

Tối ưu hóa việc gắn probe DNA bằng liên kết cộng hóa trị trên cảm biến điện hóa sợi nano vàng

- Cao Hữu Tiến
- Hà Vân Linh
- Lê Văn Hiếu

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 10 tháng 12 năm 2014, nhận đăng ngày 23 tháng 09 năm 2015)

TÓM TẮT

Tối ưu hóa việc cố định probe DNA lên bề mặt điện cực vàng có vai trò quan trọng cho sự 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 tối ưu sử dụng để gắn trên điện cực, đồng thời xác định nồng độ tối ưu của tác nhân cố định probe (mercaptohexanol) để cho hiệu quả lai hóa tối ưu nhất. Mật độ bề mặt của probe DNA được kiểm soát bằng cách ủ kết hợp probe đã biến đổi bởi thiol với

mercaptohexanol. Giữa tỉ lệ mol và mật độ probe bao phủ có 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 và 1.5 mM mercaptohexanol thì có tỉ lệ phần trăm thay đổi tối đa trong cường độ dòng khi lai ghép với DNA mục tiêu.

Từ khóa: probe DNA, cảm biến sinh học, điện hóa, cố định probe, tối ưu hóa.

MỞ ĐẦU

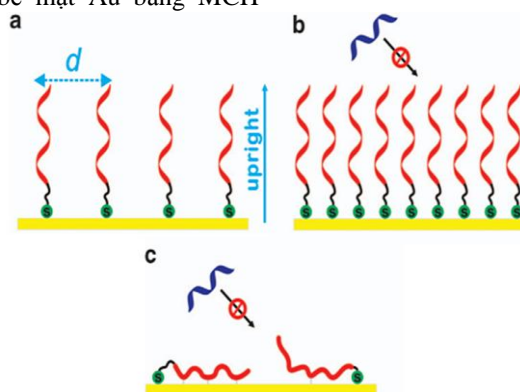
Việc phát hiện các acid nucleic (DNA, RNA) là một bước không thể thiếu trong các ứng dụng như chẩn đoán lâm sàng, quan trắc môi trường và chống khủng bố sinh học [1]. Đã có nhiều nỗ lực nhằm tăng độ nhạy, tính chọn lọc của cảm biến DNA (hoặc RNA) để có thể đưa vào ứng dụng. Gần đây, các thiết bị dựa 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

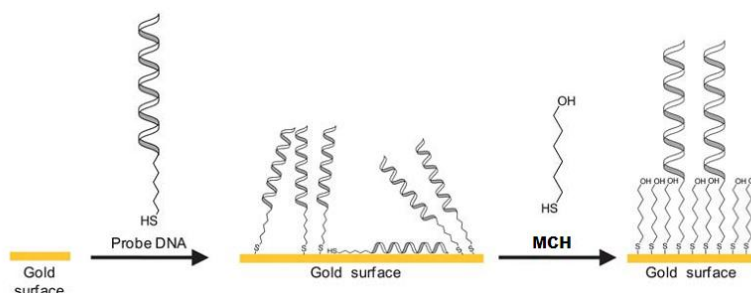
cứu đã được công bố về việc phát hiện sự lai ghép của probe DNA với mục tiêu trong pha dung dịch bằng cách sử dụng các phương pháp kỹ thuật bao gồm quang học, điện hóa học và cơ học [13-17]. Tuy nhiên, cần rất nhiều nỗ lực tập trung vào việc làm thế nào để cố định probe lên bề mặt mà cho hiệu quả lai tốt nhất, đặc biệt là ảnh hưởng của mật độ probe đến động học bắt giữ mục tiêu. Nếu probe quá thưa thớt thì chúng có thể sẽ không được định hướng tốt, và nếu quá dày đặc sẽ gây lực đẩy tĩnh điện hay trở ngại về mặt không gian trong quá trình lai hóa với mục tiêu (Hình 1B và 1C). Trong thực tế, do sự tồn tại của các tương tác giữa base DNA với bề mặt điện cực Au, DNA có thể nằm ngang trên điện cực và hấp phụ với Au thông qua nhiều nguyên tử

nitrogen (Au-N) điều này sẽ làm hạn chế khá nhiều đến khả năng tiếp cận của phân tử DNA mục tiêu (Hình 1C). Bằng cách sử dụng phân tử “trợ giúp” tự tập hợp, mercaptohexanol (MCH), để giải quyết vấn đề này (Hình 2). Việc xử lý DNA sau khi gắn trên bề mặt Au bằng MCH

không chỉ giúp loại bỏ được phần lớn các probe DNA hấp phụ không đặc hiệu mà còn giúp định hướng các đầu dò ra xa hơn do lực đẩy giữa các lưỡng cực âm của đầu alcohol (MCH) và điện tích âm trên DNA.



