

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

DYSCYPLINA NAUKOWA – NAUKI CHEMICZNE

DZIEDZINA NAUK – NAUKI ŚCISŁE I PRZYRODNICZE

Rozprawa doktorska

mgr inż. Anna Magdalena Szymczyk-Drozd

**Projektowanie narzędzi (bio)analitycznych wykorzystujących
kwasy nukleinowe - od oddziaływań molekularnych do
zastosowań praktycznych**

Promotor

dr hab. inż. Robert Ziółkowski, prof. PW

WARSZAWA 2025

Niniejsza praca została wykonana w ramach projektu IDUB against COVID-19 „*SARS-CoV-2 diagnostics based on electrochemical genosensors*” 1820/45/Z01/2020 i projektu LIDER POB BIB „*Wielopolowy elektrochemiczny czujnik DNA dedykowany jednoczesnemu wykrywaniu produktów reakcji powielania kwasów nukleinowych w trybie multiplex na przykładzie genów oporności na antybiotyki wielooporowych szczepów bakteryjnych*” CPR-IDUB/130/Z01/POB4/2023 finansowanych ze środków Politechniki Warszawskiej uzyskanych w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości - Uczelnia Badawcza” oraz projektu „*Materiały biopolimerowe o programowanej chemicznie i genetycznie selektywności do metali ciężkich dla ultraczułych biosensorów nowej generacji - ASTACUS*” TECHMATSTRATEG-III/0042/2019-00 finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

**Politechnika
Warszawska**



Podziękowania

*Na wstępie pragnę złożyć wyrazy najgłębszej wdzięczności mojemu Promotorowi - **dr hab. inż. Robertowi Ziółkowskiemu, prof. PW** za opiekę naukową, przekazaną wiedzę, liczne inspirujące dyskusje merytoryczne oraz cenne wskazówki udzielane zarówno podczas realizacji badań, jak i przygotowywania niniejszej rozprawy.*

*Wyrazy szczególnego uznania i podziękowania składam **prof. dr hab. inż. Elżbiecie Malinowskiej** za życzliwość, wsparcie, poświęcony czas oraz wartościowe uwagi, które miały istotny wpływ na przebieg prac badawczych i kształt ostatecznej wersji pracy.*

*Serdeczne podziękowania kieruję do **prof. Giovanni Marrazza** za wyjątkową gościnność i wsparcie okazane podczas mojego pobytu naukowego w Jej zespole badawczym na Uniwersytecie we Florencji.*

*Dziękuję również **prof. dr hab. Aleksandrze Zasadzie, prof. dr hab. inż. Marcinowi Olszewskiemu, prof. dr hab. inż. Magdalenie Matczuk, dr inż. Jakubowi Krzemińskiemu, dr inż. Maciejowi Trzaskowskiemu** oraz **dr inż. Marcie Mazurkiewicz-Pawlickiej** za możliwość współpracy, wsparcie merytoryczne oraz cenne uwagi na poszczególnych etapach prowadzonych badań.*

*Słowa podziękowania kieruję także do **Pracowników i Doktorantów Katedry Biotechnologii Medycznej oraz CEZAMAT PW**, z którymi miałam przyjemność współpracować. W sposób szczególny dziękuję **Julii, Sylwii, Adrianowi, Polinie** oraz **Oli** – za wspólnie spędzony czas, wsparcie i towarzystwo, które czyniło codzienność doktoranta łatwiejszą.*

*Serdecznie dziękuję Pani **Ewie Szczygieł** za niezawodne wsparcie i gotowość do rozwiązywania nawet najbardziej skomplikowanych kwestii związanych ze Szkołą Dokorską.*

*Dziękuję **Członkom Rady Doktorantów Politechniki Warszawskiej**, dzięki którym ten okres wyťažonej pracy, był również inspirującą przygodą i odskocznią od laboratorium.*

*Szczególne wyrazy wdzięczności kieruję do **moich Rodziców – Elżbiety i Zbigniewa** – za ich nieocenione wsparcie, nieustanną cierpliwość oraz niezachwianą wiarę w moje możliwości, które towarzyszą mi przez wszystkie lata mojego życia.*

*Na koniec pragnę wyrazić głęboką wdzięczność mojemu **Mężowi, Marcinowi**, za nieustające wsparcie, zrozumienie oraz obecność, które odegrały kluczową rolę w realizacji zarówno moich celów naukowych, jak i osobistych.*

Streszczenie Rozprawy Doktorskiej

mgr inż. Anna Szymczyk-Drozd

Szkoła Doktorska Politechniki Warszawskiej,
Katedra Biotechnologii Medycznej, Wydział Chemiczny,
Politechnika Warszawska

Projektowanie narzędzi (bio)analitycznych wykorzystujących kwasy nukleinowe - od oddziaływań molekularnych do zastosowań praktycznych

Elektrochemiczne biosensory DNA stanowią obiecującą alternatywę dla klasycznych metod analitycznych, oferując szybkie i tanie oznaczenia bezpośrednio w miejscu pobrania nawet w próbkach o złożonej matrycy. Aktualne kierunki ich rozwoju koncentrują się w dużej mierze na miniaturyzacji i integracji z urządzeniami przenośnymi oraz nowych możliwościach oferowanych przez wykorzystanie nanomateriałów. Kluczowym wyzwaniem pozostaje również optymalizacja składu warstw receptorowych, pogłębienie wiedzy na temat mechanizmów oddziaływań molekularnych oraz poprawa jakości powierzchni miniaturowych elektrod, co jest niezbędne dla dalszego zwiększenia czułości, zakresu detekcji i niezawodności biosensorów w rzeczywistych zastosowaniach.

Niniejsza praca koncentrowała się na zbadaniu wzajemnych oddziaływań pomiędzy składnikami próbek i roztworów pomiarowych a komponentami warstw receptorowych elektrochemicznych biosensorów DNA oraz ocenie ich wpływu na parametry pracy czujników, takie jak granica wykrywalności, selektywność i stabilność sygnału prądowego. Przeanalizowano wybrane oddziaływania pomiędzy warstwą receptorową (w tym sondami DNA, aptamerami, czynnikami blokującymi powierzchnię), składnikami próbki (tj. analitami, białkami, składnikami buforów) oraz powierzchniami elektrod i nanocząstek magnetycznych

jako sorbentów kwasów nukleinowych. Określono warunki funkcjonowania warstw receptorowych zapewniające ich stabilność podczas przechowywania oraz możliwość wykorzystania w nowoczesnych systemach analitycznych. Opracowane rozwiązania wykorzystano do detekcji biomarkerów genetycznych, takich jak wybrane fragmenty genów wirusa SARS-CoV-2 czy bakterii *Corynebacterium diphtheriae* oraz oznaczania jonów rtęci (Hg^{2+}) i selenianów (SeO_4^{2-}).

W pierwszej części pracy opisano elektrochemiczne biosensory DNA, ich znaczenie w diagnostyce medycznej i analizach środowiskowych oraz podstawowe mechanizmy działania z uwzględnieniem podziału na geno- i aptasensory. Uwagę poświęcono również technikom wykorzystywanym w detekcji sygnałów prądowych oraz wpływowi rodzaju powierzchni elektrodowej na jakość uzyskiwanych warstw receptorowych. Następnie omówiono wiodące obecnie kierunki rozwoju biosensorów, takie jak miniaturyzacja i integracja z systemami diagnostycznymi typu *point-of-care*, co pozwala na prowadzenie analiz w miejscu pobrania próbki. W tej części zawarto również przegląd strategii poprawy parametrów analitycznych, obejmujących projektowanie warstw receptorowych, zastosowanie nanomateriałów i optymalizację składu buforów pomiarowych, a także omówiono różne typy oddziaływań molekularnych, wpływających na rejestrowaną odpowiedź prądową czujników DNA.

Pierwsza część przeprowadzonych badań dotyczyła roli wypełniaczy w strukturze samoorganizujących się monowarstw (SAM) stosowanych jako warstwy receptorowe. Tradycyjnie stosowany w tym celu związek, 6-merkapto-1-heksanol (MCH), porównano z innymi wypełniaczami, m.in. dietyloditiokarbaminianem sodu (DEDTC), 2-fenyloetylotiolem (2-PhET), czy cysteaminą (CHC). Badania wykazały, że DEDTC znacząco zmniejszał interferencje ze strony białek obecnych w próbce, zapewniał wyższe natężenie rejestrowanego sygnału prądowego i mógł być z powodzeniem zaimplementowany w konstrukcji czujnika do wykrywania materiału genetycznego *Corynebacterium diphtheriae* z wykorzystaniem błękitu metylenowego jako znacznika kowalencyjnie związanego z sekwencją sondy.

W kolejnym etapie dokonano porównania różnych typów przetworników elektrochemicznych ze złotymi elektrodami pracującymi, w tym: klasycznych elektrod dyskowych, planarnych przetworników sitodrukowanych oraz przetworników wykonanych w technologii osadzania fizycznego z fazy gazowej (PVD). Przetworniki te porównano pod kątem morfologii powierzchni (badania SEM, profilometria), właściwości elektrochemicznych (woltamperometria cykliczna - CV, woltamperometria fali prostokątnej - SWV) oraz

możliwości wytwarzania samoorganizujących się monowarstw DNA. Przeprowadzone badania ujawniły różnice między badanymi typami elektrod. Przetworniki PVD wykazały wyjątkowo niską chropowatość i wysoką powtarzalność uzyskiwanych sygnałów elektrochemicznych w porównaniu z przetwornikami sitodrukowanymi, które charakteryzowały się większą zmiennością między seriami i niską stabilnością sygnału prądowego. Zastosowanie przetworników PVD pozwoliło na wytworzenie warstw receptorowych typu SAM z zastosowaniem sond molekularnych DNA o konformacji spinki, znakowanych błękitem metylenowym, co umożliwiło detekcję genetycznych markerów SARS-CoV-2. Wykazano, że biosensory na bazie przetworników PVD są obiecującą alternatywą dla klasycznych złotych elektrod dyskowych w potencjalnych przyszłych zastosowaniach w nowo konstruowanych systemach diagnostycznych.

Opracowane w toku dalszych badań elektrochemiczne aptasensory: rtęciowy i selenianowy, stanowią narzędzia analityczne do wykrywania jonów o udokumentowanej szkodliwości i znaczeniu środowiskowym. W przypadku aptasensorów rtęciowych zastosowanie sekwencji polityminowych umożliwiło wytworzenie stabilnych, międzycząsteczkowych mostków $\text{T-Hg}^{2+}\text{-T}$ w obecności jonów rtęci(II), a badania elektrochemiczne i QCM potwierdziły postulowany mechanizm działania. Aptasensor wykazał wysoką selektywność oraz stabilność sygnału nawet po kilkukrotnej regeneracji. Zidentyfikowano wpływ składników badanych roztworów na tworzenie mostków $\text{T-Hg}^{2+}\text{-T}$, co pozwoliło opracować gotowe rozwiązanie analityczne do detekcji jonów rtęci w próbkach wody na poziomie subpikomolarnym. Zastosowanie elastycznych przetworników w technologii PVD umożliwiło również miniaturyzację czujników Hg^{2+} na potrzeby potencjalnych, przyszłych konstrukcji urządzeń przenośnych przeznaczonych do analizy środowiskowej.

Opisany w kolejnej publikacji aptasensor do detekcji anionów selenianowych(VI) opracowano w oparciu o nowo wyselekcjonowany aptamer specyficzny wobec jonów SeO_4^{2-} , uzyskany w procesie SELEX. Wykorzystanie błękitu metylenowego jako markera redoks umożliwiło monitorowanie zmian sygnału elektrochemicznego wynikających z wiązania analitu. Badania nad doбором warunków pomiarowych wykazały, że detekcja selenianów(VI) przebiega najlepiej w środowisku o $\text{pH} = 4,0$. Pozwoliło to na osiągnięcie granicy wykrywalności rzędu 1 nM oraz wysokiej selektywności wobec SeO_4^{2-} w obecności jonów przeszkadzających. Opracowany aptasensor testowano w rzeczywistych próbkach wody, co potwierdziło jego skuteczność w detekcji wspomnianej postaci selenu. Potwierdzono również

stabilność sygnału przechowywanego czujnika oraz możliwość regeneracji za pomocą metody zaproponowanej w pracy.

W ostatniej części rozprawy skoncentrowano się na opracowaniu nanocząstek magnetycznych o rdzeniach Fe_3O_4 i różnych modyfikacjach powierzchniowych oraz ich zastosowaniu w wydzielaniu kwasów nukleinowych. W badaniach porównano nanocząstki pokryte m.in. polietylenoiminą (PEI), złotem, krzemionką lub utlenionym grafenem, które cechowały się odmiennymi mechanizmami oddziaływań z DNA. Wykazano, że nanocząstki pokryte PEI charakteryzują się najwyższą wydajnością adsorpcji dzięki silnym oddziaływaniom elektrostatycznym i ich dużej stabilności koloidalnej w szerokim zakresie pH. Odpowiednio dobrane warunki procesu pozwoliły na uzyskanie wysokiej efektywności wydzielania kwasów nukleinowych z przygotowanych próbek, co stanowi nową wiedzę istotną z punktu widzenia technologii oczyszczania materiału genetycznego.

Podsumowując, praca ta wnosi nową wiedzę w zakresie projektowania i optymalizacji warstw receptorowych, mechanizmów molekularnych procesów na powierzchni elektrod oraz wpływu środowiska pomiarowego na parametry biosensorów DNA. Zaproponowano nowe formy nośników bazujących na funkcjonalizowanych nanocząstkach magnetycznych, mogących znaleźć zastosowanie w separacji kwasów nukleinowych jak również zademonstrowano potencjał aplikacyjny opracowanych czujników DNA w detekcji biomarkerów genetycznych (*Corynebacterium diphtheriae* i SARS-CoV-2) oraz jonów rtęci (Hg^{2+}) i selenianów (SeO_4^{2-}) w próbkach rzeczywistych, jak również udowodniono możliwość ich późniejszej miniaturyzacji.

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

Summary of the Doctoral Thesis

M.Sc. Eng. Anna Szymczyk-Drozd

Doctoral School of Warsaw University of Technology
Chair of Medical Biotechnology, Faculty of Chemistry,
Warsaw University of Technology

Designing (bio)analytical tools involving nucleic acids - from molecular interactions to practical applications

Electrochemical DNA biosensors represent a promising alternative to classical analytical methods, offering rapid and cost-effective on-site detection, even in complex matrices. Current advancements focus primarily on biosensors miniaturization, integration into portable devices, and the employment of nanomaterials to enhance sensor performance. Key challenges remain in optimizing receptor layer composition, refining the understanding of molecular interactions, and improving the surface quality of miniaturized electrodes to further enhance biosensor sensitivity and reliability in real-world applications.

The present work focuses on investigating the interactions between the sample and components of the measurement solution and the elements of receptor layers in electrochemical DNA biosensors and evaluating their impact on sensor performance including detection limit, selectivity and current signal stability. The research scope covered interactions between the receptor layer (DNA probes, aptamers, surface blocking agents), sample components (analytes,

proteins, buffer components), electrode surfaces and magnetic nanoparticles as nucleic acid sorbents. Optimal conditions for the functioning of receptor layers were determined to ensure their stability during storage and the possibility of their use in modern analytical systems. The developed solutions have found application in the detection of genetic biomarkers, such as selected SARS-CoV-2 virus gene fragments and bacteria *Corynebacterium diphtheriae*, as well as in environmental analysis, in the determination of mercury ions (Hg^{2+}) and selenates (SeO_4^{2-}).

The first section of this work describes electrochemical DNA biosensors, emphasizing their significance in medical diagnostics and environmental monitoring. It also outlines their fundamental working principles, distinguishing between geno- and aptasensors. Focus was also placed on the techniques used for detecting current signals and the influence of the type of electrode surface on the quality of the obtained receptor layers. Subsequently, the leading current trends in biosensor development were discussed, including miniaturization and integration with point-of-care diagnostic systems, enabling on-site sample analysis. This section also provides an overview of strategies for improving analytical performance, including receptor layer design, use of nanomaterials and optimization of the composition of the measurement medium, and discusses different types of molecular interactions affecting the recorded current response of DNA biosensors.

The initial part of the conducted studies focused on the role of electrode blocking agents (EBAs) in the construction of receptor layers based on self-assembled monolayers (SAMs). The compound traditionally used for this purpose, 6-mercapto-1-hexanol (MCH), was compared with other EBAs including sodium diethyldithiocarbamate (DEDTC), 2-phenylethylthiol (2-PhET), or cysteamine (CHC). The study showed that DEDTC significantly reduced interferences from sample proteins, provided a higher intensity of the recorded current signal, and could be successfully implemented in a sensor design for detecting *Corynebacterium diphtheriae* genetic material using methylene blue as a marker covalently linked to the probe sequence.

A comparative analysis of different electrochemical transducers was also conducted, including classical gold disk electrodes, planar screen-printed transducers and electrodes fabricated using physical vapor deposition (PVD) technology. Various transducers were compared in terms of surface morphology (SEM studies, profilometry), electrochemical properties (cyclic voltammetry - CV, square wave voltammetry - SWV) and applicability as substrates for self-assembly of DNA monolayers. The results revealed significant differences between the types of electrodes studied. PVD transducers showed extremely low roughness and

high repeatability of electrochemical signals compared to screen-printed transducers, which were characterized by higher inter-series variability and low stability of the obtained current signal. The use of PVD transducers allowed the fabrication of SAM-type receptor layers using methylene blue-labeled molecular DNA probes with a hairpin conformation, which enabled the detection of SARS-CoV-2 genetic biomarkers. Biosensors based on PVD transducers were shown to be a promising alternative to classical gold disk electrodes in potential applications in future novel diagnostic systems.

The electrochemical aptasensors for mercury and selenate detection, developed in the course of further research, provide solutions for the detection of ions of documented harmfulness and environmental significance. In the case of the mercury aptasensors, the use of polythymine sequences enabled the formation of stable intermolecular T-Hg²⁺-T bridges in the presence of mercury(II) ions, and electrochemical and QCM studies confirmed the postulated working mechanism. The aptasensor showed high selectivity and signal stability even after several regenerations. The effect of the components of the tested solutions on the formation of T-Hg²⁺-T bridges was also identified, which allowed the development of a ready-made analytical solution for the detection of mercury(II) ions at the subpicomolar level in water samples. The use of flexible transducers using PVD technology also enabled the miniaturization of Hg²⁺ sensors for potential future designs of portable devices for environmental analysis.

The aptasensor for detecting selenate(VI) anions described in the next publication was developed based on a newly selected aptamer specific for SeO₄²⁻ ions, obtained through the SELEX process. The use of methylene blue as a redox marker enables the monitoring of electrochemical signal changes associated with analyte binding. Studies on the optimization of measurement conditions demonstrated that selenate(VI) detection is the most effective in a pH = 4.0, which allowed for a detection limit of 1 nM and high selectivity towards SeO₄²⁻ in the presence of interfering ions. The developed aptasensor was tested in real water samples, which confirmed its effectiveness in detecting the mentioned selenium species. The stability of the stored sensor response was also confirmed, as well as the possibility of its regeneration using the method proposed in this study.

The final part of the study focused on the development of magnetic nanoparticles with Fe₃O₄ cores and various surface modifications for nucleic acid separation. The study compared nanoparticles coated i.e. with polyethyleneimine (PEI), gold, silica or graphene oxide, which exhibited different mechanisms of interaction with DNA. PEI-coated nanoparticles demonstrated the highest DNA adsorption efficiency due to strong electrostatic interactions and high colloidal stability over a wide pH range. Appropriately selected process conditions enabled

high efficiency of nucleic acid separation from the prepared samples, contributing to advancements in genetic material isolation technology.

In summary, this study brings new knowledge in the design and optimization of receptor layers, molecular mechanisms of processes on the electrode surface, and the influence of the measurement environment on the performance of DNA biosensors. Novel sorbents based on functionalized magnetic nanoparticles have been proposed, demonstrating potential applications in nucleic acid separation and biosensing. Furthermore, the developed DNA biosensors have proven effective in detecting genetic biomarkers (*Corynebacterium diphtheriae* and SARS-CoV-2) and environmentally significant ions such as mercury (Hg^{2+}) and selenate (SeO_4^{2-}), which underscores their potential for real-world applications. The feasibility of their future miniaturization was also confirmed.

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

Spis treści

Streszczenie Rozprawy Doktorskiej	7
Summary of the Doctoral Thesis	11
Lista artykułów naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej.....	17
Wykaz skrótów	19
1. Wprowadzenie w problematykę podjętych badań.....	21
1.1 Charakterystyka i podział elektrochemicznych biosensorów DNA.....	22
1.1.1 Genosensory - detekcja specyficznych sekwencji DNA	23
1.1.2 Aptasensory - wykrywanie analitów niebędących kwasami nukleinowymi.....	24
1.1.3 Techniki elektrochemiczne stosowane w analizie sygnału	26
1.1.4 Mechanizmy detekcji w biosensorach DNA oraz wpływ rodzaju i jakości powierzchni elektrodowych na możliwość ich wykorzystania.....	28
1.2 Wybrane kierunki rozwoju układów dedykowanych analizom w miejscu pobrania próbki..	31
1.2.1 Strategie poprawy czułości i selektywności.....	32
1.2.2 Miniaturyzacja elektrochemicznych czujników DNA	33
1.3 Oddziaływania towarzyszące rozpoznawaniu molekularnemu na powierzchni i ich wpływ na konstrukcje rozwiązań biosensorycznych	34
1.3.1 Oddziaływania DNA – powierzchnia.....	36
1.3.2 Przykłady oddziaływań DNA z powierzchnią modyfikowanych nanocząstek	37
1.3.3 Oddziaływania białkowych składników próbki z powierzchnią	38
1.3.4 Oddziaływania białkowych składników próbki z receptorami DNA.....	40
1.3.5 Oddziaływania DNA receptorowego z analitami - wpływ na czułość i selektywność konstruowanych czujników	42
2. Cel i zakres pracy doktorskiej	49
3. Komentarz do cyklu artykułów naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej	51
3.1 Pogłębiona analiza wpływu czynników blokujących powierzchnię elektrody na parametry elektrochemicznego biosensora DNA z motywem spinki (P1)	52
3.2 Praktyczne aspekty konstrukcji biosensorów DNA z wykorzystaniem monowarstw SAM na zminiaturyzowanych przetwornikach złotych: przykład detekcji SARS-CoV-2 (P2)	57
3.3 Identyfikacja ograniczeń w wykrywaniu jonów rtęci(II) związanych ze środowiskiem i mechanizmem działania w celu poprawy parametrów i możliwości aplikacyjnych elektrochemicznych aptasensorów (P3).....	61
3.4 Aptamer i elektrochemiczny aptasensor do wykrywania jonów selenianowych (SeO_4^{2-}) (P4).....	66
3.5 Porównanie różnych modyfikacji powierzchni magnetycznych nanosorbentów Fe_3O_4 do zastosowań w ekstrakcji kwasów nukleinowych (P5).....	69
4. Podsumowanie.....	75

Perspektywy dalszych badań	78
5. Bibliografia	80
Oświadczenie współautorów publikacji	89
Cykl publikacji stanowiących Rozprawę Doktorską	105
Publikacja P1: Further insight into the possible influence of electrode blocking agents on the stem loop based electrochemical DNA sensor parameters	107
Publikacja P2: Practical Aspects of SAM-Based Electrochemical DNA Biosensors on Miniaturized Planar Gold Transducers: A Case Study with SARS-CoV-2	109
Publikacja P3: Identification of medium- and mechanism-related pitfalls towards improved performance and applicability of electrochemical mercury(II) aptasensors.....	111
Publikacja P4: Aptamer and Electrochemical Aptasensor towards Selenate Ions (SeO_4^{2-}) .	113
Publikacja P5: Comparative evaluation of different surface coatings of Fe_3O_4 based magnetic nano sorbent for applications in the nucleic acids extraction.....	131
Życiorys naukowy Autorki Rozprawy Doktorskiej.....	155

Lista artykułów naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej

mgr inż. **Anna Magdalena Szymczyk-Drozd**

Identyfikator ORCID: 0000-0003-2100-4169

Identyfikator Scopus: 57356262700

- P1.** A. Szymczyk, K. Soliwodzka, M. Moskal, K. Rózanowski, R. Ziółkowski, Further insight into the possible influence of electrode blocking agents on the stem loop based electrochemical DNA sensor parameters. (2021) *Sensors and Actuators B: Chemical*, 354, 131086, DOI: 10.1016/j.snb.2021.131086. (IF: 9,2, pkt. MEiN: 140, liczba cytowań niezależnych*: 13)
- P2.** A. Szymczyk-Drozd, D. Baran, A. Skiba, A. Zasada, E. Mosiej, J. Krzemiński, A. Pełowski, E. Malinowska, R. Ziółkowski, Practical Aspects of SAM-Based Electrochemical DNA Biosensors on Miniaturized Planar Gold Transducers: A Case Study with SARS-CoV-2. (2025) *Measurement*, 250, 117212, DOI: 10.1016/j.measurement.2025.117212. (IF: 5,2, pkt. MEiN: 200, liczba cytowań niezależnych*: 0)
- P3.** A. Szymczyk, M. Popiołek, J. Krzemiński, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Identification of medium- and mechanism-related pitfalls towards improved performance and applicability of electrochemical mercury(II) aptasensors. (2024) *Microchimica Acta* 191(4), 189, DOI:10.1007/s00604-024-06272-w. (IF: 5,3, pkt. MEiN: 140, liczba cytowań niezależnych*: 0)
- P4.** A. Szymczyk, M. Popiołek, D. Baran, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Aptamer and Electrochemical Aptasensor towards Selenate Ions (SeO_4^{2-}). (2024) *International Journal of Molecular Sciences*, 25(12), 6660, DOI: 10.3390/ijms25126660. (IF: 4,9, pkt MEiN: 140, liczba cytowań niezależnych*: 1)
- P5.** A. Szymczyk, M. Drozd, A. Kamińska, M. Matczuk, M. Trzaskowski, M. Mazurkiewicz-Pawlicka, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Comparative evaluation of different surface coatings of Fe_3O_4 based magnetic nano sorbent for applications in the nucleic acids extraction. (2022) *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 8860, DOI: 10.3390/ijms23168860. (IF: 5,6, pkt. MEiN: 140, liczba cytowań niezależnych*: 18)

Summaryczna wartość IF (zgodnie z rokiem opublikowania) przedstawionego powyżej i związanego ze sobą tematycznie cyklu publikacji wynosi **30,2**

Uśredniona wartość IF dla wymienionych prac naukowych wynosi **6,04**

Summaryczna liczba punktów MNiSW wymienionych publikacji wynosi **760**

Uśredniona punktacja MNiSW wymienionych publikacji naukowych wynosi **152**

Całkowita liczba cytowań publikacji wynosi*: **38** (w tym **32 niezależnych**)

Indeks Hirscha (h-index, wg Scopus*): **4**

* - stan na 05.05.2025 r.

Wykaz skrótów

AC1P.W1.R2 – ang. *screen-printed electrodes with polished surface*, elektrody sitodrukowane z polerowaną powierzchnią
AC1.W1.R2 – ang. *screen-printed electrodes with unpolished surface*, elektrody sitodrukowane z powierzchnią niepolerowaną
aPCR – ang. *asymmetric polymerase chain reaction*, asymetryczna reakcja łańcuchowa polimerazy
APTMS – ang. *(3-aminopropyl)trimethoxysilane*, (3-aminopropylo)trimetoksylan
ATP – ang. *adenosine 5'-triphosphate*, adenozy-5'-trifosforan
BDT – ang. *1,3-benzenedithiol*, 1,3-benzenoditiol
cdNA – ang. *complementary DNA*, komplementarny DNA
CHC – ang. *cysteamine hydrochloride*, chlorowodorek cysteaminy
CMD – ang. *carboxymethyl dextran*, karboksymetylodekstran
COVID-19 – ang. *coronavirus disease 2019*, koronawirus
CV – ang. *cyclic voltammetry*, woltamperometria cykliczna
DABCYL – ang. *(4-(4'-Dimethylaminophenylazo)benzoic acid)*, (kwas 4-(4'-dimetyloamino-fenylazo)benzoesowy)
DEDTC – ang. *sodium diethyldithiocarbamate*, dietylditiokarbaminian sodu
DLS – ang. *dynamic light scattering*, dynamiczne rozpraszanie światła
DMSO – ang. *dimethyl sulfoxide*, dimetylosulfotlenek
DNA – ang. *deoxyribonucleic acid*, kwas deoksyrybonukleinowy
DPV – ang. *differential pulse voltammetry*, woltamperometria pulsowa różnicowa
DRP C223 AT – ang. *screen-printed electrodes with high curing temperature ink*, elektrody sitodrukowane utwardzane w wysokiej temperaturze
DRP C223 BT – ang. *screen-printed electrodes with low curing temperature ink*, elektrody sitodrukowane utwardzane w niskiej temperaturze
dsDNA – ang. *double-stranded deoxyribonucleic acid*, kwas deoksyrybonukleinowy dwuniciowy
E – ang. *envelope*, białko otoczki
EBA – ang. *electrode blocking agent*, środek blokujący powierzchnię elektrody
EDTA – ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*, kwas wersenowy
EIS – ang. *electrochemical impedance spectroscopy*, elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna
FAM – ang. *fluorescein amidite*, amid fluoresceiny
FET – ang. *field-effect transistor*, tranzystory polowe
FRET – ang. *fluorescence resonance energy transfer*, transfer energii rezonansu fluorescencyjnego
FT-IR – ang. *Fourier transform infrared spectroscopy*, spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
GO – ang. *graphene oxide*, utleniony grafen
GOCOOH – ang. *carboxylated graphene oxide*, utleniony grafen karboksylowany
HEPES – ang. *2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid*, kwas hydroksyetylo-piperazynoetanosulfonowy
ICP-MS/MS – ang. *inductively coupled plasma - tandem mass spectrometry*, tandemowa spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie
IoT – ang. *internet of things*, technologia internetu rzeczy
LNA – ang. *locked nucleic acid*, analog DNA
LSCM – ang. *laser scanning confocal microscopy*, laserowa mikroskopia konfokalna
MB – ang. *methylene blue*, błękit metylenowy
MCE – ang. *2-mercaptoethanol*, 2-merkaptioetanol
MCH – ang. *6-mercapto-1-hexanol*, 6-merkaptio-1-heksanol
MES – ang. *2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid*, kwas 2-(N-morfolino)etanosulfonowy
miRNA – ang. *micro RNA*, jednoniciowa cząsteczka RNA o długości od 21 do 23 nukleotydów,
MNP – ang. *magnetic nanoparticle*, nanocząstka magnetyczna

MOPS – ang. *3-(N-morpholino)propanesulfonic acid*, kwas 3-(N-morfolino)propanosulfonowy
MUA – ang. *11-mercaptoundecanoic acid*, kwas 11-merkaptoundekanowy
N – ang. *nucleocapsid*, białko nukleokapsydu koronawirusa
NGS – ang. *next generation sequencing*, sekwencjonowanie następnej generacji
PCR – ang. *polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy
PE – ang. *1-pentanethiol*, 1-pentanotiol
PEG – ang. *polyethylene glycol*, poli(glikol etylenowy)
PEI – ang. *polyethylenimine*, polietylenoimina
PET – ang. *polyethylene terephthalate*, poli(tereftalan etylenu)
PNA – ang. *peptide nucleic acid*, kwas peptydonukleinowy
POC – ang. *point-of-care*, w miejscu opieki nad pacjentem
2-PhET – ang. *2-phenylethanethiol*, 2-fenyletanol
poliA – ang. *polyA*, sekwencja DNA złożona z adenin
poliT – ang. *polyT*, sekwencja DNA złożona z tymin
PVD – ang. *physical vapour deposition*, fizyczne osadzanie z fazy gazowej
QCM(-D) – ang. *quartz crystal microbalance (with dissipation monitoring)*, mikrowaga kwarcowa (z monitorowaniem rozproszenia)
qPCR – ang. *quantitative polymerase chain reaction*, ilościowa reakcja łańcuchowa polimeraz
RdRp – ang. *RNA-dependent RNA polymerase*, polimeraza RNA zależna od RNA
RNA – ang. *ribonucleic acid*, kwas rybonukleinowy
RT-PCR – ang. *reverse-transcription polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją
SAM – ang. *self-assembled monolayer*, warstwa 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
SEM – ang. *scanning electron microscopy*, skaningowa mikroskopia elektronowa
SMFS – ang. *single-molecule force spectroscopy*, spektroskopia sił pojedynczych cząsteczek
SPR – ang. *surface plasmon resonance*, rezonans plazmonów powierzchniowych
ssDNA – ang. *single-stranded deoxyribonucleic acid*, kwas deoksyrybonukleinowy jednoniciowy
STEM – ang. *scanning transmission electron microscopy*, skaningowa transmisyjna mikroskopia elektronowa
SWV – ang. *square wave voltammetry*, woltamperometria fali prostokątnej
TAMRA – ang. *tetramethylrhodamine*, tetrametylorodamina.
TGA – ang. *thermogravimetric analysis*, termogravimetria
TMOS – ang. *tetramethyl orthosilicate*, ortokrzemian tetrametylu
TOX – ang. *tox gene fragment of Corynebacterium diphtheriae strain*, fragment genu toksynotwórczego szczepu maczugowca błonicy
TRIS – ang. *2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol*, 2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol
UV-Vis – ang. *ultraviolet-visible spectroscopy*, spektroskopia ultrafioletowa-widzialna
WHO – ang. *World Health Organization*, Światowa Organizacja Zdrowia
ZNA – ang. *zip nucleic acid*, modyfikowane kwasy nukleinowe ZIP

1. Wprowadzenie w problematykę podjętych badań

Biosensory DNA stanowią istotny krok w kierunku precyzyjnej i dostępnej analityki złożonych próbek rzeczywistych. Umożliwiają one m. in. bezpośrednie wykrywanie specyficznych sekwencji kwasów nukleinowych, a także substancji o istotnym znaczeniu dla zdrowia publicznego czy ochrony środowiska. Diagnostyka medyczna jest jedną z najprężniej rozwijających się gałęzi medycyny. Poszukiwane są coraz to nowsze rozwiązania, mające na celu usprawnienie i zwiększoną wiarygodność prowadzonych analiz w celu poprawy jakości opieki zdrowotnej. Do niedawna wykonywanie oznaczeń było możliwe niemal wyłącznie w laboratorium analitycznym wyposażonym w specjalistyczny sprzęt oraz przez wykwalifikowany personel. Niestety wiąże się to z niedogodnościami, m. in. wydłużonym czasem oczekiwania na wynik analiz spowodowanym transportem próbek czy ryzykiem interferencji z uwagi na sposób ich przechowywania [1]. Przykładem potencjalnej roli biosensorów w diagnostyce mogłoby być ich szerokie wykorzystanie do szybkiej identyfikacji materiału genetycznego wirusa SARS-CoV-2 podczas pandemii COVID-19, co pozwoliłoby na eliminację wyżej wymienionych problemów, a co za tym idzie skuteczniejsze zarządzanie kryzysowe [2,3].

Równie istotnym obszarem badań jest analiza środowiskowa, która odgrywa kluczową rolę w monitorowaniu czynników stanowiących zagrożenie dla ludzi i ekosystemów. W tym przypadku biosensory DNA mogą być wykorzystywane m. in. do detekcji jonowych form toksycznych pierwiastków, takich jak rtęć, selen, ołów czy kadm, które są szkodliwe nawet w minimalnych stężeniach. Pierwiastki te mają tendencję do bioakumulacji, gromadząc się w organizmach wodnych i przenosząc na wyższe poziomy troficzne, co stanowi zagrożenie dla ekosystemów wodnych oraz zdrowia ludzkiego, prowadząc m. in. do uszkodzeń układu nerwowego, zaburzeń metabolicznych czy chorób nowotworowych. Z tego względu konieczne jest opracowanie narzędzi ciągłego monitorowania ich obecności w środowisku [4–6].

Pomimo znaczącego postępu w rozwoju biosensorów w ostatnim czasie, nadal istnieją wyzwania technologiczne ograniczające powszechne zastosowanie elektrochemicznych czujników DNA poza laboratoriami analitycznymi. Opracowywane metody oznaczania zarówno małocząsteczkowych analitów, jak i biomarkerów genetycznych powinny cechować się selektywnością, możliwością detekcji niskich stężeń oznaczanych substancji oraz krótkim czasem analizy, a proponowane rozwiązania powinny w perspektywie dawać możliwość wykorzystania w zminiaturyzowanych systemach. Wysiłki badawcze ukierunkowane są również na automatyzację całej procedury analitycznej, w której obsługa przez użytkownika

końcowego byłaby ograniczona do wprowadzenia świeżo pobranego materiału do przenośnego urządzenia bezpośrednio w miejscu pobrania próbki. Jedną z obiecujących odpowiedzi na powyższe wyzwania może być implementacja elektrochemicznych biosensorów DNA w rutynowych procedurach analitycznych.

Ważnym zagadnieniem konstrukcyjnym jest uzyskanie stabilnych i powtarzalnych warstw receptorowych, które zapewnią odporność na składniki złożonych matryc biologicznych i środowiskowych. Integracja biosensorów z przenośnymi systemami detekcyjnymi, wymagająca jednocześnie obniżenia kosztów i zapewnienia długoterminowej stabilności, stanowi kolejne istotne ograniczenie technologiczne. Problemy te są dodatkowo potęgowane przez często niedostateczną jakość powierzchni elektrod, wpływającą bezpośrednio na wiarygodność rezultatów pomiarów. Mechanizmy oddziaływań DNA z powierzchniami elektrod i nanomateriałami mogącymi pełnić rolę sorbentów wciąż są słabo poznane, co utrudnia dalszy rozwój czujników pod kątem zwiększenia selektywności i obniżenia granicy wykrywalności.

Motywacją do podjęcia badań była potrzeba opracowania stabilnych i łatwych w użyciu biosensorów DNA, które mogłyby znaleźć zastosowanie w szybkim i wiarygodnym oznaczaniu analitów, takich jak biomarkery genetyczne oraz jony nieorganiczne. Uwagę poświęcono projektowaniu warstw receptorowych o zwiększonej odporności na zakłócenia ze strony składników próbek oraz dalszym obniżeniu granic wykrywalności oferowanych przez czujniki DNA. Istotnym elementem badań było też opracowanie biosensorów na tanich, planarnych przetwornikach oraz wykorzystanie nanomateriałów do wydzielania kwasów nukleinowych, z myślą o stworzeniu kompleksowych rozwiązań diagnostycznych umożliwiających w dalszej perspektywie prowadzenie wiarygodnych analiz również poza laboratorium.

1.1 Charakterystyka i podział elektrochemicznych biosensorów DNA

Poniższy podrozdział ma na celu przybliżenie wybranych aspektów aktualnego stanu wiedzy w zakresie elektrochemicznych biosensorów DNA, ze szczególnym uwzględnieniem genosensorów i aptasensorów oraz ich praktycznych zastosowań. Omówione zostaną podstawowe zasady działania czujników, istotne z punktu widzenia detekcji specyficznych sekwencji DNA oraz wykrywania jonów nieorganicznych, takich jak Hg^{2+} i SeO_4^{2-} z wykorzystaniem aptamerów jako receptorów molekularnych. Znalazł się tu także przegląd technik elektrochemicznych stosowanych zarówno do odczytu sygnału analitycznego, jak i charakteryzacji warstw receptorowych czujników DNA. Przedstawiono strategię generowania sygnału, w tym podejścia bezznacznikowe oraz wykorzystujące znaczniki redoks, wraz

z krytyczną analizą opisanych rozwiązań. Uwagę poświęcono również wymaganiom stawianym powierzchniom elektrod oraz perspektywom zastosowania tych technologii w zminiaturyzowanych systemach, które umożliwiają prowadzenie oznaczeń w miejscu pobrania próbki.

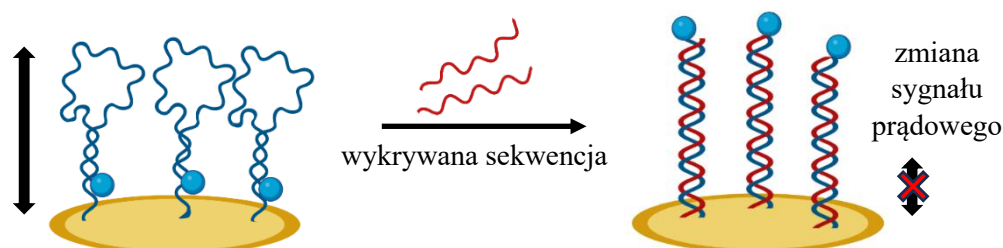
1.1.1 Genosensory - detekcja specyficznych sekwencji DNA

Zastosowanie w bioanalizie receptorów w postaci jednoniciowych sond oligonukleotydowych jest możliwe dzięki ich zdolności do selektywnego oddziaływania z sekwencją komplementarną w procesie hybrydyzacji. Zjawisko to polega na spontanicznym parowaniu się zasad o całkowitej lub częściowej komplementarności, pochodzących z różnych nici kwasów nukleinowych. Powstanie stabilnych struktur dwuniciowych możliwe jest wtedy, gdy istnieją komplementarne odcinki kwasów nukleinowych o długości co najmniej kilkunastu nukleotydów, co znajduje zastosowanie w projektowaniu sond molekularnych genosensorów do wykrywania zarówno dłuższych sekwencji, jak i niewielkich cząsteczek np. miRNA [7–9]. Biomarkery genetyczne specyficzne dla *Corynebacterium diphtheriae* i SARS-CoV-2 stanowią ważny cel w diagnostyce i monitorowaniu zakażeń, umożliwiając identyfikację tych patogenów. W przypadku *C. diphtheriae* wykrycie genów związanych z toksynotwórczością, takich jak gen *TOX*, pozwala odróżnić szczepy potencjalnie zdolne do wywołania błonicy od nieszkodliwych wariantów [10]. Ich identyfikacja typowo odbywa się poprzez analizę próbki po amplifikacji DNA metodą PCR, co umożliwia potwierdzenie obecności patogenu niezależnie od etapu zakażenia. Diagnostyka SARS-CoV-2 opiera się natomiast na detekcji materiału genetycznego wirusa po amplifikacji metodą RT-PCR, pozwalającą na powielenie w postaci DNA specyficznych regionów matrycy RNA, takich jak geny *E*, *N* i *RdRp* [11].

Sondy oligonukleotydowe stosowane jako receptory molekularne w sensorach elektrochemicznych powinny cechować się wysokim powinowactwem do oznaczanego analitu. Dotyczy to również ich unieruchomionej postaci na powierzchni elektrody. Istotnymi kierunkami badań nad rozwojem sensorów DNA staje się zatem poszukiwanie zarówno nowych sekwencji o pożądanych zdolnościach selektywnego wiązania ligandów, jak również zdobywanie wiedzy na temat mechanizmów przebiegu procesów powierzchniowych indukowanych wiązaniem analitu w warstwie bioczułej. Ich poznanie może przyczynić się do lepszego wykorzystania potencjału drzemiącego w aktualnie znanych receptorach oligonukleotydowych [12–14].

Wśród różnych typów genosensorów, szczególną uwagę zwracają konstrukcje wykorzystujące unieruchomione na powierzchni przetwornika sondy z przyłączonymi

kowalencyjnie znacznikami redoks [15,16]. Znaczniki te pełnią rolę nośników sygnału, co umożliwia rejestrowanie zmian zachodzących w wyniku hybrydyzacji sondy z docelową sekwencją DNA. Proces ich wiązania powoduje zmianę dostępności znacznika redoks względem powierzchni elektrody, co przekłada się na zmianę intensywności sygnału prądowego. Dzięki takiemu podejściu eliminowana jest potrzeba stosowania markerów redoks w roztworze, co znacząco upraszcza procedurę analityczną i umożliwia pomiary bezpośrednio w badanej próbce bez dodatków reagentów. Jednym z możliwych do wykorzystania sposobów działania takiego czujnika jest mechanizm „*signal-off*” (Rys. 1). Szczegółowy opis oddziaływań zaangażowanych w funkcjonowanie tego typu sond DNA zostanie omówiony w podrozdziale 1.3.5. „*Oddziaływania DNA receptorowego z analitami (...)*”.



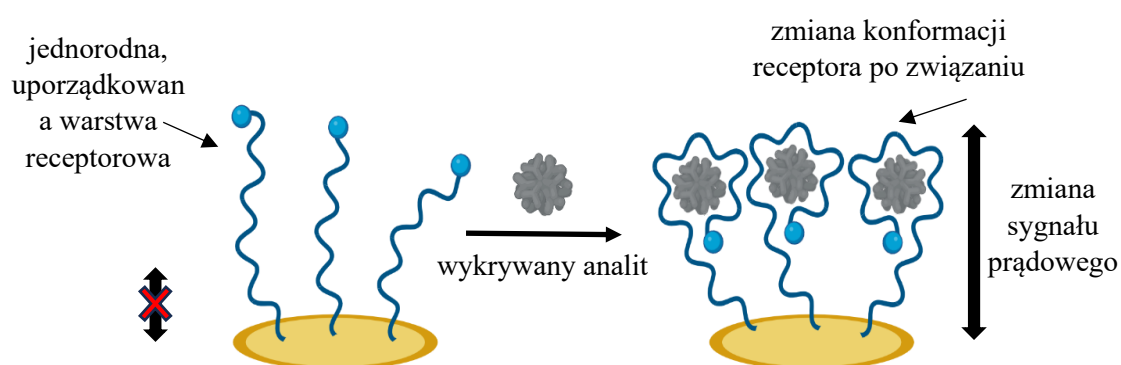
Rys. 1. Przykład zasady działania elektrochemicznego czujnika do wykrywania specyficznych sekwencji DNA ze znacznikami redoks przyłączonymi kowalencyjnie do immobilizowanych sond.

1.1.2 Aptasensory - wykrywanie analitów niebędących kwasami nukleinowymi

Dzięki bogactwu grup funkcyjnych i elastyczności strukturalnej, a co za tym idzie zdolności do przyjmowania różnych konformacji, oligonukleotydy zyskały uznanie również jako sondy dla substancji innych niż kwasy nukleinowe. Sekwencje takie, określane jako aptamery, to krótkie fragmenty DNA lub RNA wyselekcjonowane w procesie SELEX (z ang. *Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*). Wyróżniają się one wysokim powinowactwem i specyficnością wiązania docelowych ligandów, co czyni je atrakcyjnymi receptorami [17]. Oddziaływanie analit-aptamer typowo cechuje wysoka termodynamiczna stała trwałości powstającego kompleksu, pozwalająca na uzyskanie wiązania w wielu przypadkach dorównującego sile oddziaływania antygenu z przeciwciałem [18].

Dodatkowe przewagi aptamerów względem receptorów białkowych uwidaczniają się przy projektowaniu czujników DNA do wykrywania małocząsteczkowych analitów. Receptory oligonukleotydowe wykazują większą elastyczność w tworzeniu struktur przestrzennych, co

pozwała na efektywne wiązanie nawet bardzo małych substancji, takich jak jony. Dodatkowo, możliwe jest wprowadzenie do struktury aptameru zwielokrotnionych motywów wiążących, co skutkuje zwiększeniem efektywności wychwytu celu poprzez dodatkową stabilizację struktur przestrzennych powstających kompleksów [19,20]. Przeciwciała, z uwagi na naturalne ograniczenia w wiązaniu małych cząsteczek wynikające z mniejszej liczby dostępnych punktów oddziaływania oraz ich mniejszą zdolność do ulegania dynamicznym zmianom strukturalnym wywołanym interakcjami z ligandami małocząsteczkowymi, w praktyce uniemożliwiają zastosowanie jednoetapowego mechanizmu detekcji elektrochemicznej, który został zilustrowany na Rys. 2.



Rys. 2. Przykładowy mechanizm generowania sygnału aptasensora DNA z dowiązanym znacznikiem - detekcja jednoetapowa w oparciu o zmiany konformacyjne warstwy.

Wyróżnić można szereg mechanizmów molekularnych, dzięki którym aptasensory rozpoznają małe cząsteczki i jony, gdyż anality te mogą oddziaływać z różnymi regionami sekwencji receptorowych [21]. Przykładowo, atomy tlenu grup fosforanowych wchodzą w oddziaływania typu elektrostatycznego z dodatnio naładowanymi cząsteczkami, co jest szczególnie istotne przy wiązaniu białek o zasadowym charakterze czy kationów metali takich jak Cd^{2+} i UO_2^{2+} [16,22]. Zasady azotowe mogą z kolei tworzyć wiązania wodorowe z grupami funkcyjnymi małych ligandów organicznych, takich jak adenozy-5'-monofosforan [23]. Sekwencje nukleotydowe posiadające regiony hydrofobowe mogą oddziaływać z niepolarnymi fragmentami małych cząsteczek organicznych, takimi jak metabolity lub leki, a płaskie struktury pierścieniowe zasad azotowych umożliwiają oddziaływania typu π - π z pierścieniami aromatycznymi ligandów, takich jak kofeina czy niektóre antybiotyki [24]. Aptamery mogą również tworzyć kompleksy koordynacyjne z metalami, takimi jak Mg^{2+} , K^+ czy Pb^{2+} , co stabilizuje ich strukturę i zwiększa zdolność do wiązania docelowych cząsteczek, czego

przykład stanowią struktury G-kwadrupleksu stabilizowane przez obecność jonów potasu czy ołowiu [25,26].

Pomimo licznych zalet aptamerów, ich szersze wykorzystanie jako receptorów analitów małocząsteczkowych napotyka również na ograniczenia. W przypadku jonów i małych cząsteczek, ze względu na ich niewielką masę cząsteczkową oraz znaczną różnicę wielkości w porównaniu z oligonukleotydami, proces SELEX jest utrudniony [17]. Kolejnym wyzwaniem przy doborze aptamerów dedykowanych małym cząsteczkom jest brak w ich strukturze grup funkcyjnych, które mogłyby zapewnić silne wiązanie z receptorem i tym samym wysokie powinowactwo do DNA. Niemniej jednak, po zidentyfikowaniu tej przeszkody, opracowano również podejścia do metody SELEX pozwalające na jej minimalizację (np. odwracalne unieruchamianie kandydatów na aptamery na nanocząstkach magnetycznych, co zwiększa wydajność wydzielenia niewiązanych oligonukleotydów). Umożliwiło to selekcję nowych sekwencji o wysokim powinowactwie m. in. do małych cząsteczek i jonów [27].

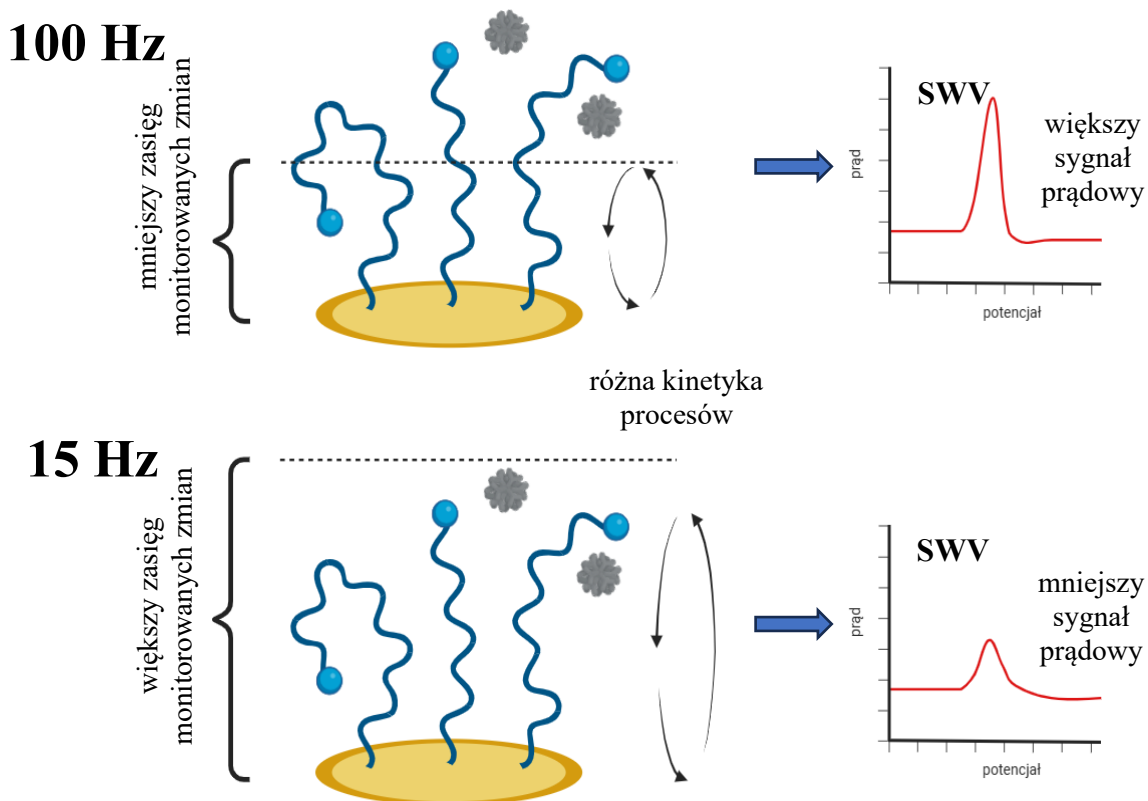
Rtęć w postaci Hg^{2+} należy do jednych z najgroźniejszych zanieczyszczeń środowiska naturalnego ze względu na wysoką toksyczność i zdolność do bioakumulacji. Kation ten może uszkadzać białka enzymatyczne oraz powodować nieodwracalne uszkodzenia DNA, co prowadzi do zaburzeń neurologicznych i uszkodzeń narządów wewnętrznych [28]. Z kolei aniony selenianowe(VI) odgrywają dwojaką rolę - w niewielkich ilościach są kluczowe dla metabolizmu i ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym, jednak ich nadmiar może prowadzić do uszkodzeń DNA oraz zakłóceń funkcji białek naprawczych, zwiększając ryzyko chorób nowotworowych i zaburzeń metabolicznych [29]. Z tego względu istnieje zapotrzebowanie na monitorowanie stężeń obu tych jonów w wodzie pitnej, glebie oraz próbkach biologicznych za pomocą łatwo dostępnych narzędzi analitycznych.

1.1.3 Techniki elektrochemiczne stosowane w analizie sygnału

Detekcja elektrochemiczna jest jedną z najczęściej stosowanych w biosensorach DNA ze względu na wysoką czułość oraz kompatybilność z czujnikami o różnych mechanizmach działania. Dodatkowym atutem jest niski koszt i łatwość miniaturyzacji potencjostatów oraz prostota przetwarzania rejestrowanego sygnału elektrochemicznego. Techniki elektrochemiczne cechują się odpornością na zakłócenia optyczne i stosunkowo wysoką tolerancją wobec złożonych matryc próbek biologicznych oraz środowiskowych, co zwiększa ich atrakcyjność w praktycznych zastosowaniach.

