

CHRONOPOTENTIOMETRIC STRIPPING ANALYSIS DETECTION OF ZEPTOMOLE LEVEL METALLOTHIONEIN ON MERCURY ELECTRODE

DETEKCE ZEPTOMOLÁRNÍCH HLADIN METALOTHIONEINU CHRONOPOTENCIOMETRICKOU ROZPOUŠTĚCÍ ANALÝZOU NA RTUŤOVÉ ELEKTRODĚ

Petrlová J.¹⁾, Adam V.^{1,2)}, Potěšil D.^{1,2)}, Klejdus B.¹⁾, Mikelová R.¹⁾, Blašík O.¹⁾, Kizek R.¹⁾

¹⁾ Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

²⁾ Katedra analytické chemie, PřF MU v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno

ABSTRACT

Amounts of metallothionein (MT) in animal organisms are adherent to presence of heavy metals, which are bounded by MT. Connection between MT amounts and appearing of tumour disease is also considered. MT belongs to intracellular, low-molecular, cysteine-rich proteins of molecular weight 6 – 10 kDa. We concerned with MT determination by chronopotenciometric stripping analysis (CPSA) in this work. Catalytic hydrogen electrodeposition is able to use for peptide and proteins determination (peak H). We used borate buffer at pH = 8 and time of accumulation 120 s for MT determination. We obtained typical concentration dependence in course of Langmuir isotherm by CPSA. Dependence was divided into two linear parts (0.6 – 10 fmol in 5 µl drop) $y = 1954.5x + 38600$; $R^2 = 0.9926$ and (10 – 320 amol in 5 µl drop) $y = 54.884x + 18567$; $R^2 = 0.9937$. Detection limit (3S/N) of MT was 11 zmol. In addition, an influence of human urine and human blood serum on catalytic signal was studied. Detection limit was about 350 fmol. Average concentration of MT was $1.1 \pm 0.015 \mu\text{M}$ (n=5) in tested blood serum samples of healthy people.

Keywords: Metallothionein; Metal-binding proteins; Hanging mercury drop electrode; Chronopotentiometric stripping analysis; Catalytic signal; Peak H; Presodium wave

ABSTRAKT

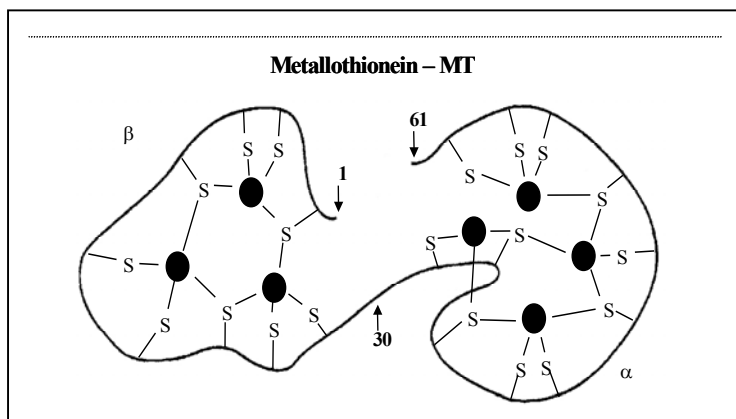
Množství metalothioneinu (MT) v živočišných organizmech je v úzké souvislosti s přítomností těžkých kovů, které MT velmi účinně váže. Zvažuje se také spojitost s výskytem nádorového onemocnění. MT patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein bohatých proteinů o molekulové hmotnosti 6 – 10 kDa. V naší práci jsme se zabývali

stanovením MT pomocí chronopotentiometrické rozpouštěcí analýzy (CPSA). Katalytické vylučování vodíku ze základního elektrolytu lze využít pro stanovení proteinů a peptidů (pík H). Pro stanovení MT jsme využili borátový pufr o pH = 8 a dobu akumulace MT 120 s. Získali jsme typickou koncentrační závislost pomocí CPSA ve tvaru Langmuierovské izotermy. Ta byla rozdělena na dva samostatné lineární úseky (0,6 – 10 fmol v 5 μ l kapce) $y = 1954,5x + 38600$; $R^2 = 0,9926$ a (10 – 320 amol v 5 μ l kapce) $y = 54,884x + 18567$; $R^2 = 0,9937$. Limit detekce (3S/N) MT byl 11 zmol. Dále byl studován vliv lidské moči a krevního séra na katalytický signál. Limit detekce MT se pohyboval kolem 350 fmol. V testovaných vzorcích séra zdravých lidí byla průměrná koncentrace MT $1,1 \pm 0,015 \mu\text{M}$ (n=5).

