

PROJEKTOWANIE NARZĘDZI (BIO)ANALITYCZNYCH WYKORZYSTUJĄCYCH KWASY NUKLEINOWE - OD ODDZIAŁYWAŃ MOLEKULARNYCH DO ZASTOSOWAŃ PRAKTYCZNYCH

DESIGNING (BIO)ANALYTICAL TOOLS INVOLVING NUCLEIC ACIDS - FROM MOLECULAR INTERACTIONS TO PRACTICAL APPLICATIONS

**Anna Szymczyk-Drozd^{1,*}, Elżbieta Malinowska^{1,2},
Robert Ziółkowski¹**

¹*Katedra Biotechnologii Medycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika
Warszawska, ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa*

²*Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii CEZAMAT, Politechnika
Warszawska, ul. Poleczki 19, 02-822 Warszawa*

**e-mail: anna.szymczyk@pw.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Oddziaływania molekularne jako podstawa projektowania elektrochemicznych biosensorów DNA
2. Wpływ sposobu immobilizacji receptorów i organizacji monowarstwy na parametry pracy genosensorów
3. Jakość powierzchni przetwornika jako czynnik determinujący parametry miniaturowych biosensorów DNA
4. Nowe sekwencje i mechanizmy generowania sygnału w elektrochemicznych aptasensorach DNA na potrzeby analityki środowiskowej
 - 4.1. Aptasensor do oznaczania jonów rtęci(II)
 - 4.2. Aptasensor do oznaczania anionów selenianowych(VI)

Podsumowanie

Kierunki dalszych badań i perspektywy rozwoju elektrochemicznych biosensorów DNA

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr inż. Anna Szymczyk-Drozd w październiku 2020 r. rozpoczęła kształcenie w Szkole Doktorskiej Politechniki Warszawskiej, podejmując interdyscyplinarną tematykę projektowania biosensorów DNA, łączącą w sobie chemię analityczną, biotechnologię, fizykochemię powierzchni, elektrochemię oraz elementy nanotechnologii. W okresie od września 2023 r. do kwietnia 2024 r. odbyła łącznie czteromiesięczny staż badawczy w grupie badawczej prof. Giovanni Marrazzy na Wydziale Chemii „Ugo Schiff” na Uniwersytecie we Florencji. Autorka 11 artykułów w czasopismach z listy filadelfijskiej o indeksie Hirscha 5. We wrześniu 2025 r. obroniła pracę doktorską na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, uzyskując stopień doktora nauk chemicznych. Praca została nagrodzona w konkursie Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk za najlepszą rozprawę doktorską w dziedzinie elektrochemii w 2026 r. Jest kierownikiem projektu PRELUDIUM 23 Narodowego Centrum Nauki, obecnie zatrudniona na stanowisku adiunkta badawczo-dydaktycznego w Katedrze Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Wyróżniona w *Top 100 Women in Biotech in Poland* - zestawieniu przygotowanym przez Fundację Edukacyjną *Perspektywy*. Jej obecne zainteresowania naukowe koncentrują się na projektowaniu narzędzi (bio)analitycznych wykorzystujących kwasy nukleinowe.



<https://orcid.org/0000-0003-2100-4169>

Dr hab. inż. Robert Ziółkowski, prof. PW od czasu studiów związany jest z Wydziałem Chemicznym Politechniki Warszawskiej, gdzie uzyskał stopień doktora nauk chemicznych (2013), a następnie doktora habilitowanego (2022). Jest autorem ponad 40 artykułów opublikowanych w czasopismach indeksowanych w bazie Web of Science, a jego indeks Hirscha wynosi 16. Wielokrotnie wyróżniany za działalność naukową, m.in. Nagrodą Rajchmana oraz nagrodami JM Rektora Politechniki Warszawskiej. Jako kierownik i wykonawca uczestniczył w realizacji projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju oraz Agencję Badań Medycznych. Jego zainteresowania badawcze koncentrują się na projektowaniu i rozwijaniu elektrochemicznych sensorów i biosensorów przeznaczonych do oznaczania kwasów nukleinowych oraz biomarkerów istotnych klinicznie. Szczególną uwagę poświęca modyfikacji powierzchni przetworników, ograniczaniu nieswoistej adsorpcji, wykorzystaniu nanomateriałów oraz integracji biosensorów z układami mikroprzepływowymi i platformami typu Point-of-Care.



<https://orcid.org/0000-0001-7225-0904>

Prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska od czasu studiów związana z Wydziałem Chemicznym PW, gdzie uzyskała stopień doktora (1984), doktora habilitowanego (2002) oraz tytuł profesora (2007). Autorka ponad 145 artykułów w czasopismach z listy filadelfijskiej o indeksie Hirscha 35. Pełni również funkcję Pełnomocnika ds. strategicznych projektów w zakresie biotechnologii w Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii CEZAMAT PW. Wielokrotna laureatka nagród naukowych (m. in. Nagrody Rajchmana, JM Rektora PW, *World's TOP 2% Scientists* 2023 i 2024). Jej główne zainteresowania naukowe koncentrują się na projektowaniu warstw receptorowych czujników chemicznych i biosensorów. Wielokrotna recenzentka doktoratów/habilitacji, kierownik projektów badawczych NCN, NCBiR i MNiSW związanych z systemami typu *Point-of-Care* (PoCT) przeznaczonymi do wykrywania istotnych klinicznie biomarkerów.



<https://orcid.org/0000-0003-4784-7674>

ABSTRACT

Electrochemical DNA biosensors represent a family of modern analytical tools that enable rapid, sensitive, and cost-effective detection of biomarkers directly at the point of care. In recent years, the development of this class of sensors has focused primarily on miniaturization and integration into portable diagnostic platforms. Concurrently, growing attention is paid to the interfacial phenomena occurring between the transducer surface, the receptor layer, and sample components, as these fundamentally govern biosensor sensitivity, selectivity, stability, and reproducibility of its performance.

This article highlights how insights into interphase molecular behaviour guide the engineering of functional receptor layers. We present the impact of key operational variables, such as the surface-blocking agent, transducer fabrication method, and measurement conditions, on overall assay performance. The discussed concepts are illustrated through practical applications, including the detection of genetic biomarkers for SARS-CoV-2 and *Corynebacterium diphtheriae*, as well as the determination of toxic species: mercury(II) and selenate(VI) ions. Specifically, diethyldithiocarbamate (DEDTC) as a surface-blocking agent reduced non-specific binding and enhanced signal quality more effectively than conventional mercaptohexanol (MCH). Furthermore, gold electrodes fabricated *via* physical vapor deposition (PVD) yielded superior reproducibility and structural uniformity compared to screen-printed counterparts. These findings demonstrate that engineering the sensor interface is essential to obtain reliable analytical response in miniaturized (bio)analytical tools for decentralized testing.

Overall, this work provides critical design guidelines for receptor layer architecture at the electrode–solution interface. The developed biosensors demonstrate strong potential for applications in medical diagnostics and environmental monitoring, with PVD technology enabling the next generation of cheap, portable diagnostic devices.

Keywords: electrochemical DNA biosensors, molecular interactions, aptasensors, self-assembled monolayers, environmental analysis, molecular diagnostics

Słowa kluczowe: elektrochemiczne biosensory DNA, oddziaływania molekularne, aptasensory, samoorganizujące się monowarstwy, analiza środowiskowa, diagnostyka molekularna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

BDT – ang. *1,4-benzenedithiol*, 1,4-benzenoditiol

CHC – ang. *cysteamine*, cysteamina

CV – ang. *cyclic voltammetry*, woltamperometria cykliczna

DEDTC – ang. *sodium diethyldithiocarbamate*, dietyloditiokarbaminian sodu

E – ang. *envelope*, białko otoczki

EBA – ang. *electrode blocking agent*, środek blokujący powierzchnię elektrody/ wypełniacz

EDTA – ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*, kwas etylenodiaminotetraoctowy

EIS – ang. *electrochemical impedance spectroscopy*, elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna

LOD – ang. *limit of detection*, granica wykrywalności

MCH – ang. *6-mercaptohexan-1-ol*, 6-merkaptoheksan-1-ol

MOPS – ang. *3-(N-morpholino)propanesulfonic acid*, kwas 3-(N-morfolino)propanosulfonowy