Techniki elektrochemiczne mogą być wykorzystane zarówno bezpośrednio do odczytu sygnału pochodzącego od biosensora, jak i do badania właściwości powierzchni elektrod czy wytworzonych warstw receptorowych. Odmiany woltamperometrii pulsowej, takie jak woltamperometria pulsowa różnicowa (DPV) i woltamperometria fali prostokątnej (SWV), znalazły zastosowanie w detekcji sygnałów prądowych w biosensorach DNA ze względu na wysoką czułość oraz skuteczną eliminację prądu pojemnościowego. Jest to możliwe dzięki wykorzystaniu krótkich impulsów napięciowych, które pozwalają rejestrować sygnał w momentach, gdy składowa pojemnościowa prądu praktycznie zanika. Techniki te umożliwiają również analizę potencjałów oksydacyjnych i redukcyjnych związków, a także określenie szybkości przeniesienia elektronów i odwracalności reakcji. Ponadto rejestracja skanów SWV przy różnych częstotliwościach dostarcza cennych informacji o dynamice procesów elektrochemicznych w warstwie receptorowej biosensora (Rys. 3). Wyższe częstotliwości oferują możliwość rejestrowania wysokich sygnałów prądowych, jednak przy ograniczonym zasięgu monitorowanych zmian. Z kolei niskie częstotliwości, mimo rejestrowanych mniejszych odpowiedzi prądowych, są szczególnie przydatne do śledzenia wolno zachodzących procesów w większej odległości od elektrody, takich jak zmiany konformacyjne na etapie stabilizacji warstwy receptorowej czujnika.

Woltamperometria cykliczna (CV) stanowi podstawową technikę pozwalającą na zbadanie procesów zachodzących na powierzchni elektrody. Rejestracja woltamperogramów CV pozwala na charakterystykę reakcji redoks (w tym identyfikację potencjałów oksydacyjnych i redukcyjnych związków chemicznych), zbadanie kinetyki reakcji elektrochemicznych (takich jak określenie mechanizmów reakcji, szybkości przeniesienia elektronów oraz odwracalności procesu redoks) czy ocenę zjawisk związanych z transportem masy (w tym analizę procesów dyfuzji i konwekcji w układzie elektrochemicznym). Za pomocą woltamperometrii cyklicznej można także ocenić stopień oczyszczenia powierzchni elektrody, co jest kluczowe dla uzyskania wysokiej jakości monowarstw typu SAM. Technika ta umożliwia również kompleksową charakterystykę już wytworzonych warstw, dostarczając informacji o ich stabilności i właściwościach elektrochemicznych [30]. Analiza prądów pików CV pochodzących od monowarstw zawierających znakowane sondy DNA pozwala na wyznaczenie ich gęstości powierzchniowej. Natomiast porównując kolejne skany CV można ocenić stabilność warstwy w czasie. Z kolei obserwacja zmian szybkości narastania potencjału informuje, czy procesy elektrochemiczne są kontrolowane przez reakcje powierzchniowe czy dyfuzję.



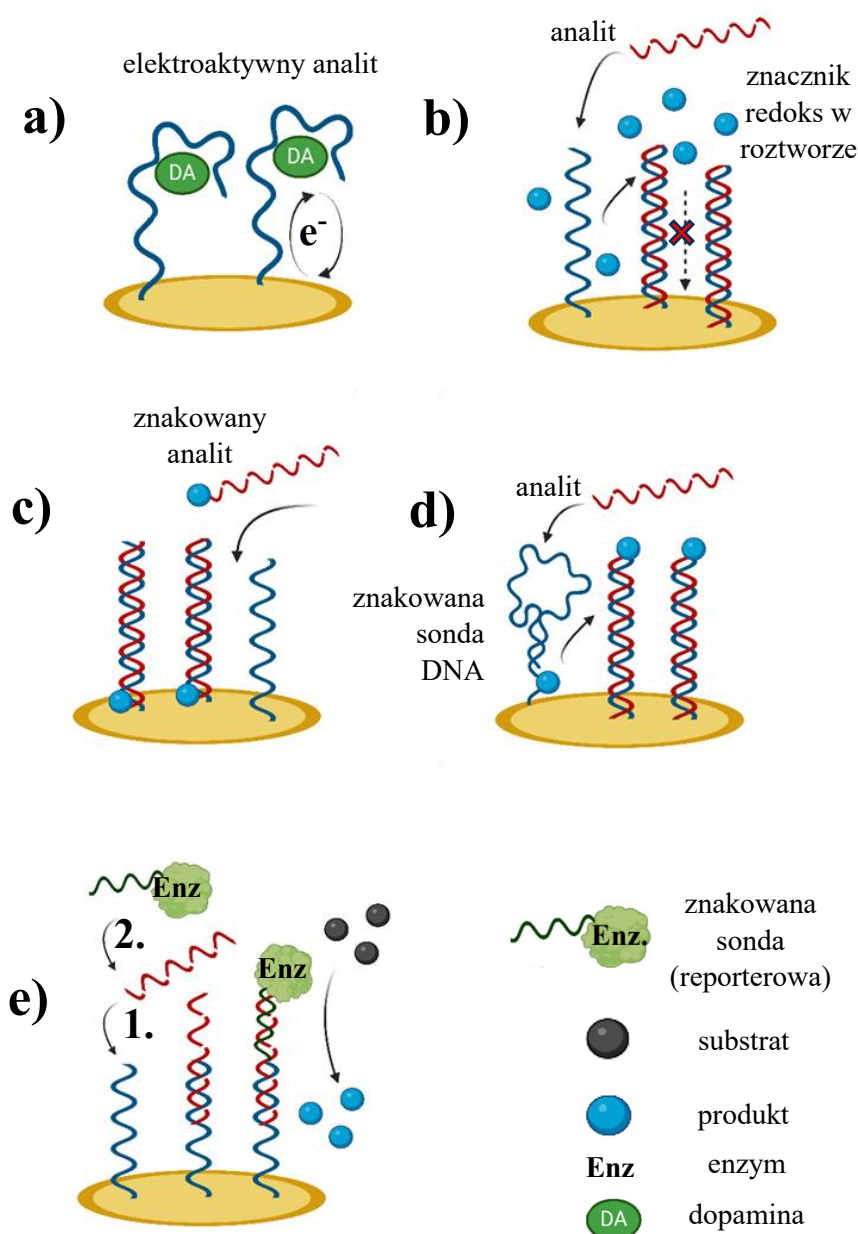
Rys. 3. Analiza dynamiki procesów elektrochemicznych w warstwie receptorowej biosensora za pomocą SWV przy różnych częstotliwościach skanowania.

Kolejną, wartą omówienia techniką, służącą do analizy właściwości układów elektrochemicznych, jest elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS). Technika ta umożliwia monitorowanie procesów powierzchniowych, parametrów takich jak opór przeniesienia ładunku i pojemność elektryczna warstwy podwójnej, jak również mechanizmów reakcji elektrochemicznych, w tym analizę procesów transferu elektronów i transportu masy czy kinetyki i termodynamiki układów elektrochemicznych oraz określenie szybkości wymiany elektronów. Analiza za pomocą spektroskopii impedancyjnej dostarcza informacji na temat granicy faz i procesów tam zachodzących [31]. Jako technika charakteryzacji, EIS pozwala m.in. na ocenę efektywności procesu immobilizacji sond DNA na powierzchni elektrody.

1.1.4 Mechanizmy detekcji w biosensorach DNA oraz wpływ rodzaju i jakości powierzchni elektrodowych na możliwość ich wykorzystania

Elektrochemiczne biosensory powinowactwa wykorzystujące kwasy nukleinowe w roli receptorów oferują szerokie możliwości doboru mechanizmu generowania sygnału, wśród których wyróżnić można podejścia bezznacznikowe (Rys. 4a), oraz szereg strategii wykorzystujących różne postaci znaczników redoks (Rys. 4b-e). Pierwsze z nich bazuje na

mierzalnym sygnale elektrochemicznym wygenerowanym bezpośrednio przez wiązany analit. Przykładem może być detekcja aktywnych elektrochemicznie analitów związanych przez aptamery w warstwie receptorowej, na przykładzie dopaminy, zieleni malachitowej czy topotekanu [32–34]. Jest to najprostsza ze znanych strategii, które oferuje *stricte* bezznackowy pomiar, jednak jej wadą jest niewielka czułość oraz ograniczenie puli substancji oznaczanych do związków aktywnych w reakcjach utleniania-redukcji.



Rys. 4. Różne strategie generowania sygnału wykorzystywane w konstrukcji biosensorów DNA: a) detekcja bezznackowa - wykorzystująca właściwości redoks związanego analitu, b) detekcja z wykorzystaniem znacznika w roztworze, c) detekcja z wykorzystaniem znakowanego analitu, d) detekcja wykorzystująca zmiany konformacyjne receptorów, e) detekcja z wykorzystaniem dodatkowego znakowania (format kanapkowy).

Najprostszym sposobem na uniknięcie tych ograniczeń w przypadku pozostałych analitów jest wykorzystanie markera redoks w roztworze (Rys. 4b). Związki takie jak heksacyjanożelazian(II) i heksacyjanożelazian(III) potasu czy błękit metylenowy obecne w badanym roztworze są w tym przypadku zewnętrznym nośnikiem sygnału elektrochemicznego, zaś źródłem sygnału analitycznego są różnice w sygnale prądowym pochodzącym od znacznika wynikające ze zmian fizykochemicznych w warstwie receptorowej po związaniu analitu. Strategia ta pozwala zachować prostotę konstrukcji warstwy receptorowej biosensora, gdyż nie wymaga ona znakowania sond, jednak takie podejście nie sprawdza się w przypadku złożonych matryc próbek. Szczególnie problematyczne są interferencje ze strony białek, które w wyniku niespecyficznej adsorpcji mogą utrudniać znacznikowi dotarcie do powierzchni i udział w reakcji elektrodowej, wpływając tym samym na końcowy wynik oznaczenia. W przypadku tej strategii generowania sygnału również procedura analityczna jest bardziej skomplikowana z uwagi na konieczność dodawania markera redoks do próbek.

Stosunkowo rzadko stosowanym rozwiązaniem jest wykorzystanie chemicznie modyfikowanych analitów, do których uprzednio przyłączono marker redoks (Rys. 4c). Choć istnieją opisane w literaturze przykłady tego typu czujników DNA, to znaczącym ograniczeniem tego podejścia jest konieczność uprzedniej modyfikacji oznaczanej substancji [35].

Dużo bardziej rozpowszechnionym podejściem jest wykorzystanie tzw. formatu kanapkowego, gdzie uzyskanie sygnału elektrochemicznego poprzedzone jest dwoma etapami, w których dochodzi do wychwytu analitu przez receptor immobilizowany na powierzchni oraz wyznakowania kompleksu receptor-analit za pomocą drugiego receptora z dowiązanym znacznikiem - tzw. sondy reporterowej, znakowanej za pomocą markera redoks bądź znacznika katalitycznego, np. enzymu (jak to zilustrowano na Rys. 4e). Mimo stosunkowo prostej strategii odczytu, w której rejestrowany sygnał pochodzący od znacznika jest bezpośrednio powiązany z obecnością (i stężeniem) analitu, podstawowe ograniczenie stanowi skomplikowana, kilkietapowa procedura analityczna, w tym konieczność wykorzystania par receptorów o powinowactwach do różnych regionów wykrywanej cząsteczki. Problem w formacie kanapkowym stanowi również wykrywanie małych analitów, dla których związanie dwóch cząsteczek receptora często nie jest możliwe ze względów sterycznych. W takich przypadkach na znaczeniu zyskuje format kompetycyjny, w którym wykrywane cząsteczki rywalizują o miejsce wiążące receptora w roztworze (najczęściej w postaci znakowanego aptameru) z analitem unieruchomionym na powierzchni elektrody. Uzyskiwana w tym

przypadku odpowiedź prądowa ma charakter malejący, tj. wzrost stężenia oznaczanej substancji skutkuje spadkiem sygnału prądowego [36].

Strategią pozwalającą połączyć zalety jednoetapowej procedury analitycznej i możliwości realizacji pomiarów bezpośrednio w próbce, bez potrzeby dodatku do niej markera redoks, jest detekcja w oparciu o zmiany konformacyjne receptorów oligonukleotydowych z dowiązanym znacznikiem (Rys. 4d). Przy doborze znacznika należy uwzględnić kilka kluczowych czynników mogących wpływać na odpowiedź biosensora. Przede wszystkim znacznik nie powinien oddziaływać z warstwą receptorową ani wpływać na jej stabilność. Ponadto powinien wykazywać wysoką selektywność wiązania do nici DNA w określonym miejscu oraz nie ulegać niespecyficzej adsorpcji na powierzchni elektrody. Kryteria te spełniają m.in. błękit metylenowy, Oracet® blue oraz błękit toluidynowy [37–39]. Z uwagi na fakt, że związanie wykrywanej cząsteczki może wywołać zmiany konformacyjne receptora czy zmiany sztywności warstwy, podejście to cechuje uniwersalność względem doboru potencjalnych analitów. W oparciu o ten mechanizm możliwa jest zarówno konstrukcja aptasensorów do wykrywania małych substancji takich jak jony, jak również genosensorów do wykrywania dużych cząsteczek takich jak specyficzne sekwencje DNA będące produktami reakcji amplifikacji PCR [40,41].

1.2 Wybrane kierunki rozwoju układów dedykowanych analizom w miejscu pobrania próbki

Aktualne kierunki rozwoju elektrochemicznych biosensorów DNA nie ograniczają się wyłącznie do opracowywania nowych receptorów czy strategii znakowania, ale obejmują również adaptację istniejących rozwiązań do potrzeb współczesnej analityki. Stawia to szereg nowych wyzwań technologicznych, m.in. zapewnienie długoterminowej stabilności biosensorów oraz możliwości ich przechowywania, prostotę konstrukcji czujnika oraz minimalizację liczby etapów analizy, co umożliwia uzyskanie wyniku w krótkim czasie. Trzeba pamiętać, że zmniejszenie rozmiarów czujników z reguły niesie za sobą spadek uzyskiwanego sygnału analitycznego. Z tego względu problem miniaturyzacji przetworników elektrochemicznych oraz możliwości poprawy ważnych parametrów analitycznych takie jak granice wykrywalności i selektywność zostały szczegółowo omówione w osobnych podrozdziałach. W poniższym rozdziale przedstawiono podejścia zwiększające czułość elektrochemicznych biosensorów DNA, takie jak modyfikacje powierzchni elektrod nanomateriałami oraz amplifikacja sygnału z wykorzystaniem reakcji enzymatycznych, a także

zastosowanie nanosorbentów magnetycznych do zateżniania kwasów nukleinowych jako analitów. Osobno omówiono również możliwości zastosowania elektrod cienkowarstwowych, wytwarzanych w technologiach PVD i sitodruku, w kontekście ich wykorzystania jako podłoży do tworzenia warstw receptorowych typu SAM w konstrukcji czujników DNA.

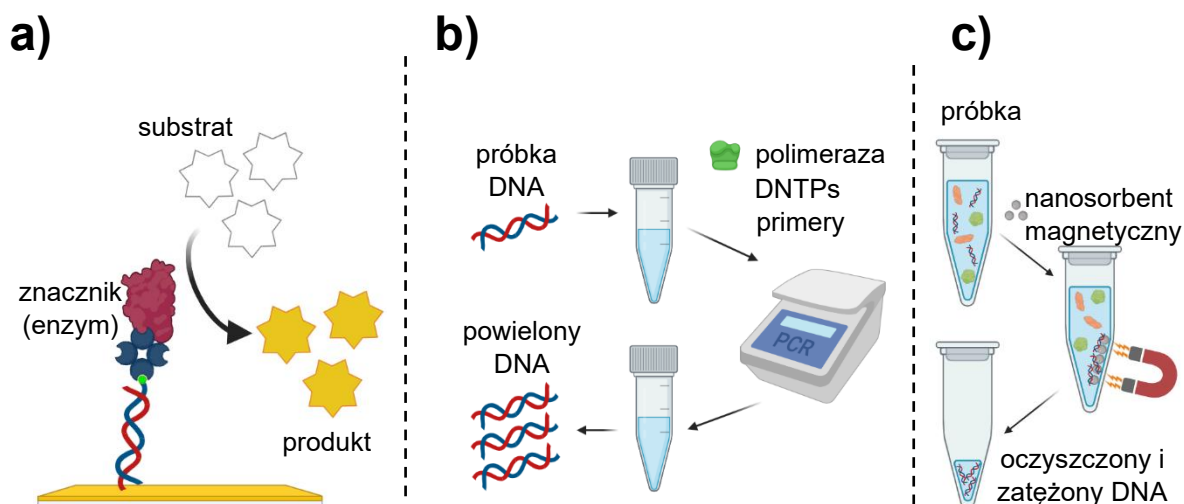
1.2.1 Strategie poprawy czułości i selektywności

W literaturze naukowej opisano różne podejścia mające na celu poprawę parametrów pracy czujników, które różnią się zarówno pod względem konstrukcji, jak i liczby etapów procedury analitycznej [42]. Najprostszym jest projektowanie nowych receptorów oligonukleotydowych – a w szczególności aptamerowych tak, aby cechowały się one wyższym powinowactwem do wykrywanego analitu przy jednocześnie wysokiej selektywności oraz optymalizacja warunków procesu rozpoznawania molekularnego. Zagadnienia te zostaną szerzej omówione w podrozdziale dotyczącym oddziaływań w biosensorach DNA (podrozdział 1.3.5. pt. *Oddziaływania DNA receptorowego z analitami - wpływ na czułość i selektywność konstruowanych czujników*). Inną często wykorzystywaną ścieżką do poprawy czułości biosensorów DNA jest modyfikacja powierzchni elektrody za pomocą przewodzących warstw pośrednich, nanomateriałów (takich jak nanocząstki złota lub materiały kompozytowe) czy polimerów przewodzących [43]. Wprowadzenie takich zmian w konstrukcji czujników prowadzi m.in. do zwiększenia powierzchni aktywnej i/lub przewodnictwa przestrzeni międzyfazowej roztwór/elektroda.

Intensywnie rozwijanym w ostatnich latach podejściem do obniżania granicy wykrywalności biosensorów elektrochemicznych jest poszukiwanie coraz bardziej efektywnych strategii generowania i/lub amplifikacji sygnału. Istotą tego podejścia stanowi chęć wygenerowania możliwie dużej zmiany sygnału dla określonego, wyjściowego stężenia analitu w próbce. Klasycznym przykładem strategii wzmocnienia sygnału, zilustrowanym na Rys. 5a, jest wykorzystanie znakowania enzymatycznego, np. za pomocą peroksydazy chrzanowej czy oksydazy glukozowej, którego celem jest wygenerowanie wysokich stężeń elektroaktywnego produktu reakcji analitycznej, którego stężenie w próbce powiązane jest z ilością wykrywanego analitu [44,45].

Odminną strategią, umożliwiającą szersze wykorzystanie genosensorów jest zastosowanie reakcji powielania materiału genetycznego w analizowanej próbce (Rys. 5b). Podejście to nie prowadzi *stricte* do poprawy czułości sensora, ale dzięki zwiększeniu wyjściowego stężenia oznaczanych sekwencji na drodze amplifikacji umożliwia wykrywanie nawet bardzo niewielkich ich ilości obecnych w wyjściowej próbce. Wyróżnić tu należy metody

bazujące na klasycznej amplifikacji PCR (ang. *polymerase chain reaction*) oraz metody wykorzystujące amplifikację izotermiczną [46,47]. Niezależnie jednak od metody, do realizacji procesu amplifikacji konieczne jest zapewnienie niezbędnych reagentów i polimeraz, co komplikuje całość procedury.



Rys. 5. Strategie przyczyniające się do zwiększenia odpowiedzi czujników DNA: a) katalityczna amplifikacja sygnału, b) powielenie materiału genetycznego, c) magnetyczne zatężenie analitu.

Efekt lokalnego zwiększenia stężenia analitu (zarówno kwasów nukleinowych, jak i innych rodzajów oznaczanych substancji) można uzyskać np. za pomocą jego izolacji poprzez wydzielenie z wykorzystaniem nanocząstek w roli sorbentów (Rys. 5c). Bardzo wygodne jest użycie do tego celu nano- lub mikrocząstek umożliwiających łatwe oddzielenie z roztworu, np. za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego [48]. Poza zatężeniem, ważną zaletą magnetycznej metody wydzielenia analitu jest również usunięcie matrycy próbki, co w sposób pośredni wpływa na poprawę selektywności poprzez eliminację interferencji pochodzących od jej głównych składników. Warto podkreślić, że magnetyczna separacja i zatężenie analitu w ostatnich latach zyskują na znaczeniu również w rozwiązaniach mikrofluidycznych, a to z uwagi na możliwość wykorzystania precyzyjnie zlokalizowanych magnesów stałych lub elektromagnesów jako integralnych elementów systemów do ich obsługi [49–51].

1.2.2 Miniaturyzacja elektrochemicznych czujników DNA

Miniaturyzacja biosensorów elektrochemicznych pozostaje jednym z aktualnych wyzwań w kontekście umożliwienia ich wykorzystywania poza laboratorium [52]. Mniejsze czujniki niosą szereg korzyści, gdyż wymagają mniejszej objętości próbek, zużywają mniej energii i mogą być łatwo sterowane przez urządzenia mobilne, takie jak smartfony w technologii

Internetu Rzeczy (IoT), co otwiera nowe możliwości w diagnostyce oraz analizie środowiskowej [53].

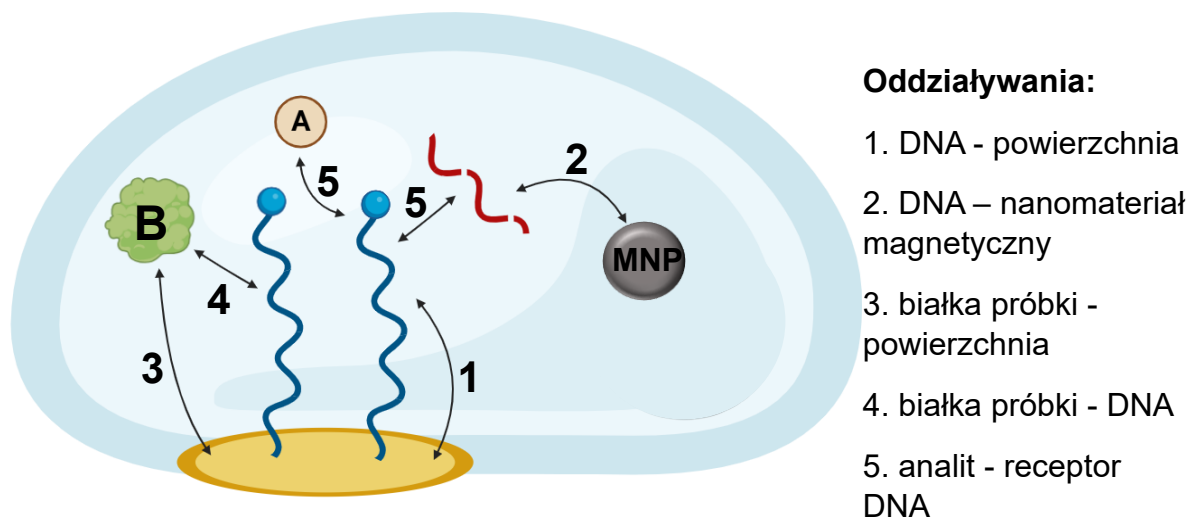
Elektrochemiczne biosensory DNA mające stanowić w przyszłości komponenty miniaturowanych systemów powinny charakteryzować się prostą konstrukcją i niezawodnym działaniem. Szczególnie atrakcyjne w tych warunkach pozostają czujniki na bazie monowarstw typu SAM z dowiązanym znacznikiem redoks, które umożliwiają uzyskanie sygnału bezpośrednio w wyniku oddziaływania sondy DNA z docelową cząsteczką [54]. Złoto pozostaje preferowanym podłożem dla tego typu warstw ze względu na doskonałe właściwości przewodzące oraz stabilność chemiczną [55]. Przyszła miniaturyzacja biosensorów, poza doбором prostej strategii generowania sygnału, wymaga także zmniejszenia geometrycznych wymiarów elektrod. W odpowiedzi na te wyzwania rozwijane są technologie cienkowarstwowe, takie jak sitodruk, druk atramentowy, osadzanie z fazy gazowej (PVD) oraz elektrodpozycja, które umożliwiają produkcję tanich elektrod na podłożach ceramicznych i polimerowych, np. foliach PET [56–59]. Popularne, wysokoprzepustowe technologie sitodruku i PVD różnią się istotnie pod względem kosztów, wydajności oraz uzyskiwanej precyzji wytwarzania. Sitodruk jest techniką umożliwiającą produkcję jednorazowych czujników na masową skalę, jednakże tą metodą uzyskiwana jest niejednorodna powierzchnia, którą cechują różnice w strukturze krystalograficznej złota, co może ograniczać możliwości tworzenia stabilnych i jednorodnych warstw receptorowych typu SAM. Z tego względu dąży się do poprawy właściwości powierzchniowych elektrod, co jest istotnym elementem w projektowaniu biosensorów, szczególnie tych przeznaczonych do masowej produkcji i jednorazowego użytku.

1.3 Oddziaływania towarzyszące rozpoznawaniu molekularnemu na powierzchni i ich wpływ na konstrukcje rozwiązań biosensorycznych

Uzyskanie niskich wartości granic wykrywalności przy zachowaniu wysokiej selektywności (bio)sensorów, możliwe jest jedynie przy właściwym doborze zarówno elementów konstrukcyjnych czujnika DNA, jak i warunków prowadzenia pomiaru. O ile oddziaływanie DNA z analitem, zwłaszcza z cząstkami biologicznymi w roztworach (a więc w homofazie), jest na ogół dobrze poznane, o tyle w układzie heterofazowym, a z takim mamy do czynienia z przypadku biosensorów, środowisko prowadzenia analizy oraz powierzchnia, na której dochodzi do rozpoznania molekularnego, mogą również w znacznym stopniu wpływać na działanie elektrochemicznego czujnika DNA. Wykorzystanie w konstrukcji czujnika receptora o wysokim powinowactwie i selektywności względem wykrywanego celu jest

warunkiem koniecznym, ale nie wystarczającym do uzyskania parametrów analitycznych i użytkowych satysfakcjonujących końcowego użytkownika.

Zarejestrowanie sygnału pochodzącego od specyficznego rozpoznawania analitu wymaga pełnej świadomości i możliwie dużej kontroli nad wzajemnymi oddziaływaniami poszczególnych komponentów układu analitycznego. Część oddziaływań jest pożądana – zaliczyć do nich można m. in. oddziaływania między DNA a powierzchnią przetwornika podczas procesu immobilizacji sondy i pozostałych komponentów warstwy receptorowej. Preferowane są również oddziaływania stanowiące istotę procesów separacji czy wstępnego zateżnienia analitu, jak i samo specyficzne wiązanie celu przez receptory oligonukleotydowe. Z drugiej strony, wszystkim tym pożądanym oddziaływaniom współtowarzyszą oddziaływania niepożądane, przede wszystkim związane z niekontrolowaną adsorpcją bądź desorpcją różnych komponentów, zachodzącą na granicy faz przetwornik – medium immobilizacji, nanosorbent – próbka/zateżzony analit czy warstwa receptorowa – próbka (Rys. 6). Należy podkreślić, że możliwe jest wpływanie na każdy z tych procesów zarówno od strony powierzchni - poprzez sterowanie jej właściwościami, jak również od strony medium reakcji – poprzez odpowiedni dobór jego składu.



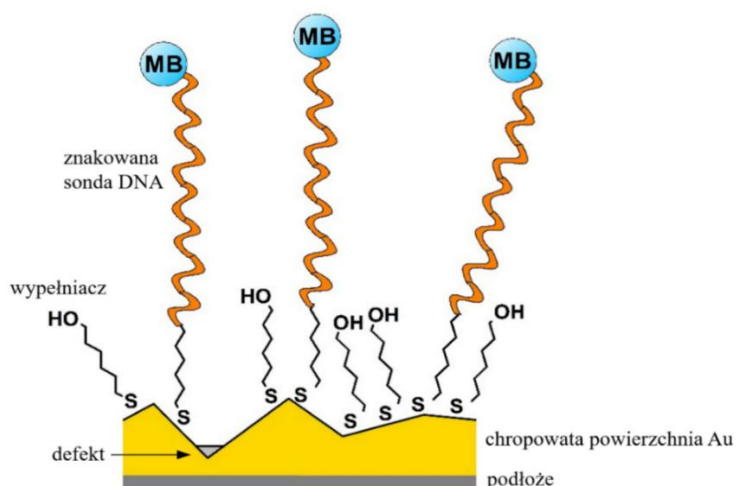
Rys. 6. Schemat ilustrujący wzajemne oddziaływania towarzyszące funkcjonowaniu biosensorów elektrochemicznych

W poniższym rozdziale omówione zostaną najważniejsze mechanizmy stojące za oddziaływaniami ważnymi z punktu widzenia uzyskania czujników DNA o oczekiwanych parametrach analitycznych. Numery przypisane poszczególnym oddziaływaniom, schematycznie zilustrowanym na Rys. 6, odpowiadają kolejności podrozdziałów, które są im poświęcone.

1.3.1 Oddziaływania DNA – powierzchnia

Podstawą metod elektrochemicznych są zjawiska zachodzące na granicy faz elektroda-roztwór. Aby zapewnić skuteczną detekcję woltamperometryczną, konieczne jest trwałe i stabilne unieruchomienie składników warstwy receptorowej na powierzchni przetwornika, który najczęściej pełni jednocześnie funkcję elektrody pracującej, czyli miejsca jednoczesnego generowania i zbierania sygnału analitycznego. Istnieje wiele strategii immobilizacji DNA na materiałach elektrodowych, zarówno złotych, jak i węglowych, takich jak bezpośrednia adsorpcja nici oligonukleotydowych oraz kowalencyjne dowiązanie terminalnie znakowanych oligonukleotydów [60–62].

Z wyjątkiem nielicznych biosensorów wykorzystujących indukowaną analitem desorpcję sond, kluczową cechą oddziaływań odpowiedzialnych za unieruchomienie receptorów oligonukleotydowych na powierzchni jest ich trwałość i stabilność w warunkach pomiarowych. To wymaganie determinuje dominującą rolę wiązań kowalencyjnych. Ponadto, istotne jest zapewnienie właściwego składu warstwy, umożliwiającego minimalizację oddziaływań niespecyficznych oraz kontrolę gęstości powierzchniowej sond, co wpływa na ich właściwą organizację i dostępność dla analitu. Spośród opisanych w literaturze metod, zdecydowanie najlepszą kontrolę nad składem warstwy receptorowej oraz konformacją występujących w niej receptorów oligonukleotydowych oferują tiolowe monowarstwy typu SAM na powierzchni złota [63,64]. Dzięki synergii silnego wiązania kowalencyjnego pomiędzy siarką a złotem oraz oddziaływań hydrofobowych pomiędzy łańcuchami alifatycznymi w strukturach typowo stosowanych łączników oraz wypełniaczy uzyskuje się stabilne i uporządkowane, polarne warstwy o wysokiej gęstości powierzchniowej [65]. Warstwy takie sprzyjają zachowaniu odpowiedniej orientacji przestrzennej sond DNA poprzez ograniczenie tendencji do konkurencyjnej adsorpcji oligonukleotydów (szczególnie tych o długich łańcuchach) wywołanej spontanicznym oddziaływaniem typu koordynacyjnego pomiędzy atomami złota i bogatymi w elektrony zasadami purynowymi [66]. Schemat mieszanej monowarstwy składającej się z tiolowanego oligonukleotydu i MCH przedstawiono na Rys. 7.



Rys. 7. Schemat warstwy receptorowej typu SAM na powierzchni złota.

Duże znaczenie ma również konieczność osiągnięcia kompromisu pomiędzy efektywnością pokrycia powierzchni złota, możliwą do uzyskania poprzez zastosowanie długołańcuchowych łączników sond DNA i wypełniaczy - stanowiących jednocześnie izolatory, a zachowaniem zdolności warstwy do transportu elektronów [67]. Zauważalna więc staje się potrzeba poszukiwania nowych kompozycji mieszanych warstw typu SAM, które mogą poprawić funkcjonowanie elektrochemicznych biosensorów DNA i zmniejszyć interferencje zarówno na etapie rozpoznawania molekularnego, jak również na etapie generowania i elektrochemicznej detekcji sygnału.

1.3.2 Przykłady oddziaływań DNA z powierzchnią modyfikowanych nanocząstek

Nanomateriały w elektrochemicznych czujnikach DNA znajdują zastosowanie zarówno jako cienkie warstwy modyfikujące powierzchnię elektrod, jak i w postaci koloidalnej w roztworach, pełniąc głównie funkcję znaczników. W przypadku obu tych zastosowań kluczowym etapem jest uprzednia modyfikacja powierzchni nanomateriałów za pomocą odpowiednich bioreceptorów, co zapewnia specyficzność detekcji [68]. Alternatywnym podejściem jest zastosowanie nanomateriałów w procedurach przedanalitycznych, na przykład jako sorbentów do izolacji i oczyszczania materiału genetycznego [69–71].

Nano- i mikrostruktury stanowią wygodne sorbenty z uwagi na ich wysoką powierzchnię właściwą wynikającą z dużego udziału atomów powierzchniowych, a co za tym idzie wysoką pojemność wiązania docelowych cząsteczek. Dodatkową zaletę stanowi możliwość wykorzystania w konstrukcji takich sorbentów rdzeni o właściwościach superparamagnetycznych, dzięki którym możliwa jest szybka i efektywna separacja cząstek

z próbki przy pomocy zewnętrznego pola magnetycznego. Zalety te stoją za popularnością wydzielania kwasów nukleinowych za pomocą cząstek magnetycznych (ang. *magnetic beads*) jako metody ekstrakcji i lokalnego zateżenia analitu przed dalszymi etapami procedury analitycznej. Cząstki magnetyczne jako sorbenty wykorzystywane są między innymi na etapie izolacji wirusowego RNA przed dalszymi etapami RT-PCR i qPCR czy na potrzeby analiz genomowych takich jak sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) lub testy PCR [72,73]. Do tego celu wykorzystuje się z reguły sorbenty magnetytowe (niemodyfikowany Fe_3O_4) lub pokryte warstwą modyfikowanej krzemionki. Mechanizm wiązania DNA/RNA opiera się w nich głównie na oddziaływaniach elektrostatycznych między fosforanami kwasów nukleinowych a naładowanymi dodatnio grupami aminowymi lub hydrofilową powierzchnią.

Należy mieć jednak na uwadze, że w przypadku izolacji DNA za pomocą nanosorbentów pożądane jest, aby oddziaływanie miało charakter odwracalny, dlatego też przy projektowaniu mechanizmu wiązania z powierzchnią konieczne jest również opracowanie protokołu desorpcji z użyciem odpowiedniego buforu elucyjnego. W aktualnie stosowanych rozwiązaniach adsorpcja typowo prowadzona jest w warunkach podwyższonej siły jonowej i z dodatkiem czynnika chaotropowego, zaś elucja indukowana jest obniżeniem siły jonowej i często również podwyższeniem temperatury [74–76]. Poza adsorpcją wspomaganą elektrostatycznie istnieje jednak szereg innych mechanizmów odwracalnego wiązania kwasów nukleinowych z powierzchnią, angażujących m.in. oddziaływania hydrofobowe typu π - π czy koordynacyjne. Ich użyteczność w procesie izolacji kwasów nukleinowych za pomocą sorbentów jednak jak dotąd nie została w sposób jednoznaczny zweryfikowana.

Trudność w ilościowej ocenie zdolności wiązania stanowi istotną przeszkodę w porównawczej charakterystyce różnych typów nanosorbentów. Wynika ona z różnic w ich składzie, rozmiarach rdzeni czy sposobie wyrażania stężenia. Pogłębiona charakterystyka nowych typów sorbentów magnetycznych w postaci nanocząstek rdzeń-powłoka może otworzyć drogę do opracowania nowych rozwiązań na potrzeby izolacji kwasów nukleinowych.

1.3.3 Oddziaływania białkowych składników próbki z powierzchnią

Parametrem warunkującym wiarygodność analiz prowadzonych w próbkach o złożonym składzie jest uzyskanie odpowiednio wysokiej selektywności czujnika, rozumianej zarówno jako wysokie powinowactwo bioreceptora do analitu względem interferentów, ale również jako ogólna odporność czujnika na zmiany sygnału na skutek oddziaływań niespecyficznych składników próbki. W przypadku zarówno geno- jak i aptasensorów DNA, pomiary przeważnie

są realizowane w próbkach o złożonym składzie, takich jak lizaty komórkowe, mieszaniny poreakcyjne z reakcji PCR czy próbki środowiskowe o wieloskładnikowej matrycy, co nakłada dodatkowe wymagania na warstwę receptorową odnośnie jej zdolności do przeciwdziałania niespecyficzej adsorpcji. Szczególnie groźne w takich przypadkach są interferencje ze strony białek, ze względu na ich różnorodność biologiczną i tendencję do adsorpcji na różnych powierzchniach i według zróżnicowanych mechanizmów (zarówno w oparciu o oddziaływania hydrofobowe jak i elektrostatyczne czy koordynacyjne) [77]. Białka jako biopolimery o znacznym ciężarze cząsteczkowym - z reguły wielokrotnie większym niż typowe receptory oligonukleotydowe - znacząco zmieniają lokalne otoczenie warstwy receptorowej, co zakłóca zarówno możliwość generowania sygnału poprzez wiązanie receptora z analitem, jak również pogarsza zdolności warstwy do transportu ładunku [78]. Toteż w elektrochemicznych biosensorach DNA, niezależnie od wykorzystywanego mechanizmu generowania sygnału, interferencje ze strony białek należy uznać za znaczące. Zapobieganie temu zjawisku jest jednym z kluczowych wyzwań, któremu należy sprostać, aby czujniki DNA mogły być powszechnie stosowane w analizie próbek rzeczywistych.

Wśród sposobów przeciwdziałania adsorpcji białek wyróżnić można dobór odpowiedniego składu buforu pomiarowego np. poprzez regulację pH czy dodatki substancji powierzchniowo-czynnych (np. Tween-20). Inną strategią jest zwiększenie odporności warstwy receptorowej na niespecyficzne osadzanie się białek i innych składników matrycy próbki poprzez odpowiedni dobór jej składu. Wiele takich rozwiązań opracowano dla czujników z detekcją SPR i QCM, gdzie problem niespecyficzej adsorpcji jest równie istotny jak w biosensorach elektrochemicznych. Stosuje się tam warstwy ochronne z długołańcuchowych polarnych polimerów, takich jak pochodne PEG czy hydrożele CMD [79]. Jednak w przypadku modyfikowanych elektrod pokrycia te nie są stosowane z uwagi na ich niską przewodność i znaczną grubość [80,81]. Z tego względu jako typowe czynniki zabezpieczające powierzchnię czujników elektrochemicznych przed niespecyficzną adsorpcją stosuje się ω -merkaptalkohole takie jak MCH i jego homologi, które mogą być spontanicznie wkomponowane do warstw SAM zawierających tiolowane sondy DNA.

Podstawowy mechanizm przeciwdziałania wiązaniu białek stanowi w tym przypadku zapewnienie jednorodności warstwy z uwagi na jej uporządkowanie (warunkowane oddziaływaniami hydrofobowymi łączników alifatycznych) oraz jej wysoka hydrofilowość [82]. Powierzchnie takie ograniczają adsorpcję białek ze względu na stabilną warstwę hydratacyjną. Usunięcie tych cząsteczek wody podczas adsorpcji białka jest entropowo niekorzystne. Dodatkowo brak oddziaływań hydrofobowych i van der Waalsa, które zazwyczaj

napędzają adsorpcję, czyni proces energetycznie nieopłacalnym, co hamuje wiązanie białek. Skuteczność tego mechanizmu nie jest jednak wystarczająca w przypadku wymagających próbek rzeczywistych o złożonej matrycy, np. w diagnostyce medycznej. W związku z tym, aktualnym zagadnieniem badawczym pozostaje poszukiwanie nowych niereceptorowych składników warstw bioczułych.

Istnieją doniesienia literaturowe wskazujące na możliwość wykorzystania innych mechanizmów przeciwdziałania adsorpcji białek, m. in. w oparciu o aktywne odpychanie elektrostatyczne (zastosowanie warstw kationowych), wytworzenie warstw hydrofobowych o obniżonej gęstości i podwyższonej przewodności zbudowanych z krótkołańcuchowych alifatycznych pochodnych ditiokarbaminianów czy zastosowanie alifatycznych i aromatycznych homologów bądź analogów ω -merkaptalkoholi celem uzyskania warstw o nieco mniejszym stopniu uporządkowania oraz większej przewodności [83–86]. Jednakże możliwość wykorzystania wypełniaczy powierzchni innych niż ω -merkaptalkohole i ich wpływ na funkcjonalność i sygnały prądowe uzyskiwane od warstw receptorowych elektrochemicznych biosensorów DNA nie została jak dotąd zweryfikowana doświadczalnie.

1.3.4 Oddziaływania białkowych składników próbki z receptorami DNA

Wśród oddziaływań wykorzystywanych na różnych etapach funkcjonowania bioczułników DNA warto wyróżnić również interakcje receptorów oligonukleotydowych ze składnikami próbek innymi niż wykrywane anality. Do zjawisk tych można zaliczyć interferencje ze strony składników próbek rzeczywistych oraz wpływ celowo wprowadzanych dodatków mających na celu modyfikację zdolności i siły oddziaływania DNA w reakcji hybrydyzacji oraz wiązania innych cząsteczek. W literaturze opisano efekty wprowadzenia szeregu dodatków do buforu hybrydyzacyjnego, takich jak kationowe polimery [87], poliaminy [88], polisacharydy, czy glicerol [89], których obecność poprawia specyficzność parowania zasad nukleinowych oraz przyspiesza kinetykę oraz wydajność izotermicznej amplifikacji.

Wartym szerszego omówienia przykładem czynnika o dwojakim mechanizmie działania, który wpływa zarówno bezpośrednio na interakcje DNA z analitami, jak również zmienia charakter ich oddziaływań z białkami, jest dimetylosulfotlenek (DMSO). Dodatek tego rozpuszczalnika w zakresie stężeń od 0,1% do 1,5% (v/v) znacząco wpływa na strukturę DNA i inne makrocząsteczki, takie jak białka i lipidy [90]. Czynnikiem ten uchodzi za destabilizujący strukturę podwójnej helisy DNA przy jego niskich stężeniach, z uwagi na tworzenie wiązań wodorowych z kwasami nukleinowymi. Lokalne osłabienie stabilności duplexu DNA-DNA, prowadzące do powstawania luźniejszych obszarów w cząsteczkach kwasów nukleinowych,

zostało opisane jako proces sprzyjający rozplataniu sond typu spinka oraz zapobiegający niekontrolowanemu tworzeniu struktur drugorzędowych nici DNA. Dotychczas znalazło to zastosowanie w protokołach biologii molekularnej [91] oraz np. w genosensorze do wykrywania RNA [92]. Ponadto, poprawę selektywności pod wpływem DMSO uzyskano w przypadku aptasensorów do detekcji jonów sodu i potasu, co zostało wyjaśnione poprzez dodatkową stabilizację struktury G-kwadrupleksu [93].

Wynikające z obecności DMSO zaburzenie pierwotnej struktury wiązań wodorowych wpływa również na natywną otoczkę hydratacyjną białek, zmieniając ich zdolności do oddziaływania zarówno z powierzchnią, jak i z sondami DNA. Minimalizacja wpływu interferencji ze strony białek na rejestrowane sygnały elektrochemicznych biosensorów jest z kolei ważnym wyzwaniem w kontekście ich potencjalnych zastosowań w analizie próbek rzeczywistych, gdyż zarówno dla produktów po reakcji amplifikacji, jak i próbek środowiskowych stanowią one składniki matrycy.

Warto jednak w tym miejscu zauważyć, że potencjał DMSO jako wielofunkcyjnego modyfikatora oddziaływań białko-DNA oraz DNA-DNA w konstrukcji genosensorów o prostym mechanizmie wykorzystującym zmiany konformacyjne unieruchomionej sondy nie został jeszcze w pełni zweryfikowany, a nieliczne jego zastosowania ograniczają się do wykorzystania tego rozpuszczalnika do destabilizacji dupleksów w roztworze w sondach typu *molecular beacon* i biosensorach do detekcji RNA [92,94].

Kolejnym aspektem koniecznym do poruszenia w kontekście wpływu składników medium analizy na oddziaływania receptor-analit jest regeneracja warstwy receptorowej. Mimo, iż z definicji biosensory DNA powinny być urządzeniami wielokrotnego użytku, zagadnienie regeneracji warstwy receptorowej często jest pomijane w badaniach nad nowymi konstrukcjami apta- czy genosensorów. Istotą regeneracji warstwy receptorowej jest wymuszenie dysocjacji substancji oznaczanej z powierzchni na skutek zniszczenia jej oddziaływań z receptorem oligonukleotydowym i przywrócenie pierwotnego stanu warstwy receptorowej, w tym odtworzenia zdolności do wiązania analitu. Dobry czynnik regenerujący poza spełnieniem swojej podstawowej funkcji, czyli efektywnego usunięcia związanych cząsteczek celu, powinien dodatkowo być łagodny względem niereceptorowych składników warstwy tak, aby zapewnić możliwość wielokrotnego jej użycia bez istotnego pogorszenia parametrów pracy czujnika.

W literaturze zaproponowano szereg metod fizycznej jak i chemicznej regeneracji warstw receptorowych aptasensorów. Z uwagi na szerokie spektrum oddziaływań odpowiedzialnych za wiązanie analitów, opisane są różnorodne podejścia. Wśród nich wskazać można zarówno

fizyczne (regeneracja termiczna czy indukowana promieniowaniem UV), jak i chemiczne (jednoczesne wykorzystanie cysteaminy i jonów Mg^{2+} [95], 1% HCl [96], zakwaszonych roztworów surfaktantów [97] czy buforu octanowego o pH = 8,0 [98]).

1.3.5 Oddziaływania DNA receptorowego z analitami - wpływ na czułość i selektywność konstruowanych czujników

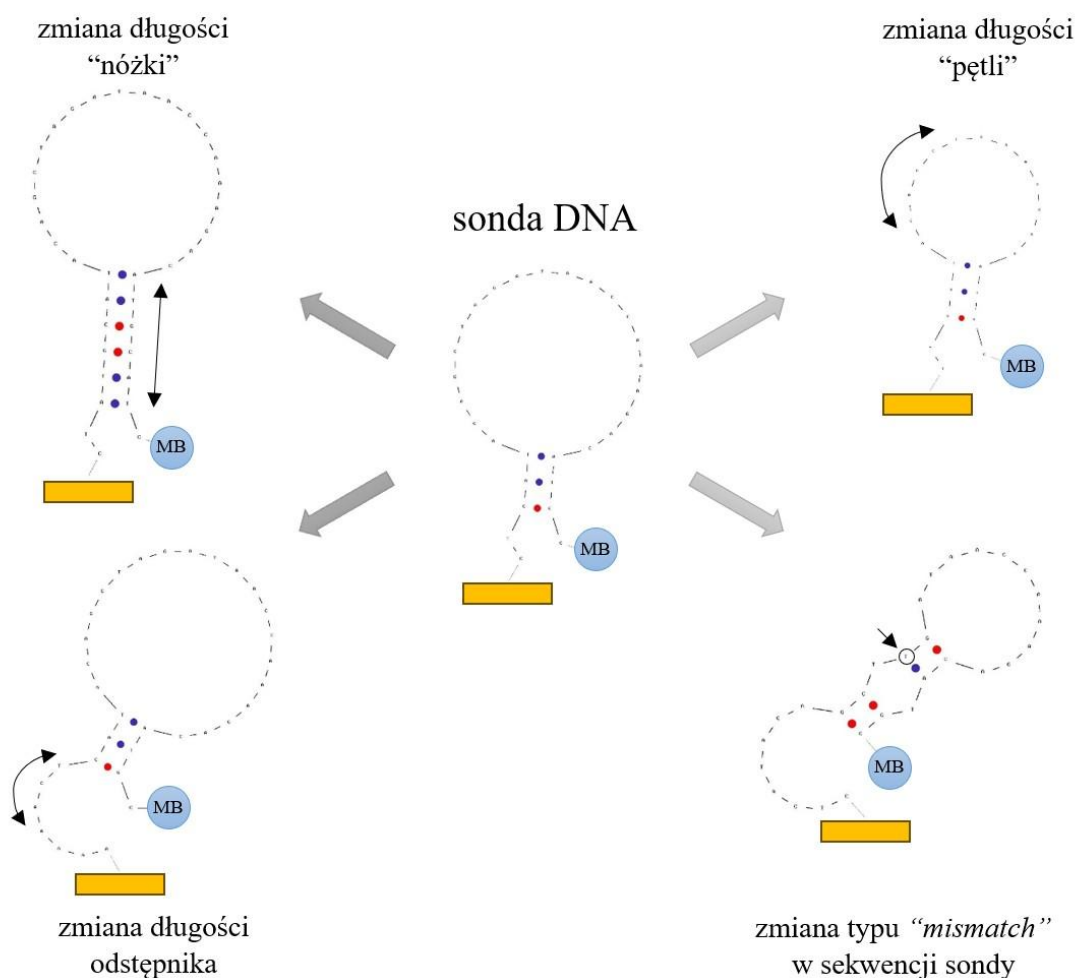
Oddziaływania receptorów oligonukleotydowych z kwasami nukleinowymi

Mechanizm rozpoznawania kwasów nukleinowych przez immobilizowaną sondę DNA polega na hybrydyzacji zgodnej z regułami Watsona-Cricka, skutkującej tworzeniem stabilnych wiązań wodorowych między zasadami komplementarnymi: A-T (lub A-U w przypadku RNA) oraz G-C. Ponieważ proces ten odwzorowuje naturalne, dobrze poznane oddziaływania zachodzące w przyrodzie, optymalne warunki do wydajnego tworzenia dupleksów są zbliżone do fizjologicznych, w których hybrydyzacja kwasów nukleinowych przebiega spontanicznie i efektywnie. Warunki środowiskowe, takie jak siła jonowa i pH, mają decydujący wpływ na kinetykę i efektywność hybrydyzacji. Jony jednowartościowe (Na^+ , K^+) stabilizują dwuniciowe DNA, zmniejszając odpychanie elektrostatyczne między grupami fosforanowymi, podczas gdy jony dwuwartościowe (Mg^{2+} , Ca^{2+}) dodatkowo stabilizują struktury drugorzędowe tworząc tzw. „mostki jonowe”. Natomiast pH w zakresie 7,0–8,0 zapewnia stabilność wiązań wodorowych, podczas gdy wartości skrajne destabilizują dsDNA i zmniejszają wydajność jego powstawania, co wykorzystywane jest jako podstawowy mechanizm regeneracji warstw receptorowych genosensorów [99].

Adaptacja spontanicznego procesu tworzenia dupleksów DNA-DNA na potrzeby rozpoznawania molekularnego w genosensorach wymaga uwzględnienia dodatkowych aspektów związanych z zachodzeniem reakcji na granicy faz oraz konieczności zaprojektowania sondy tak, aby związanie analitu wywoływało mierzalną zmianę sygnału. Szczególnie w biosensorach z dowiązanym znacznikiem hybrydyzacja powinna powodować jednocześnie reorganizację struktury sondy. Dzięki temu oddziaływanie z analitem wpływa na jej przestrzenne ułożenie względem powierzchni elektrody, zwiększając lub zmniejszając dostępność znacznika elektrochemicznego.

Podczas stosowania mechanizmu „*signal-off*” bazującego na otwarciu i usztywnieniu wyjściowej struktury typu spinki (ang. *hairpin*) z dowiązanym terminalnie markerem redoks, konieczne jest stosowanie odpowiednio długich sond tak, aby mogły one po związaniu przyjąć w sposób spontaniczny pożądaną strukturę drugorzędową. Oczekuje się, aby sondy typu spinka

spontanicznie tworzyły stabilne struktury o niskiej energii swobodnej, które łatwo rozwijają się w obecności komplementarnego analitu z uwagi na względnie niską barierę energetyczną tego procesu. Z kolei sekwencja oznaczana nie powinna tworzyć konkurencyjnych względem sondy, stabilnych struktur drugorzędowych, gdyż mogłoby to zmniejszać wydajność hybrydyzacji. Typowo w przypadku sond typu spinka (często nazywanych również sondami typu *stem-loop*) modulacja powinowactwa do sekwencji oznaczanej realizowana jest poprzez zmiany długości sztywnego segmentu dupleksowego (*stem*), długość jednoniciowej pętli (*loop*), zmiany w sekwencji sondy czy też zastosowanie dodatkowych nukleotydów niezaangażowanych w wiązanie w roli łączników (ang. *spacers*), których rolą ma być poprawa dostępności sondy dla analitu i redukcja ograniczeń sterycznych [100]. Przykłady takich ingerencji w strukturę sondy są zilustrowane na Rys. 8.



Rys. 8. Przykłady struktur sond DNA typu „spinka”

Innym opisanym w literaturze i szeroko wykorzystywanym w genosensorach sposobem podwyższenia powinowactwa receptorów do wykrywanej sekwencji oraz poprawy selektywności jest modyfikacja struktury sondy poprzez wykorzystanie analogów DNA lub

modyfikowanych nukleotydów. Analogi kwasów nukleinowych o zmienionych strukturach szkieletu fosforanowo- cukrowego takie jak PNA czy ZNA znacząco poprawiają wydajność hybrydyzacji dzięki ograniczeniu odpychania elektrostatycznego między łańcuchami, co zwiększa termodynamiczną stabilność dupleksów nawet przy niskiej sile jonowej. Inne analogi takie jak LNA pozwalają na tworzenie stabilnych w warunkach próbek biologicznych hybryd o znacznie wyższej temperaturze topnienia dupleksów oraz zwiększonej specyficzności wobec sekwencji komplementarnych [101–103]. Z kolei modyfikowane zasady, takie jak 5-metylocytosyna czy 8-oksyguanina tworzą silniejsze wiązania z komplementarnymi zasadami, co sprzyja stabilizacji struktur drugorzędowych w pętłach i sondach typu spinka [104]. Jednak z uwagi na podwyższony koszt syntezy i potencjalnie odmienne właściwości tego typu sond w monowarstwach (na etapie immobilizacji czy oddziaływań z innymi komponentami SAM) ich zastosowanie w elektrochemicznych biosensorach nie jest rozpowszechnione.

Projektowanie sekwencji sond oligonukleotydowych do zastosowań w roli receptorów dla genosensorów typowo wykorzystuje metody bioinformatyczne *in silico*. Pozwalają one określić spodziewany całkowity efekt energetyczny (wyrażany w postaci entalpii swobodnej ΔG) tworzenia struktur drugorzędowych i porównać go z efektem energetycznym tworzenia dupleksu sonda -analit. Należy jednak podkreślić, że stosowane modele nie są w stanie w pełni odzwierciedlić warunków warstwy receptorowej, w tym różnic wynikających z ograniczonej swobody konformacyjnej immobilizowanych receptorów, ograniczeń dyfuzyjnych wynikających z asocjacji zachodzącej na granicy faz, czy też różnic w powinowactwie wynikających ze składu medium hybrydyzacji czy chemicznej modyfikacji sekwencji sond.

