

USING OF METALLOTHIONEIN MODIFIED ELECTRODE SURFACE AS A SENSITIVE HEAVY METAL IONS BIOSENSOR FOR AN EVALUATION OF BEVERAGES QUALITY

POUŽITÍ METALLOTHIONEINEM MODIFIKOVANÉ ELEKTRODY JAKO CITLIVÉHO BISOENZORU TĚŽKÝCH KOVŮ PRO URČENÍ KVALITY NÁPOJŮ

**Adam V.^{1,2)}, Petrlová J.¹⁾, Potěšil D.^{1,2)}, Zehnálek J.¹⁾, Sures B.³⁾, Trnková L.⁴⁾,
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, MU, PřF Kotlářská 2, 611 37 Brno

³⁾ Univ. Karlsruhe, Zool. Inst. Okol. Parasitol. 1, Karlsruhe, D-76128, Německo

⁴⁾ Katedra teoretické a fyzikální chemie MU, PřF Kotlářská 2, 611 37 Brno

ABSTRACT

An increasing concentration of heavy metals in the environment is a serious problem for human and animal health protection and production of foodstuffs in many countries around the world. The aim of this paper was to suggest a new heavy metal biosensor based on interaction of metals (cadmium and zinc) with metallothionein, which belongs to group of intracellular, high molecular and cysteine-rich proteins binding heavy metals, using adsorptive transfer stripping (AdTS) differential pulse voltammetry (DPV). Primarily, we studied the electrochemical behaviour of MT on the surface of hanging mercury drop electrode by AdTS DPV. Perfect coverage of the electrode surface – forming of the surface assembled monolayer – was reached at time about 240 s for 1 μ M protein concentration. The detection limits of the selected heavy metals (cadmium and zinc), which were analysed in the presence of the basic electrolyte – 0.5 M NaCl (pH 6.4), were 250 fmole and 340 fmole in 5 μ l drop, respectively. In addition, we applied the biosensor to analyse heavy metals in human body liquids (human blood serum and human urine) and beverages.

Keywords: heavy metal, cadmium, zinc, biosensor, metallothionein, electrochemistry, adsorptive transfer stripping, differential pulse voltammetry, human blood serum, human urine, beverages

ABSTRAKT

Vzrůstající koncentrace těžkých kovů v životním prostředí je závažným problémem v ochraně zdraví organismů a produkci potravin v řadě zemí. Cílem této práce bylo navrhnout nový

biosenzor založený na interakci kovu (kadmium a zinek) s metalothioneinem, který patří do skupiny intracelulárních, vysoko molekulárních a na cystein bohatých proteinů, vázajících těžké kovy, využitelný pro detekci těžkých kovů pomocí adsorptivní přenosové techniky (AdTS) diferenční pulsní voltametrie (DPV). Nejprve jsme studovali elektrochemické chování metalothioneinu na povrchu rtuťové visící kapkové elektrody pomocí AdTS DPV. Dokonalé pokrytí elektrodového povrchu bylo dosaženo po akumulaci přibližně 240 s při koncentraci MT 1 μ M. Detekční limity pro kadmium a zinek, které byly analyzovány v prostředí základního elektrolytu – 0,5 M NaCl (pH 6,4), byly 250 fmolů respektive 340 fmolů v 5 μ l kapce. Dále jsme navržený biosenzor aplikovali na analýzu těžkých kovů v lidských tělních tekutinách (krevní sérum a moč) a běžně dostupných nápojích.

Klíčová slova: těžký kov, kadmium, zinek, biosenzor, metalothionein, elektrochemie, adsorptivní přenosová technika, diferenční pulsní voltametrie, lidské krevní sérum, lidská moč, nápoje

ÚVOD

Rozvoj průmyslové výroby přináší produkci celé řady škodlivých sloučenin – pesticidů, toxických organických látek a také těžkých kovů. Koncentrace těžkých kovů v životním prostředí je závažným problémem v ochraně lidského zdraví a produkci potravin v řadě zemí. A proto snadná a rychlá detekce těžkých kovů ve velmi nízkých koncentracích je nezbytná pro zajištění opatření proti akutní intoxikaci, a především, proti dlouhodobé expozici, která může vést ke vzniku mnoha onemocnění, popřípadě ke smrti. Nedávno bylo publikováno několik prací popisujících stanovení těžkých kovů pomocí biosenzorů založených na interakci těžkého kovu s DNA¹⁻⁵, enzymem (především ureasou)⁶⁻¹⁰, bakterií¹¹⁻¹³ a proteinem^{14,15}. Wu a Lin publikovali práci popisující využití metalothioneinu pro konstrukci proteinového biosenzoru detekujícího těžké kovy. Metalothioneiny (MT) patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein velmi bohatých proteinů (obsah Cys až 30 % v molekule proteinu) o molekulové hmotnosti od 6–10 kDa¹⁶. Díky své vysoké afinitě k těžkým kovům, např. k zinku, mědi nebo kadmiu, je jejich hlavní funkcí homeostatická kontrola a detoxikace těchto těžkých kovů u vývojově rozdílných organismů.

Cílem této práce bylo navrhnout biosenzor těžkých kovů založený na interakci těžkého kovu (kadmium a zinek) s metalothioneinem. Dále využít navržený biosenzor pro detekci těžkých kovů v lidských tělních tekutinách (lidská krev a moč) a pro rychlé a citlivé určení obsahu studovaných těžkých kovů v nápojích.