MB – ang. *methylene blue*, błękit metylenowy

N – ang. *nucleocapsid*, białko nukleokapsydu koronawirusa

2-PhET – ang. *2-phenylethanethiol*, 2-fenyletioetylotiol

PoCT – ang. *point-of-care testing*, w miejscu opieki nad pacjentem

PVD – ang. *physical vapour deposition*, fizyczne osadzanie z fazy gazowej

SAM – ang. *self-assembled monolayer*, monowarstwa samoorganizująca się

SARS-CoV-2 – ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego

SELEX – ang. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*, systematyczna ewolucja ligandów poprzez wzbogacanie

ssDNA – ang. *single-stranded DNA*, jednoniciowy DNA

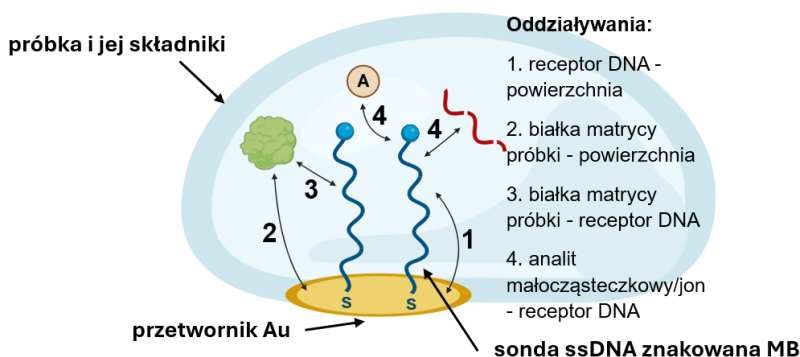
SWV – ang. *square wave voltammetry*, woltamperometria fali prostokątnej

WPROWADZENIE

Dynamiczny rozwój współczesnej diagnostyki medycznej oraz analizy środowiskowej powoduje stałe zapotrzebowanie na metody analityczne pozwalające na szybkie, wiarygodne i selektywne oznaczanie szerokiego spektrum analitów. Coraz większego znaczenia nabierają rozwiązania umożliwiające wykonywanie oznaczeń bezpośrednio w miejscu pobrania próbki (*point-of-care*), z pominięciem czasochłonnych procedur laboratoryjnych. W odpowiedzi na te potrzeby intensywnie rozwijane są biosensory elektrochemiczne wykorzystujące kwasy nukleinowe jako elementy rozpoznające. Łączą one wysoką swoistość oddziaływań molekularnych z prostotą i możliwością miniaturyzacji układów pomiarowych. Dzięki wykorzystaniu sond oligonukleotydowych oraz aptamerów DNA i RNA możliwe jest wykrywanie zarówno materiału genetycznego drobnoustrojów, jak i jonów metali, białek, toksyn czy innych związków o znaczeniu klinicznym i środowiskowym [1,2].

Mimo intensywnego rozwoju technologii biosensorowych, istotnym wyzwaniem pozostaje jednoczesne uzyskanie wysokiej czułości, selektywności oraz stabilności sygnału. W praktyce właściwości te zależą nie tylko od powinowactwa zastosowanego receptora do analitu, lecz również od szeregu zjawisk zachodzących na granicy faz pomiędzy powierzchnią przetwornika, warstwą receptorową a środowiskiem pomiarowym. Zjawiska związane z immobilizacją biologicznych elementów rozpoznających, adsorpcją składników matrycy próbki, tworzeniem samoorganizujących się monowarstw (SAM) oraz transportem analitu do powierzchni elektrody przekładają się na proces rozpoznania molekularnego, wpływając zarówno na jego przebieg, jak i na końcową odpowiedź elektrochemiczną biosensora DNA. Rosnąca liczba publikacji wskazuje, że precyzyjna kontrola tych procesów stanowi obecnie jeden z kluczowych kierunków rozwoju elektrochemicznych biosensorów DNA [3,4].

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie znaczenia oddziaływań molekularnych zachodzących w obrębie warstwy receptorowej (Rysunek 1) oraz omówienie strategii ich wykorzystania podczas projektowania nowoczesnych narzędzi (bio)analitycznych. Szczególną uwagę poświęcono wpływowi architektury warstw receptorowych, właściwości powierzchni przetworników oraz składu medium pomiarowego na parametry pracy biosensorów. Omawiane zagadnienia zostały zilustrowane przykładami praktycznych zastosowań opracowanych konstrukcji w diagnostyce molekularnej i analizie środowiskowej.



Rysunek 1. Schemat ilustrujący wzajemne oddziaływania w obrębie warstwy receptorowej i badanej próbki, towarzyszące funkcjonowaniu biosensorów elektrochemicznych

Figure 1. A diagram illustrating the interactions within the receptor layer and tested sample, involved in the working of electrochemical biosensors

1. ODDZIAŁYWANIA MOLEKULARNE JAKO PODSTAWA PROJEKTOWANIA ELEKTROCHEMICZNYCH BIOSENSORÓW DNA

Rozpoznawanie molekularne stanowi podstawę działania wszystkich biosensorów DNA, t.j. biosensorów wykorzystujących kwasy nukleinowe jako elementy receptorowe. W klasycznym ujęciu użyteczność analityczna biosensora utożsamiana jest przede wszystkim z wysokim powinowactwem sondy DNA lub aptameru do oznaczanego analitu. W rzeczywistości rejestrowana odpowiedź elektrochemiczna stanowi wynik złożonego układu zależności zachodzących jednocześnie pomiędzy powierzchnią przetwornika, warstwą receptorową, składnikami próbki oraz środowiskiem pomiarowym. To właśnie wypadkowa tych procesów decyduje o końcowej czułości, selektywności i stabilności biosensora oraz powtarzalności uzyskiwanej odpowiedzi [5].

W przeciwieństwie do oddziaływań zachodzących w roztworze, które są stosunkowo dobrze poznane, w biosensorach większość procesów przebiega na granicy faz. Imobilizacja sond oligonukleotydowych, organizacja warstwy receptorowej, transport analitu do powierzchni elektrody oraz proces wymiany elektronów zachodzą równocześnie i wzajemnie na siebie oddziałują. Nawet niewielkie zmiany właściwości powierzchni mogą prowadzić do istotnych zmian rejestrowanej odpowiedzi elektrochemicznej, mimo że sam mechanizm rozpoznania mole-

kularnego pozostaje niezmieniony względem tego samego oddziaływania w roztworze [6].

W projektowaniu biosensorów szczególnie istotne jest rozróżnienie oddziaływań pożądaných i niepożądanych. Do pierwszej grupy należą procesy odpowiedzialne za trwałą immobilizację receptorów, tworzenie uporządkowanych samoorganizujących się monowarstw, specyficzne wiązanie analitu oraz kontrolowany transport znaczników elektroaktywnych względem powierzchni elektrody. Procesy związane z formowaniem warstwy receptorowej powinny przebiegać powtarzalnie, umożliwiając standaryzację wytwarzania warstw receptorowych. Z kolei odpowiedź wynikająca z powinowactwa receptora do analitu powinna być zależna, a najlepiej wprost proporcjonalna do jego stężenia w próbce, co gwarantuje szeroki zakres odpowiedzi dynamicznej. Znacznie większym wyzwaniem pozostają niepożądane oddziaływania niespecyficzne. Adsorpcja białek, składników buforów lub innych związków obecnych w próbce może prowadzić do blokowania powierzchni elektrody, zmian konformacji unieruchomionych receptorów, wzrostu sygnału tła oraz pogorszenia selektywności oznaczeń. Zjawiska te mają szczególne znaczenie podczas analizy próbek biologicznych i środowiskowych, których skład jest znacznie bardziej złożony niż roztworów wzorcowych [7].

Coraz więcej badań potwierdza, że ograniczenie oddziaływań niespecyficznych nie polega wyłącznie na zastosowaniu odpowiedniego receptora molekularnego o wysokiej selektywności. Równie istotne jest świadome projektowanie całości architektury warstwy receptorowej oraz ściśle monitorowanie warunków, w jakich zachodzi wiązanie analitu. Obejmuje to dobór sposobu immobilizacji receptorów, zastosowanie odpowiednich związków blokujących wolne miejsca na powierzchni elektrody, regulację gęstości upakowania sond oraz optymalizację składu roztworów pomiarowych i kondycjonujących [8,9].

Ważnym elementem tego podejścia jest uwzględnienie wpływu środowiska pomiarowego. Skład buforu, siła jonowa, pH czy obecność białek i innych składników matrycy wpływają zarówno na konformację receptorów, jak i na stabilność powstających kompleksów receptor-analit. Parametry te determinują kinetykę transportu masy do powierzchni elektrody oraz przebieg procesów elektrochemicznych odpowiedzialnych za generowanie sygnału analitycznego. W konsekwencji dobór warunków pomiarowych staje się integralnym elementem projektowania i rozwoju biosensora, a nie jedynie etapem jego walidacji [10].

Opisane wyżej podejście traktujące biosensor jako system wzajemnie powiązanych procesów stanowiło podstawę badań opisanych w niniejszej pracy. Poszczególne etapy obejmowały analizę wpływu składu warstwy receptorowej, rodzaju materiału elektrodowego oraz środowiska reakcyjnego na odpowiedź elektrochemiczną biosensorów. Otrzymane rezultaty umożliwiły optymalizację architektury warstwy rozpoznającej, poprawę kluczowych parametrów analitycznych opracowanych układów i rozszerzenie możliwości praktycznych zastosowań.

