مجله علمی پژوهشی «علوم و فناوری‌های پدافند غیرعامل»
سال چهارم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲؛ ص ۲۸۳-۲۷۹

تثبیت و هیبریداسیون DNA/DNA ژن *rfbE* باکتری *Escherichia coli O157:H7* روی سطح الکترود طلا برای تشخیص توالی خاص به‌روش طیف‌بینی امپدانس الکتروشیمیایی

محمد ابراهیم مینایی[۱]، مجتبی سعادتی[۲]، مصطفی نجفی[۳*]، حسین هنری[۳]

۱- دانشجوی دکتری، ۲- استاد و ۳- دانشیار دانشگاه جامع امام حسین (ع)

(دریافت: ۹۲/۰۲/۱۴، پذیرش: ۹۲/۱۰/۰۲)

چکیده

در این تحقیق، تثبیت و هیبریداسیون توالی تک رشته DNA (ssDNA) مربوط به ژن *rfbE* باکتری *Escherichia coli O157:H7* به‌روش طیف‌بینی امپدانس الکتروشیمیایی مورد بررسی قرار گرفته است. این توالی به‌صورت تک‌لایه خودتجمعی، روی سطح الکترود طلا به‌مدت سه ساعت و در دمای محیط (۲۵ °C) تثبیت شد. تک‌لایه مخلوط شامل مرکاپتوهگزانول و مرکاپتوپروپیونیک اسید به عنوان یک طراحی رابط برای توسعه بیوسنسور مورد استفاده قرار گرفت. هیبریداسیون DNA/DNA با غوطه‌ورسازی الکترود طلای اصلاح شده با ssDNA در غلظت ۱ میکرومولار DNA هدف در محلول بافر فسفات (pH برابر ۷/۴) انجام شد. از روش‌های ولتامتری چرخه‌ای و طیف‌بینی امپدانس الکتروشیمیایی برای بررسی تثبیت و هیبریداسیون DNA استفاده شد. نتایج، نشان‌دهنده تثبیت و هیبریداسیون مناسب DNA در سطح الکترود طلا می‌باشد. حسگر طراحی شده از گزینش‌پذیری خوبی برخوردار بود. این تحقیق زمینه‌ساز توسعه آتی نوعی نانوزیست حسگر الکتروشیمیایی به‌منظور آشکارسازی عوامل بیولوژیک می‌باشد.

کلید واژه‌ها: هیبریداسیون DNA/DNA، طیف‌بینی امپدانس الکتروشیمیایی، زیست حسگر.

Immobilization and Hybridization of DNA/DNA of the *rfbE* Gene *Escherichia Coli O157:H7* on Gold Electrode Surface for the Detection of Specific Sequences by Electrochemical Impedance Spectroscopy Method

M. E. Minaei, M. Saadati, M. Najafi*, H. Honari

Imam Hossein University

(Received: 04/05/2013; Accepted: 23/12/2013)

Abstract

In this paper, the immobilization and hybridization of single strand DNA (ssDNA) sequences of rfbE gene Escherichia coli O157:H7 has been studied by electrochemical impedance spectroscopy technique. A self-assembled monolayer of the ssDNA was immobilized on the gold electrode for three hours at ambient temperature (25 ℃). A mixed monolayer comprising both mercaptohexanol (MCH) and mercaptopropionic acid (MPA) were used as an interface design for developing biosensor. The hybridization of DNA/DNA was performed by immersion the modified gold electrode with ssDNA at a concentration of target DNA, 1 μM in the phosphate buffer solution (pH 7.4). Cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy techniques were used for investigation of the DNA immobilization and hybridization. Results showed that immobilization and hybridization of DNA on gold electrode is suitable. This research underlie the future development of nanobiosensor electrochemical for detection of biological agents.

Keywords: Hybridization DNA/DNA, Electrochemical Impedance Spectroscopy, Biosensor.

