

Uniwersytet w Białymstoku

Wydział Biologiczno-Chemiczny



Rozprawa doktorska




**Opracowanie i charakterystyka elektrochemicznych
genoczujujących przeznaczonych do wykrywania wirusa
ptasiej grypy typu H5N1**

Kamila Dorota Malecka

*Praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Radeckiego
w Zakładzie Biosensorów Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej
Akademii Nauk i przedstawiona Radzie Wydziału Biologiczno-Chemicznego
Uniwersytetu
w Białymstoku*

Białystok 2016

Praca była realizowana w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie i współfinansowana w ramach:

-  *Programu Innowacyjna Gospodarka, nr WND-POIG.01.01.02-00-007/08,*
-  *Projektu 679 / N-BELGIA / 2010/0,*
-  *Projektu COST Action CM10005 "Supramolekularna Chemia w Wodzie"*



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

**UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO**



PODZIĘKOWANIA

Składam serdecznie podziękowania

Panu Profesorowi Jerzemu Radeckiemu

oraz

Pani Profesor Hannie Radeckiej

*za poświęcony czas oraz cenne wskazówki podczas wykonywania niniejszej
rozprawy*

*Koleżankom i Kolegom z Zakładu Biosensorów i Pracowni Bioelektroanalizy
Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie za pomoc,
wsparcie i atmosferę pracy*

STRESZCZENIE

Wykrywanie wirusów jest bardzo istotne w wielu dziedzinach, m.in. w ochronie zdrowia, procesach biotechnologicznych, produkcji żywności, monitoringu środowiska czy w ochronie roślin. Konwencjonalne metody, takie jak reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) bądź test immunoenzymatyczny (ELISA) często wymagają obróbki wstępnej analizowanej próby, wykwalifikowanego personelu, kosztownego sprzętu oraz drogich odczynników chemicznych. Nadal poszukiwane są szybkie, czułe, proste w zastosowaniu i stosunkowo tanie metody wykrywania patogenów w warunkach poza laboratoryjnych. W ostatnich latach obserwuje się wzrastające zainteresowanie bioczułnikami chemicznymi będącymi alternatywą dla dotychczas stosowanych metod oznaczania. Wysoka czułość i selektywność względem danego analitu oraz prostota wykonania szybkiej analizy to główne zalety, dzięki którym czujniki mogą zastąpić tradycyjne metody. Ponadto posiadają one duży potencjał miniaturyzacji, dzięki czemu oferują możliwość prowadzenia analiz środowiskowych (w miejscu poboru próbek) w niewielkich objętościach. Ze względu na rozwój produkcji masowej, mogą uzyskać stosunkowo niską cenę jednostkową.

Przedmiotem niniejszej rozprawy było opracowanie czułych genoczułników elektrochemicznych i zastosowanie ich do selektywnego wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1. Opracowano trzy bioczułniki DNA za pomocą których z powodzeniem udało się wykrywać sekwencje DNA i/lub RNA. Do tego celu zastosowano złote elektrody dyskowe. Przedstawione bioczułniki DNA oparte o warstwy Au/SH-ssDNA/6-MCH oraz Au/11-MUA+6-MCH/NH₂-ssDNA działały według mechanizmu jonokanałowego. Natomiast podstawą trzeciego była warstwa redoks-aktywna Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/NH₂-ssDNA. Czujniki typu kanału jonowego wymagały obecności zewnętrznego znacznika elektroaktywnego do obserwacji procesów hybrydyzacji. Z kolei bioczułnik posiadający warstwę redoks-aktywną posiadał centrum odpowiadające za generowanie sygnału analitycznego na powierzchni elektrody. Każdy z nich różnił się sposobem przyłączenia sondy DNA do powierzchni elektrody złotej. Sonda SH-ssDNA była bezpośrednio przymocowana do powierzchni elektrody złotej za pomocą wiązania kowalencyjnego złoto – siarka. Natomiast sondę NH₂-ssDNA unieruchamiano na dwa sposoby. W przypadku czujnika typu kanału jonowego za pośrednictwem grupy karboksylowej tiokwasu (11-MUA) poprzez wiązanie amidowe utworzone przy współdziałaniu

pochodnych karbodiimidowych (EDC/NHS). Z kolei na warstwie redoks-aktywnej sondę aminową osadzono za pomocą reakcji „click” tj. nukleofilowego otwarcia pierścienia epoksydowego.

Przeprowadzono szereg badań, w wyniku, których zoptymalizowano procedury modyfikacji powierzchni złotych elektrod roboczych, a także warunki procesów hybrydyzacji z poszczególnymi kwasami nukleinowymi. Do pomiarów zastosowano trzy techniki elektrochemiczne: woltamperometrię cykliczną, woltamperometrię fali prostokątnej oraz elektrochemiczną spektroskopię impedancyjną w układzie trójelektrodowym. Jako analitów użyto 20-merowych sekwencji DNA, ok. 180 pz sekwencji DNA (PCR), a także ok. 280-merowych transkryptów RNA. W zależności od długości testowanego analitu posiadały one 20-merowe sekwencje komplementarne lub niekomplementarne, a także 20-merowe sekwencje komplementarne w długim łańcuchu DNA czy RNA znajdujące się w różnych położeniach (na końcu 3', na końcu 5' lub na środku).

Podjęto również próbę miniaturyzacji najprostszego z zaproponowanych genoczuJNIKÓW opartego o warstwę Au/SH-ssDNA/6-MCH z zastosowaniem elektrod sitodrukowanych z pracującą elektrodą złotą. Za jego pomocą udało się wykryć m.in. niewymagające odwrotnej transkrypcji sekwencje RNA o długości około 280-mer, co może stanowić podstawę do aplikacji w warunkach poza laboratoryjnych.

Biorąc pod uwagę czułość i selektywność trzech przedstawionych genoczuJNIKÓW, można stwierdzić, że każdy z nich z powodzeniem nadaje się do wykrywania materiału genetycznego wirusa ptasiej grypy typu H5N1. Znaczący walor stanowi również możliwość wykrywania fragmentów komplementarnych do sondy ssDNA znajdujących się w ok. 180-pz łańcuchach DNA oraz ok. 280-merowych transkryptach RNA. Opracowane genoczuJNIKI umożliwiały również rozróżnienie położenia sekwencji komplementarnych znajdujących się w analizowanych oligonukleotydach. Na podstawie aktualnie przelazowanej literatury naukowej takie prace nie zostały dotychczas opublikowane.

Ponadto, w przeciwieństwie do często pojawiających się w literaturze naukowej, bioczuJNIKÓW zawierających znakowane oligonukleotydy DNA, zaproponowane w rozprawie uniwersalne systemy (jonokanałowy i z warstwą redoks-aktywną) nie wymagają skomplikowanych modyfikacji i znakowania sond DNA. Można je zastosować do unieruchamiania różnych sond DNA posiadających jedynie grupę tiolową bądź aminową na końcu 5'.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	4
WYKAZ SYMBOLI I SKRÓTÓW UŻYTYCH W ROZPRAWIE	10
WSTĘP	16
CEL PRACY	18
CZEŚĆ LITERATUROWA	19
1. BioczuJNIKI	20
1.1. Wprowadzenie.....	20
1.2. BioczuJNIKI oparte o kwasy nukleinowe.....	24
1.2.1. Budowa kwasów nukleinowych.....	24
1.2.2. Metody osadzania kwasów nukleinowych na podłożach stałych.....	27
1.2.2.1 Adsorpcja.....	29
1.2.2.2 Pułapkowanie w matrycy.....	31
1.2.2.3 Metody kowalencyjne.....	31
1.2.2.4 Powinowactwo awidyna/streptawidyna – biotyna.....	35
1.2.3. Sposoby generowania sygnału w bioczuJNIKACH elektrochemicznych opartych o kwasy nukleinowe.....	36
2. Metody wykrywania wirusów ptasiej grypy	44
2.1. Metody etiologiczne.....	46
2.2. Metody serologiczne.....	46
2.3. Metody molekularne.....	48
2.4. BioczuJNIKI przeznaczone do wykrywania wirusów ptasiej grypy.....	49
3. Rodzaje bioczuJNIKÓW elektrochemicznych zaprezentowanych w niniejszej rozprawie	53
3.1. Czujniki typu kanału jonowego.....	53
3.2. Czujniki oparte o warstwy redoks-aktywne.....	57
4. Charakterystyka technik pomiarowych stosowanych w niniejszej rozprawie	59
4.1. Układ pomiarowy.....	59
4.2. Woltamperometria cykliczna (z ang. <i>Cyclic Voltammetry</i> , CV).....	60
4.3. Woltamperometria fali prostokątnej (z ang. <i>Square Wave Voltammetry</i> , SWV).....	63
4.4. Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (z ang. <i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i> , EIS).....	65

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	68
5. Odczynniki i materiał biologiczny.....	69
5.1. Odczynniki.....	69
5.2. Materiał biologiczny.....	71
5.2.1. Sekwencje DNA.....	71
5.2.2. Sekwencje RNA.....	72
6. Aparatura.....	74
6.1. Potencjostat/galwanostat.....	74
6.2. Mikrobipotentjostat/galwanostat.....	74
7. Czujniki typu kanału jonowego przeznaczone do wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1.....	75
7.1. Przygotowanie elektrochemicznego genoczujujnika opartego o modyfikację elektrod złotych poprzez wiązanie kowalencyjne Au-S.....	75
7.1.1. Przygotowanie powierzchni dyskowych elektrod złotych.....	75
7.1.2. Modyfikacja dyskowych elektrod złotych.....	76
7.1.3. Przygotowanie powierzchni sitodrukowanych elektrod złotych.....	76
7.1.4. Modyfikacja elektrod sitodrukowanych.....	77
7.1.5. Oznaczanie kwasów nukleinowych za pomocą elektrod dyskowych.....	77
7.1.6. Oznaczanie kwasów nukleinowych przy pomocy elektrod sitodrukowanych.....	78
7.1.7. Procedury pomiarowe.....	78
7.1.7.1. Pomiary elektrochemiczne z zastosowaniem dyskowych elektrod złotych.....	78
7.1.7.2. Pomiary elektrochemiczne z zastosowaniem sitodrukowanych elektrod złotych.....	79
7.2. Przygotowanie elektrochemicznego genoczujujnika typu kanału jonowego opartego o modyfikację elektrod złotych za pomocą wiązania amidowego.....	79
7.2.1. Modyfikacja dyskowych elektrod złotych.....	79
7.2.2. Oznaczanie sekwencji DNA.....	80
7.2.3. Procedury pomiarowe.....	80
8. BioczuJNIK zawierający warstwę elektroaktywną przeznaczony do wykrywania specyficznych sekwencji DNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1.....	82
8.1. Konstrukcja warstwy elektroaktywnej AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/(Phen-Epoksy/EA krok po kroku na powierzchni elektrody złotej.....	82
8.1.1. Modyfikacja dyskowych elektrod złotych.....	82
8.1.2. Procedury pomiarowe.....	82
8.2. Konstrukcja elektrochemicznego genoczujujnika przeznaczonego do wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1	

z zastosowaniem warstwy redoks-aktywnej AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/NH ₂ -NC ₃	83
8.2.1. Modyfikacja dyskowych elektrod złotych	83
8.2.2. Oznaczanie kwasów nukleinowych z wykorzystaniem elektrod dyskowych	84
8.2.3. Procedury pomiarowe	84
WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA	85
9. Opracowanie elektrochemicznego genoczujujnika przeznaczonego do wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1 z zastosowaniem sondy z grupą tiolową –SH	86
9.1. Optymalizacja modyfikacji elektrod złotych i procesu hybrydyzacji	86
9.2. Optymalizacja zakresu stężeń analitu (20-merowych sekwencji DNA) za pomocą CV	89
9.3. Kontrola selektywności opracowanego genoczujujnika z zastosowaniem 20-merowych sekwencji DNA za pomocą SWV	94
9.4. Zależność położenia sekwencji komplementarnej względem sondy SH-NC ₃ - Sekwencje PCR1, PCR2, PCR3 oraz PCR4	96
9.5. Oznaczanie transkryptów RNA	100
9.6. Miniaturyzacja genoczujujnika na sitodrukowanych elektrodach złotych	102
9.6.1. Optymalizacja osadzania sondy DNA.....	102
9.6.2. Oznaczanie 20-merowych sekwencji DNA za pomocą techniki SWV.....	103
9.6.3. Oznaczanie ok. 280-merowych transkryptów RNA.....	104
10. Opracowanie elektrochemicznego genoczujujnika przeznaczonego do wykrywania specyficznych sekwencji DNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1 z zastosowaniem sondy osadzonej na elektrodzie złotej za pomocą wiązania amidowego	106
10.1. Charakterystyka poszczególnych etapów modyfikacji elektrod złotych.....	106
10.2. Oznaczanie 20-merowych sekwencji DNA za pomocą SWV	109
10.3. Oznaczanie 20-merowych sekwencji DNA za pomocą EIS	110
10.4. Oznaczanie produktów PCR za pomocą EIS	112
11. Opracowanie elektrochemicznego genoczujujnika przeznaczonego do wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1 z zastosowaniem kompleksu Fe (III) z Tris(5,6-epoksy – 5,6 – dihydro – [1,10] – fenantroliną)	114
11.1. Opracowanie warstwy elektroaktywnej zawierającej kompleks Fe(III) z Tris(5,6-epoksy – 5,6 – dihydro – [1,10] – fenantroliną).....	114

11.2. Potwierdzenie obecności centrum redoks-aktywnego na powierzchni elektrody złotej.....	116
11.3. Potwierdzenie osadzania sondy NH ₂ -NC ₃ na warstwie redoks-aktywnej Au/AET/Phen-Epoksy/ Fe(III)/Phen-Epoksy/	118
11.4. Oznaczanie sekwencji DNA	120
11.5. Oznaczanie transkryptów RNA.....	122
<i>PODSUMOWANIE</i>	125
Podsumowanie genoczuJNIKÓW typu kanału-jonowego	125
Podsumowanie genoczuJNIKA opartego o warstwę elektroaktywną AET/Phen-Epoksy/ Fe(III)/Phen-Epoksy	129
<i>WNIOSKI</i>	133
<i>SPIS ILUSTRACJI</i>	137
<i>SPIS TABEL</i>	142
<i>WYKAZ PUBLIKACJI I KONFERENCJI NAUKOWYCH</i>	143
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	146

WYKAZ SYMBOLI I SKRÓTÓW UŻYTYCH W ROZPRAWIE

SKRÓT	PEŁNA NAZWA
11-HUD	11-hydroksy-1-undekanetiol
11-MUA	kwask 11-merkaptoundekanowy
6-MCH	6-merkaptohexsan-1-ol
A_e	powierzchnia elektrody
A	adenina
ACV	woltamperometria prądu przemiennego
AET	aminoetanotiol
AG	aldehyd glutarowy
AGID	immunodyfuzja na żelu agarowym
AIV	wirus ptasiej grypy (z ang. <i>avian influenza virus</i>)
AI	ptasia grypa
AN	acetonitryl
AQ-PNA	peptydowy kwas nukleinowy znakowany antrachinonem
AuNPs	nanocząsteczki złota
BRCA1	gen nowotworu piersi
BZT	biochemiczne zapotrzebowania tlenu
C	cytozyna
Ck	cukier
C^0	stężenie depolaryzatora w głębi roztworu
C_{dl}	pojemność warstwy podwójnej
CdSe	nanostruktury selenku kadmu (z ang. cadmium selenide nanostructure)
Ch	chitozan
CMOS	komplementarny półprzewodzący tlenek metalu (z ang. complementary metal oxide semiconductor)
c-NC3	sekwencja komplementarna do sondy NC3
CNT	nanorurki węglowe

[Co(bpy) ₃] ³⁺	tri(2,2'-bipirydył) kobaltu
CoPor	porfiryra z kobaltem
CoPc	ftalocyjanina kobaltu
Co(Phen) ₃ ³⁺	nadchloran tris(1,10-fenantrolina) kobaltu (III)
CP	sonda chwytająca (z ang. <i>capture probe</i>)
CV	woltamperometria cykliczna
D	współczynnik dyfuzji
D-AgNP	nanocząstki srebra znakowane doksorubicyną
DEZ	dyskowe elektrody złote
DPV	woltamperometria pulsowa różnicowa
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
DPM	dipirometen
dsDNA	podwójna nić DNA (z ang. <i>double stranded DNA</i>)
E ₀	potencjał piku dla czujnika w roztworze podstawowym bez dodatku analitów
EDC	chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu
EDTA	kwask etylenodiaminotetraoctowy
EIS	elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna
ELISA	test immunoenzymatyczny
E _n	potencjał piku dla danej próbki
E _{PA}	potencjał piku anodowego
E _{PK}	potencjał piku katodowego
eSPR	elektrochemiczny powierzchniowy rezonans plazmonów
ETA	etanoloamina
E _{SW}	amplituda fali prostokątnej
F	stała Faradaya
Fc	ferrocen
G	guanina
G4-PDR	poliamidoaminowy dendrymer czwartej generacji

GCE	elektroda z węgla szklanego (z ang. glassy carbon electrode)
Gr-VS2	mieszanka grafenu-disiarczku wanadu
GW	granica wykrywalności (z ang. limit of detection)
HA	hemaglutynina
HBV	wirus zapalenia wątroby typu B
His ₆ -Qinghai	histagowane odmiany (warianty) rekombinowanej hemaglutyniny
HIT	test zahamowania hemaglutynacji
HPAI	wysokopatogenna ptasia grypa (z ang. <i>highly pathogenic avian influenza</i>)
HPV	wirus brodawczaka
I	natężenie prądu piku
I ₀	natężenie prądu piku dla czujnika w roztworze podstawowym bez dodatku analitu
I _c	prąd ładowania pojemności warstwy podwójnej
I _f	prąd faradajowski
I _n	natężenie prądu piku dla danej próbki
I _p	natężenie prądu
I _{PA}	prąd piku anodowego
I _{PK}	prąd piku katodowego
ITO	elektroda z tlenku indu domieszkowanego cynkiem
IUPAC	Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (z ang. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
k	stała charakteryzująca układ elektrod
KN	kwasy nukleinowe
LPAI	niskopatogenna ptasia grypa (z ang. <i>low pathogenic avian influenza</i>)
MB	błękit metylenowy (z ang. <i>methylene blue</i>)
MCB	merkaptobutanol
MES	kwas 2-morfolinoetanosulfonowy
MP	mykoplazmatyczne zapalenie płuc

MPA	kwask merkaptopropionowy
mRT-PCR	multipleksowa reakcja polimerazy łańcuchowej z odwrotną transkryptazą
MWCNTs	wiełoszczenne nanorurki węglowe (z ang. <i>multi-walled carbon nanotubes</i>)
n	liczba elektronów biorących udział w reakcji elektrodowej
NA	neuraminidaza
NASBA	amplifikacja sekwencji kwasów nukleinowych
nc-NC3	sekwencja niekomplementarna do sondy NC3
NH ₂ -NC3	sonda DNA z grupą aminową
NHS	imid kwasu N-hydroksybursztynowego
NIT	test zahamowania neuraminidazy
nt	nukleotyd
NT	test neutralizacji
OIE	Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt
OWD	odczyn wiązania dopełniacza
Ox	utleniacz
P	reszta kwasu fosforowego (V)
PAMAM	dendrymery poliamidoaminowe
PBS	fizjologiczny bufor fosforanowy
PCR	reakcja polimerazy łańcuchowej (z ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	glikol polietylenowy
p-ELISA	peptydowy test immunoenzymatyczny
PGE	ołówkowa elektroda grafitowa
Phen-Epoksy	5,6-epoksy-5,6-dihydro-1,10-fenantrolina
PPNWs	nanodruły polipirolowe
PPV	wirus ospowatości śliwy (z ang. Plum Pox Virus)
pz	para zasad
Q	ilość ładunku
R	stała gazowa

R_0	opór przeniesienia elektronu dla czujnika w roztworze podstawowym bez dodatku analitów
Red	reduktor
R_{et}	opór przeniesienia elektronu
rGO-GDLE	zredukowany tlenek grafenu
R_i	opór przeniesienia elektronu dla danej próbki
RNA	kwasy rybonukleinowe
RT_m	temperatura pokojowa (z ang. <i>room temperature</i>)
RT-PCR	reakcja polimerazy łańcuchowej z odwrotną transkryptazą
RRT-PCR	reakcja polimerazy łańcuchowej z odwrotną transkryptazą w czasie rzeczywistym
R_Q	opór roztworu
S	nachylenie krzywej kalibracyjnej
SAMs	samoorganizujące się monowarstwy (ang. <i>self-assembled monolayers</i>)
scFV	pojedynczy łańcuch zmiennego fragmentu przeciwciał (z ang. <i>single chain variable fragments of antibodies</i>)
SEZ	sitodrukowane elektrody złote
SH-NC3	sonda z grupą tiolową
ssDNA	pojedyncza nić dna (z ang. <i>single stranded DNA</i>)
SSC	bufor cytrynianowy (z ang. <i>saline sodium citrate</i>)
SWV	woltamperometria fali prostokątnej
T	tymina
TFA	kwasy trifluorooctowe
T_m	temperatura
TRIS	2-amino-2-hydroksymetylopropan -1,3-diol
U	uracyl
VFDF	anatoksyna-a (z ang. <i>Very Fast Death Factor</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (z ang. <i>World Health Organization</i>)

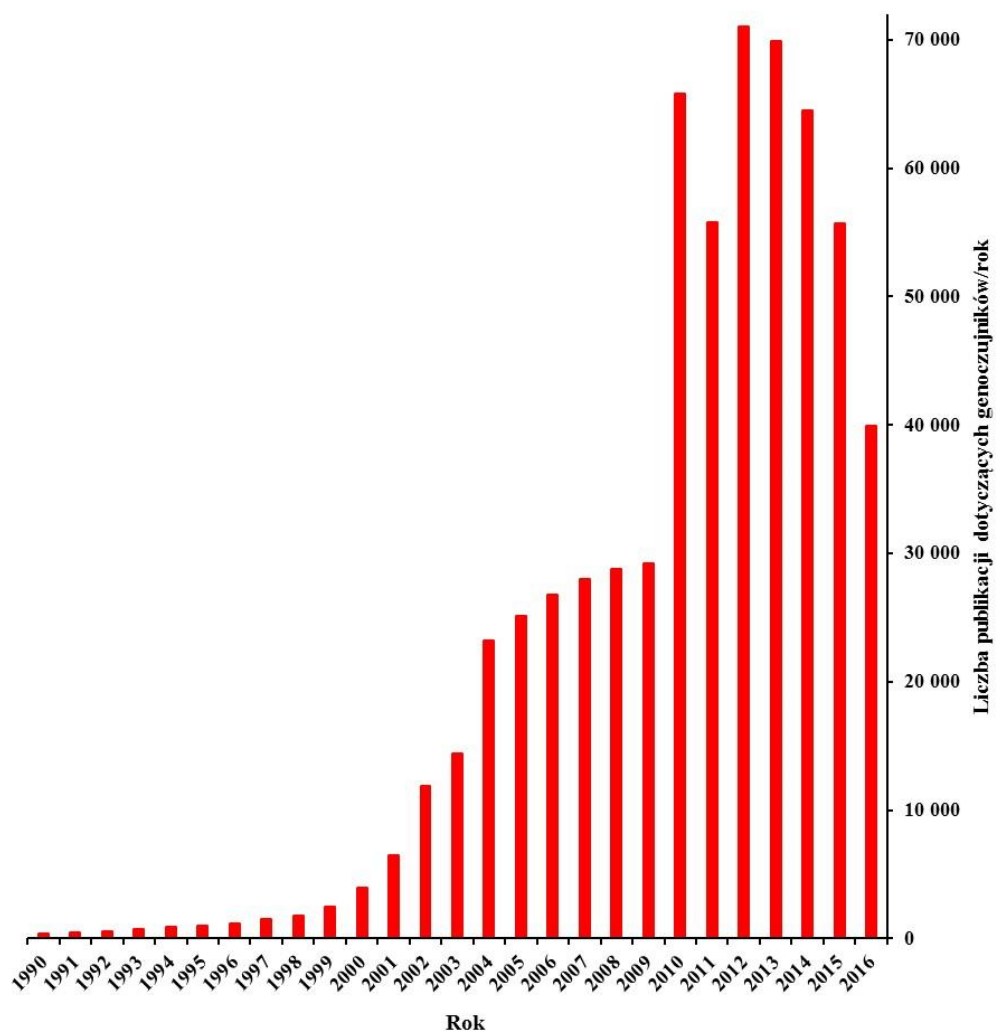
XPS	rentgenowska spektrometria fotoelektronów (z ang. <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>)
Z''	urojona składowa impedancji
Z'	rzeczywista składowa impedancji
ZA	zasada azotowa
Z_w	element Warburga
α	współczynnik przeniesienia elektronu
Γ	stopień pokrycia powierzchni elektrody
ΔE	różnica potencjałów
ΔE_i	amplituda impulsów
ΔI	względne natężenie prądu piku
v	szybkość zmian potencjału
σ	odchylenie standardowe odpowiedzi czujnika

WSTĘP

Wirus ptasiej grypy (AIV, z ang. *Avian Influenza Virus*), może rozprzestrzeniać się wśród dzikiego i domowego ptactwa, powodować epidemie, a nawet pandemie, a także stanowić zagrożenie dla ssaków, w tym ludzi. Forma wysokopatogenna (HPAI) typu H5N1 stała się w dzisiejszych czasach bardzo niebezpiecznym, zagrażającym nie tylko dla drobiu patogenem (Neumann i wsp., 2010). Mimo, że H5N1 jest wirusem grypy ptaków i zwykle nie rozprzestrzenia się wśród ludzi, od 2003 roku do czerwca 2016 odnotowano i potwierdzono 851 zakażeń ludzi typem H5N1 w 16 krajach. Około 60% z nich zakończyło się zgonem (WHO, 2016). Gdyby człowiek chory na grypę sezonową zaraził się ptasią grypą, wówczas istnieje prawdopodobieństwo zmutowania się materiałów genetycznych obu wirusów, a w konsekwencji może wiązać się to z nabyciem zdolności wirusa H5N1 do przenoszenia się z człowieka na człowieka. Łatwo przeniesione między ludźmi szczepy H5N1 mogą mieć katastrofalne skutki. W związku z powyższym istnieje zapotrzebowanie na czułe, szybkie i tanie testy do diagnozowania AIV, które pozwoliłyby jednocześnie na wczesne terapie przeciwwirusowe. Kryteria te spełniają bioczuJNIKI elektrochemiczne. Atrakcyjność ich stosowania wynika głównie z ich wysokiej czułości i selektywności względem badanego analitu. Dzięki tym właściwościom pozwalają one w sposób prosty i szybki oznaczyć interesujący składnik nawet w złożonej mieszaninie. Opracowywanie nowoczesnych bioczuJNIKÓW jest bardzo interesującym zagadnieniem zarówno, jeżeli chodzi o badania podstawowe, jak i aplikacyjne. Stanowią one doskonałą alternatywę dla obecnie stosowanych tradycyjnych technik, takich jak test immunoenzymatyczny (ELISA) czy reakcja polimerazy łańcuchowej (PCR) (Wang i wsp., 2009). Charakteryzują się prostą konstrukcją i niskim kosztem produkcji, a także szybką detekcją. Możliwe jest również ich zminiaturyzowanie.

Opracowywanie nowych technologii bioczuJNIKÓW to dynamiczna dziedzina badań. Świadczy o tym sukcesywnie wzrastająca liczba publikacji naukowych dotyczących bioczuJNIKÓW DNA – Rysunek 1. W ostatnich latach w wielu ośrodkach naukowych na świecie prowadzone są intensywne badania nad zastosowaniem bioczuJNIKÓW w analizie żywności, kryminalistyce, ale także w diagnostyce klinicznej czy środowiskowej, np. do wykrywania wirusów i innych patogenów, zarówno

roślinnych, jaski i zwierzęcych (Ahmed i wsp., 2008; Pedrero i wsp., 2012; Tam i wsp., 2009a; Civit i wsp., 2010; Cagnin i wsp., 2009).



Rysunek 1. Liczba publikacji dotyczących genocujników w bazie Web of Knowledge w latach 1990-2016.

CEL PRACY

Przedmiotem badań niniejszej rozprawy doktorskiej jest opracowanie i zastosowanie następujących elektrochemicznych genoczuJNIKÓW do wykrywania specyficznych sekwencji oligonukleotydów wirusa ptasiej grypy typu H5N1:

✚ BioczuJNIKA zawierającego sondę DNA zmodyfikowaną grupą tiolową unieruchomioną na powierzchni dyskowej elektrody złotej oraz na elektrodzie sitodrukowanej (miniaturyzacja układu) działającego w oparciu o mechanizm jonokanałowy

✚ BioczuJNIKA zawierającego sondę DNA zmodyfikowaną grupą aminową unieruchomioną na powierzchni dyskowej elektrody złotej działającego w oparciu o mechanizm jonokanałowy

✚ BioczuJNIKA posiadającego jako centrum redoks-aktywne kompleksy żelaza (III) z pochodną fenantroliny budowane na powierzchni dyskowej elektrody złotej

CZEŚĆ LITERATUROWA

Co my wiemy, to tylko kropelka.

Czego nie wiemy, to cały ocean.

-Isaac Newton

1. Bioczujniki

1.1. Wprowadzenie

Zgodnie z nomenklaturą Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) czujnik chemiczny to urządzenie przekształcające informację chemiczną na sygnał analitycznie użyteczny. Informacja chemiczna, o których mowa powyżej, może pochodzić z reakcji chemicznej element rozpoznający – analit lub właściwości fizycznych badanego układu (Hulanicki i wsp., 1991). Podstawę działania czujników chemicznych stanowią oddziaływania międzycząsteczkowe, które posiadają charakter niekowalencyjny (takie jak: siły elektrostatyczne, wiązania wodorowe, siły van der Wasala) i zachodzą na granicy dwóch faz (warstwa analitycznie aktywna/roztwór badany). Oddziaływania te stanowią domenę chemii supramolekularnej, za której rozwój Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn i Charles Pedersen otrzymali nagrodę Nobla w 1987 roku (Cram, 1992; Lehn, 1992; Pedersen, 1992).

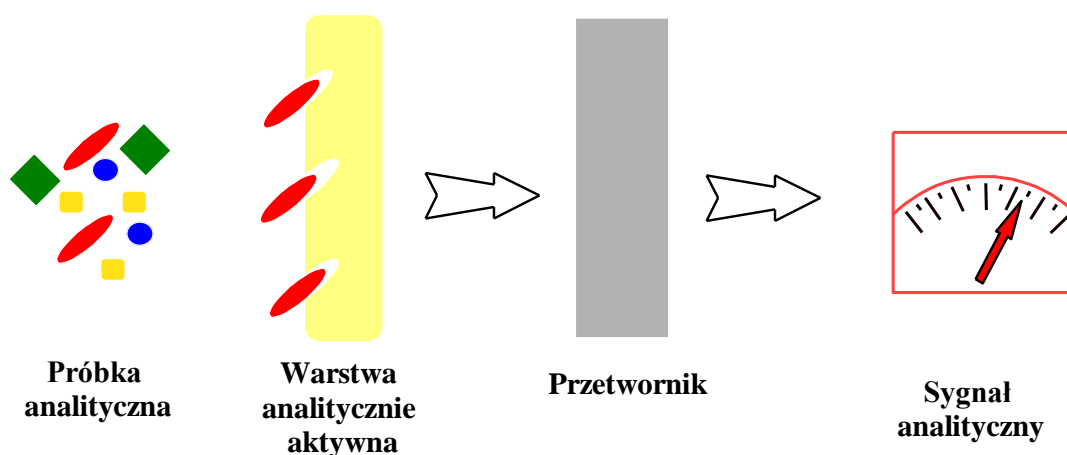
Czujnik składa się z dwóch podstawowych komponentów:

- ✚ **warstwy analitycznie aktywnej**, gdzie następuje proces rozpoznania międzycząsteczkowego – utworzenie kompleksu gospodarz-gość (element rozpoznający –analit), w trakcie którego informacja chemiczna o próbce jest przekształcana w formę energii;
- ✚ **elementu przetwornikowego**, dzięki któremu sygnał otrzymany w warstwie analitycznie aktywnej zostaje zamieniony na mierzalny parametr analityczny, tzn. nadający się do obróbki

W zależności od natury zastosowanego materiału analitycznie aktywnego czujniki można zakwalifikować do dwóch grup:

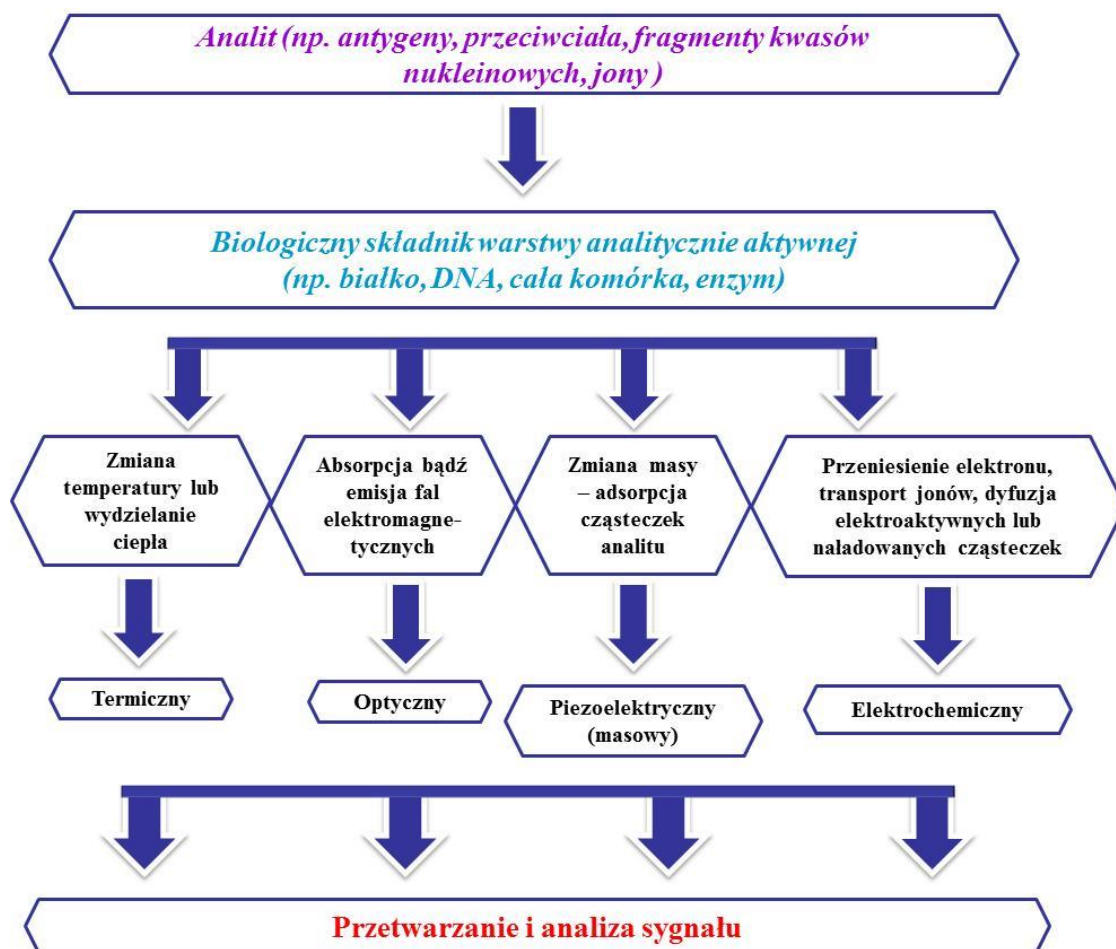
- ✚ **czujniki chemiczne** – materiałem analitycznie aktywnym w tej grupie są syntetyczne cząsteczki zdolne do selektywnego rozpoznania cząsteczek analitu.
- ✚ **bioczujniki** – należą do grupy czujników, w których elementami rozpoznania międzycząsteczkowego w warstwie aktywnej są cząsteczki stanowiące materiał biologiczny, np. DNA, białka, enzymy, przeciwciała lub całe komórki, unieruchomione na odpowiednim nośniku.

Schematycznie konstrukcję czujnika chemicznego przedstawiono na *Rysunku 2*.



Rysunek 2. Schemat budowy czujnika chemicznego.

Klasyfikacja bioczujników bazuje na dwóch charakterystycznych parametrach ich konstrukcji: systemie biodetekcji oraz typie elementu przetwornikowego. Pierwsze kryterium opiera się na specyficznych reakcjach element rozpoznający – analit, np. przeciwciało-antygen, enzym-substrat oraz oddziaływaniach kwasów nukleinowych. Natomiast ze względu na zasadę działania przetwornika można dokonać podziału (Chambers i wsp., 2008) na: optyczne (Galyanin i wsp., 2015; Paliwal i wsp., 2015; Patista i wsp., 2015), elektrochemiczne (Cagnin i wsp., 2009; Mc Caffrey i wsp., 2015; Liu i wsp., 2015), masowe (Stoytcheva i wsp., 2013; Gültekin i wsp., 2014; Sánchez-Fraga i wsp., 2014), akustyczne (Jo i wsp., 2013; An i Chen, 2015; François i wsp., 2015) i termiczne (Reyes-Romero i wsp., 2014; Weber i wsp., 2014, Salek i wsp., 2015). Drogę prowadzącą do otrzymania sygnału analitycznego schematycznie zaprezentowano na *Rysunku 3*.



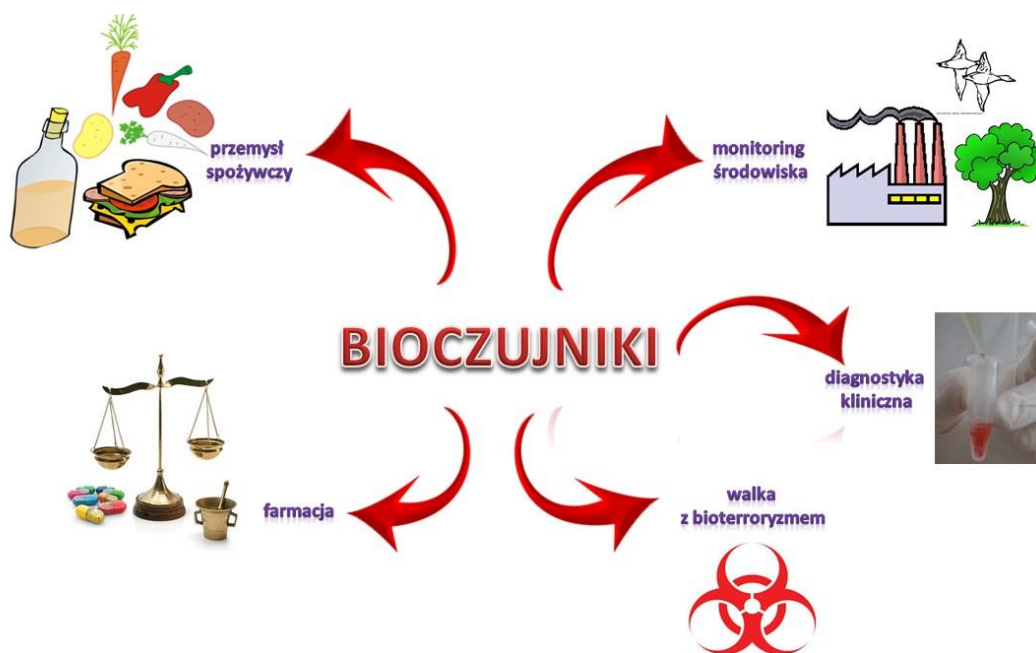
Rysunek 3. Przebieg procesów prowadzących do otrzymania sygnału analitycznych z udziałem różnych przetworników i technik pomiarowych.

O praktycznej przydatności każdego czujnika analitycznego decyduje granica wykrywalności, selektywność, powtarzalność wyników oraz czas detekcji. Większość tych parametrów zależy od warstwy analitycznie aktywnej danego czujnika (Radecki i wsp., 2006).

Bioczujniki pozwalają na wykrywanie białek (Das i Kelley, 2011), DNA (Tosar i wsp., 2010), identyfikację szeregu metabolitów (Karim i Fakhrudin, 2012), wirusów (Altintas i wsp., 2015) czy bakterii (Dong i Zhao, 2015; Webster i wsp., 2015), a także skażeń chemicznych – np. toksyn (Sharma i Mutharasan, 2013). Stosuje się je m.in. do określania zawartości metali ciężkich, pestycydów, związków azotowych i fosforowych, lotnych substancji organicznych, patogenów, substancji rakotwórczych i toksycznych (pestycydów, mykotoksyn, antybiotyków), biochemicznego zapotrzebowania tlenu (BZT) w powietrzu, wodzie czy glebie (Bahadır i Sezgintürk,

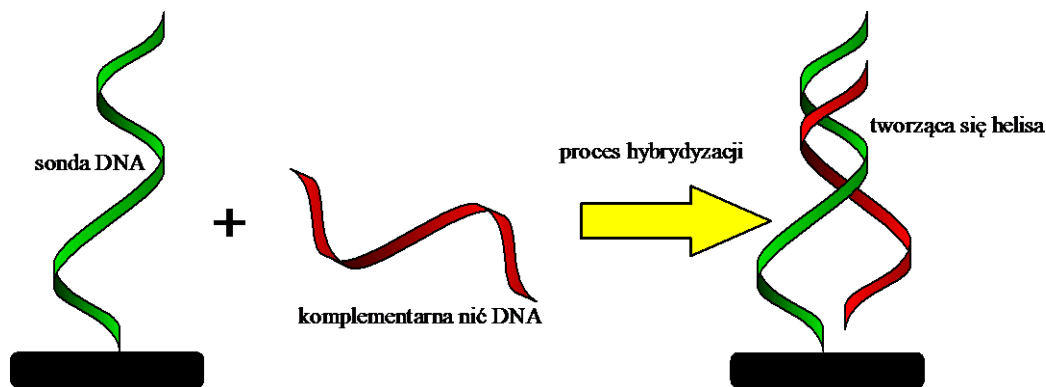
2015). BioczuJNIKI wykorzystuje się również do kontroli żywności m.in. do identyfikacji organizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO) (Radecki i wsp., 2006; Manzanares-Palenzuela i wsp., 2015; Tam, 2015). Ponadto umożliwiają one detekcję śladowych ilości materiałów wybuchowych stosowanych w terroryzmie (Sun i wsp., 2015).

Schematycznie przykładowe zastosowania bioczuJNIKÓW przedstawiono na *Rysunku 4*.



Rysunek 4. Przykładowe zastosowania bioczuJNIKÓW (opracowano na podstawie <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/Biosensory/>).

W przypadku bioczuJNIKÓW DNA proces rozpoznania międzycząsteczkowego odpowiedzialny za wytwarzanie sygnału analitycznego, realizowany jest przez proces hybrydyzacji zachodzącej między pojedynczą nicią DNA (sondą, ssDNA) osadzoną na powierzchni elektrody a komplementarną sekwencją DNA lub RNA znajdującą się w roztworze badanej próby (analitem) – Rysunek 5. Jednym z najczęściej stosowanych przetworników w przypadku genoczuJNIKÓW jest przetwornik elektrochemiczny (Gooding, 2002; Kerman i wsp. 2004; Liu i wsp., 2005a; Rivas i wsp., 2005; Degefa i Kwak, 2008; Kukul i wsp., 2008; Park i Park, 2009; Zhu i wsp., 2009a; Yu i wsp., 2014; Fernandes i wsp., 2015, Torkashvand i wsp., 2015).



Rysunek 5. Schemat budowy bioczuJNIka opartego o DNA.

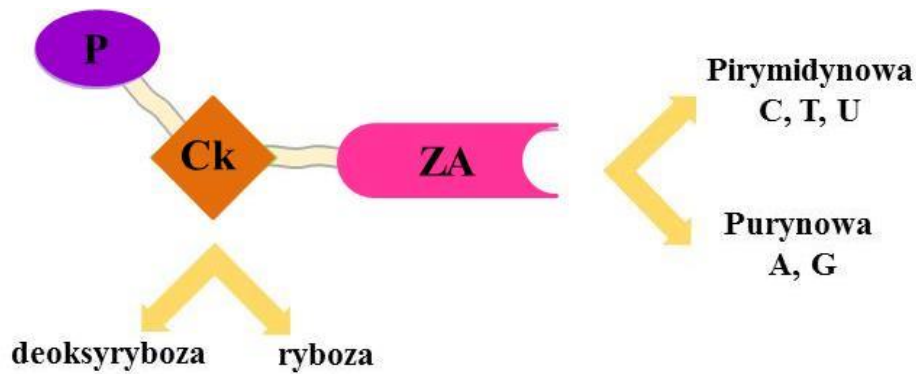
1.2. BioczuJNIki oparte o kwasy nukleinowe

1.2.1. Budowa kwasów nukleinowych

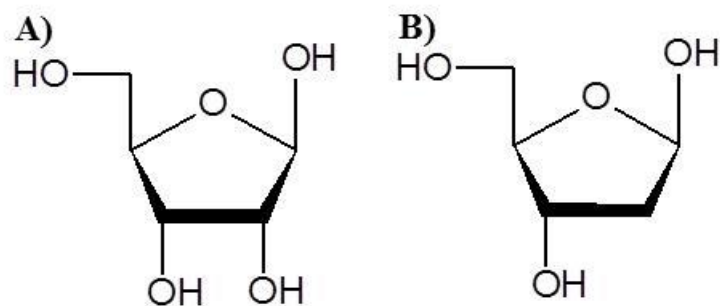
Kwasy nukleinowe (KN) są niezwykle przydatne w konstrukcji bioczuJNIków ze względu na ich silne właściwości rozpoznające (Paleček, 2002; Paleček i Bartošik, 2012). W ostatnich latach nastąpiło duże zainteresowanie wykorzystaniem kwasów nukleinowych, jako narzędzia w biodetekcji (Berney i wsp., 2000; Vercoutere i wsp., 2002; Sassolas i wsp., 2008).

Kwasy nukleinowe to związki wielkocząsteczkowe. We wszystkich komórkach organizmów występują dwa rodzaje kwasów nukleinowych: kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) oraz kwas rybonukleinowy (RNA). Każdy z nich zbudowany jest z trzech składników (Rysunek 6):

- ✚ cyklicznego pięciowęglowego cukru prostego (Ck) – pentozy, w przypadku DNA jest to deoksyryboza, a RNA ryboza (Rysunek 7)
- ✚ jednej, dwóch lub trzech reszt kwasu fosforowego (V) (P),
- ✚ heterocyklicznej zasady azotowej (ZA), będącej pochodną puryny – adenina (A), guanina (G) lub pirymidyny – cytozyna (C), tymina (T), uracyl (U)

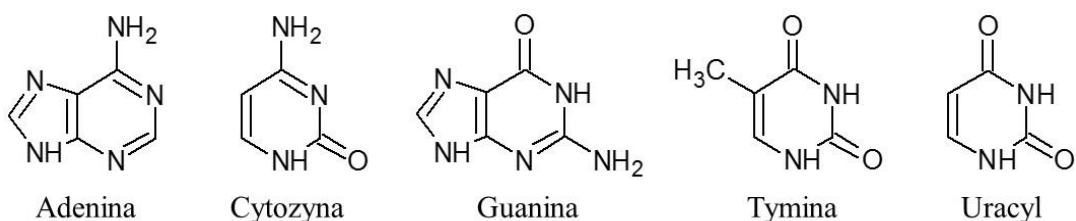


Rysunek 6. Budowa nukleotydu.



Rysunek 7. Cukry wchodzące w skład A) RNA – ryboza oraz B) DNA – deoksyryboza.

Zasady azotowe stanowiące składniki kwasów nukleinowych zawierają w swojej strukturze heterocykliczne pierścienie aromatyczne z różnymi podstawnikami – *Rysunek 8*. Są one kowalencyjnie połączone z pierścieniem cukru – pentozą tworząc nukleozydy. Natomiast nukleozydy związane kowalencyjnie z jedną lub więcej grup fosforanowych noszą nazwę nukleotydów i stanowią jednostki monomeryczne tworzące DNA lub RNA. Polimerowe cząsteczki kwasów nukleinowych posiadają ładunek ujemny pochodzący od reszt fosforanowych.

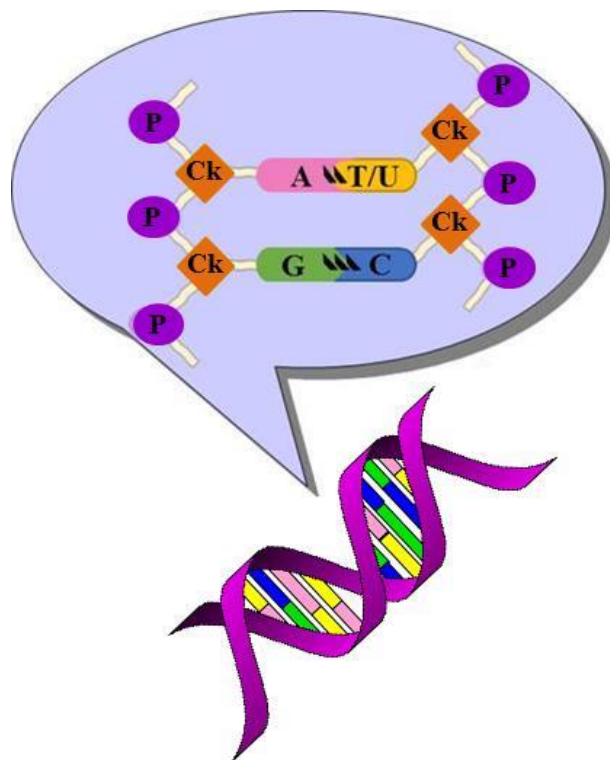


Rysunek 8. Wzory strukturalne zasad nukleinowych tworzących nukleotydy.

Przestrzenny model cząsteczki DNA został opracowany w 1953 roku przez Jamesa Watsona i Francisca Cricka. Zgodnie z nim cząsteczkę DNA tworzą dwie nici polinukleotydowe skręcone wokół wspólnej osi w kształt podwójnej helisy prawoskrętnej, w której zasady azotowe skierowane są do wnętrza, a łańcuch cukrowo-fosforanowy znajduje się na zewnątrz powstałej w ten sposób struktury przestrzennej (Stryer, 2003). W łańcuchu DNA cząsteczki cukru ułożone są na przemian z resztami kwasu fosforowego (V), który łączy ze sobą dwa różne atomy węgla kolejnych cząsteczek cukru oznaczonych jako 5' i 3'. Nici DNA w helisie biegną w przeciwnych kierunkach (są antyrównoległe), co oznacza, że naprzeciwko siebie leżą dwa różne końce – koniec 5' jednej nici i koniec 3' drugiej nici. Jeden skręt helisy zawiera 10 par nukleotydów (Turner i wsp., 2013; Allison, 2009).

Pod względem budowy RNA różni się od DNA dwoma elementami. Po pierwsze, cukrem w przypadku RNA jest ryboza, która zawiera grupę 2'-hydroksylową (grupa ta nie występuje w DNA) (*Rysunek 7A*). Po drugie, jedną z zasad azotowych budujących RNA jest uracyl (nie występuje w DNA) (*Rysunek 8*). RNA jest również mniej odporny na działanie nukleaz (Stryer, 2003).

Utrzymanie stałej odległości pomiędzy dwiema nićmi w helisie DNA lub DNA/RNA jest możliwe dzięki oddziaływaniom pomiędzy zasadami azotowymi, które łączą się ze sobą zgodnie z zasadą komplementarności. Według niej wiązania wodorowe powstają w przypadku helisy DNA-DNA pomiędzy A, a T oraz G i C. A łączy się z T dwoma wiązaniami wodorowymi, natomiast C z G trzema wiązaniami. Pojedyncze nici RNA i DNA o komplementarnych sekwencjach mogą utworzyć podwójną helisę RNA-DNA. Wówczas uracyle pochodzące z RNA łączą się z adeninami DNA, zaś adeniny RNA z tyminami DNA (*Rysunek 9*).



Rysunek 9. Fragment podwójnej nici DNA/RNA.

