

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

JUSTINA GINEITYTĖ

Biofizikos studijų programa, valstybinis kodas 6211DX009

Magistro baigiamasis darbas

**ELEKTROKATALIZINIS DNR HIBRIDIZACIJOS SIGNALO
STIPRINIMAS**

Darbo vadovas Dr. Dalius Ratautas

Vilnius, 2023

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1. Nukleorūgščių hibridizacijos matavimas, jo svarba ir šiuolaikiniai matavimo metodai	7
1.2. Elektrocheminiai metodai heterogeninei nukleorūgščių hibridizacijai matuoti realiu laiku ..	11
1.3. Elektrocheminės sistemos, skirtos nukleorūgščių hibridizacijos matavimui, kūrimas	13
1.3.1. Gaudymo zondo imobilizavimas	14
1.3.2. Laisvo elektrodo paviršiaus blokavimas	16
1.3.3. Metileno mėlis kaip DNR žymuo	18
1.4. Signalų stiprinimas	18
2. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI	22
2.1. Įranga	22
2.2. Medžiagos ir reagentai	22
2.3. Elektrodo paruošimas	23
2.4. Metodai	24
2.4.1. Metileno mėlio redukcijos matavimas spektrofotometru	24
2.4.2. Elektrocheminiai metodai	24
2.4.3. Statistiniai metodai	27
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	28
3.1. Elektrodo paviršiaus paruošimas DNR hibridizacijos matavimams	28
3.2. Tinkamo metileno mėlio reduktoriaus paieška	34
3.3. Metileno mėlio elektrocheminio signalo stiprinimas askorbo rūgštimi	36
3.4. Metileno mėliu žymėtos DNR hibridizacijos signalo didinimas askorbo rūgštimi	40
3.5. Metileno mėlio lokalizacijos įtaka signalui	44
IŠVADOS	49
SANTRAUKA	50
SANTRAUKA ANGLŲ KALBA	51

AUTORIAUS PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS, DALYVAVIMAS MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE	52
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	53
PADĖKA.....	59
PRIEDAI.....	60
1 priedas. Gaudymo zondo oligonukleotidų galimos antrinės struktūros.	60

SANTRUMPOS

CA	Chronoamperometrija
CV	Ciklinė voltamperometrija
dgDNR	Dvigrandė DNR
DZT	Darbinis zondo tirpalas (sudėtis pateikiama 2.2 skyriuje)
FBT	Fosfatinis buferinis tirpalas, sudarytas iš nurodytos koncentracijos Na_2HPO_4 ir NaH_2PO_4 druskų.
HBT	Hibridizacijos buferinis tirpalas (sudėtis pateikta 2.2 skyriuje)
HBT/AA	Hibridizacijos buferinis tirpalas su 30 mM askorbo rūgšties (sudėtis pateikta 2.2 skyriuje)
MB	Metileno mėlis (bet kuri forma) (angl. <i>methylene blue</i>)
MB _{ox}	Oksiduota metileno mėlio forma
MB _{red}	Redukuota metileno mėlio forma
QCM	Kvarco kristalo mikrobaltas (angl. <i>quartz crystal microbalance</i>)
Redokso	Oksidacijos-redukcijos
Σ	Standartinis nuokrypis
SPR	Paviršiaus plazmonų rezonansas (angl. <i>surface plasmon resonance</i>)
TCEP	Tris(2-karboksietil)fosfino hidrokloridas
tMB	MB žymėto taikinio oligonukleotidas (nespecifikuojant oligonukleotido sekos)
UBT	Universalus buferinis tirpalas (sudėtis pateikta 2.2 skyriuje)
UBT/AA	Universalus buferinis tirpalas su 20 mM askorbo rūgšties (sudėtis pateikta 2.2 skyriuje)
vgDNR	Viengrandė DNR
Z	Gaudymo zondo oligonukleotidas (nespecifikuojant oligonukleotido sekos)
ztMB	Gaudymo zondo ir MB žymėto taikinio hibridas (nespecifikuojant oligonukleotidų sekų)
ztMB _{max}	Maksimalus kiekis gaudymo zondo ir MB žymėto taikinio hibrido, galintis būti ant elektrodo paviršiaus (nespecifikuojant oligonukleotidų sekų)
ztMB _t	Gaudymo zondo ir MB žymėto taikinio hibridas laiko momentu t (nespecifikuojant oligonukleotidų sekų)

ĮVADAS

DNR hibridizacijos aptikimo jutikliai yra vertinami dėl savo specifiškumo ir jautrumo, jie plačiai taikomi biotechnologijoje ir klinikinėje diagnostikoje. Nors buvo sukurta daug biojutiklių, skirtų hibridizacijos įvykiui nustatyti užrašant galutinio taško (angl. *end-point*) rezultatą ir daugiausia dėmesio skiriant aptikimo ribų gerinimui, taip pat yra įdomu stebėti nukleorūgščių surišimo kinetiką kiekybiškai realiu laiku. Hibridizacijos stebėjimas realiu laiku gali suteikti pranašumą prieš galutinio taško matavimus, ypač tais atvejais, kai tikslumas ir greitis yra svarbūs, pavyzdžiui, atliekant diagnostinius tyrimus ir kuriant vaistus. Stebėjimas realiuoju laiku leidžia tiksliau įvertinti hibridizacijos kinetiką, todėl pagerėja tyrimo jautrumas ir specifiškumas ir sutrumpėja laikas nuo mėginio pateikimo iki tyrimo atsakymo, palyginti su galutinio taško matavimais. Bioanalizinės chemijos srityje siekiama sukurti realiu laiku veikiančius hibridizacijos stebėjimo įrenginius, kurie būtų paprasti, daugkartinio naudojimo ir pigūs.

Iki šiol realaus laiko hibridizacijos signalų nuskaitymo metodai daugiausia pagrįsti optiniais (pvz. SPR, fluorescencija) arba akustiniais (QCM) metodais, o visai neseniai buvo pristatyti daug žadantys lauko efekto tranzistorių jutikliai. Tačiau šie metodai dažnai reikalauja didelės sudėtingos įrangos, taip pat sudėtingų ir brangių biojutiklių gamybos procedūrų. Elektrocheminiai DNR hibridizacijos signalo nuskaitymo metodai yra žinomi dėl jutiklio paruošimo paprastumo, suderinamumo su mikrogamybos technologijomis, taip pat dėl galimybės pagaminti nešiojamą prietaisą, mažos kainos ir patikimo neskaidrių mėginių nuskaitymo. Vis dėlto dabartiniai elektrocheminiai hibridizacijos stebėjimo metodai turi ribotą jautrumą, laiko skiriamąją gebą ir atkartojamumą. Realaus laiko hibridizacijos signalo nuskaitymas paprastai reikalauja tam tikro signalo stiprinimo, nes nedidelio skaičiaus oligonukleotidų susirišimo įvykį, net jei jie yra pažymėti, dažnai sunku aptikti. Dabartinės signalo stiprinimo strategijos daugiausia pasitelkia fermentinius arba nanodalelėmis paremtus signalo stiprinimo metodus, kurie turi tokių trūkumų kaip didelė kaina ir mažas stabilumas. Todėl reikia paprasto ir veiksmingo įrankio, kuris galėtų elektrochemiškai stebėti heterogeninę DNR hibridizaciją realiu laiku su gera laiko skiriamąją geba, o tai galima pasiekti naudojant cheminę katalizę.

Šiame magistro baigiamojo darbo tyrime pagrindinis dėmesys buvo skiriamas elektrocheminio metodo, skirto heterogeninės DNR hibridizacijos signalo nuskaitymui realiu laiku, vystymui. **Darbo tikslas** buvo sukurti veiksmingą elektrocheminį metodą, skirtą stebėti chemiškai padidintą oligonukleotidų hibridizacijos signalą realiu laiku.

Uždaviniai:

1. Pademonstruoti veiksmingą elektrocheminio žymens, prijungto prie viengrandės DNR (vgDNR), signalo stiprinimą cheminiu būdu.

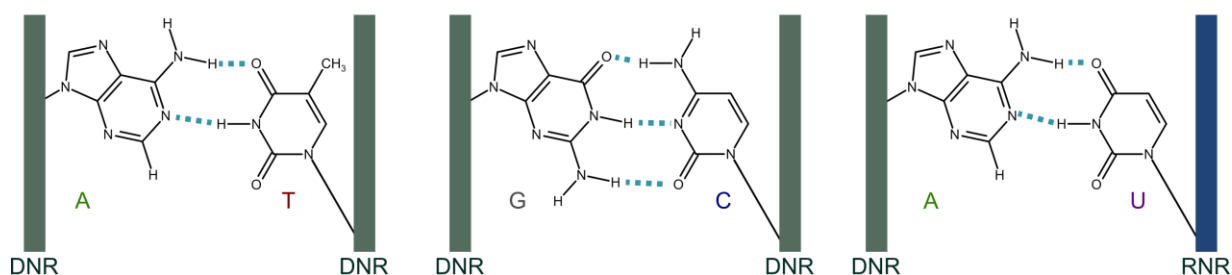
2. Įvertinti gautos elektrokatalizinės sistemos tinkamumą matuoti DNR heterogeninę hibridizaciją realiu laiku ir iš matavimų duomenų apskaičiuoti hibridizacijos parametrus.

3. Nustatyti, ar pademonstruota elektrokatalizinė sistema yra tinkama dviejų identiškų sekų vgDNR oligonukleotidų, kurių elektrocheminis žymuo prijungtas skirtinguose galuose, diferencijavimui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Nukleorūgščių hibridizacijos matavimas, jo svarba ir šiuolaikiniai matavimo metodai

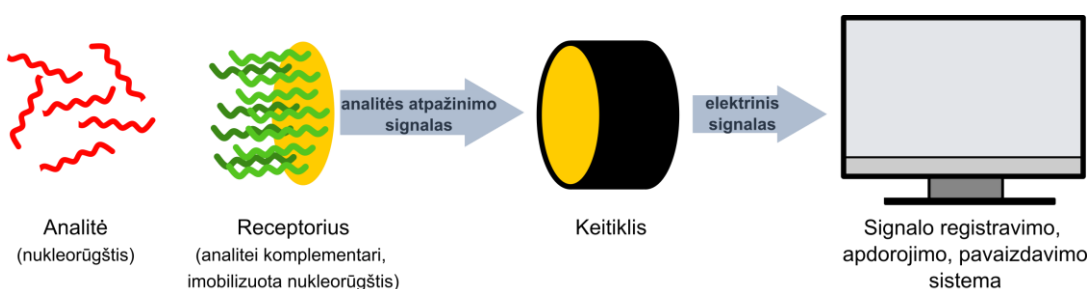
Nukleorūgštys DNR ir RNR yra organizmo genetinės informacijos saugojimo ir perdavimo molekulės, todėl jų detekcija gali suteikti informacijos apie tam tikro organizmo buvimą mėginyje arba apie genomo ar metabolizmo pakitimus, lemiančius fenotipo pokyčius ar patologiją (Ferapontova, 2018; Trotter *et al.*, 2020; Thapa, Liu and Wang, 2022). Nukleorūgščių detekcija yra pagrįsta jų nukleotidų sekos atpažinimu pasitelkiant komplementarumo principą (Kuriyan, Konforti and Wemmer, 2012). Komplementarumą nukleorūgštims suteikia jas sudarančiuose monomeruose – nukleotiduose – esančios penkios skirtingos azotinės bazės, kurių poros yra tarpusavyje komplementarios: adeninas (A) yra komplementarus timinui (T) (tik DNR) ir uracilui (U) (tik RNR), o guaninas (G) – citozinui (C). Komplementarios bazės tarpusavyje jungiasi vandeniliniiais ryšiais (1.1. pav.). Dviejų viengrandžių nukleorūgščių gijų susiliejimas į dvigrandę spiralę per Watson-Crick bazių sąveiką yra vadinamas hibridizacija. Šio proceso detekcija yra naudojama norint aptikti žinomos sekos nukleorūgšties buvimą mėginyje.



1.1. pav. Watson-Crick bazių poros: A-T, G-C ir A-U. Storos vertikalios linijos žymi pentozės-fosfato karkasus: žalia – DNR, mėlyna – RNR. Vandeniliniai ryšiai pažymėti mėlynomis brūkšninėmis linijomis. Parengta pagal (Kuriyan, Konforti and Wemmer, 2012)

Hibridizacijos detekciją galima vykdyti homogeniškai – kai abi DNR gijos laisvai juda tirpale – arba heterogeniškai – kai viena iš gijų yra imobilizuota ant paviršiaus. Homogeninė hibridizacija šiame darbe plačiau aptariama nebus. Biojutiklinės sistemos yra sudarytos iš specifiskumu analizei pasižyminčio receptoriaus, signalo keitiklio, kuris receptoriaus – analizės atpažinimo įvyki paverčia nuskaitomu signalu, ir elektroninės sistemos, skirtos tam signalui registruoti, stiprinti, apdoroti ir pavaizduoti (1.2 pav.) (Gooding, 2002). Heterogeninės hibridizacijos jutikliams reikalinga ant paviršiaus pritvirtinti vgdNR molekulę, vadinamą gaudymo zonu (angl. *capture probe*), kuri būtų komplementari dominančiai oligonukleotido sekai. Heterogeninė hibridizacija ir jos vyksmo nuskaitymas siekia Southern bloto pademonstravimo laikus (Southern, 1975), ir vėliau tapo populiariu molekulinės biologijos įrankiu: heterogenine hibridizacija pagrįsta DNR mikrogardelių technologija buvo panaudota nuskaityti žmogaus genomą (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001).. Tačiau tokie metodai leidžia pamatyti tik galutinį rezultatą ir atsakyti į klausimą, ar hibridizacija

įvyko. Galutinio taško matavimai yra naudingi tiek kokybiškai nusakant tikslios sekos buvimą mėginyje, tiek kiekybiškai, nes atlikus kalibracinius matavimus yra identifikuojama, kokį signalo stiprumą galima sieti su kokia analitės koncentracija. Tačiau galutinio taško matavimai turi ir trūkumų. Vienas jų yra ilgas rezultato laukimo laikas – pilnos hibridizacijos dažnai laukiama apie valandą arba ilgiau, neįskaitant mėginio apdorojimo laiko. Kita problema su galutinio taško matavimais yra dažnas reikalavimas vykdyti hibridizacijos ir detekcijos procesus skirtingose terpėse. Terpių keitimas, kuriam įprastai reikalingas ir papildomas plovimo žingsnis, apsunkina detekcijos procesų automatizavimą ir pritaikymą didelio našumo tyrimams. Dar vienas reikšmingas galutinio taško rezultatų nuskaitymo trūkumas yra tai, kad vieno taško pamatavimas didina klaidingo teigiamo arba neigiamo rezultato tikimybę, ko bent iš dalies išvengti padėtų kelių taškų užregistravimas hibridizacijos metu, nes kompetentingas tyrėjas galėtų atskirti tikėtinos hibridizacijos reakcijos kinetiką nuo priemaišų sukulto žingsnio tipo signalo generavimo kinetikos (Capaldo *et al.*, 2016). Ilgą detekcijos trukmę ir mažą patikimumą svarbu išspręsti norint pritaikyti hibridizacijos detekciją aplinkos stebėjimui arba klinikinėje diagnostikoje, kur svarbus greitesnis ir tikslesnis rezultatų gavimas. Geresni hibridizacijos detekcijos metodai pasitarnautų ir fundamentiniam mokslui, kur įdomu gauti kuo daugiau duomenų apie proceso vyksmo dinamiką ir juos pasitelkus kurti modelius, geriau aprašančius gamtos veikimo principus.



1.2 pav. Apibendrinta biojutiklio dizaino schema

Hibridizacijos detekciją galima paspartinti ir patikslinti matuojant ne signalą galutiniu laiko momentu, o atliekant proceso vyksmo registravimą realiu laiku (angl. *real-time*). Be detekcijos pagreitinimo ir papildomos informacijos apie jungimosi kinetiką suteikimo, realaus laiko matavimai taip pat gali padėti pagerinti specifiškumą, nes hibridizacijos kinetikos skirtumai pastebimi jau esant vieno nukleotido skirtumams tarp zondo ir taikinio (Xu *et al.*, 2017). Specifiškumo gerinimas svarbus norint detektuoti mažas analitės koncentracijas kompleksiniuose mėginiuose, kur dėl sąveikos su jutikliu konkuruoja mažos koncentracijos bet didelio afiniškumo junginiai su didelės koncentracijos bet mažo afiniškumo priemaišomis (Kanik *et al.*, 2022). Hibridizacijos matavimas realiu laiku bent iš dalies padeda spręsti ir tyrimo automatizavimo bei pritaikymo didelio našumo sistemoms problemą, nes signalo nuskaitymas vykdomas toje pačioje terpėje, kur vyksta komplementarios sekos atpažinimo procesas, nereikalaujant plovimo ir terpių keitimo žingsnių.

Realaus laiko matavimų svarbą pagrindžia dar ir tai, kad, nors nukleorūgščių hibridizacija yra plačiai taikoma įvairiose molekulinės biologijos srityse, heterogeninė hibridizacija dar nėra pilnai suprantama ir kartais nauji tyrimai nustebina išvalgomis apie pusiausvyros nusistovėjimo lėtumą mažos joninės jėgos sąlygomis, kurių reikėtų įvertinti kuriant naujas detekcijos sistemas (Bielec *et al.*, 2019). DNR dvigubos spirалės stabilumo termodinamika priklauso nuo vandenilinių ryšių susidarymo ir π sąveikų (Ferapontova, 2018). Dvigrandės DNR (dgDNR) lydymosi temperatūra (T_m), parodanti, kokioje temperatūroje nutrūksta vandeniliniai ryšiai, yra plačiai naudojamas stabilumo matas. Elektrodo paviršiuje imobilizuotų dgDNR molekulių T_m gali būti didesnė nei gaunama atliekant skaičiavimus pagal nukleorūgšties seką, nes didžiąją dalį neigiamo pentozės–fosfato karkaso krūvio kompensuoja teigiami buferinio tirpalo jonai, todėl svarbu sukurti rišimosi stebėjimo sistemas su gera laikine skyra, galinčias padėti surinkti duomenis, reikalingus tiksliau heterogeninę hibridizaciją aprašantiems modeliams sukurti. Dėl realaus laiko hibridizacijos matavimo privalumų lyginant su galutinio taško nuskaitymu, yra tobulinami bei toliau kuriami metodai tokiems tyrimams atlikti.

Norint DNR rišimąsi detektuoti, hibridizacijos įvykis turi sukelti signalą, kurį tyrėjai galėtų nuskaityti ir taip identifikuoti taikinio atpažinimą. Heterogeninės hibridizacijos matavimų realiu laiku signalo nuskaitymas dažniausiai būna optinis arba akustinis. Akustinis nuskaitymas atliekamas kvarcinio kristalo mikrobaloanso metodika (angl. *quartz crystal microbalance*, QCM) (Okahata *et al.*, 1992; Caruso *et al.*, 1997), kurios detekcijos principas pagrįstas tuo, kad jutiklyje naudojamas kvarco kristalas keičia savo vibracijų rezonanso dažnį priklausomai nuo ant paviršiaus adsorbuotos masės. Jau 1992-aisiais tyrėjams pavyko realiu laiku stebėti specifiską pikomolinės koncentracijos vgDNR hibridizaciją ant aukso elektrodo, padengto taikiniui komplementaria zondo DNR (Okahata *et al.*, 1992). Žemą detekcijos ribą pasiekti tikriausiai padėjo tai, kad tyrėjai naudojo didelės molekulinės masės ($2,4 \cdot 10^6$ g mol⁻¹) taikinį. Vėlesni QCM matavimai rodė, kad atsaką pakeisti gali ir jautraus paviršiaus klampa, elastingumas, šiurkštumas ir panašūs veiksniai, galintys apsunkinti DNR hibridizacijos stebėjimą sudėtingose daugiakomponentėse matricose (Yamaguchi *et al.*, 1993). Norint detektuoti mažas (atomolines) koncentracijas trumpų oligonukleotidų, reikalingos signalo stiprinimo strategijos, apimančios nanomedžiagų prijungimo, fermentinės katalizės ar nukleorūgščių prailginimo arba padauginimo metodikas (Liu, 2019).

Tradicinį optinį nuskaitymą galima suskirstyti į fluorescencinį reikiamai pažymėtoms DNR molekulėms ir paviršiaus plazmonų rezonanso (angl. *surface plasmon resonance*, SPR) nežymėtiems oligonukleotidams. SPR metodas matuoja ant metalo paviršiaus adsorbuotų plonų sluoksnių lūžio indekso kitimą, kurį galima susieti su adsorbuoto sluoksniu mase ir storium (Pattnaik, 2005). Pirmieji kiekybinį DNR heterogeninės hibridizacijos parametrų vertinimą *in situ* ant pasyvintų aukso paviršių pademonstravo (Peterlinz *et al.*, 1997), kur buvo stebėta 0.5 μ M vgDNR

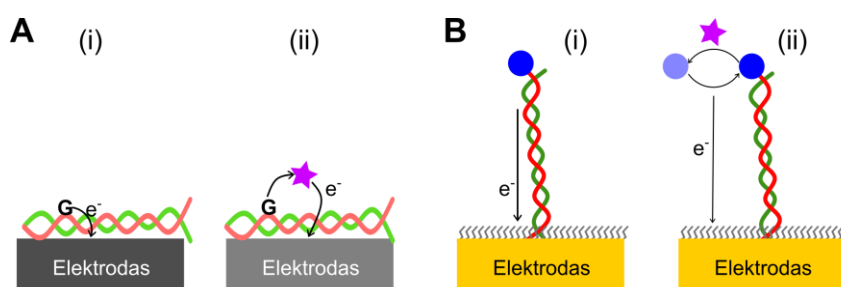
hibridizacija su ant aukso paviršiaus imobilizuotu alkantioliu modifikuotu gaudymo zondų. Gana didelė *vgDNR* koncentracija tirpale matuojant SPR buvo reikalinga todėl, kad šio metodo atsakas auga didėjant analitės molinei masei, o trumpi oligonukleotidai yra mažos molekulės. Siekdami spręsti mažos taikinio molekulinės masės problemą tyrėjai gali analizę arba signalinį zondą sujungti su nanodalelėmis ir taip padidinti hibridizacijos įvykio metu atsirandantį masės pokytį tirpalo – elektrodo sandūroje, dėl kurio ir pakinta matuojamas lūžio rodiklis. Tokia strategija buvo pritaikyta prie DNR prijungus silicio dioksido nanodaleles (Delpont *et al.*, 2012). Tad su SPR galima stebėti DNR hibridizaciją ir tirpimą realiu laiku, tačiau norint pasiekti praktiškai svarbias detekcijos ribas reikalingas signalo didinimas prie DNR prijungiant didelės molekulinės masės daleles, kurios gali reikšmingai pakeisti darinio judrumą, sulėtinti detekciją, ir paversti duomenis mažiau tinkamais fundamentiniams nukleorūgščių heterogeninės hibridizacijos tyrimams.

Žymėtų oligonukleotidų hibridizacijai stebėti skirta fluorescencinė detekcija yra ko gero populiariausias hibridizacijos signalo nuskaitymo metodas, kuris taikomas ir plačiai paplitusiose mikrogardelėse (Rao, Rodesch and Grainger, 2012; Boissinot *et al.*, 2021). Šiose sistemose gaudymo zondai imobilizuojami ant, pavyzdžiui, polistireno rutuliukų, ir hibridizuojami su taikinio sekomis, žymėtomis fluoroforais, arba pasitelkiant sumuštinio strategiją, kai taikinytis yra dalinai komplementarus gaudymo zondui ir dalinai – fluoroforu žymėtam signaliniam zondui. Fluoroforų skleidžiami fotonai detektuojami jautriais sensoriais, leidžiančiais pasiekti labai mažas detekcijos ribas. Hibridizacijos stebėjimas realiu laiku pasitelkiant fluorescencinius signalus leidžia tyrėjams eksperimentiškai įvertinti kuriamų detekcijos sistemų komponentų rišimosi kinetiką ir jos nulemtus parametrus, tokius kaip detekcijos riba ar matavimui reikalingas laikas (Boissinot *et al.*, 2021). Eksperimentinis oligonukleotidų rišimosi vertinimas gali būti reikalingas todėl, kad heterogeninė hibridizacija yra prasčiau suprantama už homogeninę, naudojami matematiniai modeliai gali nukrypti nuo eksperimentinių rezultatų, todėl ne visada užtenka sumodeliuoti sistemą *in silico* prieš ją taikant laboratorijoje. Pavyzdžiui, skirtingi taikiniai gali sudaryti įvairias 3D struktūras, kurių sąveiką su paviršiuje imobilizuotais gaudymo zondais sunku nuspėti, ir gali būti tiksliau ir efektyviau tiesiog pamatuoti. Fluorescencinio signalo stebėjimas registruojant hibridizaciją realiu laiku buvo įvardintas kaip būdas greitai atrinkti galimas nukleorūgštis, kurias siekiama taikyti, pavyzdžiui, HIV-1 detekcijai (Schwille, Oehlschläger and Walter, 1996). Be kinetikos parametru vertinimo, hibridizacijos stebėjimas fluorescenciškai buvo pademonstruotas kaip būdas detektuoti vieno nukleotido polimorfizmą, o tai svarbu įvairių genetinių ir vėžinių sutrikimų diagnostikoje (Peter *et al.*, 2001; Boissinot *et al.*, 2021). Galiausiai, šis signalo nuskaitymo metodas geba nustatyti patogenų buvimą mėginyje: buvo pademonstruota bakterinio užkrato detekcija per 5-15 min. iš tikslinės bakterijos genetinės medžiagos amplikono (Boissinot *et al.*, 2021).

Aprašytiems metodams taikyti reikalinga sudėtinga laboratorinė įranga. Optinė detekcija reikalauja šviesos šaltinių, filtrų, veidrodžių ir lęšių, o QCM būtina akustinių signalų registravimo aparatūra. Tuo tarpu elektrocheminių jutiklių taikymui reikalinga aparatūra dažnai būna paprastesnė, nes elektriniai signalai yra generuojami tiesiai ant jutiklio elektrodo taip palengvinant integraciją su likusia prietaiso elektronika ir duomenų apdorojimu. Elektrocheminiai detekcijos prietaisai yra suderinami su mikrogamybos technologijomis ir todėl lengvai miniatiūrizuojami. Dėl mažo dydžio elektrocheminiai detekcijos prietaisai yra patrauklūs taikymui poreikio vietoje (angl. *point-of-need*) užkrečiamųjų ligų diagnostikai, tinkamo gydymo parinkimui, veterinarijai ir maisto saugai (Trotter *et al.*, 2020). Dėl išvardintų priežasčių, elektrocheminiai jutikliai gali būti palyginti pigūs, ir turi potencialo už mažesnę kainą pasiekti tokias pat žemas detekcijos ribas bei tokią pat gerą laikinę skyrą kaip tradiciniai metodai.