Klíčová slova: Metallothionein; kovy vázající proteiny, visící kapková rtuťová elektroda, chronopotentiometrická rozpouštěcí analýza, katalytický signál, pík H, prenátriová vlna

ÚVOD

Objev metallothioneinu (MT) je datován rokem 1957, kdy Margoshes a Valee izolovali MT z koňských ledvin¹. Metallothionein patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein velmi bohatých proteinů (obsah Cys až 30 % v molekule proteinu) o molekulové hmotnosti 6–10 kDa^{2,3}. V molekule MT nejsou přítomny aromatické aminokyseliny a cysteiny se v primární sekvenci vyskytují obvykle v těchto repetících: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, kde X představuje jinou aminokyselinu než cystein⁴. MT se skládají ze dvou vazebných domén, α , β které jsou složeny z cysteinových klastrů (Obr.1). N-terminální část peptidu je označena jako β -doména, má tři vazebná místa pro dvojmocné ionty; C-terminální část peptidu (α -doména) má schopnost vyvázat čtyři dvojmocné ionty kovů. V případě jednomocných iontů kovů je MT schopen vázat celkem 12 atomů.



Obr. 1: Schéma vnitřní struktury metallothioneinu.

Hlavní biologickou funkcí MT, díky své vysoké afinitě k těžkým kovům, např. k zinku, mědi nebo kadmiu, je homeostatická kontrola a detoxikace těchto těžkých kovů u vývojově rozdílných organismů. Často diskutovanou otázkou je schopnost MT transportovat atomy kovů k apoenzymům a jejich aktivní zapojení do homeostázy esenciálních prvků. Je známo, že těžké kovy produkují reaktivní kyslíkové radikály. Tyto vzniklé radikály jsou pravděpodobně schopny reagovat s MT. Význam detoxikace těžkých kovů narůstá, protože většina z těchto těžkých kovů se rozptyluje v atmosféře nebo rozpouští ve vodách a postupně kontaminuje ekosystémy. Stálé zvyšování koncentrace těžkých kovů v životním prostředí je vážným hygienickým problémem, a proto se hledají nové metody pro jejich snadnou a rychlou detekci, použitelné i mimo specializované laboratoře⁵⁻⁸.

Pro tyto účely byla využita řada analytických metod, jako je atomová absorpční spektrofotometrie, atomová absorpční spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, ale i elektrochemie⁹⁻¹⁴. Nedávno bylo publikováno několik prací popisujících stanovení těžkých kovů pomocí biosenzorů založených na interakci těžkého kovu s DNA¹⁵, enzymem (především ureázou)¹⁶, celými bakteriálními buňkami a proteiny¹⁷. Cílem této práce bylo vysoce senzitivní stanovení metalothioneinu v biologické matrici, jako je lidská moč a krevní sérum.

MATERIÁL A METODY

Chemikálie

MT z králíčích jater (MW 7143), obsahující 5.9% Cd a 0.5% Zn, byl zakoupen u firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) byl vyroben Molecular Probes (Eugen, Oregon, USA). Chlorid sodný a ostatní použité chemikálie byly získány v čistotě ACS od společnosti Sigma Aldrich. Zásobní roztok standardu MT 10 µg.ml⁻¹ byl připraven za využití ACS vody (Sigma-Aldrich, USA) a uložen ve tmě při -20 °C. Pracovní standardní roztoky byly vždy připravovány denně a to naředěním ze zásobního roztoku.

Biologické vzorky

Vzorek *lidského krevního séra* byl získán z oddělení klinické biochemie, Úrazová nemocnice Ponávka v Brně, Česká republika. Vzorky byly denaturovány při teplotě 99 °C v termomixeru (Eppendorf 5430, USA) po 15 min a mícháním 350 rpm, a následně ochlazen na 4 °C. Denaturované homogenáty byly centrifugovány při 4 °C, 15 000 g po dobu 30 min.

(Eppendorf 5402, USA). Tepelnou úpravou byly velmi efektivně odstraněny všechny interferující proteiny.

Vzorky *lidské moče* byly získány od zdravých jedinců (personálu laboratoře). Získaná moč byla filtrována přes teflonový diskový filtr (0.45 μm a 13 mm průměr, Alltech Associates, Deerfield, IL, USA). Pro výpočet osmolality bylo využito faktu, že osmolalita lidské moči je 250 mmol.kg^{-1} .

pH stanovení

Hodnota pH byla naměřena pomocí přístroje WTW inoLab Level 3 (Weilheim, Germany), který byl řízen osobním počítačem a programem (MultiLab Pilot; Weilheim, Germany). pH-elektroda (SenTix- H, pH 0–14/3M KCl) byla pravidelně kalibrována soupravou WTW pufrů (Weilheim, Germany).