* Corresponding Author E-Mail: mnajafi@ihu.ac.ir

۱. مقدمه

باکتری اشرشیا کلی سویه *O157* پاتوژن مهم روده انسان است و به‌طور معمول با تظاهرات شدید بالینی، از جمله اسهال خونی، کولیت هموراژیک و سندرم اورمی همولیتیک[1] همراه می‌باشد. ژن *rfbE* به‌دلیل اینکه تمام سویه‌هایی که این آنتی‌ژن را بیان می‌کنند دارای علایم کلینیکی شدید می‌باشند، بیشتر مورد بررسی قرار می‌گیرد [۱]. آشکارسازی عوامل بیولوژیک به‌دلیل پیچیدگی‌های ماکرومولکول‌های حیاتی بسیار دشوار است. روش‌های تشخیص کنونی عوامل بیولوژیک دارای معایب مختلفی هستند و برای تشخیص با اطمینان بالا به بیش از یک روش تشخیصی نیاز می‌باشد. کشورهای مختلف بر روی روش‌های تشخیص ژنومی متمرکز شده‌اند و همچنین به‌دنبال روش‌های تشخیصی جدیدی برای برطرف کردن چالش‌های موجود می‌باشند [۲]. زیست حسگرها به‌عنوان ابزاری برای تشخیص عوامل بیولوژیک در حال توسعه هستند [۳]. به‌طور کلی، حسگرهای زیستی مبتنی بر جفت شدن یک عامل مشخص بیولوژیکی به‌همراه یک مبدل فیزیکی برای تبدیل اطلاعات بیولوژیکی به یک علامت قابل تشخیص، متناسب با غلظت آنالیت می‌باشند. علامت ممکن است به‌علت تغییرات به‌وجود آمده نظیر تغییر در غلظت پروتون، انتشار و یا جذب گازها (به‌عنوان مثال، آمونیاک یا اکسیژن)، جذب یا انعکاس تابش نور، انتشار گرما، تغییرات جرم یا مبادله الکترون و تغییر در جذب سطحی گونه‌ها براساس برهم‌کنش‌های بین آنالیت با ترکیبات بیولوژیکی روی سطح حسگر تولید شود [۴]. زنجیره DNA به‌عنوان یکی از ترکیبات بیولوژیکی مهم، با توجه به پتانسیل فوق‌العاده تشخیص مولکولی آن، برای توسعه زیست حسگرها بسیار مناسب است. زیست حسگرهای مبتنی بر DNA، از اتصال ترجیحی مکمل تک‌رشته توالی اسید نوکلئیک، بهره می‌برند. این سیستم، معمولاً با تثبیت پروب DNA تک‌رشته‌ای (ssDNA) روی یک سطح برای تشخیص توالی هدف DNA مکمل خود از طریق هیبریداسیون عمل می‌کند [۵].

در سال‌های اخیر، مطالعات مربوط به طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی[2] (EIS) در آنالیز زیستی به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است. روش EIS یکی از حساس‌ترین ابزارهای مطالعه پدیده‌های سطحی می‌باشد. علاوه بر این، در مقایسه با روش‌های ولتامتری، به‌ویژه در مورد سطوح اصلاح‌شده با عوامل بیولوژیکی، یک روش غیرتخریبی محسوب شده و به عوامل تثبیت شده در سطح آسیب نمی‌رساند. در این روش از یک پتانسیل DC، مانند پتانسیل مدارباز (OCP)، و یک پتانسیل متناوب (AC) کوچک جهت بررسی پاسخ سیستم استفاده می‌شود. بر این اساس روش EIS با موفقیت برای تشخیص هدایت الکتریکی DNA [۶]، هیبریداسیون DNA [۷ و ۸]، عدم تطابق تک نوکلئوتیدی در دو رشته DNA (dsDNA)، هیبریداسیون در جای طبیعی DNA/PNA، تکثیر DNA و RNA و برهمکنش یون‌های فلزی با DNA به‌کاربرده شده است [۹]. یکی از اصلی‌ترین مراحل در توسعه نانوزیست حسگرها الکتروشیمیایی، تثبیت ترکیب بیولوژیکی بر سطح الکترود کار به‌عنوان حسگر می‌باشد. پارامترهای متعددی بر تثبیت ssDNA[3] (عنصر بیولوژیکی) و به‌نوبه خود بر پاسخ امپدانس الکتروشیمیایی مؤثر هستند. مهم‌ترین پارامترها شامل موارد زیر است: الف) خواص فیزیکی شیمیایی مشتقات تیول، ب) طول و نوع بازهای آلی توالی ssDNA، ج) غلظت ترکیبات تثبیت‌شونده در سطح الکترود، د) زمان تثبیت ترکیبات در سطح الکترود، هـ) دمای تثبیت و هیبریداسیون زنجیره‌های DNA [۱۰].