1.2. Elektrocheminiai metodai heterogeninei nukleorūgščių hibridizacijai matuoti realiu laiku

Nukleorūgščių elektrocheminės detekcijos istorija prasidėjo nuo Emil Paleček oscilografinės polarografijos matavimų ant gyvsidabrio elektrodų (Paleček, 1960), o vėliau buvo pereita prie tiesioginės nukleobazių redukcijos arba oksidacijos ant elektrodų paviršiaus matavimų (Paleček *et al.*, 1993). Šiuolaikinius būdus matuoti heterogeninę nukleorūgščių hibridizaciją elektrochemiškai galima suskirstyti į dvi pagrindines grupes: nežymėtų ir žymėtų oligonukleotidų detekciją (1.3 pav.) (Gooding, 2002; Ferapontova, 2018; Trotter *et al.*, 2020). Pirmoji grupė apima metodus, kuriuose oligonukleotidai nėra pažymėti oksidaciniu-redukciniu (redokso) aktyvumu pasižyminčia molekule (1.3 pav. A). Tokiu atveju, nenaudojant papildomų reagentų, galima matuoti elektrodo paviršiaus ar difuzinio sluoksnio pakitimus arba nukleotidų oksidacijos signalus. Į matavimo tirpalą pridėjus papildomų reagentų, atsiranda galimybė matuoti su hibridizacija susijusį jų redokso signalo didėjimą arba mažėjimą. Antrajai metodų grupei priklauso oligonukleotidų, sujungtų su redokso žymeniu, matavimai (1.3 pav. B). Tokius matavimus vėl galima atlikti be papildomų reagentų tirpale arba jų pridėjus siekiant signalo stiprinimo. Abiejų strategijų elektrocheminiai jutikliai gali būti taikomi realaus laiko hibridizacijos matavimams.



1.3 pav. Elektrocheminių hibridizacijos detekcijos metodų pavyzdinės schemos. **A.** Nežymėtų oligonukleotidų detekcija: (i) – be papildomų reagentų; (ii) – su papildomais reagentais. **B.** Oligonukleotidų su elektrocheminiu žymeniu detekcija: (i) – be papildomų reagentų; (ii) – su papildomais reagentais. Parengta pagal (Ferapontova, 2018)

Detekcijos metodai, kurie nereikalauja oligonukleotidų pažymėjimo ir papildomų reagentų yra patrauklūs dėl savo pigumo ir paprastumo, tačiau pasižymi žemais absoliučiais signalais bei jų nespecifiškumu. Nežymėtos DNR detekcijai dažniausiai naudojamas elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodas. Pritaikant elektrocheminio impedanso spektroskopiją sistemai, kurioje ant auksinio elektrodo imobilizuotas gaudymo zondas ir matuojant dvigubo sluoksnio talpą (Capaldo *et al.*, 2016), buvo pasiektas 1 pM detekcijos limitas zondui komplementariai vgDNR matavimus atliekiant buferiniame tirpale, ir nanomolinės eilės detekcijos limitas, kai sukurta sistema buvo pritaikyta detektuojant zondui komplementarią miRNR sudėtingesnėje matricoje – skiestoje žmogaus kraujo plazmoje. Tyrimo metu maksimali pademonstruota laikinė skyra buvo 15 s. Kitas daug žadantis būdas stebėti nežymėtų oligonukleotidų hibridizaciją be papildomų reagentų yra lauko efekto tranzistoriais pagrįsti jutikliai. Jų veikimas paremtas tuo, kad prie elektrodo paviršiaus jungiantis krūvį turinčioms molekulėms, jos pakeičia krūvių pasiskirstymą elektrode, pasikeičia potencialas tarp elektrodo paviršiaus ir elektrolito (Fritz *et al.*, 2002). Šį potencialo pokytį galima užregistruoti kaip pokyčius laidume arba talpoje ir susieti su krūvį turinčios analizės, pavyzdžiui DNR, rišimosi prie paviršiaus kinetika ir koncentracija tirpale. Buvo pademonstruotas grafenu dengtas lauko efekto tranzistorius, su kuriuo biojutikliu buvo pasiekta 10 pM detekcijos riba DNR hibridizacijai, pademonstruotas DNR rišimosi stebėjimas realiu laiku, gautas signalas buvo priklausomas nuo koncentracijos (Xu *et al.*, 2017). Be to, aprašyta sistema gebėjo aptikti vieno nukleotido polimorfizmus DNR sekoje. Tyrimo autoriai teigia, kad tokia ir panašios sistemos galėtų ateityje būti potencialiai taikomos ekonomiškai efektyviai didelio našumo vaistų kandidatų, genetinių variacijų ir ligų biožymenų atrankai naudojant grafeno DNR gardelę. Reagentų pridėjimas į tirpalą, kuriame detektuojami nežymėti oligonukleotidai leidžia padidinti matuojamus absoliučius signalus. Tyrėjams yra pavykę realiu laiku stebėti nežymėtos DNR hibridizaciją, kai elektrocheminį signalą registruoti leido $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ jonai, kurie sąveikauja su DNR elektrostatiškai, todėl didesnis jų kiekis sukaupiamas elektrodo paviršiuje, kai ant jo yra dgDNR, palyginus su vgDNR (Guo *et al.*, 2013). Amperometrinio matavimo metu tyrėjai teigia stebėję 10 pM koncentracijos hibridizaciją. Tačiau signalas, nors ir mažesnis, buvo generuojamas ir įvedus nepilnai komplementarią DNR, tad specifiškumo trūkumo problema nebuvo pilnai išspręsta. Be to, tyrime srovės kilimo pradžia stebima tik praėjus maždaug 25 min. po analizės įvedimo į tirpalą, tad rezultatai kelia klausimų apie pritaikomumą hibridizacijos kinetikos modeliavimui. Nežymėtų oligonukleotidų hibridizacijos detekcija elektrochemiškai yra problematiška dėl mažo generuojamo signalo ir todėl kylančių sunkumų matuojant mažų koncentracijų nukleorūgščių hibridizaciją. Nors yra publikacijų apie jutiklius nežymėtiems oligonukleotidams su dideliu jautrumu, jis dažnai tampa trūkumu sistemą bandant pritaikyti matavimams biologiniuose mėginiuose. Kompleksinėse matricose yra įvairių ląstelių, baltymų, ištirpusių organinių ir neorganinių junginių, ir visi šie komponentai gali sukelti

reikšmingus triukšmus kai nespecifiškai adsorbuojasi ant elektrodo paviršiaus. Nors lauko efekto tranzistoriai yra daug žadanti sritis biojutiklių ateičiai, jų gamyba vis dar brangi ir jutiklio kaina tampa maža tik gaminant didelius kiekius, arba sukūrus protokolus efektyviai regeneruoti paviršių taip įgalinant panaudoti jutiklį kelis kartus ir sumažinti vieno matavimo kainą.

Manoma, kad geresnį signalo/triukšmo santykį kompleksiniuose mėginiuose gali padėti pasiekti metodai, kurių metu matuojamas faradėjinis signalas, gaunamas iš elektrocheminio žymens, prijungto prie taikinio arba signalinio zondo. Tam dažniausiai pasitelkiami signalo skenavimo reikalaujantys elektrocheminiai metodai, tokie kaip kvadratinės bangos voltamperometrija arba ciklinė voltamperometrija. Joninės jėgos įtakos oligonukleotidų hibridizacijos greičio tyrimams mokslininkai yra pritaikę kvadratinės bangos voltamperometrijos matavimus su 5 min. laikine skyra, kai siekė stebėti 100 nM koncentracijos MB žymėto taikinio hibridizaciją įvairios joninės jėgos tirpaluose (Khuda *et al.*, 2023). Darbo autorei su tyrimų grupe (Serapinas *et al.*, 2022) pavyko stebėti DNR oligonukleotidų hibridizaciją realiu laiku, kai kas 5 minutes buvo registruojamos ciklinės voltamperogramos. Sukurta sistema galėjo detektuoti nanomolines žymėtų oligonukleotidų koncentracijas ir buvo pritaikyta vertinant nukleaziniu veikimu pasižyminčių fermentų aktyvumą įvairiuose laboratoriniuose skysčiuose ir žmogaus seilėse. Nors žymenų naudojimas padidina matavimo kainą, signalo specifiškumas biojutikliuose įprastai būna to vertas. Norint faradėjinėmis reakcijomis pagrįstais biojutikliais pasiekti mažesnes detekcijos ribas ir geresnę laikinę skyrą reikalingas signalo stiprinimas, pavyzdžiui, įvedant papildomų reagentų (Furst, Hill and Barton, 2014). Papildomų reagentų naudojimas dar padidina tyrimo kainą ir kai kuriais atvejais gali apsunkinti metodo automatizavimą dėl reikalingų plovimų, tačiau įmanoma sukurti sistemas, įgalinančias signalą stiprinti matavimų metu realiu laiku.

1.3. Elektrocheminės sistemos, skirtos nukleorūgščių hibridizacijos matavimui, kūrimas

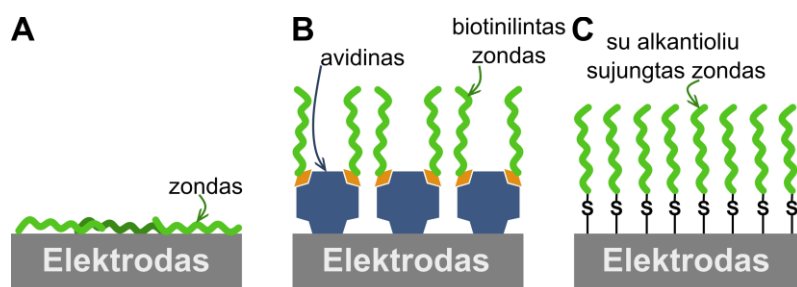
Elektrocheminių DNR biojutiklių veikimas pagrįstas analitei komplementarios DNR sekos (zondo) imobilizavimu ant elektrodo paviršiaus, ir analitės – zondo sąveikos detekcija elektrocheminiais metodais. Hibridizacijos greičiui svarbus tiek zondo, tiek taikinio DNR dydis (ilgis bazėmis), maišymas, zondo tankis ant elektrodo paviršiaus (Chan, Graves and McKenzie, 1995). Siekiant efektyvesnės hibridizacijos ir didesnio signalo, jutiklių dizainus galima tobulinti keičiant ant elektrodo paviršiaus imobilizuoto zondo molekulių tankį, parenkant optimalią blokuojančio sluoksnio sudėtį bei pažymint taikinį arba signalinį zondą tinkamu elektrocheminiu žymekliu. Šiame skyriuje bus iš eilės aptariama visų išvardintų parametrų svarba efektyvaus hibridizacijos jutiklio kūrimui.

1.3.1. Gaudymo zondo imobilizavimas

Analitės receptoriūmi nukleorūgščių hibridizacijos jutikliuose dažniausiai būna vgdNR arba jos DNR analogai, tokie kaip surakinta nukleorūgštis (angl. *locked nucleic acid, LNA*) ar peptidinė nukleorūgštis (angl. *peptide nucleic acid, PNA*). Nukleorūgštys yra patrauklūs zondai afiniškumu pagrįstiems jutikliams (Zhang *et al.*, 2022), nes pasižymi dideliu specifiškumu atpažinti komplementarias sekas ir kitas analites (baltymus ar net visas ląsteles), nukleorūgščių molekulės yra atsparios temperatūrų svyravimams, jų struktūra aiški ir lengvai programuojama, todėl galima paprastai ir patikimai masiškai gaminti komponentus elektrocheminiams jutikliams. Be to, nukleorūgštis lengva modifikuoti įvairiomis molekulėmis ir funkcinėmis grupėmis, padedančiomis oligonukleotidą pritvirtinti prie elektrodo arba galinčiomis elgtis kaip redokso žymenys.

Detekcija vyksta zondo DNR atpažįstant taikinio nukleorūgštį. Heterogeninės hibridizacijos efektyvumui didelę įtaką turi ant elektrodo imobilizuoto DNR sluoksnio kokybė, kurią apibūdina tankumas, homogeniškumas ir DNR molekulių orientacija elektrodo atžvilgiu (Ferapontova, 2018). Šie parametrai padeda užtikrinti zondo prieinamumą taikiniui, juos galima keisti parenkant zondo imobilizavimo ant elektrodo paviršiaus strategiją.

Paprasčiausias zondo imobilizavimo būdas yra fizikinė adsorbcija (1.4 pav. A). Jis nereikalauja nukleorūgščių modifikavimo, todėl yra pigus ir greitas. Po adsorbcijos DNR molekulės ant elektrodo paviršiaus išsidėsto plokščiai. Tokioje konformacijoje galima analizuoti DNR per tiesioginę jos bazių oksidaciją arba redukciją, arba pasitelkiant redokso indikatorius (Ferapontova, 2011). Siekiant geresnės DNR adsorbcijos kontrolės, elektrodo paviršių galima modifikuoti polikatijoniniais polimerais, kurie elektrostatiškai sąveikautų su anijoniniu DNR fosfato karkasu (Lemeshko *et al.*, 2001). Tačiau adsorbuota DNR pasižymi mažiau specifine, silpnesne hibridizacija, triukšmingu signalu, didesniu elektrodo užterštumu ir silpnu signalu.



1.4 pav. Gaudymo zondo imobilizavimo būdai. **A.** Fizikinė adsorbcija. **B.** Biotino – avidino/streptavidino sąveika. **C.** Kovalentinis prijungimas. Parengta pagal (Thapa, Liu and Wang, 2022)

Kita paviršiaus modifikavimo DNR strategija yra biotino – adivino/streptavidino ryšio, vienos stipriausių nekovalentinių sąveikų gamtoje, panaudojimas (Liu *et al.*, 2008) (1.4 pav. B). Biotinas yra tinkamas DNR modifikavimui dėl savo mažo dydžio, stabilumo ir todėl, kad netrukdo kuriamo jutiklio zondo – taikinio sąveikai (Thapa, Liu and Wang, 2022). Elektrodo padengimas avidinu/streptavidinu leidžia ant paviršiaus imobilizuoti biotinilintą DNR greitai sudarant ryšį, kuris

stabilus įvairiuose pH, temperatūrose, organiniuose tirpikliuose. Tačiau imobilizacijai tinkamų DNR-biotino hibridų sintezė bei paviršiaus dengimas reikalauja daugiažingsnių cheminių reakcijų, papildomo paviršiaus blokavimo, taip gamybos procesas apsunkinamas ir prailginamas.

Dar viena efektyvi ir dažnai naudojama DNR imobilizacijos procedūra yra kovalentinis prijungimas (1.4 pav. C) (Thapa, Liu and Wang, 2022). Viena vgdNR grandinės pusė (3' arba 5') modifikuojama dažniausiai tiolio (–SH) (Serapinas *et al.*, 2022) arba amino (–NH₂) grupe (Xu *et al.*, 2015), galinčia sudaryti kovalentinius ryšius su specifinėmis funkcinėmis grupėmis, kuriomis padengiamas elektrodo paviršius (pvz. karboksilinėmis, aldehydinėmis, izotiocianato, epoksidinėmis), arba pačiu metaliniu elektrodu. Be kovalentiniam pririšimui būdingo stiprumo ir stabilumo, tiolių – metalo (būtent aukso) ryšys dar žinomas dėl lengvo paruošimo. Šios savybės lėmė didelį tioliais modifikuotų DNR grandinių populiarumą ruošiant hibridizacijos detekcijai skirtus paviršius. DNR modifikavimui reikalingos daugiažingsnės cheminės reakcijos, be to, elektrodo paviršių dažniausiai reikia papildomai blokuoti siekiant išvengti nespecifinių sąveikų. Tačiau gauti savitvarkiai monosluoksniai ant elektrodų paviršių pasižymi paprastu ir gerai atsikartojančiu paruošimu, geru taikinio surišimu ir stabilumu, kuris užtikrina itin menką aktyvaus sluoksnio desorbciją matavimų metu.

DNR savitvarkiai monosluoksniai ant aukso yra išsamiai charakterizuoti. DNR monosluoksniai, imobilizuoti per alkantiolius yra elektrochemiškai stabilūs nuo –0,6 V iki +0,6 V. Redukcinėje pusėje stabilumą riboja tiolių desorbcija – ties –1,3 V (vs. Ag/AgCl) prie 7 pH jie visiškai desorbuojasi nuo paviršiaus (Wang *et al.*, 1999). Tuo tarpu esant per dideliu teigiamam potencialui yra oksiduojami guaninai (Ferapontova and Domínguez, 2003) ir tioliai (Lai *et al.*, 2006). DNR imobilizuojant per ditiolines jungtis potencialo ruožą, kuriame savitvarkis monosluoksnis yra stabilus, galima išplėsti, tačiau ilgalaikio stabilumo problemos, susijusios su aukso paviršiaus korozija deguonies turinčiuose tirpaluose, išlieka (Ferapontova, 2018).

Ištyrinėta, kaip imobilizacijos sąlygos veikia oligonukleotidų paviršiaus tankį, hibridizacijos savybes bei geometriją ir orientaciją paviršiaus atžvilgiu. Palaikant neigiamą elektrodo potencialą, per 5' galą imobilizuota alkantioliu modifikuota dgDNR būna stati paviršiui, kai tuo tarpu imobilizavimas per 3' galą lemia 33° palinkimą paviršiaus statmens atžvilgiu (Farjami, Campos and Ferapontova, 2012). Tokį orientacijų skirtumą lemia DNR fosfodiesterinių ryšių asimetrija pentozės–fosfato karkase. Skirtinga orientacija po imobilizacijos daro įtaką ir elektronų pernašai tarp elektrodo ir elektrocheminio žymens ant oligonukleotido. Elektrodui taikant teigiamą potencialą, dgDNR pasvirimas link paviršiaus didėja dėl elektrostatinės sąveikos. Mažo tankumo savitvarkiuose monosluoksniuose dgDNR gali pasvirti net 70° statmens paviršiui atžvilgiu, o tankiuose sluoksniuose šis posvyris sumažėja iki 45° (Kelley *et al.*, 1998; Rant *et al.*, 2006). Statesnė zondo konformacija gali būti naudinga didinant šio oligonukleotido prieinamumą taikiniui,

todėl magistro baigiamojo darbo metu buvo pasirinkta naudoti zondus, imobilizuojamus per 5' galą. Atsižvelgiant į elektrodo potencialo įtaką DNR posvyriui, buvo renkamasis elektrochemiškai aktyvus žymuo, kuriam nebūtų reikalinga detekcija taikant teigiamą potencialą.

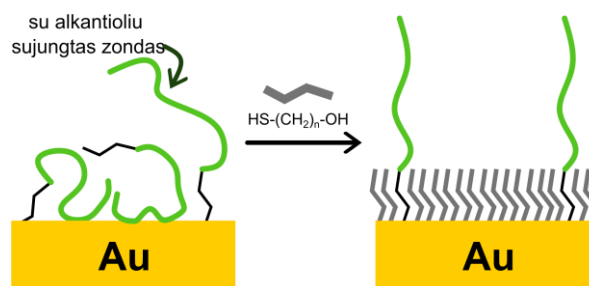
Imobilizacijos metu naudojamo tirpalo joninė jėga taip pat turi įtakos zondo tankiui (Herne and Tarlov, 1997). Didesnėje joninėje jėgoje daugiau alkantiolintų zondo molekulių prisijungia prie auksinio elektrodo paviršiaus. Šiame tyrime joninė jėga buvo keičiama didinant KH_2PO_4 koncentraciją nuo 0 iki 1 M, ties 0.4 M stebėtas paviršiaus įsotinimas zonu. Vėlesnėse studijose tapo populiariu zondo tankį ant paviršiaus kontroliuoti keičiant MgCl_2 koncentraciją. Palyginus CaCl_2 , MgCl_2 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KCl ir NaCl buvo parodyta, kad 100 mM Mg^{+2} jonai turėjo didžiausią įtaką elektrodo paviršiaus padengimui DNR zonu (Petrovykh *et al.*, 2003). Todėl baigiamojo darbo metu zondo imobilizavimo tirpalo sudėtyje buvo MgCl_2 .

1.3.2. Laisvo elektrodo paviršiaus blokavimas

Stiprus S–Au ryšio nepakanka optimaliam jutiklio paviršiaus dizainui. Pradiniai bandymai matuoti elektrocheminius signalus DNR, imobilizuotos ant elektrodo per 5' galą parodė, kad jų hibridizacijos efektyvumas tesiekė 10 % (Levicky *et al.*, 1998), dar prastesni rezultatai gauti atlikus ne elektrocheminius, o QCM matavimus (Lao *et al.*, 2005), kurių metu ant paviršiaus imobilizavus vien DNR nepavyko stebėti net 1 μM analitės hibridizacijos. Tai lėmė mažas zondo prieinamumas taikinio molekulėms: neutronų atspindžio tyrimai parodė, kad zondas, dėl azotinių bazių sąveikos su auksu, gulėjo ant elektrodo paviršiaus plokščioje konformacijoje (Levicky *et al.*, 1998). Imobilizuotos DNR molekulės gali per fosfatinį karkasą arba azotines bazes nespecifiškai sąveikauti su elektrodo paviršiumi taip sumažinant hibridizacijos su taikiniu efektyvumą. Be to, imobilizacijos metu ant paviršiaus fizikinėmis sąveikomis adsorbuotos zondų dalys matavimų metu gali nuo elektrodo atsitraukti ir palikti paviršių atvirą nespecifinėms sąveikoms su matavimo buferio ir mėginio komponentais, kurie gali sukelti reikšmingus triukšmus, trukdančius detektuoti mažus specifinius signalus.

Šių problemų sprendimui Herne ir Tarlov (1997) aukso paviršių padengė mišriu savitvarkiu sluoksniu iš SH–DNR ir merkaptoheksanolio (MCH) (1.5 pav.). Pritaikius šią strategiją tyrėjai teigė pasiekę 100 % hibridizacijos efektyvumą elektrocheminių matavimų metu (Levicky *et al.*, 1998) bei pademonstravo hibridizacijos stebėjimą QCM (Lao *et al.*, 2005). Nukleorūgštys atliko taikinio atpažinimo, o MCH – paviršiaus blokavimo funkciją. MCH tiolinės grupės stiprus afiniškumas auksui nukonkuravo nespecifiškai ant jo adsorbuotas DNR bazines. Be to, neigiamu dipolio momentu pasižyminti hidroksi grupė kitame MCH gale padėjo elektrostatiškai atstumi imobilizuotą DNR nuo elektrodo paviršiaus ir suteikti jai statesnę, palankesnę hibridizacijai konformaciją. SH–DNR ir MCH koncentracijų santykio keitimas leidžia kontroliuoti DNR zondų tankį ant paviršiaus, padeda

jiems palaikyti stačią konformaciją bei sumažina nespecifinę DNR ir kitų molekulių adsorbciją ant paviršiaus.

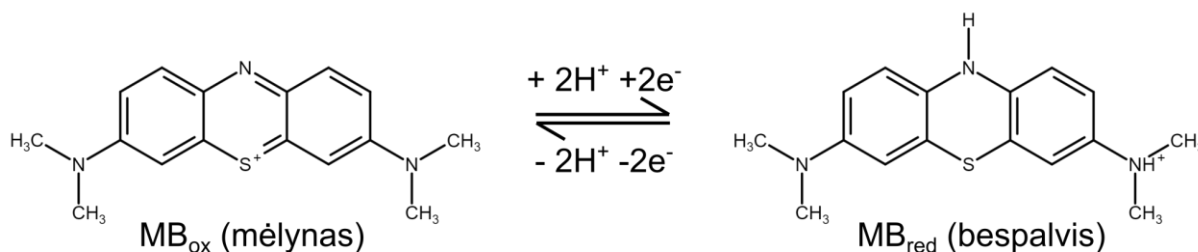


1.5 pav. vgdNR zondų padengto auksinio elektrodo paviršiaus papildomas blokavimas merkaptoheksanoliu. Parengta pagal (Herne and Tarlov, 1997; Levicky *et al.*, 1998)

Vėliau tyrėjai išbandė įvairaus ilgio ir funkcinių grupių tiolius DNR modifikuotų elektrodų jautrių sluoksnių atskiedimui siekiant geresnių detekcijos ribų, didesnio jutiklių stabilumo ir specifiškumo (Takenaka *et al.*, 2000). Išbandžius amintolių savitvarkius monosluoksnius paaiškėjo, kad amino grupių įgaunamas teigiamas krūvis sąveikauja su DNR karkasu, jį pritraukia ir suprastina hibridizacijos efektyvumą (Chan *et al.*, 1997). Todėl patartina naudoti hidroksigrupes ar kitas neigiamu krūviu pasižyminčias grupes kai renkama molekule blokuojančiam sluoksniui. Keičiant alkantiolio ilgį, arba naudojant ditiotreitolį, galima reguliuoti gaunamo savitvarkio monosluoksniu elektrinę varžą ir stabilumą (Ferapontova, 2018). Skirtingo ilgio alkantiolių sluoksnių, prisijungusių prie auksinio elektrodo paviršiaus, elektrocheminiai tyrimai parodė, kad didesnio ilgio alkantioliai suformuoja tvarkingesnius, tankesnius ir geriau elektronų pernašą blokuojančius sluoksnius (Shen *et al.*, 1997). Tokius rezultatus patvirtina ir optiniai elipsometriniai bei infraraudonosios spektroskopijos matavimai (Porter *et al.*, 1987). Trumpų alkantiolių sluoksniai pasižymi didesne 2D difuzija ir gali elgtis kaip skysčiai, padidinti elektrodų paviršiaus nestabilumą. Manoma, kad ilgos grandinės alkantioliams stabilumą suteikia tarp elektrodo paviršiuje imobilizuotų molekulių veikiančios van der Waals'o jėgos. Elektrocheminiai matavimai indikavo, kad ilgos alkantiolių grandinės užtikrina geresnę elektronų pernašos varžą, mažiau skylučių sluoksnyje, ir todėl mažesnę tikimybę leisti pašaliniams jonams ir kitoms medžiagoms sąveikauti su elektrodu (Porter *et al.*, 1987). Svarbu įvertinti, ar pasirinkto blokuojančio tiolio ilgis neblokuos elektronų pernašos tarp analizės elektrocheminio žymens ir elektrodo. Vis dar dažniausiai paviršiaus blokavimui DNR jutikliuose, paremtuose aukso elektrodais, naudojama molekule yra MCH: vidutinio ilgio molekule užtikrina pakankamą sluoksniu stabilumą ir neblokuoja elektronų pernašos iš taikinio elektrocheminio žymens; be to, neigiamas hidroksigrupės dipolio momentas padeda zondui įgauti hibridizacijai palankią konformaciją.