1.2.2. Metody osadzania kwasów nukleinowych na podłożach stałych

Wybór metody osadzania sondy na powierzchni elektrody ma kluczowe znaczenie dla czułości i selektywności konstruowanego genoczujujnika. Generalnie metoda ta powinna zapewnić:

- ✚ precyzyjną kontrolę gęstości upakowania i przestrzennej orientacji poszczególnych sond DNA w osadzonej warstwie, aby nitki wzajemnie na siebie nie oddziaływały i nie blokowały dostępu analitu, nie straciły swojej aktywności biologicznej – zapewnienie możliwie najbardziej wydajnego przebiegu procesu hybrydyzacji (warstwa zbyt upakowana utrudnia ten proces ze względu na możliwość oddziaływania sond DNA między sobą, blokując do nich dostęp dla analitu, natomiast warstwa zbyt luźna zwiększa prawdopodobieństwo niespecyficznego adsorpcji na powierzchni elektrody, adsorpcja taka jest źródłem wysokiego prądu tła);
- ✚ utworzenie stabilnej warstwy analitycznie aktywnej w warunkach prowadzenia eksperymentu;
- ✚ powtarzalność i łatwość procedury osadzania (de-los-Santos-Álvarez i wsp., 2004; Radecki i wsp., 2006)

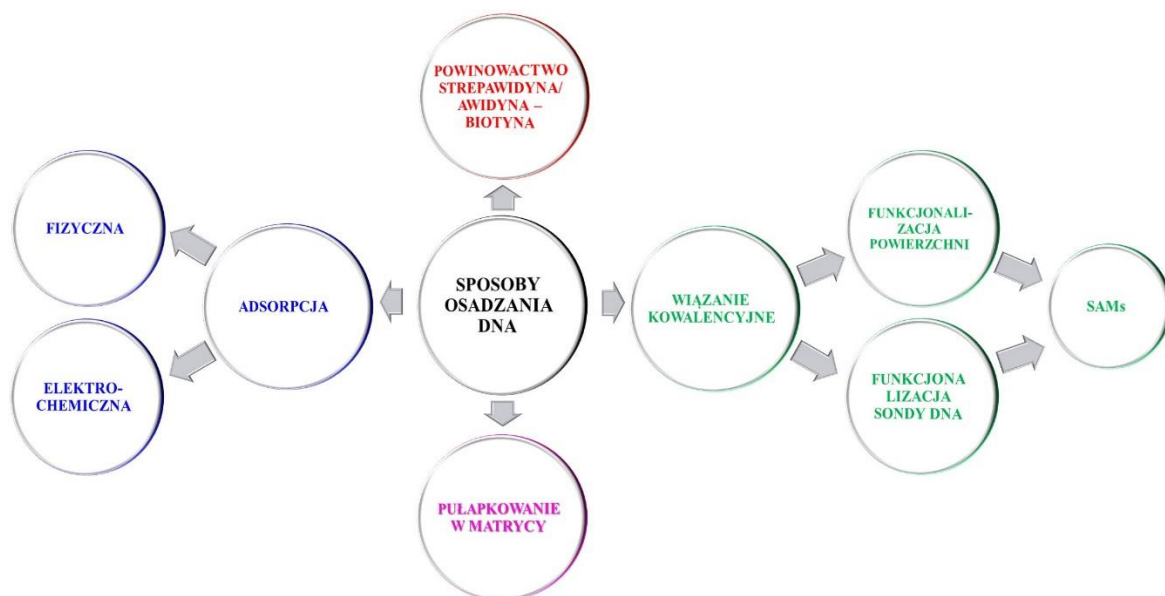
Osadzanie kwasu deoksyrybonukleinowego może być realizowane przez oddziaływanie niekowalencyjne lub tworzenie wiązań kowalencyjnych (Paleček i Jelen, 2005). Pewne sposoby osadzania zapewniają bezpośrednią styczność cząsteczek kwasu z powierzchnią przetwornika, a w przypadku innych w kontakcie tym pośredniczą dodatkowe ugrupowania chemiczne.

Obecnie w literaturze sposoby osadzania sond ssDNA na elektrodach są niezwykle zróżnicowane i nieustannie pojawiają się nowe procedury wykorzystujące coraz bardziej złożone układy. Do najczęściej opisywanych należą metody schematycznie przedstawione na *Rysunku 10A* (Pividori i wsp., 2000; D'Souza, 2001; Wang, 2002a; Wang, 2002b; Paleček i Jelen, 2005; Di Giusto i King, 2006; Paleček i Bartošik, 2012):

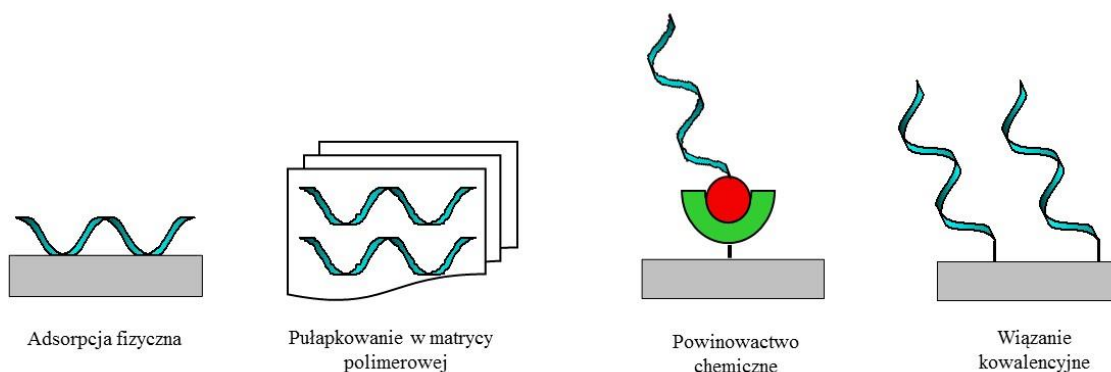
- ✚ Adsorpcja fizyczna i adsorpcja przy określonym potencjale
- ✚ Enkapsulacja (unieruchomienie w warstwie polimerowej)
- ✚ Wiązanie poprzez powinowactwo awidyny i biotyny,
- ✚ Wiązanie kowalencyjne - unieruchomienie z wykorzystaniem powinowactwa grup tiolowych do złota lub z wytworzeniem wiązania amidowego (poprzez tworzenie samoorganizujących się warstw tiolowych)

Najbardziej popularne sposoby osadzania DNA na powierzchniach elektrod stałych przedstawiono schematycznie na *Rysunku 10B*.

A)



B)



Rysunek 10. A) Sposoby osadzania DNA na powierzchniach stałych. B) Najczęściej wykorzystywane techniki osadzania kwasów nukleinowych (Li i Lu, 2009).

1.2.2.1 Adsorpcja

Adsorpcja fizyczna jest najprostszym sposobem osadzania kwasów nukleinowych. Stosuje się ją w przypadku, np. pastowych elektrod węglowych, elektrod grafitowych, z węgla szklanego, a sporadycznie również ITO (z tlenku indu domieszkowanego cynkiem), rtęciowych, czy złotych (Pividori i wsp., 2000; Fojta, 2002; de-los-Santos-Álvarez i wsp., 2004; Gherghi i wsp., 2004; Paleček i Jelen, 2005; Wang i wsp., 2006; Pedano i Rivas, 2010). KN adsorbują się w sposób trwały i nieodwracalny. Bioczułnik tego typu przygotowuje się poprzez nakroplenie

na powierzchnię elektrody roboczej roztworu DNA i pozostawienie go do wyschnięcia. Skutkuje to utworzeniem cienkiej warstwy analitycznie aktywnej o przypadkowym i nieuporządkowanym ułożeniu poszczególnych łańcuchów DNA. W przypadku tworzenia warstw analitycznie aktywnych przeznaczonych do konstrukcji bioczuJNIKÓW metoda osadzania kwasów nukleinowych na drodze adsorpcji nie spełnia oczekiwanej roli. DNA adsorbując się na powierzchniach elektrod może łączyć się z nią wielopunktowo, co znacznie ogranicza zmiany struktury przestrzennej nici DNA następujące w wyniku oddziaływań np. hybrydyzacji DNA (Moser i wsp., 1997; Geng i wsp., 2009; Li i Lu, 2009; Wu i wsp., 2011).

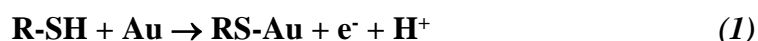
Na powierzchni elektrod węglowych można również osadzać KN poprzez adsorpcję elektrochemiczną (przy stałym potencjale) (Pividori i wsp., 2000). Ze względu na hydrofilową powierzchnię węgla (otrzymaną na przykład przez jej utlenienie) KN adsorbują się za pośrednictwem szkieletu fosforanowego, pozostawiając zasady dostępne do hybrydyzacji. Naładowana dodatnio elektroda węglowa przyciąga elektrostatycznie ujemnie naładowany szkielet, co powoduje, że adsorpcja jest jeszcze silniejsza (Paleček i Bartošik, 2012). Adsorpcję elektrochemiczną ssDNA przeprowadza się w ciągle mieszanym roztworze przy dodatnim potencjale +0.2 V lub +0.5 V względem elektrody odniesienia. Utrzymuje się go przez określony czas, który zależy od stężenia oligonukleotydu (około 2-5 minut) (Marrazza i wsp., 1999; Pedano i Rivas, 2005; Bagni i wsp., 2006; Szpakowska i wsp., 2006). Potencjał ten zwiększa stabilność sond, oddziałujących elektrostatycznie pomiędzy dodatnio naładowaną powierzchnią węgla a ujemnie naładowanym hydrofilowym szkieletem cukrowo-fosforanowym. Wówczas zasady azotowe zorientowane są w kierunku roztworu i gotowe do hybrydyzacji z analitem. Warunkiem zajścia efektywnej adsorpcji oligonukleotydów na powierzchni elektrody jest odpowiednio wysokie napięcie. Jednocześnie nie może przekraczać pewnych wartości, by nie spowodować utlenienia zasad azotowych. DNA adsorbuje się na powierzchni elektrody węglowej dzięki jej niejednorodnej i rozwiniętej powierzchni, a ułożenie łańcuchów podobnie jak w przypadku adsorpcji fizycznej nie jest uporządkowane (Pividori i wsp., 2000). Przesunięcie w kierunku potencjałów bardziej ujemnych powoduje desorpcję DNA spowodowaną elektrostatycznym odpychaniem (Paleček i Bartošik, 2012).

1.2.2.2 Pułapkowanie w matrycy

Alternatywną metodą osadzania oligonukleotydów na powierzchni elektrody jest ich wbudowanie w polimerową matrycę (Ioannou i wsp., 2006; Dimitrov i wsp., 2011; Velusamy i wsp., 2011). Pozwala ona na bardziej stabilne unieruchomienie KN niż adsorpcja. W celu wytworzenia matrycy wykorzystuje się polimery kationowe (np. chitosan lub poli(chlorek diallilodimetyloamonu)) (Zhang i Hu, 2007; Tiwari i Gong, 2009) bądź polimery przewodzące (np. politiofenu czy polipirolu) (Ramanaviciene i Ramanavicius, 2004; Rahman i wsp., 2015). Unieruchomienie oligonukleotydów w matrycy polimerowej skutkuje powstaniem trójwymiarowej warstwy o dużej gęstości. Wadą tej metody jest trudność kontrolowania wielkości porów. Ruchliwość (elastyczność) DNA i dostępność dla analitu jest w tym przypadku dość mocno ograniczona, co prowadzi do utrudnienia procesów hybrydyzacji (de-los-Santos-Álvarez i wsp., 2004; Galandová i Labuda, 2009; Li i Lu, 2009).

1.2.2.3 Metody kowalencyjne

Oddziaływania tiol-metal szlachetny są często stosowane do kowalencyjnego wiązania biocząsteczek na powierzchni metali. Silne powinowactwo grup tiolowych do złota pozwala na tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy atomami siarki i złota:



Naturę wiązania S-Au, badano przy pomocy rentgenowskiej spektrometrii fotoelektronów (XPS), spektroskopii oscylacyjnej, spektrometrii mas i technik elektrochemicznych. Wykazano, że tiol adsorbuje się na powierzchni elektrody złotej, tworząc silne wiązanie kowalencyjne Au-S (Labuda i wsp., 2010; Vericat i wsp., 2010).

Kwasy nukleinowe nie tworzą samoczynnie wiązań kowalencyjnych z powierzchnią elektrody. W związku z tym niezbędna jest modyfikacja samych składników warstwy analitycznie aktywnej lub funkcjonalizacja powierzchni elektrody (Li i Lu, 2009).

Powszechnym sposobem osadzania kwasów nukleinowych na powierzchniach elektrod stałych jest tworzenie wiązania kowalencyjnego pomiędzy grupą funkcyjną wprowadzoną do sondy DNA a sfunkcjonalizowaną bądź niesfunkcjonalizowaną

powierzchnią elektrody złotej. Metoda ta zapobiega przede wszystkim wymywaniu sond z warstwy analitycznie aktywnej do roztworu, co ma miejsce w przypadku unieruchamiania oligonukleotydów w tzw. strukturach polimerowych). Ponadto z uwagi na możliwość wyeliminowania niespecyficznego adsorbentu warstwy analitycznie aktywnej w znacznym stopniu zredukowane są szумы oraz fałszywe odpowiedzi bioczuwnika. Energia, jaką należałoby dostarczyć, aby zerwać wiązanie kowalencyjne jest na tyle duża, że kilkukrotne odmywanie powierzchni elektrody (usuwanie nieunieruchomionych cząstek) nie powoduje wymywania się utworzonej warstwy (Heise i Bier, 2006).

Oligonukleotydy na powierzchni elektrod złotych można kowalencyjnie osadzić na dwa sposoby. Pierwszy z nich polega na unieruchomieniu na powierzchni elektrody związków tiolowych zaopatrzonych w odpowiednie grupy funkcyjne, które następnie wiążą się z sondami DNA za pomocą wiązania kowalencyjnego (Love i wsp., 2005). Może to być kowalencyjne wiązanie amidowe (Ligaj i wsp., 2014; Malecka i wsp., 2013, 2014; Donmez i wsp., 2015; Zhu i wsp., 2015a) lub fosforoamidowe (Xu i wsp., 2006; Park i Park, 2009). Ten sposób osadzania KN wymaga funkcjonalizacji powierzchni elektrody złotej poprzez osadzenie warstw alkilotioli zakończonych grupami $-NH_2$ lub $-COOH$, a także wcześniejszej modyfikacji jednego z końców łańcucha oligonukleotydowego przez wprowadzenie np. łańcucha alkilowego zakończonego grupą $-COOH$ lub $-NH_2$. Metoda ta zapewnia sondom DNA swobodę konformacyjną, co znacznie ułatwia proces hybrydyzacji (Prashar, 2012).

Tego typu rozwiązanie zostało wykorzystane w niniejszej rozprawie. Elektrode złotą zmodyfikowano mieszaną warstwą tioli posiadających grupy funkcyjne $-OH$ oraz $-COOH$. Pojedyncza nić DNA posiadająca na końcu 5' grupę $-NH_2$ za pośrednictwem mieszaniny EDC i NHS została związana z grupą $-COOH$ tworząc wiązanie amidowe (Malecka i wsp., 2013).

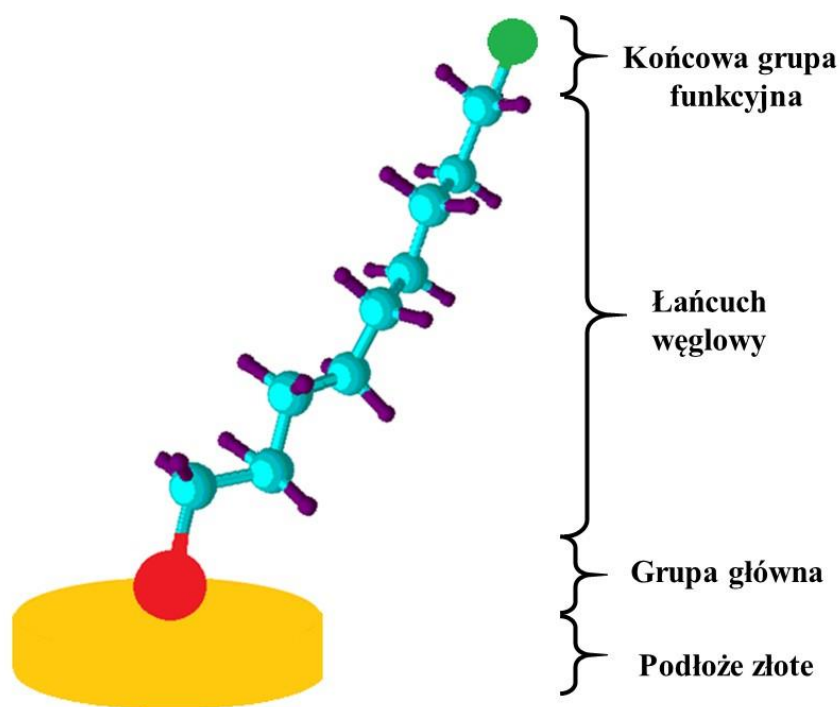
Drugi sposób opiera się na osadzeniu chemicznie zmodyfikowanej sondy DNA (głównie końca 5') łącznikiem z grupą $-SH$. Najczęściej stosuje się trzy- lub sześciowęglowe łączniki merkaptoalkilowe. Sondy wyposażone w taki łącznik służą do bezpośredniego tworzenia monowarstw na powierzchni elektrod złotych. Pojedyncze nici DNA zmodyfikowane grupami tiolowymi, bądź związki alkilotiolowe pośredniczące w kowalencyjnym przyłączeniu DNA do powierzchni elektrody, są unieruchamiane na powierzchni złota tworząc samoorganizujące się warstwy (SAMs) (Sassolas i wsp., 2008). Chemisorpcja cząstek posiadających grupy tiolowe jest

to metoda polegająca na spontanicznej reakcji pomiędzy powierzchnią elektrody złotej a cząsteczką zawierającą grupę merkaptoalkilową. Pionierskiego odkrycia samoorganizujących się monowarstw dokonali Nuzzo i Allara, dzięki badaniom powierzchni elektrod złotych zmodyfikowanych organicznymi sulfidami (Nuzzo i Allara, 1983).

W pierwszym etapie przygotowania bioczuJNIKA najczęściej stosuje się warstwy mieszane składające się z sondy DNA i wypełniacza. Taka strategia została zastosowana również w niniejszej rozprawie. W celu eliminacji wolnych przestrzeni na elektrodzie używa się rozcieńczalnika wypełniającego miejsca pomiędzy sondami DNA (np. 6-MCH) (Gooding, 2002; Paleček i Jelen, 2005; de-los-Santos-Álvarez i wsp., 2004; Wong i wsp., 2005; Mannelli i wsp., 2005). Zapewnia to utworzenie regularnej i uporządkowanej warstwy, w której cząsteczki DNA stykają się z powierzchnią elektrody tylko za pośrednictwem łącznika tiolowego i nachylone są do niej pod stałym kątem, co zapewnia jednakową dostępność łańcuchów kwasu dla substancji oddziałujących z nimi (Pividori i wsp., 2000; de-los-Santos-Álvarez i wsp., 2004; Paleček i Jelen, 2005).

Każdą z cząsteczek, które stanowią budulec warstwy samoorganizującej się można podzielić na trzy części, co zademonstrowano na Rysunku 11:

- ✚ grupę główną – siarkową, która tworzy silne, wiązanie kowalencyjne z podłożem;
- ✚ łańcuch główny (szkielet) – węglowodorowy o różnej długości, który stabilizuje SAM dzięki niekowalencyjnym oddziaływaniom van der Waalsa; zapewnia efektywne upakowanie monowarstwy i przyczynia się do stabilizowania struktury ze wzrostem długości łańcucha;
- ✚ końcową grupę funkcyjną, która może pełnić różne funkcje; niewielka zmiana w grupie końcowej może spowodować zmiany właściwości fizycznych i chemicznych warstwy; grupy końcowe nadają szczególne właściwości powierzchni (hydrofilowe, hydrofobowe); mogą być również wykorzystywane do zamocowania różnych biocząsteczek lub nanostruktur za pomocą słabych oddziaływań lub wiązań kowalencyjnych (Labuda i wsp., 2010; Vericat i wsp., 2010).



Rysunek 11. Schemat fragmentu monowarstwy samoorganizującej się na powierzchni elektrody złotej.

Metoda tworzenia monowarstw samoorganizujących się posiada następujące zalety:

- ✚ umożliwia zorientowane położenie sondy DNA w stosunku do powierzchni elektrody
- ✚ daje możliwość regulacji gęstości rozmieszczenia sondy na powierzchni elektrody złotej poprzez stosowanie rozcieńczalnika np. 6-MCH (Mannelli i wsp., 2005; Wong i wsp., 2005)
- ✚ zapewnia elastyczność osadzonej sondy DNA
- ✚ umożliwia tworzenie tzw. warstw mieszanych zawierających oprócz sondy, np. alkitiole eliminujące niespecyficzną adsorpcję biocząsteczek pochodzących z analizowanej próby na powierzchni elektrody

Technika ta ze względu na opisane zalety, a także relatywnie prostą procedurę przygotowania jest najszerzej stosowana do konstrukcji bioczuJNIKÓW opartych o procesy hybrydyzacji (Drummond i wsp., 2003; Liu i wsp., 2005b; Aryaa i wsp., 2009).

1.2.2.4 Powinowactwo awidyna/streptawidyna – biotylna

Metoda osadzania oligonukleotydów wykorzystująca naturalne powinowactwo awidyny lub streptawidyny do biotylny jest również szeroko stosowana w konstrukcji biocujników DNA. Nić DNA modyfikuje się poprzez kowalencyjne przyłączenie biotylny do jednego z jej końców, a na powierzchni elektrody osadza się awidynę bądź streptawidę (Sassolas i wsp., 2008).

Procedury unieruchomienia biotylnowanego kwasu nukleinowego w przypadku tej metody przebiega według dwóch schematów:

- ✚ elektroda/ awidyna lub streptawidyna/ biotylnowany oligonukleotyd,
- ✚ elektroda/ biotylna/ awidyna lub streptawidyna / biotylnowany oligonukleotyd.

Każda cząsteczka awidyny lub streptawidyny może wiązać się z czterema biotylnowanymi cząsteczkami ssDNA, wiążąc je niekowalencyjnie. Taka strategia zwiększa ilość DNA na powierzchni przetwornika, zmniejsza niespecyficzną adsorpcję i poprawia stosunek sygnału do szumu.

Uzyskana tą metodą warstwa cechuje się dużą trwałością i stabilnością, porównywalną z immobilizacją kowalencyjną. Daje ona również możliwość kontroli gęstości upakowania sond na powierzchni elektrody (de-los-Santos-Álvarez i wsp., 2004; Paniel i wsp., 2013).

W *Tabeli 1* dokonano podsumowania przedstawionych metod osadzania kwasów nukleinowych na powierzchniach stałych. Nie wszystkie z przedstawionych metod spełniają pożądane wymagania. Chemisorpcja, a przede wszystkim wiązanie kowalencyjne, a także powinowactwo chemiczne są obiecującymi metodami osadzania sond DNA ze względu na możliwość jej przyłączenia do powierzchni elektrody w jednym punkcie. Jednak proces wytworzenia wiązania kowalencyjnego, jest dość złożony, wymaga modyfikacji odpowiednimi grupami funkcyjnymi powierzchni elektrody, sondy DNA lub obu tych elementów. Zatem, proste i tanie procedury unieruchamiania kwasów nukleinowych, takie jak adsorpcja czy unieruchamianie w matrycy polimerowej mogą być również brane pod uwagę. W przypadku adsorpcji fizycznej ani powierzchnia elektrody, ani DNA nie wymagają modyfikacji. Fakt ten potwierdza, że stanowi ona najprostszy i najtańszy sposób unieruchomienia kwasów nukleinowych. Aczkolwiek, zdolność oddziaływań sondy z analitami jest w tym wypadku ograniczona. Powodem tego zjawiska jest brak kontroli orientacji sondy,

związany z jej ograniczoną elastycznością spowodowaną przez wielopunktowe unieruchomienie sondy. Desorpcja w tym wypadku jest również trudna do uniknięcia.

Tabela 1. Ocena poszczególnych metod unieruchomienia kwasów nukleinowych. + słaba, ++ średnia, +++ dobra (de-los-Santos-Álvarez i wsp., 2004)

Metoda osadzania DNA	Gęstość upakowania i kontrola orientacji	Stabilność	Zdolność wiązania	Prostota wykonania	Brak niespecyficzej adsorpcji	Koszt
Adsorpcja fizyczna	+	+	+	+++	+	+++
Adsorpcja elektrostatyczna	++	+	++	++	+	+++
Unieruchamianie w matrycy	+	++	+	++	+++	++
Elektrostatyczne unieruchamianie w matrycy	++	++	++	++	+++	++
Powinowactwo	+++	+++	+++	+	+++	+
Wiązanie kowalencyjne	+++	+++	+++	+	+++	++

Podsumowując, procedura osadzania sond DNA na powierzchni elektrody ma istotny wpływ na proces jej hybrydyzacji z komplementarnymi sekwencjami DNA czy RNA obecnymi w roztworze badanej próby. Każda z przedstawianych wyżej metod posiada wady i zalety, dlatego w literaturze wciąż spotykane są metody doskonalenia ich tak, aby mogły gwarantować jeszcze lepszą selektywność, trwałość i wysoką czułość bioczuJNIKA.

1.2.3. Sposoby generowania sygnału w bioczuJNIKACH elektrochemicznych opartych o kwasy nukleinowe

W ostatnim trzydziestoleciu elektrochemiczne techniki detekcji i analizy DNA zyskują coraz większą popularność jako metody molekularnej diagnostyki w medycynie, ochronie środowiska, kryminalistyce, czy farmacji. Metody te są relatywnie tanie, proste i mogą być stosowane poza laboratorium.

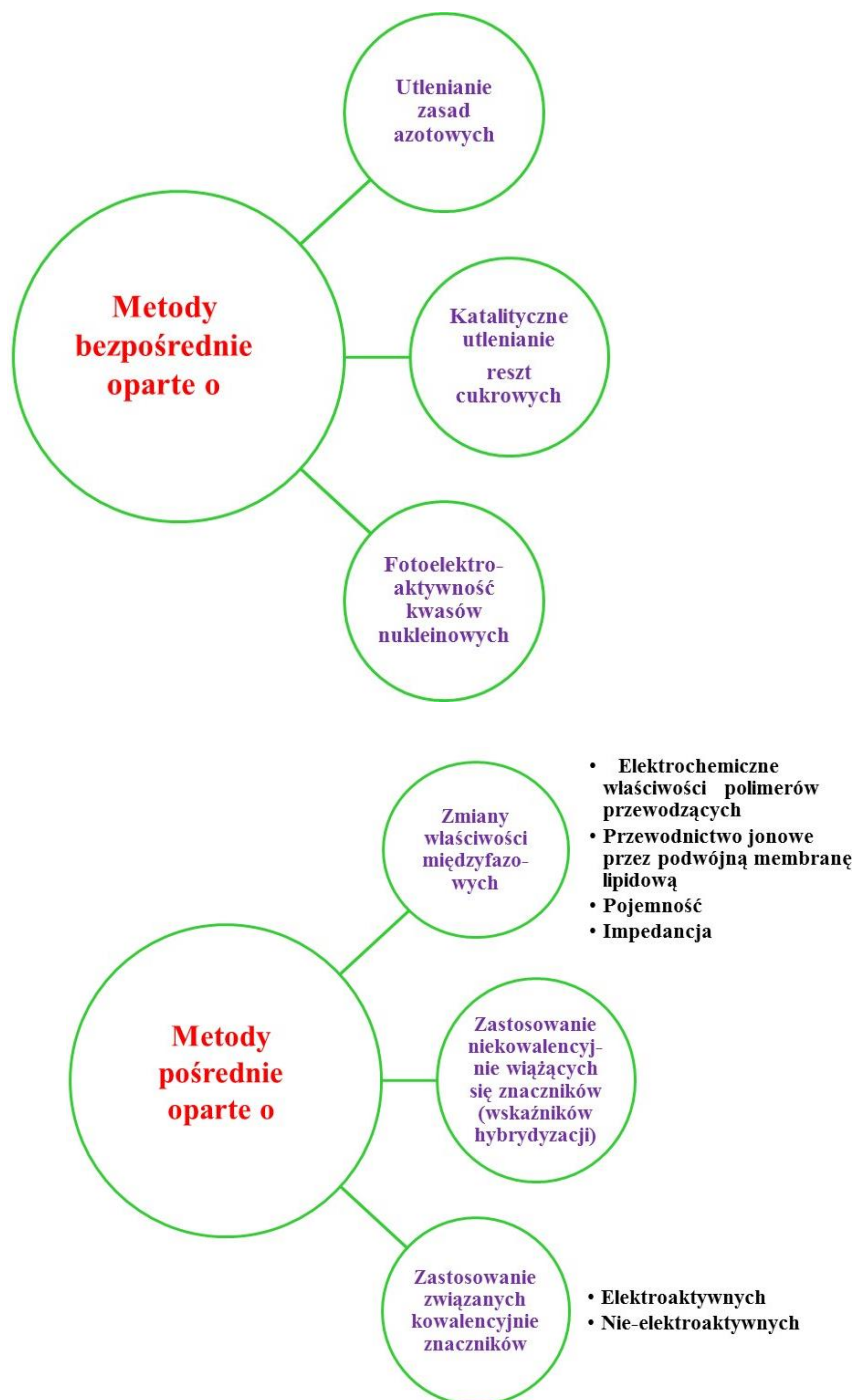
Po przeprowadzeniu interakcji sondy DNA z badanym analitem – DNA czy RNA, układ detekcyjny ma na celu dokonanie analizy sprawdzającej wytworzenie się hybrydy na powierzchni elektrody. Do technik wykrywających procesy hybrydyzacji należą techniki bezodczynnikowe (z ang. *reagent-less*). Nie wymagają one zastosowania dodatkowych odczynników w celu wywołania sygnału analitycznego. Stosuje się również metody bezwskaźnikowe (z ang. *label-free*), w których nie ma potrzeby chemicznej modyfikacji sond DNA, analitów czy innych substancji oddziałujących z oligonukleotydami (Lucarelli i wsp., 2008).

Jednym ze sposobów wykrywania hybryd kwasów nukleinowych osadzonych na powierzchniach stałych są metody oparte o naturalne właściwości elektroaktywne kwasów nukleinowych, wykorzystujące wskaźniki redoks-aktywne (wiążące się z DNA kowalencyjnie lub niekowalencyjnie), a także oparte na aktywności katalitycznej wybranych enzymów. Przegląd technik wykrywania procesów hybrydyzacji stosowanych w elektrochemicznych bioczuJNIKACH DNA przedstawiono w *Tabeli 2* na podstawie raportu technicznego sporządzonego przez Labudę i współpracowników (Labuda i wsp., 2010).

Tabela 2. Metody detekcji wykorzystywane w bioczuJNIKACH elektrochemicznych DNA według IUPAC (Labuda i wsp., 2010).

Zasada wykrywania	Przykłady	Metoda bezwskaźnikowa (<i>label-free</i>)	Metoda bezodczynnikowa (<i>reagent-less</i>)
Elektroaktywność kwasów nukleinowych	Utlenienie guaniny na elektrodach węglowych	Tak	Tak (może być połączona z mediatorami redoks)
	Tensametryczna odpowiedź DNA na elektrodach rtęciowych		Tak
Wskaźniki redoks	Elektrostatyczne (aniony lub kationy)		Nie
	Interkalatory, związki łączące się z rowkami DNA		
Wskaźniki redoks wiążące się kowalencyjnie (znaczniki)	Związki metaloorganiczne, związki chelatowe metali, ugrupowania organiczne, nanocząsteczki	Nie	Tak (może zostać zastosowany jako mediator redoks przy użyciu rozpuszczalnego depolaryzatora)
Enzymy połączone z DNA	Fosfatazy, peroksydazy		Nie

Powszechnie stosuje się dwie strategie generowania elektrochemicznego sygnału analitycznego przez bioczuJNIKI oparte na procesach hybrydyzacji: metodę bezpośrednią i metodę pośrednią (de-los-Santos-Álvarez i wsp., 2004; Radecki i wsp., 2006; Labuda i wsp., 2010). Charakterystyka powyższych metod została przedstawiona na *Rysunku 12*.



Rysunek 12. Strategia opracowana w celu wygenerowania sygnału elektrochemicznego w bioczuJNIKACH przeznaczonych do wykrywania kwasów nukleinowych (de-los-Santos-Álvarez i wsp., 2004).

Metody bezpośrednie wykrywające procesy hybrydyzacji opierają się na elektroaktywności KN osadzonych na powierzchni elektrody. Jest to możliwe dzięki katalitycznemu utlenianiu zasad i cukrów budujących kwasy nukleinowe. Wszystkie zasady azotowe wchodzące w skład DNA posiadają zdolność do elektrochemicznego utleniania się na powierzchniach elektrod węglowych. Do celów analitycznych jednak najczęściej wykorzystuje się sygnał pochodzący od guaniny, która wykazuje najsilniejsze właściwości elektroaktywne na różnych elektrodach stałych (Paleček i Fojta, 2005). Metody oparte na utlenianiu zasad azotowych są bezwskaźnikowe, szybkie i proste, co niewątpliwie jest zaletą. Niestety utlenianie guaniny na elektrodach stałych wymaga wysokich dodatnich potencjałów (około 1 V względem chlorosrebrowej elektrody odniesienia), co wiąże się ze znacznym sygnałem tła powodującym obniżenie granic wykrywalności. Powyższy sposób wykrywania KN umożliwia analizę procesów hybrydyzacji bez konieczności modyfikacji nici kwasów nukleinowych, co z pewnością upraszcza samą konstrukcję bioczuJNIKA, a także obniża koszty z tym związane. Jednak tego typu układy są jednorazowe, a sam sygnał jest dość słaby i zależy od obecności guaniny w sekwencji sondy unieruchomionej na powierzchni elektrody, co jak można przypuszczać wyklucza go z wielu zastosowań. Wykorzystanie znaczników redoks-aktywnych niezależniających otrzymywany sygnał prądowy od sekwencji DNA przy jednoczesnym zwiększeniu jego intensywności stanowi w tym przypadku użyteczne rozwiązanie.

Wykrywanie procesów hybrydyzacji zachodzących na powierzchni elektrod może odbywać się nie tylko w oparciu o bezpośrednią elektrochemię KN. Pośrednie metody wykrywania hybrydyzacji DNA opierają się na:

1. obserwacji zmian właściwości na granicy fazy elektroda/ roztwór
2. wykorzystaniu znaczników specyficjnie oddziałujących z pojedynczymi lub podwójnymi nićmi DNA obecnymi w warstwie detekcyjnej bioczuJNIKA.

Procedury należące do pierwszej kategorii bazują na badaniu zmian następujących parametrów wywołanych procesami hybrydyzacji:

- ✚ zmian natężenia prądu faradajowskiego (Malecka i wsp., 2012; 2014; 2015; 2016; Gao i wsp., 2016)
- ✚ przewodnictwa jonowego (Hianik i wsp., 2001; Tam i wsp., 2009b; Gu, 2014)
- ✚ elektrochemicznych właściwości polimerów przewodzących (Galandová i Labuda, 2009; Peng i wsp., 2009; Ates, 2013; Ramanavicius i wsp., 2012)

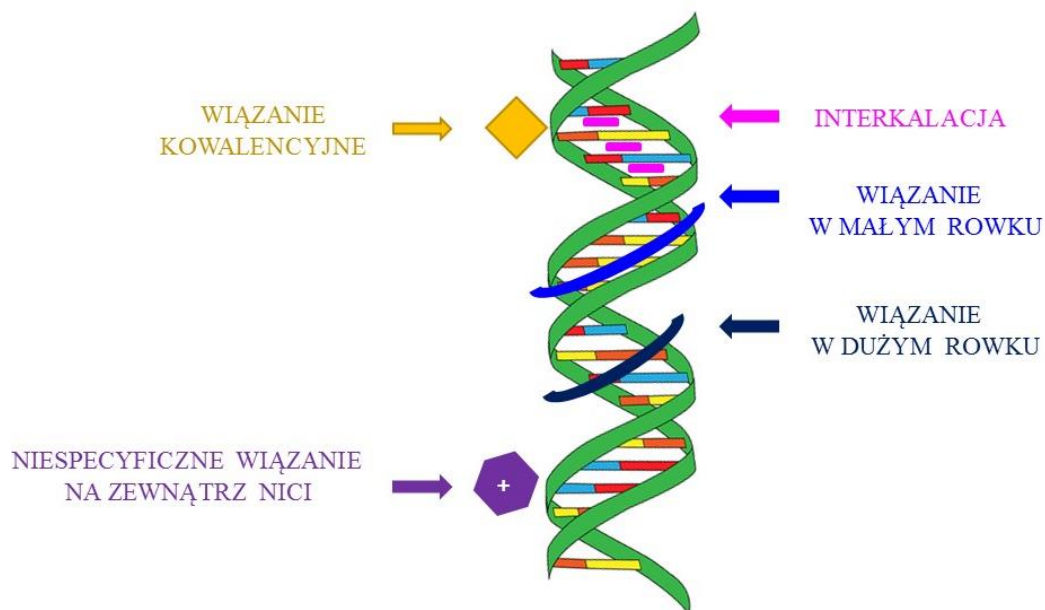
- ✚ pojemności elektrycznej (Berney i wsp., 2000; Hong i wsp., 2004; Kang i wsp., 2010; Tsai i wsp., 2011)
- ✚ impedancji badanej granicy faz (Labuda i wsp., 2010; Malecka i wsp., 2013; Jarocka i wsp., 2016)

Znacznie częściej procesy hybrydyzacji zachodzące w warstwie detekcyjnej bioczuJNIKA obserwuje się z zastosowaniem znaczników elektroaktywnych posiadających zdolność wiązania się z kwasami nukleinowymi w sposób niekowalencyjny. Niekowalencyjne znaczniki redoks stosuje się do rozróżniania sondy ssDNA (wskazując, że hybrydyzacja nie miała miejsca) od dupletu (wskazując proces hybrydyzacji). Wskaźniki te mogą odpowiadać na zmiany ilości DNA na powierzchni elektrody (wskaźniki elektrostatyczne) lub rozpoznawać strukturę DNA (wiązanie w dużych lub małych rowkach helisy, czy też interkalacja) (Labuda i wsp., 2010).

Metoda ta wykorzystuje różną powinowactwo znaczników elektrochemicznych do pojedynczych i podwójnych nici DNA (Paleček i Fojta, 2005). Biorąc pod uwagę zasadę działania znaczników elektroaktywnych wiążą się one z DNA przez (Leszczyński i Duński, 2006):

- ✚ elektrostatyczne oddziaływania na zewnątrz helisy DNA
- ✚ interkalację do wnętrza helisy
- ✚ wiązania w dużych lub małych rowkach helisy (obszarach, w których występują potencjalne donory oraz akceptory wodoru w wiązaniach wodorowych),
- ✚ wiązania kowalencyjne,

Sposoby wiązania cząsteczek z DNA przedstawiono schematycznie na *Rysunku 13*.



Rysunek 13. Sposoby wiązania cząsteczek z DNA (Leszczyński i Duński, 2006).

Niespecyficzne oddziaływanie elektrostatyczne na zewnątrz helisy polega na przyciąganiu cząsteczek obdarzonych ładunkiem dodatnim przez ujemnie naładowane grupy fosforanowe stanowiące element składowy szkieletu DNA (Rauf i wsp., 2005; Ferapontova i wsp., 2011). Wskaźniki elektrostatyczne odpowiadają na różnice w gęstości ładunku ujemnego pomiędzy pojedynczą nicią DNA a hybrydą. Proces hybrydyzacji zachodzący pomiędzy sondą unieruchomioną na powierzchni elektrody a analitem DNA skutkuje zwiększeniem gęstości ładunku ujemnego przy powierzchni elektrody. Wskaźniki redoks, takie jak np. anionowy kompleks heksacyjanożelazianu (III/II) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (są odpychane od powierzchni zmodyfikowanej sondą DNA) lub kationowy kompleks heksaaminorutenu $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ (są przyciągane do ujemnie naładowanej hybrydy) stosuje się do monitorowania zmian gęstości ładunku ujemnego za pomocą impedancji lub technik woltamperometrycznych (Labuda i wsp., 2010; Paleček i Bartošik, 2012). Unieruchomienie kwasów nukleinowych na powierzchni elektrody nie powoduje zahamowania oddziaływań elektrostatycznych z w/w znacznikami redoks-aktywnymi (McEwen i wsp., 2009).

Elektrostatyczne przyciąganie lub odpychanie ujemnie bądź dodatnio naładowanych znaczników redoks-aktywnych obecnych w roztworze przez helisę DNA unieruchomioną na powierzchni elektrody, wykorzystywane było przez profesora

Umezawę w tworzeniu elektrochemicznych czujników jonokanałowych opartych o DNA (Aoki i Umezawa, 2002; 2003). Dokładnie czujniki tego typu zostały omówione w *Rozdziale 3.1*.

W porównaniu z oddziaływaniami elektrostatycznymi większą specyficzność w odróżnianiu jednoniciowego DNA od hybrydy wykazują związki interkalujące (Richards i Rodger, 2007; Neto i Lapis, 2009; Greschner i wsp., 2013; Rescifina i wsp., 2014). Charakteryzują się one zazwyczaj strukturą, w skład której wchodzi układ aromatyczny o minimum 3-4 pierścieniach. Dzięki tej budowie interkalatory wnikały pomiędzy pary płaskich zasad azotowych w podwójnej nici DNA (najczęściej są to pary G≡C) (Reynisson i wsp., 2003; Li i wsp., 2007). Cząsteczki interkalatorów gromadzą się na powierzchni elektrody zmodyfikowanej hybrydą w znacznie większym stopniu niż w przypadku pojedynczej nici DNA (Paleček i Fojta, 2005). W bioczujnikach elektrochemicznych jako interkalatory stosuje się np. daunomycynę (Cai i wsp., 2003; Yang i wsp., 2007; Zhu i wsp., 2012), bromek etydyny (Elahi i wsp., 2012; Balvedi i wsp., 2014; Honorato Castro i wsp., 2014), oranż akrydyny (Siddiquee i wsp., 2011), błękit metylenowy (Zhang i wsp., 2009; Radhakrishnan i wsp., 2013; Tavallaie i wsp., 2014; Lin i wsp., 2015), czy proflawinę (Gębala i wsp., 2009; 2010). Wymienione powyżej związki wykazują większe powinowactwo względem hybrydy niż pojedynczej nici DNA.

Jednak najbardziej specyficznie wykrywają helisę DNA związki wiążące się z nią w tzw. małych rowkach, typowych jedynie dla podwójnych nici DNA (McEwen i wsp., 2009). Ten sposób oddziaływania substancji z DNA, w przeciwieństwie do interkalacji, nie powoduje zmian w konformacji DNA. Bazuje on na mechanizmie podobnym do modelu „klucza i zamka” obecnego w wiązaniach pomiędzy ligandem a makrocząsteczką. Związki wiążące się w mniejszym rowku DNA zbudowane są z kilku pojedynczych pierścieni zwykle aromatycznych typu pirol, furan czy benzen połączonych między sobą krótkim łącznikiem. Substancjami wykazującymi tego typu oddziaływania z DNA są między innymi: berenil (Zhou i wsp., 2014), distamycyna (Khedkar i wsp., 2007), Hoechst 33342 (Zhou i wsp., 2012), Hoechst 33258 (Safavieh i wsp., 2012), netropsyna (Andac i wsp., 2011), czy pentamidyna (Szapowska i wsp., 2006).

Oprócz wiązania w małym rowku, potencjalnym miejscem oddziaływań różnych substancji w strukturze helisy DNA jest również duży rowek. Tego typu wiązanie występuje rzadziej, gdyż obszerna przestrzeń dużego rowka uniemożliwia tworzenie

wielu połączeń niekowalencyjnych przez małe cząsteczki, jednocześnie udostępniając go dla większych molekuł, np. białek (Leszczyński i Duński, 2006). Jeśli już dana substancja zwiąże się z DNA w dużym rowku, często dochodzi do utworzenia formy potrójnej helisy (Erdem i Ozsoz, 2002). Omawiany typ wiązania dotyczy głównie związków, w których oprócz fragmentu struktury wiążącego się (przeważnie słabo) w dużym rowku DNA, występują inne struktury, pozwalające na silne łączenie cząsteczek z DNA (np. na drodze interkalacji lub wiązania kowalencyjnego). Występowanie dodatkowych grup funkcyjnych jest często kluczowe, gdyż oddziaływania występujące w dużym rowku są zbyt słabe, by utrzymać tam ligand (Leszczyński i Duński, 2006). Substancjami wiążącymi się z DNA w dużym rowku są na przykład: dimeryczne kaliksareny (Hu i wsp., 2012), norfloksacyna (Erdem i Ozsoz, 2002), kompleksy chromu III i zasady Shiffa np.: $[\text{Cr}(1,2\text{-bis}(\text{salicylidenoamino})\text{etano}(\text{H}_2\text{O})_2)]^+$ (Vijayalakshmi i wsp., 2000).

Większość wykorzystywanych związków oddziałujących z rowkami dwuniciowych KN wykazywało większe powinowactwo do fragmentów zawierających pary zasad A i T (Chaires, 1998; Haq, 2002).

Znaczniki łączące się z DNA w sposób kowalencyjny są narzędziem często stosowanym w bioczujnikach przeznaczonych do wykrywania specyficznych sekwencji oligonukleotydów. Znakowanie polega na modyfikacji chemicznej sondy bądź analitu za pomocą związków elektroaktywnych. Wprowadzenie do DNA kowalencyjnie przymocowanego znacznika elektroaktywnego znacznie poprawia specyficzność zwłaszcza procesów hybrydyzacji, ponieważ znakowane DNA można łatwo odróżnić od nieznakowanego z powodu różnic potencjałów redoks składników DNA i znaczników (na przykład znakowany analit DNA z nieznakowaną sondą, znakowana sonda z nieznakowanym analitem, lub znakowany nukleotyd wprowadzony w określonym położeniu do innego nukleotydu w cząsteczce DNA). Ponadto, zastosowanie różnych znaczników dla różnych sekwencji nukleotydowych pozwala na analizę wielu analitów równolegle (Labuda i wsp., 2010). Do znaczników elektroaktywnych kowalencyjnie przyłączających się do kwasów nukleinowych należą m.in.: kompleksy tetratlenku osmu, pochodne ferrocenu, kompleksy rutenu, antrachinon, grupy aminofenyłowe i nitrofenyłowe, wielościenne klastry boru, znaczniki enzymatyczne (peroksydaza, alkaliczna fosfataza), nanocząsteczki/kropki kwantowe, a także nanorurki węglowe (Paleček i Bartošik, 2012).

2. Metody wykrywania wirusów ptasiej grypy

Ptasią grypę wywołują wirusy grypy typu A należące do rodziny *Orthomyxoviridae*. Typ A spotyka się u różnorodnych gatunków ptaków i ssaków. Podział wirusów grypy typu A jest oparty na właściwościach antygenowych zewnętrznych powierzchniowych glikoprotein – hemaglutyniny (HA) oraz neuraminidazy (NA), podanych jako podtyp *HxNy*. Dotychczas zidentyfikowano 16 podtypów HA (H1-H16) i 9 podtypów NA (N1-N9), co daje łącznie 144 możliwe kombinacje segmentów genowych i powoduje istnienie ogromnej różnorodności wirusów typu A, chociaż nie wszystkie kombinacje *HxNy* występują naturalnie. Genom wirusa typu A zawiera jednociowy kwas RNA o ujemnej polarności, podzielony na osiem segmentów (Lee i Saif, 2009).

Wirus ptasiej grypy, podobnie jak inne szczepy wirusa grypy, rozprzestrzenia się w organizmie żywiciela poprzez dwa białka – hemaglutyninę (HA) i neuraminidazę (NA). Umożliwiają one wirusowi H5N1 atakowanie zarówno ptaków, jak i ludzi. Symbol H5N1 oznacza, że na powierzchni wirusa ptasiej grypy znajdują się białka: hemaglutynina typu piątego i neuraminidaza typu pierwszego (Lee i Saif, 2009). HA pośredniczy w łączeniu się wirusa z receptorami komórkowymi i w ten sposób pozwala wirusowi wnikać do komórek. Natomiast NA, znajdująca się w mniejszych ilościach w otoczce wirusa, uwalnia nowopowstałe cząstki wirusa z zakażonej komórki – w ten sposób mogą one infekować kolejne komórki. Niewielkie zmiany tych białek umożliwiają wirusowi zarażanie nowych gatunków żywicieli. Zmiany mogą powstać wskutek mutacji lub podczas wymiany genów, gdy dwa różne typy wirusa zarażą tę samą komórkę (Kukol i wsp., 2008).

Wirusy ptasiej grypy (AIV), w zależności od ich zjadliwości, podzielono na dwie formy: wysoko- (HPAI) i niskopatogenną (LPAI). Znane są dwa szczepy o wysokiej patogeniczności – H5 i H7, które mogą przyczyniać się do dużej śmiertelności wśród drobiu. Szczepy te zazwyczaj jednak nie pojawiają się wśród dziko żyjących ptaków. Występują one u drobiu przetrzymywanego w ogromnych, nienaturalnych zagęszczeniach. Dzikie ptaki mogą zarazić się tymi szczepami przez bezpośredni kontakt z chorym drobiem. Zakażenia drobiu wysoce zjadliwą ptasią grypą mogą spowodować bardzo wysoką śmiertelność zbliżającą się nawet do 100%, podczas gdy zakażenia niskimi szczepami patogennymi są łagodniejsze. Spośród wszystkich

podtypów ptasiej grypy wirus H5N1 ma szczególne znaczenie z wielu względów. H5N1 mutuje szybko i posiada skłonność przyjmowania genów od wirusów zarażających inne gatunki zwierząt. Ptaki, które przeżyły zakażenie, wydzielają wirusa w odchodach i ślinie przez co najmniej 10 dni, przyczyniając się do jego szybkiego rozprzestrzeniania. W 16 krajach w okresie od 2003 roku do czerwca 2016 roku zanotowano 851 przypadków ludzkiego zakażenia ptasią grypą, w tym 450 zgonów (WHO, 2016).

Pierwszy przypadek zakażenia człowieka wirusem H5N1 HPAI miał miejsce w Hong Kongu w 1997 roku. W Polsce natomiast odnotowano dwie epidemie ptasiej grypy (AI) w ciągu ostatnich dwóch dekad, które miały miejsce w roku 2006 i 2007. Wiosną 2006 roku wykryto 64 przypadki wirusa H5N1, głównie w łabędziach niemych. Z kolei w grudniu 2007 roku, 9 przypadków HPAI H5N1 potwierdzono u drobiu handlowego i 1 u dzikich ptaków trzymanyh w niewoli (Śmietanka i Minta, 2014). Rozprzestrzenianie się zakażenia wśród ptaków zwiększa możliwość bezpośredniego zarażenia ludzi. Z biegiem czasu, ze wzrostem liczby zarażonych ludzi, wzrasta również prawdopodobieństwo, że w organizmie osoby, jednocześnie zarażonej szczepami sezonowej i ptasiej grypy, powstanie nowy podtyp wirusa, zawierający charakterystyczne dla ludzkiego wirusa geny, które zapewnią mu łatwe przenoszenie między ludźmi. Takie zdarzenie mogłoby doprowadzić do pandemii grypy (Charlton i wsp., 2009; Lin i wsp., 2009; Wang i wsp., 2013). Ze względu na fakt, że objawy ptasiej grypy nie są wystarczająco charakterystyczne, aby ustalić diagnozę wyłącznie na podstawie obrazu klinicznego ważne jest, aby korzystać z niezawodnych narzędzi diagnostycznych. Szybka identyfikacja wirusa ma istotne znaczenie kliniczne, ekonomiczne i epidemiologiczne (Diouani i wsp., 2008).

Aktualnie rozwijane są różnorodne podejścia do wykrywania wirusów ptasiej grypy. Część z nich skupia się na ulepszaniu już istniejących metod, inne opierają się na całkiem nowych pomysłach. Natomiast techniki rutynowej diagnostyki bazują głównie na dobrze sprawdzonych metodach takich jak test ELISA, PCR czy amplifikacja sekwencji kwasów nukleinowych (NASBA). Obecnie do wykrywania wirusów ptasiej grypy stosuje się metody etiologiczne, serologiczne, a także molekularne (Ping i wsp., 2015).

2.1. Metody etiologiczne

Do metod etiologicznych stosowanych do wykrywania wirusa ptasiej grypy należy izolacja wirusa poprzez jego hodowlę wirusa w zarodkach kurzych i dalszą identyfikację jego podtypów. Jest ona uważana za złoty standard, ponieważ jest to metoda czuła i dokładna, generująca wysokie miana wszystkich rodzajów wirusów ptasiej grypy (Newton i wsp., 2000). Jednak hodowla, a następnie identyfikacja wyizolowanego wirusa jest kosztowna, wymaga dużego nakładu pracy i znacznych ilości materiału biologicznego. Czas oczekiwania na wynik jest często zbyt długi (nawet do 2 tygodni), co znacznie ogranicza możliwość jej wykorzystania w praktyce klinicznej. Ponadto, ze względu na zakaźność i wysoką zjadliwość wirusa, może zagrażać bezpieczeństwu środowiska i zdrowia publicznego. W związku z tym izolacja wirusa nie nadaje się do szybkiego wykrywania i rutynowej diagnozy. Może być stosowana w celu uzyskania żywych izolatów wirusa z przeznaczeniem do dalszej szczegółowej analizy laboratoryjnej. Inne techniki wykrywania, takie jak immunodyfuzja na żelu agarowym (AGID), różne testy immunologiczne (immunofluorescencyjne, immunoenzymatyczne, np. ELISA czy immunochromatograficzne) i reakcja polimerazy łańcuchowej w czasie rzeczywistym (RT-PCR) mogą potwierdzić i sklasyfikować izolaty wirusa (Ping i wsp., 2015).

