

ELEKTROCHEMICKÉ METODY PRO IDENTIFIKACI BAKTERIÍ, SENZORY A BIOSENZORY

Dagmar CHUDOBOVÁ¹

¹ *Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic*

1. LITERÁRNÍ REŠERŠE

Senzory a biosenzory

Termín biosenzor se začal používat po roce 1977 [1]. Biosenzory jsou analytické přístroje obsahující citlivý prvek biologického původu, který je buď součástí nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem. Poskytuje průběžný elektronický signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné nebo několika (skupin) chemických látek ve vzorku. Obecně tedy toto zařízení převádí určitý fyzikální nebo chemický signál na jiný signál, lépe měřitelný.

Skládá se ze dvou částí, biologické části a převodníku. Jejich využití je velmi široké, od klinické oblasti, přes armádu až po potravinářství. Jako bioreceptory mohou být použity enzymy, protilátky, bílkoviny, oligonukleotidové sekvence aj.

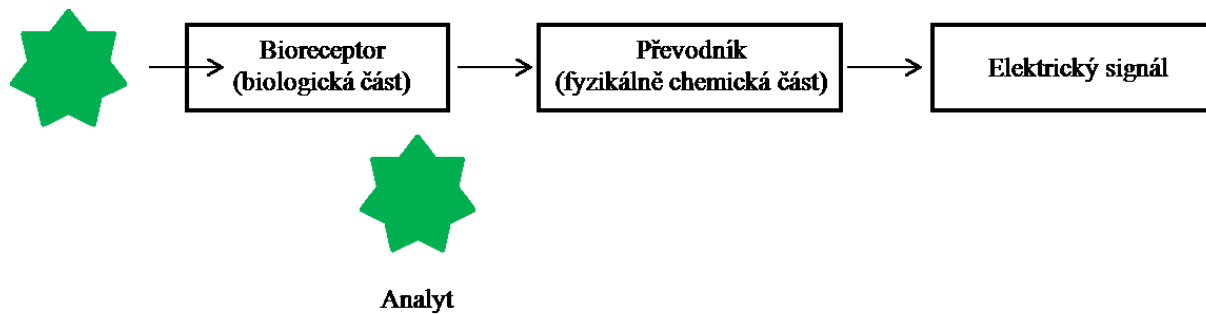
Jedním z hlavních rysů biosenzorů je citlivost a selektivita. Analýza zároveň probíhá v reálném čase, ale na rozdíl od biologických nebo klinických analýz, analýzy s využitím biosenzorů vždy vyžadují označení typu kolorimetrie, fluorescence nebo radioaktivity. Toto značení umožňuje posouzení změn v čase jednotlivých dějů [1]. Častou výhodou biosenzorů je jejich malá velikost a přenositelnost, tudíž stačí relativně malé množství vzorků pro analýzu. Zároveň se vyznačují svou dlouhou životností a univerzálním designem.

Biosenzory se používají pro detekci a identifikaci patogenních mikroorganismů a toxinů, které znečišťují životní prostředí nebo potraviny. Detekcí těchto patogenů se snižuje riziko ohrožení zdraví a tím i související náklady na zdravotní péči a onemocnění z potravin. Biosenzory bývají rovněž využívány k určení organoleptických vlastností potravin. V případě ovoce lze analyzovat obsah některých organických kyselin a cukrů, které jsou indikátory dodržování legislativních požadavků. Zajímavostí z oblasti medicíny jsou tzv. bionické čočky, což jsou biosenzory umístěné do objektivů, které umožňují rychlou diagnostiku oční sítnice [1].

Biosenzory byly v průběhu let podrobeny dalšímu rozvoji, zejména ve vztahu k analýze glukózy a nukleových kyselin. Mezinárodní diabetická federace odhaduje, že diabetes postihuje více než 150 milionů lidí po celém světě a její komplikace mají za následek onemocnění ledvin, slepotu a značně zvýšené riziko vzniku srdečních chorob. Měření hladiny glukózy v krvi je jedním z klinických parametrů při kontrole diabetu. V roce 1962 byla navržena myšlenka na zařízení, kdy postačí jen pár kapek krve a během několika minut je krev zanalyzována. Tato myšlenka byla prvním konceptem pro metody na principu biosenzorů. V současné době se tato analýza stala součástí běžné praxe pro miliony diabetiků po celém světě [1].

Jsou-li použity biosenzory pro klinické účely v biologickém médiu, je celá řada faktorů, které mohou provoz ovlivnit s ohledem na složitost prostředí, ve kterém působí. Nejdůležitějším faktorem mohou být interakce proteinů a buněčného povrchu.

Princip funkce biosenzoru:



Prvky používané jako biosenzory musí splňovat několik základních kritérií, aby mohly být používány jako snímací jednotky. Nejprve musí být potvrzena afinita objektu k prvku a selektivita, aby došlo k rozpoznání prvku v přítomnosti dalších sloučenin.