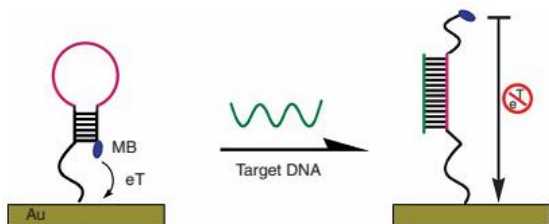
Hình 1. Ảnh hưởng của mật độ probe đến động học lai hóa với DNA mục tiêu. (A) Khoảng cách lý tưởng giữa các probe liên tiếp nhau. (B) Các probe tập hợp với mật độ cao. (C) Probe có xu hướng nằm ngang trên bề mặt điện cực.



Hình 2. Tác dụng của MCH trong việc định hướng probe

Trong các kỹ thuật nhận dạng, điện hóa là phương pháp phổ biến phát hiện sự lai ghép một cách nhanh và nhạy, nhằm phát triển các 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 lần đầu tiên đã sử dụng các phân tử beacon trong một dung dịch

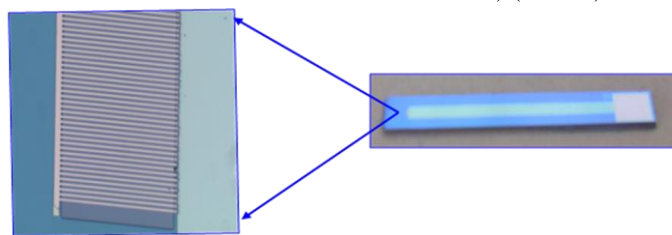
phân tích để phát hiện sự lai ghép DNA [19]. Kể từ đó phân tử beacon đã được điều chỉnh (chuyển thể) theo những hệ thống phát hiện dựa trên quang học cũng như điện hóa [20, 21]. Các phân tử beacon được gắn trên probe DNA sợi đơn và khi không có sự hiện diện của sợi mục tiêu chúng sẽ hình thành cấu trúc 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 3).



Hình 3. 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 ankan-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 cộng hóa trị 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. Mỗi liên quan của sự thay đổi trong dòng oxi hóa khử tạo thành một tín hiệu



Hình 4. Hình ảnh dưới kính hiển vi của array Au nanowire (AuNW)

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-GAGGGT TGTGATGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAA CTT CTCCA CAACCCTC-MB-3'

Mục tiêu là sản phẩm của phản ứng RT-PCR (với cặp môi IF: CCAAGGAAACTGGGTGC AG và IR: CTTGGATACCACAGAGAATGA ATTTT) [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'...GAGG GTTGTGGAGAAGTTTTTGAAGAGGGCTGA GA ATTCAT...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 Ω .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 μ m; rộng: 2 μ m; cao: 60 nm) (Hình 4).

Chuẩn bị cảm biến

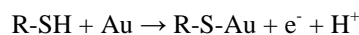
Trước khi tiến hành thí nghiệm hoặc đưa vào sử dụng bất kỳ chip cảm biến nào, cảm biến phải được kiểm tra cẩn thận dưới kính hiển vi, đặc biệt chú ý đến khu vực điện cực để xác định xem có bất kỳ vị trí nào không đồng đều của lớp phủ Au, hạt không rõ, hoặc vết trầy xước. Tuy nhiên, những khiếm khuyết 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 0 V đến 1,6 V trong dung dịch H₂SO₄ 0,005 M đến khi một chu kì điện hóa đặc trưng của một điện cực Au sạch quan sát được [33].

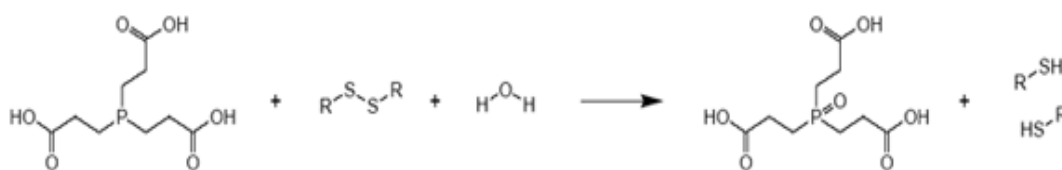
Sau quá trình làm sạch này, điện cực được biến đổi với probe stem-loop như sau: từ dung dịch probe (100 μM) đã được khử lần đầu tiên trong TCEP 10 mM; dung dịch này được giữ ở 4 °C khoảng 2 giờ để khử các liên kết disulfide

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 ủ 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.



