

# Nồng độ probe tối ưu cho việc lai hóa trong cảm biến điện hóa sợi nano vàng

- Cao Hữu Tiến
- Nguyễn Quang Thiện
- Hà Văn Linh
- Lê Văn Hiếu

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

- Lê Văn Mạnh Hùng

Trường Đại học Quốc Tế, ĐHQG-HCM

## TÓM TẮT

*Việc cố định probe DNA lên bề mặt điện cực vàng với nồng độ tối ưu có vai trò then chốt trong hướng phát triển của các cảm biến sinh học DNA. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành khảo sát và tìm ra nồng độ probe gắn trên điện cực để cho hiệu quả lai hóa tối ưu nhất. Chúng tôi đã sử dụng một phương pháp để kiểm soát mật độ bề mặt của probe DNA bằng cách ủ kết hợp probe được biến đổi bởi thiol với*

**Từ khóa:** probe DNA, cảm biến sinh học, điện hóa, nồng độ probe, tối ưu.

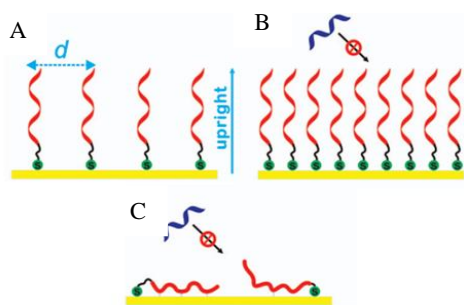
*mercaptohexanol. Giữa tỉ lệ mol và mật độ probe bao phủ mối tương quan tuyến tính, do đó bằng cách áp dụng nồng độ probe khác nhau trong quá trình chế tạo cảm biến, chúng tôi có thể kiểm soát được mật độ phân tử của các probe DNA trên bề mặt điện cực. Kết quả cho thấy với nồng độ probe 500 nM thì cho hiệu quả lai ghép tối đa với DNA mục tiêu*

## MỞ ĐẦU

Việc phát hiện các acid nucleic (DNA, RNA) là một bước không thể thiếu trong các ứng dụng như chẩn đoán lâm sàng, quang trắc môi trường và chống khủng bố sinh học [1]. Đã có nhiều nỗ lực nhằm tăng độ nhạy, tính chọn lọc của cảm biến DNA (hoặc RNA) để có thể đưa vào ứng dụng. Gần đây, các thiết bị dựa trên DNA đã thu hút sự quan tâm đáng kể vì những ứng dụng đầy hứa hẹn của chúng trong lĩnh vực điện tử học nano [2, 3], sinh học phân tử tính toán [4-8], hình ảnh tế bào [9] và nạp thuốc [10-12].

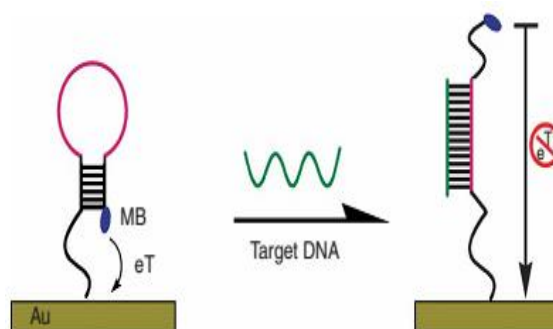
Ngày nay, nhiều nhà nghiên cứu đang khai thác đặc tính của bề mặt vật liệu khi gắn các oligomer DNA nhằm ứng dụng trong công nghệ sinh học, y học và công nghệ nano. Nhiều nghiên

cứu đã được công bố về việc phát hiện sự lai ghép của probe DNA với mục tiêu trong pha dung dịch bằng cách sử dụng các phương pháp kỹ thuật bao gồm quang học, điện hóa học và cơ học [13-17]. Tuy nhiên còn khá ít nỗ lực tập trung vào việc hiểu được cách cố định probe lên bề mặt, đặc biệt là ảnh hưởng của mật độ probe đến động học bắt giữ mục tiêu. Nếu probe quá thưa thớt thì chúng sẽ không được định hướng tốt, và nếu quá dày đặc sẽ làm ảnh hưởng về mặt không gian trong quá trình lai hóa với mục tiêu (Hình 1B và 1C).



