

MARCIN ŁOŚ, GRZEGORZ WĘGRZYN

*Uniwersytet Gdański  
Katedra Biologii Molekularnej  
Kładki 24, 80-822 Gdańsk  
e-mail: wegrzyn@biotech.univ.gda.pl*

## ELEKTRYCZNE BIOCHIPY

### WSTĘP

Współczesna diagnostyka, mająca na celu wykrywanie mikroorganizmów lub substancji biologicznych (białka, kwasy nukleinowe itd.), oparta jest głównie na dobrze sprawdzonych metodach, które można nazwać „tradycyjnymi”. Mają one wiele zalet, lecz zwykle są dość czasochłonne i często ich stosowanie wymaga użycia laboratorium wyposażonego w specjalistyczny i różnorodny sprzęt. W związku z tym, są one stosunkowo mało przydatne do użycia w warunkach, w których wynik pomiaru powinien być znany niemal natychmiast, a próbka powinna zostać zanalizowana najlepiej w miejscu jej pobrania.

Warunki takie muszą, z kolei, być spełnione w coraz większej liczbie procedur. Wiąże się to z wieloma ograniczeniami dotyczącymi zarówno sprzętu, jak i metody detekcji. Do ograniczeń takich należą: łatwość transportu sprzętu służącego do analizy próbek, niska wrażliwość na zakłócenia mechaniczne oraz maksymalna automatyzacja procesu detekcji. W niniejszym opracowaniu chcielibyśmy zapoznać czytelnika z metodami detekcji, które mogą spełnić stawiane wyżej wymagania, a mianowicie z techniką elektrycznych biochipów.

### KONSTRUKCJA ELEKTRYCZNYCH BIOCHIPÓW I SYSTEMY DETEKcji

Elektryczne biochipy charakteryzują się stosunkowo prostym systemem detekcji. Składa się on z kilku elementów, z których część umieszczona jest bezpośrednio na biochipie, a część jest umieszczona w czytniku. Na powierzchni chipu umieszczone są elektrody, które najczęściej wykonane są ze złota, platyny, grafitu lub polipirołu (PIVODORI i współaut. 2000). Czytnik jest w stanie mierzyć zmiany fizycznych parametrów najbliższego otoczenia elektrod, których wynikiem jest zmiana napięcia lub natężenia prądu przepływającego pomiędzy elektrodami, oporu elektrycznego lub pojemności elektrycznej na granicy biochipu i roztworu. Zmiany te mogą wynikać z samego pojawienia się w pobliżu powierzchni cząsteczek, np. DNA lub RNA, lub mogą być one spowodowane obecnością znaczników modyfikujących pa-

rametry w pobliżu powierzchni (PIVODORI i współaut. 2000).

Pojawienie się w pobliżu powierzchni biochipu cząsteczek DNA lub RNA, tworzących dupleks z sondami umieszczonymi na powierzchni elektrod, może zostać wykryte dzięki zmianom pojemności elektrycznej, zmianom przewodności w wyniku formowania dupleksu lub sygnału elektrycznego powstającego przy utlenianiu reszt guaninowych.

Zmiany możliwe do zmierzenia mogą być spowodowane obecnością znacznika, który może być przyłączony zarówno do oligonukleotydów, przeciwciał, jak i innych ligandów, lub spontanicznie łączyć się z kwasami nukleinowymi. Część z nich powoduje bezpośrednią zmianę w przewodności powierzchni chipu. Przykładem takiego znacznika jest fer-

ročen. Inną grupę znaczników stanowią enzymy, których aktywność może spowodować np. wytrącenie się warstwy izolatora na powierzchni biochipu lub przekształcenie substratu biernego elektrycznie w produkt przewodzący prąd. Najczęściej stosowane enzymy to alkaliczna fosfataza i peroksydaza chrzanowa (LUCARELLI i współaut. 2004).

Osobną grupę stanowią biosensory magnetyczne. Ich konstrukcja oparta jest na

materiałach, których przewodnictwo elektryczne zmienia się w polu magnetycznym. W tym przypadku znacznikiem są cząsteczki magnetyczne lub paramagnetyczne, a element używany do wykrycia ich akumulacji na powierzchni sensora swoją budową przypomina głowicę komputerowego twardego dysku (GRAHAM i współaut. 2004, EDELSTEIN i współaut. 2000).