MATERIÁLY A METODY

Chemikálie

Metalothionein (králíčí játra, MW 7143) obsahující 5,9 % Cd a 0,5 % Zn, chlorid sodný, dusičnan kademnatý, dusičnan zinečnatý a další použité chemikálie byly zakoupeny od Sigma Aldrich (St. Louis, USA), vyjma tris(2-karboxyethyl)fosfinu (TCEP), který byl od Molecular Probes (Eugen, Oregon, USA). Zásobní roztoky standardu metalothioneinu v koncentraci $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ byly připravovány pomocí ACS vody (Sigma-Aldrich, USA) a uchovávány ve tmě při 4 °C. Pracovní standardní roztoky byly připravovány denně ředěním roztoků zásobních. Hodnoty pH byly měřeny pomocí WTW inoLab Level 3 pH metrem (Weilheim, Germany), který byl propojen s osobním počítačem a řízen programem (MultiLab Pilot; Weilheim, Germany). pH-elektroda (SenTix- H, pH 0–14/3M KCl) byla pravidelně kalibrována sadou WTW pufrů (Weilheim, Germany).

Elektrochemické metody

Elektrochemické měření bylo prováděno na AUTOLABu (EcoChemie, Holandsko) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byl použit tříelektrodový systém a skládal se z visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE) jako pracovní elektrody s plochou 0.4 mm^2 , Ag/AgCl/ $3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl elektrody jako referenční elektrody a platinového drátku jako pomocné elektrody. GPES software (EcoChemie, Holandsko) byl aplikován na zpracování hrubých dat za použití úrovně 4 Savitzky and Golay filtru. Analyzované vzorky byly deoxygenovány pro měření pomocí probublávání argonem (99.999%) nasyceného vodou po 120 s. Všechny experimenty byly prováděny při pokojové teplotě.

Adsorpční přenosová rozpouštěcí (AdTS) diferenční pulzní voltametrie (DPV) metalothioneinu

Metalothionein byl detekován pomocí AdTS DPV. Vzorky obsahující metalothionein byly před každým měřením redukovány pomocí přídatku 1 mM tris(2-karboxyethyl)fosfinu (TCEP) podle ¹⁷. Základním elektrolytem byl 0,5 M chlorid sodný, pH 6,4. DPV parametry byly následující: počáteční potenciál $-1,2 \text{ V}$, konečný potenciál $-0,3 \text{ V}$, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok $1,05 \text{ mV/s}$, modulační amplituda 25 mV.

Reálné vzorky

Lidská moč

Lidská moč (získaná od zdravého laboratorního personálu) byla filtrována přes teflonový kulatý filtr (0.45 μm a 13 mm průměr, Alltech Associates, Deerfield, IL, USA) a před analýzou byla 10 $\times$ zředěna 0,5 M chloridem sodným (pH 6,4). Dále jsme do 10 $\times$ zředěného roztoku lidské moči přidali Cd(II) anebo Zn(II) v koncentracích 25, 50, 100, 225, 400, 600 anebo 50, 100, 200, 400, 600, 800 μM .

Lidské krevní sérum

Vzorky lidského krevního séra byly získány z Ústavu klinické biochemie, Úrazové nemocnice Pónávka v Brně. Lidské krevní sérum bylo před analýzou 1000 $\times$ zředěno pomocí 0,5 M chloridu sodného (pH 6,4). Navíc jsme k takto připravenému roztoku přidali Cd(II) anebo Zn(II) v koncentracích 50, 100, 200, 400, 600, 800 μM .

Nápoje

Minerální vody přírodní a ochucené (Magnesia a Mattoni) byly zakoupeny v supermarketu Tesco. Před analýzou nebyly vzorky ředěny. Kadmnaté anebo zinečnaté ionty byly do vzorku minerálních vod přidány v koncentracích 100, 200, 300 a 400 μM .

VÝSLEDKY A DISKUSE

V nedávné době byly publikovány práce zabývající se konstrukcí biosenzorů na detekci těžkých kovů pomocí rozdílných biologických součástí (houby, bakterie, proteiny, peptidy)^{2,5,6,10,12-15,18-27}. V naší práci jsme se zabývali elektrochemickým stanovením těžkých kovů pomocí jejich interakce s metalothioneinem.

Elektrochemické chování metalothioneinu bylo již dříve popsáno pomocí chronopotenciometrické rozpouštěcí rozpouštěcí analýzy, cyklické a diferenční pulzní voltametrie. Nedávno jsme studovali MT pomocí CPSA v kombinaci s adsorptivní přenosovou technikou. V této práci byla zvolena diferenční pulzní voltametrie v kombinaci s adsorptivní přenosovou technikou pro lepší pochopení možných procesů, které probíhají na povrchu pracovní elektrody.

Adsorptivní přenosová technika jako základ elektrochemického biosenzoru

Adsorptivní přenosová technika byla vyvinuta jako vhodný nástroj pro elektrochemickou analýzu biomolekul, jako jsou proteiny a DNA²⁸⁻³⁶. Princip analýzy

spočívá v adsorbování studovaného analytu na povrch pracovní elektrody (HMDE). Po ukončení expozice je přebytek analytu z povrchu pracovní elektrody omyt v pufru. Bylo prokázáno, že na povrchu HMDE vzniká pouze film z látek vysokomolekulárních nebo silně interagujících s povrchem elektrody (za vzniku celé řady fyzikálně chemických interakcí).

