

## MARKERY VYVOLANÉ STRESEM PŮSOBENÍM TĚŽKÝCH KOVŮ

Dalibor Húska, Vojtěch Adam, René Kizek

### ÚVOD

Narůstající význam paramagnetických mikro a nanočástic vzhledem k jejich široké působnosti, od separace a izolace celých buněk (bakterií), proteinů, virových částic, nukleových kyselin až po magnetickou zobrazovací resonanci a magnetickou hypertermii, ukazuje na jejich stále výraznější využívání v pokročilých technologiích. Mezi ně bezesporu patří i technologie sensorů, neboť jednoduché, selektivní, senzitivní senzory a biosenzory představují unikátní nástroje pro rychlou detekci vybraného analytu i v poměrně složité matrici (*Adam, a kol., 2005, Kizek, a kol., 2003, Kravcukova, a kol., 2008, Polohova a Snejdarkova, 2008, Vopalensky, a kol., 2007, Zajoncova a Sebela, 2007*). Unikátnost nabývá na významu, pokud existuje možnost napojení vhodného a spolehlivého senzoru do automatizovaného režimu. V uvedeném procesu automatizace dochází k výraznému snížení kontaminace vzorku a experimentálních chyb způsobených lidským faktorem, což je důležité i v analýze nukleových kyselin (DNA, RNA) jak pro účely diagnostické, tak kriminalistické (*Huska, a kol., 2008*). 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 (vlas, 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 částice (*Palecek a Fojta, 2007*). Ukazuje se, že propojení paramagnetických částic s elektrochemickou detekcí přináší jednoduchý postup izolace sledovaných molekul (*Huska, a kol., 2009, Palecek, a kol., 2002, Palecek, a kol., 2002, Palecek a Jelen, 2002, Palecek, a kol., 2002, Palecek, a kol., 2004*). Celý systém izolace je možné rozdělit do tří samostatných

kroků vázaných na tři různé povrchy. První krok je podmíněn povrchem, kde 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. Posledním krok – detekce – je reprezentovaný povrchem vysoce účinného elektrochemického detektoru.

Kromě DNA je nečastěji 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 dřeně, 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. Následnou tepelnou denaturací lze zachycenou mRNA z paramagnetických částic uvolnit a následně s ní dále pracovat za využití analytických nebo molekulárně-biologických technik (*Huska, a kol., 2007,2009, Prusa, a kol., 2008*).

## GENOM, TRANSKRIPTOM, PROTEOM

Věda postupně přechází od poznání genomu k transkriptomu a dál k proteomu. Dnes je podle *International sequencing consortium* zcela osekvenováno kolem 700 organismů a další stovky se očekávají do konce roku 2012. Mezi nejčastěji sekvencované organismy patří prokaryota a to hlavně z důvodu jejich patogenity, dále mezi důležité organismy, které byly osekvenovány patří organismy modelové jako je *Drosophila Melanogaster* a *Arabidopsis thaliana*. Velmi důležitou skupinou jsou kulturní plodiny zde byl zatím plně osekvenován genom rýže a kukuřice. Samozřejmě nejdůležitějším organismem, který byl osekvenován je člověk. Oborem, který se zabývá stanovením úplného genetického kódu daného organismu se nazývá genomika. Tato vědní disciplína se ještě dál dělí na genomiku strukturní a funkční. Genomika však začala nevyhovovat v oblasti exprese genu a na základě informací, které popsala genomika se začal rozvíjet nový vědní obor transkriptomika (*Huska, 2009*).

### Transkriptomika

Transkriptomika se zabývá sledováním exprese genů, hledáním rozdílů v genové expresi za různých podmínek, v různých stádiích vývoje a v různých orgánech. Transkriptom je pak soubor všech mRNA přítomných v daném okamžiku v dané buňce, pletivu, orgánu. Transkriptom vytváří šablonu pro syntézu proteinů tedy proteomu. U eukaryot se mRNAs váží k polyribosomům (polysomům) kde se podrobí translaci výsledkem jsou pak proteiny. Naproti tomu translatačně inaktivované mRNAs jsou asociovány k samostatným ribozomům (monosomy). Konstantní tok mRNA molekul mezi těmito dvěma stavy je klíčový v regulaci syntézy proteinů. Další faktory hrající roli během translace mRNA jako je jednoduchý rozklad mRNA v reakci na různé podněty mohou mít významný vliv na konečném množství syntetizovaných proteinů. Navíc post-transkripční úpravy jako alternativní sestřih mRNA zvyšují rozmanitost proteinů, které mohou být syntetizovány z určitého množství genů. Z těchto důvodů se v poslední době začala velmi intenzivně vyvíjet i oblast vědy nazvaná proteomika, zabývající se expresí genetické informace na úrovni proteinů. Je ale velmi důležité znát primární molekuly

mRNA zodpovědné za syntézu základních proteinů. (Adam, a kol., 2003, Adkins, a kol., 2002, Anderson a Seilhamer, 1996, Gygi, a kol., 1999, Ross, 1995, Zong, a kol., 1999)

Genomika, transkriptomika i proteomika jsou navzájem propojené vědní disciplíny, které pomohou pochopit celistvost organismů na molekulární úrovni. Každý tento vědní obor přispívá svým dílčím příspěvkem. Bez genomiky bychom nevěděli sekvence a umístění genu na chromozómu bez transkriptomiky bychom neznali expresi jednotlivých genů a bez proteomiky bychom neznali konečnou expresi, strukturu a interakce jednotlivých proteinů.

Sledování exprese genů je však stále významné. Uvážíme-li, že stále platí to, aby se protein mohl realizovat musí projít přes molekulu mRNA a pokud dojde k neočekávaným situacím, jako je například náhlý vliv stresových faktorů na organismus, dochází v buňce ke změně metabolismu a potřebě syntetizovat nové enzymy, proteiny, struktury. Jedna molekula mRNA není schopna toto všechno realizovat, a tudíž profil exprese se začne významně měnit od stavu, kdy se nachází organismus v optimálních podmínkách. Zvyšuje se tak podíl aktivních mRNA. (Guhaniyogi a Brewer, 2001, Zhou, a kol., 1998)

## Metody sledování exprese

Od začátku 90. let 20. století se vyvinulo mnoho různých metod schopných detekovat a kvantifikovat míru genové exprese, jako je DD differential display (diferenciální display), SAGE serial analysis of gene expression (sériová analýza genové exprese), rapid analysis of gene expression (SAGE). RT-PCR, Northern blotting, S1 nuclease protection assay (S1 test ochrany před účinkem nukleázy) a DNA Microarrays/ genové čipy. Porozumění funkci genu je založeno na expresi a regulaci daného genu v souvislosti k mnoha dalším souvisejícím a nesouvisejícím genům. Obecně je to nazýváno jako *global gene profiling*. Porozumění funkce genu je mnohem složitější než pouhé objasnění jeho základní struktury, je třeba pochopit, jak je exprese kontrolována a jak exprese ovlivňuje další geny a skupiny genů. (Alwine, a kol., 1977), (Berk a Sharp, 1977), (Adams, a kol., 1991), (Okubo, a kol., 1992), (Velculescu, a kol., 1995)

## Genové čipy

Genové čipy nebo také microarrays se zavádějí v polovině 90. let minulého století. Jejich rozvoj byl indukován většími nároky genomiky, kdy pro pochopení komplexnosti nestačilo sledovat exprese jednoho genu, ale všech genů celého genomu. Microarray se začínají intenzivně rozvíjet společně s osekvenovanými organizmy. Zavedením těchto metod se intenzivně rozvíjí i funkční genomika následována transkriptomikou. Následující kapitola se bude zabývat principem microarray. (*Epstein, a kol., 2002*)