#### DETEKCJA KWASÓW NUKLEINOWYCH PRZY UŻYCIU ELEKTRYCZNYCH BIOCHIPÓW

Aby móc przeprowadzić skuteczną detekcję kwasów nukleinowych przy użyciu elektrycznych biochipów należy najpierw wybrać odpowiednią metodę i miejsce przytwierdzenia sondy. Sonda może być przytwierdzona na biochipie lub poza nim. Umieszczenie sondy poza biochipem stosuje się tylko w przypadku, gdy reakcja detekcji odbywa się poza chipem, a na chipie analizuje się tylko produkt tej reakcji. Przykładem takiego podejścia są prace prowadzone przez GABIG-CIMIŃSKĄ i współaut. (2004a, b, c). W tym przypadku sondy przytwierdzone były do perełek paramagnetycznych. Jednak użycie biochipów wielopozycyjnych wymusza przytwierdzenie odpowiednich sond w obrębie odpowiednich miejsc pomiarowych (ŁOŚ i współaut. 2005).

Metody przytwierdzenia sond oligonukleotydowych do powierzchni biochipu są uzależnione głównie od rodzaju powierzchni. Najprostszą metodą jest adsorbcja DNA na powierzchni biochipu. Adsorbcja na powierzchni jest jednak często nietrwała, a na niektórych powierzchniach przebiega z bardzo niską wydajnością. Można tę wydajność zwiększyć wykorzystując fakt, że cząsteczki DNA migrują w stronę anody. Odpowiednio przykładając napięcie do elektrod biochipu można uzyskać stosunkowo wysokie stężenia cząsteczek sondy w pobliżu anody, co sprzyja ich adsorbcji na powierzchni. Inną metodą jest wysuszenie roztworu sondy na chipie. Możliwe jest ponadto umieszczenie sond na powierzchni biochipu przez ich domieszanie do pasty, z której następnie formuje się elektrody grafitowe. Wtedy sondy, które przed domieszczeniem do materiału, z którego zostaną uformowane elektrody, przyłączane są do perełek zbudowanych z krzemionki i tlenku tytanu (LUCARELLI i współaut. 2004).

Metodą, która zapewnia wydajne przyłączanie sondy do powierzchni biochipu i jednocześnie skutecznie zapobiega ich desorpcji jest przyłączanie kowalencyjne. Ten typ immobilizacji zwykle znacznie zwiększa zdolność sondy do hybrydyzowania z kwasami nukleinowymi z próbki dzięki temu, że sondy mogą zostać przyłączone do powierzchni za pomocą linkera, przez co, z kolei, formowanie dupleksu nie jest ograniczone bliskością powierzchni chipu. W przypadku użycia złotych lub platynowych elektrod, sondy mogą zostać przyłączone przy użyciu grupy siarczkowej lub tiolowej umieszczonej na końcu 5' oligonukleotydu (LUCARELLI i współaut. 2004).

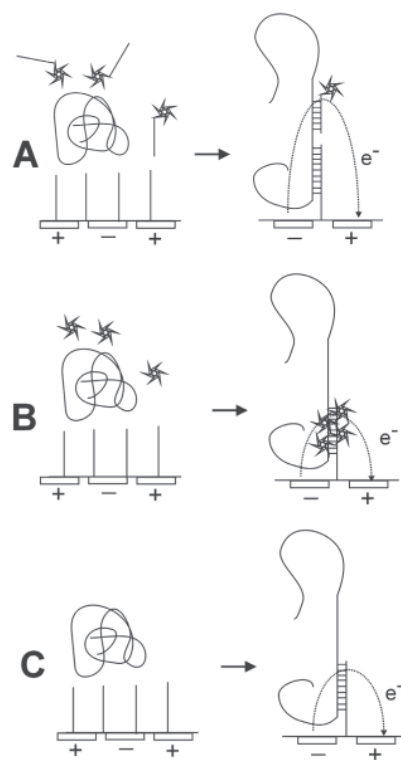
Kolejną metodą używaną do przyłączenia sondy do powierzchni chipu jest użycie streptawidyny lub awidyny i oligonukleotydu z przyłączoną biotyną. Ten system może najlepiej sprawdzać się w przypadku złotych elektrod. Białka, wśród nich awidyna, spontanicznie adsorbują się na powierzchni złota. W przypadku elektrod grafitowych użycie tej metody immobilizacji oligonukleotydów jest znacznie bardziej skomplikowane (PIDIORI i współaut. 2000).

Po zaadsorbowaniu sondy na powierzchni biochipu można przejść do analizy wyizolowanych z badanej próbki materiału kwasów nukleinowych. Kolejne etapy detekcji zależą od tego, czy używa się systemu bezznacznikowego, niespecyficznego interkalatorów czy specyficznych sond drugorzędowych (detekcyjnych).