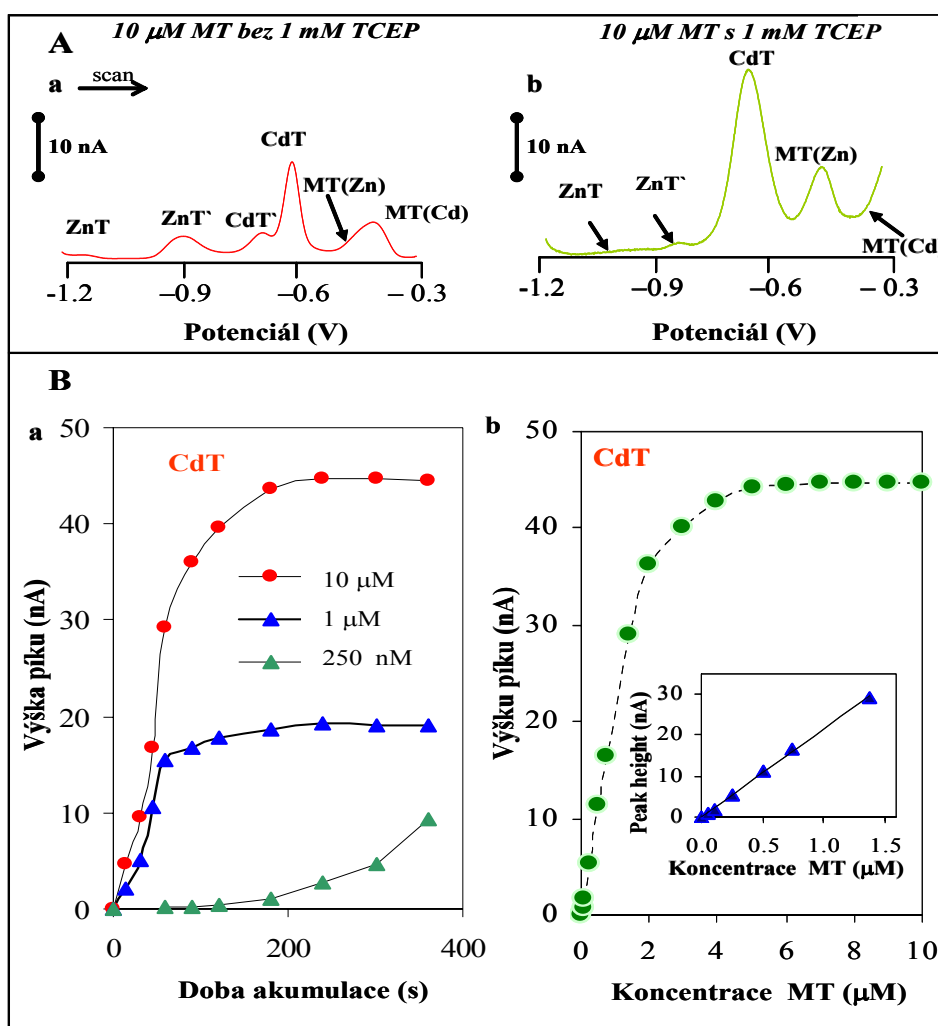
Adsorptivní přenosová technika pro detekci metallothioneinu

Metallothionein (MT) je významným savčím proteinem vázajícím kovy. MT studovaný pomocí DPV poskytuje několik elektrochemických signálů, jako komplexy MT s těžkými kovy přítomnými v roztoku, tj. MT(Cd); MT(Zn), CdT⁺, ZnT⁺ a ZnT²⁺ ³⁷⁻³⁹. V získaných voltamogramech, jsou však kromě signálů uvedených komplexů kovů s MT ještě navíc přítomny redoxní signály iontových forem Cd(II) a Zn(II) ³⁷⁻³⁹.

Proto nás zajímalo jaký bude elektrochemický záznam MT po aplikaci AdTS DPV. MT (1 μ M) byl nejdříve akumulován na povrch pracovní elektrody a získaná voltametrická křivka je ukázána na Obr. 1Aa. Byly pozorovány všechny předpokládané elektrochemické signály MT (MT(Cd); MT(Zn), CdT⁺, ZnT⁺ a ZnT²⁺), avšak žádný signál volných iontových forem Cd a Zn. Zjištěný fakt, potvrzuje předpoklad, že nízkomolekulární sloučeniny nejsou schopny přenosu, a tedy i následné detekce. V případě, že byla provedena akumulace (120 s) pouze těžkého kovu (Cd, Zn), nebyl pozorován žádný signál odpovídající těžkému kovu (není ukázáno). Dále nás zajímalo, jaký bude mít vliv redukční činidlo TCEP na pozorované MT signály. DPV voltamogramy 10 μ M MT bez 1 mM TCEP (a) a s 1 mM TCEP (b) jsou ukázány na Obr. 1Aa,b. V případě analýzy redukovaného MT jsme pozorovali značný pokles výšky píku ZnT⁺. Zatímco výška signálů CdT⁺ a MT(Cd) vzrostla okolo 30 – 40 % v porovnání z neredukovaným MT. Navíc signál CdT⁺ zmizel. Pozorované změny mohou být způsobeny redukcí oxidovaných MT clusterů. A proto jsme v našich následujících experimentech používali 1 mM TCEP pro redukci MT.

Již dříve jsme zjistili, že MT je na povrch HMDE velmi dobře akumulovatelný ⁴⁰⁻⁴³. Závislost proudové odezvy MT na době akumulace u tří MT koncentrací (10 μ M, 1 μ M a 250 nM) je ukázána na Obr. 1Ba. Získané závislosti pro koncentrace MT (1 a 10 mM) měly tvar Langmuierovské izotermy. Dokonalého pokrytí povrchu metallothioneinem bylo dosaženo po jeho expozici 200 až 250 s, Obr. 1Ba. V případě nízké koncentrace byla pozorovaná závislost hyperbolická a ani do 360 s nebylo dosaženo plného pokrytí povrchu pracovní elektrody Obr. 1Ba. Pro následující experimenty jsme používali 10 μ M MT, který jsme adsorbovali 240 s na povrch pracovní elektrody.