Opisana wyżej złożoność mechanizmu rozpoznawania molekularnego w genosensorach wskazuje zatem na potrzebę każdorazowej, eksperymentalnej weryfikacji użyteczności zaprojektowanych receptorów oligonukleotydowych do zastosowań w sensorach zarówno pod kątem powinowactwa do analitu (efekt energetyczny wiązania), jak i możliwości generowania sygnału prądowego (stabilność obu konformacji sondy w warunkach pomiaru i występowanie mierzalnej różnicy w sygnale po związaniu analitu).

Oddziaływania receptorów oligonukleotydowych z jonami nieorganicznymi

Rozpoznawanie molekularne przez aptamery z reguły nie odwzorowuje naturalnych procesów biochemicznych, ponieważ sekwencje te są uzyskiwane na drodze selekcji *in vitro*, toteż optymalne warunki ich działania mogą znacznie odbiegać od warunków fizjologicznych. W przeciwieństwie do sond DNA, których mechanizm wiązania bazuje na hybrydyzacji Watsona-Cricka i wymaga omawianego wyżej środowiska stabilizującego strukturę dupleksu,

aptamery mogą działać w znacznie szerszym zakresie warunków środowiskowych. Proces rozpoznawania molekularnego w przypadku tych sekwencji jest mniej zależny od stabilizacji przez konkretne jony, co pozwala na ich zastosowanie w zróżnicowanych matrycach, w tym jako receptory jonów nieorganicznych w próbkach środowiskowych. Wspominana wyżej swoboda w doborze warunków oferuje szereg nowych możliwości, ponieważ wiązanie analitu przez aptamer może w ten sposób angażować różne jego komponenty - zarówno szkielety cukrowo-fosforanowe jak i zasady azotowe, a także niewykorzystywane w przypadku prostych reakcji hybrydyzacji DNA-DNA mechanizmy oddziaływań [24,105].

Na przestrzeni ostatnich lat opublikowano szereg prac opisujących możliwości wykrywania kationów i anionów nieorganicznych za pomocą aptasensorów DNA wykorzystujących różne strategie detekcji sygnału. Szczególnie wartym uwagi - zarówno z uwagi na mechanizm oddziaływania z kwasami nukleinowymi, jak również znaczenie oznaczania tego jonu w analityce środowiskowej - jest kation rtęci(II), dla którego przykłady aptasensorów zestawiono w Tabeli 1.

W większości opisanych przypadków selektywność aptasensorów względem jonów rtęci(II) wynika z unikalnej zdolności Hg^{2+} do tworzenia mostków T- Hg^{2+} -T, wspomaganej zmianami konformacyjnymi aptameru oraz preferencyjnym wiązaniem koordynacyjnym z wybranymi grupami donorowymi w jego strukturze. Należy jednak zauważyć, że analiza źródeł literaturowych nie dostarcza jednoznacznych wniosków na temat mechanizmu generowania sygnału elektrochemicznego, ani również nie rozstrzyga, jaka powinna być optymalna sekwencja i długość sondy DNA z dowiązanym znacznikiem, która będzie najbardziej odpowiednia do zastosowań w voltamperometrycznych biosensorach opartych na monowarstwach typu SAM.

Poza odpowiednim zaprojektowaniem sondy, istnieje również możliwość poprawy selektywności wiązania kationów poprzez odpowiednie dostosowanie warunków środowiskowych wpływających m.in. na stabilność analitu w roztworze. Warunki te mogą być dostosowane tak, aby utrudnić wiązanie innych jonów metali, czego przykładem może być np. zastosowanie precyzyjnej kontroli pH sprzyjającej hydrolizie części jonów przeszkadzających bądź zastosowanie jako czynników buforujących lub dodatków do buforu czynników stabilizujących lub kompleksujących wybrane formy kationów w roztworach. Doniesienia literaturowe wskazują również na możliwość sterowania selektywnością aptamerów za pomocą wprowadzenia do medium pomiarowego jonów dwuwartościowych [106].

Tabela 1. Przykłady aptasensorów DNA wykorzystywanych do wykrywania jonów rtęci(II)

Zasada działania	Źródło sygnału	Aptamer	Detekcja	Zakres liniowy/ LOD	Oдноśnik
tworzenie „spinki” – hybrydyzacja wspomagana wewnątrz-cząsteczkowymi mostkami T-Hg ²⁺ -T	dowiązany znacznik MB (<i>signal-on</i>)	22 nb, bogaty w T (64% sekwencji)	woltamperometria (SWV)	1 fM - 1 nM/ 0,62 fM	[20]
	dowiązany znacznik FAM (wygaszanie fluorescencji)		fluorymetria (FRET)	10 - 250 nM/ 3,5 nM	[107]
	[Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} w roztworze (<i>„signal-on”</i>)	29 nb, bogaty w T (62% sekwencji)	EIS	0 - 500 nM/ 50 nM	[108]
	dowiązany MB (<i>„signal-off”</i>)	26 nb, bogaty w T (62% sekwencji)	kolorymetria	1 - 300 nM/ 0,7 nM	[109]
	osłabienie oddziaływania kompleksu aptamer-Hg ²⁺ z podłożem	33 nb, bogaty w T (52% sekwencji)	spektroskopia sił pojedynczych cząsteczek (SMFS)	10 - 100 pM/ 100 pM	[110]
	dowiązany ferrocen (<i>„signal-on”</i>)	33 nb, bogaty w T (52% sekwencji) 14 nb, bogaty w T (72% sekwencji)	woltamperometria (DPV)	0,01 - 500 nM/ 0,005 nM	[111]
	dowiązany znacznik FAM (wygaszanie fluorescencji – <i>„signal-on”</i>)		fluorymetria	2 - 160 nM/ 0,2 nM	[112]
	dowiązany ferrocen (<i>„signal-on”</i>)	22 nb, bogaty w T (64% sekwencji)	woltamperometria (DPV) i EIS	nie dotyczy/ 0,1 ng/ml	[113]
	dowiązany znacznik TAMRA i wygaszacz DABCYL (<i>„signal-off”</i>)	sekwencja polityminowa T ₁₂	fluorymetria	12,7 nM - 1 μM/ 12,7 nM	[114]
hybrydyzacja dwóch nici DNA wspomagana mostkami T-Hg ²⁺ -T i klasyczna hybrydyzacja (mechanizm kompetycyjny)	dowiązany znacznik FAM (<i>„signal-on”</i>)	23 nb, bogaty w T (35% sekwencji)	fluorymetria	200 - 900 fM i 5 - 33 pM/ 106 fM	[115]

hybrydyzacja dwóch nici DNA wspomagana mostkami T-Hg ²⁺ -T	dowiązany nanomateriał jako znacznik („ <i>signal-on</i> ”)	10 nb, bogaty w T (50% sekwencji)	chemiluminescja	20 nM - 0,5 μM/ 1 pM	[116]
hybrydyzacja dwóch nici DNA wspomagana mostkami T-Hg ²⁺ -G	dowiązany znacznik FAM („ <i>signal-on</i> ”)	33 nb, bogaty w T (30% sekwencji) i G (36% sekwencji)	fluorymetria	0.01- 0,3 μM/ 4,72 nM	[117]
degradacja RNA zmodyfikowanego fosforotioanem pod wpływem Hg ²⁺	dowiązany znacznik FAM i wygaszacz Iowa Black FQ („ <i>signal-on</i> ”)	17 nb, zawierający 3 zmodyfikowane adeniny	fluorymetria	0 - 50 nM/ 1,7 nM	[118]

* źródło – praca własna

W opisanych dotychczas przykładach elektrochemicznych aptasensorów do detekcji jonów Hg²⁺, wpływ buforu stanowiącego środowisko oddziaływania analitu z aptamerem nie został jednak wyjaśniony w sposób wyczerpujący. Wspomniane wyżej niedostatki wiedzy wydają się mieć kluczowy wpływ na brak przełożenia badań podstawowych na przykłady wykorzystania aptasensorów DNA w systemach spełniających wyzwania współczesnej analityki środowiskowej.

Szczególnie trudną do wykrywania za pomocą aptamerów DNA grupę związków stanowią aniony nieorganiczne. Ich prosta budowa oraz ujemny ładunek istotnie ograniczają pulę mechanizmów rozpoznawania molekularnego oferowanych przez aptamery. Szkielet fosforanowy DNA jest ujemnie naładowany, co powoduje odpychanie elektrostatyczne pomiędzy aptamerem a anionami. W przeciwieństwie do kationów, które stabilizują strukturę DNA poprzez neutralizację ładunków grup fosforanowych, aniony wykazują skłonność do destabilizacji drugorzędowych struktur aptamerów, co znacznie utrudnia ich wiązanie. Brak specyficznych miejsc wiążących dla większości anionów w szkielecie DNA również ogranicza możliwości selektywnego rozpoznania, ponieważ zasady azotowe nie posiadają odpowiednich grup donorowych do tworzenia stabilnych kompleksów z anionami. Dodatkowo aniony są silnie solwatowane w środowisku wodnym, a usunięcie warstwy hydratacyjnej wymaga znacznej ilości energii, co obniża termodynamiczną efektywność procesu wiązania przez aptamer [119,120].

Przykładem pierwiastka, którego oznaczanie nieorganicznych anionowych form byłoby wartościowe z punktu widzenia analiz środowiskowych jest selen. Wykazuje on skłonność do

bioakumulacji, a jego wodnorozpuszczalne formy takie jak seleniany(IV) i seleniany(VI) są szkodliwe, szczególnie dla organizmów wodnych [121]. Jak dotąd nie zostały opracowane aptasensory umożliwiające detekcję anionów selenianowych(VI) (SeO_4^{2-}), a przyczyn tego upatrywać należy właśnie w przypuszczalnej trudności w wyselekcjonowaniu sekwencji aptamerowej o odpowiednio wysokim powinowactwie do tych anionów. Tym niemniej, wykorzystanie oddziaływań powinowactwa pomiędzy różnego typu aptamerami a anionami jest możliwe, czego przykłady zestawiono w Tabeli 2. Co należy jednak podkreślić, autorzy przedstawionych przykładów często skupiali się jedynie na charakteryzacji oddziaływania aptamer-analit i nie stosowali wyselekcjonowanych sekwencji kwasów nukleinowych jako receptorów w projektowaniu urządzeń analitycznych. Połączenie prostoty konstrukcji, wygody użytkowania oraz korzystnych parametrów analitycznych elektrochemicznych aptasensorów DNA sprawia, że wyselekcjonowanie sekwencji aptamerowej zdolnej do selektywnego oddziaływania z jonami SeO_4^{2-} i opracowanie na jej podstawie sensora wydaje się obiecującym podejściem do monitorowania stężenia tego anionu.

Tabela 2. Przykłady aptamerów DNA zdolnych do oddziaływania z małocząsteczkowymi związkami małocząsteczkowych związków o charakterze anionowym

Analit	Mechanizm wiązania	Metoda detekcji	Zakres liniowy/ LOD	Próbka	Oдноśnik
fosforany(V)	nie opisano	kolorymetria i woltamperometria	50-1000 μM / 0,983 μM	brak danych	[121]
arseniany(III)	indukowana analitem zmiana konformacyjna	EIS	0.67-133 nM/ 0,8 μM	brak danych	[122]
		FET	0.667 - 13,35 nM/ 0,257 nM	woda mineral na	[123]
ATP	indukowana analitem zmiana konformacyjna dsDNA	fluorescencja (FRET)	0,1 μM - 1 mM/ 3,35 nM	ATP wewnątrz z komórki HeLa	[124]
	indukowana analitem zmiana konformacyjna, wiązania wodorowe i oddziaływania π - π	kolorymetria (agregacja AuNPs)	wykorzystanie reakcji zachodzących w roztworze bez konstruowania aptasensora		[125]
anionowe porfiryny (N-metylo mezoporfiryna IX i pochodne)	oddziaływania porfiryn z guaniną – tworzenie G- kwadrupleksów	spektroskopia UV- Vis, elektroforeza, dichroizm kołowy	wykorzystanie reakcji zachodzących w roztworze bez konstruowania aptasensora		[126]

* źródło – praca własna

2. Cel i zakres pracy doktorskiej

Celem było opracowanie metod prowadzących do poprawy parametrów pracy wybranych biosensorów, poprzez odpowiednią modyfikację warstw receptorowych, składu roztworów badanych, wstępnego przygotowania próbek, czy też procedur pomiarowych. Jako modelowe anality wybrano biomarkery genetyczne chorób wirusowych i bakteryjnych (COVID-19, błonica) oraz małe cząsteczki nieorganiczne (jony Hg^{2+} i SeO_4^{2-}), reprezentujące obiekty badań istotne z punktu widzenia analizy klinicznej i środowiskowej, odpowiednio. Szczególny nacisk położono na poznanie mechanizmów oddziaływań w odpowiedzialnych za proces rozpoznawania analitów, jak i generowania sygnału analitycznego.

Pierwsza z głównych hipotez badawczych dotyczy zwiększenia sygnału prądowego poprzez zastosowanie alternatywnych do powszechnie stosowanego 6-merkaptol-heksanolu (MCH), cząsteczek blokujących w warstwach samoorganizujących się (SAM) na powierzchni złotych elektrod. W celu jej weryfikacji zaplanowano prace ukierunkowane na dobór wypełniacza warstwy SAM w biosensorach przeznaczonych do detekcji genów związanych z toksynotwórczością.

Kolejnym obszarem badawczym jest kompleksowa ocena przydatności przetworników elektrochemicznych wykonanych w technologii fizycznego osadzania z fazy gazowej (PVD) i ich porównanie do klasycznych przetworników sitodrukowych. Postawiona hipoteza badawcza wskazuje na relację pomiędzy lepszą jednorodnością i niższą chropowatością powierzchni a bardziej efektywnym formowaniem warstw receptorowych oraz większą stabilnością i powtarzalnością sygnałów elektrochemicznych.

Istotny element pracy stanowi również zbadanie wpływu składu roztworu pomiarowego oraz zastosowanych sekwencji sond DNA i aptamerów na możliwość selektywnego i czułego wykrywania jonów rtęci(II) oraz selenianów(VI). Przyjęto, że odpowiednio dobrane warunki procesu analitycznego - w tym pH, siła jonowa i skład buforu - mają istotny wpływ na konformacyjne zmiany w warstwie receptorowej determinujące mechanizm rozpoznania analitu i generowania sygnału.

Ostatnia hipoteza badawcza dotyczy zastosowania funkcjonalizowanych nanocząstek magnetycznych jako nośników do selektywnego wiązania i wydzielania kwasów nukleinowych. Założono, że modyfikacja powierzchni nanocząstek Fe_3O_4 - obejmująca m. in. pokrycie polietylenoiminą (PEI), złotem, krzemionką czy tlenkiem grafenu - pozwoli na kontrolowanie charakteru i siły oddziaływań z DNA (elektrostatyczne, hydrofobowe,

koordynacyjne), co przełoży się na skuteczność i odwracalność procesów adsorpcji i desorpcji materiału genetycznego.

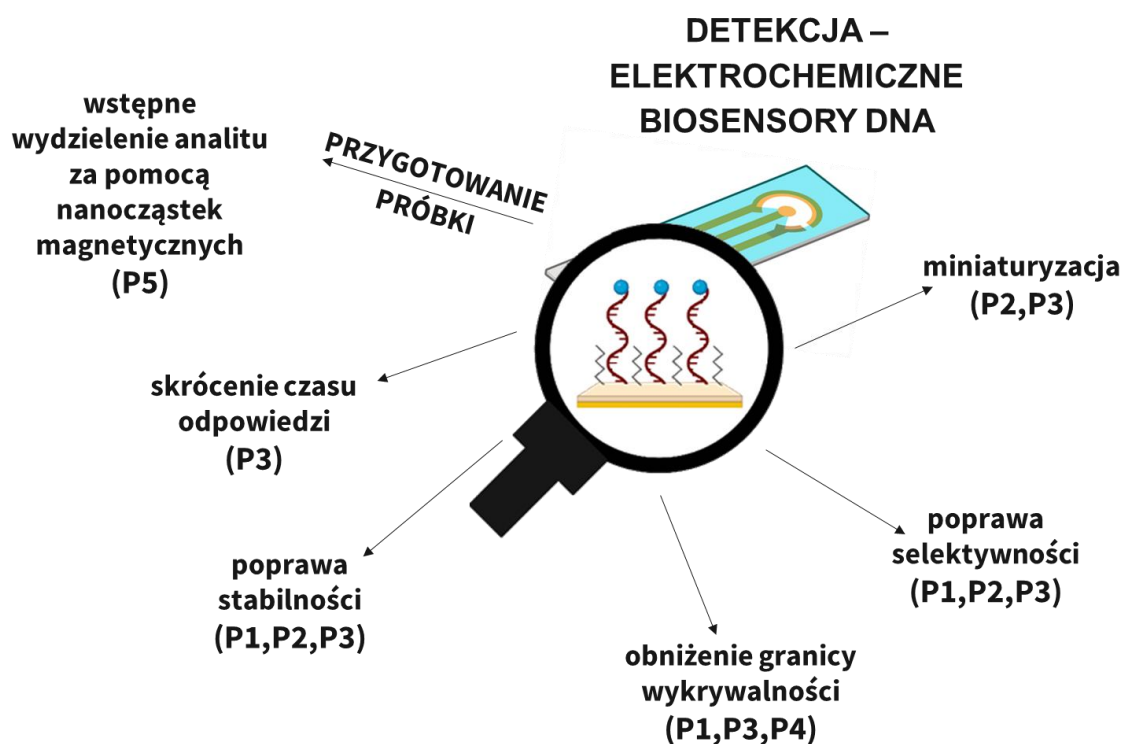
Realizacja celu niniejszej pracy doktorskiej obejmuje następujące zadania badawcze, przedstawione w cyklu pięciu artykułów naukowych:

- zaprojektowanie i selekcja odpowiednich sekwencji sond oligonukleotydowych i aptamerowych pod kątem zwiększenia selektywności i czułości konstruowanych na ich podstawie biosensorów DNA,
- analiza wpływu wybranych niereceptorowych składników warstwy receptorowej na parametry pracy biosensora DNA do wykrywania biomarkerów genetycznych na przykładzie toksoidu błoniczego,
- opracowanie nowych kompozycji warstw samoorganizujących się (SAM) na powierzchni elektrody złotej i ocena ich wpływu na niespecyficzną adsorpcję białek oraz odpowiedź prądową sensora,
- zbadanie wpływu długości sekwencji polityminowej na charakter odpowiedzi czujnika w obecności jonów rtęci(II) (mechanizm „*signal-off*” vs. „*signal-on*”),
- zbadanie wpływu składu roztworów pomiarowych na oddziaływania DNA z jonami, takimi jak kationy rtęci(II) i aniony selenianowe(VI), a w konsekwencji na odpowiedź elektrochemiczną opracowywanych biosensorów,
- miniaturyzacja biosensorów DNA, na przykładzie genosensora do detekcji amplifikowanych sekwencji SARS-CoV-2 i aptasensora do wykrywania Hg^{2+} , z zastosowaniem wybranych typów planarnych, trójelektrodowych miniaturowych przetworników elektrochemicznych,
- identyfikacja kluczowych oddziaływań między DNA a powierzchnią nanocząstek w kontekście ich zastosowania do wydzielania kwasów nukleinowych i oczyszczania próbek biologicznych.

W trakcie realizacji badań zastosowano techniki analityczne, m.in.: woltamperometrię cykliczną (CV) i fali prostokątnej (SWV), elektrochemiczną spektroskopię impedancyjną (EIS), mikrowagę kwarcową z monitorowaniem rozproszenia (QCM-D), tandemową spektrometrię mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-MS/MS), analizę elementarną, spektrofotometrię UV-Vis i termogravimetrię (TGA), jak również techniki charakteryzacji materiałów m.in.: skaningową i transmisyjną mikroskopię elektronową (SEM/STEM), laserową mikroskopię konfokalną (LSCM), spektroskopię w podczerwieni (FT-IR), dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) oraz magnetometrię.

3. Komentarz do cyklu artykułów naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej

Fundament niniejszej Rozprawy Doktorskiej stanowi pięć spójnych tematycznie prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych. Publikacje oznaczone symbolami P1 – P5 przedstawiają realizację zadań badawczych dotyczących szeroko pojętych badań mechanizmów oddziaływań kwasów nukleinowych ze składnikami warstwy receptorowej czy roztworem pomiarowym. Badania te prowadzono w kontekście ich wykorzystania w konstrukcji geno- i aptasensorów oraz wstępnego przygotowania próbek. Najważniejsze wątki badawcze dotyczące poprawy parametrów pracy biosensorów i wstępnego przygotowania próbek przedstawione w ramach artykułów naukowych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej zostały zaprezentowane na Rys. 9.



Rys. 9. Schemat koncepcyjny badań wykonanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej.

W zastosowaniach biosensorycznych DNA wykazuje istotnie rozszerzone spektrum oddziaływań, wykraczające poza jego naturalne funkcje biologiczne. Kluczowe w projektowaniu biosensorów jest zrozumienie oddziaływań między sekwencjami kwasów nukleinowych jako receptorów molekularnych (unieruchomionych na powierzchni) jak i obecnych w roztworze (jako wykrywane anality) – z sekwencjami komplementarnymi DNA [P1, P2], jonami [P3, P4] czy nanomateriałami [P5], jak również z pozostałymi

niereceptorowymi składnikami warstwy bioczułej [P1]. Użyteczność kwasów nukleinowych w roli receptorów molekularnych w warstwach typu SAM czujników DNA zależy zarówno od morfologii i stanu powierzchni elektrody [P2], jak i od składu roztworu pomiarowego [P3, P4], które mają bezpośrednie przełożenie na parametry pracy biosensorów. W kontekście projektowania warstw receptorowych kluczowe jest selektywne wzmacnianie pożądanych oddziaływań, takich jak interakcje z analitem. Jednocześnie należy minimalizować niepożądane oddziaływania, np. niespecyficzne oddziaływanie sond z powierzchnią, matrycą próbki czy niereceptorowymi elementami warstwy receptorowej, gdyż mogą one zakłócać, a nawet uniemożliwiać wykrywanie analitu.

3.1 Pogłębiona analiza wpływu czynników blokujących powierzchnię elektrody na parametry elektrochemicznego biosensora DNA z motywem spinki (P1)

A. Szymczyk, K. Soliwodzka, M. Moskal, K. Różanowski, R. Ziółkowski, Further insight into the possible influence of electrode blocking agents on the stem loop based electrochemical DNA sensor parameters. (2021) Sensors and Actuators B: Chemical, 354, 131086, DOI: 10.1016/j.snb.2021.131086

W publikacji P1 skupiono się na wykorzystaniu znakowanych sond DNA w formie spinki (z ang. *hairpin*) do konstrukcji biosensorów DNA [40]. Co warto zauważyć, większość opisanych w literaturze rozwiązań skupia się na wykrywaniu za pomocą tego mechanizmu krótkich sekwencji (do około 30 nukleotydów). Z praktycznego punktu widzenia, jeśli mamy do czynienia z próbką rzeczywistą po procesie amplifikacji kwasów nukleinowych, zwykle jest ona jednak o wiele dłuższa. Dlatego też w badaniach w głównej mierze skupiono się na wykorzystaniu receptora DNA ulegającego zmianom konformacyjnym do wykrywania fragmentów DNA o długościach rzędu 100 nukleotydów. Biorąc pod uwagę doniesienia o pojawiających się ponownie zachorowaniach na błonicę [127,128], jako modelowy analit wybrano gen toksoidu błoniczego.

Badania opisane w publikacji P1 koncentrują się na analizie wpływu składu warstwy receptorowej na jej oddziaływanie z wykrywanym DNA oraz na dalszym rozwoju strategii elektrochemicznej detekcji kwasów nukleinowych w biosensorach. W przeprowadzonych analizach główny nacisk postawiono na porównanie wybranych niereceptorowych składników warstwy bioczułej. Okazuje się, że mają one istotny wpływ na oddziaływania zachodzące w warstwie dyfuzyjnej przy powierzchni elektrody, jak również na natężenie rejestrowanego sygnału elektrochemicznego. Zbadano i przeanalizowano wpływ rodzaju zastosowanego czynnika blokującego elektrodę (tzw. wypełniacza) zarówno na parametry pracy uzyskanego w ten sposób genosensora, jak również jakość uzyskanej warstwy receptorowej.

Badane wypełniacze podzielono na cztery główne grupy (**Rys. 2; [P1]**):

- ω -merkptoalkohole, wykazujące częściowy ładunek ujemny, dzięki obecności tlenu w grupie hydroksylowej, do których zaliczono 6-merkpto-1-heksanol (MCH) oraz 2-merkptoetanol (MCE);
- związki o częściowym ładunku dodatnim, wynikającym z obecności wolnej i zdolnej do protonowania grupy aminowej, reprezentowane przez cysteaminę (CHC);
- związki obojętne o wyższej przewodności niż ω -merkptoalkohole, dzięki ich strukturom rezonansowym, z dietyloditiokarbaminianem sodu (DEDTC) jako przedstawicielem;
- tiolowe pochodne z pierścieniami aromatycznymi, w tym 2-feniloetylotiol (2-PhET), przypuszczalnie ustawiony prostopadle do powierzchni, oraz 1,3-benzenoditiol (BDT), prawdopodobnie przyjmujący konfigurację skośną.

Analizowano wpływ warunków samoorganizacji wypełniaczy na jakość monowarstw. Imobilizacja tiolowanych sond DNA na elektrodzie trwała 30 s przy użyciu 0,2 μ M roztworu w 1 M KH_2PO_4 . Stężenie i czas inkubacji elektrod z uprzednio zaimobilizowanym DNA z wypełniaczami zwiększono odpowiednio do 2 mM i 24 h (lub 48 h dla DEDTC ze względu na jego budowę i wolniejszą chemisorpcję na złocie [129]). Wiadomo, że uporządkowana, gęsta monowarstwa minimalizuje interakcje złota ze składnikami próbki, co w założeniu poprawia stabilność sygnału. Mając na uwadze powyższe, w pierwszym etapie badań przanalizowano pod tym kątem monowarstwy mieszane uzyskane przy udziale wybranych wypełniaczy, a zarejestrowane voltamperogramy cykliczne przedstawiono na **Rys. 3; [P1]**. Największe spadki prądu pojemnościowego w porównaniu do niemodyfikowanej złotej elektrody zaobserwowano dla DEDTC, MCH, BDT oraz 2-PhET, co wskazuje na skuteczną modyfikację/zabezpieczenie powierzchni elektrody przez te wypełniacze. Brak wyraźnego efektu pokrycia powierzchni w przypadku MCE może wynikać z niskiej jakości i słabej organizacji utworzonej warstwy, co prowadzi do odsłonięcia fragmentów powierzchni elektrody. Obszary te umożliwiają kontakt składników próbki z powierzchnią złota, co sprzyja występowaniu reakcji elektrochemicznych, takich jak np. redukcja tlenu do nadtlenku wodoru. Proces ten może przyczyniać się do degradacji warstwy receptorowej, ograniczając jej stabilność i powtarzalność sygnału.

Badania uzyskiwanych sygnałów prądowych pochodzących od warstwy receptorowej za pomocą SWV pozwoliły zaobserwować dość zaskakującą zależność natężenia prądu od częstotliwości skanowania w przypadku CHC. Przy 15 Hz nie rejestrowano sygnału, natomiast wzrost częstotliwości początkowo zwiększał intensywność reakcji redoks błękitu

metylenowego, po czym następował jej spadek (**Rys. 7; [P1]** i Rys. 10b). Początkowy brak sygnału prądowego prawdopodobnie związany jest z obserwowanym wysokim prądem pojemnościowym rejestrowanym w przypadku tak skonstruowanych warstw receptorowych. Zwiększanie częstotliwości skanowania prowadzi do zmniejszenia warstwy dyfuzyjnej, a ostatecznie do zwiększenia rejestrowanego prądu faradajowskiego. W momencie, gdy wartość tego prądu przekroczyła wartość prądu pojemnościowego zaczęto obserwować sygnał elektrochemiczny pochodzący od warstwy receptorowej. Natomiast dalsze zwiększanie częstotliwości skanowania w pewnym momencie prowadzi do obniżenia rejestrowanego prądu, co może wynikać z budowy zastosowanego wypełniacza. W szczególności może to być związane z obecnością wolnej pary elektronowej na atomie azotu, jak również może wynikać z zależności między częstotliwością skanowania a reakcją redoks błękitu metylenowego i transferem elektronów w poprzek warstwy receptorowej do elektrody. Co warto podkreślić, zastosowanie w roli środka blokującego powierzchnię elektrody DEDTC oraz 2-PhET pozwoliło na rejestrację wyższych natężeń prądu oraz na obniżenie granicy wykrywalności analitu w porównaniu z dotychczas stosowanym MCH.

Istotnym parametrem, na który zwrócono uwagę przy doborze składu warstwy receptorowej w mieszanych monowarstwach typu SAM jest stabilność uzyskiwanej odpowiedzi prądowej [64]. W mechanizmach detekcji opartych na zmianach konformacyjnych warstwy receptorowej konieczne jest osiągnięcie stanu równowagi, aby rejestrowane zmiany sygnału prądowego wynikały wyłącznie z oddziaływania z analitem. Stabilność warstw bioczułych zawierających sondy DNA znakowane błękitem metylenowym monitorowano poprzez okresową rejestrację sygnału prądowego (**Rys. 4; [P1]** i Rys. 10a). W przypadku MCH i DEDTC zaobserwowano przewidywalny przebieg zmian, prowadzący do stopniowego zaniku wahań sygnału aż do momentu jego całkowitej stabilności. Natomiast w przypadku warstw zawierających wypełniacze z pierścieniami aromatycznymi, takie jak 2-PhET oraz BDT, sygnał SWV wykazywał znaczną niestabilność w czasie. Zjawisko to może wynikać z oddziaływań typu π - π między pierścieniami aromatycznymi obecnymi w sondzie DNA a unieruchomionymi cząsteczkami wypełniacza, co prowadzi do dynamicznych zmian w strukturze warstwy receptorowej i utrudnia osiągnięcie stabilnej odpowiedzi czujnika.

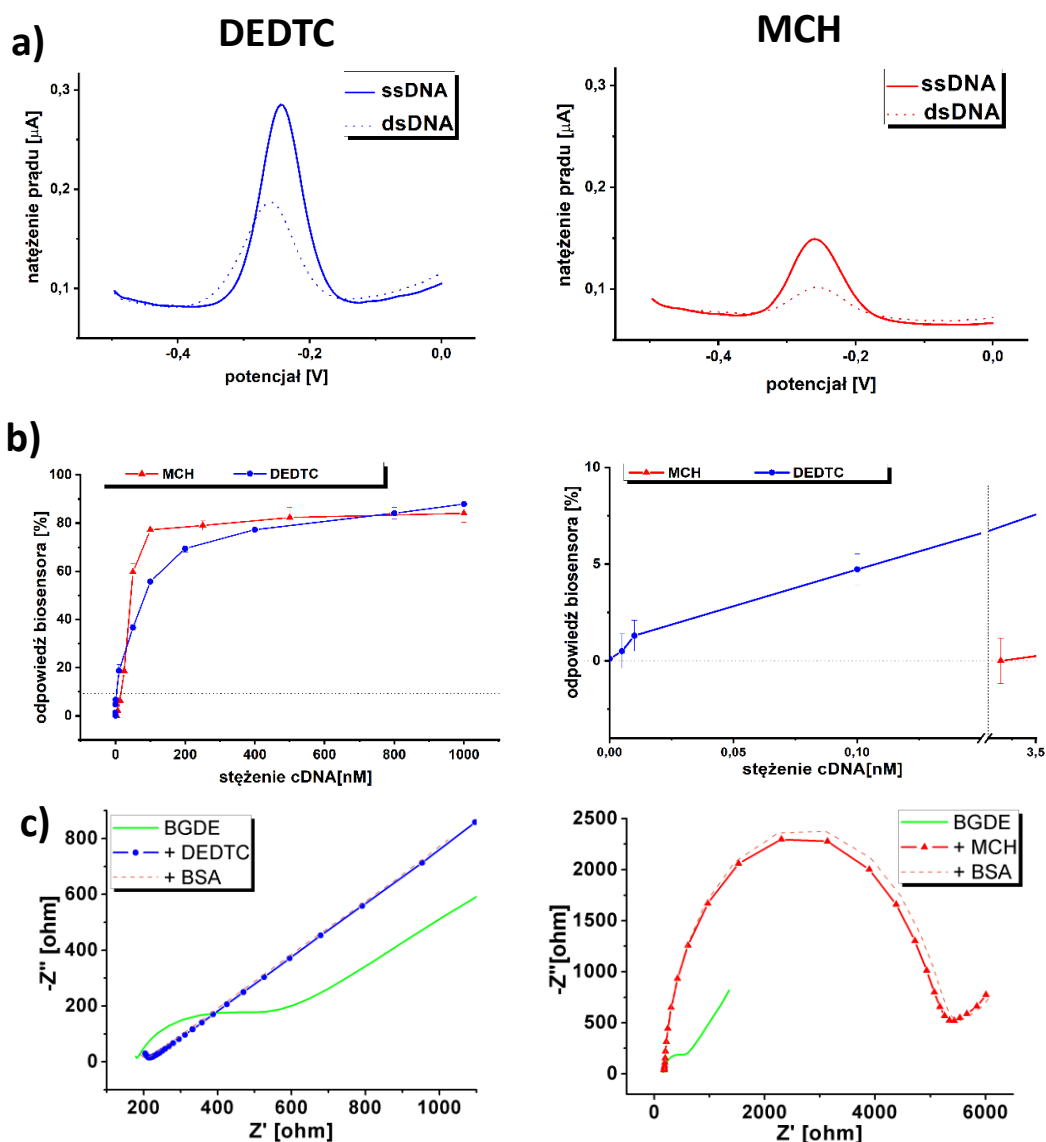
W kolejnym kroku zbadano wpływ różnych wypełniaczy na kinetykę transferu elektronów (**Rys. S6; [P1]**). Zaobserwowano pod tym względem dwie ciekawe zależności. Pierwsza, to wzrost szybkości wymiany elektronów w przypadku elektrody modyfikowanej warstwą receptorową (zawierającą DEDTC) w porównaniu do elektrody niemodyfikowanej. Druga również dotyczy wzrostu szybkości wymiany elektronów, ale po procesie hybrydyzacji

w przypadku warstwy zawierającej BDT. Najprawdopodobniej może to wynikać ze zmiany ułożenia kowalencyjnie unieruchomionych sond DNA na powierzchni elektrody. Z uwagi na znaczną długość stosowanych sond DNA wykazują one względnie wysoką elastyczność, co może skutkować w tym przypadku adsorpcją nici DNA na powierzchni pokrytej BDT. Elektroda pokryta warstwą tego wypełniacza najprawdopodobniej charakteryzuje się odsłoniętymi pierścieniami aromatycznymi co sprzyja takiemu zjawisku. Natomiast niska szybkość wymiany elektronów przed procesem hybrydyzacji najprawdopodobniej związana jest z trudnością ich przekazania do elektrody przez taki wypełniacz. Z kolei jej wzrost po procesie hybrydyzacji może świadczyć o utworzeniu dwuniciowych struktur DNA wykazujących przewodność elektryczną na odpowiednio długich odcinkach i drodze elektronów do elektrody właśnie wzdłuż dwuniciowych struktur DNA. Jednak ze względu na niskie odpowiedzi biosensora na zmienne stężenie cDNA, BDT ostatecznie nie sprawdził się jako skuteczny wypełniacz.

Mechanizmy zaobserwowane w badaniach elektrochemicznych potwierdzono przy pomocy mikrowagi kwarcowej. Zmierzona dyssypacja energii, określająca elastyczność warstwy, była znacznie wyższa dla MCH niż dla wypełniaczy o ładunku nieujemnym, co sugeruje różnice w organizacji warstwy receptorowej (**Rys. S2; [P1]**). Należy oczekiwać, iż jedynie w monowarstwie z MCH jednoniciowe sondy DNA były ukierunkowane prostopadle do elektrody, co wpływało na jej odmienne właściwości mechaniczne. Po hybrydyzacji elastyczność warstwy z MCH malała ze względu na sztywność dsDNA, podczas gdy dla pozostałych wypełniaczy wzrastała, co wskazuje na mniej uporządkowaną wyjściową orientację sond i osłabienie w ten sposób oddziaływań π - π odpowiedzialnych za pierwotne usztywnienie struktury sondy.

Podczas analizy próbek rzeczywistych, oprócz omówionych wcześniej aspektów, należy uwzględnić wpływ skomplikowanej matrycy, zawierającej białka i inne składniki, na warstwę receptorową czujnika. W celu oceny oddziaływań niespecyficznych przeprowadzono badania z wykorzystaniem spektroskopii impedancyjnej i mikrowagi kwarcowej po dodaniu białek modelowych (BSA i HSA) (**Rys. 8 i S5; [P1]** oraz Rys. 10c). Wyniki wykazały, że powierzchnia złota modyfikowana DEDTC była najmniej podatna na adsorpcję białek, podczas gdy 2-PhET wykazywał tendencję do silnej asocjacji białek, co potwierdzono poprzez zarejestrowany wzrost oporu elektrody (EIS) oraz zmiany częstotliwości i dyssypacji energii na sensogramach QCM. Z tego względu oceniono, iż 2-PhET nie sprawdza się jako skuteczny środek blokujący powierzchnię elektrody.

Podsumowując, badania wykazały, że DEDTC jako wypełniacz o obojętnym ładunku, stanowi obiecującą alternatywę dla MCH. Uzyskane parametry, takie jak natężenie sygnału prądowego, stabilność warstwy receptorowej oraz odpowiedź biosensora na wykrywaną, specyficzną sekwencję, potwierdzają skuteczność DEDTC jako komponentu warstwy receptorowej czujników DNA (Rys. 10a i 10b). W porównaniu do innych analizowanych związków, DEDTC znacząco ograniczał niespecyficzną adsorpcję białek, co zwiększało stabilność sygnału biosensora (Rys. 10c). Wyniki te sugerują, że zastosowanie tego wypełniacza może prowadzić do bardziej powtarzalnych i wiarygodnych pomiarów w rzeczywistych próbkach biologicznych niż standardowo używany MCH.



Rys. 10. 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) [na podstawie **PI**].

3.2 Praktyczne aspekty konstrukcji biosensorów DNA z wykorzystaniem monowarstw SAM na zminiaturyzowanych przetwornikach złotych: przykład detekcji SARS-CoV-2 (P2)

A. Szymczyk-Drozd, D. Baran, A. Skiba, A. Zasada, E. Mosiej, J. Krzemiński, A. Peplowski, E. Malinowska, R. Ziółkowski, Practical Aspects of SAM-Based Electrochemical DNA Biosensors on Miniaturized Planar Gold Transducers: A Case Study with SARS-CoV-2. (2025) Measurement, 250, 117212, DOI: 10.1016/j.measurement.2025.117212

Monowarstwy samoorganizujące się (SAM), w połączeniu z odpowiednio przygotowanym podłożem przetwornika, zapewniają kontrolowane środowisko dla immobilizacji sond DNA. Należy oczekiwać zatem, iż wybór sekwencji sondy oraz typu przetwornika, na którego powierzchni zostanie utworzona warstwa receptorowa będzie mieć bezpośredni wpływ na jakość skonstruowanego czujnika. Aby ocenić przydatność złotych elektrod pracujących jako podłoża do tworzenia stabilnych i dobrze zorganizowanych warstw receptorowych na potrzeby konstrukcji elektrochemicznych biosensorów DNA, w publikacji **P2** przeprowadzono badania charakterystyczne jakości powierzchni złota jako materiału elektrodowego stosowanego w miniaturowych przetwornikach elektrochemicznych. W badaniach zastosowano sondę molekularną typu spinka, znakowaną błękitem metylenowym, do detekcji genetycznych markerów COVID-19 po reakcji transkrypcji i amplifikacji PCR.

Na wstępnym etapie, z pomocą oprogramowania *OligoAnalyzer*, zaprojektowano sondy DNA i określono ich przewidywane, najbardziej stabilne struktury drugorzędowe (**Tab. 3; [P2]**). Wszystkie zaprojektowane sondy preferencyjnie przyjmują konformację pętli, w której znacznik redoks znajduje się blisko powierzchni elektrody. Jednak można się spodziewać, że różnice w stabilności termodynamicznej, określanej na podstawie energii Gibbsa, będą wpływały na ich zdolność do spontanicznych zmian konformacyjnych oraz efektywność tworzenia sztywnych dupleksów dsDNA z docelowym analitem. Wiadomo, że sposób unieruchomienia sondy na spolaryzowanej powierzchni elektrody ma istotny wpływ na jej predyspozycje do rozpoznawania sekwencji komplementarnych [62]. Z tego względu wybór docelowych sekwencji sond został poparty badaniami eksperymentalnymi. Analizę rozpoczęto od tworzenia warstw receptorowych na klasycznych elektrodach dyskowych, przyjmując jako kryterium oceny sond DNA uzyskiwane odpowiedzi gotowych czujników dla różnych stężeń cDNA, wybierając te oferujące największą czułość. Okazało się, że wybrane na podstawie badań doświadczalnych sekwencje receptorowe w większości charakteryzowały się również najniższą energią Gibbsa (wyjątek stanowił gen *RdRp*), co potwierdzało ich zdolność do efektywnej hybrydyzacji z wykrywaną sekwencją.

W kolejnym etapie zbadano odpowiedź biosensorów z wybraną sekwencją sondy (S1 dla genów *E* i *N* oraz S2 dla genów *RdRp* i *ACTB*) w próbkach rzeczywistych, które stanowiły mieszaniny poreakcyjne reakcji PCR. Początkowo rozróżnienie próbek dodatnich (zawierających wykrywany analit) i ujemnych (nie zawierających wykrywanego analitu) było niemożliwe, prawdopodobnie z powodu obecności w nich białek, które mogą oddziaływać zarówno z powierzchnią elektrody, jak i z badanym analitem. Aby zminimalizować ten efekt, zastosowano dodatek rozpuszczalnika organicznego, zwiększającego wydajność hybrydyzacji w próbkach bogatych w białka. Po przeanalizowaniu różnych rozpuszczalników i ich stężeń wybrano 20% (v/v) roztwór dimetylosulfotlenku (DMSO) w buforze pomiarowym. Mechanizm jego działania polegał na zmniejszeniu powinowactwa białek do kwasów nukleinowych oraz obniżeniu temperatury topnienia dsDNA, co ułatwiało rozplecenie struktur drugorzędowych typu spinka jak i prawdopodobnych struktur drugorzędowych tworzonych przez sekwencje wykrywane i między sekwencjami wykrywanymi w próbce. Obecność DMSO w medium pozwoliła skutecznie rozróżnić próbki dodatnie i ujemne za pomocą opracowanego elektrochemicznego genosensora.

Kolejnym etapem badań było wykorzystanie miniaturowych przetworników do konstrukcji biosensora o wcześniej wybranej sekwencji sondy. Porównawczej analizie poddano zarówno komercyjne elektrody sitodrukowane, których zastosowanie w roli podłoża w czujnikach opisano w literaturze [130,131], jak i miniaturowe elektrody wytworzone metodą osadzania z fazy gazowej (PVD). Elektrody te pozyskano w ramach współpracy z dr inż. Jakubem Krzemińskim z Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii Politechniki Warszawskiej. Badane warianty elektrod sitodrukowanych obejmowały elektrody utwardzane w wysokiej (DRP C223AT) oraz w niskiej temperaturze (DRP C223BT), a także elektrody z dodatkowym procesem polerowania (AC1P.W1.R2) oraz bez obróbki powierzchniowej (AC1.W1.R2).

Analiza mikroskopowa powierzchni przetworników (**Rys. 5; [P2]**) wykazała istotne różnice w jakości warstwy złota na badanych planarnych elektrodach. Elektrody sitodrukowane różnych typów cechowała ogólnie duża niejednorodność oraz słabo zdefiniowane granice między elektrodą a strefą izolacji. Elektrody PVD cechowały się najbardziej jednorodną powierzchnią i najniższą chropowatością.

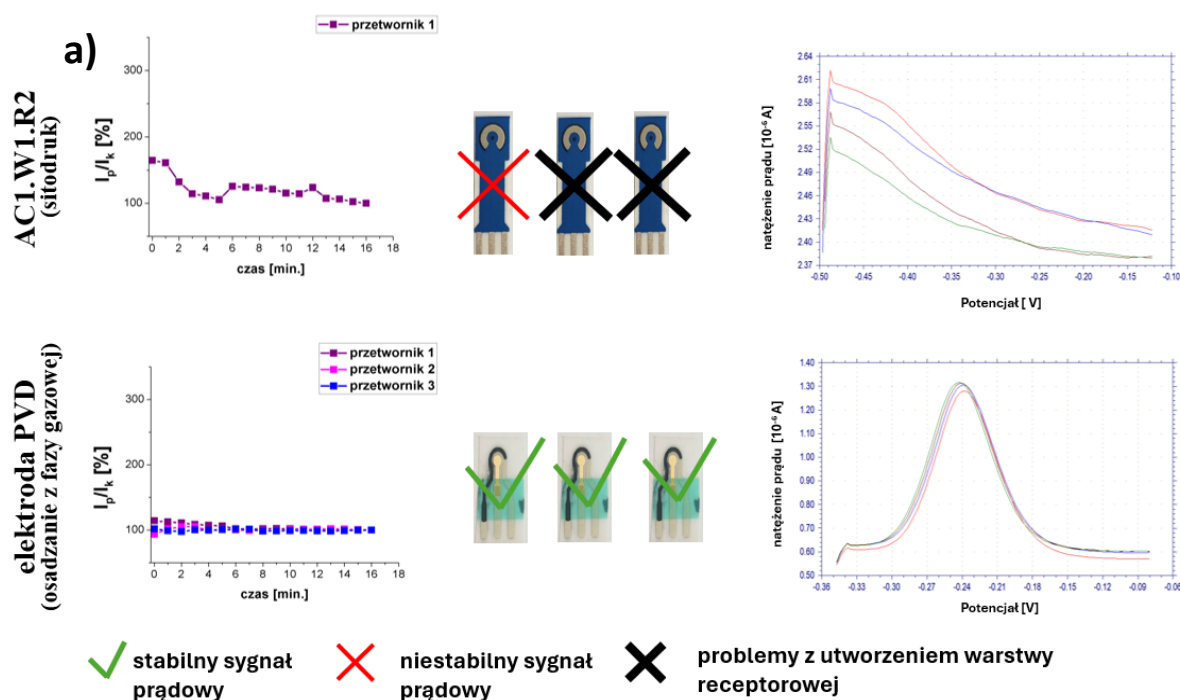
Analiza odpowiedzi elektrochemicznej elektrod sitodrukowanych i PVD wykazała, iż w żadnym z przypadków nie zaobserwowano odwracalnego charakteru procesów elektrodowych, wykorzystując heksacyjanożelaziany(II,III) potasu jako markery redoks (**Rys. 6; [P2]**). Jako że producenci przetworników sitodrukowanych deklarują możliwość uzyskania

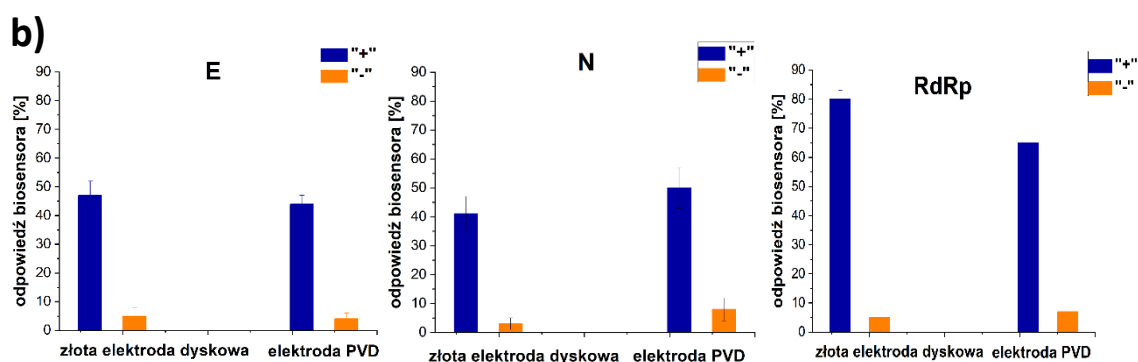
odwracalnych odpowiedzi prądowych, obserwacja ta mogła świadczyć o niewystarczającej czystości powierzchni. W związku z tym opracowano procedury czyszczenia elektrod dostosowane indywidualnie do każdego rodzaju przetwornika, które zaowocowały uzyskaniem odwracalnych odpowiedzi prądowych (**Rys. 6; [P2]**). Pozwoliło to na podjęcie próby wytworzenia czujników DNA (na bazie monowarstw samoorganizujących się) na wszystkich rodzajach badanych przetworników. Pomimo skutecznego oczyszczenia powierzchni wszystkich przetworników, nie na każdym podłożu uzyskano stabilny sygnał prądowy pochodzący od zaimmobilizowanych sond DNA. W przypadku elektrod sitodrukowanych - AC1P.W1.R2 i AC1.W1.R2 po etapie czyszczenia wyjściowe gęstości prądów były ponad dwukrotnie niższe w porównaniu do każdego z pozostałych analizowanych przetworników (Tabela na **Rys. 6d; [P2]**). Z kolei po próbie wytworzenia SAM na tego rodzaju przetwornikach nie uzyskano sygnałów prądowych (**Rys. 7; [P2]** i Rys. 11a), co świadczy o problemach z tworzeniem się stabilnych monowarstw samoorganizujących się. Inną sytuację zaobserwowano dla elektrod utwardzanych w niskich i wysokich temperaturach, które cechowały się wyższą gęstością prądu. W przypadku tych przetworników utworzona monowarstwa SAM umożliwiła rejestrację sygnału prądowego, który był niestabilny i mało powtarzalny, co może oznaczać powolną degradację warstwy w trakcie prowadzenia pomiarów. Z kolei elektrody wytworzone w technologii PVD charakteryzowały się najwyższą gęstością prądu i pozwoliły na utworzenie warstwy receptorowej cechującej się wysoką stabilnością sygnału prądowego i powtarzalnością procesu tworzenia czujników DNA.

Na podstawie przeprowadzonych analiz elektrochemicznych można wnioskować, że istnieje zależność między jakością monowarstwy typu SAM a uzyskaną gęstością prądową. Prawdopodobnym wyjaśnieniem zaobserwowanych zależności jest obecność na każdej z badanych elektrod sitodrukowanych, mimo czyszczenia, zarówno obszarów o dobrej jakości powierzchni złota, umożliwiających uzyskanie odwracalnej odpowiedzi prądowej, jak i fragmentów zanieczyszczonych resztkami polimeru lub pasty przewodzącej z procesu sitodruku. Skutkowało to obniżeniem efektywności wymiany elektronów między elektrodą a znacznikami redoks w roztworze $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-})$, co jest odzwierciedlone w uzyskanych gęstościach prądu, oraz pogorszonej zdolności do tworzenia jednorodnych warstw typu SAM. Jedynie przy użyciu przetworników PVD możliwe było utworzenie stabilnej warstwy bioczułej, co pozwoliło na efektywne wykrycie specyficznej sekwencji biomarkera genetycznego COVID-19. Uzyskano odpowiedzi biosensora pozwalające jednoznacznie rozróżnić próbki dodatnie, zawierające wykrywany analit, od próbek ujemnych (**Rys. 8d; [P2]** i Rys. 11b). Dodatkowo wykazano, iż czujniki na podłożu PVD charakteryzowały się większą

stabilnością i powtarzalnością oferowanych parametrów w porównaniu do analizowanych elektrod sitodrukowanych.

Podsumowując, biosensory DNA skonstruowane na bazie opracowanych i wytworzonych elektrod PVD oferują parametry pracy porównywalne z klasycznymi elektrodami dyskowymi. Jednorodna powierzchnia oraz niska chropowatość planarnych przetworników PVD umożliwiły skuteczną immobilizację warstwy typu SAM posiadających w strukturze sondy typu „spinka” (Rys. 11a). Opracowane czujniki pozwalały na jednoznaczne rozróżnienie próbek dodatnich i ujemnych oraz detekcję genetycznych markerów SARS-CoV-2 po reakcji RT-PCR (Rys. 11b). W porównaniu do elektrod sitodrukowanych, elektrody PVD zapewniały lepszą powtarzalność i stabilność pomiarów, a ich przygotowanie ograniczało się do oczyszczania w atmosferze ozonu generowanego pod wpływem wysokoenergetycznego promieniowania UV, eliminując konieczność stosowania agresywnych metod chemicznych. Ze względu na wykazane w pracy **P2** zalety, biosensory DNA w oparciu o planarne przetworniki wytworzone w technologii PVD na podłożach elastycznych mają duży potencjał zastosowania jako elementy detekcyjne w zminiaturyzowanych analizatorach.





Rys. 11. a) porównanie przetworników wytworzonych techniką sitodruku oraz osadzania z fazy gazowej PVD pod względem stabilności sygnału prądowego 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 biomarkery genetyczne SARS-CoV-2 [na podstawie P2].

3.3 Identyfikacja ograniczeń w wykrywaniu jonów rtęci(II) związanych ze środowiskiem i mechanizmem działania w celu poprawy parametrów i możliwości aplikacyjnych elektrochemicznych aptasensorów (P3)

A. Szymczyk, M. Popiołek, J. Krzemiński, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Identification of medium- and mechanism-related pitfalls towards improved performance and applicability of electrochemical mercury(II) aptasensors. (2024) *Microchimica Acta* 191(4), 189, DOI:10.1007/s00604-024-06272-w

Kolejnym celem badawczym było opracowanie zminiaturyzowanych aptasensorów do wykrywania jonów Hg^{2+} , z myślą o ich potencjalnym przyszłym zastosowaniu w analizie środowiskowej w miejscu poboru próbki. W ramach przeprowadzonych badań postawiono hipotezę, że w elektrochemicznych aptasensorach z sekwencjami polityminowymi (poliT) zmiany natężenia prądu nie zawsze wynikają ze zmian konformacyjnych sondy. Na wstępnym etapie skoncentrowano się na pełnym zrozumieniu mechanizmu oddziaływania jonów rtęci(II) z aptamerami polityminowymi. Zastosowano strategię opartą na monowarstwie typu SAM z aptamerem znakowanym błękitem metylenowym. Przewidywano dwa możliwe mechanizmy rozpoznawania Hg^{2+} , tj. tworzenie mostków tyminowych między sąsiadującymi nićmi DNA lub wiązanie jonów w obrębie pojedynczej nici polityminowej. Badania koncentrowały się na wpływie składu warstwy receptorowej, długości sondy DNA oraz składu buforu pomiarowego na mechanizm detekcji, stabilność układu i parametry otrzymanego sensora.