2. WPLYW SPOSOBU IMMOBILIZACJI RECEPTORÓW I ORGANIZACJI MONOWARSTWY NA PARAMETRY PRACY GENOSENSORÓW

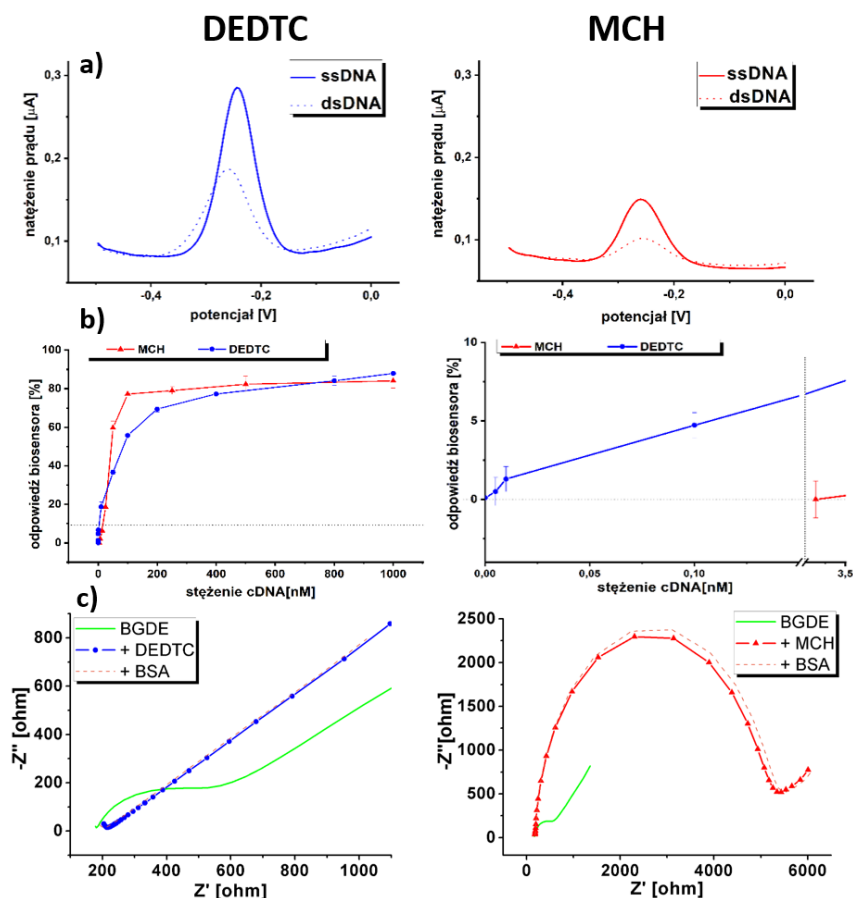
Kluczowym warunkiem prawidłowego działania biosensora jest wysoka dostępność unieruchomionych receptorów, minimalizacja adsorpcji niespecyficznej oraz wydajny transfer elektronów [11-13]. Jednym z najczęściej stosowanych sposobów modyfikacji złotych elektrod jest tworzenie samoorganizujących się monowarstw z wykorzystaniem tiolowanych oligonukleotydów. Rozwiązanie to pozwala na trwałe unieruchomienie sond DNA dzięki tworzeniu wiązań Au-S oraz uzyskanie uporządkowanej warstwy receptorowej [14-15]. Jednocześnie pozostające pomiędzy unieruchomionymi sondami wolne obszary powierzchni wymagają zastosowania odpowiednich związków wypełniających (EBA), których zadaniem jest stabilizacja monowarstwy oraz ograniczenie niespecyficznej adsorpcji.

Najczęściej stosowanym związkiem blokującym jest 6-merkapto-1-heksanol (MCH), który od wielu lat stanowi standard w konstrukcji biosensorów DNA z uwagi na jego strukturalne podobieństwo do tiolowanych linkerów sześciowęglowych wykorzystywanych do znakowania sond oligonukleotydowych [16-18]. Pomimo powszechnego zastosowania związek ten nie jest jednak pozbawiony ograniczeń. Poza oczywistą wadą - niskim przewodnictwem elektronowym z uwagi na tendencję do tworzenia gęstych monowarstw alkanotiolowych - związek ten wykazuje ograniczone właściwości przeciwoadsorpcyjne z uwagi na brak rozbudowanej, elastycznej, hydrofilowej struktury. W warunkach analizy rzeczywistych próbek biologicznych obecność białek i innych składników matrycy prowadzi do pogorszenia parametrów analitycznych biosensora [19]. Wskazuje to, że wybór środka blokującego nie powinien być traktowany jako element rutynowy, lecz jako jeden z kluczowych etapów projektowania warstwy receptorowej. Zastąpienie MCH może okazać się korzystne nie tylko z punktu widzenia poprawy właściwości elektrycznych warstwy, ale i jej odporności na biologiczne zanieczyszczenia powierzchni elektrody [20]. Może to być szczególnie pożądane w przypadku konstrukcji biosensorów wykorzystujących jako element rozpoznający odpowiednio

zaprojektowaną sondę kwasu nukleinowego - genosensorów DNA, których celem jest wykrywanie specyficznych sekwencji w próbkach bogatych w białka, np. w mieszaninach poreakcyjnych po amplifikacji materiału genetycznego.

W przeprowadzonych badaniach dokonano porównania kilku związków mogących pełnić funkcję wypełniaczy monowarstw typu SAM, obejmujących dietyloditiokarbaminian sodu (DEDTC), 2-fenyletylotiol (2-PhET), 1,4-benzenoditiol (BDT), cysteaminę (CHC) oraz klasycznie stosowany MCH. Analiza wykazała, że poszczególne związki w odmienny sposób wpływają na organizację warstwy receptorowej oraz przebieg procesów zachodzących na powierzchni elektrody. Szczególnie korzystne właściwości wykazywał DEDTC, którego zastosowanie prowadziło do wyraźnego ograniczenia niespecyficznych oddziaływań z białkami obecnymi w próbce oraz zwiększenia rejestrowanego sygnału elektrochemicznego - w tym przypadku rozumianego jako różnica wartości prądu rejestrowanej przed i po związaniu przez jednoniciową sondę DNA (ssDNA) wykrywanej sekwencji o charakterze biomarkerowym (Rysunek 2) [21]. Co ciekawe, elektroda zmodyfikowana monowarstwą DEDTC wykazywała niższy opór przeniesienia ładunku (R_{ct}) niż czysta elektroda złota. Efekt ten przypisuje się obecności zdelokalizowanych struktur rezonansowych w ugrupowaniu ditiokarbaminianowym kleszczowo związanym z powierzchnią Au, krótkim łańcuchom etylowym minimalizującym barierę tunelowania oraz ograniczeniu odpychania elektrostatycznego anionowego wskaźnika redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ na skutek modyfikacji powierzchni [22,23].

Uzyskane wyniki wskazują, że poprawa parametrów analitycznych nie wynika wyłącznie z zastosowania nowego związku chemicznego w roli wypełniacza, lecz przede wszystkim z odmiennego sposobu organizacji warstwy receptorowej i zmniejszenia liczby miejsc sprzyjających niespecyficznej adsorpcji. Odpowiednio dobrany środek blokujący wpływa jednocześnie na orientację sond DNA, ich wzajemne oddziaływania oraz dostępność powierzchni dla oznaczanego analitu.



Rysunek 2. Porównanie właściwości elektrochemicznych monowarstw DEDTC i MCH: a) natężenie sygnału prądowego (pomiar SWV); b) odpowiedź biosensora dla różnych stężeń analitu (pomiar SWV, po lewo wyższe stężenia, po prawo niższe); c) wpływ adsorpcji białka na oporność warstwy (pomiar EIS), gdzie BGDE oznacza “niemodyfikowaną” złotą elektrodę dyskową [21].

Figure 2. Comparison of the electrochemical properties of DEDTC and MCH monolayers: (a) Peak current intensity (SWV measurements); (b) Biosensor response for various analyte concentrations (SWV measurements; higher concentrations on the left, lower concentrations on the right); (c) Effect of protein adsorption on layer resistance (EIS measurements), where BGDE stands for ‘bare’ gold disc electrode [21].

Praktyczne znaczenie przedstawionej strategii wytwarzania warstw receptorowych potwierdzono podczas opracowania elektrochemicznego genosensora przeznaczonego do wykrywania materiału genetycznego *Corynebacterium diphtheriae*. W konstrukcji czujnika wykorzystano sondę DNA znakowaną błękitem metylenowym, natomiast DEDTC zastosowano jako składnik blokujący powierzchnię elektrody. Tak zaprojektowany biosensor charakteryzował się wysoką

selektywnością wobec oznaczanej sekwencji DNA oraz korzystniejszym stosunkiem sygnału do tła niż analogiczne układy wykorzystujące klasyczny MCH. Wyniki te potwierdziły możliwość zastąpienia powszechnie stosowanych środków blokujących nowymi związkami lepiej dostosowanymi do analizy próbek o złożonym składzie. Przeprowadzone badania mają znaczenie wykraczające poza przedstawiony przykład aplikacyjny. Pokazują one, że dobór warstwy receptorowej nie powinien ograniczać się do zwiększania liczby receptorów na powierzchni elektrody. Znacznie ważniejsze jest zapewnienie odpowiedniej organizacji przestrzennej cząsteczek w monowarstwie, poprawa jej właściwości elektrycznych oraz ograniczenie oddziaływań niespecyficznych, które często stanowią główny czynnik pogarszający parametry analityczne biosensorów [21]. Takie podejście wpisuje się w obecny kierunek rozwoju elektrochemicznych biosensorów DNA, w którym świadome projektowanie właściwości powierzchni staje się równie istotne jak dobór samego elementu rozpoznającego.