Elektrochemické stanovení

Elektrochemické stanovení bylo provedeno pomocí přístroje AUTOLAB analyzátor (EcoChemie, Netherlands), který byl napojený na VA-Stand 663 (Metrohm, Switzerland), používala se pracovní cela s tříelektrodovým systémem. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0.4 mm^2 . Referentní elektroda byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocná elektroda byla uhlíková tyčinka. Základní elektrolyt byl připraven smícháním jednotlivých složek pufru. Před vlastní elektrochemickou analýzou byl z roztoku odstraněn kyslík probubláním argonem (99.999%), který byl sycený vodou po dobu 240 s. Teplota základního elektrolytu byla kontrolována pomocí termostatované nádoby za využití termostatu Ultra- thermostat U10.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Absorptivní přenosová rozpouštěcí technika (AdTS) ve spojení s chronopotentiometrickou rozpouštěcí analýzou (AdTS CPSA)

Pro stanovení obsahu metalothioneinu (MT) adsorptivní přenosovou rozpouštěcí technikou ve spojení s chronopotentiometrickou rozpouštěcí analýzou (AdTS CPSA) ¹⁸byla zaznamenávána derivace převrácené hodnoty času ku potenciálu $(dE/dt)^{-1}$ v závislosti na potenciálu E . AdTS CPSA parametry byly dále testovány v našich experimentech. Po adsorpci MT na povrch rtuťové visící kapkové elektrody (HMDE) byla elektroda důkladně omyta a přenesena do elektrolytické nádoby s roztokem základního elektrolytu.

Stanovení MT pomocí CPSA a katalytického píku H

O výkladu mechanismu katalytického vylučování vodíku na rtuťové kapkové elektrodě existuje několik teorií a) *Heyrovského* (katalyzátorem je obecně látka BH): $H^+ + e^- = H$; $BH^+_{ads} + H = B_{ads} + H_2^+$; $B_{ads} + H^+ = BH$; $H_2^+ + e^- = H_2$ b) *Frumkina a Andrejevové* (katalyzátor je slabá kyselina a je naadsorbován na elektrodě): $H_{ads} + e^- = A^- + H_{ads}$; $A^- + H^+ = HA_{ads}$ c) *Majranovského* (katalyzátor je ve dvou formách kyselá BH^+ a zásaditá B; DH^+ a D představují kyselá a bazické hydroxoniové ionty rozpouštědla): $B + DH^+ = BH^+ + D$; $BH^+ + e^- = BH$; $2 BH = 2 B + H_2$ d) *Stackelbergův* (přepětí vodíku je sníženo přes kyselou formu BH^+ , který je adsorbován na elektrodě): $B^+_{ads} + H_3O^+ = BH^+_{ads} + H_2O$; $BH^+_{ads} + e^- = B_{ads} + \frac{1}{2} H_2$.

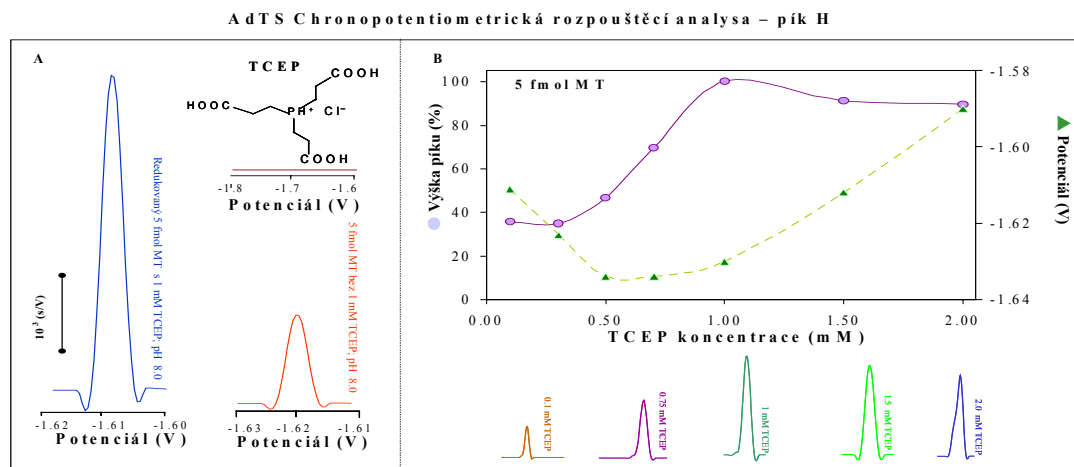
My jsme navrhli možný mechanismus interakce MT s kyselinou boritou, kde proton donorem může být molekula vody: $MT + H-O-H + B(OH)_3 = MT-H^+ + B(OH)_4^-$. Před 5 lety bylo využito Tomschikem a kol. katalytického vylučování vodíku ze základního elektrolytu pro stanovení peptidů¹⁰. Pozorovaný katalytický signál byl označen jako pík H. Od té doby je tomuto katalytickému procesu v naší skupině věnována pozornost, jednak za účelem odhalení katalytického vylučování vodíku, ale také pro velmi senzitivní elektroanalytické stanovení peptidů a proteinů^{12,18-20}. Vysoká senzitivita a kombinace s analýzou velmi malého množství vzorku (mikrolitrové objemy) činí z tohoto analytického stanovení proteinů jeden z nejsenzitivnějších nástrojů pro analýzu peptidů a proteinů.