در این تحقیق، سطح الکترود طلا با تثبیت اولیگونوکلئوتید ssDNA مربوط به ژن *rfbE* باکتری *Escherichia coli O157:H7* و تشکیل تک‌لایه‌های تیول مخلوط، شامل مرکاپتوهگزانول و مرکاپتوپروپیونیک اسید اصلاح شد. با استفاده از این الکترود اصلاح‌شده و روش طیف‌بینی امپدانس الکتروشیمیایی، هیبریداسیون DNA/DNA بین اولیگونوکلئوتید تثبیت‌شده و اولیگونوکئوتید مکمل، دارای ناجوری و غیرمکمل تشخیص داده شد. نتایج این تحقیق می‌تواند زمینه‌ساز طراحی نانوحسگرهای زیستی برای مقاصد تشخیصی عوامل بیولوژیک باشد.

۲. مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، اولیگونوکلئوتیدها توسط نرم‌افزار Oligo Primer 3 طراحی (جدول ۱) و پس از سفارش ساخت، از شرکت Bioneer Corporation کشور کره شمالی خریداری شد. توالی انتخاب شده مربوط به ژن *rfbE* باکتری *Escherichia coli O157:H7* می‌باشد. این اولیگونوکلئوتیدها شامل توالی ۲۳ مری تیوله شده در انتهای ′۵ به همراه فضاساز C_6، توالی ۲۳ مری کاملاً مکمل، توالی ۲۳ مری دارای ۲ باز ناجور[4] و توالی ۲۳ مری غیرمکمل می‌باشند. سایر مواد نظیر مرکاپتوهگزانول[5]، مرکاپتوپروپیونیک اسید[6]، $K_3[Fe(CN)_6]/K4[Fe(CN)_6]$ و مانند آن از شرکت سیگما خریداری شد.

جدول ۱. اولیگونوکلئوتیدهای طراحی شده شامل توالی پروب تیوله شده، توالی کاملاً مکمل، توالی دارای ۲ باز ناجور و توالی غیرمکمل.

نوع الیگونوکلئوتید	توالی
Prob1	5′-SH-$(CH_2)_6$- CGGTTGCTCTTCATTTAGCTTTG-3′
complementary	GCCAACGAGAAGTAAATCGAAAC
Mismaiched	GCTAACGAGAAGTACATCGAAAC
Non complementary	ATGCAGTCTCCTACGCGATCGCA

[1] Hemolytic Uremic Syndrome (Hus)
[2] Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS)
[3] Single Strand DNA
[4] Mismaich
[5] Mercapto-1-Hexanol (Mch)
[6] Mercaptopropionic Acid (Mpa)

۲-۱. تیمار اولیه الکترود طلا

الکترود طلا با قطر ۲ میلی‌متر مطابق روش گزارش شده توسط گبالا و شاهمن جلا داده شد [۱۰]. الکترود با دوغاب آلومینا (۰/۳ و ۰/۰۵ میکرومتر α -Al_2O_3) روی یک پد به‌مدت ۱۰ دقیقه جلا داده شد و سپس با حمام اولتراسونیک در آب خالص تمیز گردید. پس از آن الکترود در ۰/۱ مولار H_2SO_4 تا دست‌یابی به ولتاموگرام ثابت تحت پتانسیل چرخه‌ای بین ۰ و ۱/۵ ولت قرار گرفت. در ادامه الکترود با مقدار فراوان آب شستشو داده شد و سطح الکترود با گاز نیتروژن خشک گردید. از این الکترود برای تثبیت عنصر بیولوژیکی استفاده شد [۱۱ و ۱۲].