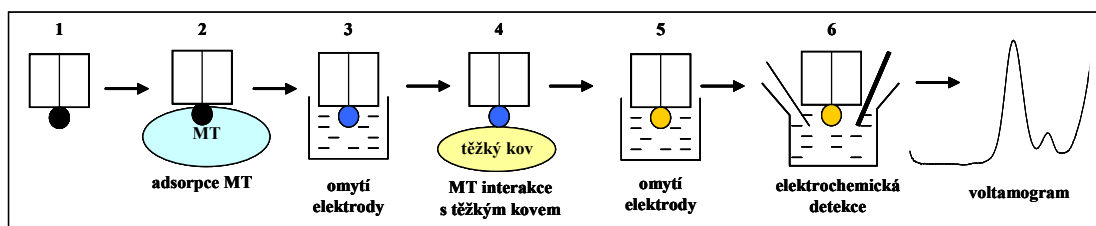
Koncentrační závislost byla studována metodou postupného ředění vzorku MT. Jako analytický signál byl vyhodnocován pík CdT (-0.64 V). Získaná závislost ve studovaném rozsahu 50 nM až 10 μ M MT měla také tvar Langmuirovské izotermy (Obr. 1Bb). Ve vyšších koncentracích dochází pravděpodobně k plnému pokrytí povrchu pracovní elektrody, čímž se mění vlastnosti elektrodové dvojvrstvy. V případě nízkých koncentrací (50 nM až 1 μ M MT) jsme získali striktně lineární závislost koncentrace MT na proudové odezvě signálu CdT ($y = 21.37x - 0.0575$; $R^2 = 0.9983$) s limitem detekce MT (3S/N) 40 nM, Obr. 1Bb.



Obr. 1: DPV voltamogramy 10 μ M MT bez (Aa) a s 1 mM TCEP – tris(2-carboxyethyl)phosphine (Ab) získané AdTS DPV technikou. DPV parametry: počáteční potenciál -1,2 V, konečný potenciál -0,3 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 25 mV, $E_{ads} = 0$ V. Vliv různých dob akumulace (Ba) a MT koncentrace (Bb a vložený obrázek Bb) na velikost CdT proudové odezvy. Další experimentální detaily jsou uvedeny v sekci Materiály a metody.

Modifikace HMDE metallothioneinem

V našem případě bylo využito HMDE jako fyzikálně chemického části a metallothioneinu jako biologické části biosenzoru na stanovení těžkých kovů. Jak bylo popsáno výše, neprokázali jsme, že by bylo možné přenášet na povrchu HMDE samotný těžký kov a je známo, že PC a MT velmi dobře váží do svých struktur těžké kovy^{37,44-52}. Proto bylo možné provést experiment: i) na povrch pracovní elektrody HMDE adsorbovat MT ii) odstranit přebytečný MT iii) vystavit adsorbovaný MT působení těžkého kovu iv) detekovat změnu signálu MT (schéma experimentu je zobrazeno na Obr. 2).



Obr. 2: Schéma adsorptivní přenosové rozpouštěcí techniky použité pro detekci těžkých kovů; (1) obnova povrchu visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE); (2) adsorpce MT na povrch HMDE; (3) omytí elektrody v chloridu sodném (0.5 M, pH 6.4); (4) interakce těžkého kovu (kadmium anebo zinek) s proteinem modifikovaným HMDE povrchem; (5) omytí elektrody v chloridu sodném (0.5 M, pH 6.4); (6) analýza MT pomocí DPV v 0,5 M chloridu sodném, pH 6,4.

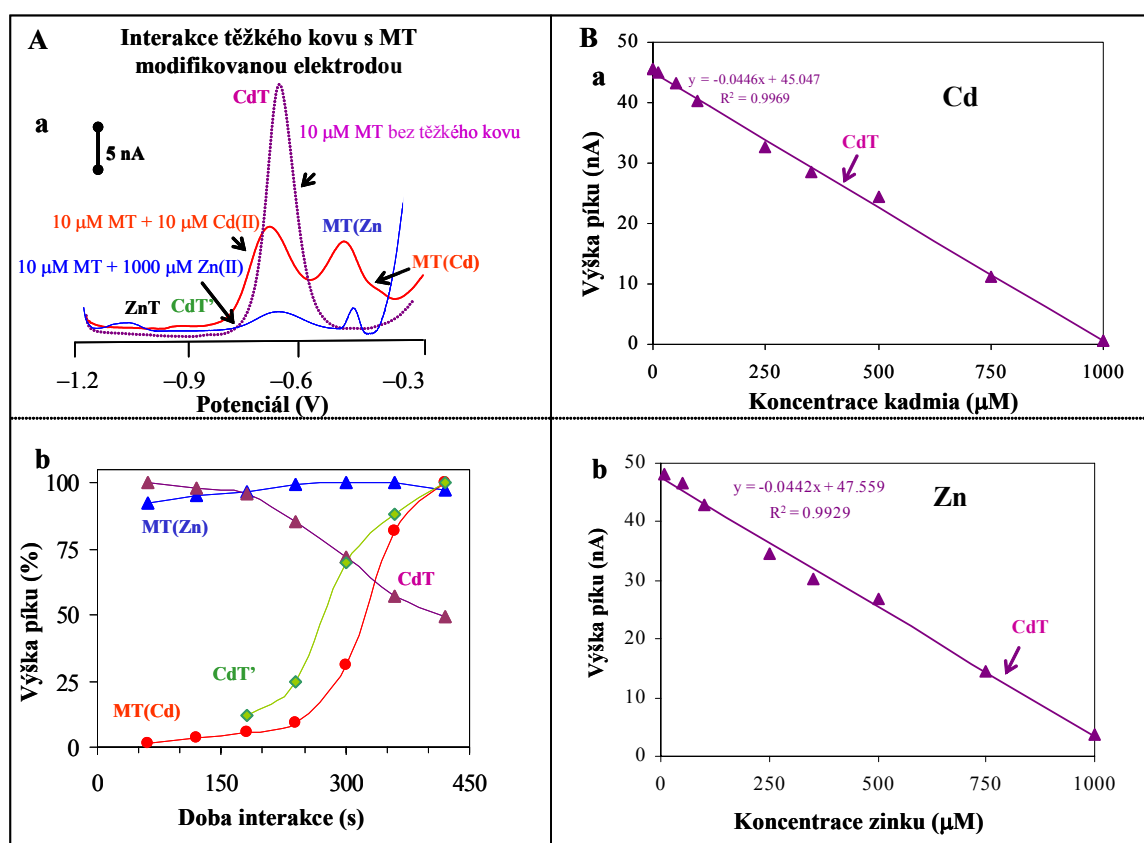
Elektrochemické chování metallothioneinem modifikované HMDE v přítomnosti Cd(II) a Zn(II)