**Hình 1.** Ảnh hưởng của mật độ probe đến động học lai hóa với DNA mục tiêu. (A) Khoảng cách lí tưởng giữa các probe liên tiếp nhau. (B) Các probe tập hợp với mật độ cao. (C) Probe có xu hướng nằm ngang trên bề mặt điện cực.

Điện hóa là phương tiện để phát hiện sự lai ghép một cách nhanh và nhạy, mà điều này thì rất cần thiết cho sự phát triển một cảm biến DNA ít tốn kém, đơn giản và gọn nhẹ [18]. Thông thường, một cảm biến điện hóa gồm có một điện cực rắn và các probe được gắn lên bề mặt mà khi lai ghép với các sợi bổ sung với nó (sợi mục tiêu) thì sẽ tạo ra một tín hiệu điện hóa có thể phát hiện được. Thông thường, mỗi sợi probe DNA được sửa đổi ở vị trí 3' hoặc 5' với một phân tử oxi hóa khử (Methylene Blue, MB) mà chính nó là tác nhân trực tiếp cung cấp tín hiệu điện hóa. Tyagi và cộng sự [19] lần đầu tiên đã sử dụng các phân tử beacon trong một dung dịch phân tích để phát hiện sự lai ghép DNA. Kể từ đó phân tử beacon đã được điều chỉnh (chuyển thể) theo những hệ thống phát hiện dựa trên quang học cũng như điện hóa [20, 21]. Các phân tử beacon được gắn trên probe DNA sợi đơn và khi không có sự hiện diện của sợi mục tiêu chúng sẽ hình thành cấu trúc thứ cấp giống như kẹp tóc (hairpin). Trình tự probe thực sự nằm ở phần vòng lặp (loop) và phần gốc (stem) thì được cấu trúc bởi một số cặp base bổ sung cho nhau ở hai đầu của chuỗi vòng lặp. Một phân tử oxi hóa khử được gắn vào một đầu của probe và phân tử này được định vị ngay sát bề mặt của điện cực (Hình 2).



**Hình 2.** Cơ chế chuyển điện tử của probe có cấu trúc stem-loop trước và sau khi lai với mục tiêu

Bề mặt vàng đã được sử dụng như một chất nền cho việc cố định các probe DNA và các phân tử khác neo bám (anchorage) trong một số cách thức phát hiện DNA khác nhau [21, 23-25]. Bề mặt vàng cung cấp thuận lợi cho việc gắn vào bề mặt của nó các phân tử đã được biến đổi bởi thiol [26] và cũng có thể hoạt động như điện cực làm việc trong các phương pháp phát hiện điện hóa. Các alkane-thiol và alcohol-thiol [24, 27, 28] đã được sử dụng để tạo ra một lớp đơn hỗn hợp để kiểm soát mật độ bề mặt của các probe. Đây là một thông số quan trọng trong việc thiết kế nên một cảm biến có độ nhạy và có tính chọn lọc cao [20, 21, 24, 27].

Trong nghiên cứu này chúng tôi chế tạo cảm biến E-DNA được dựa trên một DNA có cấu trúc stem-loop được gắn phân tử oxi hóa khử mà nó có khả năng tự lắp ráp trên điện cực vàng bằng một liên kết Au-S. Quá trình lai ghép của mục tiêu với khu vực vòng (loop) gây ra sự thay đổi lớn về cấu hình trong bề mặt giới hạn của DNA và do đó làm ảnh hưởng đáng kể đến tốc độ chuyển điện tử giữa các phân tử oxi hóa khử với điện cực. Mối liên quan của sự thay đổi trong dòng oxi hóa khử tạo thành một tín hiệu của mục tiêu mà không cần bổ sung thêm các thuốc thử ngoại sinh [29, 30].