۲-۲. تثبیت ssDNA روی سطح الکترود طلا

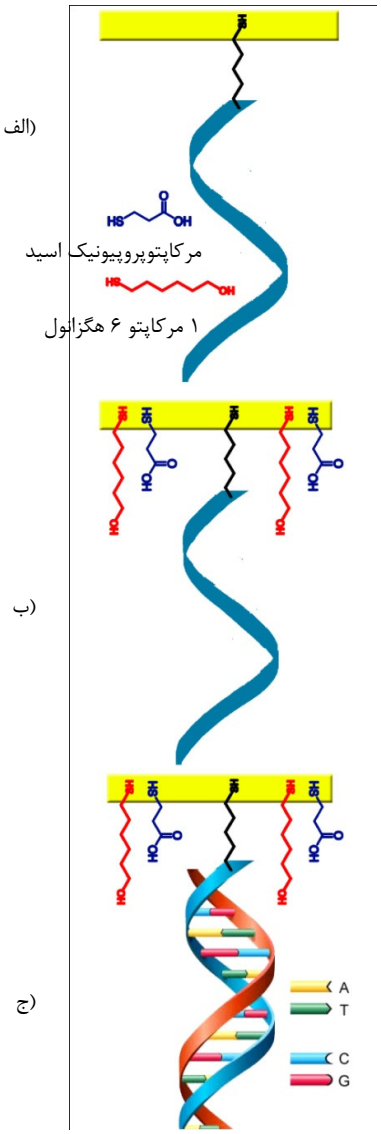
توالی ssDNA تیوله یک تک‌لایه خودتجمعی[1] را به‌دلیل تمایل بالای گروه تیول نسبت به طلا، روی سطح الکترود تشکیل می‌دهد. برای تثبیت توالی DNA روی الکترود طلای تمیز شده، اولیگومر ssDNA تیوله در موقعیت ۵′ (۱ میکرومولار) درون بافر تثبیت (Tris–HCl ۱۰ میلی‌مولار، EDTA ۱/۰ میلی‌مولار و KH_2PO_4 ۱ مولار، pH برابر ۷) به‌مدت یک ساعت غوطه‌ور شد [۱۳]. پس از فرایند جذب شیمیایی، الکترود با آب دوبار تقطیر شستشو داده تا رشته‌هایی که به‌صورت ضعیف متصل شده‌اند حذف شوند. پس از آن، برای تشکیل تک‌لایه‌های تیول مخلوط، الکترود اصلاح‌شده در محلول (۲ میلی‌مولار) مرکاپتوهگزانول و مرکاپتوپروپیونیک اسید در بافر سیترات (۱۰۰ میلی‌مولار، pH برابر ۲/۴) به‌مدت ۱ ساعت غوطه‌ور شد [۱۴ و ۱۵].

۲-۳. هیبریداسیون DNA روی الکترود اصلاح‌شده

برای هیبریداسیون با DNA مکمل، الکترود طلای اصلاح شده مرحله قبل در بافر هیبریداسیون (Tris–HCl ۱۰ میلی‌مولار، EDTA ۱ میلی‌مولار و NaCl ۱ مولار، pH برابر ۷ شامل ۱ میکرومولار DNA مکمل) به‌مدت ۱ ساعت غوطه‌ور شد. پس از آن، الکترود با بافر فسفات شستشو داده شد. شمایی از مراحل تثبیت در شکل (۱) نشان داده شده است. همین روش برای هیبریداسیون با توالی دارای باز ناجور و توالی غیر مکمل انجام شد [۱۶و ۱۷].

