

MARIUSZ TICHONIUK

**Konstrukcja i zastosowanie
elektrochemicznego biosensora DNA
do detekcji mikroflory patogennej
w żywności**

**Praca przedstawiona Radzie Wydziału Towaroznawstwa
Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu celem uzyskania
stopnia doktora nauk ekonomicznych w zakresie towaroznawstwa**

**Promotor:
Prof. dr hab. Marian Filipiak**

**Praca wykonana
w Katedrze Biochemii
i Mikrobiologii**

Poznań 2010

*Panu Profesorowi
dr hab. Marianowi Filipiakowi
za opiekę naukową
oraz cierpliwość i wyrozumiałość
składam serdeczne podziękowania*

*Wszystkim Pracownikom
Katedry Biochemii i Mikrobiologii
za pomoc i wsparcie
serdecznie dziękuję*

*Kochanej żonie
i rodzicom*

Spis treści

Wstęp	1
Część literaturowa	4
1. Zagrożenie żywności mikroflorą chorobotwórczą	4
1.1. Skala zagrożeń mikrobiologicznych żywności	6
1.2. Zatrucia pokarmowe o etiologii bakteryjnej	10
1.3. <i>Aeromonas hydrophila</i> – charakterystyka zagrożenia	14
1.4. Metody wykrywania bakterii chorobotwórczych w żywności.....	16
2. Biosensory	21
2.1. Zasada konstrukcji biosensora	22
2.2. Obecny stan rozwoju technologii biosensorowych	24
3. Wykorzystanie biosensorów DNA w badaniu żywności	28
3.1. Biosensory do wykrywania związków chemicznych oddziałujących z dsDNA	30
3.2. Biosensory do wykrywania specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych	31
3.2.1. Badanie żywności zmodyfikowanej genetycznie	33
3.2.2. Detekcja mikroflory patogennej	34
4. Elementy analizy elektrochemicznej w biodetekcji DNA	37
4.1. Techniki pomiarowe z kontrolowaną zmianą potencjału	37
4.1.1. Chronoamperometria/chronokulometria	38
4.1.2. Woltamperometria cykliczna.....	43
4.1.3. Woltamperometria fali prostokątnej	46

4.2. Elektrochemiczny układ pomiarowy	48
4.2.1. Środowisko pomiarowe	49
4.2.2. Elektroda pracująca	50
4.2.3. Elektroda odniesienia i pomocnicza.....	53
4.3. Modyfikacje złotej elektrody pracującej.....	53
4.3.1. Samoorganizujące się monowarstwy	55
4.3.2 Immobilizacja sond DNA.....	57
5. Systemy detekcji hybrydyzacji w elektrochemicznych biosensorach DNA	59
5.1. Czynniki wpływające na proces hybrydyzacji DNA.....	59
5.2. Detekcja procesu hybrydyzacji kwasów nukleinowych	61
5.2.1. Bezpośrednie metody detekcji hybrydyzacji DNA.....	63
5.2.2. Pośrednie metody detekcji hybrydyzacji DNA	64
Cel pracy	68
Część doświadczalna.....	70
1. Materiały i metody.....	70
1.1. Aparatura, sprzęt i oprogramowanie.....	70
1.2. Odczynniki	71
1.3. Procedury pomiarowe	73
1.3.1 Wyznaczanie elektrochemicznego pola powierzchni elektrody.....	74
1.3.2. Badanie elektrochemicznego efektu blokowania.....	75
1.3.3. Pomiar pojemności elektrycznej interfazy elektroda-roztwór elektrolitu.....	76
1.3.4. Wyznaczenie ilości DNA unieruchomionego na powierzchni elektrody pracującej	77
1.3.5. Ocena wyników hybrydyzacji z użyciem błękitu metylenowego	80
1.3.6. Ocena wyników hybrydyzacji z użyciem wskaźnika Hoechst 33258	81

1.4. Pozostałe procedury.....	81
1.4.1. Czyszczenie powierzchni elektrod złotych.....	81
1.4.2. Wybór i ocena sond ssDNA	82
1.4.3. Aktywacja sond ssDNA	84
1.4.4. Modyfikacja powierzchni elektrod pracujących.....	85
1.4.5. Hybrydyzacja w warstwie detekcyjnej biosensora	85
1.4.6. Izolacja i amplifikacja bakteryjnego DNA	86
2. Wyniki i dyskusja	89
2.1. Zaprojektowanie sond ssDNA specyficznych dla genu aerolizyny <i>A. hydrophila</i> ..	89
2.2. Przygotowanie elektrody pracującej i ustalenie warunków pomiarowych.....	92
2.2.1. Przygotowanie powierzchni elektrod złotych.....	92
2.2.2. Charakterystyka buforów wytypowanych do pomiarów elektrochemicznych	95
2.2.3. Sygnał elektrochemiczny wybranych wskaźników hybrydyzacji DNA	96
2.2.4. Przygotowanie sond ssDNA do immobilizacji w warstwie detekcyjnej biosensora	100
2.3. Modyfikacja powierzchni elektrody złotej – konstrukcja warstwy detekcyjnej biosensora.....	101
2.3.1. Efekt blokowania elektrochemicznego przez monowarstwy modyfikujące elektrodę	102
2.3.2. Pojemność elektryczna interfazy między powierzchnią elektrody a roztworem elektrolitu.....	105
2.3.3. Gęstość powierzchniowa sond ssDNA w warstwie detekcyjnej biosensora	112
2.4. Reakcja hybrydyzacji w warstwie detekcyjnej biosensora.....	120
2.4.1. Charakterystyka DNA zakumulowanego na powierzchni elektrody pracującej.....	121
2.4.2. Wpływ czasu reakcji na wydajność hybrydyzacji	124
2.4.3. Odpowiedź systemu detekcji hybrydyzacji na zmianę stężenia docelowego DNA.....	126

2.4.4. Odpowiedź systemu detekcji hybrydyzacji na obecność niekomplementarnych fragmentów DNA.....	132
2.5. Wykrywanie <i>Aeromonas hydrophila</i> w wodzie pitnej	136
2.5.1. Detekcja z użyciem wskaźnika błękitu metylenowego	136
2.5.2. Detekcja z użyciem wskaźnika Hoechst 33258	138
3. Podsumowanie wyników badań	143
Wnioski	148
Załączniki	149
Załącznik 1. Karta opisująca zatrucie pokarmowe wywołane przez bakterie <i>Aeromonas hydrophila</i> zawarta w wytycznych Światowej Organizacji Zdrowia „Foodborne Diseases Outbreaks. Guidelines for Investigation and Control”	149
Załącznik 2. Kompletna sekwencja genu aerolizyny <i>Aeromonas hydrophila</i> AH14 opublikowana w bazie GenBank.....	150
Lista publikacji	152
Literatura	152
Spis ilustracji	171
Spis tabel	174

Stosowane skróty i oznaczenia

A_E	– elektrochemiczne pole powierzchni elektrody złotej
A_G	– geometryczne pole powierzchni elektrody złotej
AQDS	– sól disodowa kwasu antrachinono-1,5-disulfonowego
AuE	– elektroda złota
CC	– ang. <i>Chronocoulometry</i> , chronokulometria
CPE	– ang. <i>Carbon Paste Electrode</i> , elektroda wykonana z pasty węglowej
CV	– ang. <i>Cyclic Voltammetry</i> , woltamperometria cykliczna
DAPI	– dichlorowodorek 4',6-diamidino-6-fenylindolu
DM	– chlorowodorek daunomycyny
dsDNA	– ang. <i>double-stranded DNA</i> , dwuniciowy DNA
DTT	– ditiotreitól
EBE	– ang. <i>Electrochemical Blocking Effect</i> , efekt blokowania elektrochemicznego
EDTA	– wersenian di-sodu dwu-uwodniony
EIS	– ang. <i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i> , elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna
Γ_{ibf}	– ang. <i>ion barrier factor</i> , współczynnik bariery jonów
Hoechst 33258	– tri-chlorowodorek bis-benzoimidu H 33258
MB	– błękit metylenowy
MCE	– 2-merkaptoetanol
MCH	– 6-merkaptto-1-heksanol
MCN	– 9-merkaptto-1-nonanol
n	– liczba pomiarów
ntDNA	– niekomplementarny DNA
ntOligo	– niekomplementarny oligonukleotyd
R	– współczynnik szorstkości powierzchni elektrody złotej
RuHex	– chlorek heksaaminorutenu (III)
RSD	– ang. <i>Relative Standard Deviation</i> , względne odchylenie standardowe
QCM	– ang. <i>Quartz Crystal Microbalance</i> , technika mikrowagi kryształu kwarcu
ssDNA	– ang. <i>single-stranded DNA</i> , jednociowy DNA
SWV	– ang. <i>Square-Wave Voltammetry</i> , woltamperometria fali prostokątnej
TBE	– TRIS/kwas borowy/EDTA
tDNA	– komplementarny DNA
tOligo	– komplementarny oligonukleotyd
TRIS	– tri(hydroksymetylo)aminoetan

Wstęp

Skuteczne zapewnienie bezpieczeństwa żywności wymaga efektywnej oceny zagrożeń wynikających z niewłaściwego przygotowania, przechowywania bądź dystrybucji surowców oraz gotowych produktów spożywczych [1]. Wśród zidentyfikowanych czynników największe niebezpieczeństwo stanowi zanieczyszczenie mikrobiologiczne. Niepożądane mikroorganizmy mogą przedostać się do produktu na dowolnym etapie jego przygotowania, dostosowując się do różnych warunków środowiska i umożliwiając sobie w ten sposób przetrwanie, wzrost oraz wydzielanie toksycznych związków chemicznych [2]. Wzrost zagrożenia mikrobiologicznego wiąże się również z globalizacją przemysłu spożywczego (import z krajów, w których mogą występować inne chorobotwórcze szczepy mikroorganizmów), zmianami w nawykach żywieniowych (popularność żywności niskoprzetworzonej, długotrwałe przechowywanie w warunkach chłodniczych) czy starzeniem się społeczeństw (spadek odporności immunologicznej konsumentów) [3]. Ponadto niebezpieczeństwo wywołuje także pojawianie się nowych drobnoustrojów patogennych o rosnącej istotności jako czynniki etiologiczne (określanych mianem „emerging pathogens”). Do tej grupy zaliczane są między innymi bakterie *Aeromonas hydrophila* wytwarzające szereg substancji szkodliwych dla zdrowia [4,5].

Zagrożenie mikrobiologiczne żywności ma istotne znaczenie ze względu na wysoką częstotliwość występowania, szybkość i skalę rozprzestrzeniania, a w szczególności z powodu problemów w detekcji [6,7]. Konwencjonalne metody monitorowania skażenia mikrobiologicznego wiążą się z szeregiem niedogodności. Często są one zbyt długotrwałe i skomplikowane w wykonaniu [1,8]. Wspomniane cechy nie sprzyjają wykorzystaniu tych metod w efektywnych rozwiązaniach zapewniających bezpieczeństwo zdrowotne żywności. Rodzi to potrzebę poszukiwania alternatywnych sposobów szybkiego i wiarygodnego wykrywania niepożądanych mikroorganizmów w produktach żywnościowych [6,9].

Wśród nowoczesnych rozwiązań analitycznych pojawiają się metody detekcji patogenów wykorzystujące techniki biologii molekularnej, biotechnologii oraz nanotechnologii. Jednym z intensywnie rozwijanych podejść jest próba wykrywania patogennych mikroorganizmów poprzez oznaczanie specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych [2,10]. Intensyfikacji prac nad tą metodą sprzyja dynamiczna rozbudowa elektronicznych baz bioinformatycznych zawierających między innymi duży zbiór sekwencji DNA mikroorganizmów. Nie bez znacze-

nia jest także rozwój nanoinżynierii oraz nowoczesnych materiałów, które coraz doskonalej naśladują układy biodetekcji naturalnie występujące w przyrodzie [1]. Wśród opracowywanych metod wykrywania patogenów przez identyfikację specyficznych fragmentów DNA najczęściej wymienia się techniki hybrydyzacji *in situ* z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych, techniki oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy oraz inne obiecujące rozwiązania, takie jak mikromacierze lub biosensory DNA [10].

Technologie biosensorowe są rozwijane od około 50 lat. Współczesne biosensory charakteryzują się o wiele wyższym zaawansowaniem konstrukcyjnym i różnorodnością wykonywanych zadań od zaprezentowanej w 1962 roku przez L.C. Clarka i C. Lyonsa tzw. „elektrody enzymatycznej” – uznawanej za prekursora tego typu urządzeń [11]. Biosensory wykorzystujące w warstwie detekcyjnej cząsteczki kwasów nukleinowych znalazły zastosowanie zarówno w wykrywaniu związków oddziałujących z daną biocząsteczką, jak i w detekcji specyficznych fragmentów DNA lub RNA [12]. Drugie rozwiązanie może być zastosowane między innymi do wykrywania w żywności cząsteczek DNA typowych dla genetycznie zmodyfikowanych organizmów lub wskazujących na zanieczyszczenie niepożądanymi drobnoustrojami. Wśród biosensorów przeznaczonych do wykrywania specyficznych fragmentów DNA (lub RNA) na podstawie hybrydyzacji z sondami molekularnymi szczególnie ważna jest konstrukcja warstwy detekcyjnej, która zapewniałaby wysoką wydajność oznaczenia [13]. Jednym z popularnych rozwiązań z tego zakresu jest wykorzystanie samoorganizujących się monowarstw, które umożliwiają uporządkowane i stabilne unieruchomienie sond w warstwie detekcyjnej biosensora [14]. Równie ważny dla działania urządzenia jest efektywny i wiarygodny system detekcji hybrydyzacji. Wiele korzyści przynosi wykorzystanie elektroaktywnych wskaźników, które skutecznie rozróżniają jedno- i dwuniciowe fragmenty DNA umiejscowione w warstwie detekcyjnej [12].

Celem niniejszej pracy jest skonstruowanie elektrochemicznego biosensora DNA przeznaczonego do wykrywania fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla mikroorganizmów patogennych występujących w żywności. Jako docelowy DNA został wybrany fragment genu aerolizyny – toksyny wytwarzanej przez bakterie *Aeromonas hydrophila*. Konstrukcja warstwy detekcyjnej będzie opierać się na wykorzystaniu samoorganizującej się struktury tioorganicznych cząsteczek na powierzchni elektrody złotej. Warstwę taką stanowić będą zmodyfikowane alkilotiolowym łącznikiem sondy DNA oraz merkaptoalkoholowe cząsteczki strukturotwórczego wypełniacza. System detekcji reakcji hybrydyzacji zostanie oparty na wykorzystaniu elektrochemicznych wskaźników różnicujących jedno- i dwuniciowy DNA unieruchomiony na powierzchni elektrody złotej.

Głównym celem zastosowania gotowego biosensora byłaby analiza jakościowa tj. wykrycie bakterii *A. hydrophila* w próbkach żywności. Przy zapewnieniu odpowiedniej procedury przygotowania próbek opracowany system biodetekcji umożliwiłby przeprowadzenie oznaczeń ilościowych danego patogenu.

Część literaturowa

1. Zagrożenie żywności mikroflorą chorobotwórczą

Badanie żywności pod względem obecności mikroorganizmów patogennych jest jednym z podstawowych narzędzi kontroli bezpieczeństwa produktów spożywczych [15,16]. Żywność stanowi doskonałe środowisko rozprzestrzeniania różnorodnych mikroorganizmów patogennych (wliczając w to bakterie, wirusy i inne drobnoustroje) [5]. Mimo ciągle ulepszanych technologii wytwarzania i dystrybucji produktów spożywczych, które zmierzają do obniżenia mikrobiologicznego zagrożenia zdrowia konsumentów, dobrze znane od wielu lat patogeny zanieczyszczające żywność, takie jak *Salmonella* spp., nadal stanowią poważny problem [6]. Jest to związane z wieloma czynnikami, wśród których najczęściej wymieniane są dwie grupy przyczyn. Po pierwsze, istotne zagrożenie mikrobiologiczne wynika ze zmian modeli żywieniowych konsumenta – jemy coraz bardziej różnorodne potrawy, najczęściej w jak najmniejszym stopniu przetworzone oraz sposobu przygotowania żywności (intensyfikacja produkcji, ograniczone stosowanie konserwantów) [2,6,7]. Drugim istotnym czynnikiem jest nabywanie przez mikroorganizmy nowych cech zwiększających ich chorobotwórczość i/lub odporność na działania ograniczające ich rozwój [3,6,16]. Dodatkowo, poważne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności stanowi grupa tzw. nowych patogenów o wzrastającej istotności (ang. *emerging pathogens*), które do tej pory nie były traktowane jako czynniki mogące wywoływać zatrucia pokarmowe. Wymieniane są tu między innymi bakterie *Listeria monocytogenes* oraz *Aeromonas hydrophila* [4,5,17], które potrafią doskonale rozwijać się w produktach przechowywanych w warunkach chłodniczych.

W trosce o zdrowie swoich obywateli organy ustawodawcze Polski i Unii Europejskiej stworzyły szereg aktów prawnych regulujących kwestie dotyczące bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności. Podstawą kontroli stanu produktów spożywczych w naszym kraju jest ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 roku o bezpieczeństwie żywności i żywienia (Dz.U. 2006 nr 171 poz. 1225) wraz z późniejszymi zmianami [18]. Jest ona w pełni spójna z postanowieniami rozporządzenia (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 roku ustanawiającego ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołującego Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) oraz ustanawiającego

procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności (Dz.U. WE L 31 z 1.02.2002; Dz. U. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 15, t. 6, str. 463) [19]. Na podstawie ustawy z dnia 22 stycznia 2000 roku o ogólnym bezpieczeństwie produktów (Dz. U. 2000 nr 15, poz. 179) [20] utworzono w Polsce Krajowy System Informowania o Niebezpiecznych Produktach Żywnościowych. Od 2003 roku jest on częścią składową Europejskiego Systemu Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznych Produktach Żywnościowych i Środkach Żywnienia Zwierząt (RASFF) – podlegającego wspomnianemu wcześniej Europejskiemu Urzędowi ds. Bezpieczeństwa Żywności. Obecnie Polski Punkt Koordynacyjny EFSA znajduje się w Głównym Inspektoracie Sanitarnym. Dodatkowo w Polsce obowiązują postanowienia rozporządzenia Komisji (WE) nr 2073/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 15 listopada 2005 roku w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych (Dz.U. L 338 z 22.12.2005, str. 1) [21] oraz rozporządzenie Komisji (WE) nr 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 roku zmieniające rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 (Dz.U. L 322 z 7.12.2007, str. 12) [22]. W celu realizacji wymagań wszystkich wymienionych aktów prawnych odpowiednie jednostki kontrolne nieustannie przeprowadzają badania stanu mikrobiologicznego dostępnych na rynku surowców i produktów spożywczych.

Według rozporządzenia (WE) nr 2073/2005 bezpieczeństwo żywności powinno być zapewnione głównie poprzez podejście zapobiegawcze, na przykład wdrażanie rozwiązań z zakresu Dobrej Praktyki Higienicznej (GHP) oraz procedur opartych na zasadach Systemu Analizy Zagrożeń i Krytycznych Punktów Kontroli (HACCP). W ostatnich latach opracowano szereg podobnych rozwiązań systemowych zmierzających do zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego żywności. Wśród najpowszechniejszych podejść można wymienić:

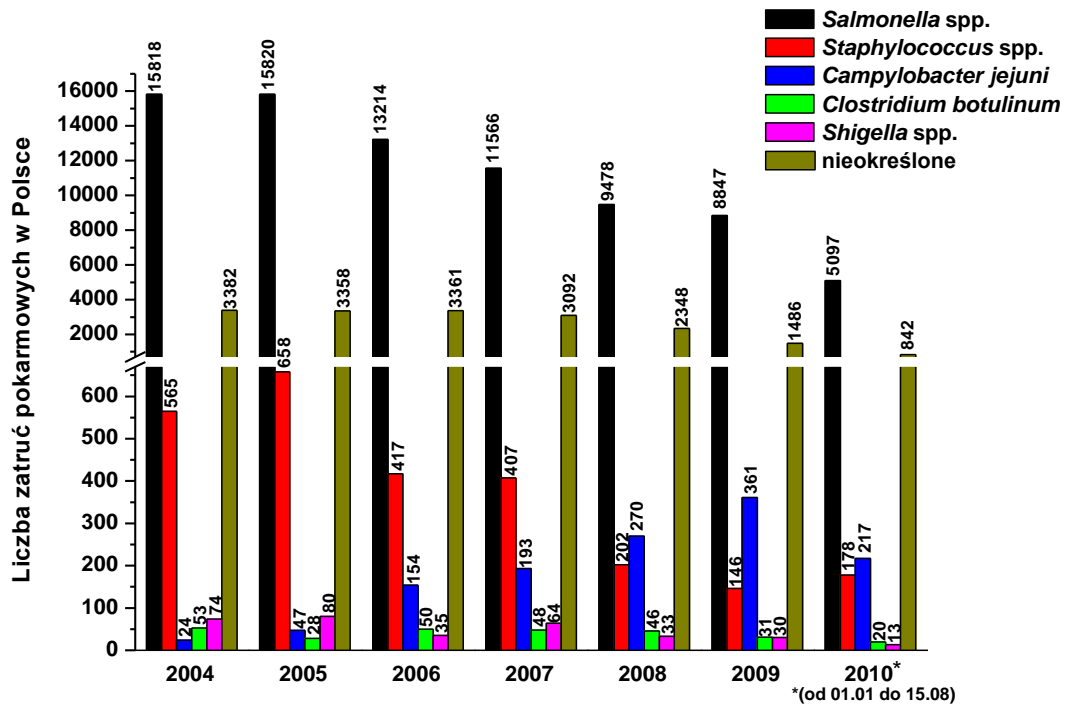
- system zarządzania bezpieczeństwem żywności oparty na normie ISO 22000,
- standardy zapewnienia bezpieczeństwa żywności – BRC, IFS (opracowane na potrzeby zrzeczeń firm obrotu i handlu żywnością),
- standard zapewnienia bezpieczeństwa żywności dla pierwotnej produkcji rolnej GlobalGap.

Wymienione rozwiązania systemowe wymagają najczęściej szybkiej i jednoznacznej detekcji zagrożeń mikrobiologicznych w odniesieniu do surowców, na wszystkich etapach procesu wytwarzania artykułów żywnościowych i w samym finalnym produkcie. Z racji ograniczeń konwencjonalnych metod identyfikacji patogenów w żywności przyczyniają się one do wyraźnego wzrostu zainteresowania alternatywnymi narzędziami kontroli tego zagrożenia [1,2,9].

1.1. Skala zagrożeń mikrobiologicznych żywności

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) definiuje zatrucia pokarmowe jako schorzenia o charakterze zakaźnym lub toksycznym wywołane przez czynniki, które przedostają się do organizmu wraz ze spożywaną żywnością [5]. Ogólna liczba przypadków zatruc pokarmowych występujących rocznie na świecie jest bardzo trudna do ustalenia z wielu przyczyn – między innymi braku ujednoczonych definicji zakażeń w poszczególnych zestawieniach statystycznych, nie zgłaszania przypadków zatruc lub nie wiązania ich ze spożyciem skażonej żywności [23]. Na podstawie badań przeprowadzonych przez WHO szacuje się, że w 2008 roku z powodu chorób układu pokarmowego wywołanych zatruciem zmarło około 1,5 miliona osób [24]. Dominująca większość wspomnianych przypadków wiązała się ze spożyciem zanieczyszczonej mikrobiologicznie żywności. Zagrożenie to dotyczy nie tylko słabo rozwiniętych regionów naszego globu. W krajach uprzemysłowionych procentowy udział obywateli cierpiących na zatrucia pokarmowe sięga do 30 % ogółu populacji w ujęciu rocznym [1]. Przykładowo, Centra Zwalczenia i Zapobiegania Chorób (CDC) funkcjonujące w Stanach Zjednoczonych ustaliły, że w samym 2007 roku stwierdzono na terenie USA 21244 przypadków zatruc pokarmowych, z czego 18 doprowadziło do śmierci [25]. Wśród przyczyn skażenia żywności wymieniano chorobotwórcze wirusy (38% przypadków), bakterie (35%) oraz pasożyty układu pokarmowego (poniżej 1%). Oprócz zatruc wywołanych skażeniem chemicznym (1%) i wieloma różnymi połączonymi czynnikami (3%) spora część przypadków pozostała niewyjaśniona względem wywołujących je przyczyn (24%).

W Polsce informacje dotyczące zachorowań na choroby zakaźne, zakażenia i zatrucia są obligatoryjnie przesyłane przez stacje sanitarno-epidemiologiczne do Państwowej Inspekcji Sanitarnej (PIS), a następnie przekazywane do Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny (NIZP-PZH). Funkcjonujący w ramach danej jednostki Zakład Epidemiologii wprowadza uzyskane w ten sposób dane do zasobów systemu EPIMELD. Na podstawie informacji zgromadzonych w wyżej wymienionym systemie przygotowane zostało zestawienie (rys. 1) obrazujące skalę zatruc pokarmowych w Polsce wywołanych przez bakterie chorobotwórcze najpowszechniej występujące w żywności w naszym kraju.



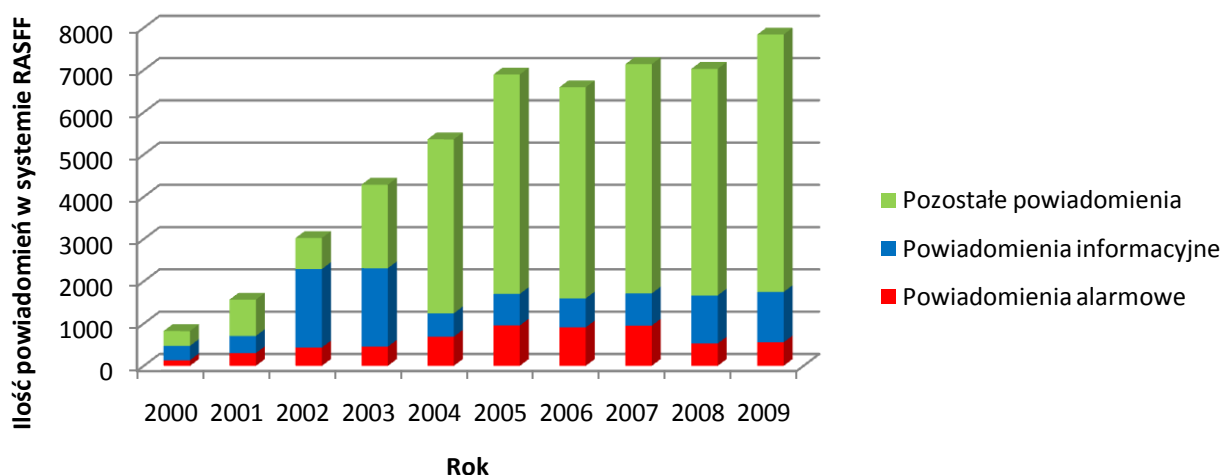
Źródło: Opracowanie własne na podstawie danych z NIZP-PZH [26]

Rysunek 1. Dane NIZP-PZH przedstawiające ilość zatruc pokarmowych wywołanych skażeniem bakteryjnym żywności w Polsce w latach 2004-2010.

Mimo iż w ostatnich latach obserwuje się w Polsce malejącą ilość odnotowanych zatruc pokarmowych wywołanych przez bakterie chorobotwórcze, to problem związany z mikrobiologicznym zagrożeniem bezpieczeństwa żywności wciąż pozostaje poważny (rys. 1). Zatrucia bakteriami z rodzaju *Salmonella* spp. – osiągające obecnie poziom około 9 tysięcy przypadków rocznie – nadal stanowią istotne zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Niepokojąca jest także utrzymująca się na stosunkowo wysokim poziomie ilość zakażeń wywołanych bakteriami z rodzaju *Staphylococcus* spp. oraz stale rosnąca liczba przypadków zatruc patogenami z gatunku *Campylobacter jejuni*. Większość analiz związanych z ustaleniem czynnika wywołującego zatrucie pokarmowe wykonywana jest metodami konwencjonalnymi, które najczęściej wymagają czasu i zaangażowania wykwalifikowanego personelu. W związku z utrudnieniami w identyfikacji bakterii patogennych niepokojąca jest także duża liczba przypadków zatruc, które pozostają bez wyjaśnienia przyczyny zachorowania (rys. 1). Dodatkowo z roku na rok odnotowuje się w Polsce bardzo dużą liczbę

wirusowych zakażeń jelitowych wywołanych między innymi przez rotawirusy oraz norowirusy – w roku 2009 ogółem 32660 przypadków [26].

Zanieczyszczenie mikroflorą chorobotwórczą żywności, która wprowadzana jest na rynek Unii Europejskiej, można ocenić posługując się danymi uzyskanymi z systemu wczesnego ostrzegania o niebezpiecznych produktach żywnościowych i środkach żywienia zwierząt (RASFF). Pomimo malejącej w ostatnich latach liczby powiadomień alarmowych, ogólna liczba zgłoszeń odnotowywanych od początku bieżącego dziesięciolecia w systemie RASFF stale wzrasta (rys. 2). Niepokojąca pozostaje także zwiększająca się ilość powiadomień informacyjnych, najczęściej dotyczących produktów zbadanych i zatrzymanych na granicy Unii Europejskiej. Jest to szczególnie istotne z punktu widzenia bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności. Przykładowo w 2007 roku wśród 81 tego typu powiadomień, aż 20 wiązało się ze skażeniem mikroorganizmami patogennymi, 19 – obecnością niezidentyfikowanej mikroflory, a 7 – zanieczyszczeniem mikrobiologicznym innego rodzaju [27].

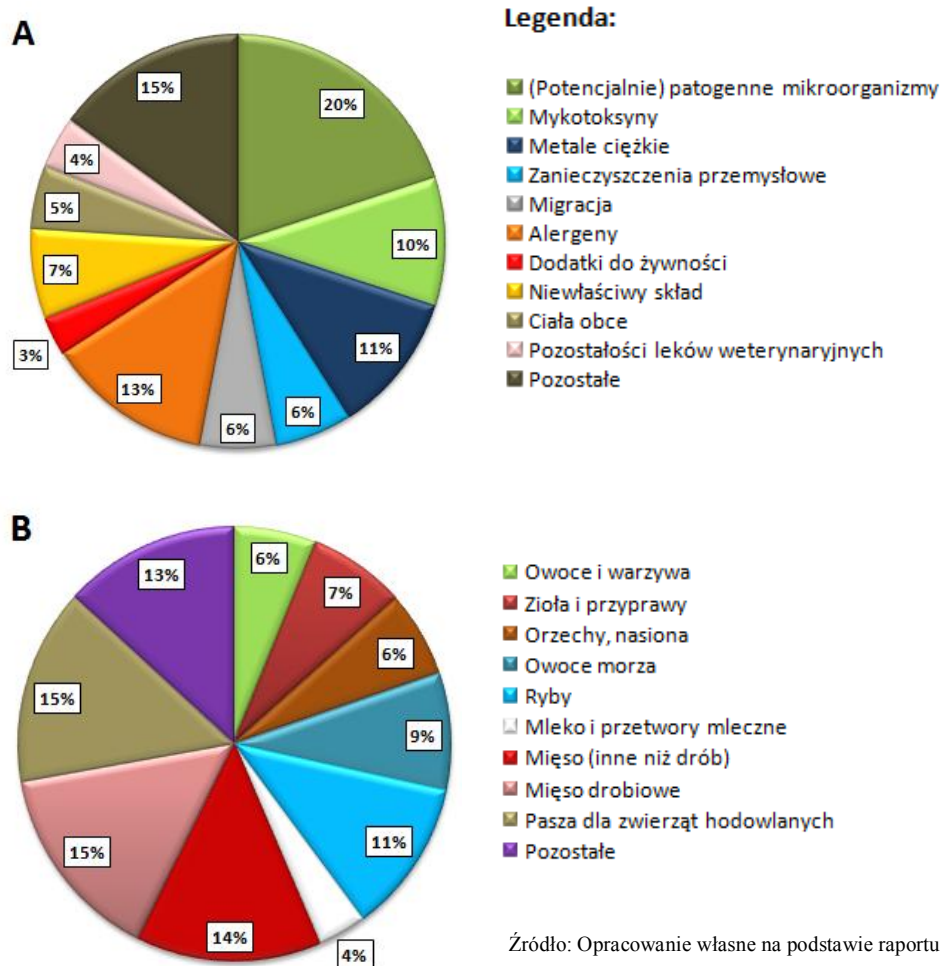


Źródło: Opracowanie własne na podstawie raportów RASFF z lat 2007-2009 [27-29]

Rysunek 2. Ilość przypadków zagrożenia bezpieczeństwa żywności odnotowanych w systemie RASFF w latach 2000-2009.

Analizując dane zawarte w raporcie RASFF i dotyczące 2009 roku można zauważyć, że jedną z najczęstszych przyczyn powiadomień alarmowych odnotowanych w danym systemie było skażenie żywności przez potencjalnie patogeniczne mikroorganizmy – 112 przy-

padków na 565 zgłoszonych [29]. Co piąty produkt rozpoznany jako niebezpieczny wiązał się z wyżej wymienionym zagrożeniem (rys. 3A). Z kolei aż 10% powiadomień alarmowych dotyczyło znalezienia w badanej żywności mykotoksyn w ilości zagrażającej zdrowiu konsumenta (59 przypadków).



Rysunek 3. Struktura powiadomień alarmowych odnotowanych w systemie RASFF w 2009 roku uporządkowana pod względem rodzaju zidentyfikowanego zagrożenia (A); podział powiadomień dotyczących potencjalnie patogennych mikroorganizmów na poszczególne grupy produktów, których dotyczyły (B).

Na podstawie zebranych w systemie RASFF danych można uznać, że prawie co trzecie zgłoszenie alarmowe łączyło się ze stwierdzeniem niebezpieczeństwa ze strony produktów zanieczyszczonych przez niepożądane mikroorganizmy chorobotwórcze. Wśród najczęściej wymienianych kategorii produktów żywnościowych skażonych patogennymi mikroorganizmami wymienione zostało mięso drobiowe (15% powiadomień) oraz mięso

inne niż drób (14%) (rys. 3B). Stosunkowo często dane zagrożenie wiązało się z zanieczyszczonymi mikrobiologicznie rybami (11% zgłoszeń) i owocami morza (9%). Dodając do wymienionych kategorii produktów zgłoszenia dotyczące mleka i przetworów mlecznych, można zauważyć, że ponad 50% powiadomień w systemie RASFF w 2009 roku dotyczących obecności potencjalnie patogennych mikroorganizmów w żywności odnosiło się do produktów, które powinny być przechowywane w warunkach chłodniczych lub w stanie zamrożonym.

Dane opublikowane przez Światową Organizację Zdrowia oraz krajowe instytucje zajmujące się monitorowaniem sytuacji epidemiologicznej w poszczególnych państwach (np. CDC, NIZP-PZH) wskazują na bardzo istotną liczbę zatruc pokarmowych wywoływanych co roku przez mikroorganizmy patogenne występujące w żywności. Z kolei informacje gromadzone przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności i zawarte w raportach systemu RASFF potwierdzają znaczący rozmiar zagrożenia mikrobiologicznego dotyczącego produktów żywnościowych dostępnych na rynku Unii Europejskiej. Według opinii epidemiologów rzeczywista liczba zatruc, za które odpowiedzialne są mikroorganizmy, w każdym roku dotyczy około 30% światowej populacji ludności [3].

1.2. Zatrucia pokarmowe o etiologii bakteryjnej

Zgodnie z nomenklaturą Światowej Organizacji Zdrowia mianem zakażeń i zatruc pokarmowych (ang. *foodborne diseases*) określa się zespół chorób o charakterze zakaźnym, inwazyjnym lub toksycznym szerzących się za pośrednictwem żywności [5]. Wśród objawów tych schorzeń najczęściej obserwowane są różnego rodzaju niedogodności żołądkowo-jelitowe: nudności, wymioty, bóle brzucha lub biegunka [3]. Mogą wystąpić też inne zaburzenia związane z gorączką lub obniżeniem ciepłoty ciała, ogólnym osłabieniem organizmu lub zaburzeniem krążenia [30,31]. Porównując ilość zachorowań hospitalizowanych i śmiertelnych wywołanych przez różne czynniki patogenne można zauważyć, że największe zagrożenie dla zdrowia i życia konsumentów stanowią chorobotwórcze bakterie [3].

W zależności od rozpoznanego czynnika etiologicznego bakteryjne zatrucia pokarmowe można podzielić na intoksykacje oraz infekcje. Intoksykacje są wywoływane przez toksyny,

które działają niezależnie od obecności samego drobnoustroju patogenicznego. Typowymi intoksykacjami są zatrucia jadem kielbasianym (wytwarzany przez bakterie *Clostridium botulinum*) i enterotoksyną gronkowcową (wydzielana przez *Staphylococcus* spp.) [30,31]. Infekcje są wynikiem wtargnięcia do organizmu gospodarza żywych komórek bakterii i ich dalszego rozwoju w tym organizmie [3]. W przypadku gdy zakażające mikroorganizmy wytwarzają toksyny, mamy do czynienia z toksykoinfekcją. Przykładem zatrucia typu zakaźnego są zatrucia wywołane przez pałeczki *Salmonella* i inne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* [30].

Toksyny bakteryjne dzielą się na dwie grupy w zależności od tego czy stanowią one składnik komórek drobnoustrojów, czy też są wydzielane do środowiska – odpowiednio: endo- i egzotoksyny. W drugiej grupie można wyróżnić poszczególne rodzaje substancji, które charakteryzują się podobnym miejscem swojego działania. Są to między innymi toksyny uszkodzające błony, działające wewnątrzkomórkowo lub też wywołujące nadmierną odpowiedź immunologiczną [3]. Toksyny mogą być jedyną przyczyną objawów chorobowych lub należeć do szerokiego wachlarza czynników patogenności danej bakterii [31].

Czas mijający od spożycia zakażonej żywności do wystąpienia objawów zatrucia pokarmowego zależy od czynnika etiologicznego oraz indywidualnej podatności organizmu konsumenta na zatrucie – wynosi on od kilku do kilkunastu godzin [23,30]. Patogenne bakterie gramododatnie są zdolne do wytwarzania egzotoksyn, których większość ulega inaktywacji poprzez działanie temperatury powyżej 60°C, kwasów i enzymów trawiennych. Wyjątkiem od tej reguły jest toksyna botulinowa oraz enterotoksyna gronkowcowa. Obie substancje mogą być szkodliwe także w formie doustnej i charakteryzują się odpornością na działanie wyższych temperatur. Ogólnie egzotoksyny wykazują silną toksyczność, a ich działanie ujawnia się dopiero po pewnym czasie, który może wynieść od kilkunastu do kilkudziesięciu godzin. Porównując egzo- i endotoksyny, te drugie wykazują się mniejszą toksycznością. Są one wytwarzane głównie przez bakterie gramujemne. Endotoksyny wytrzymują ogrzewanie w temperaturze 80 – 120°C przez godzinę. Większość z nich jest również odporna na działanie enzymów proteolitycznych. Chorobotwórczość tych toksyn wiąże się głównie z wywoływaniem u zakażonego pacjenta gorączki.

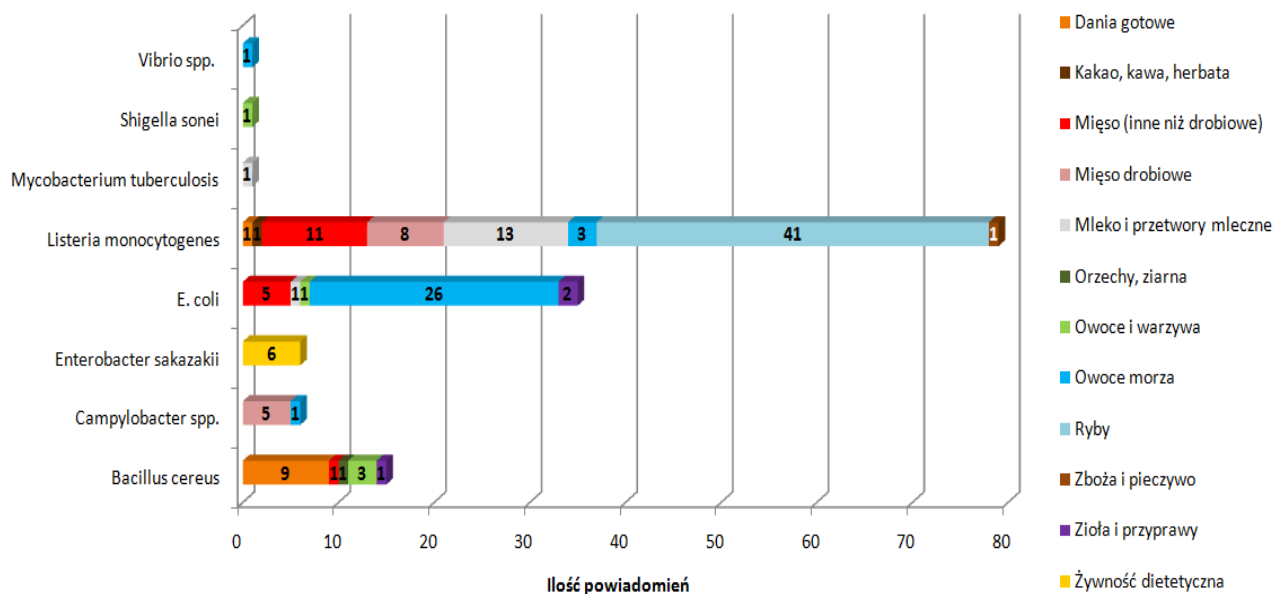
Oprócz toksyczności, o chorobotwórczości poszczególnych drobnoustrojów bakteryjnych decydują także inne cechy, takie jak zakaźność oraz inwazyjność. Właściwości mikroorganizmów – które umożliwiają im wywołanie choroby – są ogólnie określane mianem czynników patogenności (wirulencji) [31]. Wśród wspomnianych cech wymienia się:

umiejętność łączenia się drobnoustrojów z komórkami gospodarza, unikanie mechanizmów obronnych lub zdolność wywoływania objawów chorobowych [3]. Stopień wirulencji poszczególnych bakterii uzależniony jest także od poziomu inwazyjności danego patogenu, który opisuje jego możliwości do zainfekowania napotkanego gospodarza i wiązania z komórkami docelowymi [31]. Zadanie to ułatwiają między innymi elementy budowy komórek drobnoustrojów określane mianem struktur powierzchniowych – rzęski, fimbrie oraz adhezyny.

Wśród najpopularniejszych czynników etiologicznych odpowiedzialnych za większość bakteryjnych zatruc pokarmowych wymienia się w literaturze następujące mikroorganizmy: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* oraz *Clostridium botulinum* [1,3,5,6,16,31,32]. Oprócz przedstawionych powyżej drobnoustrojów niebezpieczne są także oportunistyczne patogeny o rosnącej istotności (ang. *emerging pathogens*), które mogą być przenoszone za pośrednictwem żywności. Wzrost ich znaczenia jako czynników wywołujących zatrucia pokarmowe wiąże się najczęściej ze zmianami przyzwyczajzeń żywieniowych oraz rozwojem technik diagnostycznych mogących je zidentyfikować. Dodatkowo istotne są także zmienność genetyczna tych mikroorganizmów oraz możliwość nabywania genów kodujących czynniki patogenności [23]. Do grupy drobnoustrojów chorobotwórczych o rosnącym znaczeniu zalicza się między innymi: *Enterobacter sakazakii*, *Aeromonas hydrophila*, *Legionella* spp., *Mycobacterium avium* oraz *Helicobacter pylori* [3,5,17,23,31,33].

Literatura podaje szczegółowe opisy poszczególnych bakterii patogennych występujących w żywności, zarówno tych uznawanych za niebezpieczne od wielu lat jak i tych, których znaczenie wzrosło w ostatnim czasie [3,4,6,16,17,23,31,33-35]. Według danych epidemiologicznych gromadzonych przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Polsce najczęstszą przyczyną bakteryjnych zatruc pokarmowych jest skażenie żywności przez pałeczki *Salmonella* spp. [26]. Na dalszych miejscach pod względem częstotliwości występowania plasują się choroby wywołane przez *Staphylococcus* spp. oraz *Campylobacter jejuni* (rys. 1). Nieco mniejsza ilość przypadków – około 30 zachorowań rocznie – dotyczy zatruc pokarmowych wywołanych przez bakterie *Clostridium botulinum* lub *Shigella* spp. Dane gromadzone przez system RASFF w 2009 roku potwierdzają dominującą rolę pałeczek *Salmonella* spp. jako najczęściej występującej bakterii w mikrobiologicznie skażonej żywności [29]. Na 335 powiadomień dotyczących tego drobnoustroju najwięcej wiązało się z różnego

rodzaju środkami żywienia zwierząt (28%), mięsem drobiowym (20%), mięsem innym niż drobiowe (15%) oraz ziołami i przyprawami (10%). Bardzo duża liczba powiadomień (79 przypadków w 2009 roku) dotyczyła także skażenia żywności przez pałeczki *Listeria monocytogenes* – z czego ponad połowa odnosiła się do zanieczyszczonych mikrobiologicznie ryb (rys. 4). Obecność *Escherichia coli* odnotowano w 35 produktach, z czego większość powiadomień odnosiła się do owoców morza. Wśród pozostałych, znaczących czynników zanieczyszczających żywność można wymienić także bakterie *Bacillus cereus* (głównie odnotowane w daniach gotowych). Interesujące jest również spostrzeżenie, iż przypadki skażenia żywności przez *Enterobacter sakazakii* dotyczyły wyłącznie żywności dietetycznej (6 powiadomień). Pałeczki *Campylobacter* spp. zanieczyszczały z kolei głównie mięso drobiowe (5 powiadomień). W systemie RASFF w 2009 roku odnotowano także sporadyczne przypadki skażenia żywności przez bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella sonnei* oraz *Vibrio* spp.



Źródło: Opracowanie własne na podstawie raportu RASFF 2009 [29]

Rysunek 4. Rodzaje bakteriologicznych zagrożeń (potencjalne patogeny bez *Salmonella* spp.) odnotowanych w systemie RASFF w 2009 roku.

1.3. *Aeromonas hydrophila* – charakterystyka zagrożenia

Rodzaj *Aeromonas* obejmuje gramujemne pałeczki, które są psychrofilne, katalazo-dodatnie, oksydazo-dodatnie, nieprzetrwalnikujące oraz w przypadku większości gatunków wyposażone w aparat ruchu [32,36]. Bakterie te charakteryzują się ponadto chemoorganicznymi wymaganiami żywieniowymi. Posiadają one metabolizm funkcjonujący zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych [23,37]. W ostatnim czasie badania DNA tych mikroorganizmów doprowadziły do wyodrębnienia *Aeromonas* spp. z rodziny *Vibrionaceae* i przeniesienia do nowoutworzonej jednostki systematycznej – rodziny *Aeromonadaceae*. Według zmienionego podziału taksonomicznego rodzaj *Aeromonas* składa się obecnie z 17 oddzielnych grup hybrydizacyjnych oraz 14 fenotypowych gatunków, wśród których wymienia się także wybrany do badań *A. hydrophila* [38]. Charakterystyka tego oportunistycznego patogenu oraz opis jego chorobotwórczości zostały skrótowo przedstawione w karcie zawartej w poradniku WHO dotyczącym chorób wywołanych zanieczyszczoną żywnością – zamieszczonej w załączniku 1 [5].

Bakterie *A. hydrophila* naturalnie zasiedlają czyste i zanieczyszczone wody powierzchniowe oraz osady dno. Łatwo namnażają się w ściekach, gdzie ich liczebność może sięgać 10^5 jtk/ml [39]. Powszechność występowania i duża zdolność adaptacji do zmiennych warunków otoczenia sprawiają, że ten mikroorganizm potrafi zanieczyszczać wiele różnorodnych produktów spożywczych [4,40]. Drobnoustrój ten był izolowany między innymi z wody pitnej, warzyw, ryb, owoców morza, drobiu oraz mięsa innego niż drobiowe [23,41]. Zdolność rozwoju zarówno w środowisku tlenowym, jak i beztlenowym pozwala bakterii skolonizować produkty pakowane w modyfikowanej atmosferze [42]. Optymalną temperaturą wzrostu *A. hydrophila* jest około 30°C, ale wiele szczepów potrafi rozwijać się w warunkach chłodniczych [5]. Populacja tych drobnoustrójów, obecnych w różnego rodzaju produktach żywnościowych może wzrosnąć od dziesięciu do tysiąca razy w ciągu 7 – 10 dni przechowywania w temperaturze 5°C [42]. Jest to szczególnie niebezpieczne, gdyż rozwój tych mikroorganizmów, przykładowo w rybach słodkowodnych przechowywanych w lodzie, nie powoduje zmian cech organoleptycznych danego produktu – mimo bardzo dużego skażenia drobnoustrójem [43].

Obecnie *A. hydrophila* jest uznany za patogen o rosnącym znaczeniu, który może wywołać zatrucie pokarmowe poprzez spożycie zanieczyszczonej nim żywności (załącznik 1) [5,17]. Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (USEPA, ang. *United States Environmental Protection Agency*) umieściła ten mikroorganizm na liście mikroorganizmów

potencjalnie chorobotwórczych, które skażają wodę – ang. *Contaminated Candidate List* (CCL) [44]. Ponadto drobnoustroje z gatunku *A. hydrophila* są uznawane za oportunistyczne patogeny dla wielu, zarówno stało- jak i zmiennocieplnych, zwierząt [37,45]. Głównymi schorzeniami, które wywołują te bakterie są różnego rodzaju zatrucia pokarmowe. Mogą one charakteryzować się łagodnymi objawami samoistnie ustępującymi po kilku dniach lub przybrać postać zatrucia zbliżonego w przebiegu do czerwonki kojarzonej z bakteriami *Shigella* spp. [40,46]. Bakterie *A. hydrophila* mogą być także przyczyną innych schorzeń występujących poza układem pokarmowym – bakteriemii, posocznicy i infekcji ran (także infekcji po zabiegach medycznych) [23]. Mikroorganizm jest szczególnie niebezpieczny w przypadku zatruc pokarmowych zdiagnozowanych u małych dzieci, osób w podeszłym wieku i o osłabionym układzie immunologicznym [33]. Odporność na wiele antybiotyków, jaką stwierdzono dla licznych szczepów *A. hydrophila*, zwiększa problem leczenia tego typu zakażeń [41].

Infekcje wywołane przez *A. hydrophila* stanowią zagrożenie dla zdrowia ze względu na zdolność tego drobnoustroju do wytwarzania szeregu toksyn i innych substancji ułatwiających kolonizowanie organizmu gospodarza. Wśród czynników wirulencji tej bakterii wymienia się między innymi różne egzo- i endotoksyny, cytotoksyny, inwazyjne, siderofory, adhezyny oraz struktury tworzące tak zwaną warstwę S [47]. Biorąc pod uwagę rolę wyżej wymienionych czynników w wywoływaniu zatruc pokarmowych, szczególne znaczenie mają hemolizyny wydzielane pozakomórkowo. Do grona tych związków zaliczana jest wytwarzana przez *A. hydrophila* aerolizyna. Posiada ona właściwości enterotoksyczne, cytotoksyczne oraz hemolityczne [48,49].

Poszczególne gatunki bakterii z rodzaju *Aeromonas* charakteryzują się zróżnicowanymi cechami wzrostu (biochemicznymi i fizjologicznymi) na podłożach mikrobiologicznych. Utrudnia to wybór uniwersalnych pożywek, które umożliwiłyby oznaczenie *A. hydrophila* wyizolowanych z żywności [4]. Najczęściej pożądaną selektywność uzyskuje się dzięki podłożom wzbogaconym w ampicylinę i/lub środki inhibujące stosowane do hodowli bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* (np. sole żółciowe, zieleń brylantowa) [50]. Uzyskane kultury bakteryjne są następnie badane metodami biochemicznymi lub komercyjnie dostępnymi zestawami do identyfikacji mikroorganizmów. Metoda ta jest jednak często zawodna. Zestawy do biochemicznej identyfikacji bakterii gramujemnych (na przykład API 20E, Vitek) mogą dawać nieprawidłowe wyniki i mylić bakterie *Aeromonas* spp. z *Vibrio* spp. [51]. Pomijając wspomniane utrudnienia, konwencjonalne metody detekcji *A. hydrophila* są zbyt złożone i czasochłonne [4]. Wśród proponowanych alternatywnych sposobów identyfikacji

tego mikroorganizmu w próbkach środowiskowych i w żywności sprawdzone zostały techniki oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) oraz wykorzystujące immunodetekcję białek błony zewnętrznej (OMP). Standardowe procedury stosujące oba podejścia były porównane z metodami konwencjonalnymi w przypadku wykrywania *Aeromonas* spp. w próbkach mięsa drobiowego i mleka [52]. Między wynikami uzyskanymi w sposób tradycyjny i techniką PCR zaobserwowano dobrą korelację. Oba rozwiązania umożliwiły wykrycie pojedynczej komórki chorobotwórczej bakterii w 1 ml/g badanego produktu żywnościowego. Z kolei detekcja immunologiczna nie dawała pozytywnych rezultatów w próbkach zawierających komórki *Aeromonas* spp. w ilości nie przekraczającej 10^3 jtk na 1 ml/g produktu.

Techniki związane z analizą DNA wydają się być obiecującym rozwiązaniem wśród rozwijanych metod detekcji bakterii *A. hydrophila* [51]. Większość z nich do tej pory skupiała się na identyfikacji specyficznych sekwencji genu 16S rRNA [45,52,53] lub genów kodujących toksyny – np. aerolizynę [52,54] lub hemolizynę [55]. Technika PCR była wykorzystana przykładowo do wykrywania *A. hydrophila* w przechowywanych w lodzie rybach słodkowodnych [43], próbkach żywności sprzedawanej w sieciach handlowych [56] oraz w surowym mleku [54]. W celu uproszczenia detekcji fragmentów DNA specyficznych dla danego patogenu produkty reakcji PCR oznaczano przy pomocy piezoelektrycznego biosensora DNA [57]. Jednak procedura przygotowania tego urządzenia była zbyt długa i skomplikowana.

1.4. Metody wykrywania bakterii chorobotwórczych w żywności

Detekcja mikroorganizmów chorobotwórczych występujących w produktach żywnościowych przeprowadzana jest z wykorzystaniem metod, które możemy podzielić na kilka grup w zależności od właściwości drobnoustrojów ocenianych podczas ich identyfikacji [9]. Metody fenotypowe opierają się na analizie cech zewnętrznych badanych mikroorganizmów przy użyciu mikroskopu. Jednak oceniając wyłącznie podobieństwo komórek między różnymi filogenetycznie rodzinami nie można w sposób jednoznaczny zidentyfikować poszczególnych drobnoustrojów [8]. Metody biochemiczne wykorzystują z kolei ocenę produktów szlaków metabolicznych charakterystycznych dla danych mikroorganizmów. Analiza metabolitów poszczególnych bakterii pozwala na ustalenie z dużym prawdopodobieństwem ich przynależności taksonomicznej [35]. Bardziej dokładną identyfikację drobnoustrojów patogennych

obecnych w żywności można przeprowadzić stosując metody serologiczne oparte na użyciu przeciwciał specyficznych dla antygenów danego mikroorganizmu. Testy immunochemiczne są także często wykorzystywane do wykrywania toksyn wytwarzanych przez poszczególnych przedstawicieli chorobotwórczej mikroflory [58]. Najbardziej precyzyjne metody identyfikacji bakterii oparte są na badaniu materiału genetycznego drobnoustrojów przy pomocy technik biologii molekularnej. Metody genetyczne pozwalają na określenie przynależności gatunkowej danego mikroorganizmu – często w połączeniu z ustaleniem szczepu [8].

Opracowywane przez dekady konwencjonalne metody detekcji mikroorganizmów funkcjonują obecnie jako standardowe procedury oznaczania mikroflory chorobotwórczej w próbkach żywności [59]. Mimo pewnych ograniczeń nadal zapewniają one oznaczenia o wysokiej specyficzności i czułości [1,60]. Identyfikacji bakterii dokonuje się oceniając cechy morfologiczne i biochemiczne badanych mikroorganizmów. Oznaczenie zazwyczaj składa się z kilku etapów – przednamnażania, namnażania selektywnego i detekcji poszczególnych drobnoustrojów. Pierwszy etap polega na posiewie wymazu z próbki żywności na podłoże nieselektywne w celu zwielokrotnienia liczby mikroorganizmów (szczególnie istotne w przypadku wysoce przetworzonych produktów żywnościowych). Następnie uzyskana mieszanina przesiewana jest na podłoże selektywne, które umożliwia namnożenie i wyizolowanie badanego drobnoustroju jednocześnie eliminując pozostałe mikroorganizmy. Ostatecznie przeprowadza się identyfikację poszukiwanej bakterii przy pomocy testów biochemicznych i/lub serologicznych [58,61,62]. Główną wadą konwencjonalnych metod detekcji mikroorganizmów patogennych w żywności jest ich praco- i czasochłonność – uzyskanie wstępnych wyników zajmuje zazwyczaj 2 – 3 dni, a pełne potwierdzenie wymaga często 7 – 10 dni [1,35]. Dodatkowo klasyczne metody identyfikacji drobnoustrojów wiążą się najczęściej z koniecznością zapewnienia odpowiedniego laboratorium oraz wykwalifikowanego personelu [34,60]. Wspomniane utrudnienia uniemożliwiają swobodne wykorzystanie technik konwencjonalnych w powszechnej praktyce przemysłowej [59]. Często, aby zwiększyć ich efektywność, są one łączone z innymi metodami detekcji mikroorganizmów patogennych opartymi na w pełni lub częściowo zautomatyzowanej analizie DNA, wykorzystaniu przeciwciał lub innych czynników biochemicznych (oznaczenia turbidymetryczne, impedymetryczne, mikrokalorymetryczne) [1,8,58].

Najprostsze modyfikacje konwencjonalnych sposobów wykrywania bakterii chorobotwórczych wiążą się z wykorzystaniem specjalnie wzbogaconych podłoży przystosowanych do wykrywania poszczególnych mikroorganizmów. Przykładowo do detekcji bakterii *Listeria monocytogenes* przygotowano podłoża ONE Broth (oferowane przez firmę Oxoid), *Listeria*

special broth (Bio-Rad) oraz *Listeria* Xpress broth (Bio-Mérieux). Innym podejściem jest połączenie metod konwencjonalnych z testami biochemicznymi, takimi jak na przykład testy API[®] (firmy Bio-Mérieux), BBL Minitek system (Becton Dickinson Microbiological Systems) lub MicroLog[™] (Biolog). Oznaczenie polega na prostych reakcjach chemicznych, które zachodzą w podłożach wzrostowych. Często są one powiązane z dodatkową reakcją chromogenną przeprowadzaną po określonym okresie inkubacji. Podstawą tego typu detekcji jest specyficzność przemian różnych źródeł węgla przez badane drobnoustroje oraz charakterystyka innych szlaków metabolicznych poszczególnych patogenów [15,58]. Odmiernym proponowanym rozwiązaniem jest modyfikacja płytkowej metody oznaczania ogólnej liczby mikroorganizmów w produktach poprzez użycie podłoża typu Petrifilm[™] (firmy 3M[™]) – złożonego z podwójnej warstwy zawierającej podłoże wzrostowe i czynnik rozpoznawczo-różnicujący. W ten sposób oznaczane mogą być między innymi bakterie wskaźnikowe *E. coli* w próbkach wody [8]. Modyfikacja wspomnianej metody płytkowej jest podstawą działania wielu innych narzędzi do szybkiej identyfikacji mikroorganizmów, takich jak Compact Dry (Nissui Pharmaceutical Co., LTD), SimPlate[®] (BioControl systems), TEMPO[®] (Bio-Mérieux), Colilert[®] (IDEXX Laboratories) czy Soleris[™] (Neogen) [59].

Metody immunochemiczne oparte na wykorzystywaniu przeciwciał, najprawdopodobniej jako jedyne techniki biodetekcji mogą być z powodzeniem stosowane do wykrywania zarówno komórek bakteryjnych, przetrwalników, wirusów jak i samych toksyn wytwarzanych przez patogenne mikroorganizmy [1]. Specyficzność testów serologicznych zależy od specyficzności użytego przeciwciała – monoklonalnego, poliklonalnego lub rekombinowanego [58]. Wśród opracowanych procedur do wykrywania mikroorganizmów patogennych można wymienić przykłady immunochemicznego oznaczania między innymi bakterii *A. hydrophila* [52], *E. coli* [63,64], *Salmonella* spp. [65,66] lub też *Listeria monocytogenes* [67,68]. Najczęściej serologiczna detekcja bakterii wykonywana jest przy pomocy testu ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) przeprowadzanego w sposób bezpośredni lub tzw. metodą kanapkową (ang. *sandwich method*) [58]. Oprócz prostych testów serologicznych w sprzedaży dostępny jest już także w pełni zautomatyzowany zestaw do immunodetekcji mikroorganizmów chorobotwórczych VIDAS[®] (firmy Bio-Mérieux). Wśród innych rozwiązań z zakresu immunochemicznego wykrywania patogenów opracowano również metody połączone z wykorzystaniem bioluminescencyjnych enzymów (BEIA ang. *bioluminescent enzyme immuno-assay*) [65], technik immunomagnetycznych (ELIMCL, ang. *enzyme-linked immunomagnetic chemiluminescence*) [63] oraz testów aglutynacji [67]. Pomimo zdecydowanie mniejszej czasochłonności oznaczeń

serologicznych w porównaniu z konwencjonalnymi technikami detekcji patogenów, dane rozwiązanie posiada także kilka znaczących niedogodności. Badania immunochemiczne mogą mieć za niską czułość układu detekcji, obniżony poziom powinowactwa zastosowanego przeciwciała względem docelowego antygeny lub ulegać zakłóceniom wywołanym przez zanieczyszczenia badanej próbki [1].

W ostatnim dwudziestoleciu nastąpił intensywny rozwój molekularnych metod detekcji mikroflory patogennej opartych na analizie specyficznych sekwencji kwasów nukleinowych wyizolowanych z badanych drobnoustrojów. Szczególnie jest to widoczne w odniesieniu do zmian, jakie wywołały wyniki tego typu badań w taksonomii danych mikroorganizmów [15]. Wśród najintensywniej rozwijanych technik wykrywania patogennych mikroorganizmów w żywności opartych na detekcji specyficznych fragmentów DNA wymienia się metody hybrydyzacji *in situ* (powiązane ze znacznikami fluorescencyjnymi), różne odmiany łańcuchowej reakcji polimerazy oraz rozwiązania analityczne wykorzystujące mikromacierze lub biosensory DNA [10].