System bezznacznikowy wydaje się najprostszym w zastosowaniu, jednak nie zawsze charakteryzuje się on wystarczającą czułością lub powtarzalnością (WANG i współaut. 1998, BERGGREN i współaut. 1999, HIANIK i współaut. 2001). Użycie niespecyficznego

interkalatorów, które wpływają na parametry fizyczne powierzchni biochipu, np. zwiększając jej przewodnictwo elektryczne, pozwalają na znacznie czulsze wykrywanie tworzenia dupleksu z sondą (YE i współaut. 2003). Jednak i one nie są pozbawione wad. Interkalatory zwykle wykazują też powinowactwo do jednoniciowego DNA sondy. Z tego powodu tylko niektóre z nich wykazują wystarczającą różnicę w powinowactwie do jedno- i dwuniciowych kwasów nukleinowych.

Użycie specyficznych sond drugorzędowych pozwala na precyzyjne przyłączenie do dupleksu utworzonego przez badane DNA lub RNA cząsteczki pozwalającej na jej wykrycie przez pomiar parametrów elektrycznych. Cząsteczki takie mogą zarówno wpływać na te parametry bezpośrednio, jak i pośrednio. Przykładem cząsteczki, która może zostać przyłączona do sondy drugorzędowej i wpływa bezpośrednio na przewodnictwo elektryczne jest ferrocen (VERNON i współaut. 2003). Cząsteczkami, które pośrednio wpływają na parametry elektryczne powierzchni chipu są enzymy. Dzięki ich aktywności na powierzchni chipu następuje przekształcenie substratu w produkt, np. fosforanu naftylu w  $\alpha$ -naftol (VETCHA i współaut. 2002) lub fosforanu p-aminofenolu w p-aminofenol (GABIG i współaut. 2004a, b; NEBLING i współaut. 2004) w wyniku działania alkalicznej fosfatazy. Z kolei aktywność peroksydazy chrzanowej – drugiego najczęściej wykorzystywanego w detekcji na biochipach enzymu – można wykryć za pomocą amperometrycznego pomiaru stężenia  $H_2O_2$  (DE LUMLEY-



Ryc. 1. Wykrywanie obecności kwasów nukleinowych przy użyciu znakowanej sondy (A), interkalatora (B) i w systemie bezznacznikowym (C).

-WOODYEAR i współaut. 1996) lub za pomocą izolowania elektrod przez nierozpuszczalny produkt reakcji  $H_2O_2$  z 3-chloro-1-naftolem (ALFONTA i współaut. 2001). Przykładowe systemy wykrywania kwasów nukleinowych przy zastosowaniu elektrycznych biochipów przedstawiono schematycznie na Ryc. 1.

#### DETEKCJA ANTYGENÓW POWIERZCHNIOWYCH PRZY UŻYCIU ELEKTRYCZNYCH BIOCHIPÓW

Detekcja antygenów powierzchniowych jest naturalnym wyborem przy wykrywaniu białek, np. toksyn białkowych. Jest ona również przydatna przy wykrywaniu wirusów i bakterii. Dzięki temu podejściu można oszczędzić czas potrzebny na izolację kwasów nukleinowych z próbki. Również ilość potencjalnych celów przemawia za wykorzystaniem tej strategii wykrywania drobnoustrojów. Spowodowane jest to znacznie większą ilością determinant antygenowych niż kompletów materiału genetycznego obecnych w pojedynczym organizmie.

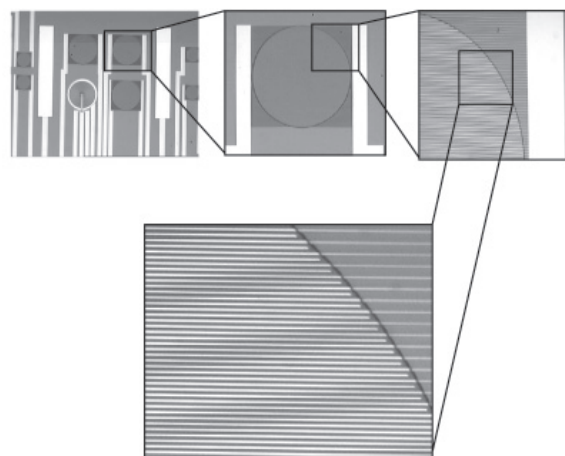
Wykrywanie antygenów powierzchniowych wirusów ma kilka zalet w stosunku do wykrywania DNA lub RNA wirusowego. Jedną z nich jest możliwość natychmiastowej