۲-۴. اندازه‌گیری الکتروشیمیایی

طیف امپدانس الکتروشیمیایی در حضور زوج ردوکس $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ در غلظت‌های ۲ میلی‌مولار و با استفاده از سه الکترود متشکل از یک الکترود مرجع AgCl/Ag (در KCl ۳ مولار)، یک الکترود کمکی سیم پلاتین و الکترود اصلاح‌شده طلا به‌عنوان الکترود کار، ثبت شد. پتانسیل DC ثابت (۲۲۰ میلی‌ولت در مقابل AgCl/Ag) استفاده شده است و توسط آشفتگی AC با دامنه حدود ۵ میلی‌ولت پوشش داده شد. فرکانس مدولاسیون (تعدیل) AC از ۱ کیلوهرتز تا ۱۰ مگا هرتز با ۶۰ نقطه اندازه‌گیری شده انتخاب شد [۱۸ و ۱۹]. بررسی‌های الکتروشیمیایی با استفاده از دستگاه پتانسیواستا/گالوانواستا µAutolab FAR 2 III دارای آنالیزکننده پاسخ فرکانسی ساخت شرکت Eco Chemie هلند انجام گرفت.



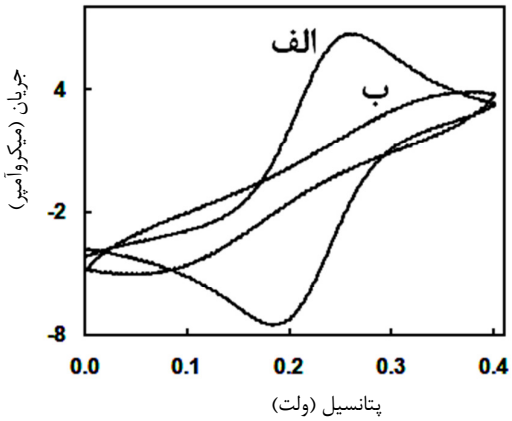
شکل ۱. تثبیت و هیبریداسیون روی سطح الکترود طلا. الف) تثبیت ssDNA روی سطح الکترود طلا، ب) تثبیت ssDNA به همراه بلوکه‌کننده مرکاپتوهگزانول و مرکاپتوپروپیونیک اسید، ج) هیبریداسیون DNA/DNA با رشته مکمل روی سطح الکترود طلای اصلاح‌شده. با هیبریداسیون رشته‌های DNA بین نوکلئوتیدهای آدنین (A) و تیمین (T)، سیتوزین (C) و گوانین (G) پیوند هیدروژنی ایجاد می‌شود.

[1] Self-Assembled Monolayer (SAM)

۳. نتایج و بحث

۳-۱. بررسی تثبیت ssDNA روی سطح الکترود

تثبیت ssDNA روی سطح الکترود طلا با دو روش ولتامتری چرخه‌ای و طیف‌بینی امپدانس الکتروشیمیایی مطالعه شده است. شکل (۲) ولتاموگرام‌های حاصل از الکترود طلا در حضور زوج رودکس $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ قبل و بعد از تثبیت ssDNA و MCH/MPA را نشان می‌دهد. کاهش جریان‌های کاتدی و آندی در ولتاموگرام (ب) نسبت به ولتاموگرام (الف) بیانگر تثبیت ssDNA و MCH/MPA روی سطح الکترود می‌باشد. طیف‌بینی امپدانس الکتروشیمیایی روشی مناسب برای تثبیت و هیبریداسیون DNA/DNA روی سطح الکترود می‌باشد. طیف امپدانس شامل یک بخش نیم‌دایره در فرکانس‌های بالا (نمودار نایکوئیست) مربوط به فرایند کنترل‌شده با فرآیند انتقال الکترون و یک بخش خطی در فرکانس‌های پایین‌تر مربوط به مرحله کنترل شده با انتشار در فرایند الکتروشیمیایی است. قطر نیم دایره برابر با مقاومت انتقال بار[1] است که رفتار سطح الکترود برای زوج رودکس را نشان می‌دهد و بنابراین می‌تواند به‌عنوان علامتی برای مشخص کردن تغییر در مراحل تثبیت و هیبریداسیون مورد استفاده قرار گیرد.