2.2. Metody serologiczne

Przeciwciała skierowane przeciwko HA i NA, nukleoproteiny i białko matrycowe, wytwarzane po wystąpieniu ptasiej grypy u drobiu, można wykrywać za pomocą metod serologicznych, takich jak: test zahamowania hemaglutynacji (HIT), test zahamowania neuraminidazy (NIT), ELISA, AGID, odczyn wiązania dopełniacza (OWD), oraz test neutralizacji (NT) (Cox, 1999; El Zowalaty i wsp., 2013). Ze względu na ich wysoką specyficzność, testy HIT i NIT są najczęściej stosowane w identyfikacji podtypu wirusa do pomiaru poziomów odpowiednich przeciwciał dla HA i NA w próbkach surowicy (Prince i Leber, 2003). Zaletą testu HIT jest niska cena, jednakże, jest uważany za trudne narzędzie diagnostyczne, ponieważ jest pracochłonny i wymaga dwóch próbek surowicy pobranych w tym samym czasie. To samo dotyczy testu NIT. Jest on

również dość skomplikowaną i drogą metodą, a wynik nie zawsze uzyskuje się w ciągu jednego dnia roboczego. Testy te są trudne do włączenia do zautomatyzowanych procedur i wymagają ciągłego źródła odpowiednich czerwonych krwinek (Pikuła i wsp., 2011). Alternatywnie, testy ELISA stosowane są do wykrywania przeciwciał specyficznych dla wirusa grypy. Do pomiaru specyficznych przeciwciał wirusa grypy w surowicy krwi są bardziej czułe niż testy HIT czy OWD (Voeten i wsp., 1998).

Test AGID służy również do diagnostyki serologicznej wirusów ptasiej grypy (Beard, 1970; Jenson, 2014). Charakteryzuje się wieloma zaletami, używane do badania odczynniki (antygeny i surowica kontrolna) są komercyjnie dostępne na rynku. Jest tani, łatwy w wykonaniu i nie wymaga specjalistycznej aparatury pomiarowej. Jednak metodę tę cechuje dość niska czułość w porównaniu z testami ELISA i HIT. Ponadto dodatni wynik tego testu dowodzi jedynie zakażenia wirusem grypy typu A, nie wskazuje na podtyp hemaglutyniny. Konieczne są więc w takim przypadku dodatkowe badania w celu potwierdzenia bądź wykluczenia najgroźniejszych podtypów H5 i H7 wirusa AI (Pikuła i wsp., 2011; Jenson, 2014).

Testy ELISA są często wykorzystywanym narzędziem w wykrywaniu wirusów i przeciwciał przeciwko wirusowi AI. Są one komercyjnie dostępne i można je zautomatyzować (Ping i wsp., 2015). Są proste w wykonaniu i interpretacji, a w związku z tym mniej zależne od umiejętności i doświadczenia wykonującej je osoby. Testy ELISA charakteryzują się umiarkowanymi kosztami i nadają się do masowych badań przesiewowych zakażeń wirusowych grypą typu A (Mendoza i wsp., 1999). Tak więc, ta metoda jest odpowiednia do kontroli wirusów ptasiej grypy na dużą skalę np. na fermach drobiu. Jednak i ona posiada wady. Jedną z nich jest stosunkowo niska czułość. W przypadku wykrywania wirusa grypy typu A ELISA w porównaniu do metod amplifikacji KN takich jak np. PCR charakteryzuje się czułością niższą nawet 6-7 rzędów wielkości (Steininger i wsp., 2002). Natomiast użycie metod elektrochemicznych pozwala na uzyskanie stosunkowo wysokich czułości wynoszących 10 ng białka/mL. Czułość taka wystarcza do wykrycia przeciwciał przeciwko ptasiej grypie (Ohtsuka i wsp., 2008), jednak nadal może być niewystarczająca w przypadku wykrywania wirusa. W oparciu o doniesienia literatury naukowej do wykrywania przeciwciał skierowanych przeciwko wirusowi ptasiej grypy stosuje się różne testy ELISA np. p-ELISA (peptydowa) czy "Sandwich" ELISA – test podwójnego wiązania (Du i wsp., 2009; Luo i wsp., 2009; Moreno i wsp., 2009; Velumani i wsp., 2011; Zhu i wsp., 2014).

Porównując metody serologiczne z metodami izolacji w hodowli, można stwierdzić, że analizy serologiczne są znacznie szybsze i mniej kosztowne, jednak często cechuje je mniejsza czułość i specyficzność (Pikuła i wsp., 2011).

2.3. Metody molekularne

W ostatnich latach metody molekularne wykorzystujące amplifikację KN odgrywają coraz większą rolę w wykrywaniu lub diagnostyce wirusów ptasiej grypy. PCR jest aktualnie jedną z najczęściej wykorzystywanych do tego celu metod. Szczególnie warta polecenia jest ona w wykrywaniu małych ilości wirusa. Ze względu na fakt, że wirusy ptasiej grypy należą do grupy wirusów RNA, w przypadku identyfikacji tego wirusa technika PCR musi zostać poprzedzona przepisaniem informacji genetycznej na sekwencję DNA. W związku z tym metodę PCR modyfikuje się dodając etap odwrotnej transkrypcji – RT-PCR (Stefańska i wsp., 2012), aby bezpośrednio wykrywać wirusa.

Obecnie klasyczny PCR jest coraz częściej wypierany przez PCR czasu rzeczywistego (RRT-PCR), czyli PCR z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym. Koszty pojedynczej analizy przewyższają znacznie koszty standardowego PCR. Aczkolwiek RRT-PCR charakteryzuje się znacznie większą specyficznością, czułością detekcji oraz skróconym czasem analizy w porównaniu do hodowli wirusa. Jest on preferowany także ze względu na znaczną automatyzację techniki. Jednak podstawową zaletą tej metody jest jej ilościowy charakter, w przeciwieństwie do klasycznej metody PCR zapewniającej jedynie wynik jakościowy (plus/minus). Metoda ta ma również słabe strony. Należą do nich m.in., pracochłonność, dość trudna optymalizacja metody, stosunkowo wysokie (lecz systematycznie spadające) koszty zakupu aparatury, potrzeba posiadania dobrze wyposażonego laboratorium oraz zatrudnienia wyszkolonego personelu. Mimo ograniczeń metoda ta jest aktualnie jedną z najczęściej stosowanych metod szybkiego wykrywania wirusów ptasiej grypy (Stefańska i wsp., 2012; Shojaei i wsp., 2014).

W celu usprawnienia i obniżenia kosztów badania coraz częściej wykorzystuje się tzw. multiplex PCR (mRT-PCR) przeznaczony do identyfikacji więcej niż jednego wirusa w pojedynczej reakcji. Największe zalety reakcji multiplexowych to przede

wszystkim mniejsze zużycie odczynników (a tym samym niższy koszt analizy) oraz oszczędność czasu, szczególnie w przypadku konieczności badania dużej liczby próbek (Gavin i wsp., 2003; Stefańska i wsp., 2012).

Do wykrywania wirusów ptasiej grypy stosuje się również metodę opartą na amplifikacji sekwencji kwasów nukleinowych (NASBA). Ta metoda pozwala na bardzo wydajną amplifikację RNA, pozwalającą powielić materiał genetyczny w próbce nawet 10⁹ - krotnie w czasie zaledwie 2 godzin (Compton, 1991).

Eksperymenty NASBA nie wymagają użycia specjalistycznego sprzętu, całą reakcję można przeprowadzić w łaźni wodnej w jednej temperaturze, niezależnie od laboratorium czy wykwalifikowanego personelu. NASBA dostarcza dokładnych, spójnych i wiarygodnych wyników o wysokiej czułości. Może dorównać lub nawet przewyższyć PCR czasu rzeczywistego pod względem czułości. Co więcej, ze względu na izotermiczny charakter metody NASBA mogą być łatwo standaryzowane (Lau i wsp., 2006).

Najbardziej powszechnie do diagnozowania wirusów ptasiej grypy stosuje się RT-PCR (Starick i wsp., 2000; Lee i wsp., 2001; Munch i wsp., 2001), RRT-PCR (Spackman i wsp., 2002; Dovas i wsp., 2010; Zeynalova i wsp., 2015), mRT-PCR (Xie i wsp., 2006; He i wsp., 2009; Ma i wsp., 2015), a także NASBA (Chantratita i wsp., 2008; Moore i wsp., 2008; 2010). Wszystkie wyżej wymienione metody są zalecane przez WHO i OIE do wykrywania, diagnozowania i nadzoru wirusów ptasiej grypy u ludzi, drobiu i dzikiego ptactwa.

2.4. BioczuJNIKI przeznaczone do wykrywania wirusów ptasiej grypy

Klasyczne metody diagnostyczne z racji swojej pracochłonności i czasochłonności są coraz częściej zastępowane nowoczesnymi metodami, które oferują znaczące skrócenie czasu diagnozy, zwiększenie czułości i znacznie prostsze procedury wykonywania badań.

Wśród sposobów wykrywania wirusów ptasiej grypy rozwijanych w ostatnich latach znajdują się bioczuJNIKI. Najbardziej popularne, ze względu na niską cenę i wysoką czułość, stały się bioczuJNIKI elektrochemiczne. Metody opierające się

na pomiarze sygnału elektrycznego mają znacznie większe możliwości miniaturyzacji układu pomiarowego.

Parametry, takie jak pojemność (Guiducci i wsp., 2004), natężenie prądu czy oporność (Liu i wsp., 2012) mogą się zmieniać w wyniku rozpoznania sekwencji komplementarnej KN (genoczuJNIKI) czy antygeny (immunoczuJNIKI) w badanej próbce.

ImmunoczuJNIKI są to bioczuJNIKI, które zawierają w warstwie analitycznie aktywnej lub wykrywają przeciwciała (lub ich fragmenty). Wykorzystują one zdolność przeciwciał (bądź ich fragmentów) do rozpoznania właściwych sobie antygenów nawet w bardzo złożonych matrycach. W wyniku takiego rozpoznania powstają kompleksy immunologiczne, które wpływają na właściwości powierzchni zmodyfikowanych elektrod (Luppa i wsp., 2001). W ostatnich latach w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie prowadzone są intensywne badania nad zastosowaniem immunoczuJNIKÓW do wykrywania wirusów ptasiej grypy. Przykładowe elektrochemiczne immunoczuJNIKI zestawiono w *Tabeli 3*. W zależności od konstrukcji, rodzaju badanej substancji i matrycy mogą one osiągać czułość wahającą się w granicach od 0.43 pg/mL do kilkunastu tysięcy 10^4 pg/mL.

Tabela 3. Przykładowe elektrochemiczne immunoczuJNIKI przedstawione w literaturze naukowej przeznaczone do wykrywania AIV.

Modyfikacja elektrod	Technika pomiarowa	Analit	Granica wykrywalności [pg/mL]	Referencje
Au/16-MHA/Ab	EIS	H7N1	5.0	Diouani i wsp., 2008
Au/OT+BDDT/NV/Ab	EIS	AIV	8 000	Hassen i wsp., 2011
Au/Con A/HRP/BSA	DPV	H9N2	1 000	Zhou i wsp., 2013
Au/OT/OGaL/BSA	EIS	H1N1	10 000	Wicklein i wsp., 2013
Au/HDT/AuC/Fab ⁷ /BSA	EIS	His ₆ -Qinghai	2.2	Jarocka i wsp., 2014
Au/MCB+DPM/Cu(II)/HA/BSA	EIS	anty-HA	2.4	Jarocka i wsp., 2015
GCE/AuPd/Ab/BSA	DPV	wirus grypy	0.43	Yang i wsp., 2015
GCE/EDA/AG/Ab/BSA	LSV	H7N9	6.8	Wu i wsp., 2015
Au/TBBT/AuC/scFv/BSA	EIS	His ₆ -Qinghai	0.6	Jarocka i wsp., 2016

Skróty: Au – elektroda złota; Ab – przeciwciało; 16-MHA – kwas 16-merkaptotekstadekanowy; OT – oktanotiol; BDDT – biotynylowany dodekanotiol; NV – neutrawidyna; Con A – konkanawalina A; HRP – peroksydaza chrzanowa; BSA – surowicza albumina bydłęca; DPV – woltamperometria pulsowa różnicowa; Fab⁷ – fragmenty przeciwciał wiążących; GCE – elektroda z węgla szklistego; SA – kwas sialowy; OGaL – oktylogalaktozyd; AuPd – nanocząsteczki złota i palladu; AuC – złoto koloidalne; EDA – etylenodiamina; AG – aldehyd glutarowy, LSV – woltamperometria liniowa, TBBT – 4,4'-tiobisbenzenotiol, scFv – pojedynczy łańcuch zmiennego fragmentu przeciwciał, HDT – 1,6-heksanoditiol, His₆-Qinghai – histagowane odmiany (warianty) rekombinowanej hemaglutyniny, MCB – merkaptobutanol, DPM – dipirometen, HA – hemaglutynina

GenoczuJNIKI zawierają w warstwie analitycznie aktywnej sondy DNA pozwalające na wykrywanie specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych. Istotą działania genoczuJNIków, będących tematem tej rozprawy, jest oddziaływanie sekwencji DNA lub DNA/RNA między sobą, czyli reakcja hybrydyzacji. Jest to zjawisko spontanicznego parowania się zasad pochodzących z różnych nici kwasów nukleinowych. Może zachodzić pomiędzy dwiema cząsteczkami DNA, RNA lub DNA i RNA, o całkowitej lub częściowej komplementarności. W literaturze naukowej można spotkać bardzo zróżnicowane przykłady genoczuJNIków przeznaczonych do wykrywania specyficznych sekwencji DNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1.

Przykłady przedstawiono w *Tabeli 10*. Dokładniej temat ten zostanie omówiony w dalszej części rozprawy.

Za pomocą genoczuJNIKÓW można wykrywać wirusy bardziej specyficZnie i z lepszą czułością niż za pomocą immunoczuJNIKÓW, które z kolei są szybsze i bardziej niezawodne (Qasim i wsp., 2014).

W literaturze naukowej przedstawione są również doniesienia opisujące zastosowanie optycznych (Bai i wsp., 2012; Suenaga i wsp., 2012; Wang i wsp., 2013; Diltemiz i wsp., 2013) i masowych (Brockman i wsp., 2013; Takahashi i wsp., 2013; Wang i Li, 2013; Wangchareansak i wsp., 2013) bioczuJNIKÓW do wykrywania wirusa ptasiej grypy, które jednak są w zdecydowanej mniejszości w przeciwieństwie do bioczuJNIKÓW elektrochemicznych.

3. Rodzaje bioczuJNIKÓW elektrochemicznych zaprezentowanych w niniejszej rozprawie

W niniejszej rozprawie skonstruowano dwa typy elektrochemicznych genoczuJNIKÓW: typu kanału jonowego oraz oparty o warstwę redoks-aktywną. W związku z tym na nich skupiono się w opracowaniu teoretycznym.

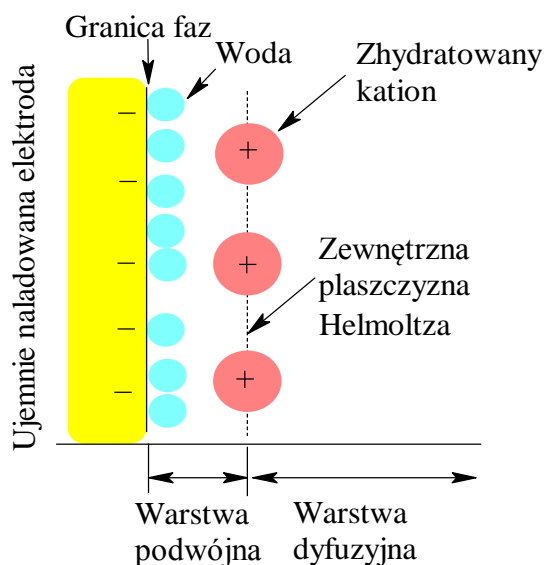
3.1. Czujniki typu kanału jonowego

Inspiracją do powstania czujnika typu kanału jonowego były procesy kanałowego transportu jonów przez błony biologiczne. Upraszczając, mechanizm tego transportu polega na selektywnej reakcji pomiędzy analitem a elementem rozpoznającym. Następstwem tego procesu jest otwarcie kanału membranowego umożliwiające przepływ przez błonę komórkową wielu neutralnych cząsteczek bądź jonów. Proces ten był wzorcem do powstania specyficznego biomimetycznego czujnika amperometrycznego zwanego czujnikiem jonokanałowym (Umezawa i Aoki, 2004).

Działanie tego czujnika jest oparte na reakcjach analitu z elementem rozpoznającym znajdującym się na powierzchni elektrody. W wyniku tej reakcji zmienia się dostępność przy powierzchni elektrody dla jonów lub cząsteczek znacznika redoks-aktywnego. Znacznikami redoks mogą być cząsteczki bądź jony ulegające reakcji utlenienia lub redukcji na powierzchni elektrody, neutralne chemicznie zarówno w stosunku do analitu, jak i elementu rozpoznającego (Delgado i wsp., 2005). Warstwę analitycznie aktywną w tego typu czujnikach otrzymuje się poprzez chemiczną modyfikację powierzchni elektrod stałych, najczęściej złotych, odpowiednią liczbą warstw monomolekularnych o właściwościach rozpoznających.

Czujnik elektrochemiczny typu kanału jonowego przekształca zjawisko rozpoznania międzycząsteczkowego pomiędzy analitem a elementem rozpoznającym na zmianę szybkości przeniesienia elektronów między powierzchnią elektrody a znacznikiem redoks-aktywnym. Proces rozpoznania międzycząsteczkowego odpowiedzialnego za analityczną aktywność czujnika zachodzi na granicy faz elektroda-roztwór. Nieodłącznym elementem tego mechanizmu jest przekraczanie warstwy podwójnej na granicy faz zarówno przez analit, jak i jony znacznika ulegające elektrodowej reakcji utlenienia-redukcji (Thévenot i wsp., 1999). Tworzenie granicy faz

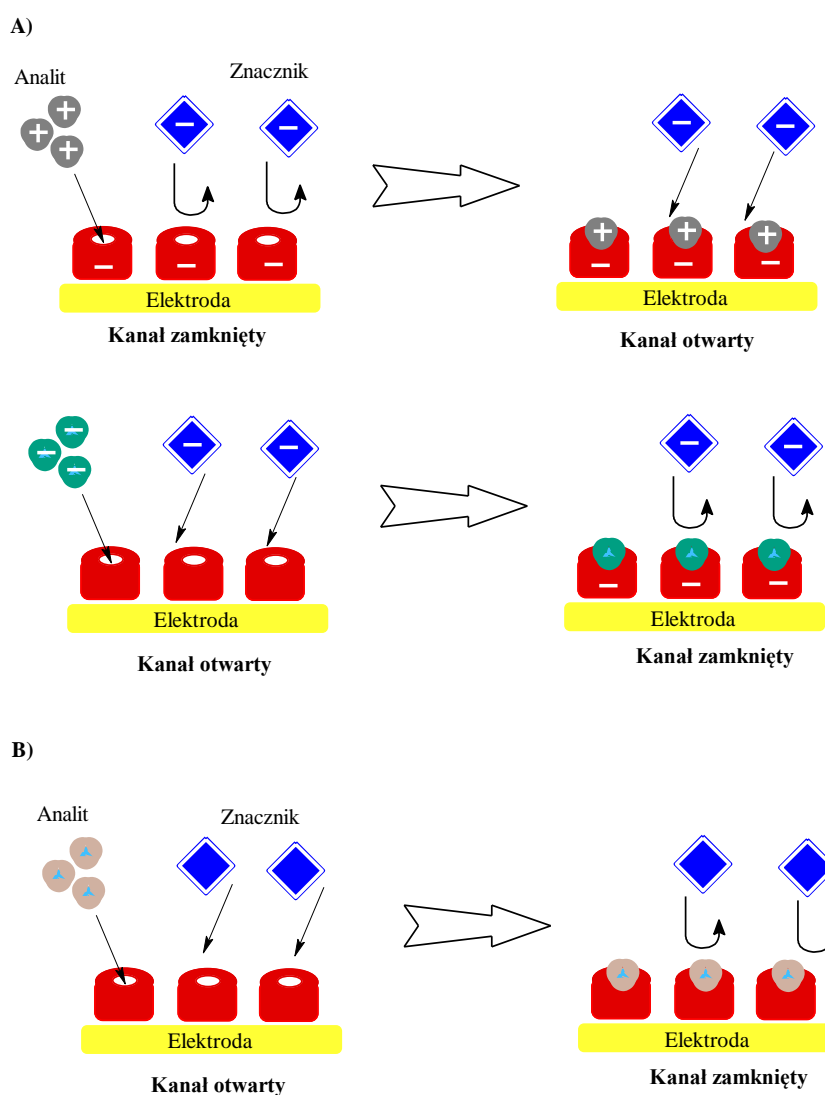
pomiędzy fazą stałą (elektroda) a ciekłą (roztwór analitu), powoduje załamanie symetrii układu, nawet w przypadku gdy dwie fazy w kontakcie są całkowicie homogeniczne i izotropowe. Cząsteczki na granicy faz są poddawane różnym oddziaływaniom wypadkowym w dwóch kierunkach prostopadłych do powierzchni granicznych. Efektem tego zjawiska jest różnica w energiach cząsteczek na granicy faz i wewnątrz fazy. Obszar po każdej stronie granicy faz, gdzie energia cząsteczek na granicy faz i wewnątrz fazy jest różna nazywa się obszarem międzyfazowym. Grubość tego obszaru zależy od składu chemicznego poszczególnych faz. Gdy jedną z nich stanowi roztwór zawierający cząsteczki naładowane elektrycznie, wówczas obszar międzyfazowy może rozciągać się do miejsca, gdzie oddziaływania elektrostatyczne między ładunkami maleją liniowo ze wzrostem odległości. Przykładem takiego zachowania jest dyfuzyjna warstwa podwójna schematycznie przedstawiona na *Rysunku 14*.



Rysunek 14. Schemat podwójnej warstwy elektrycznej na granicy faz elektroda/ roztwór wodny

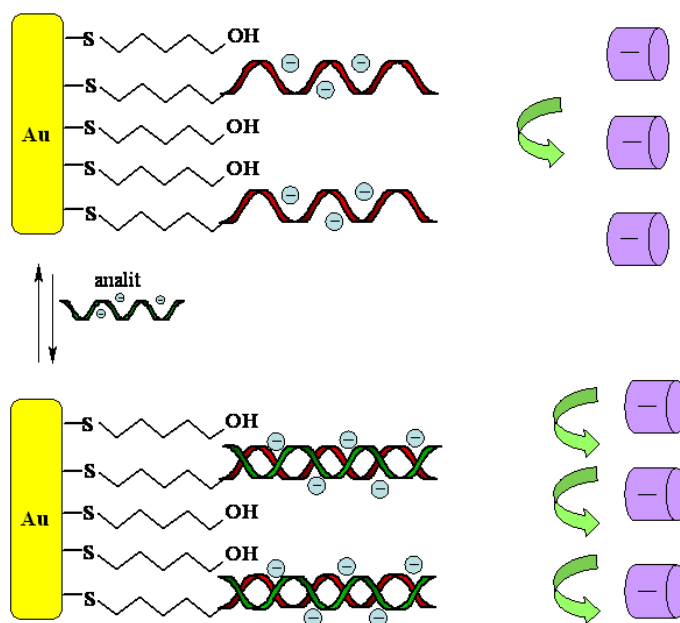
Ze względu na rodzaj oddziaływań element rozpoznający-analit występują dwa typy jonokanałowych czujników elektrochemicznych: międzycząsteczkowe oraz wewnątrzcząsteczkowe (Sugawara i wsp., 1987). W przypadku czujników działających w oparciu o mechanizm międzycząsteczkowy, oddziaływanie pomiędzy warstwą analitycznie aktywną a analitem polega na elektrostatycznym przyciąganiu bądź

odpychaniu jonów znacznika elektroaktywnego przez kompleks element rozpoznający-analit (*Rysunek 15A*). W rezultacie ulegają one łatwiej lub trudniej reakcji redoks przy powierzchni elektrody. Natomiast czujniki wewnątrzcząsteczkowe (*Rysunek 15B*) to takie, w których oddziaływanie element rozpoznający-analit prowadzi do utworzenia inkluzyjnych kompleksów, uniemożliwiając przedostawanie się jonów znacznika do powierzchni elektrody. W obu przypadkach istotny jest fakt, że rozpoznanie międzycząsteczkowe przebiegające na powierzchni elektrody można zaobserwować dzięki zmianie kinetyki elektrodowej reakcji redoks (Kisza, 2001).



Rysunek 15. Schemat: A) „międzycząsteczkowego” czujnika typu kanału jonowego oraz B) „wewnątrzcząsteczkowego” czujnika typu kanału jonowego.

Na *Rysunku 16* przedstawiono schemat działania mechanizmu jonokanałowego na przykładzie genocujnika. W warunkach pomiarowych (pH 7.4) jednoniciowa sonda DNA unieruchomiona na elektrodzie występuje w postaci ujemnie naładowanej cząsteczki. Warstwa utworzona na powierzchni elektrody jest quasi-przepuszczalna dla ujemnie naładowanych jonów znacznika redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ znajdującego się w wodnym roztworze pomiarowym. Po procesie hybrydyzacji z sekwencją komplementarną tworzy się helisa DNA (dwuniciowy kompleks). Powoduje to zwiększenie ujemnego ładunku na powierzchni elektrody. Elektrostatyczne odpychanie pomiędzy ujemnie naładowaną warstwą a jonami znacznika redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ hamuje przedostawanie się znacznika do powierzchni elektrody. Prowadzi to do zmniejszenia szybkości przeniesienia elektronów pomiędzy znacznikiem a powierzchnią elektrody przez warstwę modyfikacyjną. Konsekwencją tego zjawiska jest obniżenie natężenia prądu piku w technice SWV i wzrost oporu przeniesienia elektronu w technice EIS po procesie hybrydyzacji.

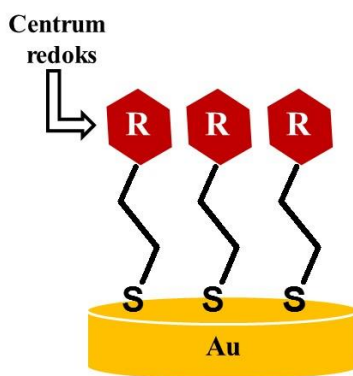


Rysunek 16. Schemat działania mechanizmu jonokanałowego na przykładzie genocujnika.

3.2. Czujniki oparte o warstwy redoks-aktywne

Zastosowanie warstw redoks-aktywnych do konstrukcji bioczujników stanowi stosunkowo nowy trend w rozwoju tych narzędzi pomiarowych. Warstwy elektroaktywne wykazują liczne zalety w porównaniu do warstw nieposiadających centrów redoks. Główną ich zaletą jest brak konieczności stosowania zewnętrznego znacznika elektroaktywnego. Sygnał analityczny generowany jest w procesach utleniania i redukcji centrów redoks-aktywnych znajdujących się w warstwie modyfikującej elektrodę. Takie warstwy mogą służyć jako przetwornik oraz/lub analitycznie aktywny składnik. Ścisłe upakowanie związków tiolowych na powierzchni elektrody złotej zapobiega przesuwaniu się centrów redoks-aktywnych w kierunku powierzchni elektrody oraz w kierunku defektów w SAMs. Dlatego prąd faradajowski spowodowany reakcją redoks przebiegającą na lub w pobliżu niedoskonałości SAMs staje się nieistotnym składnikiem całkowitego prądu faradajowskiego. Dzięki temu rejestrowany sygnał analityczny nie jest zakłócany.

Warstwy elektroaktywne można otrzymać metodą kowalencyjną, w której cząsteczki zawierające w swej budowie centra elektroaktywne są bezpośrednio osadzone na powierzchni elektrod poprzez utworzenie wiązania kowalencyjnego S-Au (Eckermann i wsp., 2010) – *Rysunek 17*.



Rysunek 17. Schemat idealnie zorganizowanej warstwy elektroaktywnej.

Elektroaktywne SAMs wykazują odwracalne właściwości elektrochemiczne w przypadku, gdy prąd jest mierzony z odpowiednio małą szybkością zmian potencjału, ponieważ wtedy odpowiedź kontrolowana jest przez czynniki termodynamiczne, a nie przez czynniki kinetyczne. Dyfuzja również nie ma wpływu na procesy utleniania

i redukcji, ze względu na unieruchomienie centrów elektroaktywnych na powierzchni elektrody (Hepel i Zhong, 2012).

Dla powierzchni elektrod zmodyfikowanych elektroaktywną SAMs prąd faradajowski jest opisany następującym równaniem (Finklea, 1996):

$$I = \frac{4I_p e^\Gamma}{(1+e^\Gamma)^2} \quad (2)$$

gdzie I_p oznacza natężenie prądu w voltamperometrii cyklicznej, które wyrażone jest za pomocą równania:

$$I_p = \frac{n^2 F^2 A_e \Gamma v}{4RT_m} = \frac{nFA_e \Gamma v}{4RT_m} \quad (3)$$

gdzie n - oznacza liczbę elektronów biorących udział w reakcji półkowej,

F - to stała Faradaya,

A_e - oznacza powierzchnię elektrody,

Γ - oznacza stopień pokrycia powierzchni elektrody [mol/cm²],

R - to stała gazowa,

T_m - jest to temperatura,

v - oznacza szybkość zmian potencjału.

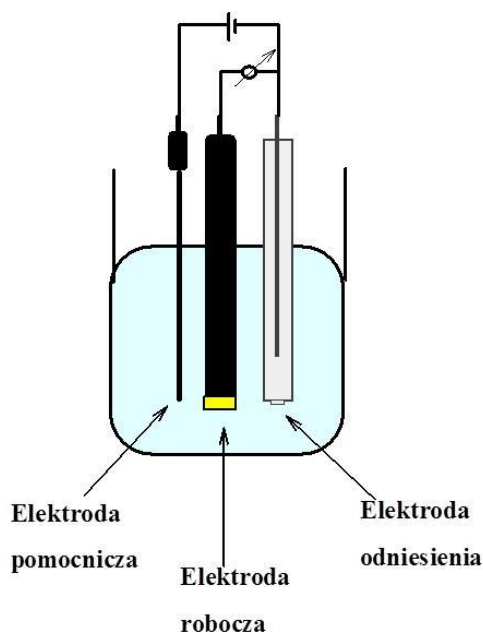
Z równania (3) wynika, iż natężenie prądu piku I_p jest proporcjonalne do szybkości zmian potencjału v .

Różnica pomiędzy pikiem anodowym (utleniania) i katodowym (redukcji) (ΔE) teoretycznie jest równa zero dla powierzchni pokrytych cząsteczkami elektroaktywnymi. W praktyce jednak obserwuje się małe wartości ΔE , które spowodowane są szczątkowym nieskompensowanym oporem i/lub wzajemnymi oddziaływaniami pomiędzy centrami redoks-aktywnymi. Idealne voltamogramy cykliczne dla elektroaktywnych SAMs na powierzchni elektrod powinny być symetryczne z szerokością w połowie wysokości równą $90.6/n$ mV w temperaturze 25°C.

4. Charakterystyka technik pomiarowych stosowanych w niniejszej rozprawie

4.1. Układ pomiarowy

Obecnie najczęściej wykonuje się pomiary amperometryczne w układzie trójelektrodowym z elektrodą roboczą (wskaźnikową), elektrodą odniesienia (referencyjną) i elektrodą pomocniczą (przeciwelektrodą) – *Rysunek 18*. Układ taki wymaga zastosowania urządzenia zwanego potencjostatem, który pozwala na polaryzację elektrody roboczej i pomiar prądu przez nią płynącego. W układzie trójelektrodowym prąd płynie między elektrodą roboczą a pomocniczą, która służy do zamknięcia obwodu elektrycznego. Elektroda odniesienia zapewnia stałą wartość potencjału. W celu zmniejszenia oporu roztworu między elektrodą roboczą a odniesienia, umieszcza się je bardzo blisko siebie. W pomiarach używa się elektrod pomocniczych o dużo większej powierzchni niż elektroda robocza, w celu zwiększenia powierzchni przeniesienia elektronów w reakcjach zachodzących na powierzchni elektrody roboczej.



Rysunek 18. Schemat naczynka pomiarowego z konfiguracją trzech elektrod stosowanego w pomiarach.

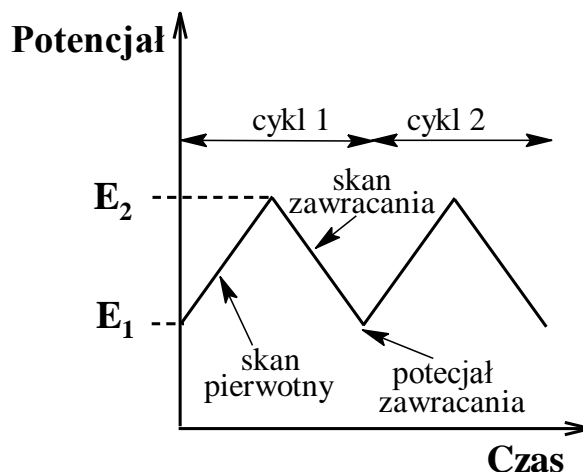
Elektrody robocze w technikach elektrochemicznych mogą być wykonane z różnych materiałów. Materiały obecnie najpowszechniej wykorzystywane do produkcji elektrod roboczych obejmują: złoto, platynę, węgiel szklisty, grafit pirolityczny oraz półprzewodniki, np. tlenki cyny czy indu. Elektroda odniesienia powinna charakteryzować się dobrze znanym i stabilnym potencjałem elektrodowym. Najczęściej stosowane z uwagi na prostotę użycia (w przeciwieństwie do standardowej elektrody wodorowej) i stabilność potencjału są elektrody kalomelowa i chlorosrebrowa. Elektrody pomocnicze są wykonane z materiałów obojętnych elektrochemicznie, takich jak złoto, platyna czy węgiel (Kisza, 2001).

Pomiary woltamperometryczne prowadzi się w roztworze elektrolitu podstawowego (są to najczęściej sole, np. KCl, Na₂SO₄, KClO₄, KNO₃) o wysokim stężeniu w celu wyeliminowania wpływu migracji jonów na procesy elektrodowe.

4.2. Woltamperometria cykliczna (z ang. *Cyclic Voltammetry, CV*)

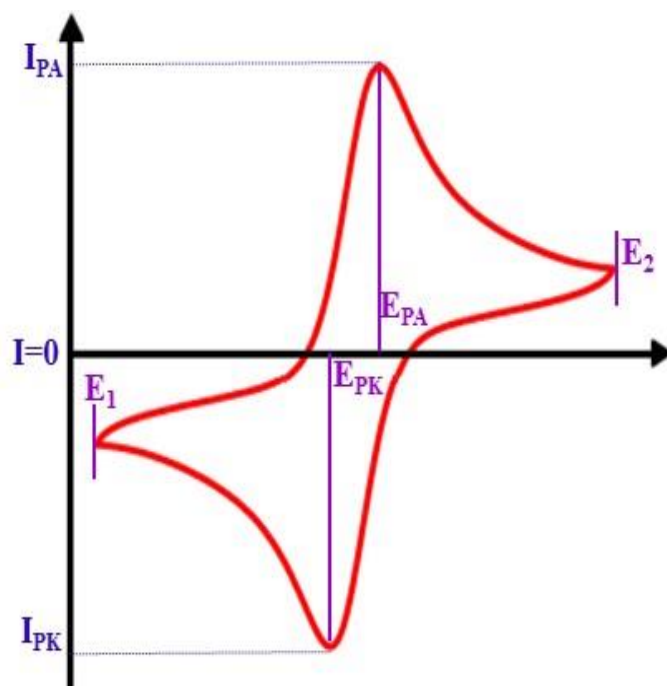
Terminem woltamperometria określa się metody elektroanalityczne, w których natężenie prądu płynącego przez elektrodę polaryzowaną – roboczą o stałej powierzchni zależy od potencjału tej elektrody w czasie. Krzywa opisująca zależność prąd – potencjał, zwana krzywą woltamperometryczną, przybiera kształt piku. Dostarcza ona również informacji o ilościowym i jakościowym składzie analizowanego roztworu (Cygański, 1995; Skoog i Leary, 1992). W woltamperometrii cyklicznej oprócz prądu faradajowskiego, związanego z procesami utlenienia i redukcji, rejestruje się także prąd pojemnościowy. Eliminacja prądu pojemnościowego występuje natomiast w technikach impulsowych, w których prąd jest mierzony podczas przebiegu cyklu fali prostokątnej dwukrotnie (Wang i wsp., 2006; Zajt, 2001; Osteryoung i Osteryoung, 1985).

W technice woltamperometrii cyklicznej do elektrody roboczej przykładany jest potencjał zmieniający się liniowo w ustalonych granicach od wartości E_1 do E_2 i z powrotem do E_1 , ze stałą szybkością. Na *Rysunku 19* przedstawiona została zmiana potencjału w czasie.



Rysunek 19. Zmiany potencjału elektrody w czasie w woltamperometrii cyklicznej.

Elektroda robocza polaryzowana jest potencjałem narastającym i opadającym o wartości zawartej w przedziale między potencjałem początkowym E_1 i końcowym E_2 . Można więc wyróżnić przebieg pierwotny i powrotny. Przy podwyższeniu potencjału od wartości E_1 do E_2 zachodzi utlenianie substancji i pojawia się na krzywej woltamperometrycznej pik prądu anodowego (I_{PA}). Natomiast przy potencjale E_2 następuje odwrócenie kierunku polaryzacji elektrody, a produkt anodowego utleniania ulega katodowej redukcji i tworzy się pik prądu katodowego (I_{PK}). W rezultacie na krzywej woltamperometrycznej odwracalnego procesu dyfuzyjnego pojawiają się dwa piki – utlenienia oraz redukcji, co jest pokazane na *Rysunku 20*. Cykl potencjałowy może być powtarzany dowolną liczbę razy. Potencjał, przy którym następuje zmiana kierunku polaryzacji nazywamy potencjałem zawracania (Bard i Faulkner, 2001).



Rysunek 20. Cykliczna krzywa voltamperometryczna dla układu odwracalnego, I_{PA} , E_{PA} – natężenie prądu i wartość potencjału piku anodowego; I_{PK} , E_{PK} – natężenie prądu i wartość potencjału piku katodowego.

Istotnymi parametrami opisującymi pik jest potencjał piku E_p oraz wielkość prądu piku I_p . Wielkość piku prądu dla procesu odwracalnego w voltamperometrii opisana jest równaniem Randlesa – Ševčika (Galus, 1997):

$$I_p = 2.72 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A_e \cdot \nu^{1/2} \cdot D^{1/2} \cdot C^0 \quad (4)$$

gdzie: I_p [A] – prąd piku utlenienia, n – liczba elektronów biorących udział w reakcji elektrodowej, A_e [cm²] – powierzchnia elektrody, ν [V/s] – szybkość zmian potencjału, D [cm²/s] – współczynnik dyfuzji, C^0 [M] – stężenie depolaryzatora w głębi roztworu.

Różnica między potencjałem piku katodowego (E_{PK}) i anodowego (E_{PA}) zależy od odwracalności procesu elektrodowego, w przypadku procesu odwracalnego w temperaturze $T_m = 25^\circ\text{C}$ wynosi ona:

$$|E_{PA} - E_{PK}| = 2.22 \frac{RT_m}{nF} = \frac{0.057}{n} \quad (5)$$

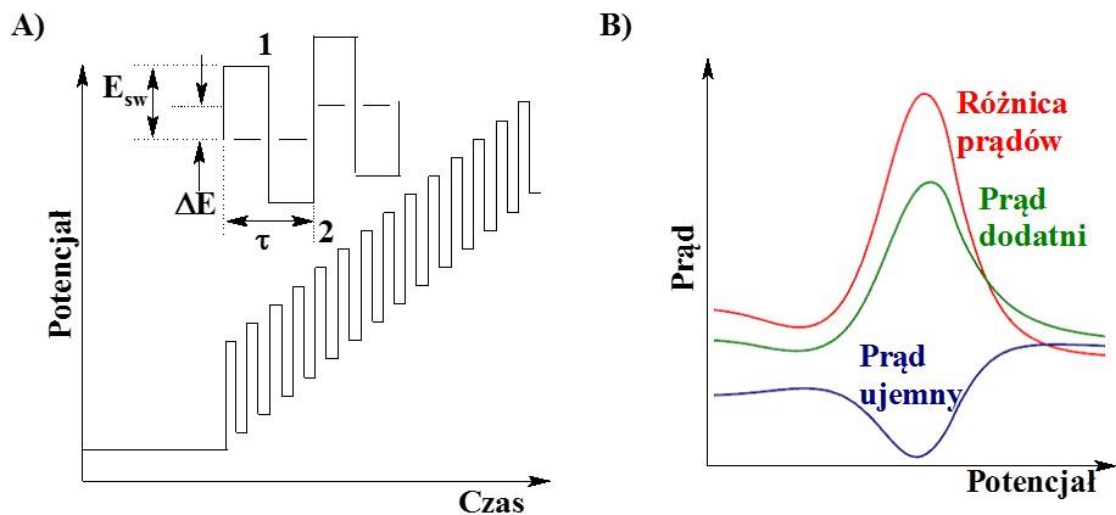
gdzie: $R = 8.31447$ J/mol·K – stała gazowa, $F = 96485.3$ C/mol – stała Faradaya (Szymczyk i wsp., 2003).

Woltamperometria cykliczna znajduje szerokie zastosowanie w badaniu reakcji chemicznych, a zwłaszcza procesów elektrodowych. Jest dobrą metodą do badania mechanizmów procesów związków nieorganicznych oraz pojemności warstwy podwójnej (Cygański, 1995; Szczepaniak, 1985).

4.3. Woltamperometria fali prostokątnej (z ang. *Square Wave Voltammetry, SWV*)

Woltamperometria fali prostokątnej odznacza się wieloma zaletami w porównaniu z innymi technikami. Jest to metoda pozwalająca na wykonywanie szybkich i precyzyjnych pomiarów (Skoog i wsp., 2007). SWV jest techniką pulsową, która w znacznym stopniu umożliwia zmniejszenie w otrzymanywanym sygnale udziału prądu pojemnościowego (efekt ładowania się warstwy podwójnej na granicy faz powierzchnia elektrody/roztwór), który może zakłócić wyniki prowadzonych badań (Scholz, 2010). Jest to możliwe dzięki połączeniu pulsów fali prostokątnej oraz schodkowo zmieniającego się potencjału. Natężenie prądu jest mierzone dwukrotnie pod koniec trwania pulsów, w związku z tym wypadkowym sygnałem jest różnica obu uzyskiwanych prądów, a wartość mierzonego prądu jest większa niż każdej składowej.

SWV jest techniką różnicową, w której na schodkowo zmieniający się potencjał nałożone są symetryczne impulsy prostokątne (fala prostokątna) (*Rysunek 21A*). Tak zmieniający się potencjał przyłożony jest do elektrody roboczej. Prąd jest próbkowany dwukrotnie podczas każdego cyklu prostokątnego, na końcu impulsu pierwotnego (dodatniego) *Rysunek 22A* (punkt 1) i na końcu impulsu powrotnego (ujemnego) *Rysunek 22A* (punkt 2). W przypadku dużych wartości amplitudy fali prostokątnej, impuls powrotny powoduje odwrotną reakcję produktu impulsu pierwotnego, czyli ponowne utlenienie produktu powstałego podczas impulsu dodatniego, powodując przepływ prądu. Uzyskujemy wówczas prąd wypadkowy będący różnicą między prądem dodatnim a ujemnym. Wykres zależności prądu wypadkowego od potencjału przybiera kształt piku symetrycznego względem potencjału półfali (*Rysunek 22B*).



Rysunek 21. A) sygnał pobudzający w woltamperometrii fali prostokątnej; B) prąd dodatni (utlenienia), ujemny (redukcji) i różnica prądów.

Wartość natężenia prądu piku określa w przybliżeniu równanie Barkera (Zajt, 2001):

$$I_p = kn^2 E_{sw} \sqrt{DC^0}, \quad (6)$$

gdzie:

E_{sw} – amplituda fali prostokątnej,

k – stała charakteryzująca układ elektrod

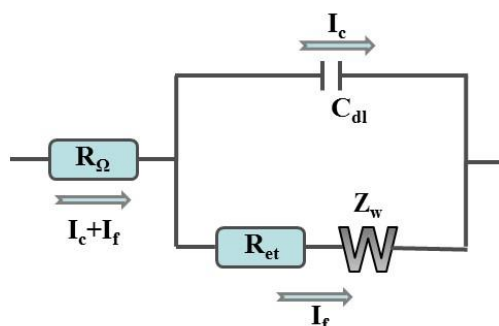
Z powyższego równania wynika, że natężenie prądu piku jest proporcjonalne do amplitudy napięcia prostokątnego oraz do stężenia cząstek elektroaktywnych.

Metoda woltamperometrii fali prostokątnej jest techniką bardzo czułą, co wynika z faktu, iż pozwala na efektywną eliminację wpływu prądu pojemnościowego na wynik pomiaru poprzez pomiar natężenia prądu pod koniec trwania impulsu. Dlatego metodę tę można stosować do oznaczeń śladowych ilości substancji, np. metali w stopach, odczynnikach chemicznych, produktach żywnościowych i rudach, itp.

4.4. Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (z ang. *Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS*)

Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna jest techniką elektrochemiczną, w której biegnący proces elektrodowy: $\text{Red} \Leftrightarrow \text{Ox} + ne$, jest zaburzany prądem zmiennym. Jako odpowiedź elektrody roboczej rejestrowana jest impedancja przy danej częstotliwości. Pomiaru impedancji elektrody roboczej dokonuje się przy potencjale półfali procesu utleniania i redukcji dla związku elektroaktywnego obecnego w roztworze elektrolitu. W związku z tym naczynko pomiarowe powinno posiadać układ trójelektrodowy.

Układ trójelektrodowy można przedstawić za pomocą obwodu zastępczego złożonego z oporników i kondensatorów, przez który będzie przepływał prąd o takiej samej amplitudzie i fazie jak w obwodzie rzeczywistym. Typowym obwodem zastępczym celki jest obwód Randlesa przedstawiony na *Rysunku 22*. Występują w nim elementy połączone równolegle, ponieważ całkowity prąd na granicy faz roztwór wodny/elektroda robocza jest sumą natężenia prądu związanego z procesem faradajowskim I_f i natężeniem prądu ładowania warstwy podwójnej I_c . Pojemność warstwy podwójnej w wielu przypadkach posiada właściwości odpowiadające czystej pojemności, dlatego jest ona reprezentowana w obwodzie zastępczym przez element C_{dl} . Prąd przepływa przez nieskompensowany opór roztworu (rezystancję omową) R_Ω , więc element ten jest połączony szeregowo z pozostałymi składnikami obwodu zastępczego. Proces faradajowski jest procesem bardziej złożonym i można go przedstawić za pomocą wydzielonego oporu przeniesienia elektronu R_{et} i impedancji związanej z przeniesieniem masy Z_w (impedancja Warburga).



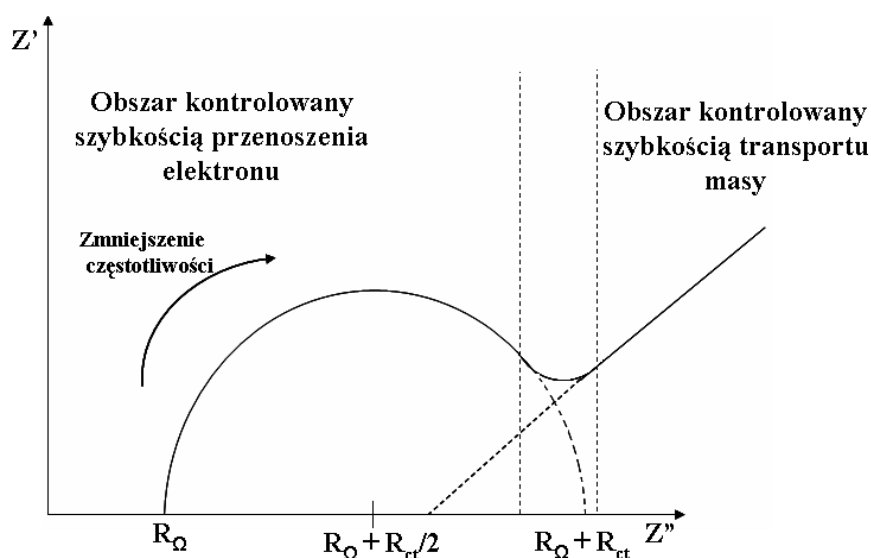
Rysunek 22. Obwód zastępczy naczynka elektrochemicznego złożony z następujących elementów: R_Ω – opór roztworu, R_{et} – opór przeniesienia elektronu, Z_w – element Warburga, C_{dl} – pojemność warstwy podwójnej, I_c – prąd ładowania pojemności warstwy podwójnej, I_f – prąd faradajowski.

Każda impedancja jest wielkością zespoloną, tj. składa się z części rzeczywistej Z' i urojonej Z'' (Kisza, 2001):

$$Z = Z' - iZ'', \quad (7)$$

gdzie $i = \sqrt{-1}$ jest jednostką urojoną.

Przy charakteryzowaniu procesów chemicznych najbardziej użyteczną formą prezentacji widma impedancyjnego jest wykres Nyquista (Rysunek 23). Otrzymuje się go przedstawiając wartości impedancji urojonej (Z'') w funkcji impedancji rzeczywistej (Z').



Rysunek 23. Wykres impedancji dla trójelektrodowego systemu elektrochemicznego. Obszary związane z przenoszeniem ładunku i transportem masy dotyczą odpowiednio zakresu wysokich i niskich częstotliwości.

Typowy kształt wykresu Nyquista składa się z półokręgu i linii prostej. Fragment o kształcie półokręgu obserwuje się przy wyższych częstotliwościach, co odpowiada procesowi ograniczonemu szybkością przeniesienia elektronu przez warstwę podwójną. Natomiast część liniowa wykresu, charakteryzująca zakres niższych częstotliwości, reprezentuje reakcję elektrochemiczną kontrolowaną szybkością przenoszenia masy, czyli procesem dyfuzji. W przypadku reakcji z szybkim przeniesieniem elektronu widmo impedancyjne może składać się jedynie z części liniowej, natomiast w wypadku bardzo wolnego przeniesienia ładunku – wyłącznie z półokręgu. Z powstałego wykresu można odczytać, jakie procesy decydują o charakterystyce badanego układu. Przy wysokich częstotliwościach na wartość impedancji wpływa przede wszystkim wartość

oporu przeniesienia elektronu na granicy faz elektroda robocza/roztwór. Z kolei przy niskich częstotliwościach na ostateczną wartość impedancji wpływa głównie impedancja Warburga, charakterystyczna dla procesów elektrodowych kontrolowanych dyfuzją (Lasia i wsp., 1999).

W przypadku zastosowania tej techniki wzrost nieodwracalności reakcji (wolniejsze przeniesienie elektronu) powoduje zwiększenie się średnicy obserwowanych okręgów i zmniejszenie się obszaru liniowego widma. Pomiar impedancji w pełnym zakresie częstotliwości informuje o obu rodzajach procesów (Pejčić i De Marco, 2006).

EIS jest bardzo czułą i stosunkowo mało inwazyjną techniką pozwalającą na pomiar pojemności elektrycznej warstwy podwójnej i oporu przeniesienia elektronu przez warstwę podwójną do powierzchni elektrody roboczej. W połączeniu z innymi technikami elektrochemicznymi stanowi cenne źródło informacji charakteryzujące budowany bioczuJNIK (Daniels i Pourmand, 2008). Analiza impedancyjna dostarcza informacji na temat granicy faz, jej struktury i procesów tam zachodzących (Lasia i wsp., 1999).

CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA

*„Nauka jest niezmiernym morzem dobrej wody.
Im więcej jej pijesz, tym bardziej jesteś spragniony.”*

- Autor nieznany

5. Odczynniki i materiał biologiczny

5.1. Odczynniki

Odczynniki zakupione w firmie Sigma-Aldrich (Poznań, Polska):

- ✚ 6-merkaptohexan-1-ol (6-MCH),
- ✚ 11-merkaptoundekan-1-ol (11-MUA),
- ✚ acetonitryl (AN),
- ✚ azyd sodu (NaN_3),
- ✚ chlorek aminotaniolu (AET),
- ✚ chlorek magnezu (MgCl_2),
- ✚ chlorek potasu (KCl),
- ✚ chlorek sodu (NaCl),
- ✚ chlorek żelaza (II) i (III) (FeCl_2 i FeCl_3),
- ✚ diwodorofosforan potasu (KH_2PO_4),
- ✚ etanoloamina (ETA),
- ✚ heksacyjanożelazian (II i III) potasu ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ i $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$),
- ✚ kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA),
- ✚ kwas 2-morfolinoetanosulfonowy (MES),
- ✚ kwas trifluoroctowy (TFA),
- ✚ N-(3-dimetyloaminopropyl)-N'-etylokarbodiimid (EDC),
- ✚ N-hydroksysukcynimid (NHS),
- ✚ wodorofosforan disodu (Na_2HPO_4),
- ✚ woda sterylna wolna od nukleaz

Odczynniki zakupione w firmie POCh (Gliwice, Polska):

- ✚ etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$),
- ✚ kwas siarkowy (VI) (H_2SO_4),
- ✚ metanol (CH_3OH),
- ✚ woda amoniakalna ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$),
- ✚ 30% woda utleniona (H_2O_2),
- ✚ wodorotlenek potasu (KOH),
- ✚ wodorotlenek sodu (NaOH),

Zawiesina tlenku glinu (alumina) o rozmiarze ziaren 0.3 oraz 0.05 μm została zakupiona w firmie Buehler (Lake Bluff, USA).

5,6-epoksy-5,6-dihydro-[1,10]-fenantrolinę zsyntetyzowano na Wydziale Chemii Katolickiego Uniwersytetu w Leuven (Belgia), w laboratorium prof. Wima Dehaena.

Odczynniki te zostały wykorzystane do sporządzenia szeregu roztworów podstawowych, które następnie posłużyły do przygotowania roztworów modyfikacyjnych, buforowych oraz próbek na poszczególnych etapach eksperymentów.