Stanovením MT pomocí CPSA v kombinaci s AdTS jsme se zabývali v našich předešlých pracích^{12,18,19,21,22}, kde jsme zjistili, že na probíhajícím katalytickém procesu se jednak účastní složky základního elektrolytu, ale také je výrazně ovlivněn protonizací MT^{12,18,19,21,22}. Na základě publikovaných výsledků jsme dále v této práci využívali pro stanovení MT 0.1 M H_3BO_3 a 0.05 M $Na_2B_4O_7$; pH = 8.

Vliv redukčního činidla na katalytický signál – pík H

Nejdříve nás zajímalo, jak bude ovlivněn AdTS CPSA signál MT v přítomnosti redukčního činidla fosfinu (TCEP). Zjistili jsme, že samotný 1 mM TCEP neposkytuje žádný signál v negativních potenciálech kolem -1.7 V, ukázáno v Obr. 2A. Nejdříve jsme k 500 fMol MT přidali 1 mM TCEP, a zjistili jsme, že pozorovaný signál MT se zvýší více jak o 50% (Obr. 2A). Navíc nás zajímalo, zda námi vybraná koncentrace TCEP je nejvhodnější pro stanovení MT. Proto jsme postupně přidávali rozdílnou koncentraci TCEP (0.1 – 1.5 mM) k MT, ukázáno v Obr. 2B. Pozorovaný signál MT se postupně s rostoucí koncentrací TCEP posouval směrem k pozitivním potenciálům a zvyšoval se do koncentrace TCEP 1 mM.

Po dosažení tohoto maxima se pík H měnil již minimálně (Obr. 2B). Pozorovaný nárůst pravděpodobně souvisí s úplnou redukcí oxidovaných SH skupin v klasterech MT²³.



Obr. 2: AdTS Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza. CPSA voltamogramy MT bez TCEP a MT s TCEP (A); Vložený obrázek: chemická struktura TCEP. Závislost výšky pík H a/nebo potenciálu na různé koncentraci TCEP (B); Vložený obrázek: CPSA voltamogramy pík H různé TCEP koncentrace (40 fmol MT). Výška píku 35 000 s/V odpovídá 100 %. CPSA základní elektrolyt obsahoval 0.1 M H₃BO₃ + 0.05 M Na₂B₄O₇. AdTS CPSA parametry byly následující: iniciační potenciál 0 V, konečný potenciál –1.85 V, teplota 20°C, doba akumulace 100 s.

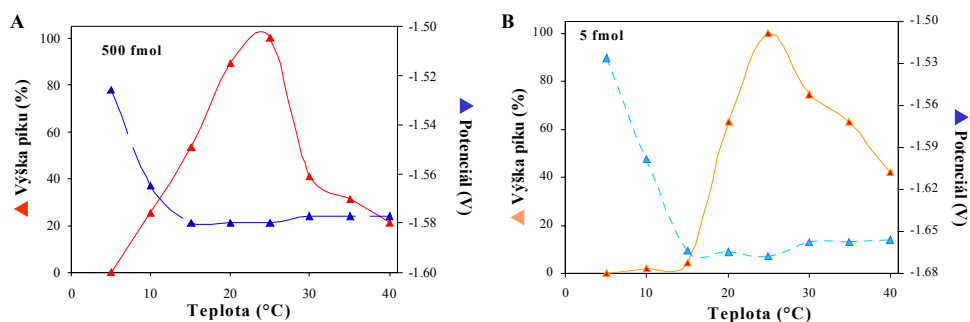
Vliv rozpouštěcího proudu

Výška píku H závisí na aplikovaném rozpouštěcím proudu (I_{str}) pro analýzu proteinů¹⁸. Jak se zdá je pro stanovení MT nejvhodnějším rozpouštěcí proud – 1 μA . Při vyšším proudu dochází k výraznému poklesu signálu MT. Při proudu pod –1 μA se délka vlastního elektrochemického měření prodlužuje na více jak 5 min.