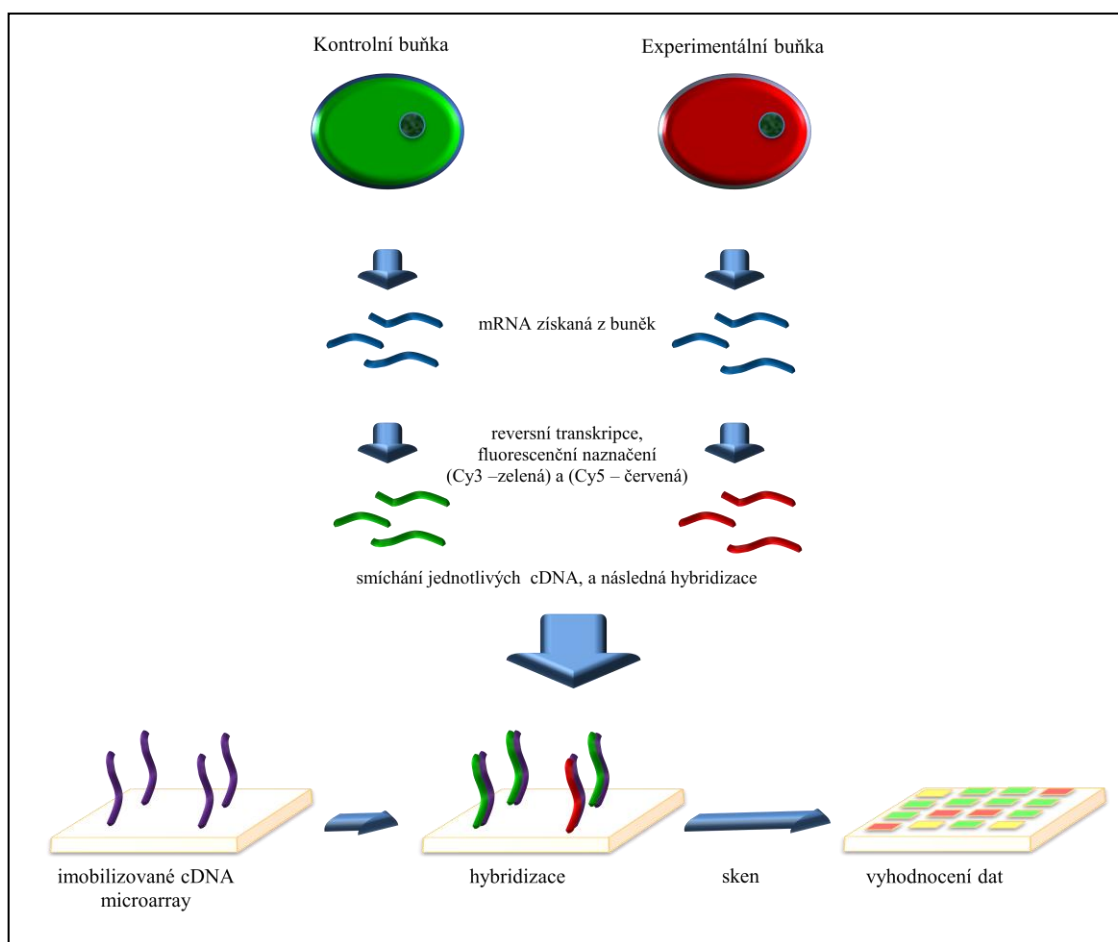
Genové čipy lze rozdělit podle typu sledované molekuly na i) DNA microarrays – analýza DNA pro určení změny v počtu kopií genů nebo chromozomů ii) mRNA microarray (expresní microarray) – analýza cDNA nebo přímo mRNA, pro určení konkrétní exprese genů v daném okamžiku. My se budeme zabývat technikami expresních čipů.

Principem expresních čipů je imobilizace cDNA (tj. mRNA převedená pomocí enzymu RNA reverzní transkriptázou zpět na cDNA) nebo krátkých syntetických specifických deoxyoligonukleotidů odvozených z dané mRNA na skleněnou mikrotitrační destičku. Analýza daného vzorku pak probíhá na základě hybridizace značeného vzorku (cDNA, mRNA) reprezentující exprimované geny s imobilizovanými komplementárními sekvencemi (proby, sondy) (Obr.1). (*Schena, a kol., 1995*), (*Nuwaysir, a kol., 1999*), (*DeRisi, a kol., 1996*)

Hlavní rozdíl mezi cDNA a oligonukleotidy je v jejich přípravě a množství. cDNA se musí nejprve nesyntetizovat pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) následně se musí purifikovat a naznačit sondou. Velikost fragmentů se pohybuje mezi 500 a 2000 bp. Malé množství každé cDNA je pak imobilizováno na známé místo skleněné mikrotitrační destičky za pomoci robota nebo manuálně. Výsledný čip obsahuje desetitisíce takto upevněných cDNA. Array založené na deoxyoligonukleotidech o velikosti 20 až 25 bp, jsou konstruovány buď pomocí robotického spotovače nebo speciální metodou přímo (in situ) syntézy na skleněný povrch pomocí procesu fotolitografie (technologie Affymetrix). Výsledný čip může obsahovat až statisíce těchto proub na ploše 1.6 cm<sup>2</sup>. (*Kim a Watkinson, 2002*), (*Epstein, a kol., 2002*), (*Nuwaysir, a kol., 1999*)

Izolace a následná detekce cDNA se nejčastěji provádí ze dvou izolovaných vzorků, z kontrolního a testovaného, kde se předpokládá změna v expresi. cDNA z kontrolního vzorku se

značí zelenou fluorescenční barvou a cDNA z testovaného vzorku barvou červenou. (Ramaswamy, 2004). Detekce sledovaných čipů pak probíhá měřením emitovaného záření fluorescenčních sond o dané vlnové délce, po ozáření dvěma lasery. Pomocí počítačového softwaru jsou pak vyhodnocována data. Detekují se tři druhy barev i) zelená - exprese genů pouze kontrolního vzorku ii) červená – exprese genů pouze testovaného a iii) žlutá – exprese genů z kontrolního i testovaného vzorku. (Obr. 1.)