Roztwory te to:

- 10 mM PBS: 10 mM KH_2PO_4 , 1.8 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl , 2.7 mM KCl , + 2.5 mM MgCl_2 , pH 7.4

- 10 mM PBS: 10 mM KH_2PO_4 , 1.8 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl , 2.7 mM KCl , pH 7.4

- 1 M bufor fosforanowy $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 1 M NaCl + 5 mM MgCl_2 + 1 mM EDTA, pH 6.57

- 50 mM PBS: 50 mM KH_2PO_4 , 9 mM Na_2HPO_4 , 685 mM NaCl , 13.5 mM KCl + 5 mM MgCl_2 , pH 7.4

Wszystkie wodne roztwory przygotowano przy użyciu sterylnej wody dejonizowanej. Wodę dejonizowaną o oporności $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ otrzymywano przy pomocy systemu HLP smart 1000 (LABART, Polska) a następnie za pomocą systemu Simplicity® 185 Water System (Millipore, Francja).

Eksperymenty przeprowadzono w temperaturze pokojowej, chyba, że zaznaczono inaczej.

5.2. Materiał biologiczny

5.2.1. Sekwencje DNA

Zmodyfikowaną odpowiednio grupą tiolową i aminową specyficzną sekwencję oligonukleotydów pochodzącą od wirusa ptasiej grypy typu H5N1 (pojedyncza nić DNA – ssDNA) – 5'-SH-(CH₂)₆-CCT CAA GGA AGA AGA GAG AG-3' oraz 5'-NH₂-(CH₂)₆-CCT CAA GGA AGA AGA GAG AG-3' zastosowano jako sondę (o nazwie odpowiednio SH-NC3 i NH₂-NC3), którą unieruchamiano na powierzchni elektrod złotych. Dwie niezmodyfikowane sekwencje oligonukleotydów c-NC3 (5'-CTT CTT CCT TGA CTC TCT GG-3') i nc-NC3 (5'-GGA GTT CCT TCA TCA CTC TC-3') użyto odpowiednio, jako komplementarną i niekomplementarną. Oligonukleotydy były dostarczone przez firmę Biomers (Niemcy). Sekwencje specyficzne, zarówno elementu rozpoznającego, jak i analitu zostały wybrane przez współpracowników z Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Materiał biologiczny w postaci dwuniciowych produktów PCR i sekwencji RNA został przygotowany przez laboratorium prof. Agnieszki Sirko z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN. Region komplementarny do sondy (SH-NC3) znajduje się na końcu 3' produktu PCR1, na końcu 5' produktu PCR2 oraz na środku (83-103 pz) PCR3. We fragmencie PCR4 nie ma sekwencji komplementarnej do SH-NC3. Całkowita długość poszczególnych fragmentów DNA wynosi kolejno 181 pz, 179 pz, 180 pz i 183 pz dla PCR1, PCR2, PCR3 i PCR4.

5.2.2. Sekwencje RNA

Stosowane sekwencje nukleotydowe transkryptów RNA są przedstawione poniżej. We wszystkich przypadkach jest to nić ujemna, jak w materiale genetycznym wirusa. Fragmenty komplementarne do sondy NC3 są zaznaczone na czerwono:

✚ RNA1 (283 nt)

5'-GAAUACUCAAGCUAUGCAUCCAACGCGUUGGGAGCUCUCCCAUAUGGU
CGACCUGCAGGCGGCCGCGAAUUCACUAGUGAUUCUUCUUCUCUCUCCUU
GAGGGCUAUUUCUGAGCCCAGUCGCAAGGACUAAUCUGUUUGAUUUCAC
AUAUUUGGGGCAUUCCCCGAUUGGUGAGAGGGUGGAUGUUUGUGGAAUGGC
AUACUAGAGUUUAUCGCCCCUAUUGGAGUUUGACACUUGGUGUUGCAGU
UACCAUAUCCAAUUCACAAUCGAAUUCCCGCGGCCGC-3'

✚ RNA2 (281 nt)

5'-GAAUACUCAAGCUAUGCAUCCAACGCGUUGGGAGCUCUCCCAUAUGGU
CGACCUGCAGGCGGCCGCGAAUUCACUAGUGAUUUUGGUGACUCCAUCUA
UUGCCUUUUGAGUGGAUUCUUUGUCUGCAGCGUACCCACUCCCCUGCUCG
UUGCUAUGGUGGUACCCAUACCAACCAUCUACCAUUCCUGCCAUCCUCC
CUCUAUAAAACCUGCUAUAGCUCCAAAUAGUCCUCUCUUUUUUCUUCUUC
UCUCUCCUUGAGGAAUCGAAUUCCCGCGGCCGC-3'

✚ RNA3 (282 nt)

5'-GAAUACUCAAGCUAUGCAUCCAACGCGUUGGGAGCUCUCCCAUAUGGU
CGACCUGCAGGCGGCCGCGAAUUCACUAGUGAUUCAUACCAACCAUCUAC
CAUUCCUGCCAUCCUCCUCUAUAAAACCUGCUAUAGCUCCAAAUAGUC
CUCUCUUUUUUCUUCUUCUCUCUCCUUGAGGGCUAUUUCUGAGCCCAGUC
GCAAGGACUAAUCUGUUUGAUUUCACAUUUUGGGGCAUUCCCCGAUGG
UGAGAGGGUGGAUGUAAUCGAAUUCCCGCGGCCGC-3'



RNA4 (277 nt)

5'-GGGCGAAUUGGGCCCGACGUCGCAUGCUCGCGCCGCAUGGCGGCCG
CGGGAAUUCGAUUGGGCUAUUUCUGAGCCCAGUCGCAAGGACUAAUCUG
UUUGAUUUCACAUAUUUGGGGCAUUCGCCGAUGGUGAGAGGGUGGAUGU
UGUGGAAUGGCAUACUAGAGUUUAUCGCCCCUAUUGGAGUUUGACACUU
GGUGUUGCAGUUACCAUAUCCAAUUCACUUUUCAUAAUUGUUGAGUCC
CCAAUCACUAGUGAAUUCGCGGCCGCCUGCAGG-3'

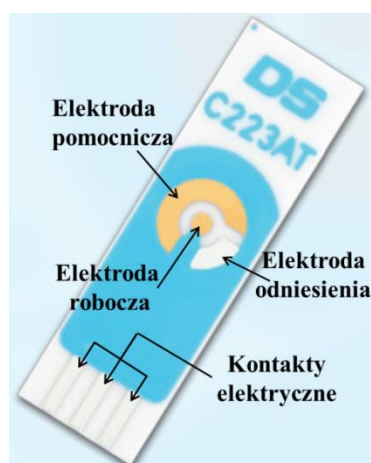
6. Aparatura

6.1. Potencjostat/galwanostat

Pomiary elektrochemiczne były przeprowadzane przy użyciu potencjostatu-galwanostatu AutoLab (Eco Chemie, Utrecht, Holandia) w trójelektrodowym układzie pomiarowym (*Rysunek 19*). Eksperymenty woltamperometryczne przeprowadzono w naczynku pomiarowym o objętości 5 mL. Do eksperymentów jako elektrody robocze zastosowano złote elektrody dyskowe o średnicy 2 mm, wyprodukowane przez firmę Bioanalytical Systems (BAS) (West Lafayette, Indiana, USA). Potencjały były mierzone względem chlorosrebrowej elektrody odniesienia zakupionej również w firmie BAS. Jako elektrody pomocniczej użyto drucika platynowego.

6.2. Mikrobipotentjostat/galwanostat

Pomiary elektrochemiczne przeprowadzono również w zminiaturyzowanym układzie - bipotentjostat/galwanostat – μ Stat 400 (DropSens, SL, Hiszpania). Do tego celu zastosowano jednorazowe elektrody sitodrukowane (DropSens, SL, Hiszpania). Mają one postać zintegrowanego układu sitodrukowanego, składającego się z naniesionych na nieprzewodzące podłoże polimerowe: złotej elektrody roboczej o średnicy 1.6 mm, srebrowej elektrody odniesienia, złotej elektrody pomocniczej oraz kontaktu elektrycznego (*Rysunek 24*). Wymiary elektrody wynoszą $34 \times 10 \times 0.5$ mm (długość \times szerokość \times grubość). Eksperymenty woltamperometryczne przeprowadzono nakraplając na układ trójelektrodowy 40 μ L roztworu.



Rysunek 24. Konstrukcja elektrody sitodrukowanej (www.dropsens.com).

7. Czujniki typu kanału jonowego przeznaczone do wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1

7.1. Przygotowanie elektrochemicznego genoczujującego opartego o modyfikację elektrod złotych poprzez wiązanie kowalencyjne Au-S

7.1.1. Przygotowanie powierzchni dyskowych elektrod złotych

Przygotowanie dyskowych elektrod złotych (DEZ) polegało na ich mechanicznym czyszczeniu poprzez polerowanie na suknach polerskich, na które nanoszono zawiesiny tlenku glinu (aluminy) o średnicy ziaren – 0.3 μm oraz 0.05 μm . Procedura trwała po 5 minut dla każdej z zawiesin. Po zakończeniu polerowania elektrody opłukano w wodzie Mili-Q i zanurzano do zlewki z wodą. Taki zestaw umieszczano w płuczce ultradźwiękowej na 30 sekund w celu usunięcia resztek aluminy. Po tym czasie elektrody ponownie opłukano wodą Mili-Q i czyszczono elektrochemicznie za pomocą techniki woltamperometrii cyklicznej (CV) z użyciem standardowego trójelektrodowego układu pomiarowego (chlorosrebrowa elektroda referencyjna, platynowa przeciwelektroda i złota elektroda robocza). W pierwszym etapie elektrody zanurzono do 0.5 M roztworu wodorotlenku potasu i czyszczono elektrochemicznie poprzez przemiatając potencjałem w zakresie od -1200 mV do -400 mV (względem elektrody chlorosrebrowej jako elektrody odniesienia) z szybkością skanowania 100 mV/s, liczba cykli: 3, 50 i 10. Następnie elektrody umieszczano w 0.5 M roztworze kwasu siarkowego (VI) i przemiatało potencjałem w zakresie od -300 mV do 1500 mV, z szybkością skanowania 100 mV/s, liczba cykli: 3, 10 i 3. Na koniec powierzchnie elektrod odświeżano w 0.5 M roztworze KOH stosując 10 cykli. Wszystkie użyte roztwory, odtleniano przed użyciem przez przedmuchiwanie azotem (ultra czysty 6.0, Air Products, Polska) przez 10 minut.

Następnie, po starannym opłukaniu, elektrody były przechowywane w probówkach z wodą dejonizowaną Mili-Q do momentu modyfikacji.

7.1.2. Modyfikacja dyskowych elektrod złotych

Wyczyszczone elektrody złote płukano kolejno 5 mL: wody Mili-Q i buforu PBS o stężeniu 0.01 M, pH 7.4. Następnie, na powierzchnię każdej elektrody nakraplano 10 μ L mieszaniny zawierającej 1 μ M sondy SH-NC3 i 10 μ M 6-MCH (wypełniacz) w buforze PBS. Elektrody przykryto probówkami w celu zabezpieczenia przed zanieczyszczeniem i odparowaniem roztworu i przechowywano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, na każdą elektrodę nakropiono 10 μ L 1 mM 6-MCH i inkubowano przez 1 godzinę również w temperaturze pokojowej.

Zmodyfikowane elektrody opłukano 5 mL 0.01 M PBSu, pH 7.4 i kondycjonowano przez noc w tym buforze w temperaturze pokojowej. Po kondycjonowaniu, zmodyfikowane elektrody były stosowane do oznaczania następujących analitów:

- 20-merowych sekwencji DNA komplementarnego (c-NC3) i niekomplementarnego (nc-NC3);
- ok. 180 pz produktów PCR1-PCR3 posiadających sekwencję komplementarną w różnych położeniach lub PCR4 nieposiadającego sekwencji komplementarnej do sondy NC3;
- ok. 280-merowych transkryptów RNA1-RNA3 posiadających sekwencję komplementarną w różnych położeniach lub RNA4 nieposiadającego sekwencji komplementarnej do sondy NC3.

7.1.3. Przygotowanie powierzchni sitodrukowanych elektrod złotych

Procedura czyszczenia sitodrukowanych elektrod złotych (SEZ) była jednoetapowa – polegała na elektrochemicznym czyszczeniu w 0.5 M kwasie siarkowym. Zanim do tego przystąpiono każda SEZ została dokładnie opłukana etanolem i wodą Mili-Q. Następnie, na powierzchnię nakraplano 40 μ L 0.5 M roztworu kwasu siarkowego i przemiatało potencjałem w zakresie od -200 mV do 1100 mV, przy szybkości skanowania wynoszącej 100 mV/s, liczba cykli: 6, 10 oraz 6. Po starannym opłukaniu 5 mL wody Mili-Q i 0.01 M buforu PBS, SEZ modyfikowano.

7.1.4. Modyfikacja elektrod sitodrukowanych

Na powierzchnię każdej elektrody roboczej nakraplano 4 μL mieszaniny zawierającej 1 μM sondy SH-NC3 i 10 μM 6-MCH w buforze PBS o pH 7.4. Następnie każdą elektrodę szczelnie zamknięto w naczynku wagowym i przechowywano przez 3h w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie 4 μL 1 mM 6-MCH został nakroplony na każdą elektrodę roboczą i inkubowany przez 1h. Następnie modyfikowane elektrody opłukano 5 mL 0.01 M PBS, pH 7.4 i kondycjonowano przez noc w temperaturze 4°C w roztworze 0.01 M PBS + 0.01 % NaN_3 , w celu zabezpieczenia przed mikroorganizmami sondy DNA osadzonej na powierzchni elektrody.

Tak zmodyfikowane elektrody posłużyły do oznaczania następujących analitów:

- 20-merowych sekwencji DNA komplementarnego (c-NC3) i niekomplementarnego (nc-NC3),
- ok. 280-merowych transkryptów RNA1–RNA3 posiadających sekwencję komplementarną w różnych położeniach lub RNA4 nieposiadającego sekwencji komplementarnej do sondy NC3

7.1.5. Oznaczanie kwasów nukleinowych za pomocą elektrod dyskowych

20-merowe sekwencje DNA (c-NC3, nc-NC3) oraz ok. 180 pz produkty PCR (PCR1, PCR2, PCR3, PCR4) rozcieńczano w buforze do hybrydyzacji (0.01 M PBS, pH 7.4) do stężeń: 10, 20, 40, 60, 80 i 100 pM. Produkty PCR w celu denaturacji były ogrzewane przed hybrydyzacją w łaźni wodnej o temperaturze 95°C przez 10 minut, a następnie szybko ochładzane na lodzie przez 2 minuty. Reakcje hybrydyzacji przeprowadzono w temperaturze pokojowej przez nakroplenie na 1h 10 μL odpowiedniego rozcieńczenia analitu na elektrodę złotą zmodyfikowaną warstwą SH-NC3/6-MCH. Po upływie 1h, elektrodę opłukiwano 5 mL 0.01 M PBS, pH 7.4 w celu usunięcia niezwiązanych cząsteczek analitu. Inkubacje kolejnych stężeń analitów kontrolowano za pomocą woltamperometrii fali prostokątnej (SWV).

Ok. 280-merowe transkrypty RNA (RNA1, RNA2, RNA3, RNA4) rozcieńczono w 0.01 M buforze PBS (pH 7.4) do stężenia 10 pM. W celu przeprowadzenia procesu

hybrydyzacji powierzchnię DEZ zmodyfikowaną warstwą SH-NC3/6-MCH pokryto 10 μL roztworu analitu (RNA1, RNA2, RNA3 i RNA4) na 30 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie elektrodę opłukiwano 5 mL buforu PBS, w celu usunięcia niezwiązanych cząsteczek analitu. Zmiany zachodzące po inkubacji analitów obserwowano za pomocą SWV.

7.1.6. Oznaczanie kwasów nukleinowych przy pomocy elektrod sitodrukowanych

Zarówno oligonukleotydy (c-NC3, nc-NC3), jak i transkrypty RNA (RNA1, RNA2, RNA3 i RNA4) rozcieńczono w buforze hybrydyzacyjnym 0.01 M PBS (pH 7.4) do stężenia 1 pM.

Reakcje hybrydyzacji na SEZ zmodyfikowanych warstwą SH-NC3/6-MCH przeprowadzano w temperaturze pokojowej przez nakroplenie na 30 minut na powierzchnię elektrody roboczej 4 μL odpowiedniego analitu o stężeniu 1 pM (c-NC3, nc-NC3, RNA1, RNA2, RNA3 lub RNA4). Po tym czasie elektrodę opłukano 5 mL 0.01 M PBS, pH 7.4 w celu usunięcia niezwiązanych cząsteczek analitu.

7.1.7. Procedury pomiarowe

7.1.7.1. Pomiary elektrochemiczne z zastosowaniem dyskowych elektrod złotych

Pomiary elektrochemiczne przy użyciu elektrod dyskowych przeprowadzane były w naczynku pomiarowym w układzie trójelektrodowym. Jako znacznik redoks-aktywny zastosowano 1 mM roztwór $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Woltamperometria cykliczna była wykonywana w zakresie potencjałów od +600 mV do -200 mV z szybkością skanowania równą 100 mV/s. Natomiast woltamperometria fali prostokątnej była wykonywana w zakresie potencjałów od +600 mV do -200 mV z krokiem potencjałowym równym 1 mV, częstotliwością fali prostokątnej 25 Hz i amplitudą 50 mV.

Odpowiedzi czujnika wyrażano jako: $(I_n - I_0)/I_0$, w którym I_n oznacza wartość natężenia prądu piku mierzonego w obecności analitu, 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ i 0.01 M PBS, a I_0 wartość natężenia prądu piku otrzymana w roztworze zawierającym 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ i 0.01 M PBS.

7.1.7.2. Pomiary elektrochemiczne z zastosowaniem sitodrukowanych elektrod złotych

Pomiary elektrochemiczne wykonywano nakraplając na układ trójelektrodowy 40 μL w obecności 1 mM roztworu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Woltamperometria cykliczna była wykonywana w zakresie potencjałów od +600 mV do -200 mV dla 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ z szybkością skanowania równą 100 mV/s.

Woltamperometria fali prostokątnej dla 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ była wykonywana w zakresie potencjałów od +300 mV do -200 mV z krokiem potencjału równym 1 mV, częstotliwością fali prostokątnej 25 Hz i amplitudą 50 mV.

7.2. Przygotowanie elektrochemicznego genoczujującego typu kanału jonowego opartego o modyfikację elektrod złotych za pomocą wiązania amidowego

7.2.1. Modyfikacja dyskowych elektrod złotych

Procedura czyszczenia elektrod złotych została opisana w *Rozdziale 7.1.1*. Bezpośrednio po wyczyszczeniu elektrody złote kilkakrotnie opłukano wodą dejonizowaną i etanolem, i zanurzono na 30 minut w etanolowej mieszaninie tioli: 0.1 mM 11-MUA i 1 mM 6-MCH zawierającej 2% TFA. TFA zapobiega tworzeniu się wiązań wodorowych zarówno na powierzchni elektrody, jak i w roztworze modyfikującym. Następnie elektrody przemyto etanolem, 10% etanolem roztworem amoniaku (w celu odpłukania TFA) oraz ponownie etanolem. W niniejszej rozprawie procedura tworzenia warstwy mieszanej 11-MUA i 6-MCH powstała w oparciu o sposób opracowany przez Wang i współpracowników (Wang i wsp., 2005).

W kolejnym kroku grupy karboksylowe pochodzące z 11-MUA aktywowano za pomocą mieszaniny roztworów – 100 mM EDC i 50 mM NHS w 50 mM buforze MES (pH 5.5) przez 1h. Następnie elektrody z aktywowanymi grupami karboksylowymi zanurzono do 10 μM roztworu sondy $\text{NH}_2\text{-NC}_3$ w buforze MES o pH 7. Po 18h osadzania sondy $\text{NH}_2\text{-NC}_3$ elektrody spłukano buforem MES (pH 7.0) i potraktowano 0.1 M ETA w 50 mM buforze MES o pH 5.5 przez 30 sekund. Zmodyfikowane elektrody opłukano kolejno 5 mL buforu 50 mM MES (pH 7.0) i 10 mM PBS (pH 7.4) i kondycjonowano przez noc w 10 mM buforze PBS w temperaturze pokojowej.

Tak przygotowane dyskowe elektrody złote zastosowano do oznaczania następujących analitów:

- 20-merowych sekwencji DNA komplementarnego (c-NC3) i niekomplementarnego (nc-NC3);
- ok. 180 pz produktów PCR1 posiadających sekwencję komplementarną i PCR4 nieposiadającego sekwencji komplementarnej do sondy NC3;

7.2.2. Oznaczanie sekwencji DNA

Krótkie sekwencje oligonukleotydów (c-NC3, nc-NC3) rozcieńczano w buforze do hybrydyzacji (0.01 M PBS, pH 7.4) do stężeń: 10, 20, 40, 60, 80 i 100 fM lub 10, 20 i 40 fM. Dwuniciowe produkty PCR (PCR1 i PCR4) rozcieńczano w tym samym buforze do otrzymania następujących stężeń: 10, 20, 40 fM. Produkty PCR w celu denaturacji były ogrzewane przed hybrydyzacją w łaźni wodnej o temperaturze 95°C przez 10 minut, a następnie szybko ochładzane na lodzie przez 2 minuty i rozcieńczane do odpowiednich stężeń. Reakcje hybrydyzacji przeprowadzono w temperaturze pokojowej przez nakropienie na 1h 10 μ L odpowiedniego rozcieńczenia analitu na elektrodę złotą zmodyfikowaną warstwą 6-MCH+11-MUA/ NH₂-NC3. Po upływie 1h, elektrody opłukiwano 5 mL 0.01 M PBS, pH 7.4 w celu usunięcia niezwiązanych cząsteczek analitu i kontrolowano za pomocą woltamperometrii fali prostokątnej (zakres stężeń 20-mer DNA 10-100 fM) i elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (zakres stężeń 20-mer DNA i PCR 10-40 fM).

7.2.3. Procedury pomiarowe

Woltamperometria fali prostokątnej dla 1 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} była wykonywana w zakresie potencjałów od +600 mV do -300 mV z krokiem potencjału równym 1 mV, częstotliwością fali prostokątnej 25 Hz i amplitudą 50 mV.

Elektrochemiczną spektroskopię impedancyjną (EIS) wykonywano w układzie trójelektrodowym przy zadanym potencjale, którym był potencjał formalny znacznika redoks [Fe(CN)₆]^{3-/4-} równy +170 mV w zakresie częstotliwości od 0.1 Hz do 10 kHz, z amplitudą prądu zmiennego równą 10 mV. Otrzymane widma w postaci wykresów

Nyquista analizowano za pomocą oprogramowania potencjostatu – GPES, które pozwoliło na wyznaczenie oporu przeniesienia elektronu R_{et} przez warstwę modyfikującą do powierzchni elektrody.

Do obliczania odpowiedzi analitycznej genoczuwnika stosowano wartości uzyskane z wyrażenia $(R_i - R_0)/R_0$, gdzie R_i jest wartością oporu przeniesienia elektronu (R_{et}) dla danego analitu, a R_0 jest wartością oporu przeniesienia elektronu dla czujnika w buforze bez obecności analitu.

8. Bioczułnik zawierający warstwę elektroaktywną przeznaczony do wykrywania specyficznych sekwencji DNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1

8.1. Konstrukcja warstwy elektroaktywnej AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/(Phen-Epoksy/EA krok po kroku na powierzchni elektrody złotej

8.1.1. Modyfikacja dyskowych elektrod złotych

Czyste elektrody złote opłukano kolejno 5 mL: wody Mili-Q, metanolu i mieszaniny MeOH : AN (1:1), a następnie modyfikowano w następujących etapach:

- I.** 1 mM roztworem AET – 3h, RT_m
- II.** 1 mM roztworem Phen-Epoksy – 18h, RT_m
- III.** 1 mM roztworem FeCl₃ – 6h, RT_m
- IV.** 1 mM roztworem Phen-Epoksy – 18h, RT_m
- V.** 1 mM roztworem ETA– 3h, RT_m

We wszystkich etapach elektrody złote modyfikowano zanurzając do probówek zawierających roztwory modyfikujące. Uszczelniano je taśmą teflonową i parafilmem, aby uniknąć parowania rozpuszczalnika. We wszystkich etapach modyfikacji jako rozpuszczalnik stosowano mieszaninę MeOH : AN (1:1). Poszczególne etapy tworzenia warstwy elektroaktywnej były przeprowadzane w atmosferze azotu. Po zakończeniu modyfikowania elektrody opłukano kolejno 5 mL mieszaniny MeOH : AN i 0.1 M roztworu KCl. Po modyfikacji elektrody kondycjonowano w temperaturze pokojowej w 0.1 M roztworze KCl przez noc.

8.1.2. Procedury pomiarowe

CV była wykonywana w zakresie potencjałów od +600 mV do –200 mV dla szybkości skanowania 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 oraz 1000 mV/s w 0.1 M roztworze KCl.

SWV była wykonywana w oknie potencjału od +400 mV do -400 mV z krokiem potencjału równym 1 mV, częstotliwością fali prostokątnej 25 Hz i amplitudą 50 mV w 0.1 M roztworze KCl.

Wszystkie pomiary przeprowadzono w 0.1 M roztworze KCl odtlenionym strumieniem azotu przez 10 minut. Delikatny strumień azotu pozostawiono również nad roztworem podczas wszystkich pomiarów.

8.2. Konstrukcja elektrochemicznego genoczujujnika przeznaczonego do wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1 z zastosowaniem warstwy redoks-aktywnej AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/NH₂-NC3

8.2.1. Modyfikacja dyskowych elektrod złotych

Czyste elektrody złote płukano kolejno wodą dejonizowaną, metanolem oraz mieszaniną MeOH : AN (1:1), a następnie modyfikowano w następujących etapach:

- I.** 1 mM roztworem AET – 3h, RT_m
- II.** 1 mM roztworem Phen-Epoksy – 18h, RT_m
- III.** 1 mM roztworem FeCl₃ – 6h, RT_m
- IV.** 1 mM roztworem Phen-Epoksy – 18h, RT_m
- V.** 1 μM roztworem sondy NH₂-NC3 – 6h, RT_m

Procedura modyfikacji w etapach I-IV jest analogiczna do opisanej w *Rozdziale 8.1.1*. W etapie V natomiast do immobilizacji sondy NH₂-NC3 jako rozpuszczalnik został zastosowany acetonitryl. Po zakończeniu modyfikowania elektrody opłukano kolejno 5 mL AN i 0.01 M roztworu PBS. Po modyfikacji elektrody kondycjonowano w temperaturze pokojowej w 0.01 M roztworze PBS przez noc.

Tak zmodyfikowane elektrody złote posłużyły do oznaczania następujących analitów:

- 20-merowych sekwencji DNA komplementarnego (c-NC3) i niekomplementarnego (nc-NC3),

● transkryptów RNA1 i RNA3 posiadającymi sekwencję komplementarną w różnych położeniach lub RNA4 nieposiadającym sekwencji komplementarnej do sondy NC3

8.2.2. Oznaczanie kwasów nukleinowych z wykorzystaniem elektrod dyskowych

Krótkie sekwencje oligonukleotydów (c-NC3, nc-NC3) rozcieńczano w 0.01 M buforze PBS, pH 7.4 do otrzymania następujących stężeń: 100, 200, 400, 600, 800 i 1000 pM. Natomiast transkrypty RNA (RNA1, RNA3, RNA4) rozcieńczano w 0.01 M buforze PBS, pH 7.4 do otrzymania następujących stężeń: 10, 100 i 1000 pM. Reakcje hybrydyzacji przeprowadzono w temperaturze pokojowej przez nakroplenie na 30 minut na elektrodę złotą zmodyfikowaną warstwą AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/NH₂-NC3 10 µL odpowiedniego rozcieńczenia analitu. Po upływie tego czasu, elektrodę opłukiwano 5 mL 0.01 M buforu PBS, pH 7.4 i kontrolowano za pomocą SWV.

8.2.3. Procedury pomiarowe

Zmiany sygnału analitycznego w funkcji stężenia, zarówno DNA (c-NC3, nc-NC3), jak i RNA (RNA1, RNA3, RNA4) obserwowano za pomocą SWV. Wykonywano ją w zakresie potencjałowym od +0.4 V do -0.2 mV z krokiem potencjału równym 1 mV, częstotliwością fali prostokątnej 25 Hz i amplitudą 50 mV w 0.01 M buforze PBS.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

9. Opracowanie elektrochemicznego genoczujujnika przeznaczanego do wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1 z zastosowaniem sondy z grupą tiolową –SH

9.1. Optymalizacja modyfikacji elektrod złotych i procesu hybrydyzacji

Jednym z najważniejszych etapów w tworzeniu bioczuJNIKÓW opartych o DNA jest dobór sposobu przyłączenia sondy do powierzchni elektrody, jej orientacja i upakowanie. Procedura osadzania sondy DNA na powierzchni elektrody ma istotny wpływ na przebieg procesów hybrydyzacji z komplementarnymi sekwencjami ssDNA lub RNA obecnymi w roztworze. W oparciu o analizę danych literaturowych można stwierdzić, że najczęściej, jako sondy molekularne stosuje się pojedyncze nici DNA krótsze niż 24-merowe (Steel i wsp., 2000). W związku z powyższym w badaniach opisanych w niniejszej rozprawie użyto sondy 20-merowej zmodyfikowanej na końcu 5' grupą tiolową. Sondy SH-ssDNA są szeroko stosowane do osadzania na podłożach stałych, najczęściej na złocie (Aryaa i wsp., 2009, Gębala i Schuhmann, 2010; Grabowska i wsp., 2013, Ligaj i wsp., 2014; Jollya i wsp., 2015; Malecka i wsp., 2012; Power i Morrin, 2013; Yao i wsp., 2013).

Stężenie, rozmieszczenie i orientacja sond ssDNA osadzonych na powierzchni elektrody ma decydujący wpływ na wydajność procesów hybrydyzacji (Nowicka i wsp., 2011; Gębala i Schuhmann, 2010). Istotną rolę w konstrukcji genoczuJNIKÓW pełni również rozcieńczalnik. Zapewnia on odpowiednie odstępy pomiędzy sondami, które umożliwiają lepszy dostęp analitów do sondy ssDNA. Zapobiega również niespecyficznej adsorpcji DNA i eliminuje bezpośredni kontakt pomiędzy znacznikiem redoks a powierzchnią elektrody złotej. Jako rozcieńczalnika w niniejszej rozprawie użyto powszechnie stosowanego 6-MCH (Hong i wsp., 2013; Keighley i wsp., 2008; Miao i wsp., 2014; Park i Park, 2009; Ren i wsp., 2015; Revenga-Parra i wsp., 2011). Inne opisane w literaturze naukowej rozcieńczalniki, to np. merkaptobutanol - MCB (Kafka i wsp., 2008; Doneux i wsp., 2014) czy 11-hydroksy-1-undekanol - 11-HUD (Aoki i Tao, 2007; 2008).

Na podstawie analizy literatury oraz w oparciu o wyniki przeprowadzonych eksperymentów wybrano optymalne parametry modyfikacji elektrod złotych oraz

warunki hybrydyzacji. Poszczególne parametry zestawiono w *Tabelach 4 i 5*. Optymalizując warunki modyfikacji i hybrydyzacji w kolejnych eksperymentach zmieniano tylko jeden z parametrów.

Skład buforów modyfikacyjnych, hybrydyzacyjnych i pomiarowych, stężenia ich składników, temperatura osadzania sondy DNA, czasy modyfikacji i hybrydyzacji, a także zakres stężeń analitu znaleziono doświadczalnie. Przetestowano kilka roztworów buforowych przeznaczonych do osadzania, jak i hybrydyzacji DNA różniących się składem elektrolitów i ich stężeniami (*Tabela 4 i 5*). Według literatury zarówno osadzanie, jak i procesy hybrydyzacji przeważnie przeprowadza się w roztworach buforu fosforanowego, TRIS-HCl lub cytrynianowego (SSC) o pH w zakresie 7.0 – 8.0 (Martínez-Paredes i wsp., 2010). Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów zarówno do modyfikacji elektrod złotych, jak i hybrydyzacji wybrano 0.01 M PBS, pH 7.4 (fizjologiczne). Czas trwania procesu hybrydyzacji jest zróżnicowany, w zależności od procedury wynosi od 5 minut do 16 godzin (Kafka i wsp., 2008; Gębala i wsp., 2009; Henry i wsp., 2010). Jednak wydłużanie tego procesu może prowadzić do powstawania oddziaływań niespecyficznych pomiędzy sondą a analitem (Paleček i Fojta, 2005). Na podstawie wyników przeprowadzonych eksperymentów za optymalny czas uznano 1h.

Tabela 4. Optymalizacja parametrów immobilizacji i hybrydyzacji sondy SH-NC3 dla jednoetapowych modyfikacji elektrod złotych przeprowadzanych w temperaturze pokojowej.

Lp.	1	2	3
Czas modyfikacji	18 h		
Skład roztworu	1 μM SH-NC3 + 10 μM 6-MCH w B1	1 μM SH-NC3 + 10 mM 6-MCH w B1	1 μM SH-NC3 + 1 mM 6-MCH w B1
Bufor hybrydyzacyjny	B1		
Czas hybrydyzacji	2 h		
Zakres stężeń c-NC3	10 – 40 pM		
Redoks znacznik	1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ oraz 1 mM $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ w B1	1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ w B1	
Technika pomiarowa	EIS		

Tabela 5. Optymalizacja parametrów osadzania i hybrydyzacji sondy SH-NC3 dla dwuetapowych modyfikacji elektrod złotych

Lp.		1	2	3	4	5
I etap	Czas modyfikacji	3h				
	Skład roztworu modyfikacyjnego	1 μM SH-NC3 + 10 μM 6-MCH w B1, RT	1 μM SH-NC3 + 10 μM 6-MCH w B2, RT	1 μM SH-NC3 + 10 μM 6-MCH w B2, ogrzewanie sondy w 85°C przez 10 min. i powolne ochładzanie do RT	1 μM SH-NC3 + 1 mM 6-MCH w B3	
II etap	Czas modyfikacji	1h				
	Skład roztworu	1 mM MCH				
Bufor hybrydyzacyjny		B1	B2		B4	
Czas hybrydyzacji		1h				
Zakres stężeń c-NC3		10 – 100 pM				
Znacznik redoks		1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ w B1	1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ w B2			1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ w B4
Technika pomiarowa		EIS, CV	EIS, CV, SWV	CV, SWV	EIS	

Skład buforów:

B1: 10 mM PBS: 10 mM KH_2PO_4 , 1.8 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, + 2.5 mM MgCl_2 , pH 7.4

B2: 10 mM PBS: 10 mM KH_2PO_4 , 1.8 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4

B3: 1 M bufor fosforanowy: $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 1 M NaCl + 5 mM MgCl_2 + 1 mM EDTA, pH 6.57

B4: 50 mM PBS: 685 mM NaCl, 13.5 mM KCl, 50 mM KH_2PO_4 , 9 mM Na_2HPO_4 + 5 mM MgCl_2 , pH 7.4

Podsumowując, po dokonaniu optymalizacji składu warstwy analitycznie aktywnej pod kątem poprawy parametrów analitycznych bioczuJNIKA wybrano następujące warunki dwuetapowej modyfikacji elektrod złotych:

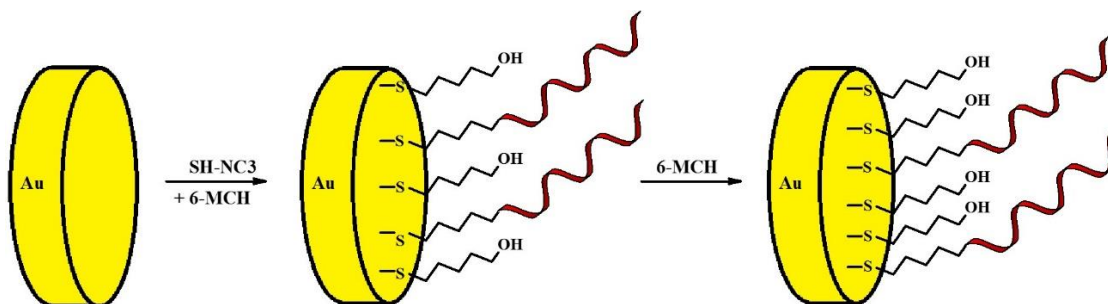
I etap: 1 μM SH-NC3 + 10 μM 6-MCH w buforze B2 – 3h

II etap: 1 mM 6-MCH w buforze B2 – 1h,

oraz warunki prowadzenia hybrydyzacji:

1 h w B2 w zakresie stężeń c-NC3 10 – 100 pM, 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ w B2, CV, SWV.

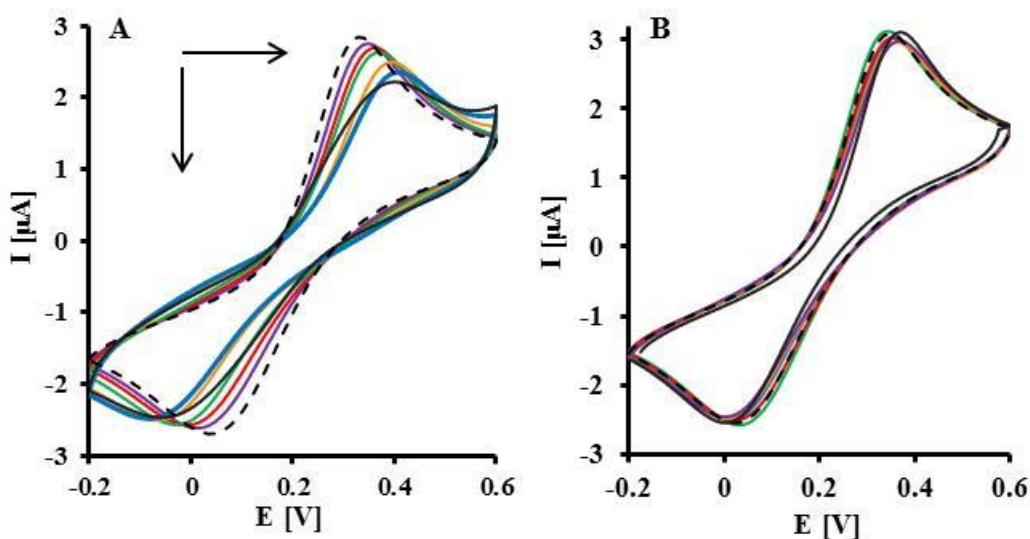
Schemat przygotowania genoczuJNIKA przedstawiono na Rysunku 25.



Rysunek 25. Schemat modyfikacji elektrod złotych z zastosowaniem bezpośredniego osadzenia sondy SH-ssDNA celem przygotowania genoczuJNIKA.

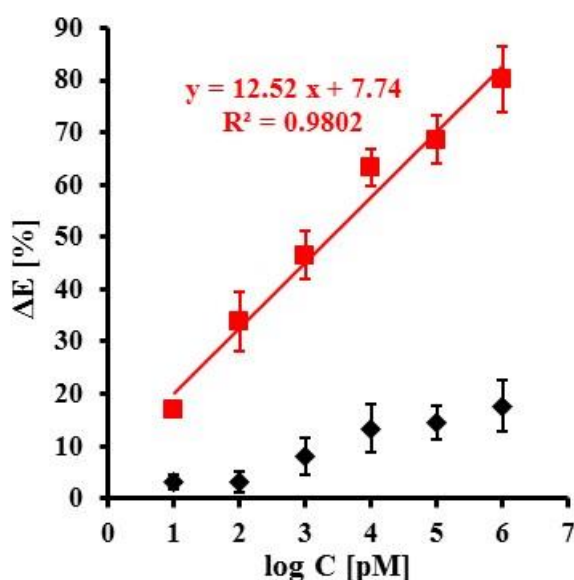
9.2. Optymalizacja zakresu stężeń analitu (20-merowych sekwencji DNA) za pomocą CV

Przeprowadzono hybrydyzację z zastosowaniem dwóch analitów c-NC3 i nc-NC3 w szerokim zakresie stężeń analitów od 10^{-11} do 10^{-6} M, co dekadę. Przykładowe krzywe cyklowoltamperometryczne pokazano na *Rysunku 26*.



Rysunek 26. Cykliczne voltamogramy (szybkość skanowania 100 mV/s) uzyskane dla elektrod zmodyfikowanych SH-NC3/6-MCH. Krzywa przerywana - przed hybrydyzacją i kolejne krzywe po hybrydyzacji z sekwencją (A) c-NC3 i (B) nc-NC3 w zakresie stężeń od 10^{-11} do 10^{-6} M, co dekadę. Skład roztworu pomiarowego: 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ w 0.01 M PBS (pH = 7.4), trójelektrodowy układ pomiarowy: elektroda robocza – dysk złoty, elektroda odniesienia – chlorosrebrowa oraz elektroda pomocnicza – drut platynowy.

Wzrost stężenia c-NC3 spowodował zmniejszenie odwracalności układu (Rysunek 26A), a w konsekwencji zwiększenie rozstawu pików ΔE oraz obniżenie natężenia prądu pików utlenienia i redukcji jonów znacznika redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Dla najwyższego stosowanego stężenia c-NC3 (10^{-6} M) ΔE zwiększyła się o 80.22 ± 3.35 %, natomiast natężenie prądu pików utlenienia i redukcji zmalało odpowiednio o 40.67 ± 3.77 % i 40.20 ± 3.52 % (Rysunek 27). W obecności nc-NC3 zmiany odwracalności były słabe (Rysunek 26B, 27). Dla najwyższego stosowanego stężenia nc-NC3 ΔE zwiększyła się o 17.61 ± 4.90 %, natomiast natężenie prądu pików redukcji i utlenienia obniżyło się o odpowiednio 2.99 ± 3.15 % i 0.97 ± 3.35 %, co dowodzi selektywności badanego układu.



Rysunek 27. Zależność różnicy potencjałów pików redukcji i utlenienia jonów znacznika redoks-aktywnego $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ΔE [%] od logarytmu ze stężenia analitu $\log C$ [pM] (■) c-NC3 i (◆) nc-NC3 ($n = 3$).

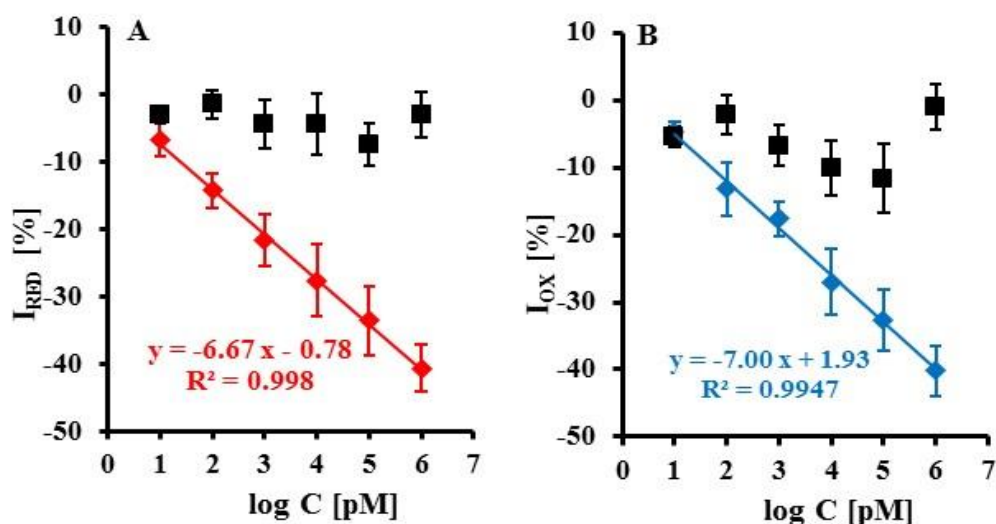
Granice wykrywalności wyznaczono w oparciu o odchylenia standardowe odpowiedzi czujnika i nachylenie krzywej kalibracyjnej według wzoru:

$$GW = 3.3 \cdot \sigma / S \quad (8)$$

gdzie σ jest odchyleniem standardowym odpowiedzi czujnika,

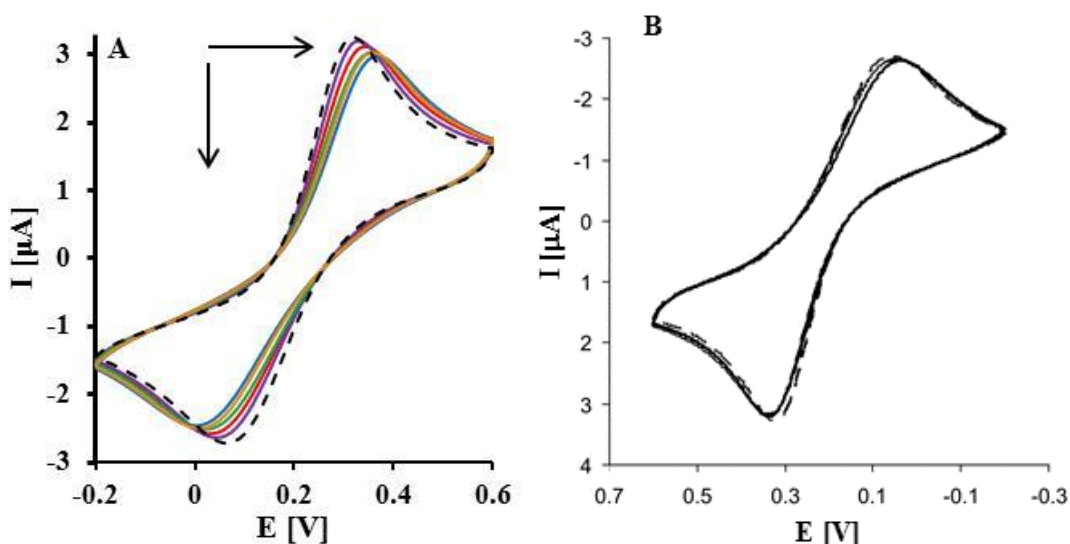
S jest nachyleniem krzywej kalibracyjnej (Swartz i Krull, 2012).

Na podstawie zmian natężenia prądu procesów utlenienia i redukcji znacznika redoks w funkcji stężenia analitu c-NC3 (Rysunek 28) wyznaczono granice wykrywalności, które wynosiły odpowiednio 0.43 i 0.71 pM. Liniową zależność pomiędzy względnym spadkiem natężenia prądów pików redukcji lub utleniania znacznika redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ zaobserwowano dla sekwencji c-NC3 w całym zakresie badanych stężeń od 10^{-11} M do 10^{-6} M.



Rysunek 28. Zależność natężenia prądu pików $I=(I_r-I_0)/I_0$ [%] A) **redukcji** i B) **utlenienia** $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ od logarytmu ze stężenia analitu $\log C$ [pM] dla (♦,◆) c-NC3 i (■) nc-NC3 ($n=3$).

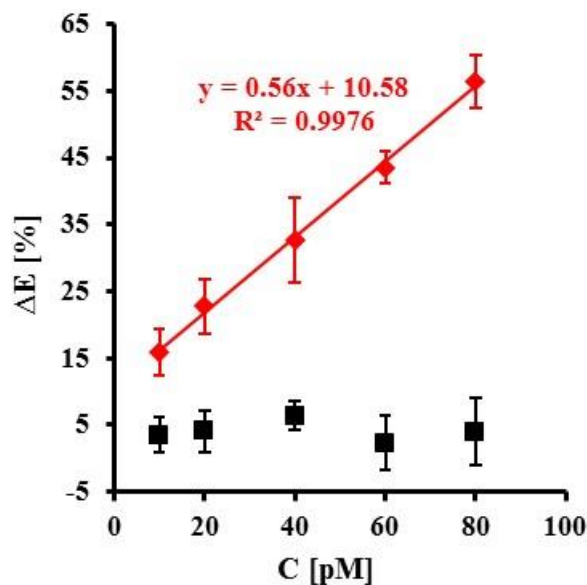
Na podstawie analizy wyników dotyczących krzywych kalibracyjnych w zakresie stężeń analitu od 10^{-11} do 10^{-6} M, jako optymalny zakres wybrano dekadę 10-100 pM. Przeprowadzono analogiczny eksperyment polegający na oznaczeniu analitów c-NC3 i nc-NC3 w zoptymalizowanym zakresie stężeń. Za pomocą CV zarejestrowano krzywe przed hybrydyzacją i po każdym kolejnym stężeniu analitu. Przykładowe krzywe przedstawiono na Rysunku 29.



Rysunek 29. Cykliczne woltamogramy (szybkość skanowania 100 mV/s) uzyskane dla elektrod zmodyfikowanych warstwą SH-NC3/6-MCH. Krzywa przerywana - przed hybrydyzacją i kolejne krzywe po hybrydyzacji z sekwencją (A) c-NC3 i (B) nc-NC3 dla stężeń: 10, 20, 40, 60 i 80 pM.

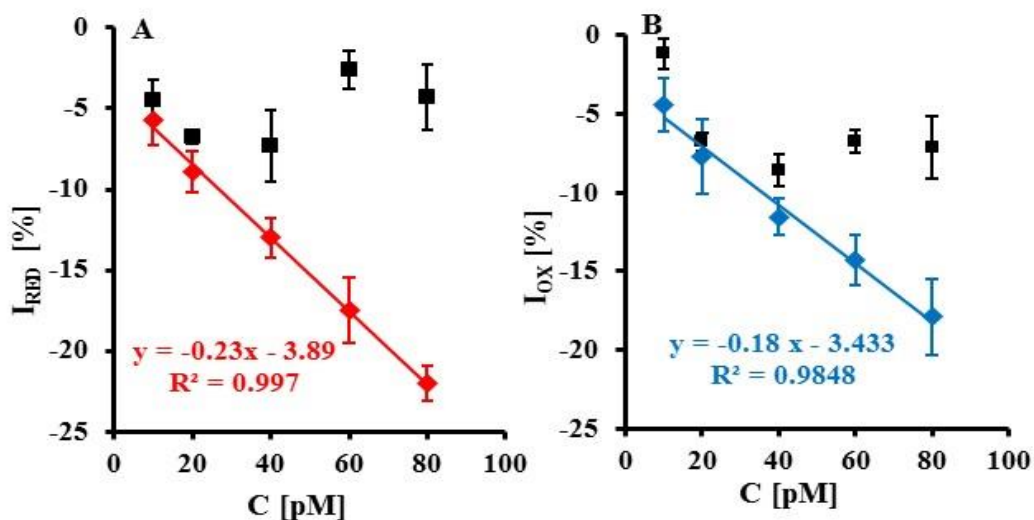
Skład roztworu pomiarowego: 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ w 0.01 M PBS (pH = 7.4), trójelektrodowy układ pomiarowy - elektroda robocza – dysk złoty, elektroda odniesienia – chlorosrebrowa oraz elektroda pomocnicza – drut platynowy.

Wzrost stężenia c-NC3, spowodował zmniejszenie odwracalności układu, a w konsekwencji zwiększenie rozstawu pików ΔE (Rysunek 30) oraz obniżenie natężenia prądu pików utlenienia i redukcji jonów znacznika redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Dla najwyższego stosowanego stężenia c-NC3 (80 pM) ΔE zwiększyła się o 56.4 ± 4.0 %, natomiast w obecności nc-NC3 zmiany odwracalności były słabe $\Delta E = 4.0 \pm 5.0$ %. Wraz ze zwiększeniem rozstawu pików utlenienia i redukcji zaobserwowano również obniżenie natężenia prądu pików utlenienia i redukcji. Najwyższe użyte stężenie sekwencji c-NC3 spowodowało obniżenie natężenia prądu pików redukcji o 22.0 ± 4.23 %, natomiast nc-NC3 o 4.30 ± 2.05 %. W przypadku procesu utlenienia wartości były podobne - najwyższe stężenie sekwencji c-NC3 spowodowało obniżenie prądu pików utlenienia o 17.90 ± 2.41 %, natomiast nc-NC3 o 7.12 ± 1.97 %. Słaba odpowiedź w przypadku sekwencji niekomplementarnej nc-NC3 potwierdza selektywność układu.



Rysunek 30. Zależność różnicy potencjałów pików redukcji i utlenienia jonów znacznika $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ΔE [%] w funkcji stężenia analitu C [pM] c-NC3 dla (♦) c-NC3 i (■) nc-NC3 ($n=6$).

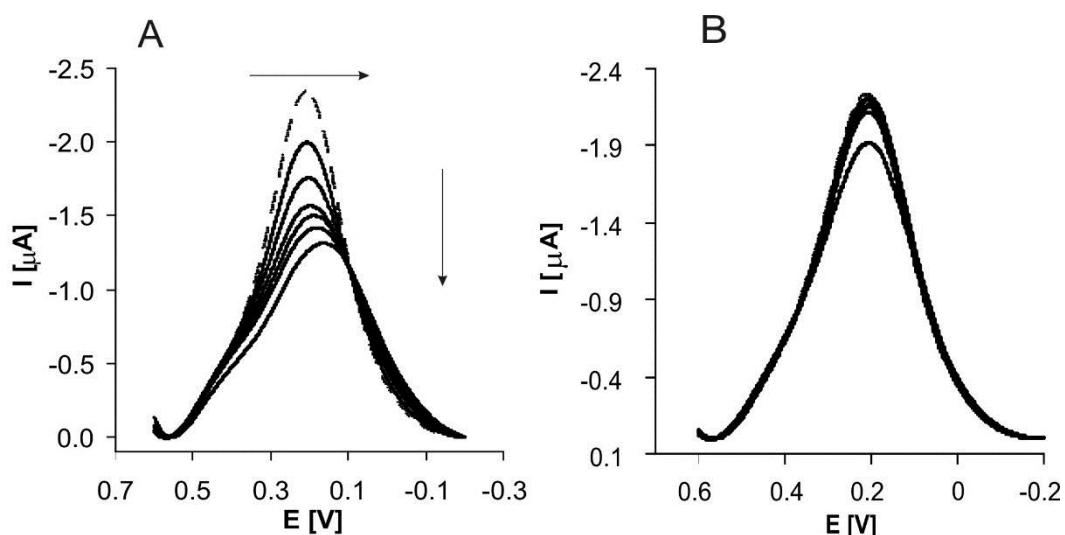
W oparciu o krzywe kalibracyjne (Rysunek 31) na podstawie Równania (8) wyznaczono granice wykrywalności dla procesu utlenienia i redukcji, które wynosiły odpowiednio 16.87 i 18.65 pM.