analizy próbki, dzięki czemu oszczędza się czas niezbędny na izolację DNA lub RNA. Drugą równie istotną zaletą jest duża ilość determinant antygenowych na powierzchni wirionu. W porównaniu z jedną cząsteczką DNA na wirion, ilość potencjalnych celów rozpoznawanych przez przeciwciała na powierzchni faga jest co najmniej  $10^3$ - $10^4$  razy większa, co teoretycznie może skutkować wzrostem czułości metody o taki właśnie współczynnik. W przypadku wykrywania bakterii, ten współczynnik jest znacznie wyższy.

Podejście to ma niestety też swoje wady. Jedną z nich jest stosunkowo długotrwały, w stosunku do syntezy sond oligonukleotydowych, proces produkcji surowicy skierowanej przeciw antygenom powierzchniowym

wirusa lub bakterii. Można ten proces przyspieszyć dzięki wykorzystaniu selekcji przeciwciał fagowych produkowanych w technologii „phage display”. Jednak niedogodności te występują z oczywistych względów tylko na początku opracowywania nowej metody diagnostycznej. W przypadku wykrywania antygenów powierzchniowych przeciwciała pierwszorzędowe muszą zostać przytwierdzone do powierzchni chipu. Biochipy wykorzystujące złote elektrody nie wymagają specjalnych przygotowań do tego kroku. Białka zawarte w nakroplonych roztworach spontanicznie adsorbują do powierzchni złota, co powoduje ich trwałą immobilizację (LIU i współaut. 2001).

Użycie elektrycznych biochipów do wykrywania bakterii i wirusów zostało ostatnio opisane (GABIG-CIMIŃSKA i współaut. 2004c, Łoś i współaut. 2005). Opracowano tę technikę w oparciu o technologię eBiochip, wykorzystującą krzemowe chipy z układem złotych mikroelektrod (Ryc. 2). Za pomocą detekcji ampreometrycznej wykrywano aktywność alkalicznej fosfatazy przekształcającej fosforan p-aminofenolu do p-aminofenolu, a tym samym umożliwiającą przepływ prądu między mikroelektrodami. Czulość detekcji wyniosła  $3 \times 10^7$  wirionów w mililitrze, co



Ryc. 2. Budowa trójpozycyjnego biochipu.

Jedna z trzech pozycji pomiarowych jest powiększona w kolejnych panelach w celu ukazania jej struktury.

oznacza, że bezpośrednio na chipie znalazło się  $2 \times 10^4$  cząstek wirusowych. Czas detekcji wyniósł poniżej 50 minut. Przy użyciu tego samego systemu detekcji udało się wykryć toksyny bakteryjne w stężeniu poniżej  $0,5 \mu\text{g/l}$  (GRUNWALD T., HINTSCHE R., informacja ustna).

#### DETEKCJA HAPTENÓW PRZY UŻYCIU ELEKTRYCZNYCH BIOCHIPÓW

Wykrywanie haptentów, takich jak np. antybiotyki czy środki ochrony roślin, wymaga nieco innego podejścia niż wykrywanie antygenów powierzchniowych. W przypadku haptentów brakuje możliwości użycia dwóch rodzajów przeciwciał – wychytującego i wykrywającego. W związku z tym zwykle w takich przypadkach używa się testów kompetycyjnych. Wymusza to użycie w teście haptentu przytwierdzonego do chipu lub znakowanego za pomocą łatwej do wykrycia cząsteczki (Ryc. 3).

Hapten zostaje przytwierdzony do powierzchni biochipu zwykle przez jego che-

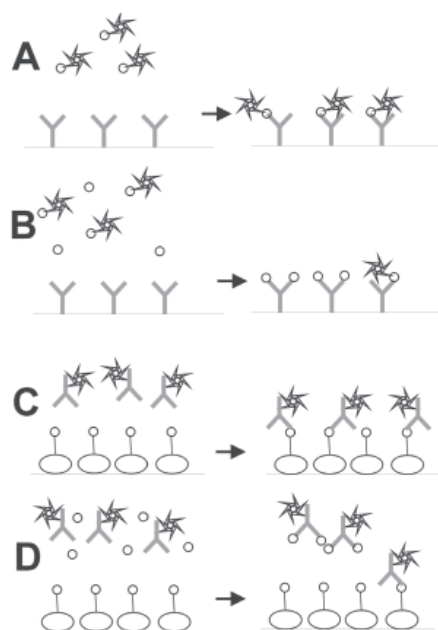
miczne wiązanie do niej lub do cząsteczki pośredniczącej w wiązaniu (np. cząsteczki białka). Następnie do próbki dodaje się niewielką, ściśle odmierzoną ilość przeciwciał lub receptorów wiążących dany substrat i znakowanych, np. za pomocą enzymu. Takie podejście w zależności od metody detekcji pozwala na uzyskanie znacznej czulości w przypadku wykrywania pestycydów wynoszącej  $0,1 \text{ ppb}$  (MARTY i współaut. 1998), a w przypadku penicyliny poniżej  $2 \text{ ng/ml}$  (ŁOŚ M. dane nieopublikowane, HINTSCHE R. i PIECHOTTA G. informacja ustna).