Využití biosenzorů je v posledních letech zaznamenáváno zejména v odvětví životního prostředí, zemědělsko-potravinářské oblasti a klinické medicíně. Jejich využití sahá od analýzy biochemické spotřeby kyslíku (BSK) až k monitorování detergentů, pesticidů či dalších jedů [1]. Tyto analýzy jsou využitím běžných metod časově velmi náročné, využití biosenzorů pak tento časový interval velmi zkracuje.

Biočipy

Biočipy jsou jedním z nejnovějších nástrojů, které jsou v současné době k dispozici k řešení nových výzev mnoha moderních klinických studií, které vyžadují získání co nejvíce analytických informací v krátkém čase a nejnižší možné náklady.

Přesněji řečeno, biočipy jsou miniaturizovaná zařízení, kdy rozvoj těchto zařízení byl doprovázen schopností řídit a ukládat velké množství informací, v souvislosti k vysokému tahu výzkumu v oblasti bioinformatiky. Tato zařízení jsou rovněž známa jako microarrays a jsou tvořena z podkladu, na kterém je umístěn biologický materiál tvořící matici, takže je známo, co bylo uloženo v každém bodu matrice [1].

Elektrochemické metody pro identifikaci bakterií

Skupina elektrochemických (elektroanalytických) metod vychází z poznatků odvětví fyzikální chemie – elektrochemie. Podstatou elektrochemických metod je studium toho, jak závisí elektrochemické chování roztoků na jejich složení a koncentraci. Objektem zkoumání je elektrochemický článek – soustava, v níž je analyzovaný roztok v kontaktu s elektrodami. Elektrody zprostředkují jeho spojení s měřicím přístrojem, který sleduje některou z elektrických veličin (proud I , potenciál E , vodivost G , elektrický náboj Q , kapacitu C apod.) [2].

Rozdělení elektrochemických metod:

Elektrochemické metody se dělí na dvě základní skupiny:

1) Metody založené na elektrodovém ději

- Potenciometrie (měření, kdy elektrochemický článek je v rovnovážném stavu)
- Voltametrie (koncentrace látky se nemění), elektrogravimetrie, coulometrie (dochází k úplné přeměně látky elektrolýzou)

2) Metody založené na měření elektrických vlastností roztoků

- Konduktometrie (měření vodivosti roztoků)
- Dielektrimetrie (měření kapacity) [2]

Diferenční pulsní voltametrie

Diferenční pulsní polarografie (DPP) je mnohem citlivější metodou než klasická polarografie. Použitím kapkové elektrody s mechanickým odtrháváním kapek se výrazně snižuje spotřeba rtuti. Napětí vkládané po malých přírůstcích pro každou novou kapku. Na konci každého přírůstku napětí je vložen obdélníkový napěťový pulz. Proud je měřen vždy před začátkem pulzu a před jeho koncem a je zjištěna diference mezi těmito proudy ΔI . Tato diference se vynáší v závislosti na vkládaném napětí. Měření proudu na konci kapek výrazně omezuje vliv kapacitního proudu.

Průběh závislosti ΔI na potenciálu odvodíme z průběhu polarografické vlny. Představme si, že z polarografické vlny budeme odečítat proud pro daný potenciál a proud pro potenciál o napěťový pulz negativnější. Vypočítáme rozdíl mezi těmito proudy. K největšímu rozdílu dojdeme v oblasti půlvlnového potenciálu. Proto má výsledná závislost tvar píku. Vrchol píku odpovídá půlvlnovému potenciálu a výška píku obsahuje depolarizátoru ve vzorku. metoda je velmi citlivá, použitelná pro vzorky koncentrací až 10^{-8} mol/l.

Dnes se často používá diferenční pulsní voltametrie (DPV) se stacionárními elektrodami. Při rychlé změně potenciálu 20-50 mV/s (*Fast Scan DPV* – FS DPV = DPV s rychlým záznamem) nevadí, že povrch elektrody není obnovován.

Diferenční normální pulsní voltametrie (DNPV) je možno použít při měření *in vivo*. Vkládané napětí působí v narůstajících pulzech, čímž se minimalizuje nebezpečí poškození tkáně. Na konci každého pulzu je vložen malý obdélníkový pulz. Proud je měřen a vyhodnocován obdobně jako DPV [2].

Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (*cyclic voltammetry*) je metoda, při níž se na stacionární elektrodu v nemíchaném roztoku vkládá potenciál trojúhelníkového průběhu s rychlostí změny (rychlostí polarizace) dE/dt . Polarizační křivky mají tvar píku a proud píku závisí na rychlosti časové změny potenciálu. V důsledku toho, že difúze je relativně pomalý transportní proces, při dostatečně vysoké rychlosti polarizace nestačí produkty elektrodové reakce zcela oddifundovat od elektrody a za vhodných podmínek je lze při opačném směru potenciálové změny detekovat.

Přímé analytické využití metody je malé, hlavní význam má při studiu elektrodových reakcí. Z průběhu katodických a anodických křivek je možno usuzovat na mechanismus elektrodové reakce, např. posuzovat její reverzibilitu.