Rysunek 31. Zależność zmian natężenia prądu pików $I=(I_r-I_0)/I_0$ [%] A) redukcji i B) utlenienia $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ w funkcji stężenia analitów C [pM]: (♦,◆) c-NC3 oraz (■) nc-NC3 ($n=6$).

9.3. Kontrola selektywności opracowanego genoczujujnika z zastosowaniem 20-merowych sekwencji DNA za pomocą SWV

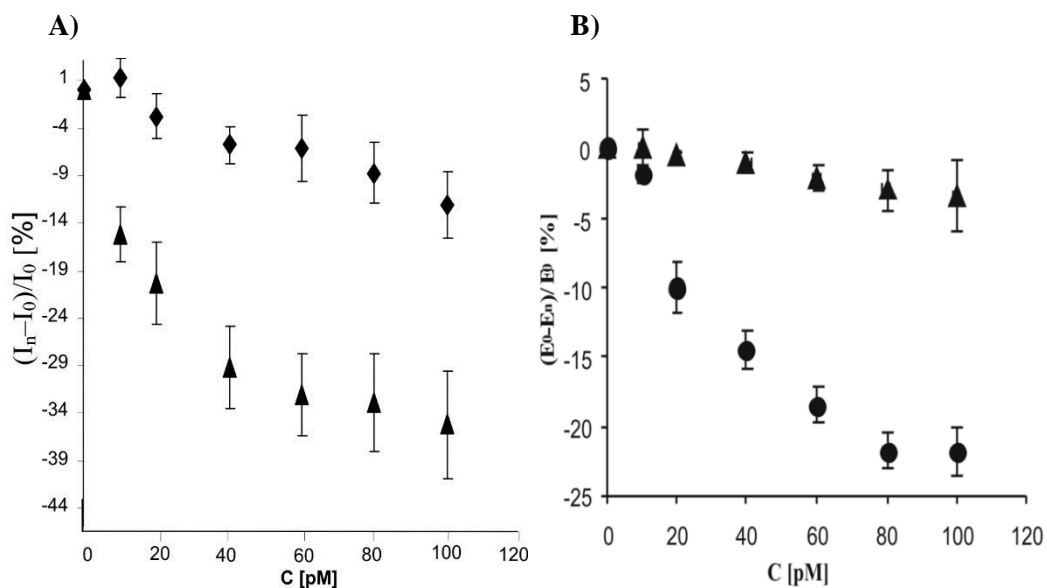
Dzięki pomiarowi natężenia prądu pod koniec trwania pulsu w technice SWV możliwa jest znaczna eliminacja prądu pojemnościowego z uwagi na jego dużo szybszy zanik w porównaniu z prądem faradajowskim. W związku z powyższym zastosowano ją do oznaczania analitów c-NC3 i nc-NC3. Reprezentatywne krzywe SWV zarejestrowane w obecności sekwencji c-NC3 i nc-NC3 przedstawiono na *Rysunku 32*. Najwyższe stężenie c-NC3 (100 pM) spowodowało spadek natężenia prądu piku znacznika redoks o $35.0 \pm 5.6 \%$ i $12.0 \pm 2.4 \%$ po hybrydyzacji z sekwencjami c-NC3 i nc-NC3 (*Rysunek 33A*). Obniżeniu natężenia prądu piku pochodzącego od znacznika redoks towarzyszy przesunięcie potencjału w kierunku wartości ujemnych. Parametr ten zmienia się wraz ze wzrostem stężenia c-NC3. W obecności nc-NC3, potencjał piku redoks praktycznie nie uległ zmianie (*Rysunek 32B, 33B*). Najwyższe stężenie c-NC3 spowodowało przesunięcie potencjału piku znacznika redoks o $22.0 \pm 2.6 \%$ w kierunku wartości ujemnych, co oznacza, że reakcja redoks była utrudniona w wyniku blokowania warstwy przez analit. W związku z tym niezbędna była większa energia do przekazania elektronu ze znacznika redoks-aktywnego w kierunku powierzchni elektrody poprzez warstwę SH-NC3/6-MCH.



Rysunek 32. Przykładowe voltamogramy SWV (częstotliwość 25 Hz) zarejestrowane na dyskowych elektrodach złotych zmodyfikowanych warstwą SH-NC3/6-MCH. Krzywa przerywana - przed hybrydyzacją i kolejne krzywe po hybrydyzacji z sekwencją (A) c-NC3 i (B) nc-NC3 dla stężeń: 10, 20, 40, 60, 80 i 100 pM.

Skład roztworu pomiarowego: 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ w 0.01 M PBS (pH = 7.4), trójelektrodowy układ pomiarowy - elektroda robocza – dysk złoty, elektroda odniesienia – chlorosrebrowa oraz elektroda pomocnicza – drut platynowy.

Granica wykrywalności wyznaczona na podstawie Równania (8) dla tego bioczuJNIKA wynosi 24 pM.



Rysunek 33. A) Zależność $I = (I_n - I_0)/I_0$ [%] od stężenia C [pM] (▲) *c*-NC3 oraz (◆) *nc*-NC3 ($n=6$).
 B) Zależność $E = (E_n - E_0)/E_0$ [%] od stężenia C [pM] (▲) *c*-NC3 oraz (●) niekomplementarnej sekwencji *nc*-NC3 ($n=6$).

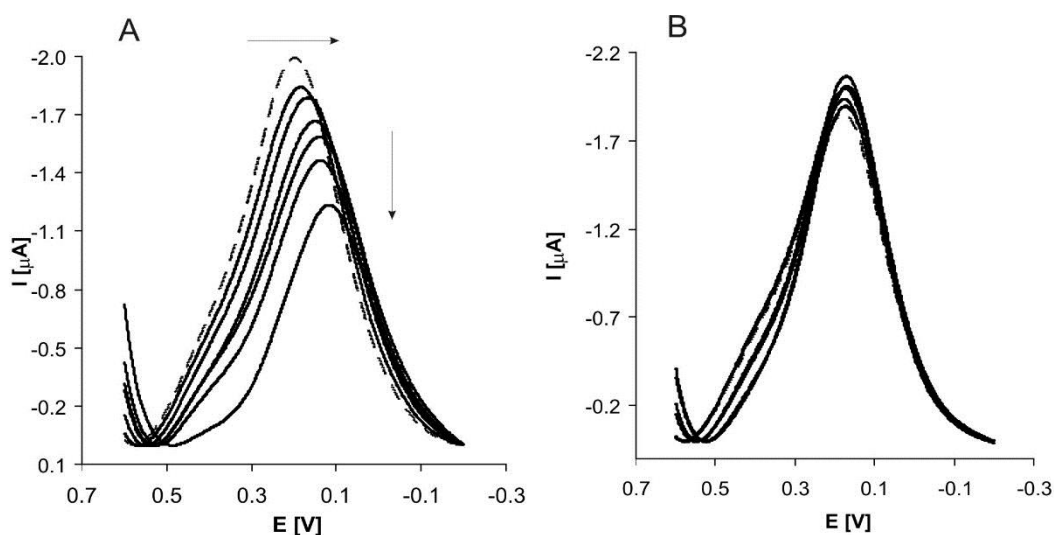
9.4. Zależność położenia sekwencji komplementarnej względem sondy SH-NC3 - Sekwencje PCR1, PCR2, PCR3 oraz PCR4

Czułość i selektywność proponowanego bioczuJNIKA, a także jego zdolność do rozróżniania położenia sekwencji komplementarnych w długich niciach DNA sprawdzano również z zastosowaniem dwuniciowych produktów PCR o długości około 180 pz, które przed hybrydyzacją denaturowano. Schematycznie produkty PCR przedstawiono na *Rysunku 34*.



Rysunek 34. Schemat położenia sekwencji komplementarnej do sondy NC3 w produktach PCR.

Warunki pomiarowe przeprowadzanych eksperymentów były analogiczne do doświadczeń z wykorzystaniem 20-merowych sekwencji DNA. Reprezentatywne woltamogramy fali prostokątnej zarejestrowane dla kolejnych wzrastających stężeń PCR1 oraz PCR4 przedstawiono na *Rysunku 35*. Liniowy spadek prądu obserwowano w obecności wszystkich komplementarnych analitów - PCR1, PCR2 i PCR3 w zakresie stężeń od 10 pM do 100 pM.

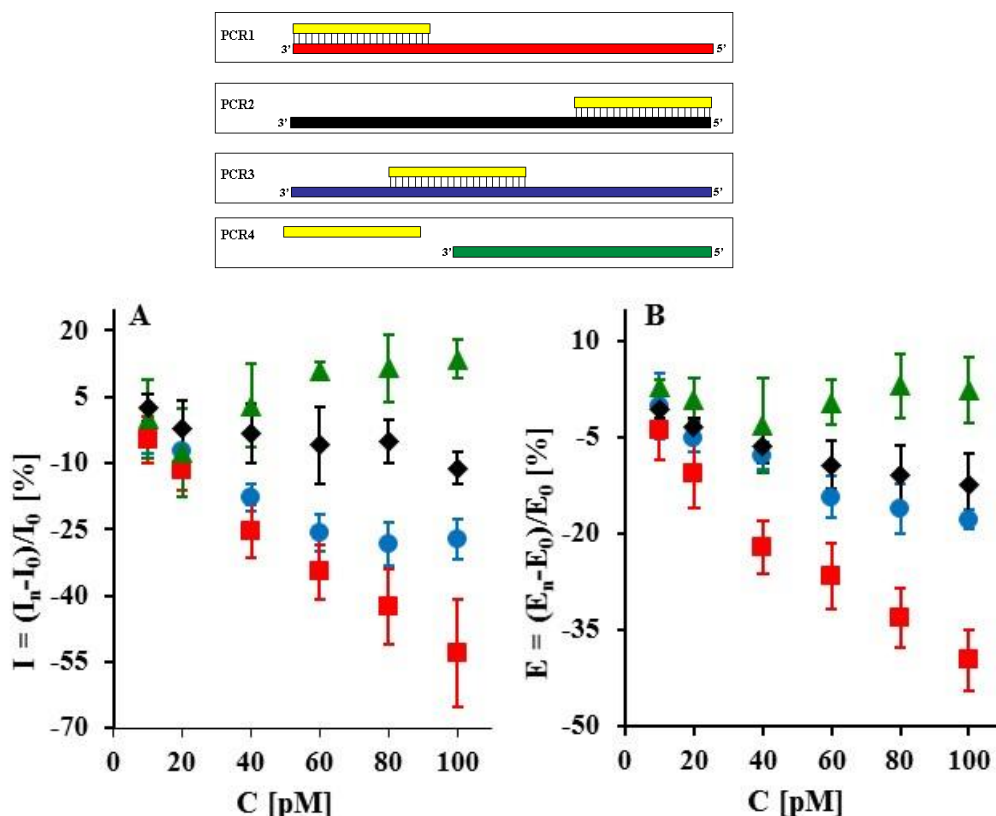


Rysunek 35. Przykładowe voltamogramy SWV (częstotliwość 25 Hz) zarejestrowane na dyskowych elektrodach złotych zmodyfikowanych warstwą SH-NC3/6-MCH. Krzywa przerywana - przed hybrydyzacją i kolejne krzywe po hybrydyzacji z sekwencją (A) PCR1 i (B) PCR4 dla stężeń: 10, 20, 40, 60, 80 i 100 pM.

Skład roztworu pomiarowego: 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ w 0.01 M PBS (pH = 7.4), trójelektrodowy układ pomiarowy: elektroda robocza – dysk złoty, elektroda odniesienia – chlorosrebrowa oraz elektroda pomocnicza – drut platynowy.

Najsilniejsza odpowiedź została wygenerowana przez PCR1 posiadający komplementarną sekwencję do sondy NC3 na końcu 3'. W tym przypadku proces hybrydyzacji przebiegał w pobliżu powierzchni elektrody, a część sekwencji PCR1 niebiorąca udziału w hybrydyzacji mogła ustawić się w kierunku roztworu. W obecności najwyższego stężenia (100 pM) produktu PCR1 obniżenie natężenia prądu piku wyniosło $53.0 \pm 12.0\%$, a wartość potencjału piku zmalała o $40.0 \pm 4.7\%$. Natomiast w PCR2, którego sekwencja komplementarna znajduje się na końcu 5', wydajność hybrydyzacji była bardzo słaba. Może to być związane z ograniczoną dostępnością do sondy unieruchomionej na powierzchni elektrody. Część niebiorąca udziału w procesie hybrydyzacji (159 nt na końcu 5') skierowana była w stronę powierzchni elektrody, a nie w kierunku roztworu. Natężenie prądu piku po hybrydyzacji z 100 pM PCR2 obniżyło się o $11.7 \pm 3.6\%$, a potencjał przesunął się w kierunku wartości ujemnych o $12.5 \pm 5.0\%$. W przypadku analitu PCR3, gdzie 82 nt na końcu 5' poprzedzały sekwencję komplementarną do sondy (region komplementarności do NC3 jest pomiędzy 83 a 103 nt) zaobserwowano obniżenie

natężenia prądu pikowego o $27.1 \pm 4.5 \%$, a wartość potencjału pikowego wzrosła o 17.7 ± 1.5 , czyli nastąpiło przesunięcie w kierunku wartości dodatnich. Analit PCR4 bez sekwencji komplementarnej spowodował jedynie niewielki wzrost natężenia prądu pikowego o $13.5 \pm 4.4 \%$, a wartość potencjału pikowego wzrosła o $2.3 \pm 5.1 \%$. Spadek wartości natężenia prądu pikowego, w różnym stopniu dla poszczególnych analitów (Rysunek 36A), koreluje się z przesunięciem potencjału w kierunku wartości ujemnych (Rysunek 36B).



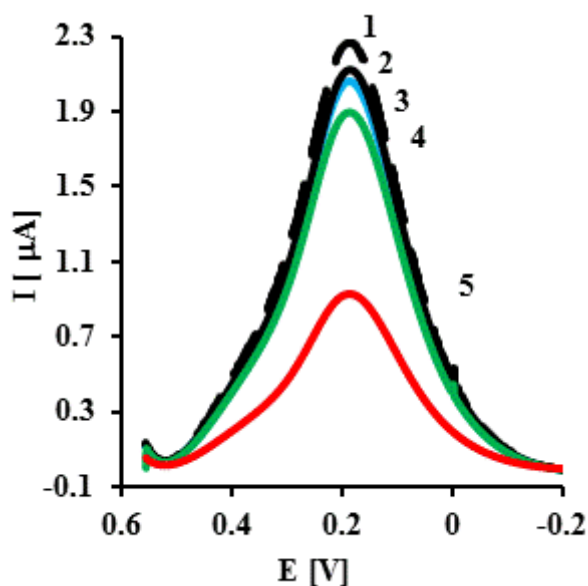
Rysunek 36. A) Zależność $I = (I_n - I_0)/I_0$ [%] od stężenia C [pM] (■) PCR1, (◆) PCR2, (●) PCR3 i (▲) PCR4 ($n=5\div 6$). B) Zależność $E = (E_n - E_0)/E_0$ [%] od stężenia C [pM] (■) PCR1, (◆) PCR2, (●) PCR3 i (▲) PCR4 ($n=5\div 6$).

Proponowany genoczuJNIK charakteryzował się dobrą czułością z granicą wykrywalności 24 i 22 pM dla c-NC3 i PCR1 wyznaczoną na podstawie Równania (8). Wykazywał również dobrą selektywność. Sygnały generowane przez produkty PCR były silniejsze w porównaniu z c-NC3, gdzie przy stężeniu 100 pM zaobserwowano $35.0 \pm 5.6 \%$ spadku natężenia prądu pikowego, natomiast dla PCR1 $53.0 \pm 12.0 \%$. Ponadto zaprezentowany genoczuJNIK był w stanie odróżnić fragmenty DNA zawierające sekwencje komplementarne w różnych położeniach.

9.5. Oznaczanie transkryptów RNA

Jako analitów do przetestowania zaproponowanego genoczujujnika użyto również ok. 280-merowych transkryptów RNA.

Czułość i selektywność genoczujujnika badano za pomocą czterech ok. 280-merowych transkryptów RNA z (RNA1, RNA2, RNA3) lub bez (RNA4) 20-merowego regionu komplementarnego do sondy SH-NC3. Położenie sekwencji komplementarnych było analogiczne do produktów PCR. Hybrydyzację z poszczególnymi transkryptami RNA przeprowadzono w jednym stężeniu – 10 pM. Przykładowe odpowiedzi genoczujujnika, po hybrydyzacji z RNA1-RNA4, zarejestrowane w technice SWV zademonstrowano na *Rysunku 37*.



Rysunek 37. Typowe krzywe SWV zarejestrowane na dyskowej elektrodzie złotej zmodyfikowanej warstwą SH-NC3/6-MCH. Krzywa przerywana (1) - przed hybrydyzacją i następne krzywe po hybrydyzacji z transkryptami o stężeniu 10 pM (2) **RNA4**, (3) **RNA2**, (4) **RNA3** oraz (5) **RNA1**.

Skład roztworu pomiarowego: 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ w 0.01 M PBS (pH 7.4). Warunki pomiarowe: trójelektrodowy układ pomiarowy - elektroda robocza – dysk złoty, elektroda odniesienia – chlorosrebrowa oraz elektroda pomocnicza – drut platynowy.

Stężenie 10 pM spowodowało zróżnicowane obniżenie natężenia prądu piku znacznika redoks w zależności od położenia sekwencji komplementarnej w transkrypcie RNA. Poszczególne wartości zestawiono w *Tabeli 6*.

Tabela 6. Zestawienie wartości obniżenia natężenia prądu piku ΔI po hybrydyzacji z poszczególnymi transkryptami RNA ($C = 10$ [pM]).

Rodzaj transkryptu RNA	ΔI [%] C=10 [pM]	Liczba powtórzeń
RNA1	-63 ± 6	7
RNA2	-11 ± 1	12
RNA3	-20 ± 2	7
RNA4	-8 ± 1	5

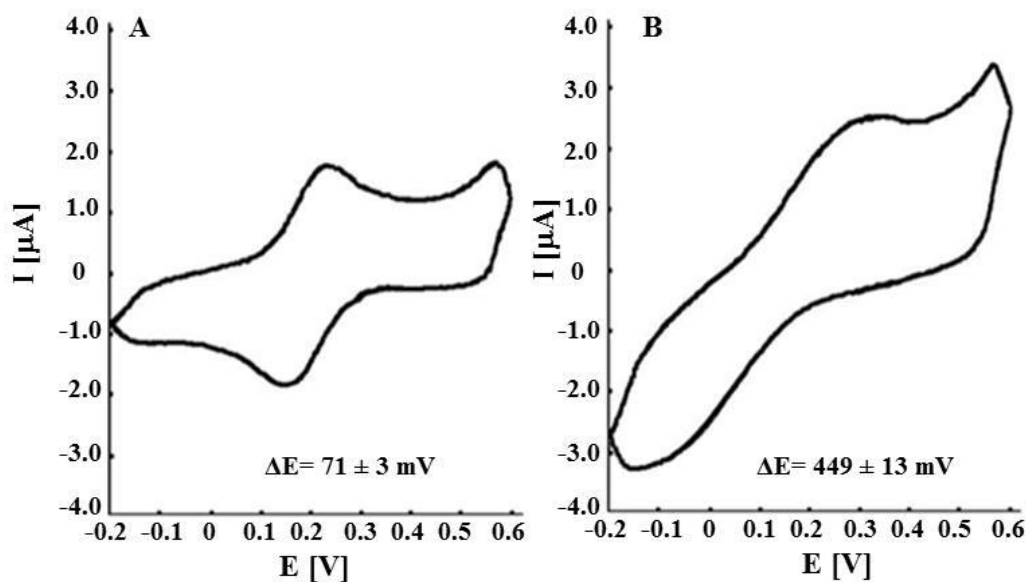
Analizując zmiany natężenia prądu piku utlenienia/redukcji $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ po hybrydyzacji z RNA można stwierdzić, że otrzymano wyniki analogiczne do tych z produktami PCR. Najsilniejszą odpowiedź zarejestrowano po hybrydyzacji z transkryptem RNA1 o stężeniu 10 pM – natężenie prądu piku obniżyło się $63 \pm 6\%$. Natomiast RNA4 nieposiadający sekwencji komplementarnej do sondy NC3 wygenerował słabą odpowiedź – natężenie prądu piku zmalało $8 \pm 1\%$, co potwierdziło selektywność badanego układu. W przypadku RNA3 odnotowano $20 \pm 2\%$ spadku natężenia prądu piku, a po hybrydyzacji z RNA2 natężenie obniżyło się o $11 \pm 1\%$.

Główną zaletą wykorzystania sekwencji RNA jest możliwość bezpośredniego wykrywania wirusa ptasiej grypy typu H5N1 w próbkach biologicznych, bez konieczności procesu odwrotnej transkrypcji RNA do DNA wirusa. Niewątpliwym walorem przedstawionego genoczuJNIKA jest również możliwość rozpoznawania położenia sekwencji komplementarnych w transkryptach RNA.

9.6. Miniaturyzacja genoczuJNIKA na sitodrukowanych elektrodach złotych

9.6.1. Optymalizacja osadzania sondy DNA

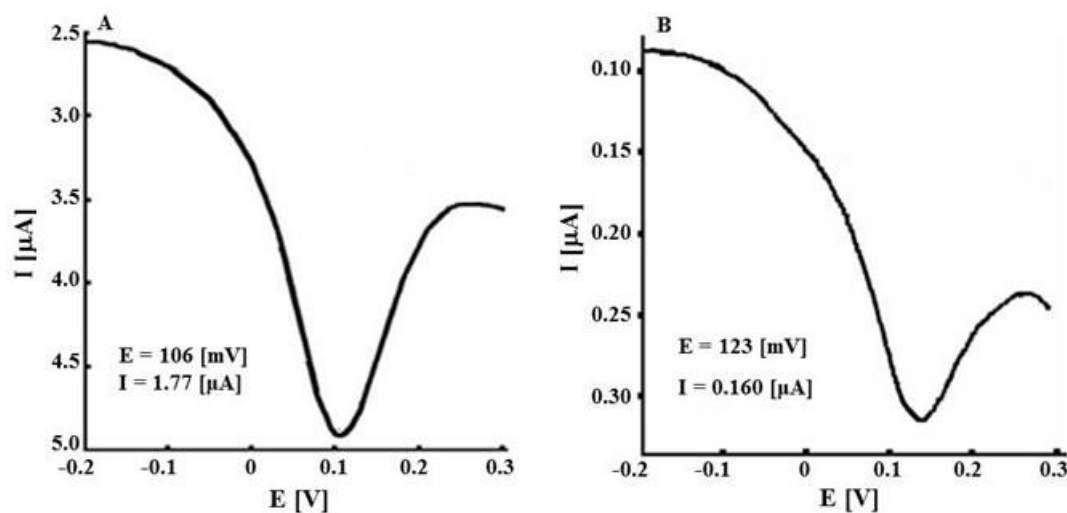
Modyfikację DEZ przeniesiono na SEZ w celu miniaturyzacji układu pomiarowego (Rozdział 7.1.4). Do buforu PBS, w którym kondycjonowano przez noc przygotowaną warstwę modyfikującą dodano 0.01% azydki sodu w celu zabezpieczenia sondy DNA przed mikroorganizmami. Osadzenie warstwy SH-NC3/6-MCH potwierdzono za pomocą CV oraz SWV w obecności $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ jako znacznika redoks. Jak przewidywano, krzywa CV zarejestrowana na czystej SEZ z zastosowaniem znacznika redoks potwierdziła odwracalność układu, z rozstawem pików utlenienia i redukcji $\Delta E = 71 \pm 3 \text{ mV}$ (Rysunek 38A). Po kowalencyjnym przyłączeniu warstwy SH-NC3/6-MCH do powierzchni SEZ natężenie prądu pików utlenienia i redukcji znacznie się zmniejszyło i nastąpił wzrost rozsunięcia pików do $449 \pm 13 \text{ mV}$ (Rysunek 38B), co wskazuje na zmniejszoną odwracalność badanego systemu.



Rysunek 38. Przykładowe krzywe CV zarejestrowane na (A) czystych elektrodach sitodrukowanych oraz (B) po modyfikacji z Au/SH-NC3/6-MCH.

Skład buforu pomiarowego: $1 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ w 0.01 M PBS , $\text{pH} = 7.4$.

W technice SWV na czystej SEZ pozycja pików wynosiła $E = 111 \pm 7$ mV, a prąd pikowy $I = 2.0 \pm 0.1$ μ A (Rysunek 39A). Po unieruchomieniu mieszanej warstwy SH-NC3/6-MCH wartość natężenia prądu pikowego uległa znacznemu obniżeniu do wartości $I = 0.15 \pm 0.01$ μ A, a potencjał pikowy przesunął się nieznacznie w kierunku wartości dodatnich do $E = 125 \pm 5$ mV (Rysunek 39B). Wyniki uzyskane za pomocą SWV korelują się z pomiarami CV.

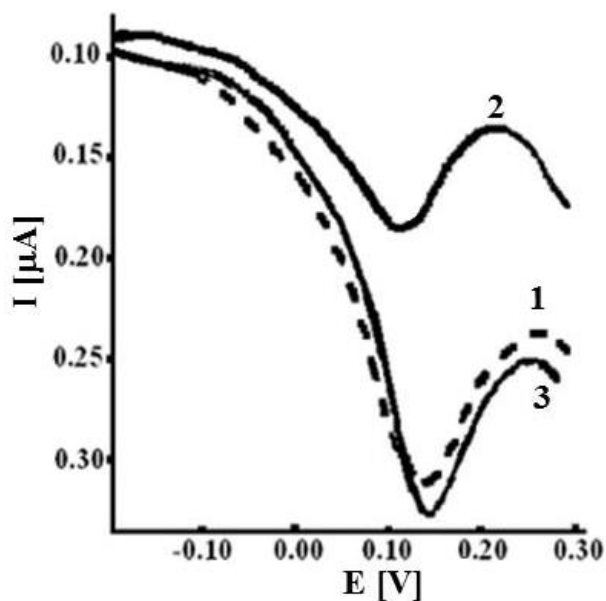


Rysunek 39. Przykładowe krzywe SWV zarejestrowane na (A) czystej elektrodzie sitodrukowanej oraz (B) po modyfikacji z SH-NC3/6-MCH.

Skład buforu pomiarowego: 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ w 0.01 M PBS.

9.6.2. Oznaczanie 20-merowych sekwencji DNA za pomocą techniki SWV

Zminiaturyzowany genoczuJNIK zastosowano do oznaczania 20-merowych sekwencji DNA charakterystycznych dla wirusa ptasiej grypy typu H5N1 techniką SWV. Przykładowe krzywe SWV zarejestrowane po hybrydyzacji w obecności c-NC3 i nc-NC3 przedstawiono na Rysunku 40. Po hybrydyzacji z 1 pM c-NC3 zaobserwowano spadek natężenia prądu pikowego utlenienia/redukcji znacznika redoks o $39.6 \pm 4.6\%$, natomiast 1 pM nc-NC3 generował znikomą odpowiedź – obniżenie natężenia prądu pikowego o $0.42 \pm 5.0\%$, co potwierdziło selektywność genoczuJNIKA.

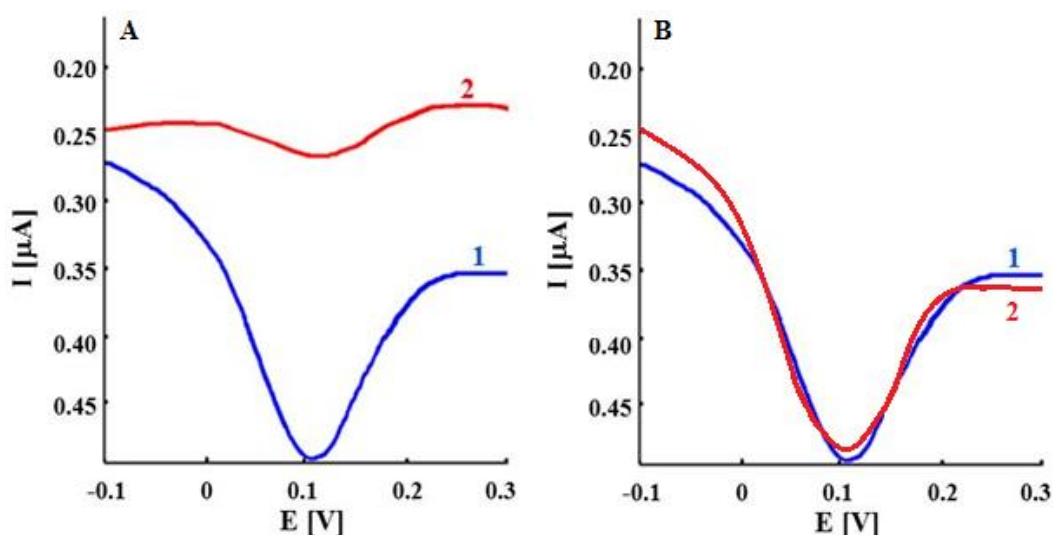


Rysunek 40. Przykładowe krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie sitodrukowanej zmodyfikowanej warstwą SH-NC3/6-MCH. Krzywą przerywaną - (1) zarejestrowano przed hybrydyzacją. Kolejne krzywe zarejestrowano po hybrydyzacji z sekwencją (2) c-NC3 oraz (3) nc-NC3 o stężeniu 1 pM.

Warunki pomiarowe: 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ w 0.01 M PBS pH 7.4.

9.6.3. Oznaczanie ok. 280-merowych transkryptów RNA

Elektrody sitodrukowane z powodzeniem zastosowano do konstrukcji genoczuJNIKA wykrywającego specyficzne sekwencje DNA wirusa ptasiej grypy w jednym stężeniu. Kolejnym krokiem było przetestowanie bioczuJNIKA do detekcji 280-merowych sekwencji RNA. Przeprowadzono analogiczny eksperyment jak na elektrodach dyskowych (Rozdział 9.5). Przykładowe krzywe SWV zarejestrowane po hybrydyzacji z RNA1 i RNA4 przedstawiono na Rysunku 41. Stężenie 1 pM RNA1, RNA2 i RNA3 spowodowało obniżenie natężenia prądu piku znacznika redoks o odpowiednio $-45.0 \pm 1\%$, $10.0 \pm 1\%$, $20.0 \pm 1\%$. Transkrypt RNA4 generował słabą odpowiedź - natężenie prądu piku obniżyło się o $-1.0 \pm 1\%$. Wartości te zostały zestawione w Tabeli 7.



Rysunek 41. Przykładowe krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie sitodrukowanej zmodyfikowanej warstwą SH-NC3/6-MCH. Krzywą niebieską (1) zarejestrowano przed hybrydyzacją. Krzywą czerwoną (2) zarejestrowano po hybrydyzacji z sekwencją: A) RNA1 oraz B) RNA4 o stężeniu 1 pM.

Warunki pomiarowe: 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ w 0.01 M PBS pH 7.4.

Celem przeprowadzenia procesu hybrydyzacji wyłącznie w jednym punkcie stężenia analitu z wykorzystaniem zminiaturyzowanego bioczuJNIKA była weryfikacja obecności specyficznej sekwencji wirusa ptasiej grypy w badanej próbce.

Na podstawie Tabeli 7 można stwierdzić, że zminiaturyzowany bioczuJNIK był w stanie wykrywać niższe stężenie (1 pM) transkryptów RNA w porównaniu do bioczuJNIKA opartego o DEZ (10 pM). W obydwu przypadkach stężenia transkryptów RNA zostały zoptymalizowane.

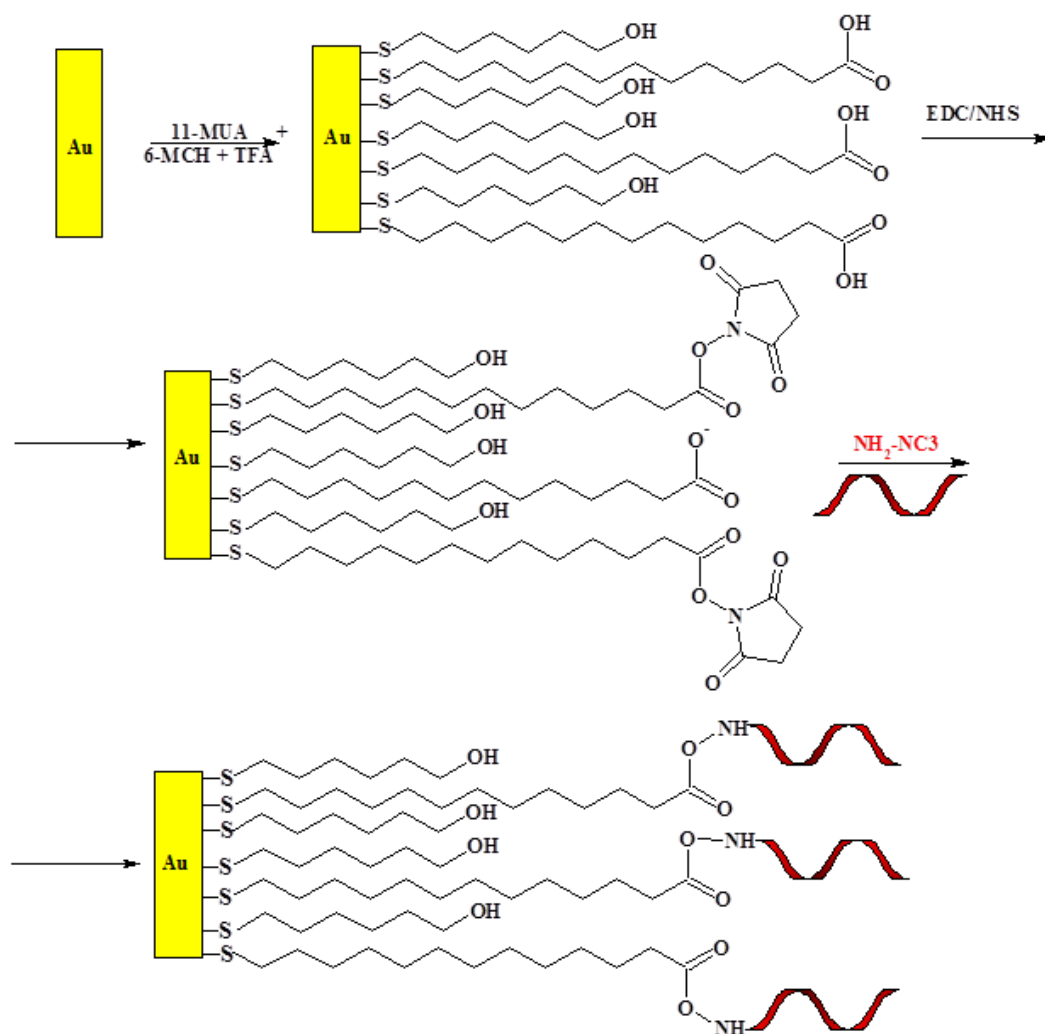
Tabela 7. Zestawienie wartości obniżenia natężenia prądu piku ΔI po hybrydyzacji z poszczególnymi transkryptami RNA na elektrodach dyskowych (DEZ) i sitodrukowanych (SEZ).

Transkrypt RNA	DEZ	SEZ
	ΔI [%] C = 10 [pM]	ΔI [%] C = 1 [pM]
RNA1	-63 ± 6 (n=7)	-45 ± 1 (n=8)
RNA2	-11 ± 1 (n=12)	-10 ± 1 (n=6)
RNA3	-20 ± 2 (n=7)	-20 ± 1 (n=7)
RNA4	-8 ± 1 (n=5)	-1 ± 1 (n=5)

10. Opracowanie elektrochemicznego genoczujujnika przeznaczanego do wykrywania specyficznych sekwencji DNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1 z zastosowaniem sondy osadzonej na elektrodzie złotej za pomocą wiązania amidowego

10.1. Charakterystyka poszczególnych etapów modyfikacji elektrod złotych

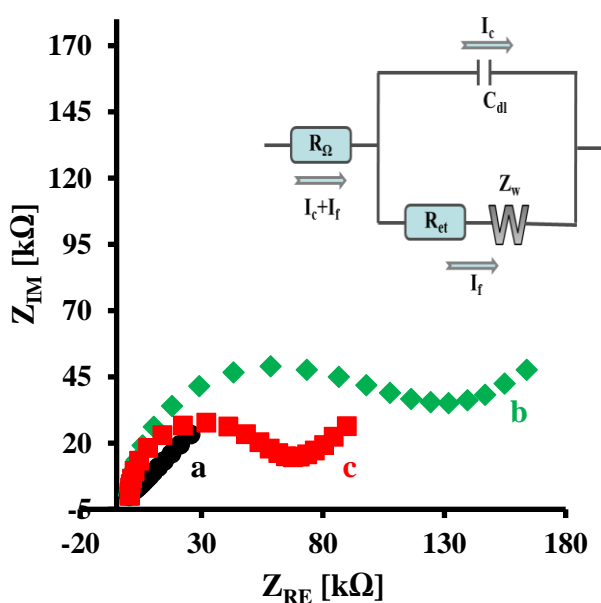
Drugim zaproponowanym w niniejszej rozprawie bioczuJNIKIEM przeznaczonym do wykrywania specyficznych sekwencji DNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1 jest czujnik posiadający sondę ssDNA unieruchomioną na powierzchni elektrody złotej za pomocą wiązania amidowego. Urządzenie to różni się od przedstawionego w rozdziale 10 sposobem osadzenia sondy ssDNA na powierzchni elektrody złotej. Pierwszy z zaproponowanych czujników skonstruowano w oparciu o bezpośrednie unieruchomienie sondy SH-NC3 na powierzchni elektrody złotej poprzez utworzenie wiązania kowalencyjnego Au-S. W tym przypadku natomiast jako sondę zastosowano pojedynczą nić DNA zmodyfikowaną grupą aminową NH₂-NC3, którą unieruchomiono na powierzchni elektrody złotej za pośrednictwem tiokwasu (11-MUA). W pierwszym etapie utworzono mieszaną warstwę tioli 11-MUA i 6-MCH. Aby przyłączyć sondę DNA z grupą -NH₂ do osadzonego na elektrodzie kwasu 11-MUA zastosowano powszechnie używaną w literaturze aktywację grup karboksylowych za pomocą mieszaniny EDC/NHS (Cho i wsp., 2012; Grabowska i wsp., 2014b; Kilic i wsp., 2012; Kraziński i wsp., 2011; Malecka i wsp., 2013; Zheng i wsp., 2014). W tym celu na 1h zanurzone elektrody do probówek zawierających 120 µL mieszaniny 0.1 M EDC i 0.05 M NHS w 0.05 M buforze MES o pH 5.5. Po tym czasie opłukano je 0.05 M buforem MES o pH 5.5 i 7.0 i zanurzone do buforu MES o pH 7.0 zawierającego sondę DNA NH₂-NC3. Po 18h inkubacji elektrody spłukano buforem MES (pH 7.0) i potraktowano 0.1 M roztworem ETA rozpuszczonym w 50 mM buforze MES o pH 5.5 przez 30 sekund w celu dezaktywacji (blokowania) pozostających grup estrowych NHS (Pan i wsp., 2009; Patel i wsp., 1998). Następnie zmodyfikowane elektrody opłukano 5 mL buforów: 50 mM MES (pH 7.0) i 10 mM PBS (pH 7.4) i kondycjonowano przez noc w 10 mM buforze PBS w temperaturze pokojowej. Poszczególne etapy tworzenia genoczujujnika przedstawiono na *Rysunku 42*.



Rysunek 42. Proces tworzenia genoczujujnika typu kanału jonowego na elektrodach złotych z zastosowaniem sondy $\text{NH}_2\text{-NC3}$.

Poszczególne etapy modyfikacji elektrod złotych w procesie tworzenia genoczujujnika ze względu na duży opór warstwy kontrolowano metodą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS). Widma impedancyjne przedstawiono w formie wykresów Nyquista. Opór przeniesienia elektronu poprzez zmodyfikowaną warstwę wyliczono stosując obwód zastępczy pokazany na wstawce *Rysunku 43*. Pomiar wykonany na czystej elektrodzie złotej dał w rezultacie linię prostą w wykresie Nyquista (*Rysunek 43a*) i opór transferu elektronów o wartości 12 k Ω . Linia prosta na wykresie Nyquista odnosi się do procesu elektrodowego ograniczonego szybkością dyfuzji znacznika redoks-aktywnego z roztworu do warstwy podwójnej. Oznacza to, że proces transferu elektronów przebiega szybciej niż dyfuzja znacznika w pobliżu powierzchni elektrody (Lasia i wsp., 1999). Opór 12 k Ω jest niski w porównaniu do oporów kolejnych warstw, co świadczy o niczym nieutrudnionym

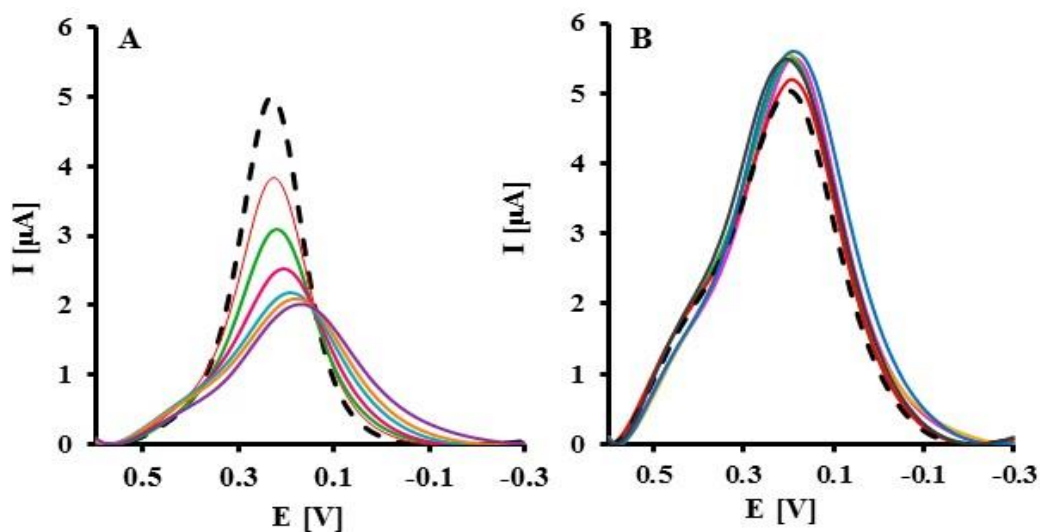
transporcie elektronów do powierzchni elektrody. Po uformowaniu na powierzchni elektrody mieszanej warstwy tiolowej 6-MCH i 11-MUA (Rysunek 43b) na wykresie Nyquista otrzymano krzywą składającą się z półokręgu i linii prostej, a opór transferu elektronów wyniósł $R_{et} = 130 \text{ k}\Omega$. Kształt półkolistej krzywej ilustruje proces ograniczony szybkością transferu elektronów, co oznacza, że dyfuzja zachodzi sprawniej niż transport elektronów. Dzieje się tak, ponieważ warstwa tiolowa blokuje dostęp znacznika z roztworu do powierzchni elektrody. Zwiększenie oporu transferu elektronów świadczy o powstaniu warstwy izolującej (Ulman, 1996). Immobilizacja sondy $\text{NH}_2\text{-NC3}$ poprzez aktywację grup karboksylowych mieszaniną EDC/NHS zmniejszyła opór transferu elektronów do $60 \text{ k}\Omega$ (Rysunek 43c). Prawdopodobnie różnica ta jest spowodowana uporządkowaniem się warstwy.



Rysunek 43. Kontrola procesu wytwarzania bioczuJNIKA za pomocą EIS. **Krzywa a** – czysta elektroda złota, **b (zielona)** – elektroda złota zmodyfikowana warstwą mieszaną 6-MCH i 11-MUA, **c (czerwona)** – elektroda złota zmodyfikowana sondą 6-MCH+11-MUA/ $\text{NH}_2\text{-NC3}$. Warunki pomiarowe: układ trójelektrodowy, zakres częstotliwości od 0.1 Hz do 10 kHz przy zadanym potencjale, którym był potencjał formalny znacznika redoks-aktywnego $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (170 mV) z amplitudą prądu zmiennego równą 10 mV. Obwód zastępczy użyty do dopasowania danych eksperymentalnych (krzywa b i c) zawierał zastępujące elementy: R_Ω – opór roztworu, C_{dl} – element fazy stałej, R_{et} – opór przeniesienia elektronu, Z_w – element Warburga.

10.2. Oznaczanie 20-merowych sekwencji DNA za pomocą SWV

Bioczułnik typu kanału jonowego zawierający sondę $\text{NH}_2\text{-NC3}$ zastosowano do oznaczania 20-merowej sekwencji c-NC3 . W celu zbadania selektywności układu zastosowano sekwencję nc-NC3 . Eksperymentalnie dobrano zakres stężeń badanych analitów. Przeprowadzono procesy hybrydyzacji w zakresie 10-100 fM. Przykładowe krzywe SWV odpowiedzi genoczułnika przedstawiono na Rysunku 44.



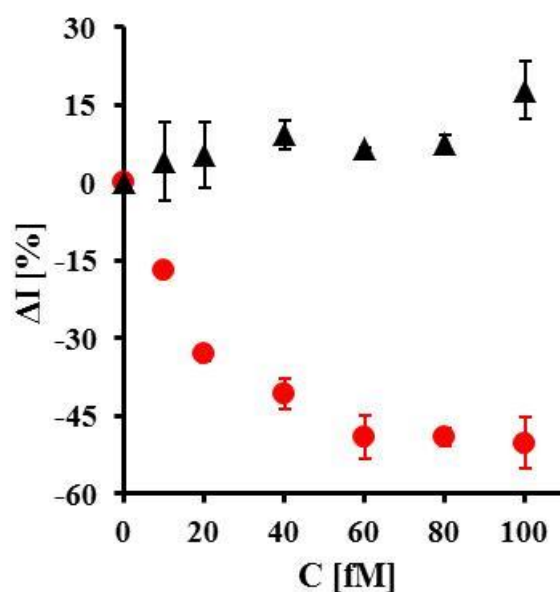
Rysunek 44. Przykładowe krzywe SWV zarejestrowane na elektrodach złotych zmodyfikowanych warstwą $\text{NH}_2\text{-NC3/6-MCH} + 11\text{-MUA}$ (krzywe przerywane), a następnie po hybrydyzacji z: A) c-NC3 ; B) nc-NC3 dla stężeń: 10, 20, 40, 60, 80 i 100 fM.

Skład roztworu pomiarowego: 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ w 0.01 M PBS (pH 7.4). Warunki pomiarowe: trójelektrowy układ pomiarowy - elektroda robocza – dysk złoty, elektroda odniesienia – chlorosrebrowa oraz elektroda pomocnicza – drut platynowy.

Ze wzrostem stężenia c-NC3 w badanej próbce natężenie prądu piku utlenienia/redukcji znacznika redoks-aktywnego ulegało obniżeniu, aż do momentu wysycenia układu - plateau zostało osiągnięte dla wartości stężenia 80 pM. Krzywe zależności względnych zmian natężenia prądu piku znacznika redoks w funkcji stężenia sekwencji c-NC3 i nc-NC3 pokazano na Rysunku 45.

Najwyższe stężenie c-NC3 – 100 fM spowodowało spadek natężenia prądu piku utlenienia/redukcji znacznika redoks o $49.1 \pm 4.3\%$, natomiast w przypadku sekwencji nc-NC3 zaobserwowano nieregularne zmiany natężenia prądu piku utlenienia/redukcji

znacznika redoks o $6.6 \pm 0.5 \%$ (Rysunek 45). Granica wykrywalności obliczona na podstawie *Równania (8)* wyniosła 10.0 fM.

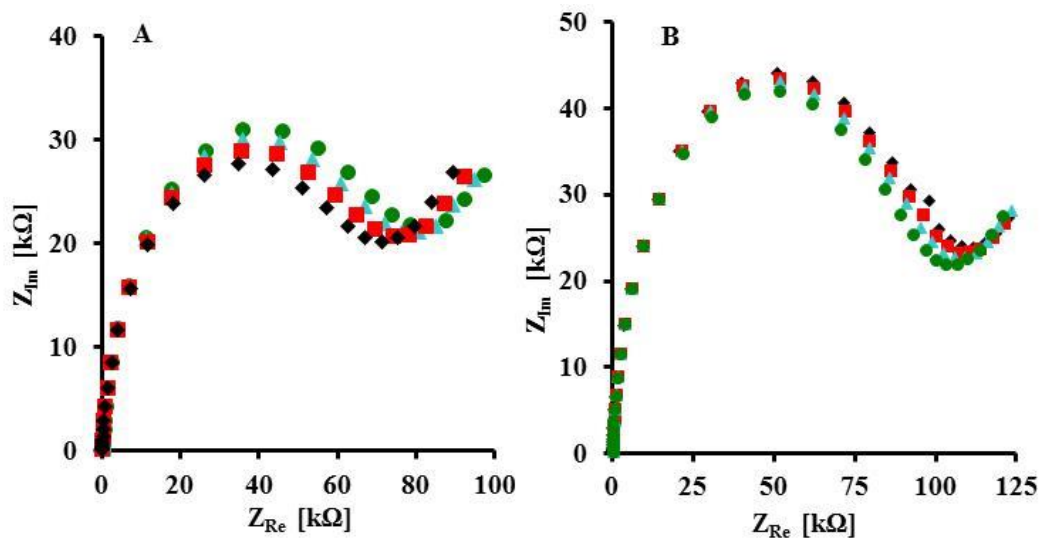


Rysunek 45. Zmiany względnego natężenia prądu piku ΔI [%] po hybrydyzacji z sekwencjami (●) c-NC3 oraz (▲) nc-NC3; $n=7$.

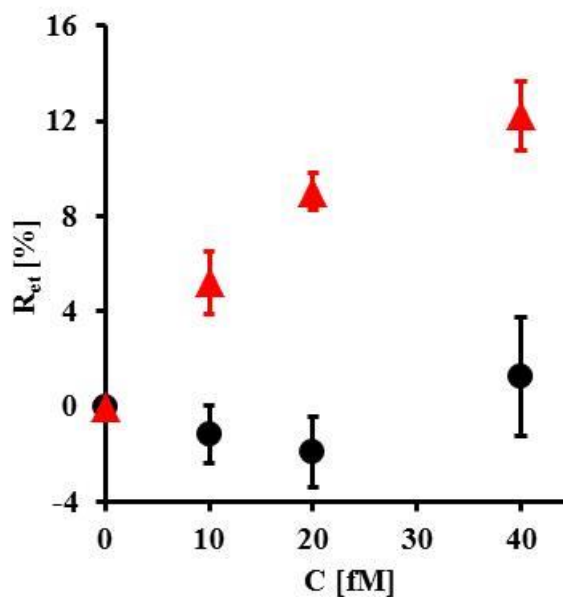
10.3. Oznaczanie 20-merowych sekwencji DNA za pomocą EIS

Oznaczanie 20-merowej sekwencji c-NC3 badano również za pomocą EIS. Eksperyment przeprowadzono analogicznie jak w przypadku SWV z ograniczeniem zakresu stężeń analitów od 10 do 40 fM.

Typowe widma impedancyjne zarejestrowane po hybrydyzacji dla kolejnych stężeń c-NC3 i nc-NC3 zilustrowano na *Rysunku 46*. Opór przeniesienia elektronu R_{et} zwiększał się wraz ze wzrostem stężenia analitu. Najwyższe stężenie analitu (40 fM) spowodowało wzrost oporu przeniesienia elektronu o $12.2 \pm 1.5\%$ dla c-NC3 i mały spadek oporu przeniesienia elektronu $1.3 \pm 2.5\%$ dla nc-NC3, co potwierdziło selektywność układu. Zmiany oporu warstwy analitycznie aktywnej po hybrydyzacji z sekwencjami c-NC3 oraz nc-NC3 pokazano na *Rysunku 47*.



Rysunek 46. Przykładowe widma impedancyjne zarejestrowane na elektrodach złotych zmodyfikowanych warstwą(♦) $\text{NH}_2\text{-NC3/6-MCH} + 11\text{-MUA}$ oraz pod wpływem hybrydyzacji: z (A) *c-NC3* oraz (B) *nc-NC3* o stężeniach: (■)10 fM,(▲) 20 fM i (●) 40 fM. Warunki pomiarowe jak na *Rysunku 43*.



Rysunek 47. Zmiany oporu warstwy analitycznie aktywnej R_{et} [%] po hybrydyzacji z sekwencjami (\blacktriangle) *c-NC3* oraz (\bullet)*nc-NC3* ($n=4$).