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH, ang. *fluorescence in situ hybridization*) opiera się na zastosowaniu krótkich oligonukleotydów (sond DNA), które są komplementarne względem charakterystycznych dla analizowanego mikroorganizmu sekwencji RNA oraz posiadają na swoim końcu fluorescencyjny wskaźnik [58]. Sonda DNA wiąże się specyficznie z docelowymi fragmentami rRNA i umożliwia detekcję poszukiwanych mikroorganizmów [69]. Hybrydyzacja sond z docelowym rybosomalnym RNA wykorzystywana jest między innymi w systemie Gene-Track (z fluorescencyjnym znakowaniem sondy) oraz systemie Gene-Probe (z sondą znakowaną estrem akrydynowym) [8].

Procedura oparta na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. *Polymerase Chain Reaction*) została opracowana prawie 20 lat temu. Obecnie stanowi ona najpowszechniejszą metodę genetyczną, która umożliwia identyfikowanie mikroorganizmów poprzez amplifikację fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla danego drobnoustroju [1,15]. Oznaczenie opiera się na powielaniu wybranych fragmentów nici DNA (lub RNA) w cyklicznie zachodzącej reakcji z zastosowaniem termostabilnej polimerazy i odpowiednio dobranych sekwencji starterowych. W odniesieniu do konwencjonalnych metod mikrobiologicznych technika PCR charakteryzuje się o wiele większą efektywnością. Zapewnia ona szybką i czułą detekcję nawet niewielkiej ilości docelowych fragmentów kwasów nukleinowych w badanej próbce. Jednak z drugiej strony wykorzystanie reakcji PCR do bezpośredniego wykrywania mikroflory patogennej może być ograniczone ze względu na wrażliwość polimerazy na czynniki środowiska, uzyskiwanie wyników fałszywie

ujemnych, możliwość otrzymywania wyników fałszywie pozytywnych, utrudniona związane z niemożnością odróżnienia żywych drobnoustrojów od martwych lub z wpływem zanieczyszczenia badanych próbek [70]. Mimo to, w literaturze zaprezentowano wiele procedur detekcji bakterii chorobotwórczych opartych na wykorzystaniu reakcji PCR. Można wśród nich wymienić opracowania dotyczące na przykład *Aeromonas hydrophila* [52,55], *Staphylococcus aureus* [71], *Listeria monocytogenes* [72,73], *Escherichia coli* O157:H7 [74] lub *Salmonella* spp. [75]. Bardzo użyteczną odmianą opisywanej technologii jest reakcja multiplex PCR, która umożliwia jednoczesne wykrywanie kilku docelowych fragmentów kwasów nukleinowych (poprzez zastosowanie więcej niż jednego zestawu starterów) [1]. Przykładowo J.S. Kim wraz ze współpracownikami opracował procedurę multiplex PCR, którą wykorzystał do równoczesnego wykrywania bakterii *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* oraz *Vibrio parahaemolyticus* [76]. Inną bardzo użyteczną modyfikacją technologii łańcuchowej reakcji polimerazy jest pomiar ilości produktów PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*), który umożliwia bardzo szybkie uzyskanie ilościowych wyników detekcji patogenów [72,73]. Samo oznaczenie polega między innymi na wykorzystaniu sond wyznakowanych barwnikami fluorescencyjnymi (np. sondy TaqMan[®] Applied Biosystem), które wiążą się z docelowymi amplifikowanymi fragmentami kwasów nukleinowych [70,77]. Mimo oczywistych zalet tej metody, nie potrafi ona rozróżnić żywych i martwych mikroorganizmów zidentyfikowanych w badanej próbce. Zadanie to można z kolei wykonać stosując technikę RT-PCR (PCR odwrotnej transkryptazy, ang. *reverse transcriptase*) [1]. Odwrotna transkryptaza (RT) prowadzi syntezę jednoniciowego DNA z użyciem matrycy mRNA obecnego tylko w żywych komórkach RNA [70]. Jednym z przykładów zastosowania RT-PCR jest opracowana przez S. Yarona i K.R. Matthews'a procedura wykrywania zdolnych do życia komórek *E. coli* O157:H7 [78].

Oznaczenie specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych zamplifikowanych w reakcji PCR przeprowadzane jest zasadniczo przy użyciu elektroforezy żelowej. Jest ona łatwa i szybka do przeprowadzenia w laboratorium, ale jako rutynowe badanie stosowane poza nim może nastroczać wielu problemów [1]. Kłopotliwe jest także wykorzystanie szkodliwych dla zdrowia barwników, które są niezbędne do weryfikacji wyników elektroforetycznego rozdziału fragmentów kwasów nukleinowych [70]. Wyżej wymienione przesłanki sprawiają, że nadal aktualna jest potrzeba opracowania alternatywnych metod prostej i jednocześnie wiarygodnej detekcji mikroorganizmów chorobotwórczych.

Wśród intensywnie rozwijanych rozwiązań są także inne sposoby oparte na wykrywaniu hybrydyzacji fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla oznaczanych patogenów [10]. Dużo uwagi skupiają na sobie między innymi mikromacierze DNA. Z technicznego punktu widzenia są one zbiorem sond molekularnych unieruchomionych w warstwie detekcyjnej urządzenia tworzącym dwuwymiarowy układ mikroskopijnych miejsc hybrydyzacji z docelowymi fragmentami kwasów nukleinowych [79,80]. Znaczącym zainteresowaniem cieszy się także intensywny rozwój różnego rodzaju technik biosensorowych, które także wykorzystują specyficzne powinowactwo sond DNA względem poszukiwanych odcinków kwasów nukleinowych. Badane fragmenty są specyficzne dla wykrywanych mikroorganizmów lub genów kodujących ich czynniki chorobotwórczości [1,9,62,81]. Niniejsza praca jest poświęcona przygotowaniu tego typu biosensora DNA, który na podstawie detekcji hybrydyzacji byłby zdolny do wykrywania mikroorganizmów patogennych w żywności.

2. Biosensory

Zgodnie z nomenklaturą Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC, ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) mianem sensora chemicznego określa się urządzenie, które przekształca informację chemiczną na analitycznie przydatny sygnał – w odniesieniu zarówno do stężenia poszczególnego składnika próbki, jak i analizy składu tej mieszaniny. Sensor jest zazwyczaj zbudowany z dwóch podstawowych elementów – chemicznego (cząsteczkowego) systemu rozpoznania oraz fizykochemicznego przetwornika [82]. Biosensor stanowi urządzenie wykorzystujące specyficzną reakcję biochemiczną, w której uczestniczą wyizolowane enzymy, układy immunologiczne, tkanki, organelle lub całe komórki, w celu wykrycia docelowych substancji – zazwyczaj poprzez układ elektryczny, termiczny lub optyczny [81]. Biosensor opierający się na zastosowaniu specyficznych właściwości kwasów nukleinowych (NA, ang. *nucleic acids*) zaliczany jest także do rodziny sensorów chemicznych. Jego działanie polega na przekształceniu bodźca (bio)chemicznego pochodzącego od oznaczanej substancji, która oddziałuje z cząsteczkami NA, na analitycznie przydatną informację. Uzyskany w ten sposób sygnał może dotyczyć zarówno rodzaju i stężenia oznaczanej substancji, jak i chemicznej struktury kwasów nukleinowych i/lub jej zmian [12].

2.1. Zasada konstrukcji biosensora

Biosensor jest urządzeniem analitycznym, którego praca opiera się na przekształceniu wyniku reakcji biologicznej na sygnał analityczny. W jego budowie wyróżnia się dwa podstawowe komponenty (rys. 5) – warstwę detekcyjną wyposażoną w element dokonujący rozpoznania biologicznego oraz przetwornik, który wytwarza mierzalny sygnał proporcjonalny do badanej właściwości oznaczanej substancji. Jako pracujące w warstwie detekcyjnej bioreceptory wykorzystywane są najczęściej enzymy, przeciwciała, kwasy nukleinowe, tkanki, komórki, organelle lub całe mikroorganizmy. Z kolei w roli przetwornika może być użyty optyczny, elektrochemiczny, piezoelektryczny, termometryczny, magnetyczny lub mikromechaniczny układ, albo kombinacja jednego lub większej ilości wymienionych rozwiązań [1].



Źródło: Opracowanie własne na podstawie [82,83]

Rysunek 5. Schemat konstrukcji biosensora.

Pomiar przy użyciu biosensora najczęściej opiera się na trzech podstawowych etapach [11,83,84]. W pierwszej kolejności, składnik biologicznie czynny rozpoznaje z odpowiednią specyficznością oznaczany związek. Następuje reakcja zachodząca w warstwie detekcyjnej urządzenia. Następnie fizykochemiczny efekt tej reakcji jest przekształcany za pomocą przetwornika w mierzalny sygnał. Ostatni etap polega na przetwarzaniu uzyskanej odpowiedzi analitycznej i wiąże się między innymi ze wzmocnieniem i/lub rejestracją otrzymanego sygnału.

Klasyfikacja biosensorów opiera się najczęściej na dwóch podstawowych parametrach jego budowy: systemie biodetekcji oraz typie przetwornika. Biorąc pod uwagę pierwsze wymienione kryterium najpopularniejszymi rozwiązaniami są biosensory wykorzystujące specyficzne reakcje: antygen-przeciwciało, enzym-substrat (czasem także z uwzględnieniem kofaktora) lub oddziaływania cząsteczek DNA (lub RNA) między sobą (hybrydyzacja

komplementarnych fragmentów kwasów nukleinowych) albo ze związkami chemicznymi zmieniającymi ich naturalne właściwości. Inne techniki biosensorowe oparte między innymi na zastosowaniu całych komórek lub syntetycznych układów biomimetycznych (naśladujących cząsteczki biologicznie czynne) są w znacznej mierze koncepcjami o wiele mniej rozwiniętymi niż pierwsze trzy układy [1]. Systemy biodetekcji wykorzystujące oddziaływanie antygen-przeciwciała funkcjonują na zasadzie zbliżonej do układu zamku i klucza. Trójwymiarowa struktura obu cząsteczek pasuje do siebie idealnie. Biorąc pod uwagę tę specyficzną właściwość oraz różnorodność budowy poszczególnych przeciwciał możliwe jest odnalezienie takiej cząsteczki, która będzie zdolna do wysoce specyficznego łączenia się z dowolnym docelowym antygenem. Spostrzeżenie to ma swoje odzwierciedlenie w ogromnej liczbie opracowanych sensorów immunologicznych, które są przeznaczone do wykrywania różnego rodzaju związków chemicznych, cząsteczek biologicznie czynnych lub komórek mikroorganizmów [1]. Wśród biosensorów wykorzystujących przeciwciała jako czynnik rozpoznający i przeznaczonych do wykrywania drobnoustrojów chorobotwórczych warto wymienić układy przystosowane do wykrywania bakterii *E. coli* O157:H7 [85], *Salmonella typhimurium* [86] lub *Bacillus* spp. [87].

Enzymy wykorzystywane w warstwie detekcyjnej biosensora mogą pełnić różne funkcje. Są one stosowane zarówno jako element rozpoznający, który funkcjonuje samodzielnie, jak i wspomagają działanie innego receptora np. przeciwciała, kwasu nukleinowego [88]. Szczególnie popularnym rozwiązaniem jest znakowanie enzymatyczne przeciwciał, co jest często używane zamiast wprowadzania znaczników radioizotopowych lub fluorescencyjnych [63]. Cząsteczki enzymów zapewniają wysoką czułość biosensora, możliwość bezpośredniej wizualizacji wyników oznaczenia oraz stabilność układu biodetekcji. Rozwiązanie to ma jednak też swoje ograniczenia w postaci wieloetapowego procesu oznaczania oraz możliwości wystąpienia zakłóceń ze strony endogennych enzymów [1].

Trzecią grupę cząsteczek, która jest wymieniana w gronie najczęściej wykorzystywanych w warstwach detekcyjnych biosensorów, stanowią kwasy nukleinowe. Szczegółowy opis technik biodetekcji opartych o specyficzne właściwości tej biologicznie czynnej struktury został zamieszczony w dalszej części pracy.

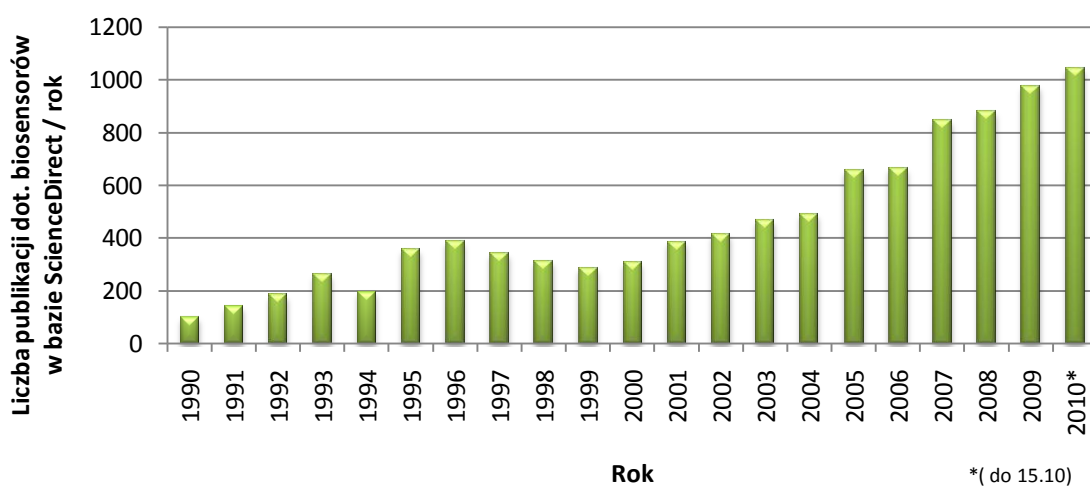
Oceniając biosensory pod względem stosowanego systemu przetwarzania sygnału biodetekcji można zauważyć, że najczęściej wykorzystywane w tym celu są przetworniki elektrochemiczne, optyczne oraz grawimetryczne (piezoelektryczne) [84]. Ostatnie z wymienionych rozwiązań oparte jest na użyciu mikrowagi kryształu kwarcu (QCM, ang. *quartz crystal microbalance*). Biosensory piezoelektryczne znalazły powszechne zastosowanie

między innymi w oznaczeniach powinowactwa biologicznego między różnymi cząsteczkami. Umożliwiają one śledzenie bezpośredniego powiązania wzrostu masy (zmian częstotliwości drgania mikrowagi) z kinetyką oddziaływania badanych związków [89]. Wśród przetworników optycznych na uwagę zasługuje technika powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR, ang. *surface plasmon resonance*), która jest często używana w biosensorach immunologicznych [90,91]. Specyficzna adsorpcja badanych substancji na odpowiednio zmodyfikowanej powierzchni metalu (zazwyczaj złota lub srebra) zmienia charakterystykę powierzchniowego rezonansu plazmonowego wzbudzanego przez światło w układzie detekcyjnym urządzenia. Mimo powszechnego wykorzystania tego systemu w komercyjnych sensorach jest on nadal zbyt kosztowny, aby mógł być stosowany jako rutynowe narzędzie w przemyśle [84]. Biorąc pod uwagę możliwość wprowadzenia do powszechnej praktyki i funkcjonowanie w zminiaturyzowanych układach detekcji najlepszym rozwiązaniem wydają się być przetworniki elektrochemiczne. Ponad połowa opisanych w literaturze biosensorów wykorzystuje tego rodzaju przetworniki ze względu na ich wysoką czułość, prostotę konstrukcji oraz konkurencyjność cenową [92]. Ponadto rozwiązania elektrochemiczne wymagają jedynie niewielkich ilości oznaczanych substancji i mogą być stosowane w przypadku próbek mętnych (często zawierających także związki fluorescencyjne lub absorbujące promieniowanie świetlne) [11]. Elementy analizy elektrochemicznej wykorzystane w niniejszej pracy do konstrukcji biosensora DNA zostały omówione w rozdziale 4.

2.2. Obecny stan rozwoju technologii biosensorowych

Historia biosensorów liczy niemal 50 lat. Pierwszym skonstruowanym układem biodetekcji była opracowana w 1962 roku przez L.C. Clarka i C. Lyonsa tzw. „elektroda enzymatyczna” zastosowana do amperometrycznego oznaczania glukozy przy współdziałaniu oksydazy glukozy [93]. Opisane rozwiązanie mogło być jednak uznane tylko za prekursora biosensorów, ponieważ wykorzystany enzym działał w roztworze i nie był unieruchomiony w warstwie detekcyjnej danego urządzenia. Jako pierwszy opracowany biosensor uznaje się elektrodę enzymatyczną zaprezentowaną w 1967 roku przez S.J. Updike’a i J.P. Hicksa – także przeznaczoną do oznaczania glukozy [94]. Wspomniany sensor opierał się na elektrodzie tlenowej Clarka, która została pokryta żelazem poliakrylamidowym

z unieruchomioną oksydazą glukozową. Prace nad biosensorami przeznaczonymi do badania poziomu glukozy w płynach ustrojowych człowieka uitorowały drogę rozwoju różnorodnym systemom enzymatycznej biodetekcji innych cząsteczek biologicznych. Mimo, że dane urządzenia bazowały na relatywnie prostych założeniach, następne generacje technologii biosensorowych wykorzystywały coraz czulsze układy detekcyjne i bardziej złożone metody analityczne. Do konstrukcji sensorów wprowadzano sukcesywnie kolejne struktury biologicznie czynne: antygeny, przeciwciała, kwasy nukleinowe, całe komórki, białka, itd. oraz rozwijano nowoczesne układy przetworników optycznych, elektrochemicznych, kalorymetrycznych, akustycznych, piezoelektrycznych, magnetycznych oraz mikro-mechanicznych [81].



Źródło: Opracowanie własne na podstawie danych z bazy ScienceDirect [95]

Rysunek 6. Liczba publikacji dotyczących biosensorów w bazie ScienceDirect w okresie ostatnich 20 lat.

Opracowywanie nowych technologii biosensorowych to bardzo dynamiczna dziedzina badań. Świadczy o tym liczba publikacji dotyczących biosensorów pojawiająca się każdego roku w elektronicznej bazie danych literaturowych ScienceDirect (rys. 6). Od początku bieżącego stulecia coroczna ilość nowych publikacji dotyczących technologii biosensorowych rosła dynamicznie i na koniec tego roku osiągnie poziom ponad 1000 pozycji [95]. Zaobserwowana intensyfikacja prac nad nowymi biosensorami wiąże się zapewne z rozwojem nanobiotechnologii, jaki miał miejsce w ostatnim dziesięcioleciu [92]. Nie bez znaczenia jest także dynamiczny rozwój różnych narzędzi bioinformatycznych,

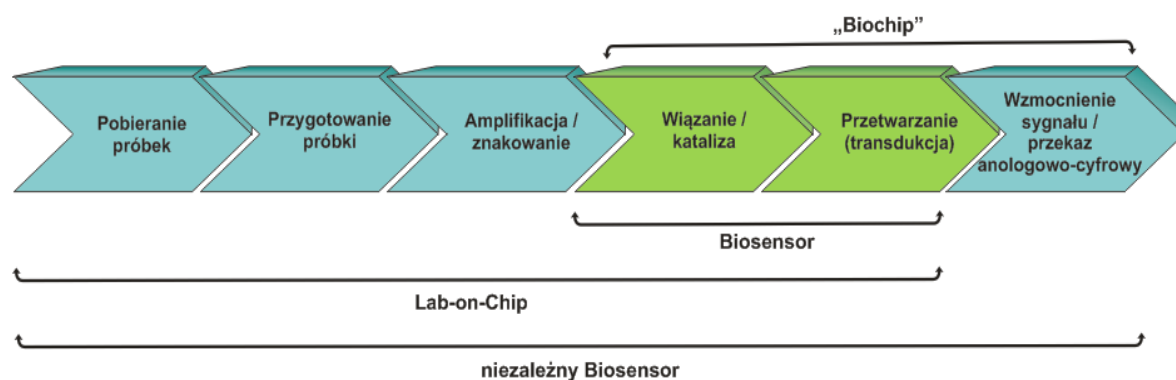
które są także wykorzystywane w opracowywaniu nowych technologii biosensorowych [96,97].

Pierwszym biosensorem wprowadzonym na rynek była elektroda enzymatyczna do oznaczania glukozy firmy Yellow Spring Instrument (YSI), która pojawiła się w sprzedaży w 1975 roku [11]. Obecnie urządzenia do badania poziomu glukozy we krwi stanowią blisko 85% wszystkich komercyjnie dostępnych biosensorów na świecie [92]. Wśród najpopularniejszych sensorów wymienia się następujące glukometry: StatStrip™ Glucose Monitor (firmy Nova Biomedical), Precision Xtra (ABBOTT Laboratories), Glucometer® (Bayer AG) oraz serię aparatów Accu-Check (Roche Diagnostic AG). Mimo absolutnej dominacji na rynku biosensorów urządzeń do oceny poziomu glukozy przewiduje się, że w nadchodzącym dziesięcioleciu znacząco wzrośnie liczba skomercjalizowanych technologii biosensorowych przeznaczonych do wykrywania patogenów.

Współcześnie szacuje się, iż roczna ilość środków przeznaczanych w skali świata na badanie i rozwój technologii biosensorowych wynosi 300 milionów dolarów amerykańskich [92]. Głównym celem prowadzonych prac jest poprawa selektywności i czułości opracowywanych układów detekcyjnych. Rozwijane technologie mają w przyszłości znaleźć zastosowanie w medycynie, farmacji, produkcji żywności, zapewnieniu bezpieczeństwa oraz ochronie środowiska. Obecnie komercjalizacja wyników wspomnianych badań nie jest jednak zbyt zaawansowana. Na drodze sprawnego transferu opracowanych technologii do powszechnej praktyki analitycznej stają najczęściej związane z tym spore koszty oraz kluczowe bariery wynikające z walidacji nowych rozwiązań (uzyskanie satysfakcjonującej stabilności, czułości detekcji i wiarygodności pracy skonstruowanych biosensorów). Mimo wymienionych ograniczeń, współczesny rynek diagnostyki laboratoryjnej nieustannie dąży do uzyskania narzędzi zdolnych do pracy w zautomatyzowanych i wysoko-wydajnych układach analitycznych, co stanowi znaczącą siłę napędową dalszego rozwoju nowych biosensorów [60].

Próbując dokonać oceny obecnego stanu rozwoju technologii biosensorowych F.F. Bier zaprezentował koncepcję uporządkowania poszczególnych kategorii urządzeń opracowanych w ramach tej dziedziny badań i umiejscowienia ich w ogólnie zarysowanym procesie analitycznym (rys. 7) [98]. Mianem biosensora określone zostało urządzenie, które jest zdolne do specyficznego rozpoznania przedmiotu detekcji wykorzystując w tym celu odpowiednią reakcję biologiczną i które jest zdolne w dalszej kolejności przekształcić wynik tej reakcji na mierzalny sygnał analityczny. Tak zwany „biochip” w porównaniu z biosensorem jest dodatkowo wyposażony w systemy zapewniające dalszą obróbkę uzyskanego sygnału

analitycznego – uzyskana informacja jest bardziej kompleksowa. Do tej grupy rozwiązań zalicza się między innymi układy oparte o technologię mikromacierzy DNA, które oprócz samych części zawierających sondy molekularne wyposażone są dodatkowo w elementy przeznaczone do wykrywania reakcji hybrydyzacji, analizowania za pomocą odpowiednich algorytmów wyników oznaczenia i rekonstruowania docelowej sekwencji kwasów nukleinowych [80,99]. Wśród układów typu „biochip”, które są już dostępne na rynku wymienia się między innymi oferowane przez firmę Affymetrix systemy GeneChip oraz układy BeadExpress[®] produkowane przez Illumina Inc. [100]. Do tej grupy rozwiązań analitycznych zalicza się także układy wykorzystujące technikę pomiarową powierzchniowego rezonansu plazmonów – na przykład systemy wytwarzane przez firmę Biacore Life Sciences (obecnie własność GE Healthcare) oraz 8500 Affinity Chip Analyzer (firmy Applied Biosystems i HTS Biosystems) [92]. Z kolei urządzenia typu „Lab-on-Chip” stanowią zminiaturyzowane systemy analityczne posiadające układ mikroprzepływu łączący komory, w których zachodzą różne reakcje chemiczne lub biochemiczne obejmujące przygotowanie, oczyszczenie i/lub wzbogacenie oraz ostateczne oznaczenie badanej substancji [101]. Tego typu rozwiązanie wprowadziła już na rynek firma Agilent Technologies. Najbardziej kompleksowym urządzeniem byłby tak zwany „niezależny biosensor” (ang. *autonomous biosensor*), który w swojej pracy łączyłby wszystkie podstawowe etapy procesu analitycznego – od pobrania próby do uzyskania ostatecznego wyniku. Prace nad tego typu rozwiązaniem wciąż trwają [98,102,103].

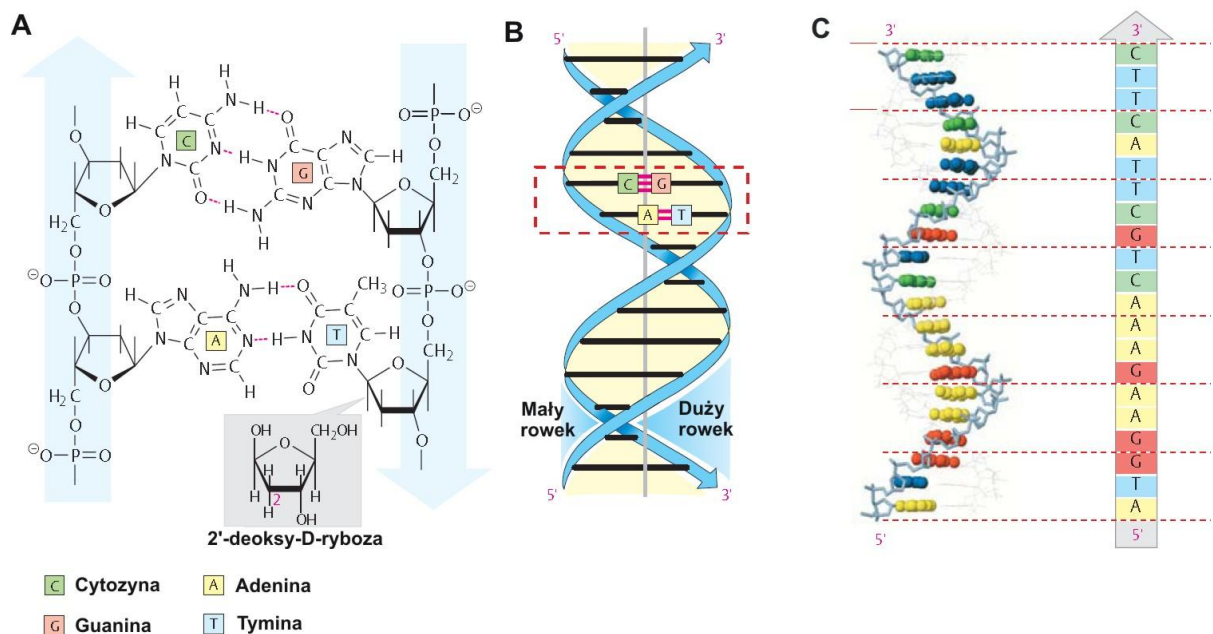


Źródło: Opracowanie własne na podstawie [98]

Rysunek 7. Miejsce biosensora w układach biodetekcji.

3. Wykorzystanie biosensorów DNA w badaniu żywności

W ostatniej dekadzie nastąpił bardzo znaczący postęp w rozwoju sensorów wykorzystujących w procesie biodetekcji cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego oraz inne formy kwasów nukleinowych, wliczając w to aptamery i kwasy peptydonukleinowe (PNA) [12,104,105]. W procedurach związanych z badaniem żywności są one najczęściej wykorzystywane w oznaczeniach związków chemicznych oddziałujących z DNA oraz w wykrywaniu fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla genetycznie zmodyfikowanych organizmów lub dla poszczególnych mikroorganizmów [106]. Zainteresowanie wykorzystaniem kwasów nukleinowych w procedurach biodetekcji, a w szczególności kwasu deoksyrybonukleinowego, wynika z jego wyjątkowych właściwości.



Źródło: Opracowanie własne na podstawie [107]

Rysunek 8. Schemat budowy kwasu deoksyrybonukleinowego (A), struktura dwuniciowego DNA (B), sekwencja jednociowego fragmentu DNA(C).

DNA jest liniowym polimerem składającym się z czterech rodzajów jednostek monomerycznych – deoksynukleotydów (rys. 8A). Każdy z nich zbudowany jest z cząsteczki 2'-deoksy-D-rybozy, reszty kwasu fosforowego oraz jednej z czterech zasad azotowych: adeniny (A), tyminy (T), cytozyny (C) lub guaniny (G). Deoksynukleotydy połączone ze sobą

wiązaniami 3',5'-fosfodiestrowymi tworzą łańcuch cukrowo-fosforanowy o przemiennie powtarzających się resztach deoksyrybozy i fosforanu [108]. Kwas deoksyrybonukleinowy składa się z dwóch takich łańcuchów, które wzajemnie się oplatając formują helikalną strukturę, gdzie zasady skierowane są do wnętrza helisy, a rdzeń cukrowo-fosforanowy znajduje się na zewnątrz (rys. 8B) [107]. Obie nici DNA w dwuniciowej helisie (dsDNA, ang. *double-stranded DNA*) są ułożone antyrównolegle do siebie – jedna z nich jest zorientowana w kierunku 5'→3', a druga odwrotnie 3'→5'. Zasady obecne w przeciwległych łańcuchach tworzą ze sobą wiązania wodorowe zgodnie z regułą komplementarności tj. A wiąże się z T, a G z C [109].

Wspomniana właściwość kwasu nukleinowego ma istotne znaczenie w przypadku detekcji specyficznych fragmentów DNA, gdzie oznaczenie polega na hybrydyzacji (formowaniu dsDNA) między jednoniciową sondą DNA (ssDNA, ang. *single-stranded DNA*) a komplementarnym fragmentem szukanego kwasu nukleinowego (tDNA, ang. *target DNA*). Z tego względu w konstrukcji biosensora bardzo ważny jest wybór właściwej sekwencji sondy ssDNA (rys. 8C). Musi ona być komplementarna w stosunku do oznaczanego fragmentu kwasu nukleinowego specyficznego dla poszukiwanej sekwencji. Z kolei w biosensorach wykrywających związki chemiczne oddziałujące z DNA warstwa detekcyjna urządzenia opiera się na dwuniciowych fragmentach kwasów nukleinowych. Badane substancje oddziałują i/lub wiążą się z kwasem nukleinowym zmieniając jego naturalne właściwości oraz często uszkadzając jego natywną strukturę [110]. Tego typu biosensory mogą stanowić użyteczny wskaźnik szkodliwych dla zdrowia zanieczyszczeń żywności, takich jak związki kancerogenne, środki farmaceutyczne lub substancje mutagenne [111].

Wprowadzenie cząsteczek kwasu nukleinowego do konstrukcji biosensorów zwiększyło stabilność układu pomiarowego (w porównaniu na przykład z sensorami enzymatycznymi) i znacznie poszerzyło możliwości analityczne danego urządzenia. Cząsteczki DNA posiadają stosunkowo wyższą trwałość niż inne biologicznie aktywne struktury, co umożliwiło wykorzystanie w technikach biosensorowych bardziej różnorodnych roztworów buforów oraz rozpuszczalników [112]. Uprościło to proces przygotowania próbki i pozwoliło na pomiary związków słabo rozpuszczalnych w wodzie. Dodatkowo raz zaprojektowane sekwencje fragmentów kwasów nukleinowych mogą być z łatwością syntetyzowane w powtarzalny sposób. Podczas syntezy otrzymywane oligo- i polinukleotydy można poddawać różnym chemicznym modyfikacjom, które zwiększają ich stabilność, specyficzność oraz zdolność do modyfikacji różnych powierzchni nadając im nowe, określone właściwości [12].

3.1. Biosensory do wykrywania związków chemicznych oddziałujących z dsDNA

Biosensory przeznaczone do wykrywania substancji oddziałujących z kwasami nukleinowymi mają zazwyczaj prostą konstrukcję. Praca urządzenia opiera się na zastosowaniu DNA (głównie dsDNA) unieruchomionego na powierzchni przetwornika, który przekazuje sygnał powstały w wyniku interakcji badanych związków chemicznych z cząsteczkami kwasów nukleinowych [112]. Charakter tego oddziaływania dotyczy najczęściej zaburzeń konfiguracji warstwy detekcyjnej biosensora (nagromadzenie lub uwolnienie różnych cząsteczek na powierzchni przetwornika), zmian konformacji lub właściwości elektrycznych sond DNA [104]. Wykrywane związki chemiczne wiążą się z cząsteczkami kwasów nukleinowych w sposób kowalencyjny lub niekowalencyjnie (poprzez oddziaływania van der Waalsa, wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe i/lub elektrostatyczne). Drugi rodzaj oznaczanych substancji może być dodatkowo pogrupowany według mechanizmu ich łączenia się z DNA. Wyróżnia się cząsteczki wiążące się w obszarze rowków (małych lub dużych) w strukturze kwasu nukleinowego oraz wnikaające (interkalujące) w przestrzenie między zasadami azotowymi [113]. Biosensory zawierające w swojej warstwie detekcyjnej dsDNA umożliwiają wykrywanie szkodliwych dla zdrowia zanieczyszczeń żywności, które wpływają niekorzystnie na strukturę i właściwości kwasów nukleinowych. Dodatkowo opracowanie układów biodetekcji opartych na wykorzystaniu cząsteczek aptamerów zwiększyło specyficzność tego rodzaju oznaczeń. Mimo iż technologie biosensorowe z użyciem aptamerów są dopiero na początkowym etapie rozwoju, opracowano już szereg procedur pozwalających na wykrywanie związków niskocząsteczkowych, struktur supramolekularnych lub całych mikroorganizmów [112].

Wśród ogółu biosensorów wykrywających związki chemiczne oddziałujące z DNA można wyróżnić rozwiązania przeznaczone do detekcji niepożądanych substancji występujących w żywności. Przykładowo, modyfikując elektrody z pasty węglowej dwuniciowymi fragmentami DNA przygotowano elektrochemiczny biosensor wykrywający heterocykliczne aminy aromatyczne – mutagenne i kancerogenne związki chemiczne powstające podczas gotowania żywności bogatej w białko [114]. Oznaczana substancja znacząco zmieniała właściwości elektrochemiczne dsDNA powodując wygaszenie sygnału reakcji redoks guaniny. Wspomniany układ biosensorowy został także wykorzystany do wykrywania metali szkodliwych dla zdrowia (jonów miedzi Cu^{2+}) wchodzących w interakcje z DNA. Bardziej kompleksowe oznaczenia jonów metali ciężkich przy pomocy elektrochemicznego

biosensora dsDNA przeprowadzone zostało w odniesieniu do potencjalnego zanieczyszczenia żywności ołowiem, niklem oraz kadmem [115]. Śledząc mechanizm oddziaływania badanych jonów metali z cząsteczkami DNA ustalono, że jony Pb^{2+} prowadziły do oksydacyjnych zniszczeń DNA. Natomiast jony Ni^{2+} i Cd^{2+} powodowały konformacyjne zmiany dwuniciowej struktury kwasu deoksyrybonukleinowego.

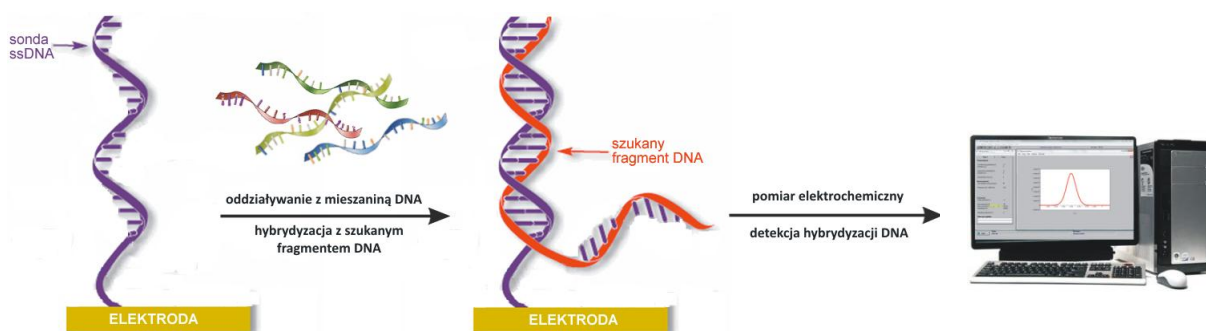
Elektrochemiczne biosensory DNA zostały także wykorzystane do oznaczenia innych genotoksycznych substancji mogących skażać żywność – polichlorowanych bifenyli, aflatoksyny B1, związków fenolowych, itp. [116-119]. Z kolei umieszczając w warstwie detekcyjnej biosensora odpowiednio dobrany aptamer DNA została opracowana procedura elektrochemicznego wykrywania oksytetracykliny (terramycyny) [120]. Ten antybiotyk jest lekiem podawanym zwierzętom hodowlanym i jego nadmierne stosowanie może powodować zanieczyszczenie tym środkiem mięsa, mleka lub jaj. Opracowane urządzenie było zdolne do specyficznej detekcji terramycyny oraz efektywnego odróżnienia danego związku od innych tetracyklin. Inny biosensor wykorzystujący w swojej warstwie detekcyjnej aptamer DNA został przygotowany z myślą o wykrywaniu cząsteczek neurotoksyny botulinowej [121]. Oznaczana substancja wywoływała zmianę konformacyjną aptamera DNA, co uruchamiało elektrochemiczny mechanizm detekcji wspomnianej toksyny obejmujący między innymi użycie enzymu peroksydazy (HRP, ang. *horseradish peroxidase*) oraz cząsteczek fluoresceiny.

Na podstawie informacji zawartych w literaturze można przypuszczać, iż wykorzystanie aptamerów DNA w biosensorach może w przyszłości stać się konkurencyjną metodą wykrywania substancji toksycznych w żywności w porównaniu na przykład z metodami immunologicznymi. Świadczą o tym kolejne opracowywane biosensorowe procedury przeznaczone do detekcji toksyn przecinkowca cholery, ochratoksyny A czy gronkowcowej enterotoksyny B [112].

3.2. Biosensory do wykrywania specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych

Działanie biosensora przeznaczonego do wykrywania specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych oparte jest na reakcji hybrydyzacji komplementarnych nici DNA (rys. 9). Warstwa detekcyjna urządzenia zawiera pojedyncze nici DNA (sondy ssDNA, długości około 15-30 nukleotydów), które są unieruchomione na powierzchni przetwornika

[110]. Sposób immobilizacji sondy musi umożliwiać jej swobodne oddziaływanie z docelowym fragmentem kwasu nukleinowego (tDNA, ang. *target DNA*) w odpowiednio dobranych warunkach reakcji (wartość pH, temperatura, siła jonowa mieszaniny reakcyjnej, itd.). Wydajność procesu tworzenia dwuniciowych kompleksów z tDNA oraz ich stabilność w znacznym stopniu zależy także od prawidłowego zaprojektowania sekwencji sond ssDNA [12]. Oprócz komplementarności względem docelowego fragmentu kwasu nukleinowego (specyficznego dla oznaczanego celu analitycznego np. mikroorganizmu patogennego) sonda musi spełniać także wymagania wynikające bezpośrednio z jej budowy. Oceniane oligonukleotydy sprawdzane są przede wszystkim pod kątem wartości teoretycznej temperatury topnienia oraz zdolności do tworzenia struktur drugorzędowych (tzw. „spinki do włosów” ang. *hairpin structure*) i dimerów [122]. W badaniu specyficzności sondy ssDNA nieodzowne jest korzystanie z programu BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*) pozwalającego przeszukiwać bazę danych GenBank będącą jednym z największych zbiorów opublikowanych sekwencji genetycznych różnych organizmów [96,123].



Źródło: Opracowanie własne na podstawie [110]

Rysunek 9. Schemat elektrochemicznego biosensora do wykrywania hybrydyzacji DNA.

Sama procedura wykrywania specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych polega najczęściej na zanurzeniu warstwy detekcyjnej biosensora w mieszaninie zawierającej DNA (rys. 9). Jeśli w badanym roztworze znajduje się poszukiwane tDNA (komplementarne względem sond ssDNA) na powierzchni przetwornika zachodzi reakcja hybrydyzacji, w wyniku której powstają dwuniciowe fragmenty kwasu nukleinowego [12,124]. Zazwyczaj proces hybrydyzacji i następnie detekcja powstałych dupleksów DNA przeprowadzane są w obrębie warstwy detekcyjnej biosensora – jest to tak zwana technika jednej powierzchni. Innym rozwiązaniem są technologie dwuwarstwowe, gdzie wykorzystywane są dwa odrębne

układy, jeden wyłącznie do rozpoznania docelowego tDNA i przeprowadzenia procesu hybrydyzacji, drugi do detekcji nowopowstałych dupleksów kwasów nukleinowych [110]. Systemy detekcji hybrydyzacji stosowane w elektrochemicznych biosensorach DNA zostały szczegółowo opisane w dalszej części pracy.

3.2.1. Badanie żywności zmodyfikowanej genetycznie

Wykrywanie genetycznych modyfikacji w produktach żywnościowych opiera się głównie na technologiach biodetekcji wykrywających specyficzne dla GMO białka (głównie przy pomocy technik immunologicznych) lub fragmenty kwasów nukleinowych. Procedury skupiające się na poszukiwaniu obecności cząsteczek DNA typowych dla genetycznie zmodyfikowanych składników żywności są obecnie zdominowane przez różnego rodzaju techniki powiązane z reakcją PCR [125]. Mimo wysokiej specyficzności i czułości wspomnianych metod wciąż poszukuje się alternatywnych sposobów wykrywania GMO, które uproszczą i przyspieszą dany proces analityczny [106]. Wśród rozwijanych koncepcji znajdują się biosensory DNA pozwalające na wykrywanie fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla genetycznie zmodyfikowanych organizmów [112,126].

W ostatnich latach liczba doniesień literaturowych odnośnie konstrukcji biosensorów DNA do wykrywania modyfikacji genetycznych w żywności zdecydowanie wzrosła. Jednym z najczęściej prezentowanych rozwiązań są sensory piezoelektryczne, wykrywające fragmenty kwasów nukleinowych specyficzne dla regulatorowych odcinków wprowadzanego DNA lub bezpośrednio związanych z cechą nadawaną organizmom GM. Opracowano między innymi biosensory piezoelektryczne zdolne do detekcji fragmentów genu *cryIA(b)* (zapewniającego modyfikowanej genetycznie kukurydzy odporność na owady) [127], genu EPSPS (nadającego soi RR tolerancję na herbicyd Roundup Ready) [128,129] oraz promotora P35S (często stosowanego w modyfikacjach genetycznych roślin) [130,131]. W każdym przypadku układ mikrowagi kwarcowej reagował pozytywnym sygnałem analitycznym (zmianą częstotliwości drgania) w wyniku skutecznej reakcji hybrydyzacji między sondą ssDNA a docelowymi fragmentami tDNA.

W innym przypadku elektrochemiczny biosensor do wykrywania fragmentu DNA specyficznego dla genu *bar* (kodującego tolerancję na herbicydy fosfotricynowe) został przygotowany z wykorzystaniem chemicznej modyfikacji powierzchni elektrody z pasty węglowej [132]. Unieruchomiona na elektrodzie sonda ssDNA wiązała się specyficznie z docelowym fragmentem tDNA tworząc na powierzchni elektrochemicznego

przetwornika dwuniciowy fragment kwasu nukleinowego. Wyniki procesu hybrydyzacji były oceniane w sposób bezpośredni (pomiar woltamperometrycznego sygnału guaniny) oraz pośredni (stosując elektroaktywny wskaźnik w postaci kompleksów kobaltu $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$). Inny elektrochemiczny biosensor do wykrywania genetycznie zmodyfikowanych organizmów został otrzymany poprzez unieruchomienie na powierzchni elektrody złotej sond ssDNA specyficznych względem fragmentów promotora P35S lub terminatora *nos* (typowych sekwencji regulatorowych wprowadzanych do organizmów GM) [133]. Wyniki hybrydyzacji sond z docelowymi fragmentami tDNA były oceniane poprzez pomiar woltamperometryczny wskaźnika błękitu metylenowego, który selektywnie akumulował się w warstwie detekcyjnej danego urządzenia zawierającej jedno- lub dwuniciowe fragmenty kwasu nukleinowego.

Ciekawy układ detekcyjny, także wykrywający fragmenty DNA specyficzne dla promotora P35S lub terminatora *nos*, zaprezentowany został na przykładzie biosensora wykorzystującego nanocząsteczki złota [134]. Zmodyfikowane biotyną docelowe fragmenty tDNA (zamplifikowane w reakcji PCR) ulegały unieruchomieniu w warstwie detekcyjnej urządzenia (wyposażonej w cząsteczki awidyny) i hybrydyzowały z sondą ssDNA, która z kolei oddziaływała specyficznie z nanocząsteczkami złota zapewniającymi bezpośrednią wizualną detekcję wyników reakcji hybrydyzacji. Całe oznaczenie trwało krótko i nie wymagało dodatkowego oprzyrządowania. Nanocząsteczki zostały także wykorzystane w innych biosensorach DNA do wykrywania fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla zmodyfikowanych genetycznie mikroorganizmów. Modyfikując elektrodę z węgla szklanego polimerem kwasu 2,6-pirydynodikarboksyłowego oraz nanocząsteczkami złota opracowano sensor zdolny do detekcji fragmentów genu *pat* (kodującego enzym acetylotransferazę fosfotrycyny) przy pomocy pomiarów techniką EIS [135]. Natomiast w oparciu o wykorzystanie magnetycznych kulek przygotowany został elektrochemiluminescencyjny biosensor DNA do wykrywania fragmentów DNA specyficznych dla promotora P35S [136].

3.2.2. Detekcja mikroflory patogennej

Metody wykrywania bakterii patogennych w produktach żywnościowych zostały scharakteryzowane w części pracy poświęconej opisowi danego zagrożenia (punkt 1.4.). Wśród obecnie rozwijających się alternatywnych sposobów detekcji mikroflory chorobotwórczej wymieniane są biosensory oparte o identyfikację w badanych próbach żywności specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych [1]. Idea pracy tego typu urządzenia skupia się na przeprowadzeniu reakcji hybrydyzacji między sondami ssDNA

unieruchomionymi na powierzchni przetwornika i docelowymi fragmentami tDNA (specyficznymi dla patogenów), a następnie identyfikacji skutków tej interakcji [12]. Mimo iż większość przedstawionych w literaturze przypadków wykorzystania biosensorów DNA do wykrywania mikroorganizmów patogennych wiąże się z zastosowaniem reakcji PCR, to rozwój technik biosensorowych w tym zakresie uważany jest za jeden z obiecujących kierunków opracowywania nowych metod detekcji mikroflory chorobotwórczej w żywności [70].

Modyfikując elektrody z pasty węglowej 27-merowymi sondami ssDNA specyficznymi dla fragmentów genu *hlyA* otrzymany został elektrochemiczny biosensor do wykrywania bakterii *Listeria monocytogenes* [137]. Po hybrydyzacji sond z docelowymi fragmentami kwasów nukleinowych wyniki tej interakcji były badane woltamperometrycznie przy pomocy elektroaktywnego wskaźnika – daunomycyny. Związek ten w większym stopniu akumulował się w dwu- niż w jednoniciowej strukturze DNA i tym samym pozwalał na wykrycie w badanej próbce fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla *L. monocytogenes*. Podobny system detekcji opracowany został dla bakterii *Escherichia coli* [138]. Na powierzchni elektrod drukowanych (wykonanych atramentem węglowym impregnowanym fulerenami) unieruchomione zostały sondy ssDNA specyficzne względem fragmentu kwasu nukleinowego 16S RNA wyizolowanego z bakterii *E. coli*. Formowanie dupleksów DNA w warstwie detekcyjnej biosensora badane było woltamperometrycznie z wykorzystaniem elektroaktywnego wskaźnika, kompleksu kobaltu i fenantroliny (Co(phen)_3^{3+}).

Bakterie *E. coli* będąc typowym mikroorganizmem wskaźnikowym (informującym o potencjalnym zanieczyszczeniu żywności mikroflorą chorobotwórczą) cieszą się dużym zainteresowaniem jako docelowy mikroorganizm wykrywany przy pomocy wielu opracowanych biosensorów DNA. Są one wykrywane przez sensory elektrochemiczne [139,140] lub piezoelektryczne [141]. Wspomniana technika mikrowagi kryształu kwarcu została także wykorzystana przy konstrukcji biosensora do wykrywania bakterii *Aeromonas hydrophila* [57]. Detekcja opierała się na użyciu sond ssDNA specyficznych względem genu aerolizyny – toksyny wytwarzanej przez ten mikroorganizm. Działanie biosensora było stosunkowo proste, ale jego przygotowanie pochłaniało dużo czasu. Sondy ssDNA połączone z biotyną unieruchamiano na zmodyfikowanym streptoawidyną złotym dysku, uprzednio pokrytym warstwą tiolowanego i karboksylowanego dekstranu. Pomiar QCM pozwolił na wykrycie cząsteczek kwasu nukleinowego specyficznych dla genu aerolizyny. Sam mechanizm adsorpcji docelowych fragmentów tDNA w warstwie detekcyjnej urządzenia nie został jednak

zweryfikowany. Nie potwierdzono faktu powstawania dwuniciowego DNA w wyniku procesu hybrydyzacji.

W konstrukcjach biosensorów DNA do wykrywania mikroorganizmów patogennych mogących zanieczyszczać produkty żywnościowe wykorzystywano także techniki dwuwarstwowe. Elektrochemiczna biodetekcja fragmentów genu *aflR* (związanego z syntezą aflatoksyny B1) umożliwiała na przykład identyfikację potencjalnie toksykogennych pleśni *Aspergillus* spp. [142]. Oznaczenie polegało na hybrydyzacji zaadsorbowanych na elektrodzie z pasty węglowej fragmentów tDNA z sondą ssDNA (zmodyfikowaną biotyną), która następnie łączyła się z cząsteczkami fosfatazy (związanymi z awidyną). Enzym po wprowadzeniu do mieszaniny reakcyjnej substratu, fosforanu 1-naftyłu, przekształcał go w 1-naftol, co było monitorowane woltamperometrycznie. Enzymatyczne przetwarzanie efektu rozpoznania specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych było także zastosowane w innym biosensorze DNA przeznaczonym do wykrywania szeregu bakterii chorobotwórczych takich, jak *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157:H7 [143].

Techniki biosensorowe do wykrywania mikroflory patogennej w żywności oparte o użycie aptamerów DNA w literaturze przedstawiane są najczęściej w powiązaniu z różnorodnymi nanostrukturami. Biosensor do detekcji *Bacillus thuringiensis* opracowany został na przykład przy pomocy kropek kwantowych (QD) selenku kadmu (ang. *cadmium selenide quantum dots*) [144]. Oznaczenie polegało na pomiarze fluorescencji następującym po połączeniu nanocząsteczek QD związanych z 60-zasadowym aptamerem DNA z przetrwalnikami *B. thuringiensis*. W innym sensorze do detekcji *Salmonella enterica* wykorzystano magnetyczne kulki zmodyfikowane aptamerami DNA, które pozwoliły na wyizolowanie z próbek żywności poszukiwanych komórek bakteryjnych [145]. Po tym zabiegu były one poddawane ilościowym oznaczeniom techniką RT-PCR obserwowanym w czasie rzeczywistym.

4. Elementy analizy elektrochemicznej w biodetekcji DNA

Elektrochemicznym biosensorem kwasów nukleinowych określa się urządzenie elektryczne, które wykorzystuje kwasy nukleinowe (zarówno naturalne, jak i syntetyczne formy oligo- oraz polinukleotydów) jako element rozpoznania biologicznego w oznaczeniach wykonywanych technikami elektrochemicznymi [12]. W większości przypadków konstrukcja tego typu sensora opiera się na modyfikacji powierzchni fizykochemicznego przetwornika (elektrody) jedno- lub dwuniciowymi cząsteczkami kwasu nukleinowego funkcjonującymi jako element rozpoznający (odpowiednio ssDNA lub dsDNA). Tak przygotowany układ detekcyjny jest najczęściej wykorzystywany w pomiarach woltamperometrycznych lub chronopotencjometrycznych [146]. Inną często spotykaną techniką analityczną opartą na zastosowaniu elektrochemicznych sensorów DNA jest elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS) [11]. W porównaniu z konkurencyjnymi technikami biosensorowymi, na przykład analizą DNA opartą na pomiarze fluorescencji znakowanych sond, techniki elektrochemiczne odznaczają się pewnymi zaletami. Wspomniane przetworniki optyczne posiadają ograniczenia związane z kosztowną aparaturą oraz koniecznością korzystania ze złożonych algorytmów obliczeniowych do odczytu uzyskanych wyników. Z tego względu wprowadzenie ich do powszechnej praktyki analitycznej wymaga sporych nakładów finansowych oraz wyspecjalizowanego personelu. Elektrochemiczne biosensory zyskują zaś spore zainteresowanie w diagnostyce molekularnej dzięki swojej wysokiej czułości, małym rozmiarom, niskim kosztom, łatwości wykorzystania oraz możliwości wkomponowania w zintegrowane mikroukłady analityczne [11,70,147-149].

4.1. Techniki pomiarowe z kontrolowaną zmianą potencjału

Podstawą wszystkich elektrochemicznych technik pomiarowych z kontrolowaną zmianą potencjału jest oznaczenie wielkości prądu względem przyłożonego potencjału [150]. Każdą z tych technik można opisać za pomocą dwóch zasadniczych parametrów – programu zmian napięcia polaryzującego elektrody oraz sposobu pomiaru prądu. Obie charakterystyki kształtują właściwości analityczne poszczególnej techniki pomiarowej oraz związek mierzonego prądu z ustalonymi warunkami pomiarowymi [151]. Do elektrochemicznych technik z kontrolowaną zmianą potencjału zalicza się między innymi chronoamperometrię, woltamperometrię liniową stałoprądową (w tym woltamperometrię cykliczną), metody

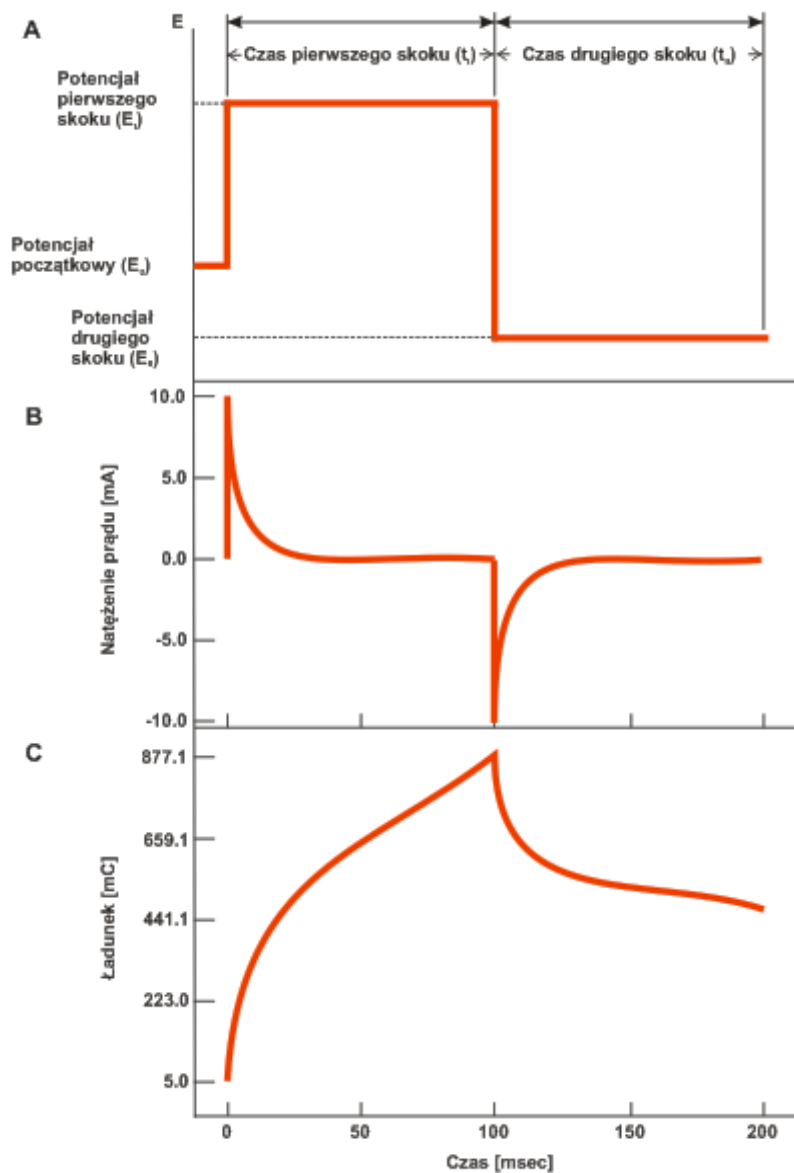
pulsowe (na przykład woltamperometrię pulsową normalną, różnicową oraz woltamperometrię fali prostokątnej), woltamperometrię zmiennoprądową, metody hydrodynamiczne oraz liniową woltamperometrię inwersyjną [150,152]. W niniejszej pracy wykorzystane zostały techniki pomiarowe stanowiące jedne z podstawowych narzędzi elektrochemicznych wykorzystywanych przy konstrukcji i następnie podczas funkcjonowania elektrochemicznych biosensorów.

4.1.1. Chronoamperometria/chronokulometria

Chronoamperometria (CA) oraz chronokulometria (CC) są podstawowymi technikami pomiarowymi często stosowanymi w ramach badań elektroanalitycznych. Pomiar chronoamperometryczny polega na rejestracji zmian natężenia prądu płynącego przez elektrodę w określonej jednostce czasu i względem użytego programu zmiany potencjału polaryzującego tę elektrodę. Chronokulometria polega na pomiarze ładunku powstałego w trakcie badanej reakcji redoks także w odniesieniu do czasu trwania oznaczenia i parametrów procesu polaryzacji elektrody pracującej. Obie techniki posiadają ten sam program zmiany napięcia polaryzującego elektrodę [153]. Może on obejmować pojedynczą lub podwójną zmianę (skok) potencjału (rys. 10).

Pomiar rozpoczyna się przy potencjale początkowym (E_0), przy którym na elektrodzie nie następuje proces elektrolizy. Następnie potencjał jest natychmiastowo (w formie skoku) zmieniany do wartości, która prowadzi do utlenienia lub redukcji badanego elektroaktywnego związku znajdującego się w roztworze reakcyjnym – tzw. potencjał pierwszego skoku E_1 . Jest on utrzymywany przez czas zdefiniowany przez program pomiaru jako czas pierwszego skoku (t_1). Pod wpływem przyłożonego potencjału obserwuje się sygnał prądu (pomiar CA) lub rosnącą wraz z upływem czasu wartość ładunku (pomiar CC) – obie wielkości powstałe w wyniku przeprowadzonej reakcji elektrodowej (utlenienia bądź redukcji elektroaktywnych cząsteczek, depolaryzatorów, zakumulowanych na elektrodzie i dyfundujących z głębi roztworu elektrolitu). W przypadku pomiaru opartego na pojedynczej zmianie potencjału polaryzującego elektrodę, pomiar jest zakończony po upływie czasu t_1 . Dla procedury obejmującej podwójną zmianę potencjału, wartość E_1 jest natychmiastowo przekształcana do wartości potencjału tzw. drugiego skoku (E_2), przy którym następuje odwrotny proces redukcji/utlenienia do wywołanego przy pierwszym skoku potencjału (cząsteczki utlenione ulegają redukcji, i odwrotnie). Wartość potencjału E_2 jest utrzymywana przez czas określony mianem czasu drugiego skoku (t_2). Podczas pomiaru CA obserwowany

jest sygnał prądu o znaku przeciwnym do odpowiedzi uzyskanej przy potencjale E_1 . Natomiast w pomiarze CC następuje sukcesywne obniżanie wartości mierzonego ładunku w zależności od czasu trwania pomiaru [153,155,156].



Źródło: Opracowanie własne na podstawie [153,154]

Rysunek 10. Zależność przykladanego potencjału (A), obserwowanego natężenia prądu (B) oraz ładunku (C) od czasu w pomiarach chronoamperometrycznych (CA)/chronokulometrycznych (CC).

Natężenie prądu wynikające z utlenienia lub redukcji elektroaktywnego związku chemicznego w odpowiedzi na zmianę potencjału mierzone techniką CA opisuje równanie Cotrella [153,155]:

$$i = \frac{nFAC_oD_o^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

gdzie:

n – liczba elektronów przenoszonych przez jon lub cząsteczkę [równoważnik/mol],

F – stała Faradaya [równa 96.485 C/równoważnik],

A – pole powierzchni elektrody [cm²],

C_o – stężenie depolaryzatora [mol/dm³],

D_o – współczynnik dyfuzji [cm²/s],

t – czas [s].

Mierzona wartość ładunku uzyskana w reakcji redoks stanowi całkę funkcji natężenia prądu względem czasu trwania tej reakcji. Tak więc całkując równanie Cotrella względem czasu otrzymuje się równanie opisujące zależność wartości ładunku od czasu trwania pomiaru – tzw. równanie Ansona – podstawa pomiarów techniką CC [153,155]:

$$Q = \frac{2nFAC_oD_o^{1/2}}{\pi^{1/2}}t^{1/2}$$

Oznaczenia wielkości ujętych w wyżej wymienionym wzorze są takie same jak w równaniu Cotrella.

Z analitycznego punktu widzenia pomiary chronokulometryczne są bardziej wiarygodne i użyteczne niż oznaczenia przeprowadzone techniką chronoamperometrii [155]. Mierzony sygnał (wartość ładunku) rośnie wraz z upływem czasu pomiaru CC (odpowiednio t₁ lub t₁ łącznie z t₂). Wnioski z eksperymentu można więc oprzeć na bardziej wiarygodnych wynikach z późniejszej części oznaczenia, pomijając rezultaty obarczone błędem niedoskonałości aparatu pomiarowego, które są uzyskiwane zaraz po zmianie potencjału z E₀ na E₁ (oraz ewentualnie z E₁ na E₂). Wykorzystując technikę chronokulometryczną możliwe jest także rozróżnienie, jaka część zmierzonego ładunku wynika z procesu ładowania warstwy podwójnej (między elektrodą a roztworem elektrolitu) i z reakcji elektrodowej

zaadsorbowanych na elektrodzie cząsteczek depolaryzatora, a jaka pochodzi z reakcji cząsteczek ulegających dyfuzji z głębi mieszaniny reakcyjnej. Ta właściwość pomiarów CC jest podstawą wykorzystania tej techniki między innymi w elektrochemicznych oznaczeniach pola powierzchni elektrody, współczynnika dyfuzji oraz stopnia adsorpcji związków elektroaktywnych na powierzchni przetwornika. Tego typu rozróżnienie nie jest możliwe do uzyskania w oparciu o pomiary chronoamperometryczne [155].