Pro ireverzibilní děj závisí rozdíl potenciálů anodického a katodického píku na rychlosti polarizace, dE/dt , a hodnotách α a k^0 charakterizujících ireverzibilní děj, přičemž z této závislosti lze uvedené parametry určit. Přímá úměra mezi výškou píku a odmocninou z rychlosti polarizace, $(dE/dt)^{1/2}$, platí pouze u dějů řízených difúzí. U dějů kontrolovaných adsorpcí (při nichž je elektrochemicky přeměňována látka adsorbovaná na povrchu pracovní elektrody) je výška píku přímo úměrná rychlosti polarizace, tj. dE/dt [3].

Elektrická impedance

V současné době se neodmyslitelnou součástí vědy a výzkumu staly analýzy buněk. Ještě donedávna však nebyl znám způsob, jak sledovat procesy probíhající na buněčné úrovni (buněčná smrt nebo naopak nárůst buněčného organismu, proliferace) [4, 5]. Průlom v této neznalosti nastal až s uvedením přístroje xCELLigence na trh, který je jedním z mála komerčně dostupných systémů tohoto typu [6, 7]. Tento přístroj umožňuje životaschopnost buňky monitorovat v reálném čase [8], jak to doposud nebylo možné [9, 10] a je využíván v mnoha odvětvích [11-13]. Jednou z největších výhod této metody je její neinvazivnost, to znamená, že není zapotřebí žádných druhů barvení, ani značení. Přístroj monitoruje buněčné změny formou tzv. relativní impedance.

Pojem impedance rozvádí již existující veličinu elektrický odpor o situace, kdy dochází k průchodu střídavého elektrického proudu. Hodnoty impedance $[Z]$ se vyjadřují v jednotkách Ohm $[\Omega]$ a lze ji vypočítat z následující rovnice, kdy U značí napětí a I proud.

$$Z = \frac{U}{I}$$

Dosud byly impedanční senzory použity mikrobiology v základním výzkumu pro různé aplikace, a to zejména pro hodnocení bakteriálního biofilmu *in vitro* [14]. Nicméně, studie o biofilmu jsou předběžné, v pokusném stadiu, což je ke standardizaci a srovnávání výsledků obtížné. K dispozici jsou komerčně dostupné impedanční snímače určené pro biologické účely. Nejnovějším z nich je přístroj xCELLigence, určený pro měření přilnavosti eukaryotních buněk a jejich životaschopnosti. Pomocí zlatých mikroelektrod je přístroj xCELLigence schopen detekovat změny vodivosti

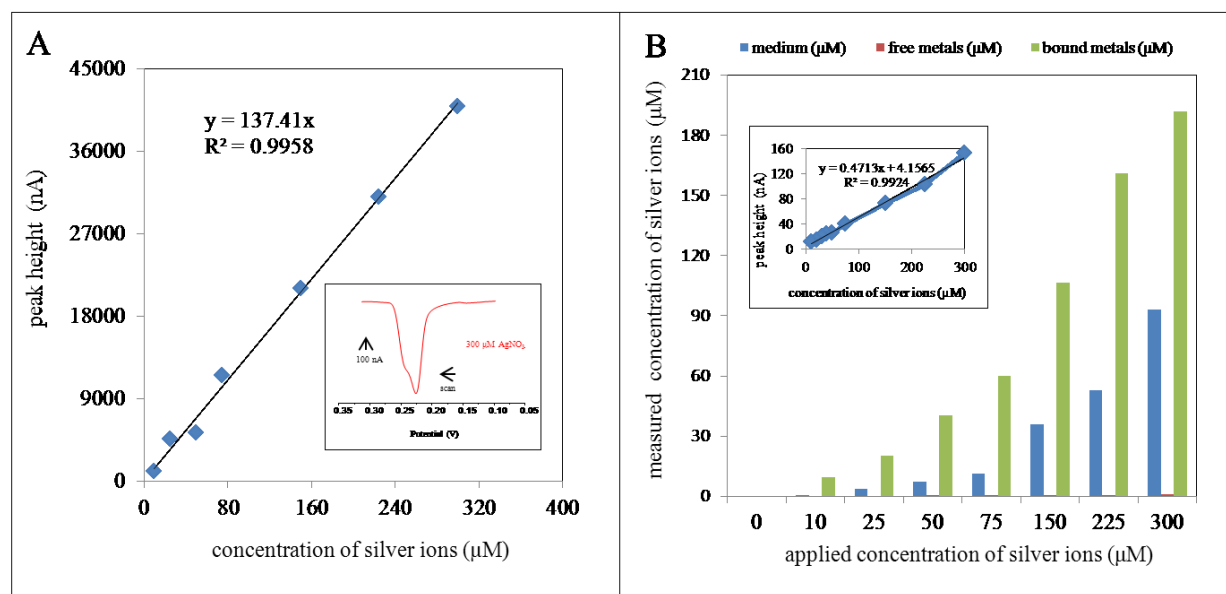
způsobené dopadáním eukaryotické monovrstvy na dno testovací destičky. Změny v impedanci jsou transformovány na bezrozměrný parametr označovaný jako Cell Index (CI).