3. JAKOŚĆ POWIERZCHNI PRZETWORNIKA JAKO CZYNNIK DETERMINUJĄCY PARAMETRY MINIATUROWYCH BIOSENSORÓW DNA

Poprawnie zaprojektowana warstwa receptorowa może spełniać swoją funkcję jedynie wówczas, gdy zostanie utworzona na powierzchni zapewniającej powtarzalne warunki immobilizacji oraz stabilny transfer elektronów. Z tego względu właściwości przetwornika elektrochemicznego stanowią jeden z podstawowych czynników decydujących o użyteczności analitycznej biosensora. Z kolei odtwarzalna jakość powierzchni elektrod determinuje możliwości seryjnego wytwarzania biosensorów oraz zapewnia wiarygodność uzyskiwanych wyników. Morfologia powierzchni, jej chropowatość, skład chemiczny materiału elektrodowego oraz jednorodność wpływają zarówno na proces tworzenia samoorganizujących się monowarstw, jak i na późniejszy przebieg procesów odpowiedzialnych za generowanie sygnału elektrochemicznego [24]. W ostatnich latach obserwuje się wyraźny wzrost zainteresowania miniaturowymi przetwornikami elektrochemicznymi przeznaczonymi do implementacji w systemy diagnostyczne typu *point-of-care* [25,26]. Zastosowanie takich elektrod umożliwia wykonywanie analiz poza laboratorium, ograniczenie objętości próbki oraz uproszczenie procedury oznaczeń. Miniaturyzacja układów pomiarowych wymaga jednak zachowania wysokiej jakości powierzchni roboczej, ponieważ wraz ze zmniejszeniem wymiarów elektrody rośnie wpływ lokalnych niejednorodności na powtarzalność odpowiedzi elektrochemicznej.

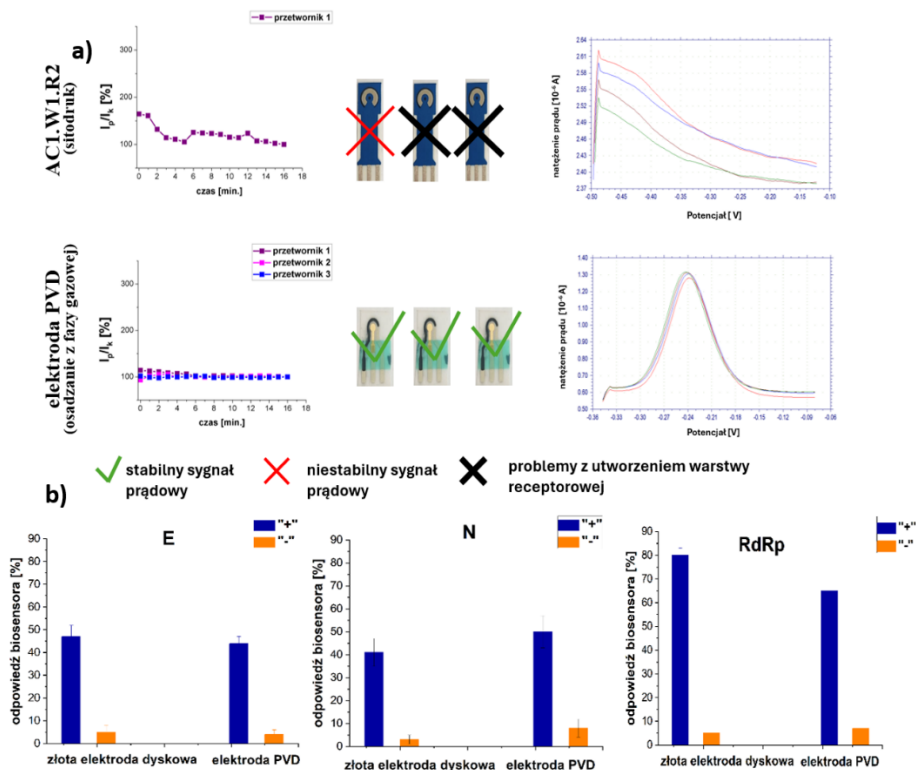
W celu określenia znaczenia właściwości powierzchni przetwornika przeprowadzono porównanie trzech rodzajów złotych elektrod: klasycznych elektrod dyskowych, planarnych elektrod sitodrukowanych oraz przetworników otrzymanych metodą fizycznego osadzania z fazy gazowej (PVD). Analizie poddano zarówno morfologię powierzchni, jak i właściwości elektrochemiczne oraz możliwość wytwarzania stabilnych warstw receptorowych opartych na samoorganizujących się monowarstwach DNA zmodyfikowanych łącznikiem z terminalną grupą tiolową (-SH) zdolnych do chemisorpcji na powierzchni złota (Rysunek 3a).

Uzyskane wyniki wykazały istotne różnice pomiędzy badanymi przetwornikami. Elektrody sitodrukowane, mimo niewątpliwych zalet związanych z niskim kosztem produkcji i możliwością masowego wytwarzania, charakteryzowały się stosunkowo dużą zmiennością parametrów powierzchni oraz większym rozrzutem wartości uzyskiwanych sygnałów prądowych. Niejednorodna topografia powierzchni utrudniała uzyskanie powtarzalnych warstw receptorowych. Znacznie korzystniejsze właściwości wykazały przetworniki wykonane w technologii PVD. Charakteryzowały się one niewielką chropowatością, wysoką jednorodnością oraz bardzo dobrą powtarzalnością parametrów elektrochemicznych. Tak przygotowane powierzchnie umożliwiały tworzenie uporządkowanych samoorganizujących się monowarstw z wykorzystaniem sond DNA znakowanych błękitem metylenowym, zapewniając jednocześnie wysoką stabilność uzyskiwanych odpowiedzi biosensora na wykrywaną specyficzną sekwencję DNA. Znaczące różnice w profilu woltamogramów SWV (Rysunek 3a) wskazują na kluczową rolę morfologii podłoża w procesie formowania warstwy receptorowej. Dla elektrod PVD obserwowano symetryczny, dobrze wykształcony pik redoks błękitu metylenowego, co potwierdza utworzenie jednorodnej i uporządkowanej monowarstwy SAM na gładkiej powierzchni złota. Z kolei zniekształcona odpowiedź prądowa dla elektrod SPE jest efektem znacznej heterogeniczności i chropowatości podłoża sitodrukowanego oraz obecności matrycy organicznej pasty. Czynniki te sprzyjają niespecyficzej adsorpcji sond DNA i uniemożliwiają prawidłową orientację ich struktury typu spinka (ang. *stem-loop*), co przekłada się na niestabilność sygnału oraz spadek wydajności przeniesienia elektronów, pomimo większej powierzchni rzeczywistej przetwornika. Wyniki te wskazują, że odpowiedni dobór metody i kontrola procesu wytwarzania planarnego przetwornika może w istotny sposób ograniczyć zmienność produkcyjną poszczególnych egzemplarzy bioczułników i w rezultacie poprawić ich niezawodność przy zachowaniu niskiego kosztu jednostkowego wytwarzania [27].

Praktyczne znaczenie opracowanych rozwiązań potwierdzono podczas konstrukcji miniaturowego genosensora przeznaczonego do wykrywania biomarkerów

genetycznych wirusa SARS-CoV-2 (t. j. E- białko otoczki, N - białko nukleokapsydu koronawirusa, RdRp - polimeraza RNA zależna od RNA) (Rysunek 3b). Wykorzystanie przetworników PVD umożliwiło otrzymanie biosensorów charakteryzujących się wysoką powtarzalnością odpowiedzi na wykrywane geny SARS-CoV-2 oraz właściwościami umożliwiającymi ich dalszą miniaturyzację i możliwą integrację z przenośnymi systemami diagnostycznymi. Otrzymane wyniki potwierdziły, że przetworniki wytwarzane metodą PVD mogą stanowić atrakcyjną alternatywę dla klasycznych złotych elektrod stosowanych w elektrochemicznych biosensorach DNA.