1.3.3. Metileno mėlis kaip DNR žymuo

Nukleorūgščių hibridizacijos detekcijai galima rasti įvairių elektrochemiškai aktyvių molekulių, galinčių su oligonukleotidais sąveikauti elektrostatiškai, rištis prie DNR griovelių, ar net interkaluoti į dvigubą spiralę (Ferapontova, 2011). Visgi kone populiariausiu indikatoriumi yra metileno mėlis (MB) (1.6 pav.).

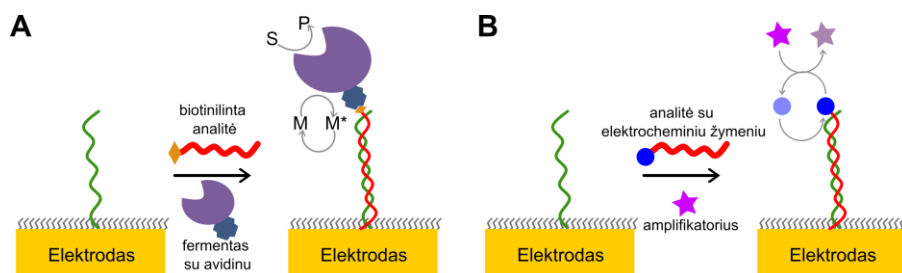


1.6 pav. Metileno mėlio oksiduota ir redukuota formos. Parengta pagal (Barou *et al.*, 2012; García-González and Fernández Abedul, 2020)

Ši molekulė dėl savo teigiamo krūvio gali sąveikauti su nukleorūgštimis elektrostatiškai, bet taip pat geba ir interkaluoti į dvigubą spiralę (Pheeney and Barton, 2012). MB yra populiarus dėl savo gebėjimo generuoti gerai atskiriamus signalus kai sąveikauja su vgDNR ir dgDNR. Be to, jo signalą galima matuoti žemame potenciale (nuo 0,1 V iki –0,4 V), kur mažiau pašalinių medžiagų kuria triukšmingus signalus, ir gaudymo zondas nėra pritraukiamas prie elektrodo paviršiaus. Taip pat MB yra netoksiškas ir pigus, o tai palengvina tyrėjų darbą bei sumažina galimą aplinkos užterštumą. Kovalentiškai prie DNR pririštas MB tyrėjams leido detektuoti bazių nesutapimus DNR ir buvo geresnis elektrocheminis žymuo už kartu išbandytą Nilo mėlį (Pheeney and Barton, 2012). Dėl išvardintų priežasčių ir dėl to, kad kovalentiškai MB modifikuoti oligonukleotidai yra lengvai prieinami įsigijimui, būtent šis žymuo buvo naudotas baigiamajame darbe.

1.4. Signalo stiprinimas

Signalo stiprinimas ypač svarbus siekiant heterogeninę hibridizaciją su žymėtais oligonukleotidais stebėti realiu laiku: be signalo stiprinimo, vieną kartą nuskaicius signalą iš prie elektrodo paviršiaus atsidūrusio žymens, tas žymuo tampa elektrochemiškai nereaktyvus, jei nėra ciklinamas elektrodo potencialas. Elektrodo potencialo ciklinimo siekiama išvengti todėl, kad tokie matavimai suprastina laikinę skyrą, ir skatina jautraus paviršiaus degradaciją. Taigi, norint kiekvieno signalo nuskaitymo metu gauti informaciją apie visus ant elektrodo paviršiaus prisijungusius elektrochemiškai aktyviu žymeniu pažymėtus oligonukleotidus, o ne tik tuos, kurie spėjo prisijungti per laiką, praėjusį nuo paskutinio nuskaitymo, reikia tą žymenį regeneruoti į būseną, kuri galėtų vėl keistis elektronais su elektrodu. Toks procesas vadinamas elektrokataliziniu signalo stiprinimu. Elektrokataliziniame cikle signalo stipriklio vaidmenį gali atlikti fermentai, nanodalelės arba cheminės medžiagos (Zhou *et al.*, 2022) (1.7 pav.).



1.7 pav. Signalų stiprinimo schemos. **A.** Fermentinis signalų stiprinimas. S – substratas, P – produktas, M – mediatorius, M^* - aktyvuotas mediatorius. **B.** Nefermentinis signalų stiprinimas. Violetinė žvaigždė – amplifikatorius, kuris gali būti, pvz., nanodalelė arba cheminė medžiaga. Parengta pagal (Ferapontova, 2018)

Fermentinis signalų stiprinimas dažniausiai taikomas sumuštinio tipo metodikose, kuriomis paremtų prietaisai jau yra pasiekę komercinio prieinamumo lygį (Trotter *et al.*, 2020). Fermentas perdirba daug substrato molekulių ir taip padidina signalą (1.7 pav. A). Komercializuotų sistemų pavyzdžiai yra *Combimatrix/CustomArray* ir *GeneFluidics* sukurti produktai. *Combimatrix/CustomArray* prietaisas ElectraSense® sudarytas iš 12544 elektrodų matricos (angl. *array*), ant kurių imobilizuotas zondas (Rodrigo *et al.*, 2014). Taikinio nukleorūgštis, pažymėta biotinu, hibridizuojasi su zonu, o prie hibrido per streptavidino-biotino sąveiką prijungiama krienu peroksidazė (HRP angl. *horse radish peroxidase*). HRP buvimas prie elektrodo paviršiaus detektuojamas, nes terpėje esant H_2O_2 fermentas oksiduoja 3,3',5,5'-tetrametilbenzideną (TMB), kuris elektrodo paviršiuje redukuojamas ir sukuria amperometrinių signalą. Šiam prietaisui reikalingas mėginio paruošimas ir plovimo bei buferių keitimo žingsniai atliekami rankomis, tačiau signalo nuskaitymas itin spartus – rezultatai iš visų 12544 elektrodų gaunami per 30 s. *GeneFluidics* taip pat naudoja HRP signalų stiprinimui, tačiau jų metode pažymėta ne taikinio nukleorūgštis, o detektoriaus zondas (angl. *detector probe*) (Liao *et al.*, 2006). Detektoriaus zondas sujungtas su fluoresceinu ir komplementarus taikiniui. Taikinio hibridas su detektoriaus zonu per laisvą taikinio dalį jungiasi prie elektrodo paviršiuje imobilizuoto zondo. Tuomet per fluoresceiną prijungiama antifluoresceino antikūnu žymėta HRP, kuri katalizuoja elektrochemiškai aktyvaus TMB oksidaciją. Prietaisas taikomas mikroorganizmų atpažinimui detektuojant jų 16S rRNR. Įprasta analizė užtrunka apie 50 min., įskaitant laiką, reikalingą ląstelių lizavimui, hibridizacijai ir HRP prijungimui. *GeneFluidics* prietaisas taikomas šlapimo takų infekcijų atpažinimui ir jautrumo antimikrobinėms medžiagoms tikrinimui, sukurtas produktas UtiMax™ gavo CE žymę 2017-aisiais. Produktas kol kas tinkamas tik detekcijai, mėginio paruošimo automatizavimas nėra įgyvendintas. Nors komerciškai pritaikomi, tokie metodai, dėl reikalaujamų plovimo žingsnių, yra sunkiai adaptuojami hibridizacijos stebėjimui realiu laiku. Be to, fermentai yra brangūs ir pasižymi nestabiliu ilgalaikio saugojimo metu bei reikalauja griežtai kontroliuojamų matavimo sąlygų optimalaus veikimo užtikrinimui.

Nanodalelėmis pagrįstas elektrokatalizinis signalų stiprinimas yra tiriamas kaip alternatyva nestabiliems fermentams (1.7 pav. B). Buvo pademonstruota, kad magnetinės Fe_3O_4 dalelės

pasizymi kataliziniu aktyvumu, kurį dar labiau sustiprinti gali sujungimas su metaliniais nanonarvais (Zheng *et al.*, 2014). Nors šiame tyrime buvo pademonstruotas ląstelių jutiklio signalo didinimas, faktas, kad tirta nanomedžiaga gali amplifikuoti metileno mėlio signalą leidžia manyti, kad strategija būtų sėkmingai pritaikoma ir DNR jutikliuose, paremtuose būtent MB žymeklio signalo nuskaitymu. Svarbu paminėti, kad Fe_3O_4 pasižymėjo geresniu stabilumu įvairiuose pH ir skirtingose temperatūrose lyginant su HRP/ H_2O_2 signalo stiprinimo schema. Nanodalelės, sudarytos iš kitų metalų, pavyzdžiui aukso ar sidabro, taip pat yra tiriamos taikymams elektrokataliziniame signalo didinimui nukleorūgščių elektrocheminiuose jutikliuose ir gali padėti pasiekti pikomolines ar net atomolines detekcijos ribas (Islam *et al.*, 2018; Tian *et al.*, 2019). Tačiau nanodalelių gamyba dažnai būna sudėtinga ir brangi, o pačios medžiagos linkę agreguoti didelės joninės jėgos sąlygomis, kurios kaip tik turėtų užtikrinti efektyvesnę DNR hibridizaciją.

Todėl cheminė elektrokatalizė yra patraukli alternatyva, nes signalo stiprinimui galima pasitelkti palyginti pigias ir stabilias medžiagas (1.7 pav. B) (Boon *et al.*, 2000). Cheminė elektrokatalizė DNR jutiklių signalo stiprinimui pradėta vystyti tyrėjams pastebėjus, kad elektrodus padengus tvarkingais, tankiais dgDNR sluoksniais ir matuojant elektronų pernašą iš elektrochemiškai aktyvių žymeklių į elektrodą galima detektuoti DNR nekomplementarias nukleotidų poras (Furst, Hill and Barton, 2014). Rezultatai rodo, kad elektronų pernaša per dgDNR beveik išnyksta atsiradus bent vienos bazės nesutapimui. Pradiniuose tyrimuose signalą ribojo, pasak tyrėjų, mažas kiekis dgDNR molekulių, kurios telpa ant įprastinio elektrodo paviršiaus. Laikant, kad dgDNR diametras yra 2 nm, o tipinio aukso darbinio elektrodo – 2 mm, vienas darbinis elektrodas gali talpinti iki pikomolinio kiekio dgDNR. Pagal matavimų rezultatus, su viena dgDNR molekule sąveikauja viena MB molekulė (Ferapontova, 2011), o iš tiek elektrochemiškai aktyvių žymeklių gaunamas signalas yra mažas. Signalui padidinti buvo nuspręsta pasitelkti elektrokatalizinį ciklą. Efektyvi sistema buvo mikromolinės MB koncentracijos derinimas su milimoline $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ koncentracija, nes $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ efektyviai redukuojamas į $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ sąveikaujant su MB_{red} . Tvarkingu dgDNR monosluoksniu padengtų elektrodų paviršiuje vyksta tokie procesai: MB interkaluoja į dgDNR ir darbiniam elektrodui suteikiant redukcinią potencialą yra redukuojamas į MB_{red} ; MB_{red} yra mažiau afiniškas dgDNR, disasocijuoja nuo jos ir patenka į tirpalą, kuriame reakcijos su $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ metu yra oksiduojamas į MB_{ox} , galintį vėl interkaluoti į nukleorūgščių monosluoksnį ir dalyvauti elektronų perdavime darbiniam elektrodai. Toks katalizinis ciklas leido padidinti registruojamas sroves maždaug viena eile (Kelley *et al.*, 1999). Sukurta elektrokatalizinė sistema chronokulonometrinių matavimų metu leido detektuoti visus įmanomus bazių porų nesutapimus ir kitas pažaidas (bebazes vietas, 8-okso-adeniną, 5,6-hidroksitiminą, deoksiuracilą), galėjo nustatyti žmogaus p53 geno mutacijas, randamas vėžinių ląstelių linijose (Boon *et al.*, 2000). Tačiau MB/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ pasižymėjo geru veikimu (diskriminacija

tarp pilno komplementarumo ir vieno nesutapimo) tik tuo atveju, kai darbinio elektrodo paviršius buvo gerai izoliuotas nuo nespecifinės sąveikos su elektrochemiškai aktyviomis molekulėmis – tam reikėjo didelio tankio dgDNR sluoksnio, kuris yra netinkamas hibridizacijos matavimams realiu laiku. Šiai problemai spręsti MB buvo kovalentiškai pritvirtintas prie imobilizuotos DNR taip, kad saito ilgio užtektų leisti MB_{red} disasociuotai nuo DNR ir tirpale sąveikauti su Fe(CN)₆³⁻, bet ne tokio ilgio, kad leistų redokso molekulei būti redukuojamai tiesiai ant elektrodo paviršiaus (Pheaney and Barton, 2012, 2013). Kita problema – tiesioginė Fe(CN)₆³⁻ redukcija ant elektrodo, buvo išspręsta kaip elektronų kriauklę panaudojant metaloproteiną hemoglobimą. Šis baltymas buvo pasirinktas dėl to, kad katalizės metu negeneruoja reaktyvių deguonies formų, galinčių pažeisti DNR, kai tuo tarpu plačiai naudojami redokso aktyvumu pasižymintys fermentai HRP arba gliukozės oksidazė jas kuria. Hemoglobino šerdyje esanti geležis gali dalyvauti katalizinėje reakcijoje su MB, o aplink esančios baltymo aminorūgštys veikia kaip izoliatorius, neleidžiantis vykti tiesioginei elektronų pernašai tarp geležies jonų ir darbinio elektrodo paviršiaus (Pheaney, Guerra and Barton, 2012).

Fe(CN)₆³⁻ naudojimas signalo stiprinimui reikalauja nuskaitymo redukciniame potencialė, žemesniame už –0,25 V, kai DNR žymėta MB ir matuojama neutraliame pH. Toks potencialas artėja prie alkantiolintos DNR zondų desorbcijos ribos (Ferafontova, 2018), o jautraus sluoksnio degradacija lemia triukšmų padidėjimą signale ir suprastina gebėjimą detektuoti nedidelių kiekių DNR adsorbciją. Norint išvengti jutiklio elektrodo jautraus paviršiaus degradacijos, realaus laiko hibridizacijos matavimus galima atlikti labiau teigiamame potencialė. Tokiu atveju signalo stiprinimui reikėtų reduktoriaus, kuris MB redukuotų į MB_{red}, o šis būtų oksiduojamas ant elektrodo sukuriant elektrokatalizinį ciklą. Gerai žinomas MB reduktorius yra L-askorbo rūgštis (Snehalatha, Rajanna and Saiprakash, 1997; Mowry and Ogren, 1999). Ši reakcija yra pritaikoma, pavyzdžiui, askorbo rūgšties elektrocheminiuose jutikliuose (Yogeswaran and Chen, 2008). Galima rasti vieną bandymą šią reakciją pritaikyti nukleorūgščių jutiklyje, kai buvo pademonstruotas MB oksidacijos signalo stiprinimas galutinio taško nuskaitymo metu taikant diferencialinio impulso voltamperometriją (Ma *et al.*, 2021). Šiame tyrime buvo pasiekta 86 aM miRNR detekcijos riba ne tik dėl MB sąveikos su askorbo rūgštimi, bet ir dėl elektroaktyvaus polimero panaudojimo, bei pasitelktos grandinės pakeitimo amplifikacijos reakcijos, leidžiančios elektrodo paviršiuje sukaupti daugiau MB molekulių. Dėl įvairių signalo stiprinimo strategijų naudojimo ir todėl, kad signalą generavo ne pačios tikslinės miRNR adsorbcija ant elektrodo, o dėl amplifikacijos sistemos ten susiformuojanti dgDNR, tokios sistemos neišeitų pritaikyti hibridizacijos stebėjimui realiu laiku. Dar vienas aprašytas metileno mėlio reduktorius yra tiocianato jonas (Pande *et al.*, 2006). Nepavyko rasti pavyzdžių, kad tiocianatas būtų pritaikytas stiprinant signalą MB, pritvirtinto prie nukleorūgšties, o L-askorbo rūgštis dar nebuvo pritaikyta DNR, žymėtos MB, hibridizacijos signalo stiprinimui realiu laiku.

2. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. Įranga

Magistro darbe elektrocheminiams matavimams buvo naudotas Reference 600+ potencioštatats iš Gamry Instruments, šviesos sugerties matavimams – BioDrop DUO ir Evolution™ 300 spektrofotometrai.

Taip pat buvo naudota kita standartinė laboratorinė įranga: įvairaus tūrio reguliuojamos pipetės, analitinės svarstyklės, magnetinė maišyklė, termostatuojama purtyklė, termostatas, ultragarso vonelė, pH matuoklis, centrifuga, įvairūs laboratoriniai indai, aukso, platinos ir palyginamasis Ag/AgCl (3 M KCl) elektrodai.

2.2. Medžiagos ir reagentai

Vanduo be nukleazių, L-askorbo rūgštis, Tris(2-karboksietil) fosfino hidrokloridas (TCEP), 6-merkaptio-1-heksanolis, natrio hidroksidas (NaOH), acto rūgštis (CH₃COOH) ir boro rūgštis (H₃BO₄) buvo įsigyti iš Sigma-Aldrich. Natrio divandenilio fosfatas (NaH₂PO₄) ir dinatrio vandenilio fosfatas (Na₂HPO₄) buvo pirkti Reachen Slovakia. Magnio chlorido heksahidratas (MgCl₂·6H₂O), sieros rūgštis (H₂SO₄), fosforo rūgštis (H₃PO₄) ir metileno mėlis buvo įsigyti iš Merck. Natrio chloridas (NaCl) ir Tris pirkti Roth. Visi naudoti reagentai buvo analitinės klasės. Oligonukleotidų tirpinimui ir saugojimui skirti tirpalai buvo paruošti naudojant vandenį be nukleazių, kiti tirpalai buvo ruošiami su dejonizuotu vandeniu (18 MΩ·cm).

Oligonukleotidai buvo įsigyti iš Metabion AG. Naudotų oligonukleotidų sekos pateikiamos 2.1. lentelėje. Lentelėje pažymėta, kad taikinio vgDNR yra sujungtos su AttoMB2 žymeniu. AttoMB2 žymuo yra MB darinys, o jų elektrocheminis elgesys iš esmės identiškas, tad paprastumo dėlei AttoMB2 žymuo toliau tekste bus vadinama MB. Gauti liofilizuoti oligonukleotidai buvo ištirpinti 10 mM Tris buferiniame tirpale, kurio pH 8,00. Zondų oligonukleotidų (z1, z2) pradinių tirpalų koncentracija buvo 800 μM, kitų oligonukleotidų (t1-MB, t2-MB3, t2-MB5) – 400 μM. Visi pradiniai tirpalai buvo saugomi šaldiklyje, –20 °C temperatūroje. Imobilizavimui skirtas zondo tirpalas buvo pavadintas darbiniu zondo tirpalu (DZT) ir ruošiamas taip: pradinis zondo tirpalas penkis kartus praskiestas TCEP tirpalu (20 mM TCEP, 10 mM Tris, 100 mM MgCl₂, pH 7,2). Toks mišinys valandą inkubuotas tamsioje vietoje kambario temperatūroje. Įvykus redukcijai, oligonukleotidai praskiesti iki galutinės 1 μM koncentracijos naudojant imobilizacijos buferinį tirpalą (10 mM Tris, 100 mM MgCl₂, pH 7,2).

2.1. lentelė. Darbe naudotų oligonukleotidų sekos

Oligonukleotido pavadinimas	Nukleotidų seka (5' → 3')	T _m , °C*	T _m , °C (patikslintas pagal [NaCl] HBT)*
Zondas1 (z1)	Thiol-C6 CAG GTG GAA CCT CAT CAG GAG ATG C	61,0	98,6
Taikinys1, žymėtas (t1-MB)	AttoMB2 GCA TCT CCT GAT GAG GTT CCA CCT G		
Zondas2 (z2)	Thiol-C6 AGC TGA GTA TTC TAC AGA GCT GGC G	57,9	96,9
Taikinys2, žymėtas 5' (t2-MB5)	AttoMB2 CGC CAG CTC TGT AGA ATA CTC AGC T		
Taikinys2, žymėtas 3' (t2-MB3)	CGC CAG CTC TGT AGA ATA CTC AGC T AttoMB2		

*apskaičiuota naudojant internete esantį įrankį *OligoCalc* (Kibbe, 2007).

Magistro baigiamajame darbe matavimams daugiausiai buvo naudojama fosfatinių buferinių tirpalų (FBT), kurie buvo ruošiami tirpinant druskų Na₂HPO₄ ir NaH₂PO₄ kiekius, reikalingus norimam pH pasiekti. Joninės jėgos reguliavimui į FBT buvo papildomai pridėdama reikiama koncentracija NaCl. Esant poreikiui, FBT pH prie reikiamos vertės buvo privedama naudojant koncentruotu NaOH arba H₃PO₄ tirpalus. Hibridizacijai naudojamos FBT variacijos tekste bus minimos dažnai, todėl joms suteikti trumpi pavadinimai: hibridizacijos buferinis tirpalas (HBT, 50 mM FBT su 3 M NaCl, pH 7,0) ir hibridizacijos buferinis tirpalas su askorbo rūgštimi (HBT/AA, 50 mM FBT su 3 M NaCl ir 30 mM askorbo rūgšties, pH 7,0).

Matavimams, kurių metu buvo tiriama pH įtaka signalui buvo naudotas universalus Britton-Robinson buferinis tirpalas (Britton and Robinson, 1931) su askorbo rūgštimi (UBT/AA): 20 mM askorbo rūgšties, 40 mM H₃BO₄, 40 mM CH₃COOH ir 40 mM H₃PO₄.

2.3. Elektrodo paruošimas

Darbo metu jutikliams paruošti buvo naudoti auksinio disko elektrodai (Ø 2 mm), pirkti iš BASi. Elektrodo ruošimas susidėjo iš mechaninio ir elektrocheminio valymų, po kurių atlikta zondo imobilizacija ir paviršiaus blokavimas. Mechaninis valymas atliktas dejonizuotu vandeniu nuplautą elektrodų paviršių poliruojant ant mikrošluostės su 0.3 µm diametro aliuminio oksido miltelių suspensija dejonizuotame vandenyje. Po to elektrodai 10 min. valyti ultragarso vonelėje. Elektrocheminis valymas susidėjo iš redukcinio ir oksidacinio valymų. Redukcinio valymo metu aukso elektrodai buvo merkami į elektrocheminę celę (3 elektrodų sistema: aukso darbinis elektrodas, platinos pagalbinis elektrodas ir Ag/AgCl (3 M KCl) palyginamasis elektrodas), užpildytą 50 mM KOH tirpalu. 30 ciklinės voltamperometrijos ciklų buvo įvykdyti skleidžiant

potencialą tarp 0 V ir $-2,6$ V 300 mV s⁻¹ skleidimo greičiu. Oksidacinis valymas atliktas 500 mM H₂SO₄ tirpale skleidžiant potencialą tarp $-0,2$ V ir $1,75$ V 30 ciklų, 300 mV s⁻¹ skleidimo greičiu. Elektrochemiškai nuvalyti elektrodai buvo kruopščiai nuplauti dejonizuotu vandeniu ir toliau padengti oligonukleotidais arba kita reikiama medžiaga.

Dengimui Zondu, Au elektrodai buvo merkami į DZT ir šaldytuve ($+4$ °C) laikomi per naktį. Tada, vėl kruopščiai nuplovus dejonizuotu vandeniu, elektrodai buvo perkeliama į 4 mM koncentracijos MCH tirpalą, kuriame kambario temperatūroje inkubuojami 3 valandas. Po laisvo paviršiaus blokavimo elektrodai buvo perkeliama į HBT ir jame paliekami kambario temperatūroje 20 arba daugiau valandų. Taip paruošti elektrodai naudoti elektrocheminiuose matavimuose.

2.4. Metodai

2.4.1. Metileno mėlio redukcijos matavimas spektrofotometru

MB yra vandenyje tirpus katijoninis dažas, pasižymintis regimosios šviesos sugertimi, kuri yra maksimali ties maždaug 665 nm šviesos bangos ilgiu (Mowry and Ogren, 1999). MB_{ox} redukcija paverčia jį bespalve forma MB_{red} (1), todėl reakcijos efektyvumą pasirinkta chemine medžiaga galima įvertinti spektrofotometriškai: vykstant redukcijai matomas MB_{ox} sugerties pikų nykimas, kol galiausiai tirpalo sugertis pasiekia foninio signalo lygį.



Į MB tirpalą pridėjus reduktoriaus perteklių, redokso reakciją galima aprašyti pirmos eilės kinetika (2).

$$\frac{d[MB]}{dt} = -k_{exp}[MB] \quad (2)$$

$$[MB] = [MB]_0 e^{-k_{exp} t}$$

Čia [MB] – MB koncentracija, k_{exp} – eksponentinio MB sugerties nykimo konstanta, [MB]₀ – pradinė MB koncentracija kiuvetėje.

Sugerties matavimams naudotas BioDrop DUO spektrofotometras, o sugerties nykimo kinetika registruota EvolutionTM 300 spektrofotometru. Sugerties spektrai matuoti nuo 400 nm iki 750 nm bangos ilgio, o sugerties nykimo kinetikos kreivės – ties $\lambda_{max} = 665$ nm. Matavimai atlikti kambario temperatūroje, netermostatuojuant, 1 cm ilgio stiklinėje kiuvetėje, išskyrus matavimus su MB žymėtu taikinio oligonukleotidu (tMB), kurie, taupant reagentus, matuoti 10 μL tūrio laše, kuriame šviesos kelias $l = 5$ μm. Medžiagos tirpintos 20 mM fosfatiniame buferiniame tirpale (FBT) su 10 mM NaCl, pH $7,00$.