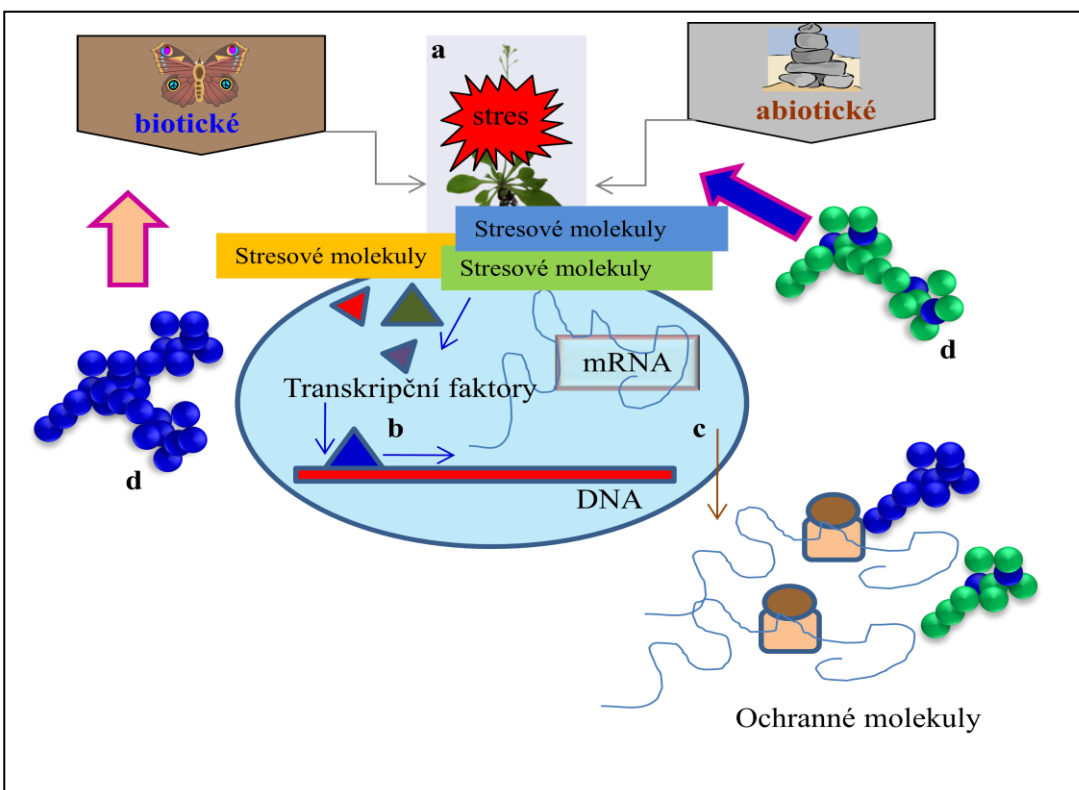


Obr. 1. Schéma principu expresních čipů. Příprava vzorku ze dvou vzorků, naznačení, hybridizace, vyhodnocení dat - Detekují se tři druhy barev: zelená - exprese genů pouze kontrolního vzorku, červená – exprese genů pouze testovaného a žlutá – exprese genů z kontrolního i testovaného vzorku.

## STRES ROSTLINNÝCH ORGANISMŮ

Rostliny se setkávají s širokou řadou environmentálních podnětů, přičemž některé z nich jsou pro ně škodlivé. Na rozdíl od živočichů nejsou rostliny schopny se přemístit z místa namísto a vyhnout se tak negativnímu působení okolního prostředí. (Goh, a kol., 2003). Na rostliny působí jak biotické (viry, bakterie, houby, okus hmyzem či býložravci) tak abiotické vlivy (počasí, koncentrace iontů, živin atd.). Odpověď rostliny na stresové faktory je zprostředkována pomocí mnoha fyziologických změn zahrnující regulaci genové exprese, změnou složení plazmatické membrány, změnou množství fytohormonů a změny množství vody. Nejdříve dochází k syntéze stresových molekul (e.g. kyselina salicylová, jasmonová). Takový signál je předán do buněčného jádra kde dochází k aktivaci signalizačních kaskád vedoucích k specifickým transkripčním faktorům. Specifický transkripční faktor je vázán do promotoru stresového genu a dochází ke spuštění procesu transkripce. Vznikající molekuly mRNA jsou z jádra transporovány do cytoplasmy kde je na ribosomech syntetizován stresový protein stimulující odolnost proti stresovému faktoru (Obr. 1). To zřejmě koreluje s adaptačními strategiemi rostlin, které byly z velké části k těmto stresům tolerantní. Mezi významné stresové látky patří především těžké kovy dostávající se do prostředí antropogenní činností. (Huska, 2009, Singh, a kol., 2002)





Obr. 2. Zjednodušené schéma stresové kaskády u rostlin vystavených abiotickému a biotickému stresu. Rostlina po zaznamenání stresového tlaku zahájí uvolnění nízkomolekulárních stresových molekul (a). Takové molekuly jsou přeneseny do buněčného jádra a aktivují genovou expresi stresového genu (b). Syntetizovaná molekula mRNA je z jádra uvolněna do cytoplasmy a na ribozomech dochází k translaci stresového proteinu (c). Stresový protein zvyšuje odolnost napadené rostliny vůči stresovému faktoru (d).



## Vliv těžkých kovů na rostlinný organizmus

Antropogenní činnost ovlivňuje přímo nebo nepřímo nejen jednotlivé organismy, ale také celou populaci nebo komunitu. Technologický vývoj přispívá k zdokonalujícímu se standardu žití, také ale sebou přináší mnoho negativních dopadů na ekosystém (*Macek, a kol., 2008*). Jeden z těchto efektů je znečištění ovzduší, půdy a vody různými typy odpady a nežádoucími látkami jako jsou právě těžké kovy a jejich sloučeniny. Díky neustálé kontaminaci prostředí těžkými kovy trávající převážně od konce minulého století se každoročně na celém světě uvolňují 22 000 tun kadmia, 954 000 tun mědi, 796 000 tun olova a 1 372 000 tun zinku (*Kovalchuk, a kol., 2005*). Jsou to alarmující čísla vzhledem k tomu, že většina těchto kovů se dostává dál do potravního řetězce, až do přímého kontaktu s člověkem. Hlavními pomyslnými přenašeči těchto látek v potravním řetězci člověka jsou zemědělské plodiny. Těžké kovy ( $\rho > 5 \text{ g.cm}^{-3}$ ) jsou jedny z nejvíce toxickými a nežádoucími látkami znečišťující zemědělské plodiny (*Greger a Ogren, 1991, Zehnalek, a kol., 2004*). Jsou přírodními složkami Zemské kůry a nemohou být degradovány nebo rozloženy. Těžké kovy jsou také nebezpečné, protože mají tendenci se bioakumulovat. Proto půda bohatá na těžké kovy znamená hrozbu pro rostliny. Toxické účinky iontů těžkých kovů na rostliny souvisejí s poškozením fotosyntetického systému, inhibicí aktivity klíčových enzymů pro rostlinný metabolismus. Zvyšující se koncentrace iontů těžkých kovů v rostlinných pletivech má za následky aktivaci ochranných mechanismů, hlavně syntézy na cystein bohatých peptidů jako glutathion nebo fytochelatinů a nebo metalothioneiny (10-12) (*Meister a Anderson, 1983*), (*Cobbett, 2000, Grill, a kol., 1985, Supalkova, a kol., 2008*), (*Zitka, a kol., 2007*), (*Diopan, a kol., 2007, Supalkova, a kol., 2007, Zimeri, a kol., 2005*). Kromě toho rostliny vykazující větší toleranci k těžkým kovům mohou být využívány pro fytoremediační technologie (*Zitka, a kol., 2007*), (*Babula, a kol., 2008, Kizek a Adam, 2007, Supalkova, a kol., 2007, Supalkova, a kol., 2007*).

Těžké kovy významně zpomalují růst rostliny a snižují tak výnos plodin. Toxické působení může být přisuzováno jejich cytotoxickým nebo genotoxickým účinkům. Toxicita kovů

do značné míry závisí na jejich schopnosti měnit svoje oxidativní stavy a tudíž se zúčastňovat redoxních reakcí Fentonovy reakce. Kovy jako třeba železo a měď se považují za kofaktory v přeměně peroxidu vodíku na hydroxilový radikál  $\text{OH}^{\bullet}$ , extrémně toxickou molekulu (Kieffer, a kol., 2008). Genotoxické působení těžkých kovů spočívá v jejich schopnosti způsobit poškození DNA vedoucí až ke změně genetického materiálu (Supalkova, a kol., 2007), (Meister a Anderson, 1983), (Slesak, a kol., 2007), (Kieffer, a kol., 2008). Nepřetržité vystavování se těžkým kovům by mohlo významně přispívat k dědičným změnám mnoha fenotypických vlastnostech u potomstva (plodu) vystavených rostlin. Proto pochopení mutagenity těžkých kovů je velmi důležité v enviromentálních studiích. K nejvíce studovaným kovům patří kadmium a olovo. Analýza toxicity Cd a Pb je mimořádně důležitá, oba jsou neesenciální kovy, které se mohou akumulovat v organismu a mají dlouhý biologický poločas rozpadu Cd 18 – 30let, Pb 1500 let. Cd se snadno dostává do kořenů, kde je mnoha rostlinami velká část Cd zablokována. Určitá část se přesto dostává dál přes xylem do listů (Kovalchuk, a kol., 2005), (Babula, a kol., 2008), (Greger a Ogren, 1991). Jakmile se Cd dostává do rostliny inhibuje kořen a nadzemní část a často způsobuje opad listů, chlorózu a celkové odumírání (Cobbett, 2000). Vliv na růst je spojen s potlačením buněčného prodlužování, tento proces způsobují ireverzibilní inhibice protonové pumpy. Chloróza je částečně spojena s deficiencí Fe a také vysoký obsah Cd v prostředí způsobuje snížení obsahu železa v rostlině. Toxické působení Cd je často spojeno s oxidativním poškozením prostřednictvím vznikajících kyslíkových radikálů ROS, jako je  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxid vodíku,  $(\text{O}_2^{\bullet-})$  superoxidový anion a hydroxilový radikál ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) (Slesak, a kol., 2007), (Kovalchuk, a kol., 2005). Tyto reaktivní molekuly, zejména hydroxylový radikál, působí destruktivně na lipidy, nukleové kyseliny a proteiny. ROS nejsou jen toxickými vedlejšími produkty metabolismu, ale fungují také jako signální molekuly kontrolující obranné procesy rostlinného organismu a hrají významnou roli v procesu programované buněčné smrti. ROS mají přímý toxický účinek na patogenní organismus a podílejí se aktivně na strukturálním zesílení rostlinné buněčné stěny<sup>1</sup>. Ochranu před oxidačním poškozením organismu aktivními formami kyslíku zajišťuje řada antioxidantních obranných systémů lokalizovaných v různých buněčných strukturách. Mezi velmi účinné antioxidanty řadíme askorbát,  $\beta$ -karoten, redukovaný glutation a