2. VÝSLEDKY

Diferenční pulzní voltametrie

Pro ověření, kolik použitého stříbra byl vázán na *S.aureus* a kolik z stříbra zůstal v médiu elektrochemické metody byla použita. Pro stanovení elektrochemické těžkého diferenční pulzní voltametrie kovových iontů (DPV) se obvykle používá [15], a může být připojen k elektrodám uhlíkové pasty [16, 17]. Aby bylo možné určit koncentraci předem stanovené látky, je nejprve třeba měřit a sestavení kalibrační křivky, která vždy předchází vlastní měření vzorků [18, 19]. Kalibrační křivka je znázorněna na Obr. 2A s typickou DP voltammogramem ve vložce. Použili jsme tuto metodu kvantifikace stříbra (I) iontů a zjistil, že největší množství použitého kovu byl vázán na bakterie *S.aureus*. Kovy v médiu byly měřeny ve vyšších koncentracích než volné kovy (obr. 2B).

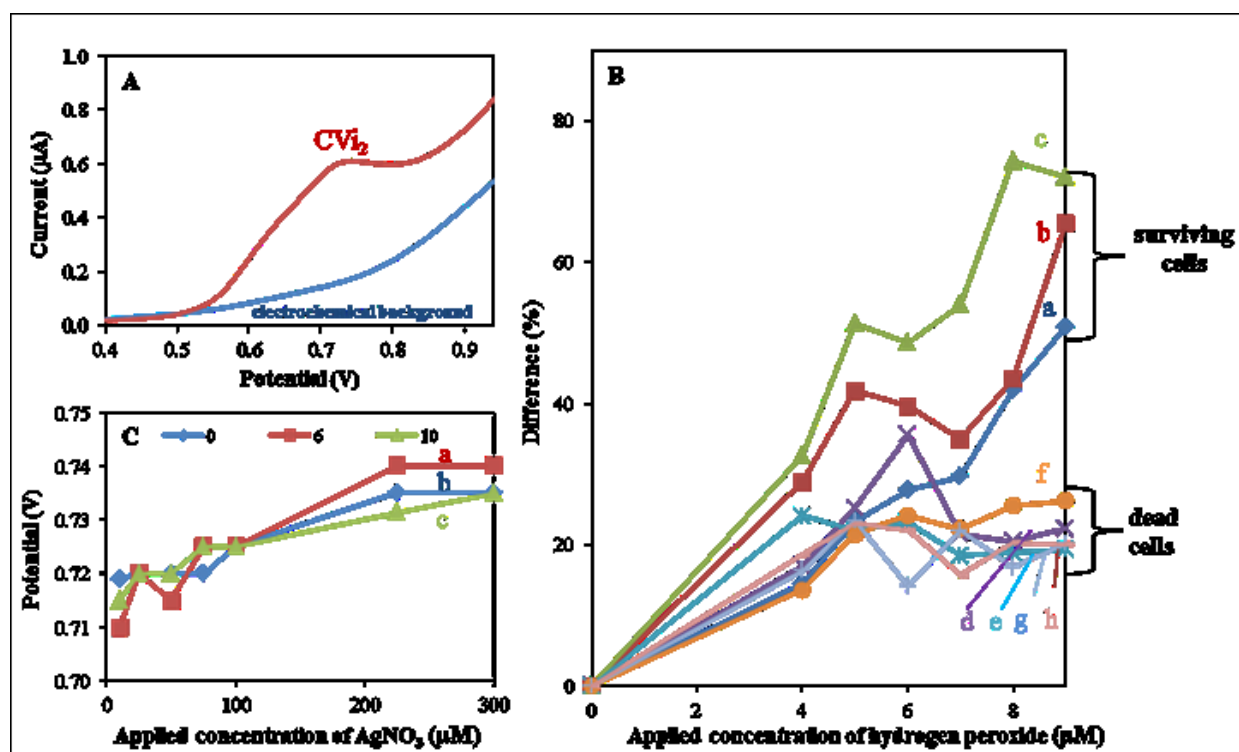
Obrázek 1. (A) Elektrochemická analýza *Staphylococcus aureus*. Kalibrační křivka stříbrných iontů (0, 10, 25, 50, 75, 150, 225 and 300 μM). Parametry DPV byly následující: počáteční potenciál -0.2 V, konečný potenciál 0.5 V, amplituda 0.05 V, doba akumulace 60 s. (B) Elektrochemická analýza *Staphylococcus aureus* a stříbrných iontů v médiu, kovů volných a kovů vázaných. Porovnání aplikovaného množství stříbrných iontů o různých koncentracích (0, 10, 25, 50, 75, 150, 225 and 300 μM) a naměřeného množství.



Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (CV) je základní elektrochemická metoda implementovaná ve všech elektrochemických analyzátoch. Z tohoto důvodu je velmi dobře přístupná a použitelná pro různé uživatele [20-23]. Tištěné elektrody jsou v poslední době stále více populární, hlavně díky svým kompaktním rozměrům, nízké spotřebě analytu a snadnému použití pro širokou škálu aplikací [24-41]. Pomocí této metody jsme byli schopni prokázat zvýšení oxidačního signalu u lyzátu *S.aureus* s různými koncentracemi stříbra a peroxidu vodíku. Zvýšení oxidačního signálu bylo pozorováno s rostoucí koncentrací stříbra a peroxidu vodíku, což značí zvyšující se oxidační stres. Pro lepší pochopení byly voltamogramy přepočítány elektrochemickým indexem.