Hình 5. Cơ chế khử liên kết disulfide của TCEP

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 μ L DNA mục tiêu đã biến tính tại nhiệt độ phòng.

Đo điện hóa

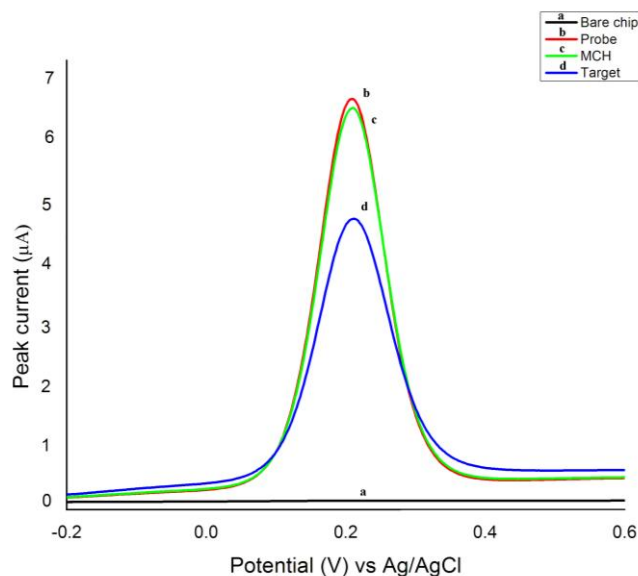
Các thí nghiệm điện hóa được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp quét thế xung vuông (SWV) trên thiết bị AUTOLAB PGSTAT12/30/302 (Netherlands), tất cả thí nghiệm được thực hiện với hệ ba điện cực thông thường. Áp dụng phép đo thế xung vuông (SWV) (5-7 phút) trong khoảng -0,5 V đến 0,4 V, bước thế 1 mV, biên độ 25 mV, tần số 25-100 Hz. 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 (bão hòa với NaCl 3 M) trong 10 mM PBS, pH 7,4, có chứa 5 mM potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$] 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 6, 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 7).

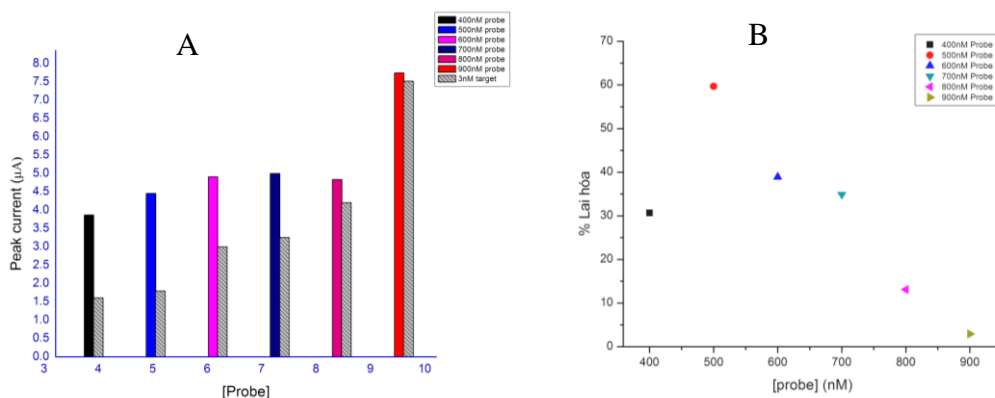
Tín hiệu điện hóa của điện cực sau khi gắn probe tăng lên rõ rệt bởi vì cấu trúc stem-loop giữ cho MB gần bề mặt điện cực, hỗ trợ cho quá trình chuyển điện tử của MB đến điện cực. Hình 6 cho thấy, giá trị dòng thu được là 6,7 μ A khi điện cực được gắn probe (Hình 6b), giá trị dòng này giảm xuống còn 6,58 μ A khi điện cực được ủ trong 2 mM MCH (Hình 6c). 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 6. 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.