Przeprowadzone badania wyraźnie pokazują, że powierzchnia przetwornika nie jest jedynie biernym nośnikiem warstwy receptorowej. Jej właściwości determinują organizację przestrzenną unieruchomionych receptorów, przebieg procesów elektrochemicznych oraz podatność warstwy receptorowej na oddziaływania niespecyficzne. W konsekwencji projektowanie nowoczesnych biosensorów powinno obejmować jednoczesną optymalizację materiału elektrodowego i architektury warstwy receptorowej, ponieważ dopiero ich wzajemne dopasowanie pozwala na pełne wykorzystanie potencjału receptorów oligonukleotydowych. Przedstawione wyniki wpisują się w obserwowany obecnie kierunek rozwoju biosensorów elektrochemicznych, w którym miniaturyzacja urządzeń nie może odbywać się kosztem pogorszenia jakości powierzchni przetwornika. Wręcz przeciwnie – im mniejsze są wymiary przetwornika, tym większego znaczenia nabiera monitorowanie jego właściwości fizykochemicznych, jednorodności morfologii oraz zapewnienie powtarzalności procesu wytwarzania. W tym kontekście technologie umożliwiające precyzyjne kształtowanie powierzchni elektrod stają się jednym z kluczowych elementów projektowania przyszłych systemów diagnostycznych typu *point-of-care*.



Rysunek 3. a) Porównanie przetworników wytworzonych techniką sitodruku oraz osadzania z fazy gazowej PVD pod względem niezawodności, stabilności sygnału prądowego (przedstawiona jako stosunek natężenia kolejnych pików do końcowego natężenia pików w trakcie trwania stabilizacji (I_p/I_k)) i natężenia prądu (pomiar SWV) oraz powtarzalności wytwarzania przetworników; b) Porównanie złotych elektrod dyskowych i elektrod wytworzonych techniką PVD pod względem odpowiedzi sensora (pomiar SWV) na różne biomarkery genetyczne SARS-CoV-2 (E, N, RdRp). Plus „+” oznacza odpowiedź od próbki dodatniej (zawierającej materiał genetyczny chorego na COVID-19 dostarczonych przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH), a minus „-” odpowiedź od próbki ujemnej - niezawierającej materiału genetycznego [27].

Figure 3. (a) Comparison of transducers fabricated by screen printing and physical vapor deposition (PVD) in terms of reliability, current signal stability (presented as the ratio of the peak current at each subsequent scan to the final peak current recorded during the stabilization period (I_p/I_k)), current intensity (SWV measurements), and fabrication reproducibility; (b) Comparison of gold disk electrodes and PVD-fabricated electrodes regarding the sensor response (SWV measurements) to different SARS-CoV-2 genetic biomarkers (E, N, RdRp). The plus sign „+” indicates a response from a positive sample (containing genetic material from a patient with COVID-19, provided by the National Institute of Public Health PZH), whereas the minus sign „-” indicates a response from a negative sample, i.e., one not containing genetic material [27].

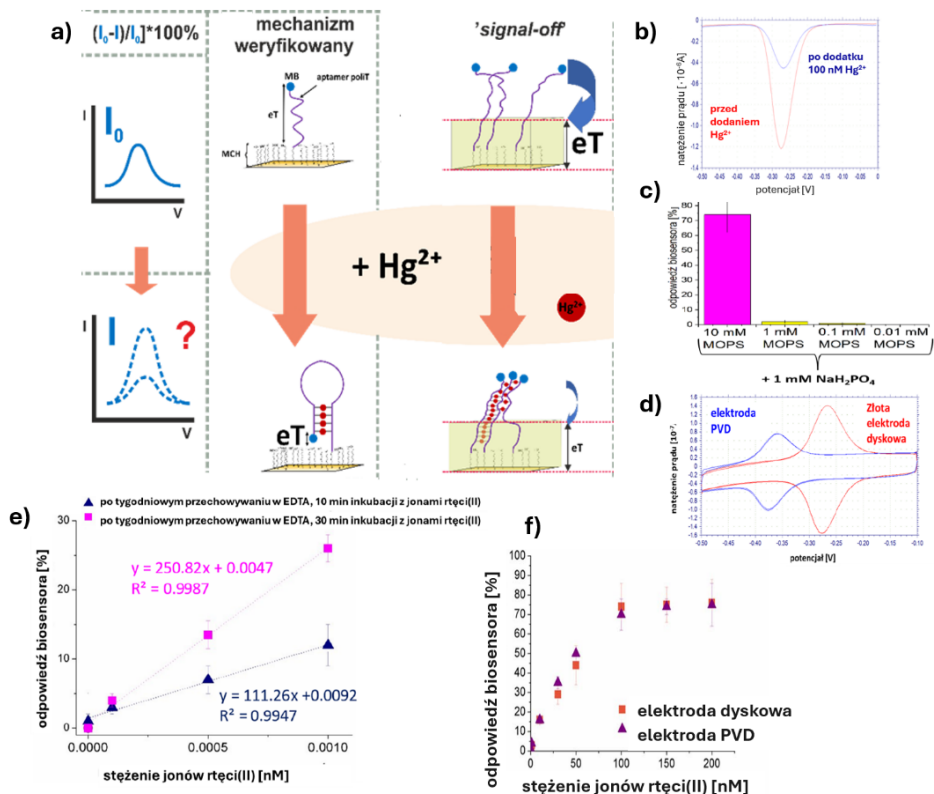
4. NOWE SEKWENCJE I MECHANIZMY GENEROWANIA SYGNAŁU W ELEKTROCHEMICZNYCH APTASENSORACH DNA NA POTRZEBY ANALITYKI ŚRODOWISKOWEJ

Oznaczanie małych jonów nieorganicznych stanowi jedno z trudniejszych wyzwań w konstrukcji elektrochemicznych aptasensorów DNA. W przypadku anionów dodatkowym utrudnieniem są odpychania elektrostatyczne na granicy faz, wynikające z ujemnego ładunku szkieletu fosfodiesterowego DNA oraz samej powierzchni elektrody. Z tego względu intensywnie poszukuje się nowych sekwencji aptamerowych o wysokim powinowactwie do analitów nieorganicznych. Wytypowanie odpowiedniego receptora nie gwarantuje jednak uzyskania optymalnych parametrów analitycznych biosensora. Równie krytyczny jest dobór środowiska pomiarowego, które musi zapewniać kompromis pomiędzy trwałością kompleksu aptamer–analit, stabilnością formy chemicznej oznaczanego jonu (np. poprzez eliminację ryzyka hydrolizy) a selektywnością oddziaływania. Co więcej, opracowanie czułego i selektywnego biosensora nie zawsze wymaga identyfikacji nowej sekwencji receptorowej – znaczną poprawę parametrów analitycznych można osiągnąć poprzez dogłębne poznanie i nadzór samego mechanizmu generowania sygnału. Zależności te przedstawiono w niniejszym rozdziale na przykładzie elektrochemicznych aptasensorów DNA przeznaczonych do oznaczania anionów selenianowych(VI) oraz kationów rtęci(II) [28,29].

4.1. APTASENSOR DO OZNACZANIA JONÓW RTĘCI(II)

Jony rtęci(II) należą do najbardziej toksycznych zanieczyszczeń środowiska, dlatego opracowanie prostych czujników do ich oznaczania pozostaje ważnym kierunkiem rozwoju współczesnej analityki. W przeciwieństwie do klasycznych biosensorów wykorzystujących hybrydyzację kwasów nukleinowych, w przypadku jonów Hg^{2+} możliwe jest wykorzystanie specyficznych oddziaływań zachodzących pomiędzy jonami rtęci a parami zasad tyminowych. Przeprowadzone badania wykazały, iż w elektrochemicznych aptasensorach z sekwencjami polityminowymi (*poliT*) zmiany natężenia prądu nie zawsze wynikają ze zmian konformacyjnych sondy, mimo iż mechanizm bazujący na tworzeniu wewnątrzcząsteczkowych struktur typu „spinka do włosów” (ang. *hairpin*) stabilizowanych mostkami $T-Hg^{2+}-T$ jest dominujący w literaturze. Przesłanką do pogłębionych badań był odmienny od oczekiwanego charakter odpowiedzi elektrochemicznej aptasensora na jony rtęci(II), polegający na spadku sygnału prądowego po związaniu analitu [30]. W pracy przedstawiono mechanizm działania opracowanego aptasensora tłumaczący te obserwacje doświadczalne. Mechanizm ten bazował na tworzeniu stabilnych mostków $T-Hg^{2+}-T$ pomiędzy sąsiadującymi ze sobą sekwencjami polityminowymi (Rysunek 4a,b) [31]. Powstanie kompleksu, a co za tym idzie usztywnienie warstwy receptorowej skutkujące pogorszeniem transportu elektronów, znajdowało bezpośrednie odzwierciedlenie w rejestrowanym sygnale elektrochemicznym.

Badania elektrochemiczne oraz pomiary z wykorzystaniem mikrowagi kwarcowej potwierdziły proponowany mechanizm działania oraz wykazały, że odpowiedź czujnika wynika bezpośrednio z procesu tworzenia kompleksów z udziałem jonów rtęci.



Rysunek 4. a) Schemat ilustrujący możliwe mechanizmy działania aptasensora Hg^{2+} ; b) odpowiedź biosensora (SWV) przed i po dodatku jonów Hg^{2+} ; c) odpowiedź SWV biosensora dla 100 nM jonów rtęci (II) zależna od stężenia kwasu morfolinopropanosiarzanowego (MOPS); d) voltamperogramy CV uzyskane dla przetwornika miniaturowego w porównaniu z klasyczną złotą elektrodą dyskową; e) odpowiedź SWV biosensora (złota elektroda dyskowa) na jony rtęci(II); f) krzywa kalibracji przygotowana dla złotej elektrody dyskowej oraz przetwornika PVD [31].