#### ZASTOSOWANIE ELEKTRYCZNYCH BIOCHIPÓW

Elektryczne biochipy są uniwersalną techniką umożliwiającą konstrukcję różnego typu testów służących do wykrywania kwasów nukleinowych, białek, a nawet haptentów. Po-

zwala to na ich zastosowanie w wielu dość odległych od siebie dziedzinach takich jak np.: kontrola bioprocessów przemysłowych, wykrywanie antybiotyków w mleczarstwie,



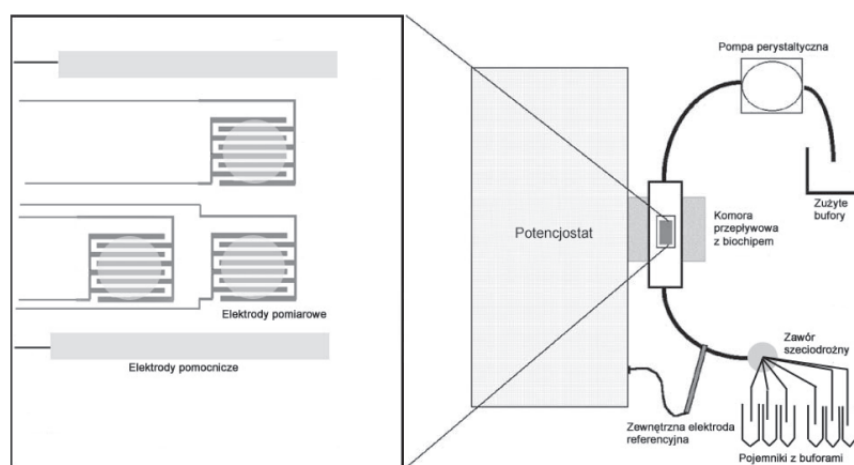


Ryc. 3. Schematy testów kompetycyjnych do wykrywania haptenu.

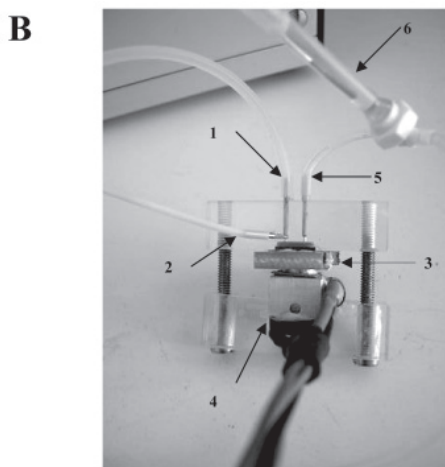
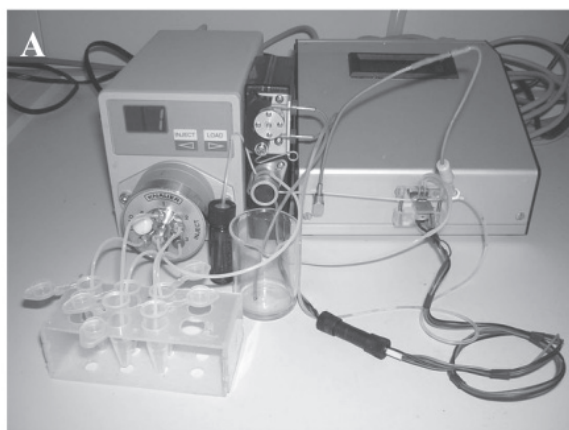
A – znakowany haptenu dodany do próbki, w której nie ma poszukiwanej substancji, przylączając się do przeciwciał na powierzchni chipu generuje silny sygnał. B – poszukiwany haptenu jest obecny w próbce; współzawodniczy on ze znakowanym haptenu o miejsca wiązania powodując obniżenie się sygnału. C – znakowane przeciwciała dodane do próbki, w której nie ma poszukiwanego haptenu przylączają się do haptenu immobilizowanego na powierzchni chipu generując silny sygnał. D – znakowane przeciwciała reaguje z haptenu obecny w próbce, co powoduje obniżenie się sygnału generowanego na chipie.