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

DNA oligonucleotide sửa đổi đã được tổng hợp bởi AITbiotech Pte Ltd. (Singapore), và được tinh sạch bằng phương pháp HPLC.

Trình tự của probe: 5'-SH-C6-

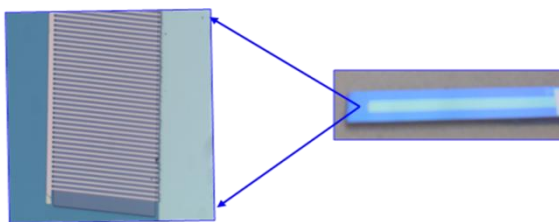
GAGGGTTGTGATGAATTCTCAGCCCTCTT  
CAAAACTTCTCCA CAA CCC TC -MB-3'

Mục tiêu là sản phẩm của phản ứng RT-PCR (với cặp mồi IF: CCAAGGAAAAC TGGGTGCAG, IR: CTTGGATACCA CAGAGAATGAATTTTT) [31] từ mRNA của Interleukin-8 mà không cần trải qua quá trình tinh sạch gì thêm (được cung cấp bởi trung tâm Y sinh học phân tử, Đại học Y Dược TP.HCM).

Trình tự của DNA mục tiêu:

5'...GAGGGTTGTGGAGAAGTTTTGAAGA  
GGGCTGA GAATTCAT...3'

Các dung dịch hóa chất 6-mercapto-1-hexanol (MCH), Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP), potassium ferricyanide ( $K_3Fe(CN)_6$ ), phosphate buffer saline (PBS) (pH 7,4) được cung cấp bởi Sigma-Aldrich (St.Louis, MO). Tất cả các thuốc thử khác thuộc loại dùng trong phân tích và được sử dụng mà không cần tinh sạch gì thêm. Nước khử ion và tiệt trùng (điện trở suất 18 M $\Omega$ .cm) đã được sử dụng trong suốt quá trình thí nghiệm. Cảm biến E-DNA đã được chế tạo bằng cách sử dụng điện cực sợi nano vàng (AuNW) (dài: 1000  $\mu$ m; rộng: 2  $\mu$ m; cao: 60 nm) (Hình 3).



**Hình 3.** Hình ảnh dưới kính hiển vi của array Au nanowire (AuNW)

### Chuẩn bị cảm biến

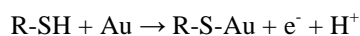
Trước khi tiến hành thí nghiệm hoặc đưa vào sử dụng bất kỳ chip cảm biến nào, cảm biến phải được kiểm tra cẩn thận dưới kính hiển vi, đặc biệt chú ý đến khu vực điện cực để xác định xem có bất kỳ vị trí nào không đồng đều của lớp phủ Au, hạt không rõ, hoặc vết trầy xước. Tuy nhiên, những khiếm khuyết tiềm tàng ở quy mô nanometer chỉ có thể phát hiện bằng phương pháp điện hóa. Các tạp chất hữu cơ trên cảm biến vàng trần (cảm biến ban đầu chưa được gắn probe) sẽ ảnh hưởng đến điện trở kháng của cảm biến trong khi các khiếm khuyết của lớp phủ đơn tự tập hợp (SAM) sẽ làm tăng dòng rò rỉ (the leakage current). Cả hai khiếm khuyết này đều không thể phát hiện bằng quang học, nhưng có thể được phát hiện bằng điện hóa [32].

Các điện cực được chuẩn bị bằng cách ngâm trong ethanol 99,7% khoảng 10 phút, sau đó rửa với nước cất, sau cùng điện cực được xử lý bằng phương pháp điện hóa với thế quét từ 0V đến 1,6V trong dung dịch  $H_2SO_4$  0,005 M đến khi một chu kì điện hóa đặc trưng của một điện cực Au sạch quan sát được [33].