Figure 4. a) Schematic illustration of the possible working mechanisms of the Hg^{2+} aptasensor; b) response of the biosensor (SWV) before and after addition of Hg^{2+} ; c) SWV response of the biosensor for 100 nM mercury(II) ions, as a function of 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) concentration; d) CV voltammograms obtained for the miniaturized transducer in comparison with a conventional gold disk electrode; e) SWV response of the biosensor (gold disc electrode) to mercury(II) ions; f) calibration curve prepared with miniaturized transducers and gold disc electrode [31].

Innym istotnym elementem badań była analiza wpływu środowiska pomiarowego na przebieg oddziaływań odpowiedzialnych za powstawanie mostków $\text{T-Hg}^{2+}\text{-T}$. Wykazano, że skład medium pomiarowego oraz obecność wybranych anionów

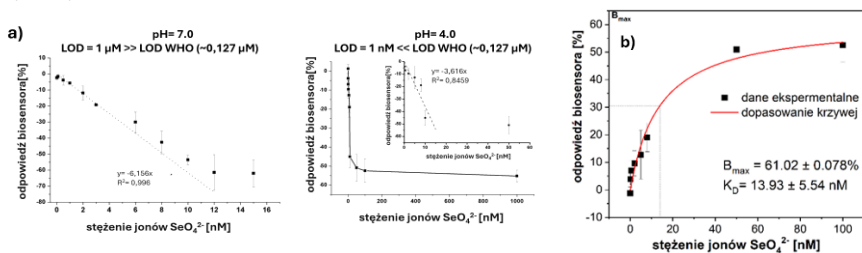
stanowiących składniki buforów mogą wpływać na efektywność tworzenia kompleksów aptamer-Hg²⁺, a tym samym na parametry analityczne biosensora (Rysunek 4c). Dostosowanie warunków pomiarowych umożliwiła uzyskanie wysokiej selektywności oraz bardzo niskiej granicy wykrywalności (LOD = 10⁻¹² M), umożliwiającej oznaczanie jonów rtęci w rzeczywistych próbkach wody. Dodatkową zaletą opracowanego rozwiązania była możliwość wielokrotnej regeneracji warstwy receptorowej oraz przechowywania biosensora bez istotnej utraty czułości. Zaobserwowano pozytywny wpływ długoterminowego przechowywania i kondycjonowania biosensora w roztworze EDTA (Rysunek 4e). Ważnym osiągnięciem badań było również przeniesienie opracowanej konstrukcji na elastyczne przetworniki PVD (Rysunek 4d, f). Potwierdziło to możliwość połączenia zoptymalizowanej wcześniej warstwy receptorowej z miniaturowymi platformami pomiarowymi przeznaczonymi do przyszłych urządzeń przenośnych.

4.2. APTASENSOR DO OZNACZANIA ANIONÓW SELENIANOWYCH(VI)

Równie szczegółowej analizy mechanizmu rozpoznania molekularnego oraz wpływu środowiska pomiarowego wymagało opracowanie biosensora do detekcji anionów selenianowych(VI). W tym przypadku kluczowe było określenie wpływu pH na powinowactwo analitu do sekwencji aptamerowej przy jednoczesnym zachowaniu trwałości oznaczanej formy SeO₄²⁻. Element rozpoznający stanowił aptamer wyselekcjonowany metodą SELEX. Zastosowanie błękitu metylenowego jako znacznika redoks umożliwiło monitorowanie zmian konformacyjnych aptameru wywołanych wiązaniem analitu, co przekładało się na zmianę sygnału elektrochemicznego [32].

Przeprowadzone badania wykazały, że na skuteczność procesu rozpoznawania molekularnego istotny wpływ wywiera środowisko pomiarowe. Szczególnie ważnym parametrem okazało się pH roztworu, determinujące zarówno strukturę aptameru, jak i efektywność oddziaływań z oznaczanym analitem. Obniżenie pH środowiska pomiarowego z 7,0 do 4,0 doprowadziło do znacznego wzrostu odpowiedzi prądowej biosensora, co przełożyło się na obniżenie granicy wykrywalności (LOD) z 1 µM do 1 nM – osiągając poprawę czułości o trzy rzędy wielkości (Rysunek 5a). Optymalizacja warunków pomiarowych pozwoliła na uzyskanie wysokiej selektywności wobec anionów selenianowych(VI) w zakresie nanomolowym. Opracowany biosensor zweryfikowano z wykorzystaniem rzeczywistych próbek środowiskowych, potwierdzając możliwość oznaczania selenianów(VI) w obecności innych jonów występujących w wodach naturalnych. Wykazano ponadto dobrą stabilność warstwy receptorowej podczas przechowywania

oraz możliwość regeneracji biosensora, co ma istotne znaczenie z punktu widzenia praktycznych zastosowań [31].



Rysunek 5. a) porównanie odpowiedzi biosensora przy pH 7.0 oraz pH 4.0; b) badanie powinowactwa aptameru do jonów SeO_4^{2-} - wyznaczenie równowagowej stałej dysocjacji (K_D) [33].

Figure 5. a) comparison of the biosensor response at pH 7.0 and pH 4.0; b) evaluation of aptamer affinity toward SeO_4^{2-} ions: determination of the equilibrium dissociation constant (K_D) [33].

Oba przedstawione przykłady (zarówno aptasensor do wykrywania Hg^{2+} , jak i SeO_4^{2-}) wskazują, że atrakcyjne parametry analityczne nie wynikają wyłącznie z samych właściwości receptora molekularnego. O skuteczności działania biosensora decyduje zintegrowana optymalizacja architektury warstwy receptorowej, jakość powierzchni przetwornika oraz właściwy dobór składu środowiska pomiarowego. Dopiero nadzór i weryfikacja tych parametrów umożliwia uzyskanie układów o wysokiej czułości i selektywności, zdolnych do pracy w złożonych matrycach rzeczywistych.

PODSUMOWANIE

Niniejsza praca prezentuje wyniki badań zrealizowanych w ramach doktoratu dr inż. Anny Szymczyk-Drozd pod opieką dr hab. inż. Roberta Ziółkowskiego, prof. uczelni. Opisanie tam badania koncentrowały się na architekturze warstw receptorowych elektrochemicznych biosensorów DNA, skupiając się na poprawie ich czułości, stabilności oraz możliwości miniaturyzacji. Kluczowym osiągnięciem w konstrukcji genosensorów było zaproponowanie dietylditiokarbaminianu sodu (DEDTC) jako alternatywy dla standardowo stosowanego MCH, co pozwoliło na uzyskanie wyższych sygnałów prądowych oraz zwiększenie odporności czujników do wykrywania specyficznych sekwencji maczugowca błonicy (*C. diphtheriae*) na interferencje białkowe w matrycach biologicznych. Równolegle udowodniono przewagę przetworników wytwarzanych metodą osadzania z fazy gazowej (PVD) nad technologią sitodruku w konstrukcji genosensorów do wykrywania specyficznych sekwencji DNA SARS-CoV-2 i aptasensora do wykrywania jonów Hg^{2+} , wykazując, że niska chropowatość powierzchni PVD sprzyja tworzeniu uporządkowanych monowarstw SAM i gwarantuje wysoką powtarzalność sygnału w układach zminiaturyzowanych. Opracowane rozwiązania znalazły zastosowanie w czulej detekcji biomarkerów genetycznych wirusa SARS-CoV-2 i bakterii błonicy

oraz w monitoringu środowiskowym jonów rtęci i selenianów. W przypadku detekcji Hg^{2+} szczegółowo wyjaśniono mechanizm działania sensora oparty na tworzeniu międzycząsteczkowych mostków $\text{T-Hg}^{2+}\text{-T}$, co pozwoliło na osiągnięcie granicy wykrywalności na poziomie subpikomolarnym. W celu oceny użyteczności analitycznej opracowanych układów, ich parametry zestawiono z reprezentatywnymi danymi literaturowymi dla poszczególnych analitów (Tabela 1). Zaproponowane biosensory charakteryzują się granicami detekcji umożliwiającymi analizę próbek rzeczywistych (po amplifikacji w przypadku sekwencji DNA) lub spełniającymi rygorystyczne normy WHO dla zanieczyszczeń środowiskowych (Hg^{2+} , SeO_4^{2-}). Choć zaawansowane metody literaturowe wykorzystujące dodatkowe etapy amplifikacji sygnału pozwalają na osiągnięcie niższych wartości LOD niż opisane w niniejszej pracy biosensory DNA, odbywa się to kosztem wydłużenia i skomplikowania procedury analitycznej. Główne przewagi opracowanych sensorów stanowią: brak konieczności wstępnego przygotowania próbki, niski koszt miniaturowej aparatury pomiarowej oraz uniwersalność architektury warstwy receptorowej, co otwiera perspektywę budowy zintegrowanych macierzy do analiz wieloanalitowych.