W celu analizy zmian konformacyjnych warstwy receptorowej po związaniu jonów Hg^{2+} zastosowano sekwencje poliT o długościach 10, 18, 30 i 40 nukleotydów, znakowane błękitem

metylenowym, a jako środek blokujący powierzchnię elektrody użyto MCH. Wstępnie dobrano gęstość powierzchniową aptameru dla sekwencji 18-nukleotydowej, dostosowując stężenie i czas immobilizacji DNA. Analiza uzyskiwanego natężenia prądu oraz stabilności sygnału pozwoliła na wyznaczenie najlepszych parametrów (4 μM i 30 min), które następnie zastosowano dla pozostałych sond. Zakładając, że w obecności jonów Hg^{2+} sonda przyjmie strukturę spinki, spodziewano się wzrostu natężenia prądu i poprawy odwracalności procesu redoks. Jednak dla sond o długości 18–40 nukleotydów zaobserwowano odwrotną zależność – w kontakcie z jonami rtęci(II) sygnał prądowy biosensora malał, co wskazuje na odmienny mechanizm detekcji niż pierwotnie przewidywano (**Rys. 1**; [P3] i Rys. 12a).

Uzyskane wyniki wskazują, że zamiast konformacyjnej reorganizacji aptameru w strukturę spinki, dochodzi do usztywnienia układu, w którym sąsiadujące nici polityminowe są stabilizowane przez tworzące się mostki T- Hg^{2+} -T. Powstała struktura ogranicza ruchliwość cząsteczki znakowanej błękitem metylenowym, co prowadzi do spadku sygnału elektrochemicznego. Zidentyfikowany mechanizm generowania sygnału różni się od klasycznie opisywanych modeli „*signal-on*”. Co szczególnie zaskakujące, w przypadku 10-nukleotydowej sekwencji, która według literatury jest sztywna, po dodatku Hg^{2+} zaobserwowano wzrost sygnału prądowego, mimo że nie jest ona zdolna do przyjęcia struktury spinki. Proponowane wyjaśnienie tego zjawiska wskazuje, że w obecności jonów rtęci(II) dochodzi do dalszej stabilizacji warstwy i nachylenia sondy w kierunku powierzchni elektrody, co skraca odległość między błękitem metylenowym a elektrodą, ułatwiając wymianę elektronów. Ostatecznie, do dalszych badań wybrano sekwencję 18-nukleotydową, dla której zaobserwowano najwyższe natężenie prądu, co zilustrowano na **Rys. 2**; [P3]. Niższe wartości sygnału elektrochemicznego dla sond o długości 30 i 40 nukleotydów wynikają z większej odległości błękitu metylenowego od powierzchni elektrody oraz ograniczeń sterycznych utrudniających efektywną wymianę elektronów. Postulowany mechanizm oddziaływania jonów Hg^{2+} z sekwencjami aptamerowymi zweryfikowano za pomocą mikrowagi kwarcowej (QCM) oraz spektroelektrochemii jako technik referencyjnych. Wyniki uzyskane za ich pomocą dostarczyły dodatkowych dowodów na proponowany mechanizm oddziaływań oraz potwierdziły stabilność kompleksów Hg^{2+} -DNA w badanych warunkach (**Rys. 3**; [P3]).

Kolejnym etapem badań było określenie wpływu składników buforu pomiarowego na oddziaływanie jonów Hg^{2+} z warstwą receptorową sensora. W tym celu przeanalizowano działanie buforów Good’a o różnych zdolnościach kompleksujących kationy dwuwartościowe i oligonukleotydy DNA, tj. TRIS, HEPES, MES oraz MOPS, oceniając czas stabilizacji sygnału elektrochemicznego (**Rys. 4**; [P3] i Rys. 12b). Najkrótszy czas i minimalną odpowiedź próbki

kontrolnej bez dodatku analitu zaobserwowano w buforze MOPS ($\text{pH} = 7,0$), nieco dłuższy w MES ($\text{pH} = 6,0$), natomiast w TRIS ($\text{pH} = 7,0$) czas stabilizacji był najdłuższy, a odpowiedź sensora w obecności próbki bez analitu - najwyższa.

Spośród testowanych buforów, to roztwór MOPS pozwolił uzyskać stabilny sygnał i praktycznie zerową odpowiedź sensora dla próbki nie zawierającej analitu, co czyni go najbardziej efektywnym medium pomiarowym. Jednakże z punktu widzenia oznaczenia jonów Hg^{2+} , uzyskana granica wykrywalności nie spełniała normy określonej przez WHO. W kolejnym etapie pracy przeanalizowano wpływ składników buforów będących związkami zdolnymi do kompleksowania jonów rtęci(II) i mogących zmienić formę tych jonów w roztworze badanym, wpływając na stabilność sygnału w analizowanych próbkach wody. Wykazano, że obecne w próbce aniony fosforanowe nie zaburzają możliwości detekcji Hg^{2+} , ponieważ w badanych warunkach kationy rtęci(II) prawdopodobnie były w większości związane z anionami MOPS. Dodatek fosforanów w stężeniu 100 mM dodatkowo poprawiał selektywność dzięki kompleksowaniu jonów przeszkadzających, jednak nadal nie pozwolił osiągnąć wymaganej granicy wykrywalności. Co ważne, obniżenie stężenia fosforanów do 1 mM znacząco zwiększyło odpowiedź biosensora dla stężenia 30 nM Hg^{2+} oraz nieznacznie poprawiło stabilność uzyskiwanego sygnału, co w rezultacie umożliwiło detekcję Hg^{2+} na poziomie wymaganym przez WHO. Dalsze badania prowadzono z wykorzystaniem 18-nukleotydowej sondy w medium pomiarowym zawierającym 100 mM MOPS i 1 mM NaH_2PO_4 ($\text{pH} = 7,0$). Zgodnie z charakterystyką przedstawioną na **Rys. 5**; [P3], opracowany biosensor wykazywał liniową odpowiedź w zakresie 1-100 nM Hg^{2+} , granicę detekcji (LOD) wynoszącą 1 nM oraz wysoką selektywność, o której świadczyły zmiany sygnałów prądowych nie przekraczające 5% dla wszystkich badanych interferentów jonowych.

W obliczu uzyskania satysfakcjonujących parametrów analitycznych, dalsza część badań została ukierunkowana na dobór parametrów istotnych z punktu widzenia wygody użytkowania biosensora oraz możliwości jego zastosowania w analizie próbek rzeczywistych. Krokiem w tym kierunku było opracowanie strategii regeneracji warstwy receptorowej biosensora. W tym celu czujnik poddano działaniu buforu zawierającego czynniki kompleksujące Hg^{2+} w postaci odpowiednio 2,5 mM tiosiarczanu potasu ($\text{pH} = 7,0$) albo 5 mM EDTA ($\text{pH} = 7,5$), których zadaniem miało być usunięcie jonów Hg^{2+} zaangażowanych w wytworzone mostki tyminowe. W obu przypadkach zaobserwowano efektywną regenerację sensora (**Rys. 6a i 6b**; [P3]). Co ważne, zauważono jednak, że stosowanie tiosiarczanu sodu prowadziło do przypuszczalnej degradacji warstwy receptorowej na skutek niespecyficznego desorpcji tioli przez wolną siarkę uwalnianą z nietrwałych jonów $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, co ograniczało jego przydatność jako

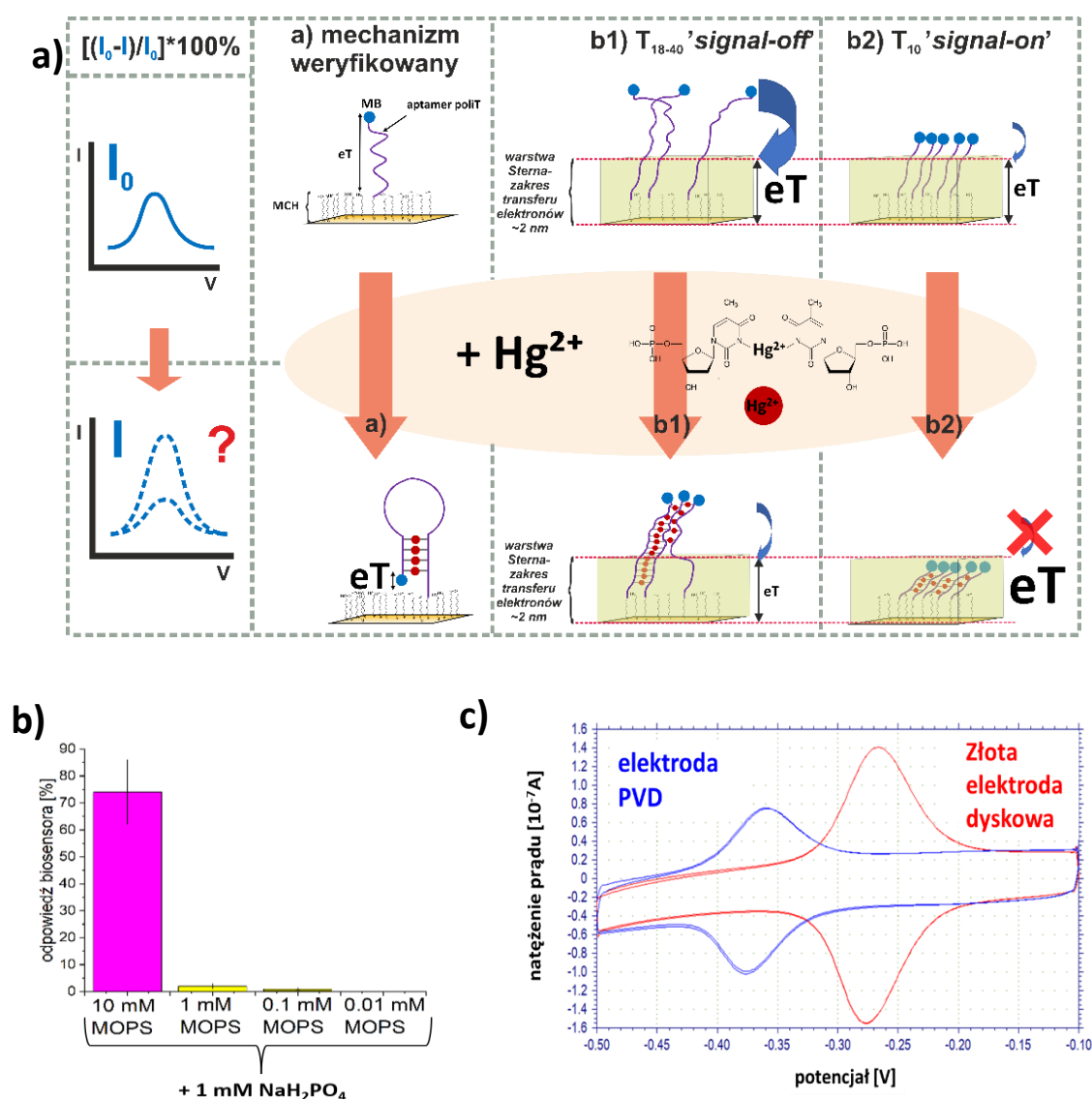
środka regeneracyjnego [132]. Takiego negatywnego wpływu nie zaobserwowano w przypadku drugiego z badanych czynników.

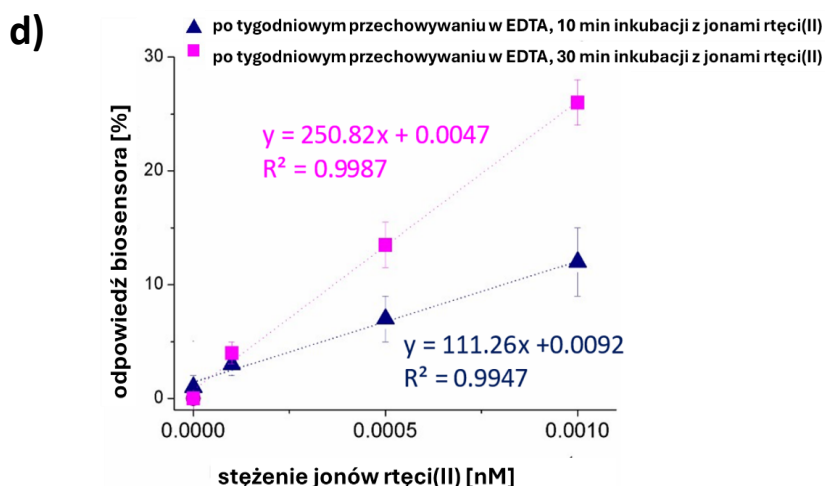
Roztwór EDTA, poza skutecznością w regeneracji, został również wykorzystany jako medium służące do długoterminowego przechowywania biosensora, gdyż wówczas odpowiedzi elektrochemiczne sensorów, uzyskane po 1-, 2- i 3-tygodniowym przechowywaniu wykazywały satysfakcjonującą powtarzalność i niewielkie zmiany sygnału prądowego dla próbki bez obecności analitu w porównaniu do sensorów bezpośrednio po przygotowaniu. Dodatkowo, po procesie przechowywania zaobserwowano zmniejszoną różnicę między potencjałem utleniania i redukcji na woltamperogramach CV (sondy znakowane błękitem metylenowym), co sugeruje korzystny wpływ EDTA na stabilność warstwy receptorowej jak również jej ewentualne oczyszczenie z jonów mogących usztywniać jej strukturę (**Rys. 6; [P3]** i Rys. 12d). Stąd też może wynikać wyraźnie odmienna odpowiedź czujnika na jony rtęci po procesie przechowywania. Zaobserwowano bowiem znaczące obniżenie granicy detekcji ($LOD = 0,001 \text{ nM}$) oraz zwiększenie czułości, nawet przy skróconym do 10 minut czasie oddziaływania z jonami Hg^{2+} , przy jednoczesnym zachowaniu jego wysokiej selektywności. Proponowane wyjaśnienie obserwowanego zjawiska uwzględnia wpływ EDTA na eliminację śladowych zanieczyszczeń pochodzących z wody czy użytych odczynników w postaci jonów metali, które mogą oddziaływać z warstwą bioreceptorową. EDTA jako skuteczny i uniwersalny czynnik kompleksujący chelatuje te jony, minimalizując tym samym ich wpływ na wyjściową konformację sond polityminowych.

Ostatnim etapem badań nad wykrywaniem jonów Hg^{2+} była konstrukcja aptasensora elektrochemicznego z wykorzystaniem przetworników planarnych. W tym celu wykorzystano miniaturowe elektrody PVD (wytworzone w ten sam sposób jak podano w publikacji P2). Powierzchnia elektrod wytworzonych metodą PVD pozwoliła na uzyskanie warstw receptorowych o stabilności porównywalnej do tych uzyskanych na powierzchni złotych elektrod dyskowych (**Rys. 7; [P3]** oraz Rys. 12c). Co więcej, odpowiedzi biosensorów w obecności jonów Hg^{2+} były zbliżone dla obu typów elektrod, zarówno w roztworach modelowych, jak i w rzeczywistych próbkach wody. Te wyniki potwierdziły, że przetworniki PVD otrzymywane w CEZAMAT PW zapewniają wysoką powtarzalność sygnałów od uzyskanych na ich podstawie biosensorów oraz stabilność uzyskiwanego sygnału prądowego.

Podsumowując, wyniki opisane w publikacji **P3** wykazały, że rozbieżności w literaturze dotyczące mechanizmu detekcji Hg^{2+} za pomocą aptamerów poliT mogą wynikać z niedostatecznego zrozumienia przebiegu procesu wiązania analitu zachodzącego w warstwach receptorowych o różnej długości sekwencji. Wykazano, że wzrastająca sztywność

warstwy receptorowej, wynikająca z tworzenia międzycząsteczkowych mostków tyminowych z jonami Hg^{2+} , determinuje charakter odpowiedzi biosensora typu „*signal-off*” (Rys. 12a), a odpowiedni dobór składu medium pomiarowego, tj. wybór MOPS jako głównego czynnika buforującego oraz anionów fosforanowych jako dodatku (Rys. 12b), ma korzystny wpływ na stabilność sygnału i uzyskiwane odpowiedzi prądowe w obecności jonów rtęci(II). Na podstawie opisanego wcześniej mechanizmu opracowano elektrochemiczne biosensory z wykorzystaniem elastycznych przetworników PVD (Rys. 12c), które charakteryzowały się zdolnością do regeneracji i długotrwałego przechowywania. Ponadto, uzyskano granicę detekcji w zakresie pikomolowym (Rys. 12d), co jest znacznie poniżej dopuszczalnego maksymalnego stężenia jonów Hg^{2+} w wodzie pitnej.





Rys. 12. a) Schemat ilustrujący mechanizmy działania aptasensora; b) odpowiedź SWV biosensora dla różnych stężeń MOPS; c) voltamperogramy CV uzyskane dla przetwornika miniaturowego w porównaniu z klasyczną złotą elektrodą dyskową; d) odpowiedź SWV biosensora na jony rtęci(II) [na podstawie P3].

3.4 Aptamer i elektrochemiczny aptasensor do wykrywania jonów selenianowych (SeO_4^{2-}) (P4)

A. Szymczyk, M. Popiołek, D. Baran, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Aptamer and Electrochemical Aptasensor towards Selenate Ions (SeO_4^{2-}). (2024) International Journal of Molecular Sciences, 25(12), 6660, DOI: 10.3390/ijms25126660

Na podstawie zdobytej wcześniej wiedzy w zakresie wytwarzania warstw receptorowych aptasensorów na powierzchniach złotych przetworników oraz mechanizmów wiązania jonów przez aptamery, podjęto badania nad opracowaniem czujnika elektrochemicznego do wykrywania jonów selenianowych(VI) (SeO_4^{2-}). Ze względu na brak w literaturze opisanych sekwencji dla jonów SeO_4^{2-} , konieczna była selekcja całkowicie nowego aptameru w procesie SELEX, przeprowadzonym przez firmę zewnętrzną. Nowo wyselekcjonowana sonda DNA została scharakteryzowana pod kątem powinowactwa do wykrywanego jonu oraz wykorzystana jako receptor w konstrukcji elektrochemicznego aptasensora. Uzyskany czujnik został następnie scharakteryzowany pod kątem oferowanych przez niego parametrów analitycznych. Badania obejmowały wyznaczenie dolnej granicy detekcji, ocenę selektywności oraz możliwości i warunków regeneracji sensora.

W konstrukcji aptasensora przyjęto strategię generowania sygnału z zastosowaniem znacznika redoks obecnego w roztworze. Kluczowe dla realizacji założonego celu było opracowanie warstwy receptorowej i dobór znacznika w taki sposób, aby jego dostęp do powierzchni elektrody oraz przebieg reakcji redoks był w istotnym stopniu uzależniony od

zmian konformacji aptamerów DNA lub ładunku warstwy receptorowej zachodzących po związaniu analitu. Różnica w rejestrowanych sygnałach prądowych przed i po inkubacji z próbką zawierającą aniony selenianowe(VI) stanowiła w takim przypadku odpowiedź biosensora (**Rys. 1; [P4]**). Początkowo wytypowano dwa wskaźniki różniące się strukturą i ładunkiem, które wykazują przez to odmienny mechanizm oddziaływania z aptamerami DNA. Wstępnie przebadano roztwór błękitu metylenowego tj. kationowego, organicznego znacznika redoks oraz równomolowy roztwór heksacyjanożelazianów(II) i heksacyjanożelazianów(III) potasu jako anionowy znacznik redoks. Badania początkowo prowadzono w roztworze o pH = 7,0, co zapewnia stabilność nici DNA i nie wpływa na specjację jonów selenianowych(VI). W zakresie pH od 3,5 do 14,0 jony te pozostają w formie zdeprotonowanej. Co ważne, zakres ten obejmuje również przedział stabilności DNA (pH = 4,0 - 9,0), co umożliwia wiarygodną detekcję anionów SeO_4^{2-} bez ryzyka degradacji nici kwasów nukleinowych unieruchomionych w warstwie receptorowej.

Przy pH = 7,0 odpowiedź biosensora uzyskano wyłącznie dla błękitu metylenowego jako markera redoks. Zjawisko to przypisano oddziaływaniom elektrostatycznym w warstwie receptorowej, gdzie kationowy znacznik jest przyciągany przez ujemnie naładowany szkielet DNA. Oczekiwano, iż w takim przypadku rejestrowany sygnał prądowy w obecności jonów SeO_4^{2-} powinien maleć z powodu przeszkód sterycznych utrudniających dostęp markera redoks do powierzchni elektrody. Jednak w rzeczywistości zaobserwowano efekt odwrotny, tj. jego wzrost (**Rys. 2; [P4]**). Najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem uzyskanej odpowiedzi czujnika jest taka zmiana konformacji aptameru po związaniu selenianów, która zwiększa przestrzeń dostępną dla znacznika redoks i ułatwia jego zbliżenie do powierzchni elektrody. Dodatkowo, na obserwowany efekt mogą wpływać oddziaływania elektrostatyczne, zwłaszcza w przypadku błękitu metylenowego, który jako kationowy znacznik redoks może silniej oddziaływać z warstwą receptorową. W przypadku zastosowania heksacyjanożelazianów(II) i (III) brak rejestrowanej odpowiedzi aptasensora sugeruje, że anionowy znacznik redoks jest odpychany przez ujemnie naładowany szkielet DNA. Efekt ten utrzymuje się nawet przy wyższych stężeniach jonów selenianowych, co wskazuje na dominację oddziaływań elektrostatycznych ograniczających dostęp znacznika do powierzchni elektrody. Ze względu na brak uzyskanej odpowiedzi elektrochemicznej dla tego markera redoks, dalsze badania prowadzono wyłącznie z użyciem błękitu metylenowego.

Kolejnym etapem badań była analiza odpowiedzi biosensora w funkcji stężenia jonów SeO_4^{2-} . Pomimo obserwowanej zależności sygnału od stężenia analitu, uzyskana granica detekcji w pH = 7,0 przekraczała wartość dopuszczalną według norm WHO (0,127 μM). Aby

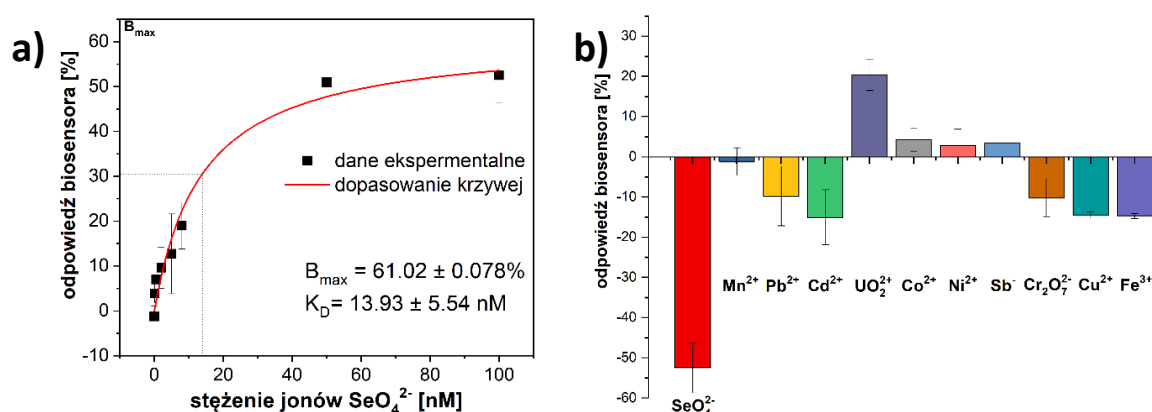
obniżyć granicę detekcji sensora, zmniejszono pH buforu pomiarowego do 4,0. Celem było ograniczenie odpychania anionów SeO_4^{2-} przez ujemnie naładowaną warstwę receptorową poprzez zmniejszenie jej wypadkowego ładunku. Osiągnięto to poprzez zwiększenie stężenia jonów H^+ , co przesunęło stan równowagi w kierunku częściowego protonowania grup $-\text{OH}$ pochodzących od 6-merkaptu-1-heksanolu oraz anionów fosforanowych pochodzących od DNA. W efekcie, mimo iż wartości bezwzględne rejestrowanych sygnałów prądowych przed i po inkubacji z analitem uległy obniżeniu, różnica sygnałów – stanowiąca miarę odpowiedzi biosensora – znacząco wzrosła w porównaniu do pomiarów w $\text{pH} = 7,0$ (**Rys. 5; [P4]**). Optimalizacja warunków pomiarowych pozwoliła na obniżenie dolnej granicy detekcji do 1 nM, co jest wartością znacząco poniżej najwyższego dopuszczalnego poziomu (0,127 μM) (**Rys. 6; [P4]** i Rys. 13a).

Przeprowadzone badania elektrochemiczne umożliwiły ocenę powinowactwa nowo opracowanego aptameru do jonów selenianowych(VI). Wyznaczona stała dysocjacji kompleksu aptamer - anion selenianowy $K_D = 13,9$ nM potwierdza wysoką zdolność miejsc wiążących aptameru do tworzenia kompleksów z analitem, nawet przy niskich stężeniach SeO_4^{2-} w badanych próbkach. Wnioski te zostały uzupełnione poprzez badania selektywności, które wykazały znikomy wpływ innych jonów o stężeniu 100 nM (m.in. SeO_3^{2-} , Mn^{2+} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}) na odpowiedź biosensora (**Rys. 7; [P4]** i Rys. 13b).

Zweryfikowano użyteczność opracowanego biosensora w analizie próbek rzeczywistych. Zaobserwowano, iż w próbkach wody wodociągowej wzbogaconych o jony SeO_4^{2-} odpowiedź prądowa była nieznacznie wyższa (ok. 5%) niż w przypadku analogicznych próbek laboratoryjnych, co potwierdza jego użyteczność. Następnie opracowano protokół regeneracji oraz dokonano oceny stabilności aptasensora podczas tygodniowego przechowywania w temperaturze ok. 4°C. W ramach testów różnych czynników regeneracyjnych sprawdzono cztery roztwory: (I) 5 mM EDTA, (II) 1 M KH_2PO_4 , (III) bufor TRIS z dodatkami KCl i MgCl_2 ($\text{pH} = 7,0$) oraz (IV) 0,5 M Na_2CO_3 ($\text{pH} = 10,5$). Spośród nich jedynie węglan sodu skutecznie usuwał jony SeO_4^{2-} związane z warstwą receptorową (**Rys. 10; [P4]**), co prawdopodobnie wynika ze zjawiska konkurencji między jonami CO_3^{2-} a anionami selenianowymi(VI) [133]. Z kolei analiza stabilności wykazała, że przechowywanie biosensora w roztworze 2 mM MCH zapewniało najwyższą trwałość warstwy receptorowej. Po tygodniu odpowiedź sensora była porównywalna do wartości uzyskanych dla świeżo przygotowanych elektrod, co potwierdza możliwość długoterminowego przechowywania na potrzeby detekcji SeO_4^{2-} .

Podsumowując, przeprowadzone badania potwierdziły użyteczność wyselekcjonowanej sekwencji aptameru w konstrukcji warstw bioczułych do wykrywania jonów

selenianowych(VI). Opracowany biosensor oferuje granicę detekcji wyraźnie poniżej wartości określonej przez WHO ($0,127 \mu\text{M}$) (Rys. 13a) i wykazuje wysoką selektywność (Rys. 13b). Określenie mechanizmu oddziaływania aptameru z jonami SeO_4^{2-} może stanowić punkt wyjścia do kontynuacji badań nad optymalizacją konstrukcji aptasensora. Dalsze badania powinny skupić się na poprawie powtarzalności pomiarów i skróceniu czasu analizy, co można osiągnąć poprzez dobór odpowiedniej gęstości powierzchniowej receptorów w warstwie bioczułej oraz składu medium pomiarowego. Istotnym kierunkiem rozwoju jest również miniaturyzacja czujników poprzez zastosowanie do ich wytwarzania planarnych przetworników.



Rys. 13. a) ocena powinowactwa aptameru do jonów SeO_4^{2-} - wyznaczenie równowagowej stałej dysocjacji (K_D); b) selektywność sensora względem jonów przeszkadzających (stężenie wszystkich jonów równe 100 nM) [na podstawie P4].

3.5 Porównanie różnych modyfikacji powierzchni magnetycznych nanosorbentów Fe_3O_4 do zastosowań w ekstrakcji kwasów nukleinowych (P5)

A. Szymczyk, M. Drozd, A. Kamińska, M. Matczuk, M. Trzaskowski, M. Mazurkiewicz-Pawlicka, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Comparative evaluation of different surface coatings of Fe_3O_4 based magnetic nano sorbent for applications in the nucleic acids extraction. (2022) International Journal of Molecular Sciences, 23(16), 8860, DOI: 10.3390/ijms23168860

W celu obniżenia granicy detekcji klasycznych metod wykrywania specyficznych sekwencji kwasów nukleinowych, jak również genosensorów, możliwe jest wstępne wydzielanie kwasów nukleinowych z matrycy próbki. Należy zaznaczyć, że tradycyjne techniki izolacji kwasów nukleinowych są czasochłonne i wymagają specjalistycznego sprzętu laboratoryjnego. Do często stosowanych metod należą ekstrakcja fenolowo-chloroformowa, wysalanie, traktowanie proteinazą K oraz adsorpcja materiału genetycznego na membranie

krzemionkowej [134]. Obecnie dąży się do opracowania szybszych i bardziej efektywnych metod. W tym kontekście interesującym rozwiązaniem okazały się powierzchniowo zmodyfikowane nanocząstki magnetyczne. Z punktu widzenia wygody separacji obecność rdzenia magnetycznego, który umożliwia łatwą manipulację nanocząstkami za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego, jest kluczową zaletą tego typu nanosorbentów. Efektywność wydzielania kwasów nukleinowych zależy przede wszystkim od ich zdolności wiązania materiału genetycznego obecnego w złożonych matrycach próbek rzeczywistych. W kolejnych etapach nanocząstki powinny umożliwiać wydzielenie z roztworu, a następnie wydajną desorpcję materiału genetycznego do roztworu elucyjnego [75].

Motywacją do podjęcia badań w tym obszarze była trudność w jednoznacznym porównaniu różnych mechanizmów adsorpcji materiału genetycznego na powierzchni nanosorbentów na podstawie dostępnych doniesień literaturowych. Nie pozwalają one na rzetelną ocenę efektywności wydzielania DNA ze względu na różnice w metodologii tego procesu oraz we właściwościach zastosowanych nanomateriałów. Szczególnie istotnym wyzwaniem jest brak ustandaryzowanych metod określania i porównywania stężenia nanocząstek. Za wartościowe naukowo uznano podjęcie próby przeprowadzenia doświadczalnej weryfikacji efektywności adsorpcji DNA na nanocząstkach oraz porównania wpływu różnych mechanizmów oddziaływania na badany proces.

W pracy **P5** przedstawiono wyniki badań dotyczących wybranych aspektów oddziaływań DNA ze zmodyfikowanymi powierzchniowo nanocząstkami tlenku żelaza(II,III). Do funkcjonalizacji nanocząstek zastosowano powłoki, takie jak polietylenoimina (PEI), krzemionka i jej aminowana pochodna oraz złoto. Wykorzystano również nanomateriały, m.in. utleniony grafen i jego karboksylowaną pochodną. Takie podejście pozwoliło na zastosowanie różnych mechanizmów oddziaływania dsDNA stanowiącego modelowy analit z powierzchniowo-modyfikowanymi magnetycznymi nanosorbentami. Przeanalizowano również wpływ składników buforu, takich jak kationy jedno- i dwuwartościowe oraz EDTA, na adsorpcję i desorpcję DNA (**Rys. 1**; **[P5]** i Rys. 14a). W wyniku koprecypitacji, a następnie postsyntetycznej modyfikacji otrzymano rodzinę nanocząstek Fe_3O_4 o identycznych rdzeniach o średnicach około 10 nm, różniące się jedynie późniejszą modyfikacją ich powierzchni. Pozwoliło to na bezpośrednie, ilościowe porównanie ich zdolności do odwracalnego wiązania DNA. Podejście to stanowiło ważny element nowości naukowej opisany w niniejszej pracy, z uwagi na trudność dokonania rzetelnej, ilościowej analizy porównawczej nanosorbentów uzyskiwanych w różnych laboratoriach na podstawie istniejących, różnych doniesień literaturowych.

W przypadku nanocząstek modyfikowanych kationowym polimerem - polietylenoiminą (PEI) oraz aminowaną krzemionką kluczową rolę w wiązaniu DNA odgrywały oddziaływania elektrostatyczne, natomiast zastosowanie utlenionego grafenu (GO) i jego karboksylowanej pochodnej (GOCOOH) pozwoliło na wykorzystanie oddziaływań hydrofobowych typu π - π oraz wiązań wodorowych. Z kolei nanocząstki pokryte krzemionką (SiO_2) oraz złotem (Au) umożliwiały adsorpcję DNA dzięki zaangażowaniu odpowiednio oddziaływań hydrofobowych i wodorowych (SiO_2) oraz koordynacyjnych (Au). Aby zapewnić rzetelną, porównawczą ocenę wpływu modyfikacji powierzchni nanocząstek na wydajność wydzielania DNA, ujednolicono ich stężenie na podstawie oznaczenia zawartości żelaza w próbkach za pomocą techniki ICP- MS/MS.

W niniejszej pracy po raz pierwszy opisano wykorzystanie polietylenoiminy jako stabilizatora nanocząstek użytego bezpośrednio podczas syntezy rdzeni Fe_3O_4 . PEI pełniła również funkcję warstwy pośredniej, ułatwiającej dalszą modyfikację powierzchni nanocząstek Fe_3O_4 , co szczegółowo omówiono w rozdziale *Materiały i Metody* publikacji [P5]. Analiza magnetometryczna wykazała, że wszystkie uzyskane nanocząstki zachowują właściwości superparamagnetyczne, jednak wartości momentu magnetycznego, zestawione w **Tab. 2c**; [P5], zależą od rodzaju modyfikacji powierzchni. Najlepszą magnetyzację wykazują nanocząstki pokryte krzemionką (74,7 emu/g_{Fe}) i aminowaną krzemionką (76,8 emu/g_{Fe}). Jedyne nieznacznie gorsze właściwości magnetyczne wykazują nanocząstki pokryte PEI, jak również GO i GOCOOH. Najsłabsze właściwości magnetyczne (44,6 emu/g_{Fe}), wykazują nanocząstki pokryte złotem. Obecność przewodzącej powłoki Au zmniejsza ich magnetyzację, ograniczając tym samym możliwość skutecznej separacji DNA w polu magnetycznym.

Do ilościowej analizy procesów adsorpcji i desorpcji DNA zastosowano metodę spektrofotometryczną opartą na absorpcji promieniowania UV przy długości fali 260 nm przez zasady azotowe kwasów nukleinowych (**Rys. 8**; [P5]). Wszystkie badane typy modyfikowanych nanosorbentów magnetycznych wykazały zdolność wiązania DNA (**Rys. 9**; [P5] i Rys. 14b), a największą efektywnością adsorpcji, sięgającą w optymalnych warunkach 99% (wyrażaną jako względny ubytek kwasu nukleinowego z roztworu) charakteryzowały się nanocząstki pokryte polietylenoiminą. Zauważono, że w przypadku modyfikacji PEI wydajność adsorpcji DNA malała wraz ze wzrostem zawartości jonów Na^+ i Mg^{2+} (z 99% przy braku dodatków tych soli do 37% przy stężeniu Mg^{2+} wynoszącym 1M). Prawdopodobnym wytłumaczeniem obserwowanego zjawiska jest ekranowanie ujemnego ładunku DNA przez kationy, co wpływa niekorzystnie na proces adsorpcji. Obserwacja ta potwierdza postulowany mechanizm interakcji oparty na oddziaływaniach elektrostatycznych.

Odwrotną tendencję we wpływie siły jonowej na wydajność adsorpcji DNA, zilustrowaną na **Rys. 9**; [P5] można zauważyć dla nanocząstek dekorowanych utlenionym grafenem (wzrost wydajności adsorpcji z 32% do 96%) i jego karboksylową pochodną (wzrost z 22% do 99%). W tym przypadku postulowaną, główną siłą napędową procesu jest oddziaływanie hydrofobowe typu π - π zasad azotowych z pierścieniami aromatycznymi nanomateriału węglowego. Z kolei zastosowanie podwyższonego stężenia kationów (zarówno jedno- jak i dwuwartościowych) w medium adsorpcji osłabia odpychanie elektrostatyczne między DNA i nanocząstkami oraz destabilizuje otoczkę hydratacyjną kwasu nukleinowego. Możliwe jest jednak również współwystępowanie dodatkowych oddziaływań, takich jak wiązania wodorowe oraz oddziaływania typu donor-akceptor między atomami tlenu w cząsteczkach tlenku grafenu (GO) a zasadami azotowymi. Udział tych oddziaływań nie został uznany jednak za znaczący, z uwagi na niewielkie różnice pomiędzy adsorpcją na Fe_3O_4 modyfikowanym za pomocą GO i jego karboksylowanej pochodnej zawierającej więcej grup elektronodonorowych bogatych w atomy tlenu.

Nanocząstki pokryte krzemionką, zarówno anionowe (niemodyfikowany SiO_2), jak i kationowe (aminowany SiO_2), wykazują umiarkowaną zdolność wiązania DNA, osiągając odpowiednio 58% i 47% wydajności adsorpcji. Zwiększenie siły jonowej nie wpływa istotnie na ten proces, co może wynikać z aglomeracji nanocząstek krzemionkowych zaobserwowanej w badaniach STEM (**Rys. 4**; [P5]). Powstawanie aglomeratów zmniejsza dostępną powierzchnię właściwą, ograniczając efektywność adsorpcji DNA. Warto podkreślić, iż nanocząstki modyfikowane SiO_2 są powszechnie stosowane w komercyjnych zestawach do ekstrakcji DNA, jednak zaobserwowana w prowadzonych pracach badawczych ich dość niska wydajność wydzielania może wynikać z braku w medium czynników chaotropowych, które zwykle wspomagają adsorpcję [135,136]. W badaniach opisanych w publikacji P5 świadomie zrezygnowano z ich użycia, aby móc ocenić alternatywne mechanizmy adsorpcji.

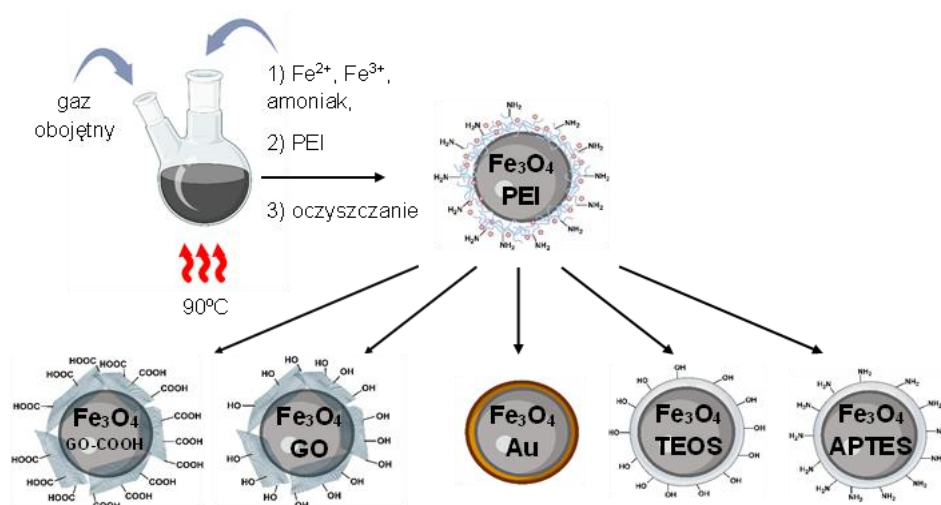
Kolejnym etapem badań była optymalizacja procesu odzysku DNA z powierzchni nanocząstek. Skoncentrowano się na doborze odpowiedniego medium desorpcyjnego, ostatecznie wybierając do tego celu roztwór 10 mM TRIS-HCl z dodatkiem 0,1 mM EDTA o pH = 8,0 (**Rys. 10**; [P5]). Efektywność odzysku DNA oceniano na podstawie widm absorpcji buforu ekstrakcyjnego w zakresie UV po procesie desorpcji oraz separacji magnetycznej nanocząstek. Całkowita zdolność wydzielania DNA jest wypadkową wydajności obu procesów – adsorpcji i desorpcji. Desorpcja wyrażana jest w wartościach procentowych względem uprzednio zaadsorbowanej ilości DNA, wysoka efektywność tego etapu nie zawsze przekłada się na większą, bezwzględną ilość wydzielonego materiału genetycznego. Analiza uzyskanych

wyników dla procesu desorpcji (przedstawionych na **Rys. 11**; [P5] i Rys. 14c) wskazuje, że w przypadku mechanizmu elektrostatycznego oddziaływania DNA z kationowymi nanocząstkami obecność jonów magnezu znacząco ułatwia desorpcję, a efekt ten jest wyraźnie silniejszy w porównaniu do nanocząstek o ujemnym ładunku powierzchniowym. Prawdopodobnie wynika to z efektywnego ekranowania ładunków przez jony Mg^{2+} , co sprzyja destabilizacji kompleksów nanocząstka-DNA i ułatwia ich rozpad podczas desorpcji. Pozytywny wpływ jonów magnezu na odzysk DNA był szczególnie wyraźny w przypadku nanocząstek pokrytych krzemionką.

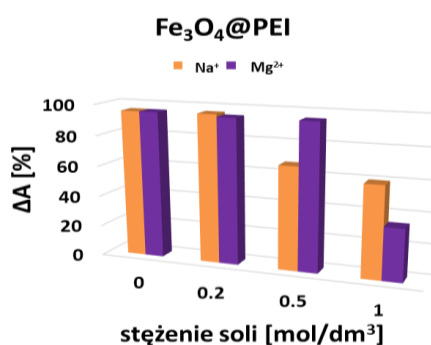
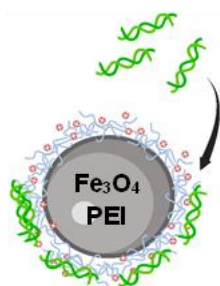
Nanocząstki modyfikowane GO i GOCOOH wykazywały odmienny mechanizm desorpcji. W ich przypadku obecność jonów magnezu nie sprzyjała odzyskowi DNA, a skuteczna desorpcja wymagała wydłużonego czasu inkubacji i podwyższonej temperatury, co wskazuje na wolniejszą kinetykę procesu. Porównując GO i GOCOOH, obecność grup karboksylowych w GOCOOH zwiększała wydajność desorpcji DNA. Prawdopodobnie wynikało to z większej liczby polarnych grup tlenowych, które tworzyły labilne wiązania wodorowe, ułatwiające późniejsze uwalnianie DNA z powierzchni nanocząstek.

Podsumowując, w ramach badań przeprowadzono syntezę nanocząstek Fe_3O_4 stabilizowanych polietylenoiminą (PEI) metodą koprecypitacji, które następnie posłużyły jako rdzeń do dalszych modyfikacji powierzchniowych (Rys. 14a). Przeprowadzone badania wykazały, że efektywność adsorpcji i desorpcji DNA zależy od rodzaju nanocząstek oraz mechanizmu ich oddziaływania z DNA. Najwyższą skuteczność adsorpcji uzyskano dla nanocząstek pokrytych kationową PEI (Rys. 14b), podczas gdy najbardziej efektywny względny odzysk osiągnięto w przypadku nanocząstek modyfikowanych GOCOOH (Rys. 14c). Należy jednak mieć na uwadze, że jest to wartość procentowa odnosząca się do uprzednio zaadsorbowanego DNA, a zatem rzeczywista, całkowita ilość DNA ulegającego desorpcji może być niższa w porównaniu do modyfikacji, dla których proces adsorpcji przebiegał z wyższą wydajnością. Istotnym czynnikiem wpływającym na przebieg desorpcji okazała się siła jonowa i rodzaj obecnych kationów. Jony Mg^{2+} wspomagały desorpcję jedynie w przypadku nanocząstek kationowych. W przypadku Fe_3O_4 dekorowanych pochodnymi grafenu, skuteczny odzysk DNA wymagał wydłużonego czasu inkubacji i podwyższonej temperatury. Uzyskane wyniki podkreślają konieczność indywidualnego doboru warunków adsorpcji i desorpcji w zależności od typu nanocząstek oraz dominujących mechanizmów oddziaływań z DNA. Wnioski te mogą przyczynić się do dalszej optymalizacji kompozycji nanosorbentów magnetycznych, zwiększając ich skuteczność zarówno w izolacji kwasów nukleinowych, jak i w zastosowaniach biosensorycznych.

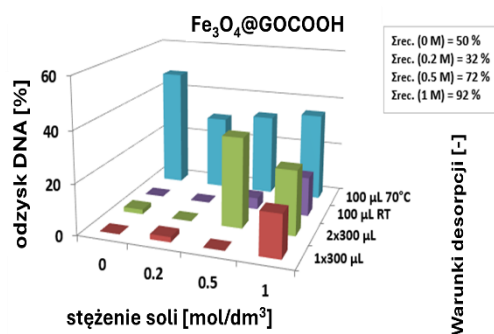
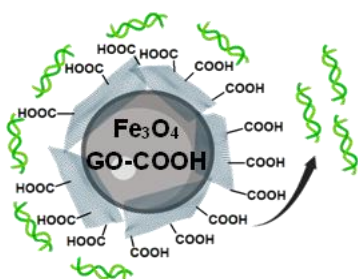
a) koprecypitacja modyfikacja



b) adsorpcja



c) desorpcja



Rys. 14. a) Schemat ilustrujący przebieg jednoetapowej syntezy rdzeni magnetycznych pokrytych PEI i późniejszej modyfikacji ich powierzchni za pomocą różnych czynników; b) adsorpcja DNA – schemat procesu i wartości efektywności adsorpcji uzyskane dla nanocząstek Fe₃O₄@PEI (dla których uzyskano najlepszą wydajność procesu); c) desorpcja DNA – schemat procesu i wartości względnej efektywności desorpcji (odzysku) uzyskane dla nanocząstek Fe₃O₄@GO-COOH (dla których uzyskano najlepszą względną wydajność procesu). W tym przypadku najbardziej wydajną desorpcję uzyskano w przypadku zastosowania wysokiej temperatury prowadzenia procesu [na podstawie P5].

4. Podsumowanie

Niniejsza rozprawa doktorska, stanowiąca cykl spójnych tematycznie publikacji, przedstawia wyniki badań nad mechanizmami oddziaływań kwasów nukleinowych, pełniących rolę receptorów molekularnych w elektrochemicznych biosensorach DNA - z innymi komponentami warstwy receptorowej, składnikami badanych roztworów oraz wybranymi analitami. Praca obejmuje również analizę procesu wiązania kwasów nukleinowych przez powierzchniowo modyfikowane nanomateriały magnetyczne. Szczególną uwagę poświęcono analizie wpływu badanych oddziaływań na parametry pracy czujników, takie jak uzyskiwana granica wykrywalności, selektywność oraz stabilność sygnału elektrochemicznego. Badania zaowocowały opracowaniem nowych rozwiązań biosensorycznych, w tym elektrochemicznych genosensorów do wykrywania specyficznych sekwencji DNA pełniących funkcję biomarkerów chorób zakaźnych (błonica, COVID-19) oraz aptasensorów do detekcji jonów Hg^{2+} i SeO_4^{2-} w próbkach środowiskowych.

W pierwszym etapie badań zaproponowano dietylditiokarbaminian sodu (DEDTC) jako alternatywny względem 6-merkaptiheksanolu (MCH) czynnik blokujący powierzchnię w warstwach receptorowych typu SAM oraz jego zastosowanie w konstrukcji elektrochemicznego czujnika DNA do detekcji biomarkera genetycznego błonicy. Wykazano, że otrzymane monowarstwy mieszane DEDTC z immobilizowanymi sondami DNA znakowanymi błękitem metylenowym charakteryzowały się większym uzyskiwanym natężeniem sygnału prądowego w porównaniu z badanymi warstwami mieszanymi z innymi wypełniaczami oraz skutkowały poprawą odporności sygnału biosensora na zakłócenia ze strony białek obecnych w matrycy próbek.

Badania nad zastosowaniem planarnych elektrod cienkowarstwowych w konstrukcji czujników DNA wykazały, że elektrody osadzone metodą PVD wykazują przewagę nad elektrodami sitodrukowanymi, umożliwiając tworzenie stabilnych i jednorodnych warstw SAM. Dzięki mniejszej chropowatości oraz wysokiej jakości powierzchni, przetworniki PVD zapewniają lepszą organizację warstwy receptorowej i pozwalają na osiągnięcie powtarzalności sygnału prądowego. Wykorzystanie odpowiednio zaprojektowanych i wyselekcjonowanych sond molekularnych typu spinka oraz użycie planarnych przetworników na podłożu PET umożliwiło otrzymanie genosensora do detekcji markerów genetycznych COVID-19.

Cennym rezultatem badań nad elektrochemicznymi aptasensorami było wykazanie, że nieoczekiwany charakter odpowiedzi typu „*signal-off*” obserwowany dla czujnika do detekcji Hg^{2+} jest wynikiem odmiennego mechanizmu tworzenia się mostków T- Hg^{2+} -T pomiędzy

dwoma sąsiadującymi niciami DNA – w przeciwieństwie do powszechnie przyjmowanego, w którym struktury te tworzą się w ramach jednej, zmieniającej konformację nici DNA. Stwierdzono, że w obecności jonów Hg^{2+} dochodzi do tworzenia mostków międzycząsteczkowych, co zwiększa sztywność monowarstwy oligonukleotydowej, a to utrudnia transport znacznika redoks do powierzchni elektrody i skutkuje spadkiem rejestrowanego sygnału elektrochemicznego. Wykazano, że skład medium pomiarowego oraz długość sond polityminowych mają istotne znaczenie dla szybkości stabilizacji i wartości rejestrowanych odpowiedzi prądowych sensora. Zaprojektowany sensor cechował się użytecznymi parametrami analitycznymi, w tym granicą detekcji na poziomie 0,001 nM i bardzo dobrą selektywnością. Zastosowanie przetworników PVD pozwoliło na miniaturyzację aptasensora. Opracowano również procedurę przechowywania i regeneracji biosensora, umożliwiającą jego wielokrotne wykorzystanie do detekcji jonów Hg^{2+} .

Kolejnym osiągnięciem opisanym w dysertacji było opracowanie elektrochemicznego aptasensora, w którym zastosowano nowo wyselekcjonowany, nie opisany wcześniej w literaturze, aptamer do detekcji jonów SeO_4^{2-} . Wykorzystanie błękitu metylenowego jako znacznika redoks w roztworze umożliwiło monitorowanie zmian sygnału po związaniu analitu, a optymalizacja warunków pomiarowych pozwoliła na osiągnięcie granicy detekcji na poziomie 1 nM w roztworze pomiarowym o pH = 4,0. Opracowany biosensor wykazał dobrą selektywność wobec selenianów(VI), a jego użyteczność potwierdzono w analizie rzeczywistych próbek wody wodociągowej.

Opracowano także metodę syntezy i scharakteryzowano pulę powierzchniowo modyfikowanych nanocząstek magnetycznych o zróżnicowanych mechanizmach oddziaływania z DNA i oceniono ich skuteczność jako nanosorbentów do wydzielania kwasów nukleinowych. Najwyższą efektywność wiązania kwasów nukleinowych wykazały nanocząstki pokryte polietylenoiminą, które dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym zapewniały wysoką wydajność wiązania i odzysku DNA. Wykazano istotny wpływ na efektywność tych procesów zarówno siły jonowej, jak i wartościowości kationów (Na^+ , Mg^{2+}) obecnych w roztworach stosowanych do wiązania i desorpcji DNA. Uzyskane wyniki potwierdziły, że optymalne warunki wiązania DNA zależą od rodzaju modyfikacji powierzchniowej sorbentu, co wskazuje na konieczność indywidualnego doboru składu medium dla każdego typu zastosowanych nanocząstek.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań dostarczyły istotnych informacji na temat oddziaływań pomiędzy składnikami próbek i roztworów pomiarowych a komponentami warstw receptorowych elektrochemicznych biosensorów DNA. Oceniono również możliwości

wydzielania DNA z próbek za pomocą powierzchniowo modyfikowanych nanocząstek magnetycznych. Badania poszerzyły wiedzę w zakresie projektowania warstw receptorowych geno- i aptasensorów DNA, wykorzystania nanomateriałów oraz wpływu roztworu pomiarowego na parametry pracy czujników. Udowodniono również konieczność kontroli nad składem warstwy bioreceptorowej. Zrozumienie tych zależności jest kluczowe dla zapewnienia odpowiednich warunków działania elektrochemicznych biosensorów DNA. Wnioski przedstawione w rozprawie mogą stanowić cenne wskazówki dla dalszych badań w tej dziedzinie.

Za najważniejsze osiągnięcia badawcze uzyskane w ramach realizacji rozprawy doktorskiej uważam:

- zaproponowanie dietylditiokarbaminianu sodu (DEDTC) jako wypełniacza stanowiącego alternatywę dla 6-merkaptohexanolu oraz wykazanie zdolności warstwy DEDTC do minimalizacji niespecyficznego adsorpcji białek i zwiększenia natężenia rejestrowanego prądu,
- ocenę przydatności komercyjnych elektrod sitodrukowanych oraz przetworników PVD (wytworzonych we współpracy z CEZAMAT PW) do konstrukcji miniaturowych biosensorów DNA oraz wykazanie przewagi przetworników PVD pod względem stabilności sygnału oraz jakości powierzchni złota sprzyjającej tworzeniu uporządkowanych monowarstw typu SAM,
- opracowanie aptasensora o odpowiedzi typu „*signal-on*” / „*signal-off*” do wykrywania jonów rtęci oraz wyjaśnienie mechanizmu oddziaływania cząsteczek aptameru z analitem polegające na usztywnieniu warstwy receptorowej poprzez tworzenie mostków T–Hg²⁺–T,
- opracowanie technologii otrzymywania planarnych przetworników PVD na elastycznym podłożu (we współpracy z CEZAMAT PW) do konstrukcji miniaturowego aptasensora do detekcji jonów Hg²⁺, opartego na miniaturowych przetwornikach PVD, charakteryzującego się użytecznymi parametrami analitycznymi (granica wykrywalności 0,001 nM - znacznie poniżej limitu określonego przez WHO) oraz potwierdzenie jego przydatności w analizie próbek rzeczywistych,
- zastosowanie nowego, nie opisanego dotąd w literaturze, aptameru selektywnego na aniony SeO₄²⁻ i opracowanie aptasensora, oferującego granicę detekcji na poziomie 1 nM SeO₄²⁻,

- przeprowadzenie szczegółowej, porównawczej analizy wpływu modyfikacji powierzchni nanocząstek magnetycznych w postaci polietylenoiminy (PEI), krzemionki, utlenionego grafenu czy złota na mechanizm oddziaływania z DNA i efektywność jego wydzielania oraz określenie roli siły jonowej w procesach adsorpcji i desorpcji kwasów nukleinowych,
- wykazanie, iż nanocząstki pokryte polietylenoiminą (PEI) cechują się najwyższą wydajnością adsorpcji DNA, co wynika z silnych oddziaływań elektrostatycznych oraz wysokiej stabilności koloidalnej w szerokim zakresie pH.