$\alpha$ -tokoferol<sup>12,13</sup>. Specializované enzymy jako superoxidodismutasa (EC 1.15.1.1), peroxidasa (EC 1.11.1.7), katalasa (EC 1.11.1.6) a enzymy askorbát-glutathionového cyklu zabezpečují univerzální obranu rostlin (Piterkova, a kol., 2005). Protože redoxní potenciál Cd je příliš nízký, nato aby se přímo podílel na Fentonově-Redoxní reakci, symptomy oxidativního stresu jsou spíše důsledkem zásahu do antioxidačních enzymů a spotřebovávání antioxidačních molekul (Kovalchuk, a kol., 2005). Dalšími účinky toxicity Cd jsou na Zn/Ca-dependentní a Zn/Ca-závazné enzymy a molekuly, vzhledem k chemické podobnosti mezi Cd a těmito elementy a následné kompetice na kofaktor enzymů. Další toxické účinky Cd vycházejí z jeho vysoké afinity k thiolům, které mohou způsobit inaktivaci důležitých enzymů pomocí vazby Cd na sulphydrylové-skupiny (-SH). Na druhé straně jsou rostliny schopny detoxikovat a odstraňovat Cd z potenciálně nebezpečných míst pomocí vysoké afinity Cd právě k thiolům syntézou glutationu (GSH), nebo phytochelatinů. GSH je důležitá antioxidační molekula syntetizovaná z aminokyselin glutamátu, cysteinu a glycinu v metabolické dráze Halliwell-Asada. Phytochelatiny jsou enzymaticky syntetizované polypeptidy s schopností vázat těžké kovy. Základní strukturou phytochelatinu je (glu-(Cys))<sub>n</sub>-Gly. Phytochelatiny a GSH mohou chelátovat Cd, a tím detoxifikovat cytosol to je dosaženo nahromaděním se chelát-polypeptid komplexů ve vakuole. Proteiny podílející se na degradaci oxidačně modifikovaných bílkovin z ubiquitin / proteázovou dráhou měly zvýšenou syntézu, což naznačuje, že stres způsobený kadmíem indukuje senescenci. U buněčných kultur *Arabidopsis thaliana*, které byly vystaveny různým koncentracím Cd, byly pozorovány na úrovni proteomu aktivace metabolismu uhlíku, dusíku a síry. Nejvýrazněji mezi zvýšenými syntézami bílkoviny byly enzymy zapojené do biosyntézy glutamátu, cysteinu a glycinu, a u prekursorů, které jsou potřebné pro tvorbu GSH a phytochelatinů (Lewandowska, a kol., 2007), (Goh, a kol., 2003) (Huska, 2009),

Pro takové účely je potřebné využívat vhodných nástrojů pro sledování exprese stresových genů na úrovni mRNA nebo výsledného proteinového produktu. Nejběžnější je sledování hladiny mRNA většinou pomocí technik využívající polymerázové řetězové reakce (PCR, nebo real time-PCR). Proto, abychom byli schopni takové detekce je potřebné izolovat

dostatečného množství nedegradované celkové mRNA s minimální kontaminací nežádoucími nukleovými kyselinami.

## PARAMAGNETICKÉ ČÁSTICE

Magnetizovatelné částice (MPs – magnetic particles) pronikají do všech vědeckých odvětví. Nalézají využití hlavně v izolaci, separaci a transportu od nukleových kyselin, proteinů až po celé buňky. Široké uplatnění nalézají v biomedicínských a biotechnologických oborech, které využívají produkty od laboratoří (chemických, fyzikálních, biofyzikálních, fyzikálněchemických až po laboratoře zaměřené na studium materiálů) zabývající se syntesou a různých modifikací povrchu MPs. Tímto MPs propojují jednotlivé vědecké disciplíny. Mezi první práce popisující aplikaci magnetických částic pocházejí z počátku 60 let 20 století, kdy H.A. Lowenstam použil biochemicky precipitovaný magnetit, sloužící jako radula zubů chitonů. V roce 1975 R. Blakemore objevil bakterii *Magnetospirillum gryphiswaldense*, která je schopna vytvářet sférické krystaly magnetitu ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) o velikosti 50 nm (Blakemore, 1975). Bakterie vytváří řetízky magnetických částic, které jí slouží k tomu, aby byla vyrovnaná souběžně se zemským magnetickým polem. Bylo zjištěno, že tyto bakterie plavou na severní polokouli vždy k severu zatímco na jižní polokouli je tomu naopak. V současnosti jsou tyto bakterie velkým středem zájmu. Od poloviny 70 let se pak MPs naplno začaly rozšiřovat hlavně v biologických a medicínských oborech (Obata, a kol., 2002), (Safarik a Safarikova, 1999), (Moroz, a kol., 2002), (Pamme, 2006).

## Syntéza a modifikace povrchu magnetických částic

Nejčastějším materiálem používaným na výrobu MPs pro biologické aplikace patří oxidy železa magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nebo jeho oxidovaná forma maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (Gupta a Gupta, 2005). MPs z oxidu kovu se dostaly do popředí zájmu, protože nejsou toxické na rozdíl od jiných kovů (kobalt či nikl), které na druhou stranu zase mají lepší magnetické vlastnosti.

Základní metody syntézy zahrnují postupy, které jsou založené na i) usazování částic v plynné fázi, ii) litografii, iii) mikroemulsi, iiiii) sonochemické syntézy a iiiiii) hydrolytické reakce (*Stolník, a kol., 1995*), (*Lee, a kol., 2001*), (*Rishton, a kol., 1996*), (*Kang, a kol., 1996*)

Základní postup chemické syntézy MPs z magnetitu je založen na hydrolytické reakci. Příprava těchto částic se skládá z následujících kroků – nejdříve proběhne koprecipitace magnetitu při 80°C ve vodném roztoku  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  iontů v prostředí 25%  $NH_4OH$ . Vzniknou tak částičky magnetitu. Ty se dále prostorově stabilizují pomocí LA (kyselina laurová, MA (kyselina marýstová nebo pomocí OA (kyselina olejová). Dále se musí jednotlivé částice oddělit od zbylého roztoku, to se provádí dekantací tj. volným usazováním. Roztok nad částicemi se pak odsaje, přidá se promývací roztok a postup se opakuje. Tento postup je často využíván v mnoha laboratořích a umožňuje připravit magnetické částice pro bioaplikace.