Tabela 1. Porównanie parametrów analitycznych oraz cech użytkowych opracowanych biosensorów z wybranymi rozwiązaniami literaturowymi do detekcji sekwencji DNA (*C. diphtheriae*, SARS-CoV-2) oraz jonów (Hg^{2+} , SeO_4^{2-}).

Table 1. Comparison of analytical performance and operational features of the developed biosensors with selected literature solutions for the detection of DNA sequences (*C. diphtheriae*, SARS-CoV-2) and ions (Hg^{2+} , SeO_4^{2-}).

	struktura		parametry analityczne			odnośnik:
	bioreceptor	materiał	zakres liniowy	detekcja	LOD	
gen maczugowca błonicy	ssDNA o strukturze tzw. spinki do włosów znakowana MB	złota elektroda dyskowa	0,05–50 nM	SWV	0,05 nM	ta praca [21]
	ssDNA o strukturze tzw. spinki do włosów znakowana MB	złota elektroda dyskowa	13,5–60 nM	SWV	0,5 nM	[34]
	amplifikacja izotermiczna (LAMP) połączona z wizualizacją kolorymetryczną i testy immunochromatograficzne	test typu lateral flow dipstick (LFD) – pasek testowy, na którym pojawiały się prążki potwierdzające obecność amplikonu	-	kolorymetryczna	0,043 nM	[35]

frag. genu SARS-CoV-2	ssDNA o strukturze tzw. spinki do włosów znakowana MB	elektrody miniaturowe ze złotem osadzonym z fazy gazowej (PVD)	-	SWV	- (jakościowa)	ta praca [27]
	ssDNA aminowane	elektroda z pastą węglową HT18C6(Ag) zmod. chitozanem i kropkami kwantowymi	1,0 pM-8,0 nM	DPV	0,3 pM	[36]
	ssDNA modyfikowana grupami lipofilowymi	detekcja w roztworze	-	kolorymetryczna	10 nM	[37]
jon Hg^{2+}	ssDNA o długości 18 nukleotydów tyminowych (poliT) znakowana MB	złote elektrody dyskowe	0,001-100 nM	SWV	0,001 nM	ta praca [31]
	ssDNA o długości 22 nukleotydów znakowana MB	elektroda z węgla szklatego modyfikowana nanocząstkami złota	1 fM- 1 nM	elektrochemiczna	0,62 fM	[38]
	ssDNA o długości 12 tymin nieznakowana + podwójnie znakowana	reakcja w roztworze	12,7 nM - 1 μ M	spektrofluorymetryczna	12,7 nM	[39]
jon SeO_4^{2-}	nowowyselekcjonowany aptamer w procesie SELEX	złota elektroda dyskowa	1 – 10 nM	SWV	1 nM	Ta praca [33]
	enzym (redukcja jonów SeO_4^{2-} do SeO_3^{2-})	złota elektroda	0,141-130 nM	DPV	0,004 nM	[40]

Uzyskane wyniki stanowią istotny fundament dla rozwoju nowej generacji przenośnych czujników *point-of-care*, przeznaczonych do pracy w złożonych matrycach rzeczywistych. Potwierdzają one, że poprawa parametrów analitycznych biosensorów wymaga równoczesnej kontroli mechanizmów rozpoznania molekularnego, właściwości powierzchni elektrody oraz składu środowiska pomiarowego. Należy jednak zaznaczyć, że wykazane przewagi technologiczne (przetworniki PVD) i modyfikacyjne (zastosowanie DEDTC) odnoszą się do badanych układów, a przeniesienie tych rozwiązań na inne architektury biosensorów wymaga każdorazowo indywidualnego doboru warunków wytwarzania warstw receptorowych i procedur pomiarowych.

W toku prowadzonych badań zidentyfikowano również potencjalne ograniczenia opracowanych rozwiązań, istotne z punktu widzenia ich dalszej optymalizacji oraz zastosowania w bardziej złożonych i zautomatyzowanych układach analitycznych. Obejmują one m.in. trwałość mechaniczną elektrod, koszty oraz skalowalność wybranych technologii wytwarzania, a także wyzwania związane z integracją biosensorów z układami mikroprzepływowymi i prowadzeniem długotrwałych pomiarów w próbkach rzeczywistych. Jednocześnie dla zidentyfikowanych ograniczeń prowadzone są prace ukierunkowane na ich minimalizację lub eliminację. Najważniejsze z nich przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Ograniczenia miniaturowych, elektrochemicznych biosensorów DNA i możliwe strategie ich eliminacji.

Table 2. Current limitations of miniaturized electrochemical DNA biosensors and strategies for overcoming them.

OGRANICZENIE	PRÓBA ELIMINACJI/MINIMALIZACJI
<u>Niewystarczająca trwałość mechaniczna elektrod PVD</u> - pomimo zachowania wysokiej powtarzalności procesu wytwarzania, w pojedynczych egzemplarzach stwierdzono występowanie zjawiska delaminacji warstwy elektrodowej od podłoża.	Trwają prace nad optymalizacją sposobu aktywacji podłoża oraz zastosowaniem miniaturowych przetworników z elektrodą złotą wytworzoną metodą druku strumieniowego (ang. <i>aerosol jet printing</i>), oraz nad elektrodami sitodrukowanymi z wykorzystaniem autorskiej pasty.
<u>Wysokie koszty oraz bariery technologiczne wytwarzania elektrod</u> - metoda napyłniania PVD wiąże się ze znacznym, nieefektywnym zużyciem złota. Dodatkowo istnieje wyraźny brak skalowalnych alternatyw dla tradycyjnych warstw ze złota.	Trwają badania nad zastosowaniem elektrod srebrnych wytwarzanych przez naukowców z Politechniki Warszawskiej, co pozwoli na znaczną redukcję kosztów.
<u>Złożoność transferu rozwiązań z układu stacjonarnego do środowiska mikroprzepływowego</u> - przeniesienie procedur pomiarowych z warunków statycznych do systemu przepływowego stanowi istotne wyzwanie aparaturowe i metodyczne.	Prowadzone są systematyczne prace nad doбором odpowiednich parametrów hydrodynamicznych do prowadzenia pomiarów elektrochemicznych w mikrokanale.
<u>Niestabilność sygnału prądowego przy zastosowaniu sond DNA o strukturze spinki (hairpin) w warunkach przepływowych</u> - dynamika przepływu płynu drastycznie utrudnia uzyskanie powtarzalnej i stabilnej	Opracowywany jest alternatywny mechanizm detekcji wykorzystujący znakowany analit. Rozwiązanie to gwarantuje generowanie sygnału pomiarowego wyłącznie w momencie zajścia swoistej zdarzenia hybrydyzacji, niwelując wpływ przepływu na konformację sondy.

odpowiedzi prądowej dla konformacji typu spinki.	
<u>Niespecyficzna adsorpcja składników matrycy w trakcie długotrwałych pomiarów w próbkach rzeczywistych</u> - osadzanie się cząsteczek interferujących na powierzchni biosensora prowadzą do stopniowej degradacji sygnału.	Prowadzona jest ewaluacja różnorodnych matryc biologicznych oraz badania nad składnikami niereceptorowymi (blokującymi) warstw, co ma na celu ograniczenie oddziaływań niespecyficznych.
<u>Konieczność stosowania złożonego pomiaru różnicowego w mechanizmie wykorzystującym spinki DNA</u> - dotychczasowy schemat detekcji wymuszał rejestrację sygnału przed i po reakcji, co komplikowało procedurę analityczną w układach ciągłych.	Zastosowanie mechanizmu opartego na znakowanym analizie eliminuje potrzebę pomiaru referencyjnego, umożliwiając bezpośrednią detekcję.

KIERUNKI DALSZYCH BADAŃ I PERSPEKTYWY ROZWOJU ELEKTROCHEMICZNYCH BIOSENSORÓW DNA

Dalszy rozwój elektrochemicznych biosensorów DNA będzie ukierunkowany na ich miniaturyzację oraz integrację poszczególnych etapów procesu analitycznego w ramach zautomatyzowanych platform. Istotnym kierunkiem badań pozostaje opracowanie rozwiązań umożliwiających analizę próbek o złożonej matrycy, w szczególności poprzez połączenie etapu przygotowania próbki z bezpośrednią detekcją analitu. W tym kontekście szczególnie perspektywiczne jest wykorzystanie funkcjonalizowanych nanocząstek magnetycznych jako materiałów umożliwiających selektywny wychwyt i izolację kwasów nukleinowych przed etapem detekcji [41]. Dalszy rozwój takich materiałów może prowadzić do otrzymania hybrydowych nanosorbentów, które poza funkcją separacyjną będą pełniły również rolę znaczników elektrochemicznych lub katalitycznych, umożliwiając ograniczenie liczby etapów procedury analitycznej, a nawet eliminację konieczności desorpcji wychwyconego analitu [42].