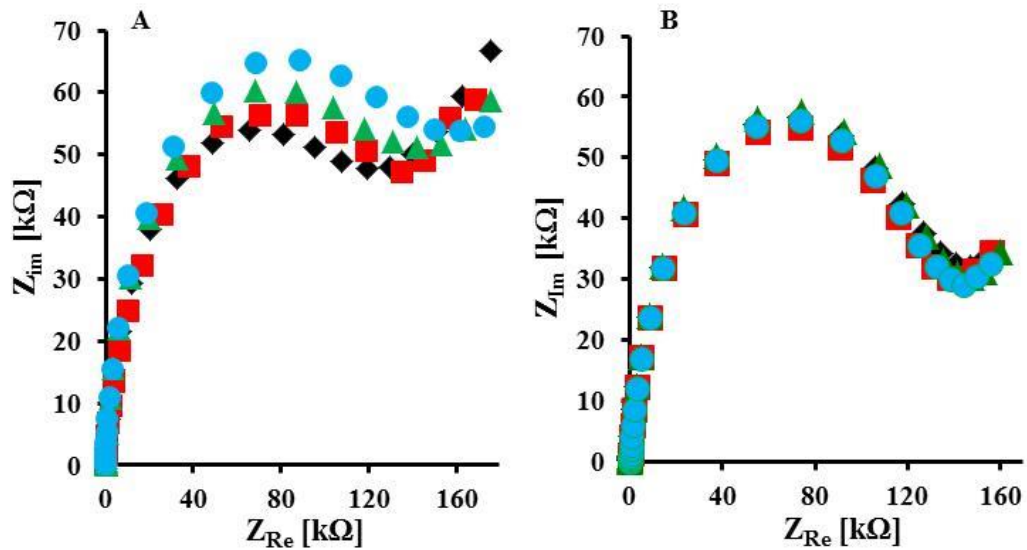
Bioczułnik ten charakteryzował się granicą wykrywalności 1.4 fM.

10.4. Oznaczanie produktów PCR za pomocą EIS

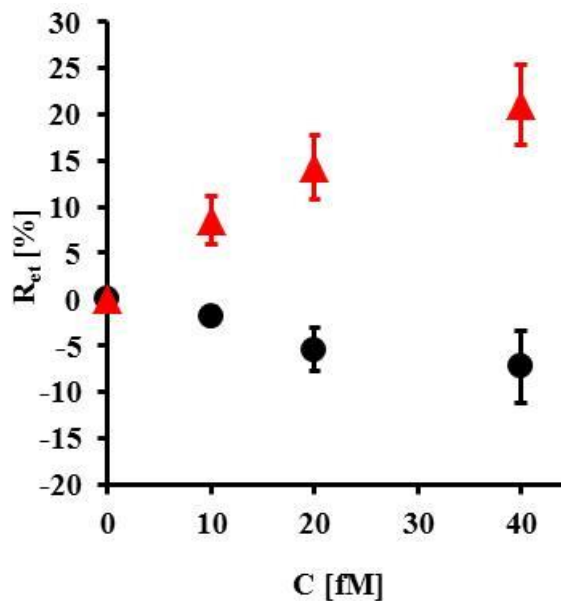
Analogiczne warunki pomiarowe, jak dla hybrydyzacji z udziałem 20-merowych sekwencji DNA zastosowano również w przypadku produktów PCR. Woltamperometria fali prostokątnej została z powodzeniem użyta jedynie w przypadku sekwencji 20-merowych. Produkty PCR oznaczano przy użyciu EIS, ponieważ hybrydyzacja z tymi analitami powoduje znaczne zablokowanie elektrody i zmiany po wytworzeniu helisy mogą nie być wystarczająco widoczne.

EIS jest szeroko stosowanym narzędziem badawczym, szczególnie w dziedzinie genoczujujących jest bardziej rozpowszechniona niż SWV (Ensafi i wsp., 2015; Fayazfar i wsp., 2014; Hu i wsp., 2012; Yang i wsp., 2012; Zhang i wsp., 2013; Zhu i wsp., 2015b), ze względu na mniejszą inwazyjność w pomiarach, a także dużą czułość w analizie zmian właściwości zachodzących na granicy faz warstwa analitycznie aktywna/roztwór pod wpływem hybrydyzacji (Li i wsp., 2007; Barsoukov i Macdonald, 2005).

Na *Rysunku 48A* przedstawiono przykładową odpowiedź genoczujującego, zawierającego w warstwie analitycznie aktywnej sondę $\text{NH}_2\text{-NC3}$, na wzrastające stężenie sekwencji PCR1 w 0.01 M buforze PBS o pH 7.4. Najwyższe stężenie analitu PCR1 (40 fM) spowodowało wzrost oporu transferu elektronów o $21.0 \pm 4.3 \%$ (*Rysunek 48A*). W eksperymencie kontrolnym z zastosowaniem produktu PCR4 (*Rysunek 48B*), w którym nie występuje sekwencja komplementarna do sondy NC3, dla najwyższego stężenia PCR4 (40 fM) zaobserwowano obniżenie oporu przeniesienia elektronu o $7.3 \pm 3.9 \%$ (*Rysunek 49, krzywa czarna*). Wobec powyższego można stwierdzić, że niespecyficzne interakcje ze zmodyfikowaną warstwą $\text{NH}_2\text{-NC3/6-MCH} + 11\text{-MUA}$ powierzchnią genoczujującego były nieznaczne. Granica wykrywalności w przypadku dwuniciowego DNA o długości 181 pz zawierającego 20 nukleotydów komplementarnych do sondy $\text{NH}_2\text{-NC3}$ na końcu 3' wyniosła 20.9 fM.



Rysunek 48. Przykładowe widma impedancyjne zarejestrowane na elektrodach złotych zmodyfikowanych warstwą $NH_2-NC3/6-MCH+11-MUA$ (◆) oraz po hybrydyzacji: z komplementarną sekwencjami (A) PCR1-NC3 oraz (B) PCR4-NC3 o stężeniach: (■) 10 fM, (▲) 20 fM i (●) 40 fM. Warunki pomiarowe jak na Rysunku 43.



Rysunek 49. Zmiany oporu przeniesienia elektronu w warstwie podwójnej R_{et} [%] po hybrydyzacji z sekwencjami (▲) PCR1-NC3 oraz (●) PCR4-NC3 ($n=5$).

11. Opracowanie elektrochemicznego genoczujujnika przeznaczonego do wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1 z zastosowaniem kompleksu Fe (III) z Tris(5,6-epoksy – 5,6 – dihydro – [1,10] – fenantroliną)

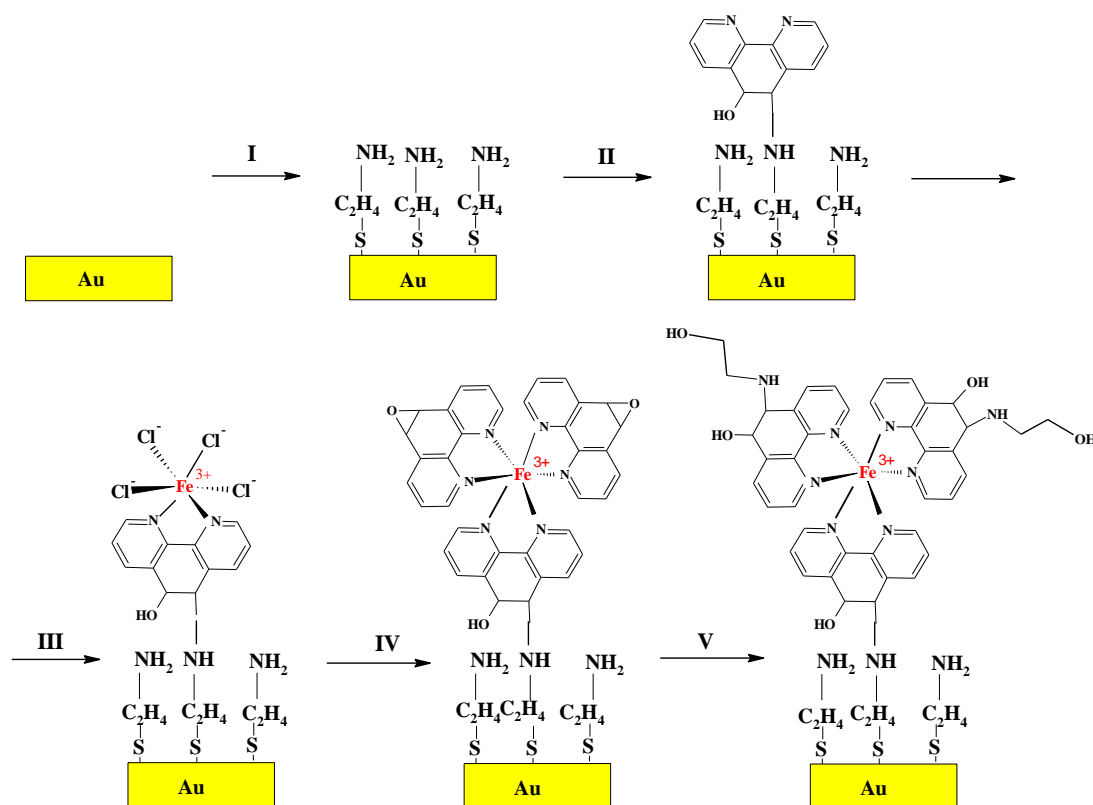
11.1. Opracowanie warstwy elektroaktywnej zawierającej kompleks Fe(III) z Tris(5,6-epoksy – 5,6 – dihydro – [1,10] – fenantroliną)

Warstwy redoks-aktywne osadzone na powierzchni elektrod stanowią doskonałą platformę do konstrukcji bioczuJNIKÓW. Centra redoks znajdujące się wewnątrz warstw elektroaktywnych są odpowiedzialne za przetwarzanie sygnałów pochodzących z procesu rozpoznania międzycząsteczkowego na sygnały analitycznie użyteczne (Dong i Li, 1997; Ferretti i wsp., 2000; Jargiło i wsp., 2013; Mielecki i wsp., 2013; Mikula i wsp., 2013, 2014; Grabowska i wsp., 2014b; 2014c; Kurzątkowska i wsp., 2015). Zaletą warstw elektroaktywnych jest brak konieczności stosowania znacznika redoks-aktywnego (obecnego w roztworze elektrolitu) do charakteryzowania zmodyfikowanych powierzchni elektrody, ponieważ sygnał analityczny generowany jest przez centra redoks-aktywne znajdujące się w warstwie.

Warstwy elektroaktywne można uzyskać m. in. metodą kowalencyjną, w której cząsteczki zawierające w swej budowie centra elektroaktywne są bezpośrednio osadzone na powierzchni elektrody poprzez utworzenie wiązania kowalencyjnego S-Au (Rowe i Creager, 1991; Rowe i wsp., 1995, Katz i Willner, 1997; Katz i wsp., 2004; Eckermann i wsp., 2010; Ruther i wsp., 2011). W niniejszej rozprawie zaproponowano kilkustopniowe tworzenie warstwy elektroaktywnej poczynając od SAMs, przez reakcję typu „click” (nukleofilowe otwarcie pierścienia epoksydowego) po koordynację jonów żelaza (III) przez atomy azotu pochodzące z pochodnej fenantroliny. Do tego celu zastosowano 5,6-epoksy – 5,6 – dihydro – [1,10] – fenantrolinę. Fenantrolina i jej pochodne dzięki silnym właściwościom kompleksującym mogą być szeroko stosowane do koordynowania wielu metali przejściowych, nie tylko jak w tym przypadku jonów Fe (III), ale na przykład: Co (II), Ni (II), Cu (I i II), Fe (II), Mn (II), Ru (II), Rh (III) (Arounaguirri i wsp., 2000; Mudasir i wsp., 2003;. Wei i wsp., 2008; Bencini i Lippolis 2010;. Qiu i wsp., 2011; Shee i wsp., 2011; Oluwafunmilayo Adekunle, 2013). W literaturze często spotykane jest zastosowanie reakcji typu „click” - reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydów do alkinów przyłączania cząsteczek lub

makrocząsteczek do powierzchni elektrod (Aiello i wsp., 2013; Bertucci i wsp., 2012; Furst i wsp. 2013; Grabowska i wsp., 2014c; Mahouche i wsp., 2009; Shamsi i wsp., 2011). Jednak według posiadanej wiedzy do tej pory nie zastosowano reakcji typu „click” – nukleofilowego otwarcia pierścienia epoksydowego w celu osadzenia cząsteczek na powierzchni elektrod.

W pierwszym etapie modyfikacji elektrod złotych miała miejsce spontaniczna samoorganizacja warstwy AET. Następnie poprzez reakcję typu „click” tj. nukleofilowego otwarcia pierścienia epoksydowego (Kolb i wsp., 2001), nastąpiło przyłączenie pochodnej fenantroliny (Phen-Epoksy). Po skompleksowaniu jonów żelaza (III) z roztworu FeCl_3 za pomocą Phen-Epoksy zamknięto kompleks ponownie za pomocą Phen-Epoksy, a grupy epoksydowe dezaktywowano w reakcji typu „click” grupami aminowymi pochodzącymi z ETA. Schemat modyfikacji elektrod złotych w celu otrzymania charakteryzowanej warstwy przedstawiono na *Rysunku 50*.

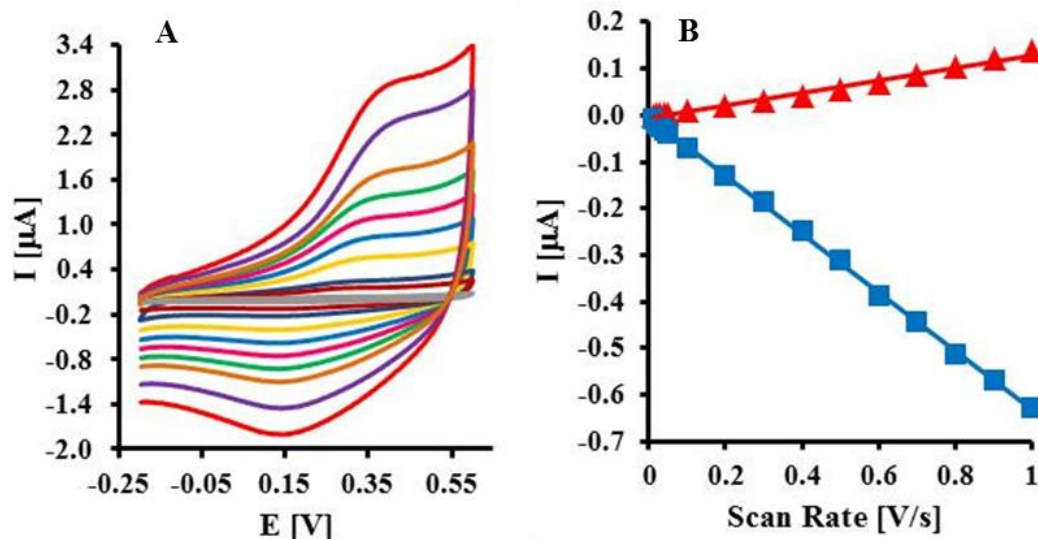


Rysunek 50. Schemat budowania warstwy redoks-aktywnej Au/AET/PhenEpoksy/Fe(III)/PhenEpoksy/ETA krok po kroku.

11.2. Potwierdzenie obecności centrum redoks-aktywnego na powierzchni elektrody złotej

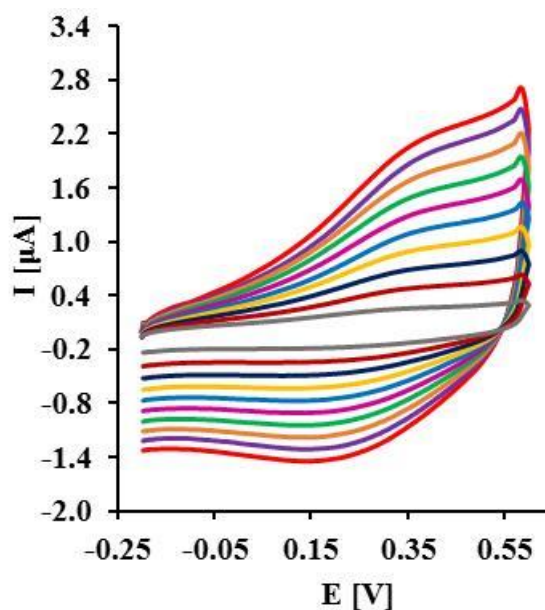
W celu skonstruowania bioczuJNIKA niezbędne jest przygotowanie odtwarzalnej i stabilnej warstwy analitycznie aktywnej. Zanim osadzono sondę ssDNA na warstwie redoks-aktywnej dokonano charakterystyki elektrochemicznej warstwy AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/ETA, gdzie grupy epoksydowe dezaktywowano przy użyciu ETA (*Rysunek 50*).

Obecność skompleksowanych jonów żelaza (III) na powierzchni elektrody złotej potwierdzono za pomocą CV w 0.1 M roztworze KCl. Charakterystyczne dla tej warstwy elektroaktywnej cykliczne woltamogramy przedstawiono na *Rysunku 51A*. Piki pochodzące od redukcji jonów Fe (III) i utlenienia jonów Fe (II) obserwowano przy potencjałach odpowiednio $E_{PK} = 248 \pm 9$ mV i $E_{PA} = 149 \pm 7$ mV, przy szybkości skanowania wynoszącej 100 mVs^{-1} . Rozstaw pików $\Delta E_p = 99 \pm 9$ mV wskazuje na proces quasi-odwracalny. Liniowa zależność wartości anodowych i katodowych prądów piku w funkcji szybkości przemiatań potencjałem od 50 do 1000 mVs^{-1} (*Rys. 51B*) sugeruje, że procesy redoks nie są zależne od dyfuzji, co potwierdza obecność kompleksu Phen-Epoksy/Fe (III)/Phen-Epoksy/ETA na powierzchni elektrody złotej.



Rysunek 51. (A) Przykładowe woltamogramy zarejestrowane techniką CV na elektrodzie złotej zmodyfikowanej warstwą Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/ETA z szybkościami przemiatania potencjałem w zakresie $50\text{-}1000\text{ mVs}^{-1}$. Skład roztworu pomiarowego: 0.1 M KCl . (B) Wykres zależności natężenia prądu pików (\blacktriangle , I_{PA}) utlenienia i (\blacksquare , I_{PK}) redukcji od szybkości zmian potencjału w zakresie od 50 do 1000 mV/s .

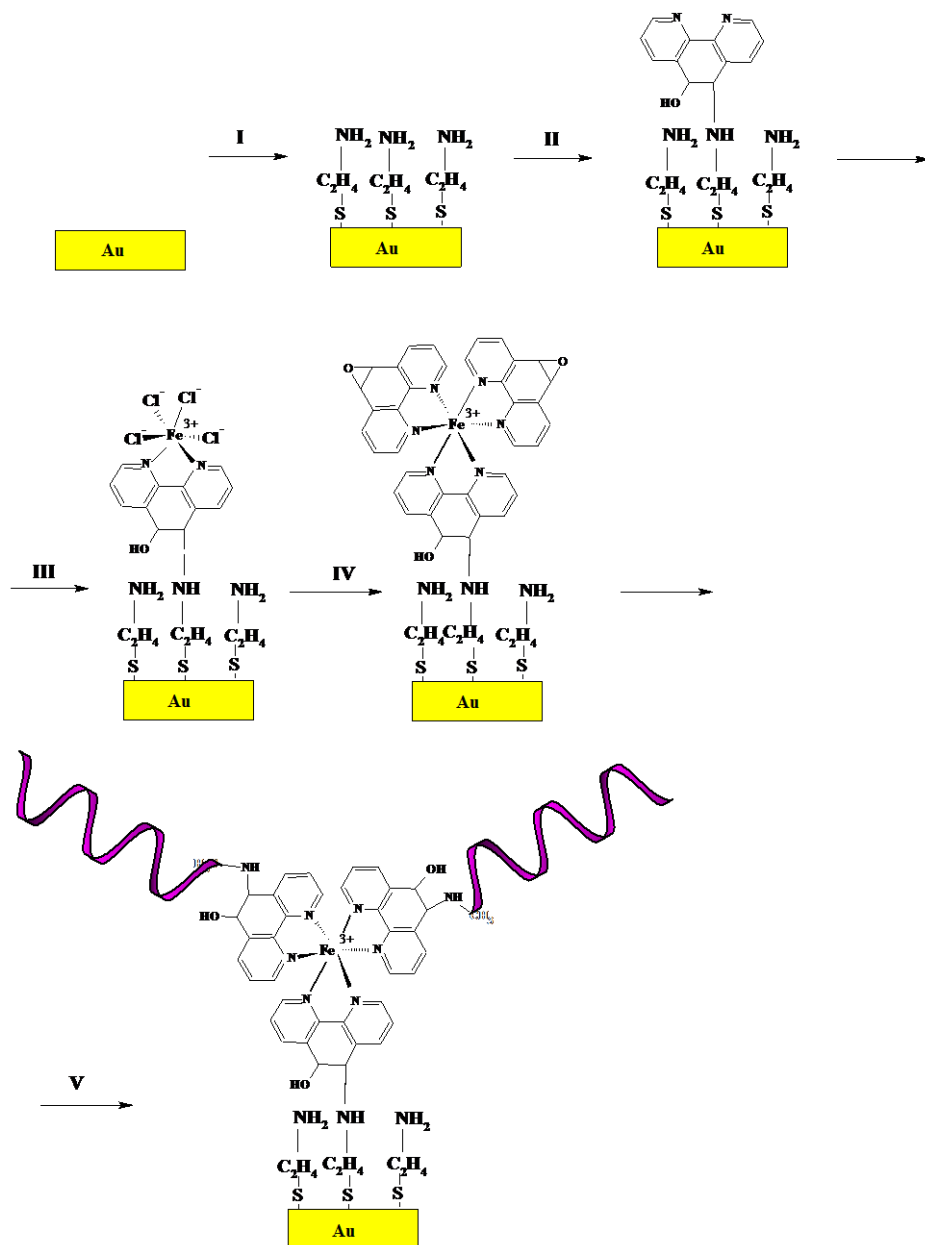
W przypadku warstwy z osadzoną na powierzchni poprzez reakcję typu „click” sondą $\text{NH}_2\text{-NC}_3$ ze względu na duży prąd pojemnościowy spowodowany wprowadzeniem do układu znacznego ładunku ujemnego, piki były słabo wykształcone i nie udało się sporządzić zależności wartości anodowych i katodowych prądów piku w funkcji szybkości przemiatania potencjałem. Przykładowe cyklowoltamogramy przedstawiono na Rysunku 52.



Rysunek 52. Przykładowe voltamogramy zarejestrowane techniką CV na elektrodzie złotej zmodyfikowanej warstwą Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/NH₂-NC3 z szybkością przemieszczania potencjałem 50-1000 mVs⁻¹ mierzona w 0.1 M KCl.

11.3. Potwierdzenie osadzania sondy NH₂-NC3 na warstwie redoks-aktywnej Au/AET/Phen-Epoksy/ Fe(III)/Phen-Epoksy/

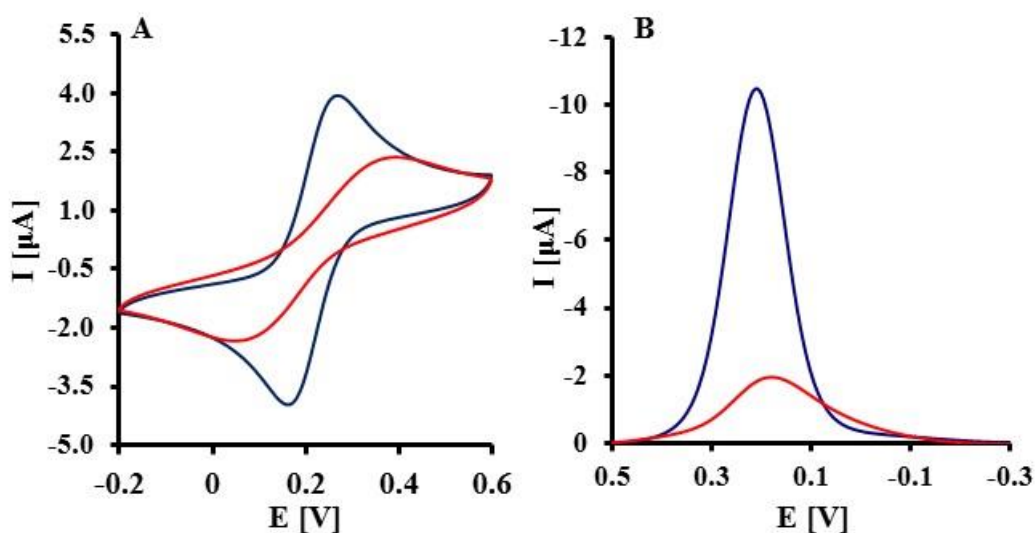
Podjęto próbę zastosowania warstwy elektroaktywnej Au/AET/Phen-Epoksy/ Fe(III)/Phen-Epoksy do konstrukcji genoczuJNIKA. Poprzez reakcję typu „click” – nukleofilowe otwarcie pierścienia epoksydowego osadzono na niej sondę DNA z grupą aminową. Schemat modyfikacji elektrod złotych przedstawiono na Rysunku 53.



Rysunek 53. Schemat modyfikacji elektrod złotych Au/AET/PhenEpoksy/Fe(III)/PhenEpoksy/NH₂-ssDNA celem przygotowania genoczuJNIka.

W celu potwierdzenia przyłączenia sondy NH₂-NC3 do zaproponowanej warstwy elektroaktywnej Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy zarejestrowano krzywe w technikach CV i SWV z zastosowaniem zewnętrznego znacznika redoks-aktywnego [Fe(CN)₆]^{3-/4-}. Scharakteryzowano warstwę Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/ETA oraz Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/NH₂-NC3. Przykładowe krzywe CV i SWV przedstawiono na Rysunku 54. W technice CV rozstaw pików dla warstwy Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/ETA wyniósł ΔE = 100 ± 7 mV,

natomiast po unieruchomieniu sondy zwiększył się do $\Delta E = 350 \pm 13$ mV. Obniżyło się również natężenie prądu pików utlenienia i redukcji. W technice SWV zaobserwowano tę samą tendencję. Wartość natężenia prądu pików przed osadzeniem sondy DNA wynosiła $I = 9.9 \pm 0.2$ μ A, natomiast po jej przyłączeniu $I = 2.7 \pm 0.1$ μ A – wartość ta zmalała o około 75%.



Rysunek 54. Przykładowe krzywe zarejestrowane techniką A) woltamperometrii cyklicznej oraz B) woltamperometrii fali prostokątnej na elektrodach złotych zmodyfikowanych warstwami *Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/ETA* oraz *Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/NH₂-NC3*.

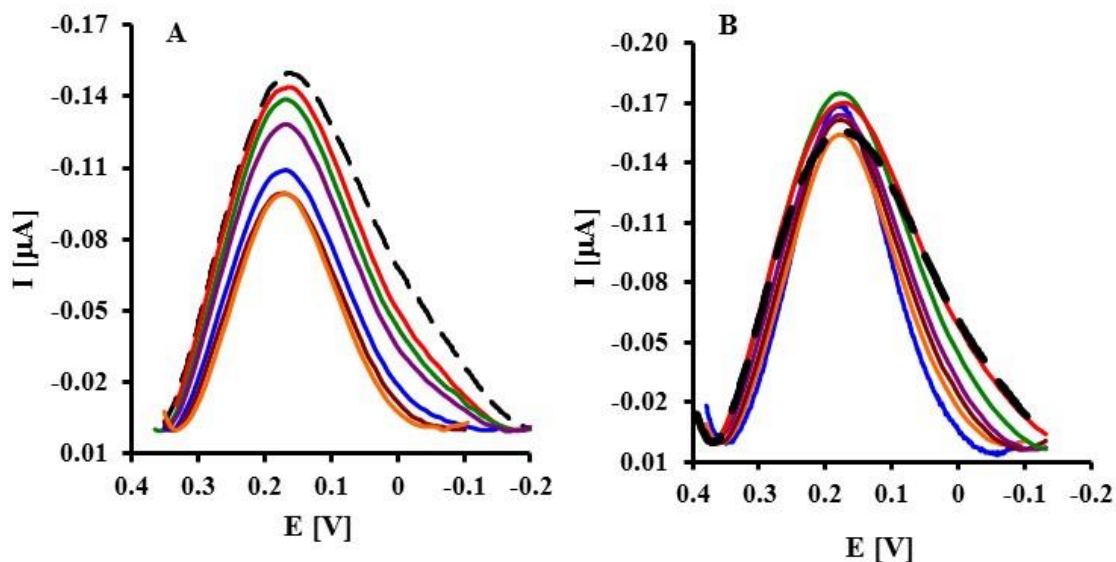
Warunki pomiarowe: 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ w 0.01 M PBS, pH 7.4.

11.4. Oznaczanie sekwencji DNA

Przetestowano trwałość zaproponowanej warstwy redoks-aktywnej AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy, która wyniosła 72h, natomiast powtarzalność modyfikacji osiągnęła 87 %. W związku z powyższym z powodzeniem zastosowano ją do stabilnego unieruchomienia sondy NH_2-NC3 przez reakcję typu "click" z grupą epoksydową. Skonstruowany genoczuJNIK był testowany poprzez badanie procesów hybrydyzacji m.in. z 20-mer specyficznymi sekwencjami DNA charakterystycznymi dla wirusa ptasiej grypy typu H5N1.

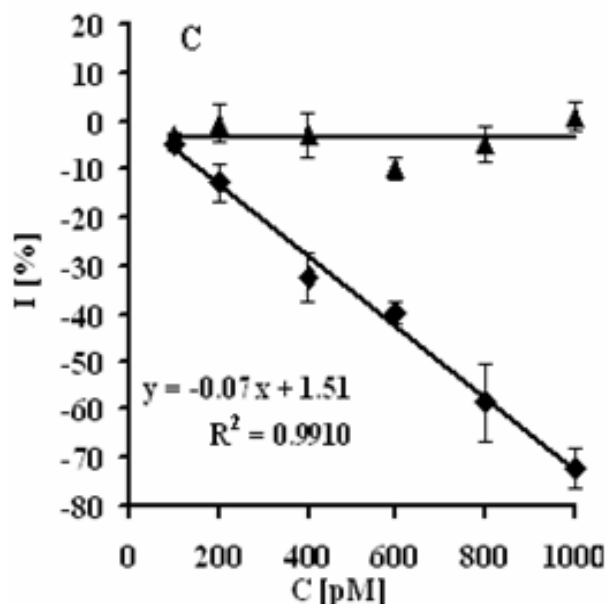
Przykładowe odpowiedzi genoczuJNIKA zarejestrowane za pomocą SWV przedstawiono na Rysunku 55. Wzrost stężenia komplementarnej sekwencji c-NC3 spowodował proporcjonalny spadek wartości natężenia prądu redukcji pików Fe (III)

(Rysunek 55A). Natomiast w obecności niekomplementarnej sekwencji nc-NC3 odpowiedzi genoczuJNIka były znikome (Rysunek 55B). Obniżenie natężenia prądu redoks pikowego pochodzącego od jonów Fe (III) w obecności najwyższego stężenia analitu c-NC3 wyniosło $72.2 \pm 4.3\%$ ($n = 6$). Najwyższe stężenie sekwencji nc-NC3 spowodowało natomiast nieznaczne obniżenie natężenia prądu o $0.92 \pm 2.1\%$ ($n = 6$) (Rysunek 56). Proponowany genoczuJNIk charakteryzował się dużą selektywnością i czułością z GW równą 73 pM.



Rysunek 55. Przykładowe krzywe SWV zarejestrowane przed hybrydyzacją (przerzywana krzywa czarna), a następnie po 30 minutach hybrydyzacji z (A) c-NC3 i (B) nc-NC3 dla stężeń: 100, 200, 400, 600, 800 i 1000 pM.

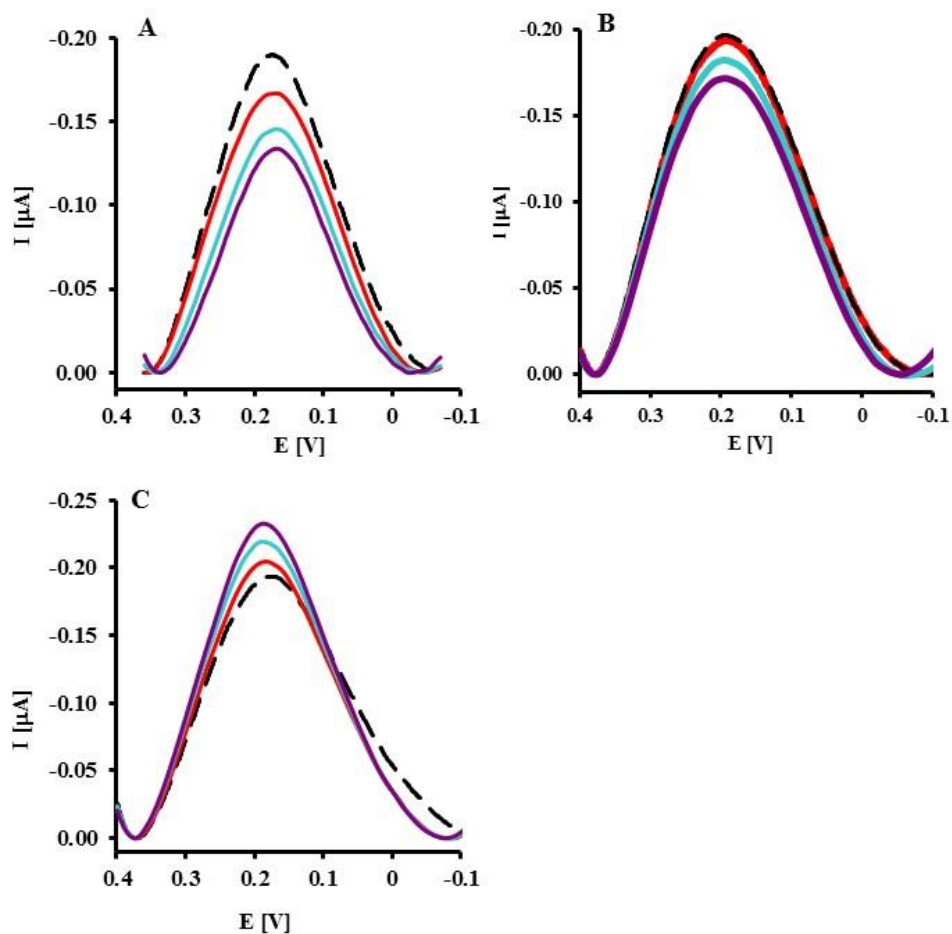
Warunki pomiarowe: 0.01 M PBS, pH 7.4.



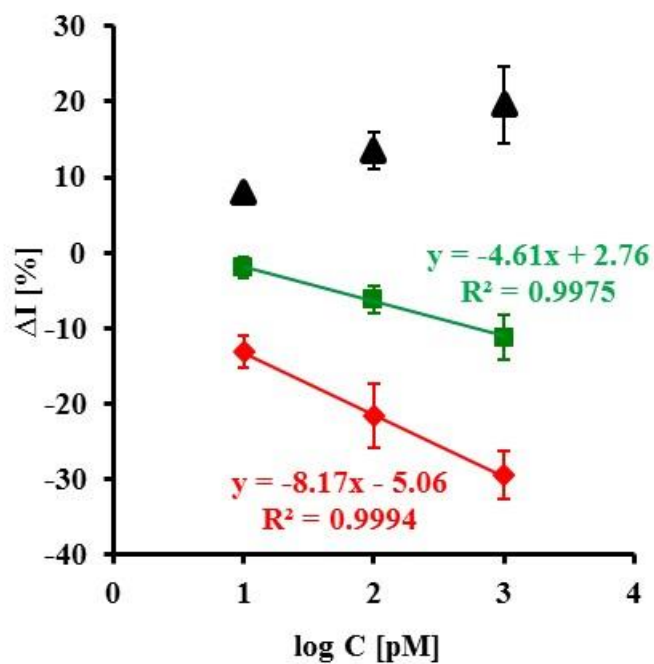
Rysunek 56. Zależność $I=(I_n-I_0)/I_0$ [%] od stężenia C [pM] (◆) komplementarnej sekwencji *c-NC3* oraz (▲) niekomplementarnej sekwencji *nc-NC3*.

11.5. Oznaczanie transkryptów RNA

Czułość i selektywność genoczuJNIKA sprawdzono stosując trzy ~280-merowe transkrypty RNA, zawierające (RNA1, RNA3) lub niezawierające (RNA4) 20-merowej komplementarnej do sondy NH₂-NC3 sekwencji RNA. Eksperymenty przeprowadzono analogicznie do hybrydyzacji z sekwencjami DNA. Przykładowe odpowiedzi genoczuJNIKA dla transkryptów RNA posiadających sekwencje komplementarne w różnych położeniach zarejestrowane za pomocą techniki SWV przedstawiono na *Rysunku 57*. Wraz ze wzrostem stężenia analitów RNA1 (*Rysunek 57A*) i RNA3 (*Rysunek 57B*), w zakresie od 10 do 1000 pM, zaobserwowano liniowe obniżenie natężenia prądu piku redoks Fe(III)/Fe(II). Spadek natężenia prądu piku w obecności najwyższego stężenia analitów RNA1 i RNA3 wyniósł odpowiednio $29.5 \pm 3.1\%$ i $11.2 \pm 3\%$. W obecności RNA4 obserwowano wzrost natężenia prądu o $19.6 \pm 5.0\%$ (*Rysunek 58*), co potwierdziło selektywność badanego układu. Najsilniejszy sygnał został wygenerowany w wyniku procesu hybrydyzacji z RNA1 (*Rysunek 58, krzywa czerwona*). Mogło to być związane z odległością sekwencji komplementarnej od końca 3' w transkryptach RNA1 i RNA2 (odpowiednio 181 nt i 103 nt). Kolejnym parametrem wpływającym na wielkość generowanego sygnału jest różna dostępność sekwencji komplementarnej w drugorzędowej strukturze RNA (Malecka i wsp., 2015).



Rysunek 57. Przykładowe krzywe SWV uzyskane dla genoczuJNIKA Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/NH₂-NC3 w buforze PBS zawierającym 0 pM (krzywa przerywana), 10 pM (krzywa czerwona), 100 pM (krzywa niebieska) i 1000 pM (krzywa fioletowa) po procesie hybrydizacji z sekwencjami: A) RNA1; B) RNA3 oraz C) RNA4. Warunki pomiarowe: 0.01 M PBS, pH 7.4.



Rysunek 58. Zależność $I=(I_n-I_0)/I_0$ [%] od logarytmu ze stężenia C [pM] (♦) RNA1, (■) RNA3 oraz (▲) niekomplementarnej sekwencji RNA4 ($n=5\div 6$).

Proponowany genoczujnik charakteryzował się dobrą selektywnością i czułością, z GW 0.87 pM i 0.94 pM dla RNA1 i RNA3. Warto również podkreślić, że genoczujnik ten wykazał zdolność rozróżniania położenia 20-merowych sekwencji komplementarnych w transkryptach RNA.

PODSUMOWANIE

Podsumowanie genoczuJNIKÓW typu kanału-jonowego

W opisanych powyżej rozdziałach niniejszej rozprawy przedstawiono dwa genoczuJNIKI typu kanału jonowego różniące się sposobem osadzenia sondy ssDNA na powierzchni elektrody złotej, ze względu na jej modyfikację różnymi grupami funkcyjnymi (-SH i -NH₂). Sonda SH-NC3 była bezpośrednio przymocowana do powierzchni elektrody złotej za pomocą wiązania kowalencyjnego złoto – siarka, natomiast sondę NH₂-NC3 unieruchomiono za pomocą tiokwasu (11-MUA) poprzez utworzenie wiązania amidowego. W obu przypadkach 6-MCH pełnił funkcję rozcieńczalnika.

Na podstawie pomiarów woltamperometrycznych wyznaczono granice wykrywalności genoczuJNIKÓW posiadających w warstwie analitycznie aktywnej sondę NH₂-NC3 (zwanego czujnikiem NH₂-NC3) lub SH-NC3 (zwanego czujnikiem SH-NC3). W przypadku sekwencji c-NC3 granica wykrywalności (GW) czujnika NH₂-NC3 była cztery rzędy wielkości niższa i wyniosła 1.4 fM, natomiast GW czujnika SH-NC3 była równa 24 pM. Różnice te mogą być spowodowane większą odległością nitki DNA od powierzchni elektrody. Sonda NH₂-NC3 jest oddalona od powierzchni elektrody na długość łańcucha 11-MUA i ten bioczuJNIK generuje wyższy sygnał po procesie hybrydyzacji. Przyczyną tego zjawiska może być zwiększona ruchliwość sondy, co implikuje jej lepszą dostępność dla analitów (Kukul i wsp., 2008).

Impedancyjny genoczuJNIK NH₂-NC3 wykrywał krótkie i długie sekwencje DNA z granicą wykrywalności 10.0 i 20.9 fM. Natomiast za pomocą bioczuJNIKA SH-NC3 można było zaobserwować zależność pomiędzy położeniem sekwencji komplementarnej w produktach PCR i transkryptach RNA a wielkością generowanego sygnału po procesie hybrydyzacji. Jednak ten genoczuJNIK okazał się mniej czuły dla krótkich i długich sekwencji DNA.

W przypadku analizy procesów hybrydyzacji z transkryptami RNA z zastosowaniem bioczuJNIKA SH-NC3 nie sporządzano krzywych kalibracyjnych, sprawdzano jedynie czy zaproponowany czujnik odpowiada na zadany analit w jednym stężeniu. W przypadku obu czujników odpowiedzi zaobserwowane po procesie hybrydyzacji z produktem PCR1 (181 pz) były silniejsze niż te zarejestrowane

po hybrydyzacji z c-NC3. Można to wyjaśnić większym ładunkiem ujemnym obecnym na produkcie PCR1 w porównaniu do c-NC3.

Zminiaturyzowano genoczuJNIK oparty o warstwę SH-NC3/ 6-MCH skonstruowany na elektrodzie sitodrukowanej. Zastosowano go do wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1. W przypadku obu analitów opracowany bioczuJNIK wykazał dobrą czułość i selektywność, a także był w stanie rozróżnić położenia 20-merowej sekwencji komplementarnej w ok. 280-merowej nici RNA. Natomiast obie niekomplementarne sekwencje generowały słabe odpowiedzi. Warto podkreślić, że głównymi zaletami prezentowanego zminiaturyzowanego genoczuJNIka są: jego proste wykonanie, przydatność do oznaczania jednoniciowych transkryptów RNA i rozróżnienie położenia 20-merowej sekwencji komplementarnej w ok. 280-merowych transkryptach RNA.

Biorąc pod uwagę parametry takie jak czułość, selektywność i łatwość przygotowania czujnika, można stwierdzić, że genoczuJNIki zarówno SH-NC3, jak i NH₂-NC3 zaproponowane w niniejszej rozprawie z powodzeniem udało się zastosować do wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1.

Konfrontując zaproponowane w niniejszej rozprawie genoczuJNIki (SH-NC3 oraz NH₂-NC3) z jonokanałowymi czujnikami przeznaczonymi do wykrywania patogenów przedstawionymi w literaturze naukowej (*Tabela 8*) należy stwierdzić, że zaproponowane w niniejszej rozprawie genoczuJNIki typu kanału jonowego (SH-NC3 oraz NH₂-NC3) charakteryzują się niską granicą wykrywalności i za ich pomocą można wykrywać długie sekwencje DNA (ok. 180 pz). Zestawione w *Tabeli 8* przykładowe czujniki DNA są w stanie wykrywać krótkie – około 20-merowe komplementarne sekwencje DNA. Wyjątek stanowi czujnik zaproponowany przez Elshafey i współpracowników (Elshafey i wsp., 2015), który wykrywa oligonukleotyd o długości 59 merów. Jednak w żadnej z wymienionych przykładowych publikacji naukowych autorzy nie stosują długich sekwencji DNA – produktów PCR, a tym bardziej transkryptów RNA.

Tabela 8. Porównanie zaproponowanych genoczuJNIKÓW typu kanału jonowego z opublikowanymi w literaturze naukowej.

Sposób modyfikacji elektrody	Technika pomiarowa	Analit	Granica wykrywalności [M]	Referencje
Au/SH-ssDNA + 6-MCH /6-MCH	EIS [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	23-mer	10 ⁻¹⁰	Kukol i wsp., 2008
GCE-COOH/biotin-ssDNA	CV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	24-mer ssDNA	8.51 · 10 ⁻¹⁴	Chung i wsp., 2011
Au/SH-ssDNA + 6-MCH /6-MCH	CV, SWV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	20-mer ssDNA 179-183-mer dsDNA	181-mer 2.4 · 10 ⁻¹¹ 20-mer 2.2 · 10 ⁻¹¹	Malecka i wsp., 2012
Au/6-MCH + 11-MUA/ NH ₂ -ssDNA	SWV, EIS [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	ssDNA 20-mer dsDNA 181-pz	SWV 20-mer - 10 ⁻¹⁴ EIS 181-pz - 2.1 · 10 ⁻¹⁴ 20-mer - 1.4 · 10 ⁻¹⁵	Malecka i wsp., 2013
GCE/ NH ₂ -ssDNA	SWV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	22-mer i 42-mer ssDNA PPV	2.4 · 10 ⁻¹² i 2.3 · 10 ⁻¹²	Malecka i wsp., 2014
PGE/ G4-PDR/ NH ₂ -ssDNA	CV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	20 mer HBV ssDNA	1.45 · 10 ⁻⁶	Mese i wsp., 2014
MWCNTs + Ch + ssDNA kompozyt	EIS [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	ssDNA	10 ⁻¹⁴	Van Thu i wsp., 2014
Au/disiarczki-ssDNA	EIS [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	59-mer ssDNA VFDF	5 · 10 ⁻¹⁰	Elshafey i wsp., 2015
GCE/ Gr-VS2/ AuNPs/ssDNA	DPV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	21-mer	5.2 · 10 ⁻¹⁴	Fang i wsp., 2015
GCE/NH ₂ -ssDNA	EIS [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	21 mer ssDNA Salmonella	1.5 · 10 ⁻¹³	Tabrizi i Shamsipur, 2015
GCE/AuNPs/PEG/SH-ssDNA		19-mer ssDNA BRCA1	1.72 · 10 ⁻¹⁵	Wang i wsp., 2015
Au/SH-ssDNA + 6-MCH/6-MCH	SWV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	20-mer ssDNA 280-mer RNA	nie wyznaczono	Malecka i wsp., 2016

Skróty: Au – elektroda złota, 6-MCH – 6-merkaptohexanol, SH-ssDNA – sonda DNA zmodyfikowana grupą tiolową, EIS – elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna, GCE – elektroda z węgla szklatego, CV – voltamperometria cykliczna, SWV – voltamperometria fali prostokątnej, ds-DNA – podwójna nić DNA, 11-MUA – kwas 11-merkaptoundekanolowy, NH₂-ssDNA - sonda DNA zmodyfikowana grupą aminową, PPV – wirus ospowatości śliwy, PGE – ołówkowa elektroda grafitowa, G4-PDR – poliamidoaminowy dendrymer czwartej generacji, HBV – wirus zapalenia wątroby typu B, MWCNTs - wielościennie nanorurki węglowe, Ch – chitozan, VFDF – anatokosyna-a, Gr-VS2 – mieszanina grafen-disiarczki wanadu, AuNPs – nanocząsteczki złota, DPV – voltamperometria pulsowa różnicowa, PEG – glikol polietylenowy, BRCA1- gen nowotworu piersi

Czułość prezentowanych w *Tabeli 8* genoczujników waha się w przedziale od 1 μM do 1 fM. Najniższą granicę wykrywalności $1.72 \cdot 10^{-15}$ M otrzymano w przypadku czujnika skonstruowanego na elektrodzie węglowej z zastosowaniem nanocząstek złota (Wang i wsp., 2015). Powszechnie wiadomo, że nanocząsteczki złota stosuje się w celu poprawienia czułości, stabilności i selektywności urządzenia (Saha i wsp., 2012). Natomiast zaproponowany w niniejszej rozprawie czujnik $\text{NH}_2\text{-NC3}$ (Malecka i wsp., 2013), charakteryzuje się zbliżoną granicą wykrywalności (dla sekwencji 20-merowych) równą $1.4 \cdot 10^{-15}$ M i posiada prostą konstrukcję opierającą się na mieszaninie związków tiolowych (6-MCH i 11-MUA).

Natomiast zaproponowany przez Kukola i współpracowników genoczujnik wytworzony przy użyciu sondy SH-ssDNA posiadającej różne długości łącznika między grupą -SH a oligonukleotydem wykazał o jeden rząd wielkości słabszą czułość dla komplementarnych sekwencji 23-mer (Kukol i wsp., 2008) w porównaniu do skonstruowanego w podobny sposób czujnika SH-NC3 (Malecka i wsp., 2012).

Podsumowanie genoczuJNIKA opartego o warstwę elektroaktywną AET/Phen-Epoksy/Fe (III)/Phen-Epoksy

Zaproponowana warstwa elektroaktywna AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy stanowiła bazę do budowy bioczuJNIKA wykrywającego specyficzne sekwencje DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1.

Za pomocą charakterystyki elektrochemicznej potwierdzono trwałe osadzenie kompleksu redoks-aktywnego na powierzchni elektrod złotych oraz w kolejnym etapie utworzenie bioczuJNIKA poprzez przyłączenie aminowej sondy DNA do powstałej warstwy za pomocą reakcji typu „click” - nukleofilowego otwarcia pierścienia epoksydowego. Należy podkreślić, że opracowana warstwa redoks-aktywna Au/AET/Phen-Epoksy/Fe (III)/Phen-Epoksy ma charakter uniwersalny. Można do niej przyłączyć dowolną sondę ssDNA zakończoną grupą aminową i w ten sposób wykreować genoczuJNIK pozwalający na oznaczanie wybranego analitu.

Skonstruowany bioczuJNIK wykazał dobrą czułość z GW 73 pM dla 20-mer c-NC3 oraz 0.87 pM dla 283-mer RNA1. Przy jego użyciu sekwencje RNA można było wykrywać z około sto razy lepszą czułością niż sekwencje DNA. Prezentowany czuJNIK charakteryzował się również dobrą selektywnością. 20-merowa sekwencja nc-NC3 bez sekwencji komplementarnej generowała słabą odpowiedź, a w przypadku 277-merowego transkryptu RNA4 bez sekwencji komplementarnej, zaobserwowano wzrost natężenia prądu piku redukcji Fe (III).

Warto podkreślić, że głównymi atutami tego urządzenia jest przydatność do oznaczania RNA bez konieczności odwrotnej transkrypcji na DNA, a także możliwość rozróżniania 20-merowych komplementarnych fragmentów w RNA znajdujących się w różnych położeniach. BioczuJNIK cechuje się następującymi zaletami: dobra elektrochemiczna odwracalność centrum redoksowego Fe (III), wysoka selektywność, niska granica wykrywalności, a także generowanie szybkiej amperometrycznej odpowiedzi.

Mechanizm działania genoczuJNIKA opartego o warstwę redoks-aktywną Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/NH₂-NC3 można porównać do mechanizmu zaproponowanego przez Kurzątkowską i współpracowników (Kurzątkowską i wsp., 2015). Opracowany mechanizm generowania sygnału analitycznego bazuje na barierze energetycznej, którą muszą pokonać jony w celu dotarcia do centrum redoks-aktywnego. W opracowanych genoczuJNIKach centra te, odpowiedzialne za generowanie

sygnału analitycznego, znajdują się blisko powierzchni elektrody. Po procesie hybrydyzacji ich położenie nie ulega zmianie. Pomimo tego, obserwowano zmiany ich aktywności elektrochemicznej. Mechanizm tego procesu generowania sygnału analitycznego polega na zmianie dostępności jonów obecnych w buforze pomiarowym do centrum redoks aktywnego, w celu zubożenia ładunku powstającego w wyniku procesów utleniania/redukcji. Zjawisko to zależy nie tylko od hydrofilowości czy hydrofobowości jonów, ale również od struktury kompleksów redoks-aktywnych znajdujących się na powierzchni elektrod złotych (Kurzątkowską i wsp., 2015).

Analizując znalezione w literaturze naukowej czujniki DNA wykorzystujące do generowania sygnału analitycznego centrum redoks znajdujące się na powierzchni elektrody i porównując je ze skonstruowanym czujnikiem opartym o warstwę redoks-aktywną Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy NH₂-NC₃ można zauważyć, że przy konstrukcji czujnika nie ma konieczności osadzania na powierzchni elektrody sondy DNA zmodyfikowanej centrum redoks.

Tabela 9. Porównanie zaproponowanego genoczuJNIKA zawierającego warstwę redoks-aktywną z opublikowanymi w literaturze naukowej.