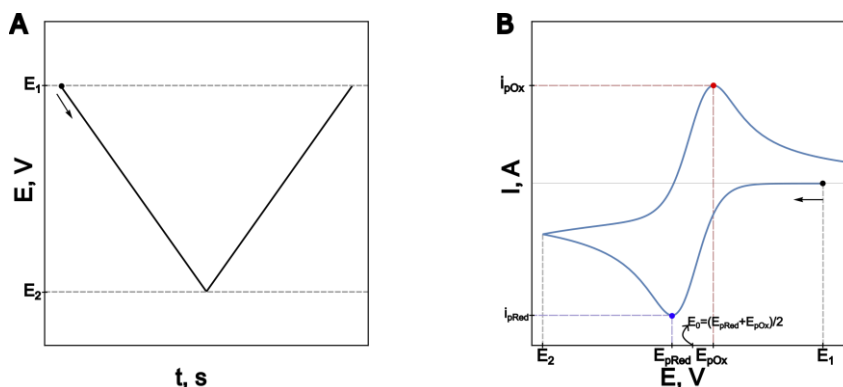
2.4.2. Elektrocheminiai metodai

Darbo metu elektrocheminiai matavimams atlikti buvo naudojama trijų elektrodų schema: Ag/AgCl (3 M KCl) palyginamasis elektrodas, Pt pagalbinis elektrodas ir reikiamai modifikuotas

Au darbinis elektrodas. Magistrinio darbo metu buvo naudoti du elektrocheminiai metodai: ciklinė voltamperometrija ir chronoamperometrija.

2.4.2.1. Ciklinė voltamperometrija

Ciklinė voltamperometrija (CV) yra taikoma oksidacinių ir redukcinių procesų tyrimui. Matavimo metu darbinio elektrodo potencialas yra keičiamas pastoviu greičiu tarp dviejų reikšmių (2.1 pav. A), ir matuojamas nuo potencialo priklausančios srovės stipris (2.1 pav. B). Atliekami du skleidimai – į teigiamas potencialo reikšmes (anodinis) ir į neigiamas potencialo reikšmes (katodinis) (Bard, Faulkner and White, 2022).



2.1 pav. Ciklinė voltamperometrija. **A.** Darbinio elektrodo potencialo keitimas laike. **B.** Matuojamo srovės stiprio priklausomybė nuo darbinio elektrodo potencialo

CV matavimų metu gaunami duomenys leidžia nustatyti tokius elektrocheminės sistemos parametrus kaip maksimali redukcinė ir oksidacinė srovės (atitinkamai I_{pRed} ir I_{pOx}), redukcinės ir oksidacinės srovių pikų potencialo reikšmės (atitinkamai E_{pRed} ir E_{pOx}) ir skirtumas tarp jų (ΔE_p). I_{pRed} ir I_{pOx} reikšmės indikuoja elektrochemiškai aktyvios medžiagos koncentraciją tirpale arba kiekį, adsorbuotą ant elektrodo paviršiaus. Tuo tarpu E_{pRed} ir E_{pOx} parametrai leidžia spręsti, kokia energija yra reikalinga priversti vykti elektrocheminę reakciją viena ar kita kryptimi, šios reikšmės glaudžiai susijusios su molekulių struktūra bei matavimo terpės savybėmis. ΔE_p dydis gerai koreliuoja su elektronų pernašos varža – kuo didesnis šis parametras, tuo didesne elektronų pernašos varža pasižymi tiriamą sistema. Maža elektronų pernašos varža gali būti susijusi su gera analitės adsorbicija ant elektrodo paviršiaus ir mažu atstumu nuo jo.

Magistro baigiamojo darbo metu CV buvo taikoma dviem skirtingiems tikslams: (1) ruošiamų elektrodų paviršiui įvertinti ir (2) MB žymėto taikinio hibridizacijai su ant paviršiaus imobilizuotu zonu matuoti.

Elektrodų paviršiaus vertinimui matavimai buvo atliekami 10 mL tūrio celėje. Potencialą skleidžiant tarp dviejų skirtingų reikšmių esant vienodoms sąlygoms, matomi skirtumai tarp srovės stiprio, matuojamo skirtingai padengus elektrodo paviršių. Tokie matavimai leidžia atskleisti, ar matavimų buferiniuose tirpaluose nėra pašalinių redokso aktyvumu pasižyminčių cheminių medžiagų, galinčių daryti įtaką signalui. Taip pat šie matavimai parodo, kad iš foninio signalo

išsiskiriantys srovės pikai atsiranda tik paviršiuje esant specifinei redokso aktyvumu pasižyminčiai medžiagai, kuri šio darbo atveju yra MB (laisvai tirpale judantis arba kovalentiškai prijungtas prie DNR).

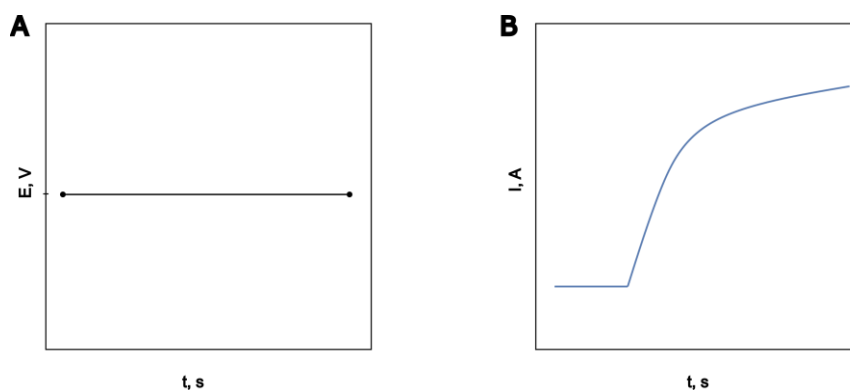
CV metodas buvo panaudotas ir realaus laiko hibridizacijos matavimams pasitelkiant šiek tiek modifikuotą publikuotame straipsnyje naudotą metodiką (Serapinas *et al.*, 2022). Eksperimentai buvo atliekami 10 mL tūrio celėje, užpildytoje reikiamu buferiniu tirpalu, termostatuojant +25 °C temperatūroje. Į tirpalą iškart (prieš pradėdant matavimą) pridėta reikiama tMB koncentracija. CV skleidimai atlikti tarp +0,1 V ir -0,4 V 0,05 V s⁻¹ skleidimo greičiu, pradėdant nuo katodinio skleidimo. Voltamperogramos užrašytos kas 3 arba 5 minutes, tarp CV registravimo įjungtas tirpalo maišymas magnetine maišykle 1500 rpm greičiu. Voltamperogramos buvo glaudinamos į modelį (3), leidžiantį iš oksidacinės srovės piko nustatyti ant elektrodo paviršiaus adsorbuoto MB kiekį (Serapinas *et al.*, 2022). Šis MB kiekis sutampa su MB žymėtos DNR kiekiu, nes prie vieno oligonukleotido kovalentiškai pritvirtintas vienas žymuo.

$$I(E) = \frac{n^2 F^2 v ztMB e^{\frac{nF}{RT}(E-E_0)}}{RT \left(1 + e^{\frac{nF}{RT}(E-E_0)}\right)^2} + a_0 + a_1(E - E_0) + a_2(E - E_0)^2 + a_3(E - E_0)^3 \quad (3)$$

Čia I – srovės stipris (A), n – elektronų, dalyvaujančių vienoje žymens oksidacijos reakcijoje, skaičius (2), F – Faradėjaus konstanta (96485 C mol⁻¹), v – elektrocheminio potencialo skleidimo greitis (0,05 V s⁻¹), R – dujų konstanta (8,3145 J K⁻¹ mol⁻¹), T – temperatūra (298,15 K), E – elektrodo elektrocheminis potencialas (V), E_0 – MB standartinis redokso potencialas (V vs. Ag/AgCl (3 M KCl)), $a_0 - a_3$ – foninės srovės stiprio koeficientai, $ztMB$ – MB žymėtos DNR hibrido su jai komplementariu zonu kiekis ant elektrodo paviršiaus (mol). Lygties išvedimą galima rasti autorės kartu su kolegomis publikuotame straipsnyje (Serapinas *et al.*, 2022). Iš kiekvienos užregistruotos voltamperogramos gautas tuo laiko momentu ant elektrodo paviršiaus esančio tMB ir zondo hibrido kiekis.

2.4.2.2. Chronoamperometrija

Chronoamperometrijos (CA) metu matuojamas srovės stiprio kitimas laike esant diskrečiai potencialo vertei (Pellitero, Shaver and Arroyo-Currás, 2020; Bard, Faulkner and White, 2022) (2.2 pav.). Baigiamojo darbo metu CA buvo taikoma charakterizuojant MB elektrocheminio signalo stiprinimo schemą bei matuojant tMB hibridizaciją esant įvairioms eksperimento sąlygoms.



2.2 pav. Chronoamperometrija. **A.** Darbinio elektrodo potencialo keitimas laike. **B.** Matuojamo srovės stiprio kitimas laike

CA matavimai atlikti 10 mL tūrio celėje, reikiamame buferiniame tirpale, termostatuojant $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje ir maišant magnetine maišykle 1500 rpm greičiu viso matavimo metu.

Visiems hibridizacijos matavimams srovės vertė pažymėto taikinio įvedimo momentu (1500 s visuose CA hibridizacijos matavimuose) buvo nustatyta kaip $I = 0$ (gautos srovės vertės pažymėtos ΔI), ir šis laiko momentas laikytas $t = 0$. Hibridizacijos matavimų realiu laiku duomenys buvo apdoroti panaikinant foninės srovės signalą. Norint iš duomenų atimti bazinės srovės dreifą, su kiekvienu naudotu elektrodu buvo atlikti 3 matavimai esant 0 nM [*tMB*]. Šių 3 matavimų ΔI vertės buvo suvidurkintos ir atimtos iš duomenų, gautų naudojant atitinkamus elektrodus esant kitoms tikslinėms koncentracijoms arba kitai joninei jėgai. Tokie duomenys buvo naudojami kuriant grafikus ir glaudinimui į modelius.

2.4.3. Statistiniai metodai

Atlikti eksperimentai buvo pakartoti tris kartus ir grafikuose pateikiama reprezentacinis trijų matavimų vaizdas arba apskaičiuotų parametrų vidurkiai \pm standartinis nuokrypis (σ). Duomenys apdoroti ir skaičiavimai atlikti *Wolfram Mathematica 11.2*.

Duomenis glaudinant darbe aprašytais modeliais, jų atitikimo įvertinimui buvo skaičiuojamas determinacijos koeficientas R^2 . Skirtingų sąlygų efektams įvertinti matavimai tomis sąlygomis buvo atliekami naudojant tuos pačius elektrodus. Todėl rezultatų porų lyginimui buvo naudojamas suporuotas t kriterijus (angl. *paired t-test*). Šio kriterijaus naudojimas duomenims su mažu imties dydžiu yra pagrįstas, kai tie duomenys nenukrypsta nuo normalaus pasiskirstymo ir tikimasi didelio efekto (de Winter, 2019). Prieš porų palyginimą duomenų normalumas buvo patikrintas Shapiro-Wilk kriterijumi, visi tikrinti duomenys nuo normalumo nebuvo nukrypę. Pasirinktas reikšmingumo lygmuo $\alpha = 0,05$, todėl, kai tekste rašoma, kad rezultatai skyrėsi reikšmingai, jų palyginimo metu gauta $p < 0,05$.

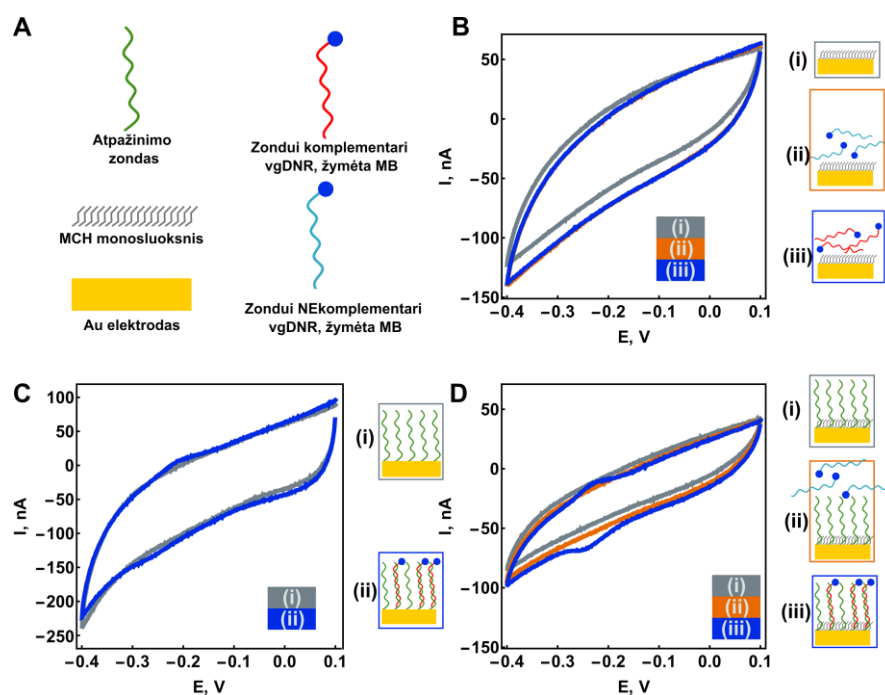
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Elektrodo paviršiaus paruošimas DNR hibridizacijos matavimams

Darbo metu pirmiausia buvo parengta auksinio disko elektrodo paruošimo metodologija, skirta DNR hibridizacijos matavimams. Ant auksinio paviršiaus per Au-S jungtį buvo kovalentiškai imobilizuoti vgDNR zondai, komplementarūs vėliau hibridizacijai naudotam taikino vgDNR oligonukleotidui. Elektrodo modifikacijos rezultatų pateikime bus iliustruojamos siekiant aptarimui suteikti aiškumo, iliustracijoms naudojamų pagrindinių simbolių legenda pateikiama (3.1 pav. A).

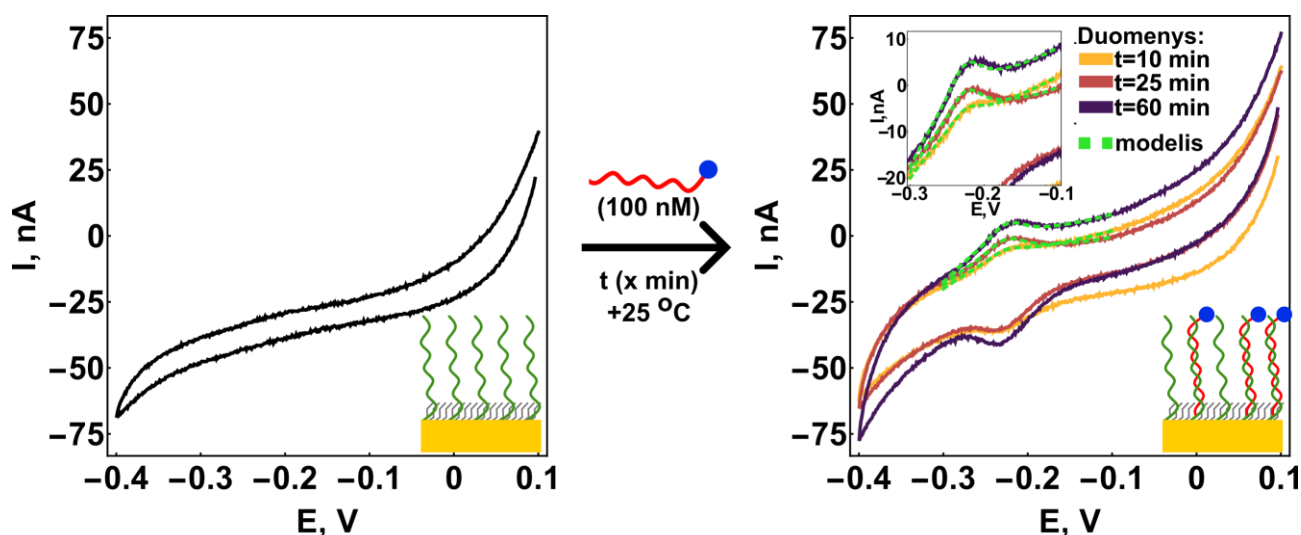
Auksinių elektrodo paviršiai modifikuoti trimis skirtingais sluoksniais siekiant pademonstruoti naudojamų komponentų būtinumą kuriant jutiklio elektrodus, ant kurių paviršiaus vgDNR gali hibridizuotis specifiskai ir sukelti kuo didesnę signalą. Pirmojo dizaino elektrodas, Au/MCH, buvo padengtas tik MCH sluoksniu, antrajam dizainui ant aukso paviršiaus buvo imobilizuotas tik z1 (2.1. lentelė) ir elektrodas pavadintas Au/z1, o trečiuoju atveju z1 padengtą elektrodo paviršių dar užblokavus MCH buvo gautas Au/z1/MCH elektrodas. Su visų dizainų elektrodais CV matavimai buvo atlikti HBT. Au/MCH elektrodas pasižymi beveik identiškomis voltamperogramomis nepriklausomai nuo to, ar buvo inkubuotas su MB žymėtais oligonukleotidais, ar ne (3.1 pav. B). Elektrodo paviršių padengus z1 oligonukleotidais (Au/z1 ir Au/z1/MCH) ir inkubavus su 100 nM komplementaraus MB žymėto taikinio (t1-MB), CV rezultatuose atsiranda oksidaciniai ir redukciniai srovės pikai (3.1 pav. C ir D). Kai laisvas elektrodo paviršius nėra papildomai blokuotas MCH (Au/z1 elektrodo atveju), oksidacinio ir redukcinių pikų vertės yra atitinkamai -0.213 V ir -0.257 V, o skirtumas tarp jų – 44 mV. Su Au/z1/MCH elektrodais, kai paviršius yra papildomai užblokuotas MCH, šių pikų reikšmės yra atitinkamai -0.223 V ir -0.243 V, skirtumas tarp jų – 20 mV. Šios reikšmės yra artimos anksčiau aprašytoms literatūroje (Pheeneey and Barton, 2012; Serapinas *et al.*, 2022). Mažesnis skirtumas tarp oksidacijos – redukcijos pikų Au/z1/MCH atveju gali reikšti, kad prie tokio paviršiaus prisihybridizavę oligonukleotidai keičiasi elektronais su darbinio elektrodu lengviau (mažesnė elektronų pernašos varža). Literatūros apžvalgos 1.3.2. skyriuje nurodyta, kad be paviršiaus blokavimo MCH tyrėjai negalėjo detektuoti hibridizacijos (Levicky *et al.*, 1998), kai tuo tarpu baigiamojo darbo metu tirtoje sistemoje užteko elektrodą palaikyti DZT ir jau buvo stebimas hibridizacijos signalas. Manoma, kad šį rezultatą galima paaiškinti tuo, jog baigiamojo darbo tyrimų metu buvo dirbama su zondo oligonukleotidais, kurie tiekėjų pristatomi formoje, kur tiolinė jungtis yra užblokuota prie jos prijungus MCH (gaunamas tokios formos darinys: C6-S-S-C6-zondas). DZT ruošimo metu siekiant aktyvuoti zondo sieros atomą sąveikai su aukso elektrodu, S-S ryšys tarp zondo oligonukleotido ir blokuojančio MCH yra redukuojamas pasitelkiant TCEP, ko pasekoje DZT tirpale gaunamas ekvimolinis zondo ir MCH kiekis. Kadangi DZT tirpalas nėra papildomai valomas, MCH gali dengti paviršių jau zondo imobilizacijos metu ir taip padėti pamatyti MB signalą po vieno elektrodo

paviršiaus modifikacijos žingsnio. Tačiau, kaip rodo rezultatai, papildomas paviršiaus blokavimas MCH yra reikalingas, nes padeda išryškinti MB signalą. Dar vienas skirtumas tarp voltamperogramų su Au/z1 ir Au/z1/MCH elektrodais yra registruojamų srovių dydžiai. Per potencialo skenavimą nuo 0.1 V iki -0.4 V ir atgal, Au/z1 elektrodo srovės pasiekia beveik -250 nA redukcinio skleidimo metu ir +100 nA oksidacinio skleidimo metu, kai tuo tarpu su Au/z1/MCH elektrodu šios reikšmės yra atitinkamai -100 nA ir +50 nA. Didesnės registruojamos srovės tuo atveju, kai paviršius nėra papildomai blokuotas MCH, rodo, kad toks elektrodas yra jautrus pašaliniam, su DNR hibridizacija nesusijusiems procesams ir yra linkęs reaguoti į deguonį ar kitus tirpalo komponentus. Tuo tarpu Au/z1/MCH dizaino elektrodo foninės srovės yra mažos, todėl su juo pasiekiamas didesnis signalo/triukšmo santykis matuojant specifinį vgdNR taikinio elektrocheminio žymens signalą. Su Au/z1/MCH elektrodu taip pat buvo atliktas matavimas hibridizacijos detekcijos specifiškumui patikrinti. Vietoje ant paviršiaus imobilizuotam z1 komplementaraus oligonukleotido, elektrodas buvo inkubuotas su t2-MB5, kuris komplementarumu su z1 nepasižymi (3.1 pav. C (ii)). Po tokios inkubacijos matuojant CV nebuvo užregistruoti MB redokso pikai taip parodant, kad prie elektrodo paviršiuje esančio zondo gali jungtis tik jam komplementari seka. Dėl signalo specifiškumo ir atsparumo triukšmams, Au/z1/MCH elektrodai buvo pasirinkti tolimesniems matavimams.



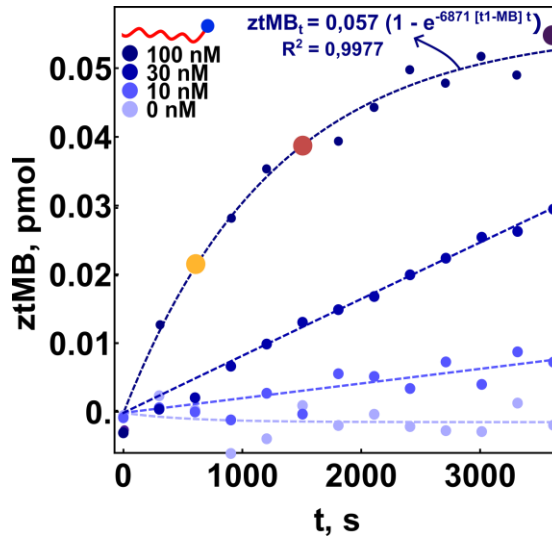
3.1 pav. Įvairiai padengtų Au elektrodų CV matavimų rezultatai. **A.** Iliustracijose naudojamo ženklinimo legenda, aktuali visiems rezultatų dalies paveikslams. **B.** Au/MCH elektrodas, matuotas prieš inkubaciją su oligonukleotidais (i), bei po inkubacijos su t2-MB5 (ii) ir t1-MB (iii). **C.** Au/z1 elektrodas prieš inkubaciją su oligonukleotidais (i) ir po inkubacijos su t1-MB (ii). **D.** Au/z1/MCH elektrodas prieš inkubaciją su oligonukleotidais (i), bei po inkubacijos su t2-MB5 (ii) ir t1-MB (iii). Inkubacijos su oligonukleotidais protokolas: elektrodai buvo pamerkti į 300 μ L HBT su 100 nM t2-MB5 arba t1-MB ir 7 min. laikyti 50 $^{\circ}$ C purtyklėje maišant 300 rpm greičiu, vėliau 20 min. vėsinti kambario temperatūroje, prieš matavimus nuplauti 20 mM FBT su 10 mM NaCl nespecifiškai adsorbuotoms molekulėms pašalinti. Matavimo sąlygos: HBT. Šalia kiekvienos paveikslėlio dalies pateiktos iliustracijos, schematiškai pavaizduojančios matuojamo elektrodo paviršius.

Su Au/z1/MCH elektrodais buvo matuojama DNR hibridizacija realiu laiku naudojant CV, nes šis metodas leidžia aiškiai iš fono išskirti MB oksidacijos-redukcijos pikus, bei regeneruoja DNR žymenį kiekvieno matavimo metu. CV matavimai buvo atliekami kas 5 minutes celėje, užpildytoje HBT, pridėjus 100 nM t1-MB. Prieš pridėdant komplementarios vgdNR, kaip jau parodyta anksčiau, elektrodo atsake nematyti srovės pikų, kurie rodytų reikšmingą elektrocheminę reakciją (3.2 pav. kairė). Tačiau ilgėjant inkubacijos laikui maišomame tirpale su t1-MB, ima ryškėti charakteringi MB pikai, kurie didėja ilgėjant hibridizacijos trukmei (3.2 pav., dešinė).



3.2 pav. DNR hibridizacijos matavimas realiu laiku naudojant CV. Voltamperogramos prieš į HBT pridėdant taikinio (kairėje) ir inkubavus su 100 nM t1-MB 10, 25 ir 60 min (dešinėje). Ištininės kreivės žymi užregistruotas voltamperogramas, o žalios brūkšninės linijos – duomenų glaudinimą į modelį (3). Dešinės pusės intarpe vaizduojami išdidinti MB oksidaciniai pikai. Grafikų dešinėje, apačioje įterptos iliustracijos schematiškai pavaizduoja Au/z1/MCH elektrodo paviršių.

Iš užregistruotų voltamperogramų galima apskaičiuoti ant elektrodo paviršiaus esančios MB žymėtos DNR kiekį pagal (3) lygtį. Kiekvienu laiko momentu gautų voltamperogramų oksidacinius pikus suglaudinus (3) lygtimi gautas grafikas, parodantis t1-MB kiekio didėjimą ant elektrodo paviršiaus didėjant hibridizacijos laikui (3.3 pav.). Eksperimento pradžioje šis kiekis buvo 0 pmol, po 5 minučių HBT maišymo padidėjo iki 0.013 pmol, o po valandą trukusios hibridizacijos ant elektrodo paviršiaus buvo jau 0.056 pmol t1-MB.



3.3 pav. Ant paviršiaus adsorbuoto t1-MB kiekio priklausomybė nuo laiko. Skrituliai žymi apskaičiuotą tMB-1 kiekį, skirtingi mėlyni atspalviai indikuoja su kokia koncentracija t1-MB buvo atliekami CV matavimai. Duomenims su 100 nM t1-MB padidinti spalvoti skrituliai rodo taškus, gautus į (3) modelį glaudinant duomenis iš atitinkamos spalvos voltamperogramų 3.2 pav. Brūkšninė linija parodo rezultatą, gautą paviršiaus padengimo priklausomybės nuo laiko duomenis glaudinant (7) lygtimi.