kontrola skażenia mikrobiologicznego żywności, szybka diagnostyka medyczna oraz diagnostyka pola walki umożliwiająca wykrycie użycia broni biologicznej przez wroga w czasie działań wojennych. Schemat budowy biochipu i systemu detekcji przedstawiony jest na Ryc. 4, natomiast przykładowy zestaw do detekcji materiału biologicznego z wykorzystaniem biochipów przedstawiony jest na Ryc. 5.

Kontrola bioprocessów przemysłowych opartych na bakterii ma duże znaczenie ekonomiczne. Bakterie, które wykorzystywane są do produkcji cennych substancji takich jak rozpuszczalniki organiczne, aminokwasy, witaminy, enzymy i wiele innych, mają swoich naturalnych wrogów. Tymi wrogami są wirusy atakujące bakterie czyli bakteriofagi. W swoim cyklu życiowym bakteriofag zakaża komórkę bakteryjną, która po wyprodukowaniu odpowiedniej ilości potomnych cząstek fagowych najczęściej ginie w procesie lizy. Infekcja bakteriofagami hodowli bakteryjnej w przemysłowym bioreaktorze często jest niemożliwa do wykrycia póki nie pojawią się wyraźne jej oznaki, takie jak spowolnienie lub brak przyrostu masy bakteryjnej, lub nawet liza całej hodowli (JONES i współaut. 2000). Zwykle w tym momencie jest już znacznie trudniej przedsięwziąć skuteczne kroki zapobiegające rozprzestrzenieniu się infekcji niż we wczesnym jej stadium. Dlatego szybka metoda umożliwiająca wykrywanie bakteriofagów w trakcie biofermentacji jest bardzo cennym narzędziem w walce z zakażeniami bakteriofagowymi w procesach przemysłowych.



Ryc. 4. Schemat budowy biochipu (po lewej) i schemat przedstawiający budowę systemu detekcji (po prawej).



Ryc. 5. Zestaw służący do wykrywania bakteriofagów (A) i biochip zamocowany w komorze reakcyjnej (B).

Na panelu A widoczne są od lewej: zawór sześciopiętrowy, pompa perystaltyczna i zawór magnetyczny, oraz jednostka centralna z widocznym chipem umieszczonym w komorze reakcyjnej. Na panelu B widoczne są: 1 – rurka doprowadzająca bufor, 2 – rurka doprowadzająca substrat, 3 – biochip, 4 – termoregulator z elementem przewodzącym ciepło, 5 – rurka odprowadzająca bufor, 6 – elektroda referencyjna.

Stosowanie antybiotyków w mleczarstwie poddawane jest ścisłym rygorom. Niedozwolone jest użycie mleka uzyskanego od zwierząt poddanych antybiotykoterapii ze względu na to, że podawane antybiotyki przenikają do mleka. Jednak przepisy takie nie zawsze są respektowane. Elektryczne biochipy sprawdziły się zarówno jako metoda detekcji

niewielkich ilości antybiotyków w mleku ([www.isit.fhg.de](http://www.isit.fhg.de)), jak i przy wykrywaniu innych niepożądanych substancji drobnocząsteczkowych takich jak np. środki ochrony roślin (MARTY i współaut. 1998).

Obecnie podejmowane są próby przystosowania elektrycznych biochipów do wykrywania w żywności patogenów, które mogą powodować zatrucia pokarmowe (GABIG-CIMINSKA i współaut. 2004c). Dzięki automatyzacji procesu detekcji urządzenia takie mogą stanowić integralny składnik linii produkcyjnych, nie wymagający skomplikowanej obsługi. Wydaje się jednak, że uzyskiwana obecnie czułość detekcji może być niewystarczająca, szczególnie w przypadku wykrywania patogenów wirusowych.