Perspektywy dalszych badań

Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszego rozwoju badań nad miniaturyzacją biosensorów DNA oraz ich potencjalną implementacją w bardziej złożonych układach analitycznych. W kontekście analizy próbek o złożonej matrycy, obiecującym rozwiązaniem jest zastosowanie zaprojektowanych, modyfikowanych powierzchniowo nanocząstek magnetycznych do wstępnego oczyszczania i izolacji kwasów nukleinowych przed detekcją specyficznych sekwencji za pomocą biosensorów DNA. Nanomateriały te, dzięki możliwości selektywnego wychwytu kwasów nukleinowych, mogą znaleźć zastosowanie nie tylko w klasycznym wydzielaniu DNA, lecz także w nowych obszarach bioanalizy. Szczególnie interesujące jest ich potencjalne wykorzystanie jako hybrydowych nanosorbentów pełniących równocześnie funkcję znaczników (np. elektrochemicznych lub katalitycznych) w czujnikach DNA opartych na różnych strategiach detekcji sygnału. W takich systemach możliwe jest całkowite wyeliminowanie etapu desorpcji, co dodatkowo upraszcza procedurę analityczną.

Dalsze prace badawcze będą koncentrowały się również na integracji opracowanych i przedstawionych w ramach niniejszej rozprawy – miniaturowych biosensorach DNA z układami mikroprzepływowymi w celu stworzenia miniaturowych, autonomicznych urządzeń do szybkiej i w pełni zautomatyzowanej analizy kwasów nukleinowych i innych analitów, istotnych z punktu widzenia badań klinicznych i środowiskowych. W ramach grupy badawczej prowadzone są już pierwsze tego typu prace, które przynoszą obiecujące wyniki. Równolegle rozwijane będą rozwiązania umożliwiające jednoczesną detekcję wielu genów z wykorzystaniem wielopolowych, planarnych czujników elektrochemicznych wytwarzanych w technologii PVD. Docelowo przewiduje się opracowanie zautomatyzowanego, przenośnego systemu analitycznego, opartego na czujnikach DNA w formie jednorazowych kaset diagnostycznych, które będą wymagały od użytkownika jedynie wprowadzenia próbki. Takie podejście, w połączeniu z rozwiązaniami zaprezentowanymi w niniejszej pracy, ma na celu

znaczące uproszczenie procedury analitycznej, co umożliwi jej zastosowanie nie tylko w warunkach laboratoryjnych, ale również w punktach opieki nad pacjentem, a nawet przez osoby bez specjalistycznego przygotowania.

Inny planowany do podjęcia przeze mnie wątek badawczy będzie koncentrować się na próbie eliminacji ograniczeń rozpoznawania molekularnego w elektrochemicznych geno- i aptasensorach dzięki wykorzystaniu mieszanego mechanizmu homofazowo-heterofazowego, w którym oddziaływanie receptor DNA-analit będzie miało miejsce w roztworze. Badania będą realizowane w ramach kierowanego przeze mnie projektu badawczego który uzyskał finansowanie w konkursie Preludium 23. Prace będą skupiać się między innymi na opracowaniu uniwersalnej platformy do woltamperometrycznej detekcji sekwencji DNA patogenu *Fusarium spp.* oraz mykotoksyny - deoksyniwalenolu, stanowiących ważne anality z punktu widzenia kontroli bezpieczeństwa żywności. Powyższe badania prowadzone będą przy współudziale grupy badawczej prof. Giovanni Marrazza z Uniwersytetu we Florencji i będą one stanowić kontynuację współpracy zapoczątkowanej podczas mojego stażu naukowego.

5. Bibliografia

- [1] F. Malentacchi, S. Pizzamiglio, R. Wyrich, P. Verderio, C. Ciniselli, M. Pazzagli, S. Gelmini, Effects of Transport and Storage Conditions on Gene Expression in Blood Samples, *Biopreserv. Biobank.* 14 (2016) 122–128. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0037>.
- [2] S.S. Mahshid, S.E. Flynn, S. Mahshid, The potential application of electrochemical biosensors in the COVID-19 pandemic: A perspective on the rapid diagnostics of SARS-CoV-2, *Biosens. Bioelectron.* 176 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112905>.
- [3] Y. Mei, X. Lin, C. He, W. Zeng, Y. Luo, C. Liu, Z. Liu, M. Yang, Y. Kuang, Q. Huang, Recent Progresses in Electrochemical DNA Biosensors for SARS-CoV-2 Detection, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10 (2022). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.952510>.
- [4] A.M. Ashrafi, Z. Koudelkova, E. Sedlackova, L. Richtera, V. Adam, Review — Electrochemical sensors and biosensors for determination of mercury ions, *J. Electrochem. Soc.* 165 (2018) B824–B834. <https://doi.org/10.1149/2.0381816jes>.
- [5] P. Kaur, D. Monga, B. Singh, Biosensors for the Detection of Selenium in Environment, 2021. <https://doi.org/10.1002/9781119693567.ch9.910>
- [6] N. Zhumanazar, I.V. Korolkov, A.B. Yeszhanov, D.I. Shlimas, M.V. Zdorovets, Electrochemical detection of lead and cadmium ions in water by sensors based on modified track-etched membranes, *Sensors Actuators A Phys.* 354 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.sna.2022.114094>.
- [7] O. Fedrigo, G. Naylor, A gene-specific DNA sequencing chip for exploring molecular evolutionary change, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1208–1213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh210>.
- [8] M.S.P. López, G.F. Cabanillas, M.J.L. Castañón, B. López-Ruiz, Development of a genosensor for peanut allergen ARA h 2 detection and its optimization by surface response methodology, *Biosens. Bioelectron.* 62 (2014) 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.065>.
- [9] M. Jarczewska, W. Bojarski, A. Majewska, M. Drozd, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Studies on the application of single-stranded DNA and PNA probes for electrochemical detection of miRNA 141, *Bioelectrochemistry* 150 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108363>.
- [10] K. Marchlewicz, I. Ostrowska, S. Oszałdowski, A. Zasada, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Molecular diagnostic of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strain by DNA sensor potentially suitable for electrochemical point-of-care diagnostic, *Talanta* 227 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122161>.
- [11] I. Barjaktarović, J.S. Maletić, N. Vučinić, A. Milutinović, M. Grujičić, V. Čabarkapa, Diagnosing COVID-19: diagnostic importance of detecting E gene of the SARS-CoV-2 genome, *Future Virol.* 18 (2023) 31–38. <https://doi.org/10.2217/fvl-2021-0330>.
- [12] J. Liu, Z. Cao, Y. Lu, Functional nucleic acid sensors, *Chem. Rev.* 109 (2009) 1948–1998. <https://doi.org/10.1021/cr030183i>.
- [13] D. Li, S. Song, C. Fan, Target-responsive structural switching for nucleic acid-based sensors, *Acc. Chem. Res.* 43 (2010) 631–641. <https://doi.org/10.1021/ar900245u>.
- [14] K. Yi, Y. Yu, S. Tan, J. Zhang, T. Ye, N. Liu, X. Tang, L. Zhang, S. Huang, A regulatable gap-electrical DNA sensor based on gold nanorods and single-walled carbon nanotubes, *Microchem. J.* 179 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107415>.
- [15] D. Kang, X. Zuo, R. Yang, F. Xia, K.W. Plaxco, R.J. White, Comparing the properties of electrochemical-based DNA sensors employing different redox tags, *Anal. Chem.* 81 (2009) 9109–9113. <https://doi.org/10.1021/ac901811n>.
- [16] M. Yuan, S. Qian, H. Cao, J. Yu, T. Ye, X. Wu, L. Chen, F. Xu, An ultra-sensitive electrochemical aptasensor for simultaneous quantitative detection of Pb²⁺ and Cd²⁺ in

- fruit and vegetable, *Food Chem.* 382 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132173>.
- [17] A.D. Ellington, J.W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature* 346 (1990) 818–822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>.
- [18] M. Ilgu, M. Nilsen-Hamilton, Aptamers in analytics, *Analyst* 141 (2016) 1551–1558. <https://doi.org/10.1039/c5an01824b>.
- [19] Y. Miyake, H. Togashi, M. Tashiro, H. Yamaguchi, S. Oda, M. Kudo, Y. Tanaka, Y. Kondo, R. Sawa, T. Fujimoto, T. Machinami, A. Ono, Mercury^{II}-mediated formation of thymine-Hg^{II}-thymine base pairs in DNA duplexes, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2172–2173. <https://doi.org/10.1021/ja056354d>.
- [20] X. Zhang, C. Huang, Y. Jiang, Y. Jiang, J. Shen, E. Han, Structure-Switching Electrochemical Aptasensor for Single-Step and Specific Detection of Trace Mercury in Dairy Products, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 10106–10112. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03259>.
- [21] T. Hermann, D.J. Patel, Adaptive recognition by nucleic acid aptamers, *Science* 80 (2000) 820–825. <https://doi.org/10.1126/science.287.5454.820>.
- [22] M. Jarczewska, R. Ziółkowski, L. Górski, E. Malinowska, Electrochemical uranyl cation biosensor with DNA oligonucleotides as receptor layer, *Bioelectrochemistry* 96 (2014) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2013.11.003>.
- [23] D. Datta, X. Meshik, S. Mukherjee, K. Sarkar, M.S. Choi, M. Mazouchi, S. Farid, Y.Y. Wang, P.J. Burke, M. Dutta, M. Dutta, M.A. Strosio, Submillimolar Detection of Adenosine Monophosphate Using Graphene-Based Electrochemical Aptasensor, *IEEE Trans. Nanotechnol.* 16 (2017) 196–202. <https://doi.org/10.1109/TNANO.2016.2647715>.
- [24] S. Cai, J. Yan, H. Xiong, Y. Liu, D. Peng, Z. Liu, Investigations on the interface of nucleic acid aptamers and binding targets, *Analyst* 143 (2018) 5317–5338. <https://doi.org/10.1039/c8an01467a>.
- [25] M. Jarczewska, L. Górski, E. Malinowska, Application of DNA aptamers as sensing layers for electrochemical detection of potassium ions, *Sensors Actuators, B Chem.* 226 (2016) 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.11.139>.
- [26] N. Zhu, X. Liu, K. Peng, H. Cao, M. Yuan, T. Ye, X. Wu, F. Yin, J. Yu, L. Hao, L. Hao, F. Xu, A Novel Aptamer-Imprinted Polymer-Based Electrochemical Biosensor for the Detection of Lead in Aquatic Products, *Molecules* 28 (2023). <https://doi.org/10.3390/molecules28010196>.
- [27] I. Manea, M. Casian, O. Hosu-Stancioiu, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, C. Cristea, A review on magnetic beads-based SELEX technologies: Applications from small to large target molecules, *Anal. Chim. Acta* 1297 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.342325>.
- [28] S.T. Zulaikhah, J. Wahyuwibowo, A.A. Pratama, Mercury and its effect on human health: A review of the literature, *Int. J. Public Heal. Sci.* 9 (2020) 103–114. <https://doi.org/10.11591/ijphs.v9i2.20416>.
- [29] M.P. Rayman, Selenium and human health, *Lancet* 379 (2012) 1256–1268. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61452-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61452-9).
- [30] S. Hassani, A.S. Maghsoudi, M.R. Akmal, S. Rahmani, P. Sarihi, M.R. Ganjali, P. Norouzi, M. Abdollahi, A sensitive aptamer-based biosensor for electrochemical quantification of PSA as a specific diagnostic marker of prostate cancer, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 23 (2020) 243–258. <https://doi.org/10.18433/jpps31171>.
- [31] A. Sharma, T. Hulse, A.H. Qatamin, M. Moreno, K.S. Souza, M.B. Pereira, F.S. Campos, L.B. Carneiro, A.M.H. de Andrade, P.M. Roehe, F. Horowitz, S.B. Mendes, Electrochemically modulated surface plasmon waves for characterization and

- interrogation of DNA-based sensors, *Analyst* 149 (2024) 5821–5831. <https://doi.org/10.1039/d4an01164c>.
- [32] M. Jarczewska, S.R. Sheelam, R. Ziółkowski, L. Górski, A label-free electrochemical DNA aptasensor for the detection of dopamine, *J. Electrochem. Soc.* 163 (2016) B26–B31. <https://doi.org/10.1149/2.0501603jes>.
- [33] Q. Wang, X. Qin, L. Geng, Y. Wang, Label-free electrochemical aptasensor for sensitive detection of malachite green based on au nanoparticle/graphene quantum dots/tungsten disulfide nanocomposites, *Nanomaterials* 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/nano9020229>.
- [34] H. Mahmoudi-Moghaddam, S. Tajik, H. Beitollahi, A new electrochemical DNA biosensor based on modified carbon paste electrode using graphene quantum dots and ionic liquid for determination of topotecan, *Microchem. J.* 150 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104085>.
- [35] R. Ziółkowski, A.B. Olejniczak, L. Górski, J. Janusik, Z.J. Leśnikowski, E. Malinowska, Electrochemical detection of DNA hybridization using metallacarborane unit, *Bioelectrochemistry* 87 (2012) 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.10.005>.
- [36] G. Selvolini, M. Lettieri, L. Tassoni, S. Gastaldello, M. Grillo, C. Maran, G. Marrazza, Electrochemical enzyme-linked oligonucleotide array for aflatoxin B1 detection, *Talanta* 203 (2019) 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.044>.
- [37] R. García-González, A. Costa-García, M.T. Fernández-Abedul, Methylene blue covalently attached to single stranded DNA as electroactive label for potential bioassays, *Sensors Actuators, B Chem.* 191 (2014) 784–790. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.10.037>.
- [38] S. Hajihosseini, N. Nasirizadeh, M.S. Hejazi, P. Yaghmaei, An electrochemical DNA biosensor based on Oracet Blue as a label for detection of *Helicobacter pylori*, *Int. J. Biol. Macromol.* 91 (2016) 911–917. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.009>.
- [39] N. Delshadi-Jahromi, R. Nazari-Vanani, H. Yadegari, N. Sattarahmady, G.R. Hatam, H. Heli, Label-free ultrasensitive electrochemical genosensing of *Trichomonas vaginalis* using anisotropic-shaped gold nanoparticles as a platform, a repeated sequence of the parasite DNA as a probe, and toluidine blue as a redox marker, *Sensors Actuators, B Chem.* 273 (2018) 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.06.051>.
- [40] C. Fan, K.W. Plaxco, A.J. Heeger, Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 9134–9137. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633515100>.
- [41] S.M. Silva, S. Hoque, V.R. Gonçalves, J.J. Gooding, The Impact of the Position of the Redox Label on Charge Transfer and Hybridization Efficiency at DNA Interfaces, *Electroanalysis* 30 (2018) 1529–1535. <https://doi.org/10.1002/elan.201800197>.
- [42] J. Sun, Y. Gan, T. Liang, S. Zhou, X. Wang, H. Wan, P. Wang, Signal enhancement of electrochemical DNA biosensors for the detection of trace heavy metals, *Curr. Opin. Electrochem.* 17 (2019) 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2019.04.007>.
- [43] S. Hajihosseini, N. Nasirizadeh, M.S. Hejazi, P. Yaghmaei, A sensitive DNA biosensor fabricated from gold nanoparticles and graphene oxide on a glassy carbon electrode, *Mater. Sci. Eng. C* 61 (2016) 506–515. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.091>.
- [44] N. Djellouli, M. Rochelet-Dequaire, B. Limoges, M. Druet, P. Brossier, Evaluation of the analytical performances of avidin-modified carbon sensors based on a mediated horseradish peroxidase enzyme label and their application to the amperometric detection of nucleic acids, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2906–2913. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.12.006>.
- [45] R. Miranda-Castro, M.J. Lobo-Castanñón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco,

- Comparative study of hrp, a peroxidase-mimicking dnzyme, and alp as enzyme labels in developing electrochemical genosensors for pathogenic bacteria, *Electroanalysis* 22 (2010) 1297–1305. <https://doi.org/10.1002/elan.200900608>.
- [46] T. Chaibun, J. Puenpa, T. Ngamdee, N. Boonapatcharoen, P. Athamanolap, A.P. O'Mullane, S. Vongpunsawad, Y. Poovorawan, S.Y. Lee, B. Lertanantawong, Rapid electrochemical detection of coronavirus SARS-CoV-2, *Nat. Commun.* 12 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21121-7>.
- [47] Z. Ding, S. Yang, J. Wang, Z. Zhao, H. Xu, Z. Chen, Z. Liu, Y. Wang, J. Bao, K. Chang, K. Chang, M. Chen, Rolling Circle Amplification/G-Quadruplex-Based Dual-Signal Ratiometric Electrochemical Aptasensor for Ultrasensitive Detection of Pathogenic Bacteria, *ChemElectroChem* 10 (2023). <https://doi.org/10.1002/celec.202300257>.
- [48] S. Carinelli, M. Luis-Sunga, J.L. González-Mora, P.A. Salazar-Carballo, Synthesis and Modification of Magnetic Nanoparticles for Biosensing and Bioassay Applications: A Review, *Chemosensors* 11 (2023). <https://doi.org/10.3390/chemosensors11100533>.
- [49] C. Hale, J. Darabi, Magnetophoretic-based microfluidic device for DNA isolation, *Biomicrofluidics* 8 (2014). <https://doi.org/10.1063/1.4893772>.
- [50] S. Rampini, P. Li, D. Gandhi, M. Mutas, Y.F. Ran, M. Carr, G.U. Lee, Design of micromagnetic arrays for on-chip separation of superparamagnetic bead aggregates and detection of a model protein and double-stranded DNA analytes, *Sci. Rep.* 11 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84395-3>.
- [51] P.R. Priya, K.S. Deepak, S.K. Dubey, S. Goel, Nucleic acid purification through nanoarchitectonics: magnetic bead integration with microfluidic chip technology, *J. Micromechanics Microengineering* 34 (2024). <https://doi.org/10.1088/1361-6439/ad6f1d>.
- [52] M. Banakar, M. Hamidi, Z. Khurshid, M.S. Zafar, J. Sapkota, R. Azizian, D. Rokaya, Electrochemical Biosensors for Pathogen Detection: An Updated Review, *Biosensors* 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/bios12110927>.
- [53] D. Verma, K.R. Singh, A.K. Yadav, V. Nayak, J. Singh, P.R. Solanki, R.P. Singh, Internet of things (IoT) in nano-integrated wearable biosensor devices for healthcare applications, *Biosens. Bioelectron.* X 11 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100153>.
- [54] R. Gangwar, K.T. Rao, S. Khatun, A.K. Rengan, C. Subrahmanyam, S.R. Krishna Vanjari, Label-free miniaturized electrochemical nanobiosensor triaging platform for swift identification of the bacterial type, *Anal. Chim. Acta* 1233 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340482>.
- [55] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology, *Chem. Rev.* 105 (2005) 1103–1170. <https://doi.org/10.1021/cr0300789>.
- [56] H.M. Stec, R.A. Hatton, Widely applicable coinage metal window electrodes on flexible polyester substrates applied to organic photovoltaics, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4 (2012) 6013–6020. <https://doi.org/10.1021/am3016763>.
- [57] K. Yamanaka, M.C. Vestergaard, E. Tamiya, Printable electrochemical biosensors: A focus on screen-printed electrodes and their application, *Sensors (Switzerland)* 16 (2016). <https://doi.org/10.3390/s16101761>.
- [58] F. Arduini, L. Micheli, D. Moscone, G. Palleschi, S. Piermarini, F. Ricci, G. Volpe, Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 79 (2016) 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.032>.
- [59] B. Mu, Y. Xu, J. Xu, M.A. Nikitina, U. Zafari, X. Xiao, Inkjet direct printing approach for flexible electronic, *Results Eng.* 14 (2022).

- <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2022.100466>.
- [60] H. Jiang, E.M. Materon, M.D.P.T. Sotomayor, J. Liu, Fast assembly of non-thiolated DNA on gold surface at lower pH, *J. Colloid Interface Sci.* 411 (2013) 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.08.043>.
 - [61] J.I.A. Rashid, N.A. Yusof, The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review, *Sens. Bio-Sensing Res.* 16 (2017) 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2017.09.001>.
 - [62] X. Meng, D. O'Hare, S. Ladame, Surface immobilization strategies for the development of electrochemical nucleic acid sensors, *Biosens. Bioelectron.* 237 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115440>.
 - [63] D. Mandler, I. Turyan, Applications of Self-Assembled Monolayers in Electroanalytical Chemistry, *Electroanalysis* 8 (1996) 207–213. <https://doi.org/10.1002/elan.1140080302>.
 - [64] A. Ulman, Formation and structure of self-assembled monolayers, *Chem. Rev.* 96 (1996) 1533–1554. <https://doi.org/10.1021/cr9502357>.
 - [65] M. Tichoniuk, D. Gwiazdowska, M. Ligaj, M. Filipiak, Electrochemical detection of foodborne pathogen *Aeromonas hydrophila* by DNA hybridization biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1618–1623. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.08.030>.
 - [66] A.B. Steel, R.L. Levicky, T.M. Herne, M.J. Tarlov, Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: Effect of oligonucleotide length on layer assembly, *Biophys. J.* 79 (2000) 975–981. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76351-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76351-X).
 - [67] A.L. Eckermann, D.J. Feld, J.A. Shaw, T.J. Meade, Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers, *Coord. Chem. Rev.* 254 (2010) 1769–1802. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.023>.
 - [68] C. Zhu, G. Yang, H. Li, D. Du, Y. Lin, Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures, *Anal. Chem.* 87 (2015) 230–249. <https://doi.org/10.1021/ac5039863>.
 - [69] E.B. Settingington, E.C. Alocilja, Electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of magnetically extracted bacterial pathogens, *Biosensors* 2 (2012) 15–31. <https://doi.org/10.3390/bios2010015>.
 - [70] H. Modh, T. Scheper, J.-G. Walter, Aptamer-modified magnetic beads in biosensing, *Sensors (Switzerland)* 18 (2018). <https://doi.org/10.3390/s18041041>.
 - [71] S. Ustuner, M.A. Lindsay, P. Estrela, Pre-concentration of microRNAs by LNA-modified magnetic beads for enhancement of electrochemical detection, *Sci. Rep.* 11 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99145-8>.
 - [72] C. Tang, Z. He, H. Liu, Y. Xu, H. Huang, G. Yang, Z. Xiao, S. Li, H. Liu, Y. Deng, H. Chen, N. He, Application of magnetic nanoparticles in nucleic acid detection, *J. Nanobiotechnology* 18 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00613-6>.
 - [73] H. Jiang, Z. Xing, X. Liu, Q. Chai, Z. Xin, C. Zhu, R. Lin, X. Deng, D. Cui, H.D. Gao, H.D. Gao, D. Ma, Comparison and development of a metagenomic next-generation sequencing protocol for combined detection of DNA and RNA pathogens in cerebrospinal fluid, *BMC Infect. Dis.* 22 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07272-y>.
 - [74] Q. Liu, J. Li, H. Liu, I. Tora, M.S. Ide, J. Lu, R.J. Davis, D.L. Green, J.P. Landers, Rapid, cost-effective DNA quantification via a visually-detectable aggregation of superparamagnetic silica-magnetite nanoparticles, *Nano Res.* 7 (2014) 755–764. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0436-9>.
 - [75] T.H. Ali, A.M. Mandal, T. Heidelberg, R.S.D. Hussen, Sugar based cationic magnetic core-shell silica nanoparticles for nucleic acid extraction, *RSC Adv.* 12 (2022) 13566–13579. <https://doi.org/10.1039/d2ra01139e>.
 - [76] M. Psarrou, M. Vamvakaki, K. Karatasos, A.N. Rissanou, Interfacial interactions

- between DNA and polysaccharide-coated magnetic nanoparticles: Insight from simulations and experiments, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 246 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2024.114386>.
- [77] M. Drozd, A. Duszczek, P. Ivanova, M. Pietrzak, Interactions of proteins with metal-based nanoparticles from a point of view of analytical chemistry - Challenges and opportunities, *Adv. Colloid Interface Sci.* 304 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102656>.
- [78] S. Bonaldo, L. Franchin, E. Pasqualotto, E. Cretaio, C. Losasso, A. Peruzzo, A. Paccagnella, Influence of BSA Protein on Electrochemical Response of Genosensors, *IEEE Sens. J.* 23 (2023) 1786–1794. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2022.3230290>.
- [79] M. Drozd, S. Karoń, E. Malinowska, Recent advancements in receptor layer engineering for applications in spr-based immunodiagnosics, *Sensors* 21 (2021). <https://doi.org/10.3390/s21113781>.
- [80] D. Wang, J. Wang, Z. Song, N. Hui, Highly selective and antifouling electrochemical biosensors for sensitive MicroRNA assaying based on conducting polymer polyaniline functionalized with zwitterionic peptide, *Anal. Bioanal. Chem.* 413 (2021) 543–553. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03025-5>.
- [81] Z. Song, R. Han, K. Yu, R. Li, X. Luo, Antifouling strategies for electrochemical sensing in complex biological media, *Microchim. Acta* 191 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00604-024-06218-2>.
- [82] Ç. Sayikli Şimşek, M. Nur Sonuç Karaboğa, M.K. Sezgintürk, A new immobilization procedure for development of an electrochemical immunosensor for parathyroid hormone detection based on gold electrodes modified with 6-mercaptohexanol and silane, *Talanta* 144 (2015) 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.010>.
- [83] S. Campuzano, F. Kuralay, J. Wang, Ternary Monolayer Interfaces for Ultrasensitive and Direct Bioelectronic Detection of Nucleic Acids in Complex Matrices, *Electroanalysis* 24 (2012) 483–493. <https://doi.org/10.1002/elan.201100452>.
- [84] B.L. Hanssen, S. Siraj, D.K.Y. Wong, Recent strategies to minimise fouling in electrochemical detection systems, *Rev. Anal. Chem.* 35 (2016) 1–28. <https://doi.org/10.1515/revac-2015-0008>.
- [85] R. Miranda-Castro, R. Sánchez-Salcedo, B. Suárez-Álvarez, N. de-los-Santos-Álvarez, A.J. Miranda-Ordieres, M. Jesús Lobo-Castañón, Thioaromatic DNA monolayers for target-amplification-free electrochemical sensing of environmental pathogenic bacteria, *Biosens. Bioelectron.* 92 (2017) 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.02.017>.
- [86] G. Chen, W. Chen, L. Xu, H. Jin, W. Sun, J. Lan, F. Wu, X. Zhang, J. Zhang, J. Chen, Sensitive, Highly Stable, and Anti-Fouling Electrode with Hexanethiol and Poly-A Modification for Exosomal microRNA Detection, *Anal. Chem.* 94 (2022) 5382–5391. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c00069>.
- [87] K.L. Wong, J. Liu, Factors and methods to modulate DNA hybridization kinetics, *Biotechnol. J.* 16 (2021). <https://doi.org/10.1002/biot.202000338>.
- [88] L. Sun, K. Frykholm, L.H. Fornander, S. Svedhem, F. Westerlund, B. Åkerman, Sensing conformational changes in DNA upon ligand binding using QCM-D. polyamine condensation and rad51 extension of DNA layers, *J. Phys. Chem. B* 118 (2014) 11895–11904. <https://doi.org/10.1021/jp506733w>.
- [89] X. Gao, B. Sun, Y. Guan, Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 1211–1218. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1552-2>.
- [90] S. Tunçer, R. Gurbanov, I. Sheraj, E. Solel, O. Esenturk, S. Banerjee, Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes, *Sci. Rep.* 8 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33234-z>.

- [91] B. Lv, Y. Dai, J. Liu, Q. Zhuge, D. Li, The Effect of Dimethyl Sulfoxide on Supercoiled DNA Relaxation Catalyzed by Type I Topoisomerases, *Biomed Res. Int.* 2015 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/320490>.
- [92] L. Xu, J. Qi, Y. Wen, W. Liang, L. Wang, Z. Yang, X. Yang, Y. Qi, M. Duan, K. Zhao, L. Li, G. Liu, A polyA DNA probe-based ultra-sensitive and structure-distinguishable electrochemical biosensor for the analysis of RNAi transgenic maize, *Analyst* 146 (2021) 3526–3533. <https://doi.org/10.1039/d1an00313e>.
- [93] N. Tariq, T. Kume, L. Luo, Z. Cai, S. Dong, R.B. Macgregor, Dimethyl sulfoxide (DMSO) is a stabilizing co-solvent for G-quadruplex DNA, *Biophys. Chem.* 282 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106741>.
- [94] N. Dave, J. Liu, Fast molecular beacon hybridization in organic solvents with improved target specificity, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 15694–15699. <https://doi.org/10.1021/jp106754k>.
- [95] G. Zeng, C. Zhang, D. Huang, C. Lai, L. Tang, Y. Zhou, P. Xu, H. Wang, L. Qin, M. Cheng, Practical and regenerable electrochemical aptasensor based on nanoporous gold and thymine-Hg²⁺-thymine base pairs for Hg²⁺ detection, *Biosens. Bioelectron.* 90 (2017) 542–548. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.018>.
- [96] N. Dave, M.Y. Chan, P.-J.J. Huang, B.D. Smith, J. Liu, Regenerable DNA-functionalized hydrogels for ultrasensitive, instrument-free mercury(II) detection and removal in water, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 12668–12673. <https://doi.org/10.1021/ja106098j>.
- [97] F. Long, C. Gao, H.C. Shi, M. He, A.N. Zhu, A.M. Klibanov, A.Z. Gu, Reusable evanescent wave DNA biosensor for rapid, highly sensitive, and selective detection of mercury ions, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4018–4023. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.03.022>.
- [98] S. Sapari, N.H.A. Razak, S.A. Hasbullah, L.Y. Heng, K.F. Chong, L.L. Tan, A regenerable screen-printed voltammetric Hg(II) ion sensor based on tris-thiourea organic chelating ligand grafted graphene nanomaterial, *J. Electroanal. Chem.* 878 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114670>.
- [99] B. Pérez-López, A. Merkoçi, *Electrochemical Genosensors*, 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118684030.ch10>.
- [100] R. Miranda-Castro, N. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, Structured nucleic acid probes for electrochemical devices, *Electroanalysis* 21 (2009) 2077–2090. <https://doi.org/10.1002/elan.200904653>.
- [101] L. Simon, G. Lautner, R.E. Gyurcsányi, Reliable microspotting methodology for peptide-nucleic acid layers with high hybridization efficiency on gold SPR imaging chips, *Anal. Methods* 7 (2015) 6077–6082. <https://doi.org/10.1039/c5ay01239b>.
- [102] A. Saadati, S. Hassanpour, M.D.L. Guardia, J. Mosafar, M. Hashemzaei, A. Mokhtarzadeh, B. Baradaran, Recent advances on application of peptide nucleic acids as a bioreceptor in biosensors development, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 114 (2019) 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.030>.
- [103] L. Zhang, W. Liang, Q. Ran, F. Liu, D. Chen, Y. Xiong, D. Jiang, Y. Li, D. Tu, X. Luo, X. Pu, Y. Wang, Ultrasensitive detection of NDM-1 resistant bacteria based on signal amplification with sandwich-type LNA electrochemical biochips, *Sensors Actuators, B Chem.* 306 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127556>.
- [104] A. Hofer, Z.J. Liu, S. Balasubramanian, Detection, Structure and Function of Modified DNA Bases, *J. Am. Chem. Soc.* 141 (2019) 6420–6429. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b01915>.
- [105] Y. Zhao, K. Yavari, J. Liu, Critical evaluation of aptamer binding for biosensor designs, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 146 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116480>.

- [106] J. Bernard Da Costa, T. Dieckmann, Entropy and Mg^{2+} control ligand affinity and specificity in the malachite green binding RNA aptamer, *Mol. Biosyst.* 7 (2011) 2156–2163. <https://doi.org/10.1039/c1mb05075c>.
- [107] W.-H. Huang, V.-P. Mai, R.-Y. Wu, K.-L. Yeh, R.-J. Yang, A microfluidic aptamer-based sensor for detection of mercury(II) and lead(II) ions in water, *Micromachines* 12 (2021). <https://doi.org/10.3390/mi12111283>.
- [108] S. Diaz-Amaya, L.-K. Lin, R.E. DiNino, C. Ostos, L.A. Stanciu, Inkjet printed electrochemical aptasensor for detection of Hg^{2+} in organic solvents, *Electrochim. Acta* 316 (2019) 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.05.079>.
- [109] L. Wang, F. Liu, N. Sui, M. Liu, W.W. Yu, A colorimetric assay for $\text{Hg}(\text{II})$ based on the use of a magnetic aptamer and a hybridization chain reaction, *Microchim. Acta* 183 (2016) 2855–2860. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1932-2>.
- [110] Q. Li, M. Michaelis, G. Wei, L. Colombi Ciacchi, A novel aptasensor based on single-molecule force spectroscopy for highly sensitive detection of mercury ions, *Analyst* 140 (2015) 5243–5250. <https://doi.org/10.1039/c5an00708a>.
- [111] Y. Liu, Y. Deng, T. Li, Z. Chen, H. Chen, S. Li, H. Liu, Aptamer-based electrochemical biosensor for mercury ions detection using aunps-modified glass carbon electrode, *J. Biomed. Nanotechnol.* 14 (2018) 2156–2161. <https://doi.org/10.1166/jbn.2018.2655>.
- [112] C. Sun, R. Sun, Y. Chen, Y. Tong, J. Zhu, H. Bai, S. Zhang, H. Zheng, H. Ye, Utilization of aptamer-functionalized magnetic beads for highly accurate fluorescent detection of mercury (II) in environment and food, *Sensors Actuators, B Chem.* 255 (2018) 775–780. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.004>.
- [113] H. Abu-Ali, A. Nabok, T.J. Smith, Development of novel and highly specific ssDNA-aptamer-based electrochemical biosensor for rapid detection of mercury (II) and lead (II) ions in water, *Chemosensors* 7 (2019). <https://doi.org/10.3390/chemosensors7020027>.
- [114] X. Zeng, F.S. Zhang, B. Zhu, L. Zhu, Fluorescence Determination of Mercurury(II) Using a Thymine Aptamer, *Anal. Lett.* 48 (2015) 2208–2216. <https://doi.org/10.1080/00032719.2015.1020430>.
- [115] M. Chaghazardi, S. Kashanian, M. Nazari, K. Omidfar, M. Shariati-Rad, Y. Joseph, P. Rahimi, Mercury (II) sensing using a simple turn-on fluorescent graphene oxide based aptasensor in serum and water samples, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 313 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.124057>.
- [116] F. Liu, S. Wang, M. Zhang, Y. Wang, S. Ge, J. Yu, M. Yan, Aptamer based test stripe for ultrasensitive detection of mercury(II) using a phenylene-ethynylene reagent on nanoporous silver as a chemiluminescence reagent, *Microchim. Acta* 181 (2014) 663–670. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1171-3>.
- [117] L. Zhang, J. Liu, M. Gao, L. Han, X. Liu, X. Xing, Fluorescent Determination of Mercury(II) and Glutathione with Binding to Thymine–Guanine Base Pairs, *Anal. Lett.* 56 (2023) 906–916. <https://doi.org/10.1080/00032719.2022.2109044>.
- [118] P.-J.J. Huang, F. Wang, J. Liu, Cleavable Molecular Beacon for Hg^{2+} Detection Based on Phosphorothioate RNA Modifications, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6890–6895. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01362>.
- [119] M.Y. Ho, N. D’Souza, P. Migliorato, Electrochemical aptamer-based sandwich assays for the detection of explosives, *Anal. Chem.* 84 (2012) 4245–4247. <https://doi.org/10.1021/ac300606n>.
- [120] R. Hein, P.D. Beer, J.J. Davis, Electrochemical Anion Sensing: Supramolecular Approaches, *Chem. Rev.* 120 (2020) 1888–1935. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00624>.
- [121] Y. Li, N. Zhu, X. Liang, L. Zheng, C. Zhang, Y.-F. Li, Z. Zhang, Y. Gao, J. Zhao, A comparative study on the accumulation, translocation and transformation of selenite,

- selenate, and SeNPs in a hydroponic-plant system, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 189 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109955>.
- [122] K. Vega-Figueroa, J. Santillán, V. Ortiz-Gómez, E.O. Ortiz-Quiles, B.A. Quinones-Colón, D.A. Castilla-Casadio, J. Almodóvar, M.J. Bayro, J.A. Rodríguez-Martínez, E. Nicolau, Aptamer-Based Impedimetric Assay of Arsenite in Water: Interfacial Properties and Performance, *ACS Omega* 3 (2018) 1437–1444. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01710>.
- [123] J. Li, A. Tyagi, T. Huang, H. Liu, H. Sun, J. You, M.M. Alam, X. Li, Z. Gao, Aptasensors Based on Graphene Field-Effect Transistors for Arsenite Detection, *ACS Appl. Nano Mater.* 5 (2022) 12848–12854. <https://doi.org/10.1021/acsanm.2c02711>.
- [124] Y. Lin, X. Tao, S. Gao, N. Li, Z. Dai, Highly sensitive and stable fluorescent aptasensor based on an exonuclease III-assisted amplification strategy for ATP detection, *Anal. Biochem.* 675 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115210>.
- [125] F. Zhang, P.-J.J. Huang, J. Liu, Sensing Adenosine and ATP by Aptamers and Gold Nanoparticles: Opposite Trends of Color Change from Domination of Target Adsorption Instead of Aptamer Binding, *ACS Sensors* 5 (2020) 2885–2893. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01169>.
- [126] Y. Li, C.R. Geyer, D. Sen, Recognition of anionic porphyrins by DNA aptamers, *Biochemistry* 35 (1996) 6911–6922. <https://doi.org/10.1021/bi960038h>.
- [127] I. Idris, I. Ibrahim, B.A. Umar, Re-emergence of diphtheria in Kano State, Nigeria: Current effort and challenges, *Trop. Doct.* 53 (2023) 403–404. <https://doi.org/10.1177/00494755231170903>.
- [128] S. Shedaiwah, H. Alsharabi, L. Anam, M.A. Al Amad, Risk factors of diphtheria outbreak in damt district of Al Dhalea Governorate, 2023 -Yemen: a case-control study, *BMC Infect. Dis.* 24 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09932-7>.
- [129] Y. Zhao, W. Pérez-Segarra, Q. Shi, A. Wei, Dithiocarbamate assembly on gold, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 7328–7329. <https://doi.org/10.1021/ja050432f>.
- [130] G. Paimard, E. Ghasali, M. Baeza, Screen-Printed Electrodes: Fabrication, Modification, and Biosensing Applications, *Chemosensors* 11 (2023). <https://doi.org/10.3390/chemosensors11020113>.
- [131] N.A.S. Rahim, N.H. Harun, M.R. Abdullah, M.A. Jamilan, B. Kamarudin, A.A. Wahab, S.N. Ibrahim, D.N. Jimat, The optimization of self-assembled monolayer of thiols on screen-printed gold electrode, *Int. J. Adv. Appl. Sci.* 12 (2023) 405–412. <https://doi.org/10.11591/ijaas.v12.i4.pp405-412>.
- [132] A.-R. Siddiqui, J. N'Diaye, A. Santiago-Carboney, K. Martin, R. Bhargava, J. Rodríguez-López, Spectroelectrochemical determination of thiolate self-assembled monolayer adsorptive stability in aqueous and non-aqueous electrolytes, *Analyst* 149 (2024) 2842–2854. <https://doi.org/10.1039/d4an00241e>.
- [133] S.S. Kim, J.H. Min, J.K. Lee, M.H. Baik, J.-W. Choi, H.S. Shin, Effects of pH and anions on the sorption of selenium ions onto magnetite, *J. Environ. Radioact.* 104 (2012) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2011.09.013>.
- [134] N. Gupta, DNA extraction and polymerase chain reaction, *J. Cytol.* 36 (2019) 116–117. https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18.
- [135] P.E. Vandeventer, J.S. Lin, T.J. Zwing, A. Nadim, M.S. Johal, A. Niemz, Multiphasic DNA adsorption to silica surfaces under varying buffer, pH, and ionic strength conditions, *J. Phys. Chem. B* 116 (2012) 5661–5670. <https://doi.org/10.1021/jp3017776>.
- [136] N. Sun, C. Deng, Y. Liu, X. Zhao, Y. Tang, R. Liu, Q. Xia, W. Yan, G. Ge, Optimization of influencing factors of nucleic acid adsorption onto silica-coated magnetic particles: Application to viral nucleic acid extraction from serum, *J. Chromatogr. A* 1325 (2014) 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.11.059>.

Oświadczenie współautorów publikacji

- mgr inż. Anna Szymczyk-Drozd (P1 - P5)
- dr hab. inż. Robert Ziółkowski, prof. PW (P1 - P5)
- prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska (P2, P3, P4, P5)
- dr inż. Krzysztof Różanowski (P1)
- mgr inż. Magdalena Moskal (P1)
- inż. Karolina Soliwodzka (P1)
- prof. dr hab. Aleksandra A. Zasada (P2)
- dr inż. Jakub Krzemiński (P2, P3)
- dr hab. inż. Marcin Olszewski, prof. PW (P3, P4)
- mgr inż. Martyna Popiołek (P3, P4)
- dr hab. inż. Magdalena Matczuk, prof. PW (P5)
- dr inż. Maciej Trzaskowski (P5)

mgr inż. Anna Magdalena Szymczyk-Drozd

Warszawa, 12.03.2025

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

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że pracach:

1. „International Journal of Molecular Sciences, A. Szymczyk, M. Drozd, A. Kamińska, M. Matczuk, M. Trzaskowski, M. Mazurkiewicz-Pawlicka, R. Ziółkowski, E. Malinowska, 2022, 23(16), 8860, DOI: 10.3390/ijms23168860”

Mój wkład pracy polegał na współudziale przy zaplanowaniu koncepcji i metodyki badawczej umożliwiającej ilościowe określenie procesów adsorpcji i desorpcji DNA z powierzchni nanocząstek, pomocy przy syntezie wszystkich typów powierzchniowo modyfikowanych nanocząstek magnetycznych oraz przeprowadziłam badania ich oddziaływań z DNA, jak również scharakteryzowałam nanocząstki za pomocą technik optycznych oraz dokonałam interpretacji uzyskanych wyników. Przygotowałam wizualizacje uzyskanych danych, jak również przygotowaniu manuskryptu oraz przeprowadzeniu dodatkowych badań i uzupełnienia treści w ramach odpowiedzi na recenzję.

2. „Sensors and Actuators B: Chemical, A. Szymczyk, K. Soliwodzka, M. Moskał, K. Różanowski, R. Ziółkowski, 2021, 354, 131086; DOI: 10.1016/j.snb.2021.131086”

Mój wkład pracy polegał na współudziale przy zaplanowaniu koncepcji badawczej, opracowaniu procedury pomiarowej, przeprowadzeniu badań literaturowych na potrzeby selekcji substancji mogących mieć zastosowanie jako środki blokujące elektrodę, przeprowadzeniu badań doświadczalnych za pomocą technik elektrochemicznych i z użyciem mikrowagi kwarcowej. Dokonałam także wstępnej interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowałam wizualizacje uzyskanych danych, a także przygotowałam pierwszą wersję manuskryptu oraz brałam aktywny udział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzję (poprzez realizację doświadczeń QCM jak i przygotowywanie rewizji manuskryptu).

3. „Measurement, A. Szymczyk-Drozd, D. Baran, A. Skiba, A. Zasada, E. Mosiej, J. Krzemiński, A. Peptowski, E. Malinowska, R. Ziółkowski, 2025, 250, 117212, DOI:10.1016/j.measurement.2025.117212.”

Mój wkład pracy polegał na współudziale przy zaplanowaniu koncepcji badań, przeprowadziłam główną część badań elektrochemicznych, obejmowały one przygotowanie i scharakteryzowanie biosensorów DNA na bazie elektrod złotych i cienkowarstwowych PVD, dobór sekwencji sond, obrazowanie SEM i za pomocą mikroskopu konfokalnego badanych przetworników miniaturowych. Dokonałam także interpretacji uzyskanych wyników, przygotowałam wizualizacje uzyskanych danych oraz pierwszą wersję manuskryptu jak również brałam kluczowy udział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzję poprzez przygotowywanie rewizji manuskryptu).

A.M.D

4. „Microchimica Acta, A. Szymczyk, M. Popiołek, J. Krzemiński, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, 2024, 191(4), 189, DOI:10.1007/s00604-024-06272-w”

Mój wkład pracy polegał na współudziale przy zaplanowaniu koncepcji badań oraz realizacji większości doświadczeń- w szczególności obejmowały one przygotowanie i scharakteryzowanie serii biosensorów DNA na bazie elektrod złotych dyskowych i cienkowarstwowych przetwornikach PVD, w tym opracowanie warunków pomiarowych (skład i pH medium pomiarowego, skład warstwy receptorowej) wykonanie pomiarów elektrochemicznych, QCM-D oraz spektroelektrochemicznych. Dokonałam także wstępnej interpretacji uzyskanych wyników pod kątem badanego mechanizmu generowania sygnału oraz przygotowałam wizualizacje uzyskanych danych oraz przygotowałam również pierwszą wersję manuskryptu, jak również brałam kluczowy udział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzję (poprzez realizację doświadczeń jak i przygotowywanie rewizji manuskryptu).

5. „International Journal of Molecular Sciences, A. Szymczyk, M. Popiołek, D. Baran, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, 2024, 25(12), 6660, DOI: 10.3390/ijms25126660”

Mój wkład pracy polegał na współudziale przy zaplanowaniu koncepcji badań, przeprowadziłam główną część badań elektrochemicznych i wyznaczyłam na ich podstawie m. in. podstawowe parametry analityczne opracowanego aptasensora. Przygotowałam, także grafiki i wykresy na potrzeby opracowanego manuskryptu jak również przygotowałam draftu artykułu oraz brałam aktywny udział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzję (poprzez realizację doświadczeń jak i przygotowywanie rewizji manuskryptu).

Anna Szymczyk -Drozd

dr hab. inż. Robert Ziółkowski, prof. PW

Warszawa, 12.03.2025

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

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

1. „International Journal of Molecular Sciences, A. Szymczyk, M. Drozd, A. Kamińska, M. Matczuk, M. Trzaskowski, M. Mazurkiewicz-Pawlicka, R. Ziółkowski, E. Malinowska, 2022, 23(16), 8860, DOI: 10.3390/ijms23168860”

Mój wkład pracy polegał na opiece merytorycznej, na współudziale przy zaplanowaniu koncepcji badań, ich realizacji oraz analizie uzyskanych wyników, a także współredagowaniu manuskryptu i późniejszej odpowiedzi na recenzje oraz korespondencji z edytorem i przygotowaniu publikacji do druku (tzw. przygotowaniu „corrected proof”). Pozyskałem finansowanie na realizację badań (kierownictwo grantu IDUB against COVID-19).

2. „Sensors and Actuators B: Chemical, A. Szymczyk, K. Soliwodzka, M. Moskał, K. Różanowski, R. Ziółkowski, 2021, 354, 131086; DOI: 10.1016/j.snb.2021.131086”

Mój wkład pracy polegał na opiece merytorycznej, na współudziale przy zaplanowaniu koncepcji badań, ich realizacji oraz analizie uzyskanych wyników, a także współredagowaniu manuskryptu i późniejszej odpowiedzi na recenzje oraz korespondencji z edytorem i przygotowaniu publikacji do druku (tzw. przygotowaniu „corrected proof”). Pozyskałem finansowanie na realizację badań (kierownictwo grantu IDUB against COVID-19).

3. „Measurement, A. Szymczyk-Drozd, D. Baran, A. Skiba, A. Zasada, E. Mosiej, J. Krzemiński, A. Peptowski, E. Malinowska, R. Ziółkowski, 2025, 250, 117212, DOI:10.1016/j.measurement.2025.117212.”

Mój wkład pracy polegał na opiece merytorycznej, na współudziale przy zaplanowaniu koncepcji badań, ich realizacji oraz analizie uzyskanych wyników, a także współredagowaniu manuskryptu i późniejszej odpowiedzi na recenzje oraz korespondencji z edytorem i przygotowaniu publikacji do druku (tzw. przygotowaniu „corrected proof”). Pozyskałem finansowanie na realizację badań (kierownictwo grantu IDUB Lider POB BIB).

4. „Microchimica Acta, A. Szymczyk, M. Popiołek, J. Krzemiński, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, 2024, 191(4), 189, DOI:10.1007/s00604-024-06272-w”

Mój wkład pracy polegał na opiece merytorycznej, na współudziale przy zaplanowaniu koncepcji badań, ich realizacji oraz analizie uzyskanych wyników, a także współtworzeniu manuskryptów i późniejszej odpowiedzi na recenzje oraz przygotowaniu publikacji do druku (tzw. przygotowaniu „corrected proof”).

Robert Ziółkowski

5. „International Journal of Molecular Sciences, A. Szymczyk, M. Popiótek, D. Baran, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, 2024, 25(12), 6660, DOI: 10.3390/ijms25126660”

Mój wkład pracy polegał na opiece merytorycznej, na współudziale przy zaplanowaniu koncepcji badań, ich realizacji oraz analizie uzyskanych wyników, a także współredagowaniu manuskryptu i późniejszej odpowiedzi na recenzje oraz korespondencji z edytorem i przygotowaniu publikacji do druku (tzw. przygotowaniu „corrected proof”).

Prof. Dr hab. E. Malinowska

prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska

Warszawa, 12.03.2025

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

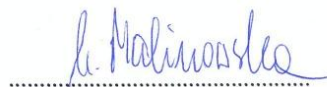
Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii CEZAMAT
ul. Poleczki 19, 02-822 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że pracach:

1. „International Journal of Molecular Sciences, A. Szymczyk, M. Drozd, A. Kamińska, M. Matczuk, M. Trzaskowski, M. Mazurkiewicz-Pawlicka, R. Ziótkowski, E. Malinowska, 2022, 23(16), 8860, DOI: 10.3390/ijms23168860”
2. „Measurement, A. Szymczyk-Drozd, D. Baran, A. Skiba, A. Zasada, E. Mosiej, J. Krzemiński, A. Peptowski, E. Malinowska, R. Ziótkowski, 2025, 250, 117212, DOI:10.1016/j.measurement.2025.117212.”
3. „Microchimica Acta, A. Szymczyk, M. Popiołek, J. Krzemiński, M. Olszewski, R. Ziótkowski, E. Malinowska, 2024, 191(4), 189, DOI:10.1007/s00604-024-06272-w”
4. „International Journal of Molecular Sciences, A. Szymczyk, M. Popiołek, D. Baran, M. Olszewski, R. Ziótkowski, E. Malinowska, 2024, 25(12), 6660, DOI: 10.3390/ijms25126660”

Mój wkład pracy polegał na konsultacjach w trakcie prowadzenia badań oraz współuczestniczeniu w finalnym przygotowaniu publikacji do druku (tzw. przygotowaniu „corrected proof”).



dr inż. Krzysztof Różanowski

Warszawa, dn. 25.02.2025 r.

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. „Sensors and Actuators B: Chemical, A. Szymczyk, K. Soliwodzka, M. Moskal, K. Różanowski, R. Ziółkowski, 2021, 354, 131086; DOI: 10.1016/j.snb.2021.131086”

Mój wkład pracy polegał na przygotowaniu części rysunków wchodzących w zakres materiału publikacyjnego.



mgr inż. Magdalena Moskal

Warszawa, dn. 25.02.2025 r.

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. „Sensors and Actuators B: Chemical, A. Szymczyk, K. Soliwodzka, M. Moskal, K. Różanowski, R. Ziółkowski, 2021, 354, 131086; DOI: 10.1016/j.snb.2021.131086”

Mój wkład pracy polegał na wykonaniu niezbędnych roztworów i próbek oraz wykonaniu wstępnych pomiarów elektrochemicznych, wchodzących w zakres materiału publikacyjnego, a wykonywanych w ramach mojej pracy inżynierskiej (pod opieką prof. Ziółkowskiego).

Magdalena Moskal

inż. Karolina Soliwodzka

Warszawa, dn. 25.02.2025 r.

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. „Sensors and Actuators B: Chemical, A. Szymczyk, K. Soliwodzka, M. Moskal, K. Różanowski, R. Ziótkowski, 2021, 354, 131086; DOI: 10.1016/j.snb.2021.131086”

Mój wkład pracy polegał na wykonaniu niezbędnych roztworów i próbek oraz wykonaniu wstępnych pomiarów elektrochemicznych, wchodzących w zakres materiału publikacyjnego, a wykonywanych w ramach mojej pracy inżynierskiej (pod opieką prof. Ziótkowskiego).

Soliwodzka

prof. dr hab. Aleksandra A. Zasada

Warszawa, 11.03.2025

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH
Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Badania Surowic i Szczepionek
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. „Measurement, A. Szymczyk-Drozd, D. Baran, A. Skiba, A. Zasada, E. Mosiej, J.Krzemiński, A. Peptowski, E. Malinowska, R. Ziółkowski, 2025, 250, 117212, DOI:10.1016/j.measurement.2025.117212.”

Mój wkład pracy polegał na przygotowaniu próbek rzeczywistych w postaci produktów łańcuchowej reakcji polimerazy podlegającym analizom oraz wsparciu podczas przygotowania manuskryptu w części poświęconej próbkom rzeczywistym.

Elektronicznie podpisany
przez Aleksandra Anna Zasada
Data: 2025.03.11 11:36:12
+01'00'

dr inż. Jakub Krzemiński

Warszawa, 11.03.2025

Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii CEZAMAT
ul. Poleczki 19, 02-822 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

1. „Microchimica Acta, A. Szymczyk, M. Popiołek, J. Krzemiński, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, 2024, 191(4), 189, DOI:10.1007/s00604-024-06272-w”
2. „Measurement, A. Szymczyk-Drozd, D. Baran, A. Skiba, A. Zasada, E. Mosiej, J. Krzemiński, A. Peptowski, E. Malinowska, R. Ziółkowski, 2025, 250, 117212, DOI:10.1016/j.measurement.2025.117212.”

Mój wkład pracy polegał wytworzeniu przetworników miniaturowych i przygotowaniu opisu dotyczącego ich wykonania w manuskrypcie.



Warszawa, 26.02.2025

dr hab. inż. Marcin Olszewski, prof. PW

Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków

Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

ul. Koszykowa 75, 00-662 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

1. „Microchimica Acta, A. Szymczyk, M. Popiołek, J. Krzemiński, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, 2024, 191(4), 189, DOI:10.1007/s00604-024-06272-w”
2. „International Journal of Molecular Sciences, A. Szymczyk, M. Popiołek, D. Baran, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, 2024, 25(12), 6660, DOI: 10.3390/ijms25126660”

Mój wkład pracy polegał na konsultacjach w trakcie prowadzenia badań, współuczestniczeniu w finalnym przygotowaniu publikacji do druku oraz pozyskaniu finansowania na realizację badań (kierownictwo grantu Techmastrateg III - Astacus).