Jak już wcześniej zasygnalizowano, całkowity ładunek (Q_{total}) zmierzony techniką CC w odpowiedzi na zmianę potencjału pochodzi z trzech źródeł [154,157]:

- ładowania warstwy podwójnej między powierzchnią elektrody a przylegającą warstwą roztworu elektrolitu (Q_{dl}),
- elektrolizy (utlenienia lub redukcji) zaadsorbowanych z roztworu elektrolitu na powierzchni elektrody cząsteczek depolaryzatora (Q_{ads}),
- elektrolizy cząsteczek depolaryzatora dyfundujących z roztworu elektrolitu podczas pomiaru CC (Q_{diff}).

Można to zapisać wzorem:

$$Q_{total} = Q_{diff} + Q_{dl} + Q_{ads}$$

Po rozwinięciu poszczególnych wyrażeń wyżej wymienionego wzoru uzyskuje się następującą zależność [155,158]:

$$Q_{total} = \frac{2nFAD_o^{1/2}C_o^*}{\pi^{1/2}}t^{1/2} + Q_{dl} + nFA\Gamma_o$$

gdzie:

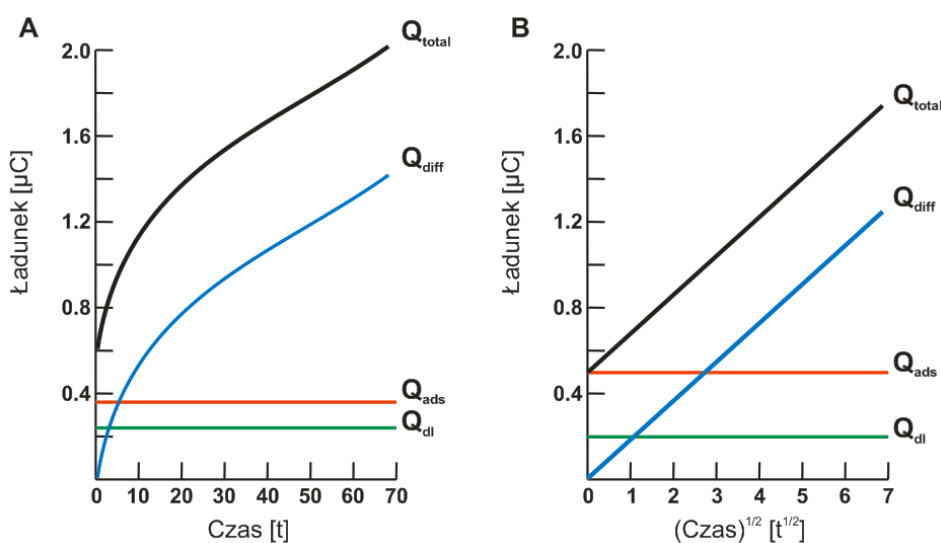
n, F, A, C_o, D_o, t – oznaczenia wielkości takie same, jak w równaniu Cottrella,

Q_{dl} – ładunek pojemnościowy [C],

$nFA\Gamma_o$ – ładunek z redukcji Γ_o [mol/cm²] zaadsorbowanych na elektrodzie cząsteczek depolaryzatora.

Wkład poszczególnych mierzonych ładunków Q_{diff} , Q_{ads} i Q_{dl} do całkowitego Q_{total} obserwowanego w typowym pomiarze CC został zaprezentowany na rysunku 11A. W przypadku odniesienia uzyskiwanych wartości ładunków względem pierwiastka kwadratowego z wartości czasu trwania pomiaru chronokulometrycznego (rys. 11B) można

zaobserwować, że wielkość całkowitego zmierzonego ładunku (Q_{total}) układa się w zależność liniową względem wartości \sqrt{t} , która przyjmuje ogólną postać równania typu $y = ax + b$. W takim ujęciu za zmienną zależną (y) można uznać ładunek Q_{total} , zmienną niezależną (x) wartość \sqrt{t} . Współczynnik nachylenia danej prostej (a) byłby zależny od wielkości ładunku Q_{diff} , natomiast punkt przecięcia się prostej $Q_{total} = f(\sqrt{t})$ z osią rzędną (przy $t = 0$) równałby się sumie wartości ładunków Q_{ads} i Q_{dl} . Przedstawione porównania są istotne, ponieważ odpowiednio dobierając serię pomiarów chronokulometrycznych można wyznaczyć doświadczalnie wartości wszystkich składowych ładunku Q_{total} [153].

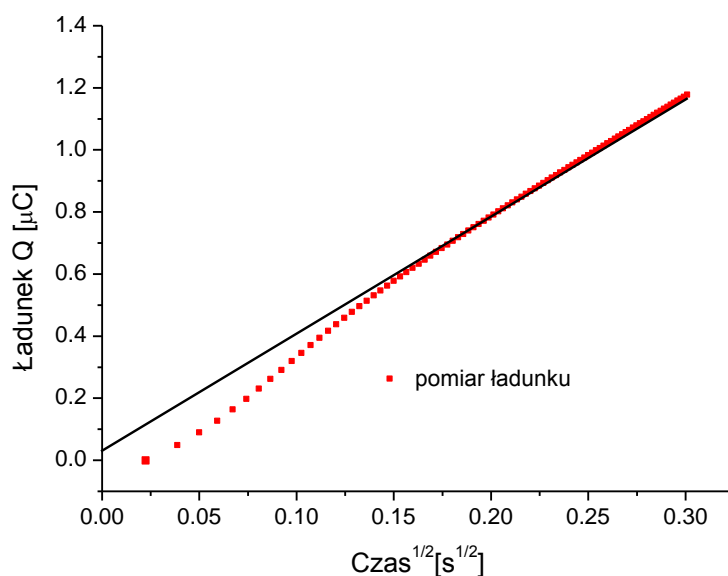


Źródło: Opracowanie własne na podstawie [153]

Rysunek 11. Zależność ładunku względem czasu (A) oraz ładunku względem wartości pierwiastka kwadratowego z czasu (B) w pomiarach chronokulometrycznych elektroaktywnych cząsteczek (zarówno tych zaadsorbowanych na elektrodzie, jak i znajdujących się w roztworze).

Mierząc wartości funkcji $Q_{total} = f(\sqrt{t})$ przy elektrodzie zanurzonej w roztworze elektrolitu z dodatkiem depolaryzatora, sprawdzany jest punkt przecięcia się prostej z osią rzędną (dla $t = 0$) i w ten sposób uzyskuje się sumę wartości Q_{ads} i Q_{dl} . Z kolei mierząc wartość $Q_{total} = f(\sqrt{t})$ przy elektrodzie zanurzonej w roztworze bez dodatku depolaryzatora, otrzymywana jest wielkość Q_{dl} . Dysponując wyznaczonymi wartościami sumy (Q_{ads} i Q_{dl}) oraz ładunku Q_{dl} możliwe jest obliczenie wielkości Q_{ads} . Przedstawione obliczenia są wykorzystywane między innymi do wyznaczania stężeń powierzchniowych cząsteczek zaadsorbo-

wanych na elektrodzie poddanej pomiarom CC oraz do obliczania powierzchni aktywnych tego typu przetwornika elektrochemicznego [155,157-162].



Źródło: Opracowanie własne.

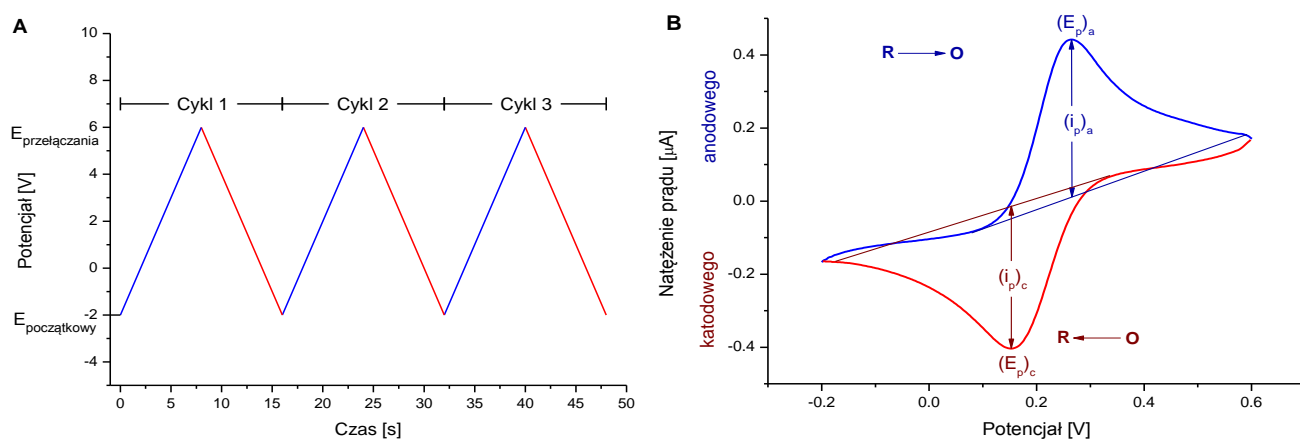
Rysunek 12. Pomiar chronokulometryczny (CC) redukcji cząsteczek chlorku heksaaminorutenu (III) zaadsorbowanych na elektrodzie złotej w 0.75 mM roztworze RuHex w 10 mM buforze TRIS-HCl (pH=7.4). Wyznaczanie wartości Q_{total} dla $t=0$.

Badania chronokulometryczne z racji wymaganych bardzo szybkich zmian wartości potencjału polaryzującego elektrodę mogą wiązać się z pewnymi niedogodnościami spowodowanymi z niedoskonałością sprzętu pomiarowego. Często zdarza się, że aparat kontrolujący poziom napięcia przykładanego do elektrody jest „zbyt wolny” i nie jest w stanie natychmiast zmienić wartości potencjału zgodnie z programem pomiaru CC (rys. 12) [155]. W takim przypadku, aby zachować wiarygodność wyników pomiarów CC, najczęściej pomija się pierwsze 20% rezultatów uzyskanych w czasie skoku potencjału (t_1 lub t_2) i wartość ładunku dla czasu $t = 0$ wyznacza się na podstawie pozostałych wyników [153].

4.1.2. Woltamperometria cykliczna

Mianem woltamperometrycznych metod elektroanalitycznych określa się zespół technik elektrochemicznych polegających na pomiarze natężenia prądu płynącego przez stacjonarną elektrodę pracującą w zależności od potencjału tej elektrody. Potencjał jest zmieniany zgodnie z określonym programem stosowanej techniki [152,163]. Zmierzone wartości natę-

zenia prądu w odniesieniu do przyłożonego napięcia tworzą tak zwaną krzywą woltamperometryczną. Jedną z najpowszechniej stosowanych technik elektroanalitycznych jest woltamperometria cykliczna (CV, ang. *Cyclic Voltammetry*). Pozwala ona na uzyskanie szeregu informacji jakościowych i ilościowych o reakcji elektrochemicznej oraz o środowisku, w którym ona zachodzi. Woltamperometria cykliczna wykorzystywana jest między innymi do badania termodynamiki procesów redoks, kinetyki procesów elektrodowych, przebiegu reakcji sprzężonych i procesów adsorpcji [150,152]. Jest ona także wykorzystywana do charakteryzowania ogólnego stanu powierzchni elektrody pracującej poprzez pomiar pojemności elektrycznej interfazy między danym przetwornikiem a zastosowanym roztworem elektrolitu [159,164,165]. Woltamperometria cykliczna jest również często wybierana jako pierwsze narzędzie analityczne w badaniach elektrochemicznych, ponieważ pozwala ona na szybką lokalizację potencjałów redoks stosowanych depolaryzatorów oraz na ocenę wpływu środowiska, w którym zachodzą procesy redoks [150,152].



Źródło: Opracowanie własne na podstawie [150,152,166]

Rysunek 13. Zależność przykładanego potencjału od czasu trwania pomiaru (A) oraz uzyskana krzywa woltamperometryczna (B) w pomiarze techniką woltamperometrii cyklicznej.

Pomiar realizowany techniką CV polega na cyklicznej zmianie potencjału elektrody stałej zanurzonej w stojącym roztworze elektrolitu i odnotowywaniu powstałego prądu. Program zmian napięć polaryzującego elektrodę ma kształt symetrycznego trójkąta (rys. 13A). Pojedynczy cykl polega na liniowej zmianie potencjału (E) tam i z powrotem między dwiema wartościami – początkową i przełączania. Szybkość zmian potencjału może być ustalona od 20 – 100 V/s (dla dużych elektrod) do nawet 10^6 V/s (dla bardzo małych

mikroelektrod) [152]. Zwiększając przykładane do elektrody napięcie pojawia się pik prądu anodowego (i_a) związany z utlenieniem ($R \rightarrow O$) będących w roztworze elektrolitu cząsteczek depolaryzatora (rys. 13B). Obserwowany prąd elektrody pracującej jest mierzony w warunkach, gdy transport depolaryzatora do/od elektrody ma charakter dyfuzyjny. Maksymalna wartość prądu i_a (wysokość anodowego piku prądu (i_p)_a) jest wyznaczana dla tak zwanego potencjału piku anodowego (E_p)_a. Po odwróceniu kierunku zmian potencjału, zmniejszając przykładane do elektrody napięcie, obserwowany jest pik prądu katodowego (i_c) wynikający z redukcji ($O \rightarrow R$) cząsteczek depolaryzatora. Maksymalna wartość prądu I_c (wysokość katodowego piku prądu (i_p)_c) jest oznaczana dla potencjału piku katodowego (E_p)_c [163].

Wielkość prądu mierzonego techniką CV (zarówno (i_p)_a jak i (i_p)_c) dla odwracalnej reakcji redoks elektroaktywnego depolaryzatora opisuje równanie Randlesa-Sevcika [150]:

$$i_p = kn^{3/2}AD^{1/2}V^{1/2}C$$

gdzie:

k – stała równa 269000,

n – ilość elektronów biorących udział w reakcji elektrodowej,

A – powierzchnia elektrody [cm^2],

D – współczynnik dyfuzji jonów depolaryzatora [cm^2/s],

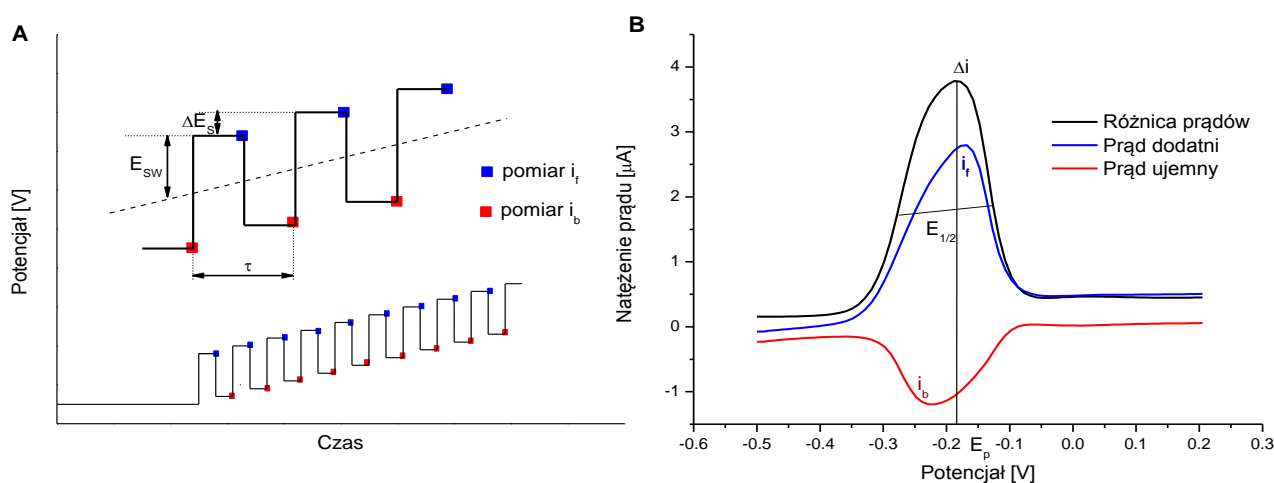
V – szybkość polaryzacji elektrody [V/s],

C – stężenie depolaryzatora w głębi roztworu [mol/dm^3].

Obserwowana wysokość sygnału elektrochemicznego (natężenia prądu anodowego lub katodowego) jest proporcjonalna do stężenia cząsteczek depolaryzatora obecnego w badanym roztworze oraz do pierwiastka kwadratowego prędkości zmian potencjału elektrody (szybkości polaryzacji elektrody) [166]. Analizując różnicę między wartością potencjału piku anodowego (E_p)_a a potencjałem piku katodowego (E_p)_c można dodatkowo ustalić, czy badany proces redoks danego depolaryzatora ma charakter odwracalny [152].

4.1.3. Woltamperometria fali prostokątnej

W pomiarach woltamperometrycznych przeprowadzanych na elektrodach stałych zanurzonych w stojących roztworach elektrolitów odnotowywane są dwa rodzaje prądu: faradajowski – związany z przemieszczaniem się elektronu (lub elektronów) w czasie procesu redoks depolaryzatora oraz pojemnościowy (ładowania, niefaradajowski) – powstający podczas ładowania warstwy podwójnej obecnej między powierzchnią elektrody a roztworem elektrolitu [152,155]. Drugi rodzaj prądu jest czasem wykorzystywany w oznaczeniach analitycznych (na przykład podczas pomiaru pojemności elektrycznej techniką CV), ale zazwyczaj utrudnia czułą analizę sygnału redoks badanego depolaryzatora. W celu zoptymalizowania stosunku wielkości prądu faradajowskiego do prądu pojemnościowego i uzyskania zdecydowanego wzrostu czułości pomiaru elektrochemicznego stosowane są tak zwane metody pulsowe. Polegają one na pomiarze prądu w funkcji czasu po pulsowej zmianie potencjału elektrody pracującej [152]. Jedną z najpopularniejszych technik pomiarowych zaliczanych do danej grupy jest woltamperometria fali prostokątnej (SWV, ang. *Square-Wave Voltammetry*).



Źródło: Opracowanie własne na podstawie [150,152]

Rysunek 14. Wykres zmian potencjału przykadanego do elektrody pracującej przy pomiarach SWV w odniesieniu do czasu (A); krzywa woltamperometryczna SWV dla roztworu zawierającego badaną substancję elektroaktywną (B), E_p – potencjał redoks, Δi_p – natężenie prądu piku redoks, $E_{1/2}$ – potencjał półpiku redoks badanej substancji.

Program sterowania potencjałem polaryzującym elektrodę pracującą w technice SWV polega na nałożeniu na schodkowo zmieniającą się wartość napięcia przykadanego

do elektrody dodatkowych pulsów w postaci fali prostokątnej (rys. 14A). Puls dodatni fali prostokątnej jest połączony ze schodkową zmianą potencjału. Dodatkowo na wykresie (rys. 14A) oznaczono: czas odpowiadający jednemu okresowi fali (τ), wysokość pulsu prostokątnego (E_{sw}) oraz wysokość schodka (ΔE). W ciągu każdego okresu fali prostokątnej, prąd jest dwukrotnie próbkowany – odpowiednio pod koniec czasu trwania pulsu dodatniego (oznaczone kolorem niebieskim) i pulsu ujemnego (kolor czerwony). Ostatecznie, mierzony prąd (Δi) jest różnicą między prądem dodatnim (i_f) i prądem ujemnym (i_b), i jest jednocześnie wyższy od każdego z elementów składowych (rys. 14B).

Pomiar prądu pod koniec każdego pulsu skutecznie eliminuje wpływ prądu pojemnościowego na wynik oznaczenia [150]. Uzyskany sygnał (pik) oprócz zmierzonego natężenia prądu (Δi) opisywany jest dodatkowo wartościami potencjału piku (E_p) oraz potencjału półfali ($E_{1/2}$), które są charakterystyczne dla oznaczonej substancji elektroaktywnej. Jednak wielkości E_p i $E_{1/2}$ są zależne także od rodzaju użytej w pomiarach SWV elektrody, roztworu elektrolitu podstawowego, temperatury oraz pozostałych warunków pomiarowych (szybkość polaryzacji elektrody, amplituda pulsu, itp.) [167].

Uzyskiwana w czasie pomiaru SWV wartość natężenia prądu piku (i_p) jest równa w przybliżeniu wielkości obliczanej równaniem Barker'a [152]:

$$i_p = kn^2 E_{sw} \sqrt{DC}$$

gdzie:

- k – stała charakteryzująca układ elektrod,
- n – ilość elektronów biorących udział w reakcji elektrodowej,
- E_{sw} – amplituda fali prostokątnej [V],
- D – współczynnik dyfuzji jonów depolaryzatora [cm^2/s],
- C – stężenie depolaryzatora w głębi roztworu [mol/dm^3].

Z wyżej przedstawionego wzoru wynika, że obserwowane natężenie prądu piku jest proporcjonalne do stężenia cząsteczek depolaryzatora w badanym roztworze oraz do amplitudy fali prostokątnej. Technika SWV z racji swojej wysokiej czułości znalazła szerokie zastosowanie w oznaczeniach śladowej ilości związków elektroaktywnych w różnego rodzaju próbkach [167].

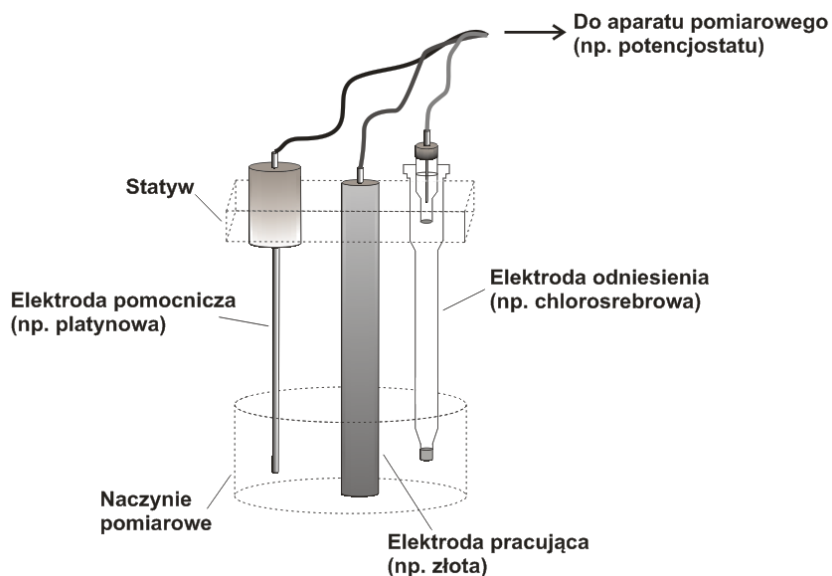
4.2. Elektrochemiczny układ pomiarowy

Poprawne przeprowadzenie pomiaru elektrochemicznego wymaga, aby układ pomiarowy był elektrycznie sprawny oraz odpowiednio dobrany do planowanego eksperymentu [168].

Konieczny jest właściwy wybór:

- zestawu elektrod: pracującej, odniesienia i pomocniczej,
- rozpuszczalnika i elektrolitu podstawowego,
- techniki elektroanalizy i jej parametrów,
- ustawienia układu elektrycznego (włącznie z doбором parametrów pracy potencjostatu).

W oznaczeniach elektrochemicznych z kontrolowaną zmianą potencjału stosuje się zazwyczaj trójelektrodowy układ pomiarowy składający się z elektrody pracującej (WE), odniesienia (RE) oraz pomocniczej (AE), które podłączone są do potencjostatu [151,152]. Schemat takiego układu przedstawia rysunek 15. Rola poszczególnych elementów danego zestawu oraz sposób ich prawidłowego przygotowania do działania opisane zostały w kolejnych punktach niniejszej pracy.



Źródło: Opracowanie własne

Rysunek 15. Schemat trójelektrodowego układu pomiarowego wykorzystywanego w pomiarach woltamperometrycznych.

4.2.1. Środowisko pomiarowe

Podstawowe wyposażenie niezbędne do wykonania pomiarów elektrochemicznych z kontrolowanym potencjałem jest stosunkowo niedrogi i powszechnie dostępne. W składzie takiego zestawu powinny się znaleźć przede wszystkim naczynie do pomiarów wraz z układem elektrod oraz aparat przeznaczony do generowania napięcia polaryzacyjnego połączony z układem pomiaru prądu i rejestratorem [150]. Bardzo ważny jest także dobór odpowiedniego rozpuszczalnika, w którym będzie się znajdować badana substancja oraz roztworu elektrolitu podstawowego zapewniającego właściwy przebieg oznaczenia elektrochemicznego [152]. Opcjonalne wyposażenie stanowi układ do usuwania tlenu z badanego roztworu, mieszadło lub tak zwana klatka Faradaya [151]. Elektrody wykorzystywane w pomiarach z kontrolowaną zmianą potencjału szczegółowo omówiono w kolejnych punktach pracy. Poniżej opisane zostały pozostałe elementy elektrochemicznego układu pomiarowego.

W pomiarach ze sterowanym potencjałem powszechnie używane są naczynia trójelektrodowe. Zazwyczaj są to zwykle pojemniczki z wieczkiem zawierającym otwory na trzy elektrody oraz rurkę do usuwania rozpuszczonego w próbce tlenu [152]. Kształt i rozmiar naczynia oraz materiał użyty do jej konstrukcji zależą od rodzaju planowanego oznaczenia i od rodzaju próbki. Najczęściej stosowane są naczynia szklane, ale w razie potrzeby wykorzystuje się również kwarcowe lub teflonowe [169]. W niektórych przypadkach naczynia umożliwiają termostatowanie próbki (zainstalowany płaszcz wodny) lub pozwalają na użycie mieszadła magnetycznego.

Wykonanie pomiaru elektroanalitycznego z kontrolowanym potencjałem wymaga doprowadzenia do układu elektrod napięcia polaryzującego, które zmienia się zgodnie z programem charakterystycznym dla danej techniki pomiarowej i według ustalonych warunków danego oznaczenia. Jednocześnie konieczny jest pomiar prądu przepływającego przez elektrodę pracującą i rejestracja wyników oznaczenia w zależności od napięcia polaryzacyjnego [151]. Współcześnie wszystkie te zadania spełnia trójelektrodowy potencjostat, który jednocześnie umożliwia polaryzację elektrody pracującej odpowiednim napięciem i pomiar prądu płynącego przez tę elektrodę [152]. Z cech, które musi spełniać prawidłowo funkcjonujący potencjostat, wymienia się zdolność do szybkiej zmiany potencjału, niskie zakłócenia i wysoka impedancja wejściowa [168].

Wszystkie pomiary elektrochemiczne są wykonywane w ośrodku złożonym z rozpuszczalnika zawierającego jony elektrolitu podstawowego oraz ewentualnie jony badanego

związku elektroaktywnego (depolaryzatora) [170]. Wybór rozpuszczalnika jest przede wszystkim uzależniony od rodzaju oznaczanego składnika i jego aktywności elektrochemicznej w danym środowisku, przewodności elektrycznej samego rozpuszczalnika, jego aktywności elektrochemicznej i reaktywności chemicznej (nie powinien reagować z badaną substancją lub produktami reakcji) [152,170]. Najczęściej stosowanym rozpuszczalnikiem jest woda, chociaż nie jest ona uniwersalnym środkiem. Czasem konieczne jest użycie niewodnych rozpuszczalników np. acetonitrylu, dla którego stężenie wody musi być niższe niż stężenie oznaczanej substancji [150,168].

W omawianych pomiarach elektroanalitycznych dodatkowo wymagane jest stosowanie elektrolitów podstawowych. Zapewniają one przewodnictwo jonowe badanego roztworu, obniżają jego oporność oraz prowadzą do wyeliminowania prądu migracyjnego [152,170]. Elektrolitami podstawowymi mogą być sole nieorganiczne, kwasy nieorganiczne lub roztwory buforów. Nie mogą one jednak oddziaływać z materiałem elektrody, ani z oznaczanymi substancjami. Elektrolit podstawowy powinien być przygotowany z odczynników o najwyższym stopniu czystości. Jego stężenie zazwyczaj wynosi od 0.1 do 1.0 M i powinno być co najmniej stukrotnie większe od stężenia oznaczanych związków chemicznych [150,152].

Dodatkowym elementem środowiska pomiarowego może być instalacja do usuwania tlenu z badanej próbki. Jest to wymagane, gdy oznaczenie elektrochemiczne przeprowadzane jest z użyciem ujemnych potencjałów. Najczęściej tlen jest usuwany poprzez przepuszczenie przez badany roztwór pęcherzyków czystego azotu lub argonu [150].

W przypadku pomiarów bardzo małych ilości badanych substancji korzystne jest umieszczenie układu pomiarowego w tak zwanej klatce Faradaya. Ta prosta instalacja zapewnia dobrą ochronę przed zakłóceniami elektrycznymi podczas wykonywanych oznaczeń elektrochemicznych [168].

4.2.2. Elektroda pracująca

W trójelektrodowym układzie pomiarowym – obecnie najczęściej wykorzystywanym w oznaczeniach z kontrolowaną zmianą potencjału – kluczową rolę odgrywa elektroda pracująca. To na jej powierzchni zachodzą procesy będące podstawą pomiaru elektrochemicznego. Z tego względu ważne jest, aby charakterystyka jej pracy zapewniała wysoki poziom mierzonego sygnału w odniesieniu do wielkości zakłóceń oraz gwarantowała powtarzalność oznaczeń [171]. Mając to na uwadze, najważniejsze kryterium przy wyborze elektrody pracującej stanowi sposób zachowania się badanej substancji na powierzchni

danego przetwornika oraz odpowiedź tła w zakresie potencjałów, w którym będą przeprowadzane pomiary. Dodatkowo pod uwagę brane są takie parametry, jak zakres polaryzacji elektrody i zakres potencjałów, w którym wykazuje ona cechy elektrody idealnie polaryzowalnej, przewodnictwo elektryczne, odtwarzalność powierzchni, właściwości mechaniczne, koszt, dostępność i toksyczność materiałów, z jakich jest ona wykonana [150]. Najbardziej zbliżoną do elektrody idealnie polaryzowalnej jest elektroda rtęciowa. Ponadto posiada ona prawie idealnie gładką i czystą powierzchnię. Jednak zakres potencjałów, w którym pracuje elektroda rtęciowa dotyczy niemal wyłącznie zakresu katodowego, gdzie najczęściej zachodzi redukcja badanych związków elektroaktywnych (depolaryzatorów) [151]. Wiele obaw budzi także materiał, z jakiego wykonana jest dana elektroda. Aby otrzymać elektrodę pracującą w zakresie potencjałów dodatnich – obecnie najczęściej stosowanych w oznaczeniach elektrochemicznych – można wykorzystać elektrodę stałą. Tego typu przetwornik jest zazwyczaj wykonywany z metali szlachetnych (Au, Pt) lub różnych odmian materiałów węglowych [11].

Elektrody stałe najczęściej występują w postaci dysków umiejscowionych w osłonie z odpornego chemicznie tworzywa sztucznego. Wyjątkami od tej reguły są na przykład elektrody złote wykonane poprzez napylenie cząsteczek tego metalu w próżni na odpowiednio przygotowaną powierzchnię lub elektrody drukowane [150]. Elektrody stałe w porównaniu z przetwornikami opartymi na rtęci wymagają bardziej czasochłonnego przygotowania [172]. Przed pomiarem elektrochemicznym (lub ewentualnie modyfikacją) powierzchnia elektrody musi być dokładnie wyczyszczona – najczęściej poprzez polerowanie mechaniczne lub sposobem elektrochemicznym. W niektórych przypadkach w celu uzyskania powtarzalnych wyników pomiarów elektrody poddawane są dodatkowo procesowi aktywacji [168].

Wśród najpopularniejszych przetworników elektrochemicznych stosowanych w pomiarach z kontrolowaną zmianą potencjału znajdują się elektrody węglowe oraz elektrody wykonane ze złota. Pierwsze z nich uzyskały ogromną popularność głównie dzięki szerokiemu zakresowi potencjałów, w którym pracują, niskim prądom tła, dużym możliwościom modyfikacji powierzchni oraz obojętności chemicznej samego materiału, z jakiego wykonany jest dany przetwornik [150]. Poszczególne rodzaje elektrod węglowych posiadają różne mikrostruktury wewnętrzne oraz strukturę chemiczną powierzchni w zależności od typu materiału i sposobu jego przetwarzania. W konsekwencji różnią się one także właściwościami elektrochemicznymi [172]. W oznaczeniach z kontrolowaną zmianą potencjału szerokie zastosowanie znalazły między innymi elektrody wykonane z węgla szklanego (GCE,

ang. *Glassy Carbon Electrode*) oraz z pasty węglowej (CPE, ang. *Carbon Paste Electrode*) [150,171]. Elektrody GCE charakteryzują się bardzo dobrymi właściwościami mechanicznymi, chemicznymi i elektrycznymi, co widać w odniesieniu do szerokiego zakresu potencjału, w jakim są one wykorzystywane, możliwości modyfikacji powierzchni i wysokiej powtarzalności po zabiegach przygotowania do pracy [150]. Są one często używane jako przetworniki elektrochemiczne w badaniach cząsteczek biologicznie czynnych, takich jak zasady azotowe wchodzące w skład kwasów nukleinowych [173,174], kwasy nukleinowe [175,176] lub chinony [177]. Z kolei elektrody CPE dzięki łatwości w odtwarzaniu i modyfikacji powierzchni roboczej zyskały miano jednego z najbardziej popularnych przetworników wykorzystywanych w konstrukcji różnego rodzaju sensorów elektrochemicznych [178]. Modyfikacja tego typu elektrod polega najczęściej na wprowadzeniu do pasty węglowej dodatków, które same zmieniają właściwości przetwornika, albo umożliwiają dokonanie dalszych udoskonaleń jego powierzchni [150,178]. Elektrody CPE są także często stosowane w elektrochemicznych badaniach właściwości różnych cząsteczek biologicznie czynnych – na przykład oligonukleotydów [179], DNA [180, 181] lub awidyny [182].

Mimo swoich oczywistych zalet elektrody węglowe posiadają zdecydowanie niższą szybkość transportu elektronów na powierzchni atomów węgla niż elektrody wykonane z metali [172]. Może to wpływać na warunki przepływu prądu powstałego w oznaczeniach elektroanalitycznych. W ostatnich latach bardzo duże zainteresowanie zyskały elektrody złote, które oprócz dobrych właściwości elektrycznych (szybka kinetyka przepływu elektronów dla wielu układów redoks) odznaczają się także szerokimi możliwościami modyfikacji powierzchni poprzez samoorganizujące się monowarstwy [183,184]. Elektrody złote występują w formie dysków zatopionych w materiale izolującym lub w postaci cienkich filmów naniesionych na specjalnie przygotowane podłoże. Te drugie są najczęściej wykorzystywane w badaniach struktur modyfikujących powierzchnię przetwornika przeprowadzanych przy użyciu technik pomiarowych, takich jak powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR), refleksyjno-absorpcyjna spektroskopia w podczerwieni (RAIRS), mikrowaga kwarcowa (QCM) czy elipsometria [185]. W zależności od potrzeb struktura złota wykorzystanego do produkcji przetwornika pozostaje niezorganizowana (polikrystaliczna) lub celowo uporządkowana (monokrystaliczna). Szczegółowy opis modyfikacji powierzchni elektrod złotych i ich wykorzystania w układach biosensorowych zawarty został w dalszej części pracy.

4.2.3. Elektroda odniesienia i pomocnicza

Potencjał elektrody pracującej jest kontrolowany przy pomocy elektrody referencyjnej (odniesienia). Elektroda ta posiada stabilny potencjał (niezależny od składu badanej próbki) i powinna być idealnie niepolaryzowalna – jej potencjał pozostaje niezmienny niezależnie od wielkości prądu przepływającego przez elektrodę pracującą [186]. W pomiarach elektrochemicznych na elektrodach stałych z kontrolowaną zmianą potencjału jako elektrodę odniesienia najczęściej wykorzystuje się elektrodę II rodzaju (odwracalną względem wspólnego anionu) chlorosrebrową lub nasyconą kalomelową [151,152]. Pierwsza z nich jest ostatnio szczególnie popularna w oznaczeniach elektroanalitycznych ze względu na zwartość konstrukcji oraz brak rtęci w swojej budowie (w przeciwieństwie do nasyconej elektrody kalomelowej). Aby ochronić elektrodę referencyjną przed bezpośrednim wpływem próbki często jest ona dodatkowo wyposażona w klucz elektrolityczny [186].

Trójelektrodowy układ pomiarowy połączony z potencjostatem do swojej prawidłowej pracy potrzebuje oprócz elektrody pracującej i referencyjnej także trzeciej elektrody określanej mianem pomocniczej [168]. W tym układzie zapewnia ona przepływ mierzonego prądu między swoją powierzchnią a elektrodą pracującą. Elektroda pomocnicza jest najczęściej wykonana z metalu szlachetnego (przeważnie platyny) lub węgla szklanego (co jest zdecydowanie rzadziej spotykane) [150,151]. W celu zminimalizowania możliwych zakłóceń pomiaru ze strony elektrody pomocniczej zaleca się, aby jej powierzchnia była znacząco większa od powierzchni elektrody pracującej [168].

4.3. Modyfikacje złotej elektrody pracującej

Modyfikacje powierzchni elektrody pracującej przeprowadzane są z wielu powodów. Wśród najczęściej wymienianych przedstawia się wzrost selektywności i czułości otrzymanego układu elektroanalitycznego, poprawę stabilności chemicznej i elektrochemicznej modyfikowanego przetwornika oraz zwiększenie jego odporności na zanieczyszczenia [171,187]. Elektrody zmodyfikowane chemicznie uzyskuje się najczęściej poprzez pokrycie materiału przewodnika (lub ewentualnie półprzewodnika) jonowym albo polimerowym filmem zbudowanym z jednakowych lub różnych cząsteczek. Zmieniają one elektrochemiczne, optyczne lub inne właściwości przestrzeni (interfazy) między powierzchnią przetwornika a otaczającym ją środowiskiem [187].

W przypadku elektrod metalowych bardzo prostym i jednocześnie wszechstronnym sposobem uzyskania pożądaných właściwości i możliwości aplikacyjnych jest modyfikacja powierzchni oparta o wykorzystanie samoorganizujących się monowarstw (SAM, ang. *Self-Assembled Monolayers*) [14,183]. W ostatnim czasie szczególną popularność zyskały struktury zbudowane z cząsteczek posiadających atomy siarki (głównie alkanotiole, sulfidów i disulfidów alkilowych) i utworzone w wyniku chemisorpcji na powierzchni złota [188-190]. Tego rodzaju monowarstwy są obecnie najlepiej poznanymi samoorganizującymi się układami w zakresie stabilności i właściwości fizykochemicznych powstałego filmu [185]. Są one stosunkowo łatwe do przygotowania i umożliwiają proste wprowadzenie w swoją strukturę cząsteczek przeznaczonych do badań lub do tworzenia systemów biodetekcji. Dobierając odpowiednie elementy wchodzące w skład warstwy SAM (budujące jej strukturę mikroskopową) można otrzymać powierzchnię o pożądaných właściwościach makroskopowych [14]. Jednak, aby nowoutworzone struktury posiadały pożądanę cechy konieczne jest odpowiednie przygotowanie powierzchni złota przed modyfikacją [184].

Przygotowanie powierzchni elektrod złotych zależy od materiału z jakiego zostały one wykonane oraz od rodzaju planowanej dalszej modyfikacji przetwornika. Wśród najczęściej stosowanych sposobów wymienia się polerowanie mechaniczne (z użyciem papieru ściernego, zawieszin diamentowych, aluminiowych, korundu lub innych minerałów), traktowanie chemiczne (trawienie kwasami, zasadami, innymi chemicznie aktywnymi mieszaninami), elektrochemiczne przemiatawanie potencjałem (lub poddawanie kondycjonowaniu przy określonej wartości potencjału) oraz wykorzystanie innych czynników fizycznych (np. ultrasonifikacja w środowisku wodnym, alkoholowym, itp.) [164,172,191,192]. Proces przygotowania elektrody zazwyczaj rozpoczyna się od mechanicznego usuwania niepożądanych substancji z powierzchni złota. Następnie elektroda wystawiana jest na działanie czynników utleniających i – w zależności od potrzeb – powierzchniowe tlenki złota są później chemicznie zredukowane bądź pozostają [192]. Często po wyżej wymienionych zabiegach stosowane są etapy traktowania termicznego lub elektrochemicznego, które mają na celu wygładzenie i utworzenie aktywnej powierzchni [164,193]. Skuteczność procesu przygotowania elektrod złotych można sprawdzić wyznaczając elektrochemiczne pole powierzchni elektrody i porównując je z obliczonym polem geometrycznym – uzyskując tym samym tak zwany współczynnik szorstkości powierzchni [192,194].

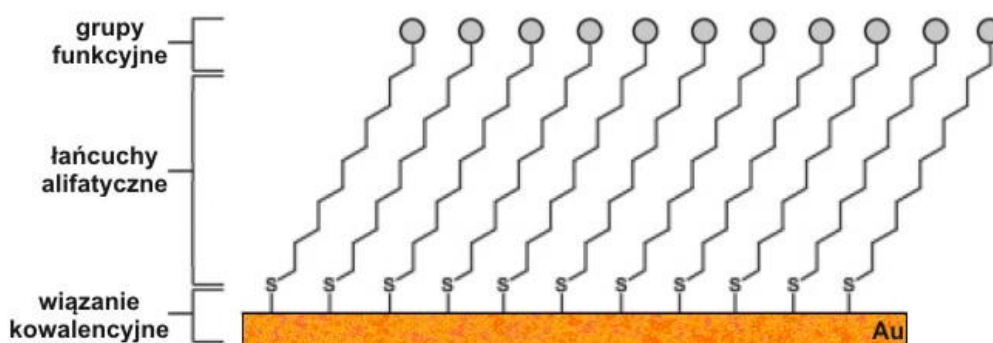
4.3.1. Samoorganizujące się monowarstwy

Samoorganizacja cząsteczkowa jest spontanicznym procesem organizacji molekuł, które znajdują się w warunkach równowagi dynamicznej, w strukturalnie określone i stabilne układy. Wskutek obecności oddziaływań niekowalencyjnych, takich jak wiązania wodorowe, siły elektrostatyczne oraz oddziaływania van der Waalsa, powstają zhierarchizowane układy [188]. Podstawowym warunkiem ich istnienia jest odpowiednia chemiczna komplementarność i strukturalna kompatybilność cząsteczek tworzących nowopowstałą strukturę. Mimo że wymienione oddziaływania są z natury słabe, ich wspólna siła prowadzi do utworzenia stabilnych makroskopowych struktur [195]. Najpopularniejszym układem typu SAM jest chemisorpcja cząsteczek zawierających grupy tiolowe lub dwusiarczki na powierzchni złota. Stosując bardzo rozcieńczone roztwory na powierzchni przetwornika otrzymywane są struktury o pożądanymi właściwościami fizycznymi i chemicznymi [190]. Biorąc pod uwagę możliwości praktycznego wykorzystania, największy potencjał aplikacyjny prezentują alkanotiolowe monowarstwy SAM. Inne cząsteczki, takie jak dialkylsulfidy lub disulfidy alkilowe, są zdecydowanie mniej efektywne w tworzeniu samoorganizujących się struktur [183].

Struktura, gęstość upakowania i stopień organizacji warstwy SAM zależy od szeregu czynników, wśród których najważniejsze wiążą się ze stanem modyfikowanego podłoża (jego rodzaj, szorstkość, czystość), budową unieruchamianych cząsteczek (rozmiar, kształt, obecność poszczególnych grup funkcyjnych) oraz przebiegiem samego procesu tworzenia monowarstwy (czas imersji, temperatura, rozpuszczalnik, stężenie i czystość adsorbatów, itd.) [184,189]. Sam proces formowania samoorganizujących się tiolowych struktur na powierzchni złota przebiega dwuetapowo [185]. W pierwszej kolejności zachodzi chemisorpcja cząsteczek adsorbentu na powierzchni metalu poprzez oksydacyjną reakcję addycji grup $-SH$ do złota. Powstają spolaryzowane wiązania kowalencyjne S-Au utrzymujące całą strukturę SAM na modyfikowanym podłożu. W drugim etapie (bardziej długotrwałym) unieruchomione cząsteczki ulegają samoorganizacji pod wpływem bocznych oddziaływań między poszczególnymi elementami monowarstwy [188].

Uzyskana tiolowa SAM modyfikująca elektrodę złotą jest warstwą cienkiego filmu o nanometrowych rozmiarach pokrywającą powierzchnię danego metalu [190]. Podstawowa forma tego typu monowarstwy składa się z trzech zasadniczych części (rys. 16). Najbliżej powierzchni elektrody znajdują się grupy czołowe pojedynczych cząsteczek budujących SAM, które mocują ją silnie do podłoża poprzez wiązanie kowalencyjne. Powyżej

występują zazwyczaj łańcuchy alkilowe, które dzięki oddziaływaniom niekowalencyjnym (głównie sił van der Waalsa) zapewniają stabilność całej struktury [184]. Końcowe grupy funkcyjne poszczególnych cząsteczek wchodzących w skład SAM zapewniają kontrolowane właściwości i reakcyjność monowarstwy [185]. Dla porównania: wprowadzenie grup hydroksylowych zapewnia hydrofilowość modyfikowanej powierzchni, grup metylowych – hydrofobowość [14]. Dzięki odpowiedniemu doborowi końcowych grup funkcyjnych, specyficzne oddziaływanie monowarstwy SAM może być wykorzystane w unieruchomieniu kolejnych cząsteczek na powierzchni elektrody złotej [190].



Źródło: Na podstawie [14]

Rysunek 16. Schemat budowy samoorganizującej się monowarstwy utworzonej z funkcyjnych alkanotioli na powierzchni złota.

Popularne jest także formowanie mieszanych samoorganizujących się monowarstw, w których poszczególne elementy składowe odpowiadają za inne funkcje nowopowstałej struktury [183]. Przykładem może być mieszana warstwa SAM zaprezentowana przez S. Choi i W.L. Myrphy'ego, która umożliwiała jednoczesne specyficzne związanie fragmentu kwasu nukleinowego, adhezję komórki oraz zapobieganie niespecyficznej adsorpcji niepożądanych cząsteczek [196]. W tym przypadku jednoniciowa sonda DNA unieruchomiona na powierzchni złota poprzez heksanotiolowy łącznik pozwalała na związanie komplementarnego fragmentu kwasu nukleinowego. Z kolei do cząsteczek alkanotioli zakończonych grupą karboksylową przyłączono peptyd Gly-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro, który umożliwiał adhezję komórek. Pozostała przestrzeń monowarstwy SAM była wypełniona przez cząsteczki alkanotioli zakończone tri(glikolem etylenu) sprawiające, że nowopowstała powierzchnia była odporna na niespecyficzne oddziaływania innych cząsteczek.

Budowa i właściwości samoorganizujących się monowarstw utworzonych na złocie mogą być oceniane przy użyciu różnych technik analitycznych: pomiaru kąta zwilżania [197], metod spektroskopowych [198,199], różnych odmian mikroskopii skaningowej [149,200], pomiarów elipsometrycznych oraz techniki SPR [201]. Elektrochemiczna ocena monowarstw SAM najczęściej odbywa się przy pomocy pomiarów spektroskopii EIS lub woltamperometrii CV [149,202]. Badania woltamperometryczne pozwalają na ustalenie ogólnej charakterystyki spójności monowarstwy oraz częstotliwości występowania defektów [185]. Wyznaczając wartość pojemności elektrycznej interfazy między powierzchnią zmodyfikowanej elektrody a roztworem mocnego elektrolitu można sprawdzić, na ile nowopowstała SAM ściśle pokrywa powierzchnię przetwornika [164,190]. Z kolei pomiary techniką EIS mogą dostarczyć informacji na temat zdolności monowarstwy do przewodzenia elektronów (poprzez pomiar rezystancji SAM) [161]. Obserwując zmieniające się właściwości monowarstwy możliwe jest także śledzenie kinetyki procesu formowania się tego typu struktur na powierzchni elektrody [158,202].

4.3.2 Immobilizacja sond DNA

Najprostsze techniki immobilizacji cząsteczek kwasów nukleinowych na powierzchni elektrod stałych opierają się na wykorzystaniu oddziaływań elektrostatycznych między ujemnie naładowanym szkieletem cukrowo-fosforanowym DNA a dodatnio spolaryzowaną powierzchnią elektrody [148]. Jednak zastosowanie tego typu procedury może prowadzić do ograniczenia specyficznych właściwości danej cząsteczki, jej niestabilnego związania lub zmniejszenia możliwości wykorzystania do celów analitycznych. Użycie samoorganizujących się struktur do unieruchomienia cząsteczek DNA na powierzchni elektrody złotej może rozwiązać większość wyżej wspomnianych ograniczeń. Jednopunktowe związanie nici kwasu nukleinowego (przy końcu 5' lub 3') pozwala na silne unieruchomienie jej na powierzchni przetwornika przy jednoczesnym utrzymaniu pełnej konformacyjnej swobody DNA [147,161,190].

Kowalencyjne unieruchomienie fragmentów kwasów nukleinowych na powierzchni elektrod złotych zmodyfikowanych samoorganizującą się monowarstwą może być przeprowadzone w dwojaki sposób. Pierwszy z nich polega na uprzednim przygotowaniu podłoża poprzez uformowanie warstwy SAM wyposażonej w grupy ligandów, które później łączą się z immobilizowanymi cząsteczkami DNA [183]. Tego typu rozwiązanie zostało wykorzystane w przygotowaniu elektrochemicznego biosensora DNA do wykrywania

organizmów zmodyfikowanych genetycznie [203]. Samoorganizująca się warstwa zbudowana z cząsteczek cysteaminy posłużyła do unieruchomienia sondy ssDNA na powierzchni elektrody złotej. Jednoniciowy fragment DNA został połączony z grupami aminowymi warstwy SAM poprzez wiązanie amidowe utworzone przy współudziale pochodnych karbodiimidowych (EDC, NHS). Konstrukcja warstwy detekcyjnej biosensora oparta o samoorganizującą się monowarstwę cysteaminy umożliwiła pewne unieruchomienie sondy na powierzchni elektrody złotej oraz zwiększyła jej dostępność dla wykrywanego komplementarnego fragmentu DNA.

Drugi sposób immobilizacji DNA na powierzchni złota z wykorzystaniem monowarstwy SAM wiąże się z wprowadzeniem do unieruchamianego fragmentu kwasu nukleinowego łącznika wyposażonego w grupy tiolowe. Najczęściej stosowane są w tym celu alifatyczne cząsteczki merkptoalkilowe posiadające w swojej strukturze 3 lub 6 atomów węgla. Sondy DNA wyposażone w tego typu łącznik (na jednym ze swoich końców) są następnie wykorzystywane do formowania monowarstw na powierzchni elektrod złotych [159]. Tiolowane sondy ssDNA są obecnie często stosowane w elektrochemicznych biosensorach DNA opartych na reakcji hybrydyzacji z docelowymi fragmentami kwasów nukleinowych [190]. Najczęściej występują one w mieszanych samoorganizujących się monowarstwach w połączeniu z cząsteczkami merkptoalkoholi tworzącymi wypełnienie SAM. Tego typu układ został wykorzystany między innymi jako model do badania wpływu struktury chemicznej powierzchni przetwornika na hybrydyzację DNA w warstwie detekcyjnej biosensora [157,159,190,198,204,205]. Wprowadzenie drugiego składnika do monowarstwy zbudowanej z tiolowanych sond ssDNA pozwoliło uzyskać także inne dodatkowe korzyści. Cząsteczki merkptoalkoholu wypełniają strukturę warstwy SAM i zabezpieczają powierzchnię elektrody przed niespecyficzną adsorpcją innych związków chemicznych [198,206]. Grupy alkoholowe wypełniacza odpychają ujemnie naładowane łańcuchy DNA, co powoduje, że unieruchomiona sonda ssDNA jest skierowana do badanego roztworu [207]. Odpowiednio dobierając stężenie i sposób immobilizacji obu składników mieszanej SAM można kontrolować stopień pokrycia powierzchni elektrody przez jednoniciowe cząsteczki DNA. W tym przypadku konieczna jest jednak ostrożność, ponieważ zbyt długi czas wprowadzania cząsteczek merkptoalkoholu może powodować desorpcję ssDNA z powierzchni złota [159,208]. Mimo powyższych zastrzeżeń taki sposób przygotowania mieszanych SAM jest wykorzystywany w wielu elektrochemicznych biosensorach DNA [158,160,162,209,210].

5. Systemy detekcji hybrydyzacji w elektrochemicznych biosensorach DNA

Efektywnie działające elektrochemiczne biosensory DNA przeznaczone do wykrywania specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych powinny spełniać trzy najważniejsze wymagania. Po pierwsze, konstrukcja warstwy detekcyjnej urządzenia ma zapewniać trwałe związanie sond ssDNA jednocześnie umożliwiając specyficzne rozpoznanie docelowego DNA [148]. Po drugie, reakcja hybrydyzacji stanowiąca podstawę pracy tego typu biosensora musi przebiegać w warunkach umożliwiających selektywne i efektywne tworzenie dwuniciowych struktur kwasów nukleinowych na powierzchni przetwornika [110]. Trzecim wymogiem jest sprawny system detekcji hybrydyzacji DNA, który w wiarygodny sposób pozwala na odróżnić pozytywne i negatywne rezultaty całego procesu biodetekcji [12].

W przypadku elektrochemicznych biosensorów DNA ocenę wyników oddziaływania sond ssDNA z badanymi próbkami kwasów nukleinowych przeprowadza się najczęściej mierząc bezpośrednio odpowiedź elektrochemiczną cząsteczek DNA, monitorując sygnał elektroaktywnych wskaźników (rozdzielających jedno- i dwuniciowe struktury kwasów nukleinowych) albo stosując drugą sondę tzw. wskaźnikową (w technikach dwuwarstwowych) [106,110,122].

5.1. Czynniki wpływające na proces hybrydyzacji DNA

Hybrydyzacja to proces, w wyniku którego dwie komplementarne nici kwasu nukleinowego łączą się ze sobą tworząc dwuniciową strukturę. W przypadku elektrochemicznych biosensorów DNA reakcja ta przeprowadzana jest najczęściej między unieruchomioną na powierzchni przetwornika sondą ssDNA i docelowym fragmentem kwasu nukleinowego (tDNA) [149]. Znacznie rzadziej wykorzystywane są techniki biosensorowe, w których dany układ jest stosowany w odwrotnej konfiguracji. W takiej sytuacji zaadsorbowane na powierzchni przetwornika cząsteczki tDNA wiążą się z komplementarnymi sondami ssDNA wprowadzonymi do roztworu hybrydyzacyjnego [142]. Z kolei w przypadku technik dwuwarstwowych reakcja hybrydyzacji przeprowadzana jest zazwyczaj dwukrotnie – raz w celu unieruchomienia docelowych fragmentów DNA w warstwie detekcyjnej biosensora (oddziaływanie z sondami ssDNA związanymi na powierzchni przetwornika) i ponownie w trakcie detekcji nowoutworzonych dwu-

niciowych odcinków DNA (najczęściej poprzez przyłączenie znakowanych sond wskaźnikowych do innego fragmentu tDNA) [110]. Tego typu rozwiązanie może być jednak zbyt złożone ze względu na konieczność przygotowania dwóch różnych sond i przeprowadzenia dwóch oddzielnych reakcji ich oddziaływania z tDNA [148].

Na przebieg procesu hybrydyzacji zachodzącego w trakcie pracy biosensora DNA wpływ ma wiele czynników. Jednym z najważniejszych jest konstrukcja warstwy detekcyjnej urządzenia. Forma sond ssDNA i sposób ich unieruchomienia na powierzchni elektrochemicznego przetwornika muszą spełniać dwa zasadnicze warunki [122]. Pierwszym warunkiem jest zachowanie w jak największym stopniu zdolności elementów warstwy detekcyjnej biosensora do specyficznego wiązania tDNA. W literaturze przytaczanych jest wiele sposobów immobilizacji sond ssDNA na powierzchni elektrod. W tym celu wykorzystawano między innymi proces adsorpcji fizycznej (często wspomaganą oddziaływaniami elektrostatycznymi), wiązanie z udziałem cząsteczek awidyny i biotyny, adsorpcję chemiczną oraz inne rodzaje wiązań kowalencyjnych [12,155]. Dwie ostatnie z wymienionych technik spełniają w najwyższym stopniu wcześniej wspomniane kryterium. W pierwszych próbach ich użycia na elektrodach złotych stosowano najczęściej samoorganizujące się monowarstwy zbudowane z reaktywnych cząsteczek tioli (wyposażonych w grupy aminowe lub karboksylowe), z którymi następnie wiązano kowalencyjnie jednoniciowe fragmenty DNA (przy współdziałaniu w tej reakcji związków karbodiimidowych) [122]. Obecnie najdogodniejszym sposobem immobilizacji sond jest wyposażanie ich w tiolowane łączniki, które ulegają chemisorpcji na powierzchni złota [190]. Dodatkowo wprowadzając do takiej monowarstwy ssDNA drugi składnik w postaci krótkich alkanotioli możliwe jest jej dokładniejsze zorganizowanie, które jednocześnie ogranicza niespecyficzne oddziaływanie elektrody z niepożądanymi w czasie detekcji cząsteczkami [206]. Tego rodzaju mieszana warstwa SAM zapewnia odpowiednią gęstość powierzchniową sond, która także wpływa na wydajność procesu hybrydyzacji z docelowym DNA [159,204]. Wprowadzenie cząsteczek alkanotioli poprawiających uporządkowanie nici DNA w warstwie detekcyjnej biosensora nie przeszkadza również w zapewnieniu drugiego wymogu stawianego tym strukturom w elektrochemicznych biosensorach. Mieszane SAM umożliwiają zachowanie przewodności elektrycznej interfazy elektroda-roztwór elektrolitu [122]. Wysoce zorganizowana monowarstwa jednopunktowo unieruchomionych sond ssDNA umożliwia swobodny przepływ ładunków powstałych w reakcjach redoks zachodzących na powierzchni przetwornika [12].

Przebieg procesu hybrydyzacji zależy również od długości sond ssDNA zastosowanych w warstwie detekcyjnej biosensora. Ilość zasad w sekwencji sondy musi być wystarczająca, aby zapewnić specyficzność oddziaływania z docelowym fragmentem DNA. Z drugiej strony nie może ona być zbyt duża, ponieważ długie cząsteczki ssDNA unieruchomione na powierzchni elektrody mogą sobie wzajemnie przeszkadzać w procesie hybrydyzacji [122]. W badaniach wpływu rozmiarów sond ssDNA na proces tworzenia dupleksów DNA najlepszą wydajność hybrydyzacji uzyskano dla 24-merowych oligonukleotydów unieruchomionych na powierzchni elektrody. Dalsze wydłużanie sond obniżało dostępność warstwy detekcyjnej dla docelowych fragmentów DNA [211].

Wydajność procesu hybrydyzacji warunkuje także środowisko, w jakim przebiega ten proces. Nie bez znaczenia jest stężenie jonów obecnych w roztworze hybrydyzacyjnym. Zazwyczaj w tym celu stosuje się roztwory wzbogacone chlorkiem sodu, którego jony korzystnie wpływają na przebieg formowania się dupleksów DNA [212]. Oprócz siły jonowej roztworu reakcyjnego na wydajność procesu hybrydyzacji wpływa także jego temperatura, skład i odczyn roztworu. Najczęściej reakcja przeprowadzana jest w temperaturze pokojowej [110,209,213]. Zwiększanie temperatury może nieco przyspieszyć formowanie się dupleksów DNA. Jednak w takich warunkach istnieje bardzo duże ryzyko desorpcji elementów monowarstwy SAM z powierzchni elektrody [214]. Reakcja hybrydyzacji w warstwie detekcyjnej biosensora przeprowadzana jest najczęściej w roztworach buforów fosforanowego, cytrynianowego (2xSSC) lub TRIS-HCl o pH z zakresu od 7.0 do 8.0 [149,159,203,209,215]. Czas trwania tej reakcji jest zróżnicowany – w zależności od zastosowanej procedury wynosił od 10 minut do godziny lub nawet dłużej [159,206,213,216,217]. Należy jednak zwrócić uwagę, iż wydłużanie czasu interakcji sond z badanym DNA może prowadzić do wystąpienia zjawiska niespecyficznego hybrydyzacji [110]. Zagadnieniu temu poświęcono więcej uwagi w części doświadczalnej niniejszej pracy.

5.2. Detekcja procesu hybrydyzacji kwasów nukleinowych

Po przeprowadzeniu interakcji sond ssDNA z ocenianym DNA dalsza praca układu biodetekcji skupia się na zbadaniu wyników tego oddziaływania. Zasadniczym celem jest sprawdzenie, czy na powierzchni biosensora powstały dwuniciowe fragmenty kwasu nukleinowego [110]. Wśród wielu różnorodnych technik detekcji hybrydyzacji można

wyróżnić te, które nie wymagają stosowania dodatkowych odczynników chemicznych (np. wskaźników, nośników redoks, substratów dla enzymów) w celu wywołania sygnału analitycznego. Rozwiązania takie określa się mianem technik bezodczynninkowych (ang. *reagent-less*). Prezentowane są także sposoby, które pomijają potrzebę chemicznej modyfikacji sond, fragmentów tDNA lub innych substancji oddziałujących z kwasami nukleinowymi – są to tak zwane techniki bezwskaźnikowe (ang. *label-free*) [122]. Pozostałe metody detekcji hybrydyzacji kwasów nukleinowych są najczęściej kombinacją jednego lub obu rozwiązań z zakresu pomijanego w technikach bezodczynninkowych lub bezwskaźnikowych.

Tabela 1. Techniki detekcji hybrydyzacji wykorzystywane w elektrochemicznych biosensorach hybrydyzacji DNA wg IUPAC.