Obrázek 3. (A) Cyklické voltamogramy 0,2 M acetátového pufru (pH 5) a oxidační píky *Staphylococcus aureus* (koncentrace *S.aureus* koresponduje s absorbancí 0,1). (B) Závislost oxidačního stresu *S.aureus* na aplikované koncentraci peroxidu vodíku (0, 6, 10 mM) obohaceného o AgNO_3 (a = 0, b = 10, c = 25, d = 50, e = 75, f = 150, g = 225 and h = 300 μM). (C) Závislost hodnoty potenciálu oxidačního stresu *S.aureus* na aplikované koncentraci iontů stříbra a peroxidu vodíku.

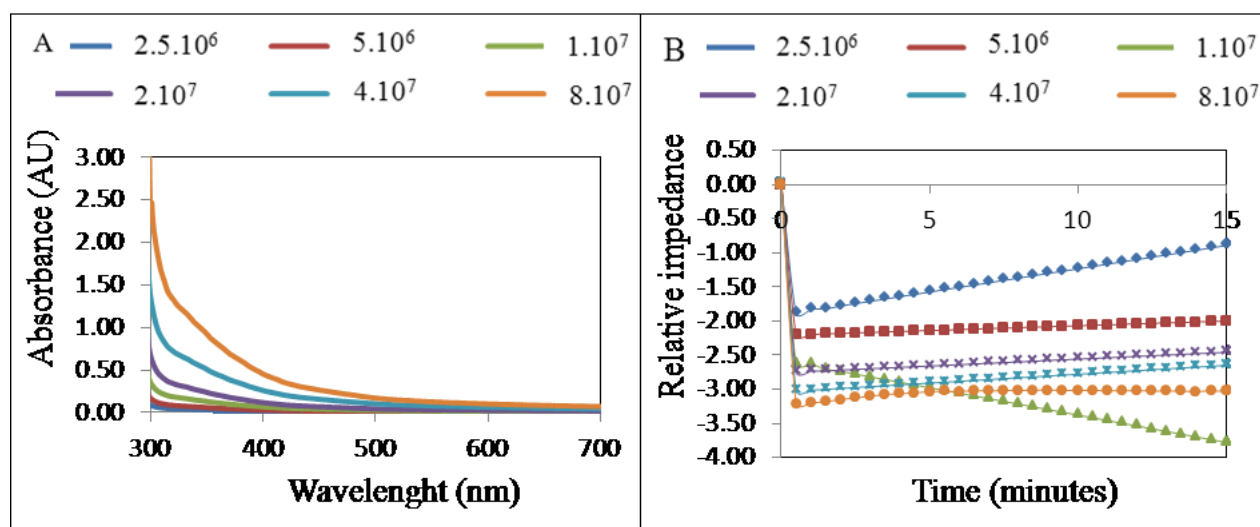


Elektrická impedance

Naše studie byla zaměřena na stanovení hodnoty relativní impedance bakterie *Staphylococcus aureus*, chitosanu a komplexů těchto látek. Bakteriální kultura nebo chitosan o objemu 200 μl byly pipetovány do jednotlivých jamek E-destiček se zlatými elektrodami na dně jamek. Zároveň byl testován komplex těchto látek v poměru 1:1. Vzorky napipetované v E-destičkách byly umístěny do přístroje xCELLigence RTCA DP a byla stanovovaná tzv. relativní impedance v časovém intervalu 15 minut, komplex pak v časovém intervalu 30 sekund, jelikož docházelo k okamžité interakci testovaných látek a tudíž k okamžitým změnám relativní impedance.

Nejprve byla změřena impedance pro *S.aureus* (koncentrace 8.10^7 , 4.10^7 , 2.10^7 , 1.10^7 , 5.10^6 , $2.5.10^6$ buněk v 1 ml) a chitosan (koncentrace 0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125 a 250 μM) samostatně v čase 15 minut po 5ti minutových intervalech (0, 5, 10 a 15 minut), poté byl proměřen jejich komplex (konstantní koncentrace bakteriální kultury a rozdílné koncentrace chitosanu). U komplexu byl interval mezi jednotlivými měřeními snížen na 30 sekund, jelikož k výrazným změnám v relativní impedanci tohoto komplexu docházelo ihned po smíchání obou látek, proto bylo nutné sledovat změny v menších časových rozestupech.