MT (10 μM) byl na povrch HMDE adsorbován 240 s a následně byla modifikovaná elektroda vystavena 10 μM Cd(II) anebo 100 μM Zn(II) po dobu 120 s. Po té byla elektroda omyta (0.5 NaCl) a umístěna do měřicí nádoby obsahující základní elektrolyt (0,5 M NaCl, pH = 6.4), experimentální schéma je zobrazeno na Obr. 2. Získané voltmetrické signály jsou zobrazeny na Obr. 3Aa. V případě Cd(II) jsme pozorovali čtyři signály komplexů MT s Cd(II) – CdT⁺: -0.82 V; CdT: -0.63 V; MT(Zn): -0.46 V a MT(Cd): -0.40 V. Přičemž po přidavku Zn(II) se objevily pouze tři signály – CdT: -0.68 V, MT(Zn): -0.46 V and ZnT: -1.1 V (Obr. 3Aa).

Vliv času interakce heavy metals s modifikovanou HMDE

Nejdříve jsme studovali vliv doby interakce těžkého kovu (kadmium anebo zinek) s MT modifikovanou HMDE. Na povrch HMDE byl adsorbován MT v koncentraci 10 μM po dobu 240 s. Takto modifikovaná elektroda byla vystavena interakci s konstantní koncentrací

kadmia po různě dlouhou dobu. Zjistili jsme, že v průběhu interakce dochází k postupnému snižování signálu CdT průměrně asi o 6% na 60 s expozici těžkým kovem a po 420 s je signál CdT snížen o více jako 50 % (Fig. 3Ab). Signál MT(Zn) se v průběhu experimentu měnil průměrně o 3%. Již na počátku experimentu byl pozorovatelný signál, který byl označen jako MT(Cd), který se vzrůstající dobou interakce vzrůstal. Nejdříve však velmi pozvolně, a teprve od 250 s byl pozorován výrazný nárůst signálu MT(Cd). Negativněji od píku CdT byl pozorován další rychle rostoucí signál CdT⁺ teprve od času akumulace asi 180 s (Obr. 3Ab). V případě Zn(II), signál CdT klesal, a signály MT(Zn) a ZnT rostly se vzrůstající dobou interakce těžkého kovu s povrchem MT modifikované elektrody (není ukázáno). Ze získaných experimentálních výsledků jsme vycházeli v další části práce, kde bylo potřebné exponovat modifikovanou HMDE těžkým kovem (kadmium anebo zinek) minimálně 300 s.



Obr. 3: DPV voltamogramy 10 μM MT bez přídavku Cd(II) a Zn(II), 10 μM MT + 10 μM Cd(II) a 10 μM MT + 100 μM Zn(II) (Aa). DPV parametry: doba akumulace 240 s, doba interakce 120 s. Závislost výšky píku CdT na době interakce (Ab). Vliv různých koncentrací Cd(II) (Ba) anebo Zn(II) (Bb) na výšku píku CdT. MT koncentrace: 10 μM . DPV parametry: doba interakce 300 s. Další detaily jsou uvedeny v legendě Obr. 1.

Přímé stanovení Cd(II) a Zn(II) pomocí MT modifikované HMDE

Dále byl studován vliv různé koncentrace těžkého kovu na pozorované MT signály. Jako analyticky využitelný signál pro kvantifikaci Cd(II) i Zn(II) byl použit pokles signálu CdT. Získaná závislost v případě Cd(II) byla lineární $y = -0,0446x + 45,047$; $R^2 = 0,9969$ a limit detekce těžkého kovu se pohyboval kolem 250 fmole v 5 μ l kapce (0,05 μ M), Obr. 3 Ba). Pro sestrojení kalibrační křivky Zn(II) bylo opět využito signálu CdT, který lineárně klesal s rostoucí koncentrací přidávaného Zn(II). Rovnice získané přímky byla $y = -0,0442x + 47,559$; $R^2 = 0,9929$ (Obr. 3Bb) a limit detekce stanovení Zn(II) se pohyboval kolem 2,5 pmole v 5 μ l kapce (0,5 μ M).