Zasada detekcji	Przykład	Technika bezodczynninkowa (ang. <i>reagent-less</i>)	Technika bezwskaźnikowa (ang. <i>label-free</i>)
Naturalna aktywność elektryczna DNA	Utlenienie guaniny na elektrodach węglowych	Tak (może być połączona z przenośnikami redoks)	Tak
Wskaźniki redoks	Elektrostatyczne (aniony lub kationy)	Nie	Tak
	Związki łączące się z rowkami DNA, interkalatory	Nie	Tak
Wskaźniki redoks wiążące się kowalencyjnie	Związki metaloorganiczne, związki chelatowe metali, ugrupowania organiczne, nanocząsteczki	Tak (mogą być stosowane jako przenośniki redoks – przy użyciu rozpuszczalnego depolaryzatora)	Nie
Enzymy połączone z DNA	Fosfatazy, peroksydazy	Nie	Nie

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [12]

Wśród najpopularniejszych sposobów wykrywania dwuniciowych fragmentów DNA unieruchomionych na powierzchni elektrody wymienia się metody oparte o naturalną aktywność elektryczną kwasów nukleinowych, wykorzystujące elektroaktywne wskaźniki redoks (wiążące się z DNA w sposób kowalencyjny lub niekowalencyjny) i/lub oparte o aktywność katalityczną wybranych enzymów. Ogólne zestawienie opisanych wyżej metod detekcji hybrydyzacji i ich powiązanie z kategoriami technik bezodczynninkowych

oraz bezwskaźnikowych zostało zaprezentowane w raporcie technicznym IUPAC dotyczącym elektrochemicznych biosensorów DNA [12]. Przykłady ich wykorzystania w tego typu sensorach przedstawiono w tabeli 1. W dalszej części niniejszej pracy poszczególne techniki detekcji hybrydyzacji DNA zostały pogrupowane zgodnie z ogólnie przyjętym w literaturze podziałem na metody bezpośrednie i pośrednie.

5.2.1. Bezpośrednie metody detekcji hybrydyzacji DNA

Bezpośrednie metody wykrywania hybrydyzacji w elektrochemicznych biosensorach opierają się przede wszystkim na badaniu aktywności elektrycznej cząsteczek DNA unieruchomionych na powierzchni przetwornika [148]. Kwasy nukleinowe są elektrycznie aktywne dzięki możliwości przeprowadzenia reakcji redoks zasad i cukrów wchodzących w skład ich cząsteczek. Wszystkie zasady azotowe budujące DNA wykazują zdolność do elektrochemicznego utleniania się na powierzchni elektrod węglowych, jednak do celów analitycznych na różnych elektrodach stałych najczęściej wykorzystuje się sygnał najaktywniejszej elektrycznie guaniny [110,179]. Teoretycznie sygnał elektrochemiczny tej zasady powinien wzrastać po reakcji hybrydyzacji w wyniku tworzenia się dupleksów DNA w warstwie detekcyjnej biosensora, ponieważ zwiększa się jej ilość na powierzchni elektrody [106]. Jednak pewne niekorzystne zjawiska ograniczają możliwość wykorzystania tego sposobu bezpośredniej detekcji hybrydyzacji. Zasady azotowe w dwuniciowych cząsteczkach DNA trudniej ulegają utlenieniu w porównaniu do fragmentów jednoniciowych [106]. Dodatkowo reakcji utleniania poddają się zazwyczaj wyłącznie cząsteczki zasady azotowej będące najbliżej powierzchni elektrody [12]. Wszystko to sprawia, że praktyczne wykorzystanie tej metody wykrywania hybrydyzacji wymaga opracowania pewnych modyfikacji. Jednym z najczęściej proponowanych rozwiązań jest zastąpienie cząsteczek guaniny w strukturze sondy ssDNA inozyną [218,219]. Związek ten także łączy się specyficznym z cytozyną. Jednocześnie inozyna wykazuje około trzykrotnie niższą aktywność elektrochemiczną w porównaniu z zastępowaną zasadą azotową. W takim układzie detekcja hybrydyzacji opiera się na pomiarze sygnału redoks guaniny pochodzącej z docelowych fragmentów tDNA związanych w warstwie detekcyjnej biosensora [106].

Przedstawione powyżej metody wykrywania dwuniciowych struktur DNA odznaczają się dwiema zasadniczymi zaletami – prostotą wykonania i możliwością natychmiastowej sygnalizacji formowania się cząsteczek dsDNA [220]. Niestety utlenienie guaniny przebiega przy stosunkowo wysokim dodatnim potencjale (ok. 1.0 V względem Ag/AgCl) i wykorzysta-

nie tego sposobu detekcji dsDNA wiąże się z wysokim sygnałem tła, co obniża czułość biosensora. Dodatkowo w przypadku elektrod złotych odpowiedź elektroanalityczna wynikająca z utlenienia guaniny nakłada się z sygnałem związanym z reakcją redoks materiału, z jakiego wykonany jest ten przetwornik [221]. Wspomniane utrudnienia można pominąć stosując związki chemiczne pośredniczące w reakcji utlenienia zasad azotowych (tabela 1). W tym celu do mieszaniny reakcyjnej najczęściej wprowadzane są kompleksy rutenu (np. bis(2,2'-bipyrydy) rutenu (II), $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$). Związki te działają jako przewodniki utlenienia guaniny umożliwiające łatwiejszy przepływ ładunków pomiędzy kwasem nukleinowym a elektrodą w trakcie badanej reakcji redoks. Zapewniony szybszy przepływ elektronów zwiększa czułość opracowanego układu biosensorowego. Dodatkowo mierzony sygnał elektrochemiczny występuje w zakresie potencjałów, gdzie odnotowywane są niższe wartości prądów tła [222].

5.2.2. Pośrednie metody detekcji hybrydyzacji DNA

Systemy wykrywania hybrydyzacji w elektrochemicznych biosensorach DNA określane mianem metod pośrednich opierają się zazwyczaj na obserwacji zmian właściwości interfejsy elektroda-roztwór elektrolitu lub wykorzystaniu wskaźników specyficznym oddziałujących z ss- i dsDNA obecnym w warstwie detekcyjnej urządzenia. Biorąc pod uwagę pierwszą kategorię procedur większość z nich opiera się na badaniu właściwości przewodzących polimerów modyfikujących powierzchnię elektrody, zmian przewodności jonowej, pomiarze pojemności elektrycznej lub impedancji badanej interfejsy [148]. Tego rodzaju układ detekcji hybrydyzacji został zastosowany między innymi w elektrochemicznym biosensorze DNA do wykrywania bakterii *E. coli* [139]. Zmiany w warstwie detekcyjnej urządzenia były oceniane poprzez pomiar pojemności elektrycznej interfejsy między powierzchnią elektrody złotej a roztworem żelazicyjanku potasu. Innym ciekawym przykładem pośredniej oceny wyników hybrydyzacji był biosensor DNA działający na zasadzie przewodności jonów przez warstwę modyfikującą powierzchnię elektrochemicznego przetwornika [223]. Jednoniciowe sondy DNA swobodnie leżąc na powierzchni elektrody złotej izolowały metal od jonów znajdujących się w roztworze. Po skutecznym procesie hybrydyzacji powstałe dwuniciowe struktury kwasów nukleinowych otwierały jonom dostęp do elektrochemicznego przetwornika i tym samym możliwa była obserwacja sygnału wskazującego na formowanie się dupleksów DNA w warstwie detekcyjnej biosensora.

Znacznie częściej zjawisko hybrydyzacji zachodzące w warstwie detekcyjnej biosensora jest obserwowane przy pomocy elektroaktywnych wskaźników wiążących się z kwasami nukleinowymi w sposób niekowalencyjny. Związki te charakteryzują się zróżnicowaną zdolnością oddziaływania z jedno- i dwuniciowymi cząsteczkami DNA [110]. Wykorzystanie wskaźnika polega najczęściej na porównaniu stopnia jego akumulacji w warstwie detekcyjnej biosensora przed i po oddziaływaniu sond ssDNA z badaną próbką kwasu nukleinowego [160]. Ilość zgromadzonych cząsteczek danego związku w preferowanej przez niego formie kwasu nukleinowego jest większa. Zależy ona także od stopnia nagromadzenia danej postaci DNA na powierzchni elektrody. Poprzez pomiar sygnału elektroanalitycznego zakumulowanego wskaźnika możliwe jest ilościowe oznaczenie docelowych fragmentów kwasów nukleinowych w badanej próbce [148]. Wskaźniki posiadają potencjał redoks piku swojej elektrochemicznej odpowiedzi znajdujący się najczęściej w pewnym oddaleniu od wartości, przy których następuje utlenianie zasad azotowych DNA (zazwyczaj są to niższe wartości potencjału) [106]. Odpowiedni dobór wskaźnika powinien ułatwiać obserwację procesu hybrydyzacji zachodzącego w warstwie detekcyjnej biosensora, co nie może być zakłócanie przez aktywność elektryczną innych substancji występujących w środowisku badanej reakcji [12].

Biorąc pod uwagę mechanizm działania elektroaktywnych wskaźników hybrydyzacji łączących się niekowalencyjnie z DNA można je podzielić na związki chemiczne oddziałujące elektrostatycznie, wiążące się z dużymi lub małymi rowkami w strukturze dsDNA oraz interkalujące podwójną helisę kwasu nukleinowego (tabela 1). Oddziaływanie między wskaźnikiem a cząsteczkami DNA opiera się na siłach van der Waalsa, wiązańach wodorowych, oddziaływaniach hydrofobowych i/lub odwracalnej wymianie ładunków między obiema strukturami [113]. Kompleksy metali takie, jak jony heksaaminorutenu (III) ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$) lub tri(2,2'-bipirydyli) kobaltu (III) ($[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{3+}$) wykazują zdolność do elektrostatycznego wiązania się w sposób ilościowy do ujemnie naładowanych cukrowo-fosforanowych szkieletów DNA (zarówno jedno- jak i dwuniciowych). Oddziaływanie to nie jest ograniczane poprzez unieruchomienie kwasów nukleinowych na powierzchni elektrody [149]. Analizując ilość zakumulowanych kompleksów metali w warstwie detekcyjnej biosensora można ustalić gęstość powierzchniową sond ssDNA i/lub skuteczność procesu hybrydyzacji (na podstawie ilości zgromadzonego DNA) na powierzchni elektrody [132,157,159,224,225].

Zdecydowanie większą specyficznosc w odróżnianiu jedno- i dwuniciowego DNA wykazują związki interkalujące. Tego typu wskaźniki posiadają najczęściej planarną strukturę

zawierającą pierścienie aromatyczne i dzięki swojej budowie wnikają (interkalują) pomiędzy sparowane zasady azotowe w dwuniciowym kwasie nukleinowym [113,226]. Cząsteczki interkalatorów gromadzą się w większej ilości na powierzchni elektrody zmodyfikowanej dsDNA (po skutecznym procesie hybrydyzacji) niż w przypadku unieruchomionych sond ssDNA [110]. W elektrochemicznych biosensorach DNA jako interkalujące wskaźniki hybrydyzacji były wykorzystywane między innymi danunomycyna (DM) [116,227,228] bromek etydyny (EtBr) [227,229] oraz sól dwusodowa kwasu antrachinono-1,5-disulfonowego (AQDS) [159,230,231].

Wymienione powyżej związki wykazują większe powinowactwo względem dwuniciowego DNA. Innym ciekawym wskaźnikiem wiążącym się niekowalencyjnie z cząsteczkami kwasu nukleinowego jest błękit metylenowy (MB) – barwnik organiczny z rodziny fenotiazyn. Wykazuje on silne oddziaływanie z guaniną w jednoniciowych fragmentach DNA [232]. Skuteczny proces hybrydyzacji ogranicza stopień akumulacji błękitu metylenowego w warstwie detekcyjnej biosensora i tym samym powoduje obniżenie się sygnału elektrochemicznego wskaźnika [133,209,233]. Niemniej jednak najbardziej specyficzne wykrywanie dwuniciowych fragmentów zapewniają związki wiążące się z dsDNA niekowalencyjnie w miejscach tzw. rowków – struktur typowych wyłącznie dla dwuniciowej struktury kwasu deoksyrybonukleinowego [149]. Ten sposób oddziaływania nie powoduje żadnych zmian w konformacji DNA (w przeciwieństwie do interkalacji) i opiera się na zasadzie podobnej do modelu „klucza i zamka” spotykanego w wiązaniach między ligandem a makrocząsteczką [226]. Związki chemiczne wykazujące takie oddziaływanie z podwójną helisą dsDNA posiadają zazwyczaj cząsteczki przypominające kształtem sierp. Tworzą one wiązanie w miejscu małego rowka, które jest stabilizowane przez oddziaływania międzycząsteczkowe. Typowym związkiem wiążącym się w ten sposób z dwuniciowymi strukturami kwasu deoksyrybonukleinowego jest bis-benzoimid H 33258 (Hoechst 33258) [234]. Znalazł on także zastosowanie w systemach detekcji hybrydyzacji w elektrochemicznych biosensorach DNA [216,227].

Ocena mechanizmu niekowalencyjnego wiązania wskaźnika z cząsteczkami DNA nie jest łatwym zadaniem. Przykładem związku, który jest klasyfikowany zarówno jako interkalator, jak i cząsteczka wiążąca z dsDNA w miejscu rowka jest dwuchlorowodurek 4',6-diamidino-6-fenylindolu (DAPI) [113,227]. Wskaźnik ten wykazuje większe powinowactwo względem dwuniciowych fragmentów DNA niż w odniesieniu do cząsteczek ssDNA.

Wskaźniki łączące się z DNA w sposób niekowalencyjny są narzędziem często stosowanym w jednowarstwowych technikach biosensorowych przeznaczonych do wykry-

wania specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych [110]. Inną metodą wykorzystywaną w tym zakresie jest znakowanie chemiczne docelowego DNA [235,236]. Jednak przygotowanie tego typu oznaczenia i następnie interpretacja jego rezultatów przysparza często zbyt wielu dodatkowych utrudnień. Zdecydowanie bardziej obiecujące rozwiązanie stanowi zastosowanie kowalencyjnie wiążących się wskaźników w celu znakowania sond ssDNA, które następnie hybrydują z docelowymi fragmentami DNA uprzednio unieruchomionymi w warstwie detekcyjnej biosensora [12]. Taki sposób detekcji specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych jest także popularny w sensorach opartych o techniki dwuwarstwowe – pierwsza powierzchnia służy do przechwycenia tDNA, druga do sygnalizacji powodzenia detekcji przy pomocy znakowanych sond [110]. Wśród sposobów chemicznej modyfikacji sond wskaźnikowych najczęściej wymienia się kowalencyjne wiązanie metali, takich jak złoto, srebro, osm [237,238] lub innych elektroaktywnych związków [239]. Bardzo często do tego celu wykorzystywane są także jednoniciowe fragmenty kwasów nukleinowych, które są modyfikowane chemicznie przy pomocy różnych pochodnych ferrocenu [240-242]. Sondy wskaźnikowe mogą być także znakowane enzymatycznie. Do najczęściej stosowanych enzymów należą peroksydaza oraz alkaliczna fosfataza [142,143,243]. Detekcja hybrydyzacji następuje wówczas po wprowadzeniu odpowiednich substratów ulegających reakcji katalizowanej przez dane enzymy. Stosowanie tego rodzaju sond wskaźnikowych może służyć także zwiększeniu czułości przeprowadzanych oznaczeń. Ilość elektronów wykorzystywanych w tego typu reakcjach enzymatycznych jest znacząco większa niż w przypadku reakcji redoks innych wskaźników kowalencyjnie wiążących się z cząsteczkami DNA [106,110].

Cel pracy

Skażenie mikrobiologiczne jest jednym z najważniejszych zagrożeń bezpieczeństwa zdrowotnego żywności. Współcześnie stosowane konwencjonalne metody wykrywania mikroorganizmów patogennych występujących w surowcach i produktach spożywczych często są zbyt czaso- i kosztochłonne, aby stanowić element efektywnej kontroli tego zagrożenia. Istnieje nieustająca potrzeba opracowywania i wdrażania do powszechnego użytku alternatywnych metod szybkiej i skutecznej detekcji mikroflory patogennej w żywności. Jednym z intensywnie rozwijanych rozwiązań jest wykrywanie niepożądanych mikroorganizmów poprzez identyfikację odcinków DNA specyficznych dla danego patogenu. Wśród opracowywanych metod umożliwiających detekcję określonych fragmentów kwasów nukleinowych dużą uwagę skupia wykorzystanie biosensorów hybrydyzacji DNA.

Celem niniejszej pracy było skonstruowanie elektrochemicznego biosensora DNA przeznaczonego do wykrywania fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla mikroorganizmów patogennych występujących w żywności na przykładzie detekcji genu aerolizyny – toksyny wytwarzanej przez bakterie *Aeromonas hydrophila*.

Realizacja zamierzonego celu wymagała:

- zaprojektowania sekwencji jednoniciowych sond DNA specyficznych dla genu aerolizyny *Aeromonas hydrophila*;
- opracowania procedury chemicznej modyfikacji powierzchni elektrod złotych w celu uzyskania warstwy detekcyjnej biosensora, w tym:
 - ustalenia sposobu przygotowania powierzchni elektrody złotej przed modyfikacją,
 - dokonania wyboru składników przeznaczonych do budowy warstwy detekcyjnej biosensora w postaci samoorganizującej się struktury,
 - przygotowania procedury formowania na elektrodzie złotej samoorganizującej się monowarstwy (SAM), w której skład wchodziłyby sondy ssDNA oraz inne cząsteczki zapewniające odpowiednie uporządkowanie nowopowstałej warstwy detekcyjnej;
- zbadania stopnia zorganizowania struktury SAM stanowiącej warstwę detekcyjną biosensora, włącznie z ustaleniem gęstości powierzchniowej sond ssDNA;

- ustalenia warunków procesu hybrydyzacji sond DNA z docelowymi fragmentami kwasów nukleinowych (w szczególności czasu trwania reakcji);
- opracowania systemu elektrochemicznej detekcji reakcji hybrydyzacji – sprawdzenie wpływu zmian stężenia docelowych fragmentów kwasów nukleinowych oraz obecności niekomplementarnego DNA w mieszaninie reakcyjnej na odpowiedź danego systemu;
- wykorzystania opracowanego biosensora DNA do wykrywania *A. hydrophila* w wodzie pitnej.

Część doświadczalna

1. Materiały i metody

1.1. Aparatura, sprzęt i oprogramowanie

Pomiary elektrochemiczne zostały przeprowadzone z wykorzystaniem potencjostatu Autolab PGSTAT12, którego praca była kontrolowana przy pomocy programu GPES 4.9.7. Zarówno sprzęt jak, i oprogramowanie zostały zakupione w firmie Eco Chemie (Utrecht, Holandia). Układ pomiarowy składał się z trzech elektrod (wszystkie dostarczone przez firmę Mineral, Warszawa):

- elektroda pracująca – dyskowa elektroda złota (AuE) wykonana z polikrystalicznego złota o średnicy powierzchni pracującej 1,2 mm, posiadająca osłonę z żywicy epoksydowej;
- elektroda odniesienia – chlorosrebrowa (Ag/AgCl, 3 M KCl) z podwójnym kluczem;
- elektroda pomocnicza – platynowa.

Pomiary wykonywano w naczynku o pojemności 1 ml w określonych roztworach elektrolitów przedmuchiwanych argonem przed wykonywaniem poszczególnych doświadczeń. W badaniach wykorzystano techniki pomiarowe z kontrolowaną zmianą potencjału: chronokulometrię (CC), woltamperometrię cykliczną (CV) oraz woltamperometrię fali prostokątnej (SWV). Parametry pomiarów zamieszczone zostały w podrozdziałach 1.3 Procedury pomiarowe i 1.4 Pozostałe procedury.

Uzyskane wyniki pomiarów były opracowywane przy pomocy programu Origin v.8.0988, CorelDRAW X4 oraz pakietu Microsoft Office 2007.

W badaniach wykorzystano także następującą aparaturę i sprzęt laboratoryjny:

- wagi analityczne Sartorius: model BP 121S (dokładność pomiarów do 0.0001 g) oraz model 3108-OCEV1 (dokładność pomiarów do 0.001 g) (Gottingen, Niemcy),
- pH-metr SevenEasy pH Mettler Toledo (Schwerzenbach, Szwajcaria),
- łaźnia ultradźwiękowa Engisonic B-1200 (Engis Ltd, Henley-on-Thames, Wielka Brytania)
- spektrofotometr UV-Vis Helios Beta (Unicam, Wielka Brytania),

- szkło laboratoryjne: kolby miarowe, zlewki, kolby stożkowe, itp.
- termocykler Biometra TProfessional Basic Gradient (Gottingen, Niemcy),
- aparat do elektroforezy Biometra Compact S z zasilaczem Biometra Standard Power Pack P25 (Gottingen, Niemcy),
- wirówka Eppendorf 5804R (Hamburg, Niemcy),
- vortex IKA MS 3 basic (Wilmington, USA),
- mieszadło magnetyczne Heidolph MR 3002 (Schwabach, Niemcy),
- transiluminator UV Vilber Lourmat ECX-20.M (Marne-la-Vallée, Francja),
- aparat cyfrowy (Canon PowerShot G10) z zestawem filtrów do fotografii w świetle ultrafioletowym (kupione w firmie Biometra, Gottingen, Niemcy),
- pipety automatyczne HTL Discovery Comfort o zmiennej objętości (Warszawa, Polska).

1.2. Odczynniki

2-Merkaptoetanol (MCE), 6-merkapto-1-heksanol (MCH), 9-merkapto-1-nonanol (MCN), błękit metylenowy (MB), chlorek heksaaminorutenu (III) (RuHex), tri-chlorowodorek bis-benzoimidu H 33258 (Hoechst 33258), sól disodowa kwasu antrachinono-1,5-disulfonowego (AQDS), chlorowodorek daunomycyny (DM), dichlorowodorek 4',6-diamidino-6-fenylindolu (DAPI), heksacyjanożelazian (II) potasu, heksocyjanożelazian (III) potasu, ditiotreitól (DTT) zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich (Poznań). Wszystkie wymienione odczynniki posiadały stopień czystości dla biologii molekularnej.

Odczynniki wykorzystane w reakcji PCR: Allegro *Taq* Polimeraza DNA (polimeraza *Taq*), mieszanina trifosforanów deoksyrybonukleotydów (dNTPs), bufor reakcyjny (z dodatkiem 25 mM MgCl₂), 25 mM roztwór MgCl₂ oraz wzorzec wielkości DNA – Nova 100bp DNA ladder zakupiono w firmie Novazym (Poznań). Agarozą (wykorzystaną w elektroforezie zamplifikowanych fragmentów DNA) pochodziła z firmy Lab Empire (Rzeszów) i posiadała stopień czystości do badań biotechnologicznych. Fluorescencyjny barwnik, SYBR[®] Gold, zakupiono w firmie Invitrogen (Life Technologies Polska Sp. z o. o., Warszawa).

Kwas siarkowy, kwaśny fosforan potasu (KH_2PO_4), kwaśny fosforan di-sodu (Na_2HPO_4), chlorek sodu, chlorek potasu, tri(hydroksymetylo)aminoetan (TRIS), wersenian di-sodu dwu-uwodniony (EDTA), kwas borowy, izopropanol, etanol (wszystkie o stopniu czystości cz.d.a.) pochodziły z firmy Polskie Odczynniki Chemiczne (Gliwice).

Wodne zawiesiny aluminium (Micropolish[®] II Alumina) o wielkości drobin 1.0 i 0.05 μm oraz podkłady do polerowania elektrod Microcloth[®] były zakupione w firmie Buehler (Dusseldorf, Niemcy). Zawiesiny do polerowania (aluminiowa i diamentowa) oraz podkłady (silikonowe i mikrowłókninowe) były elementami zestawu „PK-4 Polishing Kit” firmy BAS Bioanalytical Systems (West Lafayette, USA). Kolumny PD 10 wypełnione żelą Sephadex G-25 zakupiono w firmie GE Healthcare (Monachium, Niemcy). Zestaw do izolacji genomowego DNA z komórek bakteryjnych został zakupiony w firmie A&A Biotechnology (Gdynia).

Stosowane oligonukleotydy (zsyntetyzowane przez firmę Genomed, Warszawa) miały następujące sekwencje:

- sonda I zaprojektowana dla genu aerolizyny: 5' GTGGTGGGCTGGGCGATCAA-*p*-(CH_2)₃-SH
- komplementarny fragment DNA do sondy I: 5' TTGATCGCCCAGCCCACCAC
- sonda II zaprojektowana dla genu aerolizyny: 5' GTCAAGACGGTGGTGGGCTG-*p*-(CH_2)₃-SH
- komplementarny fragment DNA do sondy II: 5' CAGCCCACCACCGTCTTGAC
- niekomplementarny fragment DNA: 5' GCATGACGTTATTTATGAGAT
- startery wykorzystane w reakcji amplifikacji fragmentu genu aerolizyny *A. hydrophila* metodą PCR:
 - forward (F): 5' CTGCGAGGGTTATCGTTGTG
 - backward (B): 5' GTGTCGCTGTCGTTGATCG

W badaniach wykorzystano następujące roztwory oraz bufony (w nawiasach podano ilość określonych składników przypadającą na litr dejonizowanej wody):

- 0.05 M bufor fosforanowy, pH 7.6 (0.681 g KH_2PO_4 , 2.127 g Na_2HPO_4);
- 0.05 M bufor fosforanowy z dodatkiem 5 mM KCl, pH 7.6 (0.681 g KH_2PO_4 , 2.127 g Na_2HPO_4 , 0.373 g KCl);
- 10 mM bufor TRIS-HCl, pH 7.4 (1.21 g TRIS, pH doprowadzone przy pomocy 1M HCl);

- 10 mM bufor TRIS-HCl z dodatkiem 1M NaCl (bufor hybrydyzacyjny), pH 7.4 (1.21 g TRIS, 29.22 g NaCl, pH doprowadzone przy pomocy 1M HCl);
- bufor do elektroforezy TBE (TRIS/kwas borowy/EDTA), 10-krotnie stężony (10xTBE), pH 8.3 (108 g TRIS, 55 g kwasu borowego, 3.7 g EDTA);
- bufor obciążający do elektroforezy, pH 8.0 (50% glicerol, 0.025% błękit bromofenolowy, 0.025% cyjanoksylen, 1 mM EDTA) zakupiony w firmie Merck.

Bufory wykorzystane w pomiarach chronoamperometrycznych, woltamperometrycznych oraz pozostałych etapach przygotowania biosensora zostały wytypowane na podstawie wcześniejszych badań nad sensorami do wykrywania hybrydyzacji DNA oraz zebranych danych literaturowych [106,132,139,157,159,162,203].

1.3. Procedury pomiarowe

Zestawione w tej części pracy procedury pomiarowe były wykorzystywane w kolejnych etapach konstrukcji, a następnie działania elektrochemicznego biosensora DNA. Opisy sposobu wykonania pozostałych badań, często wymagające bardziej szczegółowego przedstawienia, zostały umieszczone bezpośrednio w punkcie 2. Wyniki i dyskusja.

W toku prac nad konstrukcją i zastosowaniem elektrochemicznego biosensora DNA do wykrywania mikroorganizmów patogennych w żywności przeprowadzono szereg powiązanych ze sobą badań. Otrzymane rezultaty zostały zamieszczone w punkcie 2. Wyniki i dyskusja, który zawiera także zestawienia przygotowane w formie wykresów i tabel. Powtarzalność uzyskanych w toku badań wyników o charakterze ilościowym scharakteryzowano poprzez obliczenie względnego odchylenia standardowego (RSD, ang. *Relative Standard Deviation*) dla zestawów niezależnych powtórzeń poszczególnych pomiarów. Wartość RSD, określana także mianem współczynnika zmienności, wyliczana była na podstawie następującego wzoru [244]:

$$RSD = \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100\%$$

gdzie:

RSD – względne odchylenie standardowe,

s_r – odchylenie standardowe,

\bar{x} – wartość średnia pomiarów.

Wartość względnego odchylenia standardowego opisywała precyzję wybranej metody analitycznej [245]. Im niższe było uzyskane RSD, tym wyższa była precyzja danej metody i uzyskano bardziej zadowalającą powtarzalność wyników badań.

1.3.1 Wyznaczanie elektrochemicznego pola powierzchni elektrody

Geometryczne pole powierzchni elektrody złotej (A_G) wynosiło 0.0113 cm^2 (obliczone na podstawie średnicy równej 1.2 mm). Elektrochemiczne pole powierzchni elektrody pracującej (A_E) wyznaczono poprzez pomiar woltamperometryczny (CV) zgodnie z niżej zamieszczoną procedurą, która została opracowana na podstawie danych literaturowych [155,159,193,194]:

1. Pomiar wykonywano techniką woltamperometrii cyklicznej (CV) stosując układ trzech elektrod: złotej (pracującej), chlorosrebrowej (referencyjnej) i platynowej (pomocniczej).
2. Środowiskiem pomiaru był 50 mM bufor fosforanowy ($\text{pH } 7.6$) (objętość 1 cm^3).
3. W trakcie pomiaru wykonywano 5 cykli CV w następujących warunkach: zakres od -0.8 V do $+1.6 \text{ V}$, skok potencjału 2.44 mV , szybkość polaryzacji elektrody 100 mV/s .
4. Do obliczenia elektrochemicznego pola powierzchni elektrody złotej wykorzystywano wartość ładunku związanego z pikiem redukcji złota (Q_{RAu}) zmierzonym z ustabilizowanych pętli woltamperometrycznych (CV).
5. Obliczenia elektrochemicznego pola powierzchni elektrody pracującej (A_E) oparte były o wartość przelicznika równą $390 \text{ } \mu\text{C/cm}^2$ [149,192,194,201], tzn. jeden centymetr kwadratowy powierzchni polikrystalicznej elektrody złotej zapewnia w wyżej wymienionych warunkach pomiaru CV ładunek redukcji złota równy $390 \text{ } \mu\text{C}$. W literaturze spotykana jest także inna wartość wspomnianego przelicznika – $482 \text{ } \mu\text{C/cm}^2$ [159,193,246], która jednak dawała mniej wiarygodne wyniki badań wykonanych w części doświadczalnej pracy.

$$A_E = \frac{Q_{\text{RAu}}}{390}$$

gdzie:

A_E – elektrochemiczne pole powierzchni elektrody złotej [cm^2],

Q_{RAu} – ładunek redukcji złota [μC],

390 – wartość przelicznika [$\mu\text{C/cm}^2$].

Na podstawie wyznaczonego elektrochemicznego pola powierzchni elektrody pracującej obliczany był współczynnik szorstkości powierzchni przetwornika (R) [194].

$$R = \frac{A_E}{A_G}$$

gdzie:

R – współczynnik szorstkości powierzchni elektrody złotej,

A_E – elektrochemiczne pole powierzchni elektrody złotej [cm^2],

A_G – geometryczne pole powierzchni elektrody złotej [cm^2].

1.3.2. Badanie elektrochemicznego efektu blokowania

Elektrochemiczna ocena monowarstw pokrywających powierzchnię złota była przeprowadzona poprzez sprawdzenie przewodnictwa elektronów w reakcji elektrochemicznej na zmodyfikowanych elektrodach pracujących przy zastosowaniu kompleksu redoks heksocyjanożelazian (II)/heksocyjanożelazian (III) ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) i w porównaniu z wynikami uzyskanymi na niemodyfikowanych elektrodach złotych. Oznaczenie przeprowadzono zgodnie z zamieszczoną poniżej procedurą:

1. Pomiar wykonywano techniką woltamperometrii cyklicznej (CV), stosując układ trzech elektrod: złotej (pracującej), chlorosrebrowej (referencyjnej) i platynowej (pomocniczej).
2. Środowiskiem pomiaru był 1 mM roztwór $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ w 0.1 M wodnym roztworze KCl (objętość 1 cm^3).
3. W trakcie pomiaru wykonywano 5 cykli CV w następujących warunkach: zakres od -0.2 V do +0.6 V, skok potencjału 2.44 mV, szybkość polaryzacji elektrody 100 mV/s.
4. Do obliczenia ładunku prądu faradajowskiego powstającego w wyniku utlenienia i redukcji kompleksu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ wykorzystywano cykl wykazujący ustabilizowaną krzywą woltamperometryczną (CV).
5. Współczynnik bariery jonów (Γ_{ibf}) charakteryzujący efekt elektrochemicznego blokowania (EBE) przepływu elektronów z reakcji redoks kompleksu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ był obliczany według wzoru [165,185,202]:

$$\Gamma_{ibf} = 1 - \left(\frac{Q_{SAM}}{Q_{bare}} \right)$$

gdzie:

Γ_{ibf} – współczynnik bariery jonów (ang. *ion barrier factor*),

Q_{SAM} – ładunek związany z redukcją kompleksu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ na elektrodzie zmodyfikowanej SAM [μC].

Q_{bare} – ładunek związany z redukcją kompleksu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ na niemodyfikowanej elektrodzie [μC].

1.3.3. Pomiar pojemności elektrycznej interfazy elektroda-roztwór elektrolitu

Ocenę modyfikacji powierzchni elektrody złotej przeprowadzono poprzez pomiar voltamperometryczny (CV) pojemności elektrycznej interfazy pomiędzy powierzchnią elektrody złotej (niezmodyfikowanej lub zmodyfikowanej) a roztworem elektrolitu podstawowego (1 M roztwór KH_2PO_4). Warunki oznaczenia ustalone zostały na podstawie danych literaturowych [157,159] oraz na podstawie przeprowadzonych badań (pkt. 2.2). Wyznaczenie pojemności elektrycznej interfazy przebiegało następująco:

1. Pomiar wykonywano techniką voltamperometrii cyklicznej (CV), stosując układ trzech elektrod: złotej (pracującej), chlorosrebrowej (referencyjnej) i platynowej (pomocniczej).
2. Środowiskiem pomiaru był 1 mM roztwór KH_2PO_4 (objętość 1 cm^3).
3. W trakcie pomiaru wykonywano 5 cykli CV w następujących warunkach: zakres od 0.0 V do +0.7 V, skok potencjału 2.44 mV, szybkość polaryzacji elektrody 100 mV/s.
4. Odczyt prądu pojemnościowego katodowego (i_C) i anodowego (i_A) następował po ustabilizowaniu się pętli CV (zazwyczaj 3-ci cykl CV).
5. Obliczenia pojemności elektrycznej (C) odnoszono do rzeczywistego pola powierzchni elektrody 0.0641 cm^2 (wartość uśredniona) zgodnie ze wzorem zamieszczonym poniżej [164,165]:

$$C = \frac{1}{2} \frac{(i_A + i_C)}{v \cdot A_E}$$

gdzie:

C – pojemność elektryczna interfazy [F/cm²],

i_A – prąd pojemnościowy anodowy [A],

i_C – prąd pojemnościowy katodowy [A],

v – szybkość polaryzacji elektrody [V/s],

A_E – elektrochemiczne pole powierzchni elektrody złotej [cm²].

1.3.4. Wyznaczenie ilości DNA unieruchomionego na powierzchni elektrody pracującej

Wyznaczenie ilości DNA obecnego na powierzchni elektrody pracującej polegało na przeprowadzeniu zestawu pomiarów chronokulometrycznych (CC) reakcji redukcji wskaźnika, chlorku heksaaminorutenu (III) (RuHex). Pomiar prowadzony był kolejno w roztworach o rosnącym stężeniu RuHex w roztworze elektrolitu – w celu zapewnienia maksymalnej adsorpcji wskaźnika na powierzchni elektrody i wysycenia nim wszystkich dostępnych cząsteczek kwasu nukleinowego. Pomiar CC przebiegał według następującej procedury [157]:

1. Układ pomiarowy składał się z 3 elektrod: pracującej AuE (czystej lub zmodyfikowanej), pomocniczej Pt, referencyjnej Ag/AgCl (3M).
2. Środowiskiem pomiaru był 10 mM roztwór buforu TRIS-HCl (pH = 7.4) bez lub z dodatkiem RuHex o odpowiednim stężeniu.
3. Przed pomiarem elektroda złota była zanurzona w 10 mM buforze TRIS-HCl (pH = 7.4) przez 150 sekund przy szybkości mieszania 160 obrotów/minutę, następnie mieszadło wyłączano i po 10 sekundach przeprowadzano pomiar CC w następujących warunkach:
 - potencjał początkowy: +0.1 V,
 - potencjał reakcji: -0.4 V,
 - czas trwania reakcji: 0.5 s,
 - ilość odczytów na sekundę: 1000

Podczas oznaczeń przeprowadzany był pomiar ładunku Q_{total} , na który składały się [153,157]:

$$Q_{total} = Q_{dl} + Q_{ads} + Q_{diff}$$

gdzie:

Q_{dl} – ładunek pojemnościowy interfejsy złoto-roztwór,

Q_{ads} – ładunek reakcji redoks cząsteczek RuHex zaadsorbowanych na elektrodzie,

Q_{diff} – ładunek reakcji redoks cząsteczek RuHex znajdujących się w roztworze.

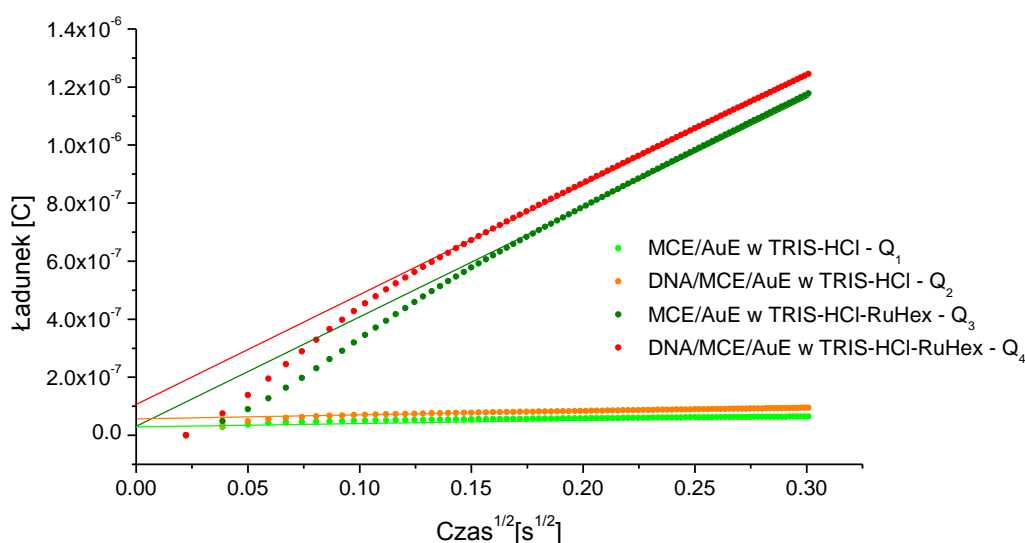
W celu wyznaczenia ilości wskaźnika RuHex zaadsorbowanego na powierzchni elektrody zmodyfikowanej DNA (samym lub w połączeniu z merkptoalkoholem) zmierzone zostały wartości ładunku (Q) dla czasu $t = 0$ w następujących przypadkach [157]:

1. Elektroda złota bez DNA zanurzona w buforze TRIS-HCl bez dodatku RuHex – uzyskana wartość ładunku Q_1 ($t = 0$) stanowi wartość ładunku Q_{dl} dla elektrody bez DNA;
2. Elektroda złota bez DNA zanurzona w buforze TRIS-HCl z dodatkiem RuHex – zmierzona wartość ładunku Q_2 ($t = 0$) stanowi sumę ładunków ($Q_{ads} + Q_{dl}$) dla elektrody bez DNA;
3. Elektroda złota z DNA zanurzona w buforze TRIS-HCl bez dodatku RuHex – otrzymana wartość ładunku Q_3 ($t = 0$) stanowi wartość ładunku Q_{dl} dla elektrody z DNA;
4. Elektroda złota z DNA zanurzona w buforze TRIS-HCl z dodatkiem RuHex – zmierzona wartość ładunku Q_4 ($t = 0$) równa jest wartości sumy ładunków ($Q_{ads} + Q_{dl}$) dla elektrody z DNA.

Przykładowy zestaw wyników pomiarów CC uzyskanych w czterech wyżej wymienionych przypadkach dla elektrody zmodyfikowanej MCE lub mieszaniną ssDNA i MCE przedstawiono na rysunku 17.

Dysponując wartościami Q_1 , Q_2 , Q_3 i Q_4 wyliczona została wielkość ładunku związanego z redukcją cząsteczek wskaźnika RuHex zaadsorbowanych tylko przez cząsteczki DNA obecne na powierzchni elektrody złotej (Q_{ads}) [161]:

$$Q_{ads} = (Q_4 - Q_3) - (Q_2 - Q_1)$$



Źródło: Opracowanie własne na podstawie [157,161]

Rysunek 17. Zestawienie pomiarów chronokulometrycznych (CC) pozwalających wyznaczyć ładunek reakcji redoks RuHex zakumulowanego przez DNA na powierzchni elektrody złotej.

W celu ustalenia ilości DNA umiejscowionego na powierzchni elektrody złotej konieczne jest ustalenie stężenia RuHex, przy którym wszystkie cząsteczki DNA zaadsorbowały maksymalną możliwą ilość wskaźnika (wysycenie wskaźnikiem). Z tego względu przeprowadzone zostały zestawy pomiarów CC w roztworze 10 mM buforu TRIS-HCl (pH = 7.4) bez dodatku i z dodatkiem kolejno 0.05 mM, 0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM, 0.75 mM, 1.0 mM, 1.5 mM oraz 2 mM RuHex (dla pomiarów z dsDNA już tylko zakres od 0.75 mM do 2 mM RuHex).

Na podstawie wyznaczonego ładunku redukcji wskaźnika RuHex zaadsorbowanego na powierzchni elektrody przez cząsteczki DNA (Q_{ads}) obliczono gęstość powierzchniową tego wskaźnika (Γ_{RuHex}) [150,155,161]:

$$\Gamma_{RuHex} = \frac{Q_{ads}}{nFA}$$

gdzie:

Γ_{RuHex} – gęstość powierzchniowa zaadsorbowanego przez DNA wskaźnika RuHex [mol/cm²],

Q_{ads} – ładunek redukcji zaadsorbowanego przez DNA wskaźnika RuHex [C],

n – liczba elektronów na cząsteczkę biorąca udział w reakcji redoks ($n = 1$),

F – stała Faradaya (96485.3399 C/równoważnik),

A – pole powierzchni elektrody (oszacowana uśredniona wartość = 0.0641 cm²).

Oszacowanie ilości DNA (Γ_{DNA}) unieruchomionego na powierzchni elektrody opierało się z kolei na zależności [104,157-159]:

$$\Gamma_{DNA} = \Gamma_{RuHex} \frac{z}{m} N_A$$

gdzie:

Γ_{DNA} – gęstość powierzchniowa sondy ssDNA [cząsteczka/cm²],

Γ_{RuHex} – gęstość powierzchniowa zaadsorbowanego przez DNA wskaźnika [mol/cm²],

z – ładunek cząsteczki redoks (dla RuHex = 3),

m – liczba zasad w sondzie ssDNA (w tym przypadku = 20),

N_A – liczba Avogadro (6.02214179 x 10⁺²³ cząsteczek/mol).

1.3.5. Ocena wyników hybrydyzacji z użyciem błękitu metylenowego

Pomiary woltamperometryczne (SWV) z wykorzystaniem błękitu metylenowego przeprowadzone zostały według poniższej procedury:

1. Zanurzenie elektrody złotej (zmodyfikowanej badaną monowarstwą) w 12.5 μ M roztworze MB w 50 mM buforze fosforanowym z dodatkiem 5 mM KCl, czas 3 minuty, mieszanie 160 obrotów/minutę.
2. Przeniesienie elektrody do czystego 50 mM buforu fosforanowego z dodatkiem 5 mM KCl i płukanie, 30 sekund, 160 obrotów/minutę.
3. Pomiar SWV w czystym 50 mM buforze fosforanowym z dodatkiem 5 mM KCl, warunki:
 - układ trzech elektrod: AuE (pracująca), Pt (pomocnicza), Ag/AgCl (referencyjna, 3M KCl),
 - zakres potencjału: od -0.40 V do + 0.05 V,
 - skok potencjału: 1 mV, amplituda: 40 mV, szybkość polaryzacji elektrody: 0.1 V/s,
 - częstotliwość: 100 Hz.
4. Wyniki pomiarów opracowywano poprzez funkcję korekcji linii bazowej (średnia ruchoma o szerokości piku 0.03 V) i automatycznego szukania pików (parametry: szerokość piku 0.03 V, wysokość piku 1x10⁻¹⁰ A).

1.3.6. Ocena wyników hybrydyzacji z użyciem wskaźnika Hoechst 33258

Pomiary voltamperometryczne (SWV) z wykorzystaniem wskaźnika bis-benzoimidowego Hoechst 33258 przeprowadzone zostały według poniższej procedury:

1. Zanurzenie elektrody złotej (zmodyfikowanej badaną monowarstwą) w 0.1 mM roztworze Hoechst w 50 mM buforze fosforanowym z dodatkiem 5 mM KCl, czas 3 minuty, mieszanie 160 obrotów/minutę.
2. Przeniesienie elektrody do czystego 50 mM buforu fosforanowego z dodatkiem 5 mM KCl i płukanie, 30 sekund, 160 obrotów/minutę.
3. Pomiar SWV w czystym 50 mM buforze fosforanowym z dodatkiem 5 mM KCl, warunki:
 - układ trzech elektrod: AuE (pracująca), Pt (pomocnicza), Ag/AgCl (referencyjna, 3M KCl),
 - zakres potencjału: od +0.30 V do + 0.85 V,
 - skok potencjału: 1 mV, amplituda: 40 mV, szybkość polaryzacji elektrody: 0.1 V/s,
 - częstotliwość: 100 Hz.
4. Wyniki pomiarów opracowywano poprzez funkcję korekcji linii bazowej (średnia ruchoma o szerokości pików 0.03 V) i automatycznego szukania pików (parametry: szerokość pików 0.03 V, wysokość pików 1×10^{-10} A).

1.4. Pozostałe procedury

1.4.1. Czyszczenie powierzchni elektrod złotych

Procedura czyszczenia powierzchni elektrod złotych opracowana została na podstawie danych literaturowych [193,203] oraz uprzednio przeprowadzonych badań – punkt 2.2. Czyszczenie elektrod pracujących opierało się na mechanicznym polerowaniu powierzchni złota przy pomocy wodnych zawiesin aluminium, płukaniu w łaźni ultrasonograficznej oraz przemiataaniu potencjałem w rozcieńczonym roztworze kwasu siarkowego (VI) do momentu uzyskania stabilnych pętli voltamograficznych CV. Procedura obejmowała kolejno:

1. Przepłukanie powierzchni elektrody złotej dejonizowaną wodą, polerowanie zawiesiną aluminium o wielkości drobin 1 μm (Micropolish[®] II Alumina, Buehler) przez 2 minuty na podkładzie ze sztucznego jedwabiu (Microcloth[®], Buehler).
2. Przepłukanie powierzchni elektrody złotej dejonizowaną wodą, polerowanie zawiesiną aluminium o wielkości drobin 0.05 μm (Micropolish[®] II Alumina, Buehler) przez 2 minuty na podkładzie ze sztucznego jedwabiu (Microcloth[®], Buehler).
3. Dokładne przepłukanie powierzchni złota z pozostałości zawiesiny aluminiowej, płukanie elektrody w łaźni ultradźwiękowej wypełnionej dejonizowaną wodą przez 3 minuty.
4. Przemiatanie potencjałem w trakcie pomiarów woltamperometrycznych (CV) w wodnym 0.05 M roztworze H_2SO_4 zgodnie z niżej wymienionymi warunkami:
 - układ 3 elektrod: AuE (pracująca), Pt (pomocnicza) i Ag/AgCl (3M KCl, referencyjna);
 - środowisko: 0.05 M H_2SO_4 (1 ml wodnego roztworu);
 - liczba cykli CV: 25 (ustalona doświadczalnie);
 - zakres od -0.3 V do + 1.5 V, potencjał skoku 5 mV, szybkość polaryzacji elektrody 100 mV/s.
5. Dokładne przepłukanie powierzchni elektrody złotej dejonizowaną wodą.

1.4.2. Wybór i ocena sond ssDNA

Projektowanie sekwencji sond ssDNA specyficznych dla genu aerolizyny, toksyny wytwarzanej przez bakterie *Aeromonas hydrophila* polegało kolejno na:

1. Znalezieniu wyjściowej kompletnej sekwencji genu aerolizyny *A. hydrophila*:
 - na stronie internetowej Centrum NCBI [247] wybrana została sekcja poświęcona DNA i RNA, a następnie baza danych GenBank [248],
 - w wyszukiwarce bazy GenBank zaznaczona została opcja wyszukiwania sekwencji DNA (opcja „nucleotide”) i przeprowadzono poszukiwanie dla hasła „*Aeromonas hydrophila, aerolysin*”
 - wśród rezultatów wyszukiwania wybrano kompletną sekwencję genu aerolizyny *Aeromonas hydrophila* (szczep AH14, załącznik 2).

2. Zawężeniu wyjściowej sekwencji genu szukanej toksyny do fragmentu, który powtarza się najczęściej w sekwencjach genu aerolizyny bakterii *A. hydrophila* opublikowanych w bazie GenBank:
 - korzystając z programu BLAST [249] – przy ustawieniach: przeglądanie sekwencji nukleotydów (opcja „nucleotide blast”), baza danych „kolekcja nukleotydów” (opcja „Nucleotide collection (nr/nt”), wysoce podobne sekwencje (opcja „megablast”), wprowadzono do oceny kompletną wyjściową sekwencję genu aerolizyny,
 - sprawdzono, jaki fragment ocenianej sekwencji pojawia się najczęściej w innych (często niekompletnych) sekwencjach genu aerolizyny *A. hydrophila* opublikowanych w bazie danych GenBank.
3. Podziale wybranego fragmentu sekwencji genu aerolizyny na 20-nukleotydowe odcinki i ich ocenie pod względem zdolności tworzenia struktur wtórnych:
 - wszystkie możliwe sekwencje składające się z 20 nukleotydów sprawdzono przy pomocy tzw. „kalkulatora DNA” [250],
 - wykluczone zostały fragmenty DNA, które wykazują skłonności do tworzenia struktur wtórnych tzw. „hairpin” (rysunek 18A) i/lub par dimerów (rysunek 18B).
4. Ocenie wybranych w pkt. 3. 20-merowych fragmentów DNA pod względem specyficzności w odniesieniu do genu aerolizyny *A. hydrophila*:
 - oceniane sekwencje sprawdzono w programie BLAST (ustawienia jak wyżej),
 - za najbardziej specyficzne uznano fragmenty, dla których odnotowano największą liczbę porównań z sekwencjami genów aerolizyny (opublikowanymi w bazie GenBank) o najwyższym stopniu podobieństwa i charakteryzującymi się najmniejszą zbieżnością z genami innych mikroorganizmów występujących w zbliżonym środowisku co *A. hydrophila*.

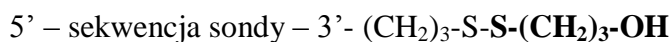


Źródło: Opracowanie własne na podstawie [251]

Rysunek 18. Niepożądane struktury fragmentów DNA.

1.4.3. Aktywacja sond ssDNA

Sondy ssDNA unieruchamiane na powierzchni elektrod złotych zostały zmodyfikowane łącznikiem (grupą merkaptopropylową – $(\text{CH}_2)_3\text{-SH}$) zabezpieczoną chemicznie przed utlenianiem mostkiem siarczkowym z merkaptopropanolem (zaznaczone poniżej przez pogrubienie) – rysunek 19.



Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 19. Schemat modyfikacji sondy ssDNA.

Usunięcie zabezpieczenia grupy tiolowej sondy ssDNA przebiegało poprzez inkubację 1 μM roztworu sond (w 50 mM buforze fosforanowym, pH 7.6) z 100 mM roztworem ditiotreitolu (DTT) (w wyżej wymienionym buforze) w proporcjach: 50 μl r-ru ssDNA, 125 μl r-ru DDT, 825 μl 50mM buforu fosforanowego pH 7.6. Po upływie godziny sondy ssDNA następnie oczyszczano i oddzielano od ditiotreitolu poprzez sączenie molekularne na kolumnkach PD 10 (GE Healthcare) wypełnionych 8.3 ml żelu Sephadex G-25. Zebrane frakcje o objętości 1 cm^3 były badane spektrofotometrycznie (przy długościach fal: 230, 260 i 280 nm) w celu sprawdzenia czystości otrzymanych sond ssDNA, ich stężenia w poszczególnych frakcjach oraz stężenia DTT. Stężenie oczyszczonych sond ssDNA było wyznaczane w przybliżeniu na podstawie następującego wzoru [252]:

$$c = \frac{A_{260} \times 100}{1.5 \times n_A + 0.71 \times n_C + 1.2 \times n_G + 0.84 \times n_T}$$

gdzie:

c – stężenie oligonukleotydu / przybliżone stężenie sond ssDNA ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$),

A_{260} – absorbancja przy długości fali 260 nm,

n_A, n_C, n_G, n_T – liczba poszczególnych nukleotydów A, C, G, T w sondzie ssDNA.

Oczyszczone sondy ssDNA były bezpośrednio wykorzystywane do immobilizacji na powierzchni elektrod złotych.

1.4.4. Modyfikacja powierzchni elektrod pracujących

Wykorzystane procedury modyfikacji powierzchni elektrody złotej (tworzenia samoorganizujących się monowarstw, SAMs) polegały na zanurzeniu wyczyszczonych elektrod odpowiednio w:

- w 1 μM roztworze zaktywowanych sond ssDNA w 50 mM buforze fosforanowym (pH=7.6) na 1 godzinę – otrzymana elektroda złota była zmodyfikowana monowarstwą sond ssDNA (ssDNA/AuE);
- w 10 mM roztworze merkptoalkoholu (MA): merkptoetanolu (MCE), merkptoheksanolu (MCH) lub merkptononanolu (MCN), w 10 mM buforze TRIS-HCl (pH=7.4) odpowiednio na 30 minut, 4 lub 16 godzin – otrzymana elektroda złota została zmodyfikowana monowarstwą merkptoalkoholu (odpowiednio MCE/AuE, MCH/AuE lub MCN/AuE);
- dla mieszanej monowarstwy ssDNA/merkptoalkohol: 1 godzina w 1 μM roztworze sond ssDNA w 50 mM buforze fosforanowym (pH=7.6), a następnie 30 min w 10 mM roztworze merkptoalkoholu w 10 mM buforze TRIS-HCl (pH=7.4) – otrzymana elektroda złota była zmodyfikowana mieszaną monowarstwą sond ssDNA i merkptoalkoholu (odpowiednio ssDNA/MCE/AuE, ssDNA/MCH/AuE lub ssDNA/MCN/AuE).

1.4.5. Hybrydyzacja w warstwie detekcyjnej biosensora

Reakcja hybrydyzacji sond ssDNA z docelowymi fragmentami kwasów nukleinowych była przeprowadzana według następującej procedury:

1. Zanurzenie elektrody złotej (zmodyfikowanej monowarstwą z sondami ssDNA) w roztworze 10 mM buforu TRIS-HCl z dodatkiem 1M NaCl (pH 7.4) zawierającego badane DNA, na określony w danym badaniu czas, w temperaturze pokojowej, przy mieszaniu z szybkością ok. 160 obrotów/minutę.

W przypadku hybrydyzacji z DNA wyizolowanym z komórek bakteryjnych, próbka DNA była bezpośrednio przed reakcją poddana procesowi denaturacji, który polegał na 3 minutowym ogrzewaniu w temperaturze 96°C, a następnie szybkim ochłodzeniu w łaźni lodowej.

2. Przeniesienie elektrody do czystego 10mM buforu TRIS-HCl (pH 7.4) i płukanie, 1 minuta, 160 obrotów/minutę.

1.4.6. Izolacja i amplifikacja bakteryjnego DNA

Izolacja DNA z komórek bakterii była przeprowadzona z zastosowaniem zestawu do izolacji genomowego DNA – GENOMIC Maxi AX (A&A Biotechnology, Gdynia).

Procedura obejmowała następujące działania:

1. Odwirowanie płynnej hodowli bakteryjnej (czas 5 minut przy 14000 obrotów/minutę), odrzucenie supernatantu.
2. Zawieszenie osadu bakteryjnego w 5 ml buforu TE i dodanie 100 µl roztworu lizozymu (stężenie enzymu 20 mg/ml, czas inkubacji 15 minut, temperatura 37°C).
3. Dodanie 5 ml buforu lizującego L 1.4 i proteinazy K (stężenie 20 mg/ml, czas inkubacji 150 minut, temperatura 37°C).
4. Dodanie do próbki 10 µl RNA-zy i mieszanie całości przez 20 sekund.
5. Przeniesienie mieszaniny do kolumny umieszczonej w probówce 50 ml i odwirowanie całości (czas 2 minuty przy 4000 obrotów/minutę).
6. Po przejściu mieszaniny przez kolumnę, przeniesienie jej do nowej probówki, dodanie 5 ml buforu płuczającego K2 i odwirowanie (czas 2 minuty przy 4000 obrotów/minutę).
7. Powtórne płukanie z wprowadzeniem do kolumny 5 ml buforu płuczającego K2 i wirowanie (warunki jak wyżej).
8. Przeniesienie kolumny do nowej probówki 50ml, wymycie oczyszczonego DNA przez dodanie 2.5 ml buforu elucyjnego K3, inkubacja próbki (czas 2 minuty, temperatura pokojowa) i wirowanie (czas 1 minuta przy 4000 obrotów/minutę).
9. Powtórne dodanie 2.5 ml buforu elucyjnego K3 i wirowanie (warunki jak wyżej).
10. Dodanie do eluatu zawierającego DNA 4 ml izopropanolu, wymieszanie, przeniesienie do probówki wirówkowej i odwirowanie (czas wirowania 10 minut, prędkość 11000 obrotów/minutę).
11. Usunięcie supernatantu, płukanie osadu przez dodanie 2 ml 70% etanolu i odwirowanie (czas 5 minut przy 11000 obrotów/minutę).
12. Usunięcie supernatantu, suszenie osadu przez 10 minut w temperaturze pokojowej (przy odwróconej próbce).
13. Dodanie do osadu wody, inkubacja do rozpuszczenia DNA.
14. Dodanie do próbki izopropanolu, odwirowanie i usunięcie supernatantu (powtórzenie tego etapu z 70% etanolem).
15. Dodanie do osadu wody i inkubacji przez 10 minut w temperaturze pokojowej do rozpuszczenia DNA.

16. Próbki wyizolowanego DNA porpcjowano i zamrożono w temperaturze -20°C.

Reakcja amplifikacji wybranych fragmentów kwasów nukleinowych przeprowadzona została techniką łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Skład mieszaniny reakcyjnej został przedstawiony w tabeli 2. Reakcja przebiegała zgodnie z procedurą zestawioną w tabeli 3.

Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR użytej do amplifikacji fragmentu genu *A. hydrophila*.

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie w mieszaninie reakcyjnej (25 µl)	Objętość [µl]
Woda	-	-	17.8
Bufor reakcyjny (z 25 mM MgCl ₂)	10x	1 x (2.5 mM)	2.5
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5
Starter F	25 µM	50 µM	0.5
Starter B	25 µM	50 µM	0.5
dNTPs	5 mM	200 µM	1.0
Polimeraza <i>Taq</i>	5 jedn./µl	1 jedn.	0.2
Matryca DNA	40 ng/µl	40 ng	1.0
Razem			25.0

Źródło: Na podstawie [253]

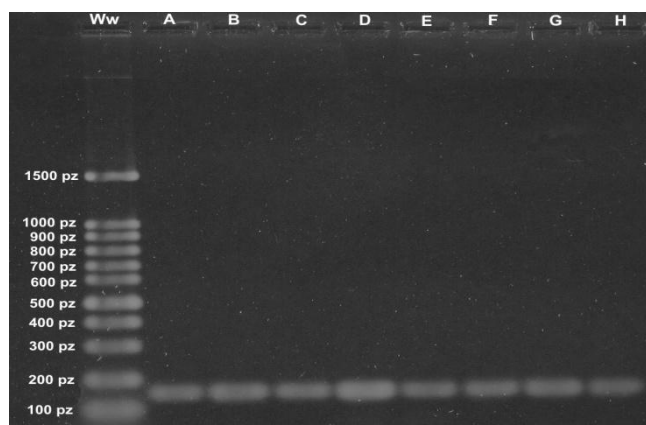
Tabela 3. Warunki reakcji PCR wykorzystanej do amplifikacji fragmentu genu *A. hydrophila*.

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	94	120	
Denaturacja	94	25	30
Wiązanie starterów	64	30	
Elongacja	72	30	
Synteza końcowa	72	120	

Źródło: Na podstawie [253]

Skuteczność amplifikacji wybranego fragmentu DNA była sprawdzona poprzez rozdział elektroforetyczny na żelu agarozowym oraz wybarwienie z użyciem fluorescencyjnego barwnika – SYBR[®] Gold. Rozdział i badanie amplifikowanego DNA przebiegało następująco:

1. 4 µl mieszaniny otrzymanej po reakcji PCR łączono z 1 µl buforu obciążającego i umieszczano w kieszonkach 0.9% żelu agarozowego.
2. Rozdział elektroforetyczny przebiegał w buforze 1xTBE (rozcieńczonym dejonizowaną wodą w stosunku 10xTBE:woda równym 1:10) przy napięciu 5 V/cm. Jako wzorzec wielkości DNA użyto mieszaniny Nova 100bp DNA ladder firmy Novazym.
3. Wybarwienie żelu wykonano z użyciem barwnika SYBR[®] Gold w buforze TRIS-HCl (pH 7.4) w proporcji 1 µl barwnika na 10 ml buforu.
4. Fotografję żelu agarowego przeprowadzono na transiluminatorze UV przy pomocy aparatu cyfrowego z zestawem filtrów do zdjęć w ultrafiolecie (rysunek 20).



Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 20. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR. Tory A-H przedstawiają produkty PCR amplifikacji fragmentu genu aerolizyny; tor Ww – wzorzec wielkości DNA.

Otrzymane próbki zamplifikowanego DNA były zamrażane w temperaturze -20°C.