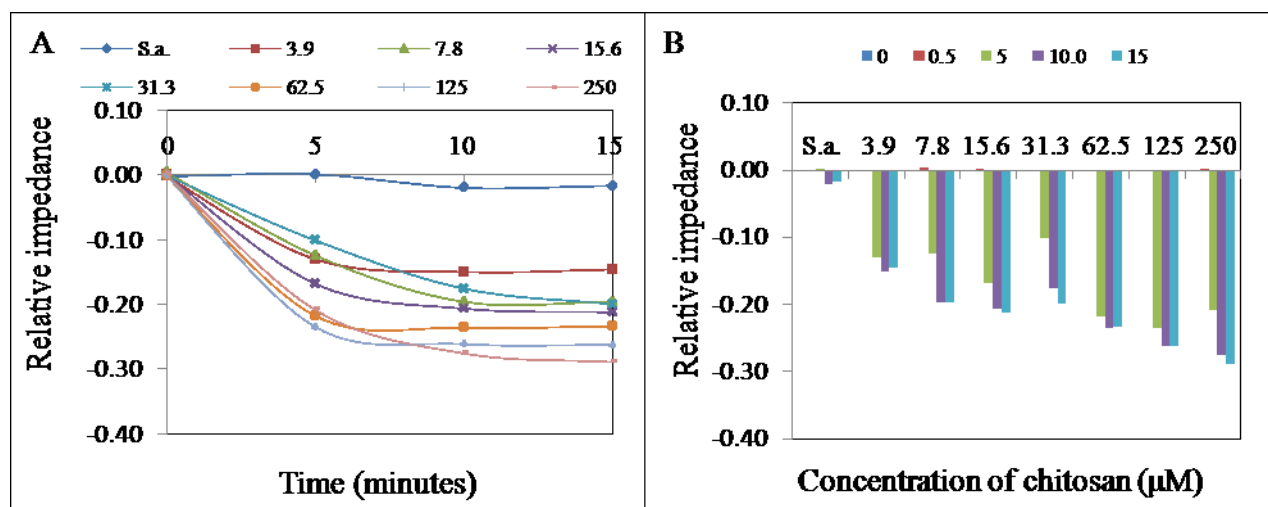
Obrázek 3. Měření impedance bakteriální kultury *Staphylococcus aureus* (množství buněk 8.10^7 , 4.10^7 , 2.10^7 , 1.10^7 , 5.10^6 , $2.5.10^6/1$ ml) v časovém intervalu 15 minut.



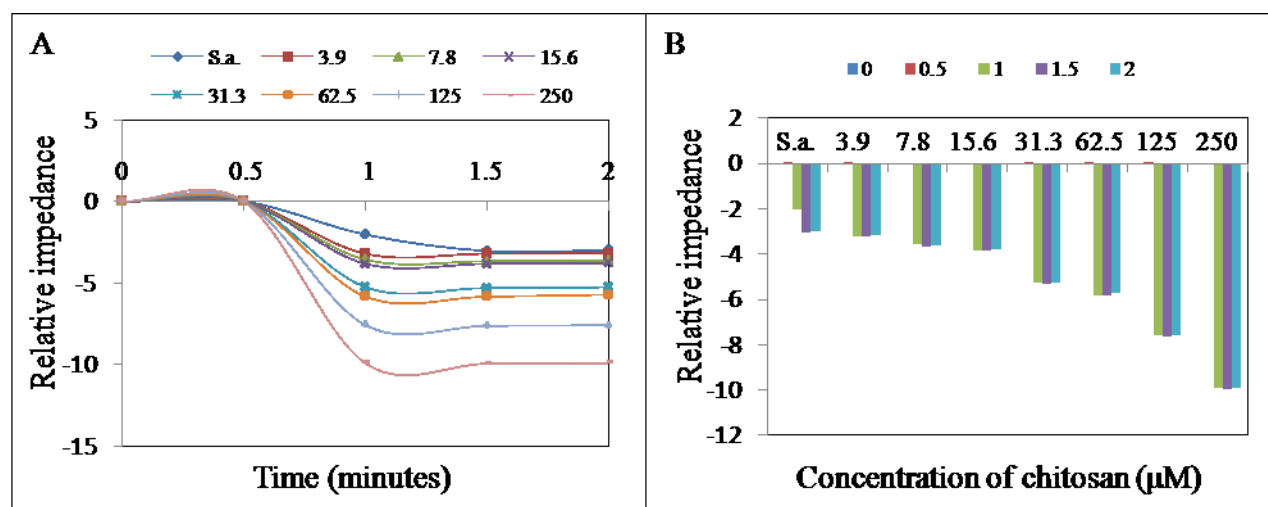
K porovnání výsledků dosažených přístrojem xCELLigence může sloužit spektrofotometrický záznam (Obr. 2A), který spektrofotometricky monitoruje bakteriální kulturu v koncentracích použitých při měření impedance (koncentrace 8.10^7 , 4.10^7 , 2.10^7 , 1.10^7 , 5.10^6 , $2.5.10^6$ buněk v 1 ml). Se zvyšující se koncentrací bakteriální kultury rostla hodnota naměřené absorbance.