.....

mgr inż. Martyna Popiótek

Warszawa, 26.02.2025

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

1. „Microchimica Acta, A. Szymczyk, M. Popiótek, J. Krzemiński, M. Olszewski, R. Ziótkowski, E. Malinowska, 2024, 191(4), 189, DOI:10.1007/s00604-024-06272-w”
2. „International Journal of Molecular Sciences, A. Szymczyk, M. Popiótek, D. Baran, M. Olszewski, R. Ziótkowski, E. Malinowska, 2024, 25(12), 6660, DOI: 10.3390/ijms25126660”

Mój wkład pracy polegał na przygotowaniu niezbędnych roztworów i próbek oraz wykonaniu części pomiarów elektrochemicznych, wchodzących w zakres materiału publikacyjnego, a wykonywanych m.in. w ramach mojej pracy inżynierskiej (pod opieką prof. Ziótkowskiego).



dr hab. inż. Magdalena Matczuk, prof. PW

Warszawa, 26.02.2025

Katedra Analityki Chemicznej
Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
ul. S. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. „International Journal of Molecular Sciences, A. Szymczyk, M. Drozd, A. Kamińska, M. Matczuk, M. Trzaskowski, M. Mazurkiewicz-Pawlicka, R. Ziótkowski, E. Malinowska, 2022, 23(16), 8860, DOI: 10.3390/ijms23168860”

Mój wkład pracy polegał na przeprowadzeniu analiz ICP-MS/MS i analiz elementarnych oraz przygotowaniu krótkich fragmentów pierwotnej wersji manuskryptu (opisu eksperymentów oraz analizy wyników) bezpośrednio dotyczących ww. badań.

Magdalena Matczuk
.....

dr inż. Maciej Trzaskowski

Warszawa, 26.02.2025

Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii CEZAMAT
ul. Poleczki 19, 02-822 Warszawa

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. „International Journal of Molecular Sciences, A. Szymczyk, M. Drozd, A. Kamińska, M. Matczuk, M. Trzaskowski, M. Mazurkiewicz-Pawlicka, R. Ziótkowski, E. Malinowska, 2022, 23(16), 8860, DOI: 10.3390/ijms23168860”

Mój wkład pracy polegał na wykonaniu obrazowania STEM oraz przygotowaniu krótkich fragmentów pierwotnej wersji manuskryptu (opisu eksperymentów oraz analizy wyników) bezpośrednio dotyczących ww. badań.



Cykl publikacji stanowiących Rozprawę Doktorską

Publikacja P1: Further insight into the possible influence of electrode blocking agents on the stem loop based electrochemical DNA sensor parameters

dostęp do publikacji:

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131086>

Publikacja P2: Practical Aspects of SAM-Based Electrochemical DNA Biosensors on Miniaturized Planar Gold Transducers: A Case Study with SARS-CoV-2

dostęp do publikacji:

<https://doi.org/10.1016/j.measurement.2025.117212>

Publikacja P3: Identification of medium- and mechanism-related pitfalls towards improved performance and applicability of electrochemical mercury(II) aptasensors

dostęp do publikacji:

<https://doi.org/10.1007/s00604-024-06272-w>

Publikacja P4: Aptamer and Electrochemical Aptasensor towards Selenate Ions (SeO_4^{2-})



Article

Aptamer and Electrochemical Aptasensor towards Selenate Ions (SeO_4^{2-})

Anna Szymczyk ^{1,2}, Martyna Popiolek ¹, Dominika Baran ¹, Marcin Olszewski ³, Robert Ziolkowski ^{1,*} and Elżbieta Malinowska ^{1,4}

¹ Chair of Medical Biotechnology, Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, Stanisława Noakowskiego 3, 00-664 Warsaw, Poland; anna.szymczyk.dokt@pw.edu.pl (A.S.); martyna.popiolek.stud@pw.edu.pl (M.P.); dominika.baran2.stud@pw.edu.pl (D.B.); elzbieta.malinowska@pw.edu.pl (E.M.)

² Doctoral School, Warsaw University of Technology, Plac Politechniki 1, 00-661 Warsaw, Poland

³ Chair of Drug and Cosmetics Biotechnology, Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, Koszykowa 75, 00-664 Warsaw, Poland; marcin.olszewski@pw.edu.pl

⁴ Centre for Advanced Materials and Technologies CEZAMAT, Warsaw University of Technology, Poleczki 19, 02-822 Warsaw, Poland

* Correspondence: robert.ziolkowski@pw.edu.pl

Abstract: Selenium is an essential inorganic compound in human and animal nutrition, involved in the proper functioning of the body. As a micronutrient, it actively contributes to the regulation of various metabolic activities, i.e., thyroid hormone, and protection against oxidative stress. However, Se exhibits a narrow concentration window between having a positive effect and exerting a toxic effect. In higher doses, it negatively affects living organisms and causes DNA damage through the formation of free radicals. Increased reactivity of Se anions can also disrupt the integrity and function of DNA-repairing proteins. As the permissible concentration of Se in drinking water is 10 µg/L, it is vital to develop sensitive and robust methods of Se detection in aqueous samples. In this study, for the first time, we proposed a selective aptamer for selenate ion detection, chosen following the SELEX process, and its application in the construction of an electrochemical aptasensor towards SeO_4^{2-} ions. Measurement conditions such as the used redox marker and pH value of the measurement solution were chosen. The proposed aptasensor is characterized by good selectivity and an LOD of 1 nM. Conditions for biosensor regeneration and storage were also investigated in this research.

Keywords: aptamer; selenate ion; electrochemistry; aptasensor; methylene blue



Citation: Szymczyk, A.; Popiolek, M.; Baran, D.; Olszewski, M.; Ziolkowski, R.; Malinowska, E. Aptamer and Electrochemical Aptasensor towards Selenate Ions (SeO_4^{2-}). *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 6660. <https://doi.org/10.3390/ijms25126660>

Academic Editor: Ryszard Lobinski

Received: 25 May 2024

Revised: 13 June 2024

Accepted: 16 June 2024

Published: 17 June 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Selenium exists in all the components of the environment, including rocks, soil, plants, and water. Wastewater discharged from mining, petrochemical agricultural, or metallurgical activities contributes to elevated Se levels in groundwater, which can quickly reach levels toxic to fish and wildlife [1]. Selenium can be found in four different oxidation states as elemental selenium Se(0), as selenide Se(-II) in organic form and in inorganic forms as oxyanions, selenite (SeO_3^{2-}) (-IV) and selenate (SeO_4^{2-}) (-VI). Inorganic forms of selenium species are considered more toxic than their organic forms due to substantially better water solubility and environmental mobility [2]. Selenite Se(IV) is known as the most toxic and selenate Se(VI) as the most bioavailable and soluble compound in the oxidizing environment [2,3]. However, because of its high capacity for bioaccumulation, the substantial harmfulness of selenate anions is also described [4,5].

For the speciation analysis and determination of anionic selenium forms in water, many spectroscopic techniques have been developed, including inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [6–8], inductively coupled plasma optical emission spectroscopy

(ICP-OES) [9], hydride generation atomic absorption spectrometry (HGAAS) [10,11], nuclear magnetic resonance imaging (NMRI) [12], neutron activation analysis [13] and fluorimetry [14]. Separation techniques such as high-performance liquid chromatography (HPLC) [15], solid-phase extraction (SPE) [16], ion-exchange chromatography (IEC) [17] and capillary electrophoresis [18] have also been employed to improve the performance of the existing selenium detection methods. Unfortunately, a laboratory equipped with expensive analytical devices is indispensable for carrying out such analyses and labor-intensive sample preparation. These methods are also time-consuming and require highly trained personnel.

An alternative to the approaches mentioned above is the employment of electrochemical techniques, which are characterized by simplicity, high sensitivity, and the capacity of miniaturization for on-site applications. To date, stripping voltammetry with the use of modified solid electrodes has been the most widely used approach. Various electrode modifiers, including mercury films [19], boron-doped gold modification of diamond electrodes [20] as well as direct detection with platinum and gold electrodes, microband electrode array [21] and a rotating gold electrode [22], have typically been employed for Se determination. Also, the use of nanomaterials opens up new possibilities in the detection of selenium anions. For this purpose, nitrogen-doped graphene [23], reduced graphene oxide [24], Au/ZnO-nanocomposite-decorated ITO electrodes [25], poly(1-aminoanthraquinone)/multiwall carbon nanotubes [26] and Mn_3O_4 -chitosan nanocomposite [27] have been used. The methods mentioned above offered the possibility of determination at satisfactorily low concentration levels, i.e., below $10 \mu\text{g/L}$ (WHO limit [28]). However, the selectivity of voltametric methods can often be unsatisfactory. Therefore, it is desirable to develop electrochemical sensors with enhanced selectivity, e.g., by designing and introducing selective bioreceptors with an affinity for selenium species. Only a few such attempts have been described in the literature [29,30]. One of them is the approach proposed by Motlagh et al., who developed an enzymatic gold nanodendrite biosensor. Selenate reductase immobilized on the electrode surface reduces selenate to selenite ion, which, as an electroactive compound [31], is then detectable by CV and DPV voltammetry [29]. A similar approach is described by the same author in [30], where, instead of a pure enzyme, the bacterial strains capable of selenate reduction were used. A different approach in biosensor development, instead of reaction catalyzed by specific enzymes, is the use of receptors that express high affinity toward a given analyte, selenate ion (SeO_4^{2-}), and its subsequent binding in the receptor layer. One example of such receptors is nucleic acid strands or, more specifically, selected sequences of nucleic acids, called aptamers. Thanks to the abundance of DNA nucleotide functional groups as aptamer building blocks, aptamers can interact according to various mechanisms with a wide range of targets, including small molecules such as inorganic anions. Another advantage of oligonucleotide receptors is the possibility of their design and synthesis *in vitro*, opposite to protein receptors, and their activity insensitivity even toward toxic compounds. Moreover, analyte-triggered conformational changes can be a source of analytical signal, which opens vast possibilities for the employment of aptamers in various detection strategies, including electrochemical detection. Despite the apparent advantages of aptamers as molecular receptors, the design of aptasensors for selenate (SeO_4^{2-}) anions has not yet been described. This may be explained by the fact that the selection of aptamers for ions and small molecules is challenging. The small molecular weight of such targets and a huge difference in size in comparison to the oligonucleotides significantly hinder the SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) process. Particular difficulties arise at the step of the separation of unbound DNA sequences from target–aptamer complexes that differ only slightly in mass and general properties [32]. Another challenge in the selection of aptamers for small molecules is the lack of epitopes or functional groups available for strong aptamer binding and the same lower affinity of the aptamers to small target molecules in comparison to larger analytes [33]. Nevertheless, after the identification of the above hindrances, there are also several approaches to solving such problems (e.g., reversible aptamer candidate

immobilization on magnetic nanoparticles, which increases the efficiency of the separation of unbound nucleic acid strands) [32] and allowing for the selection of new aptamers offering high affinity toward ions.

In this study, for the first time, we report the sequence of DNA aptamer as novel receptors towards SeO_4^{2-} ion, chosen following the SELEX process, and we describe their introduction for the construction of an electrochemical aptasensor towards selenate ion. The developed biosensor allows for the direct detection of selenate ions in aqueous samples. We believe that the high selectivity and sensitivity of the developed aptasensor are determined by the high-affinity aptamer to the given selenium ion, as well as the proposed detection strategy based on the use of methylene blue (MB) as an electrochemical redox marker. The performed studies also cover the optimization of the sensing conditions, with a focus on the selection of measurement medium composition suitable for the detection of the biosensor response. Conditions for biosensor regeneration and storage were also investigated.

2. Results and Discussion

To date, several aptamers toward inorganic ions and electrochemical aptasensors using such aptamers within receptor layers have been described [34–36]. This included mercury (Hg^{2+}), lead (Pb^{2+}), potassium (K^+), uranyl (UO_2^{2+}), silver (Ag^+) or cadmium (Cd^{2+}). In all cases, the interactions between the given ion and ssDNA aptamer(s) resulted in its binding and retention in the biosensing layer. Several proven mechanisms are responsible for this, including G-quadruplex stabilization by Pb^{2+} and K^+ [37], cytosine–cytosine mismatch stabilization by Ag^+ [38], covalent bond formation between thymine- and guanine-rich probes and Cd^{2+} [39], coordinate bond formation between the phosphate backbone and UO_2^{2+} [40], and thymine–thymine mismatch stabilization by Hg^{2+} [41]. In spite of the above, the standard procedure for new aptamer selection involves obtaining a pool of nucleic acid sequences of increasing affinity toward a given analyte in subsequent rounds (between 6 to 12) [42]. The above procedure, however, was developed for proteins, which, compared to inorganic ions, are analytes of rather sizable dimensions, 1–100 nm [43] and 0.027–0.3 nm [44], respectively. To be able to obtain aptamer sequences for such small analytes as inorganic ions, the VENNMultiplex™ mode of SELEX can be used [45]. In the presented studies, the aptamer selection process, consisting of 12 rounds, allowed for defining a sequence of high specificity towards SeO_4^{2-} ions. It was, however, necessary to further prove that this sequence could be used in the biosensor layer of the electrochemical aptasensor as a receptor towards selenate ions. The biosensor construction was based on a typical self-assembled monolayer setup [46]. In order to be able to immobilize the investigated aptamer on the gold disc electrode surface, it was modified with a thiol group. After its deposition on the gold substrate, the blocking 6-mercapto-1-hexanol was immobilized to cover the electrode area not occupied by ssDNA [46,47]. For electrochemical signal generation, the redox marker was used, freely available in the solution. The mechanism of detection of the developed electrochemical aptasensor, confirmed during the presented studies, is shown in Figure 1, together with the equation for biosensor response calculation.

Briefly, as the redox indicator (the only electroactive compound in the used potential range, approximately from -0.2 to 0.8 V) is freely available in the sample, the electrochemical biosensor response will depend on the change in the efficiency of its oxidation or reduction. This efficiency, in turn, depends on the possibility and easiness of reaching the electrode surface. As it changes together with binding the analyte by the receptor layer, the observed changes in redox current are translated into the biosensor response (Figure 1). In the presented studies, ultimately, the cationic marker, methylene blue, was chosen, and the observed tendency in redox current changes is shown in Figure 1. However, as several such indicators are available, which differ in structure and charge and share a mechanism of interaction with DNA strands, this ultimately translates into smaller or larger changes in redox reaction efficiency triggered by binding of the analyte (e.g., selenate ion) by the receptor layer; initially two such indicators were investigated as the source of the signal for the biosensor response [46]. These were (i) methylene blue, an aromatic

compound exhibiting a positive charge, and (ii) an equimolar mix of ferro-/ferricyanide with a negative charge. Moreover, the evaluation of the biosensor response registered for such different redox markers may point to its source.

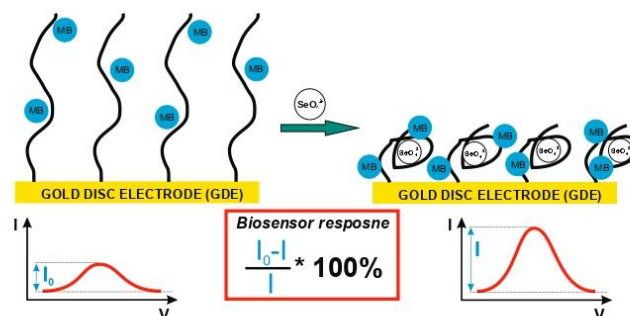


Figure 1. Schematic illustration of the biosensor response mechanism and the equation used for biosensor response calculation.

The initial experiments were conducted at pH 7.0 (Figure 2), which is optimal for DNA strands [48,49] and has a negligible influence on the selenate ion [50]. It should be remembered that depending on the medium composition and properties (e.g., pH), the analyzed ion could be present in a different form than initially assumed. One of the best examples of the measurement environment's influence on the form of analyzed anion, and the same on the obtained results, could be mercury ion (Hg^{2+}) [51–53], where, depending on medium pH and its composition, mercury could be present as HgCl_2 , $\text{Hg}(\text{OH})_2$, HgClOH , HgOHCO_3^- , or complexed by the components of the measurement solution [52]. Luckily, selenate anions (SeO_4^{2-}) are quite stable across a broad pH range (pH between 3.5 and 14.0). Only below pH 3.0 is it protonated and changes into HSeO_4^- [50]. Similar changes could also be observed for the receptor layer. DNA molecules are stable in the pH range from 4.0 to 9.0 [48,49], but in more extreme values, they are susceptible to pH-dependent destabilization. Below pH 3.5, DNA loses purine bases (adenine and guanine) in the so-called depurination process, and below pH 2.0, it also loses its polyanionic character due to the protonation of the phosphate backbone [48,49,54]. In turn, for pH higher than 9.0, dsDNA is prone to alkaline denaturation due to the abundance of hydroxide ions, which break the hydrogen bonds between DNA strands (remove hydrogen ions from the base pairs of DNA). Nonetheless, as can be seen in Figure 2, the biosensor response at pH 7.0 toward selenate ion (calculated according to the equation presented in Figure 1) was obtained only when methylene blue was used as the redox marker (square wave voltammetry anodic or cathodic scans were chosen based on higher current changes).

This might result from the electrostatic interactions present in the receptor layer. In the case of the cationic redox marker (methylene blue), its attraction by a negatively charged phosphate DNA backbone moves the net receptor layer charge toward being more positive, which may make the selenate anions approach the electrode surface. However, binding SeO_4^{2-} by aptamer strands and its retention in the biosensing layer should diminish the current registered for the aptasensor after the recognition process due to the formation of possible steric hindrances for redox markers approaching the electrode surface [55], which were not observed to increase, as shown in Figure 2. Nonetheless, in the literature, there are also several examples of electrochemical signal increase after analyte binding by the receptor layer [56,57]. Similarly to these reports, we conclude (which is also pictured in Figure 1) that the change in spatial aptamer shape after selenate ion binding leads to more space in the receptor layer for the redox marker to approach the electrode surface. We also conclude that because of exactly the same electrostatic hindrances, no aptasensor response was registered when the anionic redox marker, equimolar mix of ferro-/ferricyanide,

was used (even for substantially higher selenate ion concentration, 100 μM , compared to assays with methylene blue, 1–12 μM). As described above, the electrostatic mechanism of attraction or repulsion of the investigated redox marker could also be confirmed by increased reversibility of registered redox reaction after SeO_4^{2-} ion binding by the receptor layer (ΔE changes from 54 to 38 mV); see Figure 3.

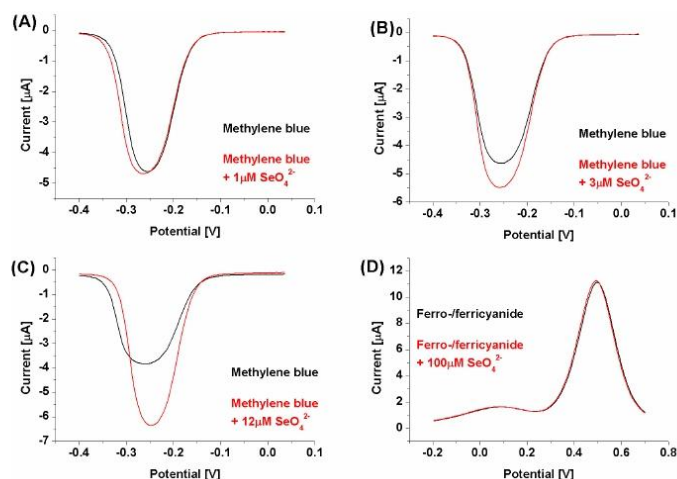


Figure 2. SWV voltammograms. (A–C): Biosensor response registered with methylene blue as a redox marker with an increasing selenate ion concentration (from 1 to 12 μM); (D): biosensor response registered with ferro-/ferricyanide as a redox marker with a selenate ion concentration of 100 μM .

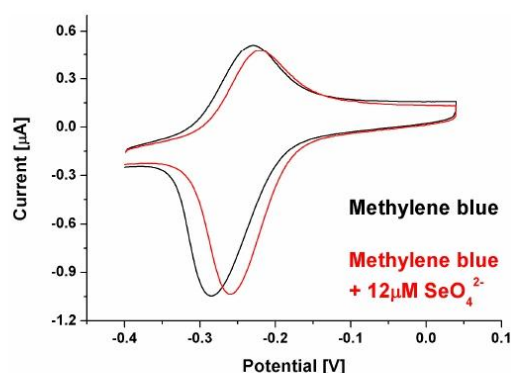


Figure 3. CV voltammogram for biosensor response registered with methylene blue as a redox marker with a selenate ion concentration of 12 μM .

Because of the registered aptasensor response for selenate ion in an assay with methylene blue as a redox marker, we evaluated the biosensor response for a given concentration range of selenate ion (Figure 4).

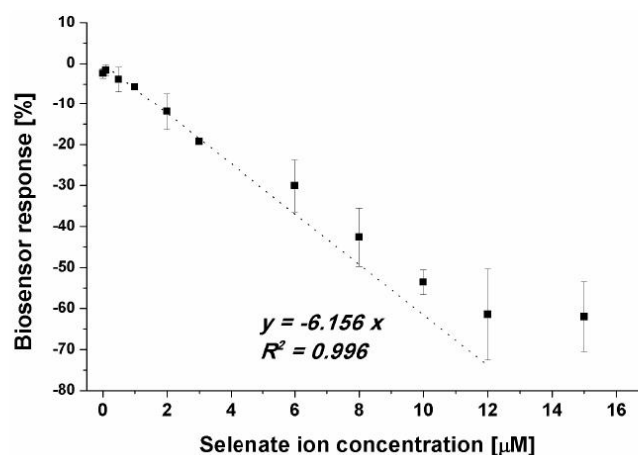


Figure 4. Dependency between selenate ion concentration and calculated biosensor response (result obtained for SWV experiments, $n = 4$).

Although it was possible to observe the dependency between the biosensor response and SeO_4^{2-} concentration in the sample (Figure 4), the obtained LOD at the level of $1 \mu\text{M}$ (linear range from 1 to $12 \mu\text{M}$) was not satisfactory as the limit for selenium presence in water samples specified by the WHO is at the level of $10 \mu\text{g/L}$ [28], which gives approximately $0.127 \mu\text{M}$. As the specified WHO limit and the obtained LOD differ by 10-fold, an attempt was made to lower the detection limit. Based on the above results, we attempted to move the overall receptor layer charge toward more positive, which should increase the efficiency in SeO_4^{2-} anion approximation to the electrode surface. In the presented studies, it was realized by lowering the pH of the measurement medium to pH 4.0. Such a change results in the protonation of the last element of the receptor layer, 6-mercapto-1-hexanol, which, at higher pH values, exhibits a partially negative charge (originating from $-\text{OH}$ moieties) and is protonated near pH 5.0 [58]. As was already stated, the selenate ion is stable in the broad pH range [50] and retains its form, SeO_4^{2-} . For single-stranded DNA, with our aptamer used as a receptor, depurination takes place below pH 3.5, which allowed us to conduct experiments at pH 4.0 (Figure 5).

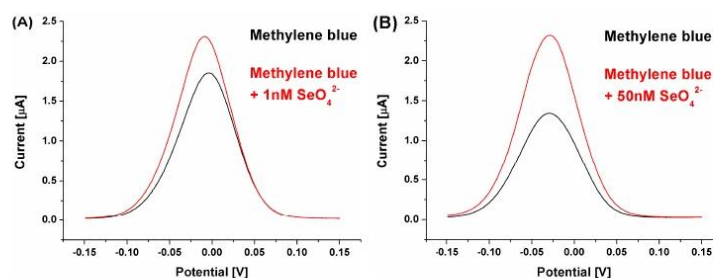


Figure 5. SWV voltammograms for biosensor response registered with methylene blue (pH 4.0) as a redox marker and for selenate ion concentration at the level of (A) 1 nM and (B) 50 nM.

The change in the overall receptor layer charge (toward more positive values) could be observed already for the redox reaction of cationic methylene blue. As its concentration was not changed ($50 \mu\text{M}$) between assays conducted at pH 4.0 and 7.0, and the registered currents were two-times smaller than for pH 7.0, it can be concluded that its electrostatic

attraction by the receptor layer was of significantly lower efficiency. Also, the methylene blue redox potential was moved toward more positive values, from approximately -0.25 V for pH 7.0 to approximately -0.025 V for pH 4.0, which additionally points to changes in its interactions with the receptor layer. However, what is significantly more important is the fact that the calculated biosensor response was high even for a significantly lower selenate ion concentration than during measurements at pH 7.0. This, in turn, could originate from the fact that, in these conditions, the receptor layer negative charge originates only from the immobilized ssDNA aptamer strands, which approximates, at least theoretically, conditions where the aptamer sequences were selected in the depth of solution during the SELEX process. Nonetheless, the change in the pH value of the measurement environment resulted not only in a change in registered voltammograms (methylene blue redox reaction) but also in the obtained analytical parameters of the aptasensor toward the analyte (SeO_4^{2-}). Although we expected an increased aptasensor response toward the analyzed ion, the obtained LOD (approximately 1 nM) was far below the above-mentioned detection limits specified by the WHO [28] (Figure 6A).

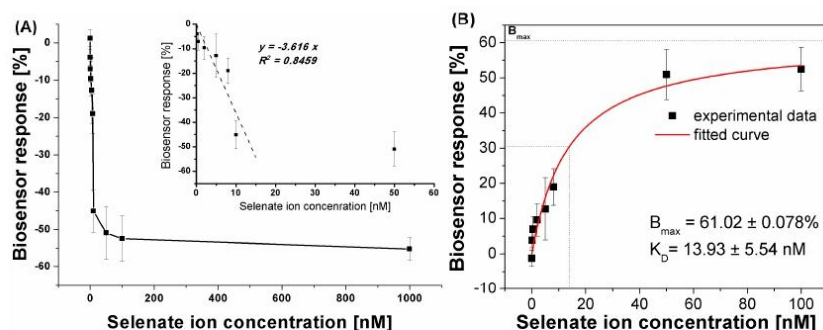


Figure 6. (A) Dependency between selenate ion concentration and calculated biosensor response (result obtained for SWV experiments, $n = 4$); (B) plot of the absolute aptasensor electrochemical responses (transformed to positive values versus calculated with the equation presented in Figure 1) in the function of analyte concentration for the determination of equilibrium dissociation constant (K_D). Black points represent experimental points; red curve represents fitting through non-linear regression according to the “one-to-one” kinetic model.

This made us evaluate the strength of the binding affinity between the obtained receptor layer with the developed aptamer and the selenate ion by calculation of the dissociation constant (K_D). Assuming a simple aptamer–analyte interaction at equilibrium according to the “one-to-one” kinetic model and good interaction stability, it was possible to numerically determine the equilibrium dissociation constant (K_D) [59]. This parameter reflects the binding affinity of the target to the aptamer molecule. As can be seen in Figure 6B, the K_D value at the level of 13.9 nM indicates the high ability of aptamer binding sites to form complexes with the detected analyte, even at its low concentrations in the sample.

The calculated dissociation constant proved the high affinity of the as-prepared biosensing layers toward selenate ions in the used measurement conditions. This was further confirmed by the selectivity studies (Figure 7), where all analyzed ions were at the level of 100 nM.

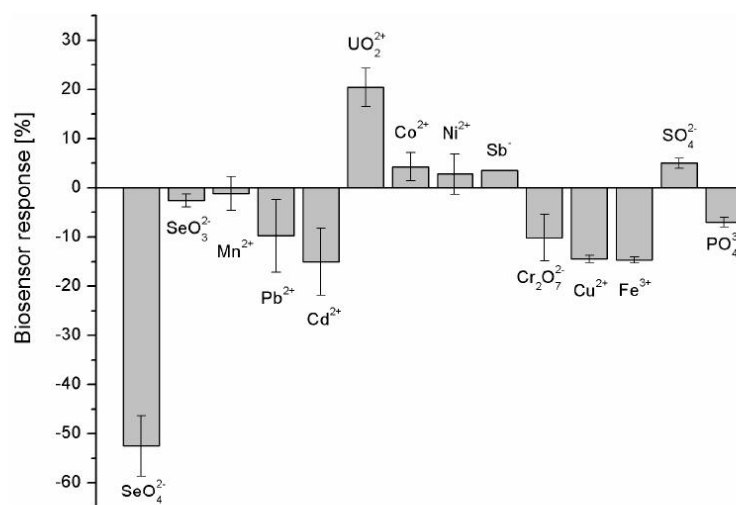


Figure 7. Selectivity studies of as-prepared electrochemical aptasensor. All ions were at the level of 100 nM and the sensor incubation in the sample was conducted for 30 min ($n = 4$).

As can be seen in Figure 7, the highest aptasensor response was obtained for selenate ion ($-52.48 \pm 6.00\%$) followed by Cd^{2+} ($-15.04 \pm 6.80\%$) and Fe^{3+} ($-14.69 \pm 0.63\%$). The lowest biosensor responses were registered for Ni^{2+} ($2.80 \pm 4.14\%$) and Sb^{3+} ($3.50 \pm 0.00\%$). The clear decrease in the registered methylene blue reduction current after biosensor incubation in the sample (different biosensor response) was registered for UO_2^{2+} ($20.41 \pm 3.91\%$). These could indicate that strong binding of anions or cations in the receptor layer changes the overall charge of such a layer. In the case of UO_2^{2+} cation, which forms coordination bonds with phosphates present in the DNA backbone, the charge becomes more positive, which diminishes the electrostatic attraction of the positive redox marker, methylene blue, the same reducing the registered current. As we can see in Figure 7, a different biosensor response is observed for selenate anions. In this case, the current increases, which may suggest the increase in the negative charge deposited at the electrode surface (increased attraction of cationic redox marker, methylene blue) and increased efficiency in its redox reaction. Additionally, importantly, the aptasensor response toward SeO_3^{2-} was negligible.

In order to further confirm that the observed biosensor response results from the selenate ion binding by the aptamer, and not with any other interactions that could take place within the receptor layer, we modified electrodes only with different blocking agents (EBAs). This allowed us to obtain different surface properties: (i) hydrophilic with neutral charge for 6-Mercapto-1-hexanol (MCH); (ii) hydrophilic with neutral-to-negative charge for 11-mercaptoundecanoic acid (MUA; pK_a of $\text{pH} \sim 4$); (iii) hydrophilic with positive charge for cysteamine (CYS); (iv) hydrophobic with neutral charge for 1-pentanethiol (PE). Then, such prepared electrodes were used in selenate ion detection as if it were a typical aptasensor. The registered “biosensor” response is presented in Figure 8, together with example voltammograms. As can be seen, the registered differences in the “response” toward selenate ion (a few percent of changes) for every EBA used are within the margin of error and do not indicate the selenate ion detection. The only differences were registered for methylene blue redox current intensity after signal stabilization, where, for a positively charged (CYS) electrode, the lowest signal was obtained, then, together with increasing the negative charge density at the electrode surface, the registered current also increases (MCH and MUA). The highest current was registered for PE, which most likely results from the lipophilic character of the electrode surface, which could more efficiently attract the methylene blue. However, different currents registered for different EBA used could

lead to diminishment or increase the electrochemical aptasensor response toward selenate ion, which will be subjected to other studies by us. However, importantly, the above results clearly indicate that the change in current after subjection of the prepared aptasensor to the selenate ions comes almost only from the binding of selenate ions to the aptamer, not from any other interactions that could take place within the receptor layer.

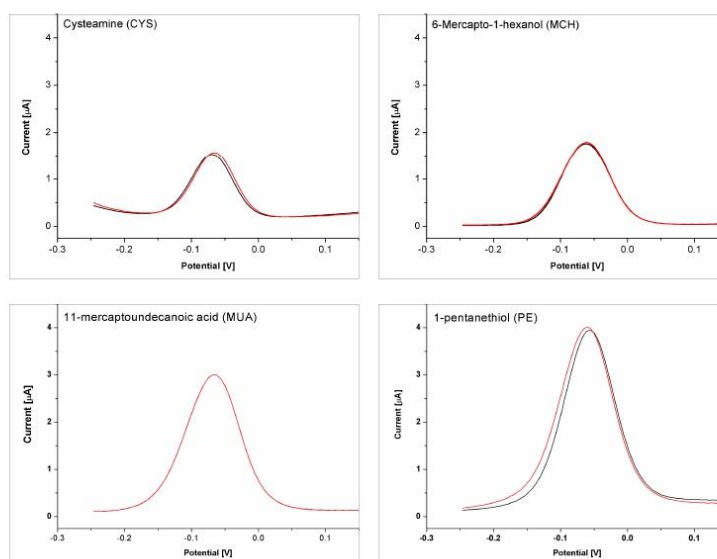


Figure 8. Response of the electrodes modified with appropriate electrode blocking agent (cysteamine, 6-mercapto-1-hexanol, 11-mercaptoundecanoic acid or 1-pentanethiol) for measurement solution containing only methylene blue (black line) and for methylene solution with selenate ion addition (100 nM) (red line).

Both the presented selectivity and the low dissociation constant motivated us to also evaluate the developed biosensor response for selenate ion in the real sample. This was tap water, as we initially followed WHO regulations related to the selenate limits in drinking water (Figure 9).

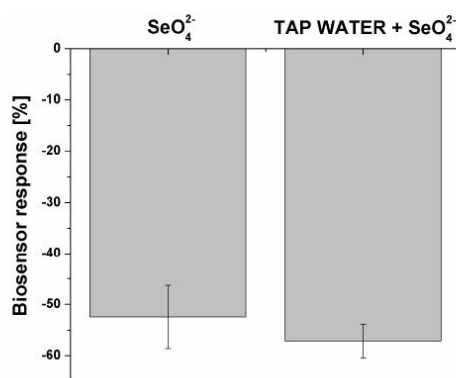


Figure 9. Real sample analysis with the use of the prepared biosensor. The selenate ion concentration was 100 nM ($n = 4$).

The tap water was diluted 1:1 (*v/v*) with measurement solution (twice concentrated) and spiked with 100 nM SeO_4^{2-} . As was previously mentioned, the limit specified by the WHO for selenium concentration in drinking water is at the level of 0.01 mg/L (0.127 μM) [28]. As can be seen in Figure 9, the developed aptasensor response was only slightly higher for the spiked real sample ($-57.19 \pm 0.03\%$) than for the laboratory sample ($-52.48 \pm 0.06\%$).

Further studies were dedicated to (i) the evaluation of the possibility of biosensor regeneration and its subsequent use in selenate ion concentration determination (Figure 10A) and (ii) the evaluation of the biosensor stability during one week of storage in chosen conditions (Figure 10B). The first mentioned experiments involved 20 min of aptasensor incubation in one of the following solutions; 5 mM EDTA, pH 7.5 (as a standard complexing agent that proved its applicability in multiple studies [51]); 1 M KH_2PO_4 , pH 4.5 (used in the presented studies as solution for DNA immobilization); solution of 10 mM TRIS, 50 mM KCl and 20 mM MgCl_2 , pH 7.0 (used in various studies as a typical DNA/DNA hybridization buffer [47]); and 0.5 M Na_2CO_3 , pH 10.5 (with a significantly changed pH and presence of CO_3^{2-} ions, which, according to the literature, can compete with selenate ions during its removal with magnetite from granitic groundwater [60]).

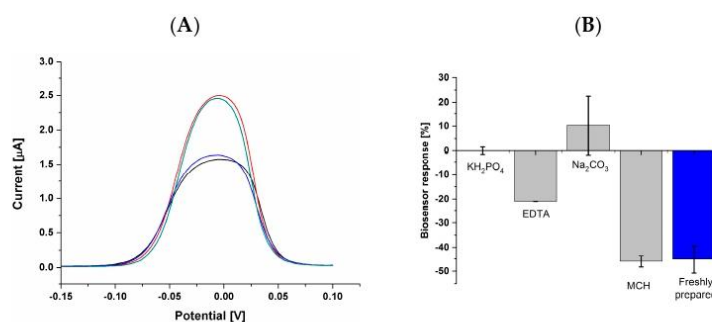


Figure 10. (A) Aptasensor regeneration studies. Black line: before selenate ion detection; red line: after 30 min of electrode incubation in selenate ion solution (100 nM); blue line: after 20 min of aptasensor incubation in 0.5 M Na_2CO_3 at pH 10.5 (regeneration); green line: after 30 min of electrode incubation in selenate ion solution (after regeneration process); (B) aptasensor response (50 nM selenate ion concentration) after one week of storage in the specific conditions (blue bar: response obtained with freshly prepared biosensor).

From the analyzed condition, the regeneration process took place only for sodium carbonate, and the appropriate current change after subsequent selenate ion determination was obtained (Figure 10A). The investigations on biosensor storage were conducted in 1 M pf KH_2PO_4 at pH 4.5, 5 mM of EDTA at pH 7.5, (used in the presented studies as solution for DNA immobilization), 0.5 M of Na_2CO_3 at pH 10.5, and water solution of 2 mM of 6-mercapto-1-hexanol (MCH). From the analyzed conditions, only the biosensor that was kept in 2 mM of MCH was able to obtain similar results for the determination of 50 nM selenate ion at a similar level to the freshly prepared biosensor (Figure 10B).

Nonetheless, taking into account the obtained results, aptasensor response dependency to selenate ion concentration (Figure 6A) and to a real sample (Figure 9), low dissociation constant of as-prepared receptor layer (Figure 6B) (K_D at the level of 13.9 nM) and obtained selectivity (Figure 7), we believe that there is the possibility of using the described aptamer sequence in the construction of biosensing layers toward SeO_4^{2-} anion.

3. Materials and Methods

3.1. Reagents

2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol—Trizma® base (TRIS), 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS), sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), potassium chloride (KCl), sodium hydroxide (NaOH), 6-mercapto-1-hexanol (MCH), methylene blue (MB), lead(II) nitrate ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), cadmium chloride (CdCl_2), copper(II) nitrate ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$), iron(III) chloride (FeCl_3), uranyl acetate ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$), cobalt(II) sulfate hexahydrate ($\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), potassium chromate (K_2CrO_4), manganese (II) chloride (MnCl_2), nickel nitrate ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$), sodium selenate (Na_2SeO_4), and potassium antimony (III) tartrate hydrate ($\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Sulfuric acid (H_2SO_4) and hydrogen peroxide (H_2O_2) were purchased from POCh (Gliwice, Poland). Potassium ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) and potassium ferrocyanide ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). All reagents were used without further purification. All solutions were prepared with Milli-Q water.

DNA aptamer specificity towards selenate ions was identified through SELEX process by Basepair Biotechnologies (Pearland, TX, USA) with the use of the VENNMultiplex™ technique dedicated to low molecular targets. In this SELEX process type, aptamer candidates were hybridized to the complementary sequences immobilized on the surfaces of magnetic nanoparticles. After each round, aptamer candidates bound with the selenate ion were removed from the nanoparticles and stayed in the supernatant after the magnetic sample separation. Application of the SELEX procedure included the use of VENNMultiplex™ for at least 12 rounds, which was followed by next-generation sequencing and bioinformatics studies. Based on results, the 32-nucleotide single-stranded DNA aptamer probe E1 (desalted, HPLC purified) specific towards selenate ions and additionally containing a disulfide group was purchased from Metabion, Planegg, Germany. The sequence was as follows: 5'-OH-C₆-S-S-C₆-TAT GAC ATT GTG ACG AAC TCC TCA CTA GAC CG. Aptamer stock solutions (100 μM) were prepared with a water-molecular biology reagent (Merck, Germany) and stored in a -20°C freezer before use.

3.2. Solutions

The solutions used in the presented experiments were as follows: 50 mM MOPS pH 7.0; 5 mM ferri/ferrocyanide in 50 mM MOPS, pH 7.0; 50 μM MB in 50 mM MOPS pH 7.0; 50 μM MB in 50 mM TRIS pH 4.0; twice-concentrated measurement solution in studies conducted for real sample analysis (100 μM MB in 100 mM TRIS pH 4.0); 5 mM ferri/ferrocyanide in 0.1 M KCl; 1 M H_2SO_4 , 0.1 M H_2SO_4 , 1 M NaOH, piranha solution ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{:H}_2\text{O}_2$ (3:1) (v/v)), 1 M KH_2PO_4 , pH 4.5; water solution of 2 mM 6-mercapto-1-hexanol. If necessary, redox indicator solutions were spiked with appropriate salts.

3.3. Gold Electrodes Cleaning and Modification

The electrochemical measurements were carried out with a conventional three-electrode system consisting of a gold disk electrode (CH Instruments, Bee Cave, TX, USA), a gold wire as an auxiliary electrode (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany), and Ag/AgCl/1 M KCl reference electrode (Mineral, Warsaw, Poland). The gold disc electrodes were prepared according to [47]. After electrode cleaning, the given concentration (usually 4 μM) of thiolated DNA probe in immobilized buffer solution (1 M KH_2PO_4 (pH 4.5)) was deposited at the surface of previously cleaned electrodes and immobilized for a given period of time (e.g., 30 min). Then, the electrodes were washed in DI water and incubated for 2 h in 2 mM MCH. Next, electrodes were rinsed with DI water and kept for 2 min in 100 mM NaOH with 1 M NaCl to remove weakly bound DNA/MCH moieties before the electrochemical measurements.

3.4. Electrochemical Measurements

Voltametric measurements were performed with a CHI660A electrochemical workstation (CH Instruments, USA). Cyclic voltammetry (CV) was conducted at a sweep rate of $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, while square wave voltammetry (SWV) was recorded at a pulse amplitude of 25 mV, an increment of 4 mV, and a frequency of 15 Hz. Depending on the pH of the measurement solution, cathodic or anodic scans were taken into account during qualitative and quantitative analyses. This was based on calculations made after each set of experiments. Before measurements, electrodes were incubated in an analyzed measurement buffer for 10 min. Then, a series of SWV measurements were conducted to stabilize the initial receptor layer signal (I_0).

4. Conclusions

Due to human activity, particularly related to natural environment degradation and changes in the global temperature values, the distribution of various pollutants or toxins in the environment changes. This may result in groundwater contamination and consequent bioaccumulation of compounds hazardous to human health in agricultural crops, animals consumed, and in the air we breathe. This, in turn, entails the need for the elaboration of mobile and easy-to-use analytical devices, which could be operated by non-professionals directly in the place of need. One such approach is to use electrochemical sensors and biosensors, which, because of their dimensions, low cost, and ease of integration in more advanced microfluidic devices, make such solutions possible. However, one of the most important parts of such biosensors is the receptor layer and, more precisely, the receptor, which could selectively bind the analyte of choice. The progress in new receptor development is directly connected to the progress in the development of the abovementioned sensors and biosensors and, ultimately, also to the mobile devices capable of precise analysis of the sample in the place of sampling. One example of such receptors is aptamers, single-stranded DNA or RNA oligonucleotides selected during the SELEX process. Herein, we present the 32-nucleotide aptamer sequences, identified during the VENNMultiplex™ mode of systematic evolution of ligands by exponential enrichment. It was further modified with the thiol group at its 5' end and applied for the first time in the receptor layer of electrochemical aptasensor toward selenate ion. During the presented studies, the measurement conditions were chosen, specifically the redox marker used and pH value of the measurement solution. This, however, makes it possible to elucidate, at least at the very first step, the mechanism of SeO_4^{2-} ion interaction with the receptor layer and to obtain interesting analytical parameters of the developed electrochemical aptasensor. Especially from the point of view of the level of detection, which was far below the limits described by the WHO ($10 \text{ }\mu\text{g/L}$) and selectivity. For elaborated receptor layer and measurement conditions, the dissociation constant was calculated ($13.93 \pm 5.54 \text{ nM}$), which further indicates the high ability of aptamer binding sites to form complexes with the detected analyte even at its low concentrations in the sample. It should, however, be emphasized that this is by far the first attempt to utilize aptamer-based layers for electrochemical detection of selenate ions, and this paper does not provide an exhaustive list of aptasensor construction examples. We believe that further studies will allow for increased repeatability of the conducted experiments, shorten the analysis, or make it more user friendly. These can be achieved, e.g., by the application of other electrode blocking agents [47,61], optimization of the receptor density within the biosensing layer and measurement solution composition, or application of transducers manufactured in printed electronic technology [51].

5. Patents

Authors have patent “DNA aptamer sequence, its use for selective detection of selenium ions, a method of manufacturing an electrochemical aptamer sensor and a method of measurement using it, and an electrochemical aptamer sensor containing an oligonucleotide DNA aptamer sequence”, P.448520 pending to Assignee.

Author Contributions: A.S.: writing—original draft preparation, writing—review and editing, methodology, investigation, validation; M.P.: investigation; D.B.: investigation; M.O.: supervision, funding acquisition, writing—review and editing; R.Z.: writing—original draft preparation, writing—review and editing, conceptualization, methodology, formal analysis, visualization; E.M.: supervision, writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financially supported by the Warsaw University of Technology and The National Centre for Research and Development under the III program TECHMATSTRATEG—Strategic research and development program “Modern material technologies—TECHMATSTRATEG”, no. TECHMATSTRATEG-III/0042/2019-00 and acronym ASTACUS, “Biopolymer materials with chemically and genetically programmed heavy metals selectivity for new generation of ultra-sensitive biosensors”.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available on request.

Acknowledgments: We would like to express our gratitude to Marcin Drozd for his valuable contribution to dissociation constant (K_D) calculation.

Conflicts of Interest: The authors declare the following financial interests/personal relationships that may be considered potential competing interests: Marcin Olszewski reports financial support was provided by The National Centre for Research and Development. Robert Ziółkowski and Marcin Olszewski have patent “DNA aptamer sequence, its use for selective detection of selenium ions, a method of manufacturing an electrochemical aptamer sensor and a method of measurement using it, and an electrochemical aptamer sensor containing an oligonucleotide DNA aptamer sequence”, P.448520 pending to Assignee. The other authors declare that they have no competing financial interests or personal relationships could appear to have influenced the work reported in this paper.

References

1. Somogyi, Z.; Kádár, I.; Kiss, I.; Juriková, T.; Szekeres, L.; Balla, Š.; Nagy, P.; Bakonyi, G. Comparative toxicity of the selenate and selenite to the potworm *Enchytraeus albidus* (Annelida: Enchytraeidae) under laboratory conditions. *Eur. J. Soil Biol.* **2012**, *50*, 159–164. [\[CrossRef\]](#)
2. Wake, B.D.; Bowie, A.R.; Butler, E.C.V.; Haddad, P.R. Modern preconcentration methods for the determination of selenium species in environmental water samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 491–500. [\[CrossRef\]](#)
3. Bleiman, N.; Mishael, Y.G. Selenium removal from drinking water by adsorption to chitosan–clay composites and oxides: Batch and columns tests. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *183*, 590–595. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Ečimović, S.; Velki, M.; Vuković, R.; Štolfa Čamagajevac, I.; Petek, A.; Bošnjaković, R.; Grgić, M.; Engelmann, P.; Bodó, K.; Filipović-Marjić, V.; et al. Acute toxicity of selenate and selenite and their impacts on oxidative status, efflux pump activity, cellular and genetic parameters in earthworm *Eisenia andrei*. *Chemosphere* **2018**, *212*, 307–318. [\[CrossRef\]](#)
5. Palmer, I.S.; Olson, O.E. Relative Toxicities of Selenite and Selenate in the Drinking Water of Rats. *J. Nutr.* **1974**, *104*, 306–314. [\[CrossRef\]](#)
6. Wallschläger, D.; Roehl, R. Determination of inorganic selenium speciation in waters by ion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry using eluant elimination with a membrane suppressor. *J. Anal. At. Spectrom.* **2001**, *16*, 922–925. [\[CrossRef\]](#)
7. Jackson, B.P.; Miller, W.P. Soluble Arsenic and Selenium Species in Fly Ash/Organic Waste-Amended Soils Using Ion Chromatography–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 270–275. [\[CrossRef\]](#)
8. Yang, R.; Li, Q.; Zhou, W.; Yu, S.; Liu, J. Speciation Analysis of Selenium Nanoparticles and Inorganic Selenium Species by Dual-Cloud Point Extraction and ICP-MS Determination. *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 16328–16336. [\[CrossRef\]](#)
9. Panhwar, A.H.; Tuzen, M.; Kazi, T.G. Ultrasonic assisted dispersive liquid-liquid microextraction method based on deep eutectic solvent for speciation, preconcentration and determination of selenium species (IV) and (VI) in water and food samples. *Talanta* **2017**, *175*, 352–358. [\[CrossRef\]](#)
10. Goldberg, S.; Martens, D.A.; Forster, H.S.; Herbel, M.J. Speciation of Selenium(IV) and Selenium(VI) using Coupled Ion Chromatography–Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2006**, *70*, 41–47. [\[CrossRef\]](#)
11. Huang, P.M.; Fujii, R. Selenium and Arsenic. In *Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods*, 5.3; Wiley: Hoboken, NY, USA, 2018; pp. 793–831. [\[CrossRef\]](#)
12. Finley, J.W.; Sigrid-Keck, A.; Robbins, R.J.; Hintze, K.J. Selenium Enrichment of Broccoli: Interactions between Selenium and Secondary Plant Compounds. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1236–1238. [\[CrossRef\]](#)

13. Lavi, N.; Alfassi, Z.B. Determination of trace amounts of cadmium, cobalt, chromium, iron, molybdenum, nickel, selenium, titanium, vanadium and zinc in blood and milk by neutron activation analysis. *Analyst* **1990**, *115*, 817. [\[CrossRef\]](#)
14. Utterback, P.L.; Parsons, C.M.; Yoon, I.; Butler, J. Effect of supplementing selenium yeast in diets of laying hens on egg selenium content. *Poult. Sci.* **2005**, *84*, 1900–1901. [\[CrossRef\]](#)
15. Ando, M.; Takizawa, M.; Suwabe, S.; Yamato, S.; Shimada, K. Determination of Selenium in Human Serum by Liquid Chromatography/Electron Capture Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry after Acid Digestion and Derivatization Using 2,3-Diaminonaphthalene. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2003**, *9*, 619–622. [\[CrossRef\]](#)
16. Kalantari, H.; Manoochehri, M. A nanocomposite consisting of MIL-101(Cr) and functionalized magnetite nanoparticles for extraction and determination of selenium(IV) and selenium(VI). *Microchim. Acta* **2018**, *185*, 196. [\[CrossRef\]](#)
17. Karaś, K.; Ziola-Frankowska, A.; Frankowski, M. New Method for Simultaneous Arsenic and Selenium Speciation Analysis in Seafood and Onion Samples. *Molecules* **2021**, *26*, 6223. [\[CrossRef\]](#)
18. Zhao, Y.; Zheng, J.; Yang, M.; Yang, G.; Wu, Y.; Fu, F. Speciation analysis of selenium in rice samples by using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* **2011**, *84*, 983–988. [\[CrossRef\]](#)
19. Rubinskaya, T.B.; Kovaleva, S.V.; Kulagin, E.M.; Gladyshev, V.P. Determination of Selenium(IV) by Stripping Voltammetry at a Mercury-Film Electrode. *J. Anal. Chem.* **2003**, *58*, 165–170. [\[CrossRef\]](#)
20. Ivandini, T.A.; Einaga, Y. Electrochemical Detection of Selenium (IV) and (VI) at Gold-Modified Diamond Electrodes. *Electrocatalysis* **2013**, *4*, 367–374. [\[CrossRef\]](#)
21. Beni, V.; Collins, G.; Arrigan, D.W.M. Investigation into the voltammetric behaviour and detection of selenium(IV) at metal electrodes in diverse electrolyte media. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *699*, 127–133. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Andrews, R.W.; Johnson, D.C. Voltammetric deposition and stripping of selenium(IV) at a rotating gold-disk electrode in 0.1 M perchloric acid. *Anal. Chem.* **1975**, *47*, 294–299. [\[CrossRef\]](#)
23. Fakude, C.T.; Arotiba, O.A.; Moutloali, R.; Mabuba, N. Nitrogen-doped Graphene Electrochemical Sensor for Selenium (IV) in Water. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2019**, *14*, 9391–9403. [\[CrossRef\]](#)
24. Idris, A.O.; Mabuba, N.; Nkosi, D.; Maxakato, N.; Arotiba, O.A. Electrochemical detection of selenium using glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2017**, *97*, 534–547. [\[CrossRef\]](#)
25. Jain, R.; Thakur, A.; Kumar, P.; Pooja, D. Au/ZnO nanocomposites decorated ITO electrodes for voltammetric sensing of selenium in water. *Electrochim. Acta* **2018**, *290*, 291–302. [\[CrossRef\]](#)
26. Ali, A.G.; Altahan, M.F.; Beltagi, A.M.; Hathoot, A.A.; Abdel-Azzem, M. Voltammetric and impedimetric determinations of selenium(iv) by an innovative gold-free poly(1-aminoanthraquinone)/multiwall carbon nanotube-modified carbon paste electrode. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 4988–5000. [\[CrossRef\]](#)
27. John, N.; Abraham, K.E. Detection of Selenium and Nickel Metal Ion in Water Using Mn₃O₄-Cn-Modified Electrode. *Int. J. Electrochem.* **2021**, *2021*, 6650542. [\[CrossRef\]](#)
28. *Guidelines for Drinking-Water Quality: Fourth Edition Incorporating the First and Second Addenda* [Internet]; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2022; ISBN 9789240045064.
29. Motlagh, M.K.; Noroozifar, M.; Kraatz, H.-B. Highly sensitive and selective detection of selenate in water samples using an enzymatic gold nanodendrite biosensor. *Can. J. Chem.* **2023**, *101*, 440–448. [\[CrossRef\]](#)
30. Motlagh, M.K.; Noroozifar, M.; Sodhi, R.N.S.; Kraatz, H. Development of a Bacterial Enzyme-Based Biosensor for the Detection and Quantification of Selenate. *Chem.—A Eur. J.* **2022**, *28*, e202200953. [\[CrossRef\]](#)
31. Kolliopoulos, A.V.; Metters, J.P.; Banks, C.E. Electroanalytical sensing of selenium(iv) utilising screen printed graphite macro electrodes. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 851. [\[CrossRef\]](#)
32. Ruscito, A.; DeRosa, M.C. Small-Molecule Binding Aptamers: Selection Strategies, Characterization, and Applications. *Front. Chem.* **2016**, *4*, 14. [\[CrossRef\]](#)
33. Carothers, J.M.; Goler, J.A.; Kapoor, Y.; Lara, L.; Keasling, J.D. Selecting RNA aptamers for synthetic biology: Investigating magnesium dependence and predicting binding affinity. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2736–2747. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Ziolkowski, R.; Górski, Ł. Electrochemical metal sensors with DNA receptor layers. *Curr. Anal. Chem.* **2014**, *10*, 600–608. [\[CrossRef\]](#)
35. Jarczewska, M.; Szymczyk, A.; Zajda, J.; Olszewski, M.; Ziolkowski, R.; Malinowska, E. Recent Achievements in Electrochemical and Optical Nucleic Acids Based Detection of Metal Ions. *Molecules* **2022**, *27*, 7481. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Guo, W.; Zhang, C.; Ma, T.; Liu, X.; Chen, Z.; Li, S.; Deng, Y. Advances in aptamer screening and aptasensors' detection of heavy metal ions. *J. Nanobiotechnol.* **2021**, *19*, 166. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Bhattacharyya, D.; Mirihana Arachchilage, G.; Basu, S. Metal Cations in G-Quadruplex Folding and Stability. *Front. Chem.* **2016**, *4*, 38. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Wang, Y.; Luan, B.-Q.; Yang, Z.; Zhang, X.; Ritzo, B.; Gates, K.; Gu, L.-Q. Single Molecule Investigation of Ag⁺ Interactions with Single Cytosine-, Methylcytosine- and Hydroxymethylcytosine-Cytosine Mismatches in a Nanopore. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5883. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Hossain, Z.; Huq, F. Studies on the interaction between Cd²⁺ ions and DNA. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *90*, 85–96. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Rossberg, A.; Abe, T.; Okuwaki, K.; Barkleit, A.; Fukuzawa, K.; Nakano, T.; Mochizuki, Y.; Tsushima, S. Destabilization of DNA through interstrand crosslinking by UO₂²⁺. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 2015–2018. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