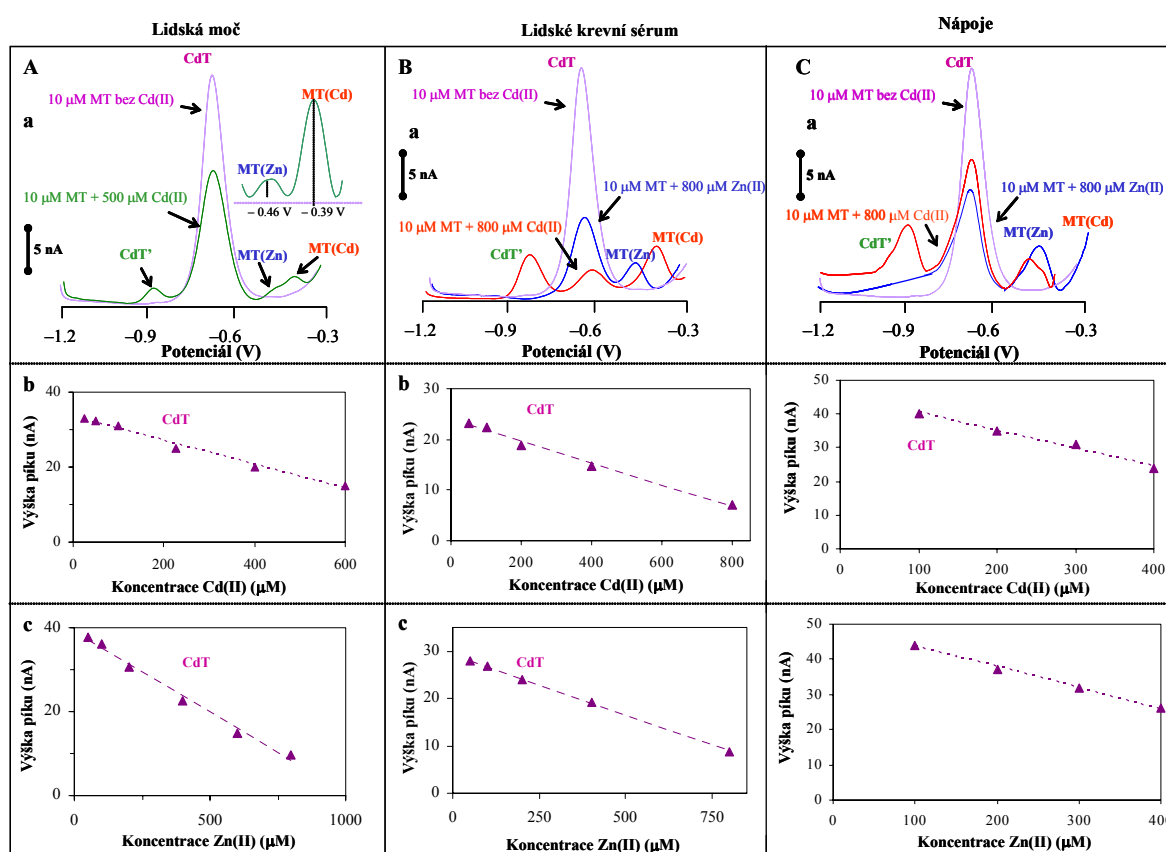
Stanovení Cd(II) a Zn(II) pomocí MT modifikované HMDE v přítomnosti lidské moči

Použili jsme náš biosenzor těžkých kovů pro detekci Cd(II) anebo Zn(II) v přítomnosti biologické matrice (lidské moči). Konkrétně, MT (10 μ M) byl adsorbován (240 s) na povrch HMDE a poté byla takto modifikovaná elektroda vystavena interakci s Cd(II) anebo Zn(II) v přítomnosti lidské moči (10 $\times$ zředěna) po dobu 300 s. Do vzorku zředěné lidské moči jsme přidali Cd(II) anebo Zn(II) v koncentracích 25, 50, 100, 225, 400, 600 anebo 50, 100, 200, 400, 600, 800 μ M. Typické voltamogramy získané v přítomnosti lidské moči jsou ukázány na Obr. 4Aa. Po přidavku Cd(II) jsme pozorovali čtyři signály: CdT', CdT, MT(Cd) a MT(Zn), zatímco po přidavku Zn(II) pouze tři: CdT, ZnT a MT(Zn) (není ukázáno). Tyto výsledky dobře korespondují s výsledky získanými v pufovaném prostředí. V případě vzrůstající koncentrace Cd(II) jsme pozorovali pokles sledovaného píku CdT ($y = -0,0321x + 33,534$; $R^2 = 0,9888$; Obr. 4Ab). V případě Zn(II) je závislost výšky píku CdT na koncentraci Zn(II) zobrazena na Obr. 4Ac a její rovnice je $y = -0,0385x + 39,143$; $R^2 = 0,9915$. Všechny pozorované signály podobné elektrochemické chování jako v pufovaném prostředí, pouze výšky všech zmíněných signálů byly v přítomnosti lidské moči nižší v porovnání s 0,5 M NaCl. Tento efekt je pravděpodobně způsoben adsorpcí nečistot přítomných v reálném vzorku na povrch pracovní elektrody. Detekční limity (3 S/N) pro Cd(II) anebo Zn(II) byly 467 fmol anebo 390 fmol v 5 μ l kapce.

Stanovení Cd(II) a Zn(II) pomocí MT modifikované HMDE v přítomnosti lidského krevního séra

Námi navržený biosenzor jsme dále testovali pro detekci těžkých kovů v přítomnosti lidského krevního séra. Postupně jsme přidali do vzorků lidského krevního séra Cd(II) anebo

Zn(II) v koncentracích 50, 100, 200, 400 a 800 μM . Typické voltamogramy získané v přítomnosti lidského krevního séra jsou ukázány na Obr. 4Ba. Jak je z obrázku dobře patrné, můžeme pozorovat tři dobře vyvinuté elektrochemické signály: CdT', MT(Cd) a CdT. Signál CdT klesal se vzrůstající koncentrací Cd(II) – $y = -0,0216x + 23,960$; $R^2 = 0,9920$ (Obr. 4Bb). Podobnou závislost jsme pozorovali v případě Zn(II). Konkrétně, CdT signál klesal se vzrůstající koncentrací Zn(II) ve vzorku krevního séra – $y = -0,0254x + 29,228$, $R^2 = 0,9997$ (Obr. 4Bc). Detekční limit (3 S/N) pro Cd(II) anebo Zn(II) byl 750 fmol anebo 630 fmol v 5 μl kapce.



Obr. 4 Biologická matrice – lidská moč. DPV voltamogramy 10 μM MT bez přídavku Cd(II) a 10 μM MT + 500 μM kadmia získané v přítomnosti 10 $\times$ zředěné lidské moči (Aa); vložený obrázek: píky MT(Zn) a MT(Cd) upravené programem GPES v módu baseline correction. Vliv různých koncentrací kademnatých (Ab) anebo zinečnatých iontů (Ac) na výšku CdT píku. Lidské krevní sérum. DPV voltamogramy 10 μM MT bez přídavku Cd(II), a 10 μM MT + 800 μM kademnatých iontů, a 10 μM MT + 800 μM zinečnatých iontů získané v přítomnosti lidského krevního séra (Ba). Vliv různých koncentrací kademnatých (Bb) anebo zinečnatých iontů (Bc) na výšku CdT píku. DPV voltamogramy 10 μM MT bez přídavku Cd(II), a 10 μM MT + 300 μM kademnatých iontů, a 10 μM MT + 300 μM zinečnatých iontů získané v přítomnosti minerální vody (Ca). Vliv různých koncentrací kademnatých (Cb) anebo zinečnatých iontů (Cc) na výšku CdT píku. MT koncentrace: 10 μM . DPV parametry: doba akumulace 240 s, doba interakce 300 s. Další detaily jsou uvedeny v legendě Obr. 3.