Vliv teploty na katalytický signál MT

Vlivem teploty na výšku píku H u MutS proteinu jsme se zabývali nedávno, a zjistili jsme, že optimum stanovení se pohybuje kolem 20 – 25 °C. Proto nás zajímalo, jaký bude vliv teploty na průběh katalytického signálu při dvou koncentracích MT (500 fmol a 5 fmol). MT byl adsorbován na povrch HMDE po dobu 120 s při laboratorní teplotě (22 – 25°C), následně omyt v roztoku základního elektrolytu a modifikovaná HMDE přenesena do roztoku základního elektrolytu o definované teplotě (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 a 40 °C). Nízké teploty vedly k výraznému snížení katalytického signálu MT a s rostoucí teplotou se signál MT rychle zvyšoval. Maximální signál byl pozorován v obou studovaných koncentracích při 25 °C (Obr. 3A,B). Podle našich pozorování je katalytický signál (pík H) silně závislý na

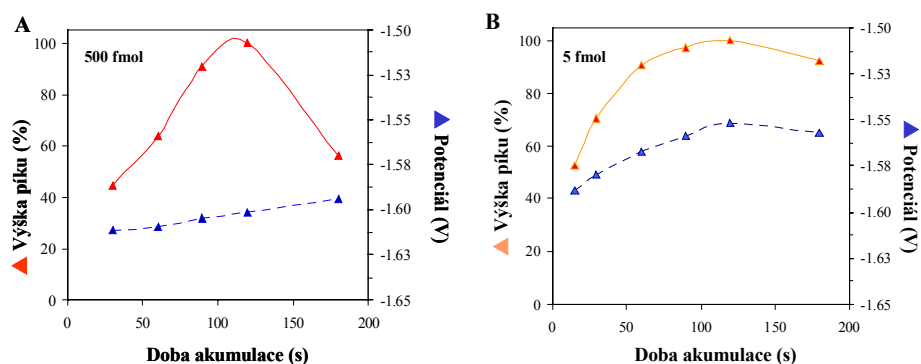
teplotě. Potenciál píků se posouval směrem do negativních potenciálů asi o 80 mV a od teploty 15 °C se měnil již velmi málo (Obr. 3 A,B).



Obr. 3: Závislost výšky píku H na teplotě (A, B) změřené dvě rozdílné koncentrace MT 500 a 5 fmol, samostatně. Výška píku 40 000 (5 fmol) a 60 000 (500 fmol) s/V odpovídá 100 %. CPESA základní elektrolyt obsahoval 0.1 M H_3BO_3 + 0.05 M $Na_2B_4O_7$. AdTS CPESA parametry byly následující: iniciační potenciál 0 V, konečný potenciál -1.85 V, doba akumulace 120 s.

Vliv doby akumulace

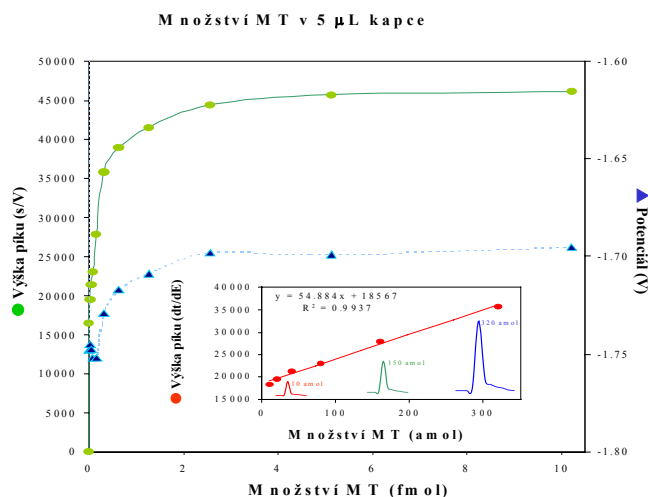
Na obrázku 4A,B je ukázán vliv doby akumulace MT ve dvou nízkých koncentracích (5 a 500 fmol) na pozorované elektrochemické odpovědi. Získaná závislost byla do 120 s u obou koncentrací MT rostoucí, avšak u 500 fmol byl pozorovaný nárůst mnohem výraznější a po dosažení maxima došlo k silnému poklesu. Ve srovnání s 5 fmol (900 fM) kde po dosažení maxima ve 120 s nebyla již pozorovatelná žádná výraznější změna ve výšce signálu (Obr. 4A,B). Pozorované signály MT se postupně posunovaly směrem k pozitivnějším potenciálům.