Sau quá trình làm sạch này, điện cực được biến đổi với probe stem-loop như sau: từ dung dịch probe (100  $\mu$ M) đã được khử lần đầu tiên trong TCEP 10 mM; dung dịch này được giữ ở 4  $^{\circ}C$  khoảng 2 giờ để khử các liên kết disulfide giữa các probe DNA (TCEP có khả năng chọn lọc và khử hoàn toàn ngay cả những alkyl disulfide ổn định nhất hòa tan trong nước trên một phạm vi pH rộng). Dung dịch trên được pha loãng với PBS 10 mM (pH 7,4) (PBS được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm trừ khi có ghi chú khác).

Các điện cực sau khi làm sạch được ngâm trong dung dịch probe stem-loop đã qua xử lý có nồng độ thích hợp trong 36 giờ. Sau quá trình ủ và hình thành lớp đơn tự lắp ráp (SAM), tiến hành loại bỏ bất kỳ probe DNA nào không được hấp phụ tốt trên bề mặt điện cực bằng cách rửa

với nước cất khử ion trong khoảng 30 s ở nhiệt độ phòng. Tại thời điểm này, probe DNA sẽ gắn với bề mặt điện cực thông qua sự hình thành SAM bởi liên kết giữa thiol với vàng.



Nồng độ probe được sử dụng trong bước này là trong khoảng từ 400 nM đến 900 nM. Điện cực sau khi biến đổi được làm khô bằng khí nitrogen và ngay lập tức chuyển vào dung dịch MCH 2 mM ở khoảng 3-5 giờ tại nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng [34]. Rửa sạch MCH hấp phụ vật lý trên bề mặt điện cực bằng nước khử ion trong 1 phút ở nhiệt độ phòng. Nhẹ nhàng lau khô các vết nước quanh điện cực (không sử dụng nitrogen). Chuyển điện cực trực tiếp vào PBS để bảo quản.

#### Chuẩn bị mục tiêu và lai ghép

Dung dịch DNA mục tiêu được pha loãng với nồng độ 1 nM trong 10 mM PBS pH 7.4. DNA mục tiêu được tổng hợp dưới dạng sợi đôi, vì vậy chúng tôi tiến hành làm biến tính DNA thành dạng đơn bằng cách nâng nhiệt độ lên 95 °C trong 5 phút sau đó hạ nhiệt độ ngay lập tức xuống 0 °C. Sau cùng điện cực được ủ khoảng 2 giờ trong 200 µL DNA mục tiêu đã biến tính tại nhiệt độ phòng.

#### Đo điện hóa

Các thí nghiệm điện hóa được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp quét thế xung vuông (SWV) trên thiết bị AUTOLAB PGSTAT12/30/302 (Netherlands), tất cả thí nghiệm được thực hiện với hệ ba điện cực thông thường. Áp dụng phép đo thế xung vuông (SWV) (5-7 phút) trong khoảng -0,5V đến 0,4V, bước thế 1mV, biên độ 25 mV, tần số 25-100Hz. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành với một dây bạch kim làm điện cực đối và một điện cực so sánh Ag/AgCl (bảo hòa với NaCl 3M) trong 10mM PBS, pH 7,4, có chứa 5mM potassium ferricyanide [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] tại nhiệt độ phòng. Tín hiệu thu nhận đã được tính toán dựa vào sự thay đổi một cách tương đối trong cường độ dòng cực

đại với cường độ dòng nền (khi không có sự hiện diện của mục tiêu). Ngoài ra, để đạt được độ ổn định lâu dài, sức chịu đựng của cảm biến đã được đánh giá với nhiều chu kỳ kiểm tra trong dung dịch đệm (không có mục tiêu), kiểm tra trong dung dịch mục tiêu bão hòa [35, 36].