41. Torigoe, H.; Miyakawa, Y.; Ono, A.; Kozasa, T. Positive cooperativity of the specific binding between Hg^{2+} ion and T:T mismatched base pairs in duplex DNA. *Thermochim. Acta* **2012**, *532*, 28–35. [CrossRef]
42. Kohlberger, M.; Gadermaier, G. SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2022**, *69*, 1771–1792. [CrossRef]
43. Edsall, J.T. The size and shape of protein molecules. In *Fortschritte der Chemischen Forschung Volume 1*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2006; pp. 119–174. [CrossRef]
44. Rahm, M.; Hoffmann, R.; Ashcroft, N.W. Atomic and Ionic Radii of Elements 1–96. *Chem.—A Eur. J.* **2016**, *22*, 14625–14632. [CrossRef] [PubMed]
45. Available online: <https://basepairbio.com/multiplex-selex-venn-multiplex-selex/> (accessed on 4 January 2024).
46. Sankar, K.; Kuzmanović, U.; Schaus, S.E.; Galagan, J.E.; Grinstaff, M.W. Strategy, Design, and Fabrication of Electrochemical Biosensors: A Tutorial. *ACS Sens.* **2024**, *9*, 2254–2274. [CrossRef]
47. Szymczyk, A.; Soliwodzka, K.; Moskal, M.; Rózanowski, K.; Ziolkowski, R. Further insight into the possible influence of electrode blocking agents on the stem-loop based electrochemical DNA sensor parameters. *Sens. Actuators B Chem.* **2022**, *354*, 131086. [CrossRef]
48. Wong, K.L.; Liu, J. Factors and methods to modulate DNA hybridization kinetics. *Biotechnol. J.* **2021**, *16*, 2000338. [CrossRef]
49. Krishnamurthy, R. Role of pK_a of Nucleobases in the Origins of Chemical Evolution. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 2035–2044. [CrossRef] [PubMed]
50. Lichtfouse, E.; Morin-Crini, N.; Bradu, C.; Boussouga, Y.-A.; Aliaskari, M.; Schäfer, A.I.; Das, S.; Wilson, L.D.; Ike, M.; Inoue, D.; et al. Methods for selenium removal from contaminated waters: A review. *Environ. Chem. Lett.* **2022**, *20*, 2019–2041. [CrossRef]
51. Szymczyk, A.; Popiolek, M.; Krzemiński, J.; Olszewski, M.; Ziolkowski, R.; Malinowska, E. Identification of medium- and mechanism-related pitfalls towards improved performance and applicability of electrochemical mercury(II) aptasensors. *Microchim. Acta* **2024**, *191*, 189. [CrossRef]
52. Ferreira, C.M.H.; Pinto, I.S.S.; Soares, E.V.; Soares, H.M.V.M. (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions—A review. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 30989–31003. [CrossRef]
53. Powell, K.J.; Brown, P.L.; Byrne, R.H.; Gajda, T.; Heftler, G.; Sjöberg, S.; Wanner, H. Chemical speciation of environmentally significant heavy metals with inorganic ligands. Part 1: The Hg^{2+} – Cl^- , OH^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , and PO_4^{3-} aqueous systems (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 739–800. [CrossRef]
54. Zhang, X.; Servos, M.R.; Liu, J. Surface Science of DNA Adsorption onto Citrate-Capped Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2012**, *28*, 3896–3902. [CrossRef]
55. Ziolkowski, R.; Górski, Ł.; Oszwaldowski, S.; Malinowska, E. Electrochemical uranyl biosensor with DNA oligonucleotides as receptor layer. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 2259–2266. [CrossRef] [PubMed]
56. Jarczewska, M.; Kierzkowska, E.; Ziolkowski, R.; Górski, T.; Malinowska, E. Electrochemical oligonucleotide-based biosensor for the determination of lead ion. *Bioelectrochemistry* **2015**, *101*, 35–41. [CrossRef] [PubMed]
57. Ziolkowski, R.; Uścińska, A.; Mazurkiewicz-Pawlicka, M.; Małolepszy, A.; Malinowska, E. Directly-thiolated graphene based electrochemical sensor for Hg(II) ion. *Electrochim. Acta* **2019**, *305*, 329–337. [CrossRef]
58. Cristiano, E.; Hu, Y.-J.; Sigfried, M.; Kaplan, D.; Nitsche, H. A Comparison of Point of Zero Charge Measurement Methodology. *Clays Clay Miner.* **2011**, *59*, 107–115. [CrossRef]
59. Thevendran, R.; Navien, T.N.; Meng, X.; Wen, K.; Lin, Q.; Sarah, S.; Tang, T.-H.; Citartan, M. Mathematical approaches in estimating aptamer-target binding affinity. *Anal. Biochem.* **2020**, *600*, 113742. [CrossRef] [PubMed]
60. Kim, S.S.; Min, J.H.; Lee, J.K.; Baik, M.H.; Choi, J.-W.; Shin, H.S. Effects of pH and anions on the sorption of selenium ions onto magnetite. *J. Environ. Radioact.* **2012**, *104*, 1–6. [CrossRef]
61. Alshanski, I.; Shitrit, A.; Sukhran, Y.; Unverzagt, C.; Hurevich, M.; Yitzchaik, S. Effect of Interfacial Properties on Impedimetric Biosensing of the Sialylation Process with a Biantennary N-Glycan-Based Monolayer. *Langmuir* **2022**, *38*, 849–855. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Publikacja P5: Comparative evaluation of different surface coatings of Fe₃O₄ based magnetic nano sorbent for applications in the nucleic acids extraction



Article

Comparative Evaluation of Different Surface Coatings of Fe₃O₄-Based Magnetic Nano Sorbent for Applications in the Nucleic Acids Extraction

Anna Szymczyk ^{1,2}, Marcin Drozd ^{1,3}, Agnieszka Kamińska ⁴, Magdalena Matczuk ⁴, Maciej Trzaskowski ³, Marta Mazurkiewicz-Pawlicka ⁵, Robert Ziolkowski ^{1,*} and Elżbieta Malinowska ^{1,3}

¹ Chair of Medical Biotechnology, Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, Stanisława Noakowskiego 3, 00-664 Warsaw, Poland

² Doctoral School No. 1, Warsaw University of Technology, Plac Politechniki 1, 00-661 Warsaw, Poland

³ Centre for Advanced Materials and Technologies CEZAMAT, Warsaw University of Technology, Poleczki 19, 02-822 Warsaw, Poland

⁴ Chair of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, Stanisława Noakowskiego 3, 00-664 Warsaw, Poland

⁵ Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Ludwika Waryńskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland

* Correspondence: robert.ziolkowski@pw.edu.pl



Citation: Szymczyk, A.; Drozd, M.; Kamińska, A.; Matczuk, M.; Trzaskowski, M.; Mazurkiewicz-Pawlicka, M.; Ziolkowski, R.; Malinowska, E. Comparative Evaluation of Different Surface Coatings of Fe₃O₄-Based Magnetic Nano Sorbent for Applications in the Nucleic Acids Extraction. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8860. <https://doi.org/10.3390/ijms23168860>

Academic Editor: Ana María Díez-Pascual

Received: 11 July 2022

Accepted: 7 August 2022

Published: 9 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Nucleic acid extraction and purification are crucial steps in sample preparation for multiple diagnostic procedures. Routine methodologies of DNA isolation require benchtop equipment (e.g., centrifuges) and labor-intensive steps. Magnetic nanoparticles (MNPs) as solid-phase sorbents could simplify this procedure. A wide range of surface coatings employs various molecular interactions between dsDNA and magnetic nano-sorbents. However, a reliable, comparative evaluation of their performance is complex. In this work, selected Fe₃O₄ modifications, i.e., polyethyleneimine, gold, silica, and graphene derivatives, were comprehensively evaluated for applications in dsDNA extraction. A family of single batch nanoparticles was compared in terms of morphology (STEM), composition (ICP-MS/MS and elemental analysis), surface coating (UV-Vis, TGA, FTIR), and MNP charge (ζ-potential). ICP-MS/MS was also used to unify MNPs concentration allowing a reliable assessment of individual coatings on DNA extraction. Moreover, studies on adsorption medium (monovalent vs. divalent ions) and extraction buffer composition were carried out. As a result, essential relationships between nanoparticle coatings and DNA adsorption efficiencies have been noticed. Fe₃O₄@PEI MNPs turned out to be the most efficient nano sorbents. The optimized composition of the extraction buffer (medium containing 0.1 mM EDTA) helped avoid problems with Fe³⁺ stripping, which improved the validity of the spectroscopic determination of DNA recovery.

Keywords: iron(II,III) oxide; magnetic nanoparticles synthesis; Fe₃O₄ MNPs functionalization; DNA extraction; DNA—nanoparticle interactions

1. Introduction

Seeking the most accessible molecular diagnostic tests and developing reliable and cheap procedures is of utmost importance [1]. In most cases, nucleic acid analysis's first step is their extraction and purification from biological material. To assure the reliability of detection assays, such as qRT-PCR or genosensors, it is crucial to obtain high-quality purified DNA or RNA [2]. Classical nucleic acid isolation procedures include phenol-chloroform extraction, salting out and proteinase K treatment, and adsorption on silica-gel membrane [3]. These efficient but time-consuming methods require hazardous solutions, dedicated equipment, and expensive consumables [4]. The newly developed procedures should be fast, have throughput, and involve the minimum possible number of reagents or benchtop equipment. Considering the abovementioned issues, nanomaterials gained

particular attention as an indispensable part. Their properties, like high surface-to-volume ratio and the easiness of surface properties adjustment, became the reason for their applications, e.g., in genetic material extraction and purification [5–8]. Carefully chosen magnetic nanoparticle (MNPs) surfaces can show a high affinity for nucleic acids. In contrast, the presence of a magnetic core allows them to be easily manipulated using an external magnetic field. The DNA should bind preferentially to nanoparticles which facilitate its removal even from complex samples (i.e., proteins or other compounds). Then the application of external magnetic force separates the MNPs. Further changing the solution where MNPs are dispersed induces medium-triggered DNA adsorption reversibility, ensuring its facile recovery back to the solution.

Current research trends targeted at new nano sorbents for the extraction of nucleic acids focus on the development of both magnetic core materials, their shape and morphology [9], and their surface functionalization [10,11]. Several magnetic materials based on iron, cobalt, and nickel have been developed, e.g., magnetic cobalt–zinc ferrite core/SiO₂ shell nano sorbents [12], cobalt-oxide-based nanoparticles [13], spinel iron-cobalt oxide compounds [14], hydrophobic magnetic deep eutectic solvents containing Fe/MnCo/Gd ions [15], and magnetic ionic liquids including cobalt(II) and nickel(II) complexes [16]. Cobalt ferrite and other types of novel magnetic nanoparticles are promising due to their magnetocrystalline anisotropy, good parameters of coercivity, and saturation magnetization. Such materials also offer high chemical stability, wear resistance, and generally high physical and chemical stability [17]. The latest concepts in designing magnetic nano sorbents also include the use of magnetic nanoparticle (MNP) assemblies [9], the use of porous structures [18], or the use of specific double helix formation interactions [19]. However, due to the low cost and simplicity of synthesis, magnetite remains the dominant magnetic material in magnetic nanoparticles dedicated to nucleic acid extraction and purification.

The current scientific literature does not indicate a universal type of surface modification and the conditions that ensure efficient nucleic acid extraction. Therefore, there are several concepts involving different kinds of interactions, including electrostatic attraction between the nanoparticle and polyanionic phosphate backbones of nucleic acids [20,21], hydrophobic interactions (π - π stacking) [22], hydrogen bonds formation [23], coordination and salt bridging [24] or specific, biological affinity [25,26]. Nevertheless, as could be found in the literature also, bare Fe₃O₄ nanoparticles, without clearly described surface properties, were successfully employed for DNA isolation [27]. Recently, Qi et al. proposed a method of capturing DNA adducts from human blood samples through Fe₃O₄@GO nano sorbent, where GO was responsible for improving selectivity by enhancing the interaction with the analyte [28]. On the other hand, in the recent publication by Zhang, the high and pH-sensitive DNA loading capacity was due to cationic polyethyleneimine [29]. Paltrinieri et al. coated Fe₃O₄ MNPs with polyallylamine hydrochloride (PAH), and PAH functionalized with guanidinium groups (PAH-Gu) for enhanced phosphate binding [30]. An interesting and recently reported example of a polycationic ligand is PEDOT. Nanoparticles modified with this polymer showed a unique, high binding capacity in acidic media [21]. Moreover, silica coatings are commonly used for the solid-phase purification of DNA [31]. Silanization with modified precursors (APTES/MPTMS) allows easily manipulating the character of functional groups, which also affects affinity towards nucleic acids [32]. Min et al. described an approach to isolate and purify DNA based on hydrogen bonding via carboxyl groups. These superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles were modified with *meso*-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) [33].

Despite the growing number of reported examples of magnetic nanomaterials as nucleic acid nano sorbents, relatively little attention is paid to the critical evaluation of adsorption mechanisms and their impact on the nucleic acids' extraction capacity. The comparative studies so far focus on quantitative analysis of solid- and liquid-phase extraction [34,35] and the confrontation of manual and automatic approaches [36]. The variety of conditions and magnetic properties of the Fe₃O₄ cores make a comprehensive comparison of the effects of surface coating difficult. Therefore, the available literature examples

concern mainly the comparison of bare and core-shell nanoparticles [37] or methods of selective and non-selective adsorption of nucleic acids [38].

Presented studies focus on the comparative analysis of the influence of the nanoparticle surface type on the efficiency of its interaction with calf thymus DNA. The proposed nanoparticle preparation method allowed several post-synthetic modifications of the starting Fe_3O_4 @PEI nanoparticles. Fe_3O_4 surface modifications cover the functionalization of a magnetic core with polyethyleneimine (PEI) and further with graphene oxide (GO), carboxylated graphene oxide (GOCOOH), gold (Au), silica/amine-silica (TMOS/APTMS). For comparison, commercially available Fe_3O_4 nanoparticles without polymer coating were analyzed in the presented studies. Obtained Fe_3O_4 types (coatings in the form of solid shells as well as surface ligands) were extensively characterized in terms of their morphology, qualitative and quantitative elemental composition, and surface properties by STEM imaging, ICP-MS, and elementary analysis, thermogravimetry, ζ -potential measurements, UV-Vis- and Fourier-transform infrared spectra registering. Additionally, we comparatively characterized nanomaterials' magnetic properties (specific magnetization and rate of magnetic separation) and determined the iron content in their prepared suspensions using ICP-MS/MS. The latter results allowed for the normalization of MNPs concentration (the same batch of magnetite core). They provided a reliable comparison of the influence of the nanoparticle surface type on the efficiency in its interaction with calf thymus DNA. The adsorption and desorption efficiency from the surface of modified nanoparticles was investigated by UV-Vis spectrophotometry. The effect of various Na^+ or Mg^{2+} concentrations in the adsorption medium and the influence of temperature and concentration of the buffer components used in the DNA desorption protocols were also examined.

2. Results and Discussion

Magnetic nanoparticles' properties, like good dispersion, high surface area, and ease of surface modification, make them ideal as sorbents, carriers for various biological species, also nucleic acids. Thus, they have broad applicability in developing the DNA/RNA analysis methods or as components in genetic material preparation assays (extraction and purification steps) [39]. The magnetic core has two essential functions. First, to provide the ability of rapid separation in an external magnetic field from the sample. Second, Fe_3O_4 acts as a platform for further functionalization with compounds expressing the affinity to nucleic acids.

However, due to nanoparticles' magnetic properties and the tendency to clusterization, maintaining their biological species adsorption efficiency typically requires their stabilization [40]. A stabilizer is also necessary to secure the Fe_3O_4 nanoparticles as a convenient platform for further modification with various coatings. The presented studies achieved the first use of polyethyleneimine (PEI) as a particle stabilizer introduced in situ during the MNPs co-precipitation synthesis method previously described by Zhou [41]. Typically, stabilization of PEI is accomplished by post-synthetic ligand exchange from the starting citrate-capped Fe_3O_4 nanoparticles. The already described post-synthetic modification takes more time (an additional 4 h), elevated temperature (80 °C), and strict control of pH during the process [42,43]. In situ capping of Fe_3O_4 nanoparticles with PEI significantly simplifies the procedure (one-pot approach) and helps maintain good colloidal stability of nanoparticles by eliminating the risk of aggregation during the ligand exchange of citrate-capped nanoparticles.

The presented research aimed to prepare magnetic nanoparticles of different surface modifications and their comparative analysis in nucleic acids (calf thymus dsDNA) adsorption/desorption process efficiency. For this purpose, seven types of surface coatings of magnetic MNPs that may interact with DNA in various ways were prepared and characterized. As was stated above, PEI provided good stabilization and gave the cationic character of the surface over a wide pH range. Based on magnetic nanoparticles coated with PEI (Fe_3O_4 @PEI), a family of functionalized nanoparticles characterized by uniform cores was synthesized. This included: two types of silica shells, anionic silica (Fe_3O_4 @TMOS)

and cationic amine-silica ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@APTMS}$); two types of graphene derivatives, graphene oxide ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@GO}$) and carboxylated graphene oxide ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@GOCOOH}$). To enable further covalent functionalization of magnetic nanoparticles with thiolated receptors, nanoparticles coated with gold shells ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$) were synthesized. Additionally, for comparison with as-obtained nano sorbents, the commercially available MNPs without polymer shells were considered (the manufacturer did not provide information on the surface coating composition). We expected that in the case of commercial Fe_3O_4 nanoparticles, their core ligands (e.g., adsorbed anions) are directly responsible for the interaction with the nucleic acid. Schemes of nanoparticles used in the framework of this study are depicted in Figure 1.

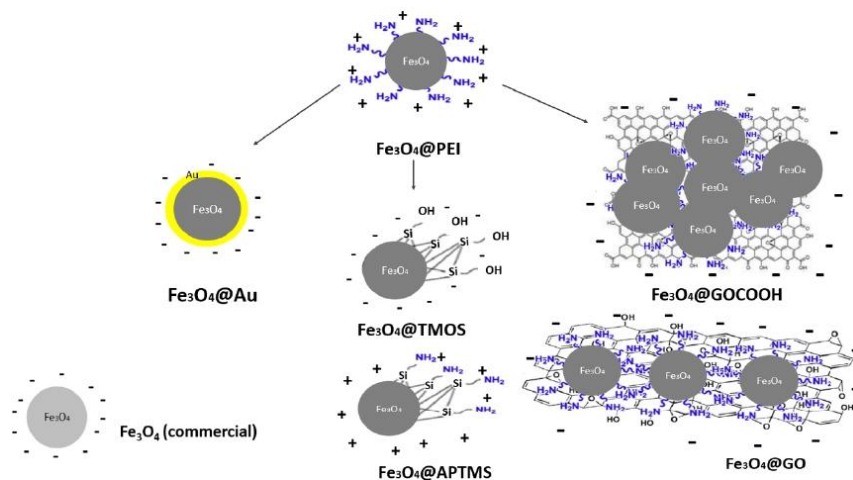


Figure 1. The scheme of magnetic nanoparticles (MNPs) prepared and investigated within this study.

It should be emphasized that before MNPs usage for nucleic acid interaction analysis, the concentration of nano sorbents on various surfaces was unified. It was achieved by using the same batch of MNPs for all modifications and the expression of nanoparticle concentrations by iron content (magnetite core). This step was crucial for the reliability of the efficiency of the comparative evaluation of DNA/MNPs interactions.

2.1. Evaluation of Magnetic Properties of Fe_3O_4 -Based Nanosorbents

To assess the influence of surface modification on the rate of magnetic separation, we measured the time from external magnetic field application to obtain the complete MNPs collection. A series of photos before, during, and after applying an external magnetic field were taken, and exemplary images are shown in Figure 2a. In addition, magnetization curves were recorded for each nanoparticle type (selected examples shown in Figure 2b), and the saturation magnetization values were determined.

As can be seen, functionalized nanoparticles retain their ability to magnetic separation, but the rate of magnetic collection strongly depends on the type of surface coating. The rates of MNPs separation were compared to MNPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@PEI}$, which were used as an internal benchmark (up to 50 s). The fastest separation (up to 30 s) was observed for nanoparticles coated with silica, amine-silica, and commercial MNPs. This can be attributed to their sizes and morphology. In the case of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@TMOS}$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@APTMS}$, partial agglomeration at the silanization stage typically occurs, resulting in large, multi-core structures. On the other hand, commercially available nanoparticles have a larger core diameter than nanoparticles obtained by co-precipitation, which is also reflected in their behavior in a magnetic field. Furthermore, nanoparticles decorated with GO and GOCOOH were characterized by good colloidal stability and rapid separation (up to 40 s) in the

magnetic field compared to PEI-coated magnetic cores. Notably, when attached to GO and carboxylated graphene oxide, magnetic nanoparticles gain properties different from those obtained from other modifications. It was noticed that such nanoparticles tend to form macroscopic graphene-like flakes (row 3, column 2 in Figure 2a). Such behavior of the obtained magnetic nanostructures confirms the effectiveness of the Fe_3O_4 decoration with graphene oxide sheets. However, the tendency of such nanoparticles to agglomerate via π - π stacking does not deteriorate their applicability as nano sorbents, as they can be easily redispersed through sonication.

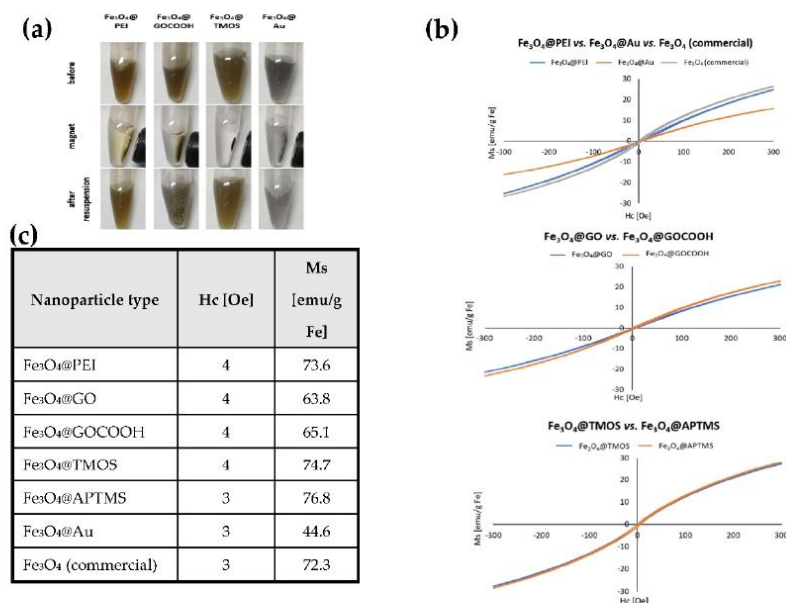


Figure 2. (a) Images of the response of chosen MPNs to the external magnetic field and their appearance after brief resuspension, (b) magnetization curves of MNP types obtained by VSM. The external field sweeps from -300 to $+300$ Oe. Magnetization units are represented by emu/g Fe, (c) calculated values of specific saturation magnetization of MNP series. H_c —coercivity field, M_s —saturation magnetization.

Macroscopic observations were confirmed by detailed magnetometric analysis. As shown in Figure 2b, coercivity values were low, indicating that synthesized MNP show typical superparamagnetic properties. This is also evidenced by the relatively high saturation magnetization values (Figure 2c), which are slightly lower but comparable to the magnetization of pure magnetite (92 emu/g). As can be seen in the detailed diagrams presented in Figure 2b, the $M(H)$ magnetization curves in a wide range of magnetic fields correlate with the saturation magnetization values. The similar nanoparticle types compared with each other show a similar course of the magnetization process (see $\text{Fe}_3\text{O}_4@GO$ vs. $\text{Fe}_3\text{O}_4@GOCOOH$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@TMOS$ vs. $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTMS$). The poor magnetizing ability of $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ compared to $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI$ and Fe_3O_4 (commercial) is also confirmed. Obtained values in most cases were still high enough to employ MNPs as powerful nano sorbents. On the other hand, $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ core-shell nanoparticles show a poor capability for magnetic separation (up to 120 s) and relatively low magnetization saturation (44.6 emu/g). This phenomenon can be explained by the presence of a conductive Au shell, which significantly reduces the nanoparticle magnetism [41] due to the mass effect of the non-magnetic coat-

ing. This type of MNPs separation was ineffective; Au-coated MNPs were excluded from detailed studies on DNA adsorption/desorption.

2.2. ζ -Potential Measurements

ζ -potential parameter of synthesized MNPs has been used to portray the changes in their surface modification (Figure 3). From the family of studied nanoparticles, only $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ (25.3 mV) and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTMS}$ (30.2 mV) are characterized by a positive charge due to the presence of protonated amino groups of the ligands. Commercial MNPs possess an intrinsic negative charge (−22.6 mV). The anionic character of these nanoparticles without polymer shells in near-neutral pH (different from the expected, intrinsically slightly cationic, bare iron(II,III) oxide) comes most likely from the complexation of the surface atoms by anions—either naturally occurring in the sample, or compounds added as a surface stabilizer (e.g., commonly used citrate) [44]. The negative charge of GO-decorated Fe_3O_4 (−16.3 mV) and GOCOOH-decorated Fe_3O_4 (−23.3 mV) confirms that originally cationic, PEI-coated iron(II,III) oxide nanoparticles are efficiently incorporated into the structure of graphene oxide. The intrinsic negative charge of GO and GOCOOH derives from carboxyl and other oxygen-containing groups on its surface. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TMOS}$ (−32.0 mV) are negatively charged due to silanol groups of the silica shell. On the other hand, the negative charge of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (−16.5 mV) comes from a citrate ion, which acts as a stabilizer of gold nanoparticles. It can be concluded that all nanoparticles gained the expected charge due to their coatings, proving their ligand attachment effectiveness.

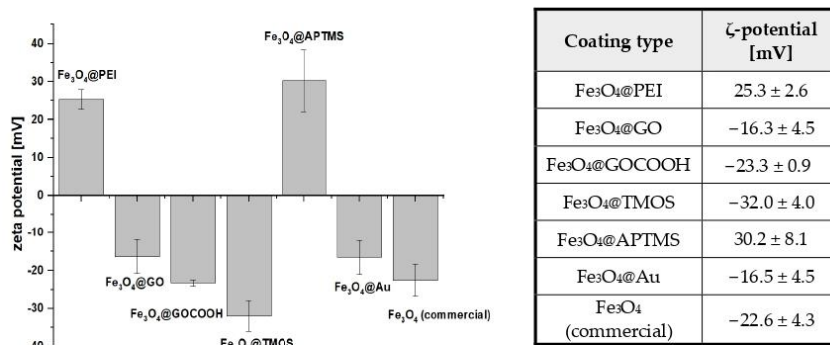


Figure 3. ζ -potential of modified magnetic nanoparticles ($n = 3$).

2.3. MNPs Morphology (Bright-Field Scanning Transmission Electron Microscopy)

Another critical parameter influencing the MNP's DNA sorption efficiency (e.g., described above silica or amine-silica coated) is their morphology. For this reason, the family of nanoparticles has been characterized by STEM. Average nanoparticle sizes were investigated based on the analysis of the obtained micrographs (Figure 4). Despite the same sizes of magnetic cores (except MNPs shown in Figure 4g), nanoparticles differ significantly in terms of their morphology, which is caused by surface modification. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ are characterized by the smallest dimensions (average diameter 8.1 nm—Figure 4a) compared to other structures. Decoration of magnetic MNPs with graphene oxide (b,c), solid silica, or amine-silica shells (d,e) also can be observed in micrographs. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ nanoparticles have been successfully adsorbed on the surface of GO and GOCOOH by electrostatic self-assembly. Moreover, compared to $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ (magnetic core size 8.8 nm), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ are wrapped more closely at the GOCOOH flake surface (core size 9.0 nm). Based on the core sizes, the decoration process did not affect the average diameter concerning $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$. The formation of silica coatings significantly influences nanoparticle morphology, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TMOS}$, and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTMS}$. In both cases, larger structures are formed (34.4 and 165.1 nm, respectively), which may be explained by the occlusion of several Fe_3O_4 cores inside a single

silica shell. On the other hand, coating MNPs with solid gold results in a slight increase in diameter to 15.7 nm, and no significant agglomeration of nanoparticle cores were visible (Figure 4f). The only nanoparticles with originally different core diameters are commercial Fe_3O_4 nanoparticles (16.4 nm) shown in Figure 4g.

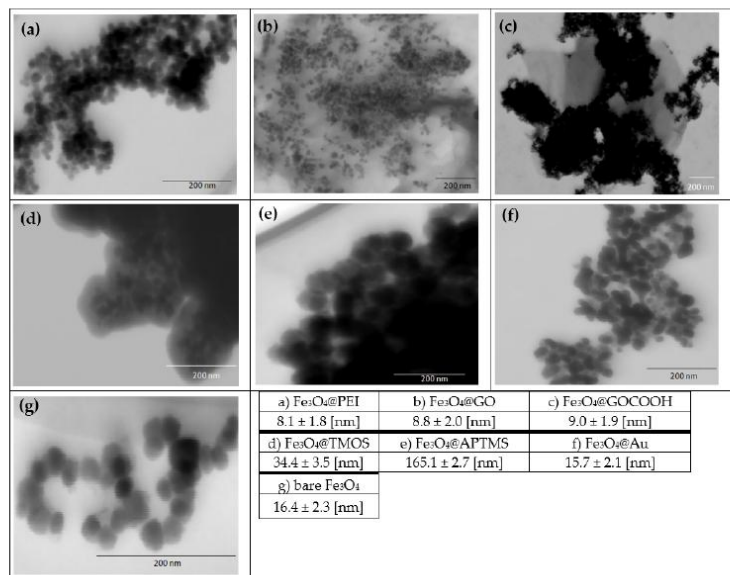


Figure 4. Fragments of STEM images and average sizes of modified, $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI$ -based magnetic nanoparticles (a–f) and commercial MNPs without polymer shell (g) (the average of the measurement results for at least 50 nanoparticles).

2.4. Compositional Analysis by Thermogravimetric Analysis (TGA)

Further characterization of the obtained core-shell nanoparticles in terms of stability and composition involved thermogravimetric analysis. The obtained thermograms show that the MNPs samples differ in thermal stability (Figure 5). TGA analysis shows that the most stable samples are those covered with a solid layer of gold. The course of thermogram of $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ MNPs is similar to parallelly co-precipitated NPs using the same protocol but without the addition of an external stabilizer (such NPs were not examined as nano sorbents in this study and used only for comparative characterization). The nanoparticles covered with a solid gold layer are characterized by the slightest loss of mass, indicating a small contribution of organic matter in their structure. In the case of silane-coated NPs, the oxidation temperature was lower than for the other samples. It can be concluded from the course of the TGA curve that both types of silane coatings have entrapped a higher amount of water than the other shell materials. APTMS-based coating exhibit the most significant weight loss, demonstrating its lower stability compared to TMOS-based silica. Slow oxidation of organic occlusions entrapped in a lattice of aminated silica is visible as the mass loss curve, which does not flatten despite the increase in temperature up to 750 °C. The significant mass loss is visible for MNPs modified with both graphene derivatives, which proves a substantial contribution of organic matter in the final product. Among the MNPs decorated with GO and GOCOOH, a minor loss is observed for the GOCOOH sample. This may be due to the lower water content and a slight reduction of GOCOOH compared to GO. A slight but noticeable weight loss (compared to unmodified MNPs) was observed for PEI-coated MNPs, which proves the effective stabilization of $\text{Fe}_3\text{O}_4@PEI$.

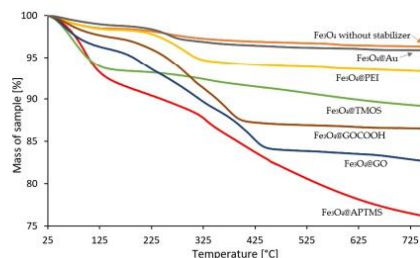


Figure 5. Thermograms of surface-modified magnetic nanoparticles. For comparison, a thermogram of homemade, non-stabilized iron oxide nanoparticles is presented, where no stabilizer was added during co-precipitation (solid orange line).

2.5. FT-IR Spectroscopy

The successful coating of Fe_3O_4 MNPs with various shells was also confirmed by FT-IR spectroscopy. In Figure 6, the FT-IR spectra of modified nanoparticles are presented and compared with the spectra of corresponding modifiers in a pure form. As can be easily noticed, the spectra of surface-modified magnetic nanoparticles manifest the characteristic bands derived from the related modifiers.

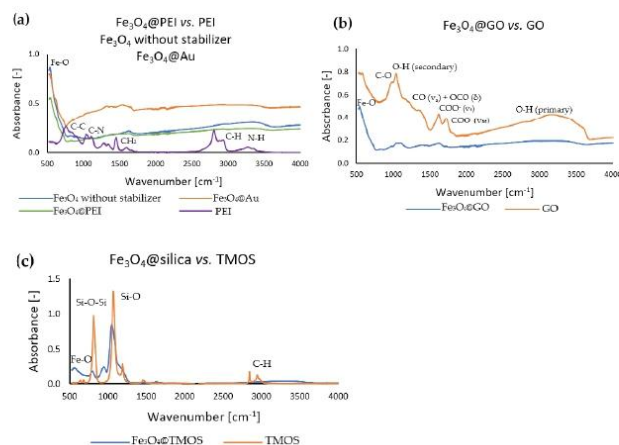


Figure 6. FT-IR absorption spectra of chosen nanoparticle types and corresponding surface modifiers in a pure form: (a) Fe_3O_4 without stabilizer, Fe_3O_4 @PEI and Fe_3O_4 @Au, (b) Fe_3O_4 @GO and pure graphene oxide, (c) Fe_3O_4 @silica and TMOS.

In all nanoparticle cases, the strong band derived from Fe-O is noticeable, around 500 cm^{-1} , characteristic of metal-oxygen bonds. Although Fe_3O_4 @PEI nanoparticles have been coated with a polymer, as evidenced by previous TGA and ζ -potential analysis, no characteristic bands assigned to the PEI polymer bonds can be observed in Figure 6a. This can be explained by a relatively thin molecular layer of ligands and thus their low amount in the analyzed sample. Hence, Au and PEI-coated MNPs do not differ significantly in the course of the spectrum from uncoated MNPs. On the other hand, clear bands corresponded to GO or TMOS modifiers shown in Figure 6b,c may indicate a higher amount deposited at the MNPs surface. Spectra of surface-modified magnetic nanoparticles show specific bands in the exact wavenumber ranges as pure materials. For Fe_3O_4 @silica, characteristic bands of Si-O and Si-O-Si bonds are noticeable, which corresponds well to TMOS precursor (except C-H bonds from methyl residuals) C-H. For Fe_3O_4 @GO and GO, similar bands assigned to C=O, C-O, and primary and secondary O-H bands, have also been identified.

The characteristic bands evidenced the presence of the carboxylate group: at $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$, the band attributed to the vibration COO^- (ν_{as}), and in the range 1300 cm^{-1} – 1400 cm^{-1} , the bands attributed to the vibrations COO^- (ν_{s})– and CO (ν_{s}) + OCO (δ). The bands (COO^- (ν_{s})) are more leading for pure GO in removing $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$.

2.6. Analysis of the Nanoparticles Composition

The elemental and ICP-MS/MS analyses were employed to determine the content of the nanoparticle's main elementary components. As seen in Table 1, and as expected, the dominant component element of MNPs is iron oxide, represented by the determined iron and estimated oxygen contents (based on the Fe/O molar fraction for nanoparticles without stabilizer). At the same time, the presence of different coatings was reflected by the contributions of different hetero-elements. In the case of nanoparticles decorated with organic coatings (PEI, GO, and GOCOOH), carbon was the dominant hetero-element. Due to the presence of polyethyleneimine in all types of particles (except bare MNPs), a certain proportion of nitrogen was observed, coming from the amine groups of the polymer. At the same time, the GO and GOCOOH decorated nanoparticles have a significantly higher ratio of carbon to nitrogen (4.11 for GO and 3.94 for GOCOOH, respectively) compared to PEI coated NPs (1.35). The shells of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TMOS}$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTMS}$ MNPs turned out to be much thicker than the remaining ones—the contribution of silicon atoms was in both cases above 40% (w/w) and was higher than the iron content. The unmodified silica obtained with TMOS coating was characterized by a low carbon and nitrogen content in contrast to the APTMS coating, in which numerous ω -aminopropyl residues have been trapped. The significant gold coverage of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ magnetic nanoparticles was also confirmed. The proportion of this element at 35.83% by mass is slightly lower than that of Fe as the main core constituent (43.21%). The obtained results unequivocally confirm the modification procedures' effectiveness for all subjected to test nanoparticles.

Table 1. Calculated compositions of studied MNPs according to ICP-MS/MS and elemental analysis.

Nanoparticle Type	% Fe in Core	% O in Core	% Dominant Hetero-Elements
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PEI}$	67.87 ± 0.38	26.85	C-2.29 $\pm$ 0.01; N-1.70 $\pm$ 0.04
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$	61.96 ± 0.22	24.62	C-6.62 $\pm$ 0.08; N-1.61 $\pm$ 0.08
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GOCOOH}$	60.83 ± 0.21	24.17	C-6.39 $\pm$ 0.04; N-1.62 $\pm$ 0.04
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TMOS}$	34.72 ± 0.91	13.79	Si-40.94 $\pm$ 0.46; C-0.56 $\pm$ 0.06; N-1.09 $\pm$ 0.02
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTMS}$	26.19 ± 0.68	10.40	Si-40.94 $\pm$ 0.46; C-9.14 $\pm$ 0.09; N-3.68 $\pm$ 0.04
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$	43.21 ± 0.43	17.17	Au-35.83 $\pm$ 0.21; C-1.31 $\pm$ 0.02
Fe_3O_4 without stabilizer	71.57 ± 0.44	28.43	-

2.7. Standardization of Magnetic Nano Sorbents Concentration

The total iron content in MNPs samples was determined using the ICP-MS/MS technique to standardize the dose of DNA nano sorbents taken into further tests. The obtained iron concentrations were used to calculate the amount of MNPs unequivocally. The idea was based on the assumption that all nanoparticle modifications were performed by directly comparing the nucleic acid binding efficiency between variously modified MNPs. As a result, the concentration of nanoparticles in all samples was unified to a total Fe concentration of $72.96 \pm 0.08\text{ }\mu\text{g/mL}$ (corresponding to the lowest concentration of iron in the undiluted MNPs sample). Based on the above data, appropriate sample solutions were prepared for further DNA adsorption and recovery studies to ensure the same concentration of magnetic cores within all experiments.

2.8. UV-Vis Absorption Spectra Analysis

The formation of surface coating usually entails a change in the optical properties of MNPs, which results in increased ligand absorption and scattering of the core-shell type structure. Absorption spectra shown in Figure 7 confirm the attachment of corresponding ligands or the formation of solid shells on the surface of magnetic cores. A slight band around 230–240 nm observed for Fe₃O₄@GO and Fe₃O₄@GOCOOH MNPs can be attributed to π - π^* transitions in graphene structure [45]. On the other hand, Fe₃O₄@TMOS and Fe₃O₄@APTMS MNPs show a high scattering, typical for larger structures [46]. In turn, the significant absorption at approximately 520–550 nm by Fe₃O₄@Au MNPs can be explained by the occurrence of surface plasmon resonance [47] (solid dark blue line). The results of the UV-Vis spectra analysis are generally consistent with the conclusions of the STEM and ζ -potential studies.

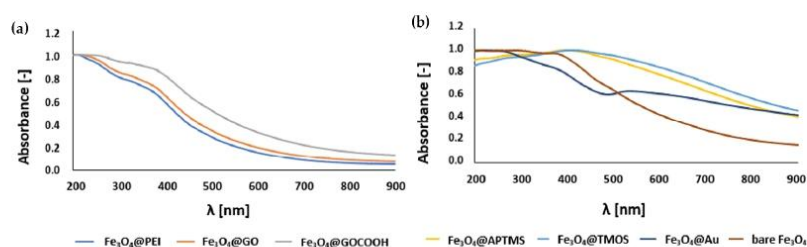


Figure 7. UV-Vis spectra of nanoparticles (a) initial Fe₃O₄@PEI cores and graphene oxide derivatives-decorated MNPs, (b) nanoparticles with solid shell (gold and silica/amine-silica). Spectra were normalized to the maximum value.

2.9. Studies of DNA Interactions with Modified MNPs

For the quantitative evaluation of calf thymus DNA adsorption and desorption processes, a spectrophotometric method based on the specific absorption wavelength of nucleobases at 260 nm was used [29]. The efficiency of the above steps was calculated as ΔA . It refers to the ratio [%] of DNA amounts in media before adsorption and after nanosorbent separation (Figure 8).

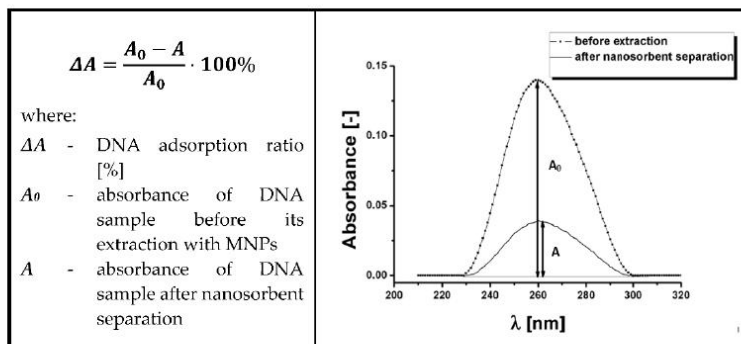


Figure 8. Procedure for evaluation of DNA adsorption efficiency on magnetic nano sorbents. Absorbance peak at 260 nm represents the DNA content in a sample before (dotted line) and after magnetic separation (for better interpretation, obtained spectra were subjected to peak finding in Origin software). The relative adsorption ratio (ΔA) is calculated using the given equation.

2.9.1. DNA Adsorption Studies

The efficiency of DNA adsorption can be influenced by several factors such as the nanoparticle surface and ligand type (solid shell, branched polymer), its charge (cationic

or anionic), and the concentration of nanoparticles or medium ionic strength. As we standardized the concentration of nanoparticles in the sample, the primary influence on the obtained results should originate only from the type of MNPs modification. This allowed us to observe and compare the effect of surface coating on calf thymus DNA interactions efficiency with modified MNPs. As the nanoparticle residuals in the analyzed sample could influence the registered absorbance value (strong absorption in the UV range, Figure 7), it was indispensable to provide their quantitative separation. Therefore, only MNPs capable of rapid and complete separation were used for this study. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, which expressed slow separation kinetics and low efficiency, were excluded. Nonetheless, after the magnetic separation of all tested nanoparticles from the DNA solution, a significant loss of absorbance at 260 nm was observed. This change manifests a relatively high DNA binding capacity of prepared magnetic nano sorbents. In the case of cationic nano sorbent, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$, a high adsorption ratio (represented by ΔA values near 99%) was observed even in the medium of low ionic strength (Figure 9a). Together with increasing the Na^+ or Mg^{2+} concentration, this efficiency diminishes to even ~37% when calf thymus DNA was dissolved in an aqueous solution containing 1M Mg^{2+} . This can be explained that the increase of the medium ionic strength can result in stronger DNA charge shielding, which adversely affects the adsorption process due to the electrostatic attraction. The observed results are in accordance with the postulated interaction mechanism, in which the positively charged surface of nanoparticles attracts negatively charged DNA structure.

As shown in Figure 9c,d, the opposite trend to $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ in solution ionic strength influence on the dsDNA adsorption can be observed for anionic nanoparticles decorated with graphene oxide and its carboxy-derivative. In this case, the main driving force for DNA adsorption is most likely π - π bonds formation with aromatic rings of carbon nanomaterial surface. However, the negative charge present at its surface can efficiently decrease nucleic acid attraction and adsorption. Nonetheless, a high concentration of cations in a binding medium can reduce the Debye Length of carbon nanomaterials. Its effectively attenuates electrostatic repulsion between DNA and nanoparticles. As observed, the adsorption efficiency increases when the medium ionic strength increase, from 32 to 96% for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ and 22 to 99% for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GOCOOH}$ (Figure 9c,d). At a salt (Na^+ and Mg^{2+}) concentration of 0.5 M, both nanoparticle types showed almost quantitative adsorption of DNA, while the adsorption efficiency in water was significantly lower, approximating 30% for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ and 20% for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GOCOOH}$. It may be explained by the slight difference in surface charge density (see ζ -potential studies) of both GO derivatives. As was mentioned above, the dominant mechanism for DNA adsorption on graphene oxide (and its derivative) is hydrophobic π - π stacking between aromatic rings. However, the hydrogen bond formation and donor-acceptor interactions (between oxygen-bearing moieties of GO and DNA nucleobases) should also be considered. In this point of view, GOCOOH provides oxygen functional groups that most likely can additionally interact with DNA (slightly lower adsorption efficiency in water).

In the case of silica-coated nanoparticles, both with positive ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTMS}$) and negative ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TMOS}$) surface charge, a moderate ability to DNA binding (not exceeding 58% for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTMS}$ and 47% for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TMOS}$) was observed (Figure 9e,f). Moreover, for the above efficiency, the ionic strength of the solution was of rather limited influence. We expect that the higher the magnetic core agglomeration during their modification, the smaller the specific surface area available further for DNA adsorption of such nanoparticles, especially versus those where the cores agglomeration was not observed. Therefore we can note weaker adsorption efficiency for large, multi-core MNPs nanostructures coated with silica and amino-silica. The above observations can be explained because the formed, modified magnetic nanoparticles are multi-core constructs (Figure 4e,f). For this reason, the overall specific area available for DNA adsorption for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTMS}$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TMOS}$ nanoparticles is highly reduced compared to other investigated single-core MNPs. The last investigated nano sorbent, commercial non-encapsulated nanoparticles, distinguishes the most significant sensitivity to the composition of the adsorption medium—a strong positive

effect of divalent cations can be noticed (adsorption ratio increase from 54% for 0 M to 98% for 1 M MgCl_2). However, what is of particular interest in the case of monovalent cations, adsorption decreases with increasing ionic strength (from 0 M to 1 M NaCl) (Figure 9b). As there is no precise information from the manufacturer regarding nanoparticle surface composition, the obtained results can be explained by the hydration or anion association on the Fe_3O_4 surface, which gained an anionic and polar character.

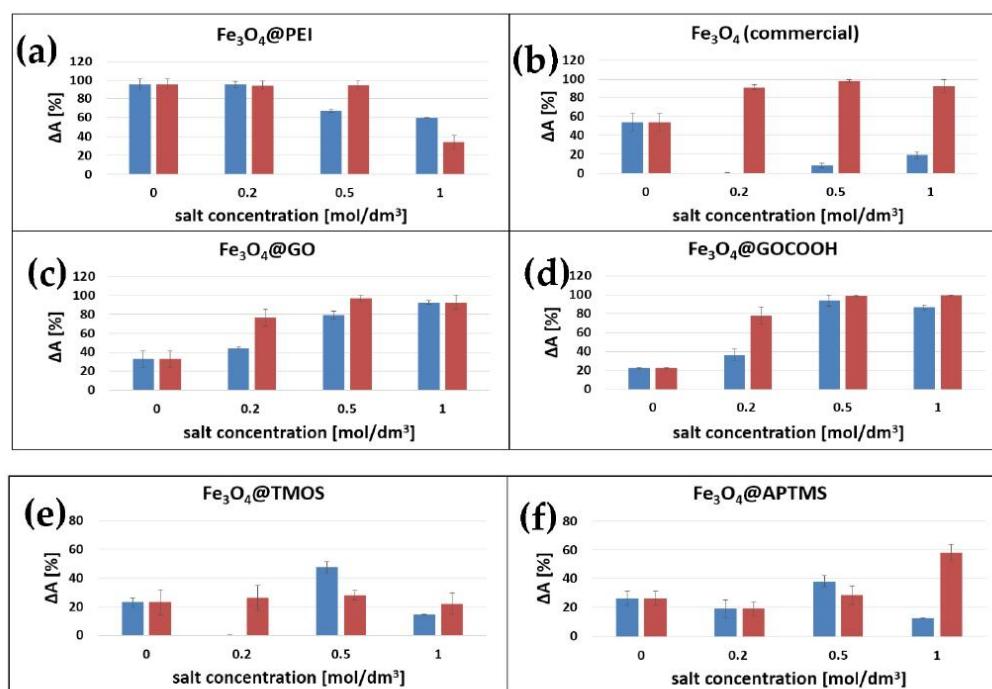


Figure 9. Effect of salt concentration and cation valency (Na^+ —blue bars, Mg^{2+} —red bars) on the adsorption ratio of calf thymus DNA (ΔA) on various types of Fe_3O_4 -based magnetic nano sorbent. Extraction medium composition is an essential factor in DNA binding and subsequent elution from the surface of magnetic nanoparticles. Inefficient adsorption of nucleic acids on nanoparticles may result from electrostatic repulsion between negatively charged nucleic acids and several types of examined nanoparticles. This prompted us to increase the ionic strength of the adsorption medium. The main driving force behind DNA adsorption is the high concentration of ions that reduce the Debye length in the binding solution. This cause effectively shields negative charges and intensely weakens the repulsive electrostatic forces between DNA and nanoparticles.

In general, the DNA extraction efficiency within this study may be influenced by factors such as (i) nanoparticle active surface area—long DNA chains may have a problem attaching to a nanoparticle with very small size; (ii) surface charge—DNA binding by cationic nanoparticle can be driven by electrostatic interactions; (iii) dispersion—the real surface area of MNPs per concentration unit may vary after modification with different coatings, e.g., multi-core particles or their aggregates; (iv) surface coatings types, like in the case of graphene oxide and possible π - π interactions with DNA.

Because of magnetic core concentration standardization in our study, the dominant factor influencing the extraction efficiency is the type of Fe_3O_4 surface coating, its charge, expressing possible interactions, and dispersion degree. The effect of surface charge is visible in the example of cationic nanoparticles coated with polyethyleneimine (characterized

by very good adsorption due to electrostatic attraction of anionic DNA backbones). On the other hand, multi-core and aminated silica-coated MNPs are characterized by a poor DNA extraction efficiency due to the limited surface area available for adsorption.

Na^+ and Mg^{2+} ions influence both binding and desorption processes. Their presence is associated with ion bridging and charge screening during the interaction of DNA and nanoparticle surface. On the other hand, during the desorption process of nucleic acids from modified MNPs, their complexation by EDTA may play a significant role.

2.9.2. Effect of EDTA Concentration on the Obtained Reliability of UV-Vis Results

Magnetic nanoparticles are investigated from the point of view of their application for nucleic acid adsorption, extraction, and its further desorption back to the solution. Both these steps, adsorption and desorption, take place in different environments. Typically, buffered and slightly alkaline media (pH~8.0) containing salt and chelating agents should be used for DNA desorption from nanoparticles [26,37]. The most common chelating agent is EDTA, while there are some discrepancies in the literature regarding its appropriate concentration, where typically 0.1–10 mM is used [26,37,48,49]. Moreover, the presence of EDTA in the desorption medium can have pros and cons. Apart from inhibiting nucleic acids restriction enzymes (DNases, RNases) and facilitating nucleic acid desorption (destabilization of coordination bonds and salt bridging), it can also negatively influence the amplification efficiency of nucleic acids. This was a motivation to initially use EDTA in a desorption medium at 1 mM. However, it had to be diminished even to 0.1 mM. Figure 10 shows the influence of EDTA concentration in desorption media on obtained results (for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ nanoparticles as an example). Moreover, the UV-Vis spectra of desorption buffer with two different EDTA concentrations and formed complex of EDTA with Fe^{3+} are presented.

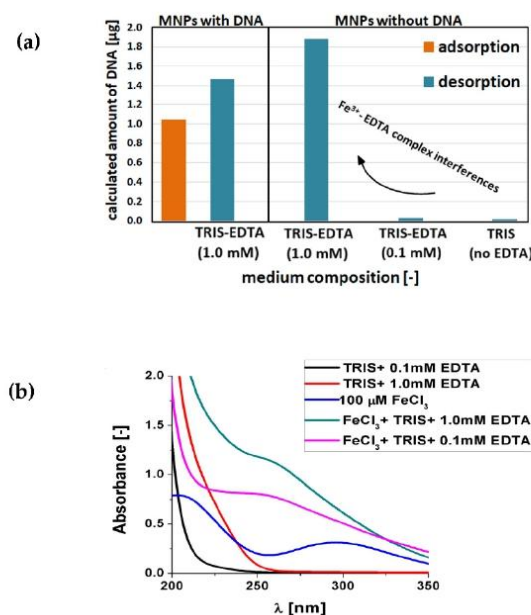


Figure 10. (a) The calculated theoretical amount of DNA in desorption media (blue bars) with different EDTA content after incubation with $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ MNPs. Orange bars—signal obtained at adsorption step, blue bars—at desorption step. (b) Influence of the presence of iron(III) ion on the UV-Vis absorption spectra of individual desorption media with different EDTA concentrations.

First experiments using 10 mM TRIS-HCl of pH 8.0 and 1 mM EDTA as desorption media resulted in unexpectedly high DNA recovery (%), indicating the increase in nucleic acid concentration in the solution after its adsorption and desorption steps (Figure 10a). These repeated results raised doubts about the validity of the spectrophotometric method of DNA concentration determination in the desorption procedures [29,50]. Similar experiments for all nanoparticles without initially adsorbed calf thymus DNA showed a significant increase in UV-Vis absorbance for 260 nm. This confirmed that EDTA in the concentration of 1 mM has a crucial impact on the accuracy of desorption process evaluation using the established UV-Vis method. The reason was probably related to EDTA-induced stripping of Fe^{3+} from the magnetite core. The effect was additionally confirmed on UV-Vis spectra registered for 10 mM TRIS-HCl of pH 8.0 with EDTA (1 mM or 0.1 mM) solution with or without the addition of 100 μM FeCl_3 (Figure 10b). As clearly seen, EDTA forms a complex with Fe^{3+} ion with a strong absorption band at around 260 nm (analytical wavelength in desorption analysis). Notably, a 10-fold decrease of the chelating agent concentration (to 0.1 mM) thoroughly eliminated its interference considering all types of MNPs (Figure 8a, Fe_3O_4 @PEI as example). The background absorbance of supernatants was negligible, only slightly more significant than in the case of the complete absence of EDTA in the desorption medium. Therefore, for further studies on the DNA extraction process, TRIS buffer with 0.1 mM EDTA was used [50]. Such concentration seems to be a trade-off between ensuring the stability of the nucleic acid during the extraction process (by inhibiting nucleases) and suppressing interferences during spectrophotometric DNA determination.