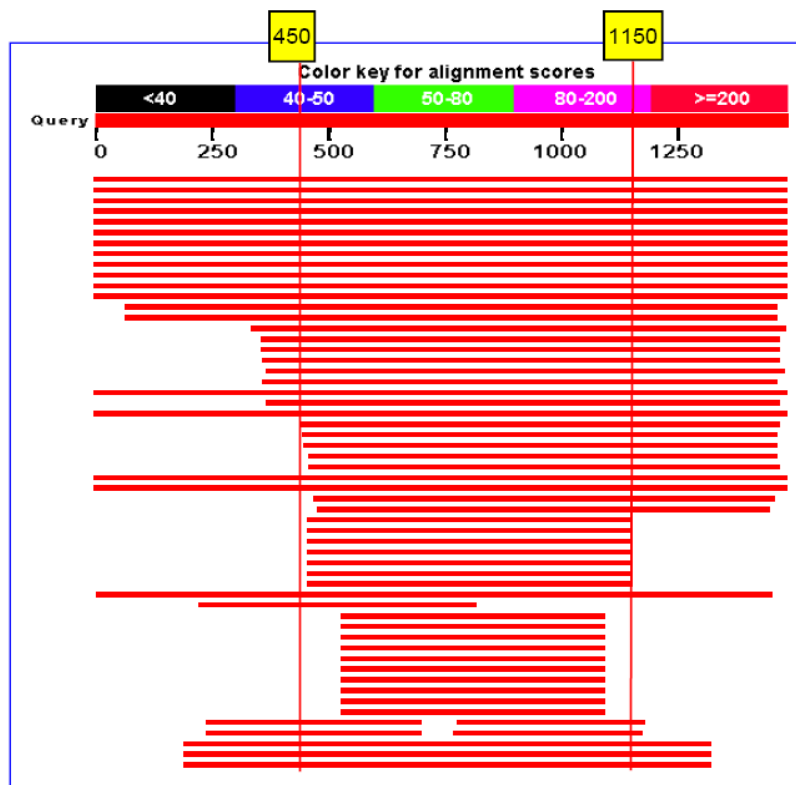
Czystość i ilość DNA po rozpuszczeniu w buforze hybrydazyjnym była sprawdzana poprzez pomiar spektrofotometryczny przy długościach fal 230, 260 i 280 nm. Stężenie DNA wyznaczano zgodnie z założeniem, że w kuwecie o grubości warstwy 1 cm wartość współczynnika absorbancji przy $\lambda = 260$ nm wynosi 1 ($A_{260} = 1$) dla roztworu dsDNA o stężeniu 50 µg/cm³ [252].

2. Wyniki i dyskusja

2.1. Zaprojektowanie sond ssDNA specyficznych dla genu aerolizyny *A. hydrophila*

Punktem wyjścia w wyborze fragmentów DNA specyficznych dla mikroorganizmu *Aeromonas hydrophila* było poszukiwanie w bazie GenBank kompletnej sekwencji genu aerolizyny syntetyzowanej przez te bakterie. Kompletna sekwencja wyżej wymienionego genu znaleziona została w odniesieniu do szczepu *A. hydrophila* AH14 (LOCUS: EU650663, 1482 pz, BCT 10-May-2008). Odpowiednie zestawienie danych z bazy NCBI zamieszczono w załączniku 2. Szczegółowa procedura wyboru przedstawionej sekwencji genu aerolizyny *A. hydrophila* została przedstawiona w punkcie 1.4.2. Wybór i ocena sond ssDNA.

Wprowadzając całą sekwencję genu aerolizyny *A. hydrophila* AH14 do programu BLAST sprawdzono, która jego część pojawia się najczęściej w innych sekwencjach opublikowanych w bazie NCBI dla genu aerolizyny *A. hydrophila* (według procedury opisanej w punkcie 1.4.2.). Jako najczęściej powtarzający się fragment został wybrany odcinek między 450 a 1150 parą zasad wyjściowej sekwencji genu aerolizyny (rys. 21).



Rysunek 21. Wykres BLAST pokrycia wyjściowej sekwencji genu aerolizyny przez inne doniesienia dla *A. hydrophila*.

Wybrany odcinek genu podzielono następnie na 682 fragmenty składające się z 20 par zasad, które otrzymano przesuwając się kolejno o jedną zasadę w wyjściowej sekwencji genu aerolizyny. Uzyskane 20-merowe fragmenty kwasu nukleinowego były poddane ocenie przydatności jako potencjalna sonda ssDNA w konstruowanym biosensorze. Stosując tak zwany „kalkulator DNA” odrzucone zostały sekwencje kwasów nukleinowych, które mogły tworzyć struktury II-rzędowe i/lub dimery DNA. Pozostałe 211 fragmentów DNA poddano ocenie specyficzności względem genu aerolizyny *A. hydrophila* przy pomocy programu BLAST – procedurę postępowania opisano w punkcie 1.4.2. Najwyższy stopień specyficzności został uzyskany dla niżej wymienionych sekwencji (na początku podany jest numer zasady w wyjściowym genie aerolizyny):

- 655: 5'-CTGGTCAAGACGGTGGTGGG-3',
- 656: 5'-TGGTCAAGACGGTGGTGGGC-3',
- 657: 5'-GGTCAAGACGGTGGTGGGCT-3',
- 658: 5'-GTCAAGACGGTGGTGGGCTG-3',
- 659: 5'-TCAAGACGGTGGTGGGCTGG-3',
- 660: 5'-CAAGACGGTGGTGGGCTGGG-3',
- 667: 5'-GTGGTGGGCTGGGCGATCAA-3'.

Do dalszych badań nad modyfikacją powierzchni elektrody złotej wybrano sekwencję zaczynającą się od zasady nr 667 w wyjściowej sekwencji genu aerolizyny. W związku z przewidywaną modyfikacją końca 3' sondy ssDNA poprzez alkanotiolowy łącznik dana sekwencja zapewniała największą ilość guaniny maksymalnie oddalanej od miejsca modyfikacji. Właściwość ta odgrywałaby znaczącą rolę w przewidywanym systemie detekcji reakcji hybrydyzacji opartym na wykorzystaniu aktywnych elektrochemicznie wskaźników DNA – między innymi błękitu metylenowego, który wykazuje specyficzne powinowactwo względem guaniny (punkt 5.2.2. części literaturowej niniejszej pracy).

Po szczegółowym sprawdzeniu specyficzności wybranych sekwencji, porównaniu z danymi przedstawionymi w literaturze, ustalono następujące sekwencje do wykorzystania w badaniach:

- 667: 5'-GTGGTGGGCTGGGCGATCAA-(CH₂)₃-SH => sonda I, która została użyta przy badaniu warstwy detekcyjnej biosensora, w pomiarach chronokulometrycznych i przy pomiarach woltamperometrycznych (SWV) z użyciem wskaźnika błękitu metylenowego;

- 543: 5'-CTGCGAGGGTTATCGTTGTG => starter F, starter wykorzystany w reakcji PCR potwierdzającej obecność stosowanych sond w DNA wyizolowanym z hodowli *A. hydrophila*;
- 698: 5'-GTGTCGCTGTCGTTGATCG => starter B, także wykorzystany w wyżej wymienionej reakcji PCR;
- 658: 5'-**GTCAAGACGGTGGTGGGCTG**-(CH₂)₃-SH => sonda II, stosowana do pomiarów woltamperometrycznych (SWV) z użyciem wskaźnika bis-benzoimidowego Hoechst 33258.

Poniżej przedstawione jest umiejscowienie opisanych fragmentów DNA w wyjściowej sekwencji genu aerolizyny *A. hydrophila*:

```
541 GGCTGCGAGG GTTATCGTTG TGGCGAGAAG ACGTCCATCA AGGTCAGCAA TTTTGC GTAC
601 AACCTGGACC CTGACAGCTT CAAACATGGT GACGTGACCC AGTCTGACCG TCAGCTGGTC
661 AAGACGGTGG TGGGCTGGC GATCAACGAC AGCGACACCC
```

W celu potwierdzenia poprawności wyboru wyżej wymienionych sekwencji, przeprowadzona została reakcja PCR z użyciem starterów zaprojektowanych do amplifikacji fragmentu genu aerolizyny zawierającego oba wytypowane odcinki sond ssDNA. Reakcja przebiegała zgodnie z procedurą przedstawioną w punkcie 1.4.6 niniejszej pracy. Jako matrycę wykorzystano DNA wyizolowane z komórek bakterii *A. hydrophila*. W wyniku rozdzielenia elektroforetycznego i wybarwienia odczynnikami SYBR[®] Gold produktów reakcji PCR otrzymano fragmenty DNA o długości 156 pz (rys. 20) tj. odpowiadające założonej długości amplifikowanego odcinka genu aerolizyny. Tym samym potwierdzona została obecność wybranych sekwencji w DNA badanych bakterii.

W opracowanym przez S. Tombelli i współpracowników piezoelektrycznym biosensorze hybrydyzacji DNA [57] także zastosowano sondę ssDNA specyficzną dla genu aerolizyny *A. hydrophila*. Jej sekwencja: 5' caccaggtattggacgctgtccc oraz sekwencja komplementarnego odcinka DNA nie były obecne w wyjściowym genie aerolizyny *A. hydrophila* AH14 wykorzystanym w niniejszej pracy.

W literaturze znaleziono dodatkowo sekwencje starterów reakcji PCR, które wykorzystano do amplifikacji specyficznego obszaru wyżej wymienionego genu [43,52]. Mogłyby one także służyć jako sekwencje sond ssDNA do wykrywania bakterii *A. hydrophila*. Wspomniane fragmenty DNA prezentowały się następująco:

- 19-merowy starter F: 5' GC(A/T)GA(A/G)CCC(A/G)TCTATCC(A/T)G,
- 20-merowy starter B: 5' TTTCTCCGGTAAGACCATTG.

Amplifikowany fragment DNA miał długość 252 par zasad. Wspomniana sekwencja startera F oraz miejsce wiązania startera B zaznaczono w wyciągu z bazy NCBI zamieszczonym w załączniku 2. Podczas projektowania sond ssDNA dla genu aerolizyny *A. hydrophila* oba fragmenty DNA znalazły się poza najczęściej powtarzającym się fragmentem tego genu. Dodatkowo, po sprawdzeniu przez „kalkulator DNA” okazało się, iż obie sekwencje posiadają skłonność do tworzenia struktur drugorzędowych i zostałyby wyeliminowane w przyjętej procedurze wyboru sond ssDNA (według punktu 1.4.2.).

2.2. Przygotowanie elektrody pracującej i ustalenie warunków pomiarowych

2.2.1. Przygotowanie powierzchni elektrod złotych

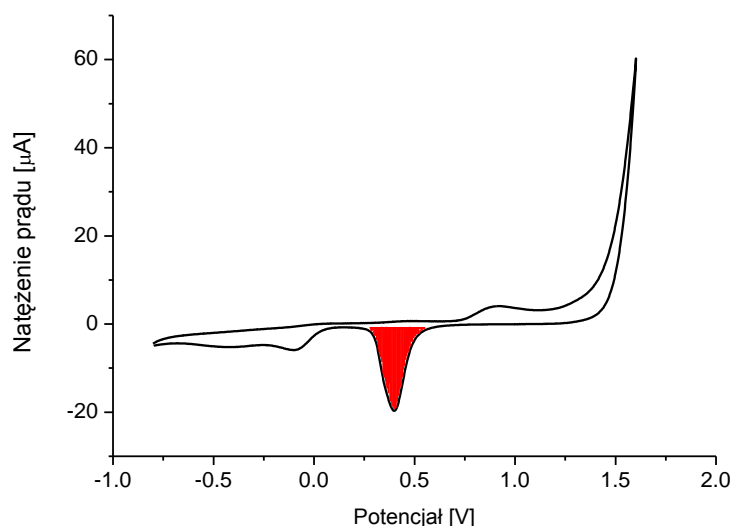
Podstawowym zjawiskiem w trakcie reakcji elektrochemicznych przeprowadzanych w przygotowanym układzie pomiarowym jest przepływ elektronów pomiędzy powierzchnią elektrody pracującej a cząsteczkami znajdującymi się w obszarze przyelektrodowym. Na przebieg tego niejednorodnego procesu znacząco wpływa mikrostruktura i szorstkość powierzchni elektrody, blokowanie aktywnych obszarów elektrody przez zaadsorbowane substancje oraz charakter grup funkcyjnych (np. tlenków) obecnych na jej powierzchni [254]. W celu zoptymalizowania warunków przebiegu ocenianej reakcji redoks podjęte zostały działania zmierzające do wyboru metody usuwania niepożądanych substancji z powierzchni elektrody złotej oraz jej przygotowania, które umożliwiłoby otrzymywanie powtarzalnych właściwości powierzchni przetwornika.

Sprawdzone zostały trzy metody przygotowania powierzchni elektrody pracującej oparte na polerowaniu mechanicznym i ewentualnym przemiataniu potencjałem w rozcieńczonym kwasie siarkowym (VI). Czyszczenie polegające na traktowaniu powierzchni złota czynnikami chemicznymi (na przykład gorącym roztworem KOH) [149,202] nie zostało zastosowane ze względu na izolację elektrody wykonaną z materiału wrażliwego na tego rodzaju działania.

Sprawdzone zostały kolejno:

1. procedura polerowania elektrod złotych zgodna z zaleceniami producenta zestawu do czyszczenia elektrod „PK-4 Polishing Kit” (BAS Bioanalytical Systems, USA) oparta na polerowaniu mechanicznym początkowo zawiesziną diamentową, następnie aluminiową oraz traktowaniu elektrody ultradźwiękami w łaźni z wodą destylowaną [191,203,255];
2. podobne podejście jak przedstawione powyżej – z zastąpieniem środków polerujących zawiesinami aluminium Mikropolish[®] II firmy Buehler (Dusseldorf, Niemcy) o wielkości ziaren odpowiednio 1.0 i 0.05 μm [192,213,256];
3. procedura wykorzystująca polerowanie mechaniczne zawiesinami aluminiowymi (Mikropolish[®] II Alumina) z dodatkowym wprowadzeniem etapu polerowania elektrochemicznego w 0.05 M roztworze H_2SO_4 [159,193,231,232,257] – szczegółowy opis w punkcie 1.4.1. pracy.

Elektrody złote nieczyszczone oraz poddane wyżej opisanym zabiegom wykorzystano następnie do pomiarów elektrochemicznego pola powierzchni (A_E) – zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 1.3.1. pracy (rys. 22). Na podstawie uzyskanych wyników obliczany był także współczynnik szorstkości ocenianych powierzchni. Wyniki wszystkich oznaczeń zostały zestawione w tabeli 4.



Rysunek 22. Krzywa voltamperometryczna (CV) z zaznaczonym pikiem redukcji tlenków złota uzyskana dla wyczyszczonej elektrody złotej w 50 mM buforze fosforanowym z dodatkiem 5 mM KCl.

Wszystkie oceniane procedury przygotowania elektrod powodowały wzrost elektrochemicznego pola powierzchni przetwornika i jednocześnie zwiększenie szorstkości (w porównaniu z elektrodami nieczyszczonymi). Wprowadzenie etapu elektrochemicznego polerowania wpłynęło na wygładzenie powierzchni złota. Zaobserwowane tendencje były w pełni zgodne z wnioskami badań przeprowadzonych przez R.F. Carvalhala i współpracowników [192], którzy oceniali wpływ różnych procedur przygotowania powierzchni elektrod złotych na odpowiedź elektrochemiczną tego materiału. Biorąc pod uwagę najniższy stopień szorstkości ($R = 5.67$) i najwyższą powtarzalność wyników oceny ($RSD = 5\%$) do prac nad konstrukcją elektrochemicznego biosensora DNA wybrana została procedura przygotowania przetwornika oparta na polerowaniu mechanicznym i przemiataniu potencjałem.

Trafność tego wyboru potwierdzają wyniki pomiaru elektrochemicznego efektu blokowania i pojemności elektrycznej uzyskane dla wyczyszczonych elektrod złotych (odpowiednio punkt 2.3.1. i 2.3.2. pracy). Wyznaczone na tym etapie badań elektrochemiczne pole powierzchni elektrody złotej, równe 0.0641 cm^2 ($n = 8$, $RSD = 5\%$), zostało wykorzystane we wszystkich późniejszych obliczeniach odnoszących się do pola powierzchni elektrody pracującej (między innymi dotyczących wartości pojemności elektrycznej interfejsy elektroda-roztwór elektrolitu, gęstości powierzchniowej sond ssDNA w warstwie detekcyjnej biosensora).

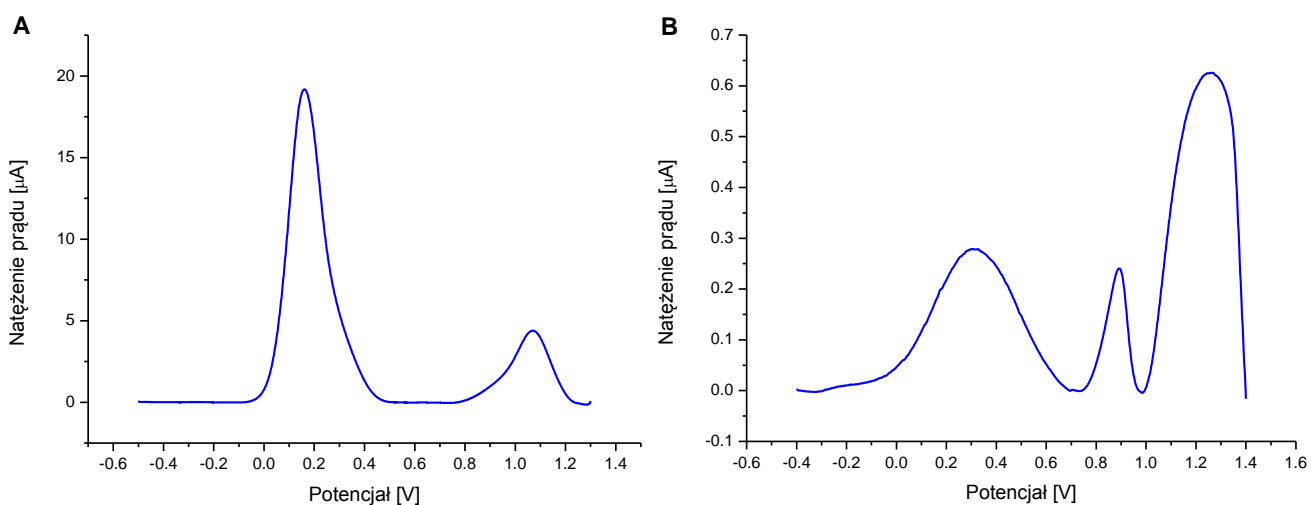
Tabela 4. Wartości elektrochemicznego pola powierzchni i współczynnika szorstkości dla elektrod nieczyszczonych oraz poddanych ocenianym procedurom czyszczenia.

Czyszczenie powierzchni elektrody złotej	Geometryczne pole powierzchni (A_G) [cm^2]	Elektrochemiczne pole powierzchni (A_R) [cm^2]	Współczynnik szorstkości (R)	Liczba pomiarów (n)	RSD [%]
Nieczyszczone	0.0113	0.0441	3.90	8	33
(1) Czyszczenie zawiesinami BAS	0.0113	0.0746	6.60	6	10
(2) Czyszczenie zawiesinami Buehler	0.0113	0.0677	5.99	8	5
(3) Czyszczenie zawiesinami Buehler i polerowanie elektrochemiczne	0.0113	0.0641	5.67	8	5

2.2.2. Charakterystyka buforów wytypowanych do pomiarów elektrochemicznych

Odpowiednie przygotowanie elektrody pracującej jest ważnym elementem poprzedzającym przeprowadzenie oznaczeń elektrochemicznych. Równie istotny jest wybór roztworu elektrolitu stanowiącego środowisko procesów zachodzących w przestrzeni przyelektrodowej podczas wykonywanych pomiarów (punkt 4.2.1. części literaturowej pracy). Na podstawie zebranych danych literaturowych [157,159,161,203,216,221,231] do oznaczeń elektrochemicznych wytypowane zostały dwa bufony o zbliżonym pH:

1. 10 mM bufor TRIS-HCl (pH 7.4),
2. 50 mM bufor fosforanowy z dodatkiem 5 mM KCl (pH 7.6).



Rysunek 23. Krzywe woltamperometryczne (SWV) otrzymane dla wyczyszczonych elektrod złotych zanurzonych w 50 mM buforze fosforanowym z dodatkiem 5 mM KCl (pH 7.6) (A) i w 10 mM buforze TRIS-HCl (pH 7.4) (B).

Stosując technikę woltamperometrii fali prostokątnej sprawdzona została odpowiedź elektrochemiczna roztworów wybranych buforów (rys. 23). Warunki pomiaru były następujące:

- układ trzech elektrod: AuE (pracująca), Ag/AgCl (referencyjna, 3 M), Pt (pomocnicza);
- środowisko: 1 cm³ badanego buforu;
- zakres potencjału: od -0.4 V do +1.4 V;
- skok potencjału: 1 mV, amplituda: 40 mV, szybkość polaryzacji elektrody: 0.1 V/s, częstotliwość: 100 Hz;

- wyniki pomiarów opracowywano poprzez funkcję korekcji linii bazowej (średnia ruchoma o szerokości pików 0.03 V) i automatycznego szukania pików (parametry: szerokość pików 0.03 V, wysokość pików 1×10^{-10} A).

Na podstawie przeprowadzonych pomiarów (po dwanaście niezależnych powtórzeń dla każdego z badanych roztworów) stwierdzono, iż oceniany 50 mM bufor fosforanowy wykazywał mniejszą aktywność elektrochemiczną niż 10 mM bufor TRIS-HCl. Dla buforu fosforanowego obserwowano jedynie pik przy potencjale 0.15 V i pik związany z reakcją redoks materiału elektrody pracującej przy 1.07 V (rys. 23A). Z kolei roztwór 10 mM buforu TRIS-HCl wykazał odpowiedź elektrochemiczną składającą się z trzech pików widocznych na uzyskanej krzywej woltamperometrycznej, które dodatkowo pokrywały znaczący obszar badanego zakresu potencjału (rys. 23B). Szczegółowe wyniki zamieszczone są poniżej:

1. Pomiar woltamperometryczny (SWV) dla 10 mM buforu TRIS-HCl (pH 7.4):
 - pik przy potencjale +0.36 V – wysokość pików 3.1 μ A (RSD = 11%),
 - pik przy potencjale +0.89 V – wysokość pików 2.9 μ A (RSD = 13%),
 - pik przy potencjale +1.25 V – wysokość pików 6.3 μ A (RSD = 15%).
2. Pomiar woltamperometryczny (SWV) dla 50 mM buforu fosforanowego z dodatkiem 5 mM KCl (pH 7.6):
 - pik przy potencjale +0.15 V – wysokość pików 19.2 μ A (RSD = 10%),
 - pik przy potencjale +1.07 V – wysokość pików 4.5 μ A (RSD = 12%).

Do pomiarów woltamperometrycznych z użyciem elektroaktywnych wskaźników hybrydyzacji DNA (planowanych w dalszej części pracy) wybrany został 50 mM bufor fosforanowy z dodatkiem 5 mM KCl (pH 7.6), który zapewniał mniejszą ilość sygnałów redoks w badanym zakresie potencjału.

2.2.3. Sygnał elektrochemiczny wybranych wskaźników hybrydyzacji DNA

Konstrukcja elektrochemicznego biosensora DNA do wykrywania specyficznych fragmentów DNA wymaga opracowania efektywnego systemu detekcji hybrydyzacji. Opierając się na zebranych danych literaturowych (zamieszczonych poniżej, osobno przy każdym związku chemicznym) wytypowano pięć wskaźników hybrydyzacji DNA, które mogłyby być zastosowane do różnicowania jedno- i dwuniciowych fragmentów kwasów nukleinowych obecnych na powierzchni elektrody złotej. Każdy z wybranych związków

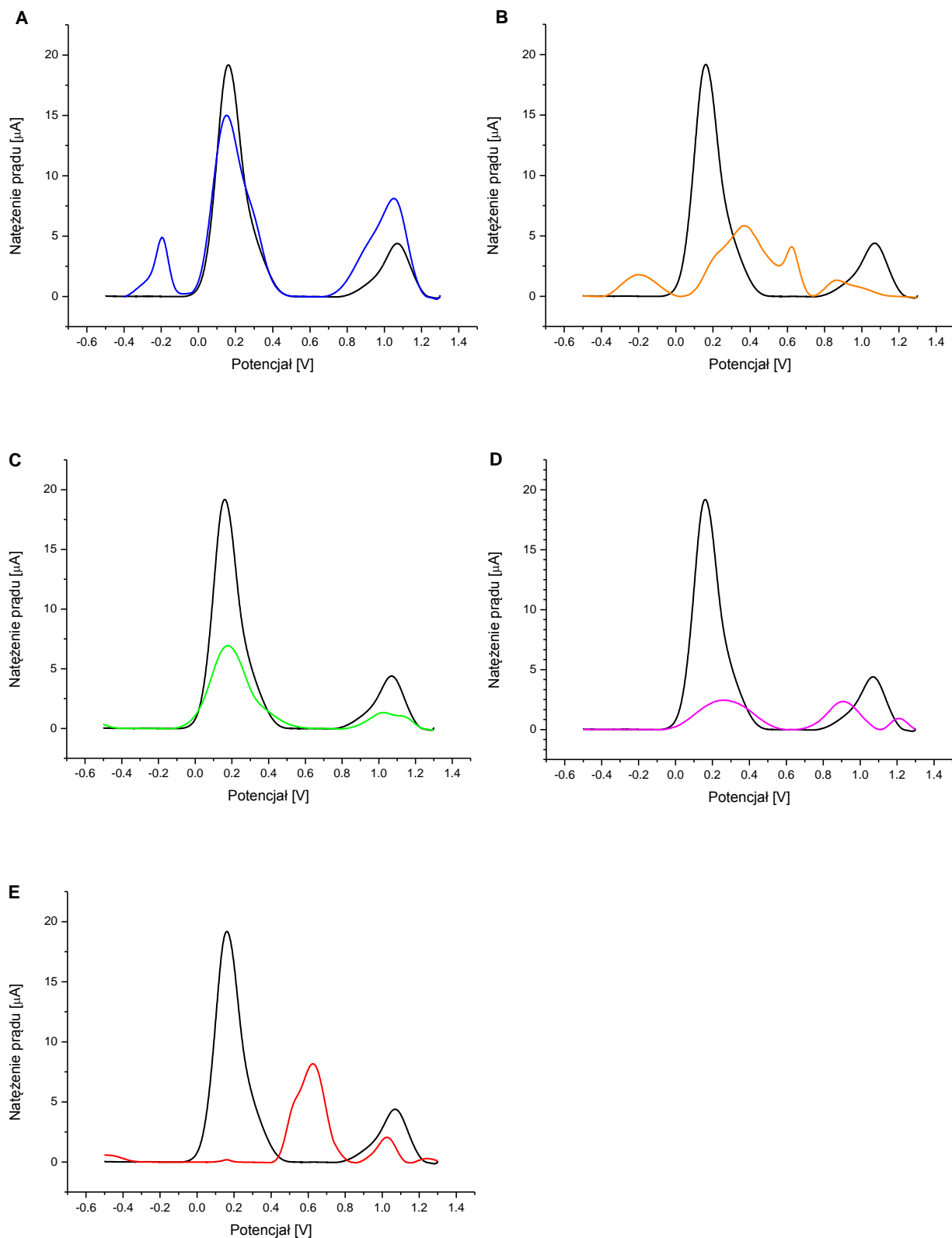
odznacza się różnym sposobem oddziaływania z cząsteczkami DNA i wykazuje większe powinowactwo względem jedno- lub dwuniciowej formy kwasu deoksyrybonukleinowego (punkt 5.2.2. części literaturowej niniejszej pracy):

- błękit metylenowy (MB) odznacza się powinowactwem względem guaniny, która jest bardziej dostępna w jednoniciowych fragmentach DNA niż w dupleksach dsDNA;
- sól disodowa kwasu antrachinono-1,5-disulfonowego (AQDS) jest anionowym interkalatorem wnikającym w dwuniciową strukturę dsDNA;
- daunomycyna (DM) także interkaluje cząsteczki dsDNA;
- 4',6-diamidino-6-fenylindol (DAPI) jest zaliczany zarówno do związków interkalujących dsDNA, jak i cząsteczek wbudowujących się w rowki dwuniciowej helisy kwasu deoksyrybonukleinowego;
- bis-benzoimid H 33258 (Hoechst 33258) jest typowym związkiem łączącym się z małym rowkiem w strukturze dsDNA.

Celem tego etapu badania jest wybór wskaźnika, który posiada potencjał piku redoks nie pokrywający się z sygnałami tła. Stosując technikę woltamperometrii fali prostokątnej sprawdzona została odpowiedź elektrochemiczna roztworu ocenianego związku chemicznego w 50 mM buforze fosforanowym z dodatkiem 5 mM KCl (pH 7.6) (rys. 24). Ocenie poddano kolejno:

1. 10 mM roztwór błękitu metylenowego (MB) [203,206,209,213,227,231-233,257,258];
2. 5 mM roztwór soli disodowej kwasu antrachinono-1,5-disulfonowego (AQDS) [159,221,230,231];
3. 10 mM roztwór chlorowodoru daunomycyny (DM) [116,227,228,259];
4. 10 mM roztwór dichlorowodoru 4',6-diamidino-6-fenylindolu (DAPI) [227,228];
5. 0.5 mM roztwór trichlorowodoru bis-benzoimidu H 33258 (Hoechst 33258) [149,216,227,234].

Zastosowane warunki pomiarowe były takie same, jak przy ocenie buforów wytypowanych do oznaczeń elektrochemicznych (punkt 2.2.2.).



Rysunek 24. Krzywe voltamperometryczne (SWV) otrzymane dla wyczyszczonych elektrod złotych przed (—) i po wprowadzeniu 10 mM MB (—) (A), 5 mM AQDS (—) (B), 10 mM DM (—) (C), 10 mM DAPI (—) (D), 0.5 mM Hoechst 33258 (—) (E) do 50 mM buforu fosforanowego z dodatkiem 5 mM KCl (pH 7.6).

Odpowiedź elektrochemiczna uzyskana podczas badania roztworów poszczególnych wskaźników była następująca:

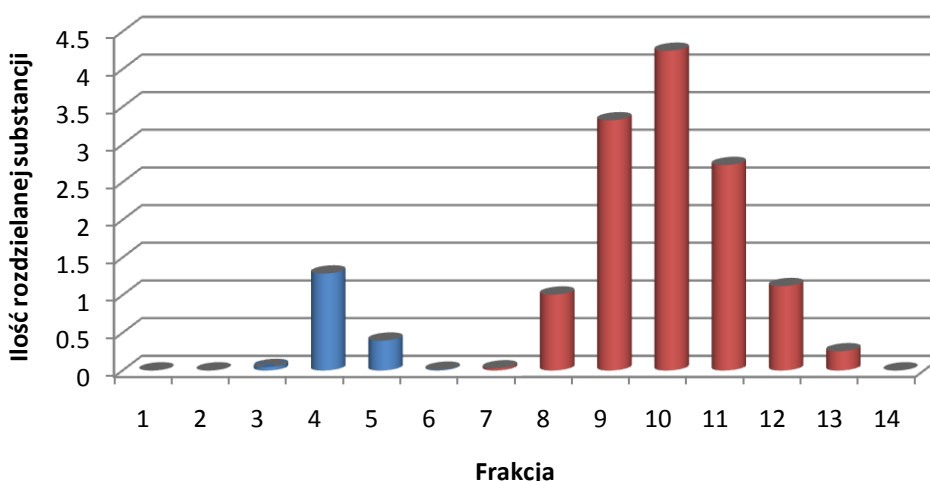
1. Pomiar woltamperometryczny (SWV) dla 10 mM roztworu MB:
 - pik przy potencjale -0.20 V – wysokość piku 4.8 μA ($n = 5$, RSD = 13%),
 - pik przy potencjale +0.15 V – wysokość piku 15.0 μA ($n = 5$, RSD = 15%),
 - pik przy potencjale +1.05 V – wysokość piku 8.1 μA ($n = 5$, RSD = 18%).
2. Pomiar woltamperometryczny (SWV) dla 5 mM roztworu AQDS:
 - pik przy potencjale -0.20 V – wysokość piku 1.8 μA ($n = 8$, RSD = 20%),
 - pik przy potencjale +0.19 V – pik trudny do oceny, nie występował we wszystkich 8 pomiarach,
 - pik przy potencjale +0.37 V – wysokość piku 5.9 μA ($n = 8$, RSD = 15%),
 - pik przy potencjale +0.62 V – wysokość piku 4.0 μA ($n = 8$, RSD = 10%),
 - pik przy potencjale +0.86 V – wysokość piku 1.3 μA ($n = 8$, RSD = 25%).
3. Pomiar woltamperometryczny (SWV) dla 10 mM roztworu DM:
 - pik przy potencjale +0.17 V – wysokość piku 6.9 μA ($n = 8$, RSD = 20%),
 - pik przy potencjale +1.01 V – wysokość piku 1.3 μA ($n = 8$, RSD = 24%),
 - pik przy potencjale +1.14 V – wysokość piku 1.1 μA ($n = 8$, RSD = 29%).
4. Pomiar woltamperometryczny (SWV) dla 10 mM roztworu DAPI:
 - pik przy potencjale +0.26 V – wysokość piku 2.4 μA ($n = 5$, RSD = 32%),
 - pik przy potencjale +0.90 V – wysokość piku 2.4 μA ($n = 5$, RSD = 28%),
 - pik przy potencjale +1.21 V – wysokość piku 0.9 μA ($n = 5$, RSD = 30%).
5. Pomiar woltamperometryczny (SWV) dla 0.5 mM roztworu Hoechst 33258:
 - pik przy potencjale +0.16 V – wysokość piku 0.2 μA ($n = 8$, RSD = 13%),
 - pik przy potencjale +0.52 V – pik trudny do oceny, nie występował we wszystkich 8 pomiarach,
 - pik przy potencjale +0.63 V – wysokość piku 8.2 μA ($n = 8$, RSD = 15%),
 - pik przy potencjale +1.03 V – wysokość piku 2.1 μA ($n = 8$, RSD = 17%).

Wśród ocenianych związków chemicznych wskaźniki DM i DAPI nie wykazywały pożądanej odpowiedzi elektrochemicznej. Ich sygnał pokrywał się pod względem potencjałów obserwowanych pików z sygnałem tła (tj. pików związanych z roztworem buforu i materiałem elektrody pracującej) (rys. 24C i 24D). Wskaźnik AQDS zapewniał wyraźny sygnał pochodzący z reakcji redoks jego cząsteczek (pik przy potencjale +0.6 V),

ale łączył się on w znacznej części z odpowiedzią elektrochemiczną buforu fosforanowego (pik przy potencjale +0.4 V) (rys. 24B). Jedynie wskaźniki MB i Hoechst 33258 umożliwiły obserwację pików związanych z ich reakcją redoks (odpowiednio przy potencjałach -0.2 V i +0.6 V), które jednocześnie nie pokrywały się z sygnałami tła (rys. 24A i 24E). Oba elektroaktywne związki chemiczne zostały wytypowane jako wskaźniki hybrydyzacji DNA, które mogą być wykorzystane w konstruowanym elektrochemicznym biosensorze.

2.2.4. Przygotowanie sond ssDNA do immobilizacji w warstwie detekcyjnej biosensora

W celu unieruchomienia jednoniciowej sondy ssDNA na powierzchni elektrody pracującej koniec 3' wspomnianego fragmentu DNA został zmodyfikowany przy pomocy merkaptopropylenowego łącznika. Wprowadzona grupa tiolowa była zabezpieczona chemicznie przed utlenianiem poprzez mostek disiarczkowy z merkaptopropanolem (rys. 19). Usunięcie tego zabezpieczenia wymagało użycia roztworu ditiotretolu i przebiegało zgodnie z procedurą zamieszczoną w punkcie 1.4.3. Wyznaczone spektrofotometrycznie stężenia sond ssDNA i DTT obecnych podczas procesu aktywacji w poszczególnych frakcjach eluatu z kolumny przedstawiono na rysunku 24. Ocena skuteczności oczyszczania sond ssDNA była przeprowadzana także poprzez pomiary spektrofotometryczne – odpowiednio przy długościach fal λ równych 230 nm (A_{230}), 260nm (A_{260}) i 280 nm (A_{280}).



Rysunek 25. Stężenia oczyszczanych sond ssDNA (■) [μ M] i roztworu DTT (■) [mM] w poszczególnych frakcjach eluatu otrzymanych podczas rozdzielania na kolumnach PD 10.

Stężenie zaktywowanej sondy ssDNA w połączonych frakcjach 4 i 5 wynosiło średnio 1 μM ($n = 40$, $\text{RSD} = 9\%$). Wszystkie porcje wycieku z kolumny zebrane przed frakcją 7 były wolne od ditiotritolu, który pojawiał się dopiero w późniejszych etapach sączenia molekularnego (rys. 25). Czystość uzyskanych roztworów DNA była zadowalająca. Stosunek wartości absorbancji A_{230}/A_{260} był niższy niż wartość 0.5, a stosunek A_{260}/A_{280} przekraczał wartość 1.7.

Zastosowana procedura aktywacji i oczyszczania sond ssDNA zapewniała zadowalające rezultaty – powtarzalne stężenie i czystość uzyskiwanych roztworów fragmentów DNA zmodyfikowanych merkaptotioalkilowym łącznikiem. Tak przygotowane sondy były bezpośrednio wykorzystywane do modyfikacji powierzchni wyczyszczonych złotych elektrod pracujących (procedura 1.4.4.).

2.3. Modyfikacja powierzchni elektrody złotej – konstrukcja warstwy detekcyjnej biosensora

Konstrukcja warstwy detekcyjnej biosensora do wykrywania hybrydyzacji DNA opiera się zasadniczo na sondach ssDNA komplementarnych względem docelowych fragmentów kwasów nukleinowych [1,12]. W celu unieruchomienia wspomnianych sond ssDNA na powierzchni modyfikowanej elektrody złotej zostały one wyposażone w merkaptopropylenowy łącznik (punkt 1.2.4.). Wprowadzona do cząsteczki kwasu nukleinowego grupa tiolowa $-\text{SH}$ umożliwi jej chemiczną adsorpcję na powierzchni złota. Kolejny etap konstrukcji warstwy detekcyjnej biosensora przewiduje próbę wprowadzenia do warstwy unieruchomionych na elektrodzie sond ssDNA cząsteczek merkaptotioalkoholi – odpowiednio krótszych (merkaptotioetanol), nieznacznie (merkaptotioheksanol) lub zdecydowanie dłuższych (merkaptotioanonanol) niż merkaptopropylenowy łącznik (punkt 1.4.4.). Uformowana w ten sposób mieszana samorganizująca się monowarstwa SAM powinna zapewnić dobrze zorganizowaną warstwę detekcyjną przygotowywanego biosensora z trwale związanymi i dostępnymi sondami ssDNA (punkt 4.3.2. części literaturowej pracy).

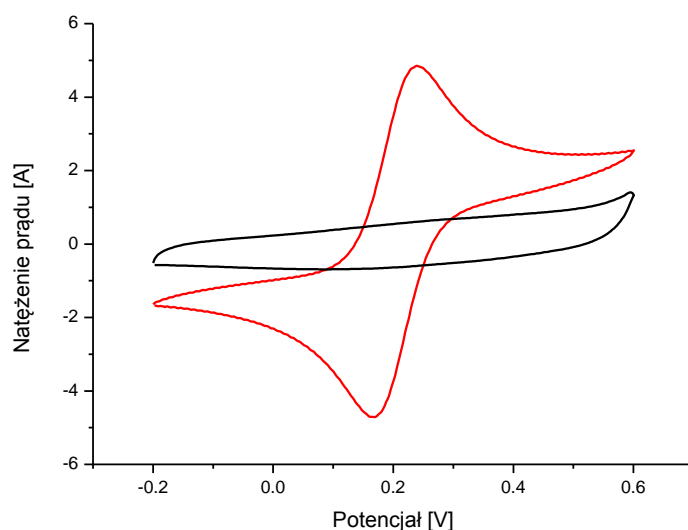
Ocena wyników powyżej opisanej chemicznej modyfikacji powierzchni elektrody złotej została przeprowadzona przy pomocy pomiarów elektrochemicznych polegających na:

1. Pomiarze elektrochemicznego efektu blokowania sygnału elektroaktywnego związku (kompleksu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) przez nowopowstałą organotioalową warstwę.

2. Wyznaczeniu pojemności elektrycznej interfazy ukształtowanej pomiędzy powierzchnią elektrody złotej a roztworem mocnego elektrolitu.
3. Pomiarze gęstości powierzchniowej sond ssDNA unieruchomionych w warstwie detekcyjnej biosensora.

2.3.1. Efekt blokowania elektrochemicznego przez monowarstwy modyfikujące elektrodę

Elektrochemiczna ocena samoorganizujących się monowarstw alkanotiole na powierzchni elektrody złotej opiera się na założeniu, iż złożona z cząsteczek organicznych struktura działa jak fizyczna bariera uniemożliwiająca innym cząsteczkom wnikanie wystarczająco blisko do powierzchni złota [164]. Pomiarzy woltamperometryczne w prostych elektrolitach stanowią bardzo przydatne narzędzie w ocenie zdolności tiolowych SAM do przewodzenia procesów faradajowskich [165]. Elektrochemiczne właściwości takiej monowarstwy są silnie uwarunkowane przez rozmiary i rozpowszechnienie defektów w jej strukturze. Jako miarę doskonałości utworzonych filmów wykorzystuje się między innymi efekt blokowania elektrochemicznego (EBE) sygnału redoks np. kompleksu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ [260]. Im wyższą wartość uzyskuje ten parametr, tym bardziej zorganizowaną strukturę posiada dana monowarstwa i tym silniej izoluje powierzchnię złota od zastosowanego roztworu elektrolitu [185].



Rysunek 26. Krzywe woltamperometryczne (CV) uzyskane dla czystej elektrody AuE w 0.1 M roztworze KCl z (—) i bez (—) dodatku wskaźnika redoks 1mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

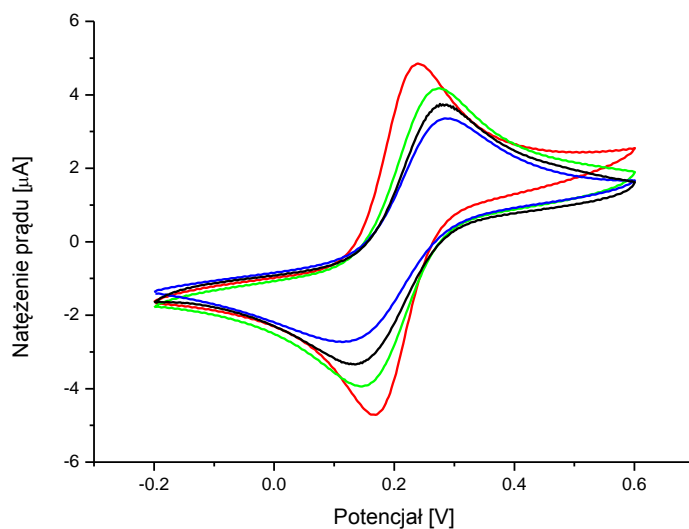
Pomiar efektu blokowania elektrochemicznego przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 1.3.2. W pierwszej kolejności sprawdzone zostało, jak zachowuje się wyczyszczona elektroda złota w 0.1 M roztworze KCl bez i z dodatkiem związku redoks, kompleksu 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (rys. 26). Wyczyszczona elektroda złota nie wywołała żadnego sygnału elektrochemicznego (piku redoks) w czystym 0.1 M roztworze KCl. Wybrany układ mógł stanowić środowisko pomiaru w przyjętym zakresie potencjału. Wprowadzenie 1 mM wskaźnika redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ do roztworu KCl pozwoliło na zaobserwowanie prądów anodowego i katodowego wynikających z reakcji tego elektroaktywnego kompleksu. Różnica w położeniu pików utlenienia i redukcji $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ wskazywała na pełną odwracalność wspomnianych procesów i brak zakłócenia przepływu jonów w przestrzeni przyelektrodowej [150,165]. Kształt zaobserwowanej krzywej voltamperometrycznej świadczył także o skutecznym procesie czyszczenia elektrody pracującej przed przeprowadzonym pomiarem CV.

Tabela 5. Efekt blokowania elektrochemicznego reakcji redoks wskaźnika $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (roztwór 1 mM w 0.1 M KCl) uzyskany na elektrodzie złotej zmodyfikowanej merkptoalkoholem – MCE, MCH lub MCN.

Mierzona wielkość	Wyniki pomiaru wskaźnika $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ / RSD [%]			
	Elektroda AuE (ilość powtórzeń = 8)	Elektroda MCE/AuE (ilość powtórzeń = 8)	Elektroda MCH/AuE (ilość powtórzeń = 7)	Elektroda MCN/AuE (ilość powtórzeń = 7)
Potencjał redukcji $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ [V]	0.170 / 1	0.158 / 4	0.113 / 30	0.149 / 9
Potencjał utlenienia $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ [V]	0.238 / 1	0.261 / 4	0.287 / 7	0.270 / 4
Różnica potencjałów [V]	0.068 / 3	0.103 / 15	0.174 / 31	0.122 / 19
Ładunek powstały przy redukcji $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ [μC]	9.162 / 7	8.237 / 6	6.899 / 10	7.237 / 10
Współczynnik bariery jonów (Γ_{ibf})	- / -	0.10	0.25	0.21

Zdolność do tworzenia monowarstw SAM przez wybrane merkapt alkohole została zbadana poprzez modyfikację powierzchni elektrody złotej podczas 16-godzinnej immobilizacji cząsteczek merkapt oetanolu, merkapt oheksanolu lub merkapt onnanolu – przeprowadzona zgodnie z procedurą przedstawioną w punkcie 1.4.4. Długi czas formowania SAM był zastosowany celowo, aby uzyskać wyraźny efekt blokowania elektrochemicznego przez powstałe organotiolowe monowarstwy. Ocena efektu EBE została przeprowadzona zgodnie z procedurą zawartą w punkcie 1.3.2. i wyrażona przy pomocy współczynnika bariery jonów związanego z daną reakcją redoks (Γ_{ibf}) (tabela 5).

W badaniu zdolności tworzenia samoorganizującej się monowarstwy i tym samym szczelnego pokrycia powierzchni elektrody złotej najlepsze rezultaty uzyskano podczas zastosowania cząsteczek merkapt oheksanolu. Nieco słabsze wyniki otrzymano dla merkapt onnanolu. Zdecydowanie najniższą zdolność elektrochemicznego blokowania wykazała monowarstwa zbudowana z merkapt oetanolu. Przedstawione wnioski potwierdza także wzrastająca – kolejno dla MCE, MCN i MCH – różnica w potencjale pików utlenienia i redukcji $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, która świadczy o rosnącej trudności w przepływie elektronów związanej z reakcją redoks elektroaktywnego wskaźnika (rys. 27).



Rysunek 27. Krzywe woltamperometryczne (CV) uzyskane w 0.1 M roztworze KCl z dodatkiem 1mM wskaźnika $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dla czystych elektrod AuE (—) i zmodyfikowanych monowarstwami merkapt alkoholi: MCE (—), MCH (—) lub MCN (—).

Stopień uporządkowania poszczególnych monowarstw SAM był charakteryzowany przez wyznaczony współczynnik blokowania reakcji kompleksu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Najwyższym

stopniem organizacji organotiolowej struktury charakteryzował się merkptoheksanol ($\Gamma_{\text{ibf}} = 0.25$). Nieco gorszy wynik uzyskano dla merkptononanolu ($\Gamma_{\text{ibf}} = 0.21$), który posiada zdecydowanie dłuższe cząsteczki niż MCH. Najniższą wartość współczynnika blokowania zaobserwowano dla wypełniacza o najkrótszych cząsteczkach – merkptoetanolu ($\Gamma_{\text{ibf}} = 0.10$).

Podjęte próby oceny modyfikacji powierzchni elektrody złotej poprzez pomiar efektu EBE elektroaktywnego wskaźnika $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ wykazały różnicę w skuteczności formowania zorganizowanych monowarstw przez oceniane merkptoalkohole. Żadna z badanych struktur SAM nie powodowała jednak wyraźnego efektu blokowania elektrochemicznego, co potwierdzały wyniki podobnych oznaczeń zaprezentowanych w literaturze. A.B. Steel i współpracownicy porównywali efekt EBE dla 2.5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ rozpuszczonego w 10 mM buforze TRIS-HCl (pH 7.4) przed i po modyfikacji elektrody złotej przez MCH lub mieszaninę sondy ssDNA z MCH [157]. Nowopowstałe struktury zmniejszyły praktycznie o połowę stopień przepływu elektronów do i z powierzchni zmodyfikowanego przetwornika. V. Dharuman i J.H. Hahn poprzez immobilizację na elektrodzie złotej mieszanej monowarstwy sond ssDNA i jednego z wypełniaczy: 1-merkptopropanu, kwasu 3-merkptopropionowego lub merkptoheksanolu, uzyskali prawie całkowite zablokowanie przepływu elektronów w wyniku reakcji redoks kompleksu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ [160]. Z kolei S. Campuzano i współpracownicy modyfikując elektrodę złotą monowarstwą złożoną z cząsteczek kwasu 3-merkptopropionowego, kwasu 11-merkptoundekanowego lub mieszaniny obu (w stosunku 25/75) uzyskali wartości współczynnika bariery jonów (utożsamianego ze stopniem pokrycia elektrody przez SAM) odpowiednio 0.38, 1.00 i 0.94 [202].

2.3.2. Pojemność elektryczna interfazy między powierzchnią elektrody a roztworem elektrolitu

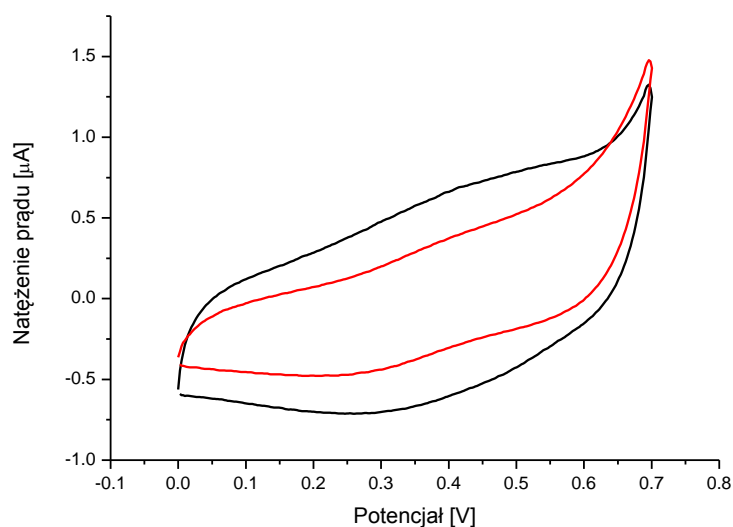
Stopień uporządkowania SAM na zmodyfikowanej elektrodzie pracującej może być badany technikami elektrochemicznymi nie tylko poprzez sprawdzenie zdolności monowarstwy do blokowania reakcji redoks elektroaktywnego wskaźnika. Innym popularnym narzędziem stosowanym do ustalenia przenikalności jonów przez ocenianą strukturę jest pomiar międzyfazowej pojemności elektrycznej (C). Oznaczenie polega na zbadaniu właściwości elektrycznych interfazy między powierzchnią zmodyfikowanej elektrody a roztworem silnego elektrolitu. Pomiar pojemności elektrycznej dostarcza informacji na temat stopnia upakowania monowarstwy SAM i ilości występujących w niej

defektów [164,261]. Im niższa wartość C jest obserwowana, tym mniej defektów posiada SAM oraz mniejsza jest przenikalność jonów do powierzchni elektrody [165,185].

Badanie pojemności elektrycznej dla ocenianych w pracy monowarstw SAM rozpoczęto od przeprowadzenia wyboru roztworu mocnego elektrolitu, który stanowiłby środowisko dla danych pomiarów elektrochemicznych. Na podstawie danych literaturowych do oceny wytypowane zostały dwa roztwory [157,159,164,262]:

1. 1 M KCl,
2. 1 M KH_2PO_4 .

Pomiar pojemności elektrochemicznej interfejsy elektroda-roztwór elektrolitu wykonano zgodnie z procedurą zawartą w punkcie 1.3.3. dla wyczyszczonych elektrod złotych (AuE) i elektrod zmodyfikowanych monowarstwą zbudowaną z cząsteczek MCH (MCH/AuE) (procedura modyfikacji przebiegała zgodnie z opisem zamieszczonym w punkcie 1.4.4., w czasie 16 godzin). Merkaptoheksanol został wybrany jako związek chemiczny, który z trzech ocenianych merkaptoalkoholi uzyskał najlepsze rezultaty w ocenie efektu blokowania (EBE) dla uformowanych monowarstw.



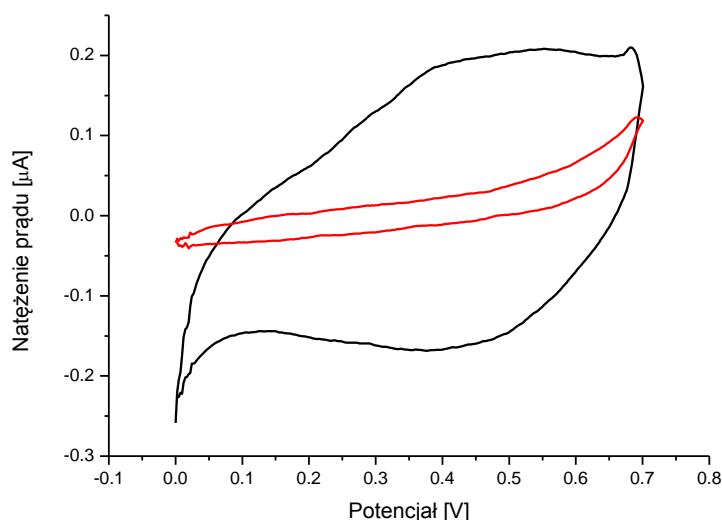
Rysunek 28. Krzywe woltamperometryczne (CV) uzyskane przy pomiarze pojemności elektrycznej interfejsy między elektrodą pracującą – czystą elektrodą złotą (—) lub elektrodą zmodyfikowaną warstwą MCH (—) – a roztworem elektrolitu (1 M KCl).

W przypadku pomiaru przeprowadzonego w 1 M roztworze KCl (rys. 28) uzyskana wartość pojemności elektrycznej interfejsy między wyczyszczoną elektrodą złotą a roztwo-

rem elektrolitu wyniosła $98.8 \mu\text{F}$ przypadających na 1 cm^2 powierzchni przetwornika ($n = 5$, $\text{RSD} = 5\%$). Umieszczenie na powierzchni złota samoorganizującej się monowarstwy MCH spowodowało spadek wartości pojemności elektrycznej C do poziomu $54.4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n = 4$, $\text{RSD} = 18\%$). Mimo iż wprowadzenie do ocenianej interfejsy cząsteczek merkptoheksanolu wywołało prawie dwukrotne obniżenie pojemności elektrycznej C , to wartości tego parametru dla elektrod zmodyfikowanych MCH były nadal zdecydowanie wyższe w porównaniu z danymi literaturowymi, gdzie uzyskiwano wartości równe kilku mikrofarradom na cm^2 [157,159,164].

Pomiary pojemności elektrycznej interfejsy między elektrodą złotą a 1 M roztworem KH_2PO_4 w zależności od stanu powierzchni danego przetwornika dostarczyły następujących wyników (rys. 29):

- dla wyczyszczonych elektrod złotych: $26.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n = 15$, $\text{RSD} = 13\%$),
- dla elektrod zmodyfikowanych monowarstwą SAM z MCH: $2.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n = 6$, $\text{RSD} = 24\%$).



Rysunek 29. Krzywe woltamperometryczne (CV) uzyskane przy pomiarze pojemności elektrycznej interfejsy między elektrodą pracującą – czystą elektrodą złotą (—) lub elektrodą zmodyfikowaną warstwą MCH (—) – a roztworem elektrolitu ($1 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$).

Wykorzystany w pomiarach wykonanych metodą woltamperometrii cyklicznej 1 M roztwór KH_2PO_4 zapewnił wyraźne obniżenie pojemności elektrycznej interfejsy elektroda-elektrolit po wprowadzeniu na powierzchnię przetwornika monowarstwy SAM merkptoheksanolu. Jednocześnie uzyskane rezultaty badań były porównywalne

z prezentowanymi w literaturze, otrzymanymi dla podobnych oznaczeń wartościami [157,159]. Do dalszych badań nad pojemnością elektryczną interfejsy między powierzchnią elektrody (zmodyfikowanej różnymi monowarstwami SAM) a roztworem elektrolitu wybrany został 1M roztwór KH_2PO_4 .

Tabela 6. Pojemności elektryczne dla czystej elektrody złotej i elektrod zmodyfikowanych SAM.

Elektroda złota	Pojemność elektryczna interfejsy [$\mu\text{F}/\text{cm}^2$]	Pojemność elektryczna w porównaniu do czystej AuE [%]	Ilość powtórzeń	RSD [%]
Czysta AuE	26.0	100	15	13
ssDNA/AuE	10.4	40	6	14
MCE/AuE (16h)	10.3	40	6	34
MCE/AuE (4h)	5.4	21	5	36
MCE/AuE (30min)	7.0	27	5	38
MCH/AuE (16h)	2.7	10	6	24
MCH/AuE (4h)	1.8	7	5	8
MCH/AuE (30min)	2.7	10	6	27
MCN/AuE (16h)	4.2	16	6	24
MCN/AuE (4h)	7.3	28	6	31
MCN/AuE (30min)	9.9	38	6	33
ssDNA/MCE/AuE	7.4	28	5	18
ssDNA/MCH/AuE	4.0	15	5	27
ssDNA/MCN/AuE	11.8	45	5	33

Opierając się na procedurach zamieszczonych w punktach 1.4.1., 1.4.3. i 1.4.4. (w części doświadczalnej niniejszej pracy) przygotowano elektrody złote (AuE), które następnie zmodyfikowano różnymi rodzajami monowarstw (jedno- i dwuskładnikowych) i poddano voltamperometrycznym pomiarom pojemności elektrycznej interfejsy elektroda-roztwór

elektrolitu – zgodnie z procedurą 1.3.3. Ocenie skuteczności modyfikacji powierzchni złota poddano (tabela 6):

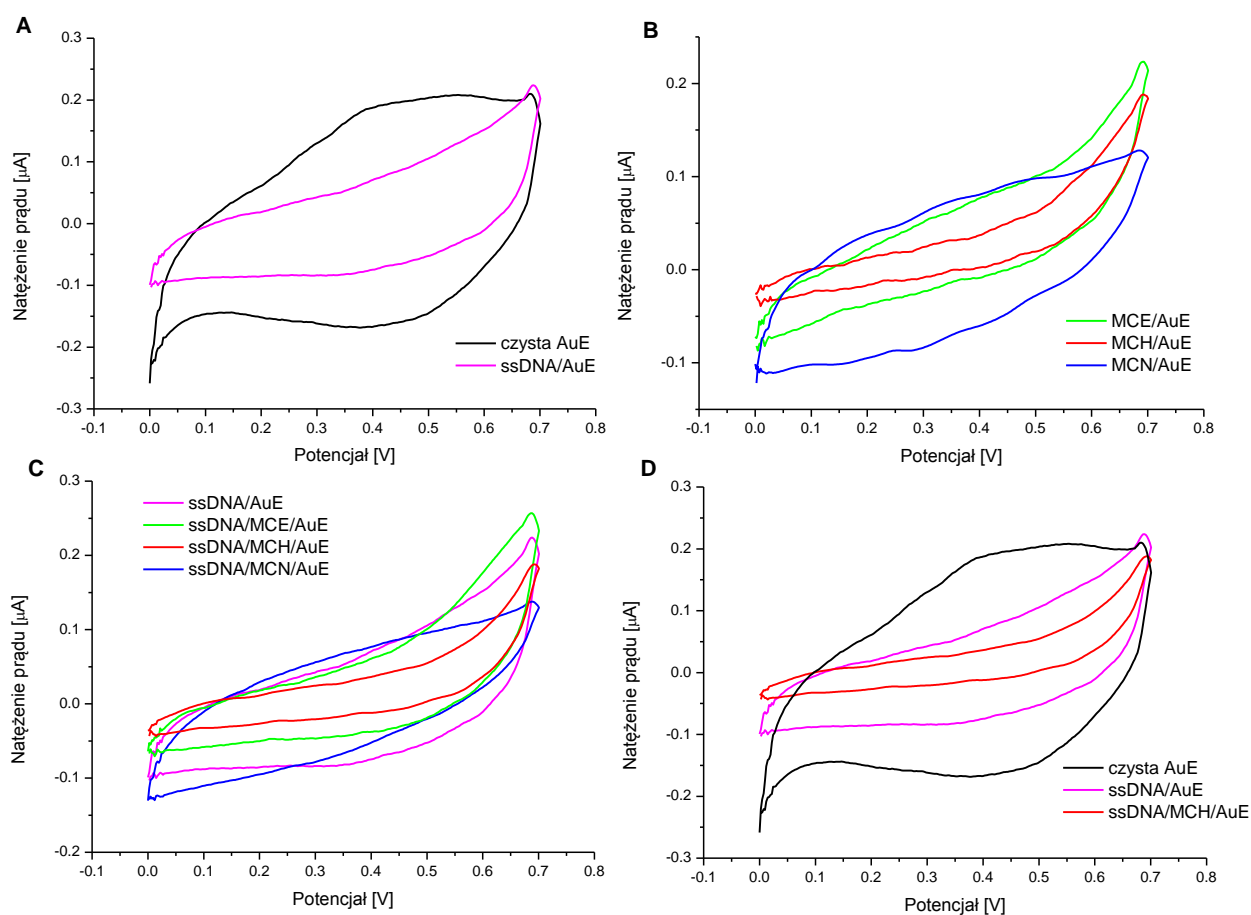
- elektrody z unieruchomionymi sondami ssDNA (ssDNA/AuE),
- elektrody zmodyfikowane jednoskładnikową monowarstwą SAM zbudowaną z cząsteczek merkptoetanolu (MCE/AuE), merkptoheksanolu (MCH/AuE) lub merkptononanolu (MCN/AuE) – które były krótsze (MCE), dwukrotnie (MCH) lub też trzykrotnie dłuższe (MCN) niż merkptoalkilowy łącznik wykorzystany do zmodyfikowania sond ssDNA. Zbadane zostały różne czasy wiązania danych merkptoalkoholi na powierzchni złota – 30 minut, 4 oraz 16 godzin,
- elektrody zmodyfikowane dwuskładnikową (mieszaną) monowarstwą SAM zbudowaną z sond ssDNA i z cząsteczek wypełniacza – jednego z ocenianych merkptoalkoholi (ssDNA/MCE/AuE, ssDNA/MCH/AuE lub ssDNA/MCN/AuE).

W wyniku unieruchomienia na powierzchni elektrody złotej jednoniciowych sond ssDNA wartość pojemności elektrycznej warstwy oddzielającej metal elektrody od roztworu elektrolitu spadła o ponad połowę. Organotiolowa struktura modyfikująca powierzchnię przetwornika znacząco obniżyła stałą dielektryczną przestrzeni znajdującej się bezpośrednio przy powierzchni elektrody złotej, co spowodowało spadek prądów pojemnościowych (mierzonych przy pomocy woltamperometrii CV) i tym samym obniżenie pojemności elektrycznej (rys. 30A). Jednak uzyskane wyniki pomiarów wskazywały na dużą ilość defektów w monowarstwie ssDNA modyfikującej powierzchnię elektrody. Najprawdopodobniej było to spowodowane niskim stopniem zorganizowania warstwy sond, ich wzajemnym splątaniem i nieszczelnym pokryciem powierzchni przetwornika. Podobne wnioski uzyskał w swoich badaniach A.B. Steel wraz ze współpracownikami [157], który na powierzchni elektrody złotej unieruchamiał sondę ssDNA lub 25-merowy homooligomer tyminy. W celu poprawy organizacji warstwy detekcyjnej biosensora zaplanowano wprowadzenie drugiego składnika do struktury SAM – merkptoalkoholu.