Hodnoty relativní impedance pro samostatnou kulturu *S.aureus* (Obr. 2B) klesaly v závislosti na koncentraci bakteriální kultury hned v první minutě měření na hodnoty v rozmezí -1.7 (koncentrace *S.aureus* $2.5.10^6$) až -3.5 (koncentrace kultury 8.10^7), hodnoty pro samotný chitosan se v prvních 5 minutách pohybovaly v rozmezí -0.15 (3.9 μM koncentrace chitosanu) až -0.3 (250 μM koncentrace chitosanu) (Obr. 3A).

Obrázek 4. Měření impedance rozdílných koncentrací chitosanu (0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250 μM) v časovém intervalu 15 minut.



Obrázek 5. Měření relativní impedance bakteriální kultury *Staphylococcus aureus* v komplexu s rozdílnými koncentracemi chitosanu (0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250 μM) v časovém intervalu 2 minut.



Po smíchání těchto látek (100 μl *S.aureus* o absorpaci 0.1 a 100 μl chitosanu o koncentracích 0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125 nebo 250 μM) a následnému proměření pak ale došlo k výraznému poklesu relativní impedance až k -12.7, a to už v první minutě měření (Obr. 4A) Hodnoty relativní impedance pro komplex se pohybovaly od -3.1 do -12.7 v závislosti na koncentraci přidané polymerní látky chitosanu k bakteriální kultuře o konstantní koncentraci 8.10^7 . Bylo tedy jasně vidět, že ihned po smísení obou testovaných látek (*S.aureus* a chitosan) docházelo ke vzniku interakcí, které se projeví rychlým přisedáním buněk na dno jamek se zlatými elektrodami, což se vyznačovalo poklesem tzv. relativní impedance.

Reference

1. Ortega, F., *Biosensores y Biochips: Herramientas para el diagnostico y la Terapeutica*. Real Academia Nacional de Farmacia, 2006: p. 140.
2. Klouda, P., *Moderní analytické metody*. 2003: p. 132.
3. Barek, J., F. Opekar, and K. Štulík, *Elektroanalytická chemie*. 2005: p. 188.
4. Rodrigues, J.R., et al., *N'-Formyl-2-(5-nitrothiophen-2-yl)benzothiazole-6-carbohydrazide as a potential anti-tumour agent for prostate cancer in experimental studies*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2013. **65**(3): p. 411-422.
5. Whiteway, S.L., et al., *Inhibition of cyclin-dependent kinase 6 suppresses cell proliferation and enhances radiation sensitivity in medulloblastoma cells*. *Journal of Neuro-Oncology*, 2013. **111**(2): p. 113-121.
6. Junka, A.F., et al., *Use of the Real Time xCelligence System for Purposes of Medical Microbiology*. *Polish Journal of Microbiology*, 2012. **61**(3): p. 191-197.
7. Ploderl, K., et al., *xCELLigence real time cell analyzer single plate system as quality control for human platelet lysate*. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2012. **6**: p. 406-406.
8. Limame, R., et al., *Comparative Analysis of Dynamic Cell Viability, Migration and Invasion Assessments by Novel Real-Time Technology and Classic Endpoint Assays*. *Plos One*, 2012. **7**(10).
9. Ke, N., X. Wand, and X. Yama, *The xCELLigence System for Real-Time and Label-Free Monitoring of Cell Viability*. *Methods in Molecular Biology*, 2011. **740**: p. 33-43.
10. Rajaraman, G., et al., *Optimization and Scale-up Culture of Human Endometrial Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: Potential for Clinical Application*. *Tissue Engineering Part C- Methods*, 2013. **19**(1).
11. Kaitu'u-Lino, T.J., et al., *Targeted Nanoparticle Delivery of Doxorubicin Into Placental Tissues to Treat Ectopic Pregnancies*. *Endocrinology*, 2013. **154**(2): p. 911-919.
12. Redova, M., et al., *MiR-210 expression in tumor tissue and in vitro effects of its silencing in renal cell carcinoma*. *Tumor Biology*, 2013. **34**(1): p. 481-491.
13. Pileczki, V., et al., *TNF-alpha Gene Knockout in Triple Negative Breast Cancer Cell Line Induces Apoptosis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013. **14**(1): p. 411-420.
14. Ramasamy, R.P., et al., *Impact of initial biofilm growth on the anode impedance of microbial fuel cells*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008. **101**(1): p. 101-108.
15. Radulescu, M.C., et al., *Determination of Silver(I) by Differential Pulse Voltammetry Using a Glassy Carbon Electrode Modified with Synthesized N-(2-Aminoethyl)-4,4 '-Bipyridine*. *Sensors*, 2010. **10**(12): p. 11340-11351.
16. Peverly, A.A. and D.G. Peters, *Electrochemical Determination of Trihalomethanes in Water by Means of Stripping Analysis*. *Anal. Chem.*, 2012. **84**(14): p. 6110-6115.
17. Yan, G.P., et al., *A highly sensitive electrochemical assay for silver ion detection based on unlabeled C-rich ssDNA probe and controlled assembly of MWCNTs*. *Talanta*, 2012. **94**: p. 178-183.
18. Bir, F., et al., *Electrochemical depositions of fluorohydroxyapatite doped by Cu²⁺, Zn²⁺, Ag⁺ on stainless steel substrates*. *Appl. Surf. Sci.*, 2012. **258**(18): p. 7021-7030.
19. de Avila, B.E.F., et al., *Sensitive and rapid amperometric magnetoimmunosensor for the determination of Staphylococcus aureus*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012. **403**(4): p. 917-925.
20. Estevao, M.S., et al., *Analysis of the antioxidant activity of an indole library: cyclic voltammetry versus ROS scavenging activity*. *Tetrahedron Lett.*, 2011. **52**(1): p. 101-106.
21. Gomes, A., et al., *Cyclic voltammetric analysis of 2-styrylchromones: Relationship with the antioxidant activity*. *Bioorg. Med. Chem.*, 2008. **16**(17): p. 7939-7943.