Sposób modyfikacji elektrody	Technika pomiarowa	Analit	Granica wykrywalności [M]	Referencje
Au/4Fc-sl DNA/6-MCH Steam loop	DPV	50-mer Grypa typu B	$3.5 \cdot 10^{-12}$	Chatelain i wsp., 2012
Au/SH-ssDNA-MB + SH- ssDNA-Fc + 6-MCH / 6- MCH	SWV	20-mer ssDNA H5N1	$1.8-2.1 \cdot 10^{-8}$	Grabowska i wsp., 2013
SPCE-Ch /AG/AQ-PNA/		ssDNA	$4 \cdot 10^{-9}$	Jampasa i wsp., 2014
		240 pz fragment genu L1 HPV (PCR)	nie wyznaczono	
		Au/CoPor-ssDNA/6-MCH	20-mer ssDNA H5N1	$2.1 \cdot 10^{-14}$
Au/MPA/ NH ₂ -3-Fe bis(dicarbollide)-ssDNA		20-mer ssDNA 181-pz dsDNA H5N1	20-mer - $3 \cdot 10^{-17}$ 181-pz - $8 \cdot 10^{-17}$	Grabowska i wsp., 2014b
Au/ SH-ssDNA-MB/ 6-MCH	e-SPR	18-mer ssDNA	$5.0 \cdot 10^{-9}$	Dallaire i wsp., 2015
Au/ SH-ssDNA-Fc/ 6-MCH + MB-primer	SWV, EIS	31-mer ssDNA	$2.8 \cdot 10^{-14}$	Gao i wsp., 2015a
Au/ SH-ssDNA-MB/ 6- MCH	SWV	43-mer Fc- ssDNA	$4.1 \cdot 10^{-14}$	Gao i wsp., 2015b
SEZ/CNT+AuNPs/SH- ssDNA		40-mer MB- ssDNA	$1.6 \cdot 10^{-9}$	García-González i wsp., 2015
Au/MCB/DPM/Cu(II)/DPM- CONH-ssDNA		20-mer ssDNA	$1.4 \cdot 10^{-12}$	Kurzątkowska i wsp., 2015
rGO-GDLE	CV, DPV	23-mer ssDNA MP	$1.6 \cdot 10^{-13}$	Li i wsp., 2015a
Au/CP/ 6-MCH	ACV	ssDNA-MB E. coli	$3 \cdot 10^{-14}$	Li i wsp., 2015b
Au/AET/Phen-Epoksy/ FeCl ₃ /(Phen-Epoksy) ₂ /NH ₂ - ssDNA	SWV	20-mer ssDNA 280-mer RNA H5N1	$7.3 \cdot 10^{-11}$ $8.7 \cdot 10^{-13}$	Malecka i wsp., 2015
Au/SH-dsDNA-MB + SH- dsDNA-Fc		IFN- γ aptamer Lys aptamer	$1.1 \cdot 10^{-12}$ $1.6 \cdot 10^{-11}$	Xia i wsp., 2015

Skróty: MB- błękit metylenowy, Ch-SPCE – węglowa elektroda sitodrukowana z chitozanem, AG – aldehyd glutarowy, AQ-PNA – peptydowy kwas nukleinowy znakowany antrachinonem, SWV – woltamperometria fali prostokątnej, eSPR - elektrochemiczny powierzchniowy rezonans plazmonów, Fc – ferocen, pz – para zasad, CoPor – porfiryne z kobaltem, MPA – kwas merkaptopropionowy, HPV – wirus brodawczaka, EIS – elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna, rGO-GDLE zredukowany tlenek grafenu, MCB – merkaptobutanol, DPM – dipirometen, CNT – nanorurki węglowe, CP – sonda chwytająca, ACV – woltamperometria prądu przemiennego, AET – aminoetantiol, AuNPs – nanocząsteczki złota, MP – mykoplazmatyczne zapalenie płuc, IFN- γ - interferon gamma, Lys – lizozym

Zaproponowany w niniejszej rozprawie genoczuJNIk oparty o warstwę redoks-aktywną Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy charakteryzuje się dość niską granicą wykrywalności. Największym jego walorem jest możliwość wykrywania za jego pomocą długich sekwencji RNA (ok. 280-mer). Zestawione w *Tabeli 9* przykładowe bioczuJNIki są w stanie wykrywać jedynie około 20-50-merowe komplementarne sekwencje DNA. Wyjątek stanowi czuJNIk zaproponowany przez Grabowską i współpracowników (Grabowska i wsp., 2014b), który wykrywa produkt PCR o długości 180 pz. Niemniej jednak w żadnej z publikacji naukowych przedstawionych w *Tabeli 9* autorzy nie przeprowadzają procesów hybrydyzacji z zastosowaniem długich sekwencji transkryptów RNA.

Granica wykrywalności prezentowanych w *Tabeli 9* genoczuJNIków waha się w przedziale od 10 nM do 0.1 fM. Najniższą granicę wykrywalności $3 \cdot 10^{-17}$ M otrzymano w przypadku czuJNIka skonstruowanego na elektrodzie złotej z zastosowaniem aminowej sondy DNA zmodyfikowanej karbolidem żelaza (Grabowska i wsp., 2014b).

WNIOSKI

Tematyka zaprezentowanej rozprawy doktorskiej obejmuje zagadnienia związane z konstrukcją i zastosowaniem elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA przeznaczonych do wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1 utworzonych na złotych elektrodach dyskowych i sitodrukowanych. Przeprowadzony został szereg badań, mających na celu optymalizację procedur przygotowywania powierzchni elektrod roboczych oraz polepszenie parametrów pomiarowych warstw analitycznie aktywnych. Skonstruowane bioczuJNIKI zostały wykorzystane do analizy oddziaływań z sekwencjami DNA i RNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1.

Przetestowane zostały trzy genoczuJNIKI. Na dyskowych i sitodrukowanych elektrodach złotych przygotowanych według poszczególnych procedur osadzone były sondy DNA z grupami tiolowymi bądź aminowymi i dokonywano woltamperometrycznych lub impedancyjnych pomiarów po procesach hybrydyzacji. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki oraz charakteryzujące je parametry, można stwierdzić, że każdy z zaproponowanych genoczuJNIKÓW z powodzeniem można zastosować do wykrywania materiału genetycznego wirusa ptasiej grypy typu H5N1. Ponadto, w przeciwieństwie do czuJNIKÓW biologicznych zawierających znakowane oligonukleotydy DNA, zaproponowane powyżej uniwersalne systemy (jonokanałowy i z warstwą redoks-aktywną) nie wymagają skomplikowanych modyfikacji i znakowania sond DNA. Można je zastosować do mocowania różnych sond DNA posiadających jedynie grupę tiolową bądź aminową na końcu 5'.

Najprostszy zaprojektowany genoczuJNIK składający się z warstwy Au/SH-NC3/MCH udało się zminiaturyzować z zastosowaniem elektrod sitodrukowanych i wykrywać za jego pomocą m.in. niewymagające odwrotnej transkrypcji sekwencje RNA o długości około 280 oligonukleotydów, co może stanowić podstawę do aplikacji w warunkach polowych.

Analizując przedstawione w literaturze naukowej genoczuJNIKI przeznaczone do wykrywania specyficznych sekwencji DNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1 można stwierdzić, że przedstawione w niniejszej rozprawie bioczuJNIKI są w stanie wykrywać sekwencje DNA z dobrą czułością. Znaczący walor stanowi również możliwość wykrywania ok. 180 pz sekwencji DNA oraz ok. 280-merowych transkryptów RNA. Na podstawie aktualnie przanalizowanej literatury naukowej takie prace nie zostały dotychczas opublikowane. Czulość i selektywność genoczuJNIKÓW opisanych

w niniejszej rozprawie jest porównywalna do czułości i selektywności czujników opracowanych przez innych autorów (*Tabela 10*). Jednak w wymienionych pracach czułość prezentowanych urządzeń oszacowano używając jedynie krótkich oligonukleotydów. Brak jest również doniesień naukowych dotyczących wykrywania długich sekwencji RNA.

Genoczujniki zaproponowane w niniejszej rozprawie (*Tabela 10*) charakteryzują się lepszą czułością w porównaniu do immunoczujników przeznaczonych do wykrywania AIV (*Tabela 3*). Najniższą granicę wykrywalności posiada genoczujnik NH₂-NC3 zaproponowany w niniejszej rozprawie – 0.01 pg/mL. Na podstawie *Tabeli 3* najniższa GW dla immunoczujnika wynosiła 0.43 pg/mL.

Tabela 10. Porównanie genoczuJNIKÓW zaproponowanych w niniejszej rozprawie z genoczuJNIKAMI opublikowanymi w literaturze naukowej przeznaczonymi do wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy.

Modyfikacja elektrody	Technika pomiarowa	Analit	Granica wykrywalności [M]	Referencje
Au/SH-ssDNA + 6-MCH/ 6-MCH	EIS	23-mer i 120-mer ssDNA	23-mer 10^{-10}	Kukul i wsp., 2008
Au/ SH-ssDNA	CV (D-AgNP)	18-mer ssDNA	10^{-12}	Ting i wsp., 2009
GCE/ MWNTs– CoPc/PAMAM/ssDNA	DPV	21-mer ssDNA	nie wyznaczono	Zhu i wsp., 2009b
GCE/CdSe/ssDNA	DPV (MB)		10^{-10}	Fan i wsp., 2010
GCE-COOH/ biotyna-ssDNA	CV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	24-mer ssDNA	$8.51 \cdot 10^{-14}$	Chung i wsp., 2011
Au/MWNTs/PPNWs/AuNPs/ SH-ssDNA/6-MCH	DPV (Co(Phen) ₃ ³⁺)	21-mer ssDNA	$4.3 \cdot 10^{-13}$	Liu i wsp., 2011
Au/SH-ssDNA + 6-MCH /6-MCH	CV, SWV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	20-mer ssDNA 179-183-mer ds-DNA	181-mer $2.4 \cdot 10^{-11}$ 20-mer $2.2 \cdot 10^{-11}$ (132 pg/mL)	Malecka i wsp., 2012
Au/6-MCH + 11-MUA/ NH ₂ -ssDNA	SWV, EIS [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	20-mer ssDNA 181-pz dsDNA	SWV 20-mer - $1 \cdot 10^{-14}$ (0.06 pg/mL) EIS 181-pz - $2.09 \cdot 10^{-14}$ 20-mer - $1.4 \cdot 10^{-15}$ (0.01 pg/mL)	Malecka i wsp., 2013
Au/SH-ssDNA-MB + SH-ssDNA-Fc + 6-MCH/ 6-MCH	SWV	20-mer ssDNA	$18-21 \cdot 10^{-9}$	Grabowska i wsp., 2013
Au/CoPor-ssDNA/6-MCH		20-mer ssDNA	10^{-14}	Grabowska i wsp., 2014a
Au/MPA/ NH ₂ -3-Fe bis(dikarbolid)-ssDNA		20-mer ssDNA 181-pz dsDNA	20-mer - $3 \cdot 10^{-17}$ 181-pz - $8 \cdot 10^{-17}$	Grabowska i wsp., 2014b
Au/AET/Phen-Epoksy/ FeCl ₃ /Phen-Epoksy/ NH ₂ -ssDNA		280-mer RNA 20-mer ssDNA	$8.7 \cdot 10^{-13}$ (74.9 pg/mL) $7.3 \cdot 10^{-11}$ (438 pg/mL)	Malecka i wsp., 2015
Au/MCB/DPM/Cu(II)/ DPM-CONH-ssDNA		20-mer ssDNA	$1.39 \cdot 10^{-12}$	Kurzątkowska i wsp., 2015
GCE/Gr–VS ₂ -Ch/AuNPs/ SH-ssDNA/6-MCH	DPV	21-mer ssDNA	$5.2 \cdot 10^{-14}$	Fang i wsp., 2015
Au/SH-ssDNA + 6-MCH /6-MCH	SWV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	20-mer ssDNA 280-mer RNA	nie wyznaczono	Malecka i wsp., 2016

Skróty: Au – elektroda złota, 6-MCH – 6-merkptoheksanol, SH-ssDNA – sonda DNA zmodyfikowana grupą tiolową, EIS – elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna, GCE – elektroda z węgla szklatego, CV – woltamperometria cykliczna, SWV – woltamperometria fali prostokątnej, ds-DNA – podwójna nić DNA, 11-MUA – kwas 11-merkaptoundekanolowy, NH₂-ssDNA - sonda DNA zmodyfikowana grupą aminową, D-AgNP – nanocząstki srebra znakowane doksorubicyną, AET – aminoetantiol, MWCNTs - wielościennie nanorurki węglowe, PPNWs – nanodruty polipirolowe, CoPC – ftalocyjanina kobaltu, PAMAM – dendrymery poliamidoaminowe, CdSe – nanostruktury selenku kadmu, Ch – chitozan, Gr-VS₂ – mieszanina grafen-disiarczek wanadu, AuNPs – nanocząsteczki złota, DPV – woltamperometria pulsowa różnicowa, MB- błękit metylenowy, Fc – ferocen, pz – para zasad, CoPor – porfiryne z kobaltem, MPA – kwas merkaptopropionowy, MCB – merkaptobutanol, DPM – dipirometen

SPIS ILUSTRACJI

Rysunek 1. Liczba publikacji dotyczących genoczuJNIKÓW w bazie Web of Knowledge	17
Rysunek 2. Schemat budowy czujnika chemicznego.	21
Rysunek 3. Przebieg procesów prowadzących do otrzymania sygnału analitycznych z udziałem różnych przetworników i technik pomiarowych.	22
Rysunek 4. Przykładowe zastosowania bioczuJNIKÓW (opracowano na podstawie http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/Biosensory/).	23
Rysunek 5. Schemat budowy bioczuJNIKA opartego o DNA.	24
Rysunek 6. Budowa nukleotydu.	25
Rysunek 7. Cukry wchodzące w skład A) RNA – ryboza oraz B) DNA – deoksyryboza.	25
Rysunek 8. Wzory strukturalne zasad nukleinowych tworzących nukleotydy.	25
Rysunek 9. Fragment podwójnej nici DNA/RNA.	27
Rysunek 10. A) Sposoby osadzania DNA na powierzchniach stałych. B) Najczęściej wykorzystywane techniki osadzania kwasów nukleinowych (Li i Lu, 2009).	29
Rysunek 11. Schemat fragmentu monowarstwy samoorganizującej się na powierzchni elektrody złotej.	34
Rysunek 12. Strategia opracowana w celu wygenerowania sygnału elektrochemicznego w bioczuJNIKACH przeznaczonych do wykrywania kwasów nukleinowych (de-los-Santos-Álvarez i wsp., 2004).	38
Rysunek 13. Sposoby wiązania cząsteczek z DNA (Leszczyński i Duński, 2006).	41
Rysunek 14. Schemat podwójnej warstwy elektrycznej na granicy faz elektroda/ roztwór wodny	54
Rysunek 15. Schemat: A) „międzycząsteczkowego” czujnika typu kanału jonowego oraz B) „wewnątrzcząsteczkowego” czujnika typu kanału jonowego.	55
Rysunek 16. Schemat działania mechanizmu jonokanałowego na przykładzie genoczuJNIKA.	56
Rysunek 17. Schemat idealnie zorganizowanej warstwy elektroaktywnej.	57
Rysunek 18. Schemat naczynka pomiarowego z konfiguracją trzech elektrod stosowanego w pomiarach.	59
Rysunek 19. Zmiany potencjału elektrody w czasie w voltamperometrii cyklicznej.	61
Rysunek 20. Cykliczna krzywa voltamperometryczna dla układu odwracalnego, I_{PA} , E_{PA} – natężenie prądu i wartość potencjału piku anodowego; I_{PK} , E_{PK} – natężenie prądu i wartość potencjału piku katodowego.	62
Rysunek 21. A) sygnał pobudzający w voltamperometrii fali prostokątnej; B) prąd dodatni (utlenienia), ujemny (redukcji) i różnica prądów.	64
Rysunek 22. Obwód zastępczy naczynka elektrochemicznego złożony z następujących elementów: R_{Ω} – opór roztworu, R_{et} – opór przeniesienia elektronu, Z_w – element	

- Warburga, C_{dl} – pojemność warstwy podwójnej, I_c – prąd ładowania pojemności warstwy podwójnej, I_f – prąd faradajowski. _____ 65
- Rysunek 23.** Wykres impedancji dla trójelektrodowego systemu elektrochemicznego. Obszary związane z przenoszeniem ładunku i transportem masy dotyczą odpowiednio zakresu wysokich i niskich częstotliwości. _____ 66
- Rysunek 24.** Konstrukcja elektrody sitodrukowanej (www.dropsens.com). _____ 74
- Rysunek 25.** Schemat modyfikacji elektrod złotych z zastosowaniem bezpośredniego osadzenia sondy SH-ssDNA celem przygotowania genoczujujnika. _____ 89
- Rysunek 26.** Cykliczne voltamogramy (szybkość skanowania 100 mV/s) uzyskane dla elektrod zmodyfikowanych SH-NC3/6-MCH. Krzywa przerywana - przed hybrydyzacją i kolejne krzywe po hybrydyzacji z sekwencją (A) c-NC3 i (B) nc-NC3 w zakresie stężeń od 10^{-11} do 10^{-6} M, co dekadę. Skład roztworu pomiarowego: 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ w 0.01 M PBS (pH = 7.4), trójelektrodowy układ pomiarowy: elektroda robocza – dysk złoty, elektroda odniesienia – chlorosrebrowa oraz elektroda pomocnicza – drut platynowy. _____ 89
- Rysunek 27.** Zależność różnicy potencjałów pików redukcji i utlenienia jonów znacznika redoks-aktywnego $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ΔE [%] od logarytmu ze stężenia analitu $\log C$ [pM] (■) c-NC3 i (◆) nc-NC3 (n= 3). _____ 90
- Rysunek 28.** Zależność natężenia prądu pików I=(I_n-I_0)/ I_0 [%] A) redukcji i B) utlenienia $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ od logarytmu ze stężenia analitu $\log C$ [pM] dla (◆,◆) c-NC3 i (■) nc-NC3 (n= 3). _____ 91
- Rysunek 29.** Cykliczne voltamogramy (szybkość skanowania 100 mV/s) uzyskane dla elektrod zmodyfikowanych warstwą SH-NC3/6-MCH. Krzywa przerywana - przed hybrydyzacją i kolejne krzywe po hybrydyzacji z sekwencją (A) c-NC3 i (B) nc-NC3 dla stężeń: 10, 20, 40, 60 i 80 pM. _____ 92
- Rysunek 30.** Zależność różnicy potencjałów pików redukcji i utlenienia jonów znacznika $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ΔE [%] w funkcji stężenia analitu C [pM] c-NC3 dla (◆) c-NC3 i (■) nc-NC3 (n= 6). _____ 93
- Rysunek 31.** Zależność zmian natężenia prądu pików I=(I_n-I_0)/ I_0 [%] A) redukcji i B) utlenienia $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ w funkcji stężenia analitów C [pM]: (◆,◆) c-NC3 oraz (■) nc-NC3 (n= 6). _____ 93
- Rysunek 32.** Przykładowe voltamogramy SWV (częstotliwość 25 Hz) zarejestrowane na dyskowych elektrodach złotych zmodyfikowanych warstwą SH-NC3/6-MCH. Krzywa przerywana - przed hybrydyzacją i kolejne krzywe po hybrydyzacji z sekwencją (A) c-NC3 i (B) nc-NC3 dla stężeń: 10, 20, 40, 60, 80 i 100 pM. _____ 95
- Rysunek 33.** A) Zależność $I = (I_n-I_0)/I_0$ [%] od stężenia C [pM] (▲) c-NC3 oraz (◆) nc-NC3 (n=6). _____ 96

- Rysunek 34.** Schemat położenia sekwencji komplementarnej do sondy NC3 w produktach PCR. _____ 97
- Rysunek 35.** Przykładowe voltamogramy SWV (częstotliwość 25 Hz) zarejestrowane na dyskowych elektrodach złotych zmodyfikowanych warstwą SH-NC3/6-MCH. Krzywa przerywana - przed hybrydyzacją i kolejne krzywe po hybrydyzacji z sekwencją (A) PCR1 i (B) PCR4 dla stężeń: 10, 20, 40, 60, 80 i 100 pM. _____ 98
- Rysunek 36.** A) Zależność $I = (I_n - I_0)/I_0$ [%] od stężenia C [pM] (■) PCR1, (◆) PCR2, (●) PCR3 i (▲) PCR4 ($n=5\div 6$). B) Zależność $E = (E_n - E_0)/E_0$ [%] od stężenia C [pM] (■) PCR1, (◆) PCR2, (●) PCR3 i (▲) PCR4 ($n=5\div 6$). _____ 99
- Rysunek 37.** Typowe krzywe SWV zarejestrowane na dyskowej elektrodzie złotej zmodyfikowanej warstwą SH-NC3/6-MCH. Krzywa przerywana (1) - przed hybrydyzacją i następne krzywe po hybrydyzacji z transkryptami o stężeniu 10 pM (2) RNA4, (3) RNA2, (4) RNA3 oraz (5) RNA1. _____ 100
- Rysunek 38.** Przykładowe krzywe CV zarejestrowane na (A) czystych elektrodach sitodrukowanych oraz (B) po modyfikacji z Au/SH-NC3/6-MCH. _____ 102
- Rysunek 39.** Przykładowe krzywe SWV zarejestrowane na (A) czystej elektrodzie sitodrukowanej oraz (B) po modyfikacji z SH-NC3/6-MCH. _____ 103
- Rysunek 40.** Przykładowe krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie sitodrukowanej zmodyfikowanej warstwą SH-NC3/6-MCH. Krzywą przerywaną - (1) zarejestrowano przed hybrydyzacją. Kolejne krzywe zarejestrowano po hybrydyzacji z sekwencją (2) c-NC3 oraz (3) nc-NC3 o stężeniu 1 pM. _____ 104
- Rysunek 41.** Przykładowe krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie sitodrukowanej zmodyfikowanej warstwą SH-NC3/6-MCH. Krzywą niebieską (1) zarejestrowano przed hybrydyzacją. Krzywą czerwoną (2) zarejestrowano po hybrydyzacji z sekwencją: A) RNA1 oraz B) RNA4 o stężeniu 1 pM. _____ 105
- Rysunek 42.** Proces tworzenia genoczuJNIKA typu kanału jonowego na elektrodach złotych z zastosowaniem sondy NH₂-NC3. _____ 107
- Rysunek 43.** Kontrola procesu wytwarzania bioczuJNIKA za pomocą EIS. **Krzywa a** – czysta elektroda złota, **b (zielona)** – elektroda złota zmodyfikowana warstwą mieszaną 6-MCH i 11-MUA, **c (czerwona)** – elektroda złota zmodyfikowana sondą 6-MCH+11-MUA/NH₂-NC3. Warunki pomiarowe: układ trójelektrodowy, zakres częstotliwości od 0.1 Hz do 10 kHz przy zadanym potencjale, którym był potencjał formalny znacznika redoks-aktywnego $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (170 mV) z amplitudą prądu zmiennego równą 10 mV. Obwód zastępczy użyty do dopasowania danych eksperymentalnych (krzywa b i c) zawierał zastępujące elementy: R_Ω – opór roztworu, C_{dl} – element fazy stałej, R_{et} – opór przeniesienia elektronu, Z_w – element Warburga. _____ 108

- Rysunek 44.** Przykładowe krzywe SWV zarejestrowane na elektrodach złotych zmodyfikowanych warstwą $\text{NH}_2\text{-NC3/6-MCH} + 11\text{-MUA}$ (krzywe przerywane), a następnie po hybrydyzacji z: A) c-NC3; B) nc-NC3 dla stężeń: 10, 20, 40, 60, 80 i 100 fM. _____ 109
- Rysunek 45.** Zmiany względnego natężenia prądu pików ΔI [%] po hybrydyzacji z sekwencjami (●) c-NC3 oraz (▲) nc-NC3; n=7. _____ 110
- Rysunek 46.** Przykładowe widma impedancyjne zarejestrowane na elektrodach złotych zmodyfikowanych warstwą(♦) $\text{NH}_2\text{-NC3/6-MCH} + 11\text{-MUA}$ oraz pod wpływem hybrydyzacji: z (A) c-NC3 oraz (B) nc-NC3 o stężeniach: (■)10 fM,(▲) 20 fM i (●) 40 fM. Warunki pomiarowe jak na Rysunku 43. _____ 111
- Rysunek 47.** Zmiany oporu warstwy analitycznie aktywnej R_{et} [%] po hybrydyzacji z sekwencjami (▲) c-NC3 oraz (●)nc-NC3 (n=4). _____ 111
- Rysunek 48.** Przykładowe widma impedancyjne zarejestrowane na elektrodach złotych zmodyfikowanych warstwą $\text{NH}_2\text{-NC3/6-MCH}+11\text{-MUA}$ (♦) oraz po hybrydyzacji: z komplementarną sekwencjami (A) PCR1-NC3 oraz (B) PCR4-NC3 o stężeniach: (■) 10 fM, (▲) 20 fM i (●) 40 fM. Warunki pomiarowe jak na Rysunku 43. _____ 113
- Rysunek 49.** Zmiany oporu przeniesienia elektronu w warstwie podwójnej R_{et} [%] po hybrydyzacji z sekwencjami (▲) PCR1-NC3 oraz (●)PCR4-NC3 (n=5). _____ 113
- Rysunek 50.** Schemat budowania warstwy redoks-aktywnej Au/AET/PhenEpoksy/Fe(III)/PhenEpoksy/ETA krok po kroku. _____ 115
- Rysunek 51.** (A) Przykładowe voltamogramy zarejestrowane techniką CV na elektrodzie złotej zmodyfikowanej warstwą Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/ETA z szybkościami przemiatania potencjałem w zakresie 50-1000 mVs^{-1} . Skład roztworu pomiarowego: 0.1 M KCl. (B) Wykres zależności natężenia prądu pików (▲, I_{PA}) utlenienia i (■, I_{PK}) redukcji od szybkości zmian potencjału w zakresie od 50 do 1000 mV/s . _____ 117
- Rysunek 52.** Przykładowe voltamogramy zarejestrowane techniką CV na elektrodzie złotej zmodyfikowanej warstwą Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/ $\text{NH}_2\text{-NC3}$ z szybkością przemiatania potencjałem 50-1000 mVs^{-1} mierzona w 0.1 M KCl. _ 118
- Rysunek 53.** Schemat modyfikacji elektrod złotych Au/AET/PhenEpoksy/Fe(III)/PhenEpoksy/ $\text{NH}_2\text{-ssDNA}$ celem przygotowania genoczujujnika. _____ 119
- Rysunek 54.** Przykładowe krzywe zarejestrowane techniką A) voltamperometrii cyklicznej oraz B) voltamperometrii fali prostokątnej na elektrodach złotych zmodyfikowanych warstwami Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/ETA oraz Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/ $\text{NH}_2\text{-NC3}$. _____ 120

- Rysunek 55.** Przykładowe krzywe SWV zarejestrowane przed hybrydyzacją (przerywana krzywa czarna), a następnie po 30 minutach hybrydyzacji z (A) c-NC3 i (B) nc-NC3 dla stężeń: 100, 200, 400, 600, 800 i 1000 pM. _____ 121
- Rysunek 56.** Zależność $I=(I_n-I_0)/I_0$ [%] od stężenia C [pM] (◆) komplementarnej sekwencji c-NC3 oraz (▲) niekomplementarnej sekwencji nc-NC3. _____ 122
- Rysunek 57.** Przykładowe krzywe SWV uzyskane dla genoczujujnika Au/AET/Phen-Epoksy/Fe(III)/Phen-Epoksy/NH₂-NC3 w buforze PBS zawierającym 0 pM (krzywa przerywana), 10 pM (krzywa czerwona), 100 pM (krzywa niebieska) i 1000 pM (krzywa fioletowa) po procesie hybrydyzacji z sekwencjami: A) RNA1; B) RNA3 oraz C) RNA4. _____ 123
- Rysunek 58.** Zależność $I=(I_n-I_0)/I_0$ [%] od logarytmu ze stężenia C [pM] (◆) RNA1, (■) RNA3 oraz (▲) niekomplementarnej sekwencji RNA4 (n=5÷6). _____ 124

SPIS TABEL

Tabela 1. Ocena poszczególnych metod unieruchomienia kwasów nukleinowych. + słaba, ++ średnia, +++ dobra (de-los-Santos-Álvarez i wsp., 2004)	36
Tabela 2. Metody detekcji wykorzystywane w bioczuJNIkach elektrochemicznych DNA według IUPAC (Labuda i wsp., 2010).	37
Tabela 3. Przykładowe elektrochemiczne immunoczuJNIki przedstawione w literaturze naukowej przeznaczone do wykrywania AIV.	51
Tabela 4. Optymalizacja parametrów immobilizacji i hybrydyzacji sondy SH-NC3 dla jednoetapowych modyfikacji elektrod złotych przeprowadzanych w temperaturze pokojowej.	87
Tabela 5. Optymalizacja parametrów osadzania i hybrydyzacji sondy SH-NC3 dla dwuetapowych modyfikacji elektrod złotych	88
Tabela 6. Zestawienie wartości obniżenia natężenia prądu piku ΔI po hybrydyzacji z poszczególnymi transkryptami RNA ($C = 10$ [pM]).	101
Tabela 7. Zestawienie wartości obniżenia natężenia prądu piku ΔI po hybrydyzacji z poszczególnymi transkryptami RNA na elektrodach dyskowych (DEZ) i sitodrukowanych (SEZ).	105
Tabela 8. Porównanie zaproponowanych genoczuJNIków typu kanału jonowego z opublikowanymi w literaturze naukowej.	127
Tabela 9. Porównanie zaproponowanego genoczuJNIka zawierającego warstwę redoks-aktywną z opublikowanymi w literaturze naukowej.	131
Tabela 10. Porównanie genoczuJNIków zaproponowanych w niniejszej rozprawie z genoczuJNIkami opublikowanymi w literaturze naukowej przeznaczonymi do wykrywania specyficznych sekwencji DNA i RNA wirusa ptasiej grypy.	135

WYKAZ PUBLIKACJI I KONFERENCJI NAUKOWYCH

Wykaz publikacji i zgłoszeń patentowych, w których wykorzystano wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej

✚ **K. Malecka**, A. Stachyra, A. Góra-Sochacka, A. Sirko, W. Zagórski-Ostoja, H. Radecka, J. Radecki, *Electrochemical genosensor based on disc and screen printed gold electrodes for detection of specific DNA and RNA sequences derived from Avian Influenza Virus H5N1*, Sens. Actuators, B **2016**, 224, 290-297.

✚ **K. Malecka**, A. Stachyra, A. Góra-Sochacka, A. Sirko, W. Zagórski-Ostoja, W. Dehaen, H. Radecka, J. Radecki, *New redox-active layer create via epoxy-amine reaction - the base of genosensor for the detection of specific DNA and RNA sequences of avian influenza virus H5N1*, Biosens. Bioelectron. **2015**, 65, 427-434.

✚ I. Grabowska, **K. Malecka**, U. Jarocka, J. Radecki, H. Radecka, *Electrochemical biosensors for detection of avian influenza virus — current status and future trends*, Acta Biochim. Pol. **2014**, 61, 471-478.

✚ **K. Malecka**, H. Radecka, J. Radecki, W. Dehaen, W. Zagórski-Ostoja, Sposób wytwarzania warstwy elektroaktywnej na powierzchni elektrody złotej, bioczuJNIK zawierający elektrodę i jego zastosowanie, *Numer zgłoszenia*: PL408351, K-4485p/14; PCT/IB2015/000083, *Data zgłoszenia*: **2014-05-27**.

✚ **K. Malecka**, I. Grabowska, J. Radecki, A. Stachyra, A. Góra- Sochacka, A. Sirko, H. Radecka, *Electrochemical detection of Avian Influenza Virus genotype using amino-ssDNA probe modified gold electrodes*, Electroanalysis **2013**, 25, 1871-1878.

✚ **K. Malecka**, I. Grabowska, J. Radecki, A. Stachyra, A. Góra-Sochacka, A. Sirko, H. Radecka, *Voltammetric detection of specific DNA sequence of Avian Influenza Virus H5N1 using DNA probe deposited onto gold electrode*, Electroanalysis **2012**, 24, 39-46.

Opublikowane prace, które nie wchodzą w skład rozprawy doktorskiej

- ✚ **K. Malecka**, L. Michalczyk, H. Radecka, J. Radecki, *Ion-channel genosensor for the detection of specific DNA sequences derived from plum pox virus in plant extracts*, *Sensors* 2014, *14*, 18611-18624.
- ✚ I. Grabowska, **K. Malecka**, A. Stachyra, A. Góra-Sochacka, A. Sirko, W. Zagórski-Ostoja, Hanna Radecka and Jerzy Radecki, *Single Electrode Genosensor for Simultaneous Determination of Sequences Encoding Hemagglutinin and Neuraminidase of Avian Influenza Virus Type H5N1*, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10167-10173.

Wydarzenia naukowe, na których prezentowano wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej

- ✚ 18. Piknik Naukowy Polskiego Radia i Centrum Nauki Kopernik, 31 lipca 2014, Warszawa
- ✚ K. Malecka, H. Radecka, J. Radecki, A. Stachyra, A. Góra-Sochacka, A. Sirko, "Wykrywanie specyficznych sekwencji DNA wirusa ptasiej grypy H5N1 przy użyciu czujników elektrochemicznych" XLI Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności - Innowacyjność w Nauce o Żywności i Żywieniu, 2-3 lipca 2013 r., Kraków (wystąpienie ustne w języku polskim)
- ✚ 17. Piknik Naukowy Polskiego Radia i Centrum Nauki Kopernik, 15 czerwca 2013 r., Warszawa
- ✚ K. Malecka, H. Radecka, J. Radecki, "Elektrochemiczne genoczuJNIKI do wykrywania specyficznej sekwencji DNA wirusa ptasiej grypy typu H5N1", X Środowiskowe Seminarium Młodych Pracowników Nauki, 25 marca 2013 r., Olsztyn (prezentacja ustna w języku polskim)
- ✚ K. Malecka, H. Radecka, J. Radecki, "Elektrochemiczne genoczuJNIKI do wykrywania wirusa H5N1 ptasiej grypy", 55. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, 16-20 września 2012 r., Białystok (prezentacja ustna w Sekcji Elektrochemicznej, w języku polskim)
- ✚ K. Malecka, H. Radecka, J. Radecki, "Elektrochemiczne genoczuJNIKI do wykrywania specyficznej sekwencji RNA wirusa H5N1 ptasiej grypy", VI Konferencja Centrum

Biotechnologii Produktów Leczniczych, 28-30 czerwca 2012, Karnity (prezentacja ustna w języku polskim)

✚ K. Malecka, H. Radecka, J. Radecki, „Czujniki typu kanału jonowego do wykrywania wirusa ptasiej grypy”, I Spotkanie Międzynarodowego Projektu: Opracowanie warstw transduktorowych do konstrukcji biosensorów stosowanych w kontroli jakości żywności, diagnostyki medycznej i monitorowania środowiska naturalnego, 18-21 maja 2011, Łańsk (prezentacja ustna w języku angielskim)

✚ K. Malecka, H. Radecka, J. Radecki, „Jonokanałowe czujniki do wykrywania wirusa ptasiej grypy (H5N1)”, III Konferencja Centrum Biotechnologii Produktów Leczniczych, 24-26 maja 2010 r., Łochów (prezentacja ustna w języku polskim)

BIBLIOGRAFIA

1. Ahmed M.U., Hossain M.M., Tamiya E., *Electrochemical biosensors for medical and food applications*, *Electroanalysis* **2008**, *20*, 616–626.
2. Aiello V., Joo N., Buckley J., Nonglaton G., Duclairoir F., Dubois L., Marchon J.C., Gely M., Chevalier N., De Salvo B., *Redox behavior of a ferrocene monolayer on SiO₂ obtained after click-coupling*, *Surf. Sci.* **2013**, *612*, 57–62.
3. Allison L.A., *Podstawy biologii molekularnej*, Wydanie pierwsze, Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa **2009**.
4. Altintas Z., Gittens M., Guerreiro A., Thompson K.-A., Walker J., Piletsky S., Tothill I.E., *Detection of waterborne viruses using high affinity molecularly imprinted polymers*, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6801–6807.
5. An L., Chen L., *A real-time array calibration method for underwater acoustic flexible sensor array*, *Applied Acoustics* **2015**, *97*, 54–64.
6. Andac C.A., Miandji A.M., Hornemann U., Noyanalpan N., *Use of the parmbsc0 force field and trajectory analysis to study the binding of netropsin to the DNA fragment (5' CCAATTGG)₂ in the presence of excess NaCl salt in aqueous solution*, *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *48*, 531–539.
7. Aoki H., Tao H., *Label- and marker-free gene detection based on hybridization-induced conformational flexibility changes in a ferrocene-PNA conjugate probe*, *Analyst* **2007**, *132*, 784–791.
8. Aoki H., Tao H., *Signal enhancement for gene detection based on a redox reaction of [Fe(CN)₆]⁴⁻ mediated by ferrocene at the terminal of a peptide nucleic acid as a probe with hybridization-amenable conformational flexibility*, *Anal. Sci.* **2008**, *24*, 929–933.
9. Aoki H., Umezawa Y., *Oligonucleotides using PNA modified gold electrodes*, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1–6.
10. Aoki H., Umezawa Y., *Trace analysis of an oligonucleotide with a specific sequence using PNA-based ion-channel sensors*, *Analyst* **2003**, *128*, 681–685.
11. Arounagiri S., Easwaramoorthy D., Ashokkumar A., Dattagupta A., Maiya B.G., *Cobalt(III), nickel(II) and ruthenium(II) complexes of 1,10-phenanthroline family of ligands: DNA binding and photocleavage studies*, *Proc. - Indian Acad. Sci., Chem. Sci.* **2000**, *112*, 1–17.
12. Aryaa S.K., Solanki P.R., Datta M., Malhotra B.D., *Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices*, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2810–2817.
- tes M., *A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers*, *Mater. Sci. Eng., C* **2013**, *33*, 1853–1859.

13. Bagni G., Osella D., Sturchio E., Mascini M., *Deoxyribonucleic acid (DNA) biosensors for environmental risk assessment and drug studies*, *Anal. Chim. Acta* **2006**, 573-574, 81–89.
14. Bahadır E.B., Sezgintürk M.K., *Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses*, *Anal. Biochem.* **2015**, 478, 107–120.
15. Bai H., Wang R., Hargis B., Lu H., Li Y., *A SPR aptasensor for detection of avian influenza virus H5N1*, *Sensors* **2012**, 12, 12506–12518.
16. Balvedi R.P.A., Castro A.C.H., Madurro J.M., Brito-Madurro A.G., *Detection of a specific biomarker for epstein-barr virus using a polymer-based genosensor*, *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 9051–9066.
17. Bard, J.A., Faulkner L.R., *Electrochemical Methods*, Wydanie drugie, John Wiley & Sons, Inc., Nowy Jork **2001**.
18. Barsoukov E., Macdonald J.R., *Impedance spectroscopy, theory, experiment, and applications*, Wydanie drugie, John Wiley & Sons, Inc., Nowy Jork **2005**.
19. Beard C.W., *Demonstration of type-specific influenza antibody in mammalian and avian sera by immunodiffusion*, *Bull. W. H. O.* **1970**, 42, 779–785.
20. Bencini A., Lippolis V., *1,10-Phenanthroline: a versatile building block for the construction of ligands for various purposes*, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, 254, 2096–2180.
21. Berney H., West J., Haefele E., Alderman J., Lane W., Collins J.K., *A DNA diagnostic biosensor: development, characterisation and performance*, *Sens. Actuators, B* **2000**, 68, 100–108.
22. Bertucci A., Manicardi A., Corradini R., *Rozdział 4 - Advanced molecular probes for sequence-specific DNA recognition in detection detection of non-amplified genomic DNA* edytowany przez G. Spoto, R. Corradini, Springer Science+Business Media, Dordrecht **2012**.
23. Brockman L., Wang R., Lum J., Li Y., *QCM aptasensor for rapid and specific detection of avian influenza virus*, *Open J. Appl. Biosens.* **2013**, 2, 97–103.
24. Cagnin S., Caraballo M., Guiducci C., Martini P., Ross M., SantaAna M., Danley D., West T., Lanfranchi G., *Overview of Electrochemical DNA Biosensors: New Approaches to Detect the Expression of Life*, *Sensors* **2009**, 9, 3122–3148.
25. Cai H., Cao X., Jiang Y., He P., Fang Y., *Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection*, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 375, 287–293.
26. Chaires J.B., *Drug-DNA interactions*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, 8, 314–320.
27. Chambers J.P., Arulanandam B.P., Matta L.L., Weis A., Valdes J.J., *Biosensor recognition elements*, *Curr. Issues Mol. Biol.* **2008**, 10, 1–12.
28. Chantratita W., Sukasem Ch., Kaewpongsri S., Srichunrusami Ch., Pairoj W., Thitithanyanont A., Chaichoune K., Ratanakron P., Songserm T., Damrongwatanapokin S.,

- Landt O., *Qualitative detection of avian influenza A (H5N1) viruses: A comparative evaluation of four real-time nucleic acid amplification methods*, Mol. Cell. Probes **2008**, 22, 287–293.
29. Charlton B., Crossley B., Hietala S., *Conventional and future diagnostics for avian influenza*, Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. **2009**, 32, 341–350.
30. Chatelain G., Ripert M., Farre C., Ansanay-Alex S., Chaix C., *A “four-ferrocene” modified stem-loop structure as a probe for sensitive detection and single-base mismatch discrimination of DNA*, Electrochim. Acta **2012**, 59, 57–63.
31. Cho M., Chun L., Lin M., Choe W., Nam J., Lee Y., *Sensitive electrochemical sensor for detection of lipopolysaccharide on metal complex immobilized gold electrode*, Sens. Actuators, B **2012**, 174, 490–494.
32. Chung D.-J., Kim K.-Ch., Choi S.-H., *Electrochemical DNA biosensor based on avidin–biotin conjugation for influenza virus (type A) detection*, Appl. Surf. Sci. **2011**, 257, 9390–9396.
33. Civit L., Fragoso A., O’Sullivan C.K., *Electrochemical biosensor for the multiplexed detection of human papillomavirus genes*, Biosens. Bioelectron. **2010**, 26, 1684–1687.
34. Compton J., *Nucleic Acids sequence-based amplification*, Nature **1991**, 350, 91–92.
35. Cox N.J., *Prevention and control of influenza*, Lancet **1999**, 354, 30–30.
36. Cram D.J., *Nobel Lectures, Chemistry 1981-1990*, Editor in Charge Tore Frängsmyr, (red) Bo. G. Malmström, World Scientific Publishing Co., Singapore **1992**.
37. Cygański A., *Metody elektroanalityczne*, WNT, Warszawa **1995**.
38. Dallaire A.-M., Patskovsky S., Vallée-Bélisle A., Meunier M., *Electrochemical plasmonic sensing system for highly selective multiplexed detection of biomolecules based on redox nanoswitches*, Biosens. Bioelectron. **2015**, 71, 75–81.
39. Daniels J.S., Pourmand N., *Label-free impedance biosensors: opportunities and challenges*, Electroanalysis **2008**, 19, 1239–1257.
40. Das J., Kelley S.O., *Protein detection using arrayed microsensor chips: tuning sensor footprint to achieve ultrasensitive readout of CA-125 in serum and whole blood*, Anal. Chem. **2011**, 83, 1167–1172.
41. Degefa T.H., Kwak J., *Electrochemical impedance sensing of DNA at PNA self assembled monolayer*, J. Electroanal. Chem. **2008**, 612, 37–41.
42. Delgado A.V., Gonzalez-Caballero F., Hunter R.J., Koopal L.K., Lyklema J., *Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena (IUPAC technical report)*, Pure Appl. Chem. **2005**, 77, 1753–1805.
43. de-los-Santos-Álvarez P., Lobo-Castañón M.J., Miranda-Ordieres A.J., Tuñón-Blanco P., *Current strategies for electrochemical detection of DNA with solid electrodes*, Anal. Bioanal. Chem. **2004**, 378, 104–118.

44. Di Giusto D.A., King G.C., *Special-purpose modifications and immobilized functional nucleic acids for biomolecular interactions*, Top. Curr. Chem. **2006**, 261, 131–168.
45. Diltemiz S.E., Ersoz A., Hur D., Kecili R., Say R., *4-Aminophenyl boronic acid modified gold platforms for influenza diagnosis*, Mater. Sci. Eng., C **2013**, 33, 824–830.
46. Dimitrov I.V., Petrova E.B., Kozarova R.G., Apostolova M.D., Tsvetanov Ch.B., *A mild and versatile approach for DNA encapsulation*, Soft Matter **2011**, DOI: 10.1039/c1sm05805c.
47. Diouani M.F., Helali S., Hafaid I., Hassen W.M., Snoussi M.A., Ghram A., Jaffrezic-Renault N., Abdelghani A., *Miniaturized biosensor for avian influenza virus detection*, Mater. Sci. Eng., C **2008**, 28, 580–583.
48. Doneux T., De Rache A., Triffaux E., Meunier A., Steichen M., Buess-Herman C., *Optimization of the Probe Coverage in DNA Biosensors by a One-Step Coadsorption Procedure*, ChemElectroChem **2014**, 1, 147–157.
49. Dong S., Li J., *Self-assembled monolayers of thiols on gold electrodes for bioelectrochemistry and biosensors*, Bioelectrochem. Bioenerg. **1997**, 42, 7–13.
50. Dong Z.-M., Zhao G.-Ch., *Label-free detection of pathogenic bacteria via immobilized antimicrobial peptides*, Talanta **2015**, 137, 55–61.
51. Donmez S., Arslan F., Arslan H., *A nucleic acid biosensor for detection of hepatitis C virus genotype 1a using poly(L-glutamic acid)-modified electrode*, Appl. Biochem. Biotechnol. **2015**, 176, 1431–1444.
52. Dovas C.I., Papanastassopoulou M., Georgiadis M.P., Chatzinasiou E., Maliogka V.I., Georgiades G.K., *Detection and quantification of infectious avian influenza A (H5N1) virus in environmental water by using real-time reverse transcription-PCR*, Appl. Environ. Microbiol. **2010**, 76, 2165–2174.
53. D'Souza S.F., *Immobilization and stabilization of biomaterials for biosensor applications*, Appl. Biochem. Biotechnol. **2001**, 96, 225–238.
54. Drummond T.G., Hill M.G., Barton J.K., *Electrochemical DNA sensors*, Nat. Biotechnol. **2003**, 21, 1192–1199.
55. Du A., Daidoji T., Koma T., Ibrahim M.S., Nakamura S., de Silva U.Ch., Ueda M., Yang Ch.-S., Yasunaga T., Ikuta K., Nakaya T., *Detection of circulating Asian H5N1 viruses by a newly established monoclonal antibody*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **2009**, 378, 197–202.
56. Eckermann A.L., Feld D. J., Shaw J. A., Meade T. J., *Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers*, Coord. Chem. Rev. **2010**, 254, 1769–1802.
57. Elahi M.Y., Bathaie S.Z., Mousavi M.F., Hoshyar R., Ghasemi S., *A new DNA-nanobiosensor based on G-quadruplex immobilized on carbon nanotubes modified glassy carbon electrode*, Electrochim. Acta **2012**, 82, 143–151.

- 58.** Elshafey R., Sijaj M., Zourob M., *DNA aptamers selection and characterization for development of label-free impedimetric aptasensor for neurotoxin anatoxin-a*, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *68*, 295–302.
- 59.** El Zowalaty M.E., Abin M., Raju S., Chander Y., Redig P.T., El Latif H.K. A., El Sayed M.A., Goyal S.M., *Isolation of avian influenza virus from polymerase chain reaction- negative cloacal samples of waterfowl*, *J. Vet. Diagn. Invest.* **2011**, *23*, 87–90.
- 60.** Ensafi A.A., Kazemnadi N., Amini M., Rezaei B., *Impedimetric DNA-biosensor for the study of dopamine induces DNA damage and investigation of inhibitory and repair effects of some antioxidants*, *Bioelectrochemistry* **2015**, *104*, 71–78.
- 61.** Erdem A., Ozsoz M., *Electrochemical DNA biosensors based on DNA-drug interactions*, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 965–974.
- 62.** Fan H., Ju P., Ai S., *Controllable synthesis of CdSe nanostructures with tunable morphology and their application in DNA biosensor of Avian Influenza Virus*, *Sens. Actuators, B* **2010**, *149*, 98–104.
- 63.** Fang L.-X., Cao J.-T., Huang K.-J., *A sensitive electrochemical biosensor for specific DNA sequence detection based on flower-like VS₂, graphene and Au nanoparticles signal amplification*, *J. Electroanal. Chem.* **2015**, *746*, 1–8.
- 64.** Fayazfar H., Afshar A., Dolati M., Dolati A., *DNA impedance biosensor for detection of cancer, TP53 gene mutation, based on gold nanoparticles/aligned carbon nanotubes modified electrode*, *Anal. Chim. Acta* **2014**, *836*, 34–44.
- 65.** Ferapontova E.E., *Electrochemical indicators for DNA electroanalysis*, *Curr. Anal. Chem.* **2011**, *7*, 51–62.
- 66.** Fernandes D.M., Silva N., Pereira C., Moura C., Magalhães J.M.C.S., Bachiller-Baeza B., Rodríguez-Ramos I., Guerrero-Ruiz A., Delerue-Matos C., Freire C., *MnFe₂O₄@CNT-N as novel electrochemical nanosensor for determination of caffeine, acetaminophen and ascorbic acid*, *Sens. Actuators, B* **2015**, *218*, 128–136.
- 67.** Ferretti S., Paynter S., Russell D.A., Sapsford K.E., Richardson D.J., *Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces*, *Trends Anal. Chem.* **2000**, *19*, 530–540.
- 68.** Finklea H.O., *Electrochemistry of organized monolayers of thiols and related molecules on electrodes*, rozdział z książki *Electroanalytical Chemistry* pod redakcją A.J. Barda, I. Rubinsteina, Nowy Jork **1996**.
- 69.** Fojta M., *Electrochemical sensors for DNA interactions and damage*, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1449–1463.

- 70.** François B., Friedt J.-M., Martin G., Ballandras S., *High temperature packaging for surface acoustic wave transducers acting as passive wireless sensors*, *Sens. Actuators, A* **2015**, 224, 6–13.
- 71.** Furst A.L., Hill M.G., Barton J.K., *DNA-modified electrodes fabricated using copper-free click chemistry for enhanced protein detection*, *Langmuir* **2013**, 29, 16141–16149.
- 72.** Galandová J., Labuda J., *Polymer interfaces used in electrochemical DNA-based biosensors*, *Chem. Pap.* **2009**, 63, 1–14.
- 73.** Galus Z., *Teoretyczne podstawy elektroanalizy chemicznej*, PWN, Warszawa **1997**.
- 74.** Galyanin V., Melenteva A., Bogomolov A., *Selecting optimal wavelength intervals for an optical sensor: A case study of milk fat and total protein analysis in the region 400–1100 nm*, *Sens. Actuators, B* **2015**, 218, 97–104.
- 75.** Gao F., Du L., Zhang Y., Tang D., Du Y., *Molecular beacon mediated circular strand displacement strategy for constructing a ratiometric electrochemical deoxyribonucleic acid sensor*, *Anal. Chim. Acta* **2015a**, 883, 67–73.
- 76.** Gao F., Gao C., He S., Wang Q., Wu A., *Label-free electrochemical lead (II) aptasensor using thionine as the signaling molecule and graphene as signal-enhancing platform*, *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 81, 15–22.
- 77.** Gao F., Qian Y., Zhang L., Dai S., Lan Y., Zhang Y., Du L., Tang D., *Target catalyzed hairpin assembly for constructing a ratiometric electrochemical aptasensor*, *Biosens. Bioelectron.* **2015b**, 71, 158–163.
- 78.** García-González R., Costa-García A., Fernández-Abedul M.T., *Enzymatic amplification-free nucleic acid hybridisation sensing on nanostructured thick-film electrodes by using covalently attached methylene blue*, *Talanta* **2015**, 142, 11–19.
- 79.** Gavin P.J., Thomson Jr. R.B., *Review of rapid diagnostic tests for influenza*, *Clin. Appl. Immunol. Rev.* **2003**, 4, 151–172.
- 80.** Geng T., Bao N., Gall O.Z., Lu C., *Modulating DNA adsorption on silica beads using an electrical switch*, *Chem. Commun.* **2009**, 7, 800–802.
- 81.** Gębala M., Schuhmann W., *Controlled orientation of DNA in a binary SAM as a key for the successful determination of DNA hybridization by means of electrochemical impedance spectroscopy*, *ChemPhysChem* **2010**, 11, 2887–2895.
- 82.** Gębala M., Stoica L., Guschin D., Stratmann L., Hartwich G., Schuhmann W., *A biotinylated intercalator for selective post-labeling of double-stranded DNA as a basis for high-sensitive DNA assays*, *Electrochem. Commun.* **2010**, 12, 684–688.
- 83.** Gębala M., Stoica L., Neugebauer S., Schuhmann W., *Label-free detection of DNA hybridization in presence of intercalators using electrochemical impedance spectroscopy*, *Electroanalysis* **2009**, 21, 325–331.