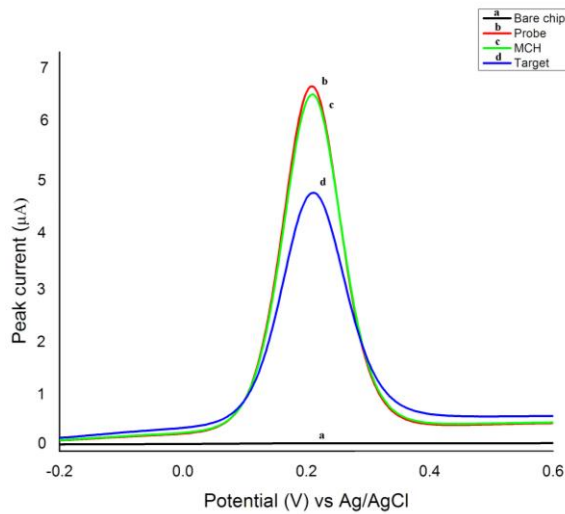
#### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nghiên cứu này là để tối ưu hóa cảm biến điện hóa thông qua việc khảo sát các yếu tố ảnh hưởng hiệu suất lai ghép cũng như các yếu tố ảnh hưởng đến tín hiệu điện hóa thu nhận được. Những ảnh hưởng của mật độ probe lên sự lai ghép probe/ mục tiêu. Như đã dự kiến và đồng thuận với các công bố trước đây [13, 37], mật độ probe ảnh hưởng mạnh đến hiệu quả lai với mục tiêu; có nghĩa là, với những màng (films) có mật độ probe cao thì hiệu quả lai ghép thấp (Hình 1B). Theo dữ liệu, mật độ probe sẽ được kiểm soát bằng cách thay đổi nồng độ probe ban đầu trong quá trình chế tạo lớp màng probe (probe film). Đối với mỗi đường lai ghép đẳng nhiệt được thể hiện trong hình 4, sự lai ghép mục tiêu với probe đã được thực hiện trong cùng điều kiện về lực ion và nồng độ của dung dịch. Hiệu quả lai ghép sau 30 phút thay đổi từ 2 % đến 63 % tùy thuộc vào nồng độ probe, đối với những lớp màng sử dụng nồng độ cao nhất (tức có mật độ cao nhất) thì thể hiện hiệu quả lai ghép thấp nhất (Hình 5).

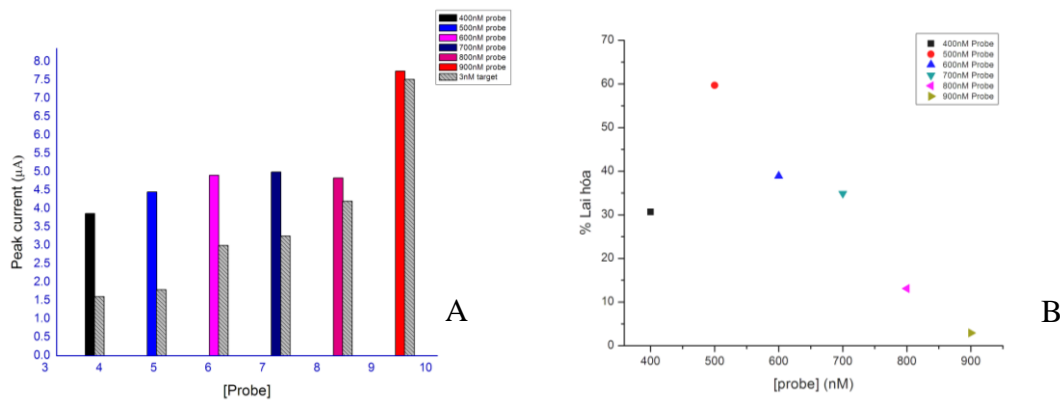
Tín hiệu điện hóa của điện cực sau khi gắn probe tăng lên rõ rệt bởi vì cấu trúc stem-loop giữ cho MB gắn bề mặt điện cực, hỗ trợ cho quá trình chuyển điện tử của MB đến điện cực. Hình 4 cho thấy, giá trị dòng thu được là 6,7 µA khi điện cực được gắn probe (Hình 4B), giá trị dòng này giảm xuống còn 6,58 µA khi điện cực được ủ trong 2 mM MCH (Hình 4C). Bởi vì MCH tạo thành lớp đơn cùng với probe, làm cho probe định hướng vuông góc với điện cực và loại bỏ những probe không được hấp phụ tốt trên điện cực.