Heterogeninės hibridizacijos kinetika gali būti aprašyta pagal tinkamai pasirinktu modeliu. Aprašomų eksperimentų metu matavimai buvo atlikti didelės joninės jėgos fiziologinio pH tirpale (HBT), kuriame, naudojantis internete prieinamu įrankiu *OligoCalc* (Kibbe, 2007), paskaičiuota T_m $z1$ – t1-MB oligonukleotidų porai buvo +98,6 °C, kai tuo tarpu matavimai atlikti +25 °C temperatūroje. Toks didelis skirtumas tarp lydymosi ir matavimo temperatūros leidžia daryti prielaidą, kad eksperimentinėmis sąlygomis ant elektrodo suformuotos dgDNR lydymasis nevyks – bus stebimas negrįžtamas rišimosi procesas (Su, Vogt and Nöll, 2018) ir reakciją galima aprašyti (4) lygtimi:



čia z – gaudymo zondas, tMB – taikinio oligonukleotidas, kovalentiškai sujungtas su MB, $ztMB$ – žymėto taikinio ir gaudymo zondo hibridas, k_{on} – hibridizacijos greičio konstanta.

Heterogeninės hibridizacijos proceso greitis aprašomas kaip $ztMB$ kiekio didėjimas ant elektrodo paviršiaus:

$$\frac{dztMB_t}{dt} = k_{on}[tMB]z \quad (5)$$

Kur z , $ztMB_t$ ir $[tMB]$ yra atitinkamai zondo kiekis ant elektrodo paviršiaus, zondo-taikinio hibrido kiekis ant elektrodo paviršiaus ir žymėto taikinio koncentracija tirpale. Laikant, kad bendras hibridizacijai prieinamo zondo kiekis $ztMB_{max}$ eksperimento metu yra nekintantis ir sudarytas iš dviejų populiacijų: laisvo zondo z ir užimto zondo $ztMB$, gauname:

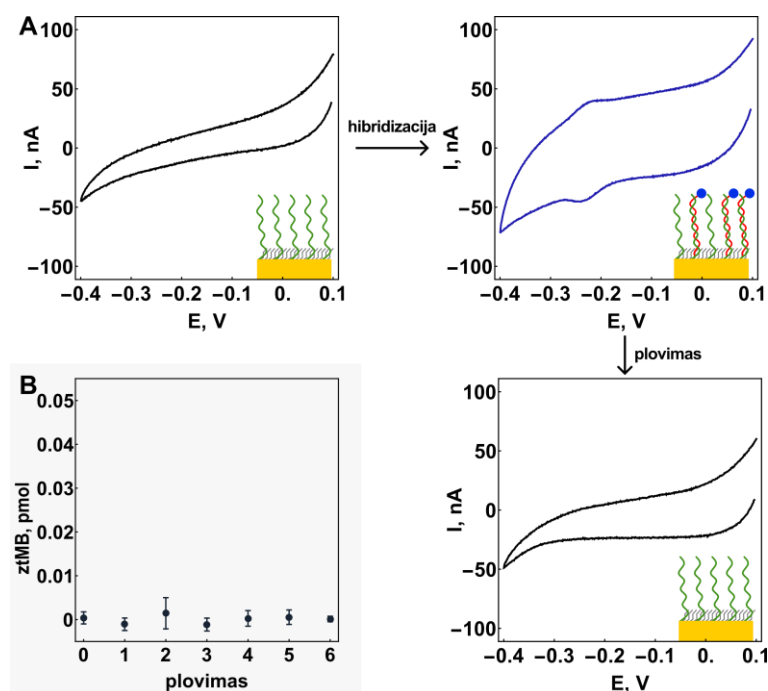
$$z = ztMB_{max} - ztMB_t \quad (6)$$

Išsprendus (5) analitiškai ir į sprendinį įstačius išraišką (6) gaunama lygtis (7), kuri aprašo zondo ir žymėto taikinio kiekio ant elektrodo paviršiaus kitimą laike..

$$ztMB_t = ztMB_{max}(1 - e^{-k_{on}[tMB]t}) \quad (7)$$

Gauta (7) lygtis buvo pritaikyta glaudinant CV realaus laiko hibridizacijos matavimų metu gautus duomenis (3.3 pav.). Glaudinimo metu gautas maksimalus hibrido kiekis ant elektrodo paviršiaus 0,057 pmol. $ztMB_{max}$ padalinus iš elektrodo ploto gautas maksimalus paviršiaus padengimas dgDNR, žymėta MB, buvo 1,77 pmol cm⁻², šis skaičius patenka į ribas literatūroje nurodomų parametro verčių (1,6 – 6,5 pmol cm⁻²) (Steel, Herne and Tarlov, 1998; Zhang *et al.*, 2007).

Kuriant elektrocheminį DNR signalo jutiklį dirbta su daugkartinio naudojimo elektrodais. Norint gauti geriau atsikartojančius rezultatus yra patogu po hibridizacijos matavimo susidariusią dgDNR išlydyti ir taip regeneruoti paviršių kitam matavimui. Kad lydymo procesas efektyvus buvo įsitikinta su trimis nepriklausomai paruoštais elektrodais atlikus 7 hibridizacijos ciklus (3.4 pav.), tarp kurių Au/z1/MCH elektrodo paviršius buvo regeneruotas elektroda 90 min. palaikius +50 °C dejonizuotame vandenyje purtyklėje maišant 300 rpm greičiu (3.4 pav. A). Po kiekvieno plovimo pradėjus naują hibridizacijos matavimą užrašyta pirmoji ciklinė neturėdavo oksidacijos ir redukcijos pikų. Šias voltamperogramas suglaudinus (3) lygtimi gauti rezultatai parodė, kad net po 6 plovimų elektrodo paviršius sėkmingai regeneruojamas (lyginant MB kiekį ant elektrodo paviršiaus po kiekvieno plovimo su kiekiu, apskaičiuotu iš hibridizacijai dar nepanaudoto elektrodo voltamperogramų, gautos $p > 0,05$) (3.4 pav. B). Todėl paruošti Au/z1/MCH elektrodai gali būti sėkmingai naudojami keliems hibridizacijos matavimams iš eilės.



3.4 pav. Elektrodo paviršiaus regeneravimas nuplaunant prisihibridizavusį taikinį. **A.** CV prieš pirmąją hibridizacijos matavimą, po 60 min. inkubacijos su 100 nM komplementaraus MB žymėto taikinio, ir po elektrodo palaikymo šiltame dejonizuotame vandenyje. Grafikų dešinėje, apačioje įterptos iliustracijos schematiškai pavaizduoja Au/z1/MCH elektrodo paviršių **B.** Apskaičiuotas MB žymėto taikinio kiekis ant elektrodo paviršiaus po kiekvieno plovimo ciklo.

Atlikti eksperimentai su trimis nepriklausomai paruoštais elektrodais, pateikiamas matavimų vidurkis $\pm \sigma$.

Kaip matyti iš 3.3 pav., matuojant hibridizaciją realiu laiku pasitelkiant CV, pasiekama tik ganėtinai prasta matavimo laikinė skyra. Naudotam potencialo skleidimo greičiui – 50 mV s^{-1} – geriausia įmanoma CV registravimo, taigi ir ztMB kiekio ant elektrodo paviršiaus sužinojimo, laikinė skyra būtų 20 s. Tačiau tokiu atveju hibridizacijos greitis tikriausiai būtų lėtas, ribojamas difuzijos, nes CV registravimo metu siekiant kuo mažesnių triukšmų turi būti išjungiamas tirpalo maišymas. Tačiau, net taikant didesnius CV skenavimo greičius ir įvairius filtrus, skirtus magnetinės maišyklės keliamiems triukšmams panaikinti, išliktų kita problema – CV matavimų metu darbinio elektrodo potencialas yra skleidžiamas iki reikšmių, siekiančių -0.4 V . DNR savitvarkiai monosluoksniai, imobilizuoti ant aukso per alkantiolines jungtis, yra stabilūs potencialų ruože nuo $-0,6 \text{ V}$ iki $+0,6 \text{ V}$ fiziologiniame pH. Prie neigiamų potencialo reikšmių vyksta alkantiolintos DNR desorbcija nuo elektrodo paviršiaus (Wang *et al.*, 1999). Todėl neigiamo potencialo suteikimas darbiniam elektrodui padidina tikimybę, kad dalis gaudymo zondo arba MCH atlips nuo paviršiaus, atidengs auksą sąveikoms su tirpalo komponentais, ir jų sukeliamas elektrocheminis atsakas sumažins norimo matuoti hibridizacijos proceso signalo/triukšmo santykį. Dėl šių su CV susijusių trūkumų buvo pradėtas kurti alternatyvus elektrocheminis metodas realiu laiku stebėti heterogeninę DNR hibridizaciją.

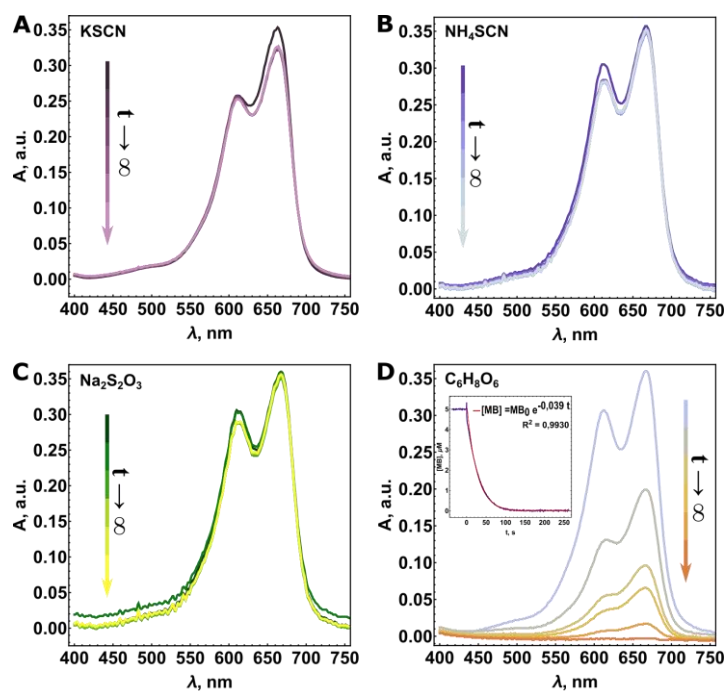
Tolesnio tyrimo metu buvo siekta sukurti analizės protokolą, leidžiantį padidinti elektronų, gautų iš vienos žymėtos DNR molekulės, skaičių. Tai leistų pagerinti hibridizacijos stebėjimo laikinę skyrą, nes per trumpesnę laiko vienetą galėtume tikėtis gauti elektronų skaičių, kurį galima atskirti nuo triukšmų. Be to, teisingai parinkus matavimo parametrus, būtų galima išvengti alkantiolintos DNR desorbcijos nuo elektrodo paviršiaus. Šiems tikslams pasiekti tinkamas elektrocheminis metodas yra CA, nes tipiškai matuojama 1 s laikine skyra, ir galima parinkti potencialą, tinkantį elektrodo paviršiaus saugojimui. Elektrochemiškai aktyvus DNR žymuo MB yra tiekiamas oksiduotos formos, todėl, norint tiesiog matuoti srovę, sukeltą žymėtos DNR hibridizacijos, reikėtų taikyti neigiamus potencialus (3.2 pav. atveju žemesnius nei $-0,265 \text{ V}$), kuriuose jau gali prasidėti jautraus paviršiaus degradacija. Visgi didesnė problema tokio matavimo atveju būtų ribotas elektronų kiekis, gaunamas iš vieno hibridizacijos įvykio. Su baigiamojo darbo metu tirta sistema atliekamiems CA matavimams HBT $+25 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje su nuolatiniu maišymu, matuojamų srovės stiprio verčių standartinis nuokrypis σ yra $16,1 \text{ pA}$. Norint užregistruoti srovės stiprį, kurį galėtume atskirti nuo triukšmo ($3 \cdot \sigma = 48,3 \text{ pA}$), ant elektrodo paviršiaus turėtų būti $0,25 \text{ fmol}$ prisihybridizavusio t1-MB. Tirpale esant 100 nM taikinio, kai hibridizacija vyksta palyginti greitai, tokiam kiekiui pasiekti reikėtų maždaug 6 s, o atliekant matavimus su mažesnėmis koncentracijomis – dar daugiau. Pavyzdžiui, 10 nM t1-MB pradinis hibridizacijos greitis yra 3 amol s^{-1} , tad signalo nuskaitymą reikėtų atlikti ne dažniau kaip kas 78 s. Be to, tokio matavimo metu kiekvieną kartą nuskaitymą srovės stiprį būtų negrįžtamai redukuojamas

MB, nes, kitaip nei CV atveju, žymuo nėra regeneruojamas, todėl kitu signalo nuskaitymo momentu gautume informaciją ne apie visą ant paviršiaus esančią dgDNR-MB, bet tik apie naujai ten atsiradusių molekulių nuo praeito signalo nuskaitymo kiekį. Todėl reikia didinti kiekį elektronų, kurį galima išgauti iš vieno hibridizacijos įvykio, o tai galima padaryti pasitelkiant elektrokatalizinį ciklą. Galima ieškoti molekulių, kurios regeneruotų oksiduotos formos MB (MB_{ox}) po to, kai šis buvo suredukuotas ant elektrodo paviršiaus, tačiau tokiu atveju reikėtų taikyti neigiamą matavimo potencialą taip rizikuojant destabilizuoti jautraus elektrodo paviršių. Paviršiaus saugojimui užtikrinti labiau tinkama yra reduktoriaus paieška, nes ši medžiaga DNR žymenį paverstų į redukuotą formą (MB_{red}), kurią tada būtų galima oksiduoti palaikant teigiamesnę jautraus elektrodo potencialą ir registruoti šį padidintą signalą. Todėl kitame skyriuje bus aprašyti keli skirtingi MB reduktoriaus variantai ir jų reakcijos įvertinimas spektrofotometru.

3.2. Tinkamo metileno mėlio reduktoriaus paieška

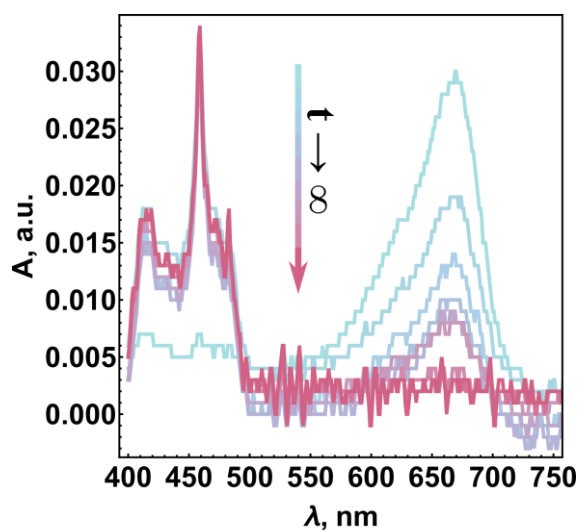
Metileno mėlio (MB) signalą galima stiprinti pasitelkiant cheminę signalo amplifikaciją. Parinkus tinkamą junginį, jis turėtų perduoti elektronus MB ir paversti jį redukuotu MB_{red} . Tokią reakciją galima atlikti su įvairiais reduktoriais. Tirpalo spalvos išnykimas reakcijos metu leidžia MB redukciją stebėti pasitelkiant regimosios šviesos spektrofotometriją.

Darbo metu buvo išbandyti keturi skirtingi potencialūs MB reduktoriai: L-askorbo rūgštis, natrio tiosulfatas ($Na_2S_2O_3$), kalio tiocianatas (KSCN) ir amonio tiocianatas (NH_4SCN). Matavimo metu, siekiant užtikrinti reduktoriaus perteklinę koncentraciją ir pasiekti eksponentinį oksiduoto MB nykimą, buvo naudojami $5 \mu M$ MB tirpalai, į kuriuos pridėta $40 mM$ reduktoriaus ($[MB] : [reduktorius] = 1 : 8000$). 3.5 pav. pavaizduoti matavimų rezultatai atskleidžia, kad iš išbandytų reduktorių efektyviai MB redukavo tik askorbo rūgštis. Pridėjus perteklių $Na_2S_2O_3$, KSCN ir NH_4SCN (3.5 pav. A, B, C), MB sugertis akimirksniu sumažėjo maždaug $0,01$ optinių vienetų dėl tirpalo praskiedimo, tačiau toliau nesikeitė matavimus atlikus net po 10 min. Atitinkami rezultatai gauti matuojant MB redukciją šiomis medžiagomis kinetiniame režime (rezultatai nepateikiami). Tuo tarpu į $5 \mu M$ MB tirpalą pridėjus $40 mM$ askorbo rūgšties (3.5 pav. D), tirpalo sugertis ėmė kristi ir per kelias minutes tirpalas iš mėlyno tapo bespalviu. Matavimai kinetiniame režime atskleidė, kad MB redukcija askorbo rūgšties pertekliumi gerai sutampa su pirmos eilės reakcijos kinetiniu modeliu (2), į kurį suglaudinus duomenis gauta $k_{exp} = 0,039 s^{-1}$.



3.5 pav. Spektrofotometriniai metileno mėlio redukcijos įvairiomis medžiagomis matavimai. **A** – 40 mM KSCN; **B** – 40 mM NH₄SCN; **C** – 40 mM Na₂S₂O₃; **D** – 40 mM askorbo rūgšties. $t \rightarrow \infty$ žymėjimas indikuoja, kad nurodyta spalvų keitimosi kryptimi didėja laiko tarpas nuo reduktoriaus pridėjimo į kiuvetę. D dalies intarpas rodo MB redukcijos kinetikos matavimą: askorbo rūgšties pridėta ties 0 s, mėlyna linija – matavimo duomenys, raudona linija – duomenų glaudinimo eksponentinio modeliu (2) rezultatas, kurio lygtis su R^2 reikšme nurodytos grafike, MB_0 – pradinė MB koncentracija (5 μ M). Matavimo sąlygos: 20 mM FBT su 10 mM NaCl (pH 7,0), 5 μ M MB, kambario temperatūra, $l = 1$ cm.

Parodžius sėkmingą MB redukciją panaudojant askorbo rūgštį, buvo įdomu pamatyti, ar šis reduktorius taip pat sąveikauja su MB, kovalentiškai surištu su vgDNR. Taupant reagentus šie matavimai buvo atlikti ne 1 cm ilgio kiuvetėje, o 10 μ L tūrio laše (šviesos kelias 5 μ m). Laše į 20 mM FBT su 10 mM NaCl (pH 7,0) pridėjus 10 μ M t1-MB ir 100 mM askorbo rūgšties (3.6 pav.) gauti rezultatai analogiški laisvo MB redukcijos rezultatams – redokso žymuo per kelias minutes yra pilnai suredukuojamas.



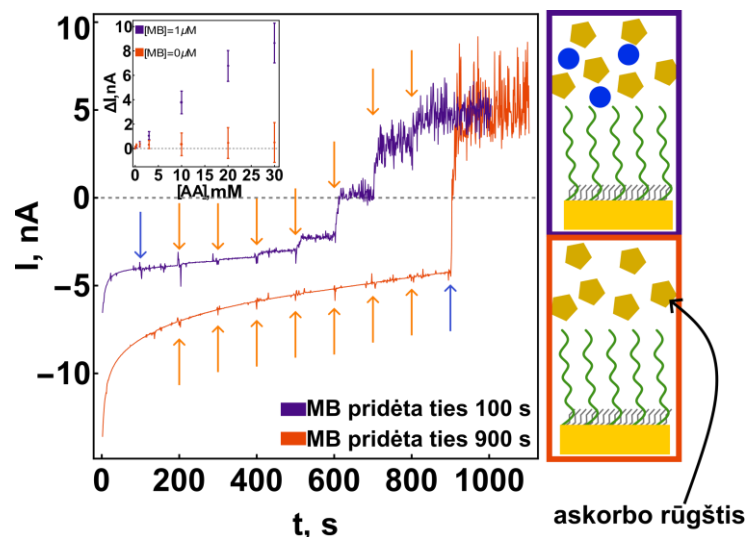
3.6 pav. Spektrofotometrinis vgDNR-MB redukcijos askorbo rūgštimi matavimas. $t \rightarrow \infty$ žymėjimas indikuoja, kad nurodyta spalvų keitimosi kryptimi didėja laiko tarpas nuo reduktoriaus pridėjimo į kiuvetę. Matavimo sąlygos: 20 mM FBT su 10 mM NaCl (pH 7,0), 10 μ M t1-MB ir 100 mM askorbo rūgšties, kambario temperatūra, $l = 5$ μ m

Spektrofotometriniai matavimai parodė, kad askorbo rūgštis yra tinkamas ir efektyvus MB reduktorius. Greita redukcija užtikrina, kad MB_{red} nebus oksiduojamas atgal į MB_{ox} tirpale ištirpusiu deguonimi greičiau, nei turėtų perduoti elektronus darbiniam elektrodui elektrocheminių matavimų metu.

3.3. Metileno mėlio elektrocheminio signalo stiprinimas askorbo rūgštimi

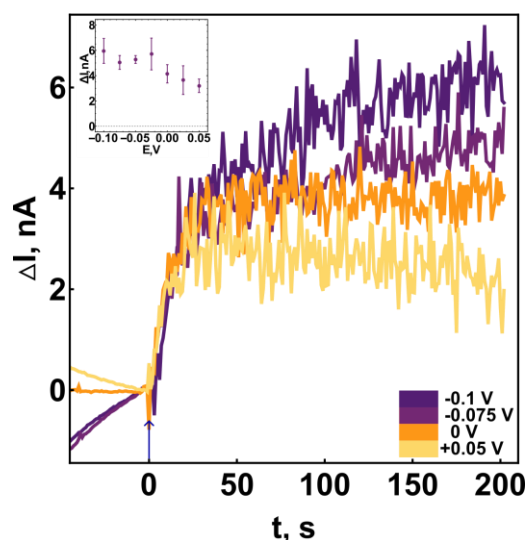
Ankstesniuose skyriuose buvo pademonstruoti du svarbūs dalykai: (1) tinkamai paruošti auksiniai elektrodai tinka matuoti tMB hibridizaciją su ant elektrodo imobilizuotu zonu ir (2) askorbo rūgštis efektyviai redukuoja metileno mėlį. Šiame skyriuje bus pademonstruota, ar MB ir askorbo rūgšties sąveiką galima stebėti elektrocheminiais metodais bei pritaikyti didinant signalą MB, kovalentiškai pritvirtinto prie DNR oligonukleotido.

Pirmiausia atlikome matavimus su laisvu MB tirpale. Į buferinį tirpalą su 1 μ M MB arba be jo buvo pridėdama didėjanti askorbo rūgšties koncentracija. Kai MB buvo pridėta į tirpalą prieš askorbo rūgštį (3.7 pav., mėlyna kreivė), didinant askorbo rūgšties koncentraciją tirpale matomi srovės stiprio pakilimai, proporcingi pridėtai signalo stipriklio koncentracijai (3.7 pav., intarpas). Srovės pokytis tampa atskiriamas nuo foninės srovės ($p < 0,05$) pridėjus 3 mM askorbo rūgšties ir daugiau. Didinant askorbo rūgšties koncentraciją vis didėjo registruojama srovė, tačiau 30 mM stipriklio pridėjimas lėmė ir triukšmų padidėjimą matavimo metu, todėl vėlesniems matavimams su laisvu MB didžiausia naudota askorbo rūgšties koncentracija buvo 20 mM. Kontrolinis eksperimentas, kai askorbo rūgštis buvo pridėdama į tirpalą be MB (3.7 pav., raudona kreivė) parodė, kad iki 30 mM stipriklio koncentracija ties taikytu elektrodo potencialu nesukelia elektrocheminio atsako, kurį būtų galima atskirti nuo foninės srovės dreifo. Šio matavimo pabaigoje pridėjus 1 μ M MB, stebimas 9,4 nA amplitudės oksidacinės srovės šuolis per 15 s. Šie rezultatai pademonstravo, kad matuojant ties -0.1 V potencialu buferiniame tirpale, kurio pH 7,0, MB_{red} yra lengvai oksiduojamas, o tuo tarpu askorbo rūgštis milimolinėmis koncentracijomis nesukelia elektrocheminio atsako, todėl MB_{red} oksidacinį signalą galima stiprinti askorbo rūgštimi.



3.7 pav. CA matavimai, skirti pademonstruoti MB-askorbo rūgšties elektrokatalizinį ciklą. Au/z1/MCH elektrodo srovės atsakas į didinamą askorbo rūgšties koncentraciją. Oranžinės rodyklės žymi askorbo rūgšties koncentracijos padidinimo momentus (100 μ M, 300 μ M, 1 mM, 3 mM, 10 mM, 20 mM, ir 30 mM). Mėlynos rodyklės žymi 1 μ M MB pridėjimą. Iliustracijos šalia grafiko schematiškai pavaizduoja elektrodo paviršiumi artimą aplinką matavimų metu tarp 100 s ir 900 s. Intarpai rodo srovės pokyčio priklausomybę nuo askorbo rūgšties koncentracijos tirpale, pateikiamas trijų matavimų vidurkis $\pm \sigma$. Matavimai atlikti palaikant $-0,1$ V potencialą, 0,2 M FBT su 10 mM NaCl (pH 7,0).

Buvo įvertintas MB_{red} oksidacijos signalo stiprinimas palaikant skirtingus darbinio elektrodo potencialus (3.8 pav.). Išbandyti septyni skirtingi darbinio elektrodo potencialai: $-0,100$ V, $-0,075$ V, $-0,050$ V, $-0,025$ V, $0,000$ V, $0,025$ V ir $0,050$ V. Eksperimentų metu buvo 100 s palaukta srovės nusistovėjimo ir tada į tirpalą pridėta 1 μ M MB, šis laiko momentas grafike pažymėtas kaip 0 ir tuo metu registruota srovės stiprio reikšmė atimta iš viso eksperimento duomenų taip panaikinant foninį signalą ir padedant grafiškai pavaizduoti skirtumus tarp MB_{red} oksidacinio signalo stiprinimo askorbo rūgštimi esant skirtingiems potencialams. Matavimai atlikti tirpale, kuriame iškart buvo askorbo rūgšties, todėl nebuvo įvertintas askorbo rūgšties atsako pasikeitimas keičiant potencialą. Tačiau su visomis išbandytomis potencialo reikšmėmis buvo sėkmingai užregistruotas oksidacinės srovės išaugimas pridėjus 1 μ M MB. Didinant darbinio elektrodo potencialą nuo $-0,100$ V iki $0,000$ V nematomas reikšmingas skirtumas tarp signalo stiprinimo. Didinant potencialą toliau, srovės skirtumo po ir prieš MB pridėjimą vidurkis ima reikšmingai mažėti. Tolesniems matavimams pasirinktas $-0,100$ V potencialas siekiant kuo labiau sumažinti tiesioginės askorbo rūgšties oksidacijos ant elektrodo paviršiaus tikimybę.