- 84.** Gherghi I.C., Girousi S.T., Voulgaropoulos A., Tzimou-Tsitouridou R., *Interaction of the mutagen ethidium bromide with DNA, using a carbon paste electrode and a hanging mercury drop electrode*, Anal. Chim. Acta **2004**, 505, 135–144.
- 85.** Gooding J.J., *Electrochemical DNA hybridization biosensors*, Electroanalysis **2002**, 14, 1149–1156.
- 86.** Grabowska I., Malecka K., Stachyra A., Góra-Sochacka A., Sirko A., Zagórski-Ostoja W., Radecka H., Radecki J., *Single electrode genosensor for simultaneous determination of sequences encoding hemagglutinin and neuraminidase of avian influenza virus type H5N1*, Anal. Chem. **2013**, 85, 10167–10173.
- 87.** Grabowska I., Singleton D.G., Stachyra A., Góra-Sochacka A., Sirko A., Zagórski-Ostoja W., Radecka H., Stulz E., Radecki J., *A highly sensitive electrochemical genosensor based on Co-porphyrin-labelled DNA*, Chem. Commun. **2014a**, 50, 4196–4199.
- 88.** Grabowska I., Stachyra A., Góra-Sochacka A., Sirko A., Olejniczak A.B., Leśnikowski Z.J., Radecki J., Radecka H., *DNA probe modified with 3-iron bis(dicarbollide) for electrochemical determination of DNA sequence of avian influenza virus H5N1*, Biosens. Bioelectron. **2014b**, 51, 170–176.
- 89.** Grabowska I., Zborowska M., Nguyen N.T., Dehaen W., Stulz E., Wood J.W., Radecka H., Radecki J., *Deposition of Ni(II) porphyrin monolayer on the gold electrode via azide-alkyne click – coupling and its electrochemical characterization*, Int. J. Electrochem. Sci. **2014c**, 9, 5948–5960.
- 90.** Greschner A.A., Bujold K.E., Sleiman H.F., *Intercalators as molecular chaperones in DNA self-assembly*, J. Am. Chem. Soc. **2013**, 135, 11283–11288.
- 91.** Gu Y., *Apparatus for detecting radiation exposure comprises first electrode; second electrode which is in electrical communication with first electrode through double strand DNA; and detector for detecting conductivity of double strand DNA*, Patent WO2014143004-A1, **2014**.
- 92.** Guiducci C., Stagni C., Zuccheri G., Bogliolo A., Benini L., Samorí B., Riccò B., *DNA detection by integrable electronics*, Biosens. Bioelectron. **2004**, 19, 781–787.
- 93.** Gültekin A., Karanfil G., Kuş M., Sönmezoğlu S., Say R., *Preparation of MIP-based QCM nanosensor for detection of caffeic acid*, Talanta **2014**, 119, 533–537.
- 94.** Haq I., *Thermodynamics of drug-DNA interactions*, Arch. Biochem. Biophys. **2002**, 403, 1–15.
- 95.** Hassen W.M., Duplan V., Frost E., Dubowski J.J., *Quantitation of influenza A virus in the presence of extraneous protein using electrochemical impedance spectroscopy*, Electrochim. Acta **2011**, 56, 8325–8328.

- 96.** He J., Bose M.E., Beck E.T., Fan J., Tiwari S., Metallo J., Jurgens L.A., Kehl S.C., Ledebor N., Kumar S., Weisburg W., Henrickson K.J., *Rapid multiplex reverse transcription-PCR typing of influenza A and B virus, and subtyping of influenza A virus into H1, 2, 3, 5, 7, 9, N1 (Human), N1 (Animal), N2, and N7, including typing of novel swine origin influenza A (H1N1) virus, during the 2009 outbreak in Milwaukee, Wisconsin*, J. Clin. Microbiol. **2009**, *47*, 2772–2778.
- 97.** Heise Ch., Bier F.F., *Immobilization of DNA on microarrays*, Top. Curr. Chem. **2006**, *261*, 1–25.
- 98.** Henry O.Y.F., Gutierrez Perez J., Acero Sanchez J.L., O’Sullivan C.K., *Electrochemical characterisation and hybridisation efficiency of co-assembled monolayers of PEGylated ssDNA and mercaptohexanol on planar gold electrodes*, Biosens. Bioelectron. **2010**, *25*, 978–983.
- 99.** Hepel M., Zhong Ch.J., *Functional nanoparticles for bioanalysis, nanomedicine, and bioelectronic devices*, Wydanie pierwsze, American Chemical Society, Washington **2012**.
- 100.** Hianik T., Gajdos V., Krivanek R., Oretskaya T., Metelev V., Volkov E., Vadgama P., *Amperometric detection of DNA hybridization on a gold surface depends on the orientation of oligonucleotide chains*, Bioelectrochemistry **2001**, *53*, 199–204.
- 101.** Hong Ch.-Y., Chen X., Liu T., Li J., Yang H.-H., Chen J.-H., Chen G.-N., *Ultrasensitive electrochemical detection of cancer-associated circulating microRNA in serum samples based on DNA concatamers*, Biosens. Bioelectron. **2013**, *50*, 132–136.
- 102.** Hong J., Yoon D.S., Park M.-I., Choi J., Kim T.S., Im G., Kim S., Pak Y.E., No K., *A dielectric biosensor using the capacitance change with AC frequency integrated on glass substrates*, Jpn. J. Appl. Phys. **2004**, *43*, 5639–5645.
- 103.** Honorato Castro A.C., França E.G., de Paula L.F., Soares M.M.C.N., Goulart L.R., Madurro J.M., Brito-Madurro A.G., *Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus*, Appl. Surf. Sci. **2014**, *314*, 273–279.
- 104.** Hu W., Blecking C., Kralj M., Suman L., Piantanida I., Schrader T., *Dimeric calixarenes: a new family of major-groove binders*, Chem. - Eur. J. **2012a**, *18*, 3589–3597.
- 105.** Hu Y., Wang K., Zhang Q., Li F., Wu T., Niu L., *Decorated graphene sheets for label-free DNA impedance biosensing*, Biomaterials **2012b**, *33*, 1097–1106.
- 106.** Hulanicki A., Głąb S., Ingman F., *Chemical sensors definitions and classification*, Pure Appl. Chem. **1991**, *63*, 1247–1250.
- 107.** Ioannou A.K., Pantazaki A.A., Girusi S.T.H., Millot M.-C., Vidal-Madjar C., Voulgaropoulos A.N., *DNA biosensor based on carbon paste electrodes modified by polymer multilayer*, Electroanalysis **2006**, *18*, 456–464.
- 108.** Jampasa S., Wonsawat W., Rodthongkum N., Siangproh W., Yanatatsaneejit P., Vilaivan T., Chailapaku O., *Electrochemical detection of human papillomavirus DNA type 16 using a*

pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe immobilized on screen-printed carbon electrodes, Biosens. Bioelectron. **2014**, *54*, 428–434.

109. Jargiło A., Grabowska I., Radecka H., Sulima M., Marszałek I., Wysłouch-Cieszyńska A., Dehaen W., Radecki J., *Redox active dipyrromethene-Cu(II) monolayer for oriented immobilization of his-tagged RAGE domains - The base of electrochemical biosensor for determination of A β 16-23'*, Electroanalysis **2013**, *25*, 1185–1193.

110. Jarocka U., Sawicka R., Góra-Sochacka A., Sirko A., Zagórski-Ostoja W., Radecki J., Radecka H., *Electrochemical immunosensor for detection of antibodies against influenza A virus H5N1 in hen serum*, Biosens. Bioelectron. **2014**, *55*, 301–306.

111. Jarocka U., Sawicka R., Góra-Sochacka A., Sirko A., Dehaen W., Radecki J., Radecka H., *An electrochemical immunosensor based on a 4,4'-thiobisbenzenethiol self-assembled monolayer for the detection of hemagglutinin from avian influenza virus H5N1*, Sens. Actuators, B **2016**, *228*, 25–30.

112. Jarocka U., Sawicka R., Stachyra A., Góra-Sochacka A., Sirko A., Zagórski-Ostoja W., Sączyńska V., Porębska A., Dehaen W., Radecki J., Radecka H., *A biosensor based on electroactive dipyrromethene-Cu(II) layer deposited onto gold electrodes for the detection of antibodies against avian influenza virus type H5N1 in hen sera*, Anal. Bioanal. Chem. **2015**, *407*, 7807–7814.

113. Jenson T.A., *Agar gel immunodiffusion assay to detect antibodies to Type A influenza virus*, Methods Mol. Biol. **2014**, *1161*, 141–150.

114. Jo W., Akkaya O.C., Solgaard O., Digonnet M.J.F., *Miniature fiber acoustic sensors using a photonic-crystal membrane*, Opt. Fiber Technol. **2013**, *19*, 785–792.

115. Jollya P., Formisano N., Tkáč J., Kasák P., Frost Ch.G., Estrela P., *Label-free impedimetric aptasensor with antifouling surface chemistry: A prostate specific antigen case study*, Sens. Actuators, B **2015**, *209*, 306–312.

116. Kafka J., Panke O., Abendroth B., Lisdat F., *A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy*, Electrochim. Acta **2008**, *53*, 7467–7474.

117. Kang B., Yeo U., Yoo K.-H., *Anodized aluminum oxide-based capacitance sensors for the direct detection of DNA hybridization*, Biosens Bioelectron. **2010**, *25*, 1592–1596.

118. Karim F., Fakhruddin A.N.M., *Recent advances in the development of biosensor for phenol: a review*, Rev. Environ. Sci. Biotechnol. **2012**, *11*, 261–274.

119. Katz E., Lioubashevsky O., Willner I., *Electromechanics of a redox-active rotaxane in a monolayers assembly on an electrode*, J. Am. Chem. Soc. **2004**, *126*, 15520–15532.

120. Katz E., Willner I., *Kinetic Separation of Amperometric Responses of Composite Redox-Active Monolayers Assembled onto Au Electrodes: Implications to the Monolayers Structure and Composition*, Langmuir **1997**, *13*, 3364–3373.

- 121.** Keighley S.D., Li P., Estrela P., Migliorato P., *Optimization of DNA immobilization on gold electrodes for label-free detection by electrochemical impedance spectroscopy*, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1291-1297.
- 122.** Kerman K., Kobayashi M., Tamiza E., *Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology*, *Meas. Sci. Technol.* **2004**, *15*, R1-R11.
- 123.** Khedkar S.A., Malde A.K., Coutinho E.C., *CoMFA study of distamycin analogs binding to the minor-groove of DNA: a unified model for broad-spectrum activity*, *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 1099–1108.
- 124.** Kilic T., Topkaya S.N., Ariksoysal D.O., Ozsoz M., Ballar P., Erac Y., Gozen O., *Electrochemical based detection of microRNA, mir21 in breast cancer cells*, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *38*, 195–201.
- 125.** Kiszka A., *Elektrochemia II. Elektrodyka*, WNT, Warszawa **2001**.
- 126.** Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B., *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- 127.** Kraziński B.E., Radecka H., Radecki J., *Surface Plasmon Resonance Based Biosensors for Exploring the Influence of Alkaloids on Aggregation of Amyloid- β Peptide*, *Sensors* **2011**, *11*, 4030–4042.
- 128.** Krejcová L., Hynek D., Adam V., Hubalek J., Kizek R., *Electrochemical sensors and biosensors for influenza detection*, *Int. J. Electrochem. Sci.* **2012**, *7*, 10779–10801.
- 129.** Kukol A., Li P., Estrela P., Ko-Ferrigno P., Migliorato P., *Label-free electrical detection of DNA hybridization for the example of influenza virus gene sequences*, *Anal. Biochem.* **2008**, *374*, 143–153.
- 130.** Kurzątkowska K., Sirko A., Zagórski-Ostoja W., Dehaen W., Radecka H., Radecki J., *Electrochemical label-free and reagentless genosensor based on an ion barrier switch-off system for DNA sequence-specific detection of the avian influenza virus*, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9702–9709.
- 131.** Labuda J., Oliveira Brett A.M., Evtugyn G., Fojta M., Mascini M., Ozsoz M., Palchetti I., Paleček E., Wang J., *Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report)*, *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 1161–1187.
- 132.** Lasia A., Conway B.E., Bockris J., White R.E., *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications, Modern Aspects of Electrochemistry*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nowy Jork **1999**.
- 133.** Lau L.T., Fung Y.W.W., Yu A.C.H., *Detection of animal viruses using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)* w Vannier P., Espeseth D. (eds): *New Diagnostic Technology: Applications in Animal Health and Biologics Controls*, *Dev Biol (Basel)*. Basel, Karger, **2006**, *126*, 7–15.

- 134.** Lee M.S., Chang P.C., Shien J.H., Cheng M.C., Shieh H.K., *Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR*, J. Virol. Methods **2001**, 97, 13–22.
- 135.** Lee Ch.-W., Saif Y.M., *Avian influenza virus*, Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **2009**, 32, 301–310.
- 136.** Lehn J.-M., *Nobel Lectures, Chemistry 1981-1990*, Editor in Charge Tore Frängsmyr, (red) Editor Bo. G. Malmström, World Scientific Publishing Co., Singapore **1992**.
- 137.** Leszczyński T., Duński H., *Sposoby wiązania cząsteczek ligandów z DNA*, Chemia spożywcza i biotechnologia, Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej **2006**, 70, 65–77.
- 138.** Li Y., Lu Y., *Functional Nucleic Acids for Analytical Applications*. Springer 2009.
- 139.** Li B., Pan G., Avent N.D., Lowry R.B., Madgett T.E., Waines P.L., *Graphene electrode modified with electrochemically reduced graphene oxide for label-free DNA detection*, Biosens. Bioelectron. **2015a**, 72, 313–319.
- 140.** Li F., Yu Z., Qu H., Zhang G., Yan H., Liu X., He X., *A highly sensitive and specific electrochemical sensing method for robust detection of Escherichia coli lac Z gene sequence*, Biosens. Bioelectron. **2015b**, 68, 78–82.
- 141.** Li D., Zou X., Shen Q., Dong S., *Kinetic study of DNA/DNA hybridization with electrochemical impedance spectroscopy*, Electrochem. Commun. **2007**, 9, 191–196.
- 142.** Ligaj M., Tichoniuk M., Gwiazdowska D., Filipiak M., *Electrochemical DNA biosensor for the detection of pathogenic bacteria Aeromonas hydrophila*, Electrochim. Acta **2014**, 128, 67–74.
- 143.** Lin Ch.-H., Hung Ch.-H., Hsiao Ch.-Y., Lin H.-Ch., Ko F.-H., Yang Y.-S., *Poly-silicon nanowire field-effect transistor for ultrasensitive and label-free detection of pathogenic avian influenza DNA*, Biosens. Bioelectron. **2009**, 24, 3019–3024.
- 144.** Lin X., Ni Y., Kokot S., *An electrochemical DNA-sensor developed with the use of methylene blue as a redox indicator for the detection of DNA damage induced by endocrine-disrupting compounds*, Anal. Chim. Acta **2015**, 867, 29–37.
- 145.** Liu X., Cheng Z., Fan H., Ai S., Han R., *Electrochemical detection of avian influenza virus H5N1 gene sequence using a DNA aptamer immobilized onto a hybrid nanomaterial-modified electrode*, Electrochim. Acta **2011**, 56, 6266–6270.
- 146.** Liu S.-F., Li Y.-F., Li J.-R., Jiang L., *Enhancement of DNA immobilization and hybridization on gold electrode modified by nanogold aggregates*, Biosens. Bioelectron. **2005b**, 21, 789–795.
- 147.** Liu J., Tian S., Nielsen P.E., Knoll W., *In situ hybridization of PNA/DNA studied label-free by electrochemical impedance spectroscopy*, Chem. Commun. **2005a**, 2969–2971.

- 148.** Liu A., Wang K., Weng S., Lei Y., Lin L., Chen W., Lin X., Chen Y., *Development of electrochemical DNA biosensors*, Trends Anal. Chem. **2012**, 37, 101–111.
- 149.** Liu L., Xia N., Liu H., Kang X., Liu X., Xue Ch., He X., *Highly sensitive and label-free electrochemical detection of microRNAs based on triple signal amplification of multifunctional gold nanoparticles, enzymes and redox-cycling reaction*, Biosens. Bioelectron. **2014**, 53, 399–405.
- 150.** Liu B., Xiao B., Cui L., Wang M., *Molecularly imprinted electrochemical sensor for the highly selective and sensitive determination of melamine*, Mater. Sci. Eng., C **2015**, 55, 457–461.
- 151.** Love J.Ch., Estroff L.A., Kriebel J.K., Nuzzo R.G., Whitesides G.M., *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology*, Chem. Rev. **2005**, 105, 1103–1169.
- 152.** Lucarelli F., Tombelli S., Minunni M., Marrazza G., Mascini M., *Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection*, Anal. Chim. Acta **2008**, 609, 139–159.
- 153.** Luo Q., Huang H., Zou W., Dan H., Guo X., Zhang A., Yu Z., Chen H., Jin M., *An indirect sandwich ELISA for the detection of avian influenza H5 subtype viruses using anti-hemagglutinin protein monoclonal antibody*, Vet. Microbiol. **2009**, 137, 24–30.
- 154.** Lippa P.B., Sokoll L.J., Chan D.W., *Immunosensors – principles and applications to clinical chemistry*, Clin. Chim. Acta **2001**, 314, 1–26.
- 155.** Ma X., Xu H., Shi L., Yang P., Zhang L., Sun X., Zhen W., Hu K., *A multiplex PCR assay for the detection of five influenza viruses using a dual priming oligonucleotide system*, BMC Infect. Dis. **2015**, 15, 93–103.
- 156.** Mahouche S., Mekni N., Abbassi L., Lang P., Perruchot C., Jouini M., Mammeri F., Turmine M., Romdhane H.B., Chehimi M., *Tandem diazonium salt electroreduction and click chemistry as a novel, efficient route for grafting macromolecules to gold surface*, Surf. Sci. **2009**, 603, 3205–3211.
- 157.** Malecka K., Grabowska I., Radecki J., Stachyra A., Góra-Sochacka A., Sirko A., Radecka H., *Voltammetric detection of a specific DNA sequence of Avian Influenza Virus H5N1 using HS-ssDNA probe deposited onto gold electrode*, Electroanalysis **2012**, 24, 439–446.
- 158.** Malecka K., Grabowska I., Radecki J., Stachyra A., Góra-Sochacka A., Sirko A., Radecka H., *Electrochemical detection of avian influenza virus genotype using amino-ssDNA probe modified gold electrodes*, Electroanalysis **2013**, 25, 1871–1878.
- 159.** Malecka K., Michalczuk L., Radecka H., Radecki J., *Ion-channel genosensor for the detection of specific DNA sequences derived from Plum Pox Virus in plant extracts*, Sensors **2014**, 14, 18611–18624.

- 160.** Malecka K., Stachyra A., Góra-Sochacka A., Sirko A., Zagórski-Ostoja W., Radecka H., Radecki J., *New redox-active layer create via epoxy–amine reaction – The base of genosensor for the detection of specific DNA and RNA sequences of avian influenza virus H5N1*, Biosens. Bioelectron. **2015**, *65*, 427–434.
- 161.** Malecka K., Stachyra A., Góra-Sochacka A., Sirko A., Zagórski-Ostoja W., Radecka H., Radecki J., *Electrochemical genosensor based on disc and screen printed gold electrodes for detection of specific DNA and RNA sequences derived from Avian Influenza Virus H5N1*, Sens. Actuators, B **2016**, *224*, 290–297.
- 162.** Mannelli I., Minunni M., Tombelli S., Wang R., Spiriti M.M., Mascini M., *Direct immobilisation of DNA probes for the development of affinity biosensors*, Bioelectrochemistry **2005**, *66*, 129–138.
- 163.** Manzanares-Palenzuela C.L., Martín-Fernández B., Sánchez-Paniagua López M., López-Ruiz B., *Electrochemical genosensors as innovative tools for detection of genetically modified organisms*, Trends Anal. Chem. **2015**, *66*, 19–31.
- 164.** Marrazza G., Chianella I., Mascini M., *Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection*, Biosens. Bioelectron. **1999**, *14*, 43–51.
- 165.** Martínez-Paredes G., González-García M.B., Costa-García A., *Genosensor for detection of four pneumoniae bacteria using gold nanostructured screen-printed carbon electrodes as transducers*, Sens. Actuators, B **2010**, *149*, 329–335.
- 166.** Mc Caffrey C., Twomey K., Ogurtsov V.I., *Development of a wireless swallowable capsule with potentiostatic electrochemical sensor for gastrointestinal track investigation*, Sens. Actuators, B **2015**, *218*, 8–15.
- 167.** McEwen G.D., Chen F., Zhou A., *Immobilization, hybridization, and oxidation of synthetic DNA on gold surface: Electron transfer investigated by electrochemistry and scanning tunneling microscopy*, Anal. Chim. Acta **2009**, *643*, 26–37.
- 168.** Mendoza L.G., McQuary P., Mongan A., Gangadharan R., Brignac S., Eggers M., *High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*, Biotechniques **1999**, *27*, 778–788.
- 169.** Mese F., Congu G., Erdem A., *Voltammetric and impedimetric detection of DNA hybridization by using dendrimer modified graphite electrodes*, J. Electroanal. Chem. **2014**, *719*, 92–97.
- 170.** Meyer R., Giselbrecht S., Rapp B.E., Hirtz M., Niemeyer Ch.M., *Advances in DNA-directed immobilization*, Curr. Opin. Chem. Biol. **2014**, *18*, 8–15.
- 171.** Miao X., Guo X., Xiao Z., Ling L., *Electrochemical molecular beacon biosensor for sequence-specific recognition of double-stranded DNA*, Biosens. Bioelectron. **2014**, *59*, 54–57.

- 172.** Mielecki M., Wojtasik J., Zborowska M., Kurzątkowska K., Radecki J., Grzelak K., Dehaen W., Radecka H., *Oriented immobilization of His-tagged kinase RIO1 protein on redox active N-(IDA-like)-Cu(II) monolayer deposited on gold electrode - The base of electrochemical biosensor*, *Electrochim. Acta* **2013**, *96*, 147–154.
- 173.** Mięka E., Sulima M., Marszałek I., Wysłouch-Cieszyńska A., Verwilt P., Dehaen W., Radecki J., Radecka H., *Oriented immobilization of his-tagged protein on a redox active thiol derivative of DPTA-Cu(II) layer deposited on a gold electrode – The base of electrochemical biosensors*, *Sensors* **2013**, *13*, 11586–11602.
- 174.** Mięka E., Wysłouch-Cieszyńska A., Zhukova L., Puchalska M., Verwilt P., Dehaen W., Radecki J., Radecka H., *Voltammetric detection of S100B protein using his-tagged receptor domains for advanced glycation end products (RAGE) immobilized onto a gold electrode surface*, *Sensors* **2014**, *14*, 10650–10663.
- 175.** Moore C., Corden S., Sinha J., Jones R., *Dry cotton or flocked respiratory swabs as a simple collection technique for the molecular detection of respiratory viruses using real-time NASBA*, *J. Virol. Methods* **2008**, *153*, 84–89.
- 176.** Moore C., Telles J.-N., Corden S., Gao R.-B., Vernet G., Van Aarlec P., Shu Y.-L., *Development and validation of a commercial real-time NASBA assay for the rapid confirmation of influenza A H5N1 virus in clinical samples*, *J. Virol. Methods* **2010**, *170*, 173–176.
- 177.** Moreno A., Brocchi E., Lelli D., Gamba D., Tranquillo M., Cordioli P., *Monoclonal antibody based ELISA tests to detect antibodies against neuraminidase subtypes 1, 2 and 3 of avian influenza viruses in avian sera*, *Vaccine* **2009**, *27*, 4967–4974.
- 178.** Moser I., Schalkhammer T., Pittner F., Urban G., *Surface techniques for an electrochemical DNA biosensor*, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 729–737.
- 179.** Mudasir, Wijaya K., Yoshioka N., Inoue H., *DNA binding of iron (II) complexes with 1,10-phenanthroline and 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline: salt effect, ligand substituent effect, base pair specificity and binding strength*, *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *94*, 263–271.
- 180.** Munch M., Nielsen L.P., Handberg K.J., Jorgensen P.H., *Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA*, *Arch. Virol.* **2001**, *146*, 87–97.
- 181.** Neto B.A.D., Lapis A.A.M., *Recent developments in the chemistry of deoxyribonucleic acid (DNA) intercalators: principles, design, synthesis, applications and trends*, *Molecules* **2009**, *14*, 1725–1746.
- 182.** Neumann G., Chen H., Gao G.F., Shu Y., Kawaoka Y., *H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties*, *Cell. Res.* **2010**, *20*, 51–61.
- 183.** Newton D.W., Treanor J.J., Menegus M.A., *Clinical and laboratory diagnosis of influenza virus infections*, *Am. J. Manag. Care* **2000**, *6*, S265–S275.

- 184.** Nowicka A.M., Kowalczyk A., Scholz F., Stojek Z., *Changes in performance of DNA biosensor caused by hydroxyl radicals*, *Electroanalysis* **2011**, *23*, 55–62.
- 185.** Nuzzo R.G., Allara D.L., *Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces*, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481–4483.
- 186.** Ohtsuka K., Endo H., Morimoto K., Vuong B.N., Ogawa H., Imai K., Takenaka S., *Detection of an antibody to avian influenza virus by an electrochemical immunoassay (eELISA)*, *Anal. Sci.* **2008**, *24*, 1619–1622.
- 187.** Oluwafunmilayo Adekunle F.A., *Ni (II), Cobalt (II), Manganese (II) and Zinc (II) Complexes of 5,6-Dihydro-5,6-Epoxy-1,10-Phenanthroline - Synthesis and Spectroscopic Studies*, *Int. J. Basic Appl. Sci.* **2013**, *13*, 6–10.
- 188.** Osteryoung J.G., Osteryoung R.A., *Square Wave Voltammetry*, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 101A–110A.
- 189.** Paleček E., *Past, present and future of nucleic acids electrochemistry*, *Talanta* **2002**, *56*, 809–819.
- 190.** Paleček E., Bartošik M., *Electrochemistry of nucleic acids*, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3427–3481.
- 191.** Paleček E., Jelen F., *Electrochemistry of nucleic acids w Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*, Elsevier, Amsterdam **2005**, 73–173.
- 192.** Paleček E., Fojta M., *Electrochemical DNA Sensors w I. Willner, E. Katz (editors) Bioelectronics. From Theory to Applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim **2005**.
- 193.** Paliwal A., Sharma A., Tomar M., Gupta V., *Room temperature detection of NO₂ gas using optical sensor based on surface plasmon resonance technique*, *Sens. Actuators, B* **2015**, *216*, 497–503.
- 194.** Pan T., Xiao Z.-D., Huang P.-M., *Characterize the interaction between polyethylenimine and serum albumin using surface plasmon resonance and fluorescence method*, *J. Lumin.* **2009**, *129*, 741–745.
- 195.** Paniel N., Baudart J., Hayat A., Barthelmebs L., *Aptasensor and genosensor methods for detection of microbes in real world samples*, *Methods* **2013**, *64*, 229–240.
- 196.** Park J.-Y., Park S.-M., *DNA hybridization sensors based on electrochemical impedance spectroscopy as a detection tool*, *Sensors* **2009**, *9*, 9513–9532.
- 197.** Patel N., Davies M.C., Heaton R.J., Roberts C.J., Tendler S.J.B., Williams P.M., *A scanning probe microscopy study of the physisorption and chemisorption of protein molecules onto carboxylate terminated self-assembled monolayers*, *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* **1998**, *66*, S569–S574.

- 198.** Patitsa M., Pfeiffer H., Wevers M., *A Surface Plasmon Resonance Optical Fibre Sensor for Testing Detergent Cleaning Efficiency*, *J. Surfactants Deterg.* **2015**, *18*, 697–706.
- 199.** Pedano M.L., Rivas G.A., *Immobilization of DNA at glassy carbon electrodes: a critical study of adsorbed layer*, *Sensors* **2005**, *5*, 424–447.
- 200.** Pedano M., Rivas G.A., *Adsorption and electrooxidation of DNA at glassy carbon paste electrodes*, *Anal. Lett.* **2010**, *43*, 1703–1712.
- 201.** Pedersen Ch., *Nobel Lectures, Chemistry 1981-1990*, Editor in Charge Tore Frängsmyr, (red) Editor Bo. G. Malmström, World Scientific Publishing Co., Singapore **1992**.
- 202.** Pedrero M., Campuzano S., Pingarrón J.M., *Magnetic beads-based electrochemical sensors applied to the detection and quantification of bioterrorism/biohazard agents*, *Electroanalysis* **2012**, *24*, 470–482.
- 203.** Pejčić B., De Marco R., *Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization*, *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 6217–6229.
- 204.** Peng H., Zhang L., Soeller Ch., Travas-Sejdic J., *Conducting polymers for electrochemical DNA sensing*, *Biomaterials* **2009**, *30*, 2132–2148.
- 205.** Piķuła A., Śmietanka K., Minta Z., *Diagnostyka serologiczna grypy ptaków*, *Życie Weterynaryjne* **2011**, *86*, 869–872.
- 206.** Ping S., Geng S., Ting-ting L., Yu-shui L., Ting F., Hua-nan W., *Methods to detect avian influenza virus for food safety surveillance*, *J. Integr. Agric.* **2015**, *14*, 2296–2308.
- 207.** Pividori M.I., Merkoći A., Alegret S., *Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods*, *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 291–303.
- 208.** Power A.C., Morrin A., *Electroanalytical Sensor Technology*, w Khalid M.A.A., *Electrochemistry*, InTech, Rijeka **2013**, 141–178.
- 209.** Prashar D., *Self assembled monolayers - a review*, *Int. J. ChemTech Res.* **2012**, *4*, 258–265.
- 210.** Prince H.E., Leber A.L., *Comparison of complement fixation and hemagglutination inhibition assays for detecting antibody responses following influenza virus vaccination*, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2003**, *10*, 481–482.
- 211.** Qasim M., Lim D.J., Park H., Na D., *Nanotechnology for diagnosis and treatment of infectious diseases*, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14*, 7374–7387.
- 212.** Qiu B., Guo L., Guo Ch., Guo Z., Lin Z., Chen G., *Synthesis of a new Ni-phenanthroline complex and its application as an electrochemical probe for detection of nucleic acid*, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2270–2274.
- 213.** Radecki J., Radecka H., Cieśla J., Tudek B., *Sensory chemiczne i biosensory w kontroli żywności zmodyfikowanej genetycznie*, *Biotechnologia* **2006**, *3*, 67–78.

- 214.** Radhakrishnan S., Sumathi C., Dharuman V., Wilson J., *Polypyrrole nanotubes–polyaniline composite for DNA detection using methylene blue as intercalator*, *Anal. Methods* **2013**, *5*, 1010–1015.
- 215.** Rahman Md.M., Li X.-B., Lopa N.S., Ahn S.J., Lee J.-J., *Electrochemical DNA hybridization sensors based on conducting polymers*, *Sensors* **2015**, *15*, 3801–3829.
- 216.** Ramanaviciene A., Ramanavicius A., *Pulsed amperometric detection of DNA with an ssDNA/polypyrrole-modified electrode*, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *379*, 287–293.
- 217.** Ramanavicius A., Oztekin Y., Balevicius Z., Kausaite-Mikstimiene A., Krikstolaityte V., Baleviciute I., Ratautaite V., Ramanaviciene A., *Conducting and electrochemically generated polymers in sensor design (Mini Review)*, *Procedia Eng.* **2012**, *47*, 825–828.
- 218.** Rauf S., Gooding J.J., Ghauri M.A., Rahman M., Anwar M.A., Khalid A.M., *Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 205–217.
- 219.** Ren W., Gao Z.F., Li N.B., Luo H.Q., *Ultrasensitive and selective signal-on electrochemical DNA detection via exonuclease III catalysis and hybridization chain reaction amplification*, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *63*, 153–158.
- 220.** Rescifina A., Zagni Ch., Varrica M.G., Pistrà V., Corsaro A., *Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling*, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 95–115.
- 221.** Revenga-Parra M., Garcia T., Pariente F., Lorenzo E., Alonso C., *Effects of ionic strength and probe DNA length on the electrochemical impedance spectroscopic response of biosensors*, *Electroanalysis* **2011**, *23*, 100–107.
- 222.** Reyes-Romero D.F., Behrmann O., Dame G., Urban G.A., *Dynamic thermal sensor for biofilm monitoring*, *Sens. Actuators, A* **2014**, *213*, 43–51.
- 223.** Reynisson J., Schuster G.B., Howerton S.B., Williams L.D., Barnett R.N., Cleveland C.L., Landman U., Harrit N., Chaires J.B., *Intercalation of trioxatriangulenium ion in DNA: Binding, electron transfer, X-ray crystallography, and electronic structure*, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2072–2083.
- 224.** Richards A.D., Rodger A., *Synthetic metallomolecules as agents for the control of DNA structure*, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 471–483.
- 225.** Rivas G., Pedano M.L., Ferreyra N.F., *Electrochemical biosensors for sequence-specific DNA detection*, *Anal. Letters* **2005**, *38*, 2653–2703.
- 226.** Rowe G.K., Carter M.T., Richardson J.N., Murray R.W., *Consequences of kinetic dispersion on the electrochemistry of an adsorbed redox-active monolayers*, *Langmuir* **1995**, *11*, 1797–1806.

- 227.** Rowe G.K., Creager S.E., *Redox and ion-pairing thermodynamics in self-assembled monolayers*, Langmuir **1991**, *7*, 2307–2312.
- 228.** Ruther R.E., Rigsby M.L., Gerken J.B., Hogendoorn S.R., Landis E.C., Stahl S.S., Hamers R.J., *Highly stable redox-active molecular layers by covalent grafting to conductive diamond*, J. Am. Chem. Soc. **2011**, *133*, 5692–5694.
- 229.** Safavieh M., Ahmed M.U., Tolba M., Zourob M., *Microfluidic electrochemical assay for rapid detection and quantification of Escherichia coli*, Biosens. Bioelectron. **2012**, *31*, 523–528.
- 230.** Saha K., Agasti S.S., Kim Ch., Li X., Rotello V.M., *Gold nanoparticles in chemical and biological sensing*, Chem. Rev. **2012**, *112*, 2739–2779.
- 231.** Sánchez-Fraga R., Ponce-Ponce V.H., Mendoza-Acevedo S., Villa-Vargas L.A., Estrada-Vázquez H., *Design and simulation of mass sensors based on horizontally actuated silicon cantilevers*, Microelectron. Eng. **2014**, *119*, 83–88.
- 232.** Salek G., Demourgues A., Jubera V., Garcia A., Gaudon M., *Mn²⁺ doped Zn₃(PO₄)₂ phosphors: Irreversible thermochromic materials useful as thermal sensors*, Opt. Mater. **2015**, *47*, 323–327.
- 233.** Sassolas A., Leca-Bouvier B.D., Blum L.J., *DNA biosensors and microarrays*, Chem. Rev. **2008**, *108*, 109–139.
- 234.** Scholz F., *Electroanalytical Methods, Guide to Experiments and Applications*, Wydanie drugie poprawione, rozszerzone, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2010**.
- 235.** Shamsi F., Coster H., Jolliffe K.A., *Characterization of peptide immobilization on an acetylene terminated surface via click chemistry*, Surf. Sci. **2011**, *605*, 1763–1770.
- 236.** Sharma H., Mutharasan R., *Review of biosensors for foodborne pathogens and toxins*, Sens. Actuators, B **2013**, *183*, 535–549.
- 237.** Shee N.K., Das D., Oluwafunmilayo Adekunle F.A., Drew M.G.B., Datta D., *Homoleptic copper (II) and copper (I) complexes of 5,6-dihydro-5,6-epoxy-1,10-phenanthroline. Six-coordinate copper (I) in solution*. Inorg. Chim. Acta **2011**, *366*, 198–202.
- 238.** Shojaei T.R., Tabatabaei M., Shawky S., Salleh M.A.M., Bald D., *A review on emerging diagnostic assay for viral detection: the case of avian influenza virus*, Mol. Biol. Rep. **2014**, DOI: [10.1007/s11033-014-3758-5](https://doi.org/10.1007/s11033-014-3758-5).
- 239.** Siddiquee S., Yusof N.A., Salleh A.B., Tan S.G., Bakar F.A., *Electrochemical DNA biosensor for the detection of Trichoderma harzianum based on a gold electrode modified with a composite membrane made from an ionic liquid, ZnO nanoparticles and chitosan, and by using acridine orange as a redox indicator*, Microchim. Acta **2011**, *172*, 357–363.
- 240.** Skoog D.A., Leary J.J., *Principles of instrumental analysis*, Saunders College Publishing, Florida **1992**.

- 241.** Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R., *Podstawy chemii analitycznej*, PWN, Warszawa **2007**.
- 242.** Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T., Suarez D.L., *Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes*, J. Clin. Microbiol. **2002**, *40*, 3256–3260.
- 243.** Starick E., Romer-Oberdorfer A., Werner O., *Type- and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza A viruses (AIV)*, J. Vet. Med., Ser. B **2000**, *47*, 295–301.
- 244.** Steel A.B., Levicky R.L., Herne T.M., Tarlov M.J., *Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly*, Biophys. J. **2000**, *79*, 975–981.
- 245.** Steininger C., Kundi M., Aberle S.W., Aberle J.H., Popow-Kraupp T., *Effectiveness of reverse transcription-PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups*, J. Clin. Microbiol. **2002**, *40*, 2051–2056.
- 246.** Stefańska I., Romanowska M., Brydak L.B., *Metody wykrywania wybranych wirusów wywołujących zakażenia układu oddechowego*, Postępy Hig. Med. Dosw. (online) **2012**, *66*, 452–460.
- 247.** Stoytcheva M., Zlatev R., Cosnier S., Arredondo M., Valdez B., *High sensitive trypsin activity evaluation applying a nanostructured QCM-sensor*, Biosens. Bioelectron. **2013**, *41*, 862–866.
- 248.** Strona internetowa <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/Biosensory/>
- 249.** Strona internetowa www.dropsens.com
- 250.** Stryer L., *Biochemia*, PWN, Warszawa **2003**.
- 251.** Sugawara M., Kojima K., Sazawa H., Umezawa Y., *Ion-channel sensors*, Anal. Chem. **1987**, *59*, 2842–2846.
- 252.** Suenaga E., Mizuno H., Penmetcha K.K.R., *Monitoring influenza hemagglutinin and glycan interactions using surface plasmon resonance*, Biosens. Bioelectron. **2012**, *32*, 195–201.
- 253.** Sun X., Liu Y., Shaw G., Carrier A., Dey S., Zhao J., Lei Y., *fundamental study of electrospun pyrene–polyethersulfone nanofibers using mixed solvents for sensitive and selective explosives detection in aqueous solution*, ACS Appl. Mater. Interfaces **2015**, *7*, 13189–13197.
- 254.** Swartz M.E., Krull I.S., *Handbook of Analytical Validation*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton **2012**, 70–71.
- 255.** Szczepaniak W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa **1985**.
- 256.** Szpakowska I., Krassowska-Swiebocka B., Maciejewska D., Kazmierczak P., Jemielita W., Konrad M., Trykowska J., Maj-Zurawska M., *Electrochemical DNA biosensor for testing*

- pentamidine and its analogues as potential chemotherapeutics*, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 1422–1430.
- 257.** Szymczyk T., Rabiej S., Pielesz A., Desselberger J., *Tablice matematyczne, fizyczne, chemiczne, astronomiczne*, Bielsko-Biała **2003**.
- 258.** Śmietanka K., Minta Z., *Avian influenza in Poland*, *Acta Biochim. Pol.* **2014**, *61*, 453–457.
- 259.** Tabrizi M.A., Shamsipur M., *A label-free electrochemical DNA biosensor based on covalent immobilization of salmonella DNA sequences on the nanoporous glassy carbon electrode*, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *69*, 100–105.
- 260.** Takahashi T., Kawagishi S., Masuda M., Suzuki T., *Binding kinetics of sulfatide with influenza A virus hemagglutinin*, *Glycoconjugate J.* **2013**, *30*, 709–716.
- 261.** Tam P.D., *Genetically modified organism (GMO) detection by biosensor based on SWCNT material*, *Curr. Appl. Phys.* **2015**, *15*, 397–401.
- 262.** Tam P.D., Hieu N.V., Chien N.D., Le A.-T., Tuan M.A., *DNA sensor development based on multi-wall carbon nanotubes for label-free influenza virus (type A) detection*. *J. Immunol. Meth.* **2009a**, *350*, 118–124.
- 263.** Tam P.D., Tuan M.A., Van Hieu N., Chien N.D., *Impact parameters on hybridization process in detecting influenza virus (type A) using conductimetric-based DNA sensor*, *Physica E* **2009b**, *41*, 1567–1571.
- 264.** Tavallaie R., Darwish N., Gebala M., Hibbert D.B., Gooding J.J., *The effect of interfacial design on the electrochemical detection of DNA and MicroRNA using methylene blue at low-density DNA films*, *ChemElectroChem* **2014**, *1*, 165–171.
- 265.** Thévenot D., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S., *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*, *Pure and Applied Chemistry* **1999**, *71*, 2333–2348.
- 266.** Ting B.P., Zhang J., Gao Z., Ying J.Y., *A DNA biosensor based on the detection of doxorubicin-conjugated Ag nanoparticle labels using solid-state voltammetry*, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25*, 282–287.
- 267.** Tiwari A., Gong S., *Electrochemical detection of a breast cancer susceptible gene using cDNA immobilized chitosan-co-polyaniline electrode*, *Talanta* **2009**, *77*, 121–1222.
- 268.** Tsai J.Z., Chen Ch.J., Chen W.Y., Liu J.T., Hsin Y.M., *Capacitance sensor system for oligonucleotide hybridization detection*, *Sens. Mater.* **2011**, *23*, 111–119.
- 269.** Turner P.C., McLennan A.G., Bates A.D., White M.R.H., *Biologia molekularna. Krótkie wykłady*, Wydanie trzecie, PWN, Warszawa **2013**.
- 270.** Torkashvand M., Gholivand M.B., Taherkhani F., *Fabrication of an electrochemical sensor based on computationally designed molecularly imprinted polymer for the determination of mesalamine in real samples*, *Mater. Sci. Eng., C* **2015**, *55*, 209–217.

- 271.** Tosar J.P., Brañas G., Laíz J., *Electrochemical DNA hybridization sensors applied to real and complex biological samples*, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 1205–1217.
- 272.** Ulman A., *Formation and structure of self-assembled monolayers*, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533-1554.
- 273.** Umezawa Y., Aoki H., *Ion channel sensors based on artificial receptors*, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 320A–326A.
- 274.** Van Thu V., Dung P.T., Tam L.T., Tam P.D., *Biosensor based on nanocomposite material for pathogenic virus detection*, *Colloids Surf., B* **2014**, *115*, 176–181.
- 275.** Velumani S., Ho H.-T., He F., Musthaq S., Prabakaran M., Kwang J., *A novel peptide ELISA for universal detection of antibodies to human H5N1 influenza viruses*, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20737.
- 276.** Velusamy V., Arshak K., Yang C.F., Yu L., Korostynska O., Adley C., *Comparison between DNA immobilization techniques on a redox polymer matrix*, *Am. J. Anal. Chem.* **2011**, *2*, 392–400.
- 277.** Vercoutere W., Akeson M., *Biosensors for DNA sequence detection*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 816–822.
- 278.** Vericat C., Vela M.E., Benitez G., Carro P., Salvarezza R.C., *Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system*, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1805–1834.
- 279.** Vijayalakshmi R., Kanthimathi M., Subramanian V., Nair, B.U., *Interaction of DNA with [Cr(Schiff base)(H₂O)₂]ClO₄*, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1475*, 157–162.
- 280.** Voeten J.T.M., Groen J., Van Alphen D., Claas E.C.J., De Groot R., Osterhau A.D.M.E., Rimmelzwaan G.F., *Use of recombinant nucleoproteins in enzyme-linked immunosorbent assay for detection of virus-specific immunoglobulin a (iga) and igg antibodies in influenza virus A- or B-infected patients*, *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 3527–3531.
- 281.** J. Wang, *Electrochemical DNA biosensors*, w *Electroanalytical methods for biological materials*, New York, Basel, Marcel Dekker, Inc., 2002a, 27- 41.
- 282.** J. Wang, *Electrochemical nucleic acid biosensors*, *Analytica Chimica Acta* 2002b, 469, 63-71.
- 283.** H. Wang, S. Chen, L. Li, S. Jiang, *Improved method for the preparation of carboxylic acid and amine terminated self-assembled monolayers of alkanethiolates*. *Langmuir* 2005, *21*, 2633–2636.
- 284.** W. Wang, X. Fan, S. Xu, J.J. Davis, X. Luo, *Low fouling label-free DNA sensor based on polyethylene glycols decorated with gold nanoparticles for the detection of breast cancer biomarkers*, *Biosens. Bioelectron.* 2015, *71*, 51–56.

- 285.** Wang R.H., Li Y.B., Hydrogel based QCM aptasensor for detection of avian influenza virus, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *42*, 148–155.
- 286.** L. Wang, L. Lin, B. Ye, Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006, *42*, 625–629.
- 287.** W. Wang, P. Ren, S. Mardi, L. Hou, Ch. Tsai, K.H. Chan, P. Cheng, J. Sheng, P. Buchy, B. Sun, T. Toyoda, W. Lim, J.S. Malik Peiris, P. Zhou, V. Deubel, Design of Multiplexed Detection Assays for Identification of Avian Influenza A Virus Subtypes Pathogenic to Humans by SmartCycler Real-Time Reverse Transcription-PCR, *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 86–92.
- 288.** Wang R., Zhao J., Jiang T., Kwon Y.M., Lu H., Jiao P., Liao M., Li Y., *Selection and characterization of DNA aptamers for use in detection of avian influenza virus H5N1*, *J. Virol. Methods* **2013**, *189*, 362–369.
- 289.** Wangchareansak T., Sangma C., Ngermmeesri P., Thitithanyanont A., Lieberzeit P.A., *Self-assembled glucosamine monolayers as biomimetic receptors for detecting WGA lectin and influenza virus with a quartz crystal microbalance*, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 6471–6478.
- 290.** Weber P., Zagrabski M., Wojciechowski B., Nikodem M., Kępa K., Berezowski K.S., *Calibration of RO-based temperature sensors for a toolset for measuring thermal behavior of FPGA devices*, *Microelectron. J.* **2014**, *45*, 1753–1763.
- 291.** Webster M.S., Cooper J.S., Chow E., Hubble L.J., Sosa-Pintos A., Wieczorek L., Raguse B., *Detection of bacterial metabolites for the discrimination of bacteria utilizing gold nanoparticle chemiresistor sensors*, *Sens. Actuators, B* **2015**, *220*, 895–902.
- 292.** Wei H., Yin J., Wang E., *Bis(2,2'-bipyridine)(5,6-epoxy-5,6-dihydro-[1,10]phenanthroline) ruthenium: synthesis and electrochemical and electrochemiluminescence characterization*, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5635–5639.
- 293.** WHO. 2016. Influenza at the human-animal interface, Mskr. January 2016, Monthly Risk Assessment Summary.
- 294.** Wicklein B., del Burgo M.Á.M., Yuste M., Carregal-Romero E., Llobera A., Darder M., Aranda P., Ortín J., del Real G., Fernández-Sánchez C., Ruiz-Hitzky E., *Biomimetic architectures for the impedimetric discrimination of influenza virus phenotypes*, *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 254–262.
- 295.** Wong E.L.S., Mearns F.J., Gooding J.J., *Further development of an electrochemical DNA hybridization biosensor based on long-range electron transfer*, *Sens. Actuators, B* **2005**, *111-112*, 515–521.

- 296.** Wu M., Kempaiah R., Huang P.-J.J., Maheshwari V., Liu J. *Adsorption and desorption of DNA on graphene oxide studied by fluorescently labeled oligonucleotides*, *Langmuir* **2011**, 27, 2731–2738.
- 297.** Wu Z., Zhou Ch.-H., Chen J.-J., Xiong Ch., Chen Z., Pang D.-W., Zhang Z.-L., *Bifunctional magnetic nanobeads for sensitive detection of avian influenza A (H7N9) virus based on immunomagnetic separation and enzyme-induced metallization*, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 68, 586–592.
- 298.** Xia J., Song D., Wang Z., Zhang F., Yang M., Gui R., Xia L., Bi S., Xia Y., Li Y., Xia L., *Single electrode biosensor for simultaneous determination of interferon gamma and lysozyme*, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 68, 55–61.
- 299.** Xie Z., Pang Y.-S., Liu J., Deng X., Tang X., Sun J., Khan M.I., *A multiplex RT-PCR for detection of type A influenza virus and differentiation of avian H5, H7, and H9 hemagglutinin subtypes*, *Mol. Cell. Probes* **2006**, 20, 245–249.
- 300.** Xu G., Jiao K., Fan J., Sun W., *Electrochemical Detection of Specific Gene Related to CaMV35S Using Methylene Blue and Ethylenediamine - modified Glassy Carbon Electrode*, *Acta Chim. Slov.* **2006**, 53, 486–491.
- 301.** Yang Y., Wang Z., Yang M., Li J., Zheng F., Shen G., Yu R., *Electrical detection of deoxyribonucleic acid hybridization based on carbon-nanotubes/nano zirconium dioxide/chitosan-modified electrodes*, *Anal. Chim. Acta* **2007**, 584, 268–274.
- 302.** Yang T., Zhou N., Li Q., Guan Q., Zhang W., Jiao K., *Highly sensitive electrochemical impedance sensing of PEP gene based on integrated Au–Pt alloy nanoparticles and polytyramine*, *Colloids Surf., B* **2012**, 97, 150–154.
- 303.** Yang Z.-H., Zhuo Y., Yuan R., Chai Y.-Q., *An amplified electrochemical immunosensor based on in situ-produced 1-naphthol as electroactive substance and graphene oxide and Pt nanoparticles functionalized CeO₂ nanocomposites as signal enhancer*, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 69, 321–327.
- 304.** Yao Ch., Xiang Y., Deng K., Xia H., Fu W., *Sensitive and specific HBV genomic DNA detection using RCA-based QCM biosensor*, *Sens. Actuators, B* **2013**, 181, 382–387.
- 305.** Yu Z.-G., Zaitouna A.J., Lai R.Y., *Effect of redox label tether length and flexibility on sensor performance of displacement-based electrochemical DNA sensors*, *Anal. Chim. Acta* **2014**, 812, 176–183.
- 306.** Zajt T. *Metody woltamperometryczne i elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna*. Gdańsk : Wydawnictwo Gdańskie, **2001**.
- 307.** Zeynalova S., Guliyev F., Vatani M., Abbasov B., *Biosurveillance of avian influenza and Newcastle disease viruses in the Barda region of Azerbaijan using real time RT-PCR and hemagglutination inhibition*, *Front. Microbiol.* **2015**, 6, [DOI: 10.3389/fmicb.2015.01128](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01128).

- 308.** Zhang Y., Hu N., *Cyclic voltammetric detection of chemical DNA damage induces by styrene oxide in natural dsDNA layer-by-layer films using methylene blue as electroactive probe*, *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 35–41.
- 309.** Zhang S., Wu Z., Shen G., State R.Y., *A label-free strategy for SNP detection with high fidelity and sensitivity based on ligation-rolling circle amplification and intercalating of methylene blue*, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 3201–3207.
- 310.** Zhang X.Y., Zhou L.Y., Luo H.Q., Li N.B., *A sensitive and label-free impedimetric biosensor based on an adjunct probe*, *Anal. Chim. Acta* **2013**, *776*, 11–16.
- 311.** Zheng J., Chen Ch., Wang X., Zhang F., He P., *A sequence-specific DNA sensor for Hepatitis B virus diagnostics based on the host–guest recognition*, *Sens. Actuators, B* **2014**, *199*, 168–174.
- 312.** Zhou J., Ellis A.V., Kobus H., Voelcker N.H., *Aptamer sensor for cocaine using minor groove binder based energy transfer*, *Anal. Chim. Acta* **2012**, *719*, 76–81.
- 313.** Zhou Ch.-H., Long Y.-M., Qi B.-P., Pang D.-W., Zhang Z.-L., *A magnetic bead-based bienzymatic electrochemical immunosensor for determination of H9N2 avian influenza virus*, *Electrochem. Commun.* **2013**, *31*, 129–132.
- 314.** Zhou J., Le V., Kalia D., Nakayama S., Mikek C., Lewis E.A., Sintim H.O., *Diminazene or berenil, a classic duplex minor groove binder, binds to G-quadruplexes with low nanomolar dissociation constants and the amidine groups are also critical for G-quadruplex binding*, *Mol. BioSyst.* **2014**, *10*, 2724–2734.
- 315.** Zhu X., Ai S., Chen Q., Yin H., Xu J., *Label-free electrochemical detection of Avian Influenza Virus genotype utilizing multi-walled carbon nanotubes–cobalt phthalocyanine–PAMAM nanocomposite modified glassy carbon electrode*, *Electrochem. Commun.* **2009b**, *11*, 1543–1546.
- 316.** Zhu B., Alsager O.A., Kumar S., Hodgkiss J.M., Travas-Sejdic J., *Label-free electrochemical aptasensor for femtomolar detection of 17 β -estradiol*, *Biosens. Bioelectron.* **2015a**, *70*, 398–403.
- 317.** Zhu N., Gao H., Gu Y., Xu Q., He P., Fang Y., *PAMAM dendrimer-enhanced DNA biosensors based on electrochemical impedance spectroscopy*, *Analyst* **2009a**, *134*, 860–866.
- 318.** Zhu Q., Gao F., Yang Y., Zhang B., Wang W., Hub Z., Wang Q., *Electrochemical preparation of polyaniline capped Bi₂S₃ nanocomposite and its application in impedimetric DNA biosensor*, *Sens. Actuators, B* **2015b**, *207*, 819–826.
- 319.** Zhu M., Gong X., Hu Y., Ou W., Wan Y., *Streptavidin-biotin-based directional double Nanobody sandwich ELISA for clinical rapid and sensitive detection of influenza H5N1*, *J. Transl. Med.* **2014**, *12*, 352.

320. Zhu L., Luo L., Wang Z., *DNA electrochemical biosensor based on thionine-graphene nanocomposite*, Biosens. Bioelectron. **2012**, 35, 507–511.