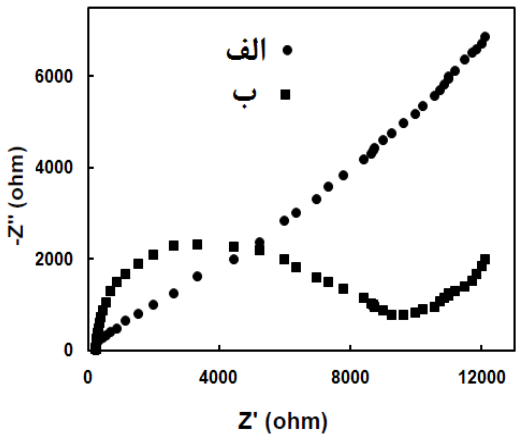


شکل ۲. ولتاگرام‌های چرخه‌ای، الف) الکترود طلای تمیزشده ب) الکترود طلای اصلاح شده با تثبیت ssDNA (۱ میکرومولار) در حضور زوج ردوکس $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ در غلظت‌های ۲ میلی‌مولار در سرعت اسکن پتانسیل $50 mVs^{-1}$

اندازه‌گیری‌های امپدانس الکتروشیمیایی یک الکترود طلای تمیزشده و اصلاح‌شده با ssDNA و MCH/MPA در شکل (۳) نشان داده شده است.

همان‌گونه که در شکل (۳- الف) مشاهده می‌شود، نمودار نایکوئیست الکترود طلای تمیزشده تقریباً به‌صورت یک خط مستقیم است که نشان‌دهنده کنترل فرآیند با انتشار است. لایه خودتجمعی ssDNA و MCH/MPA بر روی الکترود به‌عنوان یک لایه عایق عمل کرده و مانع انتقال الکترون در سطح الکترود می‌شود که نتیجه آن مشاهده یک نیم‌دایره در فرکانس‌های بالاتر می‌باشد (شکل ۳- ب).

نتایج به‌دست آمده از روش ولتامتری چرخه‌ای تطابق مناسبی با نتایج به‌دست آمده از روش طیف‌بینی امپدانس الکتروشیمیایی دارد و تأیید می‌کند که تثبیت ssDNA و MCH/MPA روی سطح الکترود طلا به‌خوبی انجام شده است.



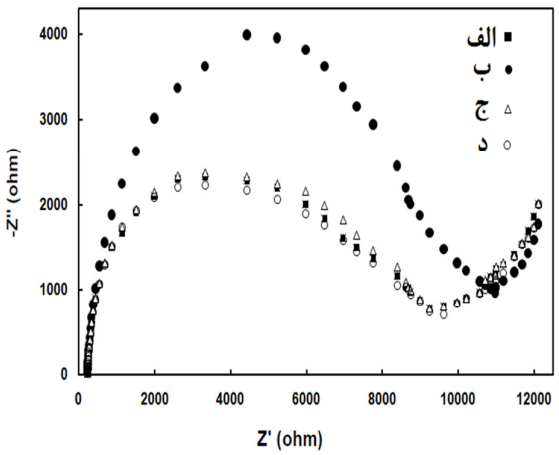
شکل ۳. طیف امپدانس الکتروشیمیایی، الف) الکترود طلای تمیزشده ب) الکترود طلای اصلاح‌شده با تثبیت ssDNA (۱ میکرومولار) در حضور زوج ردوکس $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ در غلظت‌های ۲ میلی مولار