Dalším krokem, jestliže jsou magnetické částice nasyntetizovány a stabilizovány, je modifikace jejich povrchu, což výrazně zasahuje do jejich biokompatibility. Teprve tento krok dělá z částic pravý nástroj pro jejich využití. Například modifikace proteinem laktoferinem nebo ceruloplasmidem připevněného na povrch superparamagnetických nanočástic ( $Fe_2O_3$ , o průměru 13.5 nm) poskytují částicím stabilizaci v pokojové teplotě a snižují nespecifickou endocytózu in vivo (*Gupta a Gupta, 2005*). Pokrytím tenkou vrstvou zlata na komerční částice ( $Fe_2O_3$  o průměru 4,5 nm) zlepšuje přichycení protilátek na povrch částic a účinně se tak redukuje nespecifická adsorpce (*Zhang a Meyerhoff, 2006*). Pro další modifikace povrchu se využívají hlavně polymery, organické látky a nejrůznější pokovování (*Gupta a Gupta, 2005*).

## Separace látek založená na magnetizovatelných částicích

Pro aplikaci MPs v separačních metodách se nejčastěji využívají dva způsoby modifikace. První z nich vyžaduje použití nabitého kovového povrchu pro elektrostatickou adsorpci biomolekul. Matsunaga et. Al. použil látku aminosilan 3-[2-2-aminoethyl(amino)-ethylamino-propyltrimethoxysilan] k modifikaci MPs v roztoku toulenu vyvolávající hustý amino povlak na povrchu částic (*Nakagawa, a kol., 2006*). Takto vzniklé  $NH_2$ -MPs jsou přidány

k extraktu DNA a na základě elektrostatické interakce mezi negativně nabitou DNA a pozitivně nabitou skupinou  $\text{NH}_2$  navázanou MPs. Tato metoda na rozdíl od jiných konvenčních extrakčních metod nepoužívá k promývání a uvolnění DNA organických roztoků. Tím eliminuje vliv organických roztoků na následnou detekci signálu. Podobné metody elektrostatické adsorpce založené na DNA extrakci používají polyamidamin dendrimermodifikovaný MPs (Yoza, a kol., 2003, Yoza, a kol., 2003, Yoza, a kol., 2002).

Další metody modifikace povrchu MPs zahrnují navázání specifické skupiny umožňující vázat konkrétní biomolekuly. Například: i) aktivní chemické skupiny (karboxyl a aminoskupiny), které se mohou kovalentně vázat na biomolekuly v přítomnosti specifických Cross-linking činidel (EDAC), ii) Streptavidin / Avidin ligandy, které se mohou specificky vázat na biotinylované biomolekuly. Tyto metody jsou obvykle používány k imobilizaci specifických receptorů pro zachycení cílových molekul jako třeba DNA sonda k cílové DNA a protilátka k antigenu. Komerční MPs použité v magnetické separaci jsou typické paramagnetické částice s velikostí v mikrometrech (1-10  $\mu\text{m}$ ) a jsou vybaveny polymerním obalem na vnější straně magnetického nanočásticového jádra. Tyto na zakázku dělané magnetické částice jsou modifikovány pomocí různých vazebných skupin pro specifické chemické vazby. Porovnání fyzikálních a chemických znaků některých komerčně dostupných MPs bylo zhodnoceno (Sole, a kol., 2001). Chemicky syntetizovaný oxid železa pro MPs může být vytvářen pomocí magnetických bakterií - bakteriální magnetické nanočástice (BMPs) (Matsunaga a Takeyama, 1998), (Nakamura a Matsunaga, 1993). BMPs jsou feromagnetické částice, které mají uniformní tvar a velikost od 50 – 100 nm. Zjevně přirozená lipidová dvojvrstva membrány fosfatidylethanolamin na vnější straně částice jí poskytuje velmi dobrou disperzi ve vodním roztoku a umožňuje tak BMPs sloužit jako substrát pro kovalentní vazbu s biomolekulami (Matsunaga, a kol., 1996). Jiné MPs jako třeba  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  (M = Co nebo Mn)  $\text{Co Fe}_2\text{O}_4$  superparamagnetické nanočástice byly syntetizovány a zkoumány pro bisenzorové aplikace. Nicméně procedury syntéz těchto částic jsou poměrně složité a drahé ve srovnání s nanočásticemi z oxidů železa (Grancharov, a kol., 2005) (Gu, a kol., 2006).



## **Biosenzory pro detekci specifické sekvence nukleových kyselin za využití za využití magnetické separace ve spojení s elektrochemickou detekcí**

Tato sekce je zaměřena na magnetickou separaci jako základ pro elektrochemický DNA biosenzor. Magnetická separace umožňuje vytvořit jednoduchý DNA biosenzor založený na elegantním způsobu zachycení cílené nukleové kyseliny (tj. DNA a RNA) z krve, kosti, kostní dřeně, buněčných kultur, rostlinných pletiv a jiných surových vzorků před tím než se podniknou kroky jako je cílená amplifikace nebo detekce. To významně redukuje celkové nakládání s časem pro zpracování vzorku (*Deggerdal a Larsen, 1997*) (*Smit, a kol., 2000*). Povrch MPs má na rozdíl od jednoduchého povrchu pevné elektrody velký povrch což MPs propůjčuje vysokou separační schopnost. MPs navíc nabízí další povrch pro imobilizaci DNA a elektrochemickou detekci (*Fojta, a kol., 2002*). Tato dvou povrchová strategie zlepšuje výkon senzoru v několika rovinách. V tradičním elektrochemickém DNA biosenzoru je povrch pevných elektrod (kovové, uhlíkové nebo chemicky modifikované elektrody) nejdříve namodifikován jednořetězcovou DNA (ssDNA) sondou pomocí různých imobilizačních metod jako je adsorpce, kovalentní vazba, sestavením – interakcí avidin – biotin nebo zachycení polymerem) (*Cai, a kol., 2004*) Hybridizace a následující elektrochemická detekce jsou provedeny na stejné elektrodě. Nicméně DNA film na povrchu elektrody může interferovat s transdukčním elektrochemickým signálem z elektrody. Ve dvoupovrchovém přístupu jsou ssDNA sondy imobilizovány na povrch MPs. Hybridizace mezi volnou cílovou molekulou a na MPs navázanou DNA sondou, která se nachází v kapalně fázi má vyšší schopnost hybridizace než na pevné elektrody. Po té co je DNA navázána na povrch částic a nedetekována povrchem elektrody, nemůže hybridizovaná DNA působit na transdukcii signálu. Elektrochemické přístupy pro detekci specifických sekvencí jsou dobře popsány (*Drummond, a kol., 2003*).

Hlavní metody detekce zahrnují: i) přímá detekce oxidačních signálů z purinových bází (A, G) cílové DNA. ii) měření elektrochemických signálů elektroaktivních značek (sond) – nebo enzymů a iii) detekci elektrochemických změn (impedance, proudu, kapacitance) na elektrodu.



Erdem et al., ukazuje magnetickou separaci, která je založena na elektrochemickém DNA bisenzoru za účelem detekce specifické DNA sekvence související se Salmonelózou pomocí měření oxidačního signálu guaninu na malém magnetu obsahující skleněnou uhlíkovou elektrodu (mGCE) (Erdem, a kol., 2006) (Huska, 2009.)