3.8 pav. Darbinio elektrodo potencialo įtaka MB oksidacinio signalo stiprinimui askorbo rūgštimi. Pavaizduoti duomenys atėmus foninę srovę. Mėlyna rodyklė žymi laiko momentą, kai į tirpalą pridėtas 1 μM MB. Skirtingų spalvų grafikai rodo matavimus esant skirtingam potencialui (legenda paveikslo apačioje, dešinėje). Intarpe – skirtumas tarp nusistovėjusios foninės srovės stiprio ir maksimalios srovės po MB pridėjimo. Grafike pateikiami vieno iš trijų eksperimentų, atliktų su nepriklausomai paruoštais elektrodais, vaizdai. Intarpe pateikiami srovės pokyčio vidurkiai $\pm \sigma$. Matavimo sąlygos: HBT/AA.

MB oksidacijos-redukcijos reakcijoje dalyvauja du elektronai ir du protonai, todėl reakcija yra priklausoma nuo pH. Tyrimo metu atlikome eksperimentus universaliame buferiniame tirpale, kurio pH buvo priverstas prie 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 arba 9,0. Tokios pH reikšmės pasirinktos todėl, kad šiame ruože DNR molekulės turėtų būti stabilios. Universalus buferinis tirpalas šiems matavimams buvo pasirinktas vietoje vienos iš anksčiau naudotų FBT kombinacijų todėl, kad būtų išlaikytos tirpalo buferinės savybės esant visiems pH, kuriuose norėta atlikti matavimus. Kadangi reakcijos vyksmas yra priklausomas ir nuo pH, ir nuo potencialo, siekiant tirti tik pH įtaką buvo atlikti CV matavimai (3.9 pav. A), pagal kuriuose matomų MB oksidacinės srovės pikų reikšmės buvo nustatomas CA matavimo potencialas. Tikslios E_{pOx} reikšmės nurodytos 3.1 lentelėje.

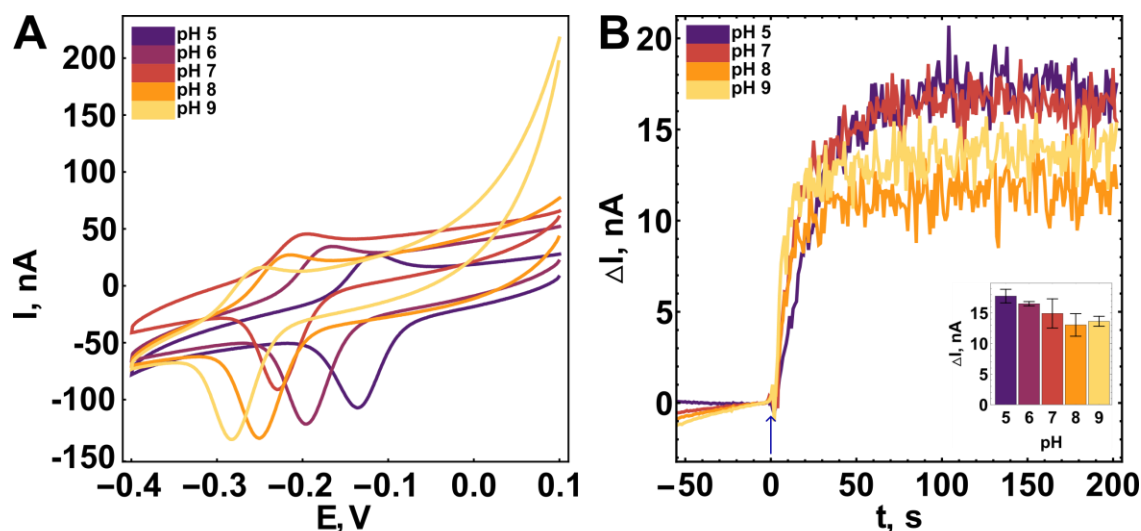
3.1 lentelė. Potencialo parinkimas atliekant matavimus skirtingo pH buferiniuose tirpaluose

pH	E_{pOx} , V	E_{CA}^* , V	$E_{CA} - E_{pOx}$, V
5,0	-0,111	-0,011	0,100
6,0	-0,170	-0,070	0,100
7,0	-0,200	-0,100	0,100
8,0	-0,225	-0,125	0,100
9,0	-0,254	-0,154	0,100

* E_{CA} – darbinio elektrodo potencialas, palaikytas CA matavimų metu.

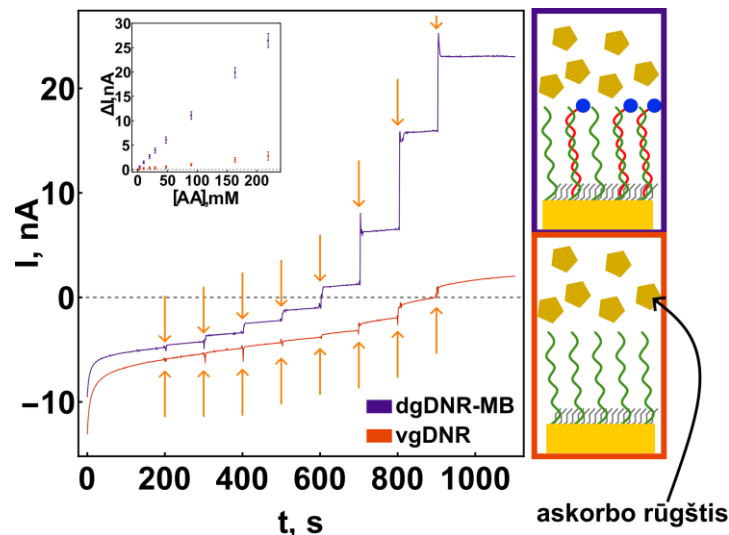
CA matavimų metu srovė nusistovėjo per 100 s ir tuomet buvo pridėta 1 μM MB (3.9 pav. B). Šis laiko momentas pažymėtas kaip $t = 0$, ir jo metu užfiksuotas srovės stipris atimtas iš viso eksperimento metu užregistruotų srovės stiprio reikšmių, taip palengvinant grafinį palyginimą oksidacinės srovės išaugimo, kurį lemia MB pridėjimas į tirpalą, kuriame yra askorbo rūgšties. Iš grafikų matyti, kad keičiant pH reikšmingai nesikeičia MB_{red} oksidacijos signalo stiprinimas, todėl tolesni matavimai buvo atlikti ties pH 7,0 remiantis tuo, kad ši vertė artimiausia fiziologiniam pH ir

todėl būtų įdomu ištirti hibridizacijos procesus joje, tikintis ateityje sistemą išbandyti žmogaus fiziologiniuose skysčiuose.



3.9 pav. CV ir CA matavimai įvairaus pH buferiniuose tirpaluose. **A.** CV matavimai UBT/AA su 1 μM MB, kai pH kinta nuo 5,0 iki 9,0 kas 1 pH vienetą. Pateikiamas trijų matavimų su nepriklausomai paruoštais elektrodais reprezentacinis vaizdas. **B.** CA matavimai skirtingo pH UBT/AA. Mėlyna rodyklė žymi laiko momentą, kai buvo pridėtas 1 μM MB. Intarpe pavaizduota srovės stiprio po ir prieš MB pridėjimą į buferinį tirpalą skirtumo vidurkis $\pm \sigma$, duomenys gauti iš eksperimentų su trimis nepriklausomai paruoštais elektrodais. Matavimų sąlygos: legendoje nurodyto pH UBT/AA, CA matavimų metu palaikytos potencialo vertės nurodytos 3.1 lentelėje.

Toliau norėta įsitikinti, kad MB-askorbo rūgšties elektrokatalizinis ciklas yra tinkamas stiprinti signalą MB, kuris kovalentiškai prijungtas prie taikinio oligonukleotido. Buvo atlikti eksperimentai su Au/z1/MCH elektrodais ir vėliau juos hibridizavus su t1-MB (3.10 pav.). Kai elektrodas buvo padengtas dgDNR-MB (3.10 pav., mėlyna kreivė), pridėdant askorbo rūgšties didėjo oksidacinė srovė, ir, pridėjus 30 mM stipriklio matavimo triukšmas nepadidėjo, todėl ši koncentracija buvo didinama ir toliau, iki 219 mM. Kiekvieną kartą padidinus askorbo rūgšties koncentraciją matomas staigus oksidacinės srovės šuolis, ir šie padidėjimai neįsisotino panaudotame stipriklio koncentracijų intervale. Kai matavimas buvo atliktas su Au/z1/MCH elektrodu be prihibridizuotos vgDNR-MB (3.10 pav., raudona kreivė), pradiniai askorbo rūgšties pridėjimai atsako nesukėlė, tačiau padidinus jos koncentraciją iki 90 mM ir daugiau jau galima matyti srovės šuolius, išsiskiriančius iš foninės srovės dreifo. 50 mM askorbo rūgšties pridėjimas sukėlė srovės pokytį, kurio p reikšmė buvo artima 0,05, todėl, siekiant vėlesnių hibridizacijos matavimų metu išvengti oksidacinio signalo, nesusijusio su vgDNR-MB prisirišimu prie elektrodo paviršiaus, tolesniems eksperimentams su MB žymėta DNR buvo pasirinkta 30 mM askorbo rūgšties koncentracija.



3.10 pav. Prie DNR kovalentiškai pritvirtinto MB elektrocheminio signalo stiprinimas askorbo rūgštimi. CA metu matuotos srovės atsakas į askorbo rūgšties koncentracijos didinimą su Au/z1/MCH elektrodu prieš (raudona kreivė) ir po (mėlyna kreivė) hibridizacijos su t1-MB. Oranžinės rodyklės žymi askorbo rūgšties koncentracijos padidinimo momentus (3 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 90 mM, 164 mM, 219 mM). Iliustracijos šalia grafiko schematiškai pavaizduoja elektrodo paviršiu artimą aplinką matavimų metu. Pavaizduotos kreivės reprezentuoja matavimus, atliktus su trimis nepriklausomai paruoštais elektrodais. Intarpas rodo srovės pokyčio priklausomybę nuo askorbo rūgšties koncentracijos tirpale, pateikiamas trijų matavimų vidurkis $\pm \sigma$. Matavimai atlikti palaikant $-0,1$ V potencialą, 0,2 M FBT su 10 mM NaCl (pH 7,0).

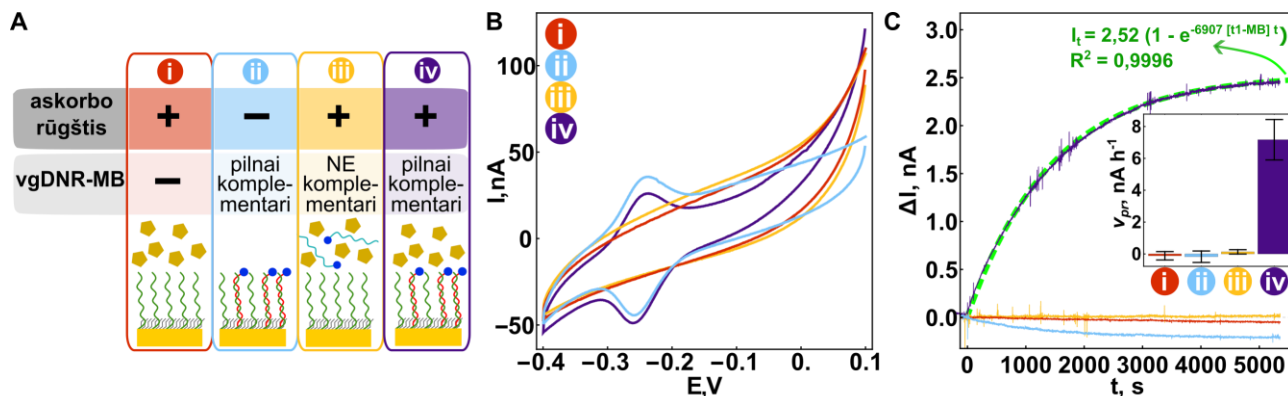
Pademonstruota, kad askorbo rūgštis yra tinkama stiprinti elektrocheminiam MB signalui, kai elektrodas padengtas dgDNR-MB sluoksniu. Tai leido manyti, kad įmanoma MB-askorbo rūgšties sąveiką pasitelkti hibridizacijos stebėjimui realiu laiku. Parinktos optimalios signalo stiprinimo sąlygos: 30 mM askorbo rūgšties, buferinio tirpalo pH 7,0, CA matavimai atliekami palaikant $-0,1$ V potencialą.

3.4. Metileno mėliu žymėtos DNR hibridizacijos signalo didinimas askorbo rūgštimi

Gavus rezultatus, kurie demonstruoja, kad askorbo rūgštis didina tiek laisvai judančio, tiek prie DNR pririšto MB signalą, buvo tirta, ar galima stebėti ant elektrodo paviršiaus imobilizuoto zondo hibridizaciją su tirpale esančia komplementaria tMB realiu laiku.

Buvo atlikti CA matavimai siekiant pademonstruoti, kad registruojamas signalas yra specifiskas zondui komplementariai sekai ir reikalauja MB-askorbo rūgšties elektrokatalizinio ciklo. Pirmo CA matavimo metu į HBT/AA tirpalą buvo nepridėta nei kiek t1-MB, antro – į HBT pridėta 100 nM t1-MB, tačiau tirpale nebuvo signalo stipriklio, o trečio – į HBT buvo pridėta 100 nM oligonukleotido t2-MB5, kuris yra nekomplementarus ant elektrodo paviršiaus imobilizuotam z1 (3.11 pav. atitinkamai raudona, šviesiai mėlyna ir geltona spalvos). Visų kontrolinių matavimų metu užregistruota srovė atitinka nulinį signalą. Po aprašytų CA eksperimentų, kurie truko 90 min., buvo atlikti ir CV matavimai (3.11 pav. B). Jie parodo, kad tirpale esant nekomplementariam oligonukleotidui (3.11 pav. B, geltona kreivė) arba išvis nesant jokio oligonukleotido (3.11 pav. B, raudona kreivė), hibridizacija nevyksta, MB redokso pikai neišryškėja. Tačiau kai į tirpalą be askorbo rūgšties buvo pridėta z1 giminingo t1-MB (3.11 pav. B,

šviesiai mėlyna), CV aiškiai matomi MB elektrocheminį aktyvumą indikuojantys pikai, kurie reiškia, kad hibridizacija įvyko, tačiau be stipriklis jos signalo nebuvo galima stebėti CA matavimo metu. Panaudojus pilną signalo amplifikacijos sistemą į HBT/AA buvo pridėta 100 nM z1 komplementaraus t1-MB (3.11 pav. C, violetinė kreivė) ir srovės stipris iškart ėmė greitai augti ir vėliau artėjo link įsisotinimo.



3.11 pav. Heterogeninės hibridizacijos CA matavimai yra specifiski ir jiems būtinas MB-askorbo rūgšties elektrokatalizinis ciklas. **A.** Lentelė, pavaizduojanti skirtingas sąlygas, kuriomis buvo atliekami pradiniai CA hibridizacijos stebėjimo matavimai. Čia naudojama spalvų legenda aktuali ir kitose paveikslėlio dalyse. **B.** CV rezultatai, gauti po C dalyje pavaizduotų CA matavimų. **C.** CA matavimai stebint heterogeninę MB žymėtos vgDNR hibridizaciją realiu laiku. Žalia brūkšninė linija – violetinės kreivės glaudinimo (12) lygtimi rezultatas. Intarpas parodo pradinį hibridizacijos greitį visomis matavimų sąlygomis. Matavimų sąlygos: $-0,1$ V, HBT/AA (išskyrus geltoną kreivę, ten HBT be askorbo rūgšties).

Gauti duomenys parodo, kaip srovės stipris kinta ant elektrodo paviršiaus atsirandant daugiau MB žymėto taikinio molekulių. Šiam procesui aprašyti reikia modelio, kuris galėtų srovės stiprio kitimą laike susieti su elektrodo paviršiaus padengimo t1-MB kitimu laike. Negrįžtamai hibridizacijai aprašyti buvo naudota (4) lygtis. Elektrodu registruojama srovė yra krūvis, pratekantis per laiko vienetą ($I = Q/t$). Krūvis, kuris atitenka elektrodui iš ant jo paviršiaus adsorbuotos elektrochemiškai aktyvios medžiagos aprašomas (Bard, Faulkner and White, 2022):

$$Q = n F z t M B_t \quad (8)$$

Eksperimentuose laikinė matavimų skyra buvo 1 s, o signalas buvo padidintas elektrokatalizės metu, jos efektyvumą aprašo amplifikacijos konstanta k_{kat} . Šiuos parametrus įstačius į (8) lygtį ir išvedus srovės priklausomybę nuo ant elektrodo paviršiaus esančio $z t M B$ kiekio gauname:

$$I_t = k_{kat} n F z t M B_t \quad (9)$$

Įstačius (7) į (9):

$$I_t = k_{kat} n F z t M B_{max} (1 - e^{-k_{on}[tMB]t}) \quad (10)$$

Priešeksponentinį narį galima pakeisti:

$$I_{max} = k_{kat} n F z t M B_{max} \quad (11)$$

Ir taip gaunama paprasta išraiška, tinkama glaudinti srovės kitimo laike duomenis:

$$I_t = I_{max} (1 - e^{-k_{on}[tMB]t}) \quad (12)$$

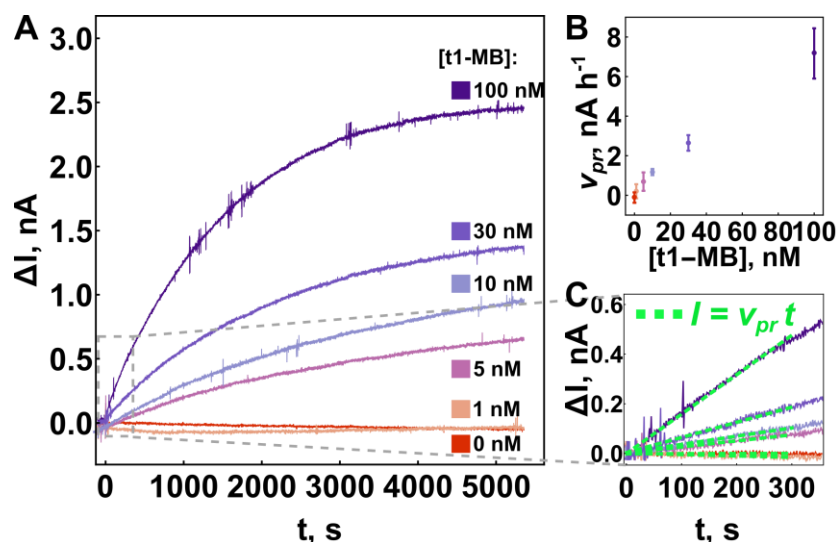
Matavimus atlikus su 100 nM t1-MB gautos pilnos paviršiaus įsotinimo taikiniu hibridizacijos kreivės, kurios buvo tinkamos glaudinti (12) lygtimi. Oligonukleotidų porai z1 – t1-MB gauti heterogeninės hibridizacijos parametrai buvo $I_{max} = (2,64 \pm 0,102)$ nA ir $k_{on} = (8,24 \pm 1,216) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Pertvarkius (11) lygtį galima gauti k_{kat} išraišką:

$$k_{kat} = \frac{I_{max}}{n F z t MB_{max}} = \frac{1}{n} k_{ep} \quad (13)$$

Su tais pačiais elektrodais, su kuriais buvo atlikti eksperimentai, iš kurių paskaičiuoti I_{max} ir k_{on} parametrai z1 – t1-MB porai, buvo atlikti ir hibridizacijos stebėjimo matavimai naudojant CV. Šiuos duomenis suglaudinus (7) lygtimi, gauta, kad $z t MB_{max} = (2,70 \pm 0,951) \cdot 10^{-14}$ mol. Gautas vertes įstačius į (13) lygtį, apskaičiuojama k_{kat} vertė yra apie $0,51 \text{ s}^{-1}$. Šį skaičių padauginus iš dviejų gaunamas elektronų pernašos konstantos parametras $k_{ep} = 1,02 \text{ s}^{-1}$, kuris parodo kiek elektronų per sekundę galima išgauti iš vieno MB žymėtos DNR hibridizacijos įvykio. Taigi MB-askorbo rūgšties elektrokatalizės ciklas suteikia galimybę ilginant matavimo laiką iš vienos analizės molekulės išgauti vis daugiau elektronų ir taip potencialiai įgalinti detekcijos limitu sumažinimą kiekybiniam DNR koncentracijos nustatymui.

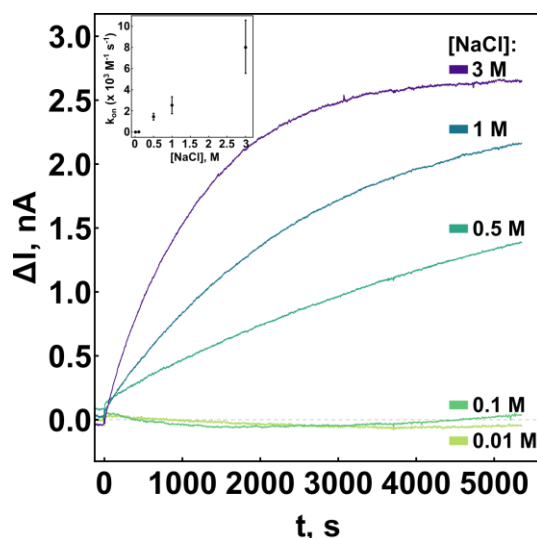
Registruojamo srovės stiprio kitimo laike signalas buvo proporcingas į tirpalą pridėtai t1-MB koncentracijai (3.12 pav.). Matavimai buvo atlikti su 0, 1, 5, 10, 30 ir 100 nM t1-MB ir pirmųjų keturių matavimų kreivės per 90 min., kurias truko eksperimentas, nepasiekė įsotinimo, todėl jų glaudinimas (12) lygtimi suteiktų netikslius rezultatus (3.12 pav. A). Norint apskaičiuoti kinetinius parametrus matavimams su mažomis vgDNR koncentracijomis būtų galima prailginti eksperimentų laiką pakankamai, kad būtų stebimas srovės stiprio įsotinimas. Tačiau šio tyrimo ribose buvo nuspręsta tirpale esančios koncentracijos nustatymui naudoti pradinį hibridizacijos greitį. Kaip matyti iš grafikų, pirmas 5 matavimo minutes (300 s) su visomis išbandytais t1-MB koncentracijomis srovės stiprio didėjimas laike gali būti gerai aproksimuojamas tiesės lygtimi (3.12 pav. C). Glaudinant eksperimentų pirmųjų 300 s duomenis tiesės lygtimi gaunamas nuolinkio koeficientas atitinka pradinį hibridizacijos greitį (v_{pr}). 0 nM koncentracijos t1-MB tirpale apskaičiuotas pradinis hibridizacijos greitis buvo $\sim 0 \text{ nA h}^{-1}$, ir 1 nM atsakas nebuvo statistiškai reikšmingai skirtingas nuo 0 nM v_{pr} . Tačiau padidinus t1-MB koncentraciją iki 5, 10, 30 ir 100 nM buvo gautos atitinkamai tokios v_{pr} vertės: $(0,69 \pm 0,464) \text{ nA h}^{-1}$, $(1,17 \pm 0,154) \text{ nA h}^{-1}$, $(2,65 \pm 0,393) \text{ nA h}^{-1}$ and $(7,17 \pm 1,270) \text{ nA h}^{-1}$ (3.12 pav. B). Galimybė nustatyti oligonukleotido koncentraciją tirpale per trumpą laiką gali pasitarnauti trumpinant nukleorūgščių biojutiklių atsako laikus (Zhang *et al.*, 2022).



3.12 pav. CA matavimai stebint heterogeninę DNR hibridizaciją realiu laiku esant skirtingoms t1-MB koncentracijoms.

A. Pilnos CA kreivės, ties 0 s buvo pridėta 0 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 30 nM, arba 100 nM t1-MB. **B.** v_{pr} priklausomybė nuo t1-MB koncentracijos, pateikiami $n = 3$ matavimų vidurkiai $\pm \sigma$. **C.** Išryškintos pirmos 350 s matavimų, pavaizduotų A dalyje. Žalia brūkšninė linija – pirmų 300 s duomenų glaudinimas tiesiniu modeliu. A ir C dalims: kiekvienai tirtai koncentracijai pateikiamas reprezentacinis vaizdas iš trijų eksperimentų, atliktų su nepriklausomai paruoštais elektrodais. Matavimų sąlygos: $-0,1$ V, HBT/AA.

Toliau siekta pademonstruoti, kad sistema, skirta heterogeninės DNR hibridizacijos stebėjimui realiu laiku gali būti pritaikoma vertinant matavimo sąlygų įtaką hibridizacijos parametrams. Kaip pavyzdinis hibridizacijos kinetikai įtaką darantis parametras buvo pasirinkta hibridizacijos matavimui naudojamo tirpalo joninė jėga. DNR karkase yra fosfato liekanų, kurios fiziologiniame pH turi neigiamą krūvį. Todėl oligonukleotidai turi savybę atstumti vienas kitą dėl elektrostatinės sąveikos tarp to paties ženklo krūvių. Tirpalo joninės jėgos didinimas padeda geriau ekranuoti oligonukleotidų karkaso neigiamą krūvį, sumažina stūmos jėgas tarp jų ir komplementarūs oligonukleotidai gali lengviau hibridizuotis (Khuda *et al.*, 2023). Toks efektas buvo stebėtas ir šio darbo metu atlikus CA matavimus į 50 mM FBT su 30 mM askorbo rūgšties tirpalą pridėjus 100 nM t1-MB ir keičiant tirpale esančio NaCl koncentraciją, taigi ir joninę jėgą (pH visur buvo privestas prie 7,0) (3.13 pav.). Gauti duomenys buvo glaudinti (12) lygtimi darant prielaidą, kad visiems matavimams I_{max} yra vienodas, nes naudojama vienoda t1-MB koncentracija. Buferiniuose tirpaluose su 0,01 M ir 0,1 M NaCl hibridizacija nebuvo detektuota. Tačiau padidinus [NaCl] iki 0,5 M, 1 M ir 3 M gautos k_{on} reikšmės atitinkamai $(1,45 \pm 0,317) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $(2,53 \pm 0,780) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ir $(8,07 \pm 2,518) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.