Obr. 3: Závislost výšky píku H na čase akumulace (A, B) změřené dvě rozdílné koncentrace MT 500 a 5 fmol, samostatně. Výška píku 40 000 (5 fmol) a 60 000 (500 fmol) s/V odpovídá 100 %. CPESA základní elektrolyt obsahoval 0.1 M H_3BO_3 + 0.05 M $Na_2B_4O_7$. AdTS CPESA parametry byly následující: iniciační potenciál 0 V, konečný potenciál -1.85 V a teplota 25°C.

Vliv koncentrace MT na pík H

Použitím rtuťové elektrody a píku H jsme získali 3-4 krát vyšší citlivost jak u ostatních elektrochemických techniky^{12,18,24,25}. Pokud jsme analyzovali rozdílné velmi nízké koncentrace redukovaného MT (od 100 nM) u doby akumulace 120 s a teplotně kontrolovaném roztoku základního elektrolytu (25°C), tak jsme získali CPSA typickou koncentrační závislost, jak je ukázáno na Obr. 5. Závislost měla tvar Langmuierovské izotermy. Tuto pozorovanou koncentrační závislost bylo možné rozdělit na dva samostatné lineární úseky (0.6 – 10 fmol v 5 μ l kapce) $y = 1954.5x + 38600$; $R^2 = 0.9926$ (není ukázáno). Na vloženém obrázku 5 je ukázána závislost 10 – 320 amol v 5 μ l kapce ($y = 54.884x + 18567$; $R^2 = 0.9937$). I při těchto velmi nízkých množstvích MT (10, 150 a 320 amol) byly pozorované píky velmi úzké, dobře vyvinuté, separované a vlastní analýza proběhla do 5 min (vložený obrázek 5). Pozorovaná relativní směrodatná odchylka se pohybovala kolem 6.5% (n=10). Díky tomuto našemu nově modifikovanému postupu bylo možné určit limit detekce 3S/N metalothioneinu v čistém základním elektrolytu jako 11 zmol.

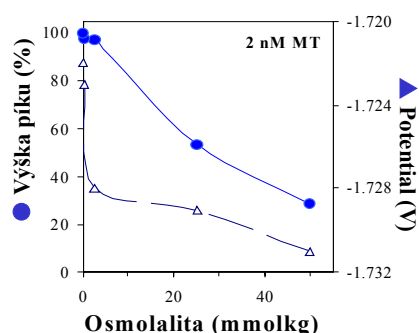


Obr. 5: Závislost výšky píku H /potenciál na množství MT v rozmezí 0 – 10 fmol a 0 – 320 amol (vložený obrázek). CPSA základní elektrolyt obsahoval 0.1 M H_3BO_3 + 0.05 M $Na_2B_4O_7$. AdTS CPSA parametry byly následující: iniciační potenciál 0 V, konečný potenciál -1.85 V, teplota 25°C a/nebo doba akumulace 120 s.

Analýza metallothioneinu v biologické matrici

Námi popsanou velmi senzitivní metodiku AdTS CPSA pro stanovení MT jsme dále využili ke stanovení MT ve složité biologické matrici (jako model nám posloužila lidská moč a krevní sérum). Nejdříve jsme se pokusili stanovit MT v moči. Zjistili jsme, že s narůstající osmolalitou moči dochází k poklesu signálu MT a pík MT se také posouvá k negativnějším potenciálům (Obr. 6).