Zdolność wytypowanych merkptoalkoholi do tworzenia samoorganizującej się monowarstwy na powierzchni złota sprawdzono modyfikując elektrodę złotą cząsteczkami MCE, MCH lub MCN przez 30 minut, 4 oraz 16 godzin. W przypadku wydłużonego czasu immobilizacji (16 godzin) warstwa SAM zbudowana z merkptoetanolu wykazywała mniejszy stopień zorganizowania niż przy krótszym procesie jej tworzenia (tabela 6.). Cząsteczki merkptononanolu wykazywały z kolei odwrotną tendencję. Dla merkptoheksanolu jego zdolność do tworzenia uporządkowanej monowarstwy (o jak najniższej

wartości pojemności elektrycznej badanej interfazy) pozostawała względnie niezmienna wraz z wydłużonym czasem immobilizacji.

Wyniki przeprowadzonego eksperymentu wykazały, że w przypadku badanych warstw SAM czas ich formowania wpływa nieznacznie (MCE, MCN) lub prawie wcale (MCH) na właściwości nowopowstałych struktur. Dodatkowo, badania wykonane przez E.L.S. Wonga i jego współpracowników [159] udowodniły obecność zjawiska wypierania sond ssDNA z mieszanej monowarstwy ssDNA/merkptoalkohol przez cząsteczki wypełniacza przy wydłużonym okresie jego interakcji z powierzchnią złota. Z tego względu do dalszych badań nad jedno- i dwuskładnikowymi warstwami SAM wybrany został 30-minutowy czas immobilizacji merkptoalkoholi.



Rysunek 30. Krzywe voltamperometryczne (CV) otrzymane przy wyznaczeniu pojemności elektrycznej dla: czystej elektrody złotej (AuE) i elektrody zmodyfikowanej ssDNA (ssDNA/AuE) (A); elektrod zmodyfikowanych merkptoetanolem (MCE/AuE), merkptoheksanolem (MCH/AuE) i merkptononanolem (MCN/AuE) – czas unieruchamiania 30 minut (B); elektrod zmodyfikowanych samą sondą ssDNA (ssDNA/AuE) i w połączeniu z wybranym merkptoalkoholem (ssDNA/MCE/AuE, ssDNA/MCH/AuE lub ssDNA/MCH/AuE) (C); czystej elektrody złotej (AuE), zmodyfikowanej sondą (ssDNA/AuE) oraz mieszaną monowarstwą sondy i merkptoheksanolu (ssDNA/MCH/AuE) (D).

Porównując wartości pojemności elektrycznej otrzymane dla elektrod zmodyfikowanych monowarstwą merkptoalkoholu można stwierdzić, iż wśród ocenianych związków najlepsze predyspozycje do formowania uporządkowanej struktury SAM wykazały cząsteczki merkptoheksanolu (rys 30B). Elektrody złote zmodyfikowane tym związkiem odznaczały się najniższą wartością pojemności elektrycznej równą $2.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n = 6$, $\text{RSD} = 27\%$) w przypadku 30-minutowego czasu unieruchamiania. Słabiej zorganizowane monowarstwy tworzyły cząsteczki merkptoetanolu oraz merkptononanolu – pojemności elektryczne badanych interfaz wyniosły odpowiednio: $7.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ($n = 5$, $\text{RSD} = 27\%$) i 9.9 ($n = 6$, $\text{RSD} = 33\%$). Taką samą kolejność w ocenie zdolności do tworzenia uporządkowanej monowarstwy SAM uzyskano w pomiarach pojemności elektrycznej dla mieszanych struktur składających się z sond ssDNA i merkptoalkoholi – najlepszy MCH, pośredni MCE i najslabszy MCN (rys. 30C). Wypełniacz MCH o długości cząsteczek nieznacznie większej niż długość merkptoalkilowego łącznika sond ssDNA zapewnił warstwę detekcyjną biosensora o najniższej liczbie defektów – w porównaniu z pozostałymi mieszanymi SAM: ssDNA/MCE i ssDNA/MCN. Jest to wynik nieco odmienny od rezultatów badań E.L.S. Wonga i jego współpracowników [159]. Wyznaczali oni pojemność elektryczną dla monowarstw złożonych z sond ssDNA (z merkptoalkilowym łącznikiem o liczbie atomów węgla $n = 3$ lub 6) i z merkptoalkoholowego wypełniacza (o liczbie atomów węgla $n = 3$ (MCE), 6 (MCH) lub 11 (merkptoundekanol, MCU). Monowarstwy o najmniejszej liczbie defektów uzyskano dla struktur zawierających cząsteczki MCU, które były znacząco dłuższe od obu badanych łączników sond ssDNA.

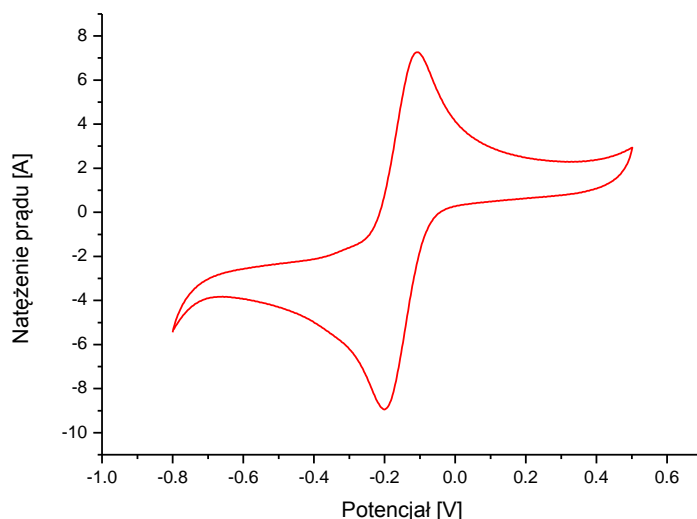
Zestawiając ze sobą rezultaty pomiarów pojemności elektrycznej interfazy elektrody złotej zmodyfikowanej warstwą sond ssDNA przed i po wprowadzeniu cząsteczek wypełniacza MCH, można zauważyć, w jakim stopniu użycie merkptoalkoholu obniżyło ilość defektów w powstałej warstwie detekcyjnej biosensora (rys. 30D). Żaden z dwóch pozostałych ocenianych związków tiolowych nie zapewnił równie efektywnego wypełnienia mieszanej monowarstwy SAM i wzrostu stopnia jej zorganizowania (tabela 6). W badaniach przeprowadzonych przez A.B. Steela i współpracowników [157] wprowadzenie merkptoheksanolu do warstwy tiolowanych sond ssDNA umiejscowionych na złocie spowodowało również znaczący spadek pojemności elektrycznej interfazy elektroda-roztwór elektrolitu, co świadczyło o znacznie mniejszej ilości defektów ocenianej SAM.

2.3.3. Gęstość powierzchniowa sond ssDNA w warstwie detekcyjnej biosensora

Przedstawione w poprzednich punktach pracy badania modyfikacji powierzchni elektrody złotej pozwalały na uzyskanie uogólnionej oceny struktury warstwy detekcyjnej przygotowywanego biosensora. W konstrukcji sensora do wykrywania hybrydyzacji DNA ważne jest także ustalenie ilości i dostępności sond ssDNA w danej warstwie detekcyjnej. W celu wyznaczenia tych wielkości posłużono się techniką pomiarów chronokulometrycznych z wykorzystaniem elektroaktywnego wskaźnika, kompleksu heksaminorutenu (III) $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (RuHex), który w sposób ilościowy wiąże się z grupami fosforanowymi fragmentów kwasów nukleinowych (procedura przedstawiona w punkcie 1.3.4. części doświadczalnej niniejszej pracy).

Przed rozpoczęciem pomiarów chronokulometrycznych konieczne było wyznaczenie potencjału formalnego dla kompleksu RuHex w 10mM buforze TRIS-HCl (pH 7.4) – ten sam bufor był później stosowany w oznaczeniach CC. Pomiar przeprowadzono techniką woltamperometrii cyklicznej stosując (rys. 31):

- układ 3 elektrod: AuE (pracująca), Pt (pomocnicza), Ag/AgCl (3M KCl, referencyjna);
- środowisko: 10 mM roztwór RuHex w 10 mM buforze TRIS-HCl (pH 7.4);
- liczba cykli: 5;
- zakres od -0.8 V do +0.5 V, potencjał skoku 2.4 mV, szybkość polaryzacji elektrody 100 mV/s.



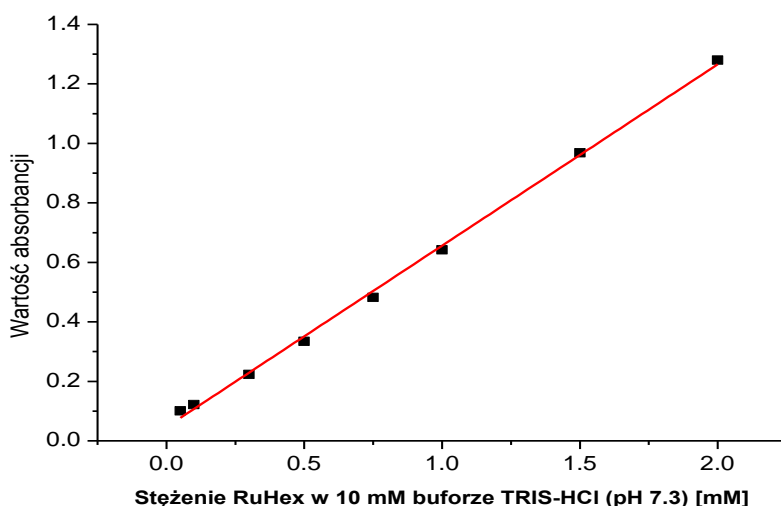
Rysunek 31. Krzywa woltamperometryczna (CV) uzyskana dla 10mM roztworu RuHex w 10 mM buforze TRIS-HCl (pH 7.4).

Badany kompleks $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ w pomiarach przeprowadzonych metodą woltamperometrii cyklicznej w 10 mM buforze TRIS-HCl (pH 7.4) posiadał potencjał formalny równy -0.15 V. Wyznaczona wielkość posłużyła do ustalenia wartości potencjału początkowego i potencjału reakcji w planowanych pomiarach CC z użyciem RuHex. Stosując wytyczne zawarte w opracowaniu A.W. Botta i W.R. Heinemana [153] ustalono następujące warunki pomiaru:

- potencjał początkowy równy +0.1 V, dla którego wszystkie cząsteczki RuHex znajdujące się w 10 mM buforze TRIS-HCl (pH 7.4) powinny ulec utlenieniu;
- potencjał reakcji równy -0.4 V, przy którym wszystkie cząsteczki RuHex znajdujące się w wyżej wymienionym buforze ulegają redukcji.

Wybrane wartości potencjałów dla pomiarów chronokulometrycznych z użyciem kompleksu $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ są zgodne z danymi przedstawionymi w literaturze [157,159,198]. Jako podstawę oznaczenia celowo wybrano proces redukcji elektroaktywnego wskaźnika, ponieważ RuHex jest podatny na utlenianie przez czynniki środowiskowe i trudniej byłoby przeprowadzić pomiar CC dla zredukowanej formy tego elektroaktywnego kompleksu.

Oznaczenia chronokulometryczne zmierzające do ustalenia ilości DNA na powierzchni elektrody pracującej przeprowadzane były w roztworach $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ o wzrastającym stężeniu (zgodnie z procedurą przedstawioną w punkcie 1.3.4.). Korzystając z pomiarów spektrofotometrycznych przy długości fali $\lambda = 277$ nm sprawdzono ilość RuHex w kolejnych roztworach 10 mM buforu TRIS-HCl (pH 7.4) przeznaczonych do pomiarów CC (rys. 32).



Rysunek 32. Wartości absorbancji przy długości fali 277 nm zmierzone dla roztworów RuHex wykorzystanych w pomiarach CC z zaznaczoną krzywą regresji liniowej (—).

Wartość współczynnika regresji linowej r dla zakresu stężeń kompleksu RuHex od 0.05 mM do 2 mM osiągnęła wartość 0.998, co stanowiło potwierdzenie zakładanego wzrostu ilości wskaźnika w kolejnych badanych środowiskach pomiarów CC.

Opierając się na procedurze przedstawionej w punkcie 1.3.4. przeprowadzono pomiary chronokulometryczne ładunku Q_{ads} charakteryzującego ilość wskaźnika RuHex zaadsorbowanego na powierzchni elektrody złotej [155,157]. Wyznaczone zostały wartości Q_{ads} dla czterech monowarstw SAM, tj. złożonej wyłącznie z sond ssDNA i z udziałem wypełniacza MCE, MCH lub MCN – dla stężeń kompleksu $Ru(NH_3)_6^{3+}$ równych 0.05 mM, 0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM, 0.75 mM, 1.0 mM, 1.5 mM oraz 2.0 mM w 10 mM buforze TRIS-HCl (pH = 7.4).

W pierwszej kolejności przeprowadzona została próba oznaczenia ilości DNA na powierzchni elektrody złotej zmodyfikowanej samymi sondami ssDNA. Elektrode pracującą przygotowano zgodnie z procedurą 1.4.4. i poddano pomiarom opisanym w punkcie 1.3.4. niniejszej pracy. Wyniki oznaczeń zestawiono w tabeli 7.

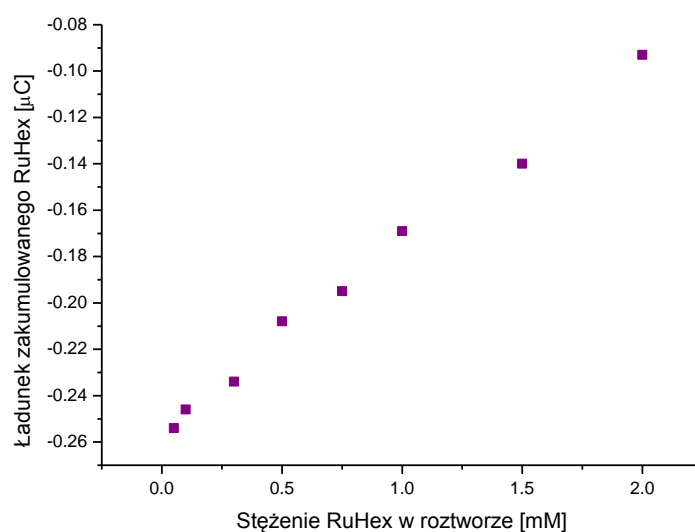
Tabela 7. Ładunek redukcji wskaźnika RuHex zaadsorbowanego na powierzchni elektrody złotej zmodyfikowanej warstwą sondy ssDNA, otrzymany w pomiarze CC przy rosnącym stężeniu RuHex.

Stężenie RuHex w roztworze [mM]	Ładunek redukcji zaadsorbowanego RuHex* [μ C]	Ilość powtórzeń	RSD
0.05	-0.254	10	25
0.10	-0.246	10	30
0.30	-0.234	10	28
0.50	-0.208	10	33
0.75	-0.195	10	31
1.00	-0.169	10	34
1.50	-0.140	8	44
2.00	-0.093	8	41

* każdy wynik jest rezultatem czterech pomiarów składowych (patrz: Procedury pomiarowe pkt. 1.3.4.)

Wysiłki zmierzające do wyznaczenia wartości ładunku Q_{ads} dla cząsteczek RuHex zakumulowanych w warstwie detekcyjnej biosensora zakończyły się niepowodzeniem. W kolejnych roztworach (o wzrastającym stężeniu wskaźnika) wartość ładunku związana

z redukcją cząsteczek RuHex gromadzących się bezpośrednio przy powierzchni elektrody przed immobilizacją sondy była wyższa niż po tym zabiegu (tabela 7). Na podstawie rezultatów przeprowadzonych pomiarów CC wynika, iż wprowadzenie monowarstwy ssDNA utrudniło dostęp cząsteczkom RuHex do powierzchni elektrody. Najprawdopodobniej sondy utworzyły strukturę skutecznie izolującą powierzchnię przetwornika od roztworu wskaźnika. Z drugiej strony wzrost stężenia RuHex w środowisku reakcyjnym powodował osłabienie tego zjawiska. Przy stopniowym zwiększaniu ilości wskaźnika w buforze TRIS-HCl wartość zmierzonego ładunku Q_{ads} wzrastała w sposób liniowy (rys. 33) – współczynnik regresji liniowej r dla tej zależności wyniósł 0.997.



Rysunek 33. Ładunek wskaźnika RuHex zakumulowanego na elektrodzie zmodyfikowanej warstwą ssDNA (■) – pomiar CC przy rosnących wartościach stężenia RuHex w roztworze.

W kolejnym kroku przeprowadzono pomiary ładunku Q_{ads} dla kompleksu RuHex zakumulowanego w warstwie detekcyjnej biosensora, którą stanowiła mieszana monowarstwa sond ssDNA i merkaptoalkoholowego wypełniacza – merkaptoetanolu, merkaptoheksanolu lub merkaptanonanolu. Procedura modyfikacji elektrod złotych została opisana w punkcie 1.4.4. części doświadczalnej niniejszej pracy. Pomiar chronokulometryczny zakumulowanego RuHex przeprowadzono według procedury przedstawionej w punkcie 1.3.4. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 8.

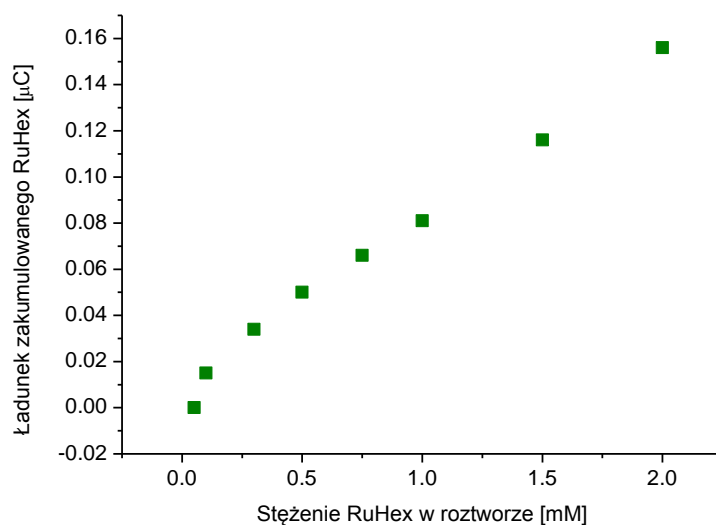
Tabela 8. Ładunek redukcji wskaźnika RuHex zaadsorbowanego na powierzchni elektrody złotej zmodyfikowanej warstwą sondy ssDNA i jednego z merkaptoalkoholi: MCE, MCH lub MCN, otrzymany w pomiarze CC przy rosnącym stężeniu RuHex.

Stężenie RuHex w roztworze [mM]	Ładunek redukcji zaadsorbowanego RuHex* [μC] / ilość powtórzeń / RSD [%]		
	ssDNA/MCE/AuE	ssDNA/MCH/AuE	ssDNA/MCN/AuE
0.05	0.000 / 10 / **	0.005 / 10 / 52	0.007 / 10 / **
0.10	0.015 / 10 / 79	0.010 / 10 / 43	0.013 / 10 / 151
0.30	0.034 / 10 / 34	0.025 / 9 / 61	0.045 / 10 / 85
0.50	0.050 / 10 / 16	0.034 / 8 / 27	0.107 / 10 / 14
0.75	0.066 / 10 / 17	0.058 / 10 / 48	0.215 / 10 / 21
1.00	0.081 / 10 / 17	0.059 / 10 / 41	0.356 / 10 / 18
1.50	0.116 / 10 / 12	0.064 / 10 / 44	0.595 / 10 / 12
2.00	0.156 / 10 / 55	0.060 / 10 / 50	0.871 / 10 / 15

* każdy wynik jest kompilacją czterech pomiarów składowych (patrz: Procedury pomiarowe 1.3.4.)

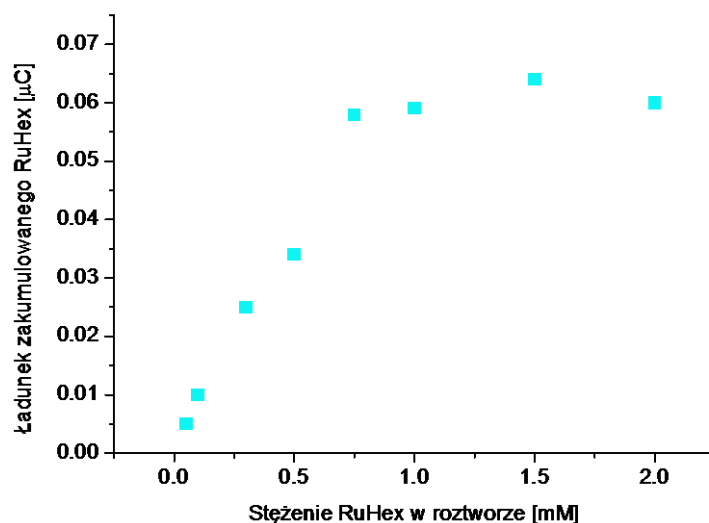
** bardzo duża zmienność wyników wynikająca z niedoskonałości układu pomiarowego

Chronokulometryczne pomiary ładunku Q_{ads} kompleksu RuHex unieruchomionego w warstwie detekcyjnej biosensora składającej się z sond ssDNA i wypełniacza MCE pokazały, że wraz ze zwiększaniem stężenia RuHex w środowisku reakcji ilość zakumulowanego wskaźnika także rosła w sposób liniowy (rys. 34). Współczynnik regresji liniowej r dla tej zależności wyniósł 0.995. W badanym zakresie stężeń wskaźnika – od 0.05 mM do 2.0 mM roztworu RuHex – nie zaobserwowano wysycenia warstwy detekcyjnej biosensora cząsteczkami wskaźnika (tabela 8). Prawdopodobnie zbyt duża liczba defektów ocenianej monowarstwy ssDNA/MCE uniemożliwiła zablokowanie pozostałym cząsteczkom wskaźnika (będącym w mieszaninie reakcyjnej) możliwości bezpośredniego przywierania do powierzchni elektrody złotej. Z powodu braku wartości Q_{ads} zakumulowanego wskaźnika w warunkach wysycenia monowarstwy SAM kompleksem RuHex nie można było przeprowadzić dalszych obliczeń zmierzających do wyznaczenia ilości DNA unieruchomionego na powierzchni elektrody złotej (zgodnie z założeniami procedury zamieszczonej w punkcie 1.3.4.).



Rysunek 34. Ładunek wskaźnika RuHex zakumulowanego na elektrodzie zmodyfikowanej ssDNA i MCE (■) – pomiar CC przy różnych stężeniach RuHex w roztworze.

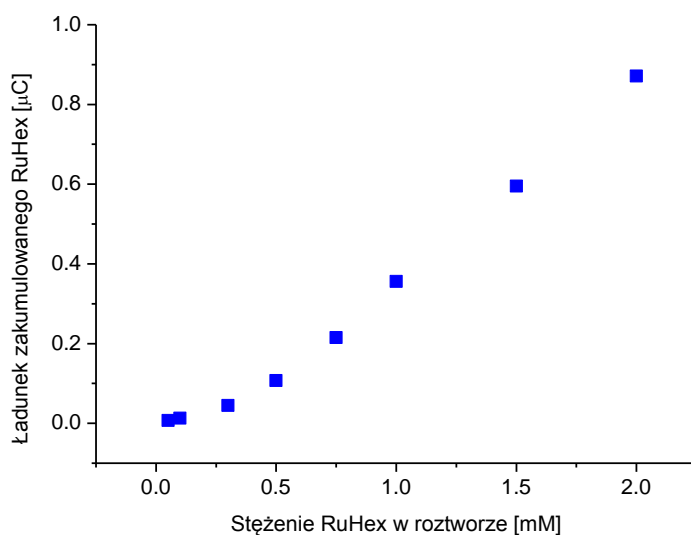
Kolejną badaną warstwę detekcyjną biosensora – opartą o mieszaną monowarstwę SAM składającą się z sond ssDNA i wypełniacza MCH – przygotowano według procedury z punktu 1.4.4. niniejszej pracy. Pomiar chronokulometryczny niezbędny do ustalenia gęstości powierzchniowej sond DNA na powierzchni elektrody złotej przeprowadzono zgodnie z wytycznymi punktu 1.3.4. Wyniki wspomnianego oznaczenia zamieszczono w tabeli 8.



Rysunek 35. Ładunek wskaźnika RuHex zakumulowanego na elektrodzie zmodyfikowanej ssDNA i MCH (■) – pomiar CC przy różnych stężeniach RuHex w roztworze.

Podobnie jak w przypadku monowarstwy ssDNA/MCE, warstwa detekcyjna biosensora zawierająca sondy ssDNA oraz cząsteczki MCH charakteryzowała się liniowym wzrostem ładunku Q_{ads} dla kompleksu $Ru(NH_3)_6^{3+}$ zakumulowanego na powierzchni elektrody złotej. Jednak w przypadku merkaptoheksanolu zależność ta odnosiła się tylko do roztworów RuHex o stężeniu poniżej 0.75 mM (rys. 35) – współczynnik regresji liniowej r wyniósł 0.993. Począwszy od roztworu reakcyjnego zawierającego 0.75 mM wskaźnika RuHex, dalsze zwiększanie ilości kompleksu $Ru(NH_3)_6^{3+}$ w środowisku pomiaru CC nie powodowało istotnego wzrostu wyznaczonej wartości ładunku Q_{ads} . Takie stężenie wskaźnika wystarczyło, aby wysycić cząsteczkami RuHex wszystkie fragmenty kwasów nukleinowych unieruchomione na powierzchni elektrody.

Wynik pomiaru CC dla 0.75 mM roztworu kompleksu $Ru(NH_3)_6^{3+}$ w buforze TRIS-HCl (zaznaczony w tabeli 8 niebieskim kolorem) został wykorzystany do obliczeń gęstości powierzchniowej DNA w warstwie detekcyjnej biosensora. Korzystając ze wzorów przedstawionych w punkcie 1.3.4. wyznaczono ilość wskaźnika, a następnie sond ssDNA obecnych na powierzchni elektrody złotej zmodyfikowanej monowarstwą ssDNA/MCH. Gęstość powierzchniowa cząsteczek RuHex wyniosła w tym przypadku 9.54×10^{-12} mol/cm², natomiast ilość DNA była równa 8.62×10^{11} cząsteczek/cm².



Rysunek 36. Ładunek wskaźnika RuHex zakumulowanego na elektrodzie zmodyfikowanej ssDNA i MCN (■) – pomiar CC przy różnych stężeniach RuHex w roztworze.

Ostatnia badana warstwa detekcyjna biosensora składała się z sond ssDNA oraz cząsteczek MCN. Formowanie mieszanej monowarstwy na powierzchni elektrody złotej przeprowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną w punkcie 1.4.4., natomiast pomiar CC ładunku Q_{ads} wykonano według opisu zawartego w punkcie 1.3.4. Wyniki badań umieszczono w tabeli 8.

Rezultaty pomiarów chronokulometrycznych wykonanych na elektrodach złotych zmodyfikowanych monowarstwą ssDNA/MCN były zasadniczo zbliżone do wyników otrzymanych dla SAM zbudowanej z sond ssDNA i cząsteczek MCE. Wraz ze wzrostem stężenia wskaźnika $Ru(NH_3)_6^{3+}$ w środowisku pomiaru CC w sposób liniowy rosła także wartość ładunku Q_{ads} kompleksu RuHex zakumulowanego w warstwie detekcyjnej biosensora uszczelnionej cząsteczkami merkaptoponanolu (rys. 36). Współczynnik regresji liniowej r tej zależności wyniósł 0.991. Podobnie, jak w przypadku mieszanej monowarstwy z merkaptoetanołem, warstwa detekcyjna ssDNA/MCN posiadała zbyt dużą liczbę defektów, które uniemożliwiły wyznaczenie ładunku Q_{ads} w warunkach wysycenia wszystkich fragmentów DNA wskaźnikiem RuHex.

Porównując wyniki chronokulometrycznych pomiarów gęstości powierzchniowej sond ssDNA wykonanych dla warstw detekcyjnych biosensora wyposażonych lub nie w cząsteczki merkaptoalkoholowego wypełniacza, tylko w przypadku mieszanej monowarstwy ssDNA/MCH możliwe było wyznaczenie ilości DNA zgromadzonego na powierzchni elektrody złotej. Pozostałe oceniane warstwy SAM charakteryzowały się strukturą posiadającą zbyt wiele defektów, które skutecznie uniemożliwiły pomiar gęstości powierzchniowej sond ssDNA techniką CC przy zastosowaniu wskaźnika RuHex.

Modyfikacja elektrody złotej mieszaną monowarstwą ssDNA/MCH zapewniła umiejscowienie na powierzchni elektrochemicznego przetwornika wysoce zorganizowanej warstwy detekcyjnej, dla której ilość sond ssDNA w przeliczeniu na 1 cm^2 powierzchni wyniosła 8.62×10^{11} cząsteczek. Jest to wartość nieco niższa niż ta zaprezentowana przez A.B. Steela i współpracowników [157], gdzie monowarstwa SAM (także zbudowana z sond ssDNA i wypełniacza MCH) odznaczała się ilością DNA w granicach $1-10 \times 10^{12}$ cząsteczek na cm^2 powierzchni elektrody. Po zbadaniu wpływu gęstości powierzchniowej sond na efektywność hybrydyzacji z docelowymi fragmentami DNA, za najbardziej optymalną ilość ssDNA w warstwie detekcyjnej biosensora uznali oni wartość nieco poniżej 5×10^{12} cząsteczek/ cm^2 – w przypadku pomiarów z użyciem wskaźnika RuHex.

W badaniach nad konstrukcją warstwy detekcyjnej ocenione zostały monowarstwy SAM składające się wyłącznie z sond ssDNA oraz mieszane struktury zawierające dodatkowo cząsteczki wypełniacza. Do uszczelnienia monowarstwy sond ssDNA wybrane zostały merkaptoalkohole, które posiadają łańcuchy alkilowe krótsze (MCE), dwukrotnie (MCH) lub trzykrotnie dłuższe (MCN) niż merkaptoalkilowy łącznik mocujący fragmenty DNA na powierzchni elektrody. Elektrochemiczna ocena stopnia zorganizowania badanych monowarstw wykazała, że najmniejszą ilość defektów posiada warstwa detekcyjna zbudowana z sond ssDNA i cząsteczek merkaptoheksanolu. Wyłącznie dla tej struktury udało się przeprowadzić pomiary ilości DNA unieruchomionego na powierzchni elektrody pracującej. W związku z uzyskanymi wynikami badań, w dalszej pracy nad konstrukcją elektrochemicznego biosensora DNA wykorzystana została warstwa detekcyjna oparta na mieszanej monowarstwie SAM składającej się z sond ssDNA i cząsteczek merkaptoheksanolu.

2.4. Reakcja hybrydyzacji w warstwie detekcyjnej biosensora

Przygotowana warstwa detekcyjna elektrochemicznego biosensora została zastosowana do zbadania oddziaływania sond ssDNA z komplementarnymi i niekomplementarnymi fragmentami oligonukleotydów (tOligo i ntOligo). Przy pomocy pomiarów chronokulometrycznych z użyciem wskaźnika RuHex ustalona została ilość DNA zgromadzonego na powierzchni elektrody pracującej przed i po interakcji sond z syntetycznymi fragmentami DNA. Z kolei pomiary wykonane metodą woltamperometrii fali prostokątnej z zastosowaniem elektroaktywnych wskaźników MB i Hoechst 33258 pozwoliły określić, czy obecne w warstwie detekcyjnej biosensora cząsteczki DNA były jedno- czy dwuniciowe. Wykorzystując skonstruowaną warstwę detekcyjną ustalono wpływ, jaki na pracę biosensora wywołują następujące czynniki:

- czas oddziaływania sond ssDNA z komplementarnymi fragmentami DNA,
- stężenie komplementarnych fragmentów DNA w mieszaninie reakcyjnej,
- obecność niekomplementarnych oligonukleotydów w mieszaninie reakcyjnej.

2.4.1. Charakterystyka DNA zakumulowanego na powierzchni elektrody pracującej

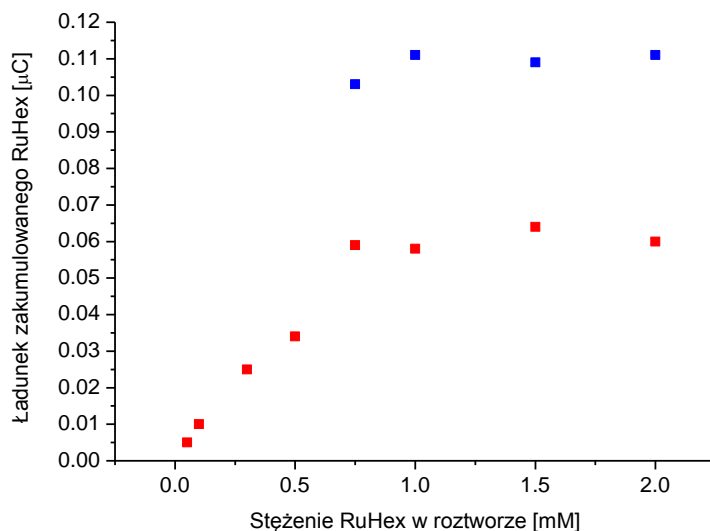
Badania reakcji hybrydyzacji w warstwie detekcyjnej biosensora rozpoczęto od sprawdzenia możliwości oszacowania ilości DNA na powierzchni elektrody pracującej przed i po interakcji sond ssDNA z docelowymi fragmentami kwasu nukleinowego (tOligo). Reakcja była przeprowadzona zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 1.4.5. Stosowano stężenia komplementarnych oligonukleotydów równe 10 μM i czas oddziaływania wynoszący 60 minut. Ilość DNA zgromadzonego na powierzchni elektrody złotej (przed i po hybrydyzacji sond ssDNA z komplementarnymi fragmentami DNA) wyznaczano przy pomocy pomiarów chronokulometrycznych (procedura według punktu 1.3.4.). Wyniki przeprowadzonych oznaczeń zestawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Ładunek redukcji wskaźnika RuHex zaadsorbowanego na powierzchni elektrody złotej zmodyfikowanej warstwą sond ssDNA i MCH, przed i po hybrydyzacji z 10 μM tDNA, uzyskany w pomiarze CC przy rosnącym stężeniu RuHex.

Stężenie RuHex w roztworze [mM]	Q_{ads} RuHex przed hybrydyzacją ssDNA/MCH [μC]	Ilość powtórzeń	RSD [%]	Q_{ads} RuHex po hybrydyzacji dsDNA/MCH [μC]	Ilość powtórzeń	RSD [%]
0.05	0.005	10	52	-	-	-
0.10	0.010	10	43	-	-	-
0.30	0.025	9	61	-	-	-
0.50	0.034	8	27	-	-	-
0.75	0.059	10	48	0.103	10	40
1.00	0.058	10	41	0.111	10	46
1.50	0.064	10	44	0.109	10	40
2.00	0.060	10	50	0.111	10	30

Pomiary CC dla monowarstwy ssDNA/MCH zostały wykonane w roztworach RuHex w 10 mM buforze TRIS-HCl (pH 7.4) z ilością wskaźnika wzrastającą od 0.05 mM do 2.0 mM. Przy stężeniu równym 0.75 mM wartość ładunku Q_{ads} ustabilizowała się – fragmenty DNA obecne w monowarstwie uległy wysyceniu kompleksem $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$.

Z kolei pomiary chronokulometryczne po procesie hybrydyzacji przeprowadzono w zakresie stężeń wskaźnika od 0.75 mM do 2.0 mM i wysycenie monowarstwy cząsteczkami kompleksu zaobserwowano przy wartości 1.0 mM RuHex (rys. 37).



Rysunek 37. Ładunek wskaźnika RuHex zakumulowanego na elektrodzie zmodyfikowanej ssDNA i MCH (pomiar CC przy różnych stężeniach RuHex w roztworze) przed (■) i po (■) hybrydyzacji z tDNA.

Na podstawie wyznaczonych ładunków Q_{ads} zakumulowanego RuHex przed i po oddziaływaniu sond z docelowymi fragmentami DNA (zaznaczone w tabeli 9 na niebiesko) została obliczona ilość cząsteczek kwasów deoksyrybonukleinowych na powierzchni elektrody złotej. W wyniku przeprowadzonej reakcji hybrydyzacji ilość DNA w warstwie detekcyjnej biosensora zwiększyła się prawie dwukrotnie:

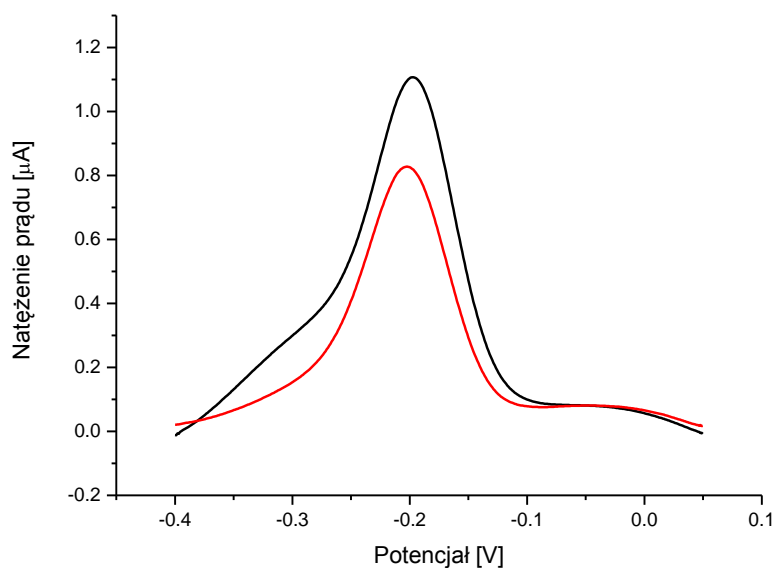
- przed interakcją sond z komplementarnymi tOligo wynosiła 8.62×10^{11} cząsteczek/cm² ($n = 10$, RSD = 48%),
- po procesie hybrydyzacji wrosła do 16.21×10^{11} cząsteczek/cm² ($n = 10$, RSD = 46%).

Stosunkowo wysokie wartości RSD są rezultatem połączenia powtarzalności wyników cząstkowych pomiarów CC przeprowadzanych w celu uzyskania końcowej wartości ładunku Q_{ads} zaadsorbowanego wskaźnika RuHex (punkt 1.3.4.).

Wykonane pomiary CC dostarczyły dowodu na to, iż proces hybrydyzacji sond ssDNA z komplementarnymi fragmentami tOligo spowodował prawie dwukrotny wzrost ilości DNA w warstwie detekcyjnej biosensora. Chronokulometryczne oznaczenie gęstości powierzchniowej DNA na elektrodach złotych wykorzystał także J.J. Gooding w celu zbadania kinetyki

procesu hybrydyzacji [159]. W tym przypadku uzyskane wartości ilości DNA na powierzchni elektrody złotej okazały się bardziej wiarygodne niż porównywane oznaczenia piezoelektryczne z zastosowaniem złotych dysków QCM.

W celu sprawdzenia formy DNA zgromadzonego na powierzchni elektrody złotej po 15-minutowym oddziaływaniu sond ssDNA z komplementarnymi fragmentami DNA, przeprowadzone zostały pomiary z wykorzystaniem woltamperometrii fali prostokątnej z użyciem elektroaktywnego wskaźnika – błękitu metylenowego (zgodnie z procedurą 1.3.5.). Cząsteczki MB wykazują większe powinowactwo względem jednoniciowego DNA (sond ssDNA) niż w stosunku do dwuniciowych fragmentów kwasów nukleinowych. Utworzenie na powierzchni elektrody złotej dupleksów DNA skutkowałoby obniżeniem ilości wskaźnika w warstwie detekcyjnej biosensora i tym samym zmniejszeniem natężenia prądu w reakcji redoks wspomnianych cząsteczek [209,232].



Rysunek 38. Krzywe woltamperometryczne (SWV) reakcji wskaźnika MB zakumulowanego na elektrodzie złotej zmodyfikowanej monowarstwą ssDNA/MCH przed (—) i po oddziaływaniu (—) z 10 µM tDNA przez 15 minut.

Sygnal woltamperometryczny (SWV) błękitu metylenowego zakumulowanego w warstwie detekcyjnej biosensora DNA przed oddziaływaniem z komplementarnymi tOligo wynosił 1.12 µA ($n = 5$, RSD = 14%). W wyniku reakcji hybrydyzacji sond ssDNA z docelowymi fragmentami DNA odpowiedź wskaźnika uległa obniżeniu do poziomu 0.83 µA ($n = 9$, RSD = 20%) (rys. 38). Słabszy sygnał wskaźnika (związany z mniejszym

stopniem akumulacji MB) był wynikiem formowania się w warstwie detekcyjnej biosensora dwuniciowych cząsteczek DNA – względem których błękit metylenowy posiada mniejsze powinowactwo. Podobne relacje były obserwowane w szeregu innych procesów detekcji specyficznych fragmentów DNA, gdzie MB był stosowany jako elektroaktywny wskaźnik reakcji hybrydyzacji [203,209,213,257,258].

2.4.2. Wpływ czasu reakcji na wydajność hybrydyzacji

Nie zmieniając ilości tOligo w mieszaninie reakcyjnej (10 μM) sprawdzony został wpływ czasu oddziaływania sondy ssDNA z komplementarnymi fragmentami DNA na wydajność procesu hybrydyzacji. Reakcję przeprowadzono zgodnie z wytycznymi zawartymi w punkcie 1.4.5. niniejszej pracy W pierwszej kolejności przeprowadzone zostały pomiary CC ilości DNA zgromadzonego na powierzchni elektrody pracującej (według procedury z punktu 1.3.4.) (tabela 10).

Tabela 10. Ładunek redukcji wskaźnika RuHex, jego ilość oraz stężenie powierzchniowe DNA zaadsorbowanego na powierzchni elektrody złotej zmodyfikowanej warstwą sondy ssDNA i MCH, przed i po oddziaływaniu z tDNA przez czas 5, 15, 30 i 60 minut, uzyskany w pomiarze CC przy rosnącym stężeniu RuHex.

Czas trwania hybrydyzacji [min]	$Q_{\text{ads RuHex}}$ [μC]	Γ_{RuHex} [mol/cm^2]	Γ_{DNA} [$\text{cząst.}/\text{cm}^2$]	Liczba pomiarów	RSD [%]
Brak	0.059	9.54×10^{-12}	8.62×10^{11}	10	41
5	0.093	15.04×10^{-12}	13.58×10^{11}	8	41
15	0.109	17.62×10^{-12}	15.92×10^{11}	8	27
30	0.106	17.14×10^{-12}	15.48×10^{11}	8	26
60	0.111	17.95×10^{-12}	16.21×10^{11}	10	46

Chronokulometryczne pomiary ładunku Q_{ads} wskaźnika RuHex zakumulowanego w warstwie detekcyjnej biosensora wykazały, iż 15-minutowy czas oddziaływania sond ssDNA z komplementarnymi fragmentami DNA wystarczał do uzyskania maksymalnej wydajności wiązania tOligo na powierzchni elektrody (zaznaczone w tabeli 10 na niebiesko). Po tym okresie trwania reakcji hybrydyzacji ilość fragmentów DNA w warstwie detekcyjnej

biosensora wzrosła z 8.62×10^{11} cząsteczek/cm² (n = 10, RSD = 41%) do wartości 15.92×10^{11} (n = 8, RSD = 27%). Dalsze wydłużanie czasu interakcji sond ssDNA z komplementarnymi fragmentami kwasów nukleinowych nie powodowało istotnego zwiększania gęstości powierzchniowej DNA na elektrodzie złotej.

Pomiary woltamperometryczne (SWV) sygnału wskaźnika MB (wykonane według opisu z punktu 1.4.5.) przeprowadzone przed i po różnym czasie hybryzacji sond ssDNA z docelowymi fragmentami DNA doprowadziły do uzyskania podobnych rezultatów (tabela 11). Oddziaływanie sond z tOligo powodowało obniżenie stopnia akumulacji błękitu metylenowego w warstwie detekcyjnej biosensora. W przypadku 15-minutowego czasu trwania reakcji, sygnał wskaźnika uzyskał najniższą wartość (w tabeli 11 – pola zaznaczone na niebiesko). Krótszy czas hybrydyzacji powodował co prawda podobny spadek sygnału błękitu metylenowego, ale powtarzalność uzyskanych wyników woltamperometrycznej detekcji dsDNA była znacząco mniejsza. Z kolei wydłużenie czasu oddziaływania sond ssDNA z cząsteczkami tOligo wywoływało niespecyficzne wiązanie się fragmentów kwasów nukleinowych na powierzchni elektrody pracującej. Takie zjawisko było szczególnie zauważalne w przypadku wzrostu sygnału MB uzyskanego po godzinnej reakcji hybrydyzacji w warstwie detekcyjnej biosensora.

Tabela 11. Natężenia prądu w pomiarach SWV wskaźnika MB zakumulowanego na elektrodach złotych zmodyfikowanych monowarstwą ssDNA/MCH oraz po oddziaływaniu z tDNA przez czas 5, 15, 30 i 60 minut.

Czas trwania hybrydyzacji [min]	Natężenie prądu redoks MB [μ A]	Liczba pomiarów	RSD [%]
Brak	1.12	5	14
5	0.86	9	43
15	0.83	9	20
30	0.86	5	35
60	0.97	5	28

Na podstawie przeprowadzonych oznaczeń ilości i formy kwasów nukleinowych zgromadzonych na powierzchni elektrody złotej po reakcji hybrydyzacji ustalono, że dla danej warstwy detekcyjnej 15 minut stanowiło optymalny czas oddziaływania sond ssDNA z komplementarnymi fragmentami DNA. Z tego względu dalsze badania z użyciem

konstruowanego biosensora przeprowadzano stosując 15-minutowy czas trwania reakcji hybrydyzacji.

W przypadku innych opisanych w literaturze elektrochemicznych układów biodetekcji specyficznych fragmentów DNA, czas oddziaływania sond z docelowymi odcinkami kwasów nukleinowych był bardzo zróżnicowany. Przykładowo w badaniach przeprowadzonych przez Z.L. Zhi [217] oraz S. Peeters'a [208] i ich współpracowników proces hybrydyzacji trwał tylko 10 minut. Z kolei w badaniach zrealizowanych przez N. Zhu [213] czy X.H. Lin [258] i ich współpracowników proces interakcji sond ssDNA z docelowymi fragmentami DNA zajął 30 minut. Godzinę czasu na hybrydyzację z komplementarnym tDNA w swoich układach biodetekcji przeznaczali A.B. Steel [157], Y.S. Choi [216] oraz O.Y.F. Henry [206] wraz ze swoimi współpracownikami.

2.4.3. Odpowiedź systemu detekcji hybrydyzacji na zmianę stężenia docelowego DNA

Kolejnym etapem badań nad funkcjonowaniem opracowanego systemu detekcji hybrydyzacji było sprawdzenie wpływu ilości komplementarnych fragmentów kwasów nukleinowych w mieszaninie hybrydyzacyjnej na odpowiedź konstruowanego biosensora. Elektrody złote zmodyfikowane monowarstwą SAM zawierającą sondy ssDNA i cząsteczki MCH umieszczono na 15 minut w buforze hybrydyzacyjnym zawierającym różną ilość komplementarnych tOligo (zgodnie z procedurą z punktu 1.4.5.). Warstwa detekcyjna biosensora przed i po badanej interakcji poddana była pomiarom chronokulometrycznym (wg procedury z punktu 1.3.4.) mierzącym do ustalenia ilości DNA na powierzchni elektrody złotej. Wyniki przeprowadzonych oznaczeń zestawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Ładunek redukcji wskaźnika RuHex, jego ilość oraz stężenie powierzchniowe DNA zaadsorbowanego na powierzchni elektrody złotej zmodyfikowanej warstwą sondy ssDNA i MCH, przed oraz po oddziaływaniu z 5 i 10 μ M tDNA, uzyskany w pomiarze CC przy rosnącym stężeniu RuHex.

Stężenie tDNA [mM]	$Q_{\text{ads RuHex}}$ [μ C]	Γ_{RuHex} [mol/cm^2]	Γ_{DNA} [$\text{cząst.}/\text{cm}^2$]	Liczba pomiarów	RSD [%]
Brak	0.059	9.54×10^{-12}	8.62×10^{11}	10	41
5	0.080	12.94×10^{-12}	11.68×10^{11}	8	41
10	0.109	17.62×10^{-12}	15.92×10^{11}	8	27

Ilość sond ssDNA w warstwie detekcyjnej biosensora przed procesem hybrydyzacji wynosiła 8.62×10^{11} cząsteczek w przeliczeniu na 1 cm^2 powierzchni elektrody pracującej. Oddziaływanie sond z komplementarnymi fragmentami tOligo w stężeniu $5 \text{ }\mu\text{M}$ spowodowało wzrost ilości cząsteczek DNA w warstwie detekcyjnej do poziomu 11.68×10^{11} na 1 cm^2 elektrody złotej. Z kolei zwiększenie stężenia tOligo w mieszaninie hybrydyzacyjnej do wartości $10 \text{ }\mu\text{M}$ skutkowało odnotowaniem proporcjonalnie wyższej gęstości powierzchniowej DNA, która była równa 15.92×10^{11} cząsteczek na 1 cm^2 przetwornika. Przeprowadzone oznaczenia CC wskazywały, iż wzrost stężenia komplementarnych fragmentów kwasów nukleinowych w mieszaninie hybrydyzacyjnej powodował proporcjonalne zwiększenie ilości DNA unieruchomionego w warstwie detekcyjnej biosensora po interakcji sond ssDNA z tOligo.

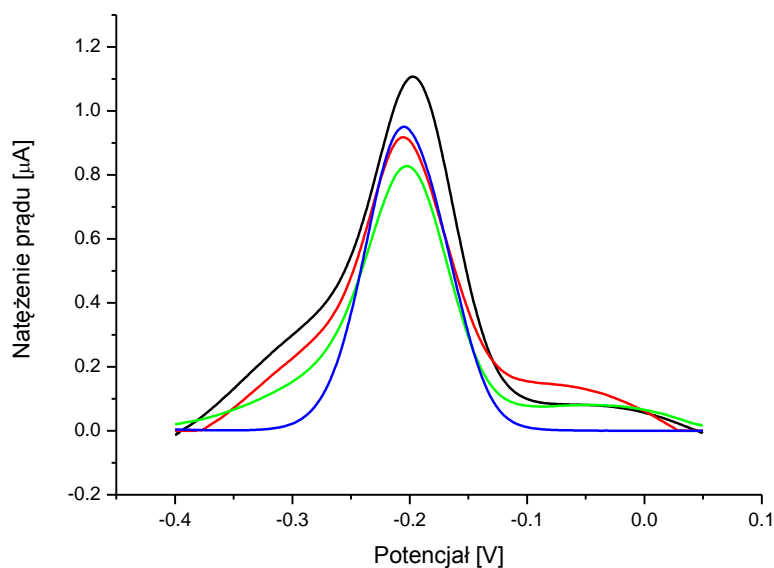
Dla wyżej opisanej relacji przeprowadzone zostały pomiary woltamperometrycznej odpowiedzi wskaźnika MB zakumulowanego w warstwie detekcyjnej biosensora przed i po reakcji hybrydyzacji (wg procedury opisanej w punkcie 1.3.5.). Wyniki oznaczenia zestawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Natężenie prądu w pomiarach SWV wskaźnika MB zakumulowanego na elektrodach złotych zmodyfikowanych monowarstwą ssDNA/MCH przed oraz po oddziaływaniu z 1, 5 i 10 μM tDNA.

Stężenie tDNA [μM]	Natężenie prądu redoks MB [μA]	Liczba pomiarów	RSD [%]
Brak	1.12	5	28
1	0.98	5	17
5	0.92	5	18
10	0.83	5	20

Sygnał błękitu metylenowego zakumulowanego w warstwie detekcyjnej biosensora wyniósł $1.12 \text{ }\mu\text{A}$. Zwiększając stężenie komplementarnych fragmentów tOligo w mieszaninie hybrydyzacyjnej uzyskano stopniowo zmniejszający się stopień akumulacji MB na powierzchni elektrody pracującej. Jednocześnie obserwowana była coraz niższa wartość sygnału woltamperometrycznego (SWV) wskaźnika (rys. 39). Dla najniższego stężenia tDNA (równego $1 \text{ }\mu\text{M}$) natężenie prądu z reakcji redoks MB wynosiło $0.98 \text{ }\mu\text{A}$. Kolejno dla coraz

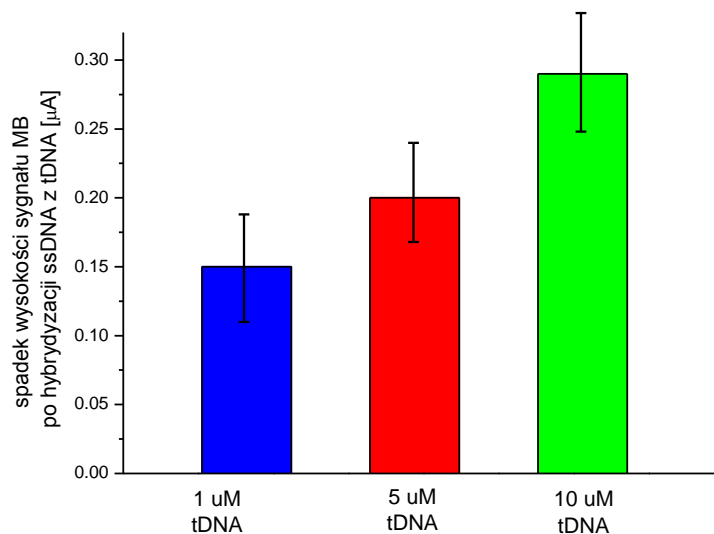
większych ilości komplementarnych fragmentów DNA (5 μM i 10 μM) odpowiedź elektroaktywnego wskaźnika uległa obniżeniu odpowiednio do wartości 0.92 μA i 0.83 μA .



Rysunek 39. Krzywe woltamperometryczne (SWV) reakcji wskaźnika MB zakumulowanego na elektrodzie złotej zmodyfikowanej monowarstwą ssDNA/MCH przed (—) i po oddziaływaniu z 1 μM (—), 5 μM (—) i 10 μM (—) tDNA.

W celu łatwiejszej interpretacji zależności sygnału zakumulowanego MB od stężenia komplementarnych tOligo w mieszaninie hybrydyzacyjnej, obliczona została różnica między odpowiedzią analityczną wskaźnika uzyskaną przed reakcją hybrydyzacji i po oddziaływaniu sond ssDNA z określoną ilością tDNA (rys. 40). Zaobserwowana została liniowa zależność między zastosowanym stężeniem tOligo a wartością spadku sygnału woltamperometrycznego błękitu metylenowego. Współczynnik regresji liniowej r dla tej relacji osiągnął wartość 0.995. Wraz ze zwiększaniem ilości tOligo w mieszaninie reakcyjnej na powierzchni elektrody złotej formowała się coraz większa ilość dwuniciowego DNA, a to z kolei skutkowało niższym stopniem akumulacji wskaźnika i jego słabszą odpowiedzią w pomiarach woltamperometrycznych (SWV).

Podobna liniowa zależność pomiędzy stężeniem tOligo w mieszaninie reakcyjnej a stopniem obniżenia sygnału MB po procesie hybrydyzacji w warstwie detekcyjnej biosensora zaprezentowali w swoich badaniach między innymi N. Zhu [213], D. Ozkan [257] oraz X.H. Lin [258].



Rysunek 40. Spadek wysokości sygnału wskaźnika MB przy wzroście stężenia tDNA w mieszaninie reakcyjnej.

Mimo iż błękit metylenowy jest powszechnie stosowanym wskaźnikiem hybrydyzacji, to zdaniem części autorów publikacji dotyczących konstruowania biosensorów DNA jego wykorzystanie w warstwach detekcyjnych opartych o mieszane struktury ssDNA/merkptoalkohol może stwarzać pewne problemy – podobnie jak w przypadku innych kationowych interkalatorów [160]. Przepływ elektronów z reakcji redoks wspomnianych związków przez warstwę DNA do powierzchni elektrody może być zakłócony przez niespecyficzną adsorpcję cząsteczek wskaźnika zarówno na ujemnie naładowanym fosforanowym szkielecie kwasów nukleinowych [147,263], jak i na końcowych grupach hydroksylowych wypełniacza [246,264]. W związku z powyższymi przesłankami i nieco utrudnioną interpretacją rezultatów hybrydyzacji DNA na podstawie stopnia akumulacji błękitu metylenowego (odwrócona zależność), podjęta została próba wykorzystania w konstruowanym biosensorze jednego z tak zwanych zewnętrznych wskaźników hybrydyzacji DNA – barwnika bis-benzoimidowego Hoechst 33258. Związek ten wykazuje większe powinowactwo względem dwuniciowego DNA wiążąc się z jego cząsteczkami poprzez oddziaływania w mniejszym rowku.

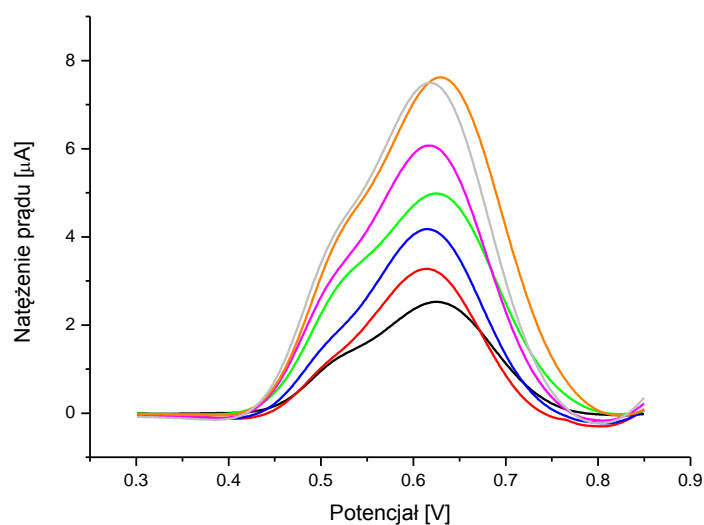
Pomiary woltamperometryczne (SWV) wskaźnika Hoechst 33258 zgromadzonego w warstwie detekcyjnej biosensora przed i po oddziaływaniu sond ssDNA z komplementarnymi tOligo (różne stężenia) przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 1.3.6. niniejszej pracy. Reakcja hybrydyzacji na powierzchni elektrod złotych

zmodyfikowanych monowarstwą ssDNA/MCH przebiegała według wytycznych zawartych w punkcie 1.4.5. Uzyskane wyniki pomiarów woltamperometrycznych zakumulowanego wskaźnika Hoechst 33258 przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14. Natężenie prądu w pomiarach SWV wskaźnika Hoechst 33258 zakumulowanego na elektrodach złotych zmodyfikowanych monowarstwą ssDNA/MCH przed oraz po oddziaływaniu z 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 7.5 μ M, 10 μ M oraz 15 μ M tDNA.

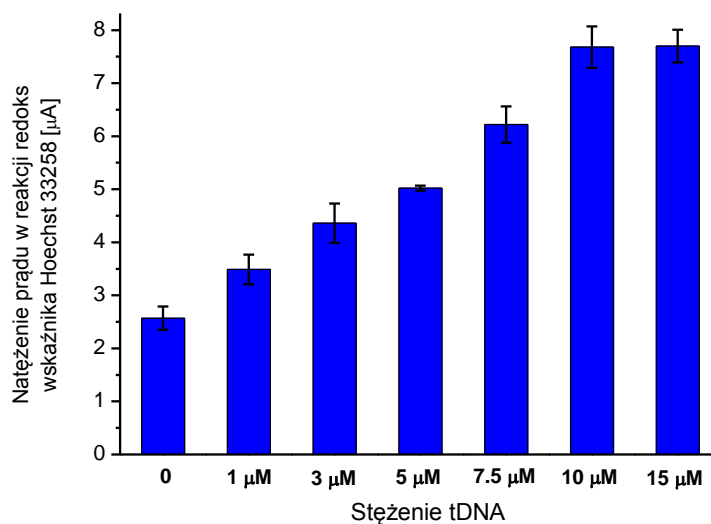
Stężenie tDNA [μ M]	Natężenie prądu redoks Hoechst 33258 [μ A]	Liczba pomiarów	RSD [%]
Brak	2.57	4	17
1	3.49	3	16
3	4.36	3	17
5	5.02	3	2
7.5	6.22	3	11
10	7.68	3	10
15	7.70	3	8

Sygnal wskaźnika Hoechst 33258 związanego niespecyficznie w warstwie detekcyjnej biosensora (przed procesem hybrydyzacji) wyniósł 2.57 μ A ($n = 4$, RSD = 17%). Oddziaływanie sond ssDNA z komplementarnymi fragmentami DNA obecnymi w mieszaninie hybrydyzacyjnej w coraz to większym stężeniu powodowało sukcesywne zwiększanie się ilości dwuniciowego DNA na powierzchni elektrody, co było obserwowane poprzez wzrost stopnia akumulacji (i jednocześnie sygnału SWV) wskaźnika Hoechst 33258 (rys. 41). Wspomniana tendencja utrzymywała się w zakresie stężeń tOligo od 1 μ M do 10 μ M i miała charakter liniowy (rys. 42). Dla ilości tOligo w mieszaninie hybrydyzacyjnej powyżej 10 μ M sygnał wskaźnika Hoechst 33258 ulegał stabilizacji, co wiązało się prawdopodobnie z wykorzystaniem większości dostępnych sond ssDNA w warstwie detekcyjnej biosensora przez komplementarne fragmenty kwasów nukleinowych.



Rysunek 41. Krzywe voltamperometryczne (SWV) reakcji wskaźnika Hoechst 33258 zakumulowanego na elektrodzie złotej zmodyfikowanej monowarstwą ssDNA/MCH przed (—) i po oddziaływaniu z 1 μM (—), 3 μM (—), 5 μM (—), 7.5 μM (—), 10 μM (—) i 15 μM (—) tDNA.