2.9.3. DNA Desorption and Recovery Studies

The final step of the presented investigations covers evaluating the calf thymus DNA recovery from the surface of the analyzed nanoparticles. UV-Vis spectra registered for solution (optimized as described above) after desorption and magnetic separation of nanoparticles enabled the assessment of DNA recovery concerning the amount of DNA adsorbed (100%) on nanoparticles (Figure 11). The desorption process was examined in various conditions, starting from mild (room temperature, short, 5-min incubation), gradually moving to more drastic (30-min incubation at 70 °C).

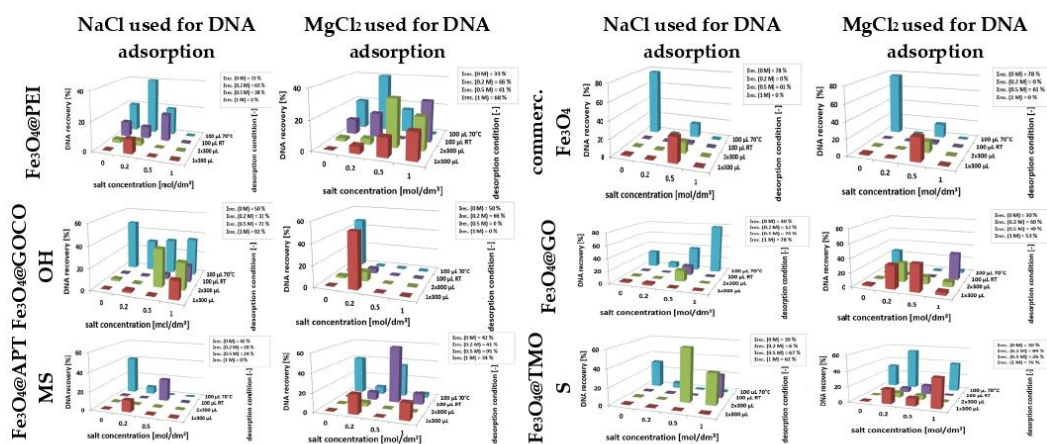


Figure 11. DNA recovery ratios obtained at individual desorption steps. Left column—adsorption recoveries carried out in a solution containing Na^+ cation, right column— Mg^{2+} cation. Insets show the cumulative recoveries obtained for each magnetic nano sorbent under defined DNA adsorption conditions (salt concentration).

The 3D graphs presented in Figure 11 show the DNA recovery ratios at its individual desorption stages (Z-axis) versus different ionic strengths of the adsorption media (X-axis).

The desorption studies were carried out for nanoparticles used in adsorption experiments in media of various ionic strengths. The cumulative desorption efficiencies for individual media with different salt contents are presented as corresponding insets in Figure 11.

The mono- and divalent cations (Na^+ and Mg^{2+}) influence several factors during DNA interaction with surfaces, e.g., charge screening, interactions with DNA backbone, dsDNA structure stabilization, or with chelating agents. These result from valence, polarizability, and EDTA chelating capacity differences. The DNA sugar-phosphate backbone shows a strongly anionic character in media with a pH close to neutral. Moreover, investigated surfaces express different charges, positive or negative. Multivalent electrolytes, in particular magnesium, are the most effective in charge screening and formation of salt bridges between adjacent anions [51,52]. Monovalent cations can bind to the DNA backbone as counterions neutralize the negatively charged DNA surface without bridging [53]. Cations' co-adsorption facilitates DNA binding on the modified surfaces, which also possess a negative charge [54]. It was observed that in the case of the electrostatic mechanism of DNA interaction with cationic nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PEI}$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTMS}$), the beneficial effect of magnesium ions is more visible than for nanoparticles characterized by negative surface charge (lack of desorption in 1 M NaCl and 68% and 34% in 1 M MgCl_2 , respectively). In previously published works, it has been confirmed that the divalent ions support the formation of dense and more rigid DNA adsorbates due to the increased charge shielding and salt-bridging effect [51]. What is more, the facility of Mg^{2+} ion chelation by EDTA may favor the degradation of nanoparticle-DNA assemblies at the desorption step. Similarly, silica-coated nanoparticles exhibit slightly better DNA recoveries (from 0 to 42% for $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTMS}$ and from 0 to 67% for $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TMOS}$, respectively) when co-adsorbed with magnesium ions, which is consistent with a few reports in which both flat surfaces and SiO_2 -coated nano sorbents were examined [52,55].

Nanoparticles decorated with graphene derivatives (GO and GOCOOH), which interact with DNA primarily by attracting aromatic rings or donor-acceptor bonds, exhibit substantially different behavior in the DNA desorption process. In their case, magnesium ion did not promote DNA release. Additionally, significantly better DNA recovery ratios (up to 52% for $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GOCOOH}$ and from 0 to 78% for $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$) can be observed in more aggressive desorption conditions (long desorption times, elevated temperature), which indicates possibly slower desorption kinetics. A slight, beneficial effect of GO carboxylation on DNA desorption was also observed, presumably related to the increased content of polar, oxygen-containing groups available for hydrogen bonding. Commercial nanoparticles with larger diameters and without an additional shell should be considered separately. For such MNPs, the anionic and polar character of the surface is determined by the presence of hydroxyl groups and anions adsorbed on the bare Fe_3O_4 surface. The results obtained for these nanoparticles, e.g., relatively low DNA recoveries and good efficiency of its uptake, indicate a high nanomaterial affinity to DNA, resulting in its hindered desorption. Detailed results of cumulative desorption efficiencies (Insets in Figure 11) confirm the need for individual selection of optimal desorption parameters for each type of nanoparticle used as a DNA nano sorbent.

3. Materials and Methods

3.1. Reagents

Iron(III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), iron(II) chloride tetrahydrate ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 25% ammonium hydroxide (NH_4OH), branched polyethyleneimine (PEI) $M_w = 25$ kDa, hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH), 96% ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), tetramethyl orthosilicate (TMOS), sodium borohydride (NaBH_4), gold(III) chloride trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), sodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), citric acid ($\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2$), hydroxylamine hydrochloride ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$), hydrochloric acid ($\geq 37\%$) and nitric acid ($\geq 69.0\%$)—both for trace analysis, deoxyribonucleic acid from calf thymus, sodium chloride (NaCl), magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Trizma base (TRIS, $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$) were purchased from

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) was from Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA). Graphene oxide (GO) was prepared by oxidation of natural graphite according to Hummer's method [56] as described previously by Ziolkowski [45]. Carboxylated graphene oxide (GOCOOH) was prepared based on the methodology described by Song [57]. Iron(II,III) oxide nanoparticles suspension without polymer stabilizer, dispersed in water at 3 wt.%—further referred to as commercial Fe_3O_4 MNPs) was from PlasmaChem GmbH (Berlin, Germany). Iron, gold, and yttrium standard solutions were purchased from ULTRA Scientific, Inc (North Kingstown, RI, USA). High-purity water was produced by an Elix Water Purification system (Millipore, Molsheim, France) and used throughout this work.

3.2. Synthesis of Surface-Functionalized Magnetic Nanoparticles

In order to obtain a family of magnetic nanoparticles with various surface modifications, in the first stage Fe_3O_4 @PEI nanoparticles were obtained by co-precipitation and then subjected to surface functionalization. Details of the experimental procedures are given in sections from Section 3.2.1. to Section 3.2.4, and the amounts of reagents used are summarized in Table 2.

Table 2. Summary of the amounts of reagents used in the synthesis of nanoparticles.

	Reagent	Weight/Volume Used	Amount [molar]
Fe_3O_4 core synthesis	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4.886 g	18.07 mmol
	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.982 g	15 mmol
	$\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (core synthesis)	15 mL (25%)	218 mmol
	PEI	20 mL (20 mg/mL)	16 μmol
GO/GOCOOH coating	Fe_3O_4 @PEI MNPs	5 mL ($\text{OD}_{380} = 1.5$) = 4.612 $\mu\text{g/mL}$	(-) Molar mass unknown
	GO	5 mL (10 mg/mL)	(-) Molar mass unknown
	GOCOOH	5 mL (10 mg/mL)	(-) Molar mass unknown
Silica/amine-silica coating	Fe_3O_4 @PEI MNPs	150 mL ($\text{OD}_{380} = 1.5$) = 4.612 $\mu\text{g/mL}$	(-) Molar mass unknown
	$\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (silica coating synthesis)	6 mL (25%)	87.2 mmol
	TMOS (silica coating)	600 μL	4.07 mmol
	TMOS (amine-silica coating)	450 μL	3.06 mmol
	APTMS	150 μL	0.64 mmol
Au coating	Fe_3O_4 @PEI MNPs	80 mL ($\text{OD}_{380} = 1.5$) = 4.612 $\mu\text{g/mL}$	(-) Molar mass unknown
	$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Au-seeds)	10 mL (1 %)	0.25 mmol
	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20 mL (38.8 M)	77.60 μmol
	NaBH_4	4.5 mL (0.075%)	89.21 μmol
	NaOH	250 mL (10 mM)	25.00 mmol
	$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Au-coating)	100 μL (10 mM)	1 μmol
	$\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$	100 μL (30 mM)	3 μmol

3.2.1. Fe_3O_4 @PEI Magnetic Cores

Synthesis of iron(II,III) oxide nanoparticles was carried out using the modified co-precipitation method described by Zhou et al. using PEI as stabilizing ligand instead of sodium citrate [41]. The reaction was carried out at 90 °C under a nitrogen atmosphere with mechanical stirring at 2000 rpm. 4.886 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 2.982 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ were

dissolved in 120 mL of water, and then 15 mL of a 25% ammonium hydroxide was quickly added. After 10 min, 20 mL of PEI aqueous solution (20 mg/mL) was injected. The stirring was carried out for the next 2 h. Then, the previously cooled suspension of Fe_3O_4 nanoparticles was washed five times by magnetic decantation, and the purified MNPs were reconstituted in 500 mL ultrapure water. For the separation of nanoparticles, cylindrical neodymium magnet ($d = 70$ mm, $H = 50$ mm) N42 was used. Magnetic nanoparticles coated with hyperbranched PEI were subjected to surface modification or used as obtained. A stock solution of Fe_3O_4 @PEI nanoparticles with an optical density of $\text{OD}_{380} = 1.5$ in suitable solvents was used for further steps. MNPs without stabilizer (used for comparative purposes) were synthesized according to the same protocol but without the addition of PEI.

3.2.2. GO and GO-COOH-Decorated Fe_3O_4

The procedures of decorating iron oxide(II,III) nanoparticles with GO and GOCOOH were carried out analogously. After 15 min sonication, 5 mL of Fe_3O_4 MNPs suspension ($\text{OD}_{380} = 1.5$) was added to 5 mL of GO/GOCOOH (10 mg/mL), and the whole mixture was magnetically stirred for 30 min. Then the nanoparticles were washed three times by magnetic decantation.

3.2.3. Silica and Amine-Silica Coated Fe_3O_4

Silica-coated nanoparticles were prepared by the Störber method according to the modified procedure described by Z. Zhao [58]. Then, 150 mL of PEI-coated MNPs suspension ($\text{OD}_{380} = 1.5$) in anhydrous ethanol, 7.5 mL of deionized water, and 6 mL of ammonium hydroxide solution were mixed and sonicated for 30 min. 600 μL of TMOS was added into the mixture (in portions of 100 μL , with 10 min intervals of sonication) and vigorously stirred for the next 4 h at room temperature to allow the formation of silica layers. The obtained nanoparticles were washed three times by magnetic separation. To obtain nanoparticles coated with amine-silica, the mixture of TMOS and APTMS (3:1, v/v), instead of pure TMOS, was used, while the rest of the preparation procedure remained the same.

3.2.4. Fe_3O_4 @Au Core-Shell Nanoparticles

Synthesis of spherical gold nanoparticles (Au seeds) was carried out with NaBH_4 reduction of Au(III) using the method described by Brown et al. [59]. 10 mL 1% HAuCl_4 solution and 900 mL of H_2O were stirred magnetically. After 5 min, 20 mL of 38.8 M sodium citrate was added, followed by 4.5 mL of freshly prepared 0.075% NaBH_4 . The Au colloid solution was stirred for another 10 min. To prepare Fe_3O_4 @PEI decorated with Au seeds, to 150 mL of Au nanoparticle's suspension, 80 mL of a stock PEI-coated MNPs solution was added dropwise. The mixture was stirred for the next 4 h at room temperature. Washing was performed by magnetic decantation using 0.5 mM Na/citrate buffer pH 5.5. Then nanoparticles were suspended in 10 mM 250 mL NaOH for further Au deposition. To obtain Fe_3O_4 @Au core-shell nanoparticles, a solid gold coating was deposited on the nanoparticles previously decorated with gold seeds by hydroxylamine-mediated HAuCl_4 reduction. Au seeds-decorated Fe_3O_4 @PEI, 100 μL of 10 mM HAuCl_4 , and 100 μL of 30 mM $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ were added in 4 portions each at 3-min intervals with continuous stirring.

3.3. Nanoparticles Characterization

3.3.1. Characterization of the Morphology, Magnetic and Surface Properties of MNPs

The magnetic properties of powdered MNPs samples were characterized by the SQUID vibrating sample magnetometer (QD-VSM) (Quantum Design). The suspension of nanoparticles was dried into powder form by magnetic collection, followed by drying the residual in a laboratory dryer at 60 °C until a stable mass of nanoparticle powder was obtained. The hysteresis loops were recorded at the varying magnetic field between -2.0 and $+2.0$ T at a constant temperature of 300 K stabilized to 0.02 K accuracy. For all types of nanomaterials, UV-Vis absorption spectra were recorded using a Lambda 25 spectrophotometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and quartz microcuvette with a

1 cm pathlength (Hellma Analytics) in the range of 190–900 nm. ζ -potential of modified MNPs was measured by Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, UK) in disposable polystyrene cuvettes and dip cells with Pd electrodes. All ζ -potential measurements were carried out in three repetitions. BF-STEM nanoparticle micrographs were taken using Hitachi SU8230 ultra-high resolution field emission scanning-transmission electron microscope (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) at 30.0 kV accelerating voltage. Copper TEM grids coated with Lacey carbon film were, before observation, immersed in aqueous suspensions of MNPs and dried in ambient conditions.

3.3.2. Determination of Total Iron Concentration in MNPs Samples

MNPs samples were homogenized (1 h of ultrasound bath) and digested using aqua regia in a Speedwave Four microwave-assisted digestion system (Berghof, Eningen, Germany) for 30 min at increased temperature (from 50 to 240 °C) and pressure (from 10 to 50 bar) with yttrium as internal standard (10 µg/L final concentration). The concentration of iron in samples was determined using an inductively coupled plasma tandem mass spectrometer working as an element-specific detector. The Agilent 8900 ICP Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Tokyo, Japan) was equipped with a 2.5 mm quartz torch and the Pt-cones in the interface. The position of the torch and the nebulizer gas flow were adjusted daily, with emphasis paid to the increase the signal-to-noise ratio using a 1 µg/L solution of Co, Y, and Ti in 2% (v/v) HNO₃ and 2% (v/v) HNO₃, respectively. The RF power was 1550 W, nebulizer gas flow—1.09 L/min, reaction gas flow (hydrogen in ICP-MS/MS)—5.5 mL/min. The total concentrations of selected metal were calculated as a result of monitoring the mass/charge ratios 56 (⁵⁶Fe), registered in the on-mass mode after the production in plasma and collision-reaction cell of singly-positively charged ions, and normalization (⁸⁹Y) after daily external calibration against 10-point calibration lines (0–500 µg/L, R² > 0.9998).

3.3.3. Qualitative and Quantitative Characterization of Various MNPs Surface Coatings

FTIR measurements were carried out in Attenuated Total Reflectance (ATR) mode using the Nicolet iS10 apparatus with an adapter equipped with a diamond crystal (Thermo Scientific). Measurements were carried out in the mid-infrared range (500–4000 cm^{−1}) using: (i) solid samples of nanoparticle powders and (ii) surface modifiers in their pure form. Thermogravimetric analysis (TGA) was carried out using a TGA/DSC3+ thermogravimeter (Mettler Toledo) at a temperature increment 10 °C/min in a temperature window of 25–750 °C and air flow rate 60 mL/min. The total content of C, H, and N elements in modified MNPs was measured using a Vario EL III analyzer with a thermal conductivity detector (Elementar, Langensfeld, Germany) by the accurate weighting of the solid sample and its burning in oxygen at 1150 °C in a dynamic system. Fe, Au, and Si content in solid MNPs was established using the ICP-MS/MS technique, analogically to the methodology presented above (see Section 3.3.2; monitored isotopes: ²⁸Si, ⁵⁶Fe, ¹⁹⁷Au at on-mass mode), but solid samples before digestion were accurately weighted. The oxygen content in the cores of surface-modified MNPs was estimated using the molar ratio of Fe/O in the synthesized bare MNPs as the rest types of the nanomaterials were formed based on such cores (with specific FeO/Fe₂O₃ ratio).

3.4. Studies on DNA Interactions with Different MNPs Surfaces

To evaluate the efficiency of the DNA adsorption by various magnetic nanoparticles, 200 µL of DNA solutions (0.0786 mg/mL) in media of different salt content: 0.2, 0.5, and 1 M NaCl or MgCl₂ were prepared. Then, 100 µL of the above solution was mixed with 100 µL aqueous dispersion of magnetic nanoparticles. After 5 min of incubation, the nanosorbent was magnetically collected until the complete separation of nanoparticles was observed. The clear, colorless solution over a precipitate of nanoparticles was taken. In most cases, a separation process was accomplished within less than 1 min, except for nanoparticles Fe₃O₄@Au, for which at least 2 min were needed. Then, 150 µL of supernatant was taken

and placed in a quartz microcuvette in a Lambda 25 spectrophotometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Then, an absorption spectrum in the 200–350 nm range was captured.

The process of nucleic acids desorption with magnetic nanoparticles was also carried out. Unless otherwise stated, previously separated nanoparticles with adsorbed DNA were suspended in 300 μL of TRIS-EDTA (10 mM TRIS and 0.1 mM EDTA, pH 8). Then the mixture was sonicated for 30 s, left on the magnet to separate nanoparticles, and the supernatant was collected for UV absorption spectrum measurement. The influence of the desorption step duration was examined. For this purpose, 100 μL of the TRIS-EDTA buffer was added to the nanoparticles and left for 30 min. Then, the nanoparticles were separated using a magnet and discarded. Moreover, the influence of temperature on the desorption process was examined. For this purpose, 100 μL of the TRIS-EDTA buffer with nanoparticles was placed in an incubator (Mettler, Büchenbach, Germany) for 30 min at 70 $^{\circ}\text{C}$. To determine the DNA amount in samples after the adsorption/desorption step, the absorption coefficient was calculated, $2.26 (\mu\text{g}/\mu\text{L})^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, based on absorbance intensities of the standard curve. The total volumes of adsorption and desorption media (used for calculating total DNA content) were 200 μL and 800 μL , respectively.

4. Conclusions

The presented studies carried out a comprehensive, comparative analysis of the impact of Fe_3O_4 nanoparticles' surface modification on their physicochemical properties and DNA binding ability and recovery. A new approach to the co-precipitation method using PEI as a capping agent allowed us to obtain good-quality cationic nanoparticles covered with PEI in a one-step synthesis. The core-shell type nanoparticles synthesized in this way show good stability and shell-dependent magnetism (within limits 44.6–76.8 emu/g Fe, the best for $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@APTMS}$), which allowed them to be used as DNA nano sorbents. The efficiency of surface coating for all MNP types was qualitatively and quantitatively characterized by a combination of TGA, FTIR, ICP-MS/MS, and elemental analysis. Thanks to different interaction mechanisms with DNA, their capacity for reversible DNA binding was characterized. Comprehensive characterization of their morphology, composition, and surface properties has proven effective modification with PEI ligands, Au solid coating, silica, amine-silica, and GO/carboxylated GO decorations.

Among the examined nanoparticles, the most efficient in adsorption are $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@PEI}$ (near 99%), characterized by the electrostatic mechanism of DNA attraction. The most efficient in desorption are $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@GOCOOH}$ (near 78%), characterized by the hydrophobic and hydrogen bond-derived mechanism of DNA attraction. The significant influence of the ionic strength and valence of the extraction medium cation (Na^+ and Mg^{2+}) on DNA binding and recovery for the selected nanoparticle types was demonstrated. Based on studies of the desorption process under various conditions, it was concluded that individual selection of desorption conditions for each nanoparticle type is required to obtain high DNA recovery. During the research, it was also found that high EDTA concentration in the medium adversely affects the desorption process and acts as a potential source of interferences during spectrophotometric DNA determination due to iron(III) stripping from MNPs (inducing nanoparticles degradation). Therefore, a medium containing 0.1 mM EDTA was chosen for desorption process investigation in the presented research. These studies drive a new preparation protocol, which should be implemented during the effective design of new magnetic nano sorbents to rapidly isolate nucleic acids from complex samples.

Author Contributions: Conceptualization, R.Z.; methodology, A.S., R.Z., M.D. and M.M.; investigation, A.S., R.Z., M.D., M.T., M.M.-P. and A.K.; writing—original draft preparation, R.Z., M.D. and A.S.; writing—review and editing, R.Z., M.D. and M.M.; visualization, R.Z. and A.S.; supervision, R.Z., M.D. and E.M.; funding acquisition, R.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by: (i) IDUB against the COVID-19 project granted by Warsaw University of Technology under the program Excellence Initiative: Research University (IDUB) and (ii) by Warsaw University of Technology.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data available on request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Balogh, E.P.; Miller, B.T.; Ball, J.R. (Eds.) *Improving Diagnosis in Health Care*; National Academies Press: Washington, DC, USA, 2015; ISBN 0309377692.
- Ali, N.; Rampazzo, R.D.C.P.; Costa, A.D.T.; Krieger, M.A. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *Biomed Res. Int.* **2017**, *2017*, 9306564. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gupta, N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *J. Cytol.* **2019**, *36*, 116–117. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sambrook, J.; Russell, D.W. Extraction, Purification, and Analysis of mRNA from Eukaryotic Cells. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA, 2001; pp. 345–455, ISBN 978-0-87969-577-4.
- Wang, X.; Xing, L.; Shu, Y.; Chen, X.; Wang, J. Novel Polymeric Ionic Liquid Microspheres with High Exchange Capacity for Fast Extraction of Plasmid DNA. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *837*, 64–69. [\[CrossRef\]](#)
- Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, Applications, and Toxicities. *Arab. J. Chem.* **2019**, *12*, 908–931. [\[CrossRef\]](#)
- Wierucka, M.; Biziuk, M. Application of Magnetic Nanoparticles for Magnetic Solid-Phase Extraction in Preparing Biological, Environmental and Food Samples. *TrAC -Trends Anal. Chem.* **2014**, *59*, 50–58. [\[CrossRef\]](#)
- Chen, Y.; Liu, Y.; Shi, Y.; Ping, J.; Wu, J.; Chen, H. Magnetic Particles for Integrated Nucleic Acid Purification, Amplification and Detection without Pipetting. *TrAC -Trends Anal. Chem.* **2020**, *127*, 115912. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Poncelet, L.; Malic, L.; Clime, L.; Geissler, M.; Morton, K.J.; Nassif, C.; Da Fonte, D.; Veilleux, G.; Veres, T. Multifunctional Magnetic Nanoparticle Cloud Assemblies for: In Situ Capture of Bacteria and Isolation of Microbial DNA. *Analyst* **2021**, *146*, 7491–7502. [\[CrossRef\]](#)
- Ali, T.H.; Mandal, A.M.; Heidelberg, T.; Hussien, R.S.D. Sugar Based Cationic Magnetic Core-Shell Silica Nanoparticles for Nucleic Acid Extraction. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 13566–13579. [\[CrossRef\]](#)
- He, J.; Huang, M.; Wang, D.; Zhang, Z.; Li, G. Magnetic Separation Techniques in Sample Preparation for Biological Analysis: A Review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *101*, 84–101. [\[CrossRef\]](#)
- Torres-Rodríguez, J.; Soto, G.; López Medina, J.; Portillo-López, A.; Hernández-López, E.L.; Vargas Viveros, E.; Elizalde Galindo, J.T.; Tiznado, H.; Flores, D.-L.; Muñoz-Muñoz, F. Cobalt–Zinc Ferrite and Magnetite SiO₂ Nanocomposite Powder for Magnetic Extraction of DNA. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2019**, *91*, 33–43. [\[CrossRef\]](#)
- Ștefănescu, M.; Dippong, T.; Stoia, M.; Ștefănescu, O. Study on the Obtaining of Cobalt Oxides by Thermal Decomposition of Some Complex Combinations, Undispersed and Dispersed in SiO₂ Matrix. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2008**, *94*, 389–393. [\[CrossRef\]](#)
- Ștefănescu, M.; Stoia, M.; Dippong, T.; Ștefănescu, O.; Barvinschi, P. Preparation of Co_xFe_{3-x}O₄ Oxidic System Starting from Metal Nitrates and Propanediol. *Acta Chim. Slov.* **2009**, *56*, 379–385.
- Peng, F.; Liu, M.; Wang, X.; Ding, X. Synthesis of Low-Viscosity Hydrophobic Magnetic Deep Eutectic Solvent: Selective Extraction of DNA. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1181*, 338899. [\[CrossRef\]](#)
- Hice, S.A.; Clark, K.D.; Anderson, J.L.; Brehm-Stecher, B.F. Capture, Concentration, and Detection of Salmonella in Foods Using Magnetic Ionic Liquids and Recombinase Polymerase Amplification. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 1113–1120. [\[CrossRef\]](#)
- Ștefănescu, M.; Stoia, M.; Caizer, C.; Dippong, T.; Barvinschi, P. Preparation of Co_xFe_{3-x}O₄ Nanoparticles by Thermal Decomposition of Some Organo-Metallic Precursors. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2009**, *97*, 245–250. [\[CrossRef\]](#)
- Yuan, Q.; Liang, Z.; Wang, S.; Zuo, P.; Wang, Y.; Luo, Y. Size-Controlled Mesoporous Magnetic Silica Beads Effectively Extract Extracellular DNA in the Absence of Chaotropic Solutions. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2022**, *644*, 128831. [\[CrossRef\]](#)
- Silva-Santos, A.R.; Oliveira-Silva, R.; Sousa Rosa, S.; Paulo, P.M.R.; Prazeres, D.M.F. Affinity-Based Magnetic Particles for the Purification of Single-Stranded DNA Scaffolds for Biomanufacturing DNA-Origami Nanostructures. *ACS Appl. Nano Mater.* **2021**, *4*, 14169–14177. [\[CrossRef\]](#)
- Chiang, C.-L.; Sung, C.-S.; Wu, T.-F.; Chen, C.-Y.; Hsu, C.-Y. Application of Superparamagnetic Nanoparticles in Purification of Plasmid DNA from Bacterial Cells. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *822*, 54–60. [\[CrossRef\]](#)
- Da Silva, R.J.; Pedro, G.C.; Gorza, F.D.S.; Maciel, B.G.; Ratkovski, G.P.; Mojica-Sánchez, L.C.; Medina-Llamas, J.C.; Chávez-Guajardo, A.E.; de Melo, C.P. DNA Purification Using a Novel γ -Fe₂O₃/PEDOT Hybrid Nanocomposite. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1178*, 338762. [\[CrossRef\]](#)

22. He, Y.; Yi, C.; Zhang, X.; Zhao, W.; Yu, D. Magnetic Graphene Oxide: Synthesis Approaches, Physicochemical Characteristics, and Biomedical Applications. *TrAC-Trends Anal. Chem.* **2021**, *136*, 116191. [\[CrossRef\]](#)
23. He, Y.; Xie, T.; Tong, Y. Rapid and Highly Sensitive One-Tube Colorimetric RT-LAMP Assay for Visual Detection of SARS-CoV-2 RNA. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *187*, 113330. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Jiang, S.; Zhuang, J.; Wang, C.; Li, J.; Yang, W. Highly Efficient Adsorption of DNA on Fe³⁺-Iminodiacetic Acid Modified Silica Particles. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2012**, *409*, 143–148. [\[CrossRef\]](#)
25. Pang, Y.; Wang, C.; Wang, J.; Sun, Z.; Xiao, R.; Wang, S. Fe₃O₄@Ag. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *79*, 574–580. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Sarkar, T.R.; Irudayaraj, J. Carboxyl-Coated Magnetic Nanoparticles for mRNA Isolation and Extraction of Supercoiled Plasmid DNA. *Anal. Biochem.* **2008**, *379*, 130–132. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Saiyed, Z.M.; Ramchand, C.N.; Telang, S.D. Isolation of Genomic DNA Using Magnetic Nanoparticles as a Solid-Phase Support. *J. Phys. Condens. Matter* **2008**, *20*, 204153. [\[CrossRef\]](#)
28. Qi, L.; Xu, R.; Gong, J. Monitoring DNA Adducts in Human Blood Samples Using Magnetic Fe₃O₄@graphene Oxide as a Nano-Adsorbent and Mass Spectrometry. *Talanta* **2020**, *209*, 120523. [\[CrossRef\]](#)
29. Zhang, C.; Liu, W.-J.; Wang, T.-Y.; Qian, T.-T.; Ain, N.U.; Wu, L.-Q.; Wu, X.-N.; Cai, X.-P.; Zeng, Q.; Xie, H.-P. Fabrication of Surface Charge PH-Sensitive Multi-Bumpy Small Magnetic Bead with Ultrahigh Magnetic Content and Its Ultrahigh Loading Capacity and Salt-Free Rapid Isolation for DNA. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *189*, 113439. [\[CrossRef\]](#)
30. Paltrinieri, L.; Wang, M.; Sachdeva, S.; Besseling, N.A.M.; Sudhölter, E.J.R.; De Smet, L.C.P.M. Fe₃O₄ Nanoparticles Coated with a Guanidinium-Functionalized Polyelectrolyte Extend the PH Range for Phosphate Binding. *J. Mater. Chem. A* **2017**, *5*, 18476–18485. [\[CrossRef\]](#)
31. Chiang, C.-L.; Sung, C.-S.; Chen, C.-Y. Application of Silica-Magnetite Nanocomposites to the Isolation of Ultrapure Plasmid DNA from Bacterial Cells. *J. Magn. Magn. Mater.* **2006**, *305*, 483–490. [\[CrossRef\]](#)
32. Lee, A.H.F.; Gessert, S.F.; Chen, Y.; Sergeev, N.V.; Haghir, B. Preparation of Iron Oxide Silica Particles for Zika Viral RNA Extraction. *Heliyon* **2018**, *4*, e00572. [\[CrossRef\]](#)
33. Min, J.H.; Woo, M.-K.; Yoon, H.Y.; Jang, J.W.; Wu, J.H.; Lim, C.-S.; Kim, Y.K. Isolation of DNA Using Magnetic Nanoparticles Coated with Dimercaptosuccinic Acid. *Anal. Biochem.* **2014**, *447*, 114–118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Leonel, J.A.F.; Vioti, G.; Alves, M.L.; da Silva, D.T.; Meneghesso, P.A.; Benassi, J.C.; Spada, J.C.P.; Galvis-Ovallos, F.; Soares, R.M.; Oliveira, T.M.F.D.S. DNA Extraction from Individual Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Specimens: Which Is the Method with Better Results? *Exp. Parasitol.* **2020**, *218*, 107981. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Psifidi, A.; Dovas, C.I.; Bramis, G.; Lazou, T.; Russel, C.L.; Arsenos, G.; Banos, G. Comparison of Eleven Methods for Genomic DNA Extraction Suitable for Large-Scale Whole-Genome Genotyping and Long-Term DNA Banking Using Blood Samples. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0115960. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Riemann, K.; Adamzik, M.; Frauenrath, S.; Egensperger, R.; Schmid, K.W.; Brockmeyer, N.H.; Siffert, W. Comparison of Manual and Automated Nucleic Acid Extraction from Whole-Blood Samples. *J. Clin. Lab. Anal.* **2007**, *21*, 244–248. [\[CrossRef\]](#)
37. Rahnama, H.; Sattarzadeh, A.; Kazemi, F.; Ahmadi, N.; Sanjarian, F.; Zand, Z. Comparative Study of Three Magnetic Nanoparticles (FeSO₄, FeSO₄/SiO₂, FeSO₄/SiO₂/TiO₂) in Plasmid DNA Extraction. *Anal. Biochem.* **2016**, *513*, 68–76. [\[CrossRef\]](#)
38. Adams, N.M.; Bordelon, H.; Wang, K.-K.A.; Albert, L.E.; Wright, D.W.; Haselton, F.R. Comparison of Three Magnetic Bead Surface Functionalities for RNA Extraction and Detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 6062–6069. [\[CrossRef\]](#)
39. Yildiz, I. Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedical Separation and Purification. *Nanotechnol. Rev.* **2016**, *5*, 331–340. [\[CrossRef\]](#)
40. Schwertmann, U.; Cornell, R.M. *Iron Oxides in the Laboratory*; WILEY-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, 2000; ISBN 9783527613229.
41. Zhou, H.; Lee, J.; Park, T.J.; Lee, S.J.; Park, J.Y.; Lee, J. Ultrasensitive DNA Monitoring by Au-Fe₃O₄ Nanocomplex. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *163*, 224–232. [\[CrossRef\]](#)
42. Rocher, V.; Manerova, J.; Kinnear, M.; Evans, D. Direct Amine-Functionalisation of γ-Fe₂O₃ Nanoparticles. *Dalt. Trans.* **2014**, *43*, 2948–2952. [\[CrossRef\]](#)
43. Goon, I.Y.; Lai, L.M.H.; Lim, M.; Munroe, P.; Gooding, J.J.; Amal, R. Fabrication and Dispersion of Gold-Shell-Protected Magnetite Nanoparticles: Systematic Control Using Polyethyleneimine. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 673–681. [\[CrossRef\]](#)
44. Blank-Shim, S.A.; Schwaminger, S.P.; Borkowska-Panek, M.; Anand, P.; Yamin, P.; Fraga-García, P.; Fink, K.; Wenzel, W.; Berensmeier, S. Binding Patterns of Homo-Peptides on Bare Magnetic Nanoparticles: Insights into Environmental Dependence. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14047. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Ziolkowski, R.; Górski, L.; Malinowska, E. Carboxylated Graphene as a Sensing Material for Electrochemical Uranyl Ion Detection. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, *238*, 540–547. [\[CrossRef\]](#)
46. Pham, X.-H.; Hahn, E.; Kim, H.-M.; Son, B.S.; Jo, A.; An, J.; Thi, T.A.T.; Nguyen, D.Q.; Jun, B.-H. Silica-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Grafted onto Graphene Oxide for Protein Isolation. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 117. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Weng, C.; Li, X.; Lu, Q.; Yang, W.; Wang, J.; Yan, X.; Li, B.; Sakran, M.; Hong, J.; Zhu, W.; et al. A Label-Free Electrochemical Biosensor Based on Magnetic Biocomposites with DNAzyme and Hybridization Chain Reaction Dual Signal Amplification for the Determination of Pb²⁺. *Microchim. Acta* **2020**, *187*, 575. [\[CrossRef\]](#)
48. Zhang, M.; Li, L.; Li, B.; Tian, N.; Yang, M.; Zhang, H.; You, C.; Zhang, J. Adsorption of DNA by Using Polydopamine Modified Magnetic Nanoparticles Based on Solid-Phase Extraction. *Anal. Biochem.* **2019**, *579*, 9–17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

49. Saiyed, Z.M.; Parasramka, M.; Telang, S.D.; Ramchand, C.N. Extraction of DNA from Agarose Gel Using Magnetic Nanoparticles (Magnetite or Fe_3O_4). *Anal. Biochem.* **2007**, *363*, 288–290. [[CrossRef](#)]
50. Xu, J.; Chen, D.; Yang, Y.; Gong, H.; Gao, W.; Xiao, H. A One Step Method for Isolation of Genomic DNA Using Multi-Amino Modified Magnetic Nanoparticles. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 3324–3332. [[CrossRef](#)]
51. Nguyen, T.H.; Elimelech, M. Plasmid DNA Adsorption on Silica: Kinetics and Conformational Changes in Monovalent and Divalent Salts. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 24–32. [[CrossRef](#)]
52. Melzak, K.A.; Sherwood, C.S.; Turner, R.F.B.; Haynes, C.A. Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *181*, 635–644. [[CrossRef](#)]
53. Matthew, J.B.; Richards, F.M. Differential Electrostatic Stabilization of A-, B-, and Z-forms of DNA. *Biopolymers* **1984**, *23*, 2743–2759. [[CrossRef](#)]
54. Wu, M.; Kempaiah, R.; Huang, P.-J.J.; Maheshwari, V.; Liu, J. Adsorption and Desorption of DNA on Graphene Oxide Studied by Fluorescently Labeled Oligonucleotides. *Langmuir* **2011**, *27*, 2731–2738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Vandeventer, P.E.; Lin, J.S.; Zwing, T.J.; Nadim, A.; Johal, M.S.; Niemz, A. Multiphasic DNA Adsorption to Silica Surfaces under Varying Buffer, pH, and Ionic Strength Conditions. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 5661–5670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Hummers, W.S.; Offeman, R.E. Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1339. [[CrossRef](#)]
57. Song, M.; Xu, J. Preparation of Polyethylenimine-Functionalized Graphene Oxide Composite and Its Application in Electrochemical Ammonia Sensors. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 523–530. [[CrossRef](#)]
58. Zhao, Z.; Cui, H.; Song, W.; Ru, X.; Zhou, W.; Yu, X. A Simple Magnetic Nanoparticles-Based Viral RNA Extraction Method for Efficient Detection of SARS-CoV-2. *bioRxiv* **2020**, 961268. [[CrossRef](#)]
59. Brown, K.R.; Walter, D.G.; Natan, M.J. Seeding of Colloidal Au Nanoparticle Solutions. 2. Improved Control of Particle Size and Shape. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 306–313. [[CrossRef](#)]

Życiorys naukowy Autorki Rozprawy Doktorskiej

Artykuły naukowe w czasopismach z listy filadelfijskiej

1. A. Szymczyk, K. Soliwodzka, M. Moskal, K. Różanowski, R. Ziółkowski, Further insight into the possible influence of electrode blocking agents on the stem loop based electrochemical DNA sensor parameters. (2021) *Sensors and Actuators B: Chemical*, 354, 131086; DOI: 10.1016/j.snb.2021.131086. (IF: 9,2 pkt. MEiN: 140, liczba cytowań niezależnych*: 13)
2. A. Szymczyk-Drozd, D. Baran, A. Skiba, A. Zasada, E. Mosiej, J. Krzemiński, A. Peplowski, E. Malinowska, R. Ziółkowski, Practical Aspects of SAM-Based Electrochemical DNA Biosensors on Miniaturized Planar Gold Transducers: A Case Study with SARS-CoV-2. (2025), *Measurement*, 250, 117212, DOI: 10.1016/j.measurement.2025.117212. (IF: 5,2, pkt. MEiN: 200, liczba cytowań niezależnych*: 0)
3. A. Szymczyk, M. Popiołek, J. Krzemiński, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Identification of medium- and mechanism-related pitfalls towards improved performance and applicability of electrochemical mercury(II) aptasensors. (2024) *Microchimica Acta* 191(4), 189, DOI:10.1007/s00604-024-06272-w. (IF: 5,3, pkt. MEiN: 140, liczba cytowań niezależnych*: 0)
4. A. Szymczyk, M. Popiołek, D. Baran, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Aptamer and Electrochemical Aptasensor towards Selenate Ions (SeO_4^{2-}). (2024) *International Journal of Molecular Sciences*, 25(12), 6660, DOI: 10.3390/ijms25126660. (IF: 4,9, pkt MEiN: 140, liczba cytowań niezależnych*: 1)
5. A. Szymczyk, M. Drozd, A. Kamińska, M. Matczuk, M. Trzaskowski, M. Mazurkiewicz-Pawlicka, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Comparative evaluation of different surface coatings of Fe_3O_4 based magnetic nano sorbent for applications in the nucleic acids extraction. (2022) *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 8860, DOI: 10.3390/ijms23168860. (IF: 5,6 pkt. MEiN: 140, liczba cytowań niezależnych*: 18)
6. A. Szymczyk, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Modern Electrochemical Biosensing Based on Nucleic Acids and Carbon Nanomaterials. (2023) *Sensors*, 23(6), 3230, DOI: 10.3390/s23063230. (IF: 3,4, pkt. MEiN: 100, liczba cytowań niezależnych*: 5)

7. M. Jarczewska, A. Szymczyk, J. Zajda, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Recent Achievements in Electrochemical and Optical Nucleic Acids Based Detection of Metal Ions (2022) *Molecules*, 27(21), 7481, DOI: 10.3390/molecules2721748, (IF: 4.6, pkt. MEiN: 140, liczba cytowań niezależnych*: 2)

Sumaryczna wartość IF (zgodnie z rokiem opublikowania): 38.2

Sumaryczna liczba punktów MNiSW: 1000

*stan na 05.05.2025 r.

Publikacje w materiałach recenzowanych

1. A. Szymczyk, R. Ziółkowski, M. Drozd, E. Malinowska, Investigations on magnetic nanoparticles surface modifications suitable for nucleic acids extraction. (2021) EYEC monograph: 9th European Young Engineers Conference, Seventh Volume, ISBN 978-83-936575-9-9, 82- 88 (20 pkt. MEiN).
2. A. Szymczyk, R. Ziółkowski, M. Drozd, E. Malinowska, The influence of monovalent and divalent cations on the adsorption of DNA on modified magnetic nanoparticles. (2021) *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce, Technika i inżynieria: materiały, polimery i kompozyty*, ISBN 978-83-66743-20-5, 65-72.
3. A. Szymczyk, R. Ziółkowski, M. Drozd, E. Malinowska, Application of modified magnetic nanoparticles in modern medical diagnostics. (2021) *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce, Technika i inżynieria: materiały, polimery i kompozyty*, ISBN 978- 83-66743-20-5, 58-64.

Udzielone patenty

1. Numer zgłoszenia: P. 448520 - "Sekwencja aptamerowa DNA, sposób wytwarzania elektrochemicznego czujnika aptamerowego ją zawierającego, sposób pomiaru stężenia jonów metali i elektrochemiczny czujnik aptamerowy".

Udział w projektach badawczych

1. SARS-CoV-2 diagnostics based on electrochemical genosensors, IDUB Against COVID, „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” (IDUB), 2020/2022, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska – wykonawca.

2. Materiały biopolimerowe o programowanej chemicznie i genetycznie selektywności do metali ciężkich dla ultraczułych biosensorów nowej generacji, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR) w ramach strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych Nowoczesne technologie materiałowe - TECHMATSTRATEG III/0042/2019-00, 2021/2024, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska – wykonawca/ chemik.
3. Elektrochemiczne biosensory DNA wykorzystujące multifunkcjonalne nanocząstki magnetyczno-katalityczne w detekcji biomarkerów genetycznych chorób zakaźnych i zagrożeń środowiskowych, Young PW, „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” (IDUB), 2023/2025, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska – wnioskodawca i główny wykonawca.
4. European integration of new technologies and social-economic solutions for increasing consumer trust and engagement in seafood products (FishEUTrust), HORIZON-CL6-2021-FARM2FORK-01-10; nr.1060712, 2022/2026, Department of Chemistry, University of Florence – wykonawca.
5. Wielopolowy elektrochemiczny czujnik DNA dedykowany jednoczesnemu wykrywaniu produktów reakcji powielania kwasów nukleinowych w trybie multiplex na przykładzie genów oporności na antybiotyki wielooporowych szczepów bakteryjnych, LIDER POB BIB, 2023/2025, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska – wykonawca/ asystent badawczy.
6. Innowacyjny zintegrowany system diagnostyki polowej i stacjonarnej inwazji pasożytniczych, bakteryjnych i wirusowych na obszarach PKW (DIAGNOTROP), Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR), DOB- BIO-12-04-001-2022, 2023/2027, Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii (CEZAMAT), Politechnika Warszawska – wykonawca.
7. Eliminacja ograniczeń rozpoznawania molekularnego w elektrochemicznych DNA-sensorach o mieszanym mechanizmie homofazowo-heterofazowym do detekcji zagrożeń biologicznych żywności, Preludium 23, Narodowe Centrum Nauki (NCN), 2024/53/N/ST4/03840, 2025/2028, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska – kierownik.

Udział w konferencjach krajowych i zagranicznych

1. A. Szymczyk*, R. Ziółkowski, M. Drozd, E. Malinowska, Modifications of magnetic nanoparticles suitable for nucleic acids extraction, *National Scientific Conference „Knowledge – Key to Success” – 5th edition*, online, 23/01/2021- prezentacja ustna.
2. A. Szymczyk*, R. Ziółkowski, M. Drozd, E. Malinowska, Application of modified magnetic nanoparticles in modern molecular medical diagnostics, *XIII Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa- Młodzi Naukowcy w Polsce- Badania i Rozwój*, online, 22/03/2021 - prezentacja ustna.
3. A. Szymczyk*, R. Ziółkowski, M. Drozd, E. Malinowska, Investigations on nucleic acids extraction from biological samples with modified magnetic nanoparticles, *9th European Young Engineers Conference*, on-line, 19/04/2021 - 21/04/2021- prezentacja ustna.
4. A. Szymczyk*, R. Ziółkowski, M. Drozd, E. Malinowska, Modified magnetic nanoparticles in nucleic acids extraction, *28th International Biodetection Technologies Conference*, online, 17/06/2021 - 18/06/2021 - prezentacja posteru.
5. A. Szymczyk*, K. Soliwodzka, M. Moskal, K. Różanowski, R. Ziółkowski, Influence of electrode blocking agents on the stem-loop based electrochemical DNA sensor parameters, *ChemSession '21- XVII Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików*, online, 24/09/2021 - prezentacja posteru.
6. A. Szymczyk*, K. Soliwodzka, M. Moskal, K. Różanowski, R. Ziółkowski, In-depth insight into the possible influence of electrode blocking agents on the stem-loop based electrochemical DNA sensor parameters, *7th International Conference on Bio Sensing Technology*, Sitges, Hiszpania, 22/05/2022 - 25/05/2022 - prezentacja posteru.
7. A. Szymczyk*, R. Ziółkowski, A. Joniak, A. Kramarska, J. Kawalec, E. Malinowska, Electrochemical detection of SARS-CoV-2 genetic markers using DNA biosensor based on stem-loop probe, *9th International Symposium on Sensor Science*, Warszawa, Polska, 20/06/2022 - 22/06/2022 - prezentacja posteru.
8. A. Szymczyk*, R. Ziółkowski, A. Joniak, A. Kramarska, J. Kawalec, E. Malinowska, New compositions of electrochemical DNA biosensors receptor layers for fast and sensitive detection of SARS-CoV-2 biomarkers, *3rd MMCS: Shaping Medicinal Chemistry for the New Decade*, Rzym, Włochy, 27/07/2022 - 29/07/2022 - prezentacja posteru.

9. A. Szymczyk*, M. Popiołek, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Practical aspects and challenges in the design of electrochemical, hairpin-based DNA biosensors for rapid detection of mercury ion, *Pittcon 2023*, Filadelfia, Stany Zjednoczone, 18/03/2023 -22/03/2023 - prezentacja posteru.
10. A. Szymczyk*, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Practical and mechanistic aspects of mercury –polythymine aptamer interaction in the design of an electrochemical DNA biosensor, *20th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies*, Saloniki, Grecja, 04/07/2023 - 07/07/2023 - prezentacja ustna.
11. A. Szymczyk*, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Practical and mechanistic aspects of mercury – polythymine aptamer interaction in the design of an electrochemical DNA biosensor, Label-free electrochemical DNA biosensor to mercury ions detection, *20th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies*, Saloniki, Grecja, 04/07/2023 - 07/07/2023 - prezentacja posteru.
12. A. Szymczyk*, M. Drozd, M. Olszewski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, A label-free insight into the molecular aspects of electrochemical DNA sensors for mercury ion detection, *EuroAnalysis 2023*, Genewa, Szwajcaria, 27/08/2023 - 31/08/2023 - prezentacja posteru.
13. A. Szymczyk*, M. Drozd, R. Ziółkowski, E. Malinowska, SPR studies of the impact of mercury(II) on DNA duplex formation - towards novel applications in nanoparticle-based Hg^{2+} biosensing, *The 4th International Electronic Conference on Biosensors (IECB 2024)*, online, 20/05/2024 - 22/05/2024 - prezentacja posteru.
14. A. Szymczyk-Drozd*, M. Drozd, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Novel mechanisms in DNA-based biosensing compatible with magnetic-catalytic nanoparticles for detecting Hg^{2+} and viral genetic biomarkers, *XXIII Conference on Sensors and Microsystems (AISEM 2025)*, Trydent, Włochy, 11/02/2025 - 14/02/2025 - prezentacja posteru.
15. A. Szymczyk-Drozd*, M. Drozd, R. Ziółkowski, E. Malinowska, DNA-decorated magneto-catalytic nanoparticles as bifunctional nanosorbents and nanozyme labels for electrochemical biosensing, *8th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials*, Montpellier, Francja, 03/03/2025 – 06/03/2025 - prezentacja posteru.

Współautorstwo wystąpień na konferencjach krajowych i zagranicznych

1. A. Szymczyk, R. Ziółkowski, M. Jarczewska, M. Olszewski and E. Malinowska*, Nucleic acids based approach in electrochemical detection of metal ions, *AnalytiX-23*, Osaka, Japonia, 17/05/2023 -19/05/2023.
2. M. Jarczewska*, J. Zajda, R. Ziółkowski, A. Szymczyk, M. Sokal, I. Zaráś, O. Kujawa, E. Malinowska, M. Olszewski, Application of aptamer-based biosensors for electrochemical detection of heavy metal (cat)ions, *EuroAnalysis 2023*, Genewa, Szwajcaria, 27/08/2023 – 31/08/2023.
3. R. Ziółkowski*, J. Krzemiński, D. Baran, A. Szymczyk, E. Malinowska, Investigations on receptor layer composition, quality of electrochemical transducers gold surface and preparation procedure of biosensor dedicated to chosen SARS-CoV-2 genetic markers detection, *27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2023)*, Katowice, Polska, 15/10/2023 – 19/10/2023.
4. R. Ziółkowski*, A. Szymczyk, M. Olszewski, E. Malinowska, Investigations on electrochemical, spectroelectrochemical and piezoelectrical analysis on heavy metal ions interactions with receptor layers based on DNA strands, *Single-Molecule Sensors and nanoSystems International Conference (s3ic2023)*, Barcelona, Hiszpania, 22/11/2023 – 24/11/2023.
5. R. Ziółkowski, A. Szymczyk, D. Baran, J. Krzemiński, E. Malinowska*, Investigations on receptor layer composition, quality of electrochemical transducers and preparation procedure of biosensor dedicated to chosen SARS-CoV-2 genetic markers detection, *Pittcon 2024*, San Diego, California, USA, 24/02/2024- 28/02/2024.
6. D. Baran*, A. Szymczyk, R. Ziółkowski, E. Malinowska, Opracowanie wielopolowego elektrochemicznego czujnika DNA dedykowanego wykrywaniu fragmentu genów oporności na antybiotyki powielanych w reakcji multiplex, *Chemsession'24 - XX Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików*, Warszawa, Polska, 28/06/2024.
7. M. Carbone*, A. Szymczyk, G. Selvolini, G. Marrazza, Smart aptasensor for biotoxins detection in mussels, *XXIII Conference on Sensors and Microsystems (AISEM 2025)*, Trydent, Włochy, 11/02/2025- 14/02/2025.

Opieka nad pracami dyplomowymi

1. Praca dyplomowa magisterska, Aleksandra Skiba, *„Badania nad możliwością wykorzystania wielopolowych przetworników elektrochemicznych wytwarzanych w technologii elektroniki drukowanej w konstrukcji czujników DNA”*, 2024, promotor: dr hab. inż. Robert Ziółkowski, prof. PW.
2. Praca dyplomowa magisterska, Martyna Popiołek, *„Wykrywanie bakteryjnej wielolekooporności z wykorzystaniem elektrochemicznych biosensorów DNA w tym z użyciem przetworników wielopolowych wytwarzanych w technologii elektroniki drukowanej”*, 2024, promotor: dr hab. inż. Robert Ziółkowski, prof. PW.

Staże badawcze

Czteromiesięczny staż naukowy w grupie badawczej prof. Giovanni Marrazza, Departament of Chemistry, University of Florence w ramach programu Mobility PW IX zrealizowanego w ramach NAWA SEED oraz Mobility PW XI zrealizowanego w ramach przedsięwzięcia „Inicjatywa doskonałości – uczelnia badawcza”, 04/09/2023 – 05/12/2023 oraz 08/04/2024 – 09/05/2024. Publikacja, podstawą, której są wyniki badań uzyskane podczas pobytu – w przygotowaniu.

Szkolenia

Prince2® Foundation Certificate in Project Management (szkolenie: 20/06/2022-21/06/2022 oraz 12/07/2022), zakończony egzaminem i uzyskaniem certyfikatu o nr: GR656264986AS (12/10/2022).

Wyróżnienia i nagrody

1. II miejsce w konkursie w MedTech-Athon „Inżynierowie dla Medycyny” (wygrana grupowa, zespół w składzie: A. Duszczyk, B. Bałamut, A. Szymczyk, S. Karoń, M. Lelit, P. Rękas), finansowanie w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza”, Warszawa, maj 2022.
2. Nagroda Rektora za wyjątkowe zaangażowanie na rzecz Uczelni w semestrze letnim roku akademickiego 2021/2022.
3. Nagroda Rektora za wyjątkowe zaangażowanie na rzecz Uczelni w semestrze zimowym roku akademickiego 2022/2023.
4. Nagroda Rektora za wyjątkowe zaangażowanie na rzecz Uczelni w semestrze letnim roku akademickiego 2023/2024.
5. Nagroda Rektora za wyjątkowe zaangażowanie na rzecz Uczelni w semestrze zimowym roku akademickiego 2024/2025.

Działalność na rzecz społeczności Doktorantów:

1. Delegat w Radzie Doktorantów PW w latach 2020-2025.
2. Członek Rady Szkoły Doktorskiej PW nr 1 w latach 2020-2021.
3. Członek Rady Szkoły Doktorskiej PW w latach 2021-2025.
4. Członek Komisji Nauki Rady Szkoły Doktorskiej (dawna Komisja ds. Oceny Śródkresowej) w latach 2021-2025.
5. Pomoc przy organizacji oraz prowadzenie sesji planarnych (*chairman*), rejestracja uczestników i rozdanie certyfikatów podczas Szkoły Letniej Doktorskiej realizowanej w ramach projektu „*Smart Education for Engineering Doctors*” NAWA-STER organizowanej przez Politechnikę Warszawską w dniach 12/09/2022-16/09/2022.
6. Członek / Gość Senackiej Komisji ds. Współpracy z Zagranicą w latach 2023-2025.
7. Obserwator - przedstawiciel z ramienia Rady Doktorantów PW podczas posiedzeń Komisji Oceny Śródkresowej SD w latach 2021-2024.
8. Obserwator - przedstawiciel z ramienia Rady Doktorantów PW podczas rozmów kwalifikacyjnych do Szkoły Doktorskiej w latach 2021-2025.
9. Wolontariusz podczas konferencji *EuroAnalysis 2023* organizowanej w Genewie w dniach 27/08/2023- 31/08/2023.