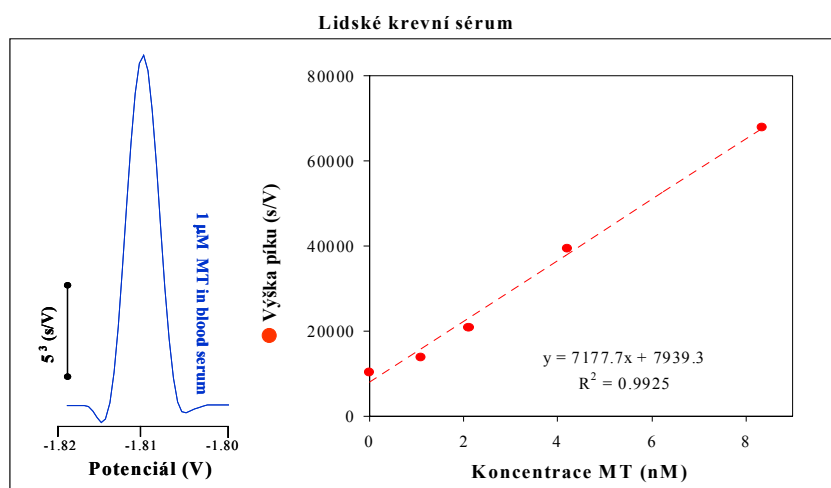
Efekt osmolality na pík H



Obr. 6: Lidská moč. Vliv osmolality vzorku lidské moči na výšku/potenciál píku H. CPSA základní elektrolyt obsahoval 0.1 M H_3BO_3 + 0.05 M $Na_2B_4O_7$. AdTS CPSA parametry byly následující: iniciační potenciál 0 V, konečný potenciál -1.85 V, teplota 25°C a/nebo čas akumulace 120 s.

Při osmolalitě moči nad 50 mmol/kg již není vhodné provádět stanovení (pozorovaný signál se snížil o více jak 50%). Proto je pro analytické stanovení proteinů (MT) pomocí AdTS CPSA potřebné studovaný biologický vzorek vhodně naředit, aby byla snížena jeho specifická hustota a senzitivita stanovení zůstala zachována. K moči (0.25 mmol/kg) bylo postupně přidáváno rozdílné množství MT. Získali jsme lineární závislost na koncentraci ($y = 11317x + 9133.4$, $R^2 = 0.9994$).

Nedávno bylo zjištěno, že hladina MT se mění u závažných onemocnění jater, jako je hepatocelulární karcinom, chronická hepatitida a cirhóza jater^{23,26}. Hladina MT byla stanovena pomocí ELISA po kyselé a tepelné úpravě vzorku. My jsme se rozhodli využít naší AdTS CPSA techniky pro stanovení MT v lidském krevním séru. Nejdříve byl vzorek tepelně denaturován a po centrifugaci byl odebraný supernatant použitý pro analýzu MT. Vzorek byl před vlastní analýzou naředěn 1000x a následně analyzován v 5 μ l kapce. V případě analýzy více koncentrovaného vzorku dochází k poklesu píku o 25 % (v porovnání s 10x ředěným vzorkem), pravděpodobně v důsledku adsorpce na povrch HMDE. Do takto připraveného vzorku krevního séra jsme přidávali rozdílnou koncentraci MT (Obr. 7). Získali jsme velmi dobrou lineární závislost standardního přídatku na zvyšující se koncentraci MT ($y = 7177.7x + 7939.3$; $R^2 = 0.9925$). Limit detekce se pohyboval kolem 350 fmol. V námi testovaných vzorcích lidského séra byla zjištěna průměrná koncentrace MT $1.1 \pm 0.015 \mu$ M (n=5). Na obrázku Obr. 7 je ukázán chronopotenciogram odpovídající 1 μ M MT koncentraci.



Obr. 7: Lidské krevní sérum. Závislost výšky píku H na množství MT v rozmezí $0 - 8$ nM přidaného k lidskému krevnímu séru a voltamogram $1 \mu\text{M}$ MT v lidském krevní séru. CPESA základní elektrolyt obsahuje $0.1 \text{ M H}_3\text{BO}_3 + 0.05 \text{ M Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. AdTS CPESA parametry byly následující: iniciační potenciál 0 V , konečný potenciál -1.85 V , teplota 25°C a/nebo čas akumulace 120 s .

ZÁVĚR

Je naprosto zřejmé, že metody analytické chemie kráčí směrem k atomolům²⁷. Jak se ukazuje katalytické signály vylučování vodíku umožňují také velmi senzitivní analýzu MT v atomolární koncentraci. Studovat množství MT v biologických vzorcích je velmi potřebné a jak se v posledních letech ukazuje, je hladina MT nejen markerem vlivu těžkých kovů na organismu, ale také markerem agresivních nádorových onemocnění. Námi popsaná elektroanalytická metoda AdTS CPESA umožňuje stanovení MT v zeptomolech v borátovém pufru, pH 8.0 a je jí možné aplikovat na analýzu reálných vzorků, jako je lidské krevní sérum a moč.

Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory grantů FRVŠ 164/2004, IGA MZLU 3/2004 a GAČR 525/04/P132.