3.13 pav. CA matavimai stebint 100 nM t1-MB heterogeninę hibridizaciją realiu laiku esant skirtingoms buferinio tirpalo joninėms jėgoms. Ties 0 s buvo pridėta 100 nM t1-MB. Matavimai atlikti buferiniame tirpale esant 0,01 M, 0,1 M, 0,5 M, 1 M arba 3 M NaCl. Kiekvienai tirtai NaCl koncentracijai pateikiamas reprezentacinis vaizdas iš trijų eksperimentų, atliktų su nepriklausomai paruoštais elektrodais. Intarpe pateikiama k_{on} priklausomybė nuo NaCl koncentracijos, pateikiami 3 matavimų vidurkiai $\pm \sigma$. Matavimų sąlygos: $-0,1$ V, 50 mM FBT su 30 mM askorbo rūgšties ir nurodyta NaCl koncentracija.

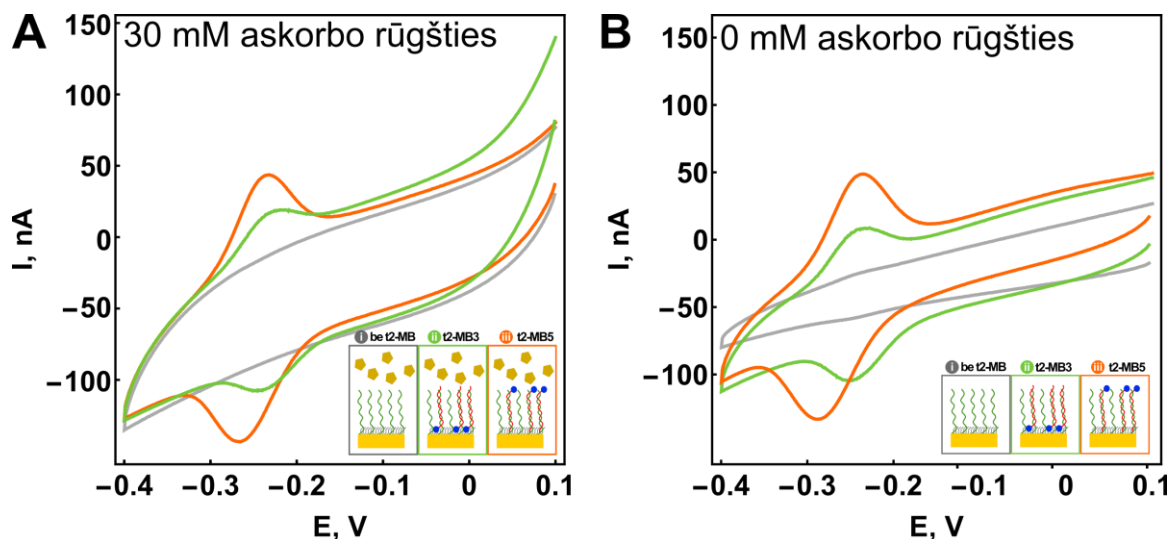
Buvo pademonstruota, kad MB-askorbo rūgšties elektrokatalizinis ciklas yra būtinas norint CA matavimo metu stebėti heterogeninę DNR hibridizaciją realiu laiku. Gaunamas signalas yra specifiskai paviršiuje imobilizuotam zondui komplementariai sekai ir priklauso nuo taikinio koncentracijos. Mažiausia koncentracija, kurios hibridizacijos signalą pavyko stebėti realiu laiku buvo 5 nM. Taip pat CA matavimų metu buvo patvirtinta, kad didinant buferio joninę jėgą didėja hibridizacijos greitis. Todėl pademonstruota MB-askorbo rūgšties sąveika yra tinkama oligonukleotidų hibridizacijos kinetikai vertinti ir gali būti pritaikoma taikinio koncentracijos nustatymui.

3.5. Metileno mėlio lokalizacijos įtaka signalui

Patvirtinus, kad MB-askorbo rūgšties elektrokatalizinė sistema buvo veiksminga hibridizacijos signalui sustiprinti, buvo įdomu iširti, kaip elektroaktyvaus žymens padėtis jutiklio elektrodo paviršiaus atžvilgiu veikia signalą. Tokios žinios būtų svarbios labiau informuotam, išmintingesniam hibridizacijos reakcijos stebėjimui skirtų zondų ir taikinių porų kūrimui. Šiam tyrimui buvo naudoti auksiniai elektrodai, ant kurių imobilizuotas z2 zondas (Au/z2/MCH elektrodai), kurio seka skiriasi nuo ankstesniuose skyriuose naudoto z1 (2.1. lentelė). Taikiniai buvo z2 komplementarūs oligonukleotidai t2-MB5 ir t2-MB3, kurių sekos yra identiškos, tačiau skiriasi elektroaktyvaus žymens lokalizacija – 5' arba 3' gale, kaip indikuoja paskutinis skaitmuo oligonukleotidui suteiktame pavadinime. Iširti du kraštiniai atvejai, kai po hibridizacijos įvykio MB žymuo atsiranda taip arti elektrodo, kaip leidžia auksą blokuojančio sluoksnio storis (t2-MB3 atveju) arba taip toli nuo paviršiaus, kaip leidžia suformuotos dgDNR ilgis (t2-MB5 atveju) (3.15 pav. A). Darant prielaidą, kad vienos bazių poros ilgis yra 0,34 nm, didžiausias įmanomas atstumo

skirtumas tarp naudojamų taikinių žymenų būtų 8,5 nm. Buvo atlikti hibridizacijos stebėjimo realiu laiku matavimai į HBT/AA pridėjus 100 nM t2-MB5 arba t2-MB3 naudojant tiek CV, tiek CA.

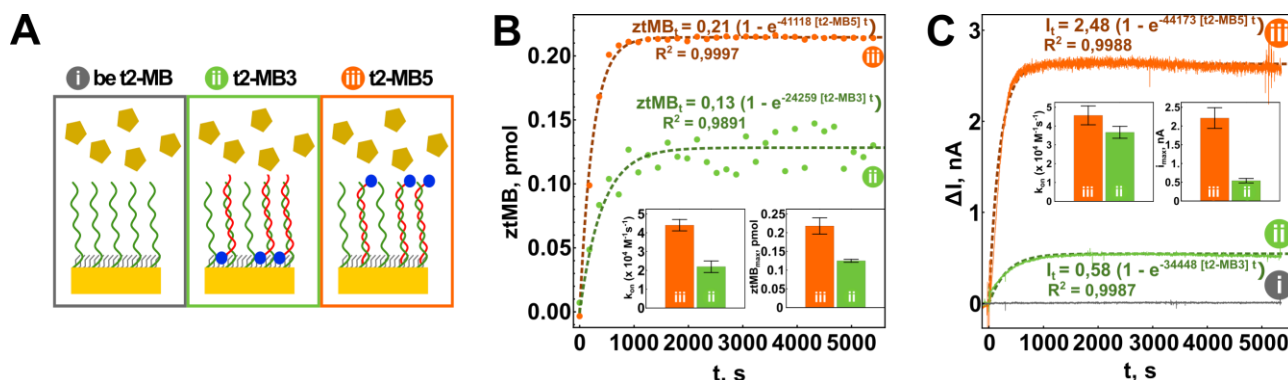
CV rezultatuose yra matomi skirtumai tarp rezultatų su taikiniams, kurie skiriasi MB lokalizacija. 3.14 pav. A dalyje yra pavaizduotos voltamperogramos, gautos po 90 min trukusių hibridizacijos matavimų su t2-MB5 arba t2-MB3, kai matavimai vyko HBT/AA. Hibridizacija su t2-MB3 per tą patį laiką sukelia mažesnės amplitudės MB oksidacinės ir redukcinės srovių pikus ir skirtumas tarp šių pikų potencialo reikšmių yra mažesnis lyginant su rezultatais, gautais po hibridizacijos su t2-MB5. Matavimus pakartojus HBT be askorbo rūgšties matomi kokybiškai tokie patys rezultatai (3.14 pav. B, t2-MB3 atveju pikai mažesni, ir potencialų skirtumas tarp tų pikų mažesnis). Tai reiškia, kad stebimi hibridizacijos efektyvumo pokyčiai priklauso nuo MB lokalizacijos, o ne MB sąveikos su askorbo rūgštimi. Tai, kad MB prijungimas 3' gale lemia mažesnę skirtumą tarp žymės oksidacinės ir redukcinės srovių pikų potencialų galima būtų paaiškinti tuo, kad mažesnis elektronų pernašos atstumas šį procesą palengvina.



3.14 pav. CV matavimai su Au/z2/MCH elektrodais prieš ir po hibridizacijos su t2-MB3 arba t2-MB5, kai tirpale yra arba nėra askorbo rūgšties. **A.** Matavimai HBT/AA prieš hibridizaciją (pilka) ir po hibridizacijos su t2-MB3 (žalia) arba t2-MB5 (oranžinė). **B.** Matavimai HBT be askorbo rūgšties prieš hibridizaciją (pilka) ir po hibridizacijos su t2-MB3 (žalia) arba t2-MB5 (oranžinė). Abiejose dalyse pateikiamas reprezentacinis vaizdas matavimų, atliktų su trimis nepriklausomai paruoštais elektrodais. Grafikų apačioje, dešinėje pateiktos iliustracijos, skirtos palengvinti artimos elektrodo paviršiui aplinkos vizualizaciją.

CV matavimai buvo atlikti ir hibridizacijos stebėjimui realiu laiku (3.15 pav. B). Iš šių matavimų rezultatų suskaičiuotos paviršiaus padengimo MB žymėtu taikiniu vertės kiekvienu laiko momentu ir šie duomenys suglaudinti (7) lygtimi. Taip gauti hibridizacijos parametrai abiem taikiniams: t2-MB5 hibridizacijai su z2 gauta $k_{on} = (4,40 \pm 0,303) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ir $z_tMB_{max} = (0,22 \pm 0,022) \text{ pmol}$, kai tuo tarpu t2-MB3 hibridizacijai $k_{on} = (2,20 \pm 0,308) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ir $z_tMB_{max} = (0,12 \pm 0,004) \text{ pmol}$. Lėtesnė hibridizacija atveju, kai MB prijungtas prie 3' galo galėtų būti paaiškintas tuo, kad žymuo sukelia sterinius trukdžius oligonukleotidų rišimosi metu (Khuda *et al.*, 2023). Panašiai galima bandyti aiškinti ir maksimalaus paviršiaus padengimo MB žymėtu

taikiniu faktą, kai žymuo po hibridizacijos turi atsидurti arčiau elektrodo paviršiaus. Gali būti, kad MB užima reikšmingai daug vietos ir todėl paviršiuje lieka mažiau zondo molekulių, galinčių efektyviai dalyvauti hibridizacijoje.



3.15 pav. Signalų skirtumai, detektuojant taikinį su skirtinga MB lokalizacija. **A.** Ilustracijos, schematiškai pavaizduojančios elektrodo paviršius ir jam artimą aplinką matavimų metu: pilka (i) – į HBT/AA ne pridėta MB žymėto taikinio; žalia (ii) – į tirpalą pridėta 100 nM t2-MB3; oranžinė (iii) – į tirpalą pridėta 100 nM t2-MB5. Spalvų reikšmė yra aktuali visame 3.5 skyriuje. **B.** MB žymėto taikinio kiekis ant elektrodo paviršiaus, apskaičiuotas iš CV hibridizacijos matavimų. **C.** CA hibridizacijos realiu laiku matavimai. Spalvų žymėjimas sutampa su A dalimi. B ir C dalimis: pateikiamas reprezentacinis vaizdas matavimų, atliktų su trimis nepriklausomai paruoštais elektrodais; matavimo sąlygos: HBT/AA, $t = 0$ žymi taikinio įvedimo momentą, brūkšninės linijos žymi duomenų glaudinimo tinkamais modeliais ((7) – CV duomenims, (12) – CA duomenims) rezultatus, pateikiamos ir jas aprašančios lygtys su R^2 reikšmėmis. Intarpai rodo nuo hibridizuojamo taikinio priklausomą hibridizacijos greičio konstantą ir maksimalų pasiekiamą elektrodo paviršiaus padengimą arba maksimalią pasiekiamą srovę. Pateikiamas trijų matavimų su nepriklausomai paruoštais elektrodais vidurkis $\pm \sigma$

Buvo atlikti ir CA hibridizacijos stebėjimo matavimai su t2-MB5 ir t2-MB3 (3.15 pav. C). Matomi rezultatai kokybiškai panašūs į gautus iš CV matavimų, nes t2-MB5 pasiekia didesnes srovės įsisotinimo reikšmes: $I_{max} = (2,21 \pm 0,276)$ nA ir $I_{max} = (0,54 \pm 0,058)$ nA atitinkamai t2-MB5 ir t2-MB3. Tuo tarpu k_{on} parametrai CA matavimų metu skirtingiems taikiniams statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($k_{on} = (4,57 \pm 0,501) \cdot 10^4$ M⁻¹ s⁻¹ t2-MB5 atveju ir $k_{on} = (3,67 \pm 0,318) \cdot 10^4$ M⁻¹ s⁻¹ t2-MB3 atveju). CV matavimų tarp k_{on} reikšmių pastebėtas skirtumas t2-MB3 ir t2-MB5 oligonukleotidams nebėra stebimas matuojant CA. Tai galėtų reikšti, kad nuolatinis, nepertraukiamas maišymas CA matavimų metu padeda sumažinti MB lokalizacijos įtaką hibridizacijos greičiui. Nors kokybiškai $ztMB_{max}$ ir I_{max} padidėjimas t2-MB5 atveju sutampa, kiekybiškai I_{max} priklausomai nuo MB padėties skiriasi 4,1 karto, kai $ztMB_{max}$ šis santykis tesiekia 1,7. Tai leidžia manyti, kad atliekant CA matavimus registruojamo signalo skirtumą padidina askorbo rūgštis, turinti geresnę prieigą prie MB, pritvirtinto prie vgDNR taikinio 5' galo. Signalų skirtumo padidėjimas, kai žymuo yra distaliai, o ne proksimaliai, atsižvelgiant į darbinio elektrodo paviršius, gali leisti panaudoti MB-askorbo rūgšties elektrokatalizinę sistemą, kad realiu laiku būtų stebima molekulinė sąveika, dėl kurios MB nutolsta nuo elektrodo paviršiaus, pakeičiant šį įprastai neigiamo signalo įvykį teigiamo signalo įvykiu, o tai yra svarbu gerinant nukleorūgštims paremtų biojutiklių veikimą (Zhang *et al.*, 2022).

CV matavimai su t2-MB5 oligonukleotidais rodo, kad šiuo atveju daugiau taikinio molekulių hibridizuojasi su paviršiuje pritvirtintais zondais, palyginti su anksčiau aprašyta z1 – t1-MB pora, tačiau CA matavimų metu užfiksuota srovė nepadidėjo tiek pat daug. Taigi z2 – t2-MB5 sistemos k_{ep} ir k_{kat} yra atitinkamai $0,11 \text{ s}^{-1}$ ir $0,05 \text{ s}^{-1}$, beveik viena eile mažesni nei ankstesniuose skyriuose aprašytiems oligonukleotidams. Tuo tarpu su t2-MB3 šie parametrai įgyja dar mažesnes reikšmes: $k_{ep} = 0,04 \text{ s}^{-1}$; $k_{kat} = 0,02 \text{ s}^{-1}$. Neatitikimas tarp t1-MB ir t2-MB5 oligonukleotidų gali atsirasti dėl galimo askorbo rūgšties masės pernašos į DNR monosluoksnį ribojimo: kai didėjant MB kiekiui ant paviršiaus askorbato jonai nepatenka ten taip greitai, kad signalo didėjimas būtų proporcingas MB kiekio didėjimui. Skirtumą tarp t2-MB5 ir t2-MB3 galima aiškinti tuo, kad MB žymens buvimas giliau DNR monosluoksnyje t2-MB3 atveju apsunkina MB-askorbo rūgšties sąveiką ir todėl sulėtina elektronų pernašą.

Įdomu yra ir tai, kad tiriant vienodo ilgio (25 nt) zondo – taikinio poras, kurių MB žymenys prijungti 5' gale (t. y. z1 – t1-MB pora ir z2 – t2-MB5 pora), gauti skirtingi hibridizacijos parametrai: tiek zMB_{max} , tiek k_{on} reikšmės buvo didesnės maždaug viena eile atliekant matavimus su z2 – t2-MB5 pora. Vienas iš galimų paaiškinimų tokiam rezultatų skirtumui galėtų būti skirtingos antrinės struktūros, kurias turi galimybę sudaryti tyrimų metu naudoti zondai. Pasitelkus *Integrated DNA Technologies Oligo Analyzer* internetinį įrankį (*Oligo Analyzer*, no date) buvo nustatyta, kad z1 gali sudaryti dvi plaukų segtuko struktūras, kurių T_m yra $47,1$ ir $45,7$ °C, o z2 gali sudaryti tris plaukų segtuko struktūras, kurių T_m svyruoja tarp $32,3$ ir $37,5$ °C (nurodytos temperatūros vertės nekoreguotos pagal druskos koncentraciją). Plaukų segtukų struktūros pateikiamos *1 Priede*. Tai, kad z1 sudaro stabilesnes antrines struktūras gali daryti įtaką hibridizacijos parametrui dėl dviejų priežasčių. Pirma, imobilizavimo metu vienas z1 oligonukleotidas dėl savo antrinės struktūros gali užimti daugiau elektrodo ploto, ir todėl ant paviršiaus imobilizuotis telpa mažiau zondo molekulių, ko pasekoje matavimai su z1 rodo mažesnes zMB_{max} vertes už matavimus su z2. Antra, pačių matavimų metu z1 gali sudaryti stabilesnius plaukų segtukus, todėl hibridizacijos kinetiką riboja ne tik taikinio patekimo prie elektrodo paviršiaus greitis, bet ir tai, kad vykstant hibridizacijai zondas turi išsilankstyti iš savo anksčiau įgautos konformacijos, ir šis išsilankstymas vyks lėčiau stabilesnio plaukų segtuko atveju.

Šiame skyriuje pademonstruota, kad heterogeninė hibridizacija gali reikšmingai skirtis identiškoms sekoms, kurių elektrochemiškai aktyvus žymuo pritvirtintas skirtinguose galuose. Tai, kad šis skirtumas padidėja CA matavimų metu leidžia manyti, kad principas galėtų būti pritaikomas, pavyzdžiui, baltymų, metalų jonų ar kitų analičių detekcijai panaudojant aptamerus, kurie taikinio surišimo metu atitolina savo žymenį nuo elektrodo paviršiaus (Curti *et al.*, 2022). Dar verta paminėti, kad pademonstravome, jog dvi vienodo ilgio (25 nt) oligonukleotidų sistemos pasižymėjo drastiškai skirtingais heterogeninės hibridizacijos parametrais. Rezultatai parodo, kad

kuriant diagnostines sistemas svarbu planuojamas naudoti atpažinimo ir taikinines sekas įvertinti eksperimentiškai, nes jų rišimosi kinetikos skirtumai gali nustebinti. Konkrečių nagrinėtų sekų atveju hibridizacijos greičio ir paviršiaus padengimo skirtumai galėjo atsirasti, pavyzdžiui, dėl to, kad vienas iš zondų yra linkęs sudaryti stabilesnę plaukų segtuką nei kitas, ir todėl stebime hibridizacijos reakciją, kuriai įvykti reikia ne tik taikinio – zondo susidūrimo, bet ir plaukų segtuko ištirpimo.

IŠVADOS

1. Askorbo rūgštis efektyviai redukuoja metileno mėlį, kuris gali būti reoksiduojamas ant elektrodo paviršiaus taip sukuriant elektrokatalizinį signalo stiprinimo ciklą. Pademonstruotas elektrokatalizinis procesas leidžia diferencijuoti vgDNR nuo dgDNR-MB, kai naudojama 10 mM ir didesnė askorbo rūgšties koncentracija.
2. MB-askorbo rūgšties elektrokatalizinis ciklas leidžia pasiekti elektronų pernašos konstantos vertes iki $1,02 \text{ s}^{-1}$ vienam hibridizacijos įvykiui ir, naudojant chronoamperometriją, realiu laiku (su 1 s laikine skyra) stebėti 25 nt ilgio vgDNR hibridizaciją koncentracijų ruože nuo 5 nM iki 100 nM.
3. Realus laiko heterogeninės hibridizacijos stebėjimo duomenys gerai aprašomi negrįžtamos hibridizacijos modeliu, kuris leidžia įvertinti hibridizacijos greičio konstantą ir maksimalų paviršiaus įsotinimą taikinio molekulėmis. Gaunami duomenys ir jų glaudinimo rezultatai yra tinkami tiriant tirpalo joninės jėgos įtaką hibridizacijos greičiui.
4. Gautų realaus laiko hibridizacijos duomenų pradinius taškus glaudinant tiesiniu modeliu galima per 5 min. įvertinti MB žymėto oligonukleotido koncentraciją tirpale.
5. Metileno mėlio prijungimas prie 3' taikinio oligonukleotido galo, kai šis hibridizuojasi prie zondo, imobilizuoto per 5' galą, sumažina maksimalų paviršiaus padengimą MB žymėtu taikiniu. Šį skirtumą galima stebėti ir be MB-AA elektrokatalizinio ciklo (matuojant CV), o jo pasitelkimas CA matavimų metu sustiprina žymens lokalizacijos įtaką signalo stiprumui lyginant su CV matavimais, ir gali būti potencialiai pritaikomas matuojant žymens nutolimo nuo elektrodo signalą kaip oksidacinės srovės padidėjimą.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Justina Gineitytė
Magistro baigiamasis darbas

ELEKTROKATALIZINIS DNR HIBRIDIZACIJOS SIGNALO STIPRINIMAS

SANTRAUKA

Heterogeninės nukleorūgščių hibridizacijos stebėjimas realiu laiku yra plačiai tyrinėjama sritis dėl jos pritaikymo ligų diagnostikoje, aplinkos monitoringe ir fundamentiniuose tyrimuose. Elektrocheminės hibridizacijos nuskaitymo metodai yra ypač perspektyvūs, nes jie žada puikų veikimą mažomis sąnaudomis, taip pat paruošimo ir matavimo protokolo paprastumą ir pritaikymą didelio našumo tyrimams. Tačiau aprašyti tik keli tyrimai, kurie atlieka elektrocheminį žymėtos DNR hibridizacijos nuskaitymą realiu laiku, o jų laiko skiriamoji geba bei detekcijos ribos nuvilia.

Šiuo magistro baigiamojo darbo metu buvo siekiama sukurti veiksmingą elektrocheminį metodą, skirtą stebėti chemiškai padidintą oligonukleotidų hibridizacijos signalą realiu laiku. Šio tyrimo tikslai: pademonstruoti veiksmingą elektrocheminio žymens, prijungto prie viengrandės vgDNR, signalo stiprinimą cheminiu būdu; įvertinti gautos elektrokatalizinės sistemos tinkamumą matuoti DNR heterogeninę hibridizaciją realiu laiku ir iš matavimų duomenų apskaičiuoti hibridizacijos parametrus; nustatyti, ar pademonstruota elektrokatalizinė sistema yra tinkama dviejų identiškose sekose oligonukleotidų, kurių elektrocheminis žymuo prijungtas skirtinguose galuose, diferencijavimui.

Ekperimentai buvo atlikti Gyvybės mokslų centro (VU) laboratorijose. Šviesos sugerties matavimai buvo atlikti naudojant BioDrop DUO ir Evolution™ 300 spektrofotometrų, siekiant iširti kelis galimus metileno mėlio (MB) reduktorius. Reference 600⁺ potenciostatas iš Gamry Instruments buvo naudojamas ciklinės voltamperometrijos ir chronoamperometrijos matavimams atlikti, kurie buvo reikalingi paruoštų jutiklių elektrodų funkcionalumui įvertinti, taip pat MB elektrokatalizės efektyvumo hibridizacijos signalo stiprinimui įrodyti. Gauti duomenys buvo išanalizuoti ir vizualizuoti naudojant *Wolfram Mathematica 11.2*.

Rezultatai parodė, kad askorbo rūgštis yra veiksmingas metileno mėlio (MB) reduktorius ir įgalina elektrokatalizinį ciklą, reikalingą DNR hibridizacijos stebėjimui realiu laiku su 1 s laiko skiriamąja geba. Matavimų rezultatai gali būti panaudojami hibridizacijos parametrų apskaičiavimui, pasiektos elektronų pernašos greičio konstantos iki 1,02 s⁻¹. MB pritvirtinimas prie skirtingų taikinio DNR galų parodė, kad elektronų pernaša pagreitėja, kai po hibridizacijos MB yra atokiau nuo elektrodo.

Justina Gineitytė
Master thesis

ELECTROCATALYTIC AMPLIFICATION OF DNA HYBRIDIZATION SIGNAL
SUMMARY

Monitoring of heterogeneous nucleic acid hybridization in real time is a widely researched field due to its applications in disease diagnostics, environmental monitoring, and fundamental science. Electrochemical hybridization readout methods are particularly promising due to their promise of excellent performance at low cost, as well as preparation and measurement protocol simplicity and applicability for high throughput studies. However, there are only a few studies described that perform electrochemical readout of labelled DNA hybridization in real time, and their temporal resolution, as well as detection limits, are disappointing,

This master's thesis aimed to develop an effective electrochemical tool for monitoring the chemically amplified hybridization signal of oligonucleotides in real time. The goals of this study were: to demonstrate an effective chemical signal amplification method for an electrochemical label attached to single-stranded DNA; evaluate the suitability of the electrocatalytic system to measure DNA hybridization in real time and calculate the hybridization parameters from obtained data; to determine whether the demonstrated electrocatalytic system is suitable for the differentiation of two oligonucleotides of identical sequences with an electrochemical label attached at different ends.

Experiments were performed in the laboratories at Life Sciences Center (VU). Light absorbance measurements were conducted with BioDrop DUO and Evolution™ 300 spectrophotometers to assay several prospective reducers of methylene blue. Reference 600⁺ potentiostat from Gamry instruments was used to execute cyclic voltammetry and chronoamperometry measurements which were needed to assess the functionality of prepared sensing electrodes, as well as prove the effectiveness of MB electrocatalysis for hybridization signal amplification. Obtained data were analyzed and visualized using *Wolfram Mathematica 11.2*.