Quá trình lai ghép hoàn toàn của probe với mục tiêu làm phá vỡ cấu trúc stem-loop, đồng

thời làm cho MB di chuyển ra xa điện cực do đó MB không thể chuyển điện tử đến điện cực.



**Hình 4.** Kết quả khảo sát tín hiệu điện hóa của từng bước tiến hành bằng phương pháp quét thế xung vuông (SWV) trong 5 mM  $K_3(FeCN)_6$ / PBS. (A) điện cực AuNW trần, (B) điện cực sau khi ủ trong probe, (C) điện cực sau khi gắn và cố định probe bằng MCH, (D) điện cực được lai hóa với DNA mục tiêu.



**Hình 5.** (A) Khảo sát nồng độ probe tối ưu dựa vào cường độ dòng khi lai hóa với 3 nM DNA mục tiêu, (B) Hiệu suất lai hóa ứng với các nồng độ probe sử dụng (400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM, 900 nM).

Như đã phân tích ở phần trước, hiệu suất lai hóa phụ thuộc rất nhiều vào số lượng probe được gắn lên bề mặt điện cực, làm thay đổi khoảng cách giữa các probe và những thông số này được kiểm soát tăng hay giảm là tùy thuộc vào giá trị

nồng độ probe được áp dụng lúc đầu. Trong bài này chúng tôi tiến hành khảo sát hiệu suất lai hóa với 3 nM DNA mục tiêu tương ứng với các giá trị nồng độ probe là 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM và 900 nM. Qua quá trình khảo sát

(Hình 5B) cho thấy cường độ dòng sau khi lai DNA mục tiêu ứng với 500 nM probe giảm khoảng 60 % là giá trị cao nhất trong các thông số khảo sát. Ở giá trị nồng độ probe cao nhất ứng với 900 nM thì giá trị cường độ dòng lai mục tiêu chỉ giảm khoảng 2 %. Điều này khẳng định sự phân bố không gian của probe trên bề mặt điện cực có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình lai hóa với mục tiêu.

#### KẾT LUẬN

Nồng độ probe cho hiệu quả lai ghép tối đa là 500 nM. Với việc tìm ra nồng độ probe tối ưu

nhằm tối ưu hóa khoảng cách giữa các probe với nhau trên bề mặt điện cực vàng, chúng tôi đã cải thiện đáng kể hiệu suất lai hóa với mục tiêu. Qua đó tạo tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm tăng độ nhạy và độ đặc hiệu của cảm biến điện hóa.

*LỜI CẢM ƠN:* Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Phòng thí nghiệm Công nghệ Nano, ĐHQG-HCM, Trung tâm Y sinh học phân tử, ĐHY Dược - HCM đã hỗ trợ cho nghiên cứu này.

## Optimal probe concentration for the hybridization in the based-electrochemical biosensor gold nanowire

- Cao Huu Tien
- Nguyen Quang Thien
- Ha Van Linh
- Le Van Hieu  
University of Science, VNU-HCM
- Le Van Manh Hung  
International University, VNU-HCM

#### ABSTRACT

*The immobilisation of DNA probe on gold electrode surface with the optimal concentration is very important to develop of the DNA biosensors. In this study, we conducted an experiment that determined the optimal concentration of the probe attached the electrodes for the maximum hybridization efficiency. We have used a method that control the surface density of*

*DNA probe by annealing probe modified by thiol and mercaptohexanol. Based on the linear relationship between the mol ratio and density probe, we control probe concentration in the sensor fabricating process as well as the molecular density of DNA probes on the electrode surface. The result of probe concentration 500 nM is optimal for hybridization with DNA target.*