Przedstawiona na rysunku 42 zależność sygnału Hoechst 33258 od stężenia tOligo w mieszaninie hybrydyzacyjnej w zakresie od 1 μM do 10 μM miała charakter liniowy. Wyznaczony dla tej relacji współczynnik regresji liniowej r uzyskał wartość 0.995.



Rysunek 42. Zależność natężenia prądu w reakcji wskaźnika Hoechst 33258 zakumulowanego na elektrodzie po reakcji hybrydyzacji od stężenia tDNA w mieszaninie reakcyjnej.

Praca układu detekcyjnego biosensora została pozytywnie zweryfikowana w zakresie stężeń od 1 μM do 10 μM komplementarnych fragmentów tOligo obecnych w badanej mieszaninie hybrydyzacyjnej. Ilość DNA zakumulowanego na powierzchni elektrod złotych zwiększała się proporcjonalnie do stężenia tOligo oddziałujących z sondami ssDNA w warstwie detekcyjnej urządzenia. Sygnał biosensora wyrażony woltamperometryczną odpowiedzią wskaźnika MB lub Hoechst 33258 odzwierciedlał skalę formowania się dupleksów DNA na elektrodzie pracującej, która z kolei była połączona wyraźną relacją z ilością wprowadzonego do mieszaniny hybrydyzacyjnej komplementarnego DNA.

Przedstawiony zakres stężeń tOligo, w jakim pracował konstruowany biosensor jest zbliżony do ilości komplementarnego DNA stosowanej przy opracowywaniu podobnych układów biodetekcji specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych. Przykładowo, A.B. Steel i współpracownicy badając zależność wydajności hybrydyzacji od gęstości powierzchniowej sond w monowarstwie ssDNA/MCH na elektrodach złotych stosowali 1 μM roztwory fragmentów tDNA [157]. E.L.S. Wong i współpracownicy opracowali biosensor do wykrywania hybrydyzacji DNA, który w systemie detekcji wykorzystywał długodystansowy przepływ elektronów przez warstwę DNA do wskaźnika redoks (AQDS) [221]. Proces hybrydyzacji przeprowadzany był w 4 μM roztworze komplementarnych fragmentów DNA w buforze hybrydyzacyjnym (10 mM TRIS-HCl z dodatkiem 1M NaCl). Z kolei G.D. McEwen i współpracownicy w konstrukcji elektrochemicznego biosensora DNA (opartego na wskaźniku Hoechst 33258) badaną reakcję hybrydyzacji przeprowadzali w 1 μM roztworze komplementarnych tDNA w buforze 2 x SSC (bufor cytrynianowy) [149].

2.4.4. Odpowiedź systemu detekcji hybrydyzacji na obecność niekomplementarnych fragmentów DNA

Opracowany system wykrywania hybrydyzacji w warstwie detekcyjnej biosensora wykazał pożądany poziom czułości względem zmian stężenia komplementarnych fragmentów DNA w mieszaninie reakcyjnej. W celu sprawdzenia specyficzności przygotowanego układu przeprowadzone zostały badania odpowiedzi systemu detekcji hybrydyzacji z użyciem niekomplementarnych fragmentów DNA (ntOligo).

W pierwszej kolejności sprawdzono, czy obecność ntOligo w mieszaninie hybrydyzacyjnej wpływa na ilość DNA zgromadzonego na powierzchni elektrody złotej. W oznaczeniach wykorzystano procedurę pomiarów chronokulometrycznych opisaną w punkcie 1.3.4. Przygotowana warstwa detekcyjna biosensora została poddana działaniu

komplementarnych i niekomplementarnych fragmentów kwasów nukleinowych zgodnie z procedurą przedstawioną w punkcie 1.4.5. stosując 10 μM roztwory tOligo lub ntOligo w buforze hybrydyzacyjnym. Wyniki oznaczeń CC przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Ładunek redukcji wskaźnika RuHex, jego ilość oraz stężenie powierzchniowe DNA zaadsorbowanych na powierzchni elektrody złotej zmodyfikowanej warstwą sondy ssDNA i MCH, przed oraz po oddziaływaniu z 10 μM tDNA lub ntDNA, uzyskany w pomiarze CC przy rosnącym stężeniu RuHex.

Stężenie tDNA [mM]	Q_{ads} RuHex [μ C]	Γ_{RuHex} [mol/cm ²]	Γ_{DNA} [cząst./cm ²]	Liczba pomiarów	RSD [%]
Brak	0.059	9.54×10^{-12}	8.62×10^{11}	10	41
10 μM tDNA	0.109	17.62×10^{-12}	15.92×10^{11}	8	27
10 μM ntDNA	0.080	12.94×10^{-12}	11.68×10^{11}	8	45

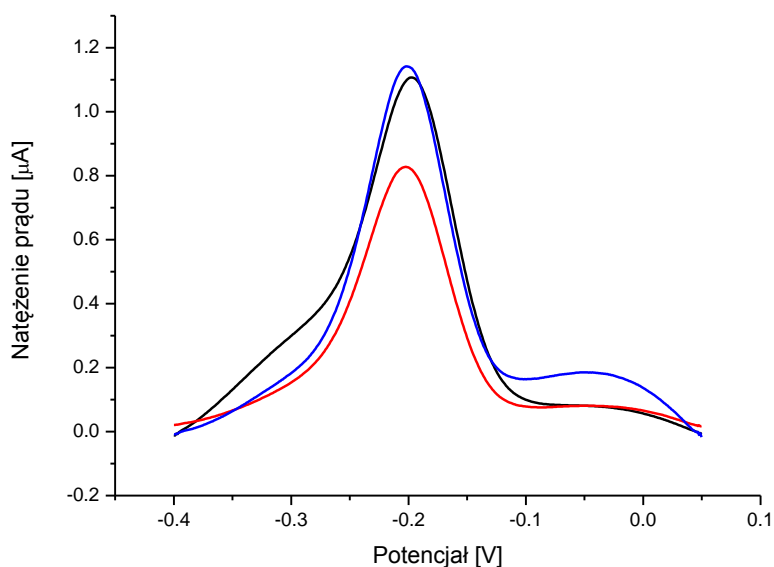
Gęstość powierzchniowa sond ssDNA w warstwie detekcyjnej biosensora wynosiła 8.62×10^{11} cząsteczek w przeliczeniu na 1 cm² powierzchni elektrochemicznego przetwornika. W wyniku hybrydyzacji z komplementarnymi tOligo ilość DNA na elektrodzie pracującej zwiększyła się prawie dwukrotnie do poziomu 15.92×10^{11} cząsteczki/cm². Oddziaływanie sond ssDNA z niekomplementarnymi ntOligo spowodowało tylko częściową niespecyficzną adsorpcję fragmentów DNA w warstwie detekcyjnej biosensora. W wyniku tej interakcji ilość DNA zgromadzonego na powierzchni elektrody złotej zwiększyła się do wartości 11.68×10^{11} cząsteczek/cm². Chronokulometryczne pomiary gęstości powierzchniowej fragmentów kwasów nukleinowych unieruchomionych w warstwie detekcyjnej biosensora pozwoliły na wyraźne rozróżnienie rezultatów oddziaływania sond ssDNA z komplementarnymi i niekomplementarnymi fragmentami DNA.

Oddziaływanie warstwy detekcyjnej biosensora z cząsteczkami ntOligo zostało także sprawdzone poprzez woltamperometryczne pomiary elektroaktywnych wskaźników (MB oraz Hoechst 33258) zakumulowanych na powierzchni elektrody złotej przed i po interakcji sond ssDNA odpowiednio z roztworem tOligo lub ntOligo – zgodnie z procedurami opisanymi w punktach 1.3.5., 1.3.6. oraz 1.4.5. części doświadczalnej niniejszej pracy.

Sygnal błękitu metylenowego zaadsorbowanego na powierzchni elektrody złotej przed badanym oddziaływaniem wynosił 1.12 μA (n = 5, RSD = 28%). Hybrydyzacja sond ssDNA z komplementarnymi fragmentami tOligo (10 μM) skutecznie obniżyła wartość

odpowiedzi redoks MB do poziomu $0.83 \mu\text{A}$ ($n = 5$, $\text{RSD} = 20\%$). Oddziaływanie układu detekcyjnego biosensora z niekomplementarnymi cząsteczkami ntOligo ($10 \mu\text{M}$) praktycznie nie spowodowało żadnej reakcji biorąc pod uwagę stopień akumulacji błękitu metylenowego (rys. 43). Sygnał wskaźnika uległ nawet niewielkiemu wzrostowi w stosunku do wyniku uzyskanego dla samej monowarstwy ssDNA/MCH i osiągnął wartość $1.17 \mu\text{A}$ ($n = 5$, $\text{RSD} = 28\%$).

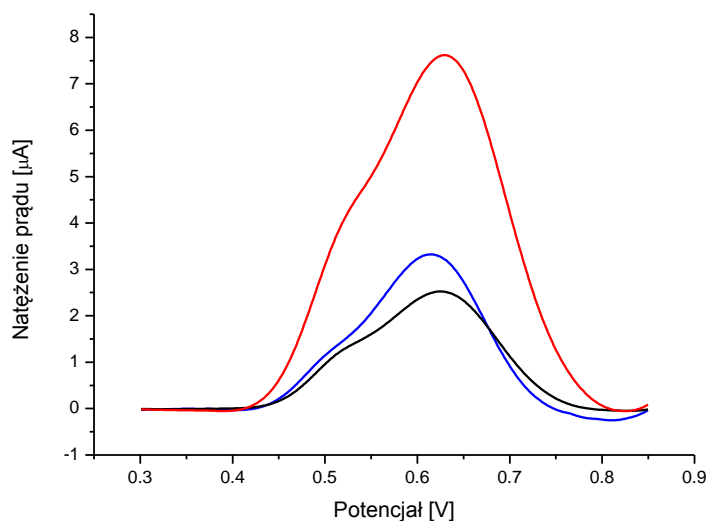
Niekomplementarne cząsteczki ntOligo nie utworzyły z sondami ssDNA struktur dwuniciowych (brak spadku odpowiedzi redoks MB). Niespecyficzne związanie niewielkiej ilości ntOligo na powierzchni elektrody złotej skutkowało nieznacznym wzrostem sygnału dodatkowo zakumulowanego błękitu metylenowego. Układ detekcji hybrydyzacji oparty na woltamperometrycznym pomiarze (SWV) wskaźnika redoks MB okazał się odporny na wpływ niekomplementarnych fragmentów ntDNA w mieszaninie hybrydyzacyjnej.



Rysunek 43. Krzywe woltamperometryczne (SWV) reakcji wskaźnika MB zakumulowanego na elektrodzie złotej zmodyfikowanej monowarstwą ssDNA/MCH przed (—) i po oddziaływaniu z $10 \mu\text{M}$ tDNA (—) lub ntDNA (—).

System wykrywania hybrydyzacji oparty na pomiarze SWV sygnału wskaźnika Hoechst 33258 został także poddany próbie sprawdzenia reakcji względem wprowadzenia do mieszaniny reakcyjnej fragmentów ntOligo. Woltamperometryczna odpowiedź cząsteczek Hoechst 33258 zakumulowanych w monowarstwie ssDNA/MCH wyrażała się natężeniem prądu równym $2.57 \mu\text{A}$ ($n = 4$, $\text{RSD} = 17\%$). Hybrydyzacja sond ssDNA z tOligo ($10 \mu\text{M}$) powodowała wzrost sygnału wskaźnika do wartości $7.68 \mu\text{A}$ ($n = 3$, $\text{RSD} = 10\%$). Natomiast

interakcja warstwy detekcyjnej biosensora z niekomplementarnymi fragmentami ntDNA (10 μM) skutkowała nieznacznym wzrostem stopnia akumulacji cząsteczek Hoechst 33258 i zwiększeniem odpowiedzi woltamperometrycznej (w porównaniu do wyników pomiarów dla monowarstwy ssDNA/MCH) do wartości 3.53 μA ($n = 4$, RSD = 19%). Zaobserwowane niewielkie zwiększenie sygnału wskaźnika wynikało najprawdopodobniej z niespecyficznego związania pewnej ilości fragmentów ntOligo i/lub cząsteczek Hoechst 33258 na powierzchni elektrody złotej i nie wpływało znacząco na pracę warstwy detekcyjnej biosensora (rys. 44).



Rysunek 44. Krzywe woltamperometryczne (SWV) reakcji wskaźnika Hoechst 33258 zakumulowanego na elektrodzie złotej zmodyfikowanej monowarstwą ssDNA/MCH przed (—) i po oddziaływaniu z 10 μM tDNA (—) lub ntDNA (—).

Opracowany układ wykrywania hybrydyzacji okazał się stosunkowo odporny na obecność ntOligo w badanej mieszaninie hybrydyzacyjnej. Sygnały analityczne generowane przez skonstruowany system biodetekcji przy wprowadzeniu niekomplementarnych fragmentów DNA do warstwy detekcyjnej biosensora były nieznacznie wyższe i wiązały się głównie z niespecyficzną adsorpcją (na niewielką skalę) cząsteczek ntOligo i/lub elektroaktywnych wskaźników hybrydyzacji.

2.5. Wykrywanie *Aeromonas hydrophila* w wodzie pitnej

Skonstruowany biosensor został wykorzystany do wykrywania fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla genu aerolizyny *A. hydrophila* w DNA wyizolowanym z komórek bakterii znajdujących się w próbkach wody pitnej. Woda jest naturalnym środowiskiem bytowania wykrywanego mikroorganizmu patogennego. Najczęściej stanowi ona również nośnik, za pomocą którego ten drobnoustrój przemieszcza się oraz powoduje zanieczyszczenie różnego rodzaju produktów spożywczych (punkt 1.3. części literaturowej niniejszej pracy).

Izolację kwasów nukleinowych z komórek bakteryjnych przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 1.4.6. niniejszej pracy. W badaniu wykorzystano próbki wody pitnej, które zostały zakażone żywymi kulturami bakteryjnymi. Warstwa detekcyjna biosensora składająca się z sond ssDNA i cząsteczek wypełniacza MCH została przygotowana poprzez modyfikację powierzchni elektrody złotej – zgodnie z procedurą przedstawioną w punkcie 1.4.4. Wykrywanie bakterii *A. hydrophila* polegało na detekcji fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla genu aerolizyny w ocenianych próbkach DNA. W oznaczeniach zastosowano pomiary SWV z użyciem elektroaktywnych wskaźników MB oraz Hoechst 33258 – według procedur opisanych w punktach 1.3.5. i 1.3.6. Ze względu na wyższą efektywność woltamperometrycznej detekcji hybrydyzacji z użyciem elektroaktywnych wskaźników zrezygnowano z chronokulometrycznego wyznaczania gęstości powierzchniowej DNA w warstwie detekcyjnej biosensora. Hybrydyzację wyizolowanego z komórek bakteryjnych DNA z sondami ssDNA przeprowadzono według opisu zamieszczonego w punkcie 1.4.5. W oznaczeniach referencyjnych wykorzystano próbki DNA wyizolowane z wody zakażonej bakteriami *Propionibacterium* spp.

2.5.1. Detekcja z użyciem wskaźnika błękitu metylenowego

W pierwszej kolejności przeprowadzona została detekcja bakterii *A. hydrophila* przy pomocy pomiarów woltamperometrycznych z użyciem wskaźnika błękitu metylenowego. Z próbek wody pitnej zaszczepionych żywymi kulturami bakterii po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 30°C wyizolowano DNA, które następnie poddano procesowi amplifikacji korzystając z techniki reakcji PCR – zgodnie z opisem w punkcie 1.4.6. Amplifikacja docelowych fragmentów DNA była konieczna ze względu na niższą

czułość systemu detekcji hybrydyzacji opartego na wskaźniku redoks MB. Wyniki przeprowadzonych oznaczeń woltamperometrycznych (SWV) zestawiono w tabeli 16.

Tabela 16. Sygnał MB otrzymany w pomiarach woltamperometrycznych (SWV) dla DNA wyizolowanego z próbek zaszczipionych *A. hydrophila* i *Propionibacterium* spp.

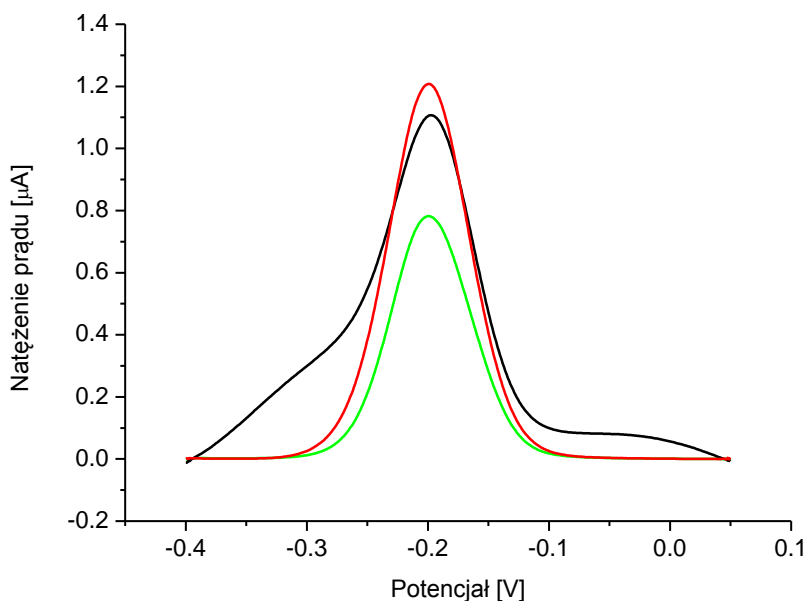
Oddziaływanie z ssDNA/MCH/AuE	Sygnał MB [μA]	Ilość powtórzeń	RSD [%]
brak	1.12	5	14
DNA wyizolowane z próbek zawierających <i>A. hydrophila</i>	0.78	5	8
DNA wyizolowane z próbek zawierających <i>Propionibacterium</i> spp.	1.25	5	21

Odpowiedź analityczna wskaźnika błękitu metylenowego uzyskana dla monowarstwy ssDNA/MCH przed interakcją z badanym DNA była równa $1.12 \mu\text{A}$ ($n = 5$, $\text{RSD} = 14\%$). Oddziaływanie warstwy detekcyjnej biosensora z DNA wyizolowanym z próbek wody skażonej bakteriami *A. hydrophila* (w ilości $2.5 \mu\text{g}$ na cm^3 mieszaniny hybrydyzacyjnej) spowodowało spadek sygnału MB w pomiarach woltamperometrycznych do poziomu $0.78 \mu\text{A}$ ($n = 5$, $\text{RSD} = 8\%$). Obecne w mieszaninie reakcyjnej docelowe fragmenty DNA utworzyły z unieruchomionymi na powierzchni elektrody pracującej sondami ssDNA dwuniciowe struktury kwasów nukleinowych, co spowodowało wyraźne obniżenie stopnia akumulacji błękitu metylenowego (rys. 45).

Oznaczenia referencyjne, w których wykorzystane zostało DNA wyizolowane z próbek skażonych bakteriami *Propionibacterium* spp. (także poddane procesowi amplifikacji) nie przyniosły spadku odpowiedzi analitycznej wskaźnika redoks (w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla monowarstwy ssDNA/MCH). Interakcja warstwy detekcyjnej biosensora z ntDNA (w ilości $4.0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) spowodowała nieznaczny wzrost sygnału błękitu metylenowego do wartości $1.25 \mu\text{A}$ ($n = 5$, $\text{RSD} = 21\%$), co było najprawdopodobniej rezultatem niewielkiej niespecyficjnej adsorpcji ntDNA na powierzchni elektrody złotej (rys. 45).

Uzyskana różnica pomiędzy sygnałem MB zakumulowanym na elektrodzie pracującej po oddziaływaniu z DNA wyizolowanym z próbek zaszczipionych *A. hydrophila* i po oddziaływaniu z DNA pochodzącym z próbek zawierających bakterie z rodzaju *Propionibacterium*

wskazuje na skuteczność działania opracowanego systemu biodetekcji poszukiwanego mikroorganizmu patogennego [162].



Rysunek 45. Krzywe voltamperometryczne (SWV) reakcji wskaźnika MB zakumulowanego na elektrodzie złotej zmodyfikowanej monowarstwą ssDNA/MCH przed (—) i po oddziaływaniu z DNA wyizolowanym z próbek zawierających *A. hydrophila* (poddanym reakcji PCR) (—) i *Propionibacterium* spp. (—).

2.5.2. Detekcja z użyciem wskaźnika Hoechst 33258

Opracowany system biodetekcji specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych połączony z voltamperometrycznym pomiarem sygnału wskaźnika Hoechst 33258 został wykorzystany do analizy próbek wody pitnej skażonej bakteriami *A. hydrophila* i referencyjnymi mikroorganizmami z rodzaju *Propionibacterium* spp. Wyizolowane z komórek bakteryjnych DNA zostało poddane amplifikacji zgodnie z opisem zawartym w punkcie 1.4.6. niniejszej pracy. Wyniki detekcji fragmentów DNA specyficznych dla genu aerolizyny *A. hydrophila* zestawiono w tabeli 17.

Niespecyficzna akumulacja cząsteczek Hoechst 33258 na powierzchni elektrochemicznego przetwornika powodowała, że dla elektrod złotych zmodyfikowanych monowarstwą ssDNA/MCH układ pomiarowy odnotował sygnał wskaźnika równy 2.57 μA (n = 4, RSD = 17%). Oddziaływanie biosensora z DNA wyizolowanym z próbki wody zaszczepionej bakteriami *A. hydrophila* (przy stężeniu równym 2.5 μg/cm³) prowadziło

do zwiększenia stopnia akumulacji cząsteczek Hoechst 33258 w warstwie detekcyjnej urządzenia.

Tabela 17. Sygnał Hoechst 33258 otrzymany w pomiarach woltamperometrycznych (SWV) dla DNA wyizolowanego z próbek zawierających *A. hydrophila* oraz *Propionibacterium* spp.

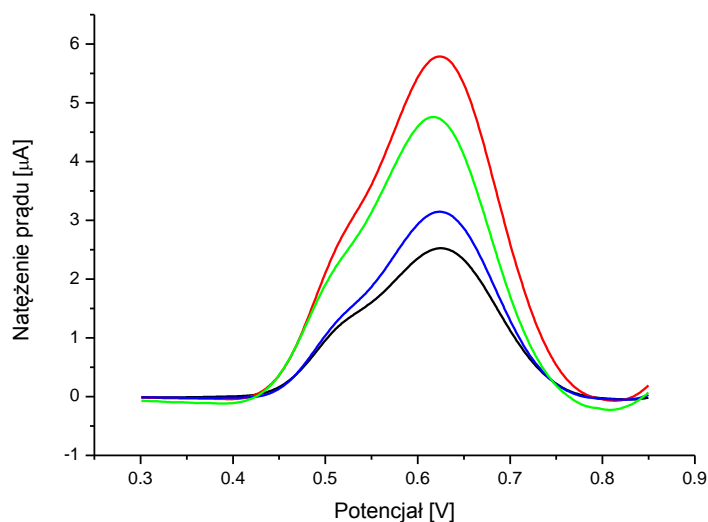
Oddziaływanie z ssDNA/MCH/AuE	Sygnał Hoechst 33258 [μA]	Ilość powtórzeń	RSD [%]
brak	2.57	4	17
DNA wyizolowane z próbek zawierających <i>A. hydrophila</i>	5.86	3	7
DNA wyizolowane z próbek zawierających <i>Propionibacterium</i> spp.	3.22	4	28

Obecne w badanym roztworze docelowe fragmenty DNA (specyficzne dla genu aerolizyny) utworzyły z sodnami ssDNA dwuniciowe struktury kwasów nukleinowych, które unieruchomione na powierzchni elektrody złotej wywołały wyższą odpowiedź woltamperometryczną (SWV) wskaźnika (rys. 46). Wartość natężenia prądu zmierzona dla reakcji redoks zakumulowanego Hoechst 33258 wyniosła $5.86 \mu\text{A}$ ($n = 3$, RSD = 7%). Opracowany biosensor pozwolił na wyraźną i wysoce powtarzalną detekcję fragmentów DNA specyficznych dla bakterii *A. hydrophila* w badanej próbce wody.

W przypadku oddziaływania opracowanego układu biodetekcji z DNA wyizolowanym z referencyjnej próbki wody pitnej (skażonej bakteriami z rodzaju *Propionibacterium* spp.), odpowiedź wskaźnika była znacząco niższa i zbliżona do wyniku uzyskanego dla elektrod złotych zmodyfikowanych monowarstwą ssDNA/MCH (rys. 46). Niekomplementarne fragmenty DNA (stężenie $4.0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) spowodowały tylko nieznaczny wzrost ilości wskaźnika zakumulowanego na powierzchni elektrody pracującej, co znalazło swoje odzwierciedlenie w uzyskanej wartości woltamperometrycznej odpowiedzi Hoechst 33258 równej $3.22 \mu\text{A}$ ($n = 4$, RSD = 28%).

Wykorzystując skonstruowany biosensor do badania DNA wyizolowanego ze skażonej mikrobiologicznie wody (poddanego amplifikacji techniką PCR) uzyskano prawie dwukrotnie wyższy sygnał wskaźnika Hoechst 33258 dla próbek zawierających docelowe fragmenty kwasu nukleinowego niż dla mieszaniny referencyjnego DNA. W związku z zaobserwowaną efektywnością oznaczenia *A. hydrophila* opracowany układ biodetekcji sprawdzono

na nieamplifikowanym DNA wyizolowanym z wody zawierającej poszukiwany mikroorganizm.



Rysunek 46. Krzywe voltamperometryczne (SWV) reakcji wskaźnika Hoechst 33258 zakumulowanego na elektrodzie złotej zmodyfikowanej monowarstwą ssDNA/MCH przed (—) i po oddziaływaniu z DNA wyizolowanym z próbek zawierających *A. hydrophila* poddanych reakcji PCR (—), nieamplifikowanym (—) lub wyizolowanym z próbek zaszczipionych *Propionibacterium* spp. (—).

Pomiary voltamperometryczne (SWV) wskaźnika zakumulowanego w warstwie detekcyjnej biosensora po oddziaływaniu z nieamplifikowanym DNA pozwoliły na wykrycie fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla genu aerolizyny. Uzyskana w tym przypadku odpowiedź Hoechst 33258 – równa $4.96 \mu\text{A}$ ($n = 4$, $\text{RSD} = 12\%$) – była wyraźnie wyższa niż sygnał voltamperometryczny otrzymany w referencyjnych oznaczeniach (rys. 46). Jednak skuteczność formowania dwuniciowego DNA (i tym samym akumulacji cząsteczek wskaźnika) na powierzchni elektrody pracującej okazała się niższa niż w sytuacji zastosowania zabiegu amplifikacji fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla genu aerolizyny *A. hydrophila*.

W toku przeprowadzonych oznaczeń uzyskano wyraźne rozróżnienie wysokości sygnału Hoechst 33258, który został unieruchomiony w warstwie detekcyjnej biosensora przed i po oddziaływaniu z DNA wyizolowanym z badanych próbek wody. Proces biodetekcji (po przeprowadzonej reakcji PCR) wykonany dla produktu skażonego bakteriami *A. hydrophila* zapewnił sygnał przewyższający prawie dwukrotnie odpowiedź analityczną uzyskaną dla DNA wyizolowanego ze środowiska zawierającego bakterie *Propionibacterium*

spp. W przypadku DNA wyizolowanego z próbki zawierającej *A. hydrophila* i nie poddanego amplifikacji techniką PCR – rezultat oznaczenia był mniej efektywny, ale nadal wyraźnie różnicował próbki skażone poszukiwanym mikroorganizmem i wolne od niego (rys. 46).

W konfrontacji z innymi przedstawionymi w literaturze systemami biosensorowej detekcji fragmentów DNA specyficznych dla mikroorganizmów patogennych opracowany biosensor prezentuje się co najmniej konkurencyjnie. Przykładowo, piezoelektryczny układ opracowany przez S. Tombelli i współpracowników [57] skutecznie wykrywał próbki zawierające fragmenty DNA specyficzne dla *A. hydrophila* (wyizolowane z wody i innych źródeł, poddane amplifikacji PCR). Jednak procedura przygotowania warstwy detekcyjnej urządzenia mogła stwarzać wiele komplikacji. Biosensor bowiem opierał się na sondach ssDNA zmodyfikowanych biotyną, powiązanych z cząsteczkami streptawidyny, która z kolei była unieruchomiona kowalencyjnie na tiolowo-dekstranowej monowarstwie pokrywającej złotą powierzchnię dysku mikrowagi kwarcowej. Czas przygotowania tego typu układu biodetekcji wynosił około czterech dni.

Inny biosensor do wykrywania hybrydyzacji DNA, przeznaczony do detekcji fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla toksynotwórczych gatunków z rodzaju *Aspergillus* spp. (poddanych reakcji PCR), posiadał z kolei bardzo prosty w przygotowaniu układ detekcyjny [142]. Skomplikowany wydawał się jednak sam system oceny skuteczności reakcji hybrydyzacji. W pierwszej kolejności docelowe fragmenty DNA były elektrostatycznie adsorbowane na powierzchni elektrody z pasty węglowej. Następnie unieruchomiony tDNA oddziaływał z sondą ssDNA zmodyfikowaną biotyną, którą później wiązano z cząsteczkami fosfatazy alkalicznej połączonej ze streptawidyną. Wspomniany enzym służył do wzmocnienia procesu detekcji produktów reakcji hybrydyzacji przeprowadzanej na powierzchni elektrody z pasty węglowej.

Zbliżoną konstrukcyjnie do opracowanej w niniejszej pracy warstwę detekcyjną posiadał biosensor przygotowany przez J. Berganza i współpracowników [139], który wykorzystano do elektrochemicznego wykrywania bakterii *Escherichia coli* 0157:H7. Na powierzchni elektrody złotej (pracującej w mikroukładzie elektrochemicznym z elektrodą pomocniczą) unieruchomione zostały sondy ssDNA zmodyfikowane merkptoalkilowym łącznikiem oraz cząsteczki wypełniacza – merkptoheksanolu. Detekcja hybrydyzacji polegała na pomiarze woltamperometrycznym (CV) sygnału wskaźnika (heksacyjanożelazianu (III) potasu), który wzrastał wraz ze zwiększeniem ilości tDNA w mieszaninie hybrydyzacyjnej. Detekcja fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla *E. coli* 0157:H7 w materiale genetycznym wyizolowanym z komórek bakteryjnych (poddanym amplifikacji techniką PCR)

przebiegała skutecznie nawet dla małych stężeń tDNA (0.2 μM). Autorzy nie zaprezentowali jednak żadnych wyników badań z użyciem niekomplementarnego DNA wyizolowanego z innych mikroorganizmów.

Przedstawiony w niniejszej pracy elektrochemiczny biosensor do wykrywania hybrydyzacji DNA umożliwił detekcję fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla genu aerolizyny *Aeromonas hydrophila* w próbkach DNA wyizolowanych z wody pitnej zanieczyszczonej wspomnianym mikroorganizmem chorobotwórczym. Przygotowanie warstwy detekcyjnej urządzenia – polegające na utworzeniu na powierzchni elektrody złotej samoorganizującej się monowarstwy zbudowanej z sond ssDNA i cząsteczek MCH – zajmuje około dwóch godzin. Oddziaływanie układu biodetekcji sensora z badanym DNA, a następnie wykrywanie wyników reakcji hybrydyzacji trwa około 30 minut. Cała procedura oznaczenia bakterii *A. hydrophila* w badanym produkcie (połączona z przygotowaniem próbki DNA) może zostać przeprowadzona w czasie około 7 godzin. Skonstruowany w niniejszej pracy biosensor umożliwił wykrycie fragmentów DNA specyficznych dla wybranego mikroorganizmu w ilości 2.5 μg na 1 cm^3 badanego roztworu ($n = 3$, RSD = 7%).

3. Podsumowanie wyników badań

Głównym celem badań zrealizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej było skonstruowanie, a następnie wykorzystanie elektrochemicznego biosensora DNA do wykrywania mikroflory patogennej w żywności. Opracowane urządzenie służyło do detekcji fragmentów kwasów deoksyrybonukleinowych specyficznych dla genu aerolizyny – toksyny wytwarzanej przez bakterie *Aeromonas hydrophila*. Drobnoustrój ten został wybrany jako modelowy mikroorganizm mogący powszechnie występować w produktach żywnościowych i stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Prace przeprowadzone w celu skonstruowania danego biosensora DNA mogą być podzielone na cztery podstawowe etapy badań (rys. 47).



Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 47. Główne etapy zrealizowanych badań.

I. Przygotowanie powierzchni elektrody złotej

W pierwszej kolejności podjęto czynności związane z wyborem i przygotowaniem podstawowych elementów składowych konstruowanego biosensora DNA.

1. Stosując narzędzia bioinformatyczne, takie jak program BLAST i kalkulator DNA Sigma-Genosis, zostały wybrane sekwencje jednoniciowych sond ssDNA komplementarnych względem docelowych fragmentów DNA (tDNA) specyficznych dla genu aerolizyny *A. hydrophila*. Dwie spośród wytypowanych sond ssDNA przeznaczono do konstrukcji warstwy detekcyjnej biosensora. Dodatkowo opracowano procedurę aktywacji grupy tiolowej danych sond ssDNA zmodyfikowanych alkanotiolowym łącznikiem i sprawdzono ich czystość przed immobilizacją na powierzchni elektrody złotej.
2. Przeprowadzono badania stopnia szorstkości i powtarzalność powierzchni elektrody złotej otrzymywanej po zabiegach jej mechanicznego, fizycznego i/lub elektro-

chemicznego przygotowania przed dalszą modyfikacją. Na podstawie uzyskanych wyników ustalona została procedura przygotowania elektrody złotej przed jej wykorzystaniem do konstrukcji biosensora DNA. Wyznaczono wartość elektrochemicznego pola powierzchni elektrody pracującej równą 0.0641 cm^2 ($n = 8$, $\text{RSD} = 5\%$), która była istotna w dalszych oznaczeniach związanych z oceną warstwy detekcyjnej przygotowywanego urządzenia.

3. W wyniku badania właściwości elektrochemicznych wybranych buforów został wybrany roztwór elektrolitu podstawowego, 50 mM bufor fosforanowy z dodatkiem 5 mM KCl (pH 7.6), który mógł być wykorzystywany w pomiarach elektrochemicznych związanych z detekcją hybrydyzacji DNA w warstwie detekcyjnej biosensora.
4. Na podstawie wykonanych pomiarów woltamperometrycznych (SWV) przeprowadzona została selekcja elektroaktywnych wskaźników przeznaczonych do wykrywania dwuniciowych cząsteczek kwasów deoksyrybonukleinowych. Wśród zastosowanych związków tylko błękit metylenowy i Hoechst 33258 wykazywały odpowiedź elektrochemiczną przy wartościach potencjałów wolnych od sygnałów tła.

II. Przygotowanie warstwy detekcyjnej biosensora

W dalszej części prac nad konstrukcją elektrochemicznego biosensora DNA skupiono się na utworzeniu samoorganizującej się monowarstwy na powierzchni elektrod złotych, która stanowiłaby układ detekcyjny przygotowywanego sensora. Pod względem konstrukcji i dostępności dla docelowych fragmentów DNA sprawdzono warstwy SAM, które oprócz sond ssDNA zawierały także cząsteczki jednego z ocenianych merkptoalkoholi. W toku zrealizowanych prac zbadane zostały związki posiadające w swojej strukturze ilość atomów węgla mniejszą (merkptoetanol), dwukrotnie (merkptoheksanol) oraz trzykrotnie większą (merkptononanol) niż merkptoalkilowy łącznik użyty do immobilizacji sondy ssDNA na powierzchni elektrody.

1. W pierwszej kolejności sprawdzona została zdolność samych merkptoalkoholi do tworzenia samoorganizujących się monowarstw na powierzchni złota. Wyniki pomiarów elektrochemicznego efektu blokowania pokazały, iż najwyższą zdolność formowania uporządkowanych monowarstw SAM na elektrodzie złotej wykazywały cząsteczki merkptoheksanolu. Nieco słabsze rezultaty uzyskano dla merkptononanolu. Najmniejszy potencjał do tworzenia zorganizowanych struktur SAM na złocie posiadały cząsteczki merkptoetanolu.

2. Oceniając pojemność elektryczną interfejsy pomiędzy powierzchnią elektrody złotej (czystej lub zmodyfikowanej samoorganizującą się monowarstwą) a roztworem mocnego elektrolitu (1M K₂HPO₄) ustalono, że najwyższą zdolność formowania uporządkowanych struktur SAM (bez lub z udziałem sond ssDNA) posiadają cząsteczki merkaptoheksanolu.
3. Wyniki chronokulometrycznego badania ilości sond ssDNA w mieszanych monowarstwach SAM (sonda i merkaptalkohol) potwierdziły, że cząsteczki merkaptoetanolu i merkptononanolu w niedostatecznym stopniu uszczelniają strukturę SAM utworzoną z nici ssDNA. Modyfikując powierzchnię elektrody złotej mieszaną monowarstwą składającą się z sond ssDNA i cząsteczek MCH uzyskano warstwę detekcyjną biosensora o gęstości powierzchniowej jednoniciowych fragmentów DNA równej 8.62×10^{11} cząsteczek/cm². Porównując uzyskane wyniki z danymi literaturowymi [157], otrzymana gęstość powierzchniowa sond ssDNA w warstwie detekcyjnej biosensora powinna zapewnić ich pełną dostępność dla komplementarnych fragmentów DNA.

Na podstawie wyników przeprowadzonych oznaczeń do dalszych prac nad opracowaniem elektrochemicznego biosensora DNA wybrana została warstwa detekcyjna zbudowana z samoorganizującej się monowarstwy. W składzie tej warstwy SAM znalazły się zmodyfikowane tiolowym łącznikiem sondy ssDNA oraz cząsteczki merkaptoheksanolu.

III. Hybrydyzacja DNA w warstwie detekcyjnej biosensora

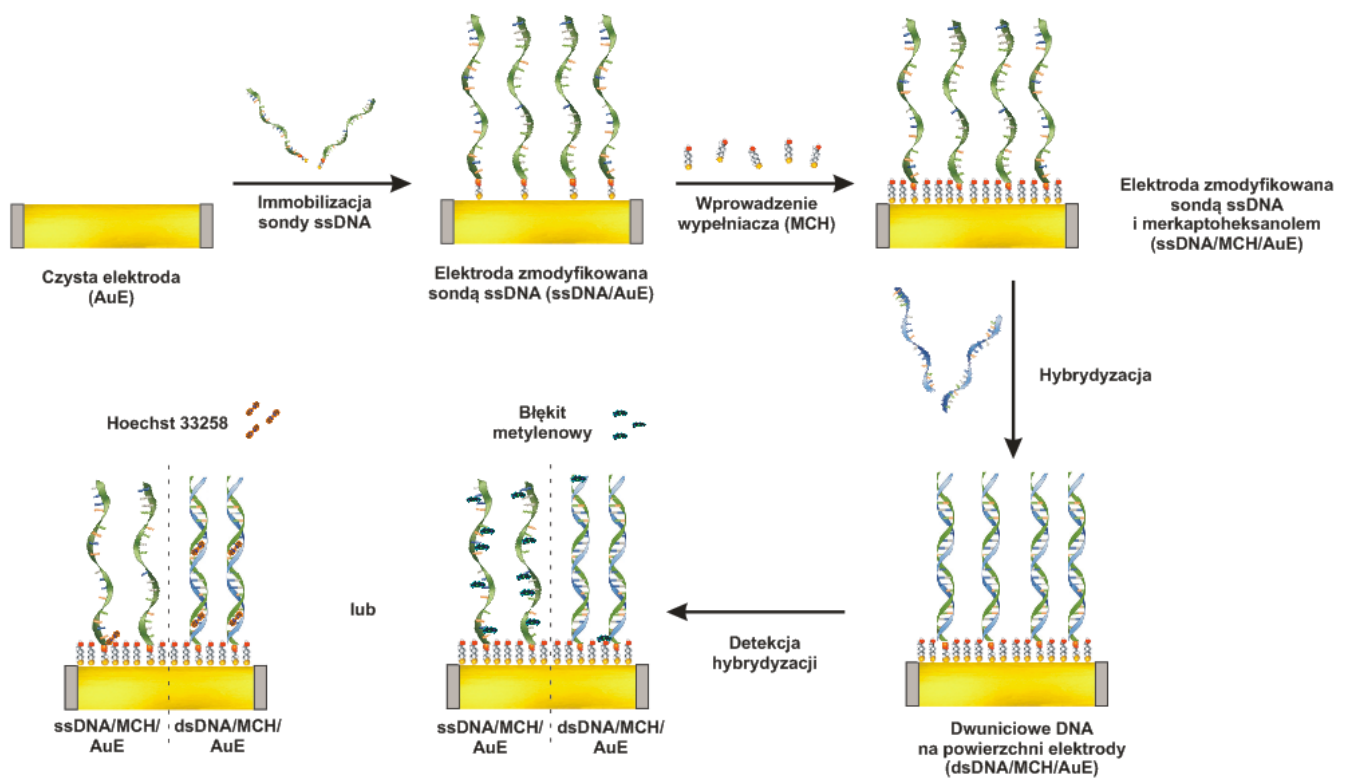
Opracowana warstwa detekcyjna biosensora (zbudowana z sond ssDNA i cząsteczek MCH) została wykorzystana do badań skuteczności reakcji hybrydyzacji z użyciem komplementarnych i niekomplementarnych fragmentów kwasów nukleinowych. Pomiarów chronokulometrycznych przeprowadzono przed i po oddziaływaniu sond ssDNA z komplementarnymi cząsteczkami DNA potwierdziły prawie dwukrotnie zwiększoną akumulację kwasów nukleinowych na powierzchni elektrody wskutek badanej interakcji. Dodatkowo pomiary woltamperometryczne z użyciem wskaźnika MB wykazały, iż badany proces hybrydyzacji powoduje powstawanie cząsteczek dsDNA w warstwie detekcyjnej biosensora. Wykorzystując elektroaktywne wskaźniki specyficznie oddziałujące z jedno- i dwuniciowym DNA oraz pomiary ilości DNA na powierzchni elektrody, przeprowadzono kolejne badania reakcji hybrydyzacji, podczas których sprawdzony został układ detekcyjny konstruowanego biosensora.

1. Oceniając przy pomocy pomiarów CC (z użyciem RuHex) i oznaczeń techniką SWV (stosując wskaźnik MB) wpływ czasu reakcji sond ssDNA z badanym DNA ustalono, że 15-minutowe oddziaływanie wspomnianych cząsteczek zapewnia optymalny przebieg procesu hybrydyzacji.
2. Stosując wyżej wymienione techniki i wprowadzając do pomiarów SWV nowy wskaźnik Hoechst 33258 stwierdzono, iż opracowany system jest zdolny do ilościowego oznaczania komplementarnych fragmentów kwasów nukleinowych w mieszaninie hybrydyzacyjnej w zakresie stężeń od 1 μM do 10 μM tOligo.
3. Obecność niekomplementarnych fragmentów kwasów nukleinowych w mieszaninie hybrydyzacyjnej nie wpływała znacząco na pracę opracowanego systemu wykrywania hybrydyzacji DNA w warstwie detekcyjnej biosensora.

IV. Detekcja bakterii *Aeromonas hydrophila*

Skonstruowany elektrochemiczny biosensor został wykorzystany do detekcji bakterii *A. hydrophila* poprzez wykrywanie fragmentu kwasu nukleinowego specyficznego dla genu aerolizyny (toksyny wytwarzanej przez poszukiwany patogenny mikroorganizm) w DNA wyizolowanym z próbek wody pitnej. Schemat procesu przygotowania i następnie działania opracowanego urządzenia przedstawia rysunek 48. Szacowany czas wykonania poszczególnych etapów zaprezentowanych na danym wykresie wynosił około 2 godzin. Dodając do tego czas przygotowania próbki DNA całość detekcji bakterii *A. hydrophila* może być wykonana w ciągu około 7 godzin.

Stosując opracowany biosensor DNA przeprowadzona została detekcja bakterii *A. hydrophila* w próbkach wody pitnej zanieczyszczonej badanym mikroorganizmem patogennym oraz w próbkach referencyjnych zawierających inną bakterię. Elektrochemiczny system detekcji oparty o wykorzystanie elektroaktywnych wskaźników hybrydyzacji (zarówno błękitu metylenowego, jak i Hoechst 33258) umożliwił wykrycie w badanej próbce DNA fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla szukanego patogenu (stężenie DNA równe 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, $n = 3$, $\text{RSD} = 7\%$). W oznaczeniach referencyjnych na próbkach zawierających DNA z *Propionibacterium* spp. (stężenie DNA równe 4.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) badany układ biodetekcji generował sygnał analityczny zbliżony do odpowiedzi uzyskanej dla samych sond ssDNA unieruchomionych na powierzchni elektrochemicznego przetwornika.



Rysunek 48. Schemat przygotowania i działania opracowanego biosensora DNA.

Wnioski

Wyniki przeprowadzonych badań dowiodły, że możliwa jest detekcja mikroorganizmu patogennego na podstawie wykrycia w badanej próbce fragmentów kwasów nukleinowych specyficznych dla danego drobnoustroju przy pomocy skonstruowanego biosensora DNA. Przygotowany układ biodetekcji umożliwił szybsze zidentyfikowanie bakterii *Aeromonas hydrophila* w skażonej mikrobiologicznie wodzie pitnej, niż dotychczas opracowane konwencjonalne i alternatywne metody wykrywania tego patogenu.

Opracowana procedura skonstruowania warstwy detekcyjnej biosensora oparta na wykorzystaniu mieszanej samoorganizującej się monowarstwy (zbudowanej z sond ssDNA i cząsteczek merkaptoheksanolu) pozwoliła na uzyskanie uporządkowanej i stabilnej powierzchni przetwornika elektrochemicznego wyposażonej w elementy wiążące docelowe fragmenty kwasów nukleinowych i zapobiegające niespecyficznemu adsorpcji niepożądanych cząsteczek w trakcie procesu analitycznego.

Przygotowany system elektrochemicznego wykrywania reakcji hybrydyzacji w wiarygodny sposób sygnalizuje proces specyficznego wiązania poszukiwanych fragmentów kwasów nukleinowych w warstwie detekcyjnej biosensora i nie jest znacząco podatny na obecność w mieszaninie hybrydyzacyjnej innych niekomplementarnych odcinków DNA.

Możliwe jest także wykrywanie odcinków kwasów nukleinowych specyficznych dla bakterii *A. hydrophila* w próbkach DNA wyizolowanych z wody pitnej i nie poddanych procesowi amplifikacji w reakcji PCR. Uzyskana odpowiedź analityczna pozwoliła na wyraźne zróżnicowanie próbek kwasów nukleinowych otrzymanych z produktów skażonych poszukiwanym mikroorganizmem i wolnych od niego.

Opracowany biosensor był wykorzystany do detekcji *A. hydrophila*. Zmieniając sekwencje sond ssDNA w warstwie detekcyjnej urządzenia możliwe jest zastosowanie biosensora do wykrywania innych mikroorganizmów chorobotwórczych zanieczyszczających produkty żywnościowe.

Stosując skonstruowany biosensor DNA stwierdzono obecność bakterii *A. hydrophila* w badanej wodzie pitnej. Odpowiednio modyfikując sposób przygotowania próbki możliwe byłoby przeprowadzenie oznaczeń o charakterze ilościowym także w odniesieniu do innych rodzajów żywności.

Załączniki

Załącznik 1. Karta opisująca zatrucie pokarmowe wywołane przez bakterie *Aeromonas hydrophila* zawarta w wytycznych Światowej Organizacji Zdrowia „Foodborne Diseases Outbreaks. Guidelines for Investigation and Control” [5]

Nazwa choroby	Zatrucie pokarmowe wywołane przez bakterie <i>Aeromonas</i> spp. (ang. <i>Aeromonas enteritis</i>)
Czynnik etiologiczny	Bakteria: <i>Aeromonas hydrophila</i> .
Opis czynnika	Gram-ujemne, ruchliwe, nieprzetrwalnikujące, względnie beztlenowe, proste lub zakrzywione pałeczki. Nie rosną przy 4-5% stężeniu NaCl oraz przy pH poniżej 6. Optymalna temperatura wynosi 28°C ale rozwijają się także w warunkach chłodniczych (przy 4°C). Wiele szczepów posiada zdolność do wzrostu w zakresie pH od 4 do 10 przy innych optymalnych warunkach.
Czas inkubacji	24 – 48 godzin.
Objawy	Wodnisty stolec, skurcze brzucha, gorączka, wymioty.
Powikłania	Zapalenie płuc i oskrzeli, zapalenie pęcherzyka żółciowego.
Czas trwania	Kilka dni, tygodni.
Miejsce występowania, źródło	Powszechne w środowisku wodnym i w ściekach.
Środki przenoszenia i powiązanie z żywnością	Ryby, owoce morza (krewetki, ostrygi), ślimaki, woda pitna; izolowane z szerokiej gamy produktów żywnościowych.
Specyficzne środki kontroli	Przemysł: zabiegi chemiczne i dezynfekcja instalacji wodociągowej, napromienianie żywności, procesy termiczne, dobre praktyki higieniczne podczas produkcji i przetwarzania żywności. Zakłady żywienia zbiorowego / gospodarstwa domowe: dokładne gotowanie żywności, odpowiednie przechowywanie żywności gotowej tzw. <i>ready-to-eat</i> .
Występowanie	Na całym świecie, sporadyczne przypadki zbiorowych zachorowań w Afryce, Australii, Europie, Japonii i Północnej Ameryce. Zasięg nieokreślony.
Pozostałe komentarze	Oportunistyczny patogen.

Załącznik 2. Kompletna sekwencja genu aerolizyny *Aeromonas hydrophila* AH14 opublikowana w bazie GenBank

[EU650663](#). *Aeromonas hydrophila* [gi:187438559]

LOCUS EU650663 1482 bp DNA linear BCT 10-MAY-2008

DEFINITION *Aeromonas hydrophila* strain AH14 aerolysin gene, complete cds.

ACCESSION EU650663

VERSION EU650663.1 GI:187438559

KEYWORDS

SOURCE *Aeromonas hydrophila*

ORGANISM [Aeromonas hydrophila](#)

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales;

Aeromonadaceae; *Aeromonas*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1482)

AUTHORS Singh,V., Rathore,G., Kapoor,D., Mishra,B.N. and Lakra,W.S.

TITLE Gene cloning, expression and characterization of recombinant aerolysin from *Aeromonas hydrophila*

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1482)

AUTHORS Singh,V., Rathore,G., Kapoor,D., Mishra,B.N. and Lakra,W.S.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (16-APR-2008) Aquatic Microbes Section, National Bureau of Fish Genetic Resources, Canal Ring Road, PO-Dilkusha, Lucknow, UP 226002, India

FEATURES Location/Qualifiers

ORIGIN

```
1 atgcaaaaac taaaataac tggcttgca ttgatcatat cggcctgct gatggctcag
61 gctaacgctg cagaaccgt ctatccagac cagttgcgcc tgttctcgct gggtcaggag
121 gtctgtggcg acaagtatcg ccctattact cgagaagaag cccagagcgt taaaagtaat
181 attgtcaata tgatgggcca gtggcaaata agcggctctgg ccaacggctg ggtaataatg
241 ggaccgggtt ataatggtga aataaaacct ggctcggcgt ccaataacct gtgttaccgg
301 gtcaatcctg ttaccggagaaatatcccacc ttgtcagctc tggatattcc agatgggtgat
361 gaggtggatg tgcagtggcg actggtacac gacagtgcga atttcatcaa accaaccagc
421 tatctggcgc attatctcgg ctatgcctgg gtggcgcgca atcacagcca atatgctggt
481 gaagacatgg atgtgaccgg tgatggtgat ggctgggtga tccgcggcaa caatgacggc
541 ggctcgcagg gttatcgttg tggcgagaag acgtccatca aggtcagcaa ttttgcgtac
601 aacctggacc ctgacagctt caaacatggt gacgtgacc agtctgaccg tcagctggtc
```

661 aagacggtag tgggctgggc gatcaacgac agcgacaccc cgcaatccgg gtatgacgtc
721 actctgcgtt acgatactgc caccaactgg tccaagacca atacctatgg cctgagcgag
781 aagtgatcca ccaagaacaa gttcaagtgg ccaactgtag gggaaaccga actctccatc
841 gagattgcgg ccaaccagtc atgggatcc cagaacgggg gttctaccac cacctccctg
901 tcgcaatccg tgcggccgac ggtgccggcc cgctccaaga tcccggtgaa gatcgagctc
961 tacaaggctg atatctcta tcctatgag ttcaaggccg atgacagta tgacctgacc
1021 ctgagtggct tctgcgttg ggtgggcaat gcctgtgata cccatccgga caatcgcccg
1081 aactggaacc acaccttctg catcgggccc tacaaggaca aggcgagcag cattcctac
1141 cagtgggaca agcgttacat cccgggtgaa gtgaagtgtt gggactggaa ctggaccatc
1201 cagcagaacg gcctgtctac catgcagaac aacctggcca gactgctgag cccggcgagg
1261 gctgggatca ccggcgattt cagcggcgag agccagttt ctggcaatat cgaaatcggg
1321 gcgcccgtgc ccctcgcggc ggatggcaag ggcctcag ctctcagcg gagaagggga
1381 gaacagggcc tgcgactgga gatcccgctc gatgcgcaag agctctccgg gcttgcttc
1441 agcaacgtca gcctgagcgt gacgccagt gccaatcaat aa

//

Na podstawie danych literaturowych [43,52]:

5' **gcagaacccgtctatccag** – sekwencja startera F

5' **caatcctgtaccggagaaa** – miejsce wiązania startera B

Lista publikacji:

1. Ligaj, M., Filipiak, M., **Tichoniuk, M.** Biosensor DNA i sposób wykrywania specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych oraz zastosowanie biosensora DNA. – zgłoszenie patentowe numer: P 382226.
2. **Tichoniuk, M.**, Ligaj, M., Filipiak, M. Application of DNA Hybridization Biosensor as a Screening Method for the Detection of Genetically Modified Food Components, *Sensors*, 2008, 8, strony 2118-2135.
3. Ligaj, M., **Tichoniuk, M.**, Filipiak, M. Detection of bar gene encoding phosphotricin herbicide resistance in plants by electrochemical biosensor. *Bioelectrochemistry*, 2008, 74, strony 32-37.
4. **Tichoniuk M.**, Filipiak M. Wykorzystanie samoorganizujących się monowarstw organotiolowych w badaniach struktur biologicznych i biodetekcji. w *Na pograniczu chemii i biologii*. Tom XX, Red. Koroniak H., Barciszewski J., Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, 2008, strony 561-579.
5. **Tichoniuk M.**, Gwiazdowska D., Ligaj M., Filipiak M.: Electrochemical detection of foodborne pathogen *Aeromonas hydrophila* by DNA hybridization biosensor. artykuł w druku w *Biosens. Bioelectron.*, dostępny on-line, DOI information: 10.1016/j.bios.2010.08.030.

Literatura

1. **Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., Adley, C.** An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnol Adv.* 2010, 28, strony 232-254.
2. **Havelaar, A.H., Brul, S., de Jong, A., de Jonge, R., Zwietering, M.H., ter Kuile, B.H.** Future challenges to microbial food safety. *Int J Food Microbiol.* 2010, 139, strony S79-S94.
3. **Nowak, A., Oltuszek-Walczak, E., Świtoniak, T.** Zatrucia i zakażenia pokarmowe. w Libudzisz, Z., Kowal, K., Żakowska, Z. (Ed.) *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności.* Warszawa : Wydawnictwo Naukowe PWN SA, 2008, strony 265-288.
4. **USEPA.** *Aeromonas: Human Health Criteria Document.* Washington, USA : U.S. Environmental Protection Agency, 2006.
5. **WHO.** *Foodborne disease outbreaks. Guidelines for investigation and control.* Genewa, Szwajcaria : World Health Organization, 2008.
6. **Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., van der Giessen, J., Kruse, H.** Foodborne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol.* 2010, 139, strony S3-S15.
7. **Quested, T.E., Cook, P.E., Gorris, L.G.M., Cole, M.B.** Trends in technology, trade and consumption likely to impact on microbial food safety. *Int J Food Microbiol.* 2010, 139, strony S29-S49.
8. **Goderska, K., Szwengiel, A.** Nowe metody stosowane w analizie żywności. *Laboratorium.* 2009, 5, strony 10-15.
9. **Lazcka, O., Del Campo, F.J., Munoz, F.X.** Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2007, 22, strony 1205-1217.
10. **Barken, K.B., Haagenzen, J.A.J., Tolker-Nielsen, T.** Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. *Clin Chim Acta.* 2007, 384, strony 1-11.
11. **Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voros, J., Reimhult, E.** Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures. *Sensors.* 2008, 8, strony 1400-1458.
12. **Labuda, J., Oliveira Brett, A.M., Evtugyn, G., Fojta, M., Mascini, M., Ozsoz, M., Palchetti, I., Palecek, E., Wang, J.** Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem.* 2010, 82, strony 1161-1187.
13. **Radecki, J., Radecka, H., Cieśla, J., Tudek, B.** Sensory chemiczne i biosensory w kontroli żywności zmodyfikowanej genetycznie. *Biotechnologia.* 2006, 74, strony 67-78.

14. **Tichoniuk, M., Filipiak, M.** Wykorzystanie samoorganizujących się monowarstw organo-tiolowych w badaniach struktur biologicznych i biodetekcji. w Koroniak, H., Barciszewski, J. (Ed.) *Na pograniczu chemii i biologii. Tom XX*. Poznań: Wydawnictwo Naukowe UAM, 2008, strony 561-579.
15. **Bzducha, A.** Szybkie metody identyfikacji mikroorganizmów w żywności. *Medycyna Wet.* 2007, 63, strony 773-777.
16. **Kołożyn-Krajewska, D.** Efektywność systemu HACCP wobec ryzyka nowych zagrożeń mikro-biologicznych. w Kijowski, J., Cegielska-Radziejewska, R. (Ed.) *Kontrola zagrożeń żywności auditowanym i certyfikowanym systemem ISO 22000 / HACCP*. Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, 2008, strony 26-37.
17. **Canada, Health.** *Bacterial waterborne pathogens - current and emerging organisms of concern*. Ottawa, Kanada: Federal-Provincial-Territorial Committee on Health and the Environment, 2006.
18. **Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia** (Dz. U. 2006 nr 171 poz. 1225) wraz z późniejszymi zmianami.
19. **Rozporządzenie (WE) nr 178/2002** Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 roku ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołującego Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiającego procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności (Dz. U. WE L 31 z 1.02.2002, str. 1; Dz. U. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 15, t 5, str 463).
20. **Ustawa z dnia 22 stycznia 200 r. o ogólnym bezpieczeństwie produktów** (Dz. U. 2000 nr 15 poz. 179) - obecnie nieobowiązująca.
21. **Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005** Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 15 listopada 2005 roku w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych (Dz. U. L338 z 22.12.2005, str. 1).
22. **Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1441/2007** z dnia 5 grudnia 2007 roku zmieniające rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych (Dz. U. L 332 z 7.12.2007, str.12).
23. **Adams, M.R., Moss, M.O.** *Food microbiology*. Cambridge, Wielka Brytania: RSC Publishing, 2008.
24. **WHO.** *The world health report 2008. Primary health care. Now more than ever*. Genewa, Szwajcaria: World Health Organisation, 2008.
25. **Centers for Disease Control and Prevention.** Surveillance for foodborne disease outbreaks — United States, 2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2010, 59, strony 973-979.
26. **EPIMELD.** Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne, zakażeniach i zatruciach w Polsce. *Zakład Epidemiologii, Pracownia Analizy Epidemiologicznej Skażeń Biologicznych*. [Online] sierpień 2010. http://www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html#01
27. **Directorate-General for Health & Consumers.** *The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual report 2007*. Luxemburg: European Communities, 2008.
28. **Directorate-General for Health & Consumers.** *The Rapid Alert System for Health and Feed (RASFF). Annual report 2008*. Luxemburg: European Communities, 2009.

29. **Directorate-General for Health & Consumers.** *The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual report 2009.* Luxemburg: European Communities, 2010.
30. **Burbianka, M., Pliszka, A., Burzyńska, H.** *Mikrobiologia żywności.* Warszawa: Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, 1983.
31. **Salyers, A.A., Whitt, D.D.** *Mikrobiologia. Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko.* Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN SA, 2003.
32. **Acheson, D.W.K.** Food and Waterborne Illnesses. w Schaechter, M. (Ed.) *Encyclopedia of microbiology. 3rd Edition. Volume IV.* Oxford, Wielka Brytania: Elsevier Inc., 2009, strony 365-381.
33. **Garcia, S., Heredia, N.** Foodborne pathogens and toxins: An overview. w Heredia, N., Wesley, I., Garcia, S. (Ed.) *Microbiological safe foods.* New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 2009, strony 15-52.
34. **Grzybowski, J., Reiss, J.** *Praktyczna bakteriologia lekarska i sanitarna.* Warszawa: Dom Wydawniczy Bellona, 2001.
35. **Montville, T.J., Matthews, K.R.** *Food Microbiology. An Introduction.* Washington, USA: ASM Press, 2008.
36. **Janda, J.M., Abbott, S.L.** The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev.* 2010, 23, strony 35-73.
37. **Pund, R.P., Theegarten, D.** Die Bedeutung der beweglichen *Aeromonaden* als Krankheits-erreger für den Menschen. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz.* 2008, 5, strony 569-576.
38. **Martin-Carnahan, A., Joseph, S.W.** *Aeromonadaceae.* w Brenner, D.J., Krieg, N.R.; Staley, J.T.; Garrity, G.M. (Ed.) *The Proteobacteria, Part B, Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd edition.* New York, USA: Springer-Verlag, 2005, strony 556-580.
39. **Kaznowski, A.** *Identyfikacja gatunków genomowych pałeczek Aeromonas oraz oznaczenie ich właściwości biochemicznych, fizjologicznych i oporności na wybrane czynniki przeciwbakteryjne.* Poznań: Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im Adama Mickiewicza, 1997.
40. **Tichoniuk, M., Gwiazdowska, D., Ligaj, M.** Importance of *Aeromonas hydrophila* as a food-borne pathogen. *10th International Commodity Science Conference (IGWT) Current Trends in Commodity Science, 17-18.09.2009.* Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, 2009, str. 103.
41. **Daskalov, H.** The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control.* 2006, 17, strony 474-483.
42. **Berrang, M.E., Brackett, R.E., Beuchat, L.R.** Growth of *Aeromonas hydrophila* on Fresh Vegetables Stored under a Controlled Atmosphere. *Appl Environ Microb.* 1989, 55, strony 2167-2171.
43. **Gonzalez-Serrano, C.J., Santos, J.A., Garcia-Lopez, M.L., Otero, A.** Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case. *J Appl Microbiol.* 2002, 93, strony 414-419.
44. **USEPA.** Announcement of the drinking water contamination candidate list. Notice. *Federal register.* 2005, 70, str. 9071.