## Literatura

- ADAM, P. J.; BOYD, R.; TYSON, K. L.; FLETCHER, G. C.; STAMPS, A.; HUDSON, L.; POYSER, H. R.; REDPATH, N.; GRIFFITHS, M.; STEERS, G.; HARRIS, A. L.; PATEL, S.; BERRY, J.; LOADER, J. A.; TOWNSEND, R. R.; DAVIET, L.; LEGRAIN, P.; PAREKH, R.; TERRETT, J. A. Comprehensive proteomic analysis of breast cancer cell membranes reveals unique proteins with potential roles in clinical cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, roč. 278. č. 8, s. 6482-6489. ISSN 0021-9258.
- ADAM, V.; PETRLOVA, J.; POTESIL, D.; LUBAL, P.; ZEHNÁLEK, J.; SURES, B.; KIZEK, R. New electrochemical biosensor to determine platinum cytostatics to DNA structure. *Chem. Listy*, 2005, roč. 99. č. 5, s. 353-393. ISSN 0009-2770.
- ADAMS, M. D.; KELLEY, J. M.; GOCAYNE, J. D.; DUBNICK, M.; POLYMERPOULOS, M. H.; XIAO, H.; MERRIL, C. R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R. F.; KERLAVAGE, A. R.; MCCOMBIE, W. R.; VENTER, J. C. COMPLEMENTARY-DNA SEQUENCING - EXPRESSED SEQUENCE TAGS AND HUMAN GENOME PROJECT. *Science*, 1991, roč. 252. č. 5013, s. 1651-1656. ISSN 0036-8075.
- ADKINS, J. N.; VARNUM, S. M.; AUBERRY, K. J.; MOORE, R. J.; ANGELL, N. H.; SMITH, R. D.; SPRINGER, D. L.; POUNDS, J. G. Toward a human blood serum proteome - Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2002, roč. 1. č. 12, s. 947-955. ISSN 1535-9476.
- ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. METHOD FOR DETECTION OF SPECIFIC RNAS IN AGAROSE GELS BY TRANSFER TO DIAZOBENZYLOXYMETHYL-PAPER AND HYBRIDIZATION WITH DNA PROBES. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, roč. 74. č. 12, s. 5350-5354. ISSN 0027-8424.
- ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. In (eds.). *2nd Siena 2D Electrophoresis - From Genome to Proteome*: Sep 16-18, Vch Publishers Inc. Siena, Italy, 1996, s. 533-537. ISBN
- BABULA, P.; ADAM, V.; OPATRILOVA, R.; ZEHNÁLEK, J.; HAVEL, L.; KIZEK, R. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environ. Chem. Lett.*, 2008, roč. 6. č. 4, s. 189-213. ISSN 1610-3653. clanek IF 1.080
- BERK, A. J.; SHARP, P. A. SIZING AND MAPPING OF EARLY ADENOVIRUS MESSENGER-RNAS BY GEL-ELECTROPHORESIS OF S1 ENDONUCLEASE-DIGESTED HYBRIDS. *Cell*, 1977, roč. 12. č. 3, s. 721-732. ISSN 0092-8674.

- BLAKEMORE, R. MAGNETOTACTIC BACTERIA. *Science*, 1975, roč. 190. č. 4212, s. 377-379. ISSN 0036-8075.
- CAI, H.; XU, Y.; HE, P. G.; FANG, Y. Z. Advances of the deoxyribonucleic acid immobilization on electrode surface for the electrochemical deoxyribonucleic acid biosensor designing. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2004, roč. 32. č. 6, s. 815-820. ISSN 0253-3820.
- COBBETT, C. S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.*, 2000, roč. 123. č. 3, s. 825-832. ISSN 0032-0889.
- DEGGERDAL, A.; LARSEN, F. Rapid isolation of PCR-ready DNA from blood, bone marrow and cultured cells, based on paramagnetic beads. *Biotechniques*, 1997, roč. 22. č. 3, s. 554-557. ISSN 0736-6205.
- DERISI, J.; PENLAND, L.; BROWN, P. O.; BITTNER, M. L.; MELTZER, P. S.; RAY, M.; CHEN, Y. D.; SU, Y. A.; TRENT, J. M. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genetics*, 1996, roč. 14. č. 4, s. 457-460. ISSN 1061-4036.
- DIOPAN, V.; BALOUN, J.; ADAM, V.; MACEK, T.; HAVEL, L.; KIZEK, R. Determination of expression of metallothionein at transgenic tobacco plants. *Listy Cukrov. Reparske*, 2007, roč. 122. č. 9-10, s. 325-327. ISSN 1210-3306. clanek IF 0.085
- DRUMMOND, T. G.; HILL, M. G.; BARTON, J. K. Electrochemical DNA sensors. *Nature Biotechnology*, 2003, roč. 21. č. 10, s. 1192-1199. ISSN 1087-0156.
- EPSTEIN, J. R.; BIRAN, I.; WALT, D. R. Fluorescence-based nucleic acid detection and microarrays. *Analytica Chimica Acta*, 2002, roč. 469. č. 1, s. 3-36. ISSN 0003-2670.
- ERDEM, A.; PIVIDORI, M. I.; LERMO, A.; BONANNI, A.; DEL VALLE, M.; ALEGRET, S. Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes. *Sens. Actuator B-Chem.*, 2006, roč. 114. č. 2, s. 591-598. ISSN 0925-4005.
- FOJTA, M.; HAVRAN, L.; BILLOVA, S.; KOSTECKA, P.; MASARIK, M.; KIZEK, R. Two-surface strategy in electrochemical DNA hybridization assays: Detection of osmium-labeled target DNA at carbon electrodes. In (eds.). *9th International Conference on ElectroAnalysis (ESEAC)*: Jun 09-13, Wiley-VCH Verlag GmbH. Krakow, Poland, 2002, s. 431-440. ISBN
- GOH, C. H.; NAM, H. G.; PARK, Y. S. Stress memory in plants: a negative regulation of stomatal response and transient induction of rd22 gene to light in abscisic acid-entrained Arabidopsis plants. *Plant Journal*, 2003, roč. 36. č. 2, s. 240-255. ISSN 0960-7412.
- GRANCHAROV, S. G.; ZENG, H.; SUN, S. H.; WANG, S. X.; O'BRIEN, S.; MURRAY, C. B.; KIRTLEY, J. R.; HELD, G. A. Bio-functionalization of monodisperse magnetic nanoparticles and their use as biomolecular labels in a magnetic tunnel junction based sensor. *Journal of Physical Chemistry B*, 2005, roč. 109. č. 26, s. 13030-13035. ISSN 1520-6106.
- GREGER, M.; OGREN, E. Direct and indirect effects of Cd<sup>2+</sup> on photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiol. Plant*, 1991, roč. 83. č., s. 129-135. ISSN