۳-۲. بررسی هیبریداسیون DNA/DNA روی الکترود اصلاح‌شده

طیف امپدانس الکتروشیمیایی یک الکترود اصلاح شده با ssDNA و MCH/MPA و بعد از هیبریداسیون با اولیگونوکلئوتید مکمل، اولیگونوکلئوتید غیرمکمل و اولیگونوکلئوتید دارای ناجوری در شکل (۴) نشان داده شده است. مقاومت انتقال بار ناشی از اکسایش/ احیای ردیاب هگزاسیانوفرات در نمودار نایکوئیست بعد از هیبریداسیون DNA مکمل (شکل ۴- ب)، نسبت به این نمودار در الکترود طلا قبل از هیبریداسیون با DNA مکمل (شکل ۴- الف) افزایش یافته است.

این نتایج بیانگر برهم‌کنش مناسب بین ssDNA تثبیت شده و DNA مکمل بوده و نشان‌دهنده تشخیص موفقیت‌آمیز قطعه‌ای از ژن *rfbE* باکتری *Escherichia coli O157:H7* در محلول آبی می‌باشد. برای بررسی کارایی حسگر زیستی در تمایز بین اولیگونوکلئوتید مورد نظر و اولیگونوکلئوتیدهای مداخله‌کننده احتمالی طیف امپدانس الکتروشیمیایی الکترود اصلاح شده با ssDNA و MCH/MPA با دو نمونه اولیگونوکلئوتید غیرمکمل و اولیگونوکلئوتید دارای ناجوری به ترتیب در شکل (۴ ج و د) نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، برهم‌کنش حسگر با این دو گونه تأثیر محسوسی در پاسخ حسگر نداشته و نشان‌دهنده گزینش‌پذیری بسیار مناسب حسگر تهیه شده می‌باشد.

[1] Charge Transfer Resistance (Rct)



شکل ۴. طیف امپدانس الکتروشیمیایی، الف) الکترود اصلاح‌شده با ssDNA، ب) هیبریداسیون با اولیگونوکلئوتید مکمل، ج) هیبریداسیون با اولیگونوکلئوتید غیرمکمل، د) هیبریداسیون با اولیگونوکلئوتید دارای ناجوری.

در حضور زوج ردوکس $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ در غلظت ۲ میلی‌مولار و توسط آشفتگی AC با دامنه حدود ۵ میلی‌ولت، فرکانس مدولاسیون (تعدیل) AC از ۱ کیلوهرتز تا ۱۰ مگا هرتز با تعداد ۶۰ نقطه اندازه‌گیری، انتخاب شد.

۴. نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که EIS یک فن موفق با حساسیت و کارایی بالا برای مطالعه روند هیبریداسیون DNA/DNA است. حسگرهای DNA بر اساس تشخیص EIS، بدون برچسب (Label-free) هستند و بنابراین، دارای مزایای استفاده از جمله هزینه کم، سادگی، سهولت و کوچک‌سازی می‌باشند. در این مطالعه، توالی تثبیت شده ssDNA روی سطح الکترود، اولیگونوکلئوتید خاصی از باکتری را تشخیص می‌دهد و این موضوع می‌تواند برای توسعه حسگرهای بیولوژیک جهت آشکارسازی عوامل بیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد.

۵. مراجع

[1] Romain, B.; Benoit, R. "Evaluation of Enrichment-Free PCR-Based Detection on the rfbE Gene of Escherichia Coli O157-Application to Municipal Wastewater"; Water Research 2007, 41, 1280-1286.

[2] Sanvicens, N.; Pastells, C.; Pascual, N.; Marco, M. "Nanoparticle-Based Biosensors for Detection of Pathogenic Bacteria"; TrAC Trends in Anal. Chem. 2009, 28, 1243-1252.