**Key words:** DNA probe, biosensor, electrochemical, probe concentration, optimization.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. M.J. Heller, DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annual review of biomedical engineering*, 4, 1, 129-153 (2002).
- [2]. J.D. Slinker, N.B. Muren, S.E. Renfrew, J.K. Barton, DNA charge transport over 34 nm. *Nature chemistry*, 3, 3, 228-233, (2011).
- [3]. J.C. Genereux, J.K. Barton, Mechanisms for DNA charge transport. *Chemical Reviews*, 110, 3, 1642-1662 (2010).
- [4]. Willner, B. Shlyahovsky, M. Zayats, B. Willner, DNAzymes for sensing, nanobiotechnology and logic gate applications. *Chemical Society Reviews*, 3, 6, 1153-1165 (2008).
- [5]. G. Seelig, D. Soloveichik, D.Y. Zhang, E. Winfree, Enzyme-free nucleic acid logic circuits. *Science*, 314, 5805, 1585-1588 (2006).
- [6]. L. Qian, E. Winfree, Scaling up digital circuit computation with DNA strand displacement cascades. *Science*, 332, 6034, 1196-1201, (2011).
- [7]. L. Qian, E. Winfree, J. Bruck, Neural network computation with DNA strand displacement cascades. *Nature*, 475, 7356, 368-372 (2011).
- [8]. R. Pei., E. Matamoros, M. Liu, D. Stefanovic, Stojanovic M.N., Training a molecular automaton to play a game. *Nature Nanotechnology*, 5, 11, 773-777, (2010).
- [9]. A.S. Walsh, H. Yin, C.M. Erben, M.J. Wood, A.J. Turberfield, DNA cage delivery to mammalian cells. *ACS nano*, 5, 7, 5427-5432, (2011).
- [10]. J. Li, H. Pei, B. Zhu, L. Liang, M. Wei, Y. He, C. Fan, Self-assembled multivalent DNA nanostructures for noninvasive intracellular delivery of immunostimulatory CpG oligonucleotides. *ACS nano*, 5, 11, 8783-8789 (2011).
- [11]. S.M. Douglas, I. Bachelet, G.M. Church, A logic gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science*, 335, 6070, 831-834 (2012).
- [12]. H. Lee, A.K. Lytton-Jean, Y. Chen, K.T. Love, A.I. Park, E.D. Karagiannis, D.G. Anderson, Molecularly self assembled nucleic acid nanoparticles for targeted *in vivo* siRNA delivery. *Nature nanotechnology*, 7, 6, 389-393 (2012).
- [13]. A.B. Steel, T.M. Herne, M.J. Tarlov, Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold. *Analytical Chemistry*, 70, 22, 4670-4677 (1998).
- [14]. R. Levicky, T.M. Hern, M.J. Tarlov, S.K. Satija, Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: a neutron reflectivity study. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 38, 9787-9792 (1998).
- [15]. L.M. Demers, C.A. Mirkin, R.C. Mucic, R.A. Reynolds, R.L. Letsinger, R. Elghanian, G. Viswanadham, A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 72, 22, 5535-5541 (2000).
- [16]. G. Wu, H. Ji, K. Hansen, T. Thundat, R. Datar, R. Cote, A. Majumdar, Origin of nanomechanical cantilever motion generated from biomolecular interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98,4, 1560-1564 (2001).
- [17]. J.K. Mbindyo, B.D. Reiss, B.R. Martin, C.D. Keating, M.J. Natan, T.E. Mallouk, DNA directed assembly of gold nanowires on complementary surfaces. *Advanced Materials*, 13, 4, 249-254 (2001).