22. Nyska, A. and R. Kohen, *Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification*. Toxicol. Pathol., 2002. **30**(6): p. 620-650.
23. Chevion, S. and M. Chevion, *Antioxidant status and human health - Use of cyclic voltammetry for the evaluation of the antioxidant capacity of plasma and of edible plants*, in *Reactive Oxygen Species: From Radiation to Molecular Biology: A Festschrift in Honor of Daniel L Gilbert*, C.C. Chiueh, Editor. 2000, New York Acad Sciences: New York. p. 308-325.
24. Prasek, J., et al., *Optimization of Planar Three-Electrode Systems for Redox System Detection*. Int. J. Electrochem. Sci., 2012. **7**(3): p. 1785-1801.
25. Caramit, R.P., et al., *A new voltammetric method for the simultaneous determination of the antioxidants TBHQ and BHA in biodiesel using multi-walled carbon nanotube screen-printed electrodes*. Fuel, 2013. **105**: p. 306-313.
26. Tomassetti, M., et al., *Comparison of three immunosensor methods (surface plasmon resonance, screen-printed and classical amperometric immunosensors) for immunoglobulin G determination in human serum and animal or powdered milks*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2013. **73**: p. 90-98.
27. Shimomura, T., et al., *A novel, disposable, screen-printed amperometric biosensor for ketone 3-beta-hydroxybutyrate fabricated using a 3-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase-mesoporous silica conjugate*. Anal. Bioanal. Chem., 2013. **405**(1): p. 297-305.
28. Caygill, J.S., et al., *Disposable screen-printed sensors for the electrochemical detection of TNT and DNT*. Analyst, 2013. **138**(1): p. 346-352.
29. Prasek, J., et al., *Methods for carbon nanotubes synthesis – Review*. J. Mater. Chem., 2011. **21**(40): p. 15872-15884.
30. Chomoucka, J., et al., *Nanotechnologies for society. New designs and applications of nanosensors and nanobiosensors in medicine and environmental analysis*. Int. J. Nanotechnol., 2012. **9**(8/9): p. 746-783.
31. Adam, V., et al., *Lactoferrin isolation using monolithic column coupled with spectrometric or micro-amperometric detector*. Sensors, 2008. **8**(1): p. 464-487.
32. Huska, D., et al., *Miniaturized electrochemical detector as a tool for detection of DNA amplified by PCR*. Electrophoresis, 2008. **29**(24): p. 4964-4971.
33. Trnkova, L., et al., *Amperometric sensor for detection of chloride ions*. Sensors, 2008. **8**(9): p. 5619-5636.
34. Adam, V., et al., *Easy to use and rapid isolation and detection of a viral nucleic acid by using of paramagnetic microparticles and carbon nanotubes-based screen-printed electrodes*. Microfluid. Nanofluid., 2010. **8**(3): p. 329-339.
35. Pohanka, M., et al., *Carbofuran assay using gelatin based biosensor with acetylcholinesterase as a recognition element*. Int. J. Electrochem. Sci., 2013. **8**(1): p. 71-79.
36. Shestivska, V., et al., *Investigation of the antioxidant properties of metallothionein in transgenic tobacco plants using voltammetry at a carbon paste electrode*. Int. J. Electrochem. Sci., 2011. **6**: p. 2869-2883.
37. Pohanka, M., et al., *Electrochemical biosensor based on acetylcholinesterase and indoxylacetate for assay of neurotoxic compounds represented by paraoxon*. Int. J. Electrochem. Sci., 2012. **7**(1): p. 50-57.
38. Zitka, O., et al., *Electrochemical study of DNA damaging by oxidation stress*. Comb. Chem. High Throughput Screen., 2013. **in press**.
39. Zitka, O., et al., *Microfluidic tool based on the antibody-modified paramagnetic particles for detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine of prostate cancer patients*. Electrophoresis, 2011. **32**(22): p. 3207-3220.
40. Dospivova, D., et al., *Electrochemical behaviour of apoferritin encapsulating of silver(I) ions and its application for treatment of Staphylococcus aureus*. Int. J. Electrochem. Sci., 2012. **7**(7): p. 6378-6395.

41. Sobrova, P., et al., *Voltammetry of adiponectin and its interactions with collagen on a carbon paste electrode at femtogram level*. Int. J. Electrochem. Sci., 2012. **7**(1): p. 1-12.