[3] Singh, R.; Sumana, G.; Verma, R.; Sood, S.; Pandey M. K.; Gupta, K.; Malhotra, B. D. "DNA Biosensor for Detection of Neisseria Gonorrhoeae Causing Sexually Transmitted Disease"; J. Biotech. 2010, 150, 357-365.

[4] Ezzati Nazhad Dolatabadi, J.; Mashinchian, O.; Ayoubi, B.; Jamali, A.; Mobed, A.; Losic, D.; Omidi, Y.; Guardia, M. "Optical and Electrochemical DNA Nanobiosensors"; Trends in Anal. Chem. 2011, 30, 459-472.

[5] Sassolas, A.; Leca-Bouvier, B. D.; Blum, L. J. "DNA Biosensors and Microarrays"; Chem. Rev. 2008, 108, 109-39.

[6] Wang, L.; Chen, X.; Wang, X.; Han, X.; Liu, S.; Zhao, C. "Electrochemical Synthesis of Gold Nanostructure Modified Electrode and Its Development in Electrochemical DNA Biosensor"; Biosen. Bioelect. 2011, 30, 151-157.

[7] Zhang, K.; Ma, H.; Zhang, L.; Zhang, Y. "Fabrication of a Sensitive Impedance Biosensor of DNA Hybridization Based on Gold Nanoparticles Modified Gold Electrode"; Electroanal. 2008, 20, 2127-2133.

[8] Kafka, J.; Panke, O.; Abendroth, B.; Lisdat, F. "A Label-Free DNA Sensor Based on Impedance Spectroscopy"; Electrochem. Acta 2008, 53, 7467-7474.

[9] Long, Y. T.; Li, C. Z.; Sutherland, T. C.; Kraatz, H. B.; Lee, J. S. "Electrochemical Detection of Single-Nucleotide Mismatches: Application of M-DNA"; Anal. Chem. 2004, 76, 4059-4065.

[10] Gebala, M.; Schuhmann, W. "Controlled Orientation of DNA in a Binary SAM as a Key for the Successful Determination of DNA Hybridization by Means of Electrochemical Impedance Spectroscopy"; Chem. Phys. Chem. 2010, 11, 2887-2895.

[11] Aoki, H.; Tao, H. "Label- and Marker-Free Gene Detection Based on Hybridization-Induced Conformational Flexibility Changes in a Ferrocene–PNA Conjugate Probe"; Analyst 2007, 132, 784-791.

[12] Herne, T. M.; Tarlov, M. J. "Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces"; J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 8916-8920.

[13] Steel, A. B.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J. "Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold"; Anal. Chem. 1998, 70, 4670-4677.

[14] Gebala, M.; Stoica, L.; Neugebauer, S.; Schuhmann, W. "Label-Free Detection of DNA Hybridization in Presence of Intercalators Using Electrochemical Impedance Spectroscopy"; Electroanal. 2009, 21, 325-331.

[15] Liu, J.; Cao, Z.; Lu, Y. "Functional Nucleic Acid Sensors"; Chem. Rev. 2009, 109, 1948-1998.

[16] Park, J. Y.; Park, S. M. "DNA Hybridization Sensors Based on Electrochemical Impedance Spectroscopy as a Detection Tool"; Sensors 2009, 9, 9513-9532.

[17] Chatelain, G.; Chaix, C.; Brisset, H.; Moustrou, C.; Fages, F.; Mandrand, B. "Synthesis of Electrochemical Probes for Nucleic Acid Detection"; Sensors and Actuators B 2008, 132, 439-442.

[18] Pumera, M.; Sanchez, S.; Ichinose, I.; Tang, J. "Electrochemical Nanobiosensors"; Sensors and Actuators B 2007, 123, 1195-1205.

[19] Velusamy, V.; Arshak, K.; Yang, C. F.; Yu, L.; Korostynska, O.; Adley, C. "Comparison Between DNA Immobilization Techniques on a Redox Polymer Matrix"; Am. J. Anal. Chem. 2011, 2, 392-400.