Szybka diagnostyka medyczna wydaje się być kolejnym zastosowaniem, do którego elektryczne biochipy mogą doskonale się nadawać. W przypadkach wymagających natychmiastowej diagnozy stosuje się aktualnie takie techniki, jak np. mikroskopia elektronowa (HAZELTON i GELDERBLOM 2003), które mimo swojej precyzji obarczone są poważnymi wadami, takimi jak stosunkowo niska czułość detekcji i kosztowna aparatura wymagająca bardzo doświadczonej obsługi. W przeciwieństwie do nich, techniki detekcji opierające się na elektrycznych biochipach są łatwe do wykorzystania nawet dla laika, dzięki wysokiej automatyzacji procesu detekcji i możliwości zinterpretowania wyniku nawet przez nieskomplikowany program komputerowy.

Diagnostyka pola walki przy zastosowaniu elektrycznych biochipów potencjalnie umożliwia szybkie wykrycie użycia broni biologicznej w postaci bakterii, wirusów lub toksyn. Aktualnie takimi systemami detekcji zainteresowane są nie tylko siły zbrojne. Groźba ataku bioterrorystycznego powoduje, że nie tylko w rejonach konfliktów zbrojnych użycie takiej broni musi być brane pod uwagę. Możliwość szybkiego wykrycia jej użycia pozwala na minimalizację skutków dzięki niemal natychmiastowej identyfikacji czynnika chorobotwórczego i możliwości podjęcia działań, które przy braku systemu detekcji mogłyby zostać zainicjowane od kilku godzin (w przypadku toksyn) do kilku dni (w przypadku bakterii i wirusów) później.

#### PODSUMOWANIE

Elektryczne biochipy są bardzo obiecującą techniką, która w przyszłości może znaleźć

zastosowanie w wielu rutynowych testach diagnostycznych. Na jej korzyść przemawiają

takie cechy jak: wysoka czułość, łatwość obsługi aparatury, szybkość detekcji, stosunkowo niski koszt zarówno pojedynczego testu, jak i sprzętu niezbędnego do jego przeprowadzenia. Obniżenie cen sprzętu jest głównie zasługą zastosowania systemu detekcji nie wymagającego kosztownych elementów optycznych. Jednak, jak wszystkie techniki i ta ma swoje wady. W niektórych przypadkach możliwości miniaturyzacji wydają się być ograniczone. Nie jest to spowodowane ograniczeniami technicznymi w produkcji chipów, lecz metodą detekcji, opartej w wielu przypadkach na aktywności enzymatycznej prowadzącej do powstania cząsteczek przewodzących prąd. Umieszczenie elektrod pomiarowych bardzo blisko siebie spowoduje

może pojawienie się pomiarów fałszywie dodatnich w wyniku dyfuzji produktu reakcji enzymatycznej do sąsiednich pozycji pomiarowych. W takim przypadku pomiary dokonane na pozycjach pomiarowych otaczających pozycję, na której zarejestrowano silny sygnał, byłyby obciążone dużym błędem. Można oczywiście minimalizować niepożądane skutki przez znaczne skrócenie czasu pomiaru aktywności enzymatycznej, jednak nawet w ten sposób nie da się uniknąć zakłóceń, jeśli elektrody są za blisko do siebie zbliżone. Mimo tych ograniczeń wydaje się prawdopodobne, że technika elektrycznych biochipów może już niedługo być powszechnie stosowana w biotechnologii i diagnostyce medycznej.

## ELECTRICAL BIOCHIPS

### Summary

Rapid detection and quantification of microorganisms, particularly their nucleic acids and proteins, appears to be crucial in clinical practice, veterinary medicine, agriculture, basic research as well as in biotechnological factories. Although various techniques were described and are currently used, development of more rapid, more sensitive and quan-

titative methods seems to be still important. Here we describe a method for rapid detection of nucleic acids, proteins and small molecules, based on electrical biochip technology. This method is quick and sensitive. It can be thus expected that electrical biochips will soon be commonly used in biotechnology and medicine.