LITERATURA

- Margoshes, M. & Vallee, B. L. A. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813–4814 (1957).
- Kägi, J. H. R. & Schäffer, A. Biochemistry of Metallothionein. *Biochemistry* 27, 8509–8515 (1988).
- Kägi, J. H. R. Overview of metallothionein. Metallobiochemistry Part B: metallothionein and related molecules. *Methods Enzymol.* 205, 613–626 (1993).
- Studníčková, M., Turánek, J., Zábršová, H., Krejčí, M. & Kysel, M. Rat liver metallothioneins are metal dithiolene clusters. *J. Electroanal. Chem.* 421, 25–37 (1997).
- Kizek, R., Vacek, J., Trnkova, L., Klejdus, B. & Kuban, V. Electrochemical biosensors in agricultural and environmental analysis. *Chem. Listy* 97, 1003–1006 (2003).
- Zehnálek, J., Adam, V. & Kizek, R. Influence of heavy metals on production of protecting compounds in agriculture plants. *Listy Cukrov* 120, 222–224 (2004).
- Kizek, R., Vacek, J., Trnkova, L. & Jelen, F. Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris(2-carboxyethyl)phosphine. *Bioelectrochemistry* 63, 19–24 (2004).
- Kizek, R., Vacek, J., Trnková, L., Klejdus, B. & Havel, L. Application of catalytic reactions on a mercury electrode for metallothionein electrochemical detection. *Chem. Listy* 98, 160–167 (2004).
- Sestakova, I., Kopanica, M., Havran, L. & Palecek, E. Constant current chronopotentiometric stripping analysis of Cd-metallothionein on carbon and mercury electrodes. Comparison with voltammetry. *Electroanalysis* 12, 100–104 (2000).
- Tomschik, M., Havran, L., Fojta, M. & Paleček, E. Constant current chronopotentiometric stripping analysis of bioactive peptides at mercury and carbon electrodes. *Electroanalysis* 10, 403–409 (1998).
- Tomschik, M., Havran, L., Paleček, E. & Heyrovský, M. The "presodium" catalysis of electroreduction of hydrogen ions on mercury electrodes by metallothionein. An investigation by constant current derivative stripping chronopotentiometry. *Electroanalysis* 12, 274–278 (2000).
- Trnkova, L., Kizek, R. & Vacek, J. Catalytic signal of rabbit liver metallothionein on a mercury electrode: a combination of derivative chronopotentiometry with adsorptive transfer stripping. *Bioelectrochemistry* 56, 57–61 (2002).
- Vacek, J. et al. Electrochemical determination of lead and glutathione in a plant cell culture. *Bioelectrochemistry* 63, 347–351 (2004).

- Honeychurch, M. J. & Ridd, M. J. The potentiometric stripping analysis of proteins. *Electroanalysis* 8, 654-660 (1996).
- Fojta, M. Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. *Electroanalysis* 14, 1449-1463 (2002).
- Han, S. B., Zhu, M., Yuan, Z. B. & Li, X. A methylene blue-mediated enzyme electrode for the determination of trace mercury(II), mercury(I), methylmercury, and mercury-glutathione complex. *Biosen. Bioelectron.* 16, 9-16 (2001).
- Adam, V. et al. Phytochelatin modified electrode surface as a sensitive heavy metal ions biosensor. *Sensors* 5, in press (2005).
- Kizek, R., Trnkova, L. & Palecek, E. Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. *Anal. Chem.* 73, 4801-4807 (2001).
- Strouhal, M., Kizek, R., Vacek, J., Trnková, L. & Němec, M. Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioelectrochemistry* 60, 29-36 (2003).
- Masarik, M. et al. Sensitive electrochemical detection of native and aggregated alpha-synuclein protein involved in Parkinson's disease. *Electroanalysis* 16, 1172-1181 (2004).
- Prusa, R., Kizek, R., Vacek, J., Trnkova, L. & Zehnalek, J. Study of relationship between metallothionein and heavy metals by CPSA method. *Clin. Chem.* 50, A28-A29 (2004).
- Brazdova, M., Kizek, R., Havran, L. & Palecek, E. Determination of glutathione-S-transferase traces in preparations of p53 C-terminal domain (aa320-393). *Bioelectrochemistry* 55, 115-118 (2002).
- Kizek, R., Vacek, J., Adam, V. & Vojtesek, B. Metallothionein - cisplatin and anticancer therapy. *Klin. Biochem. Metab.* 13, 72-78 (2004).
- Palecek, E. et al. Sensitive electrochemical detection of unlabeled MutS protein and detection point mutations in DNA. *Anal. Chem.* 76, 5930-5936 (2004).
- Havran, L., Billova, S. & Palecek, E. Electroactivity of avidin and streptavidin. Avidin signals at mercury and carbon electrodes respond to biotin binding. *Electroanalysis* 16, 1139-1148 (2004).
- Nakayama, A. et al. A new diagnostic method for chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma based on serum metallothionein, copper, and zinc levels. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25, 426-431 (2002).
- Zolotov, Y. A. Toward attomoles. *J. Anal. Chem.* 59, 807 (2004).