Kolejnym istotnym kierunkiem będzie integracja miniaturowych biosensorów DNA z układami mikroprzepływowymi. Połączenie receptorów biologicznych, przetworników elektrochemicznych oraz układów odpowiedzialnych za transport i przygotowanie próbki mogą umożliwić opracowanie kompaktowych i częściowo lub w pełni zautomatyzowanych platform analitycznych. Rozwiązania typu lab-on-a-chip mogą w przyszłości pozwolić na ograniczenie zużycia próbek i odczynników, skrócenie czasu analizy oraz uproszczenie procedury pomiarowej. Szczególnie interesującą perspektywą jest rozwój przenośnych systemów wykorzystujących jednorazowe kasety diagnostyczne, w których użytkownik ograniczałby swoje działanie do wprowadzenia próbki, podczas gdy kolejne etapy analizy byłyby realizowane automatycznie.

Równolegle rozwijane będą strategie umożliwiające wieloparametrową detekcję różnych analitów w ramach jednego pomiaru. Zastosowanie wielopolowych,

planarnych układów elektrod, w tym struktur wytwarzanych z wykorzystaniem technologii PVD, może stworzyć podstawę do jednoczesnej analizy wielu sekwencji genetycznych lub innych biomarkerów. Integracja takich układów z odpowiednio zaprojektowanymi warstwami receptorowymi oraz systemami mikroprzepływowymi może prowadzić do powstania wieloparametrycznych platform diagnostycznych o zwiększonej przepustowości.

Perspektywnym kierunkiem pozostaje również rozwój nowych strategii rozpoznawania molekularnego, pozwalających na ograniczenie wpływu ograniczeń związanych z oddziaływaniami zachodzącymi bezpośrednio na powierzchni elektrody. Szczególne znaczenie może mieć wykorzystanie hybrydowych mechanizmów homofazowo-heterofazowych, w których oddziaływanie pomiędzy receptorem a analitem zachodzi częściowo w roztworze, a następnie jest przekładane na odpowiedź elektrochemiczną. Takie podejście może przyczynić się do zwiększenia uniwersalności i elastyczności konstrukcji geno- i aptasensorów oraz poszerzenia zakresu oznaczanych analitów, w tym sekwencji DNA patogenów i związków małowcząsteczkowych istotnych z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności.

W dalszej perspektywie szczególnie obiecujące wydaje się połączenie miniaturyzacji, mikrofluidyki, zaawansowanych materiałów funkcjonalnych, multipleksowej detekcji oraz automatycznej analizy danych. Integracja tych elementów może umożliwić opracowanie przenośnych i prostych w obsłudze systemów analitycznych, przeznaczonych nie tylko do zastosowań laboratoryjnych, lecz także do analizy w miejscu pobrania próbki. Tak rozwijane platformy elektrochemicznych biosensorów DNA mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce klinicznej, monitoringu środowiska oraz kontroli bezpieczeństwa żywności, przyczyniając się do skrócenia czasu uzyskania wyniku i zwiększenia dostępności zaawansowanych metod bioanalitycznych.

PODZIĘKOWANIE

Niniejsza praca została wykonana w ramach projektu IDUB against COVID-19 nr. 1820/45/Z01/2020 i projektu LIDER POB BIB nr. CPR-IDUB/130/Z01/POB4/2023 finansowanych ze środków Politechniki Warszawskiej uzyskanych w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości - Uczelnia Badawcza” oraz projektu ASTACUS TECHMATSTRATEG-III/0042/2019-00 finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. Praca doktorska napisana na podstawie prezentowanych wyników badań została wyróżniona nagrodą Komitetu Chemii Analitycznej PAN za najlepszą pracę doktorską w dziedzinie elektrochemii sponsorowaną przez firmę nLab.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 469, 1, 63.
- [2] N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, W. R. Heineman, *Chem. Soc. Rev.*, 2010. 39, 5, 1747.
- [3] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, et al., 2005, *Chem. Rev.*, 105, 4, 1103.
- [4] J. J. Gooding, *Electroanalysis*, 2002, 14, 17, 1149.

- [5] J. Liu, Z. Cao, Y. Lu, *Chem Rev.*, 2009, 109, 5, 1948.
- [6] R. Levicky, A. Horgan, *Trends Biotechnol.*, 2005, 23, 3, 143.
- [7] M. J. Russo, M. Han, P. E. Desroches, et al., *ACS Sens.*, 2021, 6, 4, 1482.
- [8] Y. Xiao, R. Y. Lai, K. W. Plaxco, *Nat Protoc.*, 2007, 2, 11, 2875.
- [9] S. D. Keighley, P. Li, P. Estrela, et al., *Biosens Bioelectron.*, 2008, 23, 8, 1291.
- [10] A. Vallée-Bélisle, F. Ricci, K. W. Plaxco, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 6, 2876.
- [11] H. Jiang, E.M. Materon, M.D.P.T. Sotomayor, et al., *J. Colloid Interface Sci.*, 2013, 411, 92.
- [12] J.I.A. Rashid, N.A. Yusof, *Sens. Bio-Sensing Res.*, 2017, 16, 19.
- [13] X. Meng, D. O'Hare, S. Ladame, *Biosens Bioelectron.*, 2023, 237.
- [14] D. Mandler, I. Turyan, *Electroanalysis*, 1996, 8, 207.
- [15] A. Ulman, *Chem. Rev.*, 1996, 96, 1533.
- [16] M. Tichoniuk, D. Gwiazdowska, M. Ligaj, et al., *Biosens Bioelectron.*, 2010, 26, 1618.
- [17] A.B. Steel, R.L. Levicky, T.M. Herne, et al., *Biophys. J.*, 2000, 79, 975.
- [18] A.L. Eckermann, D.J. Feld, J.A. Shaw, et al., *Coord. Chem. Rev.*, 2010, 254, 1769.
- [19] T. M. Herne, M. J. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 38, 8916.
- [20] Z. Song, R. Han, K. Yu, et al., *Mikrochim Acta*, 2024, 191, 3, 138.
- [21] A. Szymczyk, K. Soliwodzka, M. Moskal, et al., *Sens. Actuators B: Chem.*, 2022, 354, 131086.
- [22] F. von Wrochem, D. Gao, F. Scholz, et al., *Nat Nanotechnol.*, 2010, 5, 8, 618.
- [23] M. Parviz, N. Darwish, M. T. Alam, et al. *Electroanalysis*, 2014, 26, 1471
- [24] E. Cesewski, B. N. Johnson, *Biosens Bioelectron.*, 159, 112214.
- [25] G. Maduraiveeran, M. Sasidharan, V. Ganesan, *Biosens Bioelectron.*, 2018, 103, 113.
- [26] Z. Taleat, A. Khoshroo, M. Mazloun-Ardakani, *Mikrochim Acta*, 2014, 181, 9, 865.
- [27] A. Szymczyk-Drozd, D. Baran, A. Skiba a, et al., *Measurement*, 2025, 250, 117212.
- [28] A. Ono, H. Togashi, *Angew Chem Int Ed Engl.*, 2004, 43, 33, 4300.
- [29] E. M. McConnell, J. Nguyen, Y. Li , *Front. Chem.*, 2020, 8, 202.
- [30] S.-J. Liu, H.-G. Nie, J.-H. Jiang, et al., *Anal Chem.*, 2009, 81, 14, 5724.
- [31] A. Szymczyk, M. Popiołek ,J. Krzemiński, et al., *Mikrochim Acta*, 2024, 191.
- [32] F. Radom, P. M. Jurek, M. P. Mazurek, et al., *Biotechnol. Adv.*, 2013, 31, 8, 1260.
- [33] A. Szymczyk, M. Popiołek , D. Baran, et al., *Int J Mol Sci.*, 2024, 25, 12, 6660.
- [34] K. Marchlewicz, I. Ostrowska, S. Oszałdowski, *Talanta*, 2021, 227, 122161.
- [35] A.A. Zasada, A. Wiatrzyk, U. Czajka, et al., *BMC Infect Dis.*, 2020, 20, 1, 308.
- [36] L. Farzin, S. Sadjadi, A. Sheini, et al., *Mikrochim Acta*. 2021, 188, 4, 121.
- [37] D.C. Rodríguez, N. Lafuente-Gómez, C. Coutinho, et al., *Talanta*, 2022, 243, 123393.
- [38] X. Zhang, C. Huang, Y. Jiang, et al., *J. Agric. Food Chem.* 2018, 66, 38, 10106.
- [39] X. Zeng, F. S. Zhang, B. Zhu, et al., *Analytical Letters*, 2015, 48, 14, 2208.
- [40] Z. Yu, M. Noroozifar, K. Kerman, et al., *Sens. Actuators B: Chem*, 2025, 426, 137096.

-
- [41] A. Szymczyk, M. Drozd, A. Kamińska, et al., *Int J Mol Sci.*, 2022, 23, 16, 8860.
[42] X.-Y. Dong, X.-N. Mi, B. Wang, et al., *Talanta*, 2011, 84, 531.

Praca wpłynęła do Redakcji 31 lipca 2026 r.