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

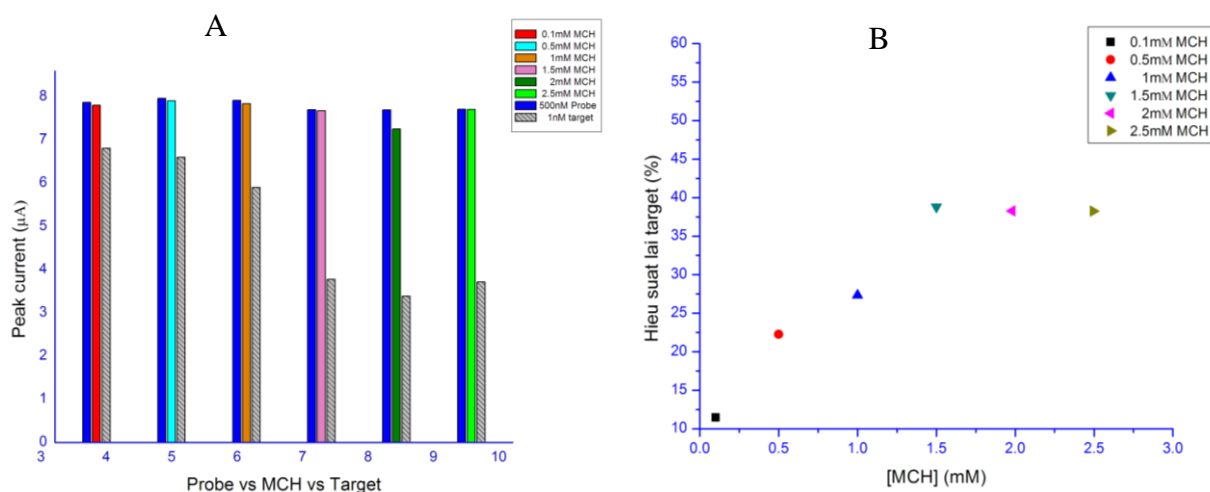
nồng độ probe là 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM và 900 nM. Qua quá trình khảo sát cho thấy cường độ dòng sau khi lai DNA mục tiêu ứng với 500 nM probe giảm khoảng 60 % là giá trị cao nhất trong các thông số khảo sát (Hình 7B). Ở giá trị nồng độ probe cao nhất ứng với 900 nM thì giá trị cường độ dòng lai mục tiêu chỉ giảm khoảng 2 %.



Hình 7. (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).

Tín hiệu của quá trình lai hóa khi sử dụng probe dạng stem-loop cũng có một phần phụ thuộc vào vị trí, cách phân bố không gian của probe trên bề mặt điện cực. Kết quả cho thấy hiệu quả lai hóa với mục tiêu tăng lên rõ rệt sau khi ủ trong dung dịch MCH với nồng độ tối ưu (Hình

8). Điều này được giải thích là do MCH giúp định hướng các probe trên bề mặt điện cực tạo thuận lợi cho việc tiếp cận với mục tiêu của probe. Vì thế có thể 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.



Hình 8. Hiệu suất cố định probe bằng cách sử dụng MCH. (A) Cường độ dòng thu nhận được trong quá trình lai mục tiêu tương ứng với từng giá trị nồng độ MCH; (B) Hiệu suất lai hóa phụ thuộc vào nồng độ MCH.

KẾT LUẬN

Việc xác định được nồng độ probe tối ưu nhằm tối ưu hóa khoảng cách giữa các probe với nhau trên bề mặt điện cực vàng cho thấy hiệu suất lai hóa với mục tiêu đã được cải thiện đáng kể. Bên cạnh đó việc sử dụng MCH làm tác nhân cố định probe cũng cho thấy một cách giải quyết bài toán về hiệu suất lai khi cảm biến được chế

tạo với mật độ probe thấp. 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.

Optimization of probe immobilization by covalent links on gold nanowire based-electrochemical biosensor

- Cao Huu Tien
- Ha Van Linh
- Le Van Hieu

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

The optimization of DNA probe immobilisation on gold electrode surface is very important to develop DNA biosensors. In this study, we conducted an experiment to determine the optimal concentration of probe attached on the electrodes and probe immobilization agent (mercaptohexanol) for maximum hybridization efficacy. We have used a method to control the surface density of DNA probe by annealing probe modified

by thiol and mercaptohexanol. With linear relationship between molar ratio and surface density of probe, by controlling probe concentration in sensor fabricating process, we can determine the molecular density of DNA probes on electrode surface. The results show that probe concentration 500 nM and 1.5 mM mercaptohexanol are optimal for hybridization with DNA target.

Key words: DNA probe, biosensor, electrochemical, probe immobilisation, 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]. I. Willner, B. Shlyahovsky, M. Zayats, B. Willner, DNAzymes for sensing, nanobiotechnology and logic gate applications, *Chemical Society Reviews*, 37, 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, M.N. Stojanovic, 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 multi-valent DNA nanostructures for non-invasive intracellular delivery of immunostimulatory CpG oligo-nucleotides, *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, 8575-8580 (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. Strohsahl, 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).