45. **Kozińska, A.** Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *J Fish Dis.* 2007, 30, strony 293-301.
46. **Edberg, S.C., Browne, F.A.** Issues for microbial regulation: *Aeromonas* as a model. *Crit Rev Microbiol.* 2007, 33, strony 89-100.
47. **Chopra, A.K., Houston, C.W.** Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes Infec.* 1999, 1, strony 1129-1137.
48. **Abrami, L., Fivaz, M., van der Goot, F.G.** Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. *Trends Microbiol.* 2000, 8, strony 168-172.
49. **Singh, V., Somvanshi, P., Rathore, G., Kapoor, D., Mishra, B.N.** Gene cloning, expression, and characterization of recombinant aerolysin from *Aeromonas hydrophila*. *Appl Biochem Biotech.* 2010, 160, strony 1985-1991.
50. **Naharro, G., Riano, J., de Castro, L., Alvarez, S., Luengo, J.M.** *Aeromonas*. w Liu, D. (Ed.) *Molecular detection of foodborne pathogen.* New York, USA: CRC Press, Taylor & Francis LLC, 2009, strony 273-288.
51. **Chacon, M.R., Castro-Escarpulli, G., Soler, L., Guarro, J., Figueras, M.J.** A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagn Micr Inf Dis.* 2002, 44, strony 221-225.
52. **Arora, S., Agarwal, R.K., Bist, B.** Comparison of ELISA and PCR vis-a`-vis cultural methods for detecting *Aeromonas* spp. in foods of animal origin. *Int J Food Microbiol.* 2006, 106, strony 177-183.
53. **Borrell, N., Acinas, S.G., Figureas, M.J., Martínez-Murcia, A.J.** Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA Genes. *J Clin Microbiol.* 1997, 35, strony 1671-1674.
54. **Ozbas, Z.Y., Lehner, A., Wagner, M.** Development of a multiplex and semi-nested PCR assay for detection of *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in rawmilk. *Food Microbiol.* 2000, 17, strony 197-203.
55. **Wang, G., Clark, C.G., Liu, Ch., Pucknell, Ch., Munro, C.K., Kruk, T.M.A.C., Caldeira, R., Woodward, D.L., Rodgers, F.G.** Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2003, 41, strony 1048-1054.
56. **Kingombe, C.I.B., Huys, G., Howald, D., Luthi, E., Swings, J., Jemmi, T.** The usefulness of molecular techniques to assess the presence of *Aeromonas* spp. harboring virulence markers in foods. *Int J Food Microbiol.* 2004, 94, strony 113-121.
57. **Tombelli, S., Mascini, M., Sacco, C., Turner, A.P.F.** A DNA piezoelectric biosensor assay coupled with a polymerase chain reaction for bacterial toxicity determination in environmental samples. *Anal Chim Acta.* 2000, 418, strony 1-9.
58. **Gwiazdowska, D., Filipiak, M.** Metody wykrywania mikroorganizmów patogennych w żywności. w Małecka, M. (Ed.) *Żywność bezpieczna dla konsumenta.* Poznań: Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, 2006, strony 25-39
59. **Jasson, V., Jacxsen, L., Luning, P., Rajkovic, A., Uyttendaele, M.** Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiol.* 2010, 27, strony 710-730.

60. **Baeumner, A.** Food pathogen and toxin detection. *Anal Bioanal Chem.* 2008, 391, strony 449-450.
61. **Atlas, R.M.** *Handbook of microbiological media for the examination of food.* Boca Raton, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006.
62. **Yang, L., Bashir, R.** Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne patho-genic bacteria. *Biotechnol Adv.* 2008, 26, strony 135-150.
63. **Gehring, A.G., Irwin, P.L., Reed, S.A., Tu, S.I.** Enzyme-linked immunomagnetic chemi-luminescence incorporating anti-H7 and anti-O157 antibodies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *J Rapid Meth Aut Mic.* 2006, 14, strony 349-361.
64. **Sunwoo, H.H., Wang, W.W., Sim, J.S.** Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using chicken immunoglobulin Y. *Immunol Lett.* 2006, 106, strony 191-193.
65. **Valdivieso-Garcia, A., Desruisseau, A., Richie, E., Fukuda, S., Tatsumi, H.** Evaluation of a 24-hour bioluminescent enzyme immunoassay for the rapid detection of *Salmonella* in chicken carcass rinses. *J Food Prot.* 2003, 66, strony 1996-2004.
66. **dos Santos Schneid, A.D., Rodrigues, K.L., Chemello, D., Tondo, E.C., Ayub, M.A.Z., Aleixo, J.A.G.** Evaluation of an indirect ELISA for the detection of *Salmonella* in chicken meat. *Braz J Microbiol.* 2006, 37, strony 350-355.
67. **Matar, G.M., Hayes, P.S., Bibb, W.F.** Listeriolysin O-based latex agglutination test for the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *J Food Prot.* 1997, 60, strony 1038-1040.
68. **Churchill, R.L.T., Lee, H., Hal, J.C.** Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *J Microbiol Meth.* 2006, 64, strony 141-170.
69. **Amann, R., Fuchs, B.M., Behrens, S.** The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. *Curr Opin Biotech.* 2001, 12, strony 231-236.
70. **Palchetti, I., Mascini, M.** Electroanalytical biosensors and their potential for food pathogen and toxin detection. *Anal Bioanal Chem.* 2008, 391, strony 455-471.
71. **Riyaz-Ul-Hassan, S., Verma, V., Qazi, G.N.** Evaluation of three different molecular markers for the detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Food Microbiol.* 2008, 25, strony 452-459.
72. **Oravcova, K., Kuchta, T., Kaclikova, E.** A novel real-time PCR-based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Lett Appl Microbiol.* 2007, 45, strony 568-73.
73. **O'Grady, J., Sedano-Balbas, Maher, M., Smith, T., Barry, T.** Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the SSR A gene, a novel diagnostic target. *Food Microbiol.* 2008, 25, strony 75-84.
74. **Mukhopadhyay, A., Mukhopadhyay, U.K.** Novel multiplex PCR approaches for the simulta-neous detection of human pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Meth.* 2007, 68, strony 193-200.
75. **Stark, R., Made, D.** Detection of *Salmonella* in foods - experience with a combination of microbiological and molecular biological methods. *Fleischwirtschaft.* 2007, 87, strony 98-101.

76. **Kim, J.S., Lee, G.G., Park, J.S., Jung, Y.H., Kwak, H.S., Kim, S.B.** A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Protect.* 2007, 70, strony 1656-1662.
77. **Podogrodzka, E.** Real-Time PCR w mikrobiologii żywności. Detekcja patogenów metodami molekularnymi. *Laboratorium.* 2009, 5, strona 34.
78. **Yaron, S., Matthews, K.R.** A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 : investigation of specific target genes. *J Appl Microbiol.* 2002, 92, strony 633-640.
79. **Karczmarczyk, M., Bartoszcze, M.** Mikromacierze DNA - nowe narzędzie w wykrywaniu czynników biologicznych. *Przegl Epidemi.* 2006, 60, strony 803-811.
80. **Bier, F.F., von Nickisch-Rosennekg, M., Ehrentreich-Forster, E., Reiss, E., Henkel, J., Strehlow, R., Andresen, D.** DNA microarrays. w Renneberg, R., Lisdat, F. (Ed.) *Biosensing for the 21st Century.* Berlin, Niemcy: Springer-Verlag, 2008, strony 433-454
81. **Nayak, M., Kotian, A., Marathe, S., Chakravorty, D.** Detection of microorganisms using biosensors - A smarter way towards detection techniques. *Biosens Bioelectron.* 2009, 25, strony 661-667.
82. **Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S.** Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. Technical report. *Biosens Bioelectron.* 2001, 16, strony 121-131.
83. **Filipiak, M.** Wykorzystanie substancji biologicznie czynnych do celów analitycznych w biosensorach enzymatycznych i biosensorach DNA. w Koroniak, H., Barciwzowski, J. (Ed.) *Na pograniczu chemii i biologii. Tom III.* Poznań: Wydawnictwo Naukowe UAM, 1999, strony 481-501.
84. **Karyakin, A.A.** Biosensors. w Baraton, M.I. (Ed.) *Sensors for Environment, Health and Security.* Dordrecht, Holandia : Springer Science + Business Media B.V., 2009, strony 255-265.
85. **Tokarsky, O., Marshall, D.L.** Immunosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 - perspectives for use in the meat processing industry. *Food Microbiol.* 2008, 25, strony 1-12.
86. **Guntupalli, R., Hu, J., Laksmanam, R.S., Huang, T.S., Barbaree, J.M., Chin, B.A.** A magnetoelastic resonance biosensor immobilize with polyclonal antibody for the detection of *Salmonella typhimurium*. *Biosens Bioelectron.* 2007, 22, strony 1474-1479.
87. **Pal, S., Ying, W., Alocilja, E.C., Downes, F.P.** Sensitivity and specificity performance of a direct-charge transfer biosensor for detecting *Bacillus cereus* in selected food matrices. *Biosyst Eng.* 2008, 99, strony 461-468.
88. **Diaz-Gonzalez, M., Gonzalez-Garcia, M.B., Costa-Garcia, A.** Recent advances in electrochemical enzyme immunoassays. *Electroanal.* 2005, 17, strony 1901-1918.
89. **Bunde, R.L., Jarvi, E.J., Rosentreter, J.J.** Piezoelectric quartz crystal biosensors. *Talanta.* 1998, 46, strony 1223-1236.
90. **Mullett, W.M., Lai, E.P.C., Yeung, J.M.** Surface plasmon resonance-based immuno-assays. *Methods.* 2000, 22, strony 77-91.

91. **Homola, J.** Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal Bioanal Chem.* 2003, 377, strony 528-539.
92. **Luong, J.H.T., Male, K.B., Glennon, J.D.** Biosensor technology: Technology push versus market pull. *Biotechnol Adv.* 2008, 26, strony 492-500.
93. **Clark, L.C., Lyons, C.** Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1962, 102, strony 29-45.
94. **Urdike, S.J., Hicks, J.P.** The enzyme electrode. *Nature.* 1967, 214, strony 986-988.
95. **ScienceDirect.** ScienceDirect. *Elsevier B.V.* [Online] sierpień 2010. <http://www.sciencedirect.com>.
96. **Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W.** GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2009, 38, strony D46-D51.
97. **Sheehan, D.** Bioinformatics. *Physical biochemistry. Principles and applications. Second edition.* Chichester, Wielka Brytania: John Wiley & Sons Ltd, 2009, strony 305-347.
98. **Bier, F.F.** Active arrays. *20th Anniversary World Congress on Biosensors.* 26-28.05.2010 Glasgow. Wlk. Brytania, strona 04.2.
99. **Wang, J.** From DNA biosensors to gene chips. *Nucleic Acid Res.* 2000, 28, strony 3011-3016.
100. **Teles, F.R.R., Fonseca, L.P.** Trends in DNA biosensors. *Talanta.* 2008, 77, strony 606-623.
101. **Bier, F., Hartwig, K.** BioMicrosystem technologies (bioMST) - enabler for a more individual medicine. *MST News.* 2008, 1, strony 6-8.
102. **Brandenburg, A., Curdt, F., Sulz, G., Ebling, F., Nestler, J., Wunderlich, K., Michel, D.** Biochip readout system for point-of-care applications. *Sensor Actuat B-Chem.* 2009, 139, strony 245-251.
103. **Kraus, S., Kleines, M., Albers, J., Blohm, L., Piechotta, G., Puttmann, Ch., Nahring, J., Nebling, E.** Quantitative measurement of human anti-HCV Core immunoglobulins on an electrical biochip platform. *Biosens Bioelectron.* 2010, w druku, doi:10.1016/j.bios.2010.03.026.
104. **Cheng, A.K.H., Sen, D., Yu, H.Z.** Design and testing of aptamer-based electrochemical biosensors for proteins and small molecules. *Bioelectrochemistry.* 2009, 77, strony 1-12.
105. **Singh, R.P., Oh, B.K., Choi, J.W.** Application of peptide nucleic acid towards development of nanobiosensor arrays. *Bioelectrochemistry.* 2010, 79, strony 153-161.
106. **Ligaj, M.** *Bioczujniki do wykrywania GMO.* Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, 2010.
107. **Koolman, J., Roehm, K.H.** *Color atlas of biochemistry. Second edition, revised and enlarged.* Stuttgart, Niemcy: Georg Thieme Verlag, 2005.
108. **Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.** Wstęp: Biochemia i rewolucja genomowa. *Biochemia.* Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN SA, 2005, strony 3-18.
109. **Hames, B.D., Hooper, N.M.** *Biochemia. Krótkie wykłady.* Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2006.

110. **Palecek, E., Fojta, M.** Electrochemical DNA Sensors. w Willner, I., Katz, E. (Ed.) *Bioelectronics. From Theory to Applications*. Weinheim, Niemcy: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2005, strony 127-192.
111. **Jasnowska, J., Ligaj, M., Tichoniuk, M., Filipiak, M.** Application of DNA electrochemical biosensor for the detection of toxic metals. *9th International Commodity Science Conference (IGWT) Current Trends in Commodity Science, 29-31.08.2007.*, 2007, Akademia Ekonomiczna w Poznaniu, strony 830-835.
112. **Van Dorst, B., Mehta, J., Bekaert, K., Rouah-Martin, E., De Coen, W., Dubruel, P., Blust, R., Robbens, J.** Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2010, w druku, doi:10.1016/j.bios.2010.07.033
113. **Li, H.H., Aubrecht, J. i Fornace Jr., A.J.** Toxicogenomics: Overview and potential applications for the study of non-covalent DNA interacting chemicals. *Mutat Res.* 2007, 623, strony 98-108.
114. **Jasnowska-Malecka, J., Ligaj, M., Tichoniuk, M., Filipiak, M.** Application of DNA electrochemical biosensor for toxic compounds present in food. *Acta Biochim Pol.* 2008, 55 Sup. 3, str. 119.
115. **Oliveira, S.C.B., Corduneanu, O., Oliveira-Brett, A.M.** In situ evaluation of heavy metal-DNA interactions using an electrochemical DNA biosensor. *Bioelectrochemistry.* 2008, 71, strony 53-58.
116. **Marrazza, G., Chianella, I., Mascini, M.** Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. *Anal Chim Acta.* 1999, 387, strony 297-307.
117. **Mascini, M., Palchetti, I., Marrazza, G.** DNA electrochemical biosensors. *Fresen J Anal Chem.* 2001, 369, strony 15-22.
118. **Lucarelli, F., Palchetti, I., Marrazza, G., Mascini, M.** Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples. *Talanta.* 2002, 56, strony 949-957.
119. **Del Carlo, M., Di Marcello, M., Perugini, M., Ponzielli, V., Sergi, M., Mascini, M., Compagnone, D.** Electrochemical DNA biosensor for polycyclic aromatic hydrocarbon detection. *Microchim Acta.* 2008, 163, strony 163-169.
120. **Kim, Y.S., Niazi, J.H., Gu, M.B.** Specific detection of oxytetracycline using DNA aptamer-immobilized interdigitated array electrode chip. *Anal Chim Acta.* 2009, 634, strony 250-254.
121. **Wei, F., Ho, Ch.M.** Aptamer-based electrochemical biosensor for Botulinum neurotoxin. *Anal Bioanal Chem.* 2009, 393, strony 1943-1948.
122. **Lucarelli, F., Tombelli, S., Minunni, M., Marrazza, G., Mascini, M.** Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection. *Anal Chim Acta.* 2008, 609, strony 139-159.
123. **Sayers, E.W., Barrett, T., Benson, D.A., Bolton, E., Bryant, S.H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D.M., DiCuccio, M. i inni.** Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2009, 38, strony D5-D16.

124. **Tichoniuk, M., Ligaj, M., Jasnowska, J., Filipiak, M.** Biosensor for the detection of specific DNA sequences in food. *9th International Commodity Science Conference (IGWT) Current Trends in Commodity Science, 29-31.08.2007*. 2007, Akademia Ekonomiczna w Poznaniu. 1053-1058.
125. **Holst-Jensen, A.** Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives. *Biotechnol Adv.* 2009, 27, strony 1071-1082.
126. **Marmiroli, N., Maestri, E., Gulli, M., Malcevschi, A., Peano, C., Bordoni, R., De Bellis, G.** Methods for detection of GMOs in food and feed. *Anal Bioanal Chem.* 2008, 392, strony 369-384.
127. **Passamano, M., Pighini, M.** QCM DNA-sensor for GMOs detection. *Sensors Actuat B-Chem.* 2006, 118, strony 177-181.
128. **Stobiecka, M., Cieśla, J.M., Janowska, B., Tudek, B., Radecka, H.** Piezoelectric sensor for determination of genetically modified soybean Roundup Ready in samples not amplified by PCR. *Sensors.* 2007, 7, strony 1462-1479.
129. **Bogani, P., Minunni, M., Spiriti, M.M., Zavaglia, M., Tombelli, S., Buiatti, M., Mascini, M.** Transgenes monitoring in an industrial soybean processing chain by DNA-based conventional approaches and biosensors. *Food Chem.* 2009, 113, strony 658-664.
130. **Karamollaoglu, I., Oktem, H.A., Mutlu, M.** QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs). *Biochem Eng J.* 2009, 44, strony 142-150.
131. **Lien, T.T.N., Lam, T.D., An, V.T.H., Hoang, T.V., Quang, D.T., Khieu, D.Q., Tsukahara, T., Lee, Y.H., Kim, J.S.** Multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs)-doped polypyrrole DNA biosensor for label-free detection of genetically modified organisms by QCM and EIS. *Talanta.* 2010, 80, strony 1164-1169.
132. **Ligaj, M., Tichoniuk, M., Filipiak, M.** Detection of bar gene encoding phosphinothricin herbicide resistance in plants by electrochemical biosensor. *Bioelectrochemistry.* 2008, 74, strony 32-37.
133. **Tichoniuk, M., Ligaj, M., Jasnowska-Malecka, J., Filipiak, M.** Electrochemical determination of genetically modified soybean Roundup Ready by DNA hybridization biosensor. *Acta Biochim Pol.* 2008, 55 Supl. 3, str. 120.
134. **Kalogianni, D.P., Koraki, T., Christopoulos, T.K., Ioannou, P.C.** Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms. *Biosens Bioelectron.* 2006, 21, strony 1069-1076.
135. **Yang, J., Yang, T., Feng, Y., Jiao, K.** A DNA electrochemical sensor based on nanogold-modified poly-2,6-pyridinedicarboxylic acid film and detection of PAT gene fragment. *Anal Biochem.* 2007, 365, strony 24-30.
136. **Zhu, D., Liu, J., Tang, Y., Xing, D.** A reusable DNA biosensor for the detection of genetically modified organism using magnetic bead-based electrochemiluminescence. *Sensor Actuat B-Chem.* 2010, 149, strony 221-225.
137. **Oczkowski, T., Filipiak, M.** Startery, elektrochemiczny biosensor DNA oraz sposób wykrywania mikroorganizmu *Listeria monocytogenes* w substancjach organicznych, zwłaszcza żywności. Patent PL 200797 B1.

138. **Shiraishi, H., Itoh, T., Hayashi, H., Takagi, K., Sakane, M., Mori, T., Wang, J.** Electrochemical detection of *E. coli* 16S rDNA sequence using air-plasma-activated fullerene-impregnated screen printed electrodes. *Bioelectrochemistry*. 2007, 70, strony 481-487.
139. **Berganza, J., Olabarria, G., Garcia, R., Verdoy, D., Rebollo, A., Arana, S.** DNA microdevice for electrochemical detection of *Escherichia coli* 0157:H7 molecular markers. *Biosens Bioelectron*. 2007, 22, strony 2132-2137.
140. **Loaiza, O.A., Campuzano, S., Pedrero, M., Pingarron, J.M.** DNA sensor based on an *Escherichia coli lac Z* gene probe immobilization at self-assembled monolayers-modified gold electrodes. *Talanta*. 2007, 73, strony 838-844.
141. **Chen, S.H., Wu, V.C.H., Chuang, Y.Ch., Lin, Ch.S.** Using oligonucleotide-functionalized Au nanoparticles to rapidly detect foodborne pathogens on a piezoelectric biosensor. *J Microbiol Meth*. 2008, 73, strony 7-17.
142. **Snevajsova, P., Tison, L., Brozkova, I., Vytrasova, J., Metelka, R., Vytras, K.** Carbon paste electrode for voltammetric detection of a specific DNA sequence from potentially aflatoxicogenic *Aspergillus* species. *Electrochem Commun*. 2010, 12, strony 106-109.
143. **Farabullini, F., Lucarelli, F., Palchetti, I., Marazza, G., Mascini, M.** Disposable electrochemical genosensor for the simultaneous analysis of different bacterial food contaminants. *Biosens Bioelectron*. 2007, 22, strony 1544-1549.
144. **Ikanovic, M., Rudzinski, W.E., Bruno, J.G., Allman, A., Carrillo, M.P., Dwarakanath, S., Bhahtdigadi, S., Rao, P., Kiel, J.L., Andrews, C.J.** Fluorescence Assay Based on Aptamer-Quantum Dot Binding to *Bacillus thuringiensis* Spores. *J Fluoresc*. 2007, 17, strony 193-199.
145. **Joshi, R., Janagama, H., Dwivedi, H.P., Kumar, S.T.M.A., Jaykus, L.A., Schefers, J., Sreevatsan, S.** Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of *Salmonella enterica* serovars. *Mol Cell Probe*. 2009, 23, strony 20-28.
146. **Palecek, E., Jelen, F.** Electrochemistry of Nucleic Acids. w Palecek, E., Scheller, F., Wang, J. (Ed.) *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins - Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics*. Amsterdam, Holandia: Elsevier B.V., 2005, strony 73-173.
147. **Drummond, T.G., Hill, M.G., Barton, J.K.** Electrochemical DNA sensors. *Nat Biotechnol*. 2003, 21, strony 1192-1199.
148. **de-los-Santos-Alvarez, P., Lobo-Castanon, M.J., Miranda-Ordleres, A.J., Tunon-Blanco, P.** Current strategies for electrochemical detection of DNA with sold electrodes. *Anal Bioanal Chem*. 2004, 378, strony 104-118.
149. **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, strony 26-37.
150. **Wang, J.** *Analytical electrochemistry. Second Edition*. Nowy York, USA: Wiley-VCH, 2000.
151. **Kubiak, W.W., Piech, R.** Wstep do polarografii i woltamperometrii. *Akademia Górniczo-Hutnicza. Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki. Katedra Chemii Analitycznej*. [Online] sierpień 2010. <http://home.agh.edu.pl/~kca/Woltamperometria.doc>.
152. **Zajt, T.** *Metody woltamperometryczne i elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna*. Gdańsk : Wydawnictwo Gdańskie, 2001.

153. **Bott, A.W., Heineman, W.R.** Chronocoulometry. *Current Separations*. 2004, 20, strony 121-126.
154. **Inzelt, G.** Chronocoulometry. w Scholz, F. (Ed.) *Electroanalytical methods. Guide to experiments and applications*. Berlin, Niemcy: Springer-Verlag, 2002, strony 137-148.
155. **Bard, A.J., Faulkner, L.R.** Basic potential step methods. *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*. New York, USA: John Wiley & Sons, 2001, strony 156-225.
156. **Denuault, G., Sosna, M., Williams, K.J.** Classical Experiments. w Zoski, C.G. (Ed.) *Handbook of electrochemistry*. Oxford, Wielka Brytania: Elsevier B.V., 2007, strony 431-469.
157. **Steel, A.B., Herne, T.M., Tarlov, M.J.** Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold. *Anal Chem*. 1998, 70, strony 4670-4677.
158. **Li, D., Zou, X., Shen, Q., Dong, S.** Kinetic study of DNA/DNA hybridization with electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochem Commun*. 2007, 9, strony 191-196.
159. **Wong, E.L.S., Chow, E., Gooding, J.J.** DNA recognition interfaces: The influence of interfacial design on the efficiency and kinetics of hybridization. *Langmuir*. 2005, 21, strony 6957-6965.
160. **Dharuman, V., Hahn, J.H.** Effect of short chain alkane diluents on the label free electrochemical DNA hybridization discrimination at the HS-ssDNA/diluent binary mixed monolayer in presence of cationic intercalators. *Sensor Actuator*. 2007, 127, strony 536-544.
161. **Degefa, T.H., Kwak, J.** Electrochemical impedance sensing of DNA at PNA self assembled monolayer. *J Electroanal Chem*. 2008, 612, strony 37-41.
162. **Tichoniuk, M., Gwiazdowska, D., Ligaj, M., Filipiak, M.** Electrochemical detection of foodborne pathogen *Aeromonas hydrophila* by DNA hybridization biosensor. *Biosens Bioelectron*. 2010, w druku, DOI information: 10.1016/j.bios.2010.08.030
163. **Marken, F., Neudeck, A., Bond, A.M.** Cyclic voltammetry. w Scholz, F. (Ed.) *Electroanalytical methods. Guide to experiments and applications*. Berlin, Niemcy: Springer-Verlag, 2002, strony 51-98.
164. **Finklea, H.O.** Electrochemistry of organized monolayers of thiols and related molecules on electrodes. w Bard, A.J., Rubinstein, I. (Ed.) *Electroanalytical chemistry. Vol. 19*. New York, USA: Marcel Dekker, 1996, strony 109-335.
165. **Ozoemena, K., Nyokong, T.** Voltammetric characterization of the self-assembled monolayer (SAM) of octabutylthiophthalocyaninatoiron(II): a potential electrochemical sensor. *Electrochim Acta*. 2002, 47, strony 4035-4043.
166. **Compton, R.G., Banks, C.E.** *Understanding voltammetry*. Toh Tuck Link, Singapur: World Scientific Publishing Co., 2007.
167. **Lovric, M.** Square-wave voltammetry. w Scholz, F. (Ed.) *Electroanalytical methods. Guide to experiments and applications*. Berlin, Niemcy: Springer-Verlag, 2002, strony 111-136.
168. **Stojek, Z.** Experimental setup. w Scholz, F. (Ed.) *Electroanalytical methods. Guide to experiments and applications*. Berlin, Niemcy: Springer-Verlag, 2002, strony 301-305.
169. **Chen, S.** Practical electrochemical cells. w Zoski, C.G. (Ed.) *Handbook of electrochemistry*. Oxford, Wielka Brytania: Elsevier B.V., 2007, strony 33-56.

170. **Creager, S.** Solvents and supporting electrolytes. w Zoski, C.G. (Ed.) *Handbook of electrochemistry*. Oxford, Wielka Brytania: Elsevier B.V., 2007, strony 57-72.
171. **Komorsky-Lovric, S.** Working electrodes. w Scholz, F. (Ed.) *Electroanalytical methods. Guide to experiments and applications*. Berlin, Niemcy: Springer-Verlag, 2002, strony 245-260.
172. **Swain, G.M.** Solid electrode materials: Pretreatment and activation. w Zoski, C.G. (Ed.) *Handbook of electrochemistry*. Oxford, Wielka Brytania: Elsevier B.V., 2007, strony 111-153.
173. **Oliveira-Brett, A.M., Matysik, F.M.** Voltammetric and sonovoltammetric studies on the oxidation of thymine and cytosine at a glassy carbon electrode. *J Electroanal Chem.* 1997, 429, strony 95-99.
174. **Wang, H.Sh., Ju, H.X., Chen, H.Y.** Simultaneous determination of guanine and adenine in DNA using an electrochemically pretreated glassy carbon electrode. *Anal Chim Acta.* 2002, 461, strony 243-250.
175. **Pedano, M.L., Rivas, G.** Immobilization of DNA on glassy carbon electrodes for the development of affinity biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2003, 18, strony 269-277.
176. **Pedano, M.L., Rivas, G.A.** Immobilization of DNA at glassy carbon electrodes: A critical study of adsorbed layer. *Sensors.* 2005, 5, strony 424-447.
177. **Oliveira-Brett, A.M., Goulart, M.O.F., Abreu, F.C.** Reduction of lapachones and their reaction with L-cysteine and mercaptoethanol on glassy carbon electrodes. *Bioelectrochemistry.* 2002, 56, strony 53-55.
178. **Svancara, I., Vytras, K., Kalcher, K., Walcarius, A., Wang, J.** Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: A review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. *Electroanal.* 2009, 21, strony 7-28.
179. **Stempkowska, I., Ligaj, M., Jasnowska, J., Langer, J., Filipiak, M.** Electrochemical response of oligonucleotides on carbon paste electrode. *Bioelectrochemistry.* 2007, 70, strony 488-494.
180. **Korbut, O., Buckova, M., Tarapcik, P., Labuda, J., Grundler, P.** Damage to DNA indicated by an electrically heated DNA-modified carbon paste electrode. *J Electroanal Chem.* 2001, 506, strony 143-148.
181. **Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erdem, A., Kucukoglu, O., Erciyas, E., Ozsoz, M.** Electrochemical biosensor for the interaction of DNA with the alkylating agent 4,4 dihydroxy chalcone based on guanine and adenine sygnals. *J Pharmaceut Biomed.* 2002, 30, strony 1339-1346.
182. **Kizek, R., Masarik, M., Kramer, K.J., Protesil, D., Bailey, M., Howard, J.A., Klejdus, B., Mikelova, R., Adam, V., Trnkova, L., Jelen, F.** An analysis of avidin, biotin and their interaction at attomole levels by voltammetric and chromatographic techniques. *Anal Bioanal Chem.* 2005, 381, strony 1167-1178.
183. **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, strony 1103-1169.
184. **Chen, D., Li, J.** Interfacial design and functionization on metal electrodes through self-assembled monolayers. *Surf Sci Rep.* 2006, 61, strony 445-463.

185. **Smith, R.K., Lewis, P.A., Weiss, P.S.** Patterning self-assembled monolayers. *Prog Surf Sci.* 2004, 75, strony 1-68.
186. **Smith, T.J., Stevenson, K.J.** Reference electrodes. w Zoski, C.G. (Ed.) *Handbook of electrochemistry*. Oxford, Wielka Brytania: Elsevier B.V., 2007, strony 73-110.
187. **Edwards, G.A., Bergren, A.J., Porter, M.D.** Chemically modified electrodes. w Zoski, C.G. (Ed.) *Handbook of electrochemistry*. Oxford, Wielka Brytania: Elsevier B.V., 2007, strony 296-327.
188. **Schreiber, F.** Self-assembled monolayers: from 'simple' model systems to bio-functionalized interfaces. *J Phys Cond Matt.* 2004, 16, strony R881-R900.
189. **Akiba, U., Fujihira, M.** SAMs on Au and Ag electrodes. w Fujihira, M., Rubinstein, I., Rusling, J.F. (Ed.) *Encyclopedia of electrochemistry. Modified electrodes. Tom X.* Weinheim, Niemcy: Wiley Verlag GmbH & Co., 2007, strony 30-104.
190. **Arya, S.K., Solanki, P.R., Datta, M., Malhotra, B.D.** Recent advances in self-assembled mono-layers based biomolecular electronic devices. *Biosens Bioelectron.* 2009, 24, strony 2810-2817.
191. **BAS.** *Electrode polishing and care.* West Lafayette, USA: Bioanalytical Systems InC., 1998.
192. **Carvalho, R.F., Freire, R.S., Kubota, L.T.** Polycrystalline gold electrodes: A comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation. *Electroanal.* 2005, 17, strony 1251-1259.
193. **Hoogvliet, J.C., Dijkstra, M., Kamp, B., van Bennekom, W.P.** Electrochemical pretreatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible surface roughness for self-assembly: A study in phosphate buffer pH 7.4. *Anal Chem.* 2000, 72, strony 2016-2021.
194. **Trasatti, S., Petrii, O.A.** Real surface area measurements in electrochemistry. *Pure Appl Chem.* 1991, 63, strony 711-734.
195. **Zhang, S.** Emerging biological materials through molecular self-assembly. *Biotechnol Adv.* 2002, 20, strony 321-339.
196. **Choi, S., Murphy, W.L.** Multifunctional mixed SAMs that promote both cell adhesion and non-covalent DNA immobilization. *Langmuir.* 2008, 24, strony 6873-6880.
197. **Arya, S.K., Solanki, P.R., Singh, R.P., Kaneto, K., Pandey, M.K., Datta, M., Malhotra, B.D.** Poly-(3-hexylthiophene) self-assembled monolayer based cholesterol biosensor using surface plasmon resonance technique. *Biosens Bioelectron.* 2007, 22, strony 2516-2524.
198. **Herne, T.M., Tarlov, M.J.** Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces. *J Am Chem Soc.* 1997, 119, strony 8916-8920.
199. **Duwez, A.S.** Exploiting electron spectroscopies to probe the structure and organization of self-assembled monolayers. *J Electron Spectrosc.* 2004, 134, strony 97-138.
200. **Chiorcea, A.M., Oliveira-Brett, A.M.** Atomic force microscopy characterization of an electrochemical DNA biosensor. *Bioelectrochemistry.* 2004, 63, strony 229-232.
201. **Rudzinski, W.E., Francis, K.** Evaluating the surface density and heterogeneity of a dithiobis (succinimidylpropionate) self-assembled monolayer on gold and its coupling with DNA embedded within a matrix. *Appl Surf Sci.* 2010, 256, strony 5399-5405.

202. **Campuzano, S., Pedrero, M., Montemayor, C., E., Fatas, Pingarrou, J.M.** Characterization of alkanethiol-self-assembled monolayers-modified gold electrodes by electrochemical impedance spectroscopy. *J Electroanal Chem.* 2006, 586, strony 112-121.
203. **Tichoniuk, M., Ligaj, M., Filipiak, M.** Application of DNA hybridization biosensor as a screening method for the detection of genetically modified food components. *Sensors.* 2008, 8, strony 2118-2135.
204. **Peterson, A.W., Heaton, R.J., Georgiadis, R.M.** The effect of surface probe density on DNA hybridization. *Nucleic Acid Res.* 2001, 29, strony 5163-5168.
205. **Drummond, T.G., Hill, M.G., Barton, J.K.** Electron transfer rates in DNA films as a function of tether length. *J Am Chem Soc.* 2004, 126, strony 15010-15011.
206. **Henry, O.Y.F, Gutierrez Perez, J., Acero Sanchez, L.J., 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, strony 978-983.
207. **Levicky, R., Herne, T.M., Tarlov, M.J., Satija, S.K.** Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: A neutron reflectivity study. *J Am Chem Soc.* 1998, 120, strony 9787-9792.
208. **Peeters, S., Stakenborg, T., Reekmans, G., Laureyn, W., Lagae, L., van Aerschot, A., van Ranst, M.** Impact of spacers on the hybridization efficiency of mixed self-assembled DNA/alkanethiol films. *Biosens Bioelectron.* 2008, 24, strony 72-77.
209. **Jin, Y., Yao, X., Liu, Q., Li, J.** Hairpin DNA probe based electrochemical biosensor using methylene blue as hybridization indicator. *Biosens Bioelectron.* 2007, 22, strony 1126-1130.
210. **Pan, D., Zuo, X., Wan, Y., Wang, L., Zhang, J., Song, Sh., Fan, Ch.** Electrochemical interrogation of interactions between surface-confined DNA and methylene blue. *Sensors.* 2008, 7, strony 2671-2680.
211. **Steel, A., 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, strony 975-981.
212. **Okahata, Y., Kawase, M., Niikura, K., Ohtake, F., Furusawa, H., Ebara, Y.** Kinetic measurements of DNA hybridization on an oligonucleotide-immobilized 27-MHz quartz crystal microbalance. *Anal Chem.* 1998, 70, strony 1288-1296.
213. **Zhu, N., Zhang, A., Wang, Q., He, P., Fang, Y.** Electrochemical detection of DNA hybridization using methylene blue and electro-deposited zirconia thin films on gold electrodes. *Anal Chim Acta.* 2004, 510, strony 163-168.
214. **Meunier-Prest, R., Raveau, S., Finot, E., Legay, G., Cherkaoui-Malki, M., Latruffe, N.** Direct measurement of the melting temperature of supported DNA by electrochemical method. *Nucleic Acid Res.* 2003, 31, strony e150/1-8.
215. **Sun, X., He, P., Liu, Sh., Ye, J., Fang, Y.** Immobilization of single-stranded deoxyribonucleic acid on gold electrode with self-assembled aminoethanethiol monolayer for DNA electrochemical sensor applications. *Talanta.* 1998, 47, strony 487-495.
216. **Choi, Y.S., Lee, K.S., Park, D.H.** Gene detection using Hoechst 33258 on a biochip. *Curr Appl Phys.* 2006, 6, strony 777-780.

217. **Zhi, Z.L., Drazan, V., Wolfbeis, O.S., Mirsky, V.M.** Electrocatalytic activity of DNA on electrodes as an indication of hybridisation. *Bioelectrochemistry*. 2006, 68, strony 1-6.
218. **Lucarelli, F., Marrazza, G., Palchetti, I., Cesaretti, S., Mascini, M.** Coupling of an indicator-free electrochemical DNA biosensor with polymerase chain reaction for the detection of DNA sequences related to the apolipoprotein E. *Anal Chim Acta*. 2002, 469, strony 93-99.
219. **Kerman, K., Morita, Y., Takamura, Y., Tamiya, E.** Label-free electrochemical detection of DNA hybridization on gold electrode. *Electrochem Commun*. 2003, 5, strony 887-891.
220. **Wang, J.** Electrochemical DNA biosensors. w Brajter-Toth, A., Chambers, J.Q. (Ed.) *Electroanalytical methods for biological materials*. New York, USA: Marcel Dekker Inc., 2002, strony 27-42.
221. **Wong, E.L.S., Mearns, F.J., Gooding, J.J.** Further development of an electrochemical DNA hybridization biosensor based on long-range electron transfer. *Sensor Actuat B-Chem*. 2005, 111-112, strony 515-521.
222. **Popovich, N.D., Eckhardt, A.E., Mikulecky, J.C., Napier, M.E., Thomas, R.S.** Electrochemical sensor for detection of unmodified nucleic acids. *Talanta*. 2002, 56, strony 821-828.
223. **Gooding, J.J., Chou, A., Mearns, F.J., Wong, E., Jericho, K.L.** The ion gating effect: using a change in flexibility to allow label free electrochemical detection of DNA hybridisation. *Chem Commun*. 2003, 15, strony 1938-1939.
224. **Del Pozo, M.V., Alonso, C., Pariente, F., Lorenzo, E.** Electrochemical DNA sensing using osmium complexes as hybridization indicators. *Biosens Bioelectron*. 2005, 20, strony 1549-1558.
225. **Wang, J., Zhang, Sh., Zhang, Y.** Fabrication of chronocoulometric DNA sensor based on gold nanoparticles/poly(L-lysine) modified glassy carbon electrode. *Anal Biochem*. 2010, 396, strony 304-309.
226. **Palchaudhuri, R., Hergenrother, P.J.** DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Curr Opin Biotech*. 2007, 18, strony 497-503.
227. **Kobayashi, M., Kusakawa, T., Saito, M., Kaji, S., Oomura, M., Iwabuchi, Sh., Morita, Y., Hasan, Q., Tamiya, E.** Electrochemical DNA quantification based on aggregation induced by Hoechst 33258. *Electrochem Commun*. 2004, 6, strony 337-343.
228. **Lee, J.G., Yun, K., Lim, G.S., Lee, S.E., Kim, S., Park, J.K.** DNA biosensor based on the electrochemiluminescence of $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ with DNA-binding intercalators. *Bioelectrochemistry*. 2007, 70, strony 228-234.
229. **Liu, S., Ye, J., He, P., Fang, Y.** Voltammetric determination of sequence specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode. *Anal Chim Acta*. 1997, 335, strony 239-243.
230. **Kertesz, V., Whittemore, N.A., Inamati, G.B., Manoharan, M., Cook, P.D., Baker, D.C., Chambers, J.Q.** Electrochemical detection of surface hybridization of oligodeoxynucleotides bearing anthraquinone tags at gold electrodes. *Electroanal*. 2000, 12, strony 889-894.
231. **Wong, E.L.S., Erohkin, P., Gooding, J.J.** A comparison of cationic and anionic intercalators for the electrochemical transduction of DNA hybridization via long range electron transfer. *Electrochem Commun*. 2004, 6, strony 648-654.

232. **Yang, W., Ozsoz, M., Hibbert, D.B., Gooding, J.J.** Evidence for the direct interaction between methylene blue and guanine bases using DNA-modified carbon paste electrodes. *Electroanal.* 2002, 14, strony 1299 - 1302.
233. **Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Meric, B., Gooding, J.J., Ozsoz, M.** Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes. *Anal Chim Acta.* 2002, 462, strony 39-47.
234. **Sufen, W., Tuzhi, P., Yang, C.F.** Electrochemical studies for the interaction of DNA with an irreversible redox compound - Hoechst 33258. *Electroanal.* 2002, 14, strony 1648-1653.
235. **Fojta, M., Havran, L., Kizek, R., Billova, S.** Voltammetric microanalysis of DNA adducts with osmium tetroxide, 2,2'-bipyridine using a pyrolytic graphite electrode. *Talanta.* 2002, 56, strony 867-874.
236. **Fojta, M., Havran, L., Billova, S., Kostecka, P., Masarik, M., Kizek, R.** Two-surface strategy in electrochemical DNA hybridization assays: Detection of osmium-labeled target DNA at carbon electrodes. *Electroanal.* 2003, 15, strony 431-440.
237. **Cai, H., Wang, Y., He, P., Fang, Y.** Electrochemical detection of DNA hybridization based on silver-enhanced gold nanoparticle label. *Anal Chim Acta.* 2002, 469, strony 165-172.
238. **Lucarelli, F., Marrazza, G., Turner, A.P.F., Mascini, M.** Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. *Biosens Bioelectron.* 2004, 19, strony 515-530.
239. **Xu, Ch., Cai, H., He, P., Fang, Y.** Electrochemical detection of sequence-specific DNA using a DNA probe labeled with aminoferrocene and chitosan modified electrode immobilized with ssDNA. *Analyst.* 2001, 126, strony 62-65.
240. **Beilstein, A.E., Grinstaff, M.W.** Synthesis and characterization of ferrocene-labeled oligodeoxynucleotides. *J Organomet Chem.* 2001, 637-639, strony 398-406.
241. **Nakayama, M., Ihara, T., Nakano, K., Maedo, M.** DNA sensors using a ferrocene-oligonucleotide conjugate. *Talanta.* 2002, 56, strony 857-866.
242. **Chahma, M., Lee, J.S., Kraatz, H.B.** Fc-ssDNA conjugate: electrochemical properties in a borate buffer and adsorption on gold electrode surfaces. *J Electroanal Chem.* 2004, 567, strony 283-287.
243. **Campbell, C.N., Gal, D., Cristler, N., Banditrat, C., Heller, A.** Enzyme-amplified amperometric sandwich test for RNA and DNA. *Anal Chem.* 2002, 74, strony 158-162.
244. **Miller, J.N., Miller, J.C.** *Statistics and chemometrics for analytical chemistry.* Essex, Wielka Brytania: Pearson Education Limited, 2005.
245. **PN-ISO 5725-1:2002.** Dokładność (poprawność i precyzja) metod pomiarowych i wyników pomiarów - Część 1: Ogólne zasady i definicje.
246. **Wong, E.L.S., Gooding, J.J.** Charge transfer through DNA: A selective electrochemical DNA biosensor. *Anal Chem.* 2006, 78, strony 2138-2144.
247. **NCBI.** National Center for Biotechnology Information. *NCBI.* [Online] sierpień 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

248. **GenBank.** GenBank. *NCBI*. [Online] sierpień 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
249. **BLAST.** Basic Local Alignment Search Tool. *NCBI*. [Online] sierpień 2008. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
250. **Sigma-Genosys.** DNA calculator. *Sigma-Genosys*. [Online] sierpień 2008. <http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp>.
251. **BioWeb.** GenWeb. *BioWeb*. [Online] sierpień 2008. http://bioweb.uwlax.edu/genweb/molecular/seq_anal/primer_design/primer_design.htm.
252. **Ligaj, M.** Kwasy nukleinowe. w Filipiak, M. (ed.) *Podstawy biochemii dla towaroznawców*. Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, 2009, strony 115-140.
253. **Ligaj, M., Gwiazdowska, D., Tichoniuk, M., Sacharowski, S., Filipiak, M.** Detection and identification of *Aeromonas hydrophila* by DNA biosensor coupled with a multiplex polymerase chain reaction. *The 61st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Electrochemistry from Biology to Physics, 26.09-01.10.2010*. 2010, strony s03-P-025.
254. **Arami, H., Mazloumi, M., Khalifehzadeh, R., Emami, S.H., Sadrnezhaad, S.K.** Polypyrrole/multiwall carbon nanotube nanocomposites electropolymerized on copper substrate. *Mater Lett*. 2007, 61, strony 4412-4415.
255. **Yau, H.C.M., Chan, H.L., Yang, M.** Electrochemical properties of DNA-intercalating doxorubicin and methylene blue on n-hexadecyl mercaptan-doped 5-thiol-labeled DNA-modified gold electrodes. *Biosens Bioelectron*. 2003, 18, strony 873-879.
256. **Ding, S.J., Chang, B.W., Wu, Ch.Ch., Lai, M.F., Chang, H.Ch.** Impedance spectral studies of self-assembly of alkanethiols with different chain lengths using different immobilization strategies on Au electrodes. *Anal Chim Acta*. 2005, 554, strony 43-51.
257. **Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Gooding, J.J., Nielsen, P.E., Ozsoz, M.** Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes. *Electrochem Commun*. 2002, 4, strony 796-802.
258. **Lin, X.H., Wu, P., Chen, W., Zhang, Y.F., Xia, X.H.** Electrochemical DNA biosensor for the detection of short DNA species of chronic myelogenous leukemia by using methylene blue. *Talanta*. 2007, 72, strony 468-471.
259. **Wang, J., Ozsoz, M., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Grant, D.H., Chicharro, M., Fernandes, J., Palecek, E.** Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface. *Bioelectroch Bioener*. 1998, 45, strony 33-40.
260. **Ju, H., Xiao, Y., Lu, X., Chen, H.** Electrooxidative coupling of a toluidine blue O terminated self-assembled monolayer studied by electrochemistry and surface enhanced Raman spectroscopy. *J Electroanal Chem*. 2002, 518, strony 123-130.
261. **Sabatani, E., Rubinstein, I.** Organized self-assembling monolayers on electrodes. 2. Monolayer-based ultramicroelectrodes for the study of very rapid electrode kinetics. *J Phys Chem*. 1987, 91, strony 6663-6669.
262. **Felgenhauer, T., Rong, H.T., Buck, M.** Electrochemical and exchange studies of self-assembled monolayers of biphenyl based thiols on gold. *J Electroanal Chem*. 2003, 550-551, strony 309-319.

263. **Kelley, S.O., Boon, E.M., Barton, J.K., Jackson, N.M., Hill, M.G.** Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA. *Nucleic Acid Res.* 1999, 27, strony 4830-4837.
264. **Wong, E.L.S., Gooding, J.J.** Electronic detection of target nucleic acids by a 2,6-disulfonic acid anthraquinone intercalator. *Anal Chem.* 2003, 75, strony 3845-3852.

Spis ilustracji

Rysunek 1. Dane NIZP-PZH przedstawiające ilość zatruc pokarmowych wywołanych skażeniem bakteryjnym żywności w Polsce w latach 2004-2010.....	7
Rysunek 2. Ilość przypadków zagrożenia bezpieczeństwa żywności odnotowanych w systemie RASFF w latach 2000-2009.....	8
Rysunek 3. Struktura powiadomień alarmowych odnotowanych w systemie RASFF w 2009 roku uporządkowana pod względem rodzaju zidentyfikowanego zagrożenia (A); podział powiadomień dotyczących potencjalnie patogennych mikroorganizmów na poszczególne grupy produktów, których dotyczyły (B).....	9
Rysunek 4. Rodzaje bakteriologicznych zagrożeń (potencjalne patogeny bez <i>Salmonella</i> spp.) zgłoszonych odnotowane w systemie RASFF w 2009 roku.	13
Rysunek 5. Schemat konstrukcji biosensora.....	22
Rysunek 6. Liczba publikacji dotyczących biosensorów w bazie ScienceDirect w okresie ostatnich 20 lat.....	25
Rysunek 7. Miejsce biosensora w układach biodetekcji.	27
Rysunek 8. Schemat budowy kwasu deoksyrybonukleinowego (A), struktura dwuniciowego DNA (B), sekwencja jedno-niciowego fragmentu DNA (C).	28
Rysunek 9. Schemat elektrochemicznego biosensora do wykrywania hybrydyzacji DNA.	32
Rysunek 10. Zależność przykładanego potencjału (A), obserwowanego natężenia prądu (B) oraz ładunku (C) od czasu w pomiarach chronoamperometrycznych (CA)/chronokulometrycznych (CC).	39
Rysunek 11. Zależność ładunku względem czasu (A) oraz ładunku względem wartości pierwiastka kwadratowego z czasu (B) w pomiarach chronokulometrycznych elektroaktywnych cząsteczek (zarówno tych zaadsorbowanych na elektrodzie, jak i znajdujących się w roztworze).	42
Rysunek 12. Pomiar chronokulometryczny (CC) redukcji cząsteczek chlorku heksaaminorutenu (III) zaadsorbowanych na elektrodzie złotej w 0.75 mM roztworze RuHex w 10 mM buforze TRIS-HCl (pH=7.4). Wyznaczanie wartości Q_{total} dla $t=0$	43
Rysunek 13. Zależność przykładanego potencjału od czasu trwania pomiaru (A) oraz uzyskana krzywa woltamperometryczna (B) w pomiarze techniką woltamperometrii cyklicznej.	44
Rysunek 14. Wykres zmian potencjału przykładanego do elektrody pracującej przy pomiarach SWV w odniesieniu do czasu (A); krzywa woltamperometryczna SWV dla roztworu zawierającego badaną substancję elektroaktywną (B).....	46
Rysunek 15. Schemat trójelektrodowego układu pomiarowego wykorzystywanego w pomiarach woltamperometrycznych.....	48
Rysunek 16. Schemat budowy samoorganizującej się monowarstwy utworzonej z funkcyjnych alkanotioli na powierzchni złota.	56
Rysunek 17. Zestawienie pomiarów chronokulometrycznych (CC) pozwalających wyznaczyć ładunek reakcji redoks RuHex zakumulowanego przez DNA na powierzchni elektrody złotej.	79
Rysunek 18. Niepożądane struktury fragmentów DNA.	83
Rysunek 19. Schemat modyfikacji sondy ssDNA.	84

Rysunek 20.	Rozdział elektroforetyczny produktów PCR. Tory A-H przedstawiają produkty PCR amplifikacji fragmentu genu aerolizyny; tor Ww – wzorec wielkości DNA.....	88
Rysunek 21.	Wykres BLAST pokrycia wyjściowej sekwencji genu aerolizyny przez inne doniesienia dla <i>A. hydrophila</i>	89
Rysunek 22.	Krzywa woltamperometryczna (CV) z zaznaczonym pikiem redukcji tlenków złota uzyskana dla wyczyszczonej elektrody złotej w 50 mM buforze fosforanowym z dodatkiem 5 mM KCl.....	93
Rysunek 23.	Krzywe woltamperometryczne (SWV) otrzymane dla wyczyszczonych elektrod złotych zanurzonych w 50 mM buforze fosforanowym z dodatkiem 5 mM KCl (pH 7.6) (A) i w 10 mM buforze TRIS-HCl (pH 7.4) (B).....	95
Rysunek 24.	Krzywe woltamperometryczne (SWV) otrzymane dla wyczyszczonych elektrod złotych przed i po wprowadzeniu 10 mM MB (A), 5 mM AQDS (B), 10 mM DM (C), 10 mM DAPI (D), 0.5 mM Hoechst 33258 (E) do 50 mM buforu fosforanowego z dodatkiem 5 mM KCl (pH 7.6).	98
Rysunek 25.	Stężenia oczyszczanych sond ssDNA [μM] i roztworu DTT [mM] w poszczególnych frakcjach eluatu otrzymanych podczas rozdziału na kolumnach PD 10.	100
Rysunek 26.	Krzywe woltamperometryczne (CV) uzyskane dla czystej elektrody AuE w 0.1 M roztworze KCl z i bez dodatku wskaźnika redoks 1mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$	102
Rysunek 27.	Krzywe woltamperometryczne (CV) uzyskane w 0.1 M roztworze KCl z dodatkiem 1mM wskaźnika $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dla czystych elektrod AuE i zmodyfikowanych monowarstwami merkaptalkoholi: MCE, MCH lub MCN	104
Rysunek 28.	Krzywe woltamperometryczne (CV) uzyskane przy pomiarze pojemności elektrycznej interfejsy między elektrodą pracującą – czystą elektrodą złotą lub elektrodą zmodyfikowaną warstwą MCH – a roztworem elektrolitu (1 M KCl).	106
Rysunek 29.	Krzywe woltamperometryczne (CV) uzyskane przy pomiarze pojemności elektrycznej interfejsy między elektrodą pracującą – czystą elektrodą złotą lub elektrodą zmodyfikowaną warstwą MCH – a roztworem elektrolitu (1 M KH_2PO_4).	107
Rysunek 30.	Krzywe woltamperometryczne (CV) otrzymane przy wyznaczaniu pojemności elektrycznej dla: czystej elektrody złotej (AuE) i elektrody zmodyfikowanej ssDNA (ssDNA/AuE) (A); elektrod zmodyfikowanych merkaptetanolem (MCE/AuE), merkaptohexanolem (MCH/AuE) i merkptononanolem (MCN/AuE) – czas unieruchamiania 30 minut (B); elektrod zmodyfikowanych samą sondą ssDNA (ssDNA/AuE) i w połączeniu z wybranym merkaptalkoholem (ssDNA/MCE/AuE, ssDNA/MCH/AuE lub ssDNA/MCH/AuE) (C); czystej elektrody złotej (AuE), zmodyfikowanej sondą (ssDNA/AuE) oraz mieszaną monowarstwą sondy i merkaptohexanolu (ssDNA/MCH/AuE) (D).	110
Rysunek 31.	Krzywa woltamperometryczna (CV) uzyskana dla 10mM roztworu RuHex w 10 mM buforze TRIS-HCl (pH 7.4).....	112
Rysunek 32.	Wartości absorbancji przy długości fali 277 nm zmierzone dla roztworów RuHex wykorzystanych w pomiarach CC z zaznaczoną krzywą regresji liniowej	113
Rysunek 33.	Ładunek wskaźnika RuHex zakumulowanego na elektrodzie zmodyfikowanej warstwą ssDNA – pomiar CC przy rosnących wartościach stężenia RuHex w roztworze.	115
Rysunek 34.	Ładunek wskaźnika RuHex zakumulowanego na elektrodzie zmodyfikowanej ssDNA i MCE – pomiar CC przy różnych stężeniach RuHex w roztworze.	117
Rysunek 35.	Ładunek wskaźnika RuHex zakumulowanego na elektrodzie zmodyfikowanej ssDNA i MCH – pomiar CC przy różnych stężeniach RuHex w roztworze.	117

Rysunek 36. Ładunek wskaźnika RuHex zakumulowanego na elektrodzie zmodyfikowanej ssDNA i MCN – pomiar CC przy różnych stężeniach RuHex w roztworze.	118
Rysunek 37. Ładunek wskaźnika RuHex zakumulowanego na elektrodzie zmodyfikowanej ssDNA i MCH (pomiar CC przy różnych stężeniach RuHex w roztworze) przed i po hybrydyzacji z tDNA.....	122
Rysunek 38. Krzywe woltamperometryczne (SWV) reakcji wskaźnika MB zakumulowanego na elektrodzie złotej zmodyfikowanej monowarstwą ssDNA/MCH przed i po oddziaływaniu z 10 μ M tDNA przez 15 minut.	123
Rysunek 39. Krzywe woltamperometryczne (SWV) reakcji wskaźnika MB zakumulowanego na elektrodzie złotej zmodyfikowanej monowarstwą ssDNA/MCH przed i po oddziaływaniu z 1 μ M, 5 μ M i 10 μ M tDNA.	128
Rysunek 40. Spadek wysokości sygnału wskaźnika MB przy wzroście stężenia tDNA w mieszaninie reakcyjnej.	129
Rysunek 41. Krzywe woltamperometryczne (SWV) reakcji wskaźnika Hoechst 33258 zakumulowanego na elektrodzie złotej zmodyfikowanej monowarstwą ssDNA/MCH przed i po oddziaływaniu z 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 7.5 μ M, 10 μ M i 15 μ M tDNA.	131
Rysunek 42. Zależność natężenia prądu w reakcji wskaźnika Hoechst 33258 zakumulowanego na elektrodzie po reakcji hybrydyzacji od stężenia tDNA w mieszaninie reakcyjnej.	131
Rysunek 43. Krzywe woltamperometryczne (SWV) reakcji wskaźnika MB zakumulowanego na elektrodzie złotej zmodyfikowanej monowarstwą ssDNA/MCH przed i po oddziaływaniu z 10 μ M tDNA lub ntDNA.	134
Rysunek 44. Krzywe woltamperometryczne (SWV) reakcji wskaźnika Hoechst 33258 zakumulowanego na elektrodzie złotej zmodyfikowanej monowarstwą ssDNA/MCH przed i po oddziaływaniu z 10 μ M tDNA lub ntDNA.	135
Rysunek 45. Krzywe woltamperometryczne (SWV) reakcji wskaźnika MB zakumulowanego na elektrodzie złotej zmodyfikowanej monowarstwą ssDNA/MCH przed i po oddziaływaniu z DNA wyizolowanym z próbek zawierających <i>A. hydrophila</i> (poddanym reakcji PCR) i <i>Propionibacterium</i> spp.	138
Rysunek 46. Krzywe woltamperometryczne (SWV) reakcji wskaźnika Hoechst 33258 zakumulowanego na elektrodzie złotej zmodyfikowanej monowarstwą ssDNA/MCH przed i po oddziaływaniu z DNA wyizolowanym z próbek zawierających <i>A. hydrophila</i> poddanym reakcji PCR, nieamplifikowanym lub wyizolowanym z próbek zaszczipionych <i>Propionibacterium</i> spp.	140
Rysunek 47. Główne etapy zrealizowanych badań.	143
Rysunek 48. Schemat przygotowania i działania opracowanego biosensora DNA.	147

Spis tabel

Tabela 1. Techniki detekcji hybrydyzacji wykorzystywane w elektrochemicznych biosensorach hybrydyzacji DNA wg IUPAC.....	62
Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR użytej do amplifikacji fragmentu genu <i>A. hydrophila</i>	87
Tabela 3. Warunki reakcji PCR wykorzystanej do amplifikacji fragmentu genu <i>A. hydrophila</i>	87
Tabela 4. Wartości elektrochemicznego pola powierzchni i współczynnika szorstkości dla elektrod nieczyszczonych oraz poddanych ocenianym procedurom czyszczenia.....	94
Tabela 5. Efekt blokowania elektrochemicznego reakcji redoks wskaźnika $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (roztwór 1 mM w 0.1 M KCl) uzyskany na elektrodzie złotej zmodyfikowanej merkaptoalkoholem – MCE, MCH lub MCN.	103
Tabela 6. Pojemności elektryczne dla czystej elektrody złotej i elektrod zmodyfikowanych SAM.....	108
Tabela 7. Ładunek redukcji wskaźnika RuHex zaadsorbowanego na powierzchni elektrody złotej zmodyfikowanej warstwą sondy ssDNA, otrzymany w pomiarze CC przy rosnącym stężeniu RuHex.....	114
Tabela 8. Ładunek redukcji wskaźnika RuHex zaadsorbowanego na powierzchni elektrody złotej zmodyfikowanej warstwą sondy ssDNA i jednego z merkaptoalkoholi: MCE, MCH lub MCN, otrzymany w pomiarze CC przy rosnącym stężeniu RuHex.	116
Tabela 9. Ładunek redukcji wskaźnika RuHex zaadsorbowanego na powierzchni elektrody złotej zmodyfikowanej warstwą sond ssDNA i MCH, przed i po hybrydyzacji z 10 μM tDNA, uzyskany w pomiarze CC przy rosnącym stężeniu RuHex.....	121
Tabela 10. Ładunek redukcji wskaźnika RuHex, jego ilość oraz stężenie powierzchniowe DNA zaadsorbowanego na powierzchni elektrody złotej zmodyfikowanej warstwą sondy ssDNA i MCH, przed i po oddziaływaniu z tDNA przez czas 5, 15, 30 i 60 minut, uzyskany w pomiarze CC przy rosnącym stężeniu RuHex.	124
Tabela 11. Natężenia prądu w pomiarach SWV wskaźnika MB zakumulowanego na elektrodach złotych zmodyfikowanych monowarstwą ssDNA/MCH oraz po oddziaływaniu z tDNA przez czas 5, 15, 30 i 60 minut	125
Tabela 12. Ładunek redukcji wskaźnika RuHex, jego ilość oraz stężenie powierzchniowe DNA zaadsorbowanego na powierzchni elektrody złotej zmodyfikowanej warstwą sondy ssDNA i MCH, przed oraz po oddziaływaniu z 5 i 10 μM tDNA, uzyskany w pomiarze CC przy rosnącym stężeniu RuHex.	126
Tabela 13. Natężenie prądu w pomiarach SWV wskaźnika MB zakumulowanego na elektrodach złotych zmodyfikowanych monowarstwą ssDNA/MCH przed oraz po oddziaływaniu z 1, 5 i 10 μM tDNA.....	127
Tabela 14. Natężenie prądu w pomiarach SWV wskaźnika Hoechst 33258 zakumulowanego na elektrodach złotych zmodyfikowanych monowarstwą ssDNA/MCH przed oraz po oddziaływaniu z 1 μM , 3 μM , 5 μM , 7.5 μM , 10 μM oraz 15 μM tDNA.....	130
Tabela 15. Ładunek redukcji wskaźnika RuHex, jego ilość oraz stężenie powierzchniowe DNA zaadsorbowanych na powierzchni elektrody złotej zmodyfikowanej warstwą sondy ssDNA i MCH, przed oraz po oddziaływaniu z 10 μM tDNA lub ntDNA, uzyskany w pomiarze CC przy rosnącym stężeniu RuHex.	133

Tabela 16. Sygnał MB otrzymany w pomiarach woltemperometrycznych (SWV) dla DNA wyizolowanego z próbek zaszczipionych <i>A. hydrophila</i> i <i>Propionibacterium</i> spp.	137
Tabela 17. Sygnał Hoechst 33258 otrzymany w pomiarach woltamperometrycznych (SWV) dla DNA wyizolowanego z próbek zawierających <i>A. hydrophila</i> oraz <i>Propionibacterium</i>	139