Stanovení Cd(II) a Zn(II) pomocí MT modifikované HMDE v nápojích

Na závěr jsme použili námi navržený biosenzor těžkých kovů na detekci Cd(II) a Zn(II) v běžně dostupných minerálních vodách. Nejprve jsme do vzorku minerální vody přidali Cd(II) anebo Zn(II) v koncentracích 100, 200, 300 a 400 μM . Voltamogramy 10 μM MT, 10 μM MT + 300 μM Cd(II) a 10 μM MT + 300 μM Zn(II) získané v přítomnosti minerální vody (Magnesia) jsou ukázány na Obr. 4Ca. Závislosti výšky píku CdT na zvyšující se koncentraci Cd(II) anebo Zn(II) získané v přítomnosti minerální vody (Magnesia) jsou zobrazeny na Obr. 4Cb,c. CdT signál lineárně klesal se zvyšující se koncentrací těžkého kovu ve vzorku minerální vody (pro Cd(II): $y = -0,056x + 48,5$; $R^2 = 0,9987$; pro Zn(II): $y = -0,052x + 45,5$; $R^2 = 0,9869$). Ze získaných kalibračních křivek jsme byli schopni zjistit koncentraci těžkých kovů (kadmia a zinku) přímo ve vzorcích minerálních vod. Množství kademnatých iontů se pohybovalo pod hranicí limitu detekce našeho biosenzoru. V případě Zn(II) jsme detekovali 1,2 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v Magnesii a 1,4 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v Mattoni.

ZÁVĚR

Vývoj snadno a rychle obnovitelných senzorů pro detekci rozdílných analytů je významným úkolem současné analytické chemie a biochemie. V naší práci byl navržen jednoduchý senzor pro stanovení Cd(II) a Zn(II) využívající modifikace povrchu visící kapkové rtuťové elektrody metalothioneinem. Získané výsledky ukazují na možné využití této technologie pro snadnou, rychlou a levnou detekci těžkých kovů přítomných v životním prostředí, potravinářských produktech či biologických vzorcích.

Poděkování

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

LITERATURA

1. Fojta, M. Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. *Electroanalysis* 14, 1449-1463 (2002).
2. Babkina, S. S. & Ulakhovich, N. A. Amperometric biosensor based on denatured DNA for the study of heavy metals complexing with DNA and their determination in biological, water and food samples. *Bioelectrochemistry* 63, 261-265 (2004).
3. Rodriguez-Mozaz, S., Marco, M. P., de Alda, M. J. L. & Barcelo, D. Biosensors for environmental applications: Future development trends. *Pure Appl. Chem.* 76, 723-752 (2004).
4. Berggren, C., Bjarnason, B. & Johansson, G. Capacitive biosensors. *Electroanalysis* 13, 173-180 (2001).
5. Lu, Y. et al. New highly sensitive and selective catalytic DNA biosensors for metal ions. *Biosen. Bioelectron.* 18, 529-540 (2003).
6. Aiken, A. M., Peyton, B. M., Apel, W. A. & Petersen, J. N. Heavy metal-induced inhibition of *Aspergillus niger* nitrate reductase: applications for rapid contaminant detection in aqueous samples. *Anal. Chim. Acta* 480, 131-142 (2003).
7. Dzyadevych, S. V. et al. Biosensors based on enzyme field-effect transistors for determination of some substrates and inhibitors. *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 496-506 (2003).
8. 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).
9. Krajewska, B., Zaborska, W. & Chudy, M. Multi-step analysis of Hg²⁺ ion inhibition of jack bean urease. *J. Inorg. Biochem.* 98, 1160-1168 (2004).
10. Kuswandi, B. Simple optical fibre biosensor based on immobilised enzyme for monitoring of trace heavy metal ions. *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 1104-1110 (2003).
11. Horswell, J., Speir, T. W. & van Schaik, A. P. Bio-indicators to assess impacts of heavy metals in land-applied sewage sludge. *Soil Biol. Biochem.* 35, 1501-1505 (2003).
12. Qian, Z. R. & Tan, T. C. BOD measurement in the presence of heavy metal ions using a thermally-killed-Bacillus subtilis biosensor. *Water Res.* 33, 2923-2928 (1999).
13. Bontidean, I. et al. Bacterial metal-resistance proteins and their use in biosensors for the detection of bioavailable heavy metals. *J. Inorg. Biochem.* 79, 225-229 (2000).
14. Wu, C.-M. & Lin, L.-Y. Immobilization of metallothionein as a sensitive biosensor chip for the detection of metal ions by surface plasmon resonance. *Biosen. Bioelectron.* doi:10.1016/j.bios.2004.03.026, in press (2004).
15. Bontidean, I. et al. Novel synthetic phytochelatin-based capacitive biosensor for heavy metal ion detection. *Biosen. Bioelectron.* 18, 547-553 (2003).