The results showed that ascorbic acid is an effective reducer of MB and can enable the electrocatalytic cycle needed to amplify the signal of DNA hybridization with electron transfer rates of up to $1,02 \text{ s}^{-1}$. Hybridization monitoring with 1 s temporal resolution was achieved, and the calculation of hybridization parameters from obtained data was demonstrated. MB placement at different target ssDNA ends resulted in enhanced electron transfer when MB is positioned distally from the electrode after hybridization.

AUTORĖS PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS, DALYVAVIMAS MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE

Publikacijos:

1. Magistro baigiamojo darbo rezultatų pagrindu parengtas straipsnis pateiktas į žurnalą *Biosensors and Bioelectronics*: **Gineitytė, J.**, Serapinas, S., Ratautas, D. (?2023?) ‘Electrochemical DNA hybridization signal amplification using methylene blue and ascorbic acid’.
2. Serapinas, S., **Gineitytė, J.**, Butkevičius, M., Danilevičius, R., Dagys, M., Ratautas, D. (2022) ‘Biosensor prototype for rapid detection and quantification of DNase activity’, *Biosensors and Bioelectronics*, 213, 114475. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114475>. Cituojamumo indeksas (angl. *Impact factor*, IF): 12,545.
3. **Gineitytė, J.**, Meškys, R., Dagys, M., Ratautas, D. (2019) ‘Highly efficient direct electron transfer bioanode containing glucose dehydrogenase operating in human blood’, *Journal of Power Sources*, 441, 227163. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2019.227163>. IF: 9,794.

Patento paraiška:

1. D. Ratautas, S. Serapinas, **J. Gineitytė**, M. Butkevičius, R. Danilevičius, M. Dagys. Electrochemical system for the rapid and sensitive detection and quantification of nuclease-like activity exhibiting enzymes. EPO paraiškos numeris: EP22150566.2, pareiškėjai - UAB Bioanalizės sistemos, UAB Laboratorija 1, 2022.

Dalyvavimas konferencijose:

1. Skomantas Serapinas, **Justina Gineitytė**, Marius Butkevičius, Marius Dagys, Rapolas Danilevičius, Dalius Ratautas. *Electrochemical biosensor for deoxyribonuclease detection and measurement*. The COINS 2022. 2022 m. vasario 28 – kovo 3 d.; Vilnius, Lietuva. (Stendinis pranešimas). <https://www.thecoins.eu/static/resources/booksofabstracts/COINS2022.pdf>.
2. Skomantas Serapinas, **Justina Gineitytė**, Marius Butkevičius, Marius Dagys, Rapolas Danilevičius, Dalius Ratautas. *Biosensor for a Rapid and Sensitive Detection and Quantification of Nuclease Activity*. 241st ECS Meeting, 2022 m. gegužės 29 – birželio 2. Vankuveris, BC, Kanada. (Stendinis pranešimas). <https://doi.org/10.1149/MA2022-01542387mtgabs>.
3. **Justina Gineitytė**, Dalius Ratautas. *Electrochemical method for hybridisation signal amplification of methylene blue-labelled DNA oligonucleotides*. The COINS 2023. 2023 m. balandžio 24 – 27 d., Vilnius, Lietuva. (Stendinis pranešimas). <https://www.thecoins.eu/static/resources/booksofabstracts/COINS2023.pdf>
4. **Justina Gineitytė**, Dalius Ratautas. *Electrochemical method for hybridisation signal amplification of methylene blue-labelled DNA oligonucleotides*. Open Readings 2023. 2023 m. balandžio 18 – 21 d., Vilnius, Lietuva. (Stendinis pranešimas). https://www.openreadings.eu/wp-content/uploads/2023/05/OpenReadings23_abstract_book.pdf

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Bard, A.J., Faulkner, L.R. and White, H.S. (2022) *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, 3rd Edition*. John Wiley & Sons, Ltd.
2. Barou, E. *et al.* (2012) 'Electrochemistry of methylene blue at an alkanethiol modified electrode', *Electrochimica Acta*, 75, pp. 387–392. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.05.017>.
3. Bielec, K. *et al.* (2019) 'Kinetics and equilibrium constants of oligonucleotides at low concentrations. Hybridization and melting study', *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(20), pp. 10798–10807. Available at: <https://doi.org/10.1039/C9CP01295H>.
4. Boissinot, K. *et al.* (2021) 'Real-time monitoring of bead-based DNA hybridization in a microfluidic system: study of amplicon hybridization behavior on solid supports', *Analyst*, 146(13), pp. 4226–4234. Available at: <https://doi.org/10.1039/D1AN00394A>.
5. Boon, E.M. *et al.* (2000) 'Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes', *Nature Biotechnology*, 18(10), pp. 1096–1100. Available at: <https://doi.org/10.1038/80301>.
6. Britton, H.T.S. and Robinson, R.A. (1931) 'CXC VIII.—Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal', *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, (0), pp. 1456–1462. Available at: <https://doi.org/10.1039/JR9310001456>.
7. Capaldo, P. *et al.* (2016) 'Circulating Disease Biomarker Detection in Complex Matrices: Real-Time, In Situ Measurements of DNA/miRNA Hybridization via Electrochemical Impedance Spectroscopy', *ACS Sensors*, 1(8), pp. 1003–1010. Available at: <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00262>.
8. Caruso, F. *et al.* (1997) 'DNA binding and hybridization on gold and derivatized surfaces', *Sensors and Actuators B: Chemical*, 41(1), pp. 189–197. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(97\)80294-8](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(97)80294-8).
9. Chan, V. *et al.* (1997) 'Adsorption and Surface Diffusion of DNA Oligonucleotides at Liquid/Solid Interfaces', *Langmuir*, 13(2), pp. 320–329. Available at: <https://doi.org/10.1021/la960670b>.
10. Chan, V., Graves, D.J. and McKenzie, S.E. (1995) 'The biophysics of DNA hybridization with immobilized oligonucleotide probes', *Biophysical Journal*, 69(6), pp. 2243–2255. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80095-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80095-0).
11. Curti, F. *et al.* (2022) 'A Folding-Based Electrochemical Aptasensor for the Single-Step Detection of the SARS-CoV-2 Spike Protein', *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(17), pp. 19204–19211. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsaami.2c02405>.
12. Delpont, F. *et al.* (2012) 'Real-time monitoring of DNA hybridization and melting processes using a fiber optic sensor', *Nanotechnology*, 23(6), p. 065503. Available at: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/6/065503>.
13. Farjami, E., Campos, R. and Ferapontova, E.E. (2012) 'Effect of the DNA End of Tethering to Electrodes on Electron Transfer in Methylene Blue-Labeled DNA Duplexes', *Langmuir*, 28(46), pp. 16218–16226. Available at: <https://doi.org/10.1021/la3032336>.

14. Ferapontova, E. (2011) 'Electrochemical Indicators for DNA Electroanalysis', *Current Analytical Chemistry*, 7(1), pp. 51–62. Available at: <https://doi.org/10.2174/157341111793797617>.
15. Ferapontova, E.E. (2018) 'DNA Electrochemistry and Electrochemical Sensors for Nucleic Acids', *Annual Review of Analytical Chemistry*, 11(1), pp. 197–218. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061417-125811>.
16. Ferapontova, E.E. and Domínguez, E. (2003) 'Direct Electrochemical Oxidation of DNA on Polycrystalline Gold Electrodes', *Electroanalysis*, 15(7), pp. 629–634. Available at: <https://doi.org/10.1002/elan.200390079>.
17. Fritz, J. *et al.* (2002) 'Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), pp. 14142–14146. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.232276699>.
18. Furst, A.L., Hill, M.G. and Barton, J.K. (2014) 'Electrocatalysis in DNA sensors', *Polyhedron*, 84, pp. 150–159. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.poly.2014.07.005>.
19. García-González, R. and Fernández Abedul, M.T. (2020) 'Chapter 24 - Electrochemical behavior of the dye methylene blue on screen-printed gold electrodes modified with carbon nanotubes', in M.T. Fernandez Abedul (ed.) *Laboratory Methods in Dynamic Electroanalysis*. Elsevier, pp. 243–254. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815932-3.00024-3>.
20. Gooding, J.J. (2002) 'Electrochemical DNA Hybridization Biosensors', *Electroanalysis*, 14(17), pp. 1149–1156. Available at: [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200209\)14:17<1149::AID-ELAN1149>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200209)14:17<1149::AID-ELAN1149>3.0.CO;2-8).
21. Guo, Y. *et al.* (2013) 'A silicon-based electrochemical sensor for highly sensitive, specific, label-free and real-time DNA detection', *Nanotechnology*, 24(44), p. 444012. Available at: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/44/444012>.
22. Herne, T.M. and Tarlov, M.J. (1997) 'Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces', *Journal of the American Chemical Society*, 119(38), pp. 8916–8920. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja9719586>.
23. Islam, Md.N. *et al.* (2018) 'Gold-loaded nanoporous ferric oxide nanocubes for electrocatalytic detection of microRNA at attomolar level', *Biosensors and Bioelectronics*, 101, pp. 275–281. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.027>.
24. Kanik, F.E. *et al.* (2022) 'Attomolar sensitivity microRNA detection using real-time digital microarrays', *Scientific Reports*, 12(1), p. 16220. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19912-z>.
25. Kelley, S.O. *et al.* (1998) 'Orienting DNA Helices on Gold Using Applied Electric Fields', *Langmuir*, 14(24), pp. 6781–6784. Available at: <https://doi.org/10.1021/la980874n>.
26. Kelley, S.O. *et al.* (1999) 'Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA', *Nucleic Acids Research*, 27(24), pp. 4830–4837. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/27.24.4830>.
27. Khuda, N. *et al.* (2023) 'Ionic Strength and Hybridization Position near Gold Electrodes Can Significantly Improve Kinetics in DNA-Based Electrochemical Sensors', *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(4), pp. 5019–5027. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsami.2c22741>.

28. Kibbe, W.A. (2007) 'OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator', *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), pp. W43–W46. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm234>.
29. Kuriyan, J., Konforti, B. and Wemmer, D. (2012) 'From Genes to RNA and Proteins', in *The Molecules of Life*. W.W. Norton & Company. Available at: <https://doi.org/10.1201/9780429258787-7>
30. Lai, R.Y. *et al.* (2006) 'Differential Labeling of Closely Spaced Biosensor Electrodes via Electrochemical Lithography', *Langmuir*, 22(4), pp. 1932–1936. Available at: <https://doi.org/10.1021/la052132h>.
31. Lander, E.S. *et al.* (2001) 'Initial sequencing and analysis of the human genome', *Nature*, 409(6822), pp. 860–921. Available at: <https://doi.org/10.1038/35057062>.
32. Lao, R. *et al.* (2005) 'Electrochemical Interrogation of DNA Monolayers on Gold Surfaces', *Analytical Chemistry*, 77(19), pp. 6475–6480. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac050911x>.
33. Lemeshko, S.V. *et al.* (2001) 'Oligonucleotides form a duplex with non-helical properties on a positively charged surface', *Nucleic Acids Research*, 29(14), pp. 3051–3058. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/29.14.3051>.
34. Levicky, R. *et al.* (1998) 'Using Self-Assembly To Control the Structure of DNA Monolayers on Gold: A Neutron Reflectivity Study', *Journal of the American Chemical Society*, 120(38), pp. 9787–9792. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja981897r>.
35. Liao, J.C. *et al.* (2006) 'Use of Electrochemical DNA Biosensors for Rapid Molecular Identification of Uropathogens in Clinical Urine Specimens', *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2), pp. 561–570. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.561-570.2006>.
36. Liu, G. *et al.* (2008) 'An Enzyme-Based E-DNA Sensor for Sequence-Specific Detection of Femtomolar DNA Targets', *Journal of the American Chemical Society*, 130(21), pp. 6820–6825. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja800554t>.
37. Liu, L. (2019) 'Nucleic Acid Amplification Strategies Based on QCM', in S. Zhang, S. Bi, and X. Song (eds) *Nucleic Acid Amplification Strategies for Biosensing, Bioimaging and Biomedicine*. Singapore: Springer, pp. 197–209. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-13-7044-1_10.
38. Ma, X. *et al.* (2021) 'p-Co-BDC/AuNPs-based multiple signal amplification for ultra-sensitive electrochemical determination of miRNAs', *Analytica Chimica Acta*, 1183, p. 338979. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338979>.
39. Mowry, S. and Ogren, P.J. (1999) 'Kinetics of Methylene Blue Reduction by Ascorbic Acid', *Journal of Chemical Education*, 76(7), p. 970. Available at: <https://doi.org/10.1021/ed076p970>.
40. Okahata, Y. *et al.* (1992) 'Hybridization of nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance', *Journal of the American Chemical Society*, 114(21), pp. 8299–8300. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja00047a056>.
41. *Oligo Analyzer* (no date). Available at: <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer> (Accessed: 15 May 2023).
42. Paleček, E. (1960) 'Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid', *Nature*, 188(4751), pp. 656–657. Available at: <https://doi.org/10.1038/188656a0>.

43. Paleček, E. *et al.* (1993) 'Biopolymer-modified electrodes in the voltammetric determination of nucleic acids and proteins at the submicrogram level', *Analytica Chimica Acta*, 273(1), pp. 175–186. Available at: [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)80156-F](https://doi.org/10.1016/0003-2670(93)80156-F).
44. Pande, S. *et al.* (2006) 'Reduction of methylene blue by thiocyanate: Kinetic and thermodynamic aspects', *Journal of Colloid and Interface Science*, 299(1), pp. 421–427. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.01.052>.
45. Pattnaik, P. (2005) 'Surface plasmon resonance', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 126(2), pp. 79–92. Available at: <https://doi.org/10.1385/ABAB:126:2:079>.
46. Pellitero, M.A., Shaver, A. and Arroyo-Currás, N. (2020) 'Critical Review—Approaches for the Electrochemical Interrogation of DNA-Based Sensors: A Critical Review', *Journal of The Electrochemical Society*, 167(3), p. 037529. Available at: <https://doi.org/10.1149/2.0292003JES>.
47. Peter, C. *et al.* (2001) 'Optical DNA-sensor chip for real-time detection of hybridization events', *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 371(2), pp. 120–127. Available at: <https://doi.org/10.1007/s002160101006>.
48. Peterlinz, K.A. *et al.* (1997) 'Observation of Hybridization and Dehybridization of Thiol-Tethered DNA Using Two-Color Surface Plasmon Resonance Spectroscopy', *Journal of the American Chemical Society*, 119(14), pp. 3401–3402. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja964326c>.
49. Petrovykh, D.Y. *et al.* (2003) 'Quantitative Analysis and Characterization of DNA Immobilized on Gold', *Journal of the American Chemical Society*, 125(17), pp. 5219–5226. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja029450c>.
50. Pheaney, C.G. and Barton, J.K. (2012) 'DNA Electrochemistry with Tethered Methylene Blue', *Langmuir*, 28(17), pp. 7063–7070. Available at: <https://doi.org/10.1021/la300566x>.
51. Pheaney, C.G. and Barton, J.K. (2013) 'Intraduplex DNA-Mediated Electrochemistry of Covalently Tethered Redox-Active Reporters', *Journal of the American Chemical Society*, 135(40), pp. 14944–14947. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja408135g>.
52. Pheaney, C.G., Guerra, L.F. and Barton, J.K. (2012) 'DNA sensing by electrocatalysis with hemoglobin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(29), pp. 11528–11533. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1201551109>.
53. Porter, M.D. *et al.* (1987) 'Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry', *Journal of the American Chemical Society*, 109, pp. 3559–3568. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja00246a011>.
54. Rant, U. *et al.* (2006) 'Electrical manipulation of oligonucleotides grafted to charged surfaces', *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4(18), pp. 3448–3455. Available at: <https://doi.org/10.1039/B605712H>.
55. Rao, A.N., Rodesch, C.K. and Grainger, D.W. (2012) 'Real-Time Fluorescent Image Analysis of DNA Spot Hybridization Kinetics To Assess Microarray Spot Heterogeneity', *Analytical Chemistry*, 84(21), pp. 9379–9387. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac302165h>.

56. Rodrigo, M. *et al.* (2014) 'Electrochemical Microarray for Identification Pathogens: A Review', *International Journal of Electrochemical Science*, 9, pp. 3431–3439. Available at: <http://www.electrochemsci.org/papers/vol9/90703431.pdf>
57. Schwille, P., Oehlschläger, F. and Walter, N.G. (1996) 'Quantitative Hybridization Kinetics of DNA Probes to RNA in Solution Followed by Diffusional Fluorescence Correlation Analysis', *Biochemistry*, 35(31), pp. 10182–10193. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi960517g>.
58. Serapinas, S. *et al.* (2022) 'Biosensor prototype for rapid detection and quantification of DNase activity', *Biosensors and Bioelectronics*, 213, p. 114475. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114475>.
59. Shen, H. *et al.* (1997) 'Blocking behavior of self-assembled monolayers on gold electrodes', *Journal of Solid State Electrochemistry*, 1(2), pp. 148–154. Available at: <https://doi.org/10.1007/s100080050039>.
60. Snehalatha, T., Rajanna, K.C. and Saiprakash, P.K. (1997) 'Methylene Blue - Ascorbic Acid: An Undergraduate Experiment in Kinetics', *Journal of Chemical Education*, 74(2), p. 228. Available at: <https://doi.org/10.1021/ed074p228>.
61. Southern, E.M. (1975) 'Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis', *Journal of Molecular Biology*, 98(3), pp. 503–517. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(75\)80083-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(75)80083-0).
62. Steel, A.B., Herne, T.M. and Tarlov, M.J. (1998) 'Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold', *Analytical Chemistry*, 70(22), pp. 4670–4677. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac980037q>.
63. Su, Q., Vogt, S. and Nöll, G. (2018) 'Langmuir Analysis of the Binding Affinity and Kinetics for Surface Tethered Duplex DNA and a Ligand–Apoprotein Complex', *Langmuir*, 34(49), pp. 14738–14748. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b04347>.
64. Takenaka, S. *et al.* (2000) 'DNA Sensing on a DNA Probe-Modified Electrode Using Ferrocenylnaphthalene Diimide as the Electrochemically Active Ligand', *Analytical Chemistry*, 72(6), pp. 1334–1341. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac991031j>.
65. Thapa, K., Liu, W. and Wang, R. (2022) 'Nucleic acid-based electrochemical biosensor: Recent advances in probe immobilization and signal amplification strategies', *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 14(1), p. e1765. Available at: <https://doi.org/10.1002/wnan.1765>.
66. Tian, R. *et al.* (2019) 'High performance electrochemical biosensor based on 3D nitrogen-doped reduced graphene oxide electrode and tetrahedral DNA nanostructure', *Talanta*, 194, pp. 273–281. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.110>.
67. Trotter, M. *et al.* (2020) 'Review: Electrochemical DNA sensing – Principles, commercial systems, and applications', *Biosensors and Bioelectronics*, 154, p. 112069. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112069>.
68. Venter, J.C. *et al.* (2001) 'The Sequence of the Human Genome', *Science*, 291(5507), pp. 1304–1351. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1058040>.
69. Wang, J. *et al.* (1999) 'Electrochemically Induced Release of DNA from Gold Ultramicroelectrodes', *Langmuir*, 15(19), pp. 6541–6545. Available at: <https://doi.org/10.1021/la9905315>.

70. de Winter, J.C.F. (2019) 'Using the Student's t-test with extremely small sample sizes', *Practical Assessment, Research, and Evaluation*, 18(1). Available at: <https://doi.org/10.7275/e4r6-dj05>.
71. Xu, B. *et al.* (2015) 'An ultrasensitive DNA biosensor based on covalent immobilization of probe DNA on fern leaf-like α -Fe₂O₃ and chitosan Hybrid film using terephthalaldehyde as arm-linker', *Biosensors and Bioelectronics*, 72, pp. 175–181. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.015>.
72. Xu, S. *et al.* (2017) 'Real-time reliable determination of binding kinetics of DNA hybridization using a multi-channel graphene biosensor', *Nature Communications*, 8(1), p. 14902. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms14902>.
73. Yamaguchi, Shuichiro. *et al.* (1993) 'Adsorption, immobilization, and hybridization of DNA studied by the use of quartz crystal oscillators', *Analytical Chemistry*, 65(14), pp. 1925–1927. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac00062a019>.
74. Yogeswaran, U. and Chen, S.-M. (2008) 'Multi-walled carbon nanotubes with poly(methylene blue) composite film for the enhancement and separation of electroanalytical responses of catecholamine and ascorbic acid', *Sensors and Actuators B: Chemical*, 130(2), pp. 739–749. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.10.040>.
75. Zhang, J. *et al.* (2007) 'DNA hybridization "turns on" electrocatalysis at gold electrodes', *Chemical Communications*, (11), pp. 1154–1156. Available at: <https://doi.org/10.1039/B615742D>.
76. Zhang, Z. *et al.* (2022) 'Development of Nucleic-Acid-Based Electrochemical Biosensors for Clinical Applications', *Angewandte Chemie International Edition*, 61(50), p. e202212496. Available at: <https://doi.org/10.1002/anie.202212496>.
77. Zheng, T. *et al.* (2014) 'Robust Nonenzymatic Hybrid Nanoelectrocatalysts for Signal Amplification toward Ultrasensitive Electrochemical Cytosensing', *Journal of the American Chemical Society*, 136(6), pp. 2288–2291. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja500169y>.
78. Zhou, X. *et al.* (2022) 'Recent Advances in Signal Amplification to Improve Electrochemical Biosensing for Infectious Diseases', *Frontiers in Chemistry*, 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2022.911678> (Accessed: 9 January 2023).

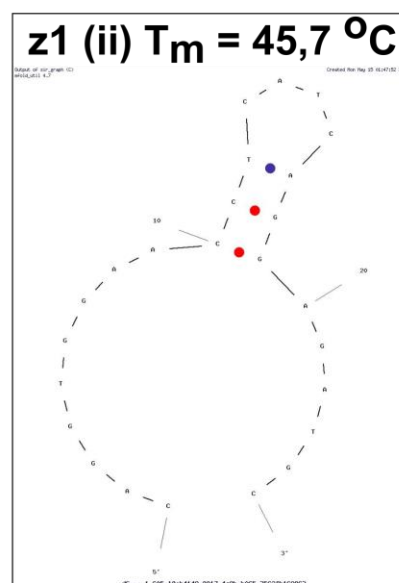
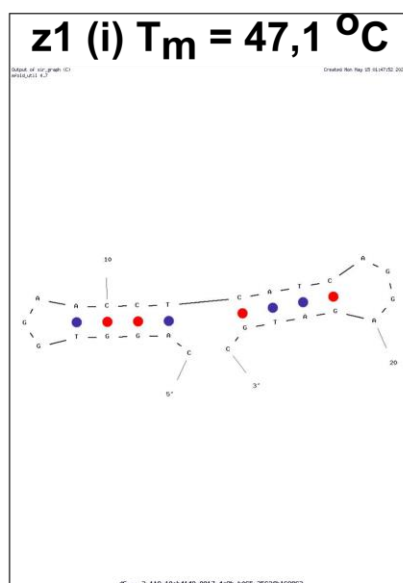
PADEKA

Dėkoju savo darbo vadovui dr. Daliui Ratautui už vertingus patarimus ir visokeriopą pagalbą darbo metu. Taip pat dėkoju Vilniaus universiteto Biochemijos instituto Bioanalizės skyriui bei jo vadovui dr. Mariui Dagiui už magistro baigiamajam darbui atlikti suteiktas priemones bei infrastruktūrą, pagalbą ir patarimus.

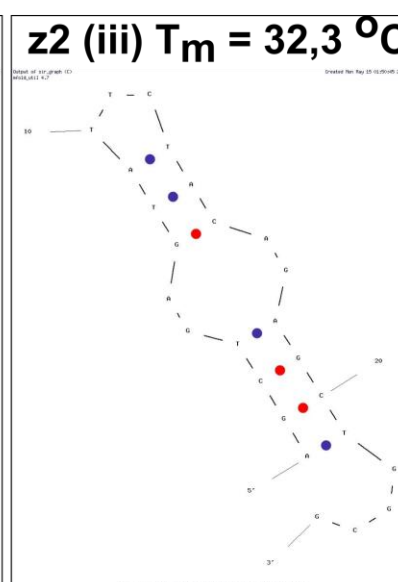
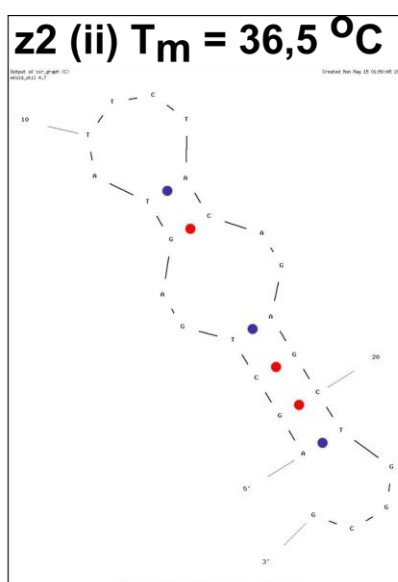
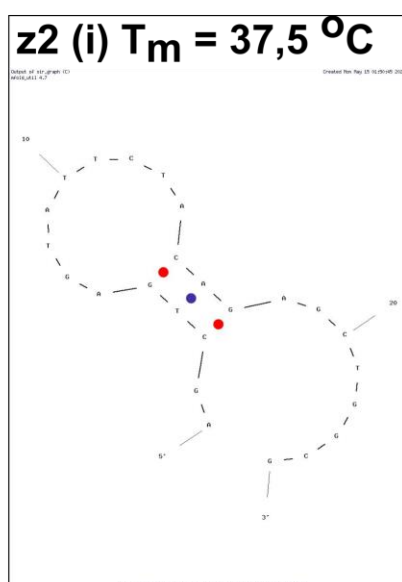
PRIEDAI

1 priedas. Gaudymo zondo oligonukleotidų galimos antrinės struktūros.

A



B



1 pav. Galimos antrinės zondų struktūros. **A** - z1, **B** – z2. Ilustracijų viršuje pateikiamos darinių lydymosi temperatūros (nekoreguotos pagal druskos koncentraciją). Struktūros sumodeliuotos ir lydymosi temperatūros apskaičiuotos naudojant *Integrated DNA Technologies Oligo Analyzer* internetinį įrankį (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>)