020–0.360 nM and the quantification limits 0.080–1.200 nM.