16. Kági, J. H. R. & Schäffer, A. Biochemistry of Metallothionein. *Biochemistry* 27, 8509–8515 (1988).
17. 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).
18. Tsai, H. C., Doong, R. A., Chiang, H. C. & Chen, K. T. Sol-gel derived urease-based optical biosensor for the rapid determination of heavy metals. *Anal. Chim. Acta* 481, 75-84 (2003).
19. May, L. M. & Russell, D. A. Novel determination of cadmium ions using an enzyme self-assembled monolayer with surface plasmon resonance. *Anal. Chim. Acta* 500, 119-125 (2003).
20. Leth, S. et al. Engineered bacteria based biosensors for monitoring bioavailable heavy metals. *Electroanalysis* 14, 35-42 (2002).
21. Lehmann, M., Riedel, K., Adler, K. & Kunze, G. Amperometric measurement of copper ions with a deputy substrate using a novel *Saccharomyces cerevisiae* sensor. *Biosen. Bioelectron.* 15, 211-219 (2000).
22. Kukla, A. L., Kanjuk, N. I., Starodub, N. F. & Shirshov, Y. M. Multienzyme electrochemical sensor array for determination of heavy metal ions. *Sensors Actuators B-Chemical* 57, 213-218 (1999).
23. Kizek, R., Vacek, J., Trnkova, L., Klejdus, B. & Kuban, V. Electrochemical biosensors in agricultural and environmental analysis. *Chem. Listy* 97, 1003-1006 (2003).
24. Gooding, J. J., Hibbert, D. B. & Yang, W. Electrochemical metal ion sensors. Exploiting amino acids and peptides as recognition elements. *Sensors* 1, 75–90 (2001).
25. Corbisier, P. et al. Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples. *Anal. Chim. Acta* 387, 235-244 (1999).
26. Brabec, V. DNA sensor for the determination of antitumor platinum compounds. *Electrochim. Acta* 45, 2929-2932 (2000).
27. Adam, V. et al. Phytochelatin modified electrode surface as a sensitive heavy metal ions biosensor. *Sensors* 5, in press (2005).
28. Paleček, E. & Postbieglová, I. Adsorptive stripping voltammetry of biomacromolecules with transfer of the adsorbed layer. *J Electroanal Chem* 214, 359–371 (1986).
29. Paleček, E. Adsorptive transfer stripping voltammetry: Effect of electrode potential on the structure of DNA adsorbed at the mercury surface. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 28, 71-83 (1992).
30. Paleček, E. New trends in electrochemical analysis of nucleic acids. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 20, 179-194 (1988).
31. Paleček, E. Adsorptive transfer stripping voltammetry - determination of nanogram quantities of DNA immobilized at the electrode surface. *Anal. Biochem.* 170, 421-431 (1988).
32. Fojta, M. et al. Two-surface strategy in electrochemical DNA hybridization assays: Detection of osmium-labeled target DNA at carbon electrodes. *Electroanalysis* 15, 431-440 (2003).

33. Ozkan, D. et al. DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label. *Bioelectrochemistry* 58, 119-126 (2002).
34. Palecek, E., Jelen, F. & Postbieglová, I. Adsorptive transfer stripping voltammetry offers new possibilities in DNA research. *Studia Biophysica* 130, 51-54 (1989).
35. Jelen, F., Tomschik, M. & Palecek, E. Adsorptive stripping square-wave voltammetry of DNA. *J. Electroanal. Chem.* 423, 141-148 (1997).
36. Fojta, M., Havran, L., Fulneckova, J. & Kubicarova, T. Adsorptive transfer stripping AC voltammetry of DNA complexes with intercalators. *Electroanalysis* 12, 926-934 (2000).
37. Dabrio, M. & Rodríguez, A. R. Electrochemical study of human foetal liver metallothionein: influence of the additions of cadmium and zinc. *Anal. Chim. Acta.* 406, 171-181 (2000).
38. Erk, M. & Raspor, B. Evaluation of cadmium-metallothionein stability constants based on voltammetric measurement. *Anal. Chim. Acta.* 360, 189-194 (1998).
39. Erk, M. & Raspor, B. Interference of Pb leaching from the pH electrode on Cd-metallothionein complex. *Anal. Chim. Acta.* 442, 165-170 (2001).
40. 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).
41. Kizek, R., Trnkova, L. & Palecek, E. Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. *Anal. Chem.* 73, 4801-4807 (2001).
42. 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).
43. 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).
44. Dabrio, M. & Rodriguez, A. R. Complexing properties of the beta metallothionein domain with cadmium and/or zinc, studied by differential pulse polarography. *Analisis* 28, 370-381 (2000).
45. Dabrio, M. & Rodríguez, A. R. Study of complexing properties of the α -metallothionein domain with cadmium and/or zinc, using differential pulse polarography. *Anal. Chim. Acta.* 424, 77-90 (2000).
46. Dabrio, M. et al. Recent developments in quantification methods for metallothionein. *J. Inorg. Biochem.* 88, 123-134 (2002).
47. Dabrio, M., Van Vyncht, G., Bordin, G. & Rodriguez, A. R. Study of complexing properties of the alpha and beta metallothionein domains with cadmium and/or zinc using electrospray ionisation mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 435, 319-330 (2001).

48. Díaz-Cruz, M. S., Díaz-Cruz, J. M., Mendieta, J., Tauler, R. & Esteban, M. Soft- and hard-modeling approaches for the determination of stability constants of metal-peptide systems by voltammetry. *Anal. Biochem.* 279, 189–201 (2000).
49. Díaz-Cruz, M. S., Esteban, M. & Rodríguez, A. R. Square wave voltammetry data analysis by multivariate curve resolution: application to the mixed-metal system. *Anal. Chim. Acta.* 428, 285–299 (2001).
50. Díaz-Cruz, M. S., Mendieta, J. & Esteban, M. Combined use of differential pulse plarography and multivariate curve resolution: as applied to the study of metal mixed complexes of the metallothionein related hexapeptide Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala. *Electroanalysis* 14, 50–56 (2002).
51. Díaz-Cruz, M. S., Mendieta, J., Monjonell, A., Tauler, R. & Esteban, M. Study of the zinc-binding properties of glutathione by differential pulse polarography and multivariate curve resolution. *J. Inorg. Biochem.* 70, 91–98 (1998).
52. Díaz-Cruz, M. S., Mendieta, J., Tauler, R. & Esteban, M. Cadmium-binding properties of glutathione: a chemometrical analysis of voltammetric data. *J. Inorg. Biochem.* 66, 29–36 (1997).