- [18]. J. Zhang, S. Song, L. Zhang, L. Wang, H. Wu, D. Pan, C. Fan, Sequence-specific detection of femtomolar DNA via a chronocoulometric DNA sensor (CDS): effects of nanoparticle mediated amplification and nanoscale control of DNA assembly at electrodes. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 26, 8575-858 (2006).
- [19]. S. Tyagi, F.R. Kramer, Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature biotechnology*, 14, 3, 303-308 (1996).
- [20]. H. Du, C.M. Strohahl, J. Camer, B.L. Miller, T.D. Krauss, Sensitivity and specificity of metal surface immobilized "molecular beacon" biosensors. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 21, 7932-7940 (2005).
- [21]. Y. Xu, L. Yang, X. Ye, P. He, Y. Fang, Impedance based DNA biosensor employing molecular beacon DNA as probe and thionine as charge neutralizer. *Electroanalysis*, 18, 9, 873-881 (2006).
- [22]. B. Dubertret, M. Calam, A.J. Libchaber, Single mismatch detection using gold quenched fluorescent oligonucleotides. *Nature biotechnology*, 19, 4, 365-370, (2001).
- [23]. A.B. Steel, T.M. Herne, M.J. Tarlov, Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold. *Analytical Chemistry*, 70, 22, 4670-4677 (1998).
- [24]. S. Pan, L. Rothberg, Chemical control of electrode functionalization for detection of DNA hybridization by electrochemical impedance spectroscopy. *Langmuir*, 21, 3, 1022-1027 (2005).
- [25]. A.A. Lubin, R.Y. Lai, B.R. Baker, A.J. Heeger, K.W. Plaxco, Sequence-specific, electronic detection of oligonucleotides in blood, soil, and foodstuffs with the reagentless, reusable E DNA sensor. *Analytical chemistry*, 78, 16, 5671-5677 (2006).
- [26]. T.M. Herne, M.J. Tarlov, Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 119, 38, 8916-8920 (1997).
- [27]. R. Lao, S. Song, H. Wu, L. Wang., Z. Zhang, L. He, C. Fan, Electrochemical interrogation of DNA monolayers on gold surfaces. *Analytical chemistry*, 77, 19, 6475-6480 (2005).
- [28]. C. Fan, K.W. Plaxco, A.J. Heeger, Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence specific detection of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 16, 9134-9137 (2003).
- [29]. F. Ricci, K.W. Plaxco, E-DNA sensors for convenient, label-free electrochemical detection of hybridization. *Microchimica Acta*, 163, 3, 4, 149-155 (2008).
- [30]. C. Fan, K.W. Plaxco, A.J. Heeger, Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence specific detection of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 16, 9134-9137 (2003).
- [31]. F. Wei, J. Wang, W. Liao, B.G. Zimmermann, D.T. Wong, C.M. Ho, Electrochemical detection of low-copy number salivary RNA based on specific signal amplification with a hairpin probe. *Nucleic acids research*, 36, 11, e65-e65 (2008).



- [32]. V. Gau, S.C. Ma, H. Wang, J. Tsukuda, J. Kibler, D.A. Haake, Electrochemical molecular analysis without nucleic acid amplification. *Methods*, 37, 1, 73-83 (2005).
- [33]. S. Zhang, R. Hu, P. Hu, Z.S. Wu, G.L. Shen, R.Q. Yu, Blank peak current suppressed electrochemical aptameric sensing platform for highly sensitive signal on detection of small molecule. *Nucleic acids research*, 38, 20, e185-e185 (2010).
- [34]. A.A. Rowe, R.J. White, A.J. Bonham, K.W. Plaxco, Fabrication of electrochemical DNA biosensors for the reagentless detection of nucleic acids, proteins and small molecules. *Journal of visualized experiments: Jove*, 52 (2011).
- [35]. V. Gau, S.C. Ma, H. Wang, J. Tsukuda, J. Kibler, D.A. Haake, Electrochemical molecular analysis without nucleic acid amplification. *Methods*, 37, 1, 73-83 (2005).
- [36]. 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. *Analytical chemistry*, 81, 21, 9109-9113 (2009).
- [37]. E. Huang, M. Satjapipat, S. Han, F. Zhou, Surface structure and coverage of an oligonucleotide probe tethered onto a gold substrate and its hybridization efficiency for a polynucleotide target. *Langmuir*, 17, 4, 1215-1224 (2001).