- GRILL, E.; WINNACKER, E. L.; ZENK, M. H. Phytochelatins - the principal heavy-metal complexing peptides of higher-plants. *Science*, 1985, roč. 230. č. 4726, s. 674-676. ISSN 0036-8075.
- GU, H. W.; XU, K. M.; XU, C. J.; XU, B. Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection. *Chemical Communications*, 2006, roč. č. 9, s. 941-949. ISSN 1359-7345.
- GUHANIYOGI, J.; BREWER, G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene*, 2001, roč. 265. č. 1-2, s. 11-23. ISSN 0378-1119.
- GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 2005, roč. 26. č. 18, s. 3995-4021. ISSN 0142-9612.
- GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, roč. 19. č. 3, s. 1720-1730. ISSN 0270-7306.
- HUSKA, D.; ADAM, V.; TRNKOVA, L.; KIZEK, R. The dependence of adenine isolation efficiency on the chain length evidenced using paramagnetic particles and voltammetry measurements. *J. Magn. Magn. Mater.*, 2009, roč. 321. č. 10, s. 1474-1477. ISSN 0304-8853. clanek IF 1.704
- HUSKA, D.; HUBALEK, J.; ADAM, V.; KIZEK, R. Miniaturized electrochemical detector as a tool for detection of DNA amplified by PCR. *Electrophoresis*, 2008, roč. 29. č. 24, s. 4964-4971. ISSN 0173-0835.
- HUSKA, D.; KRIZKOVA, S.; ADAM, V.; HUBALEK, J.; TRNKOVA, L.; PRUSA, R.; HAVEL, L.; KIZEK, R. Paramagnetic beads coupled with electrochemical detection as a tool to investigate transcriptome. *Tumor Biol.*, 2007, roč. 28. č. Suppl. 1, s. 124-124. ISSN 1010-4283. meeting abstract IF 2.481
- HUSKA, D. Profil stresového transkriptomu u rostlin po expozici ionty těžkých kovů za využití nově navrženého čipu nukleových kyselin Ústav chemie a biochemie. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2009.
- KANG, Y. S.; RISBUD, S.; RABOLT, J. F.; STROEVE, P. Synthesis and characterization of nanometer-size Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles. *Chemistry of Materials*, 1996, roč. 8. č. 9, s. 2209-&. ISSN 0897-4756.
- KIEFFER, P.; DOMMES, J.; HOFFMANN, L.; HAUSMAN, J. F.; RENAUT, J. Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics*, 2008, roč. 8. č. 12, s. 2514-2530. ISSN 1615-9853.
- KIM, D. S.; WATKINSON, J. C. Gene chip expression analysis in head and neck cancer. *Clinical Otolaryngology*, 2002, roč. 27. č. 5, s. 296-303. ISSN 0307-7772.
- KIZEK, R.; ADAM, V. Preface: New trends in phytoremediation technologies. *Listy Cukrov. Reparske*, 2007, roč. 122. č. 9-10, s. 311-311. ISSN 1210-3306. clanek IF 0.085
- KIZEK, R.; VACEK, J.; TRNKOVA, L.; KLEJDUS, B.; KUBAN, V. Electrochemical biosensors in agricultural and environmental analysis. *Chem. Listy*, 2003, roč. 97. č. 10, s. 1003-1006. ISSN 0009-2770.

- KOVALCHUK, I.; TITOV, V.; HOHN, B.; KOVALCHUKA, O. Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2005, roč. 570. č. 2, s. 149-161. ISSN 0027-5107.
- KRAVCUKOVA, P.; MAREKOVA, M.; OSTRO, A. Potential oncomarkers by proteomic, metabolomic and metabolonomic methods. *Chem. Listy*, 2008, roč. 102. č. 1, s. 15-20. ISSN 0009-2770.
- LEE, C. S.; LEE, H.; WESTERVELT, R. M. Microelectromagnets for the control of magnetic nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 2001, roč. 79. č. 20, s. 3308-3310. ISSN 0003-6951.
- LEWANDOWSKA, M.; BORCZ, B.; KAMINSKA, J.; WAWRZYNSKI, A.; SIRKO, A. Polyadenylation and decay of 26S rRNA as part of *Nicotiana tabacum* response to cadmium. *Acta Biochimica Polonica*, 2007, roč. 54. č. 4, s. 747-755. ISSN 0001-527X.
- MACEK, T.; KOTRBA, P.; SVATOS, A.; NOVAKOVA, M.; DEMNEROVA, K.; MACKOVA, M. Novel roles for genetically modified plants in environmental protection. *Trends Biotechnol.*, 2008, roč. 26. č. 3, s. 146-152. ISSN 0167-7799.
- MATSUNAGA, T.; KAWASAKI, M.; YU, X.; TSUJIMURA, N.; NAKAMURA, N. Chemiluminescence enzyme immunoassay using bacterial magnetic particles. *Analytical Chemistry*, 1996, roč. 68. č. 20, s. 3551-3554. ISSN 0003-2700.
- MATSUNAGA, T.; TAKEYAMA, H. Biomagnetic nanoparticle formation and application. *Supramolecular Science*, 1998, roč. 5. č. 3-4, s. 391-394. ISSN 0968-5677.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 1983, roč. 52. č., s. 711-760. ISSN 0066-4154.
- MOROZ, P.; JONES, S. K.; GRAY, B. N. Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions. *International Journal of Hyperthermia*, 2002, roč. 18. č. 4, s. 267-284. ISSN 0265-6736.
- NAKAGAWA, T.; HASHIMOTO, R.; MARUYAMA, K.; TANAKA, T.; TAKEYAMA, H.; MATSUNAGA, T. Capture and release of DNA using aminosilane-modified bacterial magnetic particles for automated detection system of single nucleotide polymorphisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, roč. 94. č. 5, s. 862-868. ISSN 0006-3592.
- NAKAMURA, N.; MATSUNAGA, T. HIGHLY SENSITIVE DETECTION OF ALLERGEN USING BACTERIAL MAGNETIC PARTICLES. In (eds.). *2nd Symp on Biosensors: 1992*, Elsevier Science Bv. Geneva, Switzerland, 1993, s. 585-589. ISBN
- NUWAYSIR, E. F.; BITTNER, M.; TRENT, J.; BARRETT, J. C.; AFSHARI, C. A. Microarrays and toxicology: The advent of toxicogenomics. *Molecular Carcinogenesis*, 1999, roč. 24. č. 3, s. 153-159. ISSN 0899-1987.
- OBATA, K.; TAJIMA, H.; YOHDA, M.; MATSUNAGA, T. Recent developments in laboratory automation using magnetic particles for genome analysis. *Pharmacogenomics*, 2002, roč. 3. č. 5, s. 697-708. ISSN 1462-2416.
- OKUBO, K.; HORI, N.; MATOBA, R.; NIYAMA, T.; FUKUSHIMA, A.; KOJIMA, Y.; MATSUBARA, K. LARGE-SCALE CDNA SEQUENCING FOR ANALYSIS OF



- QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ASPECTS OF GENE-EXPRESSION. *Nature Genetics*, 1992, roč. 2. č. 3, s. 173-179. ISSN 1061-4036.
- PALECEK, E.; BILLOVA, S.; HAVRAN, L.; KIZEK, R.; MICULKOVA, A.; JELEN, F. DNA hybridization at microbeads with cathodic stripping voltammetric detection. *Talanta*, 2002, roč. 56. č. 5, s. 919-930. ISSN 0039-9140. clanek IF 2.054
- PALECEK, E.; FOJTA, M. Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing. *Talanta*, 2007, roč. 74. č. 3, s. 276-290. ISSN 0039-9140.
- PALECEK, E.; FOJTA, M.; JELEN, F. New approaches in the development of DNA sensors: hybridization and electrochemical detection of DNA and RNA at two different surfaces. *Bioelectrochemistry*, 2002, roč. 56. č. 1-2, s. 85-90. ISSN
- PALECEK, E.; JELEN, F. Electrochemistry of nucleic acids and development of DNA sensors. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2002, roč. 32. č. 3, s. 261-270. ISSN 1040-8347.
- PALECEK, E.; KIZEK, R.; HAVRAN, L.; BILLOVA, S.; FOJTA, M. Electrochemical enzyme-linked immunoassay in a DNA hybridization sensor. *Anal. Chim. Acta*, 2002, roč. 469. č. 1, s. 73-83. ISSN 0003-2670.
- PALECEK, E.; MASARIK, M.; KIZEK, R.; KUHLMEIER, D.; HASSMANN, J.; SCHULEIN, J. Sensitive electrochemical determination of unlabeled MutS protein and detection of point mutations in DNA. *Anal. Chem.*, 2004, roč. 76. č. 19, s. 5930-5936. ISSN 0003-2700.
- PAMME, N. Magnetism and microfluidics. *Lab on a Chip*, 2006, roč. 6. č. 1, s. 24-38. ISSN 1473-0197.
- PITERKOVA, J.; TOMANKOVA, K.; LUHOVA, L.; PETRIVALSKY, M.; PEC, P. Oxidative stress: Localisation of reactive oxygen species formation and degradation in plant tissue. *Chemické Listy*, 2005, roč. 99. č. 7, s. 455-466. ISSN 0009-2770.
- POLOHOVA, V.; SNEJDARKOVA, M. Electron transfer in amperometric biosensors. *Chem. Listy*, 2008, roč. 102. č. 3, s. 173-182. ISSN 0009-2770.
- PRUSA, R.; KUKACKA, J.; VAJTR, D.; HUSKA, D.; ALBA, J.; ADAM, V.; KIZEK, R. New technique for quantitative electrochemical determination of total plasma mRNA. *Clin. Chem.*, 2008, roč. 54. č. Suppl. 6, s. A156-A157. ISSN 0009-9147. meeting abstract IF 4.803
- RAMASWAWY, S. Microarrays for an integrative genomics. *American Journal of Human Biology*, 2004, roč. 16. č. 2, s. 174-175. ISSN 1042-0533.
- RISHTON, S. A.; LU, Y.; ALTMAN, R. A.; MARLEY, A. C.; BIAN, X. P.; JAHNES, C.; VISWANATHAN, R.; XIAO, G.; GALLAGHER, W. J.; PARKIN, S. S. P. Magnetic tunnel junctions fabricated at tenth-micron dimensions by electron beam lithography. In (eds.). *Micro and Nano Engineering Conference 1996 (MNE 96)*: Sep 22-25, Elsevier Science Bv. Glasgow, Scotland, 1996, s. 249-252. ISBN
- ROSS, J. MESSENGER-RNA STABILITY IN MAMMALIAN-CELLS. *Microbiological Reviews*, 1995, roč. 59. č. 3, s. 423-450. ISSN 0146-0749.
- SAFARIK, I.; SAFARIKOVA, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B*, 1999, roč. 722. č. 1-2, s. 33-53. ISSN 0378-4347.

- SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. QUANTITATIVE MONITORING OF GENE-EXPRESSION PATTERNS WITH A COMPLEMENTARY-DNA MICROARRAY. *Science*, 1995, roč. 270. č. 5235, s. 467-470. ISSN 0036-8075.
- SINGH, K. B.; FOLEY, R. C.; ONATE-SANCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, roč. 5. č. 5, s. 430-436. ISSN 1369-5266.
- SLESAK, I.; LIBIK, M.; KARPINSKA, B.; KARPINSKI, S.; MISZALSKI, Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica Polonica*, 2007, roč. 54. č. 1, s. 39-50. ISSN 0001-527X.
- SMIT, M. L.; GIESENDORF, B. A. J.; HEIL, S. G.; VET, J. A. M.; TRIJBELS, F. J. M.; BLOM, H. J. Automated extraction and amplification of DNA from whole blood using a robotic workstation and an integrated thermocycler. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2000, roč. 32. č., s. 121-125. ISSN 0885-4513.
- SOLE, S.; MERKOCI, A.; ALEGRET, S. New materials for electrochemical sensing - III. Beads. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 2001, roč. 20. č. 2, s. 102-110. ISSN 0165-9936.
- STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. LONG CIRCULATING MICROPARTICULATE DRUG CARRIERS. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1995, roč. 16. č. 2-3, s. 195-214. ISSN 0169-409X.
- SUPALKOVA, V.; BEKLOVA, M.; BALOUN, J.; SINGER, C.; SURES, B.; ADAM, V.; HUSKA, D.; PIKULA, J.; RAUSCHEROVA, L.; HAVEL, L.; ZEHNALÉK, J.; KIZEK, R. Affecting of aquatic vascular plant *Lemna minor* by cisplatin revealed by voltammetry. *Bioelectrochemistry*, 2008, roč. 72. č. 1, s. 59-65. ISSN 1040-0397. clanek IF 1.880
- SUPALKOVA, V.; HUSKA, D.; DIOPAN, V.; HANUSTIAK, P.; ZITKA, O.; STEJSKAL, K.; BALOUN, J.; PIKULA, J.; HAVEL, L.; ZEHNALÉK, J.; ADAM, V.; TRNKOVA, L.; BEKLOVA, M.; KIZEK, R. Electroanalysis of plant thiols. *Sensors*, 2007, roč. 7. č. 6, s. 932-959. ISSN 1424-8220.
- SUPALKOVA, V.; PETREK, J.; BALOUN, J.; ADAM, V.; BARTUSEK, K.; TRNKOVA, L.; BEKLOVA, M.; DIOPAN, V.; HAVEL, L.; KIZEK, R. Multi-instrumental investigation of affecting of early somatic embryos of spruce by cadmium(II) and lead(II) ions. *Sensors*, 2007, roč. 7. č. 5, s. 743-759. ISSN 1424-8220.
- VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. SERIAL ANALYSIS OF GENE-EXPRESSION. *Science*, 1995, roč. 270. č. 5235, s. 484-487. ISSN 0036-8075.
- VOPALENSKY, P.; RUMML, T.; KOTRBA, P. Biological components of heavy metal biosensors. *Chem. Listy*, 2007, roč. 101. č. 6, s. 468-479. ISSN 0009-2770.
- YOZA, B.; ARAKAKI, A.; MARUYAMA, K.; TAKEYAMA, H.; MATSUNAGA, T. Fully automated DNA extraction from blood using magnetic particles modified with a hyperbranched polyamidoamine dendrimer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, roč. 95. č. 1, s. 21-26. ISSN 1389-1723.

- YOZA, B.; ARAKAKI, A.; MATSUNAGA, T. DNA extraction using bacterial magnetic particles modified with hyperbranched polyamidoamine dendrimer. *Journal of Biotechnology*, 2003, roč. 101. č. 3, s. 219-228. ISSN 0168-1656.
- YOZA, B.; MATSUMOTO, M.; MATSUNAGA, T. DNA extraction using modified bacterial magnetic particles in the presence of amino silane compound. *Journal of Biotechnology*, 2002, roč. 94. č. 3, s. 217-224. ISSN 0168-1656.
- ZAJONCOVA, L.; SEBELA, M. Amylases - Significance of determination of their activity. *Chem. Listy*, 2007, roč. 101. č. 1, s. 36-43. ISSN 0009-2770.
- ZEHNALEK, J.; VACEK, J.; KIZEK, R. Application of higher plants in phytoremediation of heavy metals. *Listy Cukrov. Reparske*, 2004, roč. 120. č. 7-8, s. 220-221. ISSN 1210-3306.
- ZHANG, H. R.; MEYERHOFF, M. E. Gold-coated magnetic particles for solid-phase immunoassays: Enhancing immobilized antibody binding efficiency and analytical performance. *Analytical Chemistry*, 2006, roč. 78. č. 2, s. 609-616. ISSN 0003-2700.
- ZHOU, W.; SOKOLL, L. J.; BRUZEK, D. J.; ZHANG, L.; VELCULESCU, V. E.; GOLDIN, S. B.; HRUBAN, R. H.; KERN, S. E.; HAMILTON, S. R.; CHAN, D. W.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Identifying markers for pancreatic cancer by gene expression analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 1998, roč. 7. č. 2, s. 109-112. ISSN 1055-9965.
- ZIMERI, A. M.; DHANKHER, O. P.; MCCAIG, B.; MEAGHER, R. B. The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmiums and are required for cadmium tolerance and accumulation. *Plant Mol.Biol.*, 2005, roč. 58. č. 6, s. 839-855. ISSN 0167-4412.
- ZITKA, O.; STEJSKAL, K.; KLECKEROVA, A.; ADAM, V.; BEKLOVA, M.; HORNA, A.; SUPALKOVA, V.; HAVEL, L.; KIZEK, R. Utilizing electrochemical techniques for detection of biological samples. *Chem. Listy*, 2007, roč. 101. č. 3, s. 225-231. ISSN 0009-2770.
- ZONG, Q.; SCHUMMER, M.; HOOD, L.; MORRIS, D. R. Messenger RNA translation state: The second dimension of high-throughput expression screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, roč. 96. č. 19, s. 10632-10636. ISSN 0027-8424.