## LITERATURA

- ALFONTA L., BARDEA A., KHERSONSKY O., KATZ E., WILLNER I., 2001. *Chronopotentiometry and Faradaic impedance spectroscopy as signal transduction methods for the biocatalytic precipitation of an insoluble product on electrode supports: routes for enzyme sensors, immunosensors and DNA sensors*. Biosens. Bioelectr. 16, 675–687.
- BERGGREN C., STALHANDSKE P., BRUNDELL J., JOHANSSON G., 1999. *A feasibility study of a capacitive biosensor for direct detection of DNA hybridization*. Electroanalysis 11, 156–160.
- DE LUMLEY-WOODYEAR T., CAMPBELL C. N., HELLER A., 1996. *Direct enzyme amplified electrical recognition of a 30-base model oligonucleotide*. J. Am. Chem. Soc. 118, 5504–5505.
- EDELSTEIN R. L., TAMANAHA C. R., SHEEHAN P. E., MILLER M. M., BASELT D. R., WHITMAN L. J., COLTON R. J., 2000. *The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents*. Biosens. Bioelectr. 14, 805–813.
- GABIG-CIMIŃSKA M., HOLMGREN A., ANDRESEN H., BARKEN K. B., WUMPELMANN M., ALBERS J., HINTSCHE R., BREITENSTEIN A., NEUBAUER A., ŁOŚ M., CZYŻ A., WĘGRZYN G., SILFVERSPARRE G., JURGEN B., SCHWEDER T., ENFORS S.-O., 2004a. *Electric chips for rapid detection and quantification of nucleic acids*. Biosens. Bioelectr. 19, 537–546.
- GABIG-CIMIŃSKA M., ŁOŚ M., HOLMGREN A., ALBERS J., CZYŻ A., HINTSCHE R., WĘGRZYN G., ENFORS S.-O., 2004b. *Detection of bacteriophage infection and prophage induction in bacterial cultures by means of electric DNA chips*. Anal. Biochem., 342, 84–91.
- GABIG-CIMIŃSKA M., ANDERSEN H., ALBERS J., HINTSCHE R., ENFORS S.-O., 2004c. *Identification of pathogenic microbial cells and spores by electrochemical detection on a biochip*. Microb. Cell Factor. 3, 2.
- GRAHAM D. L., FERREIRA H. A., FREITAS P. P., 2004. *Magnetoresistive-based biosensors and biochips*. Trends Biotechnol. 22, 455–462.
- HAZELTON P. R., GELDERBLUM H. R., 2003. *Electron microscopy for rapid diagnosis of emerging infectious agents*. Emerging Infect. Dis. 9, 294–303.
- HIANIK T., GAJDOS V., KRIVANEK R., ORETSKAYA T., METELEV V., VOLKOV E., VADGAMA P., 2001. *Amperometric detection of DNA hybridization on a gold surface depends on the orientation of oligonucleotide chains*. Bioelectrochemistry 53, 199–204.
- JONES D. T., SHIRLEY M., WU X., KEIS S., 2000. *Bacteriophage infections in the industrial acetone butanol (AB) fermentation processes*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2, 21–26.
- LIU Y.-C., WANG C.-M., HSIUNG K.-P., 2001. *Comparison of different immobilization methods on quartz crystal microbalance surface in flow injection immunoassay*. Anal. Biochem. 299, 130–135.
- LUCARELLI F., MARRAZZA G., TURNER A. P. F., MASCINI M., 2004. *Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors*. Biosens. Bioelectron. 19, 515–530.

- ŁOŚ M., ŁOŚ J. M., BLOHM L., SPILLNER E., GRUNWALD T., ALBERS J., HINTSCHE R., WĘGRZYN G., 2005. *Rapid detection of viruses using electrical biochips and anti-virion sera*. Lett. Appl. Microbiol. 40, 479-485.
- MARTY J.-L., LECA B., NOUGER T., 1998. *Biosensors for the detection of pesticides*. Analisis Magazine 26, 144-149.
- NEBLING E., GRUNWALD T., ALBERS J., SCHAFER P., HINTSCHE R., 2004. *Electrical detection of viral DNA using ultramicroelectrode arrays*. Anal. Chem. 76, 689-696.
- PIVIDORI M. I., MERKOCI A., ALEGRET S., 2000. *Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods*. Biosens. Bioelectron. 15, 291-303.
- VERNON S. D., FARKAS D. H., UNGER E. R., CHAN V., MILLER D. L., CHEN Y.-P., BLACKBURN G. F., REEVES C. W., 2003. *Bioelectronic DNA detection of human papillomaviruses using eSensor™: a model system for detection of multiple pathogens*. BMC Infect. Dis. 3, 12.
- VETCHA S., WILKINS E., YATES T., 2002. *Detection of hantavirus infection in hemolyzed mouse blood using alkaline phosphatase conjugate*. Biosens. Bioelectron. 17, 901-909.
- WANG J., RIVAS G., FERNANDES J. R., PAZ L. J. L., JIANG M., WAYMIRE R., 1998. *Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor*. Anal. Chim. Acta 375, 197-203.
- YE Y. K., ZHAO J. H., YAN F., ZHU Y. L., JU H. X., 2003. *Electrochemical behavior and detection of hepatitis virus DNA PCR production at gold electrode*. Biosens. Bioelectron., 18, 1501-1508.